T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRELERİNDE OKSALİPLATİN'İN İLAÇ TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI

SÜLEYMAN SERDAR ALKANLI

DANIŞMAN
PROF.DR. IŞIL ALBENİZ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Ailem’e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Akademik çalışmalarımda bana yol gösteren, değerli zamanını ve tecrübelerini benimle paylaşan, her türlü kolaylığı göstererek tezimin tamamlanmasında büyük katkı sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. Işıl ALBENİZ'e,

Lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden bugüne kadar geçen süreçte her zaman yanımda olan ve desteğini hissettiğim sevgili ablam Doç. Dr. Nevra ALKANLI'ya,

Nanopartiküllerin hazırlanması sürecindeki desteklerinden ötürü Doç. Dr. Burcu UÇAR ACAR ve Dr. Tayfun ACAR'a,

Deneysel çalışmalarımda bana sağlamış oldukları malzeme destekleri için Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ'e ve Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Ece ORDUERİ'ye,

Deney sürecimin tamamlanmasında önemli katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Gözde HASBAL ÇELİKOK ve Arş. Gör. Yasin ÇELİKOK'a, Arş. Gör. Gülsüm ALTIPARMAK ÜLBEGİ'ye, Güneş ÖZEN EROĞLU'ya ve Işık KORKUT'a, teşekkür ederim.

Ayrıca, tezim sürecinde benden manevi desteğini esirgemeyen sevgili annem Adalet ALKANLI'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma, TDK-2021-37548'nolu İstanbul Üniversitesi BAP projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XVİİİ
ABSTRACT ..... XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Kanser 4
2.2. Kanserin Metabolik Özellikleri 4
2.2.1. Glikoliz Metabolizması 6
2.2.2. Glutamin Metabolizması 8
2.2.3. Lipit Metabolizması 9
2.3. Kolorektal Kanser 10
2.4. Kolorektal Kanser Oluşum Mekanizmaları 15
2.5. Kolorektal Karsinoma Tedavisi 17
2.5.1. Kolorektal Karsinoma Tedavisinde Kullanılan İlaçlar 19
2.5.1.1. Floropirimidinler 19
2.5.1.2. Altın İçeren Antikanser İlaçlar 19
2.5.1.3. Platin İçeren Antikanser İlaçlar 21
2.6. Kolorektal Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler 23
2.6.1. Cerrahi Tedavi 23
2.6.2. Kemoterapi Tedavisi 24
2.6.2.1. Neoadjuvan Tedavi 24
2.6.2.2. Adjuvan Tedavi 24
2.6.2.3. Palyatif Tedavi 25
2.6.3. Radyoterapi Tedavisi 25
2.6.4. Yeni Nesil Tedaviler 25
2.6.4.1. Kök hücre Tedavisi 25

2.6.4.2. Hormon Tedavisi....25
2.6.4.3. İmmünoterapi....26
2.7. Kolorektal Kanser Tedavisinde Çoklu İlaç Direnci....26
2.8. Direnç İnhibitörleri....27
2.9. İlaç Taşıma Sistemleri....28
2.9.1. Mikropartiküller....28
2.9.2. Nanopartiküller....29
2.9.3. Kanser Kemoterapisinde Kullanılan Nanoilaç Taşıyıcılar....30
2.9.3.1. Lipozomlar....30
2.9.3.2. Polimer Miseller....31
2.9.3.3. Dendrimerler....31
2.9.3.4. Metalik ve İnorganik NP'ler....32
2.9.3.5. Nanojeller....33
2.9.3.6. Biyomimetik NP'ler....33
2.9.4. PLGA....35
2.10. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu....37
2.10.1. Morfolojik ve Topografik Özelliklerine Göre NP'lerin Karakterizasyonu....37
2.10.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)....38
2.10.1.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)....39
2.10.1.3. Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM)....40
2.10.1.4. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)....41
2.10.2. Yapısal ve Kimyasal Özelliklerine Göre NP'lerin Karakterizasyonu....42
2.10.3. X-ışını Kırınım Analizi (XRD)....43
2.10.4. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)....44
2.10.5. Yüksek Açılı Dairesel Karanlık Alan Görüntüleme (HAADF)....45
2.10.6. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)....46
2.10.7. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)....47
2.10.8. Elektroforetik Işık Saçılımı (ELS)....48
2.10.9. Raman spektroskopisi....49
2.11. Kromatografik Yöntemler....50
3. GEREÇ VE YÖNTEM....53
3.1. Gereçler....53
3.1.1. Kimyasal Maddeler....53

3.1.2. Cihazlar 54
3.1.3. Çözeltiler 55
3.1.3.1. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite Testlerinde Kullanılan Çözeltiler 55
3.1.3.2. İmmünfloresan Boyamada Kullanılan Çözeltiler 55
3.1.3.3. Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler 56
3.2. Yöntemler 56
3.2.1. Hücre Besiyeri Hazırlanması 56
3.2.2. Hücre Hattının Pasajlanması 56
3.2.3. Hücre Sayılarının Belirlenmesi 57
3.2.4. Hücre Hattının Dondurulması 57
3.2.5. Hücre Hattının Çözülmesi 57
3.2.6. Ticari İlacın Saflaştırılması 58
3.2.7. PLGA-NP'lerinin Hazırlanması 58
3.2.8. PLGA-NP'lerinin Karakterizasyonu 61
3.2.8.1. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi 61
3.2.8.2. Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılımı Analizi 61
3.2.8.3. FT-IR ve SEM Analizleri 62
3.2.8.4. In Vitro İlaç Salımı 62
3.2.9. MTT Analizi 62
3.2.10. İmmünfloresan Görüntüleme 63
3.2.11. İstatistiksel Analiz 63
4. BULGULAR 64
4.1. Karakterizasyon Sonuçları 64
4.1.1. Oksaliplatinin Saflaştırılması 64
4.1.2. Oksaliplatine Ait Kalibrasyon Çalışması 66
4.1.3. Verapamile Ait Kalibrasyon Çalışması 69
4.1.4. Nanopartiküllerin Üretilmesi, Karakterizasyonu ve Salım Profillerinin İncelenmesi 73
4.1.4.1. Enkapsülasyon Etkinliği (EE), İlaç Yükleme Kapasitesinin (DL) Belirlenmesi ve Dinamik, Elektroforetik Işık Saçılımı Analizleri 73
4.1.4.2. Polimer Nanopartiküllerin Dinamik Işık Saçılımı ile Karakterizasyonu 76
4.1.4.3. FT-IR ve SEM Analizleri 78
4.1.4.4. In Vitro İlaç Salımı 81

4.2. Sitotoksisite Sonuçları 82
4.3. İmmünfloresan Görüntüleme Sonuçları.....96
5. TARTIŞMA 100
KAYNAKLAR 106
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....132

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Altın içeren antikanser ilaçların klinikteki uygulamalarının zaman çizelgesi - Yamashita (2021)'den değiştirilerek 20
Tablo 2-2: Platin içeren antikanser ilaçların klinikteki uygulamalarının zaman çizelgesi - Zhang (2022)'den değiştirilerek 22
Tablo 2-3: Morfolojik ve topografik özelliklerine göre NP'lerin yaygın olarak kullanılan karakterizasyon yöntemleri – Joudeh ve Linke (2022)'den değiştirilerek 38
Tablo 2-4: Yapısal ve kimyasal özelliklerine göre NP'lerin yaygın olarak kullanılan karakterizasyon yöntemleri – Joudeh ve Linke (2022)'den değiştirilerek 43
Tablo 3-1: Farklı formülasyonlarda üretilen nanopartiküllerin içerikleri..... 61
Tablo 4-1: Nano-formülasyonların boyut, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI) ve reaksiyon verimi (RY) değerleri 75
Tablo 4-2: Nano-formülasyonların enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) değerleri 76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Onkojenik sinyallerin hücre metabolizmasına etkileri - Boroughs (2015)'den değiştirilerek 5
Şekil 2-2: Kolorektal kanserin 2018 yılında ülkeler genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı insidans grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek 11
Şekil 2-3: Kolorektal kanserin 2018 yılında ülkeler genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı ölüm grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek 12
Şekil 2-4: Kolorektal kanserin 2018 yılında dünya genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı görülme grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek 13
Şekil 2-5: Kolorektal kanserin 2018 yılında dünya genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı insidans ve mortalite grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek 14
Şekil 2-6: Kolorektal kanser oluşum yolakları - Schmitt (2021)'den değiştirilerek..... 17
Şekil 2-7: Verapamilin P-gp inhibisyonunun şematik gösterimi – Mirzaei (2022)'den değiştirilerek 28
Şekil 2-8: Farklı mikro parçacık yapılarının şematik gösterimi - Lengyel (2019)'dan değiştirilerek 29
Şekil 2-9: Lipozomun şematik gösterimi - Tenchov (2021)'den değiştirilerek..... 30
Şekil 2-10: Esnekliği ayarlanabilen polimer miseller – Stern (2017)'den değiştirilerek 31
Şekil 2-11: Poli(etilen glikol) (PEG)-düzenlenmiş poli(amidoamin) (PAMAM) dendrimerlerin sentezi – Kono (2012)'den değiştirilerek..... 32
Şekil 2-12: Metalik ve inorganik nanoparçacıklar – Gholizadeh (2022)'den değiştirilerek 33
Şekil 2-13: Nanojel üretiminin şematik gösterimi – Mauri (2021)'den değiştirilerek ... 33
Şekil 2-14: Biyomimetik nanopartiküller - Parodi (2017)'den değiştirilerek..... 35
Şekil 2-15: Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve onu oluşturan laktik asit ve glikolik asit monomerleri - Sampath (2016)'dan değiştirilerek 36
Şekil 2-16: Reseptör aracılı endositoz – Manzanares ve Cena (2020)'den değiştirilerek 37
Şekil 2-17: Taramalı elektron mikroskobunun şematik gösterimi - Alqaheem ve Alomair (2020)'den değiştirilerek..... 39
Şekil 2-18: Transmisyon elektron mikroskobunun şematik gösterimi - Alqaheem ve Alomair (2020)'den değiştirilerek 40
Şekil 2-19: Taramalı tünelleme mikroskobu (STM) yönteminin şematik gösterimi – Sahare (2020)'den değiştirilerek..... 41
Şekil 2-20:Dinamik ışık saçılımı ölçümünden parçacık boyutu dağılımı elde etme süreci – Misono (2019)'dan değiştirilerek 42
Şekil 2-21: X-ışını kırınım analizinin şematik gösterimi – Harrington ve Santiso (2021)'den değiştirilerek..... 44
Şekil 2-22: Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisinin şematik gösterimi - Huang (2020)'den değiştirilerek..... 45
Şekil 2-23: Yüksek açılı dairesel karanlık alan görüntülemenin şematik gösterimi - Zhang (2015)'den değiştirilerek..... 46
Şekil 2-24: X-ışını fotoelektron spektroskopisinin şematik gösterimi - Fadley (2010)'dan değiştirilerek 47
Şekil 2-25: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisinin şematik gösterimi – Giechaskiel ve Clairotte (2021)'den değiştirilerek..... 48
Şekil 2-26: Elektroforetik ışık saçılımı (ELS) yönteminin şematik gösterimi - McNeil-Watson (2013)'ten değiştirilerek 49

Şekil 2-27: Raman sprektroskopisinin şematik gösterimi - Cho ve Ahn (2020)'den değiştirilerek 49
Şekil 2-28: UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC-UV) şematik gösterimi – Salazar-Beltran (2017)'den değiştirilerek 50
Şekil 2-29: Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisinin (LC-MS) şematik gösterimi – Joye (2019)'dan değiştirilerek..... 51
Şekil 2-30: Sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyonu-kütle spektrometrisinin (LC-ESI-MS) şematik gösterimi - Boonjob (2015)'ten değiştirilerek 52
Şekil 3-1: Oksaliplatin, verapamil ve FITC'in PLGA-NP'lerine yüklenmesinin şematik gösterimi 58
Şekil 4-1: Ticari oksaliplatinin saflaştırılmasına ait preparatif HPLC kromatogramı.... 64
Şekil 4-2: Saflaştırılan oksaliplatinin 210 ve 254 nm dalga boylarındaki LC kromatogramları..... 65
Şekil 4-3: Saflaştırılan oksaliplatinin ESI-MS spektrumu..... 65
Şekil 4-4: 250 µg/ml oksaliplatine ait 210 ve 254 nm dalga boylarındaki LC kromatogramları..... 66
Şekil 4-5: Saflaştırılmış oksaliplatinin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (210 nm)..... 67
Şekil 4-6: Saflaştırılmış oksaliplatinin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (254 nm)..... 67
Şekil 4-7: Saflaştırılmış oksaliplatininin 210 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 0,9962)..... 68
Şekil 4-8: Saflaştırılmış oksaliplatininin 254 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 0,9991)..... 68
Şekil 4-9: 250 µg/ml verapamile ait 210 ve 254 nm dalga boylarındaki kromatogramları 69
Şekil 4-10: Verapamilin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (210 nm)..... 70
Şekil 4-11: Verapamilin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (254 nm)..... 70
Şekil 4-12: Verapamilin 210 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 0,9935) 71
Şekil 4-13: Verapamilin 254 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 1). 71
Şekil 4-14: 1 mg/ml verapamilin 1., 2., 4., 24. saat ve 7., 14. güne (yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla) ait stabilizasyon kromatogramları (210 nm)..... 72
Şekil 4-15: 1 mg/ml verapamilin 1., 2., 4., 24. saat ve 7., 14. güne (yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla) ait stabilizasyon kromatogramları (254 nm)..... 72
Şekil 4-16: OVP nanopartiküllerinin boyut grafiği 77
Şekil 4-17: OVP-F nanopartiküllerinin boyut grafiği..... 77
Şekil 4-18: Verapamile ait FT-IR spektrumu 78
Şekil 4-19: FITC boyasına ait FT-IR spektrumu..... 79
Şekil 4-20: Boş PLGA nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu..... 79
Şekil 4-21: OVP-10'a ait FT-IR spektrumu 80
Şekil 4-22: OVP-11'e ait FT-IR spektrumu 80
Şekil 4-23: OVP-10'a ait SEM görüntüsü..... 81
Şekil 4-24: OVP nanopartiküllerinin salım profili 82
Şekil 4-25: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin konsantrasyona bağlı ışık mikroskobu görüntüleri 83

Şekil 4-26: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin konsantrasyona bağlı ışık mikroskobu görüntüleri 83
Şekil 4-27: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları..... 84
Şekil 4-28: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi 85
Şekil 4-29: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları..... 86
Şekil 4-30: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi 87
Şekil 4-31: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ve verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları 88
Şekil 4-32: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ve verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi 89
Şekil 4-33: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları 90
Şekil 4-34: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi 91
Şekil 4-35: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları..... 92
Şekil 4-36: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi 93
Şekil 4-37: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin (OKP) ve verapamil (VER) ile muamele edilen HCT-116 hücreleri ve OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının karşılaştırılması 94
Şekil 4-38: 24 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OXATU-S ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları 95
Şekil 4-39: 24 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin (OKP) ve OXATU-S ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının karşılaştırılması 95
Şekil 4-40: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin, verapamil, oksaliplatin ve verapamil, OVP ve boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının karşılaştırılması 96
Şekil 4-41: 24 saat boyunca 0,1; 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında OVP-F'ye maruz kalan HCT-116 hücrelerinin çekirdek ve aktin iskeleti görüntüsü 97
Şekil 4-42: 48 saat boyunca 0,1; 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında OVP-F'ye maruz kalan HCT-116 hücrelerinin çekirdek ve aktin iskeleti görüntüsü 98
Şekil 4-43: 72 saat boyunca 0,1; 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında OVP-F'ye maruz kalan HCT-116 hücrelerinin çekirdek ve aktin iskeleti görüntüsü 99
Şekil 4-44: 24 saat boyunca 2 µg/ml konsantrasyonunda Falloidin-FITC yüklü OVP-F'nin salım görüntüsü 99

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

α-KG	Alfa-ketoglutarat
3PG	3-fosfogliserat
5-FU	5-florourasil
ABC	ATP-bağlayıcı kaset
ABCB1	ATP bağlayıcı kaset B 1
ACC	Asetil-CoA karboksilaz
ACLY	ATP sitrat liyaz
ADP	Adenozin difosfat
AKT	Protein kinaz B
AMPK	Aktive edici protein kinaz
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
ASCT2	Alanin-serin-sistein taşıyıcı 2
Asetil-CoA	Asetil koenzim A
ATF4	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır serum albumini
CIMP	CpG adası metilasyon fenotipi
CIN	Kromozomal instabilite
CpG	Sitozin-fosfat-guanin
DACH	1,2-diaminosiklohekzan
DAG	Diasilgliserol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür
DCM	Diklorometan

dH_2O	Distile su
DL	İlaç yükleme kapasitesi
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EDX	Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisinde
EE	Enkapsülasyon etkinliği
ELS	Elektroforetik ışık saçılımı
EMT	Epitelden mezenkimal geçiş
ERCC1	Eksizyon onarım çapraz tamamlayıcı grup 1
ESI-MS	Elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometresi
F-aktin	Filamentöz yapıdaki aktin
F6P	Fruktoz-6-fosfat
FADH2	Flavin adenin dinükleotit
FASN	Yağ asidi sentaz
FAP	Ailesel adenomatöz polipozis
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Gıda ve ilaç dairesi
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
G-aktin	Globüler yapıdaki aktin
G6P	Glukoz-6-fosfat
G6PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
GA	Glikolik asit
GA3P	Gliseraldehit-3-fosfat

GDH	Glutamat dehidrojenaz
GLS	Glutaminaz
GLUT	Glikoz taşıyıcı
GOT1	Sitosolik aspartat aminotransaminaz
GSH	Glutatyon
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz-3 β
GSSG	Glutatyon disülfidden
HAADF	Yüksek açılı dairesel karanlık alan görüntüleme
HCT-116	İnsan kolorektal karsinoma hücresi
HK	Heksokinaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPV	İnsan papilloma virüsü
HSP	Heksozamin sentez yolağı
IL-4	İnterlökin-4
IP3	İnozitol trifosfat
KLHL25	Kelch benzeri aile üyesi 25
KRAS	Kirsten sıçan sarkoma virüsü
KRK	Kolorektal kanser
LA	Laktik asit
LC-ESI-MS	Sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometresi
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
LC-UV	Sıvı kromatografi-morötesi
LDHA	Laktat dehidrojenaz A
LKB1	Karaciğer kinaz B1
LOH	Heterozigosite kaybı
LV	Lökovorin

MAP	Mitojen aktif protein
MCT-1	Monokarboksilat Taşıyıcı 1
MDR	Çoklu ilaç direnci
MEM	Minimum Temel Ortam
mKRK	Metastatik KRK
MLH1	MutL protein homolog 1
MLH6	MutL protein homolog 6
MMR	Uyumsuzluk onarım genlerinin
MSH2	MutS homolog 2
MSI	Mikrosatelit instabilite
mTORC	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi kompleksi
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür; tiyazolil mavisi
Myc	Transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir düzenleyici gen ve proto-onkogen ailesi
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NEAA	Esansiyel olmayan amino asitlerin
NER	Nükleotit eksizyon onarım
NP	Nanopartiküller
O-GlcNAc	O-bağlı β-N-asetilglukozamin
OAA	Oksaloasetat
OGT	O-GlcNAc transferazı
OKP	Oksaliplatin
ORF	Okuma bölgeleri
OVP	Oksaliplatin-verapamil-PLGA

OVP-F	Oksaliplatin-verapamil-PLGA-FITC
P-gp	P-glikoprotein
P/S	Penisilin/Streptomisin
p53	Protein 53
PBS	Fosfat tamponu
PBS-T	Fosfat tamponu-tween 20
PDA	Foto diyot analizi
PDI	Polidispersite indeksi
PHGDH	Fosfogliserat dehidrojenaz
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PMS1	Protein uyuşmazlığı onarımı sistem bileşeni 1
PMS2	Protein uyuşmazlığı onarımı sistem bileşeni 2
PPP	Pentoz fosfat yolağı
PSAT1	Fosfoserin aminotransferaz
PSPH	Fosfoserin fosfataz
RAS	Sıçan sarkoma virüsü
Riboz-5P	Riboz-5-fosfat (R5P)
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPIA	Riboz-5-fosfat izomeraz A
RPM	Dakikadaki dönüş
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RY	Reaksiyon verimi
SD	Standart sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

SIRT4	Sirtüin 4
SHMT1	Serin hidroksimetiltransferaz 1
SLC1A5	Çözünen bağlı taşıyıcı aile A1 üye 5
SREBP	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
STM	Taramalı tünelleme mikroskobu
TCA	Trikarboksilik asit
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TGF-β1	Dönüştürücü Büyüme Faktörü β 1
TP53	Tümör protein 53
UBR4	Ubikuitin Protein Ligaz E3 Bileşeni N-Tanıyan 4
UDP-GlcNAc	Üridin difosfat N-asetilglukozamin
UV-PDA	Morötesi-fotodiyot analizi
VER	Verapamil
XDP	X-bağlı distoni parkinsonizm
XRCC1	X-Ray Onarım Çapraz Tamamlayıcı 1
XRD	X-ışını kırınım analizi
XPS	X-ışını fotoelektron spektroskopisi
YAP	Yes ilişkili protein

ÖZET

Alkanlı SS. Kolorektal Karsinoma Hücrelerinde Oksaliplatin'in İlaç Tedavi Etkinliğinin Arttırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2023.

Oksaliplatin, kolorektal kanser tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. Oksaliplatin, 1,2-diaminosiklohekzan (DACH) ligandına sahip olması nedeniyle, kimyasal yapı olarak diğer platin içeren kemoterapi ilaçlarından farklıdır. Tümör mikroçevresi içindeki çeşitli hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörü-β1'in, oksaliplatine direnç kazandığı düşünülmektedir. Ayrıca, bir kalsiyum kanal bloklayıcısı olan verapamilin kemoterapiye dahil edilmesi, tedavinin etkinliğini arttırmaktadır.

Çalışmamızda, kanser tedavisinde görülen ilaç direncinin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, oksaliplatin ve verapamil içeren PLGA nanopartikül formülasyonları geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ile yapıldıktan sonra en etkili formülasyonların OVP-10 (222,00 ± 0,84) ve OVP-11 (240,80 ± 1,82) olduğu belirlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin salım profilleri ve HCT-116 insan kolorektal kanser hücrelerine *in vitro* uygulanarak sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, 0,01 ve 10 µg/ml aralığında uygulanan nanopartiküllerin HCT-116 hücre canlılığını %67'ye kadar azalttığı tespit edilmiştir. IC50 değerleri 24 saat için 6,49 µg/ml olarak bulunmuştur.

Ayrıca çalışmamızda, nanopartiküller HCT-116 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,1; 1 ve 10µg/ml konsantrasyonlarında uygulanarak, salım profillerinin immünfloresan görüntülemeleri yapılmıştır. Burada, nanopartiküllerin, oksaliplatin ve verapamili başarılı bir şekilde saldıkları ve HCT-116 hücrelerinin aktin iskelet yapısını bozduğu toksik etkilerin sonuçları elde edilmiştir.

Elde ettiğimiz nanoformülasyonun, HCT-116 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki seviyelerinde önemli bir değişiklik göstermesi, nanobileşiğimizin bu kanser hattı üzerinde kullanılabilir olduğunu, böylece tedaviye daha uzun süre devam edebilmenin mümkün olduğunu desteklemektedir. Sonuçlarımızın literatüre önemli katkı sağlayacağı ve nanopartiküllere enkapsüle edilen nanobileşenlerin, kanser hücreleri üzerindeki etkinliğinin, kemoterapi tedavisinin başarı oranını arttıracağı görüşündeyiz.

Anahtar Kelimeler: P-Glikoprotein, Oksaliplatin, Verapamil, İlaç Taşıma, PLGA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. BAP Proje No: TDK-2021-37548

ABSTRACT

Alkanlı SS. Enhancement of Drug Treatment Efficacy of Oxaliplatin in Colorectal Carcinoma Cells. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Biophysics. Doctoral Thesis. İstanbul. 2023.

Oxaliplatin is one of the most widely used drugs in the treatment of colorectal cancer. Oxaliplatin has the ligand 1,2-diaminocyclohexane (DACH). Therefore, its chemical structure is different from other platinum-containing chemo-drugs. Growth factor-β1 secreted by various cells in the tumor microenvironment is thought to acquire resistance to oxaliplatin. The use of verapamil, a calcium channel blocker, in chemotherapy increases the effectiveness of the treatment.

In our study, PLGA nanoparticle formulations containing oxaliplatin and verapamil were developed to eliminate the effect of drug resistance in cancer treatment. Characterization of nanoparticles was performed with Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS). The most effective formulations were OVP-10 (222.00±0.84) and OVP-11 (240, 80±1.82). By in vitro injection of nanoparticles into HCT-116 human colorectal cancer cells, release profile and cytotoxicity were determined.

According to the results, it was determined that nanoparticles administered to the cells in the range of 0.01 and 10 μg/ml reduced the cell viability to 67%. The IC50 value was determined as 6.49 μg/ml. for 24 hours.

In addition, in our study, immunofluorescence imaging of the release profiles of nanoparticles at concentrations of 0.1, 1, 10 μg/ml for 24, 48, 72 hours was performed. Thus, the toxicity results were obtained, in which the nanoparticles successfully released oxaliplatin and verapamil.

The fact that the nanoformulation we obtained showed a significant change in the cytotoxicity on the cells supports that our nanocompound can be used on this cancer line, so that it is possible to continue the treatment for a longer period. We believe that our results will contribute significantly to the literature and that the effectiveness of nanoparticles will increase the success of chemotherapy treatment.

Key Words: P-Glycoprotein, Oxaliplatin, Verapamil, Drug Delivery, PLGA

The study was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects (BAP). BAP Project No: TDK-2021-37548

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücutta kontrolsüz olarak çoğalan hücrelerin, yaşlanarak ölmek yerine kontrolsüz olarak farklılaşması ve çoğalmayı sürdürmesi sonucu tümör oluşumuna neden olan bir hastalıktır (Sandru ve ark. 2021; Suhail ve ark. 2019). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından üretilen GLOBOCAN 2020 kanser insidansı ve ölüm oranlarına göre, melanom dışı cilt kanseri vakaları hariç tutulduğunda, 2020 yılında, 19,3 milyon kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü gerçekleştiği belirlenmiştir. Toplam vakaya oranlandığında, meme (%11,7), akciğer (%11,4), kolorektal (%10), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri en sık teşhis edilen kanser türleridir (Sung ve ark. 2021).

Kolorektal kanser (KRK) dünya genelinde görülen kanser türleri arasında ilk üçte yer almaktadır. Ayrıca kansere bağlı ölümlerin %10'unun KRK'den kaynaklandığı belirlenmiştir (Bray ve ark. 2018). Görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde daha fazla olup, erkeklerdeki insidansı ve mortalitesi kadınlarınkinden 3-4 kat daha fazladır. Genetik, yaşam tarzı, obezite ve çevresel faktörler KRK ile ilişkilidir (Kasi ve ark. 2019).

KRK vakalarına, kemoterapi ile birlikte ilaç tedavisi uygulanır. KRK tedavisinde floropirimidinler ile altın ve platin içeren antikanser ilaçları kullanılmaktadır (Hishinuma ve ark. 2020; Mármol ve ark. 2017; Zhang C ve ark. 2022). Floropirimidinler, yaygın olarak, gastrointestinal sistem, göğüs, karaciğer, akciğer, baş ve boyundaki katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. En bilinen floropirimidin ilacı 5-florourasil (5-FU)'dir (Hishinuma ve ark. 2020). Altın içeren antikanser ilaçların en iyi bilineni auranofin'dir. Auranofin, tiyoredoksin redüktazın inhibisyonuna neden olarak reaktif oksijen türlerindeki artışı ve oksidatif stresi önler (Zhang X ve ark. 2019). Platin içeren antikanser ilaçların başında cisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gelmektedir. Kolorektal kanser tedavisinde yaygın olarak oksaliplatin ve 5-FU kombine halde uygulanır (Neugut ve ark. 2019). 5-FU, oksaliplatin ile birlikte uygulandığında tedavi yanıt oranının arttığı ve metastatik hastalardaki sağ kalım oranının daha iyiye gittiği belirlenmiştir (Boakye ve ark. 2021).

KRK tedavisindeki ilerlemelere rağmen metastatik hastalardaki sağ kalım oranı yanlızca %12 artmıştır. Ayrıca uygulanan tedaviye bağlı olarak metastatik KRK hastalarının yaklaşık %50'sinde tedaviye karşı direnç geliştiği görülmüştür (van der

Jeught ve ark. 2018). İlaç direnci oluşumunda bazı membran ilaç taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunda ve aktivitesinde meydana gelen artış neden olmaktadır (van den Kerkhof ve ark. 2020). Çoklu ilaç direnci ile ilişkili olan P-glikoprotein'in (P-gp) ekspresyonu, kanser hücresindeki ilaç moleküllerinin hücre dışına akışını gerçekleştirerek, hücre içindeki ilaç konsantrasyonunu düşürür ve kemoterapinin başarısız olmasına yol açar (Kolesnikova ve ark. 2019). Karaciğer böbrek ve kolon gibi çeşitli kanser türlerinde P-gp ifadesinin yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir (Liang C ve ark. 2019; Wang Z ve ark. 2022).

İlaç direncinin tersine çevrilmesinde P-gp inhibitörlerinin kullanılması etkili bir strateji olarak kabul edilmektedir (Yang T ve ark. 2020). Bu inhibitörlerden biri olan verapamil, bir kalsiyum kanal bloklayıcısıdır ve yapılan klinik çalışmalarda anti-tümör etkinliğini arttırdığı doğrulanmıştır (Wang H ve ark. 2013). Verapamil ve kemoterapi ilaçları birlikte kullanıldığında akciğer kanseri, kolorektal karsinom, lösemi ve nöroblastoma hücre hatlarında hücre içi ilaç birikiminde artış olduğu gösterilmiştir (Zhao L ve ark. 2016).

Kemoterapi tedavisinde karşılaşılan zorluklardan biri de nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite ve miyelosupresyon gibi ciddi istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasıdır. Bu etkiler nedeniyle de uygulanan dozun sınırlandırılması ya da yan etkiler görülmesi durumunda ilaç tedavisinin sonlandırılması gerekmektedir (Wlodarczyk ve ark. 2018).

Tedavinin sağlıklı dokulara minimum toksisite ile gerçekleştirilebilmesi için, hedefe yönelik uyarlanabilen ve ilaç salım yeteneğine sahip nanopartiküller kullanılabilmektedir (Alkahtani ve ark. 2021). En iyi bilinen biyobozunur ve biyouyumlu kopolimer poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), FDA onaylı olması nedeniyle ilaç taşıma sistemi olarak klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Risnayanti ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasında; iyi bilinen üçüncü nesil KRK kemoterapi ilacı olan oksaliplatinin ve kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncine neden olan P-gp inhibitörü verapamilin, HCT-116 kolorektal karsinoma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesini amaçladık. Bu amaçla, yapmış olduğumuz tez çalışmamızda oksaliplatin ve verapamilin, biyouyumlu ve biyobozunur özellikteki PLGA'ya enkapsüle edilmesiyle farklı formülasyonlarda PLGA nanopartikülleri elde edilmiştir. Elde edilen nanoformülasyonun, HCT-116 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermesi,

nanobileşiğimizin bu kanser hattı üzerinde kullanılabilir olduğunu, böylece tedaviye daha uzun süre devam edebilmenin mümkün olduğunu desteklemektedir.

