

**AKCİĞER KANSERİNDE KANNABİNOİDLERİN CB
RESEPTÖRLERİ ARACILI ANTİPROLİFERATİF VE
PROAPOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF CB RECEPTOR-MEDIATED
ANTIPROLIFERATIVE AND PROAPOPTOTIC EFFECT
OF CANNABINOIDS IN LUNG CANCER**

ÖZGE BOYACIOĞLU

PROF. DR. PETEK KORKUSUZ

Tez Danışmanı

DR. ÖĞR. ÜYESİ ELİF BİLGİÇ

Yardımcı Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2019

Özge BOYACIOĞLU'nun hazırladığı "Akciğer Kanserinde Kannabinoidlerin CB Reseptörleri Aracılı Antiproliferatif ve Proapoptotik Etkisinin Araştırılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedret KILIÇ
Başkan


.....

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ
Danışman


.....

Prof. Dr. Erem BİLENSOY
Üye


.....

Prof. Dr. Lokman UZUN
Üye


.....

Doç.Dr. Emirhan NEMUTLU
Üye


.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak .../.../... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

04.12/2019



ÖZGE BOYACIOĞLU

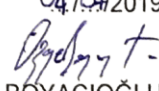
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ...ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

04.10.2019

Özge BOYACIOĞLU

ÖZET

AKCİĞER KANSERİNDE KANNABİNOİDLERİN CB RESEPTÖRLERİ ARACILI ANTİPROLİFERATİF VE PROAPOPTOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özge BOYACIOĞLU

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Yardımcı Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Elif BİLGİÇ

Haziran 2019, 90 sayfa

Akciğer kanseri, hızlı metastaz özelliği ve geç tanı alması nedeniyle dünyada en sık ölüme yol açan kanser olarak bilinmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), tüm akciğer kanseri vakalarının %80'ini oluşturmaktadır. Endokannabinoidler, vücutta sentezlenen ve genellikle klasik cannabinoid reseptörleri üzerinden etki gösteren lipid yapılı endojen esrar ligandlarıdır. Endokannabinoid sisteminin fizyolojik koşullarda akciğerde bulunduğu ve kanser patogenezinde bileşenlerinin artış göstererek CB1 reseptörleri aracılı rol oynayabileceği bildirilmiştir. Pankreas ve endometriyum kanserlerinde antiproliferatif etkisi bildirilen Araşidonilsiklopropilamid (ACPA), psikoaktif etki göstermeyen, kan-beyin bariyerini geçmeyen, lipid yapılı sentetik spesifik CB1 agonistidir. ACPA, CB1 reseptör agonizması aracılı olarak KHDAK'nde çoğalmayı azaltıcı ve apoptozu uyarıcı etki gösterebilir. ACPA'nın akciğer tümörüne hedefli ilaç adayı olarak kontrollü salımını sağlayabilecek biyoyumlu

ve biyodegradasyon hızı düşük polikaprolakton yapılı nanopartiküler sistem kullanılabilir. Kurgulanan varsayımı test etmek üzere *in vitro* koşullarda, deney ve kontrol grubu içeren gözlemsel bir deney tasarlanmıştır. Tez çalışmasında ilk olarak *in vitro* koşullarda insan kökenli ticari, altı KHDAAK hattında (A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573) qRT-PCR, akım sitometrisi ve immünositokimya yöntemleriyle kannabinoid reseptörlerinin varlığı ve düzeyleri gösterilmiştir. Buna göre A549, H1299, H358 ve H838 hatlarında yüksek CB1 reseptör ekspresyonu saptanmıştır. İkinci aşamada kannabinoid 1 reseptörünü yüksek düzeyde eksprese eden A549, H1299, H358 ve H838 hücre hatlarında WST-1 ve gerçek zamanlı impedans temelli proliferasyon analizi yöntemleriyle ACPA'nın doz ve zaman bağımlı antiproliferatif etkisi ve akım sitometrisi tekniğiyle kantitatif olarak apoptozu artırıcı etkisi ortaya konmuştur. ACPA'nın, WST-1 tekniğiyle incelenen hücre hatlarındaki antiproliferatif etkili doz aralığı 10^{-12} – 10^{-9} M olarak belirlenmiştir. Bu doz aralığına göre çalışılan gerçek zamanlı proliferasyon analizinde hücreler için etkili doz (IC50) 1.39×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır. Üçüncü aşamada ACPA'nın stabilite çalışmalarında molekülün tek başına hücre kültür süpernatantlarında 1-3. günlerde stabil olmadığından hareketle ACPA yüklü polikaprolakton yapılı nanopartiküler sistem çöktürme yöntemiyle geliştirilmiş ve optimizasyonu sağlanmıştır. Ardından ACPA'nın nanopartiküller ile kontrollü ve uzun süreli salımı sağlanmıştır. Son aşamada ACPA yüklü polikaprolakton yapılı nanopartikül sistemi gerçek zamanlı impedans temelli proliferasyon analizinde KHDAAK hatlarına uygulanmıştır. Sonuç olarak 1.39×10^{-12} M ACPA dozu salan polikaprolakton nanopartiküllerin genellikle antiproliferatif etkiyi sürdürdüğü sonucuna varılmıştır. Polikaprolakton nanopartiküler salım sistemiyle uzun süre etkili ve hedefli formülasyonu geliştirilen ACPA, CB1 agonizması aracılı olarak klinikte küratif tedavisi olmayan KHDAAK için yeni bir ilaç adayı olabilir. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında elde edilen çıktılar ile Hacettepe Teknokent Teknoloji Transfer Merkezi Patent Ofisi'ne buluş başvurusunda bulunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, Kannabinoid, ACPA, Proliferasyon, PCL, Nanopartikül, Kontrollü salım sistemi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CB RECEPTOR-MEDIATED ANTIPROLIFERATIVE AND PROAPOPTOTIC EFFECT OF CANNABINOIDS IN LUNG CANCER

Özge BOYACIOĞLU

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Elif BİLGİÇ

June 2019, 90 pages

Lung cancer is the most common cause of death among all cancers in the world due to its rapid metastasis and late diagnosis. Non-small cell lung cancer (NSCLC) constitutes 80% of lung cancer cases. Endocannabinoids are endogenous cannabis ligands with lipid structure, which are synthesized in the body and generally act on classical cannabinoid receptors. It has been revealed that the endocannabinoid system is present in lung under physiological conditions and its components can play a mediating role in the pathogenesis of cancer via CB1 receptors. Arachidonoylcyclopropylamide (ACPA) is a lipid structured, synthetic-specific CB1 agonist that does not have a psychoactive effect and does not pass through the blood-brain barrier. ACPA can decrease proliferation and increase apoptosis via CB1 receptor agonism in NSCLC. A biocompatible polycaprolactone-based nanoparticulate system with low biodegradation rate for controlled release of ACPA to the targeted lung tumor as

a drug candidate can be used. An *in vitro* observative set up with experimental and control groups was designed in order to test the presumed hypothesis. In the thesis, firstly, the presence and levels of cannabinoid receptors were determined by *in vitro* qRT-PCR, flow cytometry and immunocytochemistry methods in human commercial, six non-small cell lung adenocarcinoma cell lines (A549, H1299, H358, H838, H1975 and SW-1573). Accordingly, high CB1 receptor expression was found in the A549, H1299, H358 and H838 lines. In the second step, the dose and time-dependent antiproliferative effect of ACPA has been tested by WST-1 and real-time impedance-based proliferation analysis in the A549, H1299, H358 and H838 cell lines that highly express the cannabinoid 1 receptor. The effect of ACPA on apoptosis has been quantified by flow cytometry technique. The antiproliferative dose range of ACPA in the cell lines was determined as $10^{-12} - 10^{-9}$ M by WST-1 technique. The effective dose (IC₅₀) for the cells in the real-time proliferation assay was calculated as 1.39×10^{-12} M. In the third step, the stability studies of ACPA have been performed. The molecule alone in cell culture supernatants were not stable on days 1-3. Since ACPA is not stable, a new ACPA loaded polycaprolactone-based nanoparticular system was developed and optimized by nanoprecipitation method. Subsequently, controlled and prolonged release of ACPA with nanoparticles was achieved. In the final stage, the polycaprolactone-based nanoparticle system with ACPA was applied to NSCLC lines in impedance-based real-time proliferation analysis. As a result, polycaprolactone nanoparticles that release a dose of 1.39×10^{-12} M ACPA generally have antiproliferative effect. The long-acting and targeted formulation of the ACPA loaded polycaprolactone nanoparticular system may be a new drug candidate for NSCLC. In this context, an application was made to the Patent Office of Hacettepe Technopolis Technology Transfer Center with the outputs obtained within the scope of the thesis study.

Keywords: Non-small cell lung cancer, Cannabinoid, ACPA, Proliferation, PCL, Nanoparticle, Controlled release system

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, geniş çalışma olanağı sağlayan, desteğini esirgemeyen, çalışma disiplini örnek aldığım sayın danışmanım Prof. Dr. Petek Korkusuz'a; çalışmalarında emeğini ve yardımlarını devamlı hissettiğim yardımcı danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Elif Bilgiç'e; çalışmamda kullandığım ACPA-PCL nanopartiküler salım sisteminin geliştirilmesinde destek ve katkıları için sayın Prof. Dr. Erem Bilensoy, Öğr. Gör. Cem Varan ve Doç. Dr. Emirhan Nemutlu'ya; çalışmamın temelini oluşturan reseptörlerin mRNA seviyelerine ilişkin qRT-PCR çalışmalarında destekleri için sayın Dr. Öğr. Üyesi Ekim Taşkiran ve Öğr. Görevlisi Beren Karaosmanoğlu'na; bilgi birikimi ile farklı alanlarda kendimi geliştirmemi sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Feza Korkusuz'a; sadece laboratuvar çalışmalarında değil her konuda desteklerini hissettiğim çalışma arkadaşlarım Selin Önen ve Merve Gizer'e; proliferasyon analizlerinde değerli fikirlerine danıştığım sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Sevil Köse'ye; çalışmalarımızda destek olan ekip arkadaşlarım Eda Çiftci Dede ve Nilgün Yersal'a; Ted Ankara Koleji Lisesi'nden beri bağlarımı hiç koparmadığım ve her daim desteklerini hissettiğim değerli dostlarım Oğul Ersin Üner, Aysu Gürman, Ekin Kızılırmak, Naz Yetimoğlu ve Seda Mısırlıoğlu'na; her daim sevgileri, destekleri ve inançlarıyla yanımda olan, bana sonsuz güvenen ve bilimsel kimlikleriyle bana yol göstererek akademik araştırmalara yönelmemi sağlayan canım annem ve babama sonsuz teşekkür ediyorum. Bu tez çalışmasının yapılmasına maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (#TYL-2018-17387) teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	x
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinomu	4
2.2. Kannabinoidler	7
2.2.1. Endokannabinoid Sistemi	8
2.2.2. Endokannabinoidlerin Akciğerdeki Dağılımı.....	9
2.3. Akciğer Kanseri ve Kannabinoidler.....	10
2.4. Sentetik Selektif CB1 Agonisti Araşidonilsiklopropilamid (ACPA).....	14
2.5. Kannabinoidlerle İlgili Kontrollü Salım Sistemleri; Polikaprolakton, Nanopartiküler Salım Sistemi	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Kannabinoid Reseptörlerini Eksprese Ettiği Bilinen A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hücre Hatlarında CB1 ve CB2 Reseptör Düzeylerinin Saptanması.....	22
3.1.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattı Kültürü	22
3.1.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında qRT-PCR ile CB1 ve CB2 Reseptör İfadesinin Değerlendirilmesi	23

3.1.3. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Akım Sitometrisi ile CB1 ve CB2 Reseptör İşaretlenmesinin Değerlendirilmesi..	24
3.1.4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında İmmünohistokimyasal İnceleme.....	25
3.2. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Hücre Hatlarında, Sentetik Spesifik CB1 Agonisti ACPA'nın, <i>in vitro</i> Ortamda Doz Bağımlı Olarak Hücre Çoğalması Üzerine Etkisinin Saptanması.....	26
3.3. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Bulunduran Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hatlarında ACPA'nın Proliferasyonu Azaltıcı (EC50/IC50) Dozunun Gerçek Zamanlı Olarak Saptanması	27
3.4. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Hücre Hatlarında, Sentetik Spesifik CB1 Agonisti ACPA'nın, <i>in vitro</i> Ortamda Apoptoz Üzerine Etkisinin Akım Sitometrisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi	28
3.5. ACPA'nın Hücre Süpernatantlarındaki Miktarının Tayini.....	29
3.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.5.2. Örneklerle Ait Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.5.3. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması	29
3.5.4. ACPA Miktar Tayini	30
3.6. ACPA'nın Stabilitesi ve Uzun Süreli Sabit Salımını Sağlayabilecek Nanomühendislik Temelli ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sisteminin Geliştirilmesi	30
3.6.1. Kontrollü Salım Sistemi için Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	30
3.6.2. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonunun <i>in vitro</i> Ortamda Karakterizasyonu.....	31
3.7. Kannabinoid 1 Reseptörü Bulunduran Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hücre Hatlarında ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sistemi ile <i>in vitro</i> Ortamda Proliferasyonu Azaltıcı (EC50/IC50) Dozunu İçeren Formülasyonun Belirlenmesi.....	32

3.7.1. Hazırlanan İlaç Salım Sisteminin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İmpedans Temelli ve Gerçek Zamanlı Olarak Değerlendirilmesi.....	32
3.8. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Kültürü	35
4.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında qRT-PCR ile CB1 ve CB2 Reseptör İfadesinin Değerlendirilmesi	36
4.3. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Akım Sitometrisi ile CB1 ve CB2 Reseptör İfadesinin Değerlendirilmesi	37
4.4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücrelerinde İmmünohistokimyasal İnceleme.....	37
4.5. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında ACPA'nın Doz Bağımlı Olarak Hücre Çoğalmasına Etkisinin WST-1 Yöntemiyle Saptanması	45
4.6. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında ACPA'nın <i>in vitro</i> Ortamda Doz Bağımlı Olarak Hücre Çoğalmasına Etkisinin Gerçek Doz ve Zaman Bağımlı Olarak İmpedans Temelli Proliferasyon Analizi ile Değerlendirilmesi.....	47
4.7. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Hücre Hatlarında, Sentetik Spesifik CB1 Agonisti ACPA'nın, <i>in vitro</i> Ortamda Apoptoz Üzerine Etkisinin Akım Sitometrisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi.....	50
4.8. ACPA'nın Hücre Süpernatantlarındaki Miktarının Tayini	56
4.9. ACPA'nın Stabilitesi ve Uzun Süreli Sabit Salımını Sağlayabilecek Nanomühendislik Temelli ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sisteminin Geliştirilmesi	57
4.9.1. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonunun <i>in vitro</i> Ortamda Karakterizasyonu	57
4.10. Kannabinoid 1 Reseptörü Bulunduran Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hücre Hatlarında ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sistemi ile	

<i>in vitro</i> Ortamda Proliferasyonu Azaltıcı (EC50/IC50) Dozunu İçeren Formülasyonun Belirlenmesi.....	60
4.10.1. Hazırlanan İlaç Salım Sisteminin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İmpedans Temelli ve Gerçek Zamanlı Olarak Değerlendirilmesi	60
5. TARTIŞMA	63
SONUÇLAR	76
KAYNAKLAR.....	77
ORJİNALLİK RAPORU	91
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Dünya Sağlık Örgütü'nün akciğer kanserine ilişkin 2015 yılına ait sınıflandırması.....	5
Çizelge 2.2.	Endojen ve ekzojen kannabinoidlerle küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yapılan çalışmalar.....	11
Çizelge 2.3.	Kannabinoidlerle ilgili salım sistemleri ve etkileri.....	16
Çizelge 3.1.	Bağımlı ve bağımsız değişkenleri gösteren deney planı.....	20
Çizelge 3.2.	qRT-PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri.....	24
Çizelge 4.1.	Akım sitometrisi ile ACPA uygulanmış KHDAK hücrelerine ait apoptotik indeksler.....	56
Çizelge 4.2.	Tekli emülsiyon ve çöktürme yöntemleri ile stabil ACPA yüklü PCL nanopartiküllerin büyüklük ve dağılımlarına ilişkin sonuçlar.....	58
Çizelge 4.3.	ACPA yüklü PCL nanopartiküler salım sistemine ait yükleme etkinliği verileri.....	60

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılına ait kanser istatistikleri.....	4
Şekil 2.2.	Endokannabinoidlerin sentez ve yıkım basamakları ve kanser hücrelerindeki etkisi.....	9
Şekil 2.3.	Kannabinoid sisteminin akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etki mekanizması.....	14
Şekil 2.4.	ACPA'nın küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinomunda etkisi....	19
Şekil 3.1.	Doksan altı kuyucuklu hücre plaklarına ekim protokolü.....	27
Şekil 4.1.	Kültür plağına tutunmuş heterojen yapılı KHDAK hücre mikrogramları.....	35
Şekil 4.2.	KHDAK hücre hatlarında qRT-PCR yöntemiyle elde edilen göreceli mRNA kat artışı.....	36
Şekil 4.3.	KHDAK hücrelerinde CB reseptörlerinin akım sitometrisi ile işaretlenmesi	37
Şekil 4.4.	A549 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi.....	39
Şekil 4.5.	H1299 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi.....	40
Şekil 4.6.	H358 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi.....	41

Şekil 4.7. H838 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi.....	42
Şekil 4.8. H1975 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi.....	43
Şekil 4.9. SW-1573 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi.....	44
Şekil 4.10. ACPA'nın KHDAK hücrelerindeki antiproliferatif etkisinin WST-1 ile saptanması.....	46
Şekil 4.11. ACPA'nın KHDAK hücrelerindeki antiproliferatif etkisinin gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanması.....	48
Şekil 4.12. ACPA'nın KHDAK hücrelerindeki etkili dozunun (IC50) saptanması.....	49
Şekil 4.13. ACPA'nın etkili dozunun KHDAK'nde 24 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi.....	52
Şekil 4.14. ACPA'nın etkili dozunun KHDAK'nde 36 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi.....	53
Şekil 4.15. ACPA'nın etkili dozunun KHDAK'nde 48 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi.....	54
Şekil 4.16. ACPA'nın etkili dozunun KHDAK'nde 72 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi.....	55
Şekil 4.17. ACPA'nın KHDAK hücrelerine ait süpernatantlardaki miktarının LC-MS/MS ile saptanması.....	57
Şekil 4.18. ACPA kararlılık çalışmasına (+4°C) ilişkin veriler.....	58

Şekil 4.19. ACPA-PCL kontrollü salım sistemine ait salım profilinin zaman içinde yüzde kümülatif olarak gösterimi..... 59

Şekil 4.20. ACPA-PCL kontrollü salım sisteminin KHDAK'ndeki antiproliferatif etkisinin gerçek zamanlı impedans temelli olarak saptanması..... 62



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACPA	: Araşidonilsiklopropilamid
ACTB	: Beta-aktin
ADC	: Adenokarsinom
AEA	: Anandamid
ALK	: Anaplastik lenfoma kinaz
AKT	: Protein Kinaz B
AMPK	: 5'-adenozin monofosfat aktive protein kinazı
Bcl-2	: B hücre lenfoma-2
Bcl-xL	: B-hücrelenfoma-ekstra büyük
BRAF	: V-raf mürin sarcoma viral onkogen homolog B1
BSA	: Sığır serum albümini (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
CB	: Kannabinoid
CBD	: Kannabidiol
CBN	: Kannabinol
CB1/CnR1	: Kannabinoid 1 reseptörü
CB2/CnR2	: Kannabinoid 2 reseptörü
COX2	: Siklooksijenaz
DAB	: Kromojen diaminobenzidin
DAGL	: Diaçil gliserol lipaz
DCM	: Diklorometan
DMEM HG	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose</i>
EE (%)	: Enkapsülasyon etkinliği (%)
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
ERK 1/2	: Ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz ½
EtOH	: Etanol
FAAH	: Yağ asit amid hidrolaz
FAK	: Fokal adhezyon kinaz
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>

FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GPCR	: G-protein yapıllı reseptör
GPR55	: G protein bağıllı reseptör 55
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HUVEC	: Umblikal ven endotel hücreleri
ICAM-1	: Hücrelerarası adhezyon molekülü-1
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KRAS	: Kristen rat sarkom onkogeni
LAK	: Lenfokin ile aktif öldürücü hücreler
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
MA	: Metanandamid
MAGL	: Monoağıllı gliserol lipaz
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
MEK	: Mitojen aktive edici protein kinaz kinaz
MMP-2	: Matriks metalloproteinaz 2
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz 9
mTORC1	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi 1
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAPE	: N-ağıllı fosfatidiletanolamin
NAPE-PLD	: N-ağıllı fosfatidiletanolamin fosfolipaz D
Nrf2	: Nükleer faktör 2
NSCLC	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
OEA	: Oleiletanolamin
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCL	: Polikaprolakton
PDI	: Polidispersite indeksi
PEG	: Polietilen glikol
PGD2	: Prostaglandin D2
PGE2	: Prostaglandin E2
PGH2	: Prostaglandin H2
PGI2	: Prostatiklin

PI3K	: Fosfoinositid-3 kinaz
PKA	: Protein kinaz A
PLA2	: Fosfolipaz A2
PLGA	: Poli laktik-ko-glikolikasit
PLC	: Fosfolipaz C
PPAR	: Peroksizom aktive edici nükleer reseptörleri
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
PVP-b-PCL	: Poli(N-vinilpirolidon)blok-poli(ε-kaprolakton)
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ROS1	: Reaktif oksijen bileşeni
SCC	: Skuamöz hücre karsinomu
SCID	: Ağır Kombine Bağışıklık Yetmezliği
SCLC	: Küçük hücreli akciğer kanseri
STAT 3/5	: Transkripsiyon 3/5 sinyal transdüseri ve aktivatörü
TIMP-1	: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1
TRPA1	: Transient reseptör potansiyel ankirin 1
TRPV	: Transient reseptör potansiyel kanalı
TP53	: Tümör proteini 53
uPA	: Ürokinaz plazminojen aktivatör
uPAR	: Ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü
VEGFR	: Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	: <i>Water Soluble Tetrazolium-1</i>
15d-PGJ2	: Siklopentenon prostaglandin 2
2-AG	: 2-araşidonilgliserol
Δ⁹-THC	: Δ ⁹ -Tetrahidrakannabinol

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, hızlı yayılım göstermesi ve geç tanı alması nedeniyle dünyada en sık ölüme yol açan tümördür [1]. Diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında akciğer kanserinin beş yıllık sağ kalım oranı oldukça düşüktür. 2018 yılı istatistiklerine göre dünya çapında 2 milyonun üzerinde yeni akciğer kanseri vakası tanımlanmıştır [2]. Ölüm oranının yüksek olması, akciğer kanserinin toplumda önemli bir sağlık problemi haline gelmesine yol açmıştır [3]. Akciğer kanseri olgularının %80'i küçük hücreli dışı akciğer kanseridir [4]. Hastalarda erken tanının tedavi için önemli olduğu ve ölüm riskini azalttığı bilinmektedir [5]. Erken tanının sağlanamadığı ve tıbbi tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda yeni tümör odakları ortaya çıkmaktadır [6].

Kannabinoidler (CB), bitkilerde çeşitli formlarda, insan ve hayvanlarda ise endojen olarak sentezlenen yağ yapılı ligandlardır. Başta Δ^9 -Tetrahidrakannabinol (Δ^9 -THC) ve kannabidiol (CBD) olmak üzere kannabis türevlerinin lipofilik olmaları nedeniyle biyoyararlanımları oldukça düşüktür [7]. Endojen kannabinoidler, enzim ve reseptörleriyle endokannabinoid sistemini oluşturarak insan vücudunun homeostazisinin sağlanmasında ve pek çok fizyolojik olayda rol oynamaktadır [8]. Endokannabinoidler, klasik kannabinoid reseptörleri üzerinden veya kannabinoidden bağımsız reseptörler üzerinden etki gösterir [9]. Kannabinoidler, pek çok hastalık için ilaç adayı olarak araştırılmaktadır [1, 8]. Kannabinoidlerin tümör hücreleri üzerinde apoptotik [10, 11] ve proliferasyonu azaltıcı [10-13] etkileri olduğu grubumuzu da içeren pek çok araştırmacı tarafından saptanmıştır. Kannabinoid reseptörü aracılı olarak tümör hücrelerinin apoptoza gittiği, endoplazma retikulumu stresi aracılı gen uyarımı ile proliferasyonunun azaldığı bildirilmiştir [14].

Endokannabinoid sisteminin fizyolojik koşullarda solunum sistemi organlarında [15] ve bazı akciğer kanserlerinde kannabinoid reseptörlerinin bulunduğu bildirilmiştir [16-19]. Diğer yandan kannabinoid sisteminin endometriyum ve pankreas kanserlerinde CB1 reseptörü aracılı olarak proliferasyonu engelleyici ve apoptotik etkiye neden olduğu bildirilmiştir [11, 20-22]. Literatürde çeşitli

kannabinoidlerin KHDAK'nde proliferasyonu ve metastazı azaltıcı [23], invazyonu [24-26] azaltıcı, apoptozu uyarıcı [16] ve damarlanmayı azaltıcı [17, 27] etkileri bildirilmiştir. Ancak KHDAK'nde kannabinoidlerin CB1 reseptörü aracılı olası antiproliferatif ve apoptotik etkileri sınırlı olarak bildirilmiştir [16].

Varsayımımıza göre, kannabinoidlerin, ülkemizde sık rastlanan küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinomuna ait hücre hatlarında spesifik kannabinoid ligandları reseptör bulundurabilir, doz bağımlı olarak proliferasyonu azaltarak apoptozu uyarabilir. Etkili dozu saptandığında sentetik CB agonistlerinin kontrollü salım sistemiyle stabilite ve biyoyararlanımları artırılabilir. Böylece kannabinoidler KHDAK için ilaç adayı olabilir.

Bu tez çalışmasının **amacı**; sentetik kannabinoid agonisti Araşidonilsiklopropilamid (ACPA)'in KHDAK'nde, doz bağımlı uzun süreli proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu arttırıcı etkinliğinin değerlendirilmesi ve ACPA'nın stabil halde ve uzun süreli etki göstermesini sağlayacak polikaprolakton (PCL) ile kaplı kontrollü salım yapan nanopartiküler sistemin hazırlanmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda aşağıdaki **hedefler** bellirlenmiştir.

- i. Kannabinoid reseptörlerini eksprese ettiği bilinen A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinom hücre hatlarında CB1 ve CB2 reseptör düzeylerinin saptanması
- ii. Kannabinoid 1 reseptörünü en yüksek düzeyde eksprese eden hücre hatlarında, sentetik spesifik CB1 agonisti ACPA'nın, *in vitro* ortamda doz bağımlı olarak hücre çoğalması üzerine etkisinin saptanması
- iii. Kannabinoid 1 reseptörünü en yüksek düzeyde bulunduran küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinom hatlarında ACPA'nın proliferasyonu azaltıcı (EC50/IC50) dozunun gerçek zamanlı olarak saptanması ve apoptozu üzerine etkisinin değerlendirilmesi

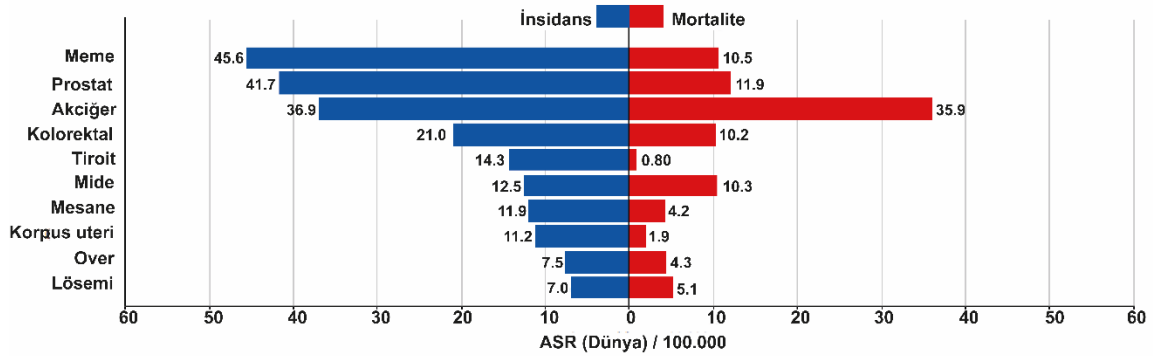
- iv. ACPA'nın stabilitesi ve uzun süreli sabit salımını sağlayabilecek nanomühendislik temelli ACPA-PCL nanopartiküler salım sisteminin geliştirilmesi
- v. Kannabinoid 1 reseptörü bulunduran küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinom hatlarında ACPA-PCL nanopartiküler salım sistemi ile *in vitro* ortamda proliferasyonu azaltıcı (EC50/IC50) dozunu içeren formülasyonun belirlenmesi

Bu tez kapsamında, yukarıdaki hedeflere ulaşılarak sentetik spesifik CB1 reseptör agonisti ACPA'nın, KHDAK hücreleri üzerinde *in vitro* ortamda proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu arttırıcı doz bağımlı etkisi ortaya konmuş; gerçek zamanlı olarak etkili dozu (IC50) saptanmıştır. Uzun süreli antitümöral etkinin sağlanabilmesi için ACPA yüklü PCL nanopartiküler sistemin geliştirilmesi ve optimizasyonu sağlanmıştır. Çalışma hem literatüre yenilikçi bilgi katkısında bulunmakta hem de tedaviye yönelik bir ürün geliştirilmesine destek sağlamaktadır. Bu doğrultuda elde edilen çıktıların fikri mülkiyet haklarının korunması ve ticarileştirilebilme potansiyeli nedeniyle Hacettepe Teknoloji Transfer Ofisi'ne buluş formu doldurularak ekip olarak patent başvurusunda bulunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinomu

Akciğer kanseri, yüksek invaziv ve metastatik özelliğiyle dünya çapında en yaygın görülen malign tümördür [2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılına ait verilerine göre akciğer kanseri en sık ölüme neden olan kanser olarak bildirilmiştir (Şekil 2.1) [28]. Türkiye'de 2018 yılında 34,703 yeni akciğer kanseri olgusu tanı almış; bunlardan 3,683 olgu ise ölümlle sonuçlanmıştır. Amerikan Kanser Derneği aynı yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde tanı alan 234,000 yeni akciğer kanserli olgunun 154,000'inin ölümlle sonuçlandığını bildirmiştir [29, 30]. 2018 yılında dünya çapında 2 milyonun üzerinde yeni akciğer kanseri olgusu tanımlanmıştır [2]. Bu olguların %80'inin küçük hücreli dışı akciğer kanseri türünde olduğu bilinmektedir [4]. Akciğer kanserinin beş yıllık sağkalım oranı (%15-17.8) oldukça düşüktür [29, 31-33]. Kanserın beyin, meme, pankreas, kolon ve prostat metastazı ise ölüm oranını artırmaktadır [34]. Yüksek mortalite oranı nedeniyle, akciğer kanserinin coğrafi mortalite paterninin insidans oranına yaklaşarak önemli bir halk sağlığı sorunu olması ve tütün dumanına maruziyetin artması bu hastalığın pandemik hale gelmesinde temel faktörler olarak değerlendirilmektedir [3].



Şekil 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılına ait kanser istatistikleri. Dünyada her 100.000 birey için yaş standardizasyonu yapılarak kanser türlerine ait insidans ve mortalite yüzdeleri hesaplanmıştır. Akciğer kanserinin diğer kanser türlerine göre yüksek mortalite oranı gösterilmektedir. [28] numaralı kaynaktan uyarlanmıştır (ASR: Age-standardized rate).

Akciğer kanseri, intratorasik yerleşimi nedeniyle ulaşabilme zorluğu ve teşhis için alınabilen örneklerin çok küçük olması nedeniyle, tanısı oldukça geç koyulabilen bir hastalıktır [3]. Dünyada görülen bütün akciğer kanserli olgulardan yaklaşık %58'inin az gelişmiş ülkelerde bulunduğu [35] ve toplumda sık görülen alt tiplerinin adenokarsinom, skuamöz hücre karsinomu, küçük hücreli ve büyük hücreli karsinom olduğu bilinmektedir [36]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2015 yılında yapılan akciğer kanseri sınıflandırması Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün akciğer kanserine ilişkin 2015 yılına ait sınıflandırması

Adenokarsinom (ADC)
Skuamöz hücre karsinomu (SCC)
Nöroendokrin tümör (küçük hücreli)
Büyük hücreli akciğer kanseri
Adenoskuamöz karsinom
Sarkomatoid karsinom
Tükürük bez tümörleri
Diğer sınıflandırılmamış tümörler

Akciğer kanseri, çoğunlukla kanserojen maddeden zengin çevre veya oksidatif stres ile oluşmakla beraber genetik mutasyon sonucu da meydana gelebildiğinden [37, 38] heterojen bir hastalıktır. Hastalığın %20'sini nöroendokrin kökenli (küçük hücreli akciğer kanseri, KHAK), %80'ini küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) oluşturmaktadır [4]. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri çoğunlukla adenokarsinom ve skuamöz hücre karsinomunu kapsamaktadır. Adenokarsinomun tüm akciğer kanserlerinin %40-50'sini oluşturduğu ve KHDAK'nin en yaygın görülen alt tip olduğu bildirilmiştir [39]. Hem akciğer adenokarsinomu hem de skuamöz hücre karsinomunun, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ile ilişkisinin olduğu bilinmektedir [37]. On bir ülke üzerinde gerçekleştirilen çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanserinin adenokarsinom türünün kadınlarda, skuamöz hücre karsinomu türünün erkeklerde daha sık rastlandığını bildirilmiştir [3, 40].

Hem klinik hem de patolojik özellikleri bakımından KHAK'nden farklılık gösteren KHDAK'nin [39] moleküler patogeneğinde; Kristen rat sarkom onkogeni (KRAS), Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), V-raf mürin sarkoma viral onkogen homologu B1 (BRAF), Fosfoinositid-3 kinaz (PI3K), Mitojen aktive edici protein kinaz kinaz (MEK) ve İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi pek çok genetik değişikliğe uğramış protoonkogen tanımlanmıştır [3, 39]. Özellikle EGFR'nün normal hücre çoğalması, apoptozu ve diğer pek çok işlevinin düzenleyicisi olduğu, kanser oluşumunun bu reseptörün mutasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir [41]. Kanserin, Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ve Reaktif oksijen bileşeni 1 (ROS1) üzerinde yapısal değişiklik, MET gibi protoonkogenlerde amplifikasyon, Tümör proteini 53 (TP53) ve Fosfataz ve tensin homologu (PTEN) gibi tümör baskılayıcı genlerde inaktivasyon veya telomeraz aktivitesinin artışı ile olduğu bildirilmiştir [42-44]. Farklı mutasyonlarla seyredebilmesi akciğer kanserinin tedavi başarısını sınırlayabilmektedir. Bu nedenle özellikle toplumumuzda proliferasyonu sınırlayan ve apoptoz mekanizmasını tetikleyebilecek terapötik potansiyelli yeni ilaç adaylarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda KHDAK'nin tedavisinde ileri evre veya metastatik olgularda tümörü hedefleyen çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında *Erlotinib*, *Gefitinib*, *Vandetanib*, *Dacomitinib*, *Icotinib*, *Afatinib*, *Bevacizumab*, *Crizotinib* ve *Ceritinib* adlı 9 hedeflenmiş tedavi ajanı yer almaktadır [45-49]. Ancak sistemik uygulanan bu ilaçların pek çok hastada ciddi yan etkilere neden olabildiği bildirilmektedir [50, 51]. Konsantrasyon ve bellek ile ilişkili sorunlar, yorgunluk, kıl köklerinin zayıflamasına bağlı saç kaybı ve ağrı, tedavi sürecini zorlaştırabilen unsurlardan sadece birkaçıdır. Hastalıkta evreye bağlı olarak kemoterapiyle beraber radyoterapi ve cerrahi tedavi de uygulanmaktadır. Meta analiz sonuçlarına göre; klinikte hâlihazırda uygulanan tedavi protokolleri ile toplam yaşam süresi, ilerlemesiz sağ kalım, tedaviye yanıt hızı ve yaşam kalitesinin geliştirilmesi hedeflendiği ancak hastada pek çok yan etkiye neden olduğu ve etkili tedavi sağlanamadığı bildirilmiştir [52, 53].

2.2. Kannabinoidler

Cannabis sativa L. (esrar) bitkisi, kannabinoid olarak bilinen 100'den fazla psikoaktif bileşene (terpenoidler, flavonoidler, yağ asitleri, şekerler vb.) sahiptir [7, 54-57]. Doğada, bitkilerde (fitokannabinoidler; Δ^9 -THC, kannabidiol (CBD), kannabinol (CBN)), insan ve hayvanlarda birden fazla yapıda bileşeni olan kannabinoidlerin endojen yapıda (Anandamid (AEA) ve 2-araşidonilgliserol (2-AG) ve laboratuvar ortamında üretilen sentetik (JWH-133, WIN-55,212-2, SR141716, ACPA) formları mevcuttur [10, 55, 58-60]. Kannabinoidler; kimyasal yapılarına göre klasik kannabinoidler (Δ^9 -THC), indol-türevli kannabinoidler (WIN55,212-2), eikozanoidler (AEA, 2-AG), antagonist/ters agonist (SR141716A, AM251, SR145528, AM630) şeklinde sınıflandırılabilir; sentetik türevlerine her gün yenileri eklenmektedir [61, 62]. Ağız yoluyla alındıklarında kannabinoidlerin biyoyararlanımı oldukça düşüktür (%6-20). Kannabisi ağız yoluyla alındıktan 1-6 saat sonra, içerdği Δ^9 -THC türevinin kandaki konsantrasyonunun en yüksek düzeye çıktığı ve yarı ömrünün yaklaşık 20-30 saat olduğu bildirilmiştir [7]. Diğer yandan kannabinoidlerin, inhalasyon ile uygulandığında hızla kan dolaşımına geçerek 2-10 dakikada maksimum konsantrasyonuna ulaşır 30 dakikada düzeylerinin hızla düştüğü izlenmiştir [7]. Sonuç olarak inhalasyon yolu ile uygulanan kannabinoidler, güçlü ancak kısa süreli etki gösterebilir [7, 63].

Endokannabinoidler, vücutta sentezlenen ve genellikle klasik kannabinoid reseptörleri üzerinden kannabis gibi etki gösteren yağ asidi türevi endojen esrar (kannabis) ligandlarıdır [64, 65]. Endokannabinoid sistemi; endojen kannabinoid ligandları ile reseptörleri ve ligandların metabolizmasında etkili enzimlerinden oluşmaktadır [66]. Endokannabinoidler hidrofobik yapıda olup hücre zarındaki proteinler ile doğrudan etkileşir. Vücudumuzda yoğun olarak merkezi sinir sisteminde bulunan endokannabinoidler ayrıca periferik sinir sistemi, immün sistem, kadın ve erkek genital sistemi, kalp damar, solunum sistemi ve sindirim sisteminde reseptör ve ligandları ile birlikte bulunur [11, 23, 55, 61, 67-69]. Endokannabinoidler doğumdan önce ve sonraki dönemde, fizyolojik ve patolojik koşullarda vücudun homeostazisinin düzenlenmesine katkıda bulunur [70]. Bu medyatörler, reseptör aracılı spesifik etkilerini hücre çoğalması, göçü ve ölüm

mekanizmaları üzerinde gösterir [71]. Bu yolla endokannabinoidler, inflamasyon, ağrı ve tümör oluşumu gibi mekanizmalarda yer alır [54, 58, 72-74].

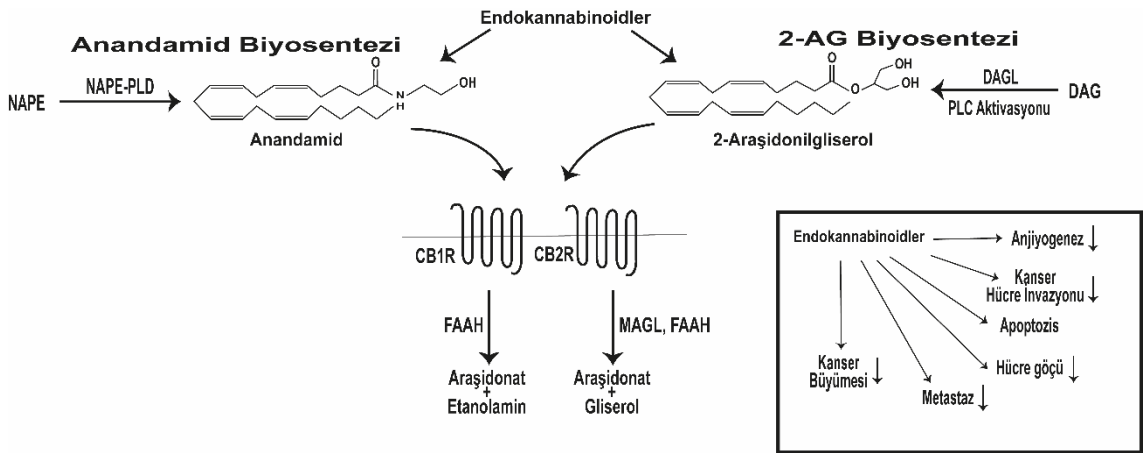
2.2.1. Endokannabinoid Sistemi

Kannabinoid sisteminin bileşenleri: Kannabis ligandları (agonist ve antagonistler) klasik reseptörleri CB1 ve CB2 üzerinden spesifik etkilerini gösterir [71]. Bu reseptörler G-proteini yapısındadır (GPCRs) [55, 65, 75]. CB1 ve CB2 reseptörleri hücre zarında beraber bulunarak diğer reseptörler ile etkileşime girebilir [58, 65, 76, 77]. Kannabinoidler, klasik kannabinoid reseptörlerinden bağımsız olarak da spesifik etki gösterebilmektedir [12, 74, 78, 79]. Klasik olmayan CB reseptörleri, G protein bağlı reseptör 55 (GPR55), transient reseptör potansiyel kanalları (TRPV) [80, 81], ligand-kapılı iyon kanalları, β -adrenerjik reseptörler, μ -opioid reseptörler ve peroksizom aktive edici nükleer reseptörleri (PPAR) olarak sıralanır [23, 73, 82, 83]. Bu reseptörlerle kannabinoidler aracılı sinyal iletimi ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır [9, 84].

Endokannabinoidlerin sinyal iletiminin düzenlenmesi; sentez ve yıkım enzimlerince kontrol edilmektedir. Klasik reseptör uyarımıyla hücre zarında sırasıyla adenilat siklaz enzimi inhibisyonu, siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretiminde azalma ve mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK)/PI3K yolağında aktivasyon gerçekleşir [7, 10, 55, 75, 85, 86]. Sonuç olarak hücrede çoğalma, göç ve ölüm dengeleri değişir [21, 87, 88]. CB1 ve CB2 reseptör gen delesyonu ile bazı kanser türlerinin progresyonunda azalma, ekspresyonunda artış ile bazı kanser tiplerinin oluşumunun tetiklendiği bildirilmektedir [12]. Çeşitli tümörlerde endojen kannabinoidler AEA [11, 89-93] ve 2-AG'nin [11, 91, 92] apoptotik ve antiproliferatif etkileri olduğu bildirilmiştir. Sentetik CB2 agonisti CB65'in endometriyum kanserinde proapoptotik ve antiproliferatif [11] etkileri, hepatokarsinom hücrelerinde anti-invaziv etkileri [94] gösterilmiştir.

Vücudumuzdaki en yaygın endojen kannabinoid ligandları AEA ve 2-AG'dir [11, 58]. Anandamid, N-açıl fosfatidiletanolamin fosfolipaz D (NAPE-PLD) enzimi tarafından N-açıl fosfatidiletanolaminin (NAPE) kataliziyle üretilmektedir. 2-AG sentezi ise fosfolipaz C (PLC) enziminin aktivasyonuna bağlı olarak diaçil gliserol lipaz (DAGL) enzimi tarafından diaçilgliserole dönüşümle gerçekleşmektedir.

Diaçilgliserol genel olarak monoaçil gliserol lipaz (MAGL) ile; AEA ise FAAH ile hidrolize edilmektedir [67, 71, 95-98]. Prostat, meme, endometriyum, over kanseri, glioma ve melanomalarda bu enzimlerin düzeyleri tümör gelişimi ile farklı biçimlerde ilişkilendirilmiştir [99-103]. Endokannabinoidlerin reseptörleri, sentez ve yıkım enzimleri ile bazı genel etkileri Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Endojen kannabinoidlerin reseptör aracılı agonistik ya da antagonistik spesifik etkileri ile spesifik olmayan etkileri tam olarak denetlenemediğinden, psikoaktif olmayan ekzojen kannabinoid türevlerinin kanser tedavisi için ilaç olma potansiyeli araştırılmaktadır [9, 67, 97, 104].



Şekil 2.2. Endokannabinoidlerin sentez ve yıkım basamakları ve kanser hücrelerindeki etkisi (NAPE; N-açil fosfatidiletanolamin, NAPE-PLD; N-açil fosfatidiletanolamin hidrolize edici fosfolipaz D, 2-AG; 2-araşidonilgliserol, DAG; Diaçil gliserol, DAGL; Diaçil gliserol lipaz, PLC; fosfolipaz C, CB1R; CB1 reseptörü, CB2R; CB2 reseptörü, MAGL; monoaçilgliserol lipaz, FAAH; yağ asit amid hidrolaz)

2.2.2. Endokannabinoidlerin Akciğerdeki Dağılımı

Endokannabinoidler, solunum sisteminin çeşitli organlarında yaygın dağılım gösterir. Akciğer, vücutta kan akımının en yüksek olduğu, en geniş yüzey alanına sahip yaşamsal bir organdır ve alveol yapısıyla solunum için gerekli kan-oksijen bariyerini oluşturmaktadır. Akciğerde parankimi oluşturan hava yollarına (bronş ve bronşiyoller) ait epitel hücreleri ve stromadaki bazı bağışıklık sistemi hücrelerinde (lenfosit, makrofaj, lökosit) kannabinoid sistemi bileşenleri bulunur

[69]. Bronşlarda CB1 reseptör ekspresyonunun CB2'ye göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [15].

Kannabinoidlerin akciğerin fizyolojik koşullarda bronşların dilatasyonu ve damar permeabilitesinde artışa yönelik etkileri bildirilmiştir [105, 106]. Anandamid, akciğerde inflamasyonu tetiklemekte [106], Calu-3 akciğer epitel hücre hattında inflamasyonla ilişkili olarak hücre geçirgenliğini arttırmaktadır. Benzer şekilde, 2-AG'nin, fare akciğerinde önemli bir prostaglandin kaynağı olduğu [107], insanda nötrofil ve eozonofiller tarafından metabolize edildiği ve inflamatuvar mekanizmayı düzenlediği bildirilmiştir [108]. Ekzojen kannabinoidlerin vücutta doz bağımlı bronkodilatasyona neden oldukları bilinmektedir [109].

Kannabinoidlerin akciğerin allerjik ve inflamatuvar hastalıkları, tümörlerini içeren pek çok patolojisinde etkili olduğu bildirilmiştir [16, 110, 111]. Son zamanlardaki deneysel çalışmalar, kannabinoidlerin bir dizi sinyal mekanizması aracılığıyla akciğer kanseri hücrelerinin çoğalma ve yayılmasını önleyici etkilerini bildirmektedir [26, 83, 112, 113].

2.3. Akciğer Kanseri ve Kannabinoidler

Kannabis, uzun yıllardan beri tıbbi uygulamalarda çeşitli amaçlarla kullanılabilmektedir [73]. Akciğer kanserlerinin adenokarsinom ve skuamöz karsinom türlerinde ekzojen ve endojen kannabinoidler ile ilgili çalışılmaktadır [19, 26, 27, 114]. Küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinom dokularında sentezlenen CB1 ve CB2 reseptör seviyelerinin normal akciğer dokularından yüksek olduğu bildirilmektedir [114]. Kannabinoid 1 reseptörü, KHDAC dokularında %24 civarında sentezlenmektedir [19, 38]. Primer miyoblastların akciğere metastazının CB1 reseptörü aracılı olduğu gösterilmiştir [115]. Buna karşın, bazı araştırma grupları kannabinoidlerin akciğer kanserinde CB2 reseptörü aracılı olarak etkili olabileceğini bildirmiştir [113, 114]. WIN55,212-2 ve JWH-133 ekzojen kannabinoidler KHDAC hücrelerinde CB1 ve/veya CB2 reseptörleri aracılı olarak [19, 23], cAMP'yi bloke ederek veya seramid sentaz aktivasyonu ile protein kinaz B (Akt) ve PI3K inhibisyonuna neden olarak proapoptotik etki göstermektedir [23, 116]. Diğer yandan, sentetik selektif CB2 agonisti JWH-133, KHDAC hücrelerinde matriks metalloproteinaz enzimlerini

inhibe ederek invazyonu engelleyebilir [27]. Delta-9-tetrahidrokannabinolün CB1 ve/veya CB2 reseptörü aracılığıyla ERK1/2 yolağının aktivasyonu ve PI3K/Akt'ın inhibisyonu ile KHDAK'nin çoğalmasını engellediği bilinmektedir [23, 26]. Kannabinoidlerin KHDAK'nde bilinen etki mekanizması Şekil 2.3'te şematize edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar ise Çizelge 2.2'de listelenmiştir.

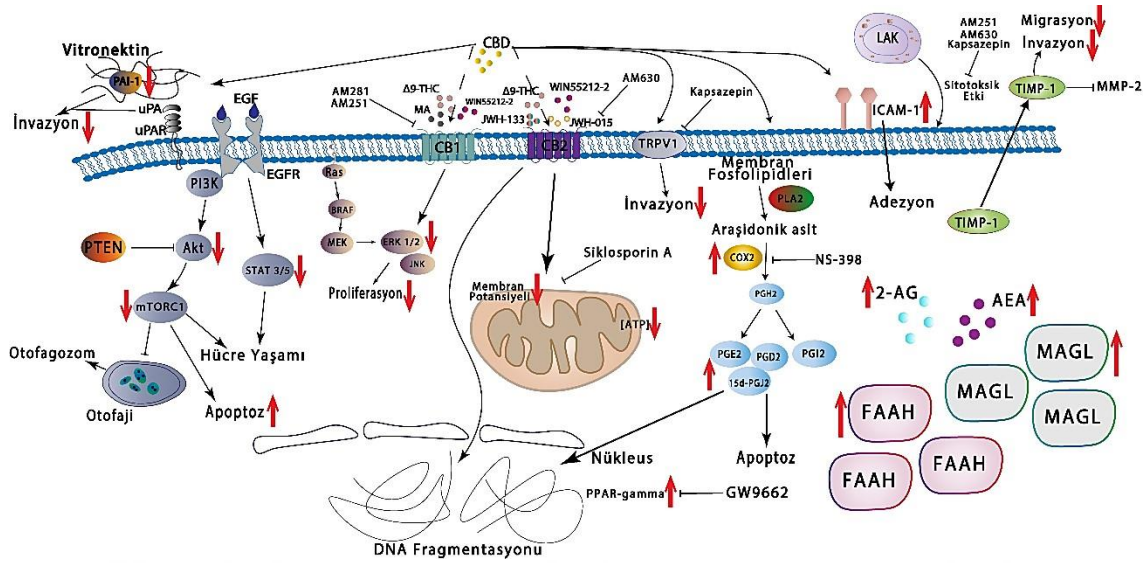
Çizelge 2.2. Endojen ve ekzojen kannabinoidlerle küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yapılan çalışmalar

Deney Düzenegi	Kannabinoid Sistemi	Etki	Kaynak
KHDAK hatları; A549, SW-1573 ile <i>in vitro</i> çalışmalar SCID CB-17 fare ile <i>in vivo</i> çalışma	Δ^9-THC (CB1 ve/veya CB2 reseptör aracılı)	✓ Hücrelerde çoğalma ↓ ✓ Apoptoz ✓ ERK1/2 ve JNK1/2 inhibisyonu ✓ Proliferasyon ↓ ✓ VEGF ↓ ✓ İnvazyon ↓ ✓ Akciğer metastazında ↓ ✓ Tümör hacminde ↓	[26, 113]
Akciğer kanseri hastalarından alınan doku örnekleri, KHDAK hatları; A549 (veya HUVEC ko-kültürü), SW-1573, A459, CALU1, H460 ve H1299 ile <i>in vitro</i> çalışmalar SCID CB-17 fare ile <i>in vivo</i> çalışma	WIN55212-2, JWH-015, CBD, MA, JWH-133, URB597 (CB1, CB2 ve/veya TRPV1 reseptörü aracılı)	✓ Hücrelerinin proliferasyonu ↓ ✓ Hücrelerin kemotaksi, kemoinvazyon ve migrasyonu ↓ ✓ Damarlanma ↓ ✓ Apoptoz ✓ Ekzojen eklenen TIMP-1 ile HUVEC hücrelerinin göçünde inhibisyon ✓ Akciğer metastazı ↓	[16, 17, 19, 27]

		✓ Akt ve MMP-9 ekspresyonunun ↓	
KHDAK hatları; A549, H358 ve H460 ile <i>in vitro</i> çalışma Nude fare (A549 hücre ksenograftı) ile <i>in vivo</i> çalışma	CBD, AM251, AM630, kapsazepin (CB1, CB2 ve/veya TRPV1 reseptörü aracılı)	✓ CBD ile hücrelerde PAI-1* ekspresyonu ↓ ✓ Hücrelerin invazyonu ↓ ✓ CBD ile tümör büyümesi ↓	[117]
KHDAK hatları; A549 ile <i>in vitro</i> çalışma Nude fare (A549 hücre ksenograftı) ile <i>in vivo</i> çalışma	CBD (TRPV-1 reseptörü aracılı)	✓ CBD ile TIMP-1 ↑ ✓ İnvazyonda ↓ ✓ CBD ile tümör metastazı ve büyüklüğü ↓	[118]
KHDAK hatları; A549, H358 ve/veya H460 ile <i>in vitro</i> çalışma Nude fare (A549 hücre ksenograftı) ile <i>in vivo</i> çalışma	CBD ve/veya AM251, AM630 ve kapsazepin ve/veya URB597 ve AA-5HT (CB1, CB2 ve/veya TRPV1 reseptörü aracılı)	✓ Kanser hücrelerinin CBD ile ICAM-1 ↑ ✓ TIMP-1 ekspresyonu ↑ ✓ İnvazyon ↓ ✓ Metastaz ↓ ✓ AM251, AM630 veya kapsazepin ile CBD aracılı sitotoksik etkinin baskılandığı saptanmıştır. ✓ CBD ile metastaz ↓	[24, 25, 119]
KHDAK hattı; A549 ve primer akciğer kanseri hasta	CBD, AM251, AM630 ve kapsazepin (COX-2 ve	✓ Kanser hücrelerinin canlılığı ↓ ✓ COX-2 ↑, PGE2, PGD2 ve 15d-PGJ2 ↑	[120]

dokuları ile <i>in vitro</i> çalışma <i>Nude</i> fare (A549 hücre ksenograftı) ile <i>in vivo</i> çalışma	PPAR-γ aracılı)	✓ Apoptoz ↑ ✓ PPARY ↑, tümör gerilemesi ✓ Tümör gerilemesi	
Hastalardan alınan akciğer kanseri biyopsi örnekleri ile <i>in vitro</i> çalışma	-	✓ Nrf 1 ve 2 ↑ ✓ p-ERK1/2 ↑ ✓ Apoptoz ↑ ✓ CB1 ve 2 reseptörlerinin seviyesinde ↑ ✓ 2-AG ve AEA seviyelerinin skuamöz hücrelerde sırasıyla 2.3 ve 1.8 kat ↑, adenokarsinom hücrelerinde sırasıyla 2.3 ve 1.44 kat ↓ ✓ FAAH ve MAGL seviyelerinin skuamöz hücrelerde sırasıyla %30 ve en az 7 kat, adenokarsinom hücrelerinde ise sırasıyla %22 ve 1.5 kat ↑	[114]

Dipnot: SCID: Ağır Kombine Bağışıklık Yetmezliği, FAK: Fokal adhezyon kinaz, MMP-9: Matriks metalloproteinaz 9, HUVEC: Umbilikal ven endotel hücreleri, LAK: Lenfokin ile aktif öldürücü hücreler, TIMP-1: Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü-1, PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1, ICAM-1: Hücrelerarası adezyon molekülü-1, WIN55212-2: CB1 ve 2 agonisti, JWH-015: CB2 agonisti, AM281: CB1 antagonisti, AM630: CB2 antagonisti, URB597: FAAH enzim inhibitörü, MA: Metanandamid (CB1 agonisti), JWH-133: CB2 agonisti, CBD: Kannabidiol, AM251: CB1 antagonisti, Kapsazepin: TRPV1 antagonisti, AA-5HT: FAAH inhibitörü, JWH-133: CB2 agonisti, Kapsazepin: TRPV1 antagonisti, *: PAI-1 inhibitörünün tümör başlatıcı etkisi olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.3. Kannabinoid sisteminin akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etki mekanizması (uPA: Ürokinaz plazminojen aktivatör, uPAR: Ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü, EGF: Epidermal büyüme faktörü, LAK: Lenfokin-aktif öldürücü hücre, TIMP-1: Matriks metalloproteinazların doku inhibitörü-1, MMP-2: Matriks metalloproteinaz 2, Akt: Protein kinaz B, mTORC1: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi 1, PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinaz, STAT 3/5: Transkripsiyon 3/5 sinyal transdüseri ve aktivatörü, MEK: Mitojen aktive edici protein kinaz kinaz, BRAF: V-raf mürin sarcoma viral onkogen homolog B1, ERK 1/2: Ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz 1/2, JNK: c-Jun N-terminal kinaz, PLA2: fosfolipaz A2, COX2: Siklooksigenaz, PGH2: prostaglandin H2, PGE2: prostaglandin E2, PGD2: prostaglandin D2, PGI2: prostasiklin, 15d-PGJ2: siklopentenon prostaglandin 2).

2.4. Sentetik Selektif CB1 Agonisti Araşidonilsiklopropilamid (ACPA)

Küçük hücreli dışı akciğer kanserine ait deneysel modellerde kannabinoid 1 reseptör agonizmasının CB2'ninkine göre daha etkili olabileceği görülmektedir (Şekil 2.3). Endojen kaynaklı kannabinoidler fizyolojik ve patolojik koşullarda akciğerde dağılım gösterebilir ve bunların CB1 ve CB2 reseptörleri üzerindeki ortak etkileri göz önüne alındığında izole CB1 agonizması için uygun ligandlar olmayabilecekleri düşünülmektedir. Bu nedenle tümör tedavisi için ilaç adayı

olarak psikoaktif etkileri bulunmayan ve kan-beyin bariyerini geçmeyen sentetik agonistler üzerinde çalışılmaktadır. Araşidonilsiklopropilamid, bu moleküllerden birisidir. Anandamid analogu olarak üretilen ACPA (MW=343.55 g/mol), selektif bir CB1 reseptör agonistidir ($K_i = 2.2 \text{ nM}$) [121]. ACPA'nın CB1 reseptörüne olan afinitesi kannabinoid 2 reseptörüne göre 325 kat fazladır [122]. ACPA saf yağ yapılı olup etanol içinde kolayca çözülebilir [123].

Araşidonilsiklopropilamid endometriyum ve pankreas kanseri hücreleriyle oluşturulan, grubumuzun da yer aldığı sınırlı sayıdaki çalışmaya ait deney modelinde CB1 reseptörü aracılığıyla proapoptotik ve antiproliferatif mekanizmayı uyarabilmektedir [11, 20-22]. ACPA, CB1 reseptörleri aracılı olarak Panc1 pankreas kanseri hücrelerinde, hücre içi 5'-adenozin monofosfat aktive protein kinazı (AMPK) aktive ederek serbest oksijen radikali bağımlı otofajiyi arttırmaktadır [21]. Pankreas adenokarsinom hücrelerine, pirimidin analogu gempitabin ACPA ile beraber uygulanmış, kuvvetli sinerjistik etki ile kanser hücrelerinde serbest oksijen radikali bağımlı mekanizma ile proliferasyonu azaltıcı etki gösterdiği bildirilmiştir [22]. Diğer çalışmada, Panc1 pankreas kanseri hücrelerine 10^{-4} - 4×10^{-4} M doz aralığında uygulanan ACPA, 2×10^{-4} M dozunda proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir [20]. ACPA, Ishikawa endometriyum adenokarsinom hücre hattında 9.3×10^{-6} M IC₅₀ dozunda proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu uyarıcı etki göstermiştir [11]. Bu hücresel mekanizmalar, KHDAC'nde ACPA ile CB1 reseptörü aracılı olarak uyarılabilirse hastalığın tedavisi için kliniğe aktarılacak üzere kullanılabilir. Ancak yağ yapılı olduğundan, ACPA'nın uzun süreli etkili dozda uygulanabilmesi için kontrollü salım sistemine yerleştirilmesi gerekir.

2.5. Kannabinoidlerle İlgili Kontrollü Salım Sistemleri; Polikaprolakton, Nanopartiküler Salım Sistemi

Klinikte ilaç tedavisinde, etken maddenin hedeflenen doz, zaman ve bölgede etki etmesi beklenir. Son yıllarda terapötik etkinin artırılması ve yan etkilerin azaltılması amacı ile nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmeye başlanmıştır [124]. Lipozomlar, dendrimerler, katı lipid nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, polimerik miseller ve lipid nanoyapılı sistemler en çok çalışılan sistemlerdir [125]. Etkili ilaç salım sistemleri olarak bilinen organik bazlı

nanopartiküller (polimerik nanopartiküller), genellikle nanoküre veya nanokapsül formunda üretilir [124]. Boyutları 10-1000 nm arasında değişebilen polimerik nanopartiküllerin biyokompatibiliteleri ve biyodegradasyon seviyeleri yüksektir.

Kannabinoidler için klinik öncesi araştırmalarda lokal uygulamaya yönelik pek çok formülasyon geliştirilmektedir [126-128]. Kannabinoidlerin ilaç geliştirme çalışmalarını zorlaştıran temel nedenlerden biri, kannabinoidlerin lipid yapıda olmaları ve sulu ortamlarda çözünürlüklerinin oldukça düşük olması, yarılanma ömürlerinin kısa olması ve stabilite sorunlarının olmasından kaynaklanmaktadır [129]. Yağ yapılı ekzojen ya da endojen kannabinoidlerin tümör tedavisinde ilaç adayı olabilmeleri için uzun süre kontrollü salımlarının sağlanması gerekmektedir [126, 130]. Bu amaçla literatürde kannabinoidlerle sınırlı sayıda nanopartiküler salım sistemi çalışması bulunmaktadır [131, 132]. Literatürde kannabinoidler ile yapılan salım sistemleri Çizelge 2.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Kannabinoidlerle ilgili salım sistemleri ve etkileri (CBD: Kannabidiol; CB13: Sentetik CB1/CB2 agonisti; URB597: FAAH inhibitörü; AM251: CB1 antagonisti)

Kannabinoid Türü	Salım Sistemi	Etki	Referans
CBD	Polikaprolakton mikropartiküller (10 günlük salım profili) (Amaç; İlacın stabilitesinin ve biyoyararlanımının artırılması)	Meme kanseri hücrelerinin çoğalmasında ↓	[126]
CB13	CB13 yüklü PLGA nanopartiküller (Amaç; <i>in vitro</i> karakterizasyon ve salım çalışması)	Nöropatik ağrı tedavisinde oral uygulama amaçlı çalışılmıştır.	[127]

Δ^9 -THC	PEG-PLGA nanopartikül (Amaç; <i>in vitro</i> karakterizasyon ve salım çalışması)	32. günde tümör hacminde 2.2 kat ↓	[132]
CB13	CB13 yüklü lipid nanopartiküller (Amaç; <i>in vitro</i> karakterizasyon ve salım çalışması)	NIH/3T3 fibroblast, HEK-293T böbrek ve Caco-2 kolorektal kanser hücrelerini etkilememiştir.	[128]
CB13	CB13 yüklü üç farklı PLGA nanopartikül (15 günlük salım profili)	Nöropatik ağrılı fare modelinde ilaç salımı ile ağrı kesici etki	[133]
Rimonabant (SR141716)	Rimonabant yüklü lipid nanopartikül (Amaç; <i>in vivo</i> rat modelinde salım çalışması)	İlaç miktarına bağlı olarak rat beyinde rimonabant birikimi	[134]
URB597, AM251 ve Rimonabant	Kannabinoid yüklü lipid nanopartikül (Amaç; <i>in vitro</i> karakterizasyon ve salım çalışması)	%100'e yakın ilaç yükleme etkinliği saptanmıştır.	[131]

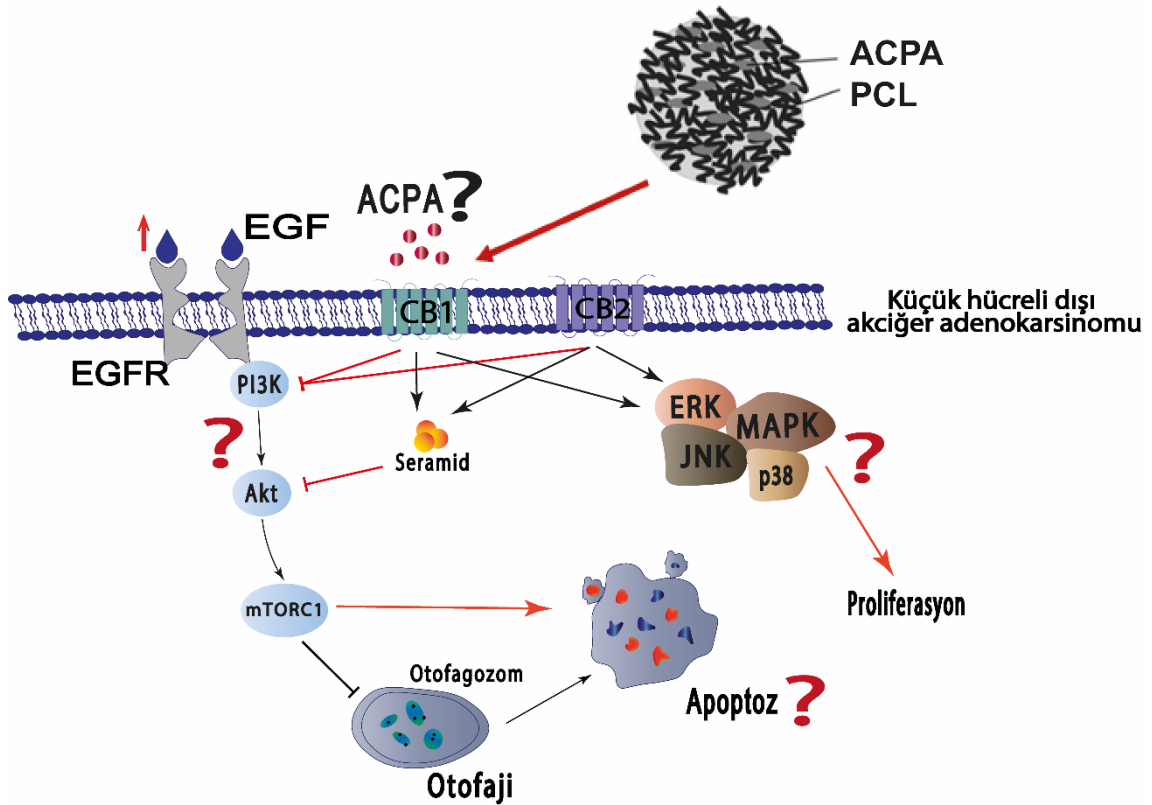
Polikaprolakton (PCL), mühendislik ve rejeneratif tıpta oldukça yaygın olarak kullanılan ve biyodegradasyon kapasitesi yüksek bir polimerdir [135]. Biyouyumlu ϵ -kaprolakton monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan biyouyumlu bir polimerdir [135]. Son yıllarda PCL, uzun süreli etki gösterebilecek ilaç taşıma sistemlerinde tercih edilmektedir. Polikaprolaktonun tercih edilme nedeninin düşük bozunma hızı olduğu ifade edilmiştir [135]. Öte yandan, PCL hidrofobik yapısından kaynaklı olarak taşıyıcı matriks içinde özellikle lipofilik yapıda ilaçların homojen dağılımını sağlayabilmektedir [136].

Anandamid yüklü PCL nanopartiküller, HEK-293 insan embriyonik böbrek hücrelerinde AEA'in hücreye alımını arttırmıştır [137]. Anandamidin hücreye alımını etkileyen inhibitörlere karşı hücre zarı taşıyıcı proteinleri ile nanopartiküllerin doğrudan etkileşiminin sağlanması, AEA'in hücre dışındaki kaybının azaltılması bakımından önemlidir. Anandamid yüklü PCL nanopartiküllerin üretimi ile %95 oranında yükleme etkinliği saptanmış ve 20-80 nm büyüklüğünde nanopartiküller elde edilmiştir [138]. Kannabidiol yüklü PCL mikropartiküller ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 10 gün içinde anlamlı proliferasyon azaltıcı etki sağlanmıştır [126, 135]. Tetrahidrokannabinol yüklendiğinde, aynı PCL mikropartiküllerin RBL2H3 rat bazofilik lösemi ve Caco2 insan kolorektal karsinom hücrelerinde 9. günde hücre çoğalmasını azalttığı bildirilmiştir [139]. Aynı grup, CBD ve THC yüklü PCL mikropartikülleri uzun süreli salım için fare glioma tümör modelinde uygulamış; mikropartiküllerin tümör büyümesini, proliferasyonunu ve damarlanmasını azalttığını, apoptozisi uyardığını bildirmiştir [140]. Glioma tedavisi için CBD, lipid nanokapsüllere yüklendiğinde ve glioblastoma U373MG hücre hattında uygulandığında, hücre canlılığının doz bağımlı olarak azaldığı görülmüştür [141]. Literatürde PCL nanopartiküllerin akciğer kanserinde uygulandığı sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır [142]. Paklitaksel yüklü polikaprolakton içerikli 3 farklı polimer bazlı nanopartikülün yüzeyi kitosan ile kaplanıp Caco-2 kolorektal hücre hattı ve A549 KHDAC hattında uygulanmış ve hücre canlılığının doz bağımlı azaldığı saptanmıştır [143]. Kalsiyum kanal blokörü tetrandrinin, antitümöral etkisinin değerlendirilebilmesi için amfifilik poli(N-vinilpirolidon)blok-poli(ε-kaprolakton) (PVP-b-PCL) kopolimerlere yüklenmiş ve nanopartikül sisteminin KHDAC hattı A549 hücrelerinde B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) ve B-hücre lenfoma-ekstra büyük (Bcl-xL) proteinlerinin inhibisyonu üzerinden apoptozu uyardığı görülmüştür [144].