Nanoilaç taşıma sistemleri, terapötik etki gösteren farmasötik bileşiklerin, tedavi edilmesi amaçlanan bölgeye taşınmasını sağlayan teknolojilerdir. Bu sistemlerin; şekil, boyut ve işlevsellik gibi fizikokimyasal özelliklerinin ayarlanmasıyla, ilacın kontrollü salımının gerçekleştirilmesi mümkün olabilmektedir.

Elde etmiş olduğumuz PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu, morfolojik özellikleri, salım profilleri, HCT-116 hücreleri üzerindeki *in vitro* etkinliği belirlenmiş ve bu sonuçlar immünfloresan boyama sonuçları ile doğrulanmıştır. Sonuçlarımızın literatüre önemli katkı sağlayacağı ve nanopartiküllere enkapsüle edilen nanobileşenlerin kanser hücreleri üzerindeki etkinliğinin, kemoterapi tedavisinin başarı oranını arttırılabileceği düşünülmektedir.

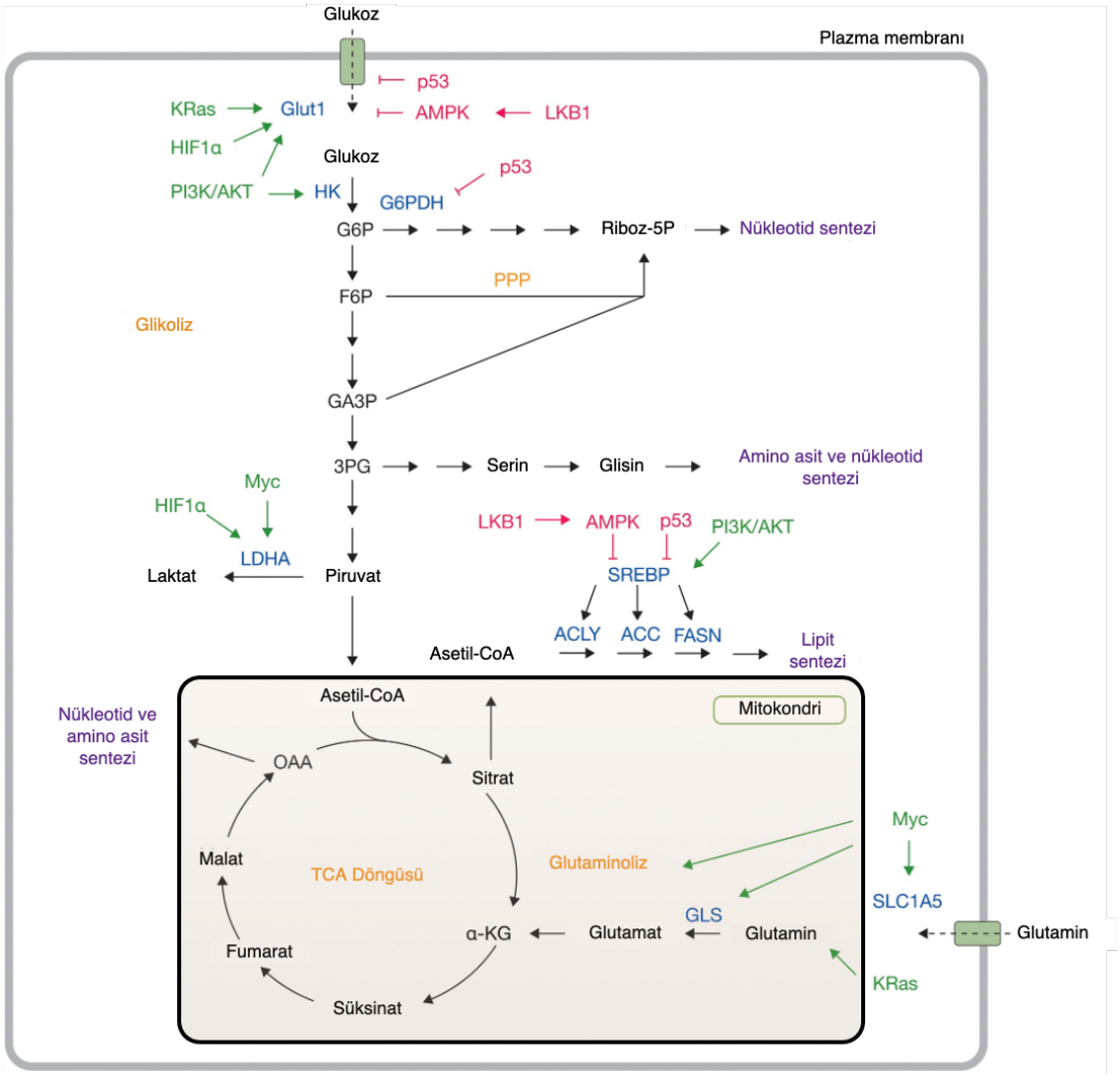
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla vücudun diğer bölümlerine yayılması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (Suhail ve ark. 2019). Çoğalan hücrelerin, yaşlanmaya bağlı olarak ölmek yerine kontrolsüz şekilde farklılaşarak çoğalmaya devam etmeleri ve kümelenmeleri neticesinde tümör oluşumu gerçekleşir. İyi huylu (benign) tümör hücreleri yayılma (metastaz) eğilimi göstermezken, kötü huylu (malign) olanlar invazyon ve metastaz özelliği gösterebilirler. Kan ve lenf damarları üzerinden vücudun çeşitli bölgelerine yayılarak çoğalmaya devam edebilir ve patolojik durumlara yol açabilirler. Kanser; karsinoma, lösemi, sarkoma, lenfoma ve merkezi sinir sistemi kanserleri olmak üzere sınıflandırılabilir (Sandru ve ark. 2021). Kanserin başlıca fizyolojik ve biyokimyasal nedenleri; ultraviyole ve iyonize radyasyonlar, viral enfeksiyonlar (ör. servikal büyümeye neden olan insan papilloma virüsü (HPV)), sigara, parazitler (ör. mesane kanserine neden olan şistozomiyaz), gıda kontaminasyonları (ör. karaciğer kanserine neden olan aflatoksinler) ve bakteriyel enfeksiyonlardır (ör. mide kanserine neden olan helicobacter pylori) (Sherwani ve ark. 2018). Kanser türleri arasında en sık teşhis edilenler akciğer (%12,7), meme (%10,9), kolorektal (%9,7) ve mide kanseridir (%7,81) (Hazafa ve ark. 2020).

2.2. Kanserin Metabolik Özellikleri

Genetik mutasyonlar, hücre-hücre kontakt inhibisyonunun baypas edilmesine ve büyüme faktörü tarafından düzenlenen kanser hücrelerinin çoğalma becerisi kazanmasına neden olur. Bununla birlikte, tümör mikroçevresindeki zayıf damarlanma (vaskülarizasyon), kronik besin yoksunluğuna ve oksijen konsantrasyonlarının düşmesine neden olur (Küçükgüven ve Çelebi-Saltik 2020). Kanser hücreleri, zorlu çevresel streslere karşı hayatta kalmak ve uyum sağlamak, harici metabolitleri yakalamak ve metabolik enzim aktivitelerinin verimliliğini en üst düzeye çıkarmak için metabolik yolaklarını değiştirirler (Şekil 2-1) (Dey ve ark. 2021).



Şekil 2-1: Onkojenik sinyallerin hücre metabolizmasına etkileri - Boroughs (2015)'den değiştirilerek

Onkojenik sinyal, glikoz ve glutamin dahil olmak üzere bol miktarda besin alımını ve bunların biyosentetik yolakları (mor) desteklemek için kullanımını düzenler. Onkoproteinlerdeki (yeşil) mutasyonlar, Warburg etkisi yoluyla artan laktat üretimine bağlı olarak artan glikoz alımına yol açar. Ek olarak, KRas ve Myc, TCA döngüsünü beslemek için glutamin metabolizmasını destekler. Glikoliz ve TCA döngüsünden gelen ara maddeler, hücre proliferasyonu için gerekli makromolekülleri üretmek için biyosentetik yolaklar sağlar. LKB1, AMPK ve p53 gibi tümör baskılayıcılar (kırmızı), biyosentetik metabolizmaya karşı koymak için çeşitli düğümlerde hareket eder. Önemli besin taşıyıcıları, transkripsiyon faktörleri ve metabolik enzimler mavi renkle vurgulanmıştır. Klasik metabolik yollar turuncu renkle vurgulanmıştır. HK: Heksokinaz, G6P: Glukoz-6-fosfat, G6PDH: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, Riboz-5P: Riboz-5-fosfat, F6P: Fruktoz-6-fosfat, PPP: Pentoz fosfat yolağı, GA3P: Gliseraldehit-3-fosfat, 3PG: 3-fosfogliserat, LDHA: Laktat dehidrojenaz A, SREBP: Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein, ACLY: ATP sitrat liyaz, ACC: Asetil-CoA karboksilaz, FASN: Yağ asidi sentaz, GLS: Glutaminaz, α-KG: Alfa-ketoglutarat, OAA: Oksaloasetat, TCA: Trikarboksilik asit.

Kontrolsüz, sonsuz çoğalma, tümörlerin temel bir özelliğidir. 1920'lerde Otto Warburg, normal hücrelerden farklı olarak kanser hücrelerinde, özellikle mitokondride solunum mekanizmalarının zarar gördüğünü keşfetmiştir. Bu nedenle kanser hücreleri

oksidatif fosforilasyonu kullanmak yerine, glikoliz yoluyla ATP elde ederler (Vaupel ve Multhoff 2021). Oksijenin bol olduğu ortamlarda bile, yüksek oranda glikolize (aerobik glikolize) bağımlıdırlar. Her metabolik süreç, diğer metabolik yollar ve hücresel reaksiyonlar için öncüler veya ara ürünler (ör. NADPH, nükleotidler, piruvat, amino asitler ve metil grupları) sağlar. Bu nedenle, stabil glikoz metabolizmasının sürdürülmesi, kanser hücresinin hayatta kalması ve kanser ilerlemesi için önemli bir gerekliliktir (Park ve ark. 2020).

2.2.1. Glikoliz Metabolizması

Warburg etkisinin ortaya çıkmasının ardından, glikoz metabolizmasının kanser hücrelerinde metabolik karbon sağlamak için anahtar kaynak olduğu belirlenmiştir. Sitoplazmaya giren glikoz, heksozamin sentez yolağı (HSP), pentoz fosfat yolağı (PPP) veya serin biyosentezi yolağı üzerinden glikoliz yardımıyla yakıt olarak kullanılabilir (Anna ve ark. 2019).

Glikoliz, çeşitli karbon ara maddelerin sağlanmasında rol oynayarak ATP ve NADH üretimini gerçekleştirir. Glikolitik enzimlerin aktivasyonunda onkojenik mutasyonların etkili olduğu gösterilmiştir. Glikoz, glikoz taşıyıcı (GLUT) proteinleri aracılığıyla hücreye girerek, sitoplazmada heksokinazlar (HK'ler) tarafından fosforile edilir ve hücre içinde hapsolur (Lu ve ark. 2021). Glikoz, glikoliz yardımıyla son ürün olan piruvata dönüşür. Glikoliz esnasında, onkogenler c-MYC, KRAS ve YAP, kanser hücrelerinde GLUT1 ekspresyonunu yukarı regüle ederler. YAP'ın aşırı ekspresyonu ve p53'teki fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar, GLUT3 ekspresyonunun artmasına ve GLUT3'ün plazma membranında birikmesine neden olur. Kanser hücrelerinde hiperaktive olan Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT yolağı, mitokondriyal HK ilişkisini artırarak HK2 aktivitesini yukarı regüle eder (Heydarzadeh ve ark. 2020; Jiang L ve ark. 2021; Zerhouni ve ark. 2021).

HK tarafından üretilen Glukoz-6-fosfat (G6P), oksidatif ve oksidatif olmayan iki farklı faza sahip olan PPP yolağını aktifleştirebilir. Oksidatif faz, NADPH ve ribuloz-5-fosfat (R5P) üretirken; oksidatif olmayan faz sadece nükleotidlerin öncüsü olan R5P'yi üretir. Yağ asidi sentezi için gerekli olan NADPH, glutatyon disülfidden (GSSG) glutatyonun (GSH) yeniden üretilmesi için gerekli olan indirgeme gücüne de sahiptir (Ghashghaeinia ve ark. 2019). Kanser hücrelerinin kronik metabolik strese maruz kaldığı göz önüne alındığında, hücresel reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin kontrolü,

apoptotik hücre ölümü dahil olmak üzere olumsuz sonuçlardan kaçınmak için önemlidir. Bu nedenle, içe akışı birçok onkojenik protein tarafından düzenlenen PPP, redoks homeostazını sürdürmek ve kanser hücrelerini oksidatif stresten korumak için kritik öneme sahiptir (Dodson ve ark. 2019; Hayes ve ark. 2020). Kanser hücrelerinde, hiperaktif PI3K/AKT ve mTORC1 sinyali, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1 (SREBP1) aktivasyonu yoluyla PPP'deki (örn., G6PDH ve RPIA) hız sınırlayıcı enzimlerin ekspresyonunu arttırır. Kanser hücrelerinde anormal AKT aktivasyonu, doğrudan fosforilasyon yoluyla PPP'deki transketolaz enzimini aktive eder (Du D ve ark. 2022; Yi ve ark. 2020). Onkojenik c-Myc, PPP akışını düzenler. Son olarak, p53'ün fonksiyon kaybı mutasyonu G6PDH'yi bağlayamadığı ve engelleyemediği zaman PPP aktivitesi artar (Pinweha ve ark. 2016).

HSP, glikosilasyon gibi protein translasyon sonrası modifikasyonlarda önemli bir rolü olan UDP-GlcNAc sağlar. GlcNAsilasyon protein stabilitesini düzenlediği için, p53'ün GlcNAsilasyonu, proteini fosforilasyon aracılı protein bozulmasından korur. mTORC1/MYC hiperaktivasyonu, O-GlcNAc transferazı (OGT) yukarı regüle ederek meme kanseri hücrelerinde HSP aktivasyonunu arttırır (Hanover ve ark. 2010).

Serin biyosentez yolağı, 3-fosfogliserat (3PG) düzeyinde glikoliz yolağından ayrılır. 3PG'yi 3-fosfohidroksipiruvata dönüştüren hız sınırlayıcı enzim olan Fosfogliserat dehidrojenaz (PHGDH), serin biyosentez yolağının ilk enzimidir (Singh ve ark. 2021). Bu metabolik süreç sırasında, fosfoserin aminotransferaz (PSAT1), reaksiyon yan ürünü olarak α-ketoglutarat (α-KG) üretir (Jiang J ve ark. 2020). Böylece serin biyosentez yolağı, daha fazla ATP üretimi ve anabolik metabolizma için bir TCA döngüsü ara maddesi sağlayabilir. Serin sentez yolağının son ürünleri (serin ve glisin), folat metabolizması ve metionin metabolizması dahil olmak üzere diğer metabolik yolakların başlatılmasında rol oynar (Du D ve ark. 2022). NADPH ve metil grupları, folat ve metionin metabolizması yoluyla üretilir (Chen L ve ark. 2019a). Serin biyosentez işlemi; amino asitlere ek olarak, translasyon sonrası modifikasyon ve epigenetik düzenlemede yer alan indirgeme potansiyeli ve metil grupları üretir (Konrad ve ark. 2022). PHGDH, çeşitli kanser hücre dizilerinde genetik ve transkripsiyonel olarak yukarı regüledir. PHGDH geni amplifiye edilir ve özellikle meme kanseri hücrelerinde enzim ekspresyonu yükselir (X. Zhao et al., 2020). c-Myc; PHGDH ve PSAT1, fosfoserin fosfataz (PSPH) ve serin hidroksimetiltransferaz 1 (SHMT1) dahil olmak üzere diğer serin biyosentez

enzimlerini transkripsiyonel olarak yukarı regüle eder (Nilsson ve ark. 2012). Bu nedenle, glikolitik ara ürünler, kanser hücrelerinin artan biyosentetik ihtiyaçlarını karşılamak için gerekli olan nükleotidler, amino asitler ve yağ asitleri üretmek için önemli biyosentetik yollara ayrılabilirler (Park ve ark. 2020).

2.2.2. Glutamin Metabolizması

Plazmada en bol bulunan amino asit olan glutamin, önemli bir karbon ve azot kaynağıdır. Azotun nükleotid sentezi için önemli bir metabolit olması ve glutaminin diğer esansiyel olmayan amino asitlerin (NEAA'lar) ve yağ asitlerinin sentezi için bir haberci olması nedeniyle, kanser hücresinin proliferasyonunda kritik rol oynar (Cluntun ve ark. 2017).

Glutaminin sitoplazmaya taşınması, glutamin taşıyıcı ASCT2 (SLC1A5) aracılığıyla gerçekleşir. Glutaminin önemli bir azot donörü olması nedeniyle çeşitli onkojenik sinyallar, ASCT2 aktivitesini tetikler (Du D ve ark. 2022). Örneğin, onkojenik c-Myc ve n-Myc, nöroblastom hücrelerinde ATF4 aracılığıyla ASCT2 ekspresyonunu yukarı regüle ederek glutamin alımını destekler (Ren ve ark. 2015). Ayrıca, mTORC1 de ASCT2 ifadesini indükler (Cormerais ve ark. 2021). Tümör mikroçevre faktörleri glutaminin taşıyıcı ifadesinin artmasında etkili olur. İnflamatuar sitokin olan IL-4, glutamin taşıyıcı reseptörüne bağlanarak meme kanseri hücrelerinde c-Myc transkripsiyonunu indükler (Leone ve ark. 2019; Luiz ve ark. 2020). Aerobik glikolizin son ürünü olan laktat, MCT-1 tarafından alınır ve ASCT2 ifadesini arttırmak için c-Myc'yi stabilize eder (Liu Y ve ark. 2018; Wang CY ve ark. 2022). Ras ile dönüştürülmüş kanser hücreleri, mikropinositoz yoluyla dış plazma proteinlerini yakalamak için hücre dışı vezikülleri kullanır (Lee ve ark. 2019).

Hücre içine alınan glutaminin iki önemli rolü vardır. İlk rolü, amino asit ve nükleotid biyosentezi için azot donörü olarak hizmet edebilir. Glutaminaz (GLS1/2) enzimleri, glutamini glutamata katalize ederek amonyak (NH_3) üretilmesini sağlar. Glutamat ayrıca TCA döngüsü ara maddesine, α-KG'ye dönüştürülebilir ve NH_4^+ üretebilir. Bu amonyak grubu, sırasıyla pirimidin ve pürin sentez yolaklarının hız sınırlayıcı enzimleri olan karbamoil fosfat sentetaz ve fosforibosil pirofosfat sentaz aracılığıyla transfer edilebilir (Yang L ve ark. 2017). Ayrıca, PI3K/AKT ekseni ve aşağı akış mTOR yolağının hiperaktivasyonu, SIRT4'ü inhibe ederek glutamat dehidrojenaz (GDH) ekspresyonunu indükler. Bu inhibisyon ADP-ribozilasyonunu ve GDH

aktivitesini inhibe eder (Ji ve ark. 2022; Wang T ve ark. 2018). Aksine, pankreas kanseri hücrelerinde, KRAS mutasyonu, redoks homeostazının uygun şekilde sürdürülmesi için NADPH sağlamak üzere GDH aktivitesini aşağı regüle eder ve sitozolik aspartat aminotransaminaz (GOT1) enzimini yukarı regüle eder (Kremer ve ark. 2021; Miyo ve ark. 2016).

Hücre içine alınan glutaminin ikinci rolü, bir karbon donörü olarak yağ asidi sentezinde görev aldığında ortaya çıkar. Plazma zarı ve hücre altı organelleri lipit çift katmanlarından oluştuğundan, hücre proliferasyonu için de novo lipit biyosentezi gereklidir. Bu nedenle, lipit biyosentezi çeşitli kanser türlerinde (örneğin prostat, akciğer ve mide) yukarı doğru düzenlenir (Li M ve ark. 2020). Normoksik koşullar altında (kandaki oksijenin normal düzeyde olduğu durum), normal hücrelerde yağ asidi sentezinin öncüsü olan çoğu asetil-CoA, glikoliz sonucu meydana gelir. Bununla birlikte, aerobik glikoliz nedeniyle, kanser hücreleri genellikle piruvatı asetil-CoA'dan ziyade laktata dönüştürür. Kanser hücrelerindeki asetil-CoA'nın çoğu, glutamin-TCA döngü ekseninden elde edilir (Du D ve ark. 2022). Glutamin, TCA döngüsünün anabolik fazına giren α-KG'ye katalizlenerek sitrat üretilir (Zeng ve ark. 2022). Sitrat, mitokondriden sitoplazmaya translokasyon yoluyla geçerek ATP sitrat liyaz (ACLY) enzimi tarafından asetil-CoA'ya katalize edilir (Wen ve ark. 2019). Daha sonra, yağ asidi sentazı (FASN) uzun zincirli yağ asidi sentezine aracılık eder (Park ve ark. 2020).

Glutamin, kanserde malign dönüşümün aracıları olarak ortaya çıkan TCA döngüsü ara maddelerini besler. Aerobik glikoliz ve oksidatif fosforilasyonun bir sonucu olarak glutamin, kanser hücrelerinde NADH ve FADH2'nin başlıca kaynağı haline gelir (Mikalayeva ve ark. 2019). Oksidatif fosforilasyonun neticesinde DNA hasarını ve oksidatif stresi indükleyebilecek ROS üretilmesi beklenir (Bhatti ve ark. 2017). Bu nedenle, onkojenik mutasyon, ROS seviyelerini yönetmek için yeterli indirgeme gücü sağlayan çeşitli NADPH sağlayan mekanizmaları indükler (Lim ve Leprivier 2019).

2.2.3. Lipit Metabolizması

Yağ asidi metabolizması, yağ asitlerinin yapısal bileşenler olmanın yanında ikincil haberciler (DAG ve IP3) olmaları nedeniyle kanser progresyonunda son derece önemlidir. Hücresel yanıt ve proliferasyon için hayati öneme sahip olan yağ asidi sentezi için, önemli miktarda NADPH gereklidir. NADPH redoks homoestazı için çok önemlidir. Bu nedenle, yağ asidi sentezinin düzenlenmesi için, redoks homoestazı ve hücresel

büyüme arasındaki dengenin korunması gerekir. Bu denge, çeşitli sinyal yolakları tarafından sağlanır (Park ve ark. 2020).

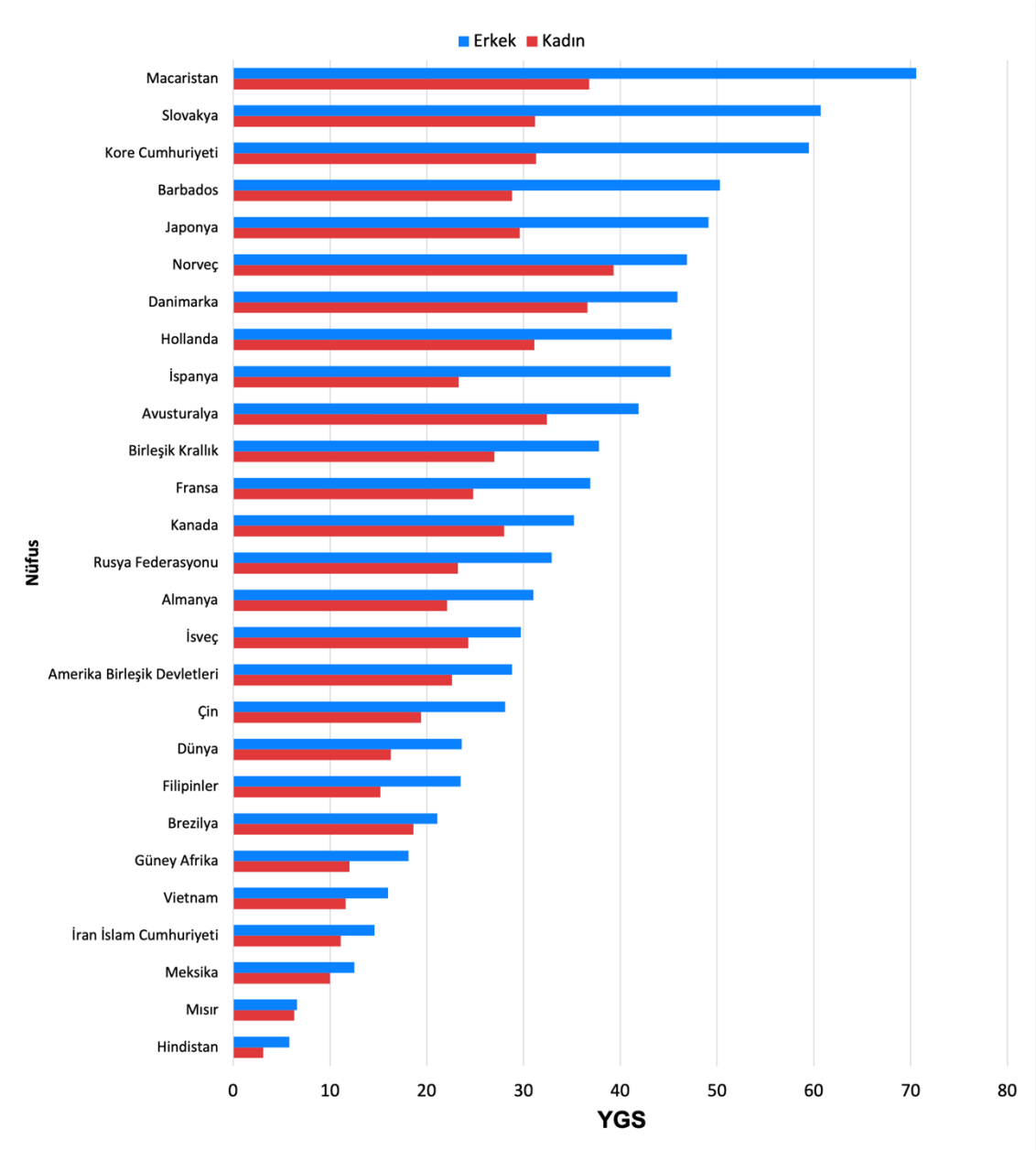
Lipit biyosentez enzimleri için transkripsiyon faktörleri olan SREBP'ler, yağ asidi sentezinin düzenlenmesinde rol oynar. İnaktif öncüller olarak endoplazmik retikulumda sentezlenen SREBP'ler, hücresel lipit seviyeleri düşük olduğunda, golgi ile ilişkili MBTPS1/2 proteaz tarafından N-ucunda ayrılır. Parçalanan ürün, çekirdekte SRE proteinine bağlanır ve hedef gen ekspresyonunu indükler (Zheng ZG ve ark. 2021). Ayrıca, GSK3β, FBXW7 aracılı ubikuitinasyon yoluyla SREBP stabilitesini inhibe eder (Bengoechea-Alonso ve Ericsson 2009). Bunun yanında, PI3K/AKT ve mTORC2 sinyalleri, anormal şekilde aktive edildiği çeşitli kanser hücresi tiplerinde SREBP'nin daha yüksek ekspresyonuna izin vermek için GSK3β'yi inhibe eder (Kim ve ark. 2021). Yağ asidi sentezinin ilk basamağında, SREBP'nin doğrudan hedef geni olan ACLY enzimi, sitratı asetil-CoA'ya dönüştürür (Paul ve ark. 2022). E3 ligaz UBR4 ve Cullin3-KLHL25 ACLY kararlılığını bozarken, ACLY asetilasyonuna neden olan p300 kararlılığın artmasını sağlamaktadır (Bradshaw 2021; Lin ve ark. 2013; Zhang C ve ark. 2016).

Yağ asidi sentezi oksijen tüketen bir süreç olduğundan, kanser hücreleri, hipoksi ve besin yetersizliği gibi durumlarda yağ asidi sentezini gerçekleştirebilmek için, harici lipit alımını yukarı doğru düzenler (Rashid ve ark. 2021). KRAS aktivasyonu, hücre dışı lipit alımını ve lizozomal yıkımı destekleyen makropinositozu kolaylaştırmaktadır (Liu X ve Ghosh 2019).

2.3. Kolorektal Kanser

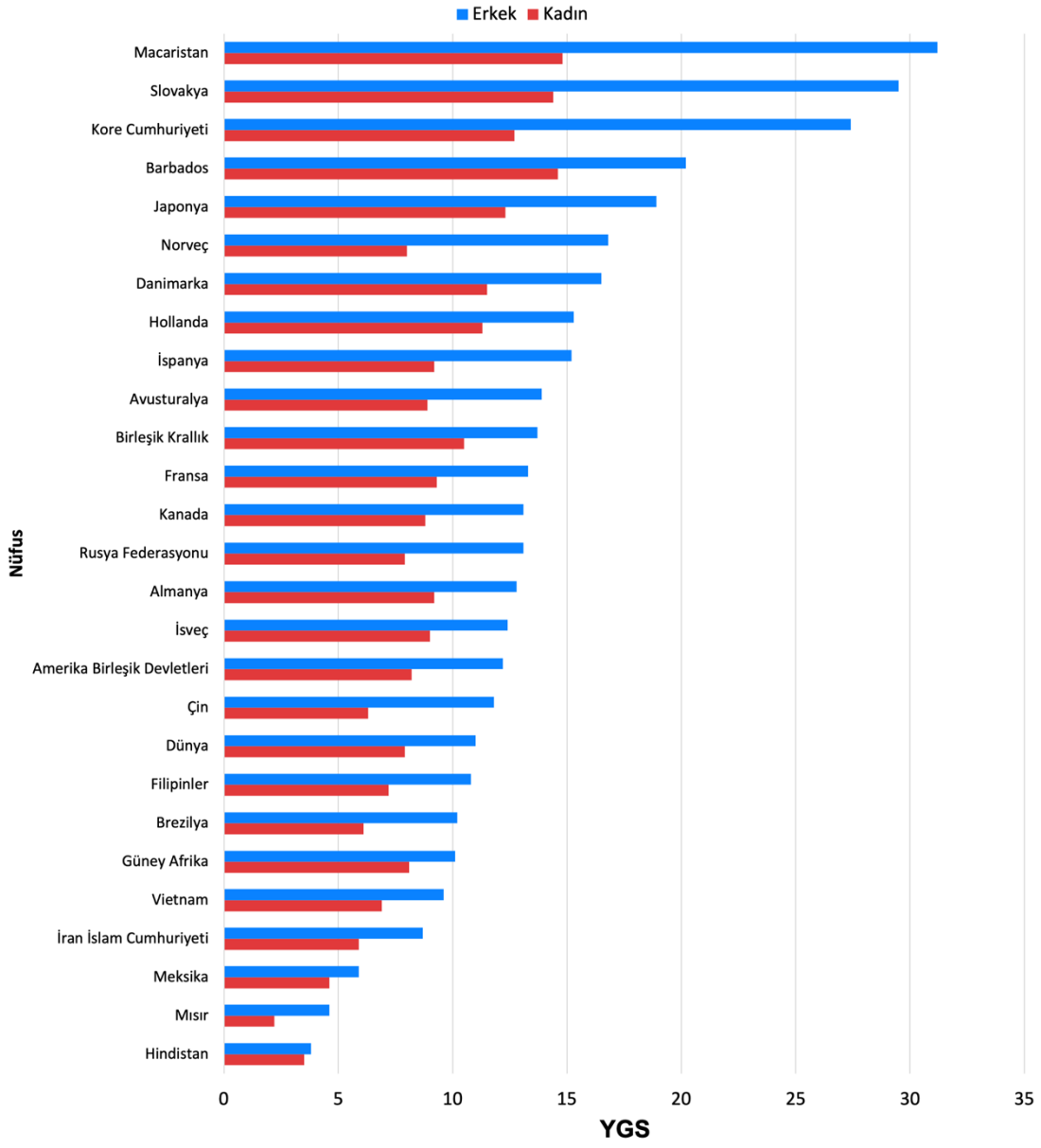
KRK, dünya genelinde üçüncü en sık görülen kanser türü olup, dünya genelinde teşhis edilen kanser vakalarının ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Bray ve ark. 2018). Kadınlarda ikinci, erkeklerde ise üçüncü en sık görülen kanser türüdür. Gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha yaygın olan KRK'in kadınlardaki insidansı ve mortalitesi erkeklere göre 3-4 kat daha düşüktür (Şekil 2-2-5) (Rawla ve ark. 2019). Gelişmekte olan ülkelerdeki ilerleyiş göz önünde bulundurulduğunda, kanser insidansının 2035 yılında 2,5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir (Arnold ve ark. 2017; Bray ve ark. 2018). KRK genetik, yaşam tarzı, obezite ve çevresel faktörler ile ilişkilidir. Özellikle rektum kanseri ve sol kolon kanseri

olmak üzere 50 yaşın altındaki KRK vakalarında endişe verici bir artış gözlemlenmiştir (Kasi ve ark. 2019; Siegel ve ark. 2017; Wolf ve ark. 2018).