Akciğer kanseri için geliştirilen nanopartiküler kontrollü ilaç salım sistemleri sınırlı sayıdadır [132]. Polietilen glikol (PEG) ve poli laktik-ko-glikolikasit (PLGA) nanopartikül sistemine yüklenen THC, KHDAC hattı A549 ve Lewis akciğer LL2 hattına uygulandığında 10 gün süreyle salım sağlandığı, ilaç yüklü nanopartiküllerin boş olanlara göre 1.4 kat fazla sitotoksik etki meydana getirdiği gösterilmiştir [132].

Tezin gerekçe ve varsayımı;

Sonuç olarak, dünyada ve ülkemizde en yüksek mortaliteye sahip kanserler olan akciğer kanserlerinin en sık rastlanan türü; KHDAK'nde sistemik yan etkileri azaltılmış, tümöre hedefli, yeni tedavi stratejilerine ciddi gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda akciğer kanserlerinde ilaç adayı olarak araştırılan kannabinoidler CB1 reseptör agonizması aracılığıyla etki süreleri kontrollü olarak uzatılabilirse KHDAK için terapötik potansiyel taşıyabilir. ACPA, izole, potent CB1 reseptörü agonisti olarak biyoyoumlu ve biyodegradasyon hızı düşük PCL nanopartiküler sistemine yüklenerek uzun süreli kontrollü salınabilirse *in vitro* ortamda bir dizi KHDAK hattında gerçek zamanlı olarak çoğalmayı azaltıcı ve apoptozu uyarıcı bir tedavi ajanı olabilir. Şekil 2.4'te çalışmanın gerekçe ve varsayımı özetlenmiştir. Tezin giriş bölümünün son kısmında varsayımı test etmek için oluşturulan amaç ve hedefler ile beklenen yaygın etki yazılmıştır.



Şekil 2.4. ACPA'nın küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinomunda etkisi. ACPA'nın tek başına ve PCL nanopartiküller ile uygulandığında KHDAK hücrelerindeki olası apoptoz uyarıcı ve proliferasyonu engelleyici etkisi gösterilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Tasarımı; bu tez kapsamında *in vitro* koşullarda deney ve kontrol grupları içeren (belirli doz aralığında ACPA uygulanmış KHDAK hücreleri ve ilacın çözücüsü etanolün %1 oranda hazırlandığı besiyeri uygulanan KHDAK hücreleri) gözlemsel bir deney gerçekleştirilmiştir. Gruplara ait tekrar sayıları (n) Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Çalışma disiplinlerarası, rastgele seçilmiş ve ileriye yönelik olarak planlanmıştır. Bağımsız değişkenler, belirli doz aralığında ACPA uygulanmış hücre grupları ve kontrol grubu; bağımlı değişkenler, proliferasyon ve apoptoz deney verileridir.

Çizelge 3.1. Bağımlı ve bağımsız değişkenleri gösteren deney planı. Deney ve kontrol gruplarıyla gerçekleştirilen iş paketlerindeki tekrar (n) sayıları gösterilmektedir.

Bağımsız Değişkenler		Bağımlı Değişkenler		
Gruplar	Hücre Türü	WST-1 Proliferasyon Analizi (n)	Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi (n)	Apoptoz Analizi (n)
10 ⁻⁶ M ACPA	A549	6	3	-
	H1299	6	3	-
	H358	6	3	-
	H838	6	3	-
10 ⁻⁷ M ACPA	A549	6	3	-
	H1299	6	3	-
	H358	6	3	-
	H838	6	3	-
10 ⁻⁸ M ACPA	A549	6	3	-
	H1299	6	3	-
	H358	6	3	-
	H838	6	3	-
10 ⁻⁹ M ACPA	A549	6	3	-

	H1299	6	3	-
	H358	6	3	-
	H838	6	3	-
10⁻¹⁰ M ACPA	A549	6	3	-
	H1299	6	3	-
	H358	6	3	-
	H838	6	3	-
10⁻¹¹ M ACPA	A549	6	3	-
	H1299	6	3	-
	H358	6	3	-
	H838	6	3	-
10⁻¹² M ACPA	A549	6	3	1
	H1299	6	3	1
	H358	6	3	1
	H838	6	3	1
ACPA-PCL NP (10⁻¹¹M ACPA doz salımı)	A549	-	3	-
	H1299	-	3	-
	H358	-	3	-
	H838	-	3	-
ACPA-PCL NP (10⁻¹²M ACPA doz salımı)	A549	-	3	-
	H1299	-	3	-
	H358	-	3	-
	H838	-	3	-
PCL NP	A549	-	3	-
	H1299	-	3	-
	H358	-	3	-
	H838	-	3	-
Kontrol	A549	6	6	1
	H1299	6	6	1
	H358	6	6	1
	H838	6	6	1

Bu tez çalışması, Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı kapsamında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na ait laboratuvar alt yapısı ve teknik donanım kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül salım sistemi ve ACPA miktar tayinine ilişkin analitik yöntem geliştirme çalışmaları için Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'dan destek alınmıştır. Giriş bölümünde yer alan araştırma hedeflerini yanıtlamak amacıyla aşağıdaki iş paketleri tamamlanmıştır.

3.1. Kannabinoid Reseptörlerini Eksprese Ettiği Bilinen A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hücre Hatlarında CB1 ve CB2 Reseptör Düzeylerinin Saptanması

3.1.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattı Kültürü

Literatüre ait *in vitro* çalışmalarda insan kanserinden üretilen hücre hatlarının kullanımı bir ilacın etkisinin gösterilebilmesi ve farklı hatlarda bu etkinin konfirme edilebilmesi açısından oldukça önemlidir [145]. Bu doğrultuda insan kanser hücre hatları, kanseri engelleyici ilaç adaylarının terapötik etkilerini test etmek için temel modeller olarak sunulmaktadır [146]. Bu amaçla tez çalışmasında, araştırılan proliferasyon azaltıcı ve apoptotik temelli etkinin gözlenebilmesi için 6 hücre hattı kullanılmıştır.

Kannabinoid aracılı yanıtların işlenmesi için klasik CB reseptörlerini bulundurdıkları bildirilen A549 (ATCC®, CCL-185™) [16, 27], H1299 (ATCC®, CRL-5803™) [16], NCI-H358 (ATCC®, CRL5807™) [17, 117], NCI-H838 (ATCC®, CRL5844™) [18], NCI-H1975 (ATCC®, CRL-5908™) [147] ve SW-1573 (ATCC®, CRL2170™) [19, 26] küçük hücreli dışı akciğer hücre hatları ticari olarak satın alınmış ve soğuk zincirde laboratuvara aktarılmıştır. Ardından A549 hücre hattı için *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (DMEM HG), H838, H1299, H1975 ve H358 hatları için RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. SW-1573 hücre hattı ilk olarak *Leibovitz L-15 Medium* ile beslenmiştir. Ardından "ATCC® *Animal Cell Culture Guide*" protokolüne göre RPMI-1640 besiyerine değiştirilmiştir. Bazal besiyerlerine ek olarak %10 FBS (*Fetal Bovine Serum*), 2 mM %2 oranında L-glutamin ve %1 oranında penisilin-streptomisin ile optimal

kültür koşullarında çoğaltılmıştır. Hücreler uygun kültür kaplarında %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C sıcaklıkta kültüre edilmiştir. İleriki aşamalarda kullanabilmek için hücreler belirli pasaja kadar çoğaltılmıştır.

3.1.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında qRT-PCR ile CB1 ve CB2 Reseptör İfadesinin Değerlendirilmesi

3.1.2.1. RNA İzolasyonu

Klasik kannabinoid reseptörlerini sentezlediği bilinen A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücre hatlarında CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonu tespiti amaçlı gen ifade analizi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda %70-80 oranda konfluense ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve fosfat tamponlu tuz çözeltisi (*Phosphate Buffered Saline – PBS*) ile hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Ardından 1 ml trizol (#T9424, Sigma-Aldrich, Almanya) RNA izolasyon materyali üretici talimatlarına göre ortama eklenerek kültür kabının tabanına yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlanmıştır. İzole edilen RNA'lar toplanarak 1.5 ml'lik tüpe alınmıştır. RNA'ların kalite kontrolünü yapabilmek amacıyla üzerine 200 µl kloroform eklenip karıştırılmış, +4 °C sıcaklıkta 15 dakika boyunca 12000 g'de santrifüj edilmiş ve ardından steril 1.5 ml'lik tüpe üst faz aktarılmıştır. Üst faza 750 µl %100'lük etil alkol eklenip karıştırılmıştır. Karıştırılan faz -20 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiş, sonrasında +4 °C sıcaklıkta 10 dakika 12000 g'de santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. İzole edilen RNA'ların (#74104, Qiagen, ABD) miktar ve saflığı, NanoDrop spektrometre ile (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, ABD) 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

3.1.2.2. cDNA Sentezi ve qRT-PCR Analizi

Miktarı ve saflığı kontrol edilen RNA'lardan QuantiTect® *Reverse Transcription Kit* (#205310, Qiagen, ABD) ile 500 ng cDNA sentezlenmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) işleminde *LightCycler® 480* (Roche, İsviçre) cihazında *PowerUp SYBR-Green Master Mix* (#A25741, ThermoFisher Scientific, ABD) floresan boyası kullanılmıştır. Çalışılan genlere ait göreceli mRNA ifade analizi için “ ΔC_t ” kantitatif hesaplama yöntemi ve *ViiATM 7 Software* (Versiyon 1.2.4) kullanılmıştır. Bu yöntem ile hesaplanmak istenen

mRNA ifade farklılığı, gen ifadesi hücrede en az değişiklik gösteren *house-keeping* gen ifadesine göre normalize edilmiştir. Hücrelerdeki CB1 (CnR1) ve CB2 (CnR2) reseptör seviyeleri, beta-aktin (β -aktin) gen ifadesine kıyaslanarak hesaplanmıştır. Deney için tasarlanmış primer uzunlukları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Bu aşama, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin (HUNİTEK) olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. qRT-PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri. Beta-aktin (β -aktin), CnR1 ve CnR2 reseptör analizleri için hazırlanan oligonükleotid dizileri gösterilmektedir.

Gen		Oligonükleotid Dizisi
β -aktin (ACTB)	Forward	5'-CGCAAAGACCTGTACGCCAAC-3'
β -aktin (ACTB)	Reverse	5'-GAGCCGCCGATCCACACG-3'
CB1 Reseptörü (CnR1)	Forward	5'-TACCTGATGTTCTGGATCGG-3'
CB1 Reseptörü (CnR1)	Reverse	5'-CCATGCGGGCTTGGTCTG-3'
CB2 Reseptörü (CnR2)	Forward	5'-CTATCCACCTTCCTACAAAGC-3'
CB2 Reseptörü (CnR2)	Reverse	5'-TGAGGCACAGCATGGAGCAG-3'

3.1.3. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Akım Sitometrisi ile CB1 ve CB2 Reseptör İşaretlenmesinin Değerlendirilmesi

Altı farklı KHDAK hattında CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonu akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmiştir. Hücreler kannabinoid reseptörleri Anti-insan CB1 (ab3558, Abcam, ABD) ve Anti-insan CB2 (ab3561, Abcam, ABD) ile işaretlenmiştir.

Kültüre edilen hücreler %70-80 oranda yoğunluğa ulaştıklarında besiyerleri uzaklaştırılmış ve PBS ile hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Ardından 100 μ l hücre süspansiyonu 12x75 ml'lik falkon tüpüne aktarılmıştır. PE işaretli CB1 antikoru ve FITC işaretli CB2 antikoru her bir tüpe 20 μ l olacak şekilde pipetlenmiştir. Alınan örnekler hafifçe vortekslenerek karanlık ortamda ve +4 °C oda sıcaklığında 20-30 dakika floresan işaretli antikorlarla inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler tekrar vortekslenmiş ve üzerine 1.5-2 ml tampon çözelti eklenerek 8-10 dakika +4 °C oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 5 dakika boyunca 1200 rpm hızda santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, pellet hafifçe vortekslenmiştir. Üzerine 2 ml yıkama solüsyonu eklenmiş ve tüp tekrar vortekslenmiştir. Santrifüj aşaması tekrar edildikten sonra 500 µl yıkama solüsyonu pellete eklenmiştir. FACS Aria (Becton Dickinson, San Jose ABD) model cihazda hücre hattı örneklerinde karşılaştırmalı analiz yapılarak hücrelerin CB1 ve CB2 reseptörleriyle işaretlenme oranları yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.1.4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında İmmünohistokimyasal İnceleme

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde CB1, CB2, NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL tespiti için immün işaretleme yapılmıştır. Konfluent olan hücreler tripsin (03-052-1B, Biological Industries, ABD) ile muamele edildikten sonra santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet ile hücre sayımı yapılmıştır. Thermanox® plastik steril *coverslip* plakalar üzerine 5000 hücre gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Daha sonra uygun hücre kültürü koşullarında inkübe edilmiştir. Konfluense ulaşan hücrelerin (ekimden 48 saat sonra) besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. 30 dakika kurutma suretiyle fiziksel olarak tespit edilen hücreler %4 paraformaldehit ile kimyasal olarak fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası hücrelerin PBS ile yıkanması ile hücrelerdeki fazla fiksatifin uzaklaşması sağlanmıştır. Uygulanacak antikörlerin penetrasyonunu sağlamak için hücreler 100'er µl %0.2 Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile yıkama sonrası endojen peroksidaz blokajı için hücreler soğuk metanol içindeki %3 H₂O₂ (216763 – Sigma-Aldrich, Almanya) ile muamele edilmiştir. Antikör uygulamasından önce spesifik olmayan bağlanmayı engellemek amacıyla hücreler 200'er µl %2.5 sığır serum albümini (BSA) (A3803, Sigma-Aldrich, Almanya) ile 45 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Anti-insan CB1 (C28866 – Sigma-Aldrich, Almanya), Anti-insan CB2 (HPA-028718 – Sigma-Aldrich, Almanya), Anti-insan DAGL (ab84733 – Abcam, İngiltere), Anti-insan MAGL (100035 – Cayman, ABD) ve Anti-insan NAPE-PLD (HPA-019832 – Sigma-Aldrich, Almanya) antikörleri için 1:100 ve FAAH (HPA-007425 – Sigma-Aldrich, Almanya) antikoru için 1:50 oranları kullanılarak %1 normal fare serumu içeren PBS içinde hazırlanmıştır. *Coverslip* plakalardan normal serum uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan primer antikörler, *coverslip*

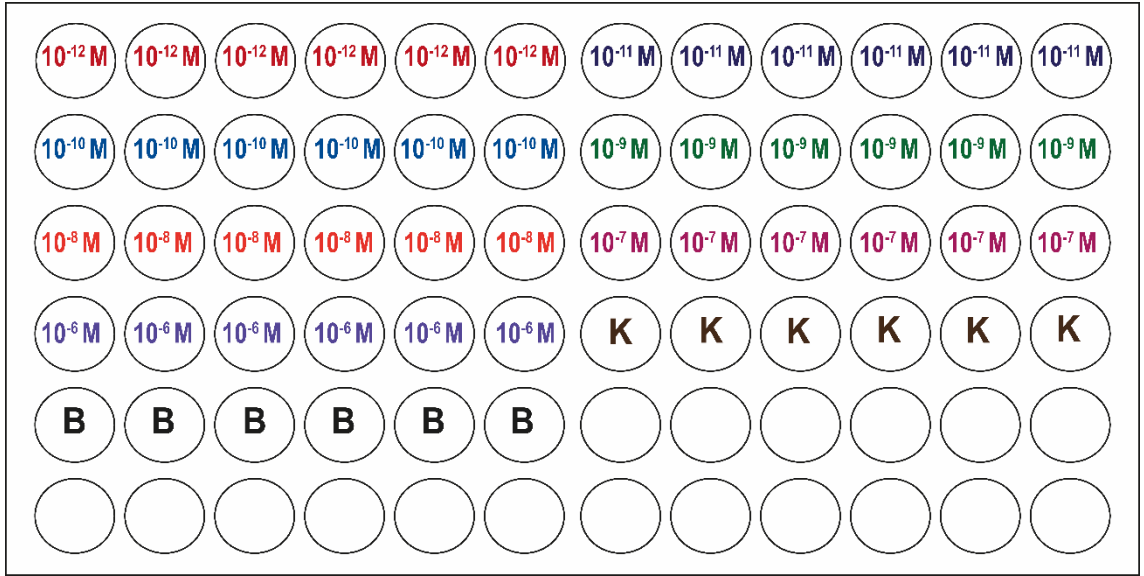
başına 200 µl olacak şekilde eklenip bir gece boyunca +4 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.

Primer antikor ile bir gece bekletilen hücreler önce PBS ile yıkanmıştır. Ardından biotin (SAB4200363 – Sigma-Aldrich) ve avidin-peroksidaz (E8386 – Sigma-Aldrich) sekonder antikorlar 1:50 oranında hazırlanmıştır. Biotin sekonder antikoru *coverslip* plakalara damlatılmış ve 30 dakika nemli ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından biotin antikoru hücrelerden uzaklaştırılmıştır. Avidin sekonder antikoru eklenerek 30 dakika nemli ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yıkama yapıldıktan sonra peroksidaz aktivitesi için kromojen diaminobenzidin (DAB) (D6065 – Sigma-Aldrich, Almanya), DAB substratı (D6190 – Sigma-Aldrich, Almanya) içinde 1:1000 oranında hazırlanmış ve hücrelerle 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından distile su ile yıkama yapılan hücrelere çekirdek zemin boyaması için hematoksin damlatılmıştır. Boyama sonrası dereceli alkollerden geçirilip şeffaflandırılan *coverslip* plakalar entellan ile kapatılmıştır. Kannabinoidlere ait immün işaretlenmeler, Leica Mikroskop (Leica DMB6 B) ve dijital kamera ataşmanı (Leica DFC7000 T) ile görüntülenmiştir.

3.2. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Hücre Hatlarında, Sentetik Spesifik CB1 Agonisti ACPA'nın, *in vitro* Ortamda Doz Bağımlı Olarak Hücre Çoğalması Üzerine Etkisinin Saptanması

Kannabinoid 1 reseptörünü eksprese eden KHDAC hücreleri qRT-PCR yöntemi ile belirlendikten sonra bu hücrelerin optimum kültür koşulları ile çoğalıp konfluense ulaşması sağlanmıştır. %70-80 konfluense ulaşan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılmış, ardından hücreler PBS ile yıkanmış ve tripsin eklenmiştir. Hücreler 15 ml'lik tüpler içinde santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısımları uzaklaştırılan hücreler, her bir kuyucuğa 5000 hücre içeren 200 µl hücre süspansiyonu gelecek şekilde hesaplanıp 96 kuyucuklu hücre plakalarına ekilmiştir. Hücre plakasına ekim prosedürü Şekil 3.1'de verilmiştir. Hücrelerin tutunmasıyla beraber (ekimden 24-48 saat sonra) bir seri dozda hazırlanan sentetik CB1 agonisti ACPA besiyeri içinde 10^{-6} - 10^{-12} M doz aralığında hazırlanarak hücrelere verilmiştir. ACPA doz aralığı literatürle uygun olacak şekilde belirlenmiştir [11, 21, 22]. Plaklar sırasıyla 1, 2 ve 3. günlerde 10'ar µl *Water Soluble Tetrazolium-1* (WST-1) ajanının (11644807001 – Roche Applied

System, İsviçre) eklenmesi ve 4 saat inkübasyon sonrasında VersaMax Microplate Reader (Molecular Device, ABD) mikroparka okuyucuda okunmuş ve hücre proliferasyon düzeyleri belirlenmiştir. Hücre sayısının en fazla düştüğü gün/günler ve doz aralığı saptanmıştır. Buna uygun olarak etkili dozun ve zamanın tespiti bir sonraki aşamada gerçekleştirilmiştir. Böylece karşılaştırma yapılarak hücrelerin çoğalma hızını en fazla düşüren doz ve zaman aralığı belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Doksan altı kuyucuklu hücre plaklarına ekim protokolü. Her doz n=6 tekrarlı olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. qRT-PCR ile CB1 reseptör ifadesi değerlendirilen hücrelerde 10^{-6} - 10^{-12} M doz aralığında ACPA hücrelere uygulanmıştır (K: Kontrol; B:Besiyeri).

3.3. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Bulunduran Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hatlarında ACPA'nın Proliferasyonu Azaltıcı (EC50/IC50) Dozunun Gerçek Zamanlı Olarak Saptanması

Hücreler üzerinde selektif CB1 agonisti ACPA'nın antiproliferatif etki düzeyinin değerlendirilmesiyle birlikte bir seri dozda proliferasyona etkisinin gerçek zamanlı ve doz bağımlı olarak ölçülebilmesi amaçlı hücre kültüründe çoğaltılan hücreler tabanı impedansı kaydeden altın mikroeletrotlarla kaplı 96 kuyucuklu hücre plakalarına ekilmiştir. A549, H1299 ve H838 hücre hatları için kuyucuk başına 5000 hücre gelecek şekilde 200 µl hücre süspansiyonu, hücre plakalarına ekilmiştir. H358 hücre hattı için her kuyucuğa 7000 hücre gelecek şekilde 200 µl hücre süspansiyonu hücre plakalarına ekilmiştir. Böylece gerçek zamanlı olarak

her 15 dakikada bir hücrelerin tabana yaptıkları basının impedansına ait veriler “hücre indeksi” olarak kaydedilmiş ve yaklaşık 24-48 saat sonrasında farklı dozlarda (10^{-9} - 10^{-12} M) hazırlanan ACPA hücrelere verilmiştir. Kannabinoidlerin doz bağımlı ve gerçek zamanlı olarak hücre proliferasyonuna etkisi xCELLigence (ACEA, Roche Applied System, İsviçre) ile ölçülmüştür. A549 hücreleri için 220, H1299 hücreleri için 178, H358 hücreleri için 210 ve H838 hücreleri için 194 saat süre ile hücre indeksleri kaydedilmiş ve hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir. Hücrelere her doz 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Bu yöntemle kannabinoidlerin proliferasyon azaltıcı ve apoptoz başlatıcı etkili dozunun (EC50/IC50) tespit edilmesi sağlanmıştır.

3.4. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Hücre Hatlarında, Sentetik Spesifik CB1 Agonisti ACPA'nın, *in vitro* Ortamda Apoptoz Üzerine Etkisinin Akım Sitometrisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi

Gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile belirlenen EC50/IC50 değerleri sonucunda proliferasyon azaltıcı etkiye duyarlılığı en fazla olan KHDAC hücrelerine akım sitometrisi ile apoptotik etkinlik tespiti amaçlı *Annexin-V/Propidium Iodide (FITC Annexin Apoptosis Detection Kit I*, 556547 – BD Pharmingen, ABD) işaretleme yapılmıştır. Bu amaçla, 25 cm² alana sahip kültür kaplarında kültüre edilen kanser hücreleri %70-80 konfluense ulaştıklarında belirlenen 1.39×10^{-12} M (IC50) ACPA dozu 4 ml hacimde uygulanmıştır. Uygulama sonrası 24, 36, 48 ve 72. saatlerde hücreler soğuk PBS ile yıkanmış ve seyreltilmiş tripsin çözeltisi ile kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler besiyeri içinde 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır. 1200 rpm hızda 5 dakika hücreler santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası PBS içinde hücre sayımı yapılmış ve 500.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu yeni tüplere aktarılmıştır. Hücreler tekrar 1200 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra 1X *Binding Buffer* 100'er µl hacimde eklenmiştir. Karanlık ortamda her tüpe 5 µl *Annexin-V* (Component no. 51-65874X) ve 5 µl *Propidium Iodide* (Component no. 51-66211E) pipetlenip yavaşça vortekslenmiştir. Hücreler oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından her tüpe 400 µl 1X *Binding Buffer* eklenerek NovoCyte® 3000 (ACEA Biosciences, Inc., İsviçre) akım sitometri cihazında ölçüm yapılmıştır.

3.5. ACPA'nın Hücre Süpernatantlarındaki Miktarının Tayini

Literatürde yarı ömrü kısa olduğu bilinen saf ACPA'nın hücre içine alınmasına ilişkin bir bulgu yer almamaktadır. Bu nedenle, grubumuz tarafından 10^{-6} M dozda ACPA, KHDAK A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hatlarına uygulandıktan sonra 1, 2 ve 3. günlerde ortamda kalan ACPA miktarı tayini için Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile kantitatif ölçümler yapılmıştır.

3.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Amber renkli şişede -20°C sıcaklıkta saklanan stok ACPA çözeltisi (5 mg/8.5 ml) kullanılarak 0.1 mg/ml (100 ppm), 0.01 mg/ml ve 0.001 mg/ml derişimde çözeltiler seyreltilerek günlük hazırlanmıştır. Hareketli faz A (%0.1 formik asit içeren su) hazırlanması için 250 ml'lik balon joje içine 100 ml su ve üzerine 0.250 ml derişik formik asit çözeltisi eklenmiştir. Hızlıca karıştırıldıktan sonra çözeltinin hacmi toplamda 250 ml olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Hareketli faz B (%0.1 formik asit içeren asetonitril) için 250 ml'lik balon joje içine 100 ml asetonitril ve üzerine 0.250 ml derişik formik asit çözeltisinden eklenmiştir. Hızlıca karıştırıldıktan sonra çözeltinin hacmi 250 ml olacak şekilde asetonitril ile tamamlanmıştır.

3.5.2. Örneklere Ait Çözeltilerin Hazırlanması

Hazırlanan örneklerden 100 µl ilaçlı besiyeri alınarak ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 200 µl asetonitril eklenmiş ve 30 saniye vortekslenmiştir. Tüpler, 15000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası elde edilen berrak santrifügattan 100 µl alınmış ve üzerine % 0,1 formik asit eklenmiştir. Hazırlanan örnekler LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

3.5.3. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

ACPA miktar tayini analizinde kullanılacak kalibrasyon eğrisini hazırlamak için ilaçsız plazma örneklerine 5.0 (5 ppm) – 0.05 (0.05 ppm) µg/ml derişim aralığında altı farklı nokta için standart ACPA eklenerek hazırlanmıştır. Numune çözeltilerinin hazırlanmasına ait işlem basamakları yapıldıktan sonra standart eklenen örnekler için analiz yapılmıştır.

3.5.4. ACPA Miktar Tayini

ACPA'nın süpernatantlardan tayini için yüksek hassasiyete sahip Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılmıştır. Bu yöntemde C18 kolon (50 mm x 3 mm, 3 µm) ve % 0,1 formik asit:% 0,1 formik asit içeren asetronitril (95:5, h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Gradient elüsyon programı 0. dakikadan 2. dakikaya kadar B hattı %40'te sabit tutulmuştur. 2. dakikadan 4. dakikaya B hattı derişimi %80 çıkarılmış, 3 dakika boyunca sabit tutulmuştur. 1 dakika içinde tekrar %40'a indirilmiştir. Akış hızı 0.35 mL/dakika ve kolon fırın sıcaklığı 40 °C'dir. ACPA için çalışılan *Multiple-Reaction-Monitoring* (MRM) koşulları; pozitif iyonizasyon modunda 14 eV'luk çarpışma enerjisi kullanılarak 344,30 m/z - 203,10 m/z kütle parçalanmaları takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.6. ACPA'nın Stabilesi ve Uzun Süreli Sabit Salımını Sağlayabilecek Nanomühendislik Temelli ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sisteminin Geliştirilmesi

3.6.1. Kontrollü Salım Sistemi için Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

ACPA'nın kısa yarı ömürlü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, saf ACPA için stabilize tayini çalışmaları yapılmıştır. Buna göre, ACPA'nın (Tocris, Cat. No. 1318, Batch No: 4A/211832) taze stokundan örnek alınarak +4 °C'de 1, 2, 3, 6 ve 8 gün süreyle bekletilmiştir. Stabilesini koruyan ACPA miktarı LC-MS/MS cihazında ölçülerek elde edilen sonuçlar grafiğe aktarılmıştır.

ACPA yüklü polimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için hidrofobik bir polimer olan sentetik polikaprolakton (PCL) polimerinden yararlanılmış ve literatürde sıklıkla bu amaçla kullanılan çöktürme ve tekli emülsiyon yöntemleri denenerek en uygun ve sade hazırlama yöntemi seçilmiştir. Bu doğrultuda tekli emülsiyon yöntemi için %0.1 (w/v) PCL ve %0.01 (w/v) ACPA (100 µg) içeren diklorometan:etanol (DCM:EtOH) (9:1; v/v) karışımı hazırlanmıştır. Ardından karışım 550 rpm'de karıştırıcıya koyulmuş ve şırınga yardımıyla %1 (w/v) Pluronik F68 içeren ultra saf su karışıma eklenmiştir. Nihai karışım 30 dakika boyunca 550 rpm hızda karıştırılmıştır. Karıştırma aşamasından sonra karışımdaki organik çözücülerin uzaklaştırılabilmesi için döner evaporatörde (*rotary evaporator*) 30 dakika karışım bekletilmiş ve

nanopartiküller 45 µm por çapına sahip filtrelerden geçirilerek sulu dispersiyon halinde elde edilmiştir. Çöktürme yöntemi için, %0.1 (w/v) PCL ve %0.01 (w/v) ACPA içeren asetonitril:etanol (9:1; v/v) karışımı hazırlanmıştır. Ardından karışım 550 rpm'de karıştırıcıya koyulmuş ve şırınga yardımıyla %1 (w/v) Pluronik F68 içeren ultra saf su karışıma eklenmiştir. Nihai karışım 30 dakika boyunca 550 rpm hızda karıştırılmıştır. Otuz dakika döner evaporatörde karışım bekletildikten sonra nanopartikül dispersiyonları 45 µm por çapına sahip filtrelerden geçirilerek serbest ACPA'nın uzaklaşması sağlanmıştır. Nanopartiküle ait karakterizasyon işlemi yapıldıktan sonra tek bir yöntem ile nanopartiküller hazırlanmıştır.

Nanopartikül dispersiyonlarını hazırladıktan sonra 48 saat boyunca nanopartiküller liyofilize edilerek toz halde elde edilmiştir. Toz nanopartiküller DCM içinde çözünmüş ve bu çözelti etanol içine eklenerek nanopartiküllerin tamamen çözünmesi ve yüklenen ilacın serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Bu işlem ile salım profili deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonunun *in vitro* Ortamda Karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* ortamda karakterizasyon çalışmaları yapılarak nanopartiküllerin polidispersite indeksi, partikül büyüklüğü, stabilitesi, yüzey yükü, ilaç yükleme etkinliği ve ilaç salım profili incelenmiştir. Hücre kültür çalışmalarında kullanılmak üzere hedef bölge için en uygun nanopartikül formülasyonu belirlenmiştir.

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI), dinamik ışık saçılımı tekniği ile kapiler zeta kuvvetleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin zeta değerlerinin ve yüzey yükünün belirlenmesinde *Zetasizer Nano ZS* cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan nanopartikül dispersiyonlarının partikül büyüklüğü ve PDI tayini amacı ile 0.9 ml'lik örnekler alınarak zeta kuvvetlerine koyulmuştur. Partikül büyüklüğü tayini için 25 °C sıcaklığında n=3 tekrarlı olarak 173° açıda tayin yapılmıştır. Yüzey yükü ölçümleri, partikül büyüklüğü tayini ile eş zamanlı olarak 12.8° açıda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilerek mV cinsinden verilmiştir.

İlaç yükleme kapasitesinin ölçümü ve ilaç salım profilinin hazırlanmasında LC-MS/MS analitik miktar tayin yönteminden yararlanılmıştır. İlaç yükleme etkinliği için n=6 tekrarlı olacak şekilde nanopartikül örneklerinin ölçümü yapılmıştır. İlaç salım profilinin belirlenmesinde diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Bunun için diyaliz membran (D977, Sigma-Aldrich, Almanya), içinde bulunan gliserolün uzaklaştırılması için 1 gece boyunca ultra saf suda bekletilmiştir. Ardından kükürt bileşiklerinin uzaklaştırılması için %0.3 (w/v) sodyum sülfid solüsyonunda 80 °C'de 1 dakika bekletilmiştir. Sıcak suda (60 °C) 2 dakika kadar diyaliz membran yıkanmıştır. Ardından membran, asidifiye etmek amaçlı %0.2 sülfürik asit solüsyonuna alınmıştır. Asidin uzaklaştırılması için sıcak su ile tekrar membran yıkanmıştır. 12000 veya üstü moleküler ağırlıktaki çoğu proteinin membranda kalması sağlanmıştır. Salım profili çalışması için hazır hale getirilen diyaliz membran tüpüne, nanopartikül dispersiyonu yerleştirilmiştir. Yirmi beş ml salım ortamından (PBS içinde) 0. dakika, 30 dakika, 1. saat, 4. saat, 8. saat, 16. saat, 1. gün, 2. gün ve 3. günde n=3 tekrarlı olacak şekilde 2 ml örnek alınarak LC-MS/MS yöntemi ile miktar tayini yapılmış ve salım profiline ait grafik % ACPA kümülatif salımı olarak elde edilmiştir. Yükleme etkinliği enkapsülasyon etkinliği (% EE) olarak verilmiş ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Enkapsülasyon Etkinliği} = \frac{\text{Ölçülen ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Başlangıçtaki ilaç miktarı } (\mu\text{g})} \times 100$$

3.7. Kannabinoid 1 Reseptörü Bulunduran Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hücre Hatlarında ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sistemi ile *in vitro* Ortamda Proliferasyonu Azaltıcı (EC50/IC50) Dozunu İçeren Formülasyonun Belirlenmesi

3.7.1. Hazırlanan İlaç Salım Sisteminin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İmpedans Temelli ve Gerçek Zamanlı Olarak Değerlendirilmesi

İş paketi 3.3'te ifade edildiği şekilde hücre kültürü ile çoğalıp konfluense ulaşan KHDAC hücrelerine hazırlanmış olan ilaç salım sistemi uygulanmıştır. Bunun için öncelikle tripsinizasyon aşaması gerçekleştirilmiş ve hücreler santrifüjlenmiştir.

Gerçek zamanlı ve doz bağımlı olarak ölçüm yapabilmek amaçlı hücre kültüründe çoğaltılan hücreler tabanı impedansı kaydeden altın mikroeletrotlarla kaplı 96 kuyucuklu hücre plaklarına ekilmiştir. A549, H1299 ve H838 hücre hatları için kuyucuk başına 5000 hücre gelecek şekilde 200 µl hücre süspansiyonu, hücre plaklarına ekilmiştir. H358 hücre hattı için kuyucuk başına 7000 hücre gelecek şekilde 200 µl hücre süspansiyonu hücre plaklarına ekilmiştir. Kannabinoid-nanopartikül salım sisteminin doz bağımlı, etkili ve gerçek zamanlı olarak hücre proliferasyonuna etkisi *xCELLigence* (RTCA, Roche Applied System, İsviçre) ile ölçülmüştür. Bu aşamada (İP 3.3)'te aktarıldığı gibi gerçek zamanlı olarak her 15 dakikada bir hücrelerin tabana yaptıkları basının impedansına ait veriler "hücre indeksi" olarak kaydedilmiş ve hücre indeksi 1.0'ı geçtikten sonra hazırlanan ACPA yüklü PCL nanopartiküller uygun dilüsyonlarda hücrelere verilmiştir. 1.39×10^{-12} M ve 1.39×10^{-11} M dozu salan ACPA-PCL nanopartikül salım sistemi besiyeri içinde 200 µl/kuyucuk şeklinde ekimden 24 saat sonra hücrelere uygulanmıştır. İlaç yüklenmemiş boş PCL nanopartiküller, 1.39×10^{-12} M ve 1.39×10^{-11} M dozu salan ACPA-PCL nanopartiküller ile aynı hacimde seyreltilerek uygulanmıştır. 1.39×10^{-12} M saf ACPA uygulanan gruplar 1, 2 ve 3. günlerde tekrar edilmiştir. A549 hücreleri için 144, H1299 hücreleri için 130, H358 hücreleri için 190 ve H838 hücreleri için 195 saat süre ile hücre indeksleri kaydedilmiş ve hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir. Hücreler için uygulanacak her doz 3 tekrarlı olarak, kontrol grupları 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle kannabinoidlerin kontrollü salımı ile antiproliferatif ve proapoptotik dozunun (EC50/IC50) uzun süreli etki etmesi sağlanmıştır.

3.8. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Araştırma kapsamında yapılması planlanan iş paketlerine göre bağımlı ve bağımsız değişkenler belirlenerek SPSS 25.0 istatistik programında çoklu ve ikili karşılaştırmalar, parametrik veya parametrik olmayan verilere göre uygulanmıştır. Tüm iş paketlerinden elde edilen verilerin normal dağılıma sahip olup olmadıkları Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir.

3.2, 3.3 ve 3.7 numaralı iş paketlerine ait deney çıktılarının verileri parametrik test varsayımlarını sağlamaktadır. Bu nedenle ikiden fazla bağımsız değişkenin karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi, ikili karşılaştırmalar için Duncan's

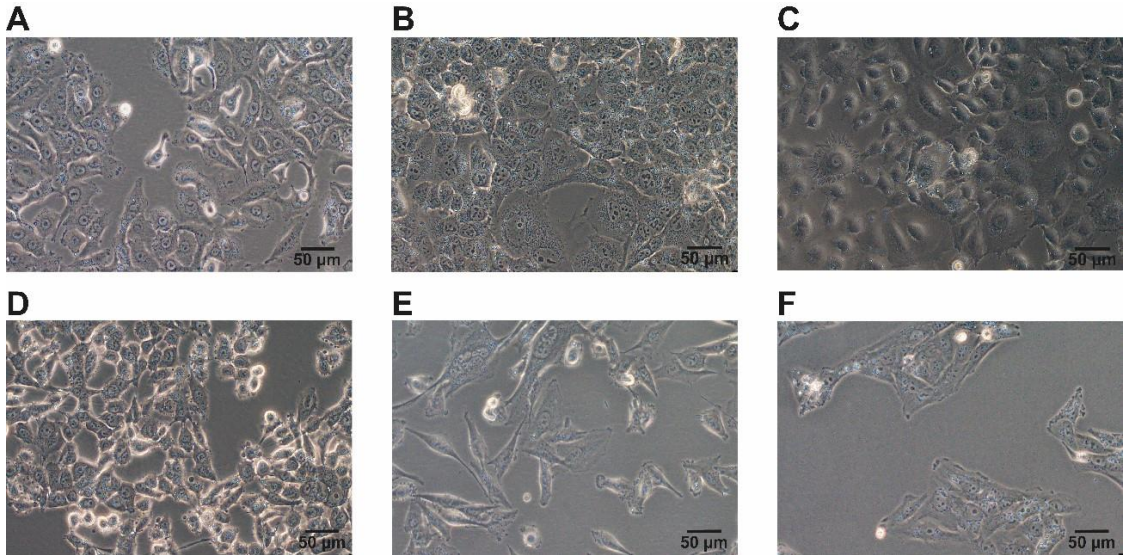
test kullanılmıştır. ACPA süpernatın miktar tayininin yapıldığı 3.5 numaralı iş paketi ve salım çalışmalarıının incelendiğı 3.6.2 numaralı iş paketine ait deney çıktılarıının normal dağılım göstermemeleri ve parametrik test koşullarını sağlamamaları nedeniyle çoklu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmalar için Bonferonni düzeltmesi kullanılmıştır. Veriler %95 güven aralığında değerlendirilerek parametrik test sonuçları için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma, parametrik olmayanlar için minimum, maksimum ve ortanca değerleri verilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Kültürü

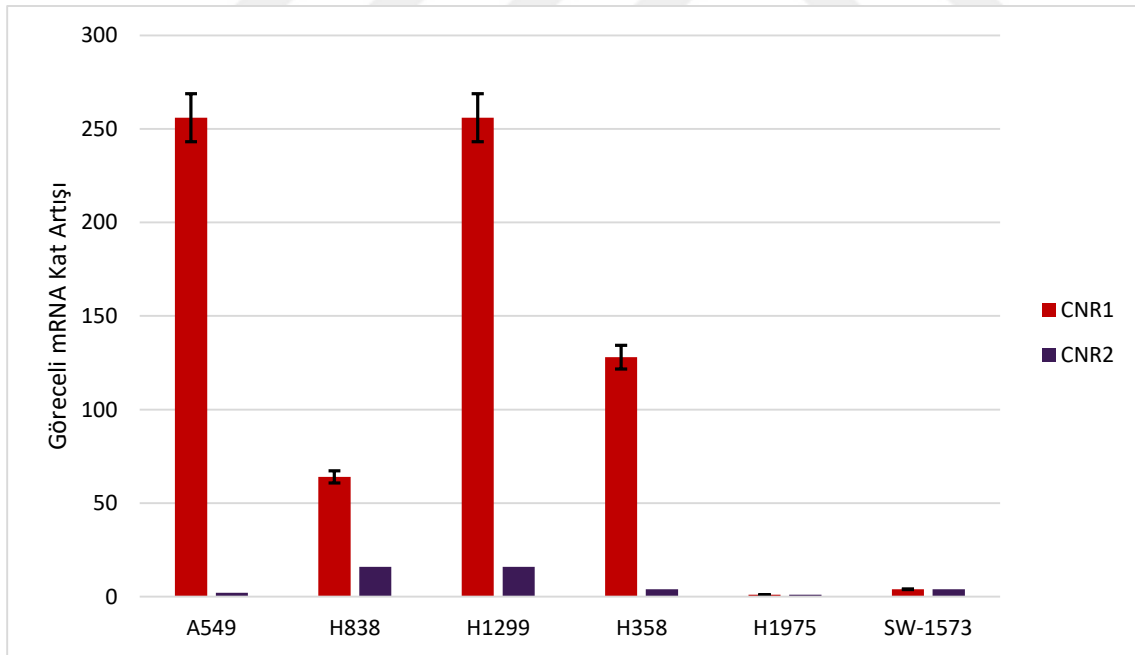
Ticari olarak laboratuvara getirilen A549, H1299, H358, H838, SW-1573 ve H1975 hücreleri optimal kültür koşullarında başarıyla üretilmiştir. A549 hücreleri insan alveolar bazal epitel kökenli adenokarsinom hücreleridir (Şekil 4.1.A). H1299 (Şekil 4.1.B) ve H838 hücreleri (Şekil 4.1.C) lenf nodu kökenli metastatik, H358 hücreleri (Şekil 4.1.D) bronkoalveolar kökenli metastatik akciğer kanseri hücreleridir. H1975 hücreleri (Şekil 4.1.E) ise primer küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinom, SW-1573 hücreleri (Şekil 4.1.F) alveolar hücre kökenli akciğer kanseri hücreleridir. Bu hücrelerde proliferasyon ve kanser ilişkili proteinlerin (EGFR, RAS, TP53 vb.) delesyona/insersiyona uğradığı bilinmektedir [148]. Bu nedenle bu hücre hatlarında proliferasyon derecesi diğer kanser tiplerine göre oldukça yüksektir. Kültür ortamında plastik kültür kaplarına yüksek oranda tutunma özelliği gösteren bu kanser hücrelerinin proliferasyon kapasitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hücre morfolojilerinin poligonalden fuziforma (iğsi) kadar değişiklik gösterdiği, bir araya gelerek odak oluşturdıkları ve kolayca kontakt inhibisyona gittikleri görülmüştür. Hücrelerde mitotik figür, artmış çekirdek/sitoplazma oranı, pleomorfizm saptanmıştır.



Şekil 4.1. Kültür plağına tutunmuş heterojen yapıları KHDAK hücre mikrografları. **(A)** A549, **(B)** H1299, **(C)** H838, **(D)** H358, **(E)** H1975 ve **(F)** SW-1573 X400.

4.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında qRT-PCR ile CB1 ve CB2 Reseptör İfadesinin Değerlendirilmesi

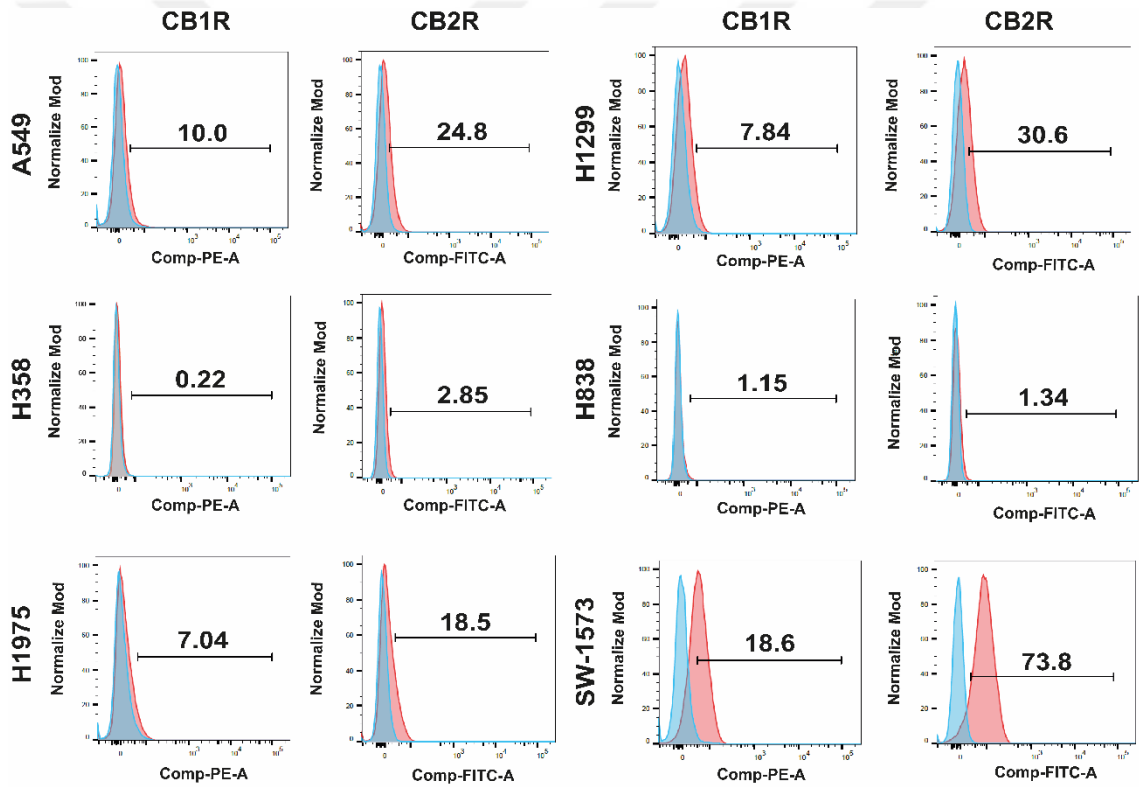
Klasik kannabinoid reseptörlerinin varlığını değerlendirebilmek amaçlı A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 KHDAK hatlarında CB1 ve CB2 reseptörlerinin ifadesi incelenmiştir. CNR1 ve CNR2 ekspresyon seviyesine ait grafik Şekil 4.2’de verilmiştir. Buna göre, A549, H1299 ve H358 hücrelerinde yüksek seviyede göreceli mRNA ekspresyonu saptanmıştır. Tez çalışmalarının devamında bu hücre hatları ele alınarak proliferasyon ve apoptoz testleri gerçekleştirilmiştir. H838 hücresinin A549 ve H1299 hücrelerine göre 4.0 kat daha düşük göreceli CB1 reseptörü mRNA ekspresyonu olduğu hesaplanmıştır. H838 ve H1299 hücrelerinde oldukça düşük CB2 reseptör ekspresyonu belirlenmiştir. H838 hücreleri yüksek seviyede CB1 reseptörü ekprese edilmemiş olsa dahi, tez çalışmasının devamında proliferasyon ve apoptoz testlerinde değerlendirmeye değer bulunmuştur. H1975 ve SW-1573 KHDAK hücrelerinde göreceli mRNA seviyesi saptanamamıştır. Bu nedenle, araştırmanın devamında bu hücreler değerlendirmelere alınmamıştır.



Şekil 4.2. KHDAK hücre hatlarında qRT-PCR yöntemiyle elde edilen göreceli mRNA kat artışı. A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücre hatlarının CNR1 (CB1 reseptör geni) ve CNR2 (CB2 reseptör geni) göreceli mRNA kat artışı gösterilmiştir.

4.3. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Akım Sitometrisi ile CB1 ve CB2 Reseptör İfadesinin Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında A549, H1299, H358 ve H838 akciğer kanseri hücre hatlarında akım sitometrisi yöntemiyle değişen oranlarda CB1 ve CB2 reseptör immün işaretlenmesi yapılmıştır. Buna göre, A549 hücrelerinde %10.0 CB1, %24.8 CB2 reseptör işaretlenmesi saptanmıştır. H1299 hücrelerinde %7.84 CB1 ve %30.6 CB2; H358 hücrelerinde %0.22 CB1 ve %2.85 CB2; H838 hücrelerinde %1.15 CB1 ve %1.34 CB2; H1975 hücrelerinde %7.04 CB1, %18.5 CB2 ve SW-1573 hücrelerinde %18.6 CB1 ve %73.8 CB2 reseptör immün işaretlenmesi belirlenmiştir (Şekil 4.3).

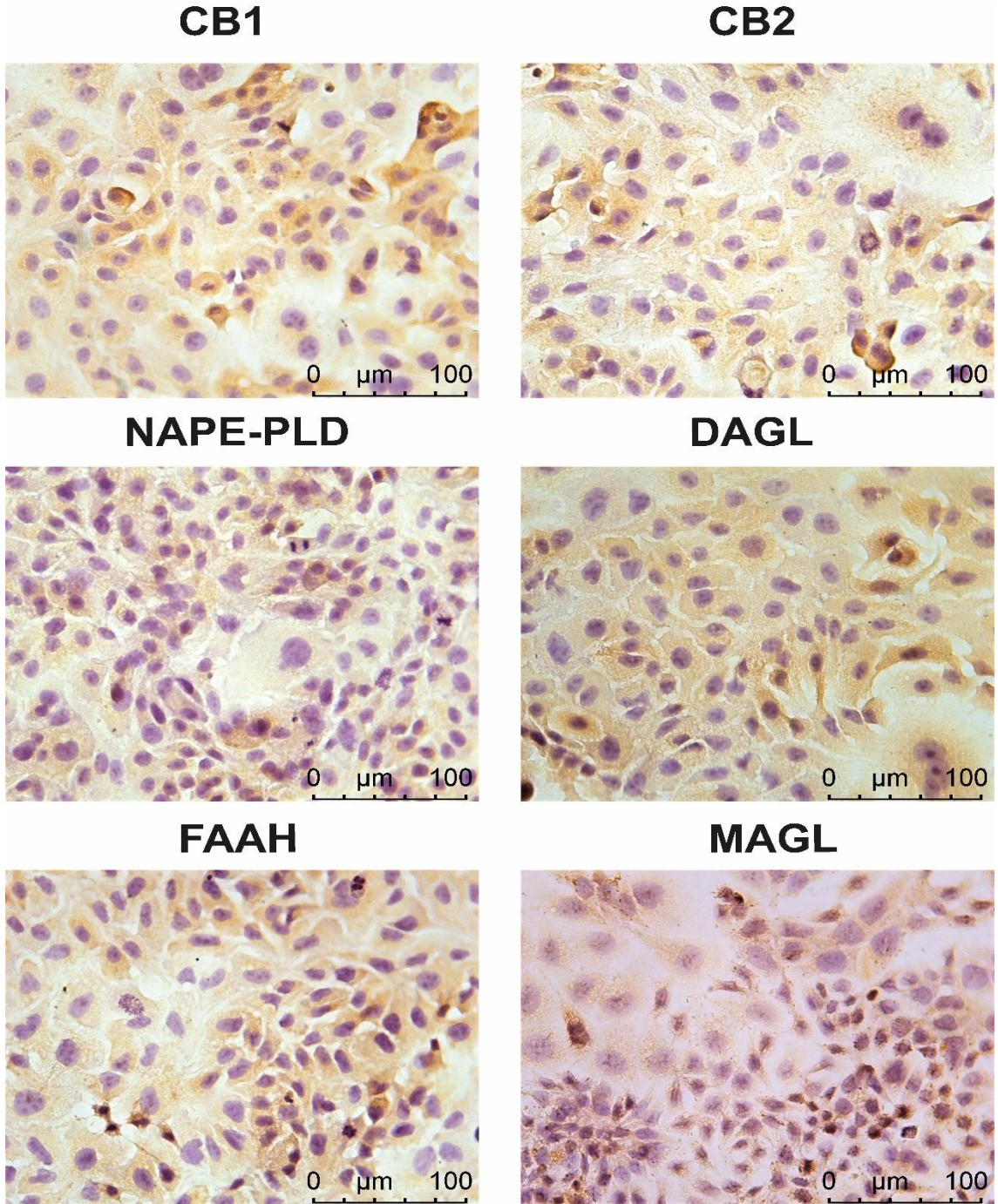


Şekil 4.3. KHDAK hücrelerinde CB reseptörlerinin akım sitometrisi ile işaretlenmesi. Sayılar işaretlenen hücre yüzdesini ifade etmektedir.

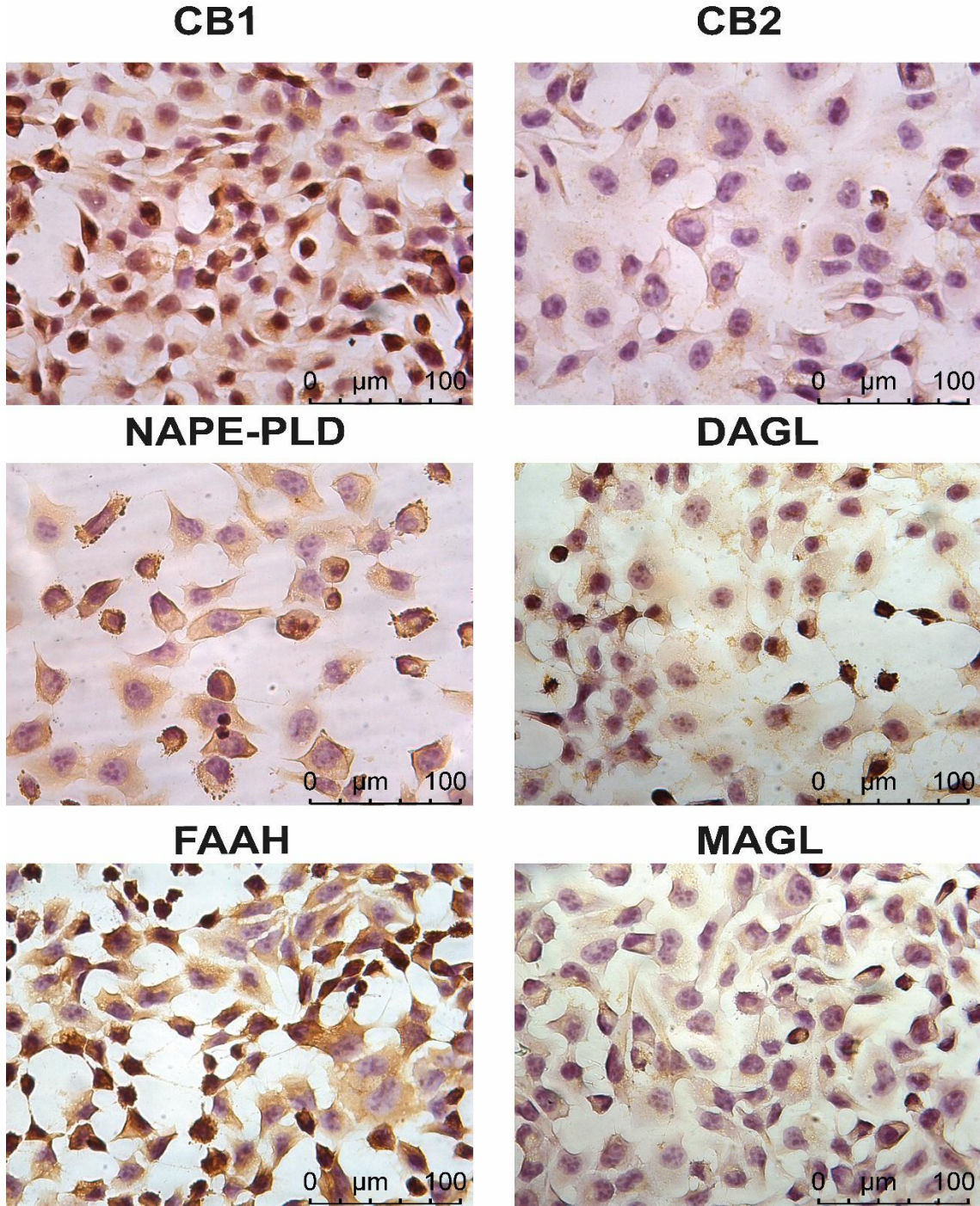
4.4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücrelerinde İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal yöntemle KHDAK hücrelerinde CB1, CB2, NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL işaretlemesi yapılmıştır. Her hücre dizisinde en az 5 farklı

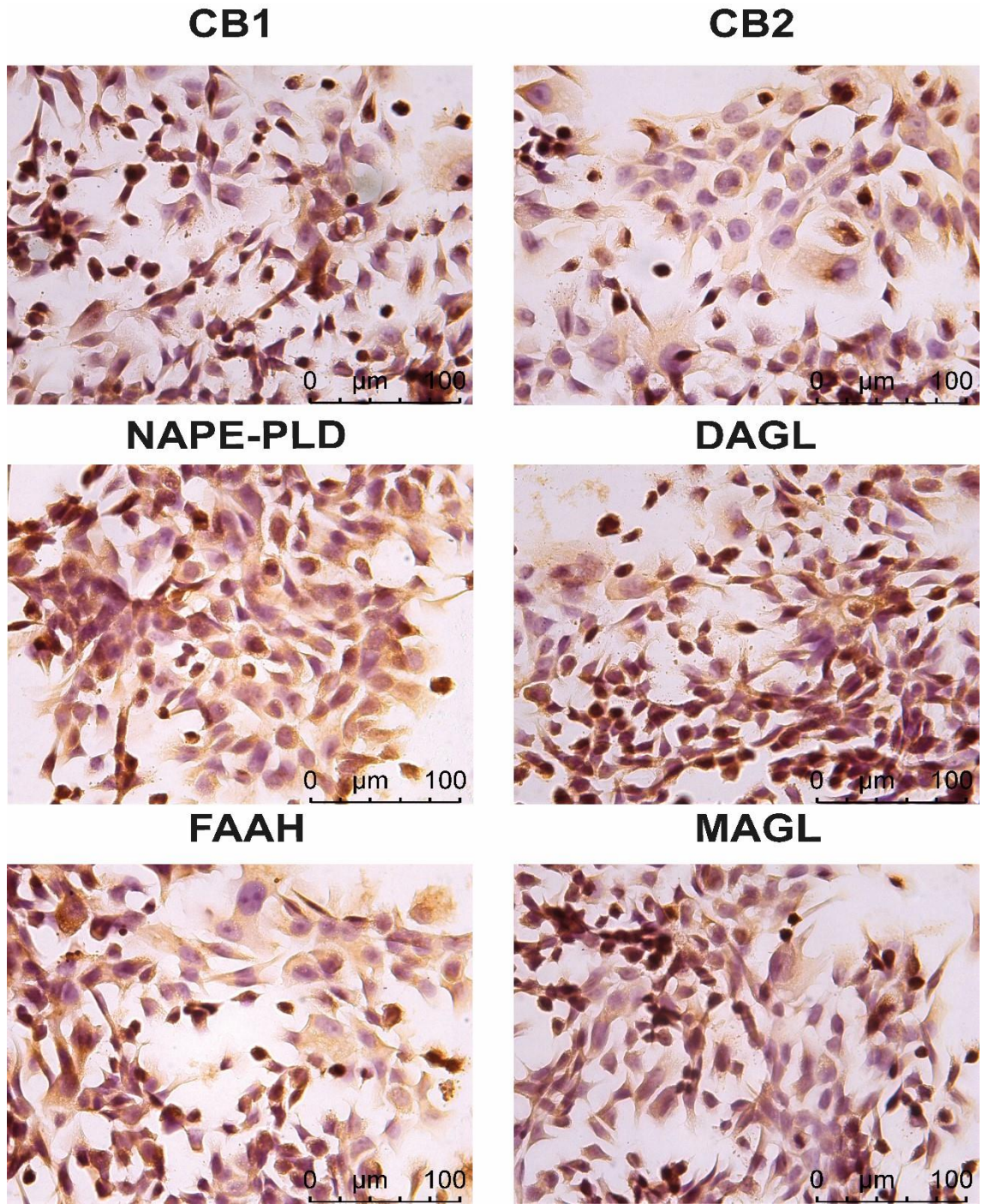
alanda gerçekleştirilen ışık mikroskobu analizleri sonucunda hücrelerde CB1/2 reseptörleri ile NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimleriyle yaygın immün işaretlenme gözlenmiştir. A549, KHDAC hattında CB1 ve CB2 reseptörlerine ait immün işaretlenmeler ile NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimlerine ait immün işaretlenmelerin birbiriyle uyumlu olduğu saptanmıştır (şekil 4.4). H1299 KHDAC hattında çekirdek ve sitoplazmada CB1 reseptör immün işaretlenmesinin CB2'den yüksek olduğu ve FAAH işaretlenmesinin MAGL işaretlenmesinden yüksek olduğu bulunmuştur (şekil 4.5). H358 KHDAC hattında çekirdek ve sitoplazmada CB1 reseptörü immün reaktivitesinin CB2 reseptörü immün reaktivitesine göre göreceli olarak daha fazla olduğu görülmüştür. NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimlerine ait immün işaretlenmelerin farklılık göstermediği saptanmıştır (şekil 4.6). H838 KHDAC hattında pleomorfizm gösteren iğsi hücrelerin CB1 ve CB2 reseptörlerine ait immün işaretlenmeleri farklılık göstermezken; NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimlerine ait yoğun immün işaretlenmeler gözlenmiştir (şekil 4.7). H1975 KHDAC hattında CB1 ve CB2 reseptörlerine ait immün işaretlenmeler ile NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimlerine ait immün işaretlenmelerin farklılık göstermediği görülmüştür (şekil 4.8). SW-1573 KHDAC hattında pleomorfizm gösteren hücrelerde CB1 ve CB2 reseptörlerine ait immün işaretlenmeler ile NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimlerine ait yoğun immün reaksiyon saptanmıştır (şekil 4.9).



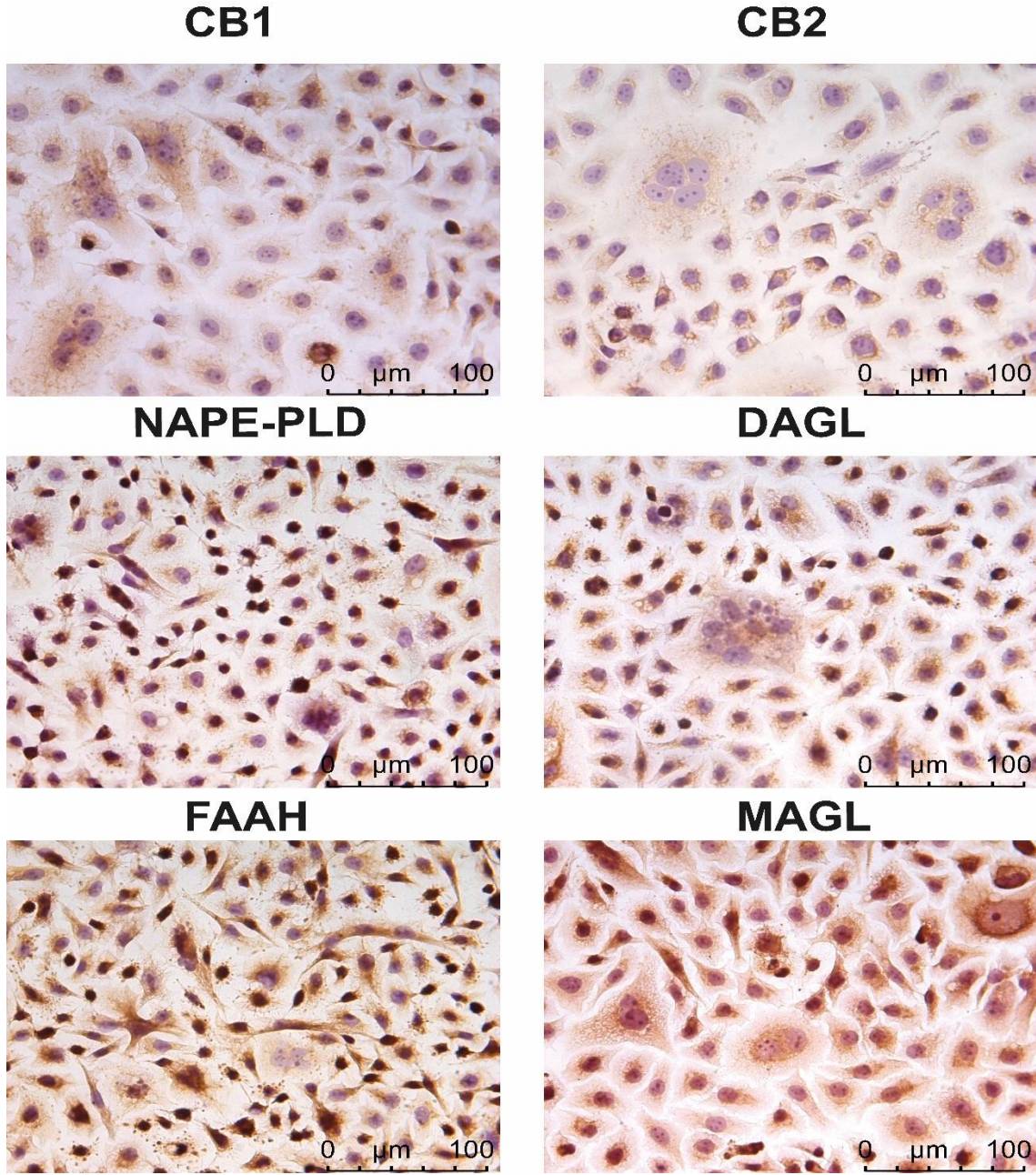
Şekil 4.4. A549 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi. **(A)** CB1, **(B)** CB2 reseptörleri ile **(C)** NAPE-PLD, **(D)** DAGL, **(E)** FAAH ve **(F)** MAGL. Kromojen: DAB, Çekirdek boyası: Hematoksilen. X400



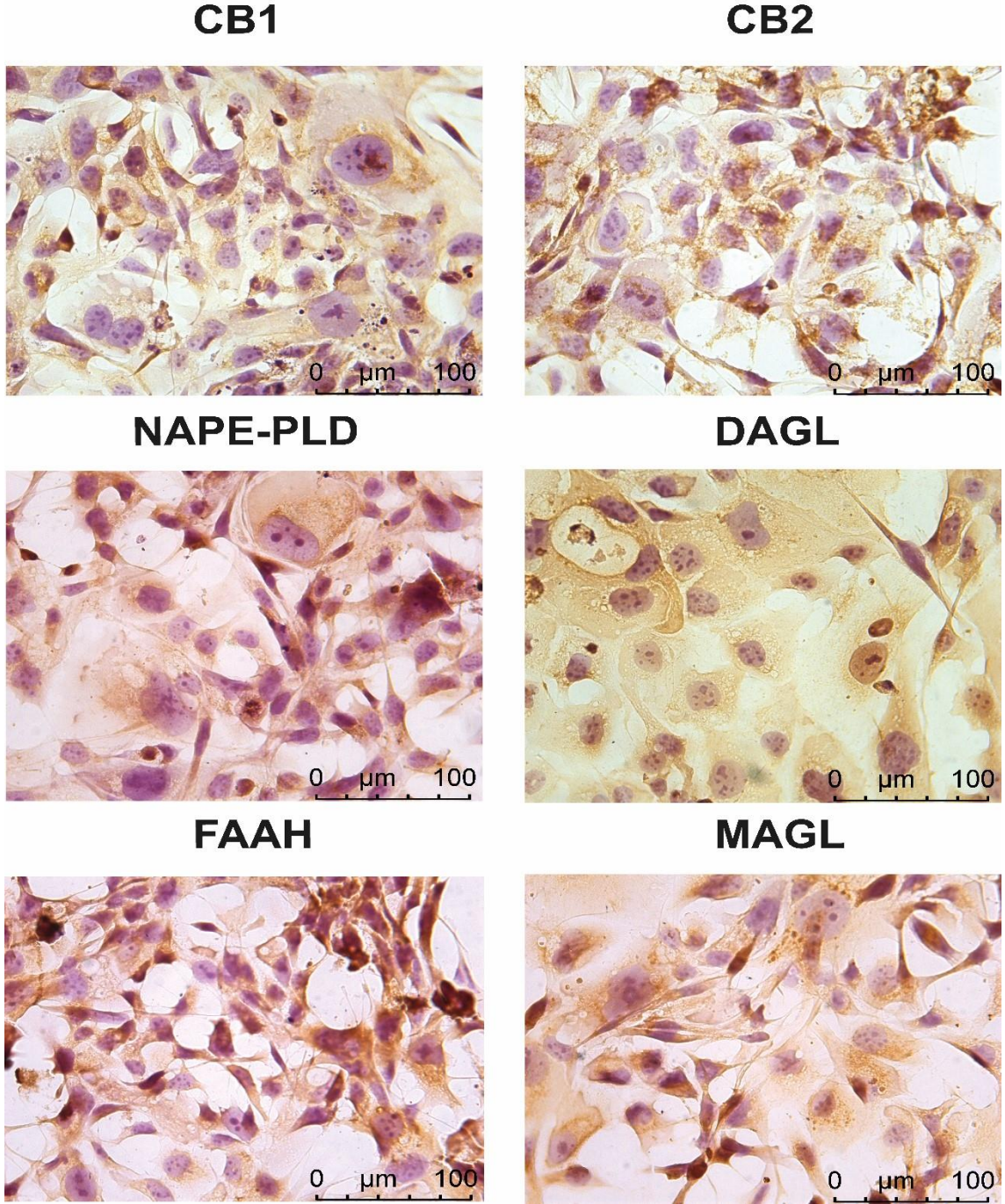
Şekil 4.5. H1299 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi. **(A)** CB1, **(B)** CB2 reseptörleri ile **(C)** NAPE-PLD, **(D)** DAGL, **(E)** FAAH ve **(F)** MAGL. Kromojen: DAB, Çekirdek boyası: Hematoksilen. X400