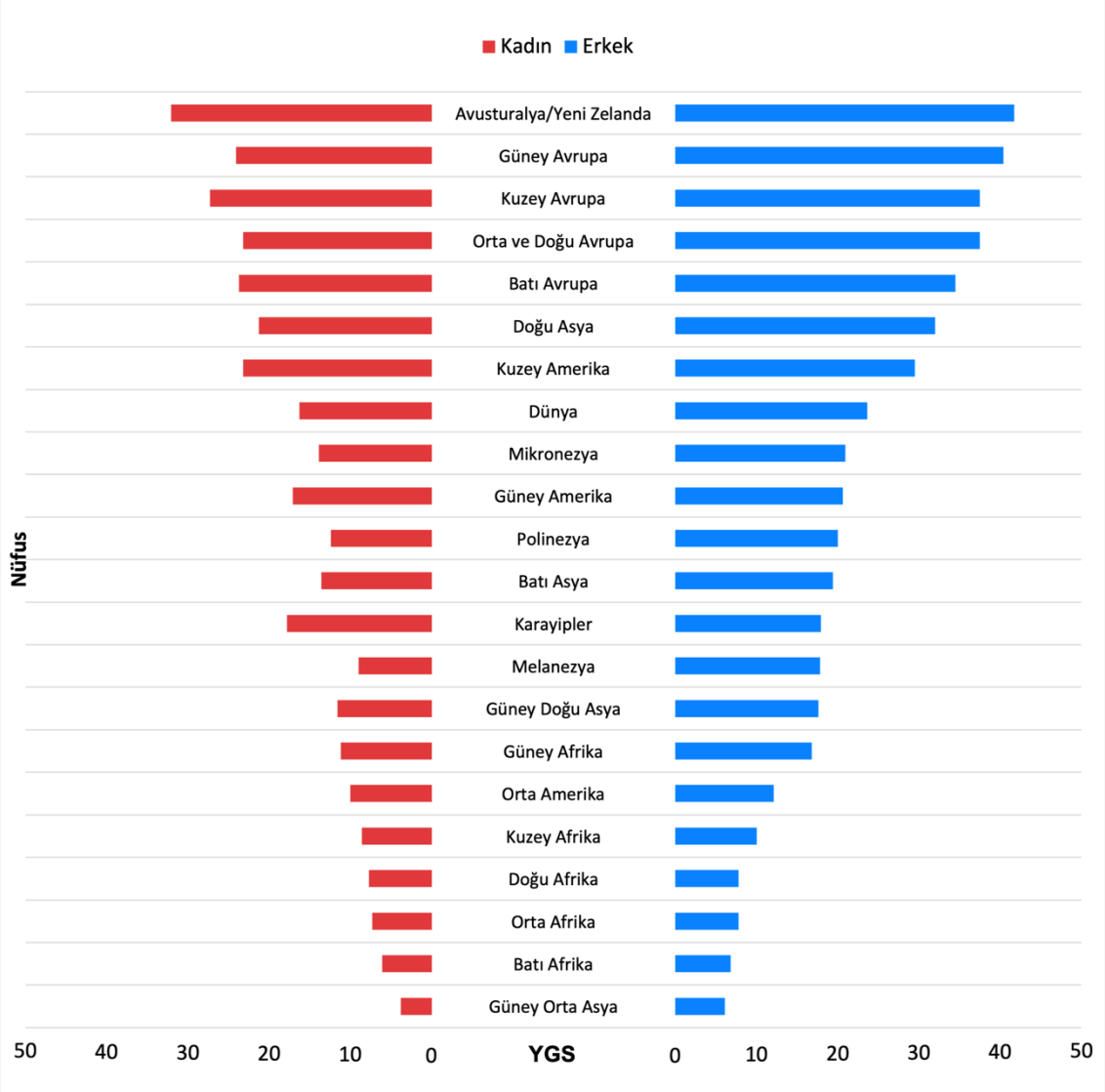
Şekil 2-2: Kolorektal kanserin 2018 yılında ülkeler genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı insidans grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek

2018'de dünya genelindeki ülkelere özgü kolorektal kanserin cinsiyete bağlı yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranlarını gösteren bar grafiği. YGS: yaşa göre standartlaştırılmış.



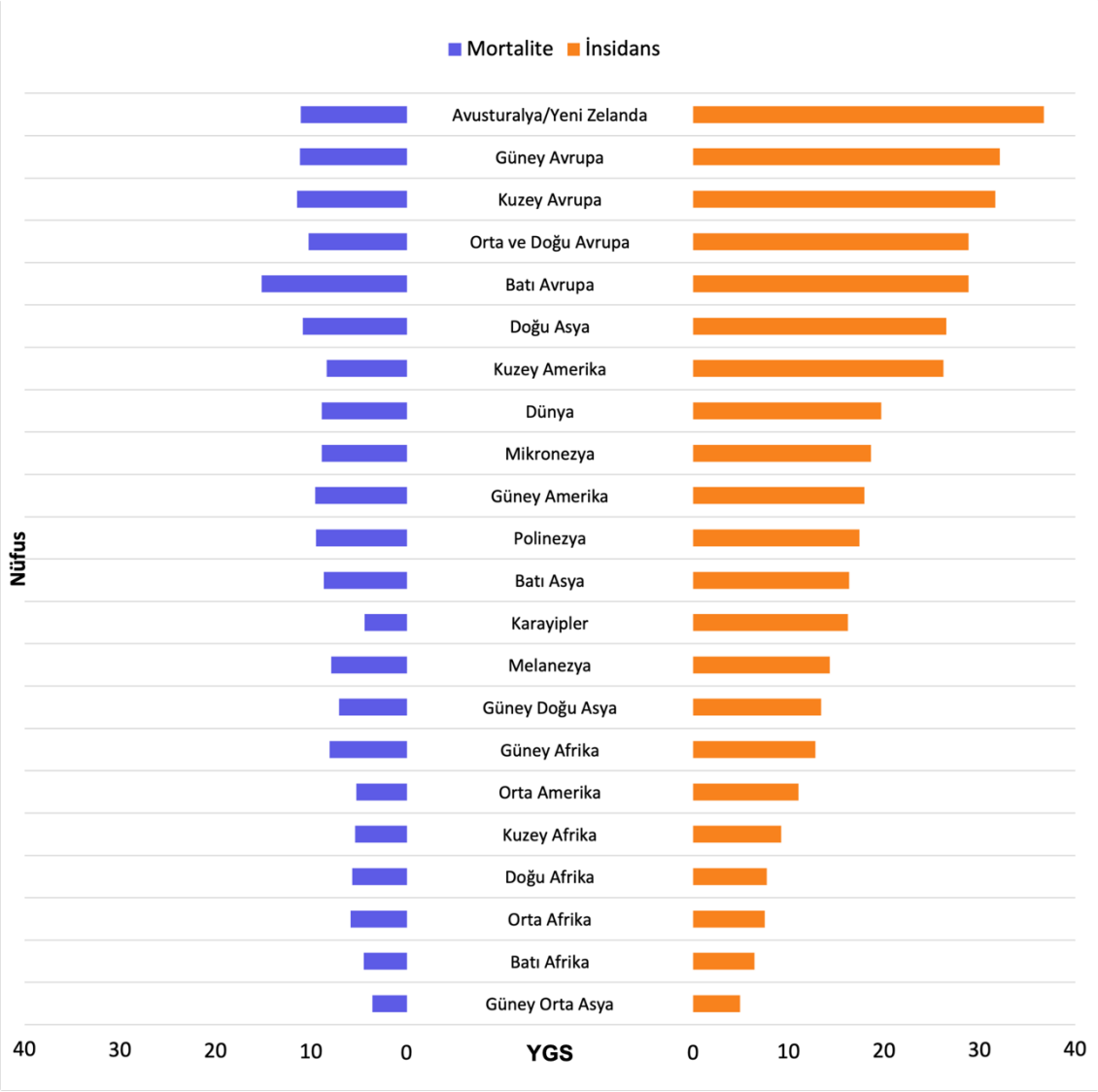
Şekil 2-3: Kolorektal kanserin 2018 yılında ülkeler genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı ölüm grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek

2018'de dünya genelindeki ülkelere özgü kolorektal kanserin cinsiyete bağlı yaşa göre standartlaştırılmış mortalite oranlarını gösteren bar grafiği. YGS: yaşa göre standartlaştırılmış.



Şekil 2-4: Kolorektal kanserin 2018 yılında dünya genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı görülme grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek

2018'de dünya genelindeki kolorektal kanserin cinsiyete bağlı yaşa göre standartlaştırılmış insidans oranlarını gösteren bar grafiği. YGS: yaşa göre standartlaştırılmış.



Şekil 2-5: Kolorektal kanserin 2018 yılında dünya genelinde yaşa ve cinsiyete bağlı insidans ve mortalite grafiği - Rawla (2019)'dan değiştirilerek

2018'de dünya genelindeki kolorektal kanserin yaşa göre standartlaştırılmış insidans ve mortalite oranlarını gösteren bar grafiği. YGS: yaşa göre standartlaştırılmış.

Hastalık insidansı ile cinsiyet ve yaş arasında güçlü ilişkiler olduğu gösterilmiştir. Ayrıca KRK'in gelişiminin çevresel ve genetik risk faktörleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Pozitif aile öyküsünün tüm KRK hastalarının yaklaşık %10-20'sinde, KRK'den etkilenen akraba sayısına, etkilenme derecesine ve KRK tanısı üzerinden geçen süreye bağlı olarak değişen risklerde etkili olduğu görülmüştür (Thanikachalam ve Khan 2019). KRK'e ilişkin genom çapında yapılan çalışmaların bazılarında KRK riski ile ilişkili kansere yatkınlık genleri (genellikle tek nükleotid polimorfizmleri) başarıyla tanımlanmış olmasına rağmen, kalıtsallığa neden olan faktörlerin çoğu hala tam olarak

bilinememektedir. KRK hastalarının yaklaşık %5-7'lik bir alt grubunun iyi tanımlanmış bir kalıtsal KRK sendromundan etkilendiği görülmektedir (Mauri G ve ark. 2019).

KRK, mutasyona uğramış genin alellerinden birini etkileyen kalıtsal mutasyonlar nedeniyle gerçekleşir. Kalıtsal kanserler, polipozis ve polipozis olmayan olmak üzere iki grup olarak sınıflandırılır. Polipozis grubundan olan ailesel adenomatöz polipozis (FAP), kolonda çok sayıda malign polip oluşumu ile karakterizedir. Polipozis olmayan kalıtsal kolorektal kanser ise, DNA onarım mekanizmalarındaki mutasyonlarla ilişkilidir. MSH2, MLH1, MLH6, PMS1 ve PMS2 gibi DNA onarım proteinlerini kodlayan alellerden birinde kalıtsal mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkan Lynch sendromu, polipozis olmayan kalıtsal kolorektal kanser grubunda en sık görülen sendromdur. Ayrıca, Lynch sendromu kolorektal kanser vakalarının %2-3'ünde görülebilir. Ailesel kolorektal kanser ise, vakaların yaklaşık %25'ini oluşturur ve kalıtsal mutasyonlar nedeniyle de ortaya çıkabilir. Fakat, herhangi bir kalıtsal kanser varyantına dahil edilemediği için kendi başına kalıtsal kanser olarak sınıflandırılmamaktadır (Mármol ve ark. 2017).

KRK, evre I, II, III, IV olmak üzere 4 ayrı evreye ayrılmaktadır. Bu evreler de erken evre (evre I ve II) ve geç evre (evre III ve IV) olarak iki gruba ayrılır. Erken evre KRK için, rezeksiyon cerrahisi en yaygın tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. İleri evre KRK için genellikle ana tedavi olarak kemoterapi uygulanmaktadır (Liang C ve ark. 2016).

2.4. Kolorektal Kanser Oluşum Mekanizmaları

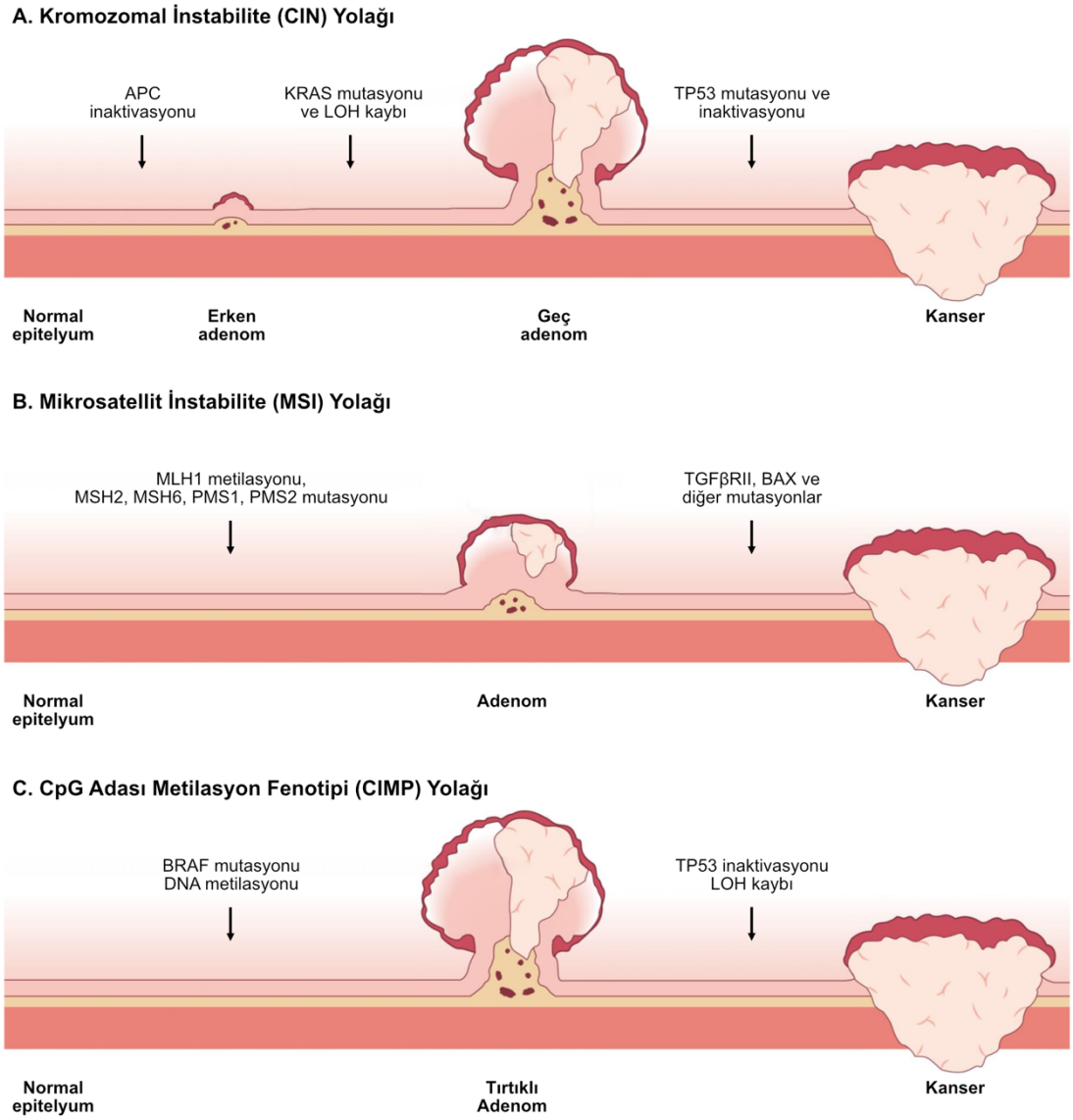
KRK'nin altında yatan önemli nedenlerden biri olan genomik instabiliteye yol açan patojenik mekanizmalar, kromozomal instabilite (CIN), mikrosatelit instabilite (MSI) ve CpG adası metilasyon fenotipi (CIMP) olmak üzere üç farklı yolak üzerinden gerçekleşmektedir (Mármol ve ark. 2017).

KRK vakalarının çoğunda etkili olan CIN yolağı, kromozom sayısındaki dengesizlikler ile karakterizedir. Kromozom sayılarında eksiklik ya da fazlalık olan anöplodik tümörler ve heterozigosite kaybı (LOH) bu yolak üzerinden gerçekleşmektedir. LOH, alellerden biri inaktif olarak kalıtılmış durumda iken, normal durumdaki diğer alelin de fonksiyonunu kaybetmesi durumudur (Sarogni ve ark. 2019). CIN yolağındaki mekanizmalar, hücre fonksiyonlarının düzgün şekilde sürdürülmesinde kritik rolü olan APC, KRAS, PI3K ve TP53 gibi genleri etkileyerek kromozom segregasyonunda

değişikliklere, telomer disfonksiyonuna ve DNA hasar yanıtına neden olur (Dariya ve ark. 2020; Doonan ve ark. 2017). APC mutasyonları, β-katenin'in çekirdeğe translokasyonuna neden olarak tümörijenez ve istilada yer alan genlerin transkripsiyonunda rol oynar. Diğer yandan, KRAS ve PI3K'deki mutasyonlar, MAP kinazın aktivasyonuna yol açarak hücre proliferasyonunu arttırır. Ana hücre döngüsü kontrol noktası olan p53'ü kodlayan TP53'te fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar, hücre döngüsüne kontrolsüz girişe neden olur (Şekil 2-6-A) (Jeong ve ark. 2018; Marcolino ve ark. 2020).

Mikrosatellit instabilite yolağı, DNA onarım mekanizmalarının ortadan kalkmasına bağlı olarak oluşan aşırı değişken fenotip nedeniyle gerçekleşir. Bunun sonucunda, mikrosatellit instabilite olan tümörlerde kısa DNA zincirlerini veya ardışık tekrarları (iki ile beş baz çifti tekrarı) onarma yeteneği azalır. Bu nedenle mutasyonlar bu bölgelerde artış eğilimindedir. Bu mutasyonlar, mikrosatellitlerin kodlayıcı bölgelerini etkileyebildiği gibi kodlayıcı olmayan bölgeleri de etkileyebilirler. Ayrıca, mikrosatellitlerde kodlanan onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin açık okuma bölgeleri (ORF) okunurken tümörlerin gelişimi gerçekleşir. Promotör hipermetilasyon gibi spontan olaylar ya da Lynch sendromunda görülen germinal mutasyonlar, uyumsuzluk onarım genlerinin (MMR) ekspresyonunun azalmasına neden olabilir. Bu tümörler esas olarak diploiddir ve daha az LOH barındırmaktadırlar. MSI olan tümörlerde mutasyona uğrayan genler arasında MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 ve PMS2 bulunmaktadır (Fu ve ark. 2021). Genel olarak, MSI tümörlerinin progrozu sporadik tümörlerden daha iyi olduğundan, gelecekte hastalığın tekrar gelişme ve ortaya çıkma riski sporadik tümörlere kıyasla daha azdır (Şekil 2-6-B) (Wielandt ve ark. 2020).

KRK'in altında yatan bir diğer önemli neden olan epigenetik instabilite CIMP'den sorumludur. CIMP tümörlerinin ana özelliği, genetik susturmaya ve protein ekspresyonunda kayba yol açan onkogen promotörlerin hipermetilasyonudur. Genetik ve epigenetiğin iş birliğinin söz konusu olduğu KRK'de, nokta mutasyonundan daha fazla metilasyon olaylarının görüldüğü bulunmuştur. Birçok CIMP tümöründe mikrosatellit instabilitesinin yanı sıra BRAF mutasyonlarının varlığının görülmesi buna örnek olarak verilebilir (Şekil 2-6-C) (Noreen ve ark. 2019).



Şekil 2-6: Kolorektal kanser oluşum yolakları - Schmitt (2021)'den değiştirilerek

2.5. Kolorektal Karsinoma Tedavisi

Anti-tümör tedavisinde kemoterapi etkin bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Bian ve ark. 2019; Zhang J ve ark. 2017). 1960'lardan önce kanser tedavisinde ilaç olarak saf organik bileşikler kullanılmıştır (Rottenberg ve ark. 2021). 1960'ların sonunda, kanser önleyici özelliğe sahip basit bir koordinasyon bileşiği olan cisplatinin tesadüfen keşfedilmesi, kemoterapi ile kanser tedavisinde yeni bir yolun önünü açmıştır (Wang D ve Lippard 2005).

Birinci nesil platin bazlı antikanser ilacı olan cisplatinin; meme, yumurtalık ve kolorektal kanserinde, habis tümör üzerinde belirgin terapötik etkileri görülmüştür (Qi ve ark. 2019). Diğer yandan cisplatin spesifik bir kemoterapötik ilaç olmaması nedeniyle tümör hücrelerinin öldürülmesinin yanı sıra sistematik toksisiteye de neden olduğu belirlenmiştir (Zhang C ve ark. 2022). Bu yüzden platin antikanser ilaçları nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite ve miyelosupresyon gibi ciddi istenmeyen etkilere sahiptir. Bu etkiler nedeniyle de dozun sınırlandırılması gerekmektedir (Wlodarczyk ve ark. 2018). Ayrıca uzun süreli cisplatin kullanımına bağlı olarak normal dokularda ciddi hasarlar meydana gelmektedir (Mjos ve Orvig 2014). Bu nedenle normal dokulara verilen hasarı azaltmak amacıyla lipozom enkapsülasyonu (Alas ve ark. 2021; Chen Q ve ark. 2018), nanomateryal taşıyıcılar tarafından ilaç iletimi (Turiel-Fernández ve ark. 2021; Zhou ve ark. 2016) ve tümör üzerinde aşırı ekspresyonu olan membran yüzey proteinlerinin hedeflenmesi (Gandioso ve ark. 2015; Zhang C ve ark. 2022) gibi stratejiler kullanılmıştır.

Metastatik KRK (mKRK) hastalarının çoğunluğu, sitotoksik ve hedefe yönelik biyolojik ajanların bir kombinasyonu uygulanarak tedavi edilmektedir. Kronik hastalıkları sebebiyle tam olarak iyileşemeyen ya da yaşam sonunda desteğe ihtiyacı olan hastalara yardım etmeyi amaçlayan palyatif amaçlı birinci basamak kemoterapi, floropirimidinlerin (ör. 5-florourasil (5-FU) veya kapesitabin) tek başlarına veya sitotoksik ajanlarla birlikte uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Yaygın olarak tercih edilen sitotoksik ajanlar lökovorin (LV), oksaliplatin ve irinotekandır. Sitotoksik ajanlar 5-FU/LV/oksaliplatin, kapesitabin/LV/oksaliplatin ve 5-FU/LV/irinotekan gibi kombinasyonlar halinde floropirimidinlerle birlikte kullanılabilmektedir. Lökovorin kullanımı tedavinin toksisitesini azaltırken, diğer sitotoksik ajanların eklenmesi, tedavinin toksik etkilerinin yoğun olmasına rağmen yanıt oranını ve progresyonsuz sağkalımı arttırmaktadır. Organ fonksiyonu iyi olan hastalara sunulacak olan ikinci basamak kemoterapi refrakter bazlı bir rejime göre seçilmemektedir. İrinotekan'a dirençli hastalar için ikinci basamak tedavide oksaliplatin içeren kombinasyondan biri uygulanmaktadır (Mármol ve ark. 2017; van Cutsem ve ark. 2014).

Geleneksel kemoterapinin yanı sıra, tedavi etkinliğini artırmak, yan etkileri ve ikincil tümör geliştirme riskini azaltmak amacıyla, altın ve platin bazlı ilaçların kullanımı gibi alternatif tedaviler üzerinde de çalışılmaktadır (Mármol ve ark. 2017).

2.5.1. Kolorektal Karsinoma Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

2.5.1.1. Floropirimidinler

Floropirimidin ilaçları, gastrointestinal sistem, göğüs, karaciğer, akciğer, baş ve boyundaki katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak bilineni 5-florourasil (5-FU) olmakla birlikte tegafur, kapesitabin ve doksifluridin floropirimidin ilaçların oral yolla alınan ön ilaçları yani farmakolojik olarak inaktif türevleridir (Hishinuma et al., 2020). 5-FU, baş-boyun ve mide-bağırsak tümörleri dahil olmak üzere katı malignitelerin tedavisinde en sık kullanılan üçüncü kemoterapötik ajandır (Sara ve ark. 2018). 5-FU'lar, tek başlarına veya hedefe yönelik tedavilerde kombinasyon halinde uygulanırlar. Sentetik bir florlanmış pirimidin analoğu olan 5-FU, KRK tedavisinde kullanılan en önemli kemoterapötik moleküldür. 5-FU anabolizmasında ya da katabolizmasında yer alan enzimler direnç oluşumunu desteklemektedirler. Bunun yanında, KRK hücrelerindeki apoptoz, otofaji, solunum, glikoz metabolizması ve hücre döngüsü temel hücresel fonksiyonlara da etki edebilmektedirler (Blondy ve ark. 2020).

Floropirimidin ilaçlar ile tedavi edilen kanser hastalarının yaklaşık %30'unda mukozit, ishal, nötropeni, trombositopeni ve el-ayak sendromu gibi ciddi yan etkilere görülebilmektedir. Tedavide ortaya çıkan ciddi toksik etkiler, tedavinin kesintiye uğramasına veya başarısız olmasına neden olmakta ve hastanın ölüm riskini de arttırmaktadır (Hishinuma ve ark. 2020). Bu durum, sıklıkla dozun azaltılmasını ve tedavinin kesilmesini gerektiren önemli bir klinik problemdir (Loganayagam ve ark. 2013). Ayrıca, tedavisi uzun süren metastatik kanserli hastaların %90'ında doğuştan veya sonradan kazanılmış direnç gelişimi, tedavideki en büyük zorluklardan biri olmaya devam etmektedir (Blondy ve ark. 2020).

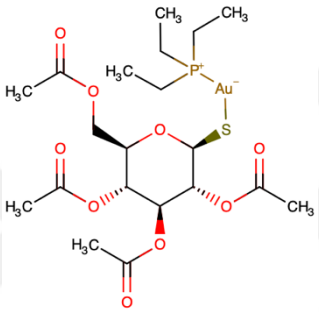
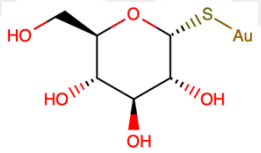
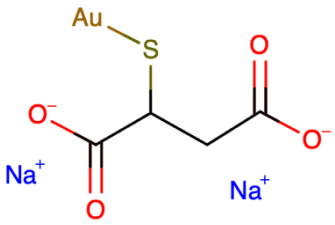
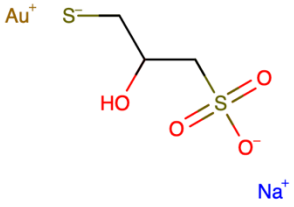
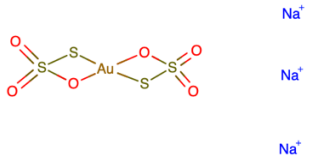
2.5.1.2. Altın İçeren Antikanser İlaçlar

Son birkaç on yılda altın(I) ve altın(III) içeren birçok metal bazlı antikanser ilacı tasarlanmıştır. Altın atomu, anti-tümör etkisini ve diğer özelliklerini iyileştirmek için fosfinler, karbin ligandları, porfirinatlar veya ditiyokarbamatlarla koordine olabildiğinden, tasarlanan ilaçların bileşiklerinin yapıları birbirlerinden oldukça farklılık göstermektedir (Lammer ve ark. 2015; Mármol ve ark. 2017).

Altın içeren antikanser ilaçlarının en iyi karakterize edilmiş olanlarından biri auranofin olarak bilinir (Tablo 2-1). Auranofin, genel olarak antiromatizmal ilaç olarak

kullanılan fosfin ve tiyol ligandları içeren bir altın(I) bileşiğidir (Onodera ve ark. 2019). Auranofin, oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa yol açan ve intrinsik apoptozu tetikleyen tiyoredoksin redüktazın inhibisyonuna neden olur (Zhang X ve ark. 2019).

Tablo 2-1: Altın içeren antikanser ilaçların klinikteki uygulamalarının zaman çizelgesi - Yamashita (2021)'den değiştirilerek

İlaç	Moleküler Yapı	Satış Yılı	Menşei
Auranofin (Ridaura)		1985	ABD
Aurotiyoglukoz (Solganal)		1940	Kanada
Aurotiyomalat (Miyokrisin)		1935	Kanada
Aurotiyoprol (Alokrisin)		-	-
Sodyum Altın Tiyosülfat (Sanokrisin)		-	-

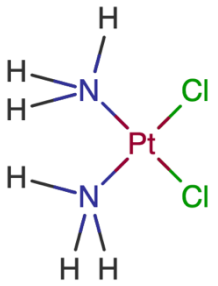
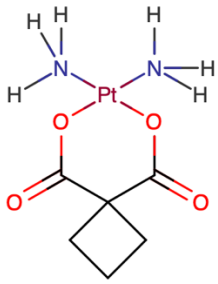
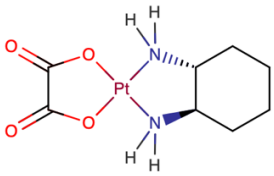
Altın atomu tioredoksin redüktaz inhibisyonundan sorumlu olduğundan, diğer altın içeren ilaçlar da kanser hücresinde apoptozu indükleyebilir (Zhang C ve ark. 2018). Tiyol ve selenol grupları altın atomlarını güçlü bir şekilde çeker. Bu nedenle, altın atomları kolorektal kanser gibi bazı kanser türlerinde upregüle edilen ve tümörün progresyonu ve sağ kalımıyla doğrudan ilişkili olan tioredoksin redüktaz gibi selenyuma bağımlı proteinleri bağlayabilir (Hong ve ark. 2020). Oluşan tioredoksin redüktaz inhibisyonu kanser hücresinin ölümünü tetikler (Zhuge ve ark. 2018).

Auranofin, kolon kanseri hücre homeostazı (Han ve ark. 2019) için kritik olan ubikuitin-proteazom sistemini (Wang F ve ark. 2022) inhibe ederek de KRK'e karşı etkili olabilir. Bu mekanizmada özellikle altın(I) türevleri redoks dengesini bozarak hücre içindeki ROS seviyelerini arttırır ve apoptoz kaskadının aktivasyonunu indükleyen ve nükleik asitleri etkilemek yerine kontrollü hücre ölümüyle sonuçlanan mitokondriyal membran potansiyelini değiştirir (González ve ark. 2019; Haji ve ark. 2020).