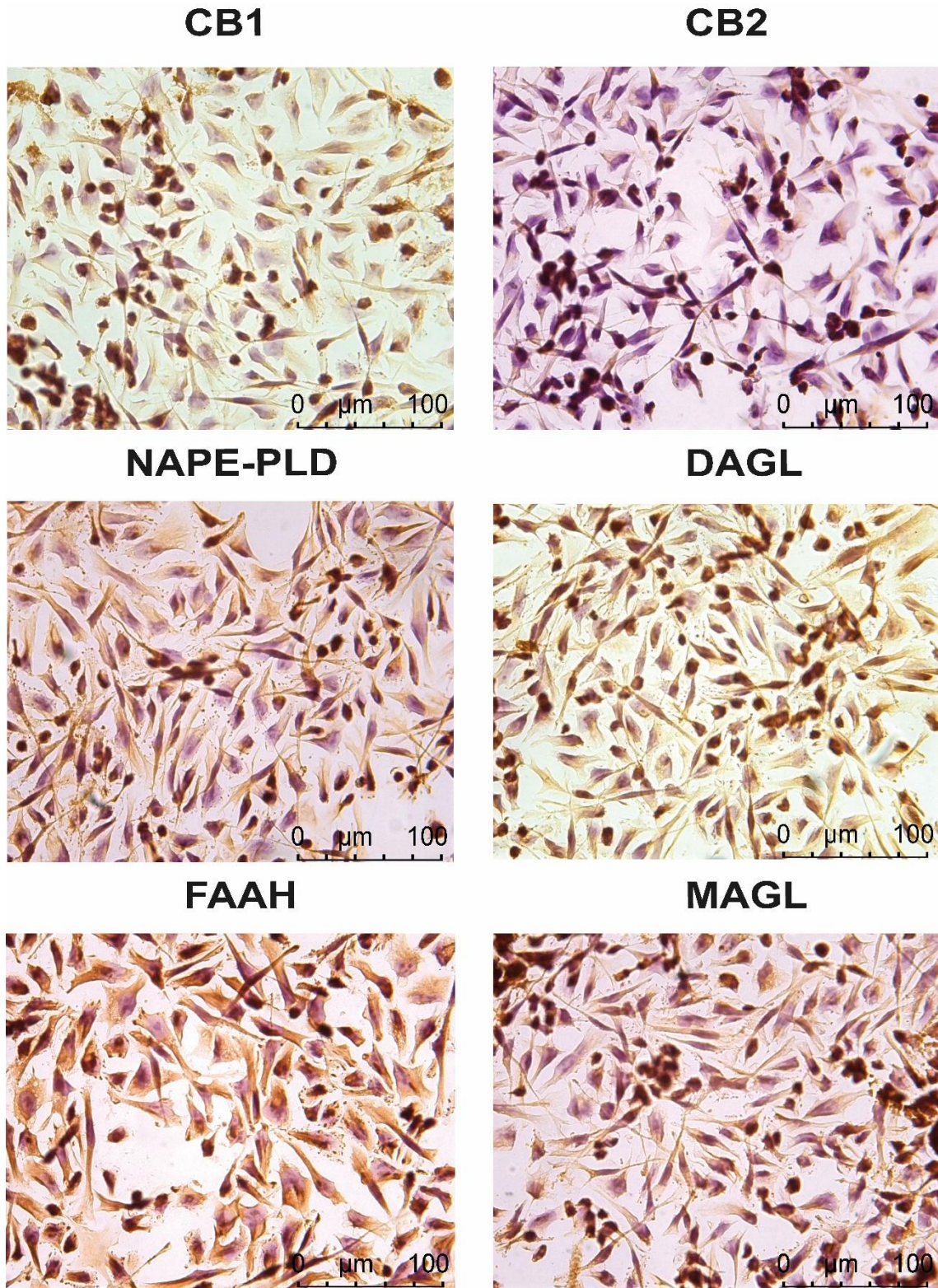
Şekil 4.6. H358 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi. **(A)** CB1, **(B)** CB2 reseptörleri ile **(C)** NAPE-PLD, **(D)** DAGL, **(E)** FAAH ve **(F)** MAGL. Kromojen: DAB, Çekirdek boyası: Hematoksilen. X400



Şekil 4.7. H838 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi. **(A)** CB1, **(B)** CB2 reseptörleri ile **(C)** NAPE-PLD, **(D)** DAGL, **(E)** FAAH ve **(F)** MAGL. Kromojen: DAB, Çekirdek boyası: Hematoksilen. X400



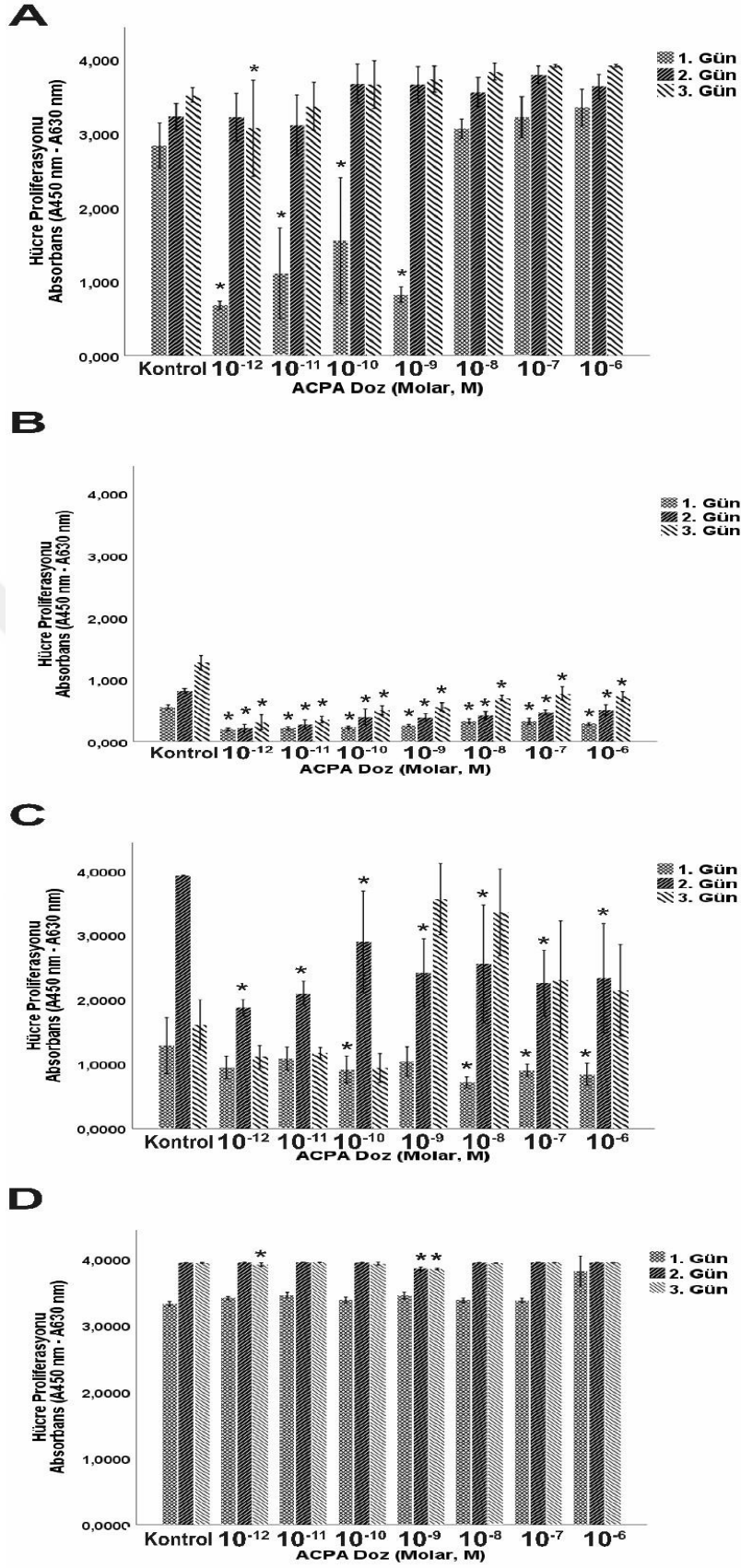
Şekil 4.8. H1975 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi. **(A)** CB1, **(B)** CB2 reseptörleri ile **(C)** NAPE-PLD, **(D)** DAGL, **(E)** FAAH ve **(F)** MAGL. Kromojen: DAB, Çekirdek boyası: Hematoksilen. X400



Şekil 4.9. SW-1573 hücrelerinin kannabinoid ilişkili moleküllerle indirekt immünperoksidaz işaretlenmesi. **(A)** CB1, **(B)** CB2 reseptörleri ile **(C)** NAPE-PLD, **(D)** DAGL, **(E)** FAAH ve **(F)** MAGL. Kromojen: DAB, Çekirdek boyası: Hematoksilen. X400

4.5. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında ACPA'nın Doz Bağımlı Olarak Hücre Çoğalmasına Etkisinin WST-1 Yöntemiyle Saptanması

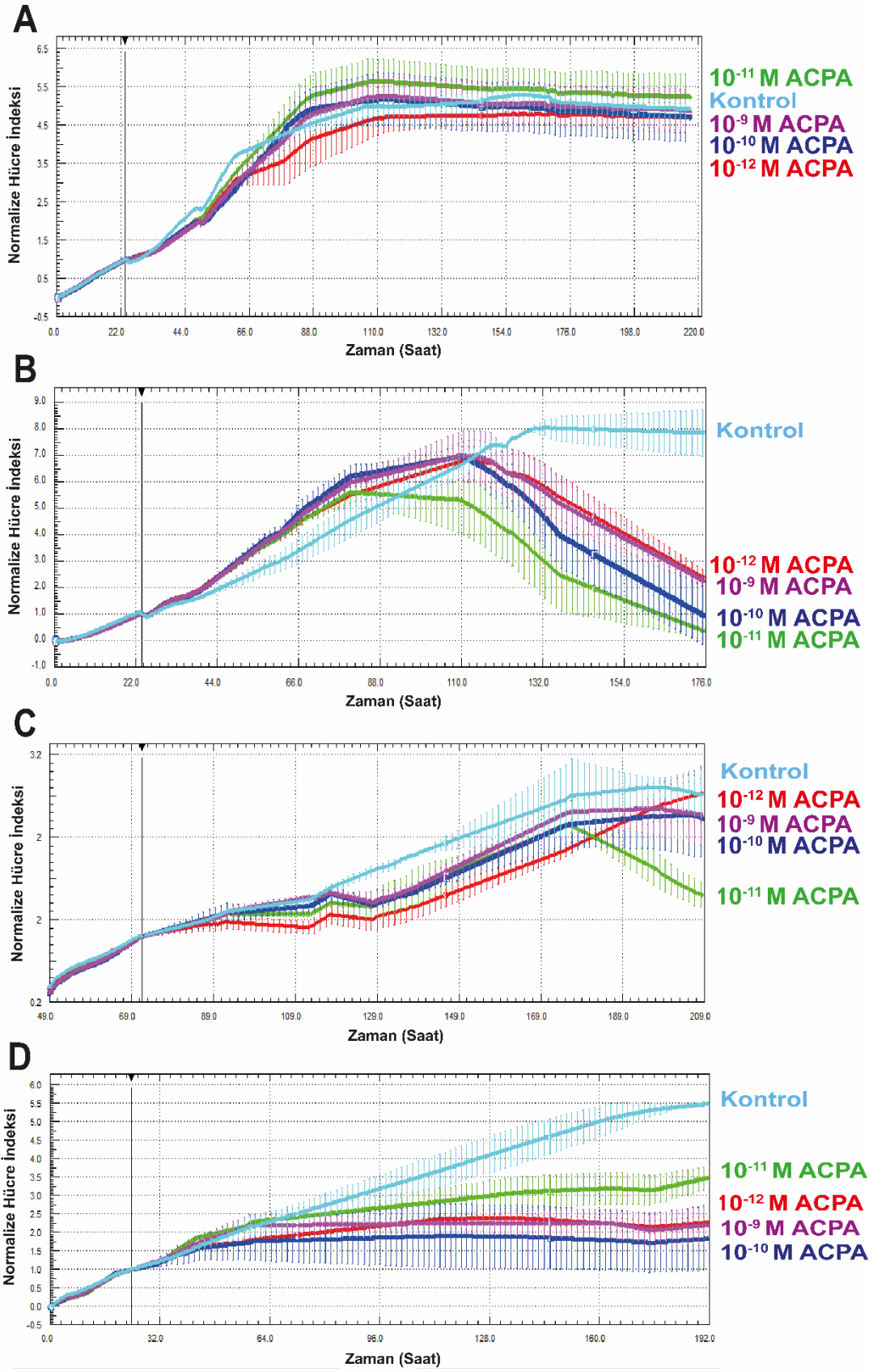
Küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hatları arasında CB1 reseptör geninin en fazla eksprese edildiği saptanan A549, H1299, H358 ve H838 hücrelerine, 10^{-12} - 10^{-6} M doz aralığında ACPA uygulanmıştır. A549 hücrelerinde 1. günde ACPA 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} M ve 10^{-9} M dozlarında uygulanmış gruplarda proliferasyonun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği saptanmıştır (* $p<0.05$). İkinci günde ACPA, uygulanan dozlarda antiproliferatif etki göstermemiştir. ACPA, 3. günde 10^{-12} M dozda A549 hücrelerinde antiproliferatif etki göstermiştir (* $p<0.05$). H1299 hücrelerinde, 1, 2 ve 3. günlerde ACPA'nın uygulanan tüm dozlarında antiproliferatif etki gözlenmiştir (* $p<0.05$). ACPA, 1. günde, 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M dozlarında H358 hücrelerine antiproliferatif etkisi gözlenmiştir (* $p<0.05$). ACPA'nın, 2. günde, H358 hücrelerinde tüm dozlarda antiproliferatif etki göstermiştir (* $p<0.05$). ACPA, H838 hücrelerinin proliferasyonunu 2. günde 10^{-9} M dozunda ve 3. günde 10^{-9} ve 10^{-12} M dozlarında istatistiksel anlamlı biçimde azaltmıştır (* $p<0.05$). WST-1 tekniği ile proliferasyon analizi sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



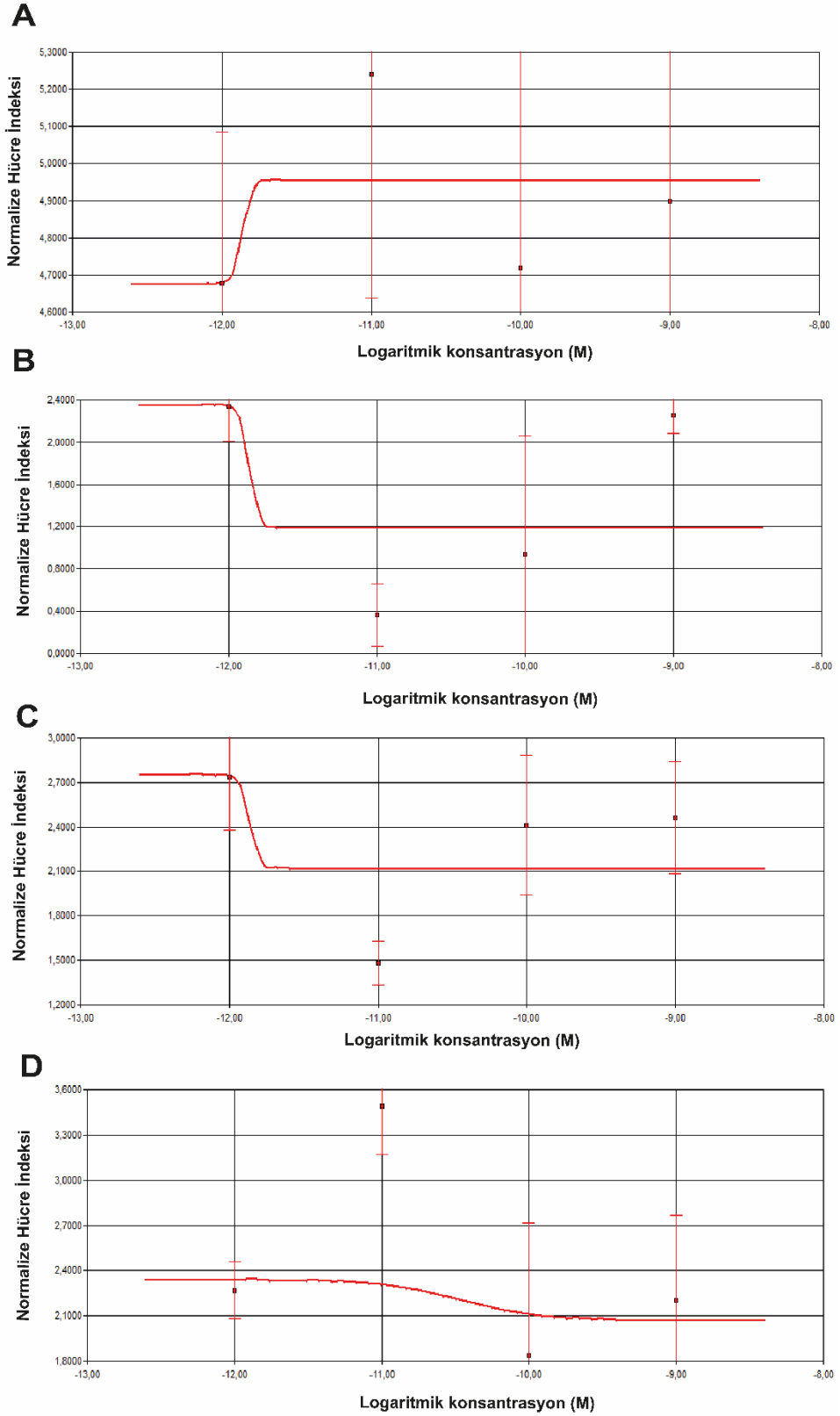
Şekil 4.10. ACPA'nın KHDAC hücrelerindeki antiproliferatif etkisinin WST-1 ile saptanması. **(A)** A549 **(B)** H1299 **(C)** H358 **(D)** H838 (*) kontrole göre $p < 0.05$.

4.6. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında ACPA'nın *in vitro* Ortamda Doz Bağımlı Olarak Hücre Çoğalmasına Etkisinin Gerçek Doz ve Zaman Bağımlı Olarak İmpedans Temelli Proliferasyon Analizi ile Değerlendirilmesi

WST-1 analizinde ACPA'nın 10^{-12} - 10^{-9} M doz aralığında maksimum etkili olduğu saptanmıştır. Gerçek zamanlı impedans temelli proliferasyon analizinde ACPA bu doz aralığında (10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} ve 10^{-12} M) uygulanmıştır. Hücreler ekildikten sonra hücre indeksleri 1.0'a ulaştığında ACPA doz aralığı uygulanmıştır. Hücre indekslerinin 1.0'a ulaştığı noktadan grafik normalize edilmiş ve bir seri dozda ACPA uygulaması yapılmıştır. ACPA, A549 hücrelerinin proliferasyonunda anlamlı değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.11A). ACPA uygulanan doz aralığında H1299 (Şekil 4.11B), H358 (Şekil 4.11C) ve H838 (Şekil 4.11D) hücrelerinin proliferasyonunu zaman bağımlı olarak azaltmıştır. ACPA belirlenen doz aralığında eklendikten sonra H1299 hücrelerinin proliferasyonunda 66. saatten itibaren azalmaya neden olmuştur. 66. saatten itibaren 10^{-11} M dozu, 86. saatten itibaren 10^{-12} , 10^{-10} ve 10^{-9} M ACPA dozları, hücrelerin proliferasyonunu kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı biçimde azaltmıştır ($p<0.05$). Kontrol grubunun 86. saatten itibaren hücre indeksleri, ACPA doz aralığına ait hücre indekslerine göre anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p<0.05$). ACPA'nın H358 hücrelerindeki en güçlü antiproliferatif etkisi ilaç eklenmesinden sonraki 48. saatten itibaren gözlenmiştir. ACPA uygulanan tüm dozlarda kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı biçimde hücre çoğalmasını azaltmıştır ($p<0.05$). ACPA, H358 hücrelerindeki en güçlü antiproliferatif etkisini 10^{-11} M dozunda 106. saatten itibaren göstermiştir. ACPA uygulaması sonrası H838 hücrelerinin proliferasyonunda 30. saatten itibaren azalmaya neden olmuştur. 30. saatten itibaren tüm ACPA dozları uygulanan hücrelerde, proliferasyon kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Kontrol grubunun 40. saatten itibaren hücre indeksleri, ACPA doz aralığına ait hücre indekslerine göre anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p<0.05$). ACPA'nın A549 hücreleri üzerinde gösterdiği antiproliferatif IC50 değeri 1.39×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12A). ACPA'nın H1299 hücrelerindeki antiproliferatif IC50 değeri 1.39×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12B). H358 hücrelerinde ACPA'nın etkili olduğu antiproliferatif IC50 değeri 1.38×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12C). H838 hücrelerinde ACPA'nın etkili olduğu antiproliferatif IC50 değeri ise 3.47×10^{-11} M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12D).



Şekil 4.11. ACPA'nın KHDAK hücrelerindeki antiproliferatif etkisinin gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanması. **(A)** A549 **(B)** H1299 **(C)** H358 **(D)** H838.



Şekil 4.12. ACPA'nın KHDAC hücrelerindeki etkili dozunun (IC50) saptanması. **(A)** A549 **(B)** H1299 **(C)** H358 **(D)** H838. ACPA için IC50 değeri A ve B'de 1.39×10^{-12} M, C'de 1.38×10^{-12} M ve D'de 3.47×10^{-11} M.

4.7. Kannabinoid 1 Reseptörünü En Yüksek Düzeyde Eksprese Eden Hücre Hatlarında, Sentetik Spesifik CB1 Agonisti ACPA'nın, *in vitro* Ortamda Apoptoz Üzerine Etkisinin Akım Sitometrisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi

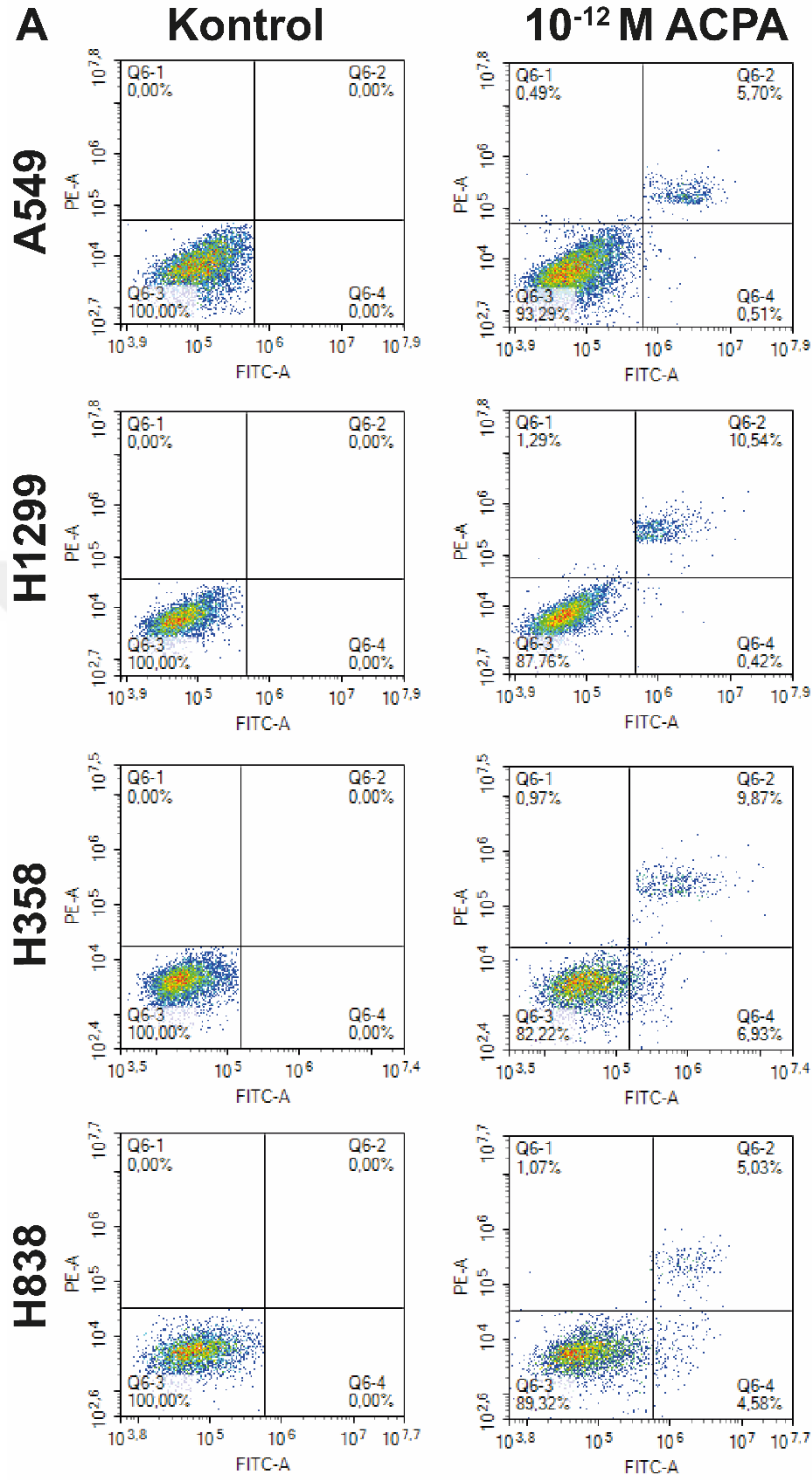
Küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549, H1299, H358 ve H838 hücrelerinde yapılan akım sitometrisi yöntemiyle ACPA uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubunda doz ve zaman bağımlı olarak canlılığı değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile elde edilen IC50 dozu 1.39×10^{-12} M ACPA dozu uygulanmıştır. Buna göre, 24. saatte A549 hücrelerinin %93.29'unun canlılığını koruduğu, buna karşın %5.70'inin geç apoptoza uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.13A). H1299 hücrelerinde 24. saatte %87.76'sının canlılığını koruduğu, %10.54'ünün geç apoptoza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.13B). H358 hücrelerinin ilk 24 saatte %82.22'sinin canlılığını koruduğu, %9.87'sinin geç apoptoza gittiği ve %6.93'ünün erken apoptoza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.13C). İlk 24 saatte ACPA H838 hücrelerinin %5.03'ünün geç apoptozuna, %4.58'inin erken apoptozuna neden olurken %89.32'sinin canlılığını korumuştur (Şekil 4.13D).

36. saatte A549 hücrelerinin %94.08'inin canlılığını koruduğu, buna karşın %1.16'sının nekroza gittiği, %3.71'inin geç apoptoza uğradığı ve %1.06'sının erken apoptoza uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.14A). H1299 hücrelerinde 36. saatte %96.63'ünün canlılığını koruduğu, %2.00'inin geç apoptoza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.14B). H358 hücrelerinin ilk 36 saatte %97.29'unun canlılığını koruduğu, %1.84'ünün geç apoptoza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.14C). İlk 36 saatte ACPA H838 hücrelerinin %1.14'ünün geç apoptozuna, %1.06'sının erken apoptozuna neden olurken %97.64'ü canlılığını korumuştur (Şekil 4.14D).

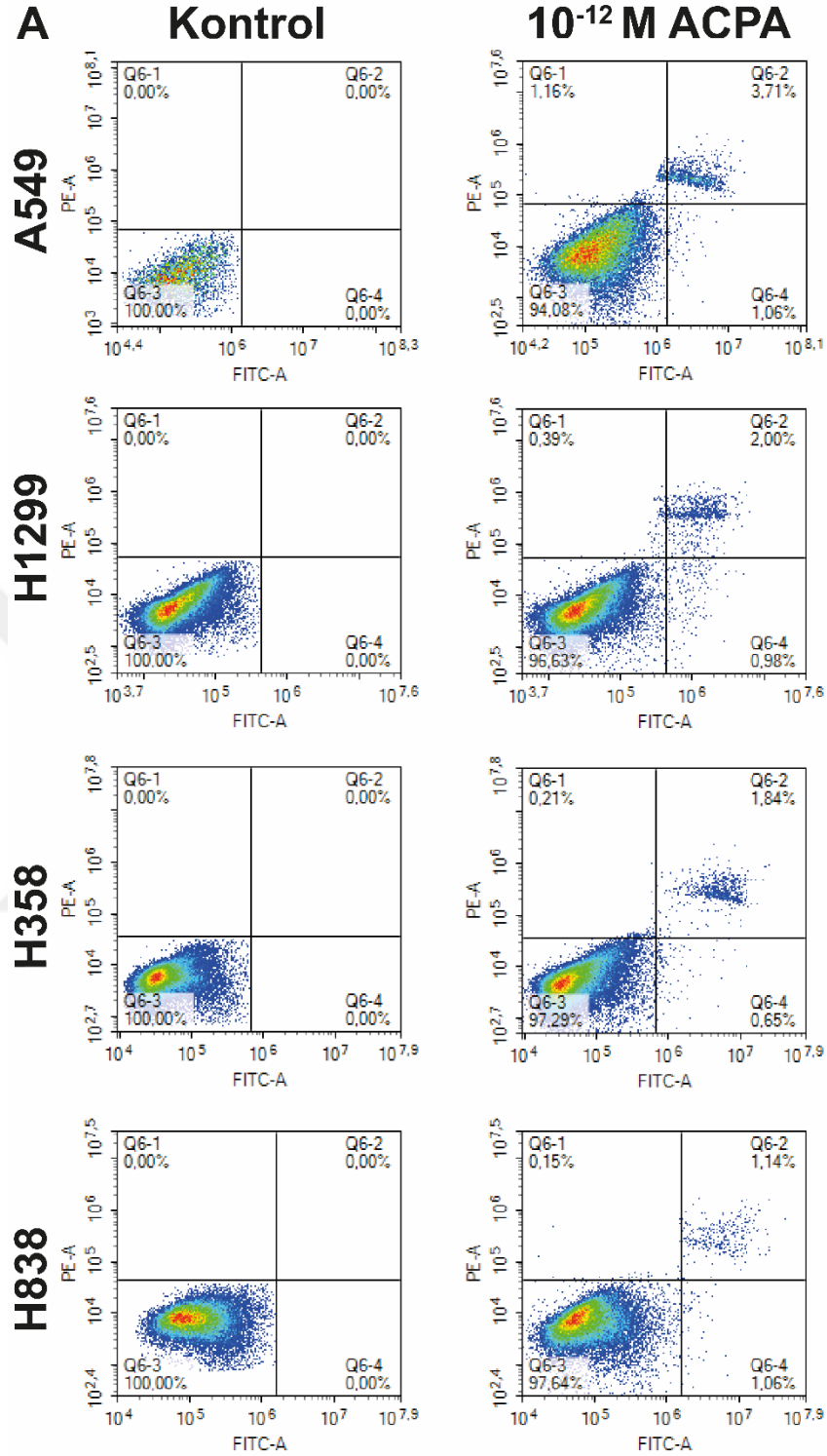
48. saatte A549 hücrelerinin %93.33'ünün canlılığını koruduğu, buna karşın %1.17'sinin nekroza gittiği, %4.82'inin geç apoptoza uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.15A). H1299 hücrelerinde 48. saatte %97.79'unun canlılığını koruduğu, %1.42'sinin geç apoptoza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.15B). H358 hücrelerinin ilk 48 saatte %92.68'inin canlılığını koruduğu, %6.86'sının geç apoptoza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.15C). İlk 48 saatte ACPA H838 hücrelerinin %10.27'sinin geç apoptozuna, %3.73'ünün nekrozuna ve %1.20'sinin erken apoptozuna neden olurken hücrelerin %84.80'i canlılığını korumuştur (Şekil 4.15D).

A549 hücresinin ACPA uygulandıktan sonraki 72. saatte %86.94'ünün canlılığını koruduğu, buna karşın %8.23'ünün nekroza gittiği, %4.30'unun geç apoptoza uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.16A). H1299 hücrelerinde 72. saatte %95.92'sinin canlılığını koruduğu, %0.63'ünün geç apoptoza ve %2.83'ünün nekroza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.16B). H358 hücrelerinin ilk 72 saatte %96.40'ının canlılığını koruduğu, %2.20'sinin geç apoptoza ve %1.24'ünün nekroza gittiği saptanmıştır (Şekil 4.16C). İlk 72 saatte ACPA H838 hücrelerinin %0.71'inin geç apoptozuna, %0.95'inin nekrozuna ve %0.20'sinin erken apoptozuna neden olurken %98.13'ü canlılığını korumuştur (Şekil 4.16D).

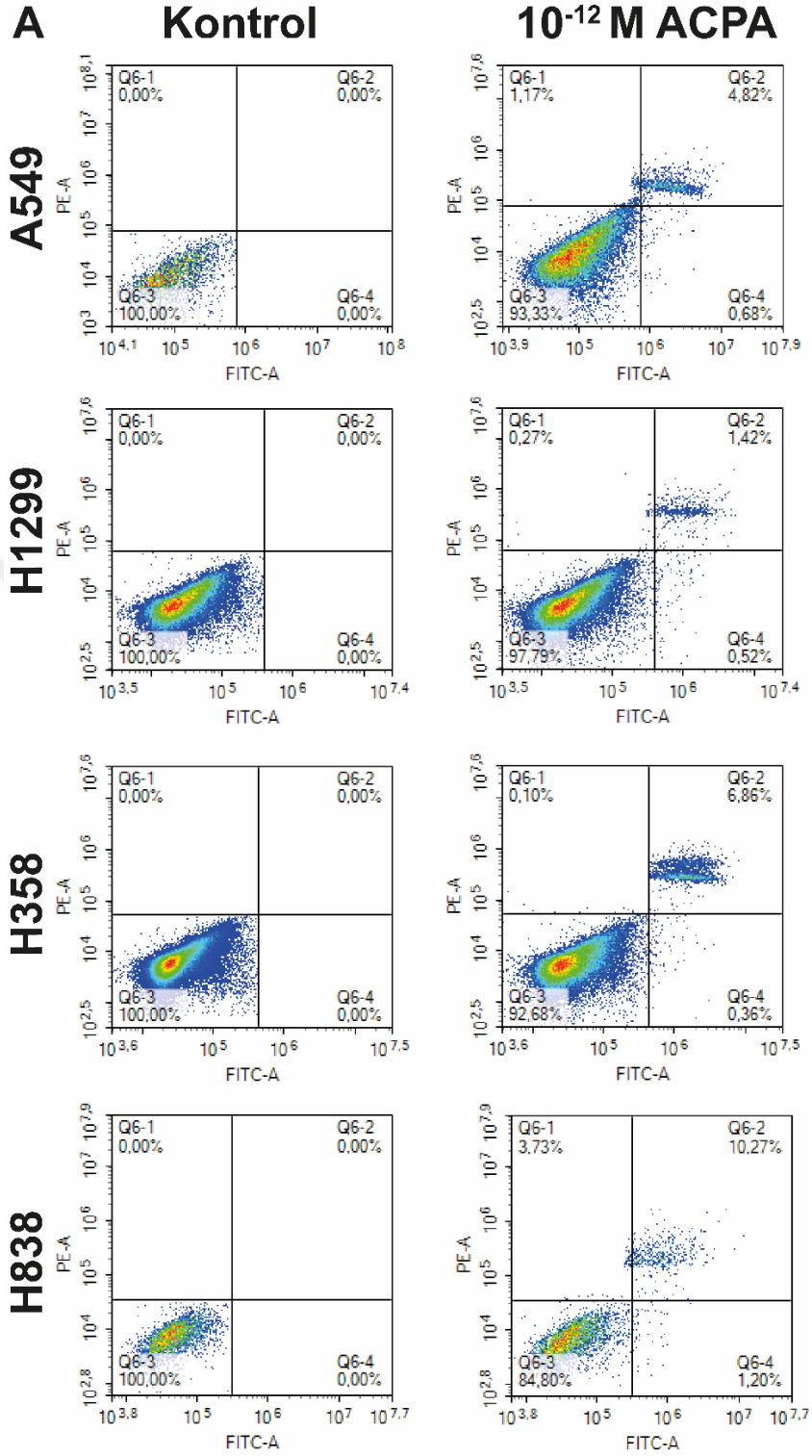




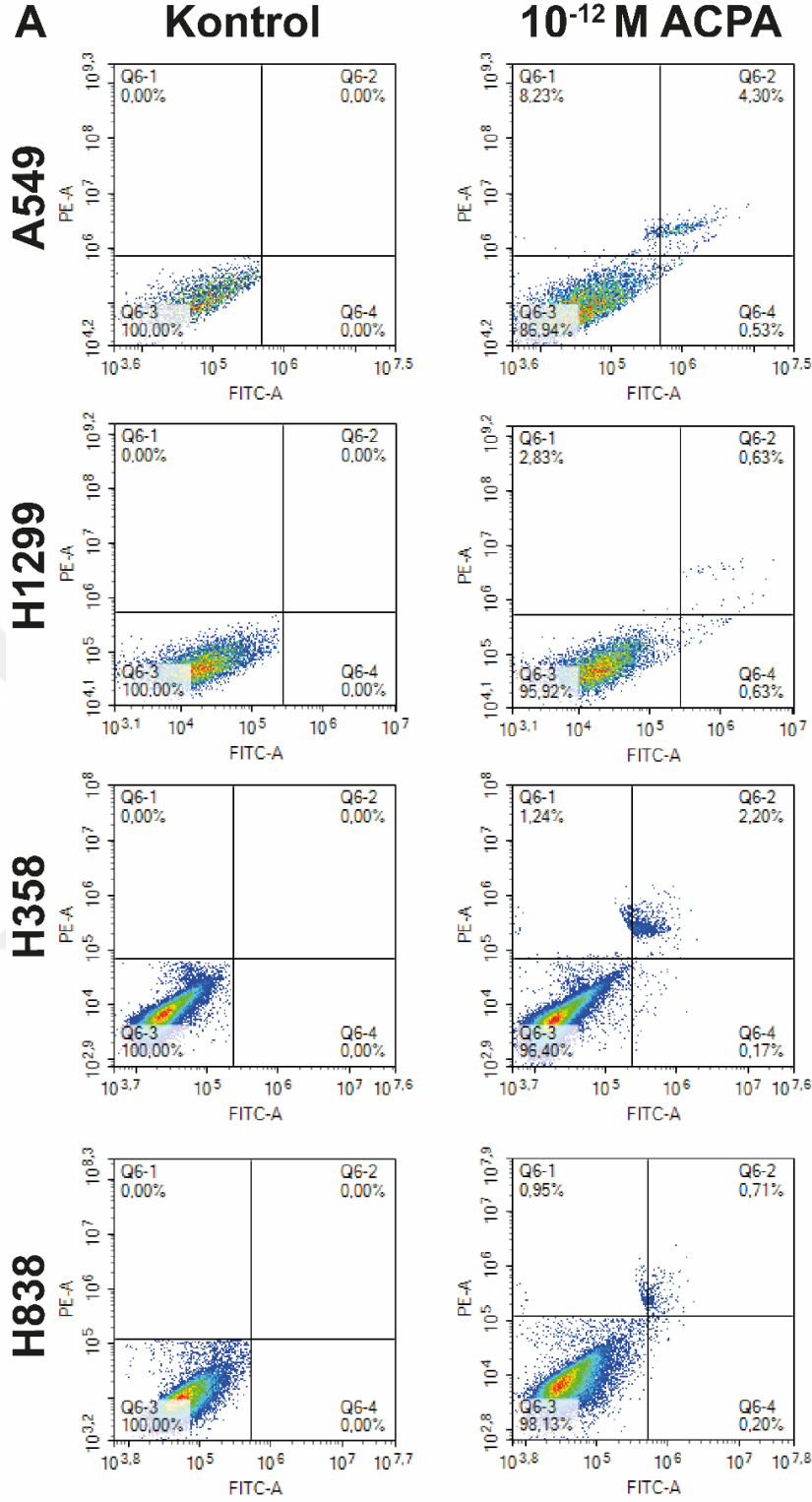
Şekil 4.13. ACPA'nın etkili dozunun KHDAC'nde 24 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi. 1.39×10^{-12} M ACPA uygulanan **(A)** A549, **(B)** H1299, **(C)** H358 ve **(D)** H838 hücrelerine ait erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak görülmektedir.



Şekil 4.14. ACPA'nın etkili dozunun KHDAK'nde 36 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi. 1.39×10^{-12} M ACPA uygulanan **(A)** A549, **(B)** H1299, **(C)** H358 ve **(D)** H838 hücrelerine ait erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak görülmektedir.



Şekil 4.15. ACPA'nın etkili dozunun KHDAC'nde 48 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi. 1.39×10^{-12} M ACPA uygulanan **(A)** A549, **(B)** H1299, **(C)** H358 ve **(D)** H838 hücrelerine ait erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak görülmektedir.



Şekil 4.16. ACPA'nın etkili dozunun KHDAK'nde 72 saatteki apoptotik etkisinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi. 1.39×10^{-12} M ACPA **(A)** A549, **(B)** H1299, **(C)** H358 ve **(D)** H838 hücrelerine ait erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak görülmektedir.

Buna göre, ACPA uygulanmış A549, H1299, H358 ve H838 hücrelerine ve kontrol gruplarına ait canlı hücre, nekrotik hücre, erken ve geç apoptotik hücre yüzdeleri Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

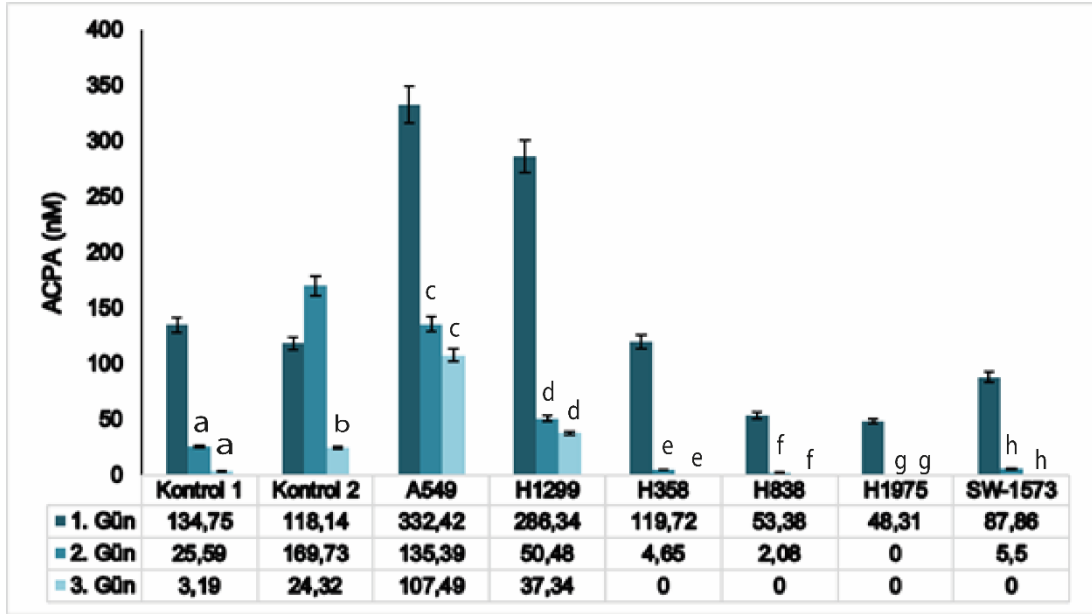
Çizelge 4.1. Akım sitometrisi ile ACPA uygulanmış KHD AK hücrelerine ait apoptotik indeksler. 1.39×10^{-12} M ACPA uygulanmış A549, H1299, H358 ve H838 hücrelerine ait canlı hücre, nekrotik hücre, erken ve geç apoptotik hücre yüzdeleri gösterilmektedir.

	Canlı Hücre (%)				Nekrotik Hücre (%)				Erken Apoptotik Hücre (%)				Geç Apoptotik Hücre (%)			
	Zaman (Saat)															
	24	36	48	72	24	36	48	72	24	36	48	72	24	36	48	72
A549	93.29	94.08	93.33	86.94	0.49	1.16	1.17	8.23	0.51	1.06	0.68	0.53	5.70	3.71	4.82	4.30
H1299	87.75	96.63	97.79	95.92	1.29	0.39	0.27	2.83	0.42	0.98	0.52	0.63	10.54	2.00	1.42	0.63
H358	82.22	97.29	92.68	96.40	0.97	0.21	0.10	1.24	6.93	0.65	0.36	0.17	9.87	1.84	6.86	2.20
H838	89.32	97.64	84.80	98.13	1.07	0.15	3.73	0.95	4.58	1.06	1.20	0.20	5.03	1.14	10.27	0.71

4.8. ACPA’nın Hücre Süpernatantlarındaki Miktarının Tayini

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücre hatlarına 10^{-6} M dozda ACPA uygulanmış ve 1, 2 ve 3. günlerde süpernatantlardan alınan örnekler LC-MS/MS ile kantitatif olarak ölçülmüştür. H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücre hatları için kullanılan RPMI besiyeri içinde aynı dozda ACPA “Kontrol 1” olarak ifade edilmiştir. A549 hücre

hattı için kullanılan DMEMF10-HG besiyeri içinde aynı dozda ACPA “Kontrol 2” olarak ifade edilmiştir. Kontrol gruplarının 1, 2 ve 3. günlere ait süpernatantları karşılaştırılmıştır. Buna göre, 1. günde RPMI besiyeri içinde bulunan ACPA miktarı 2 ve 3. günlerde anlamlı biçimde azalmıştır (*p<0.05). 1. günde DMEMF10-HG besiyeri içinde bulunan ACPA miktarı 3. günde anlamlı biçimde azalma göstermiştir (*p<0.05). A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücre hatlarına ait süpernatantlarındaki ACPA miktarı 1. güne göre 2 ve 3. günlerde istatistiksel anlamlı biçimde azalma göstermiştir (*p<0.05) (Şekil 4.17).



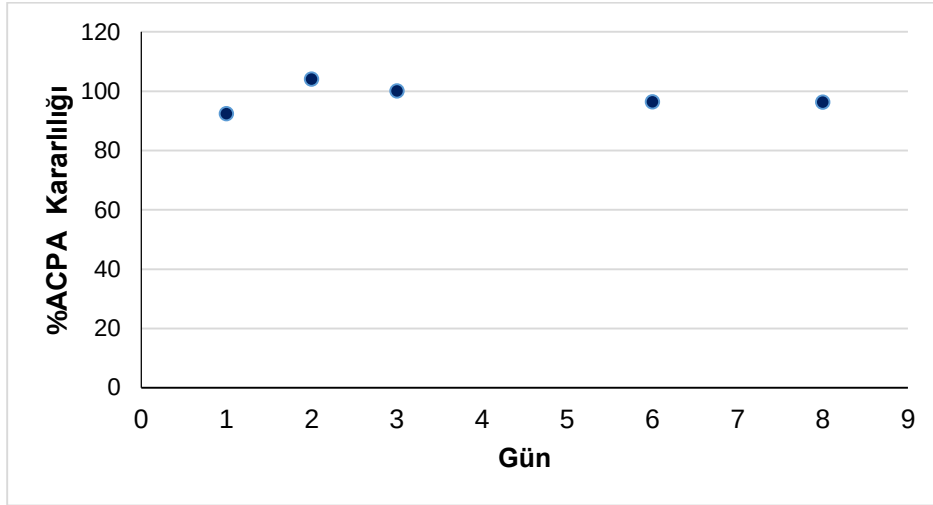
Şekil 4.17. ACPA'nın KHDAK hücrelerine ait süpernatantlardaki miktarının LC-MS/MS ile saptanması. A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücrelerinin 1, 2 ve 3. günlerde süpernatantındaki ACPA miktarı nM cinsinden belirtilmiştir (a, b, c, d, e, f, g, h: p<0.05).

4.9. ACPA'nın Stabilitesi ve Uzun Süreli Sabit Salımını Sağlayabilecek Nanomühendislik Temelli ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sisteminin Geliştirilmesi

4.9.1. Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonunun *in vitro* Ortamda Karakterizasyonu

ACPA stabilitesinin tayini için LC-MS/MS cihazında ölçümler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar yüzdece grafiğe aktarılmıştır (Şekil 4.18). Buna göre, 1, 2, 3, 6 ve

8 gün süreyle bekletilen örneklerin stabilitesini bu sürelerde koruduğu görülmüştür.



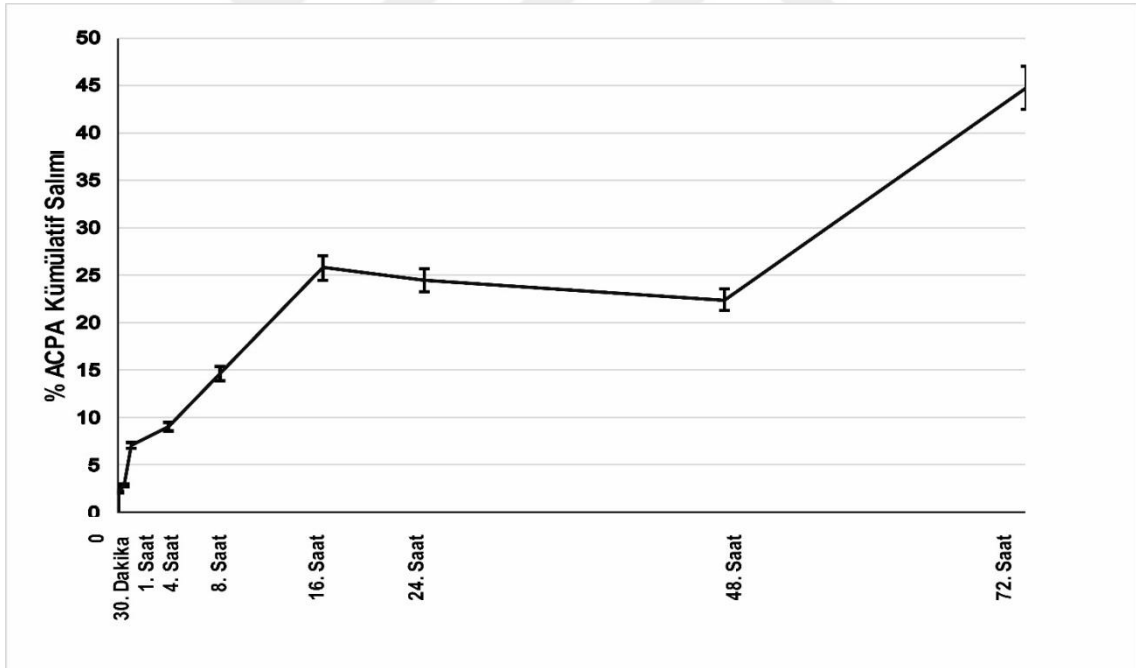
Şekil 4.18. ACPA kararlılık çalışmasına (+4°C) ilişkin veriler.

Gereç ve yöntemde belirtilen iş paketi 3.6.1’de tekli emülsiyon ve çöktürme yöntemleriyle ayrı ayrı hazırlanan stabil ACPA yüklü PCL nanopartiküllerin büyüklük ve dağılımlarına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Buna göre, tekli emülsiyon yöntemiyle hazırlanan APCA-PCL nanopartiküllerin büyüklüğü 176.4 ± 2.9 nm, PDI değeri 0.234 ± 0.033 olarak elde edilmiştir. Çöktürme yöntemiyle elde edilen APCA-PCL nanopartiküllerin büyüklüğü 162.2 ± 2.3 nm; PDI değeri 0.251 ± 0.008 olarak elde edilmiştir. Tekli emülsiyon ile hazırlanan APCA-PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli -13.4 ± 0.3 mV olarak elde edilmiştir. Çöktürme yöntemiyle hazırlanan APCA nanopartiküllerin zeta potansiyeli -29.4 ± 0.6 mV olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. Tekli emülsiyon ve çöktürme yöntemleri ile stabil ACPA yüklü PCL nanopartiküllerin büyüklük ve dağılımlarına ilişkin sonuçlar (PDI: Polidispersite İndeksi).

	Tekli Emülsiyon	Çöktürme
Nanopartikül Büyüklüğü (nm)	176.4 ± 2.9	162.2 ± 2.3
PDI	0.234 ± 0.033	0.251 ± 0.008
Zeta Potansiyeli (mV)	-13.4 ± 0.3	-29.4 ± 0.6

İlaç yükleme kapasitesinin ölçümü ve ilaç salım profilinin hazırlanması için LC-MS yöntemi kullanılmıştır. Yirmi beş ml salım ortamından 0. dakika, 30 dakika, 1. saat, 4. saat, 8. saat, 16. saat, 1. gün, 2. gün ve 3. gün 2 ml örnek alınarak LC-MS yöntemi ile miktar tayini yapılmış ve %ACPA kümülatif salımı olarak elde edilmiştir (Şekil 4.19). Buna göre 0. dakikada yüklenen ACPA'nın 2.2 ± 2.3 'si ortama salınmıştır. ACPA'nın 30. dakikada 2.9 ± 3.0 'ı, 60. dakikada 7.1 ± 7.6 'sı, 240. dakikada 9.1 ± 4.1 'i, 480. dakikada 14.6 ± 6.7 'si salınmıştır. 960. dakikada ACPA'nın 25.8 ± 7.4 'ü, 1440. dakikada 24.5 ± 5.2 'si, 2880. dakikada 22.4 ± 10.8 'i, 4320. dakikada 44.7 ± 9.9 'u salınmıştır. Salım sonunda ACPA, yüklendiği miktarının 44.7 'sini ortama salmıştır. Yükleme etkinliği enkapsülasyon etkinliği (% EE) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre ACPA, PCL nanopartiküllere PCL nanopartiküllere 39.9 ± 14.7 oranında yüklenmiştir.



Şekil 4.19. ACPA-PCL kontrollü salım sistemine ait salım profilinin zaman içinde yüzde kümülatif olarak gösterimi.

Çizelge 4.3. ACPA yüklü PCL nanopartiküler salım sistemine ait yükleme etkinliği verileri.

n=6	Toplam İlaç (µg)	Ortalama ± Standart Sapma (µg)	% Yükleme etkinliği ± Standart Sapma
1	57.7	39.9 ± 14.7	39.9 ± 14.7
2	21.3		
3	29.0		
4	26.3		
5	53.0		
6	52.2		

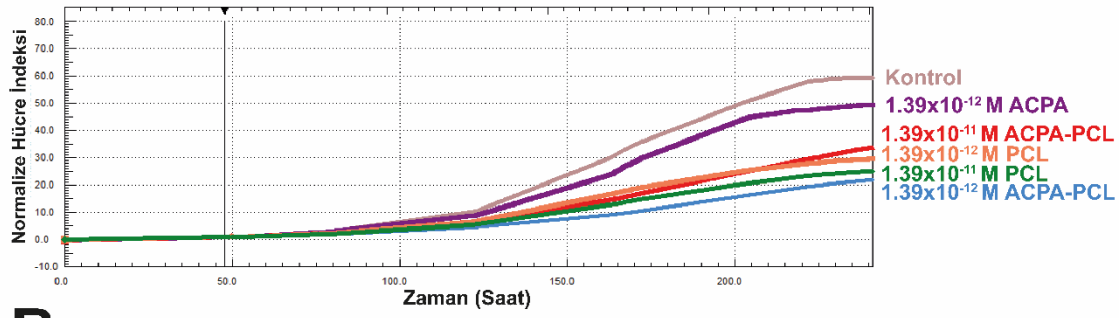
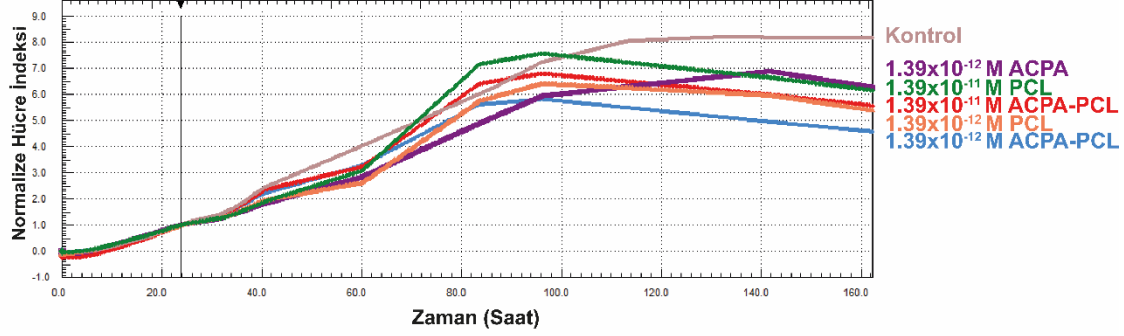
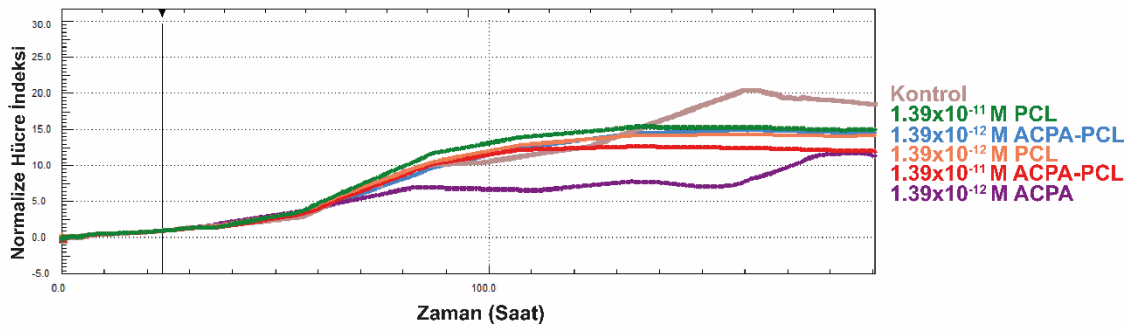
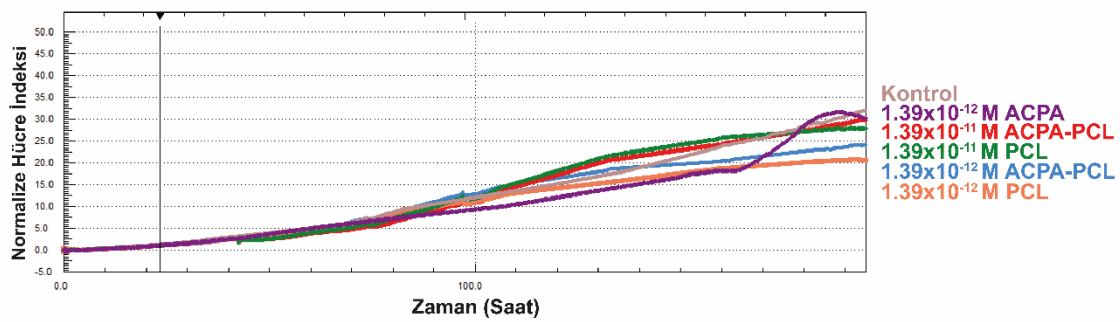
4.10. Kannabinoid 1 Reseptörü Bulunduran Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinom Hücre Hatlarında ACPA-PCL Nanopartiküler Salım Sistemi ile *in vitro* Ortamda Proliferasyonu Azaltıcı (EC50/IC50) Dozunu İçeren Formülasyonun Belirlenmesi

4.10.1. Hazırlanan İlaç Salım Sisteminin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanser Hücre Proliferasyonuna Etkisinin İmpedans Temelli ve Gerçek Zamanlı Olarak Değerlendirilmesi

Hazırlanan ACPA-PCL nanopartiküller, IC50 dozu olan 1.39×10^{-12} M ACPA salımını yapacak şekilde besiyeri içinde seyreltilmiştir. İş paketi 3.7.1'de belirtildiği şekilde hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. İlaç eklendikten sonra 96. saatten itibaren tüm dozlar, A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etki göstermiştir ($p < 0.05$). 1.39×10^{-12} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller, A549 hücrelerinin proliferasyonunu en etkili biçimde azaltmıştır (Şekil 4.20A). 1.39×10^{-12} M ACPA ve 1.39×10^{-11} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller eklendikten sonra 24. saatte, H1299 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre anlamlı biçimde azaltmıştır ($p < 0.05$). İlaç eklendikten sonra 48 ve 72. saatlerde 1.39×10^{-12} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller, 1.39×10^{-12} M ACPA ile aynı hacimde seyreltilmiş boş PCL nanopartiküller ve 1.39×10^{-12} M ACPA dozu uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı azalma görülmüştür ($p < 0.05$). H1299 hücrelerinde kontrol grubu 96. saatten itibaren tüm gruplara göre istatistiksel anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.20B). 1.39×10^{-12} M ve 1.39×10^{-11} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller H358 hücreleri üzerinde istatistiksel anlamlı antiproliferatif etkiyi 140. saate kadar göstermemiştir. 140. saatten sonra kontrol grubu deney gruplarından istatistiksel anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.20C). 1.39×10^{-12} M ve 1.39×10^{-11} M ACPA dozu

salan PCL nanopartiküller H838 hücreleri üzerinde 195 saat boyunca istatistiksel anlamlı biçimde antiproliferatif etki göstermemiştir. 1.39×10^{-12} M ACPA ve ilaç yüklenmemiş boş PCL nanopartiküllerin 190. saatte H838 hücrelerinde kontrole göre istatistiksel anlamlı biçimde azalma gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$) (şekil 4.20D).



A**B****C****D**

Şekil 4.20. ACPA-PCL kontrollü salım sisteminin KHDAK'ndeki antiproliferatif etkisinin gerçek zamanlı impedans temelli olarak saptanması. **(A)** A549 **(B)** H1299 **(C)** H358 **(D)** H838.

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, planlanan hedeflere ulaşılarak KHDAK hatları; A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hatlarında kannabinoid reseptör profili qRT-PCR, immünositokimya ve akım sitometrisi yöntemleriyle ortaya konmuştur. Sentetik spesifik CB1 reseptör agonisti ACPA'nın, A549, H1299, H358 ve H838 KHDAK hücreleri üzerinde *in vitro* ortamda CB1 aracılı olarak proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu artırıcı doz bağımlı etkisi belirlenmiş; gerçek zamanlı olarak etkili dozu (IC50) 1.39×10^{-12} M olarak saptanmıştır. Uzun süreli antitümöral etkinin sağlanabilmesi için ACPA yüklü PCL nanopartiküler sisteminin geliştirilmesi ve optimizasyonu sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda projenin ulaşılan hedeflerini kapsayan başlıklar altında sırayla tartışılmaktadır.

1. Araştırma Hedefi: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hatları; A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 değişen oranlarda CB1 ve CB2 reseptörleri bulundurmaktadır.

Araştırmaya ait ilk hedefte 6 KHDAK A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hatlarında klasik kannabinoid reseptörleri 1 ve 2'nin varlığı qRT-PCR, akım sitometrisi ve immünositokimya yöntemleriyle ortaya konmuştur. Aynı zamanda bu hatlarda kannabinoid yapım yıkım enzimleri; FAAH, NAPE-PLD, DAGL ve MAGL immünositokimyasal olarak gösterilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre A549 hattına ait CB1 reseptöründe yüksek göreceli mRNA kat artışı saptanmıştır. Aynı hücrelere ait CB1 reseptör seviyesi akım sitometrisinde CB2 reseptörüne göre oldukça düşük (%10.0) bulunmuştur. A549 hücreleri immünositokimyasal olarak incelendiğinde CB1 reseptör işaretlenmesinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. qRT-PCR yöntemiyle ele alınan hücre dizilerine ait göreceli mRNA verilerinin akım sitometrisi yöntemiyle elde edilen immün işaretlenme oranlarına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. qRT-PCR gen analizinde hücresel döngünün esas alınarak reseptör ekspresyonunun değerlendirilmesi ve eş zamanlı olarak göreceli gen ifadelerinin inceleyebilir olması bu yöntemin sonuçlarını daha anlamlı kılmaktadır. İmmünositokimyasal olarak CB reseptörleri ve kannabinoid yapım yıkım

enzimlerinin varlığının saptanmış olması, akım sitometrisi verileriyle uyum göstermemektedir. Kannabinoidlerin yağ yapılı olmaları nedeniyle hücrelerin çeşitli organellerinde serbestçe hareket edebilmeleri ve yarı ömürlerinin oldukça kısa olmasından dolayı, akım sitometrisi gibi hücrelerde hedeflenen proteinlerin immün işaretlenmesine dayanan yöntemlerle kannabinoidlerin gerçek seviyeleri tespit edilememiş olabilir [149, 150]. Grubumuzca qRT-PCR yöntemiyle elde edilen A549 KHDAC hattına ait CB1 reseptör ekspresyonunun literatür ile uyumlu olduğu saptanmıştır [26, 151]. Literatürde A549 hücrelerinin CB1 ekspresyon seviyesi *Western blot* yöntemi ile gösterilmiştir [16, 26]. Ramer vd., A549 hücrelerinde *Western blot* yöntemiyle CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonunun varlığını göstermiştir [118]. İleri çalışmalarda qRT-PCR analizlerinin *Western blot* analizleriyle desteklenmesi planlanmaktadır. Primer akciğer kanseri hasta dokularında [16] veya *in vivo* hayvan modellerinde [19] CB1 reseptör seviyesine ilişkin immünohistokimyasal çalışmalar yapılmış olsa da KHDAC hatlarında CB1 ve CB2 reseptörlerinin immün işaretlenmesine ilişkin bir bulgu bulunmamaktadır. Benzer şekilde literatürde KHDAC hatlarına ait kannabinoid reseptörlerinin akım sitometrisi ile immün işaretlenmesine ilişkin bir çalışma yer almamaktadır. Bu yönüyle immünohistokimyasal bulgular ve akım sitometrisi bulguları literatüre yenilikçi bir bilgi katmaktadır.

H1299 KHDAC hattına ait CB1 reseptör ekspresyonu qRT-PCR sonuçlarına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Akım sitometrisi sonuçlarına göre H1299 hücrelerinde %7.84 CB1 reseptör seviyesi saptanmış ve CB2'ye göre oldukça düşük bulunmuştur. Ancak H1299 hücrelerine ait qRT-PCR verilerinin literatür ile uyum sağladığı görülmüştür [18]. Moody vd., H1299 hücrelerinde qRT-PCR yönteminin yanı sıra *Western blot* analiziyle CB1 reseptörünün ifadesini göstermiştir [18]. Literatürde yer alan diğer çalışmada H1299 hücrelerinde CB1 reseptörünün ekspresyonu *Western blot* analiziyle gösterilmiştir [16]. Bu doğrultuda yapılacak çalışmaların *Western blot* analiziyle güçlendirilmesi düşünülmektedir. *Geo Database* [152] ve *European Bioinformatics Institute Expression Atlas* (CNR1 Gen ID: ENSG00000118432) [153] veritabanlarındaki H1299 hücrelerine ait CB1 gen ekspresyonları ile bu tez kapsamında elde edilen veriler uyum göstermektedir.

Kannabinoid 1 reseptörünün qRT-PCR yöntemiyle yüksek seviyede eksprese edildiği H358 KHDAK hücrelerinde göreceli mRNA kat artışı A549 ve H1299 hücrelerine göre düşük olmakla birlikte H838, SW-1573 ve H1975 hücre hatlarına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Ancak akım sitometrisi sonuçlarına göre CB1 reseptör seviyesi (%0.22) CB2'ye göre düşük seviyede tespit edilmiştir. H358 KHDAK hattında çekirdek ve sitoplazmada CB1 reseptörü immün reaktivitesinin CB2 reseptörününkine göre göreceli olarak daha yüksek olarak saptanmıştır. NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimlerine ait immün işaretlenmelerin hücre hatları arasında farklılık göstermediği saptanmıştır. H358 hücrelerinde kannabinoidlerin CB1 ve/veya CB2 reseptörleri aracılı proliferasyonu engelleyici etkisine ilişkin literatürde sınırlı sayıda çalışma [17, 117] yer alsa da bu hücreye ait gen veri tabanı haricinde mRNA düzeyinde kannabinoid reseptör ekspresyonuna dair çalışma bulunmamaktadır. Ramer vd., H358 hücrelerinde *Western blot* yöntemiyle CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonunun varlığını göstermiştir [119]. *Geo Database* [154] ve *European Bioinformatics Institute Expression Atlas* (CNR1 Gen ID: ENSG00000118432) veritabanlarına göre H358 hücre hattına ilişkin CB1 ekspresyonunun qRT-PCR sonuçları ile örtüştüğü saptanmıştır.

H838 hücre hattının qRT-PCR yöntemiyle A549 ve H1299 hücrelerine göre 4.0 kat daha düşük göreceli CB1 reseptörü mRNA ekspresyonu olduğu hesaplanmıştır. Akım sitometrisi sonuçlarına göre H838 hücrelerinde hem CB1 (%1.15) hem de CB2 reseptör seviyeleri (%1.34) oldukça düşük bulunmuştur. H838 hattında CB1 ve CB2 reseptörlerine ait immün işaretlenmeler farklılık göstermezken; NAPE-PLD, FAAH, MAGL ve DAGL enzimlerine ait yoğun immün işaretlenmeleri gözlenmiştir. H838 hücreleri A549, H1299 ve H358 hücrelerine göre düşük CB1 reseptör ekspresyonu göstermiştir. H838 hücre hattında qRT-PCR ve *Western blot* yöntemiyle CB1 reseptörü ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir [18]. Bu tez çalışmasında elde edilen qRT-PCR sonuçları ile Preet vd. ile Moody ve diğerlerine ait olanların uyum gösterdiği saptanmıştır [18, 26]. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hatlarında CB1 ve CB2 reseptörleri ve AEA ve 2AG'ye ait yapım yıkım enzimlerinin immün işaretlenmesi, kannabinoid reseptörlerinin akım sitometrisi ile immün işaretlenmesine ilişkin bir çalışma

literatürde bulunmamaktadır. Bu yönüyle immünohistokimyasal bulgular ve akım sitometrisi bulguları literatüre yeni bir bilgi sunmuştur.