2.5.1.3. Platin İçeren Antikanser İlaçlar

Günümüzde etki mekanizmaları iyi tanımlanmış ve terapötik etkileri belirlenmiş olan platin içeren antikanser ilaçları klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang C ve ark. 2022). Bu ilaçların başında cisplatin (Corte-Rodríguez ve ark. 2015), karboplatin (Calderon ve ark. 2017) ve oksaliplatin (Zayed ve ark. 2011) gelmektedir (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: Platin içeren antikanser ilaçların klinikteki uygulamalarının zaman çizelgesi - Zhang (2022)'den değiştirilerek

Nesil	Birinci	İkinci	Üçüncü
İlaç	Cisplatin	Karboplatin	Oksaliplatin
Moleküler Yapı			
Satış Yılı	1978	1986	1996
Menşei	Japonya/İtalya	Amerika	Fransa

Kemoterapide kullanılan ilk metal bazlı ilaç olan cisplatinin, testis, yumurtalık ve katı baş ve boyun tümörleri gibi çeşitli kanser türlerine karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Aldossary 2019; Giacomini ve ark. 2020). Cisplatin hücre içine girdikten sonra DNA'daki büyük (major) oluk guaninlerin nükleofilik N7 bölgesinde DNA ile reaksiyona girerek DNA'yı bağlar ve apoptozu indükler. Daha sonra inter- ve intra-çapraz bağların bir sonucu olarak cisplatin ve DNA arasında mono- ve bifonksiyonel eklentiler oluşur (Rocha ve ark. 2018).

Cisplatin kullanımı, etki mekanizması nedeniyle böbrek hasarı ve işitme kaybı gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Nefrotoksisitenin, böbrek proksimal tübülünde cisplatin birikimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Zhang Y ve ark. 2021). Ototoksisite ise ROS'daki artış nedeniyle koklear duyu tüylü hücrelerin ölümü sonucu gerçekleşmektedir (Zhang W ve ark. 2020). Cisplatin ayrıca tümör direncinde artışa neden olmaktadır. En yaygın direnç mekanizmasında, cisplatin-DNA eklentilerinin onarımında artış gözlenmektedir. Sitozolik ilaç inaktivasyonunda artış ve ilaç alımında azalma da oluşabilecek diğer olasılıklar arasında yer almaktadır (Wang L ve ark. 2021).

Cisplatin kullanımında görülen istenmeyen etkiler nedeniyle, cisplatin temel alınarak, ikinci nesil platin kemoterapi ilacı karboplatin geliştirilmiştir. Karboplatin daha düşük bir hidrasyon oranı sergiler ve cisplatine kıyasla daha az hepatotoksik, nefrotoksik,

nörotoksik ve ototoksik sistemik toksik etkiye sahip olması nedeni ile yüksek biyogüvenliğe sahiptir. Düşük toksisitesi nedeniyle agresif tümörlerin kemoterapi tedavisinde yüksek dozda kullanılabilir. Ancak cisplatin ve karboplatin tedavi sırasında ilaç direnci oluşmasına neden olmaktadır (Zhang C ve ark. 2022).

Bu nedenle, üçüncü nesil platin içeren antikanser ilacı olan oksaliplatin geliştirilmiştir. Oksaliplatin, kolorektal kanser kemoterapisinde kullanılan en yaygın ilaçlardan biridir. Cisplatinin aksine ototoksisite ve nefrotoksisiteye neden olmamaktadır (Ashry ve ark. 2021). Oksaliplatin yaygın olarak infüzyonel 5-FU/lökovorin ile kombinasyon halinde uygulanır (Neugut ve ark. 2019). Oksaliplatinin 5-FU'in yanıt oranını arttırdığı ve metastatik hastalarda daha iyi bir sağ kalım oranı sağladığı belirlenmiştir (Boakye ve ark. 2021). Oksaliplatin, DACH ligandına sahip olması nedeniyle, kimyasal yapı olarak diğer platin içeren kemoterapi ilaçlarından farklıdır. DACH, DNA'nın onarımını zorlaştırarak tümör hücresinin ölüm olasılığını arttırır. Oksaliplatin direncinin, nükleotit eksizyon onarım (NER) yolağı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. ERCC1, XRCC1 ve XDP'nin gen ekspresyon seviyeleri, oksaliplatin direnci ile bağlantılıdır (van der Jeught ve ark. 2018). Tümör mikroçevresi içindeki çeşitli hücreler tarafından bol miktarda salgılanan dönüştürücü büyüme faktörü-β1 (TGF-β1)'in, epitelden mezenkimal geçiş (EMT) yoluyla oksaliplatine direncin indüklenmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Mao ve ark. 2017). EMT yoluyla direnç gelişimi görülen meme kanseri hücrelerine uygulanan kemoterapi tedavisine bir kalsiyum kanal bloklayıcısı olan verapamil dahil edildiğinde tedavinin etkinliğinde artış olduğu belirlenmiştir (Correia ve ark. 2018).

2.6. Kolorektal Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

2.6.1. Cerrahi Tedavi

Metastaz yapmamış kolorektal kanserli hastalar için temel iyileştirici tedavi cerrahidir. Operasyon öncesi kanser evresinin ve tedavi bölgesinin belirlenmesi önemli olduğu gibi, uygulanan cerrahi müdahalenin kalitesi de tedavinin başarılı olmasında etkilidir. İleri evre rektal kanser vakalarında, neoadjuvan tedavi tümör yükünü ve hatta tümör evresini azaltabilmektedir. Bu nedenle tedavi öncesinde kanserin evresi hakkında yeterli bilgiye sahip olmak gerekmektedir (van de Velde ve ark. 2014).

2.6.2. Kemoterapi Tedavisi

KRK için kemoterapi, genel olarak neoadjuvan tedavi, adjuvan tedavi ve palyatif tedavi olarak sınıflandırmaktadır. Neoadjuvan tedavi, kanserin asıl tedavisi (cerrahi veya radyoterapi) öncesi uygulanan kemoterapi yöntemidir. Adjuvan tedavi, cerrahi veya radyoterapi tedavisi sonrasında hastalığın tekrarlamasını önlemek veya azaltmak amacıyla uygulanan kemoterapi yöntemidir. Palyatif tedavi, hastalığın tümüyle tedavisinin mümkün olmadığı durumlarda hastalığı yavaşlatmak veya hastalığa bağlı şikayetleri azaltmak amacıyla uygulanan kemoterapi yöntemidir (Song ve ark. 2017).

2.6.2.1. Neoadjuvan Tedavi

Neoadjuvan kemoterapi, tümörün evresini aşağı çekerek cerrahi sonuçların iyileştirilmesinde etkilidir. Bununla birlikte, sistemik metastatik yayılımın erken teşhisine ve tümör biyolojisinin test edilmesine imkân tanımaktadır. Ayrıca, kemoterapi duyarlılığının ve klinik deneylere potansiyel olarak dahil edilen yeni ajanların *in vivo* ortam koşullarında testlerinin yapılmasına olanak sağlamaktadır (Cheong ve ark. 2020).

Neoadjuvan tedavi, kısa süreli radyoterapi sonrası cerrahi tedavi veya 5-fluorourasil veya kapesitabin (oral yolla) ile kemoradyoterapi tedavisi uygulanabilmektedir. Preoperatif (operasyon öncesi) neoadjuvan tedavi, kanserin bölgesel (lokal) tekrarını azaltmada postoperatif tedaviden daha etkili olmasına rağmen, genel sağkalımda artış görülmemektedir. Kemoradyoterapi ve uygulanan ilaç tedavisinin arttırılması yoluyla neoadjuvan tedaviyi iyileştirmeyi amaçlayan stratejiler sağkalımda önemli bir artış göstermemiştir (Glimelius ve ark. 2013).

2.6.2.2. Adjuvan Tedavi

Postoperatif (operasyon sonrası) adjuvan tedavi, R0 rezeksiyon (parça alımı) uygulanan hastalarda kanserin tekrarlamasını önlemek ve prognozu iyileştirmek için ameliyattan sonra uygulanan sistemik kemoterapi yöntemidir. Adjuvan tedavide uygulanan floropirimidin bazlı kemoterapi, rezeke edilmiş evre III'te ve yüksek riskli evre II kolon kanserlerinin bir alt kümesinde sağkalımı artırmaktadır (Enofe ve ark. 2020; Ishiguro ve ark. 2018). Birçok önemli çalışmada, floropirimidinler (fluorourasil veya kapesitabin) ile oksaliplatinin birlikte uygulanması yeni bir standart olarak kabul görmektedir (Shinji ve ark. 2022). Tedavi sürecinde 6 ay boyunca adjuvan kemoterapi uygulanması, yıllardır kabul görmektedir. Son yapılan faz 3 klinik çalışmaları, adjuvan

kemoterapiyi 3 ay ile sınırlandırmanın, düşük riskli evre III kolon kanserlerinde tedavi etkinliğini bozmadan toksisiteyi azaltabileceğini göstermiştir (Grothey ve ark. 2018).

2.6.2.3. Palyatif Tedavi

Palyatif kemoterapi, hastalık kontrolünü artırmak için tedavinin mümkün olmadığı koşullarda uygulanan kemoterapi yöntemidir. Palyatif tedavide hastaların yaşam kalitelerini arttırmak amaçlanmaktadır. Bu kemoterapi yöntemi, yaşam kalitesini iyileştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Maree ve Potgieter 2018).

2.6.3. Radyoterapi Tedavisi

Radyoterapi, lokal olarak ilerlemiş rektal kanserli hastaların tedavisinde, kanserin tekrarlamasını önlemek amacıyla ameliyattan sonra adjuvan tedavi olarak uygulanmaktadır. Bunun yanında, tümör hacmini azaltmak ve anal sfinkteri korumak için ameliyattan önce de adjuvan tedavi olarak uygulanabilmektedir. Ayrıca semptomatik lezyonları olan, rezeke edilemeyen kolorektal kanserli hastaların semptomlarını hafifletmek ve yaşam sürelerini uzatmak için palyatif tedavide de radyoterapiden yararlanılmaktadır (Hashiguchi ve ark. 2020).

2.6.4. Yeni Nesil Tedaviler

2.6.4.1. Kök hücre Tedavisi

Kök hücre tedavisi, lösemi ve lenfoma gibi kanser türlerini tedavi etmek için uygulanmaktadır. Bu tedavi yöntemi, yüksek dozda kemoterapi veya radyasyon tedavisi nedeniyle kan yapıcı kök hücreleri tahrip olmuş kişilerde bu hücreleri eski haline getirmek amacıyla uygulanmaktadır. Kök hücre tedavisi, genellikle doğrudan kansere karşı koymaz. Bunun yerine, çok yüksek dozlarda radyasyon tedavisi, kemoterapi veya her ikisi ile gerçekleştirilen tedavinin ardından, vücuttaki kök hücre üretme yeteneğinin geri kazanılmasına yardımcı olmaktadır. Kök hücre tedavisi, çoğunlukla lösemi ve lenfoma hastalarına uygulanmakla birlikte, nöroblastom ve multipl miyelom için de kullanılabilmektedir (Nassar ve Blanpain 2016).

2.6.4.2. Hormon Tedavisi

Hormon tedavisi, büyümek için hormon kullanan kanser terlerinin büyümesini yavaşlatan veya durduran bir yöntemdir. Prostat ve meme kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Hormon tedavisi çoğunlukla diğer kanser tedavileriyle birlikte uygulanmaktadır. Tedavinin şekli, kanserin türü, yayılıp yayılmadığı, yayılma uzaklığı,

büyümek için hormon kullanıp kullanmadığı ve başka sağlık sorunları olup olmadığı incelenerek belirlenmektedir (Deli ve ark. 2020).

2.6.4.3. İmmünoterapi

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan bir tedavi yöntemidir. Kanser tedavisinde kullanılan immünoterapi çeşitleri arasında bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, T hücre transfer tedavisi, monoklonal antikorlar, tedavi aşıları, bağışıklık sistemi modülatörleri yer almaktadır. İmmünoterapi ilaçları birçok kanserin tedavisi için onaylanmıştır. Bununla birlikte, immünoterapi henüz cerrahi, kemoterapi veya radyasyon tedavisi kadar yaygın olarak kullanılmamaktadır (O'Donnell ve ark. 2019).

2.7. Kolorektal Kanser Tedavisinde Çoklu İlaç Direnci

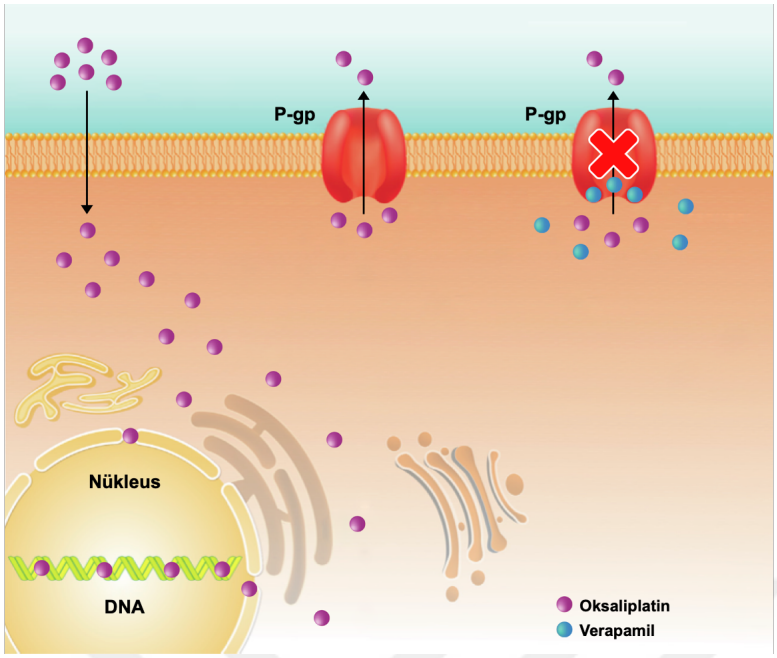
1950'lerden bugüne, 5-FU kullanılarak gerçekleştirilen kemoterapi tedavisi, KRK hastalarına uygulanan tedavinin temelini oluşturmaktadır. Devam eden süreçte oksaliplatin, irinotekan ve kapesitabin gibi kemoterapi ilaçları geliştirilmiştir. İleri seviye KRK hastalarının tedavisinde 5-FU, lökovorin ve oksaliplatin ile birlikte veya irinotekan ile birlikte hastalara uygulanmıştır. Bevacizumab ve Cetuximab gibi monoklonal antikorların kemoterapi ile birleştirilerek hastalara uygulanmasıyla KRK tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da mKRK hastalarının sağ kalım sürelerinde sadece %12'lik bir artış sağlamıştır. Bunun yanında, uygulanan tedavi neticesinde ilaç direnci ortaya çıkmaktadır. mKRK hastalarının yaklaşık %50'sinde 5-FU ile uygulanan kemoterapi tedavisine karşı direnç görülmektedir (van der Jeught ve ark. 2018).

İlaç direnci gelişimi kanser tedavisinin önündeki en büyük engellerden biri olarak kabul edilmektedir. KRK tedavisinde de ileri evredeki hastaların ilaca karşı direnç kazandığı belirlenmiştir (Beklen ve ark. 2020). Antikanser ilaçlarına karşı ilaç direnci oluşumuna, bazı membran ilaç taşıyıcı proteinlerin ekspresyonunda ve aktivitelerinde meydana gelen artış neden olmaktadır. Çoklu ilaç direnci (MDR) ile ilişkili proteinlerin, antikanser ilaçlarının hücre dışına atılmasına aracılık ederek ilaç direncini arttırdığı belirlenmiştir (van den Kerkhof ve ark. 2020). ABCB1 geni tarafından ifade edilen P-gp (MDR1 olarak da bilinir), membran taşıyıcı proteinlerinin iyi bilinenlerindendir. MDR1 proteininin ekspresyonu halinde, ilaç moleküllerinin kanser hücresi dışına akışı gerçekleşir ve kemoterapi başarısız olur. Yapılan in vitro deneylerde MDR1'in ilaç

konsantrasyonunu düşürerek ilaç direncine neden olduğu bulunmuştur (Kolesnikova ve ark. 2019). Ayrıca, karaciğer, böbrek, kolon gibi birçok kanser türünde yüksek seviyede MDR1 protein ifadesi belirlenmiştir (Liang C ve ark. 2019; Wang Z ve ark. 2022).

2.8. Direnç İnhibitörleri

İlaç direncinde hücre zarında bulunan önemli bir protein olan ve çok çeşitli maddeleri hücrelerden dışarı pompalayan P-gp'nin aşırı ekspresyonunun MDR'nin ana nedeni olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, güçlü P-gp inhibitörleri genellikle MDR'yi tersine çevirmek için etkili bir strateji olarak kabul edilir (Correia ve ark. 2018; Yang T ve ark. 2020). Bir kalsiyum kanal bloklayıcısı olan verapamil, P-gp aracılı MDR gelişiminin inhibe edilmesinde rol oynamaktadır (Şekil 2-7). Verapamilin mKRK de dahil olmak üzere birçok klinik çalışmada anti-tümör etkinliğini arttırdığı doğrulanmıştır (Wang H ve ark. 2013). Verapamil, kalsiyum iyonlarının transmembran akışını inhibe ederek, kardiyak aritmiler, anjina ve kardiyomiyopatileri tedavi etmek için klinikte kullanılmaktadır (Correia ve ark. 2018). İyon kanalları, uyarılabilir olma özelliklerinin yanında, aynı zamanda çeşitli mekanizmalarla kanser patofizyolojisinde kritik roller oynamaktadır. Ayrıca, temel hayatta kalma sinyal yolaklarını ve zar potansiyelini düzenleyerek kanser hücre proliferasyonunu kontrol edebilmektedir (Kale ve ark. 2015). Verapamil ve kemoterapi ilaçları birlikte kullanıldığında, akciğer kanseri, kolorektal karsinoma, lösemi ve nöroblastoma hücre hatlarında hücre içi ilaç birikiminde artış olduğu gösterilmiştir (Zhao L ve ark. 2016).



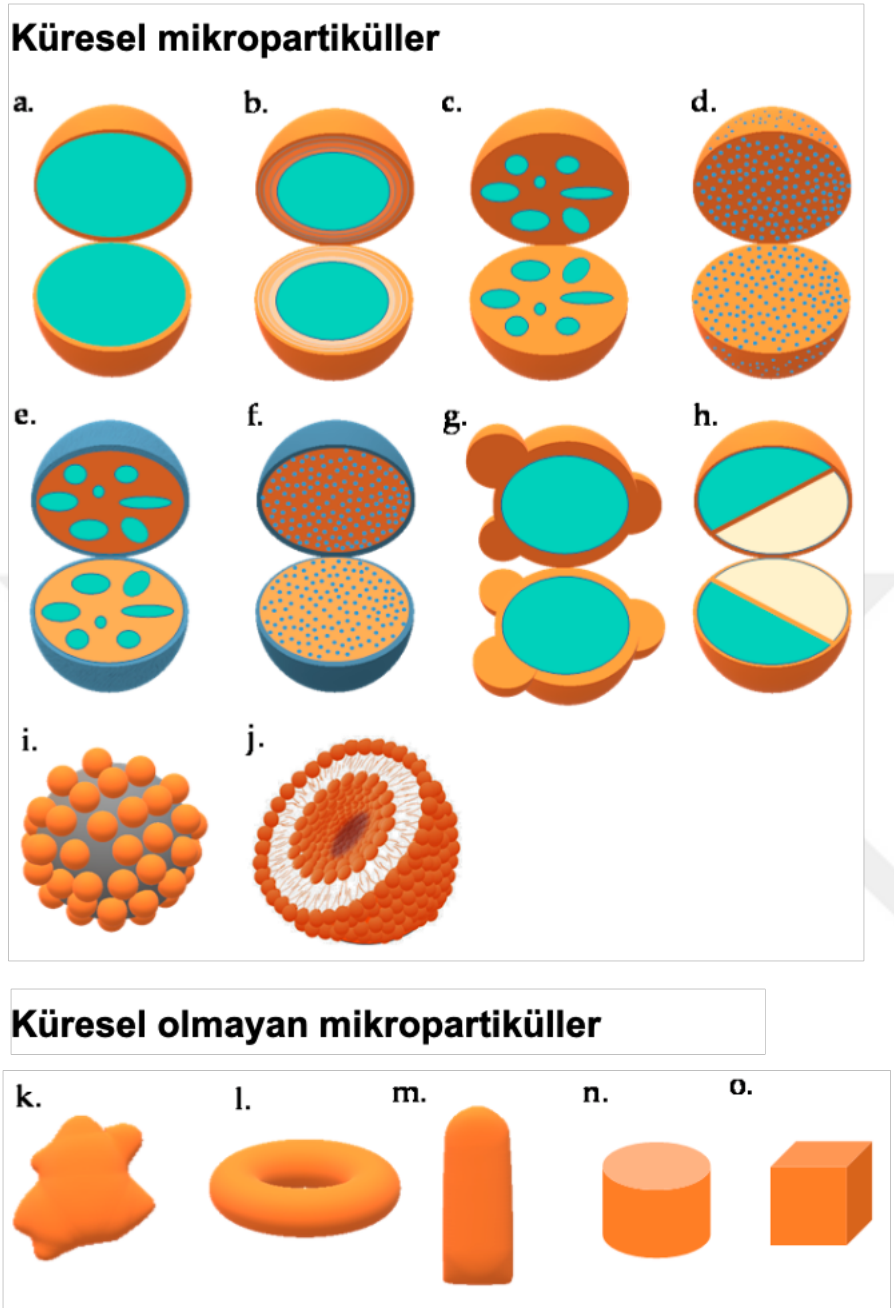
Şekil 2-7: Verapamilin P-gp inhibisyonunun şematik gösterimi – Mirzaei (2022)'den değiştirilerek

2.9. İlaç Taşıma Sistemleri

İlaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği, terapi ve hatta teşhis ve görüntülemede uygulamaları olan mikro ve nano malzemelerden oluşmaktadır (Rezvantalab ve Moraveji 2019).

2.9.1. Mikropartiküller

Mikropartiküller (MP) boyutları 1-1000 µm arasında olan ilaç taşıma sistemleridir. Yapılarına ve şekillerine bağlı olarak farklı işlevler gösterebilirler. Çok partiküllü ilaç taşıma sistemleri (mikrotanecikler, mikrogranüller, mikroküreler, mikrokapsüller, mikrosüngerler vb.), teknolojik özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Mikropartiküller, formülasyona ve üretim şekline bağlı olarak homojen veya heterojen bir yapıda elde edilebilirler. Daha sonraki süreçteki işlemleri kolaylaştırdığı için (ör. kaplama) genellikle küresel şekil tercih edilmektedir (Şekil 2-8) (Lengyel ve ark. 2019).



Şekil 2-8: Farklı mikro parçacık yapılarının şematik gösterimi - Lengyel (2019)'dan değiştirilerek

(a) mononükleer/tek çekirdek/çekirdek-kabuk, (b) çok duvarlı, (c) polinükleer/çoklu çekirdek, (d) matris, (e) kaplanmış polinükleer çekirdek, (f) kaplanmış matris partikülü, (g) yamalı mikropartikül, (h) çift bölmeli mikrokapsül, (i) kolloidozom, (j) dev lipozom, (k) düzensiz şekilli mikroparçacık, (l) torus şeklindeki mikroparçacık, (m) mermi şeklindeki mikroparçacık, (n) mikrotablet ve (o) kübik şekilli mikroparçacık.

2.9.2. Nanopartiküller

Bugüne kadar, lipozomlar, miseller ve dendrimerler gibi ilaçların doğrudan salımına izin veren çeşitli nano boyutta ilaç taşıma sistemleri kullanılmıştır (Alkahtani ve

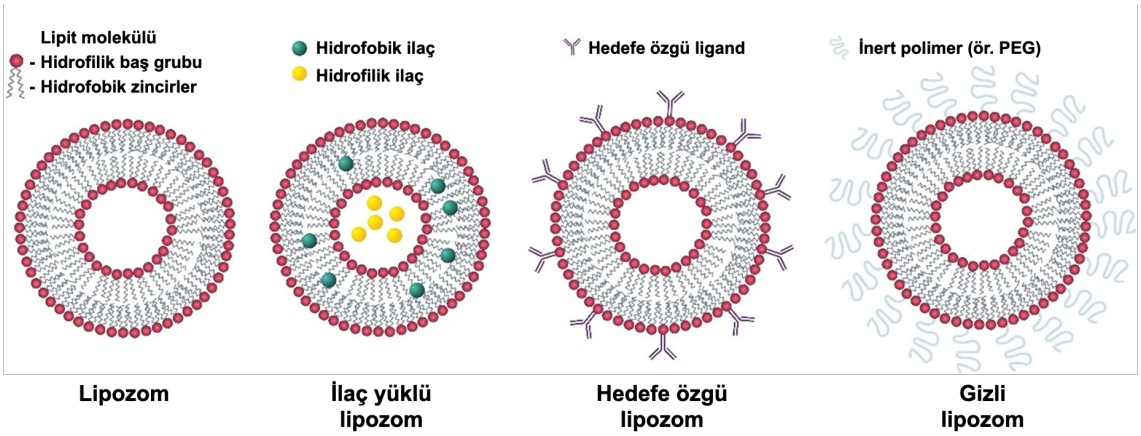
ark. 2021). Bu nanopartiküller, etraflarındaki sağlıklı dokulara minimum toksisite ile hedefe yönelik ayarlanabilir ilaç salım yetenekleri sayesinde, ilaç salım profillerini ilacın biyouygulanabilirliğini geliştirmek amacıyla düzenleyebilirler (Risnayanti ve ark. 2018).

2.9.3. Kanser Kemoterapisinde Kullanılan Nanoilaç Taşıyıcılar

2.9.3.1. Lipozomlar

Lipozomlar, endüstriyel üretimde büyük umutları olan, yüksek enkapsülasyon etkinliğine, hedefleme yeteneğine ve düşük toksisiteye sahip, fosfolipidler ve kolesterolden oluşan iki katmanlı veziküllerdir. Antijenler ve adjuvanlar (ilaç etkinliğini arttırıcılar) gibi immünoterapi ajanları, hidrofobik çekirdek içinde kapsüllenebilir veya lipid yüzeyinde adsorbe edilebilirler. Bunu, ajanlar ve lipit arasındaki yük etkileşimleri yoluyla veya lipit çift tabakasındaki kimyasal bir bağlayıcı yardımıyla gerçekleştirirler (Pattni ve ark. 2015). Ayrıca, küçük moleküllü hidrofilik kemoterapötik ajanlar, hidrofobik ajanların lipit çift katmanları halinde kapsüllenebildiği içi sulu çekirdeklere yüklenebilirler (Şekil 2-9) (Gu ve ark. 2018).

Çok sayıda onaylanan lipozomal ürün olması nedeniyle, lipozomlar kanser tedavisinde etkili bir şekilde uygulanmıştır. Ayrıca, lipozom ürünleri, kemoterapide en fazla etkinin belirlendiği araçlar olmaları nedeniyle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır (Liu Y ve ark. 2019a).

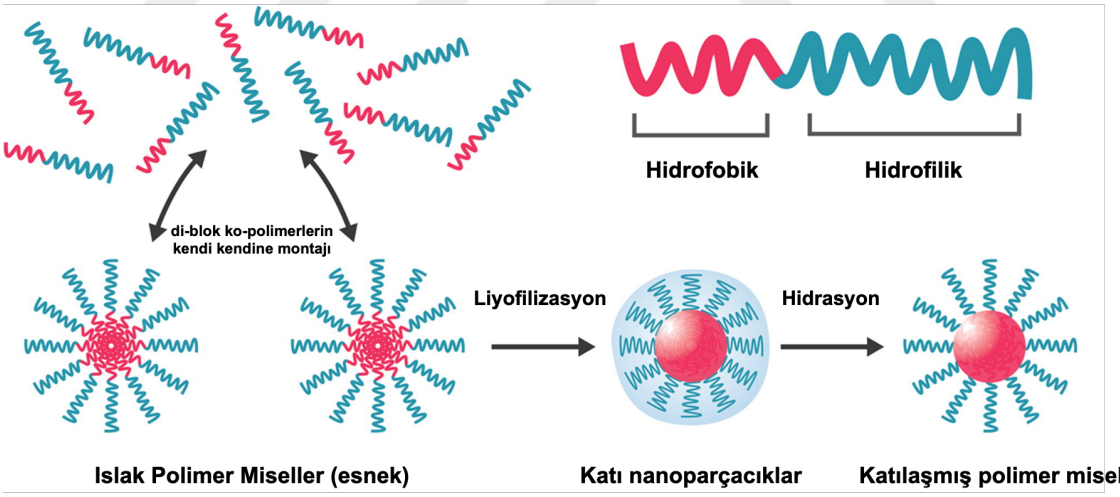


Şekil 2-9: Lipozomun şematik gösterimi - Tenchov (2021)'den değiştirilerek

2.9.3.2. Polimer Miseller

Polimer miselleri, amfifilik blok kopolimerlerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşur. Termodinamik olarak kararlı kolloidal çözeltilerdir. Hidrofobik küçük moleküllü ilaçlar, misellerin hidrofobik çekirdeğine enkapsülle edilebilirken hidrofilik ilaçlar, fiziksel etkileşimler veya kimyasal konjugasyon yoluyla misellere yüklenebilmektedir (Şekil 2-10). Polimer miseller, kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Ayrıca, hidrofilik veya hidrofobik ilaçları verimli bir şekilde paketleyebilen ve onları *in vitro* ve *in vivo* bozunmadan koruyabilen polimerik malzemelerin yüzeylerinde yapılacak değişikliklerle çok işlevli polimer miseller elde edilebilir (Mu ve ark. 2020).

FDA onaylı polimer malzemeler olan PLGA ve polilaktik asit (PLA), biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu özelliklere sahip olmaları nedeniyle, PLGA/PLA ile hazırlanan polimer miseller, kemoterapide ilaç taşıyıcıları olarak kullanılmıştır (Perinelli ve ark. 2019).