SW-1573 ve H1975 KHDAC hatlarında qRT-PCR yöntemiyle CB1 ve CB2 reseptörlerinin ekspresyonu oldukça düşük düzeyde saptanmıştır. Akım sitometrisi yöntemiyle H1975 hücrelerinde %7.04 CB1, %18.5 CB2 ve SW-1573 hücrelerinde %18.6 CB1 ve %73.8 oranında CB2 reseptör immün işaretlenmesi saptanmıştır. Bu doğrultuda akım sitometrisine ilişkin verilerin qRT-PCR sonuçlarıyla uyum sağlamadığı tespit edilmiştir. H1975 ve SW-1573 KHDAC hatlarında CB1 ve CB2 reseptörlerine ait yoğun immün işaretlenme gözlenmiştir. Tez kapsamında SW-1573 hücre hattına ait elde edilen qRT-PCR sonuçları literatür ile uyum sağlamamaktadır. Preet vd., SW-1573 hücre hattında qRT-PCR ve *Western blot* yöntemleriyle CB1 ve CB2 reseptörlerinin varlığını göstermiştir [26]. *Geo Database* [155, 156] ve *European Bioinformatics Institute Expression Atlas* (CNR1 Gen ID: ENSG00000118432) [153] veritabanlarına göre H1975 ve SW-1573 hücre hatlarına ilişkin CB1 ve CB2 ekspresyon seviyelerinin ise bu tez çalışmasına ait qRT-PCR sonuçları ile örtüştüğü saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında, KHDAC hatlarında CB1 ve CB2 reseptörlerinin varlığının değerlendirilme aşamasında göreceli mRNA kat artışları göz önüne alınmıştır. Kontrol olarak literatürde sinir sistemine ait sıkça kullanılan bir hücre hattının kullanılamamış olması iş paketinin önemli bir **sınırlaması** olmuştur. Yapılan çalışmalarda ve bu tez kapsamında kannabinoidlerin KHDAC'nde reseptör varlığı bildirilmektedir [26]. Gegotek vd., insan KHDAC dokularında CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonunun varlığını saptamıştır [137]. Ancak literatürde sağlıklı akciğer epitel hücrelerinde kannabinoid reseptörlerinin varlığına dair güncel bir çalışma bulunmaması ve bu tez kapsamında primer akciğer epitelinde CB1 ve CB2 reseptör ekspresyonlarının değerlendirilememesi, çalışmanın diğer bir sınırlaması olabilir.

2. Araştırma Hedefi: Kannabinoid 1 reseptörünü en yüksek düzeyde eksprese eden A549, H1299, H358 ve H838 hücre hatlarında, sentetik spesifik CB1 agonisti ACPA, *in vitro* ortamda doz bağımlı olarak hücre çoğalmasını azaltmaktadır. ACPA'nın proliferasyonu azaltıcı (EC50/IC50) dozu 1.39×10^{-12} M

olarak saptanmıştır. ACPA, IC50 dozunda uygulandığında A549, H1299, H358 ve H838 hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır.

Kannabinoid 1 reseptörünü eksprese eden KHDAC A549, H1299, H358 ve H838 hücre hatlarına 10^{-12} - 10^{-6} M doz aralığında ACPA uygulanmış ve WST-1 tekniği ile doz bağımlı etki görülmüştür. Buna göre, ACPA A549 hücrelerinde ilk 24 saatte proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir (* $p<0.05$). Literatürde kannabinoidlerin A549 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisine dair çalışmalar bulunmaktadır [17, 19, 117, 120]. Kannabidiol 10^{-8} - 10^{-6} M doz aralığında WST-1 analiziyle A549 hücre hattına uygulandığında hücre canlılığını etkilemediği saptanmıştır [117]. WST-1 yöntemiyle 3.0×10^{-6} M dozda kannabidiol ile A549 hücre hattı üzerinde istatistiksel anlamlı biçimde antiproliferatif etki saptanmıştır [17]. Diğer çalışmada, 3.0×10^{-6} M dozda kannabidiol A549 hücrelerine uygulanmış ve WST-1 tekniğiyle 48 saat sonra kontrole göre kannabidiolün antiproliferatif etkisi bildirilmiştir [120]. Vidinsky vd., JWH-133 CB2 agonistinin 10^{-4} - 10^{-9} M doz aralığını A549 hücrelerine uygulandıktan 72 saat sonraki canlılıklarını MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testiyle değerlendirmiş ve tüm dozlarda hücre çoğalmasında kontrole göre istatistiksel anlamlı azalma saptamıştır [27]. Kannabinoid 1/2 reseptör agonisti WIN55,212-2 ve CB2 agonisti JWH-015, 10^{-7} M – 2×10^{-6} M doz aralığında KHDAC A549 ve SW-1573 hatlarına uygulanmış ve MTT canlılık testi ile proliferasyonda azaltıcı etki görülmüştür [19]. Met-F-anandamid 10^{-5} M dozda A549 hücrelerine uygulandığında 24 saat sonra MTT yöntemiyle hücrelerinin canlılığında azalma görülmüştür [16]. Haustein vd., WST-1 analiziyle 3.0×10^{-6} M dozda kannabidiolü A549 hücrelerine uygulamış ve hücrelerin canlılıklarını koruduklarını tespit etmiştir [24]. Preet vd., Δ^9 -THC'nin KHDAC A549 ve SW-1573 hatlarındaki çoğalmayı ve invazyonu azaltıcı yönde yaptığı çalışmalarda Δ^9 -THC'nin 10^{-6} M - 2×10^{-5} M dozlarında kanser hücrelerinin canlılığını tripan mavisi boyama yöntemi ile değerlendirmiş ve Δ^9 -THC'nin hücrelerinin canlılığını etkilemediğini bildirmiştir. Δ^9 -THC, 72. saatte bu hücrelerde proliferasyon azaltıcı ve apoptozu uyarıcı etki göstermiştir [26]. Tez kapsamında elde edilen deney çıktılarında ACPA'nın etkili olduğu doz penceresinin literatür çalışmalarına göre düşük olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda düşük dozda etkinin sağlanabilmiş

olması, ileride *in vivo* ve kliniğe yönelik çalışmalarda yan etki gösterme riskini azaltılabileceği varsayılmaktadır.

H1299 hücrelerinde ACPA, tüm günlerde kontrole göre proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir. Kannabinoidlerin H1299 hücreleri üzerindeki proliferasyon azaltıcı etkilerine dair literatürde herhangi bir analiz yöntemi kullanılmamış olması nedeniyle, tez kapsamında elde edilen deney çıktıları orijinal niteliktedir.

ACPA'nın, H358 hücreleri üzerindeki proliferasyonu azaltıcı etkisi 1 ve 2. günlerde görülmüştür (* $p < 0.05$). Hem kannabinoid reseptörleri 1 ve 2 hem de TRPV1 reseptörü üzerinden etki eden CBD, THC, MA agonistleri ile selektif CB2 agonisti JWH-133 agonistleri 3×10^{-6} M dozda H358 hücrelerine uygulanmış ve 48 saat sonunda WST-1 testiyle hücre canlılığında değişim olmadığı görülmüştür [17]. Buna göre, ACPA'nın etki süresi ile literatüre ait kannabinoid çalışmalarının uyum gösterdiği görülmüştür. Buna göre H358 hücre hattı klasik CB reseptörlerini etki oluşturacak düzeyde bulundurmuyor olabilir ya da bu hücrelerde CB reseptörleri dışındaki yollardan agonistik etki oluşturulabilir.

ACPA, H838 hücrelerinin proliferasyonunda 2. günde 10^{-9} M dozunda ve 3. günde 10^{-9} ve 10^{-12} M dozlarında istatistiksel anlamlı biçimde azalmaya neden olmuştur. Kannabinoidlerin H838 hücreleri üzerindeki proliferasyon azaltıcı etkilerine dair literatürde herhangi bir çalışma yapılmamış olması, tez kapsamında elde edilen deney çıktıları yenilikçi kılmaktadır.

WST-1 analizinde ACPA'nın 10^{-12} - 10^{-9} M doz aralığında maksimum antiproliferatif etkili gösterdiği saptandıktan sonra gerçek zamanlı impedans temelli proliferasyon analizinde bu doz aralığı 24 saatte bir A549, H1299, H358 ve H838 hücrelerine uygulanmıştır. ACPA, A549 hücrelerinin proliferasyonunda anlamlı etki göstermemiştir. ACPA uygulanan doz aralığında H1299, H358 ve H838 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak azaltmıştır. ACPA, bu hücrelerde 48. saatten sonra etki göstermeye başlamıştır. ACPA'nın A549, H1299 ve H358 hücreleri üzerinde gösterdiği proliferasyon azaltıcı IC50 değeri 1.39×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır. H838 hücrelerinde etkili olduğu antiproliferatif IC50 değeri ise 3.47×10^{-11} M olarak hesaplanmıştır.

Kannabinoidlerin KHDAK'nde antiproliferatif etkisinin gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile çalışılmamış olması, literatüre yeni bir bilgi getirmesi açısından önemlidir.

Elde edilen WST-1 ve gerçek zamanlı proliferasyon analizi sonuçlarının ACPA uygulanan başka kanser türleri ile uyum gösterdiği saptanmıştır. ACPA, 2×10^{-4} M dozda uygulandığında, CB1 reseptörü aracılığıyla Panc1 pankreas kanseri hücrelerinde 1, 12 ve 24. saatlerde otofajik etkiye neden olmuştur [21]. Donadelli vd., 9×10^{-5} M ACPA'yı Panc1 hücrelerine uygulamış ve tek başına ACPA'nın etkili olmadığını ancak 2×10^{-7} M dozda gempitabin ile birlikte uygulandığında hücre proliferasyonunu azalttığını bildirmiştir [22]. ACPA, 10^{-4} M – 4×10^{-4} M doz aralığında Panc1 hücrelerine uygulandığında proliferasyon azaltıcı etki gösterdiği belirtilmiştir [20]. Bu tez kapsamında 10^{-12} – 10^{-9} M doz aralığında ACPA'nın, KHDAK hatları üzerinde proliferasyonu azaltıcı etki gücü açısından diğer çalışmalardan daha potent olduğu varsayılmaktadır.

Gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile elde edilen IC50 dozu 1.39×10^{-12} M ACPA dozu uygulanmıştır. Buna göre, 24. saatte A549 hücresi %93.29 oranında canlılığını korurken, %5.70'inin geç apoptoza uğradığı gözlenmiştir. H1299 hücrelerinde 24. saatte %87.76'sının canlılığını koruduğu, %10.54'ünün geç apoptoza gittiği saptanmıştır. İlk 24 saatte H358 hücrelerinin %82.22'sinin canlılığını koruduğu, %9.87'sinin geç apoptoza gittiği ve %6.93'ünün erken apoptoza gittiği görülmüştür. İlk 24 saatte ACPA H838 hücrelerinin %5.03'ünün geç apoptozuna, %4.58'inin erken apoptozuna neden olurken %89.32'sinin canlılığını korumuştur. 36. saatte A549 hücresinin %94.08'inin canlılığını korurken, %1.16'sının nekroza gittiği, %3.71'inin geç apoptoza uğradığı ve %1.06'sının erken apoptoza uğradığı tespit edilmiştir. H1299 hücrelerinde 36. saatte %96.63'ünün canlı kaldığı, %2.00'inin geç apoptoza gittiği saptanmıştır. H358 hücrelerinin ilk 36 saatte %97.29'unun canlı kaldığı, %1.84'ünün geç apoptoza gittiği saptanmıştır. İlk 36 saatte ACPA H838 hücrelerinin %1.14'ünün geç apoptozuna, %1.06'sının erken apoptozuna neden olurken %97.64'ü canlılığını korumuştur.

48. saatte A549 hücresinin %93.33'ünün canlılığını koruduğu, buna karşın %1.17'sinin nekroza gittiği, %4.82'inin geç apoptoza uğradığı gözlenmiştir. H1299 hücrelerinde %97.79'unun canlılığını koruduğu, %1.42'sinin geç apoptoza gittiği saptanmıştır. H358 hücrelerinin ilk 48 saatte %92.68'inin canlı kaldığı, %6.86'sinin geç apoptoza gittiği gözlenmiştir. ACPA, 48 saatte H838 hücrelerinin %10.27'sinin geç apoptozuna, %3.73'ünün nekrozuna ve %1.20'sinin erken apoptozuna neden olurken hücrelerin %84.80'i canlılığını korumuştur. A549 hücresinin ACPA uygulandıktan sonraki 72. saatte %86.94'ünün canlılığını koruduğu, buna karşın %8.23'ünün nekroza gittiği, %4.30'unun geç apoptoza uğradığı gözlenmiştir. H1299 hücrelerinde 72. saatte %95.92'sinin canlılığını koruduğu, %0.63'ünün geç apoptoza ve %2.83'ünün nekroza gittiği saptanmıştır. H358 hücrelerinin %96.40'ının canlı kaldığı, %2.20'sinin geç apoptoza ve %1.24'ünün nekroza gittiği görülmüştür. İlk 72 saatte ACPA H838 hücrelerinin %0.71'inin geç apoptozuna, %0.95'inin nekrozuna ve %0.20'sinin erken apoptozuna neden olurken hücrelerin %98.13'ü canlılığını korumuştur. Akım sitometrisine ait bu bulguların WST-1 ve gerçek zamanlı proliferasyon analizi sonuçlarına göre daha düşük olduğu görülmüştür. Erken ve geç apoptoza ilişkin yapılan deneyin tek set olarak gerçekleştirilmiş olması bu iş paketinin **sınırlaması** olarak değerlendirilebilir. Çalışmaların devamında erken ve geç apoptoz değerlendirmesinin yanı sıra diğer hücre ölümünü belirten diğer moleküllerin işaretlenmesi de planlanabilir. Böylece ACPA'nın hücresel etki mekanizmaları aydınlatılabilir.

Araşidonilsiklopropilamidin biyoyararlanımın ve yarı ömrünün oldukça düşük olması ve lipofilik yapıda olması, *in vitro* deneylerin yürütülmesi sürecinde madde kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında, bu problem çalışmanın önemli bir **limitasyonu** olarak değerlendirilebilir. Araşidonilsiklopropilamidin stabilitesini ve uzun süreli etkisini koruyabilmek için kontrollü PCL nanopartiküler salım sistemi geliştirilmiştir.

3. Araştırma Hedefi: ACPA'nın stabilitesi ve uzun süreli sabit salımını sağlayabilecek nanomühendislik temelli ACPA-PCL nanopartiküler ilaç formülasyonu geliştirilerek optimize edilmiştir. Formülasyon CB1 reseptörü bulunduran KHDAK hücre hatlarında etkilidir.

ACPA'nın besiyerindeki miktarını ölçmek amaçlı KHDAK A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücre hatlarına 10^{-6} M dozda ACPA uygulanmış ve 1, 2 ve 3. günlerde süpernatantlardan alınan örnekler LC-MS ile kantitatif olarak ölçülmüştür. Buna göre, 1. günde RPMI besiyerinde bulunan ACPA miktarı 2 ve 3. günlerde anlamlı biçimde azalmıştır (* $p < 0.05$). Birinci günde DMEMF10-HG besiyeri içinde bulunan ACPA miktarı 3. günde anlamlı biçimde azalma göstermiştir (* $p < 0.05$). A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 hücre hatlarına ait süpernatantlarındaki ACPA miktarı 1. güne göre 2 ve 3. günlerde istatistiksel anlamlı biçimde azalma göstermiştir (* $p < 0.05$). Kontrol gruplarındaki besiyeri içinde 1, 2 ve 3. günlerde ACPA miktarında azalma görülmesi ACPA'nın bu ortamda stabilitesini uzun süre koruyamadığını göstermektedir. 37 °C sıcaklıktaki ACPA stabilite çalışmalarının araştırmanın devamında yapılması hedeflenmektedir. Kannabinoidlerin hücre süpernatantlarındaki tayininin literatürde yer almamış olması, ACPA'nın stabilitesinin korunmamasına ilişkin hipotezi doğrulamaktadır. Bununla birlikte +4 °C sıcaklıkta yapılan ACPA stabilite çalışmalarında ACPA'nın 8 güne kadar stabilitesini koruduğu görülmüş olup ACPA ile çalışma süresinin bilinmesi açısından önemli bir sonuç olmuştur. Ancak 8 günden daha fazla süreli ACPA kararlılık çalışması yapılması gerektiğinden bu deneyin en belirgin limitasyonunu oluşturmuştur.

Çöktürme yöntemi ile elde edilen stabil ACPA yüklü PCL nanopartiküllerin büyüklükleri 162.2 ± 2.3 nm, PDI değeri ise 0.251 ± 0.008 olarak hesaplanmıştır. Tekli emülsiyon yöntemiyle hazırlanan APCA-PCL nanopartiküllerin büyüklüğü 176.4 ± 2.9 nm, PDI değeri 0.234 ± 0.033 olarak elde edilmiştir. Tekli emülsiyon ile hazırlanan APCA-PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli -13.4 ± 0.3 mV; çöktürme yöntemiyle hazırlanan APCA nanopartiküllerin zeta potansiyeli -29.4 ± 0.6 mV olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre deneyin devamındaki aşamalarda çöktürme yöntemi ile ACPA-PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan ACPA-PCL nanopartiküllerin yükleme etkinliği $\%39.9 \pm 14.7$ olarak hesaplanmıştır. Kannabinoid antagonisti rimonabant lipid nanopartiküllere yüklendiğinde $\%100$ 'e yakın yükleme etkinliği elde edilmiştir [131]. Kannabidiolün PCL mikropartiküllere yüklenmesi ile $\%90$ üzerinde yükleme etkinliği tespit edilmiştir [126]. Martín-Banderas vd., Δ^9 -THC'yi PEG ve PLGA nanopartikül sistemine yüklemiş ve $\%95$ - $\%97$ oranında yükleme etkinliği saptamıştır [132].

CB13 agonisti, lipid nanopartiküllere yüklendiğinde %90 oranında yükleme etkinliği hesaplanmıştır [128]. Başka bir çalışmada, CB13 agonisti PLGA nanopartiküllere yüklendiğinde %60'a yakın oranda yükleme etkinliği tespit edilmiştir [127]. Bu doğrultuda literatüre ait çıktı ile karşılaştırıldığında tez kapsamında elde edilen yükleme etkinliği sonuçları uyum sağlamamaktadır. ACPA'nın stabilitesinin ve yarı ömrünün düşük olması veya ilacın yüklenmesi sürecinde ilacın çökmesi gibi faktörlerin yükleme etkinliğini azaltmış olabileceği varsayılmaktadır. Yükleme etkinliğinin artırılması için yeni bir formülasyon içinde veya var olan formülasyonun geliştirilmesiyle ACPA'nın stabilitesinin korunarak daha yüksek oranda yükleme etkinliği sağlanacağı düşünülmektedir.

İlaç salım profilinin değerlendirilmesi için salım ortamından 0. dakika, 30 dakika, 1. saat, 4. saat, 8. saat, 16. saat, 1. gün, 2. gün ve 3. günde 2 ml örnek alınarak LC-MS yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır. Sonuçlara göre PCL nanopartiküllere içine yüklenen ACPA, kontrollü olarak salınmaktadır. 0. dakikada yüklenen ACPA'nın 2.2 ± 2.3 'si ortama salınmıştır. ACPA'nın 30. dakikada 2.9 ± 3.0 'ı, 60. dakikada 7.1 ± 7.6 'sı, 240. dakikada 9.1 ± 4.1 'i, 480. dakikada 14.6 ± 6.7 'si ortama salınmıştır. 960. dakikada ACPA'nın 25.8 ± 7.4 'ü, 1440. dakikada 24.5 ± 5.2 'si, 2880. dakikada 22.4 ± 10.8 'i, 4320. dakikada 44.7 ± 9.9 'u salınmıştır. Salım sonunda ACPA, yüklendiği miktarının %44.7'sini salım ortamına salmıştır. Elde edilen salım sonuçları literatürden farklılıklar göstermektedir. Alvarez-Fuentes vd., CB13 agonistini PLGA nanopartiküllere yükledikten sonra nanopartiküllerin 15 günlük salım profilini incelemiş ve %100'üne yakın ilaç salımı olduğunu göstermiştir [127]. CB13 agonisti üç farklı PLGA nanopartikül sistemi içine yerleştirildikten sonra 15 gün salım profili incelenmiş ve 15 günün sonunda ilacın %90 kadarı ortama salınmıştır [133]. CB13 agonisti lipid nanopartiküllere yüklendiğinde 7 saatte %100'ünü salmıştır [128]. Tetrahidrakannabinol, PEG-PLGA nanopartikül sistemine yüklendikten sonra 10 gün boyunca salım profili incelenmiş ve %80 üzerine salım gerçekleştiği saptanmıştır [132]. Tetrahidrakannabinol, PCL mikropartiküllerine yüklendiğinde 15 günlük salım profilinde %100'ünü salmıştır [139]. Kannabidiolün PCL mikropartiküllere yüklenmesi sonrası 20 günde %100'ünü salmıştır [126]. Başka bir çalışmada, rimonabantın lipid yapılı nanotaşıyıcılara yüklendikten sonraki 25-30 gün civarında %60'a kadarını saldığı gösterilmiştir [134]. Bu bulgular ile

karşılaştırıldığında tez kapsamında geliştirilmiş olan ACPA-PCL nanopartikülün geliştirilerek yükleme etkinliğinin artırılması gerektiği düşünülmektedir.

ACPA-PCL nanopartiküller hazırlandıktan sonra gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile tespit edilen 1.39×10^{-12} M ACPA dozunu salan nanopartikül salım sistemi besiyeri içinde seyreltilmiştir. Gerçek zamanlı proliferasyon analizi sonuçlarına göre ilaç eklendikten sonra 96. saatten itibaren tüm dozlar, A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etki göstermiştir ($p < 0.05$). 1.39×10^{-12} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküllerin, A549 hücrelerinin proliferasyonunu en etkili biçimde azalttığı görülmüştür.

1.39×10^{-12} M ACPA ve 1.39×10^{-11} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller eklendikten sonra 24. saatte, H1299 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre anlamlı biçimde azaltmıştır ($p < 0.05$). İlaç eklendikten sonra 48 ve 72. saatlerde 1.39×10^{-12} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller, ACPA yüklenmemiş boş PCL nanopartiküller ve 1.39×10^{-12} M ACPA dozu uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı azalma görülmüştür ($p < 0.05$). H1299 hücrelerinde kontrol grubu 96. saatten itibaren tüm gruplara göre istatistiksel anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p < 0.05$). ACPA yüklü PCL nanopartiküllerin antiproliferatif etkisinin saptanmış olması boş PCL nanopartiküllerin hücreler üzerindeki öldürücü etkisi nanopartiküler salım sisteminin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

1.39×10^{-12} M ACPA eklendikten sonra 36, 48, 144. saatlerde H358 hücrelerinde kontrole göre istatistiksel anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.39×10^{-12} M ve 1.39×10^{-11} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller H358 hücreleri üzerinde istatistiksel anlamlı antiproliferatif etkiyi 140. saate kadar göstermemiştir. 140. saatten sonra kontrol grubu deney gruplarından istatistiksel anlamlı biçimde fazla bulunmuştur ($p < 0.05$). 1.39×10^{-12} M ve 1.39×10^{-11} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller H838 hücreleri üzerinde 195 saat boyunca istatistiksel anlamlı biçimde antiproliferatif etki göstermemiştir. 1.39×10^{-12} M ACPA ve ilaç yüklenmemiş boş PCL nanopartiküllerin 190. saatte H838 hücrelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu sonuçların literatüre ait benzer çalışmalarla uyum sağlamadığı görülmüştür. Paklitaksel yüklü, kitosanla kaplı polikaprolakton içerikli 3 farklı polimer bazlı

nanopartikülün Caco-2 kolorektal hücre hattı ve A549 KHDAK hattında uygulandığında hücre canlılığının doz bağımlı azaldığı saptanmıştır [143]. Glioma tedavisi için CBD, lipid nanokapsüllere yüklenmiş ve glioblastoma U373MG hücre hattında uygulanmıştır. Sonuçta, hücre canlılığının doz bağımlı olarak azaldığı görülmüştür [141]. Tetrahidrokannabinol PCL mikropartiküllere yüklendiğinde, 9. günde RBL2H3 rat bazofilik lösemi ve Caco2 insan kolorektal karsinom hücrelerinin hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir [139]. Literatüre ait başka bir çalışmada kannabidiol yüklü PCL mikropartiküllerin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 10 gün içinde istatistiksel anlamlı biçimde proliferasyonu azaltıcı etki sağladığı bildirilmiştir [126, 135]. Hazırlanan ACPA-PCL nanopartiküler salım sisteminin salım süresinin kısa olması bu iş paketinin önemli bir limitasyonu olarak değerlendirilmekle birlikte salım süresinin artırılması ilacın tamamının hangi sürede salınacağı hakkında net bilgi verebilir. Buna karşın, düşük dozda ACPA yüklü PCL nanopartikül sisteminin KHDAK hatlarındaki etkisinin literatürde yer almaması, bu çalışmayı orijinal kılmaktadır.

Yapılan çalışma *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olup vücutta *in vivo* ortamdaki kanser mikroçevresine ait parametreleri bire bir yansıtmamaktadır. Bu sınırlama nedeniyle *in vitro* koşullar çerçevesinde sentetik kannabinoid agonisti ACPA'nın KHDAK hücrelerinde doz bağımlı proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu uyarıcı etkisi değerlendirilmiş ve çıkarımlar yapılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında proliferasyon azaltıcı ve apoptozu uyarıcı hücre içi sinyal yollarına ait protein veya transkripsiyon faktörlerinin değişimi araştırılmalıdır.

Klinikte hâlihazırda Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (*U.S. Food and Drug Administration*– FDA) onaylı 3 kannabinoid ilacı kullanılmaktadır. Onaylanan sentetik kannabinoidler **dronabinol** (Marinol® – 1985) ve **nabilon** (Cesamet®), Δ^9 -THC'ün sentetik formlarıdır. Bu ilaçlar kanser kemoterapisi sürecinde görülen bulantı ve kusmanın tedavisi için kullanılmaktadır [109, 157, 158]. Dronabinol, aynı zamanda 1992 yılından beri, AIDS hastalarında karşılaşılan iştahsızlık ve kilo kaybı gibi semptomların tedavisi için tercih edilmektedir [109, 159]. Nabilonun, dronabinole göre daha etkili olduğu 1 mg nabilonun 7-8 mg dronabinole karşılık geldiği bildirilmiştir [160]. FDA tarafından 2018 yılında onaylanan **Epidiolox®** bir kannabidiol türevi olup klinikte ağır epilepsi

nöbetlerinin tedavisi için uygulanmaktadır [161]. Tez kapsamında, KHDAK hatlarında ACPA'nın antiproliferatif etkisi *in vitro* çalışmalarla gözlenmiştir ve ileriki aşamalarda etkilediği hücresel yolların incelenmesi ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi hedeflenmektedir. Bu tez çalışmasında CB1 reseptör agonizması aracılığıyla ACPA tarafından uyarılan antiproliferatif etkinin solunum sistemi için geliştirilecek kontrollü salım sistemi ile klinikte küratif tedavisi bulunmayan akciğer kanseri için inhalasyon yoluyla uygulanacak yeni bir tedavi yöntemi adayı olması beklenmektedir. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında elde edilen çıktılar ile Hacettepe Teknoloji Transfer Merkezi Patent Ofisi'ne buluş başvurusunda bulunulmuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, KHDAK hücrelerinin bir kısmında yüksek CB1 reseptör ekspresyonu saptanmıştır. ACPA, A549 hücresinde 1. günde 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} M dozlarında proliferasyon azaltıcı etki göstermiştir. ACPA, H1299 hücresinde 3 gün boyunca tüm dozlarında proliferasyon azaltıcı etki göstermiştir. ACPA, H358 hücresinde 1. günde 10^{-10} - 10^{-6} M dozlarda, 2. günde tüm dozlarında proliferasyon azaltıcı etki göstermiştir. ACPA, H838 hücrelerinde 3. günde 10^{-9} ve 10^{-12} M dozlarında istatistiksel anlamlı biçimde azalmaya neden olmuştur. ACPA'nın A549, H1299 ve H358 hücreleri üzerinde gösterdiği proliferasyon azaltıcı IC50 değeri 1.39×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır. H838 hücrelerinde etkili olduğu antiproliferatif IC50 değeri ise 3.47×10^{-11} M olarak hesaplanmıştır. Etkili doz 50 (IC50) düzeyi 1.39×10^{-12} M olarak hesaplanan ACPA'nın, PCL nanopartiküller ile kontrollü ve uzun süreli salımı sağlanmıştır. 1.39×10^{-12} M ACPA dozu salan PCL nanopartiküller ve boş partiküller hücrelerde çeşitli etkilere neden olmakla birlikte genellikle antiproliferatif etkiyi sürdürdüğü sonucuna varılmıştır.

SONUÇLAR

1. A549, H1299, H358, H838, H1975 ve SW-1573 KHDAK hücre hatlarında değişen oranlarda CB1 ve CB2 reseptör varlığı saptanmış olup A549, H1299 ve H358 hücrelerinin CB1 reseptör seviyeleri oldukça yüksek bulunmuştur. H838 hücresi, H1975 ve SW-1573 hücrelerine göre daha yüksek CB1 reseptör ekspresyonuna sahiptir.
2. Kannabinoid 1 reseptörünü en yüksek düzeyde eksprese eden A549, H1299, H358 ve H838 hücre hatlarında sentetik CB1 spesifik kannabinoid agonisti ACPA, WST-1 analizinde proliferasyon azaltıcı etki göstermiştir.
3. ACPA, gerçek zamanlı impedans temelli proliferasyon analizi ile A549, H1299, H358 ve H838 hücre hatlarında 48. saatten itibaren 1.39×10^{-12} IC50 dozunda proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir.
4. ACPA, 1.39×10^{-12} M IC50 dozunda KHDAK A549, H1299, H358 ve H838 hücrelerine uygulandığında 24, 36, 48 ve 72. saatlerde hücreleri belirli oranda erken ve geç apoptoza götürmüştür.
5. ACPA'nın 1, 2 ve 3. günlerde yapılan süpernatant tayini ile stabilitesinin korunmadığı ve yarı ömrünün kısa olduğu konfirme edilmiştir. Bu doğrultuda PCL kaplı kontrollü uzun süreli salım sistemine ait formülasyonun tasarımı sağlanmıştır.
6. Optimizasyon ve *in vitro* karakterizasyonları yapılan ACPA-PCL nanopartiküller 1.39×10^{-12} M IC50 dozunu salacak şekilde besiyeri içinde seyreltilip hücrelere uygulandığında belirli saatlerde hücrelerde antiproliferatif etki sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- [1] S. Yasmin-Karim, M. Moreau, R. Mueller, N. Sinha, R. Dabney, A. Herman, W. Ngwa, Enhancing the Therapeutic Efficacy of Cancer Treatment With Cannabinoids, *Frontiers in Oncology*, 8 (2018).
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin*, 68 (2018) 394-424.
- [3] A.M.C. Dingemans, M. Reck, V. Westeel, Lung Cancer: ERS Monograph, European Respiratory Society 2015.
- [4] W.D. Travis, E. Brambilla, M. Noguchi, A.G. Nicholson, K.R. Geisinger, Y. Yatabe, D.G. Beer, C.A. Powell, G.J. Riely, P.E. Van Schil, K. Garg, J.H. Austin, H. Asamura, V.W. Rusch, F.R. Hirsch, G. Scagliotti, T. Mitsudomi, R.M. Huber, Y. Ishikawa, J. Jett, M. Sanchez-Cespedes, J.P. Sculier, T. Takahashi, M. Tsuboi, J. Vansteenkiste, I. Wistuba, P.C. Yang, D. Aberle, C. Brambilla, D. Flieder, W. Franklin, A. Gazdar, M. Gould, P. Hasleton, D. Henderson, B. Johnson, D. Johnson, K. Kerr, K. Kuriyama, J.S. Lee, V.A. Miller, I. Petersen, V. Roggli, R. Rosell, N. Saijo, E. Thunnissen, M. Tsao, D. Yankelewitz, International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 6 (2011) 244-285.
- [5] D.R. Aberle, A.M. Adams, C.D. Berg, W.C. Black, J.D. Clapp, R.M. Fagerstrom, I.F. Gareen, C. Gatsonis, P.M. Marcus, J.D. Sicks, Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening, *N Engl J Med*, 365 (2011) 395-409.
- [6] H. Lemjabbar-Alaoui, O.U. Hassan, Y.W. Yang, P. Buchanan, Lung cancer: Biology and treatment options, *Biochimica et biophysica acta*, 1856 (2015) 189-210.
- [7] D.I. Abrams, M. Guzman, Cannabis in Cancer Care, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97 (2015) 575-586.
- [8] M.A. Fitzcharles, E. Eisenberg, Medical cannabis: A forward vision for the clinician, *European Journal of Pain*, 22 (2018) 485-491.
- [9] G. Velasco, C. Sanchez, M. Guzman, Anticancer mechanisms of cannabinoids, *Curr Oncol*, 23 (2016) S23-32.
- [10] I. Turgeman, G. Bar-Sela, Cannabis for cancer – illusion or the tip of an iceberg: a review of the evidence for the use of Cannabis and synthetic

cannabinoids in oncology, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28 (2019) 285-296.

[11] E. Bilgic, E. Guzel, S. Kose, M.C. Aydin, E. Karaismailoglu, I. Akar, A. Usubutun, P. Korkusuz, Endocannabinoids modulate apoptosis in endometriosis and adenomyosis, *Acta Histochem*, 119 (2017) 523-532.

[12] E. Moreno, M. Cavic, A. Krivokuca, V. Casadó, E. Canela, The Endocannabinoid System as a Target in Cancer Diseases: Are We There Yet?, *Frontiers in Pharmacology*, 10 (2019).

[13] G. Wilkie, B. Sakr, T. Rizack, Medical Marijuana Use in Oncology A Review, *Jama Oncology*, 2 (2016) 670-675.

[14] E. Pagano, F. Borrelli, Targeting cannabinoid receptors in gastrointestinal cancers for therapeutic uses: current status and future perspectives, *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 11 (2017) 871-873.

[15] C. Turcotte, M.-R. Blanchet, M. Laviolette, N. Flamand, Impact of Cannabis, Cannabinoids, and Endocannabinoids in the Lungs, *Frontiers in Pharmacology*, 7 (2016) 317.

[16] J. Ravi, A. Sneh, K. Shilo, M.W. Nasser, R.K. Ganju, FAAH inhibition enhances anandamide mediated anti-tumorigenic effects in non-small cell lung cancer by downregulating the EGF/EGFR pathway, *Oncotarget*, 5 (2014) 2475-2486.

[17] R. Ramer, S. Fischer, M. Haustein, K. Manda, B. Hinz, Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells, *Biochemical Pharmacology*, 91 (2014) 202-216.

[18] T.W. Moody, S. Mantey, R.T. Jensen, D. Wink, P. Mukhopadhyay, P. Pacher, Abstract 1091: Cannabinoids inhibit epidermal growth factor receptor transactivation in lung cancer cells, *Cancer Research*, 72 (2012) 1091-1091.

[19] A. Preet, Z. Qamri, M.W. Nasser, A. Prasad, K. Shilo, X.H. Zou, J.E. Groopman, R.K. Ganju, Cannabinoid Receptors, CB1 and CB2, as Novel Targets for Inhibition of Non-Small Cell Lung Cancer Growth and Metastasis, *Cancer Prevention Research*, 4 (2010) 65-75.

[20] J. Brandi, I. Dando, M. Palmieri, M. Donadelli, D. Cecconi, Comparative proteomic and phosphoproteomic profiling of pancreatic adenocarcinoma cells treated with CB1 or CB2 agonists, *ELECTROPHORESIS*, 34 (2013) 1359-1368.

[21] I. Dando, M. Donadelli, C. Costanzo, E. Dalla Pozza, A. D'Alessandro, L. Zolla, M. Palmieri, Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells, *Cell Death Dis*, 4 (2013) e664.

[22] M. Donadelli, I. Dando, T. Zaniboni, C. Costanzo, E. Dalla Pozza, M.T. Scupoli, A. Scarpa, S. Zappavigna, M. Marra, A. Abbruzzese, M. Bifulco, M.

Caraglia, M. Palmieri, Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism, *Cell Death Dis*, 2 (**2011**) e152.

[23] S. Pisanti, P. Picardi, A. D'Alessandro, C. Laezza, M. Bifulco, The endocannabinoid signaling system in cancer, *Trends Pharmacol Sci*, 34 (**2013**) 273-282.