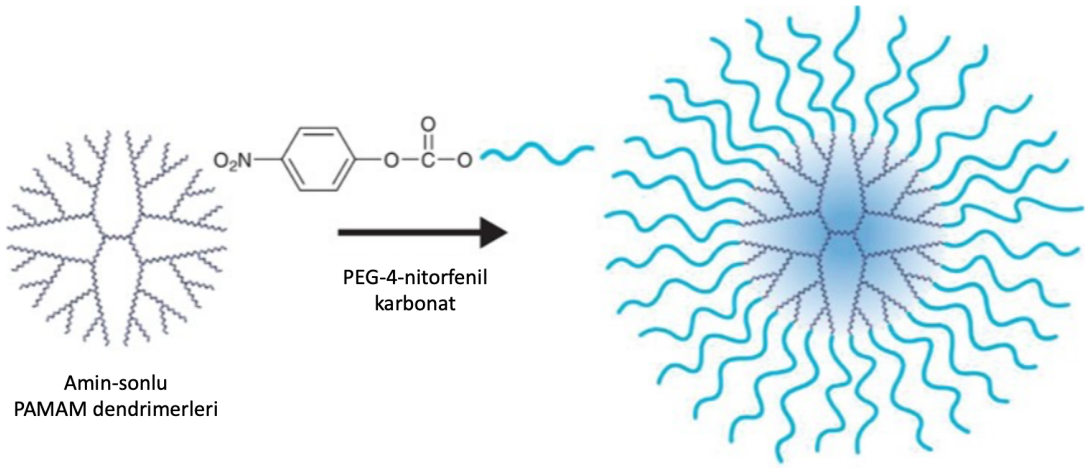


Şekil 2-10: Esnekliği ayarlanabilen polimer miseller – Stern (2017)'den değiştirilerek

2.9.3.3. Dendrimerler

Dendrimerler, hidrofobik bir çekirdek, dallanmış monomer ve işlevsel çevresel gruplardan oluşan oldukça düzenli küresel polimerlerdir (Şekil 2-11) (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde 2015). Dendrimerlerin berrak yapısı ve çoklu işlevselliği gibi benzersiz yapısal özellikleri, dendrimerlere olan bilimsel ilgiyi arttırmış ve bunun

sonucunca çok sayıda yeni dendrimer bazlı nanopartikül tasarlanmıştır (Hsu ve ark. 2017; Li HJ ve ark., 2016; Yang J ve ark. 2015). Hidrofobik çekirdek, küçük moleküler ilaçlarla yüklenebilir ve fonksiyonel grup immünoterapi ajanlarını kimyasal olarak bağlayabilir. Poliamidoamin (PAMAM), polipropilenimin (PEI) ve peptit dendrimerler günümüzde en yaygın kullanılan dendrimerlerdir. Kanser immünoterapisi için klinik denemeleri devam eden dendrimerler, kemoterapi uygulamaları için büyük beklenti oluşturmaktadır (Mu ve ark. 2020). Kemoterapide ilaç etkinliğinin arttırılması için yeni dendrimer bazlı NP'ler kullanılmaktadır (Lang ve ark. 2019).



Şekil 2-11: Poli(etilen glikol) (PEG)-düzenlenmiş poli(amidoamin) (PAMAM) dendrimerlerin sentezi – Kono (2012)'den değiştirilerek

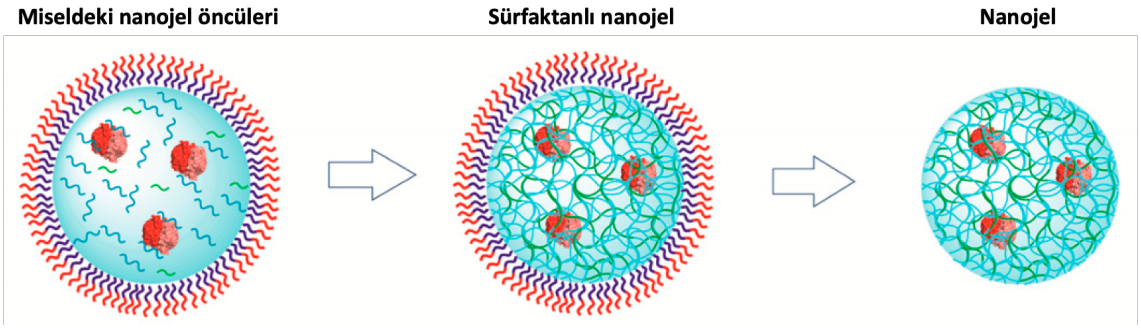
2.9.3.4. Metalik ve İnorganik NP'ler

Metalik ve inorganik NP'ler, ilaç taşıyıcıları olarak, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, işlevselleştirme esnekliği ve bağışık yanıt oluşturmaması gibi olumlu avantajlara sahiptir. Bu zamana kadar grafen oksit bazlı NP'ler (GO NP'ler), gözenekli silika NP'ler (MSN NP'ler), siyah fosfor (BP) NP'ler, altın NP'ler (AuNP'ler), bakır türevi NP'ler (Cu NPs) dahil olmak üzere çok sayıda metalik ve inorganik NP araştırılmıştır (Şekil 2-12) (Liang X ve ark. 2019; Mu ve ark. 2020; Ou ve ark. 2018). Metalik malzemeden türetilen NP'ler genellikle fototermal terapi (PTT) ve fotodinamik terapi (PDT) etkileri nedeniyle kanser immünoterapisi için büyük potansiyele sahiptir (Chen L ve ark. 2019b).

Şekil 2-12: Metalik ve inorganik nanoparçacıklar – Gholizadeh (2022)'den değiştirilerek

2.9.3.5. Nanojeller

Nanojeller, sahip oldukları nano boyutlu hidrojel yapı iskelesi, iyi biyouyumlulukları, yüksek su içerikleri ve çeşitli terapötik ajanlarla iyi uyum sağlamaları nedeniyle, kemoterapi için umut verici nano ilaç taşıyıcı sistemler olarak kabul edilmiştir (Şekil 2-13). Çok işlevli nanojeller, ligandlar yardımıyla özgünleştirilebilir ve kemoterapiye uygun olarak tasarlanabilirler (Dong ve ark. 2020; Mu ve ark. 2020; Qiao ve ark. 2019; Wu ve ark. 2017). Ayrıca, bağışıklığı uyarma yeteneğine sahip özel hidrojel sistemleri de geliştirilebilir (Jin ve ark. 2018).



Şekil 2-13: Nanojel üretiminin şematik gösterimi – Mauri (2021)'den değiştirilerek

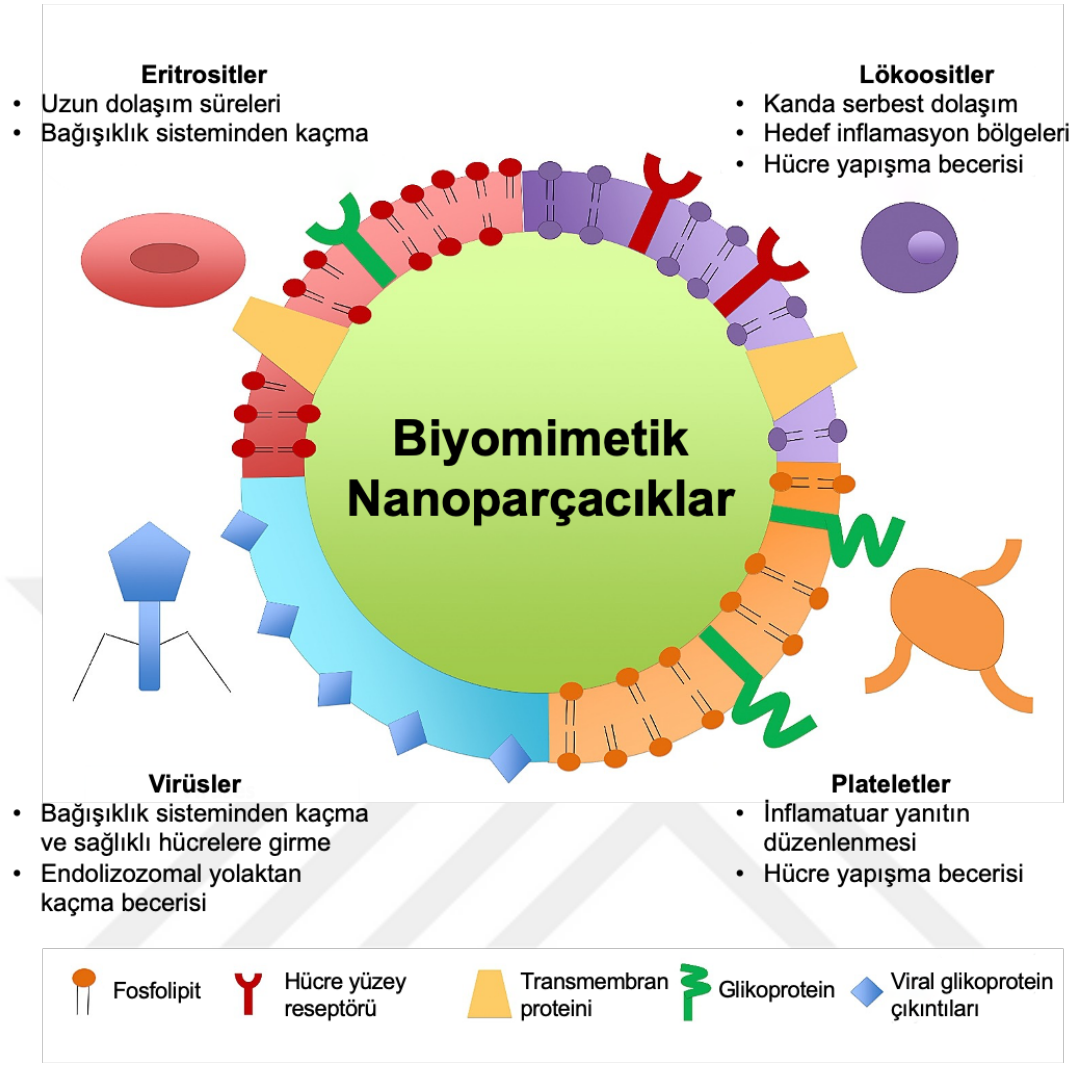
2.9.3.6. Biyomimetik NP'ler

Biyomimetik NP'ler, bağışıklık sisteminden kaçmak için NP'leri otolog bileşenler olarak gizleyebilen biyouyumluluk malzemelerinin kaplanması veya karıştırılması yoluyla doğal organizmaları/yapıları taklit edecek şekilde tasarlanmıştır (Şekil 2-14). Biyomimetik NP'ler, ilaçları hedeflenen hücrelere veya dokulara iletmek için gelişmiş hedefleme kabiliyetine, iyi biyouyumluluğa, geliştirilmiş tedavi verimliliğine ve

azaltılmış yan etkilere sahip doğal yapıların (kırmızı kan hücreleri, eksozomlar gibi) morfolojisine, yüzey özelliklerine ve boyutuna sahiptir (Mu ve ark. 2020).

Kemoterapi için biyomimetik NP'lere uygulanmış proteinler arasında albümin (Zhao P ve ark. 2018), yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) (Kadiyala ve ark. 2019), düşük yoğunluklu lipoproteinler (SDL), transferrin ailesi proteinleri ve bunlardan türetilmiş proteinler yer almaktadır (Wang H ve ark. 2019).

Hücre zarı biyomimetik NP'leri, esas olarak hücre zarını kaplayan fonksiyonel NP'lerden oluşur. Farklı hücrelerden türetilen hücre zar proteinleri biyoaktifliklerini korurlar. Bu nedenle, bağışıklık sisteminden kaçabilme, kan dolaşımında uzun süre kalabilme ve tümör hedefleme yeteneklerine sahiptirler (Vijayan ve ark. 2018; Wang H ve ark. 2020). Biyomimetik NP'leri çevreleyen zarları esas olarak eritrositleri, lökositleri, trombositleri, nötrofilleri, makrofajları, T lenfositlerini içerirler (Dehaini ve ark. 2016; Fang ve ark. 2018; Liu Y ve ark. 2019b). Biyomimetik NP'lerin farklı zar yapıları, kanser tedavisinde farklı işlevlere sahip olabilmesine olanak sağlamaktadır. Eritrosit zar biyomimetik NP'leri, biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu arttırabilir ve kan dolaşımının süresini uzatabilir (Song ve ark. 2017). Lenfosit zar biyomimetik NP'leri, tümör bölgelerine göç etme ve vücuttaki dolaşım süresini uzatma becerisine sahiptirler (Du W ve ark. 2020).

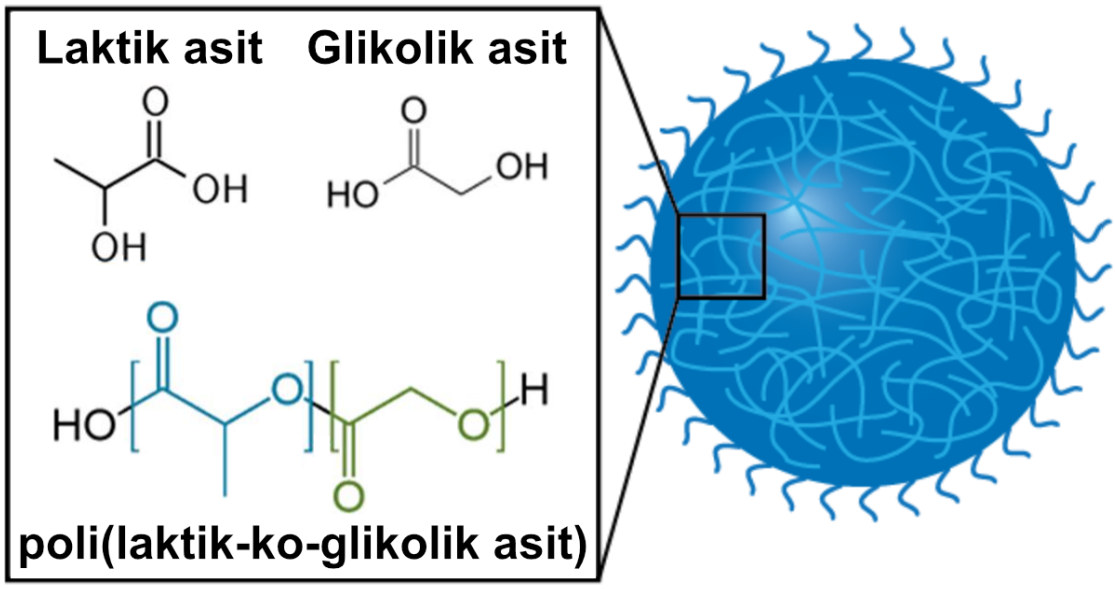


Şekil 2-14: Biyomimetik nanopartiküller - Parodi (2017)'den değiştirilerek

2.9.4. PLGA

Çok sayıda biyobozunur polimer arasından en iyi bilinen biyobozunur ve biyouyumlu bir kopolimer olan poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), FDA onaylı olduğu için, ilaç taşıma sistemi olarak klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Rezvantalab ve Moraveji 2019). PLGA, sahip olduğu bozunma özelliği nedeniyle, hidrofilik veya hidrofobik ilaçların sürekli salımı için idealdir. Ayrıca, hedefe yönelik özgün moleküllerle kolayca konjuge olabilir ve yüzey özelliklerini değiştirerek, spesifik dokulara veya hücrelere ulaşmak için etkileşimler geliştirme potansiyeline sahiptir (Alkahtani ve ark. 2021). PLGA, laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) monomerlerinin kopolimerizasyonundan oluşur (Şekil 2-15). LA ve GA monomerleri arasındaki oranı değiştirerek farklı uygulamalarda kullanılmak üzere yeniden düzenlenebilir. Bu nedenle,

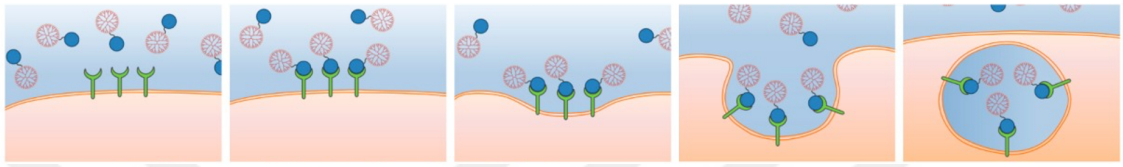
PLGA, kemoterapi ilaçlarının, antiseptik, antiinflamatuar ve antioksidan ilaçların ve proteinlerin taşınmasında ilaç taşıma sistemi olarak tercih edilmektedir (Rezvantalab ve Moraveji 2019).



Şekil 2-15: Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve onu oluşturan laktik asit ve glikolik asit monomerleri - Sampath (2016)'dan değiştirilerek

PLGA'nın bozunma süresi birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilmektedir. PLGA kullanılarak üretilen nanopartiküller (NP), sıvı fazda pinositoz yoluyla ve sitoplazmada küçük vezilküller oluşmasını kolaylaştıran klatrin-aracılı endositoz yoluyla hücrelere girerler (Şekil 2-16). Pinositoz, fagositoz sırasında üretilenden daha küçük boyutlu veziküller tarafından çözünen maddeleri ve parçacıkları içeren sıvıların hücre içerisine alınmasını ifade etmektedir (Manzanares ve Ceña 2020). Fagositoz, maddelerin hücre plazma zarından mikrometre boyutunda veziküller yardımıyla alınması olayıdır ve nanopartiküllerin hücre içine alınmasında nadiren gözlenir (Doherty ve McMahon 2009). Pinositoz mekanizması, makropinositoz veya reseptör aracılı endositoz (RME) olarak sınıflandırılmaktadır. Makropinositoz, makropinozom adı verilen, farklı boyutlardaki büyük vakuoller (kofullar) yoluyla madde alımına izin verir (Mercer ve Helenius 2012). Reseptör aracılı endositoz, NP'lerin hücre içine ulaşmak için en sık izlediği yoldur. NP'e bağlı bir ligandın özgün bir reseptöre bağlanmasıyla, konformasyonel değişiklik tetiklenir ve erken endozom ile plazma zarında kesecik oluşumu gerçekleşir (Şekil 2-16). Klatrin

aracılı endositoz (CME), klatrinin yoğun olduğu özelleşmiş plazma zarı bölgelerinde endositik klatrin kaplı veziküllerin oluşumu ile gerçekleşir. Veziküllerin boyutu hücre türüne bağlı olarak 70-150 nm aralığında değişmektedir (McMahon ve Boucrot 2011). Daha sonra vezikül hücre içine alınırken klatrin üzerindeki katman kaybolarak diğer veziküllerle birleşir ve erken bir endozom oluşturur. Bu da bir lizozomla birleşerek geç bir endozoma dönüşür (Popova ve ark. 2013).



Şekil 2-16: Reseptör aracılı endositoz – Manzanares ve Cena (2020)'den değiştirilerek

NP (mavi) yüzeyindeki bir ligand ile bir reseptörün (yeşil) özgün etkileşimi, hücre zarı üzerinde kesecik oluşumunu tetikler ve endozom oluşumuna yol açar.

PLGA-NP'leri, endolizozomlardan hızla kaçarak sitoplazmaya ulaşırlar. Bu durum, PLGA-NP'lerinin veziküler membranlarla etkileşimlerini kolaylaştırır ve membranın geçici süre bozulmasına yol açarak PLGA-NP'lerinin sitozole kaçmasına neden olur (Gong ve ark. 2020).

2.10. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

NP'lerin uygulama alanları, sahip oldukları fizikokimyasal özelliklerine göre belirlenmektedir. NP'lerin bu özelliklerinin analizi ve karakterizasyonu için farklı yöntem ve teknikler kullanılmaktadır (Joudeh ve Linke 2022).

2.10.1. Morfolojik ve Topografik Özelliklerine Göre NP'lerin Karakterizasyonu

NP'lerin, fizikokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için, morfolojik ve topografik özellikleri incelenmektedir. Bu özellikler, NP'lerin boyutunun, şeklinin, dağılımının, konumunun, toplanmasının, yüzey morfolojisinin, yüzey alanının ve gözenek boyutunun belirlenmesini sağlamaktadır (Tablo 2-3) (Joudeh ve Linke 2022).

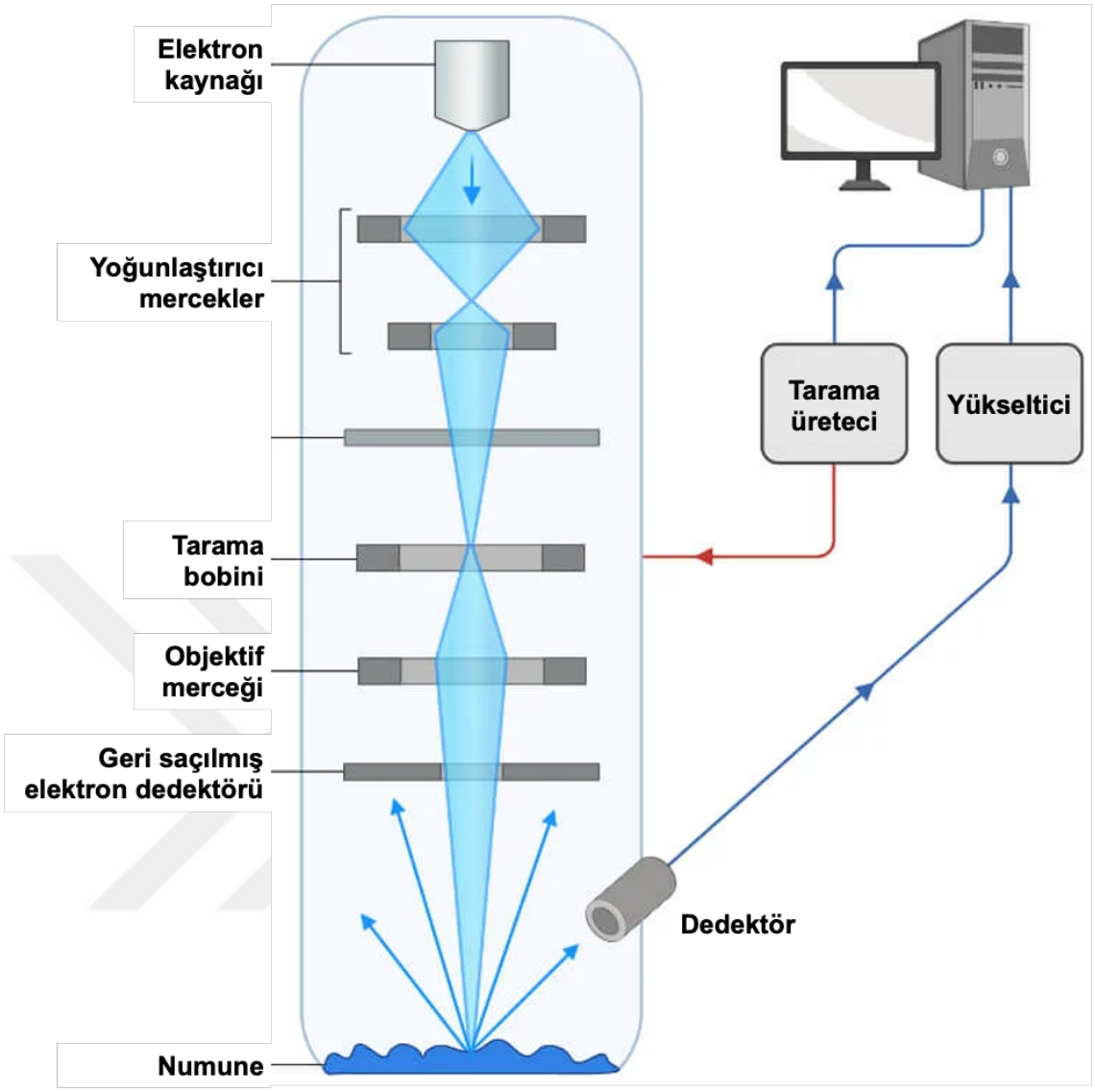
Tablo 2-3: Morfolojik ve topografik özelliklerine göre NP'lerin yaygın olarak kullanılan karakterizasyon yöntemleri – Joudeh ve Linke (2022)'den değiştirilerek

Yöntem	Boyut	Şekil	Dağılım	Konum	Toplanma	Yüzey morfolojisi	Yüzey alanı	Gözenek boyutu
TEM	+	+	+	+	+			
SEM	+	+	+		+			
STM						+		
DLS	+		+					

TEM: transmisyon elektron mikroskobu , SEM: taramalı elektron mikroskobu, STM: taramalı tünelleme mikroskobu, DLS: dinamik ışık saçılımı.

2.10.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

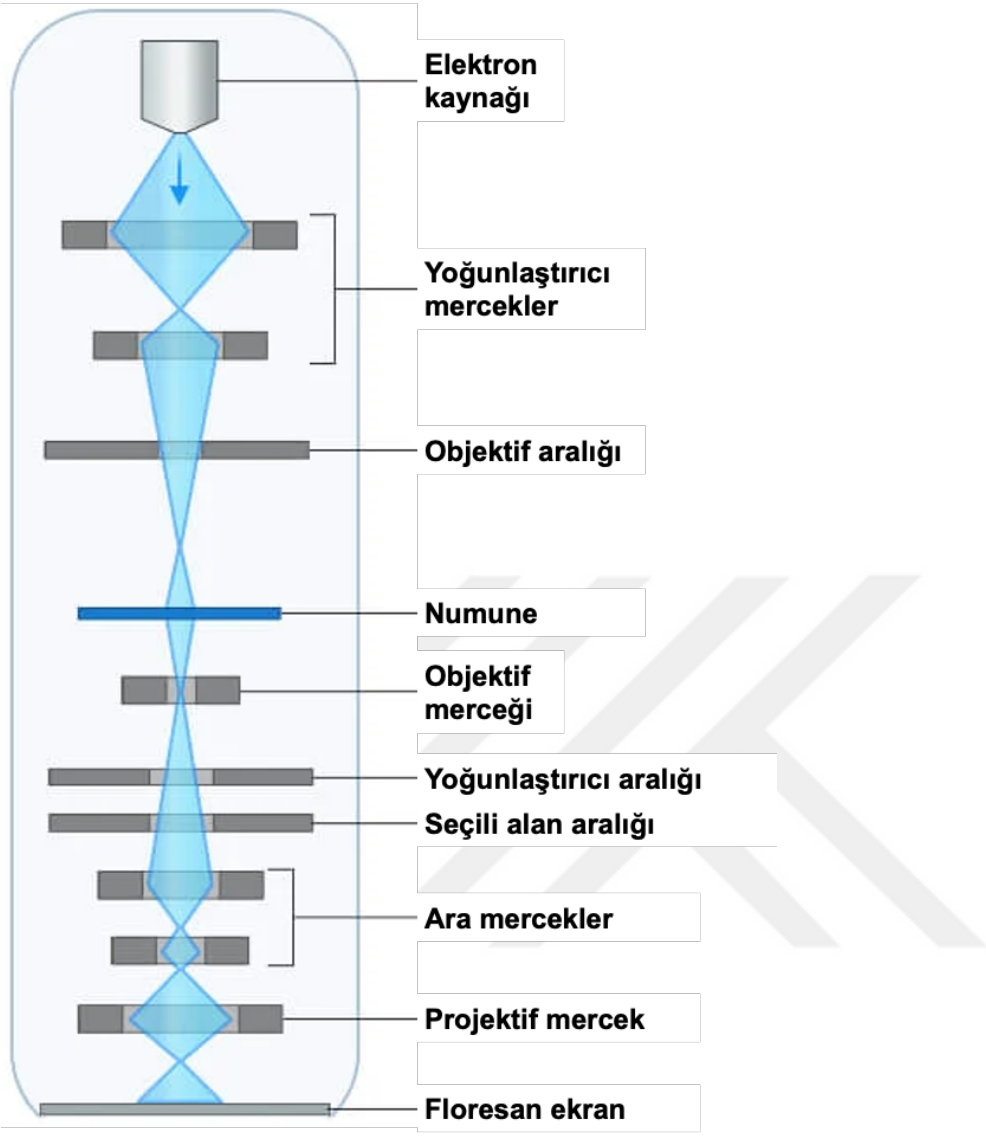
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), NP'lerin boyut, şekil, toplanma ve dağılım özellikleri hakkında bilgi vermektedir (Şekil 2-17). SEM'de, bir elektron tabancası kullanılarak bir elektron demeti üretilmektedir. Bu elektron demeti, bir dizi mercek tarafından kontrol edilerek dikey bir yol izler. Numuneye ışın çarptığında elektronların ve X-ışınlarının numunenin dışına atılmasıyla numunenin 3 boyutlu görüntüsü oluşturulur (Vladár ve Hodoroaba, 2019).



Şekil 2-17: Taramalı elektron mikroskobunun şematik gösterimi - Alqaheem ve Alomair (2020)'den değiştirilerek

2.10.1.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM), NP'lerin boyutu, şekli, lokalizasyonu, dağılımı ve toplanması hakkında iki boyutlu görüntülerle bilgi vermektedir (Şekil 2-18). TEM'de, incecik bir elektron demetini numunenin ultra ince bir bölümüne odaklayan elektromanyetik bir lens kullanılır. Bu ışın, elektronlar saçılarak veya nüfuz ederek numuneden geçer ve mikroskobun altındaki bir floresan ekrana çarpar. Elektron yoğunluklarındaki farktan yararlanılarak, numunenin görüntüsünde kontrast oluşturulur. TEM, elektron demetinin numunede seçilen bir alana odaklanmasıyla, NP kristal yapısının karakterizasyonu için de kullanılabilmektedir (Kano ve ark. 2015).

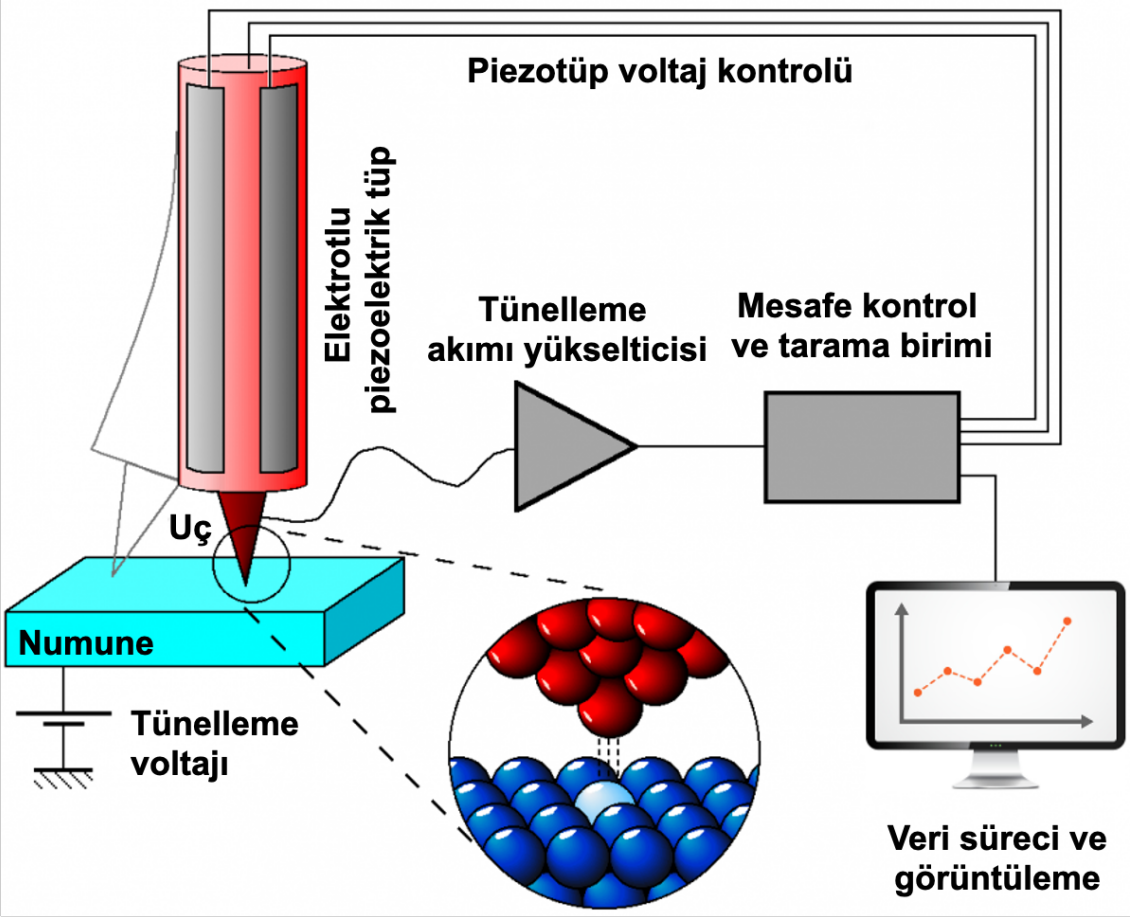


Şekil 2-18: Transmisyon elektron mikroskobunun şematik gösterimi - Alqaheem ve Alomair (2020)'den değiştirilerek

2.10.1.3. Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM)

Taramalı tünelleme mikroskobu (STM) kuantum tünelleme olgusuna dayanmaktadır. STM'de, voltaj uygulamak amacıyla, metalik bir uç numune yüzeyine çok yakın bir yere getirilir. Voltaj uygulandığında, numune yüzeyindeki elektronların atomik çözünürlüğe sahip yüzey görüntüsü, bir elektrik akımı uygulanarak yeniden oluşturulur (Kano ve ark. 2015). STM esas olarak NP'lerin topografik karakterizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılır (Şekil 2-19). Bu teknikler, inorganik NP'lerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için mükemmel yaklaşımlar sunmaktadır. Organik NP'ler (veya biyolojik materyallerle kaplanmış NP'ler) için, karmaşık numune hazırlamaları

gerektiğinden, bu tekniklerin kullanımı daha sınırlıdır. Numune hazırlama aşamasında numunenin dehidrasyonu olabilir ve bu durum numunenin büzülmesine ve toplanmasına yol açabilir (Kumar ve Dixit 2017).

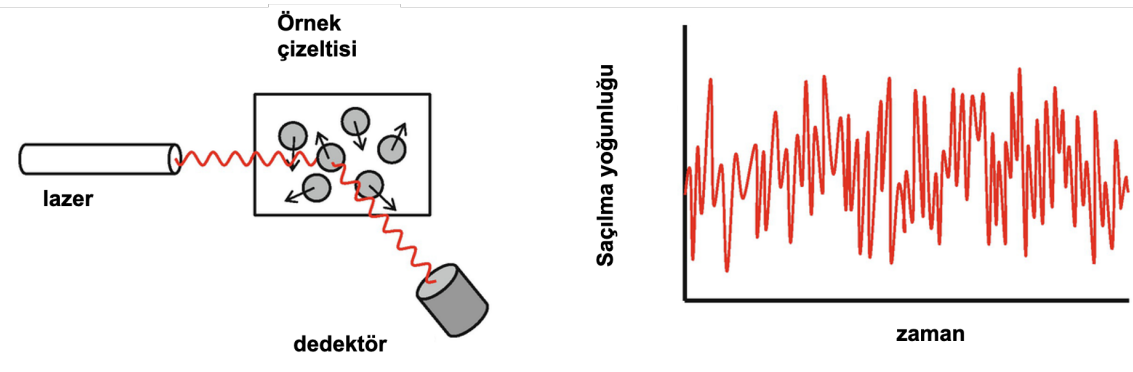


Şekil 2-19: Taramalı tünelleme mikroskobu (STM) yönteminin şematik gösterimi – Sahare (2020)'den değiştirilerek

2.10.1.4. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Dinamik ışık saçılımı (DLS), NP boyutunun ve boyut dağılımının analizi için yaygın olarak tercih edilmektedir. Çözeltide dağılmış parçacıklar sürekli olarak parçacık boyutunun hızına bağlı olarak hareket etmektedir. Bu hıza karşılık gelen dalgalanma gözlemlenerek boyut tahmin yapılabilmektedir. Dalgalanmanın korelasyon fonksiyonu elde edilerek parçacık boyutu ve dağılımı elde edilebilmektedir. DLS bu prensipten yola çıkarak, çok çeşitli parçacıkların boyut bilgilerini kolay ve doğru bir şekilde sağlayabilmektedir. DLS, veri analizini, parçacıkların aynı formda ve küresel olduğunu

varsayarak gerçekleştirir. Bu yüzden, şekil gibi detaylı bilgilerin elde edilmesinde başka ekipmanlar tercih edilmelidir (Şekil 2-20) (Misono ve ark. 2019).



Şekil 2-20:Dinamik ışık saçılımı ölçümünden parçacık boyutu dağılımı elde etme süreci – Misono (2019)'dan değiştirilerek

2.10.2. Yapısal ve Kimyasal Özelliklerine Göre NP'lerin Karakterizasyonu

NP'lerin, fizikokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi için, yapısal ve kimyasal özellikleri incelenmektedir. Bu özellikler, NP'lerin birleşiminin, fazının, kristalliğinin, işlevselliğinin, oksidasyonunun, yüzey yükünün, polaritesinin, bağlanmasının ve elektrokimyasal özelliğinin belirlenmesini sağlamaktadır (Tablo 2-4) (Joudeh ve Linke 2022).

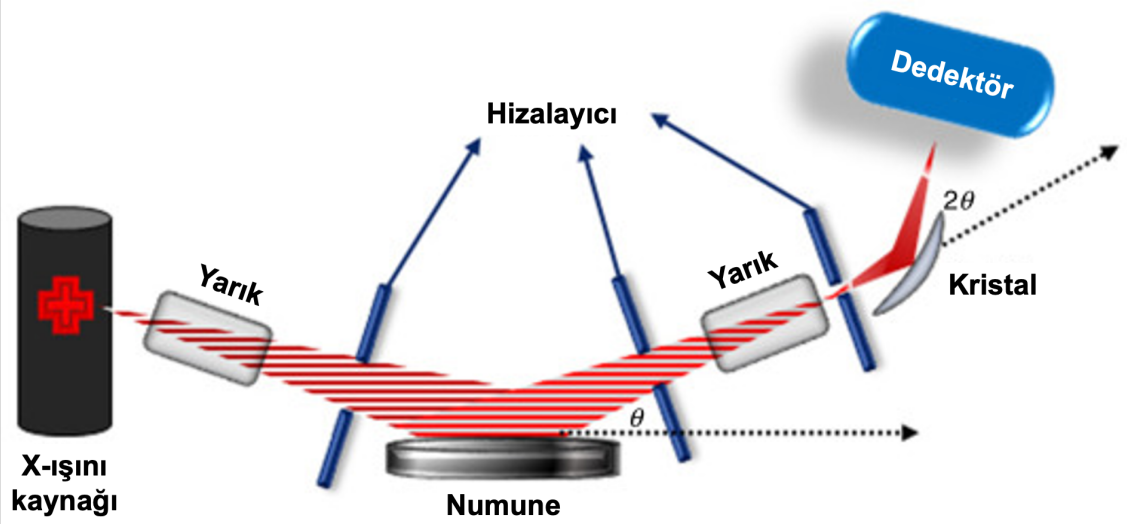
Tablo 2-4: Yapısal ve kimyasal özelliklerine göre NP'lerin yaygın olarak kullanılan karakterizasyon yöntemleri – Joudeh ve Linke (2022)'den değiştirilerek

Yöntem	Birleşim	Faz	Kristallik	İşlevsellik	Oksidasyon	Yüzey yükü	Polarite	Bağlanma	Elektrokimyasal özellik
XRD		+	+						
EDX	+								
HAADF	+								
XPS	+				+			+	+
FTIR	+			+	+		+	+	
ELS						+			
Raman spektroskopisi			+					+	

XRD: x-ışını kırınım analizi, EDX: enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi, HAADF: yüksek açılı dairesel karanlık alan görüntüleme, XPS: x-ışını fotoelektron spektroskopisi, FTIR: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi, ELS: elektroforetik ışık saçılımı.

2.10.3. X-ışını Kırınım Analizi (XRD)

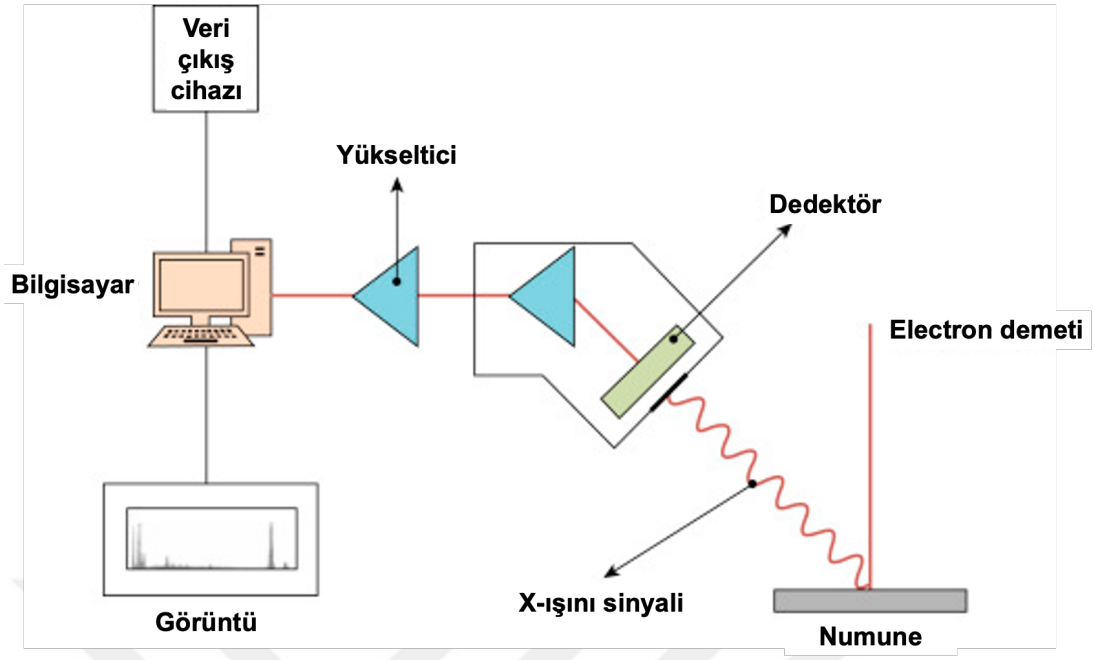
X-ışını Kırınım Analizi (XRD), bir malzemeye gelen x-ışınlarından, malzemeyi terk edenlerin yoğunluklarının ve saçılma açılarının ölçümü gerçekleştirilir (Şekil 2-21) (Epp 2016). NP'lerin fazının ve kristalliğinin analizinde bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. XRD'nin çözünürlüğü ve doğruluğu, numunelerin çeşitli atomlar arası mesafelerle oldukça amorf özelliklere sahip olduğu durumlarda veya NP'lerin birkaç yüz atomdan daha küçük olduğu durumlarda etkilenebilmektedir (Khan ve ark. 2019).



Şekil 2-21: X-ışını kırınım analizinin şematik gösterimi – Harrington ve Santiso (2021)'den değiştirilerek

2.10.4. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)

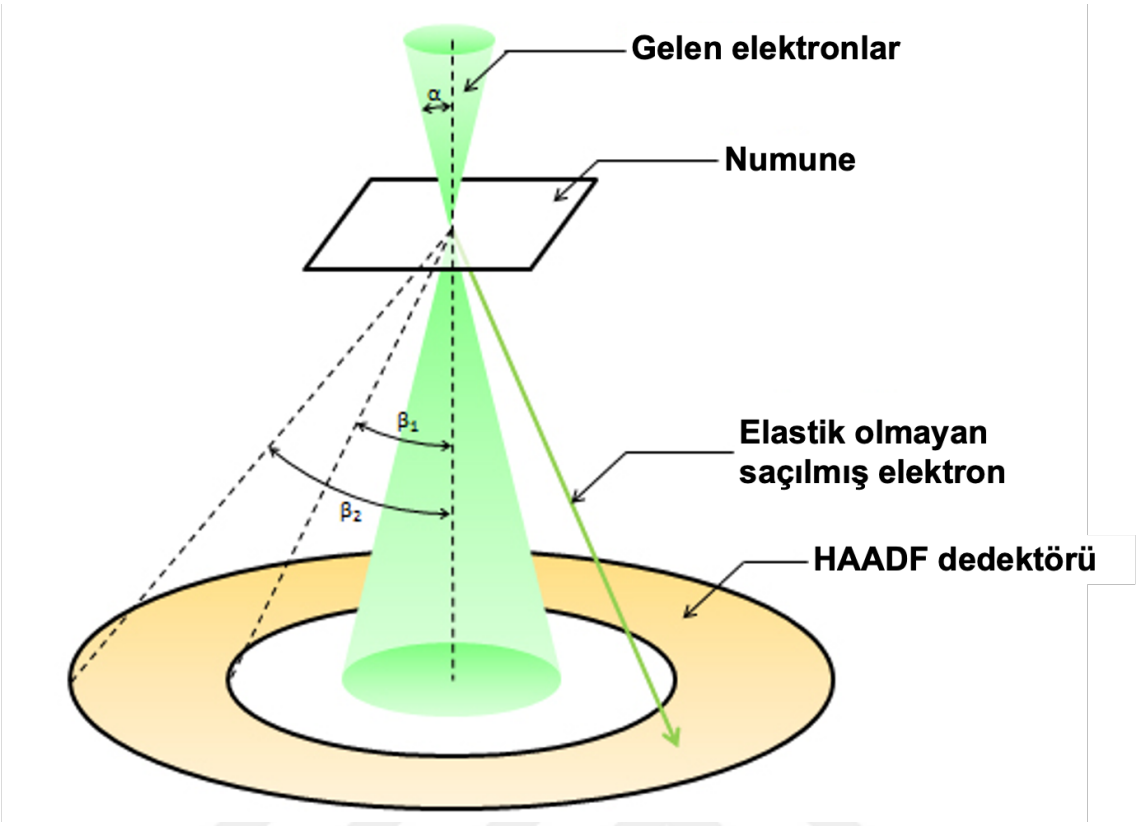
Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisinde (EDX), elektron demeti elektronları, numune yüzeyine geldiğinde iç kabuk elektronlarını dışarı fırlatır. Dış kabuk elektronları, iç kabuktaki boşluğu doldurmak için x-ışınları üretir (Şekil 2-22). Her elementin, atomik yapısından dolayı benzersiz bir x-ışını emisyon modeli bulunmaktadır. Bu nedenle, EDX, birleşim analizi yapmak için kullanılabilmektedir (Groarke ve ark. 2021). EDX, ortaya çıkan spektrumların yalnızca niteliksel birleşim bilgisini vermektedir (Nasrollahzadeh ve ark. 2019). Bu yöntem, karmaşık ek altyapılar gerektirmemektedir. Genellikle mevcut bir SEM veya TEM'e bağlı küçük bir cihaz ile işlemler gerçekleştirilir. Bu sayede, morfolojik karakterizasyon için SEM veya TEM kullanılırken, kimyasal bileşimin analizi için aynı anda EDX kullanılması mümkün olmaktadır (Goldstein ve ark. 2017).



Şekil 2-22: Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisinin şematik gösterimi - Huang (2020)'den değiştirilerek

2.10.5. Yüksek Açılı Dairesel Karanlık Alan Görüntüleme (HAADF)

Yüksek açılı dairesel karanlık alan görüntüleme (HAADF), taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) kullanılarak bir numunenin temel haritalandırılması için kullanılmaktadır (Şekil 2-23). Görüntüler, dairesel bir karanlık alan detektörü (Otten 1989) tarafından tutarsız saçılan elektronların toplanmasıyla oluşturulur. HAADF, numunenin elementlerinin atom sayısındaki değişimlere karşı yüksek hassasiyete sahiptir. Genellikle ilgili NP'ler nispeten ağır elementlerden oluştuğunda, elementlerin birleşim analizi için kullanılmaktadır. Görüntülerin kontrastı, atom numarası ve numune kalınlığına bağlıdır (Utsunomiya ve Ewing 2003).

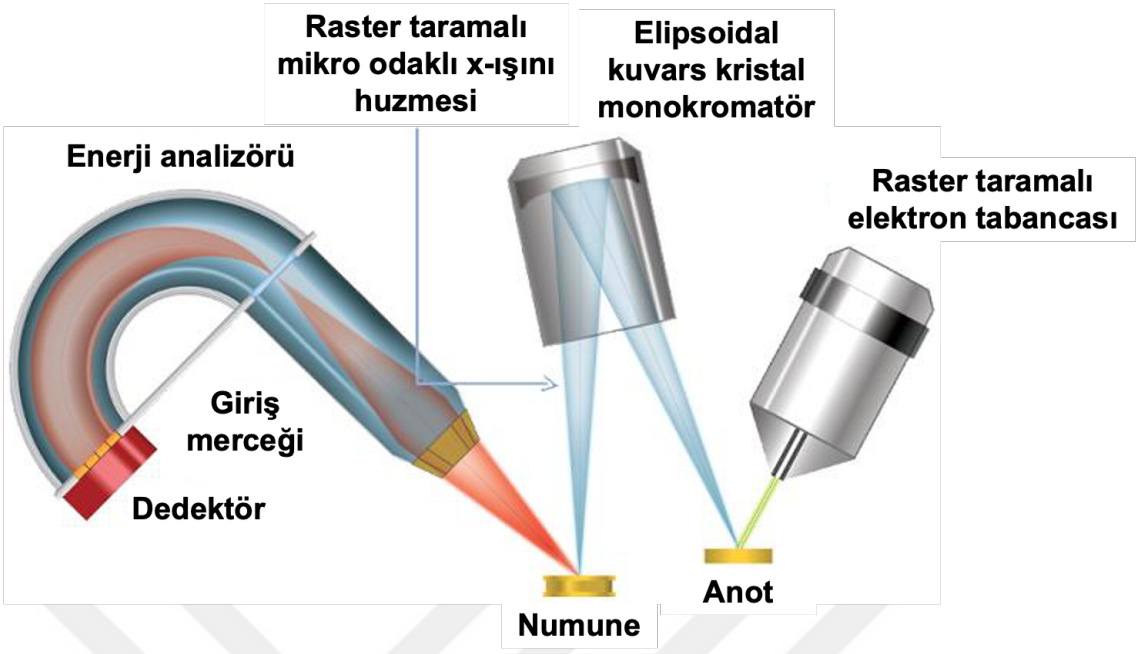


Şekil 2-23: Yüksek açılı dairesel karanlık alan görüntülemenin şematik gösterimi - Zhang (2015)'den değiştirilerek

HAADF: yüksek açılı dairesel karanlık alan görüntüleme.

2.10.6. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

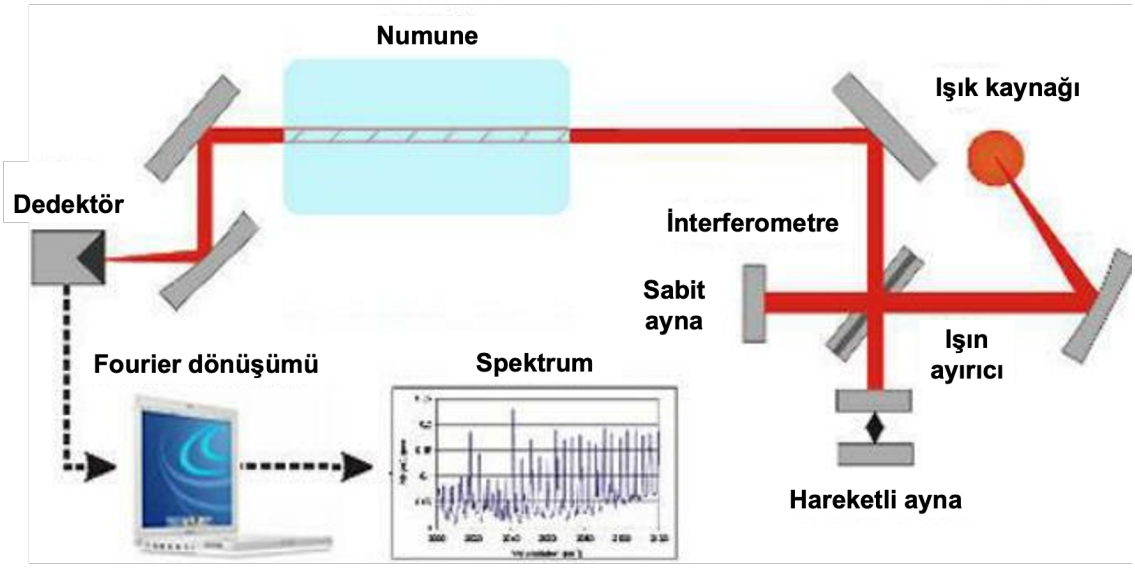
X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), NP'lerin element oranlarının, kimyasal durumun ve bağlanma şeklinin belirlenmesi için en hassas yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Khan ve ark. 2019). XPS, bir malzeme içindeki veya o malzemeyi kaplayan elementleri ve bu elementlerin kimyasal durumlarını yüksek hassasiyetle tanımlayabilen fotoelektrik etkiye dayanmaktadır (Şekil 2-24) (Fadley 2010). Bununla birlikte, XPS, elektron transferi hakkında derinlemesine bilgi edinebilmek için de kullanılabilmektedir (Lykhach ve ark. 2016).



Şekil 2-24: X-ışını fotoelektron spektroskopisinin şematik gösterimi - Fadley (2010)'dan değiştirilerek

2.10.7. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

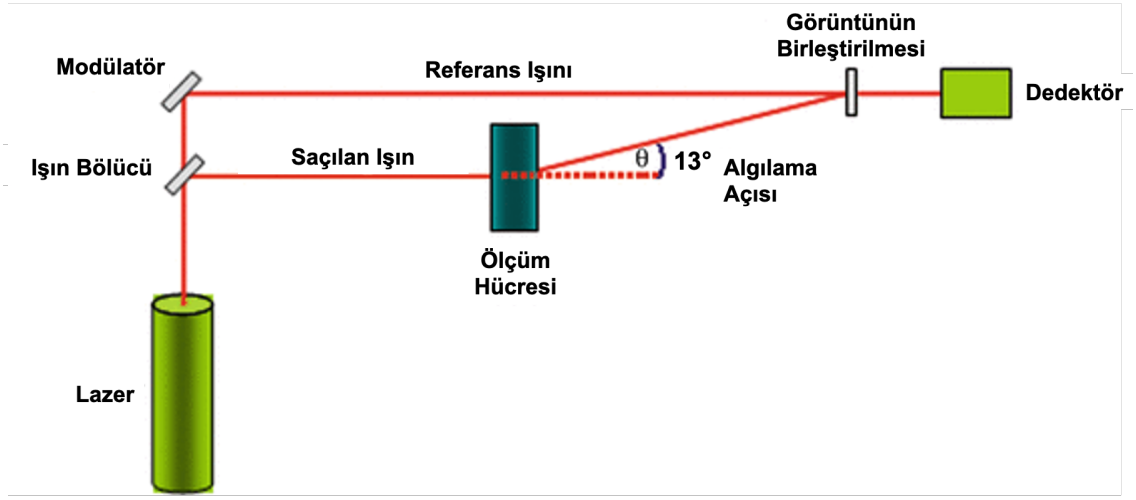
Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), bir malzemenin kızılötesi ışıkla ışınlanması sonrasında emilen veya iletilen radyasyonun kaydedilmesi mantığına dayanmaktadır. Bunun sonucunda elde edilen spektrum, numunelerin benzersiz bir parmak izini temsil etmektedir. Bu sayede, numunenin bağlanma ilginliği, polaritesi ve oksidasyon durumu gibi özellikleri hakkında bilgi edinilebilmektedir (Şekil 2-25) (Deepty ve ark. 2019; Manor ve ark. 2012). FTIR esas olarak NP'lerin yüzey kimyasal bileşimi veya işlevselleştirilmesi gibi organik malzemelerin karakterizasyonu için kullanılmaktadır. Ayrıca, yüksek saflık arandığında, kirleticilerin (kontaminantlar) tanımlanması için de kullanılmaktadır (Chevali ve Kandare 2016).



Şekil 2-25: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisinin şematik gösterimi – Giechaskiel ve Clairotte (2021)'den değiştirilerek

2.10.8. Elektroforetik Işık Saçılımı (ELS)

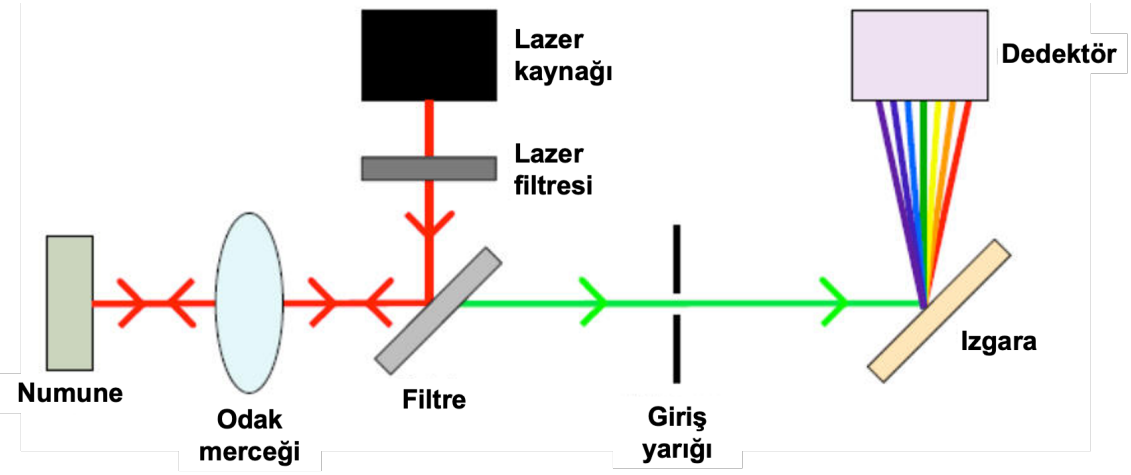
Elektroforetik ışık saçılımı (ELS), bir partikül veya makromolekül süspansiyonunun elektroforetik hareketliliğini ölçmede kullanılan analitik bir yöntemdir. DLS yönteminde olduğu gibi, süspansiyon, genellikle görünür dalga boyunda (~400–800 nm) bir ışık kaynağıyla (lazer) aydınlatılmaktadır (Şekil 2-26). Fotodedektöre bağlı bir optik sistem ve Doppler etkisinden yararlanarak parçacık hareketinin ölçülmesine izin veren bir sinyal işleme sistemi kullanılarak süspansiyondan saçılan ışık örneklenmektedir (McNeil-Watson 2013).



Şekil 2-26: Elektroforetik ışık saçılımı (ELS) yönteminin şematik gösterimi - McNeil-Watson (2013)'ten değiştirilerek

2.10.9. Raman spektroskopisi

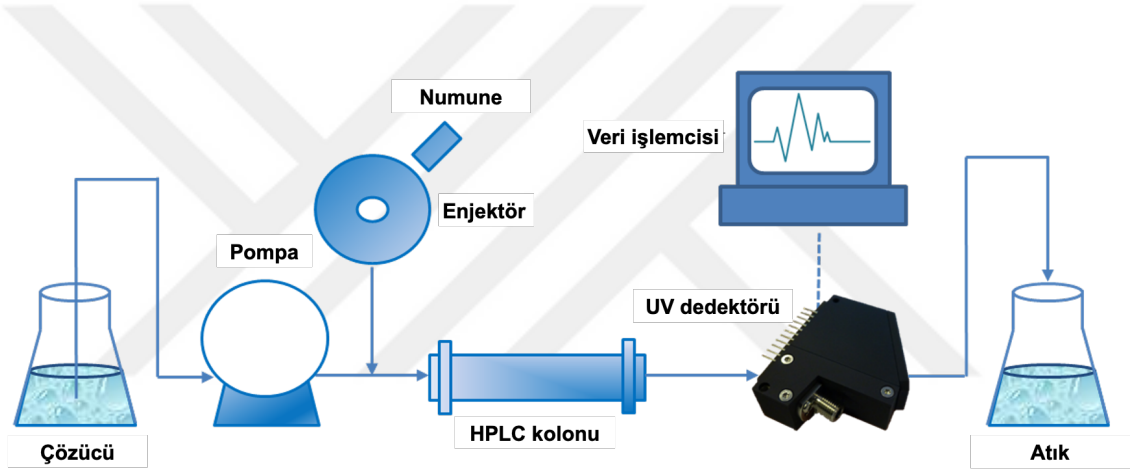
Raman spektroskopisi, bir numunenin bir lazer tarafından yayılan tek renkli ışına maruz kalması sonucu, lazer ışını ile moleküler titreşimler (fotonlar ve fononlar) arasında oluşan etkileşimlerin kaydedilmesine dayanmaktadır (Şekil 2-27). Raman saçılımı olarak bilinen bu yöntemle elastik olmayan saçılmış fotonları kaydedilmektedir. Raman spektroskopisi, numunenin kimyasal ve molekül içi bağının karakterizasyonunda kullanılır. Elde edilen veriler her numune için benzersizdir. Raman spektroskopisi, numunenin kristalografik yöneliminin karakterizasyonunda da kullanılabilmektedir (Joudeh ve Linke 2022).



Şekil 2-27: Raman sprektroskopisinin şematik gösterimi - Cho ve Ahn (2020)'den değiştirilerek

2.11. Kromatografik Yöntemler

Kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın kompleks karışımlardaki maddeleri birbirinden ayırmak için kullanılan yöntemlerdir. En yaygın kullanılan kromatografik yöntemlerden biri olan sıvı kromatografi (LC), bir karışımın ayrı ayrı bileşenlerini izole etmek için kullanılan bir ayırma işlemidir. Bu işlem sayesinde, bir numunenin, polar bir hareketli faz ve polar olmayan durağan faz yoluyla kütle transferi gerçekleştirilebilmektedir. LC'nin gelişmiş bir çeşidi olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ilaçların içerdiği maddelerin tayini ve miktarının belirlenmesi amacıyla ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2-28) (Salazar-Beltrán ve ark. 2017).

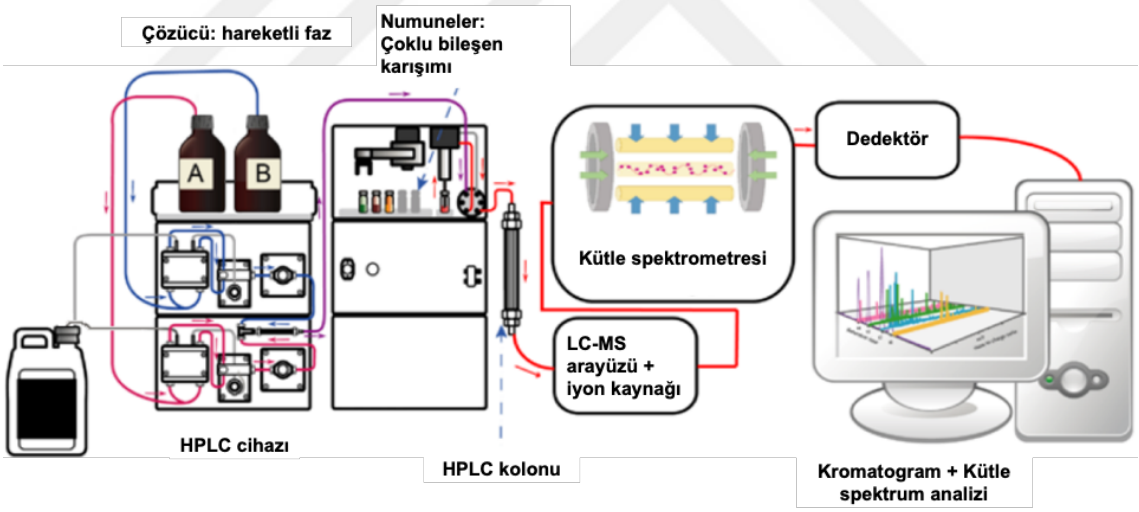


Şekil 2-28: UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC-UV) şematik gösterimi – Salazar-Beltran (2017)'den değiştirilerek

LC cihazı, numunenin enjekte edildiği ve numunenin taşınması için çözücünün (hareketli faz) geçtiği, polimer gibi granüler bir katı malzemeden (sabit faz) yapılmış gözenekli ortamla dolu bir kolondan oluşmaktadır. Cihaza enjekte edilen numune durağan faz üzerinde adsorbe edilir. Solvent, bileşikleri birer birer ayırmak için kolon materyaline ve solvente ilginliklerine bağlı olarak kolondan geçer. Durağan faza en yakın olan bileşen kolondan en son ayrılır. Yani, kolona yüksek ilginlik gösteren bileşen kolondan daha yavaş geçeceğinden, daha uzun süre kolonda kalır. UV dedektörüne sahip LC'lerde (LC-UV), zamana bağlı absorbans yoğunluğu ölçülerek bu değerler grafik halinde (LC-UV) elde edilebilmektedir (Şekil 2-28). UV dedektörlerinin sağladığından daha yüksek hassasiyet gerektiren uygulamalarda kütle spektrometresinden (MS) yararlanılmaktadır. MS, birden fazla bileşen içeren karışımları ayırırken, ayrılan

bileşenlerin tanımlanmasında LC ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır. MS, araştırılan numune ile ilgili iyonik türlerin kütle yük oranının ölçülmesine dayanmaktadır. MS, bir numunenin moleküler kütlesini ve elementel bileşimini belirlemek ve ayrıca numunenin derinlemesine yapısal incelemesini yapmak için kullanılmaktadır (den Uijl ve ark. 2021).