[24] M. Haustein, R. Ramer, M. Linnebacher, K. Manda, B. Hinz, Cannabinoids increase lung cancer cell lysis by lymphokine-activated killer cells via upregulation of ICAM-1, *Biochemical Pharmacology*, 92 (**2014**) 312-325.

[25] K. Winkler, R. Ramer, S. Dithmer, I. Ivanov, J. Merkord, B. Hinz, Fatty acid amide hydrolase inhibitors confer anti-invasive and antimetastatic effects on lung cancer cells, *Oncotarget*, 7 (**2016**) 15047-15064.

[26] A. Preet, R.K. Ganju, J.E. Groopman, Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo, *Oncogene*, 27 (**2008**) 339-346.

[27] B. Vidinsky, P. Gal, M. Pilatova, Z. Vidova, P. Solar, L. Varinska, L. Ivanova, J. Mojzis, Anti-proliferative and Anti-angiogenic Effects of CB2R Agonist (JWH-133) in Non-small Lung Cancer Cells (A549) and Human Umbilical Vein Endothelial Cells: an in Vitro Investigation, *Folia Biologica*, 58 (**2012**) 75-80.

[28] Globocan, Turkey - Global Cancer Observatory, World Health Organization, <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>, **2018**.

[29] U. Testa, G. Castelli, E. Pelosi, Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells, *Cancers (Basel)*, 10 (**2018**).

[30] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2018, *CA Cancer J Clin*, 68 (**2018**) 7-30.

[31] N.C.I. U.S. National Institutes of Health, SEER Cancer Statistics Review, 1975–2011, **2014**, pp. Available at: <http://www.seer.cancer.gov>.

[32] M.C.S. Wong, X.Q. Lao, K.-F. Ho, W.B. Goggins, S.L.A. Tse, Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status, *Scientific Reports*, 7 (**2017**) 14300.

[33] L.C. Alliance, 2018 Lung Cancer Facts, Lung Cancer Alliance, <https://lungcanceralliance.org>, **2018**.

[34] H.H. Popper, Progression and metastasis of lung cancer, *Cancer Metastasis Rev*, 35 (**2016**) 75-91.

[35] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources,

methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int J Cancer*, 136 **(2015)** E359-386.

[36] C.A. Haiman, D.O. Stram, L.R. Wilkens, M.C. Pike, L.N. Kolonel, B.E. Henderson, L. Le Marchand, Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer, *N Engl J Med*, 354 **(2006)** 333-342.

[37] S.M. Dubinett, *Inflammation and Lung Cancer*, Springer New York **2015**.

[38] D.A. Ladin, E. Soliman, L. Griffin, R. Van Dross, Preclinical and Clinical Assessment of Cannabinoids as Anti-Cancer Agents, *Frontiers in Pharmacology*, 7 **(2016)**.

[39] E. Shtivelman, T. Hensing, G.R. Simon, P.A. Dennis, G.A. Otterson, R. Bueno, R. Salgia, Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer, *Oncotarget*, 5 **(2014)** 1392-1433.

[40] J. Lortet-Tieulent, I. Soerjomataram, J. Ferlay, M. Rutherford, E. Weiderpass, F. Bray, International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women, *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 84 **(2014)** 13-22.

[41] T.J. Lynch, D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Haserlat, J.G. Supko, F.G. Haluska, D.N. Louis, D.C. Christiani, J. Settleman, D.A. Haber, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N Engl J Med*, 350 **(2004)** 2129-2139.

[42] H.I. Pass, H.I. Pass, C. International Association for the Study of Lung, Principles and practice of lung cancer : the official reference text of the IASLC, **(2012)**.

[43] J.A. Roth, W.K. Hong, R.U. Komaki, *Lung Cancer*, Wiley **2014**.

[44] N.A. Yener, D.D.J.T.R.S. Apa, Akciğer kanserinde morfolojik tanı ve sınıflama, 2 **(2014)** 281-289.

[45] C.-Y. Huang, D.-T. Ju, C.-F. Chang, P. Muralidhar Reddy, B.K. Velmurugan, A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer, *BioMedicine*, 7 **(2017)** 23-23.

[46] S.H. Lee, J.K. Lee, M.J. Ahn, D.W. Kim, J.M. Sun, B. Keam, T.M. Kim, D.S. Heo, J.S. Ahn, Y.L. Choi, H.S. Min, Y.K. Jeon, K. Park, Vandetanib in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer-harboring RET rearrangement: a phase II clinical trial, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28 **(2017)** 292-297.

[47] P.A. Janne, A.T. Shaw, D.R. Camidge, G. Giaccone, S.M. Shreeve, Y. Tang, Z. Goldberg, J.F. Martini, H. Xu, L.P. James, B.J. Solomon, Combined Pan-HER and ALK/ROS1/MET Inhibition with Dacomitinib and Crizotinib in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Results of a Phase I Study, *Journal of thoracic oncology*

: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 11 (2016) 737-747.

[48] J. Remon, B. Besse, Brain Metastases in Oncogene-Addicted Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Incidence and Treatment, *Frontiers in Oncology*, 8 (2018).

[49] S.M. Lim, H.R. Kim, J.-S. Lee, K.H. Lee, Y.-G. Lee, Y.J. Min, E.K. Cho, S.S. Lee, B.-S. Kim, M.Y. Choi, H.S. Shim, J.-H. Chung, Y.L. Choi, M.J. Lee, M. Kim, J.-H. Kim, S.M. Ali, M.-J. Ahn, B.C. Cho, Open-Label, Multicenter, Phase II Study of Ceritinib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Rearrangement, *Journal of Clinical Oncology*, 35 (2017) 2613-2618.

[50] L.G. Paz-Ares, F. de Marinis, M. Dediu, M. Thomas, J.L. Pujol, P. Bidoli, O. Molinier, T.P. Sahoo, E. Laack, M. Reck, J. Corral, S. Melemed, W. John, N. Chouaki, A.H. Zimmermann, C. Visseren-Grul, C. Gridelli, PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*, 31 (2013) 2895-2902.

[51] A. Pearce, M. Haas, R. Viney, S.-A. Pearson, P. Haywood, C. Brown, R. Ward, Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study, *PLOS ONE*, 12 (2017) e0184360.

[52] G.F. Liu, X.F. Li, S.N. Yu, Y.Y. Miao, S.H. Zhang, Efficacy and adverse events of five targeted agents in the treatment of advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: A network meta-analysis of nine eligible randomized controlled trials involving 5,059 patients, *J Cell Physiol*, 234 (2019) 3445-3457.

[53] W. Liang, X. Wu, W. Fang, Y. Zhao, Y. Yang, Z. Hu, C. Xue, J. Zhang, J. Zhang, Y. Ma, T. Zhou, Y. Yan, X. Hou, T. Qin, X. Dinglin, Y. Tian, P. Huang, Y. Huang, H. Zhao, L. Zhang, Network meta-analysis of erlotinib, gefitinib, afatinib and icotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations, *PLoS One*, 9 (2014) e85245.

[54] V. Bogdanovic, J. Mrdjanovic, I. Borisev, A Review of the Therapeutic Antitumor Potential of Cannabinoids, *J Altern Complement Med*, 23 (2017) 831-836.

[55] B. Chakravarti, J. Ravi, R.K. Ganju, Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications, *Oncotarget*, 5 (2014) 5852-5872.

[56] J. Jett, E. Stone, G. Warren, K.M. Cummings, Cannabis Use, Lung Cancer, and Related Issues, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 13 (2018) 480-487.

[57] S.D. McAllister, L. Soroceanu, P.-Y. Desprez, The Antitumor Activity of Plant-Derived Non-Psychoactive Cannabinoids, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 10 (2015) 255-267.

- [58] M.I. Khan, A.A. Sobocinska, A.M. Czarnecka, M. Krol, B. Botta, C. Szczylik, The Therapeutic Aspects of the Endocannabinoid System (ECS) for Cancer and their Development: From Nature to Laboratory, Current pharmaceutical design, 22 (2016) 1756-1766.
- [59] S. Deiana, Medical use of cannabis. Cannabidiol: a new light for schizophrenia?, Drug testing and analysis, 5 (2013) 46-51.
- [60] D. Kendall, S. Alexander, Cannabinoid Pharmacology, Elsevier Science 2017.
- [61] A.C. Howlett, M.E. Abood, CB1 and CB2 Receptor Pharmacology, Adv Pharmacol, 80 (2017) 169-206.
- [62] T. Dzierzanowski, Prospects for the Use of Cannabinoids in Oncology and Palliative Care Practice: A Review of the Evidence, Cancers, 11 (2019).
- [63] A. Minerbi, W. Hauser, M.A. Fitzcharles, Medical Cannabis for Older Patients, Drugs & Aging, 36 (2019) 39-51.
- [64] T. Ayakannu, Investigation of Endocannabinoid System Signalling Pathways and Their Regulations in Endometrial Carcinoma, Department of Cancer Studies and Molecular Medicine, University of Leicester, 2016, pp. 341.
- [65] M.T. van Jaarsveld, J.M. Houthuijzen, E.E. Voest, Molecular mechanisms of target recognition by lipid GPCRs: relevance for cancer, Oncogene, 35 (2016) 4021-4035.
- [66] G. Alpini, S. DeMorrow, Changes in the Endocannabinoid System May Give Insight into new and Effective Treatments for Cancer, Vitamins and hormones, 81 (2009) 469-485.
- [67] M. Pyszniak, J. Tabarkiewicz, J.J. Luszczki, Endocannabinoid system as a regulator of tumor cell malignancy - biological pathways and clinical significance, Onco Targets Ther, 9 (2016) 4323-4336.
- [68] N. Stella, Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas, Glia, 58 (2010) 1017-1030.
- [69] E. Gkoumassi, B.G. Dekkers, M.J. Droge, C.R. Elzinga, M. Schmidt, H. Meurs, J. Zaagsma, S.A. Nelemans, Virodhamine and CP55,940 modulate cAMP production and IL-8 release in human bronchial epithelial cells, Br J Pharmacol, 151 (2007) 1041-1048.
- [70] H.-W. Chan, N.C. McKirdy, H.N. Peiris, G.E. Rice, M.D. Mitchell, The role of endocannabinoids in pregnancy, Reproduction, 146 (2013) R101-R109.
- [71] R. Ramer, B. Hinz, Cannabinoids as Anticancer Drugs, Adv Pharmacol, 80 (2017) 397-436.
- [72] A. Athanasiou, A.B. Clarke, A.E. Turner, N.M. Kumaran, S. Vakilpour, P.A. Smith, D. Bagiokou, T.D. Bradshaw, A.D. Westwell, L. Fang, D.N. Lobo, C.S.

Constantinescu, V. Calabrese, A. Loesch, S.P.H. Alexander, R.H. Clothier, D.A. Kendall, T.E. Bates, Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: A unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364 (2007) 131-137.

[73] L.E. Klumpers, D.L. Thacker, A Brief Background on Cannabis: From Plant to Medical Indications, *Journal of AOAC International*, 102 (2019) 412-420.

[74] T. Hohmann, K. Feese, C. Ghadban, F. Dehghani, U. Grabiec, On the influence of cannabinoids on cell morphology and motility of glioblastoma cells, *PLOS ONE*, 14 (2019) e0212037.

[75] D.W. Bowles, C.L. O'Bryant, D.R. Camidge, A. Jimeno, The intersection between cannabis and cancer in the United States, *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 83 (2012) 1-10.

[76] M.M. Caffarel, C. Andradas, E. Perez-Gomez, M. Guzman, C. Sanchez, Cannabinoids: a new hope for breast cancer therapy?, *Cancer treatment reviews*, 38 (2012) 911-918.

[77] K. Yasukawa, Cannabinoids as seed compounds for the cancer treatment, *Forensic Toxicology*, 32 (2014) 189-193.

[78] K. Soderstrom, E. Soliman, R. Van Dross, Cannabinoids Modulate Neuronal Activity and Cancer by CB1 and CB2 Receptor-Independent Mechanisms, *Front Pharmacol*, 8 (2017) 720.

[79] A. Vaccani, P. Massi, A. Colombo, T. Rubino, D. Parolaro, Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism, *British journal of pharmacology*, 144 (2005) 1032-1036.

[80] S. Pisanti, A.M. Malfitano, E. Ciaglia, A. Lamberti, R. Ranieri, G. Cuomo, M. Abate, G. Faggiana, M.C. Proto, D. Fiore, C. Laezza, M. Bifulco, Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications, *Pharmacology & Therapeutics*, 175 (2017) 133-150.

[81] T.R.H. Buch, E.A.M. Buch, I. Boekhoff, D. Steinritz, A. Aigner, Role of Chemosensory TRP Channels in Lung Cancer, *Pharmaceuticals*, 11 (2018).

[82] V. Maida, P.J. Daeninck, A user's guide to cannabinoid therapies in oncology, *Current Oncology*, 23 (2016) 398-406.

[83] F.A. Javid, R.M. Phillips, S. Afshinjavid, R. Verde, A. Ligresti, Cannabinoid pharmacology in cancer research: A new hope for cancer patients?, *European journal of pharmacology*, 775 (2016) 1-14.

[84] A.S. Laun, S.H. Shrader, K.J. Brown, Z.H. Song, GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol, *Acta Pharmacologica Sinica*, 40 (2019) 300-308.

- [85] J. Guindon, A.G. Hohmann, The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication, *British Journal of Pharmacology*, 163 (2011) 1447-1463.
- [86] B.J. Cridge, R.J. Rosengren, Critical appraisal of the potential use of cannabinoids in cancer management, *Cancer Management and Research*, 5 (2013) 301-313.
- [87] A. Bettiga, M. Aureli, G. Colciago, V. Murdica, M. Moschini, R. Luciano, D. Canals, Y. Hannun, P. Hedlund, G. Lavorgna, R. Colombo, R. Bassi, M. Samarani, F. Montorsi, A. Salonia, F. Benigni, Bladder cancer cell growth and motility implicate cannabinoid 2 receptor-mediated modifications of sphingolipids metabolism, *Sci Rep*, 7 (2017) 42157.
- [88] S. Carpi, S. Fogli, A. Romanini, M. Pellegrino, B. Adinolfi, A. Podesta, B. Costa, E. Da Pozzo, C. Martini, M.C. Breschi, P. Nieri, AM251 induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in A375 human melanoma cells, *Anti-Cancer Drugs*, 26 (2015) 754-762.
- [89] B. Adinolfi, A. Romanini, A. Vanni, E. Martinotti, A. Chicca, S. Fogli, P. Nieri, Anticancer activity of anandamide in human cutaneous melanoma cells, *European journal of pharmacology*, 718 (2013) 154-159.
- [90] S.-S. Hsu, C.-J. Huang, H.-H. Cheng, C.-T. Chou, H.-Y. Lee, J.-L. Wang, I.S. Chen, S.-I. Liu, Y.-C. Lu, H.-T. Chang, J.-K. Huang, J.-S. Chen, C.-R. Jan, Anandamide-induced Ca^{2+} elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells, *Toxicology*, 231 (2007) 21-29.
- [91] O. Orellana-Serradell, C.E. Poblete, C. Sanchez, E.A. Castellon, I. Gallegos, C. Huidobro, M.N. Llanos, H.R. Contreras, Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells, *Oncol Rep*, 33 (2015) 1599-1608.
- [92] A.M. Sanchez, R. Cioffi, P. Viganò, M. Candiani, R. Verde, F. Piscitelli, V.D. Marzo, E. Garavaglia, P. Panina-Bordignon, Elevated Systemic Levels of Endocannabinoids and Related Mediators Across the Menstrual Cycle in Women With Endometriosis, *Reproductive Sciences*, 23 (2016) 1071-1079.
- [93] E. Soliman, K.L. Henderson, A.S. Danell, R. Van Dross, Arachidonoyl-ethanolamide activates endoplasmic reticulum stress-apoptosis in tumorigenic keratinocytes: Role of cyclooxygenase-2 and novel J-series prostamides, *Mol Carcinog*, 55 (2016) 117-130.
- [94] N. Pourkhalili, M.H. Ghahremani, N. Farsandaj, S. Tavajohi, M. Majdzadeh, M. Parsa, N.J. Lavasani, S.N. Ostad, Evaluation of anti-invasion effect of cannabinoids on human hepatocarcinoma cells, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23 (2013) 120-126.
- [95] B. Bosier, G.G. Muccioli, D.M. Lambert, The FAAH inhibitor URB597 efficiently reduces tyrosine hydroxylase expression through CB(1)- and FAAH-independent mechanisms, *Br J Pharmacol*, 169 (2013) 794-807.

- [96] L. De Petrocellis, V. Di Marzo, An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts, *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 23 (2009) 1-15.
- [97] P. Massi, M. Solinas, V. Cincina, D. Parolaro, Cannabidiol as potential anticancer drug, *Br J Clin Pharmacol*, 75 (2013) 303-312.
- [98] S. Oesch, J. Gertsch, Cannabinoid receptor ligands as potential anticancer agents--high hopes for new therapies?, *J Pharm Pharmacol*, 61 (2009) 839-853.
- [99] H. Li, J.T. Wood, K.M. Whitten, S.K. Vadivel, S. Seng, A. Makriyannis, H.K. Avraham, Inhibition of fatty acid amide hydrolase activates Nrf2 signalling and induces heme oxygenase 1 transcription in breast cancer cells, *Br J Pharmacol*, 170 (2013) 489-505.
- [100] M. Guida, A. Ligresti, D. De Filippis, A. D'Amico, S. Petrosino, M. Cipriano, G. Bifulco, S. Simonetti, P. Orlando, L. Insabato, C. Nappi, A. Di Spiezio Sardo, V. Di Marzo, T. Iuvone, The Levels of the Endocannabinoid Receptor CB2 and Its Ligand 2-Arachidonoylglycerol Are Elevated in Endometrial Carcinoma, *Endocrinology*, 151 (2010) 921-928.
- [101] M.P. Endsley, R. Thill, I. Choudhry, C.L. Williams, A. Kajdacsy-Balla, W.B. Campbell, K. Nithipatikom, Expression and function of fatty acid amide hydrolase in prostate cancer, *Int J Cancer*, 123 (2008) 1318-1326.
- [102] D.K. Nomura, J.Z. Long, S. Niessen, H.S. Hoover, S.W. Ng, B.F. Cravatt, Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis, *Cell*, 140 (2010) 49-61.
- [103] X. Wu, L. Han, X. Zhang, L. Li, C. Jiang, Y. Qiu, R. Huang, B. Xie, Z. Lin, J. Ren, J. Fu, Alteration of endocannabinoid system in human gliomas, *Journal of neurochemistry*, 120 (2012) 842-849.
- [104] R. Van Dross, E. Soliman, S. Jha, T. Johnson, S. Mukhopadhyay, Receptor-dependent and receptor-independent endocannabinoid signaling: a therapeutic target for regulation of cancer growth, *Life Sci*, 92 (2013) 463-466.
- [105] A. Iring, L. Hricisak, Z. Benyo, CB1 receptor-mediated respiratory depression by endocannabinoids, *Respiratory physiology & neurobiology*, 240 (2017) 48-52.
- [106] V.C. Shang, S.E. O'Sullivan, D.A. Kendall, R.E. Roberts, The endogenous cannabinoid anandamide increases human airway epithelial cell permeability through an arachidonic acid metabolite, *Pharmacol Res*, 105 (2016) 152-163.
- [107] D.K. Nomura, B.E. Morrison, J.L. Blankman, J.Z. Long, S.G. Kinsey, M.C. Marcondes, A.M. Ward, Y.K. Hahn, A.H. Lichtman, B. Conti, B.F. Cravatt, Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation, *Science*, 334 (2011) 809-813.

- [108] M.-C. Larose, C. Turcotte, F. Chouinard, C. Ferland, C. Martin, V. Provost, M. Laviolette, N. Flamand, Mechanisms of human eosinophil migration induced by the combination of IL-5 and the endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133 (2014) 1480-1482.e1483.
- [109] E. National Academies of Sciences, Medicine, The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research, The National Academies Press, Washington, DC, 2017.
- [110] R. Li, G. Chen, L. Zhou, H. Xu, F. Tang, J. Lan, R.Z. Tong, L. Deng, J.X. Xue, Y. Lu, The Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB937 Ameliorates Radiation-Induced Lung Injury in a Mouse Model, *Inflammation*, 40 (2017) 1254-1263.
- [111] Z.A. Curry, J.L. Wilkerson, D. Bagdas, S.L. Kyte, N. Patel, G. Donvito, M.A. Mustafa, J.L. Poklis, M.J. Niphakis, K.L. Hsu, B.F. Cravatt, D.A. Gewirtz, M.I. Damaj, A.H. Lichtman, Monoacylglycerol Lipase Inhibitors Reverse Paclitaxel-Induced Nociceptive Behavior and Proinflammatory Markers in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Neuropathy, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 366 (2018) 169-183.
- [112] S. Pisanti, A.M. Malfitano, C. Grimaldi, A. Santoro, P. Gazzero, C. Laezza, M. Bifulco, Use of cannabinoid receptor agonists in cancer therapy as palliative and curative agents, *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 23 (2009) 117-131.
- [113] T. Sarafian, C. Montes, A. Harui, S.R. Beedanagari, S. Kiertscher, R. Stripecke, D. Hossepiian, C. Kitchen, R. Kern, J. Belperio, M.D. Roth, Clarifying CB2 receptor-dependent and independent effects of THC on human lung epithelial cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231 (2008) 282-290.
- [114] A. Gegotek, J. Niklinski, N. Zarkovic, K. Zarkovic, G. Waeg, W. Luczaj, R. Charkiewicz, E. Skrzydlewska, Lipid mediators involved in the oxidative stress and antioxidant defence of human lung cancer cells, *Redox biology*, 9 (2016) 210-219.
- [115] A.D. Marshall, I. Lagutina, G.C. Grosveld, PAX3-FOXO1 Induces Cannabinoid Receptor 1 to Enhance Cell Invasion and Metastasis, *Cancer Research*, 71 (2011) 7471-7480.
- [116] A.M. Malfitano, E. Ciaglia, G. Gangemi, P. Gazzero, C. Laezza, M. Bifulco, Update on the endocannabinoid system as an anticancer target, *Expert opinion on therapeutic targets*, 15 (2011) 297-308.
- [117] R. Ramer, A. Rohde, J. Merkord, H. Rohde, B. Hinz, Decrease of Plasminogen Activator Inhibitor-1 May Contribute to the Anti-Invasive Action of Cannabidiol on Human Lung Cancer Cells, *Pharmaceutical research*, 27 (2010) 2162-2174.

- [118] R. Ramer, J. Merkord, H. Rohde, B. Hinz, Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1, *Biochem Pharmacol*, 79 (2010) 955-966.
- [119] R. Ramer, K. Bublit, N. Freimuth, J. Merkord, H. Rohde, M. Haustein, P. Borchert, E. Schmuhl, M. Linnebacher, B. Hinz, Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26 (2012) 1535-1548.
- [120] R. Ramer, K. Heinemann, J. Merkord, H. Rohde, A. Salamon, M. Linnebacher, B. Hinz, COX-2 and PPAR-gamma confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells, *Mol Cancer Ther*, 12 (2013) 69-82.
- [121] R.G. Pertwee, Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists, *Curr Med Chem*, 17 (2010) 1360-1381.
- [122] D. Purich, *The Inhibitor Index: A Desk Reference on Enzyme Inhibitors, Receptor Antagonists, Drugs, Toxins, Poisons, Biologics, and Therapeutic Leads*, CRC Press 2017.
- [123] H. Han, X. Liang, J. Wang, Q. Zhao, M. Yang, W. Rong, G. Zhang, Cannabinoid receptor 1 contributes to sprouted innervation in endometrial ectopic growth through mitogen-activated protein kinase activation, *Brain Res*, 1663 (2017) 132-140.
- [124] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arabian Journal of Chemistry*, (2017).
- [125] A.R. Girija, 12 - Medical Applications of Polymer/Functionalized Nanoparticle Systems, in: K. Pielichowski, T.M. Majka (Eds.) *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles*, Elsevier 2019, pp. 381-404.
- [126] D. Hernan Perez de la Ossa, A. Ligresti, M.E. Gil-Alegre, M.R. Aberturas, J. Molpeceres, V. Di Marzo, A.I. Torres Suarez, Poly-epsilon-caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161 (2012) 927-932.
- [127] J. Alvarez-Fuentes, L. Martin-Banderas, I. Munoz-Rubio, M.A. Holgado, M. Fernandez-Arevalo, Development and validation of an RP-HPLC method for CB13 evaluation in several PLGA nanoparticle systems, *TheScientificWorldJournal*, 2012 (2012) 737526.
- [128] M. Duran-Lobato, L. Martin-Banderas, R. Lopes, L.M. Goncalves, M. Fernandez-Arevalo, A.J. Almeida, Lipid nanoparticles as an emerging platform for cannabinoid delivery: physicochemical optimization and biocompatibility, *Drug development and industrial pharmacy*, 42 (2016) 190-198.

- [129] P.W. Brownjohn, J.C. Ashton, Spinal cannabinoid CB2 receptors as a target for neuropathic pain: an investigation using chronic constriction injury, *Neuroscience*, 203 (**2012**) 180-193.
- [130] G.P. Trevor Percival Castor, Nanoencapsulated delta-9-tetrahydrocannabinol Aphios Corporation, Woburn, MA (US, United States, **2014**).
- [131] E. Esposito, M. Drechsler, R. Cortesi, C. Nastruzzi, Encapsulation of cannabinoid drugs in nanostructured lipid carriers, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 102 (**2016**) 87-91.
- [132] L. Martin-Banderas, I. Munoz-Rubio, J. Prados, J. Alvarez-Fuentes, J.M. Calderon-Montano, M. Lopez-Lazaro, J.L. Arias, M.C. Leiva, M.A. Holgado, M. Fernandez-Arevalo, In vitro and in vivo evaluation of Delta(9)-tetrahydrocannabinol/PLGA nanoparticles for cancer chemotherapy, *Int J Pharm*, 487 (**2015**) 205-212.
- [133] E. Berrocoso, R. Rey-Brea, M. Fernandez-Arevalo, J.A. Mico, L. Martin-Banderas, Single oral dose of cannabinoid derivate loaded PLGA nanocarriers relieves neuropathic pain for eleven days, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 13 (**2017**) 2623-2632.
- [134] E. Esposito, L. Ravani, M. Drechsler, P. Mariani, C. Contado, J. Ruokolainen, P. Ratano, P. Campolongo, V. Trezza, C. Nastruzzi, R. Cortesi, Cannabinoid antagonist in nanostructured lipid carriers (NLCs): design, characterization and in vivo study, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 48 (**2015**) 328-336.
- [135] E. Malikmammadov, T.E. Tanir, A. Kiziltay, V. Hasirci, N. Hasirci, PCL and PCL-based materials in biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 29 (**2018**) 863-893.
- [136] A.k. Behera, B.B. Barik, S. Joshi, POLY- ϵ -CAPROLACTONE BASED MICROSPHERES AND NANOSPHERES: A REVIEW, **2013**.
- [137] A. Ligresti, L. De Petrocellis, D.H.P. de la Ossa, R. Aberturas, L. Cristino, A.S. Moriello, A. Finizio, M.E. Gil, A.I. Torres, J. Molpeceres, V. Di Marzo, Exploiting Nanotechnologies and TRPV1 Channels to Investigate the Putative Anandamide Membrane Transporter, *Plos One*, 5 (**2010**).
- [138] M.R. Aberturas, D. Hernán Pérez de la Ossa, M.E. Gil, L. Ligresti, L. De Petrocellis, A.I. Torres, V. Di Marzo, J. Molpeceres, Anandamide-loaded nanoparticles: Preparation and characterization, *Journal of Microencapsulation*, 28 (**2011**) 200-210.
- [139] D. Hernan Perez de la Ossa, M.E. Gil-Alegre, A. Ligresti, R. Aberturas Mdel, J. Molpeceres, A.I. Torres, V. Di Marzo, Preparation and characterization of Delta(9)-tetrahydrocannabinol-loaded biodegradable polymeric microparticles

and their antitumoral efficacy on cancer cell lines, *J Drug Target*, 21 (**2013**) 710-718.

[140] D. Hernán Pérez de la Ossa, M. Lorente, M.E. Gil-Alegre, S. Torres, E. García-Taboada, M.d.R. Aberturas, J. Molpeceres, G. Velasco, A.I. Torres-Suárez, Local Delivery of Cannabinoid-Loaded Microparticles Inhibits Tumor Growth in a Murine Xenograft Model of Glioblastoma Multiforme, *PLoS ONE*, 8 (**2013**) e54795.

[141] J. Aparicio-Blanco, V. Sebastian, J.P. Benoit, A.I. Torres-Suarez, Lipid nanocapsules decorated and loaded with cannabidiol as targeted prolonged release carriers for glioma therapy: In vitro screening of critical parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 134 (**2019**) 126-137.

[142] A. Babu, A.K. Templeton, A. Munshi, R. Ramesh, Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer: Progress and Challenges, *Journal of Nanomaterials*, 2013 (**2013**) 11.

[143] L. Jiang, X. Li, L. Liu, Q. Zhang, Thiolated chitosan-modified PLA-PCL-TPGS nanoparticles for oral chemotherapy of lung cancer, *Nanoscale research letters*, 8 (**2013**) 66.

[144] H. Xu, Z. Hou, H. Zhang, H. Kong, X. Li, H. Wang, W. Xie, An efficient Trojan delivery of tetrandrine by poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(ϵ -caprolactone) (PVP-b-PCL) nanoparticles shows enhanced apoptotic induction of lung cancer cells and inhibition of its migration and invasion, *International journal of nanomedicine*, 9 (**2013**) 231-242.

[145] J.P. Gillet, S. Varma, M.M. Gottesman, The clinical relevance of cancer cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*, 105 (**2013**) 452-458.

[146] S.V. Sharma, D.A. Haber, J. Settleman, Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents, *Nature reviews. Cancer*, 10 (**2010**) 241-253.

[147] J. Romero-Parra, J. Mella-Raipan, V. Palmieri, M. Allara, M.J. Torres, H. Pessoa-Mahana, P. Iturriaga-Vasquez, R. Escobar, M. Faundez, V. Di Marzo, C.D. Pessoa-Mahana, Synthesis, binding assays, cytotoxic activity and docking studies of benzimidazole and benzothiophene derivatives with selective affinity for the CB2 cannabinoid receptor, *Eur J Med Chem*, 124 (**2016**) 17-35.

[148] K. Inamura, Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification, *Frontiers in oncology*, 7 (**2017**) 193-193.

[149] A. Rigo, F. Vinante, Flow cytometry analysis of receptor internalization/shedding, *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 92 (**2017**) 291-298.

[150] W. Truong, J. Zaragoza, Analyzing surface protein expression and internalization, (**2013**).

- [151] G.E. Omnibus, GEO accession: GSM710982, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM710982>.
- [152] G.E. Omnibus, GEO accession: GSM710999, in: NCBI (Ed.).
- [153] E.B. Institute, EBI-Expression Atlas, <https://www.ebi.ac.uk/s4/jump?from=aHR0cDovL3d3dy5lYmkuYWMudWsvZQvc3VtbWFyeS9tb2xly3VsYXlvZXhwcmVzc2lvbj90ZXJtPWNucjEmY2xhc3NpZmljYXRpb249OTYwNiZ0aWQ9bmFtZU9yZ0VOU01VU0cwMDAwMDA0NDI4OA==&hash=hash&url=https://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ENSG00000118432#baseline>.
- [154] G.E. Omnibus, GEO accession: GSM711041, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM711041>.
- [155] G.E. Omnibus, GEO accession: GSM711072, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM711072>.
- [156] G.E. Omnibus, GEO accession: GSM711019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM711019>.
- [157] A. ULUGÖL, Kannabinoidlerin Klinikte Kullanılışı ve Terapötik Hedefler, *Turkiye Klinikleri Journal of Pharmacology Special Topics*, 6 (2018) 42-50.
- [158] J.G. Turcott, M. del Rocío Guillen Núñez, D. Flores-Estrada, L.F. Oñate-Ocaña, Z.L. Zatarain-Barrón, F. Barrón, O. Arrieta, The effect of nabilone on appetite, nutritional status, and quality of life in lung cancer patients: a randomized, double-blind clinical trial, *Supportive Care in Cancer*, 26 (2018) 3029-3038.
- [159] P.F. Whiting, R.F. Wolff, S. Deshpande, M. Di Nisio, S. Duffy, A.V. Hernandez, J.C. Keurentjes, S. Lang, K. Misso, S. Ryder, S. Schmidkofer, M. Westwood, J. Kleijnen, Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis, *Jama*, 313 (2015) 2456-2473.
- [160] F. Grotenhermen, K. Müller-Vahl, The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids, *Dtsch Arztebl Int*, 109 (2012) 495-501.
- [161] K. Sekar, A. Pack, Epidiolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: a comprehensive review with a focus on adverse effects, *F1000Research*, 8 (2019) F1000 Faculty Rev-1234.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 04/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: **Akciğer Kanseriinde Kannabinoidlerin CB Reseptörleri Aracılı Antiproliferatif ve Proapoptotik Etkisinin Araştırılması**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam **90** sayfalık kısmına ilişkin, **04/07/2019** tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **% 1**'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~ dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Özge BOYACIOĞLU

Öğrenci No: N17127311

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Programı: Yüksek Lisans

Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Özge Boyacıoğlu

Doğum Yeri : Ankara

E-posta : ozge.boyacioglu@ hacettepe.edu.tr
ozge.boyacioglu@atilim.edu.tr

Görev

2019-... : Araştırma Görevlisi, Atılım Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Eğitim

2017-... : Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Programı), Ankara, Türkiye; Ağırlıklı Not Ortalaması (GPA): 3.95/4.00

2013-2017 : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi (Lisans Programı), Ankara, Türkiye; Ağırlıklı Not Ortalaması (GPA): 3.70/4.00; Diploma Numarası: 17.321.048 (Fen Fakültesi Birincisi)

2009-2013 : TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi (IB Diploma Programı), Ankara, Türkiye; Diploma Notu: 79.24/100.00; Diploma Numarası: 27936

Laboratuvar Deneyimi ve İlgi Alanları

- Hücre Kültürü Teknikleri (hücre kültürü, pasajlama, dondurma-çözme, hücre izolasyonu, MTT Test), İmmünohistokimyasal ve immünohistokimyasal Boyama Teknikleri, WST-1 Analiz Tekniği, Gerçek Zamanlı İmpedans Temelli Proliferasyon Analizi.

- Kanser (Küçük hücreli dışı akciğer kanseri) araştırmaları, ilaç geliştirme, nanopartiküller, kannabinoidler.

Tez Kapsamında Alınan Destek Projeleri

- Küçük hücreli dışı akciğer adenokarsinomunda kannabinoidlerin CB reseptörleri aracılı olası antiproliferatif ve proapoptotik etkisinin araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Yürüyen Tez Desteği Projesi, Proje No: TYL-2018-17387, Proje Süresi: 07.09.2018-07.06.2019.

Nitelikler

Dil:

- Türkçe : Anadil
- İngilizce : Okuma Becerisi: İleri düzey; Yazma Becerisi: İleri Düzey; Konuşma Becerisi: Orta düzey
- Fransızca : Okuma Becerisi: Orta düzey; Yazma Becerisi: Orta düzey; Konuşma Becerisi: Orta düzey

Tezden Üretilmiş Yayınlar/Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Bu tez kapsamında elde edilen çıktılar ile Hacettepe Teknoloji Transfer Merkezi Patent Ofisi'ne buluş başvurusunda bulunulduğundan bu süreçte henüz bir yayın yapılmamıştır.