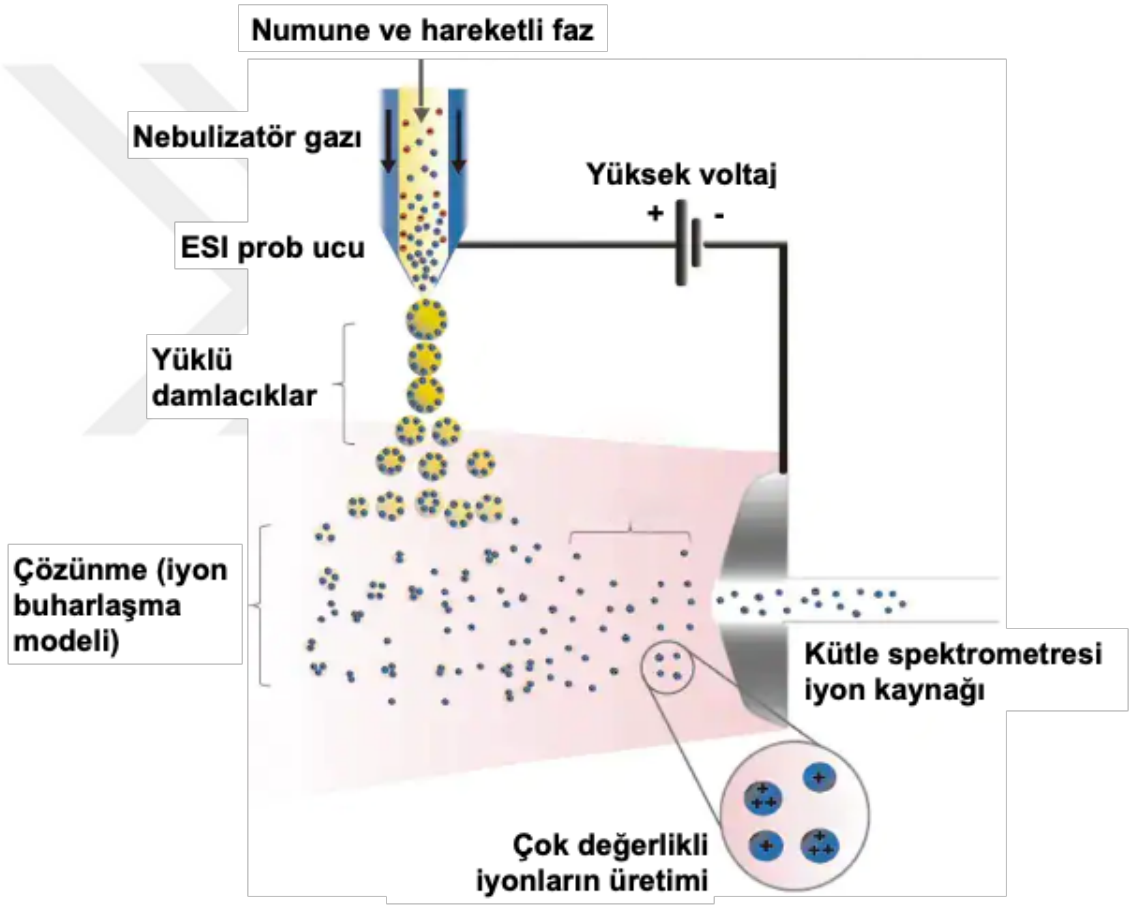
LC ve MS'nin birlikte kullanıldığı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS), LC'nin fiziksel ayırma yetenekleri ile MS'nin kütle analizi yeteneklerini birleştiren bir analitik kimya yöntemidir. Sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC-MS), ilaç analizi, gıda analizi ve çevresel testler için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. LC-MS, numunelerin analizini yüksek çıktı ve yüksek hassasiyetle yapabildiğinden avantaj sağlamaktadır. LC-MS, ilaç geliştirme çalışmalarında, ilacın test edilmesini ve geliştirilmesini hızlandıran çeşitli bileşikler için kullanılabilmektedir (Şekil 2-29) (Pitt 2009).



Şekil 2-29: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresinin (LC-MS) şematik gösterimi – Joye (2019)'dan değiştirilerek

LC-MS, elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ile birlikte de kullanılabilmektedir. ESI, aerosol oluşturmak için bir sıvıya yüksek voltajın uygulandığı bir elektrospreyin kullanarak iyon üretilmesine dayanan bir yöntemdir. Moleküllerin iyonlaştığında parçalanma eğiliminin üstesinden gelebilmesi nedeniyle, makromoleküllerden iyonların üretilmesinde etkilidir (Xia ve ark. 2021).

LC-MS ile ESI'nin birlikte kullanıldığı sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyonu-kütle spektrometresi (LC-ESI-MS), karmaşık biyolojik numunelerdeki çeşitli polaritelere sahip küçük ve büyük molekülleri analiz edilmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2-30). ESI, iyonların kütle spektrometrik analizine tabi tutulmadan önce elektrik enerjisi kullanarak çözeltiyi gaz fazına dönüştürür. Bu sayede, hassasiyet artar ve çözeltideki iyonik bileşenler analiz edilebilir. Nötr bileşikler protonasyon veya katyonizasyon yoluyla çözelti veya gaz fazında iyonik forma dönüştürülerek ESI-MS ile incelenebilmektedir (Bandu ve ark. 2015).



Şekil 2-30: Sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyonu-kütle spektrometresinin (LC-ESI-MS) şematik gösterimi - Boonjob (2015)'ten değiştirilerek

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT) (Alfa Aesar)

4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (Thermo Fisher)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich)

Diklorometan (DCM)

Etil alkol (Sigma)

Falloidin, Floresan İzotiyosiyanat Etiketli (FITC) (Merck)

Fetal Sığır Serumu (FBS) (Gibco)

Formaldehit (Sigma)

Minimum Essential Medium (MEM) Non-Essential Amino Acids (Gibco)

$NaHCO_3$ (Sodyum bikarbonat)

Oksaliplatin (Sigma-Aldrich)

OXATU-S ® 100 mg/20 mL IV infüzyon için konsantre çözelti (Onko İlaç)

Penisilin/Streptomisin (P/S) (Gibco)

PLGA (Poli Laktik-ko-Glikolik Asit) (Sigma-Aldrich)

PVA (Polivinil Alkol)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco)

Sığır serum albumini (BSA) (Sigma)

Tripsin-EDTA (Gibco)

Triton X-100 (Sigma)

Verapamil (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Cihazlar

Buz Dolabı (Arçelik)

Buz makinası (Hoshizaki)

CO_2 İnkübatör (Sanyo)

Distile Su Cihazı (GFL)

Epoch™ Microplaka Spectrofotometresi (Biotek)

Hassas Terazi (Mettler)

Hassas Terazi (Scaltec)

Hemositometre Lamı (Neubauer)

İmmünfloresan Mikroskobu (Olympus BX51)

İmmünfloresan Mikroskobu Görüntüleme Sistemi (DP2-BSW)

Laminar Hava Akım Cihazı ELB 2448 (Heraus)

LC-ESI-MS (Shimadzu)

LC-MS (Shimadzu)

LC-UV (Shimadzu)

Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)

Otoklav (Hirayama)

Otomatik Pipetler (Axypet)

pH metre (Hanna)

Santrifüj (Hettich-Universal 32)

Sıvı Azot Tankı (International Cryogenics, Inc.)

Su banyosu (Heidolph)

Taramalı elektron Mikroskobu (Zeiss EVO LS10)

Ters Mikroskop (Olympus 1M)

Ultrasonik Banyo

Vorteks (Biosan)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, HPLC (Shimadzu)

3.1.3. Çözeltiler

3.1.3.1. Hücre Kültürü ve Sitotoksisite Testlerinde Kullanılan Çözeltiler

Hücre Kültürü

Complete RPMI 1640 (cRPMI 1640)

440 ml RPMI 1640

50 ml FBS

5 ml P/S

5 ml MEM Non-Essential Amino Acids

Hücre Canlılığı

MTT solüsyonu

50 mg MTT

10 ml PBS

3.1.3.2. İmmünfloresan Boyamada Kullanılan Çözeltiler

1x PBS

1,44 gr Na_2HPO_4 . 2 H_2O

0,2 gr KCl

8,0 gr NaCl

0,24 gr KH_2HPO_4

800 ml dH_2O ile çözülerek pH HCl ile 7,4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

%1 PBS/BSA

1 gr BSA

100 ml PBS çözeltisi

%1 Triton X-100

1 ml Triton X-100

100 ml PBS

%3,7 Formaldehit

3,7 gr Formaldehit

100 ml PBS

100 ml PBS içerisine 3,7 gr formaldehit eklenip su banyosunda ısıtılarak çözünmesi beklenir.

3.1.3.3. Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

%10 $NaHCO_3$

10 g $NaHCO_3$

100 ml dH_2O

3.2. Yöntemler

Çalışma hücre kültürü, verapamil ve oksaliplatinin nanopartiküllere yüklenmesi, nanopartiküllerin karakterizasyonu, ilaç salınımı, sitotoksisite ve immünfloresan görüntüleme aşamalarından oluşmaktadır.

3.2.1. Hücre Besiyeri Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan HCT-116 hücreleri standart kültür koşullarında, %10 FBS (fetal bovin serum), %1 antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) ve %1 MEM non-essentail amino asit içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) içerisinde kültür kaplarına (flask) ekilerek 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde çoğaltıldı.

3.2.2. Hücre Hattının Pasajlanması

Çalışmalarda kullanılan HCT-116 hücreleri standart kültür koşularında; %10 FBS, %1 antibiyotik (100 U/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) ve %1 MEM non-essentail amino asit içeren RPMI 1640 (cRPMI 1640) besiyeri içerisinde kültür flasklarına ekilerek 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde çoğaltıldı. Ters mikroskopla 2-3 günde bir kontrol edilen hücreler yeterli çoğunluğa ulaştıklarında flask yüzeyinden

tripsin-EDTA kullanılarak 4 dakika 37 °C'ta inkübe edildi. Yüzeyden kaldırılan hücreler 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 3000 devir/dakika'da 3 dakika santrifüj sonunda üst sıvı atıldı ve pelet 1-2 ml taze cRPMI 1640 içerisinde çözdürüldü.

3.2.3. Hücre Sayılarının Belirlenmesi

HCT-116 hücreleri tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak toplandı ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 3 dakika santrifüj sonunda üst sıvıları atıldı. Pelet cRPMI 1640 içerisinde çözdürülerek hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücre sayımı için, hemositometre lamının üzerine bir lamel sabitlendi. Hücre süspansiyonundan mikropipet yardımıyla 10 µl alınarak lam ile lamel arasına verildi ve sayım işlemi gerçekleştirildi.

3.2.4. Hücre Hattının Dondurulması

HCT-116 hücreleri tripsin-EDTA yardımıyla tutundukları flask yüzeyinden kaldırıldı ve toplanarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 3 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıları atıldı. Tüp içerisinde kalan peletteki hücreler cRPMI içerisinde çözülerek sayıldı ve 1 ml hacimdeki hücre sayısı belirlendi. Hücreler tekrar santrifüj edilerek FBS'de çözüldü. FBS'de çözülen hücreler, her bir tüp için $5x10^6$ hücre olacak şekilde soğuğa dayanıklı cryo tüplere alındı. Cryo tüplere 1/9 oranında DMSO/FBS ilave edildi. Hücrelerin bulunduğu cryo tüpler, -86 °C'de propanol bulunan kap içerisine kademeli şekilde donmak üzere bırakıldı ve 24 saat sonra sıvı azot tankına (-196 °C) yerleştirildi.

3.2.5. Hücre Hattının Çözülmesi

Sıvı azot tankında -196 °C sıcaklıkta cryo tüpler içinde saklanmakta olan hücreler oda sıcaklığında çözüldü. Hücreler alınarak 5-6 ml cRPMI 1640 medyum olan ortama ilave edildi ve 3000 devir/dakika'da 3 dakika santrifüj edildi. Hücrelerin medyum olan ortama ilave edilmesi ile ortamdaki DMSO'nun hücreler üzerindeki toksik etkisinin azaltılması amaçlandı. İki defa gerçekleştirilen santrifüj işlemlerinin her birinin sonunda, üst sıvılar döküldü. Böylece DMSO ortamdan uzaklaştırıldı. Santrifüj işleminin sonunda hücre sayımı yapıldı ve hücreler flasklara ekildi.

3.2.6. Ticari İlacın Saflaştırılması

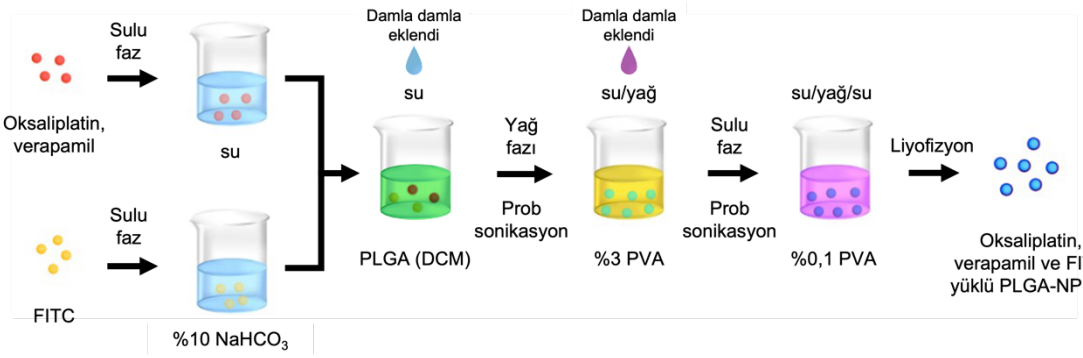
PLGA-NP'lerine yüklenmek üzere ticari oksaliplatin ilacı kullanıldı. Ticari oksaliplatin ilacı OXATU-S ® 100 mg/20 ml IV infüzyon için konsantre çözelti içeren flakondan yardımcı maddeler uzaklaştırılarak oksaliplatinin saflaştırılması için preparatif yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanıldı.

Saflaştırma işlemi, preparatif HPLC'de (RP-HPLC, SPD-M20A, FRC-10A, LC-8A, CBM-20A, Shimadzu, Tokyo, Japan) Shim-pack PRC ODS HPLC kolonu (20 mm × 25 cm) ve 210 ve 254 nm'de UV-PDA detektörü kullanılarak yapıldı. 14 ml/dk akış hızındaki elüsyon A (su, %0,1 (v/v) formik asit) ve elüsyon B (asetonitril, %0,1 (v/v) formik asit) gradient elüsyonu aşağıdaki gibi programlandı:

0-5 dakika, %10 B; 5-14 dakika, %10-80 B; 14-20 dakika, %80-10 B; 20-30 dakika, %10 B.

3.2.7. PLGA-NP'lerinin Hazırlanması

Çalışmada, PLGA-NP'lerine su/yağ/su ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak verapamil (V) ve oksaliplatin (O) birlikte ve ayrı ayrı yüklendi (Şekil 3-1). Bunun için Tablo 3-1'de verilen farklı formülasyonlarda nanopartiküller üretilerek boyut optimizasyonu yapıldı. Verapamil ve oksaliplatinin birlikte yüklendiği optimize formülasyon seçilerek ileriki çalışmalarda kullanıldı. İmmünfloresan boyama çalışmalarında kullanılmak üzere bu optimize formülasyon ayrıca Falloidin-FITC (F) floresan boya yüklü olarak da üretildi.



Şekil 3-1: Oksaliplatin, verapamil ve FITC'in PLGA-NP'lerine yüklenmesinin şematik gösterimi

Çalışmada kullanılan oksaliplatin ve verapamilin miktar tayini için standart kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Bunun için farklı konsantrasyonlarda örnekler hazırlandı. Örnek konsantrasyonları oksaliplatin için 5; 10; 25; 50; 75; 100; 250 µg/ml (suda) olacak şekilde hazırlandı. Örnek konsantrasyonları verapamil için 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 ve 1000 µg/ml (suda) olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan örnekler LC-MS cihazında 210 ve 254 nm dalga boylarında UV dedektörü ile analiz edildi. Elde edilen pik alanları konsantrasyona bağlı olarak grafiğe döküldü. Ayrıca verapamilin 37 °C'deki stabilitesini kontrol etmek için su banyolu bir inkübatörde 14 günlük bir stabilizasyon çalışması yapıldı. 1 mg/ml standart verapamil %5'lik dekstroz içerisinde çözülerek inkübe edildi. Stabilite, LC-MS cihazı ile kromatografik olarak kontrol edildi.

LC-MS analizlerinde Shimadzu LC-MS 2010 EV kullanıldı. 25 cm uzunluk ve 6 mm giriş çapı boyutlarındaki Shimadzu Shim-Pack MRC-ODS-C18 HPLC kolonuna 75 µl örnek enjekte edildi. Foto diyot analizi (PDA) detektörünün dalga boyu 210 ve 254 nm'ye ayarlandı. RP-HPLC analizi 25 °C'de gerçekleştirildi. 0.6 ml/dk akış hızında elüsyon A'dan (su, %0,1 (v/v) formik asit) elüsyon B'ye (asetonitril, %0,1 (v/v) formik asit) gradient uygulandı.

Nanopartiküllerin üretiminde, etken maddeler 750 µl saf su ile çözülürken PLGA polimeri 2,5 ml diklorometan (DCM) ile çözüldü. İkili emülsiyon oluşturulurken ikinci su fazı olarak 8 ml %3'lük polivinil alkol (PVA) çözeltisi kullanıldı. Ayrıca nanopartiküller elde edildikten sonra ortamdaki organik fazın uzaklaştırılması aşamasında nanopartiküller 35 ml %0,1'lik PVA ile seyreltildi. Tüm nanopartikül formülasyonlarının üretiminde %80 güçte 90 sn boyunca prob sonikatör ile buzlu su banyosunda sonikasyon işlemi uygulandı.

OVP-1 formülasyonunda, floresan boya (FITC) tek başına PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edildi. FITC, saf sudaki çözünürlüğü düşük olduğu için %10'luk sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) ile çözüldü. 1 mg FITC'ye 750 µl %10'luk $NaHCO_3$ eklendi ve vortekslendi. Bu çözelti polimer çözeltisine damla damla eklenirken çözeltiye sonikasyon uygulandı. Böylelikle su/yağ fazı elde edildi. Bu faz, %3'lük PVA çözeltisine damla damla eklenirken çözeltiye tekrar sonikasyon uygulandı. Böylece su/yağ/su ikili emülsiyonu oluşturuldu. İkili emülsiyon sistemi %0,1'lik PVA'ya eklendi ve organik faz (DCM), oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıyla 4 saat boyunca buharlaştırıldı. Elde edilen nanopartiküller 45 dk. 9000 rpm'de santrifüj edildi ve

ardından ultra saf su ile üç kez yıkandı. Elde edilen OVP-1 liyofilize edilerek -80 °C'de saklandı (Şekil 3-1).

OVP-2 formülasyonu için; 5 mg oksaliplatin 750 µl saf su ile çözülerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-3 formülasyonu için; 5 mg verapamil 750 µl saf su ile çözülerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-4 formülasyonu için; 5 mg oksaliplatin ve 5 mg verapamil 750 µl saf su ile çözülerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-5 formülasyonu için; 5 mg oksaliplatin ve 5 mg verapamil 500 µl saf su ile, 1 mg F ise 250 µl %10'luk $NaHCO_3$ ile çözülüp karıştırıldıktan sonra OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-6 formülasyonu için; 10 mg oksaliplatin 750 µl saf su ile çözülerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-7 formülasyonu *in vitro* deneylerde kontrol grubu olarak kullanmak amacıyla boş olarak üretildi. 750 µl saf su organik faza eklenerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-8-11 formülasyonlarında polimer miktarı 50 mg'a düşürüldü.

OVP-8 için; 5 mg verapamil 750 µl saf su ile çözülerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-9 için; 5 mg oksaliplatin 750 µl saf su ile çözülerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-10 için; 5 mg oksaliplatin ve 10 mg verapamil 750 µl saf su ile çözülerek OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı.

OVP-11 için; 5 mg oksaliplatin ve 10 mg verapamil 500 µl saf su ile, 1 mg FITC ise 250 µl %10'luk $NaHCO_3$ ile çözülüp karıştırıldıktan sonra OVP-1 için detaylı anlatılan işlemler uygulandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Farklı formülasyonlarda üretilen nanopartiküllerin içerikleri

Formülasyon	Oksaliplatin	Verapamil	PLGA	FITC
OVP-1	-	-	100 mg	1 mg
OVP-2	5 mg	-	100 mg	-
OVP-3	-	5 mg	100 mg	-
OVP-4	5 mg	5 mg	100 mg	-
OVP-5	5 mg	5 mg	100 mg	1 mg
OVP-6	10 mg	-	100 mg	-
OVP-7	-	-	100 mg	-
OVP-8	-	5 mg	50 mg	-
OVP-9	5 mg	-	50 mg	-
OVP-10	5 mg	10 mg	50 mg	-
OVP-11	5 mg	10 mg	50 mg	1 mg

3.2.8. PLGA-NP'lerinin Karakterizasyonu

OVP'lerin enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesinin belirlendi. OVP'lerin boyut ve zeta potansiyel analizleri sırasıyla DLS ve ELS teknikleri kullanılarak belirlendi. OVP'lerin morfolojik özellikleri SEM analizi ile incelendi. OVP'lerin fonksiyonel grup özelliklerinin belirlenmesinde FT-IR spektroskopisi kullanıldı.

3.2.8.1. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesinin (%DL) yüzde değerleri, nanopartikül formülasyonlarının üretimi aşamasındaki yıkama işleminden sonra elde edilen üst fazlardan LC-MS ile analiz edildi. Etken maddeler için oluşturulan kalibrasyon eğrileri yardımıyla üst fazlardaki madde miktarları belirlendi. Üst fazdaki madde miktarından (enkapsüle olmadan kalan) başlangıçta eklenen madde miktarı çıkarılarak (indirekt yöntem) verim hesabı yapıldı.

3.2.8.2. Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılımı Analizi

DLS ve ELS analizleri 4,0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern) cihazı ile gerçekleştirildi. Alınan ölçümlerde, çözeltiler için viskozite 0,8872 cP ve kırılma indisi 1,330 olarak kullanıldı ve ölçümler 25 °C'de,

otomatik modda, üç tekrarlı yapıldı. Ölçümlerde kullanılan tüm numuneler, ultra saf su ile 1:30 oranında seyreltildi.

3.2.8.3. FT-IR ve SEM Analizleri

OVP'lerin fonksiyonel grup analizi için ATR (Attenuated total reflectance) modunda Perkin Elmer 1600 FT-IR spektrofotometresi kullanıldı. Analizler 4000 cm^{-1} - 600 cm^{-1} aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte 32 kez tarama ile gerçekleştirildi.

Çalışmada yer alan OVP'ler, vakumlu ortamda üç dakika boyunca altın ile kaplı halde bekletildi ve OVP'lerin parçacık morfolojisi SEM (Zeiss EVO LS10) kullanılarak değerlendirildi.

3.2.8.4. In Vitro İlaç Salımı

OVP'lerin belirli bir miktarı pH 7,4 PBS tamponunda süspanse edilerek 37 °C'de yatay çalkalayıcıda çalkalandı. Örnek periyodik olarak santrifüj edilerek üst faz alınıp, pellet aynı tamponda tekrar süspanse edildi. Bu işlem nanopartikülden salınan etken (oksaliplatin ve verapamil) miktarı kantitatif olarak tespit edilemeyinceye kadar tekrarlandı. Toplanan üst fazlar LC-MS ile analiz edilip daha önce hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla farklı zamanlarda (0,5., 1., 3., 6., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde, 7. ve 14. günlerde) salınan madde miktarları belirlendi ve kümülatif ilaç salımı % değerleri hesaplandı.

3.2.9. MTT Analizi

Sitotoksisite çalışmalarında MTT testi kullanıldı. Sitotoksisite deneylerinde, oksaliplatin, verapamil, oksaliplatin ve verapamil, OVP ve boş PLGA-NP'leri semi-konfluent durumdaki HCT-116 hücrelerine verilerek hücrelerin canlılık sonuçları belirlendi. Sitotoksik etkinin belirlenmesi için MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) analiz yöntemi kullanıldı (Ghasemi ve ark. 2021). MTT analizi için HCT-116 hücreleri, 96 kuyulu plakalara kuyu başına hücre sayısı 10^4 olacak şekilde ekildi. Farklı derişim ve sürelerde oksaliplatin, verapamil, oksaliplatin ve verapamil, OVP ve boş PLGA-NP'leri ile muamele edilen hücreler daha sonra 0,1 mg/ml MTT solüsyonu ile 2 saat 37 ºC %5 CO_2'de inkübe edildi. MTT solüsyonunu içeren medyum hücrelerden uzaklaştırılarak plaka kuyularına 100 µl DMSO durdurma solüsyonu eklendi. Hücreler 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. 570 nm

dalga boyunda Epoch™ microplate spektrofotometresi cihazı yardımıyla alınan absorbanslar değerlendirilerek belirlenen hücre canlılık oranları karşılaştırıldı.

3.2.10. İmmünfloresan Görüntüleme

İmmünfloresan görüntüleme çalışmalarında HCT-116 hücreleri 6 kuyulu plaka kuyularına, kuyu başına $15x10^4$ olacak şekilde 1 ml cRPMI 1640 medyumunun içerisinde yuvarlak lamellerin (coverslip) üzerine ekildi ve 37 ºC %5 CO_2 kültür koşullarında inkübasyona bırakıldı. Hücreler lamellerin üzerine yapışarak semi-konfluent duruma geldiğinde Falloidin-FITC yüklü OVP (OVP-F), kuyulara artan dozlarda verildi ve hücreler inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işlemleri 24, 48 ve 72 saat için yapıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile 1 defa yıkandı ve membran geçirgenliğinin arttırılmasını sağlamak için plate kuyularına kuyu yüzeyini kaplayacak kadar %1 Triton X-100 (PBS) verilerek hücreler 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemin ardından hücrelerin bulunduğu kuyulardaki üst sıvılar çekilerek hücreler PBS ile 3 defa yıkandı. Hücreleri sabitlemek için %3,7 formaldehit (PBS) kullanıldı ve hücreler 25 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin bulunduğu kuyulardaki üst sıvılar çekilerek hücreler PBS ile 3 defa yıkandı. Aktin iskeletinin görüntülenebilmesi için Falloidin-FITC 1:250 oranında %1 BSA (PBS) içerisinde seyreltildi ve kuyu başına 600 µl olacak şekilde hücrelerin bulunduğu plaka kuyularına verildi. 2 saat beklemenin sonunda lam üzerine DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) damlatıldı ve plaka kuyularındaki hücrelerin tutunduğu coverslipler, hücreler arada kalacak şekilde ters çevrilerek lamların üzerine kapatıldı. Hücreler immünfloresan mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi. Hücrelerin görüntüleri Olympus DP-72 kamera sistemi ve DP2-TWAIN yazılımı yardımıyla alındı.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Microsoft Excel programı kullanılarak yapıldı. MTT analizinden elde edilen hücre canlılık değerleri kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı. Karşılaştırılan gruplar arasındaki farklılıklar $p<0,05$ olduğunda sonuçlar anlamlı kabul edildi.

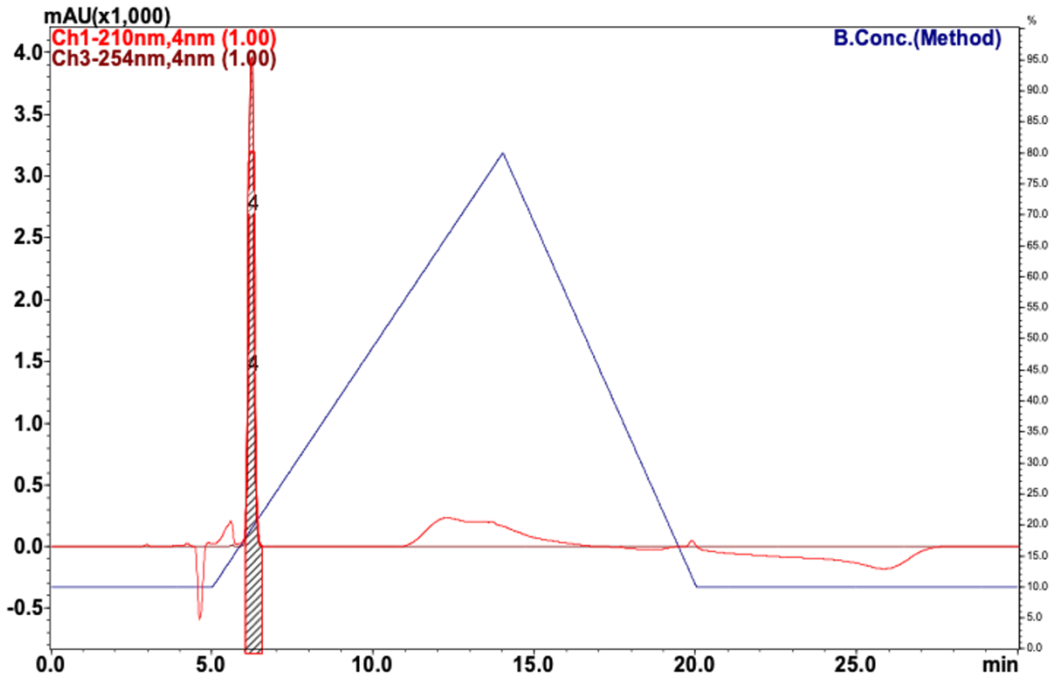
4. BULGULAR

4.1. Karakterizasyon Sonuçları

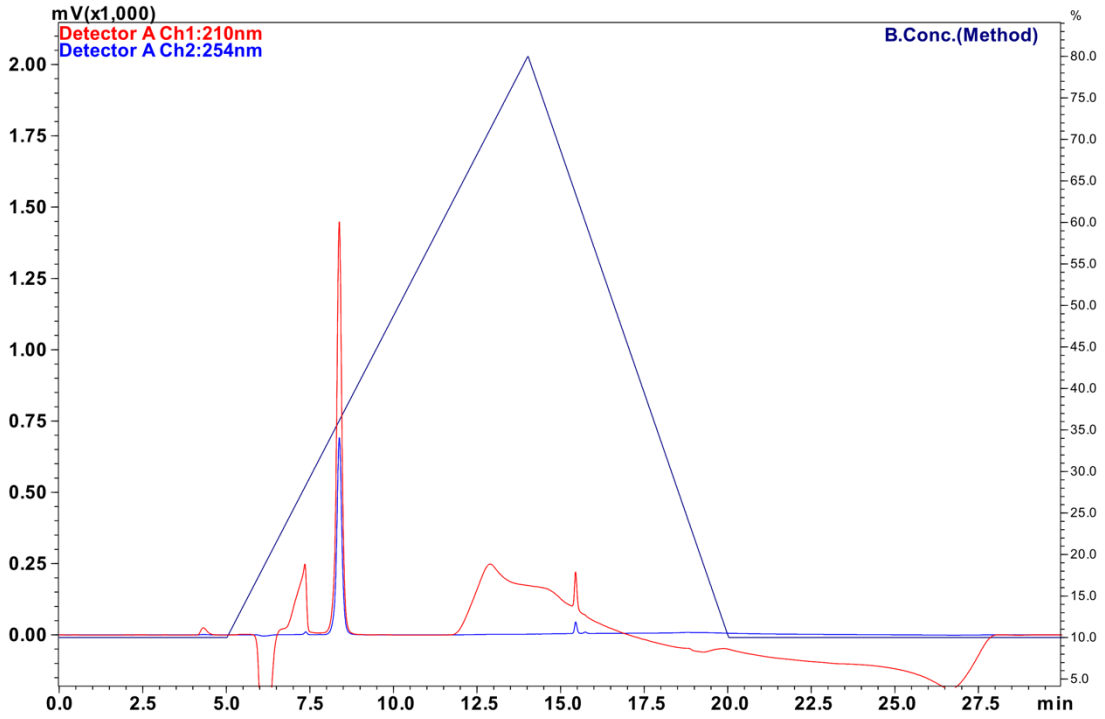
Çalışmada oksaliplatin ve verapamilin birlikte PLGA nanopartiküllerine yüklenmesi hedeflendi. Bunun için öncelikle boyut açısından optimizasyon çalışmaları yapıldı. Farklı formülasyonlarda nanopartiküller üretildi. Kemoterapi tedavisinde kullanılan oksaliplatin antikanser ilacı OXATU-S (Onko İlaç) eczaneden temin edildi. İlaçtaki oksaliplatin nanopartikül üretiminde kullanılmadan önce saflaştırıldı. Verapamil doğrudan kullanıldı. İmmünfloresan görüntülemede kullanılan PLGA-NP'lerine oksaliplatin ve verapamilin yanı sıra Falloidin-FITC floresan boyası da yüklendi.

4.1.1. Oksaliplatinin Saflaştırılması

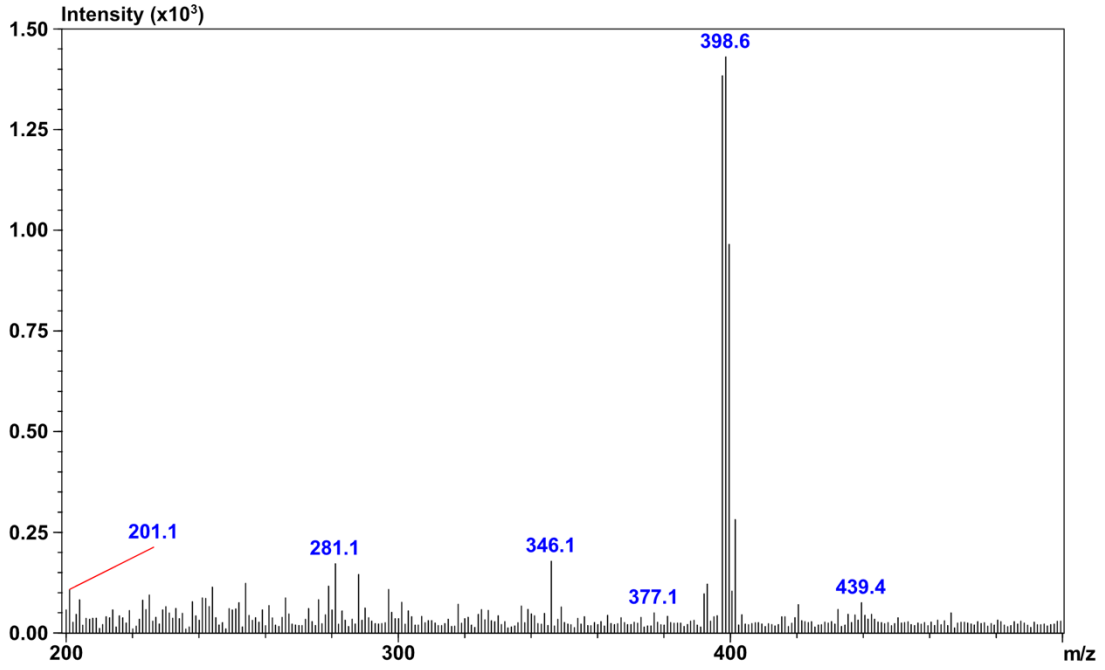
Ticari oksaliplatin ilacı OXATU-S ® 100 mg/20 ml IV infüzyon için konsantre çözelti içeren flakondaki yardımcı maddelerin uzaklaştırılması için preparatif HPLC ile saflaştırıldı. Şekil 4-1'de verilen kromatogramda 6. dk.'daki (alıkonma zamanı) 4 nolu fraksiyon toplandı. LC-ESI-MS analizi yapılarak oksaliplatinin saflığı (8,5. dk) ve molekül ağırlığı (MA + H^+ = 398,6 Da) doğrulandı (Şekil 4-2 ve 4-3).



Şekil 4-1: Ticari oksaliplatinin saflaştırılmasına ait preparatif HPLC kromatogramı



Şekil 4-2: Saflaştırılan oksaliplatinin 210 ve 254 nm dalga boylarındaki LC kromatogramları

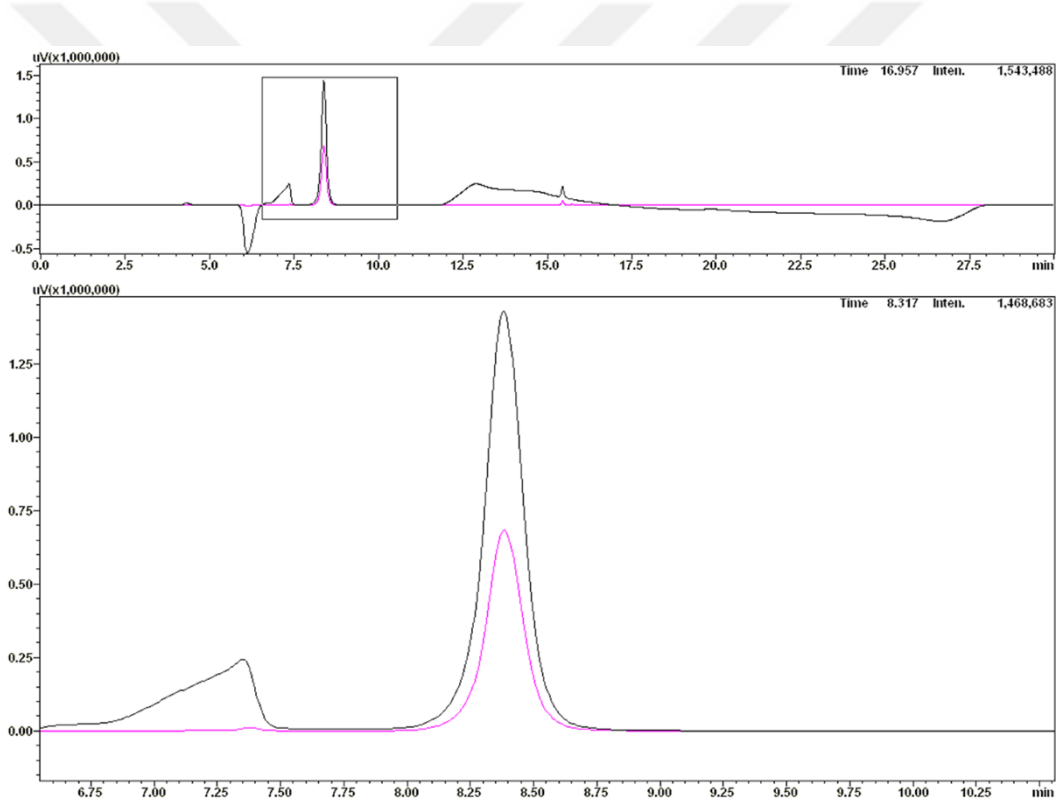


Şekil 4-3: Saflaştırılan oksaliplatinin ESI-MS spektrumu

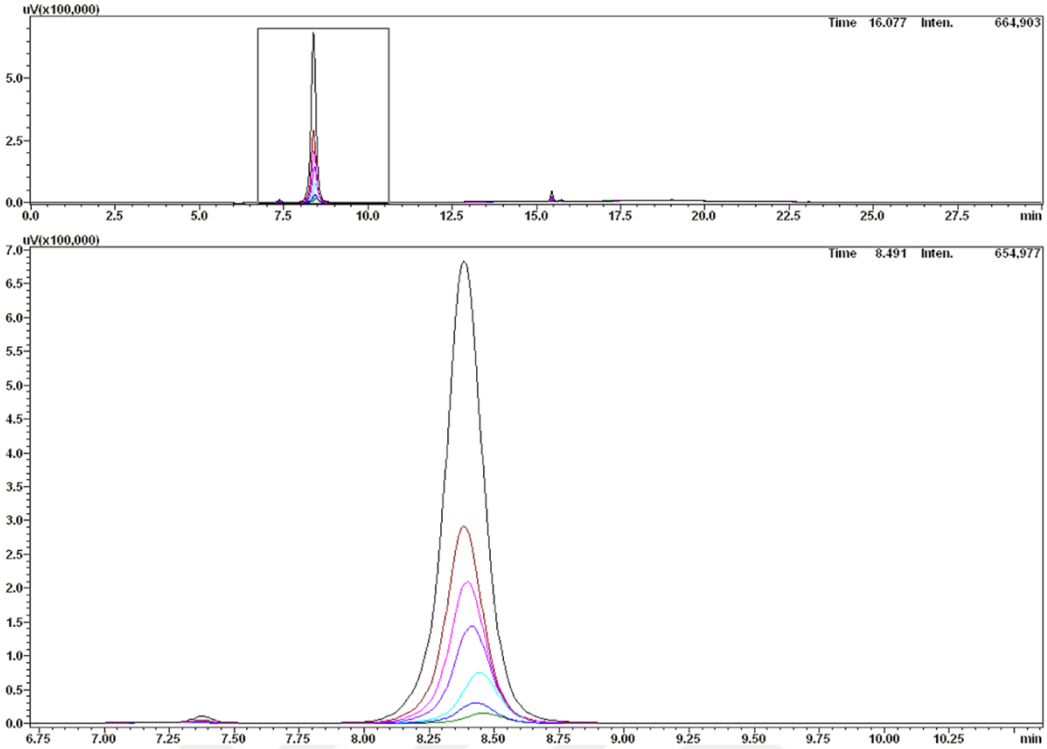
4.1.2. Oksaliplatine Ait Kalibrasyon Çalışması

5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan oksaliplatin standartları LC-MS ile analiz edildi. Örnek olarak 250 µg/ml için 210 ve 254 nm'deki LC-UV kromatogramları Şekil 4-4'te verildi. Alıkonma zamanı 8,4. dk olan pikin oksaliplatine ait olduğu belirlendi. Tüm konsantrasyonlara ait LC-UV kromatogramları da 210 ve 254 nm için sırasıyla Şekil 4-5 ve 4-6'da üst üste çakıştırılmış olarak verildi.

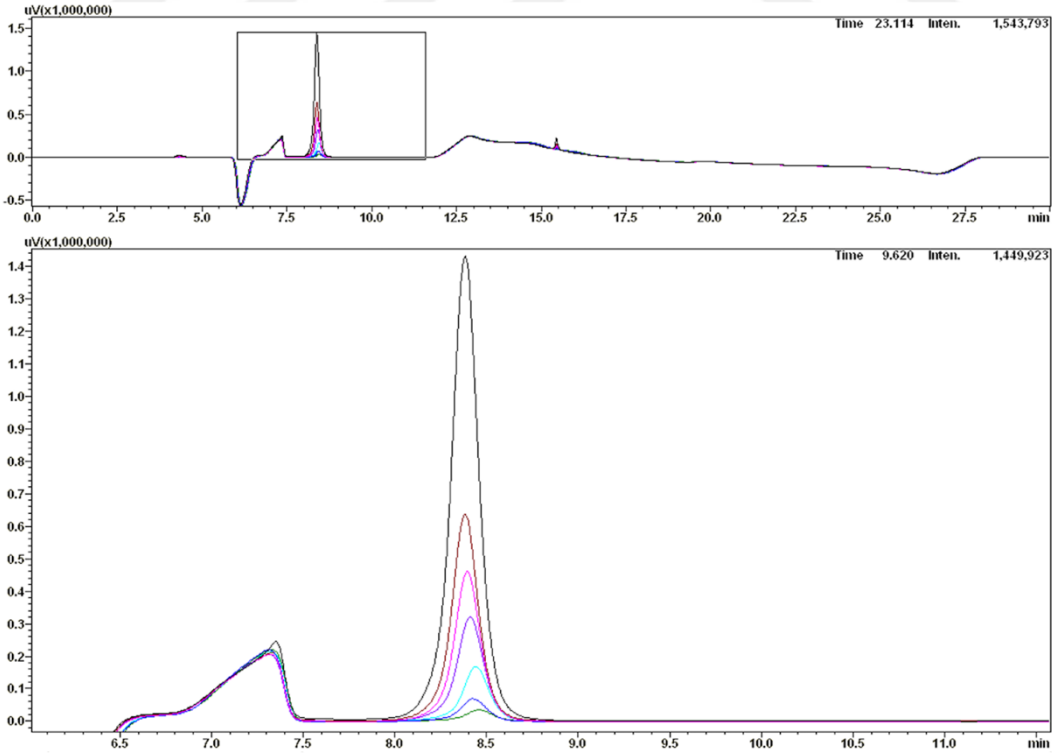
Her bir konsantrasyonun 210 ve 254 nm için elde edilen piklerinin alanlarına karşı standart kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. 210 nm için R^2 = 0,9962 bulunurken 254 nm için R^2 = 0,9991 olarak elde edildi (Şekil 4-7 ve 4-8).



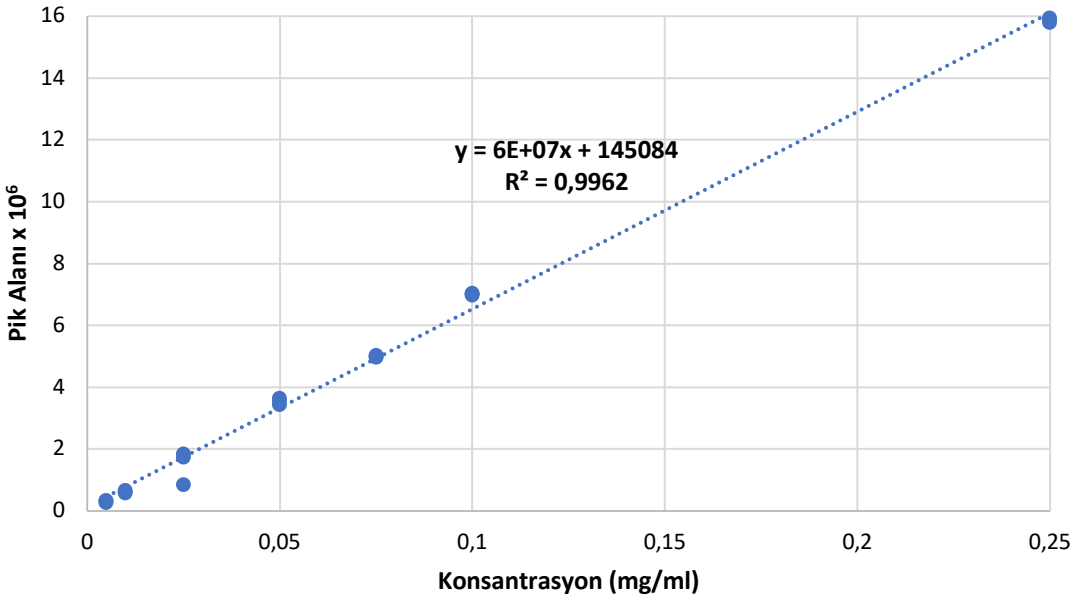
Şekil 4-4: 250 µg/ml oksaliplatine ait 210 ve 254 nm dalga boylarındaki LC kromatogramları



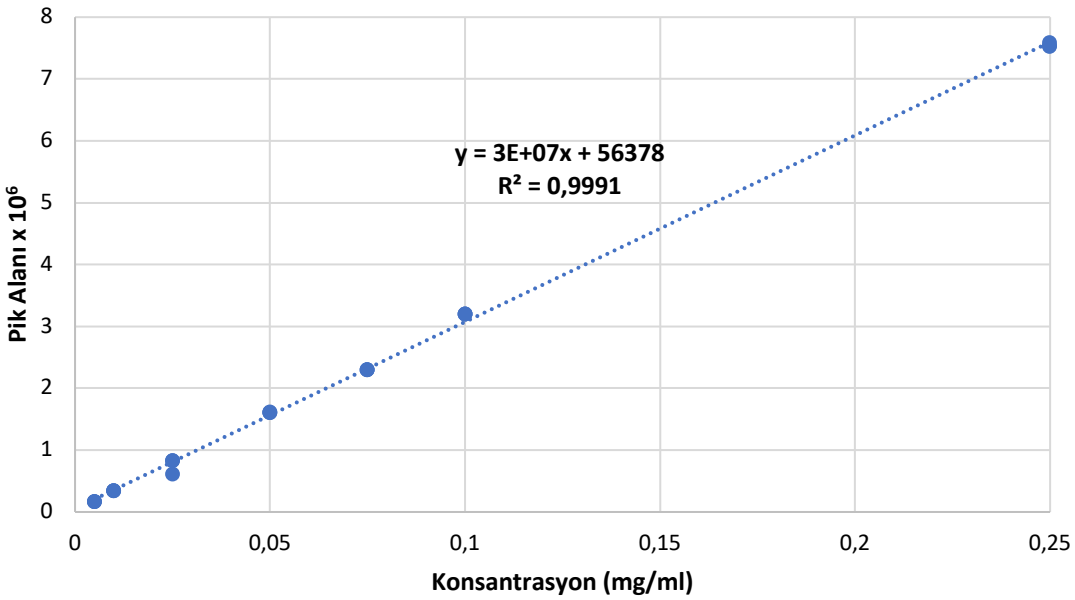
Şekil 4-5: Saflaştırılmış oksaliplatinin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (210 nm)



Şekil 4-6: Saflaştırılmış oksaliplatinin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (254 nm)



Şekil 4-7: Saflaştırılmış oksaliplatinin 210 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 0,9962)

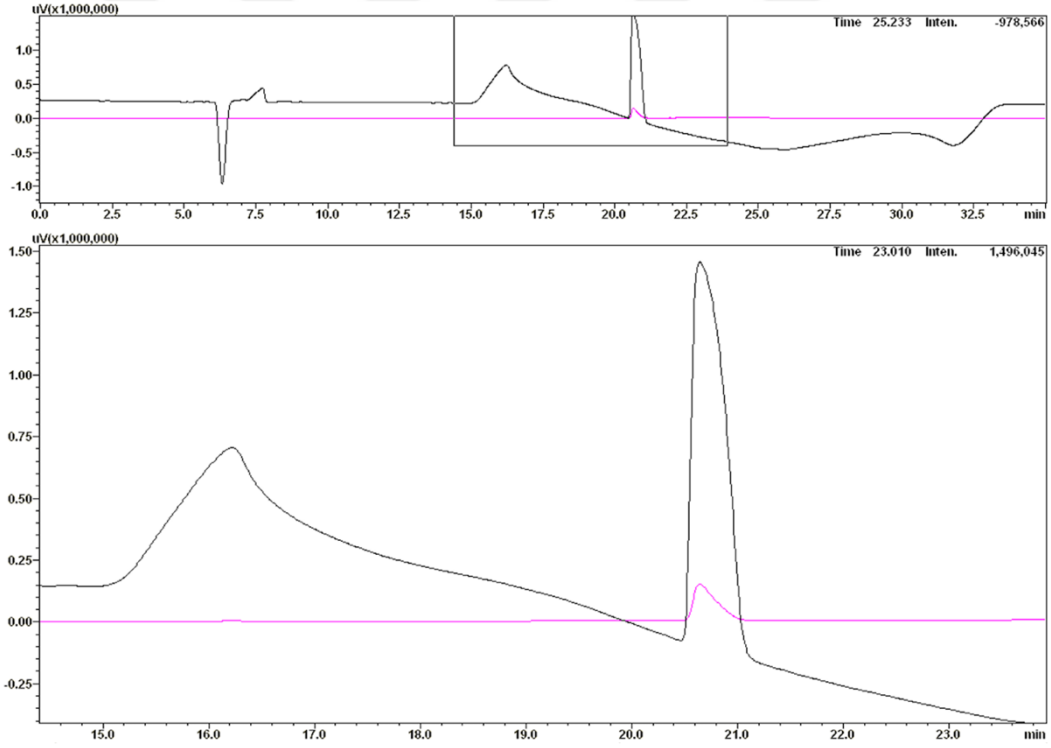


Şekil 4-8: Saflaştırılmış oksaliplatinin 254 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 0,9991)

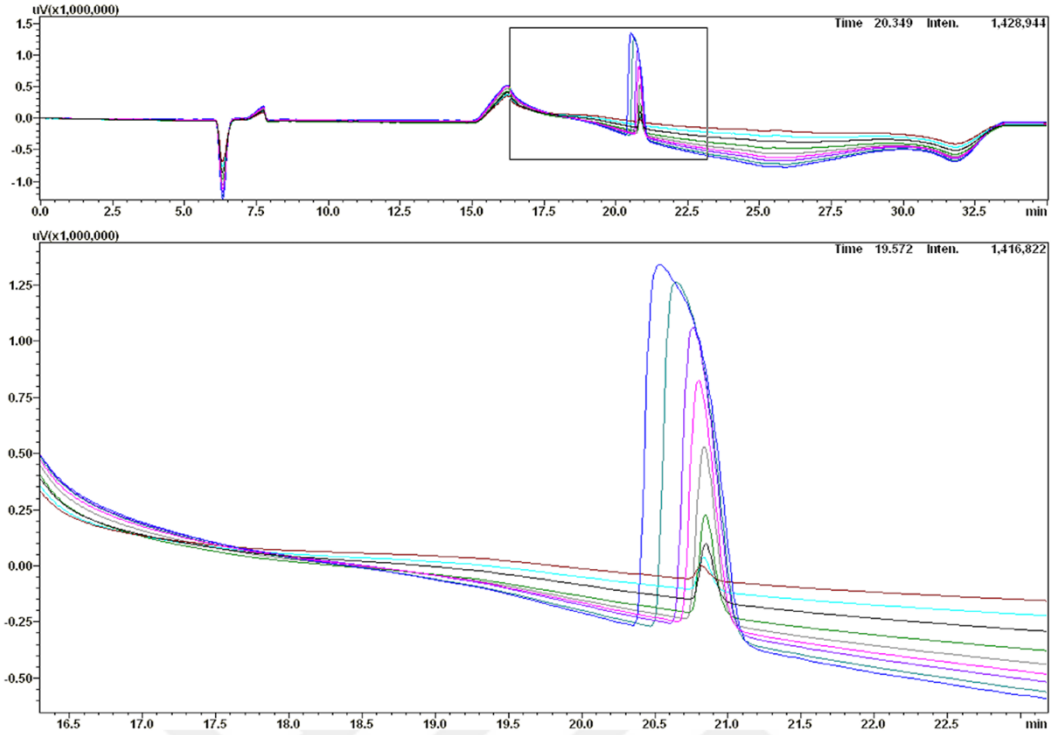
4.1.3. Verapamile Ait Kalibrasyon Çalışması

1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan standart çözeltiler LC-MS ile analiz edildi. Örnek olarak 250 µg/ml için 210 ve 254 nm'deki LC-UV kromatogramları Şekil 4-9'da verildi. Alıkonma zamanı 20,8. dk olan pikin verapamile ait olduğu belirlendi. Tüm konsantrasyonlara ait LC-UV kromatogramları da 210 ve 254 nm için sırasıyla Şekil 4-10 ve 4-11'de üst üste çakıştırılmış olarak verildi.

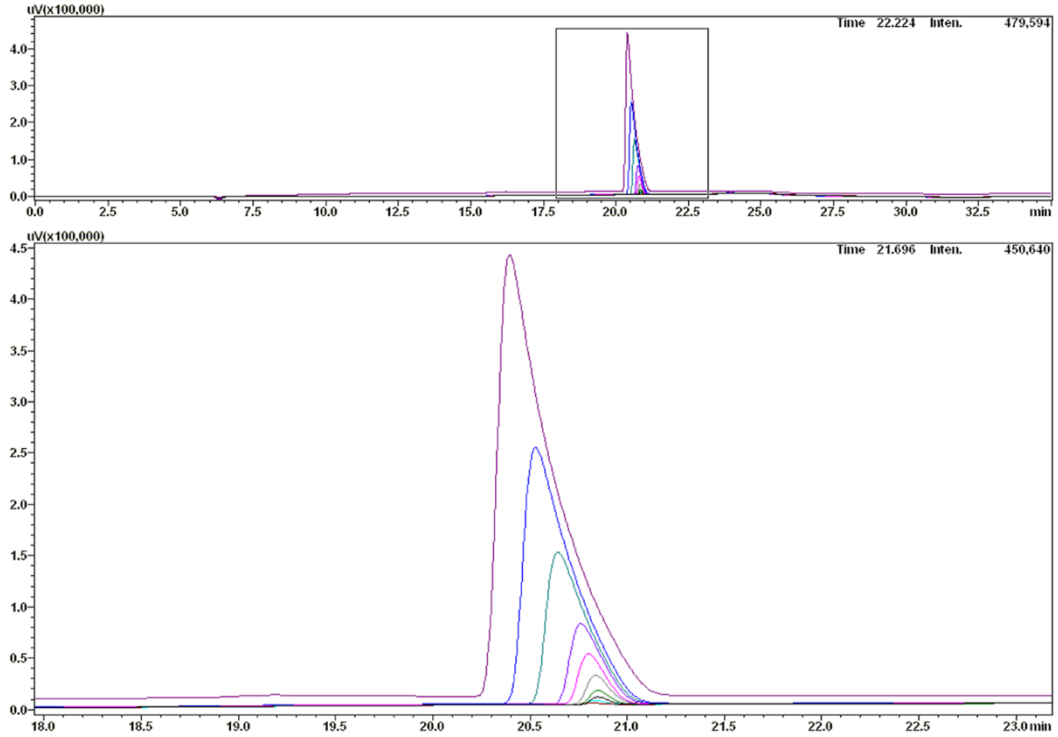
Her bir konsantrasyonun 210 ve 254 nm için elde edilen piklerinin alanlarına karşı standart kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. 210 nm için R^2 = 0,9935 bulunurken 254 nm için R^2 = 1 olarak elde edildi (Şekil 4-12 ve 4-13).



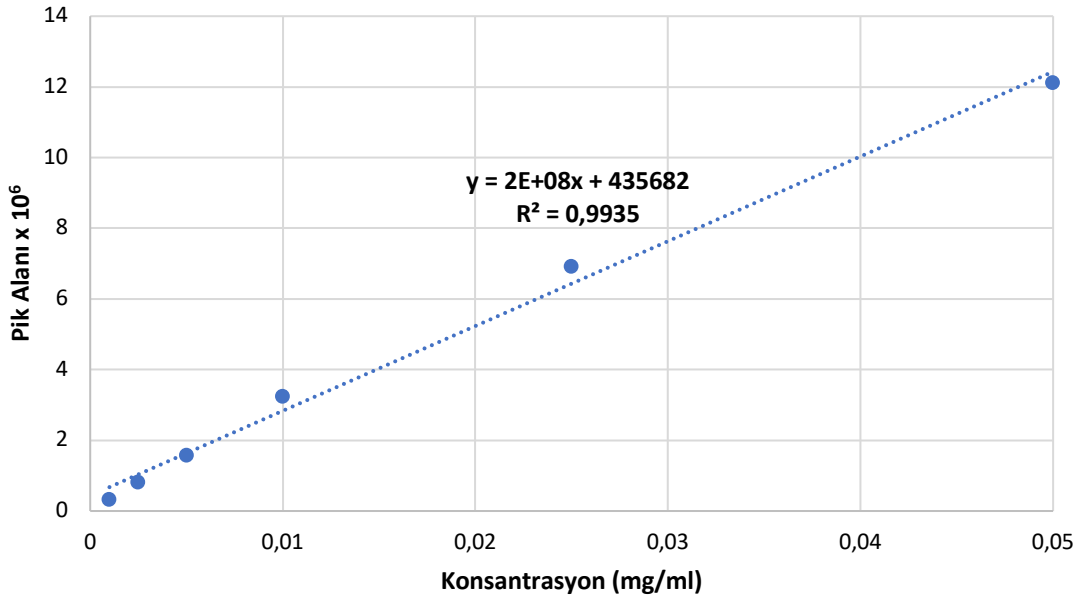
Şekil 4-9: 250 µg/ml verapamile ait 210 ve 254 nm dalga boylarındaki kromatogramları



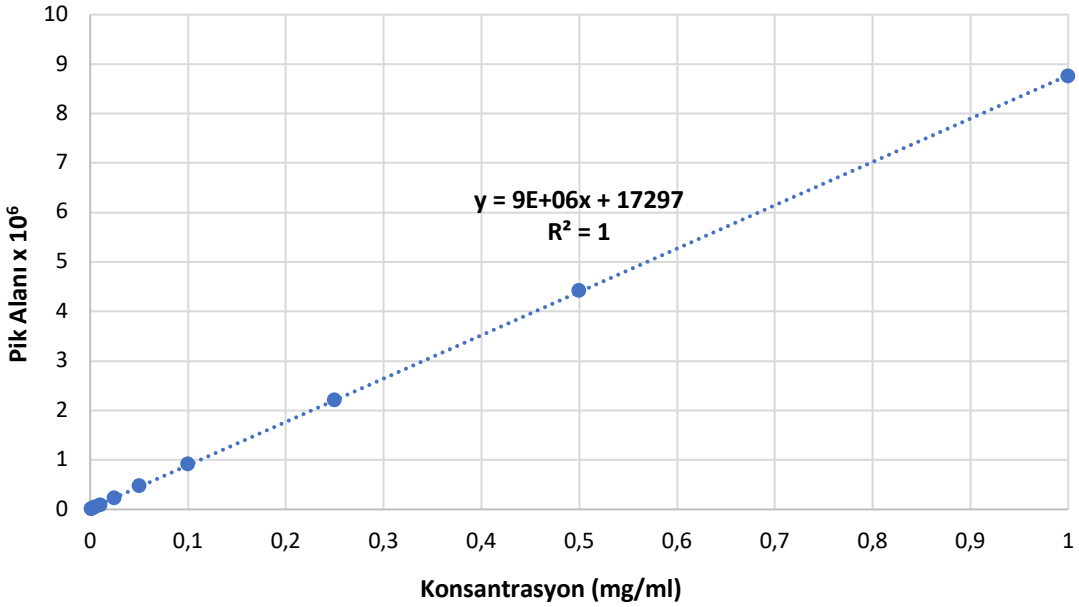
Şekil 4-10: Verapamilin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (210 nm)



Şekil 4-11: Verapamilin hazırlanan tüm konsantrasyonlarına ait üst üste çakıştırılmış LC-UV kromatogramları (254 nm)

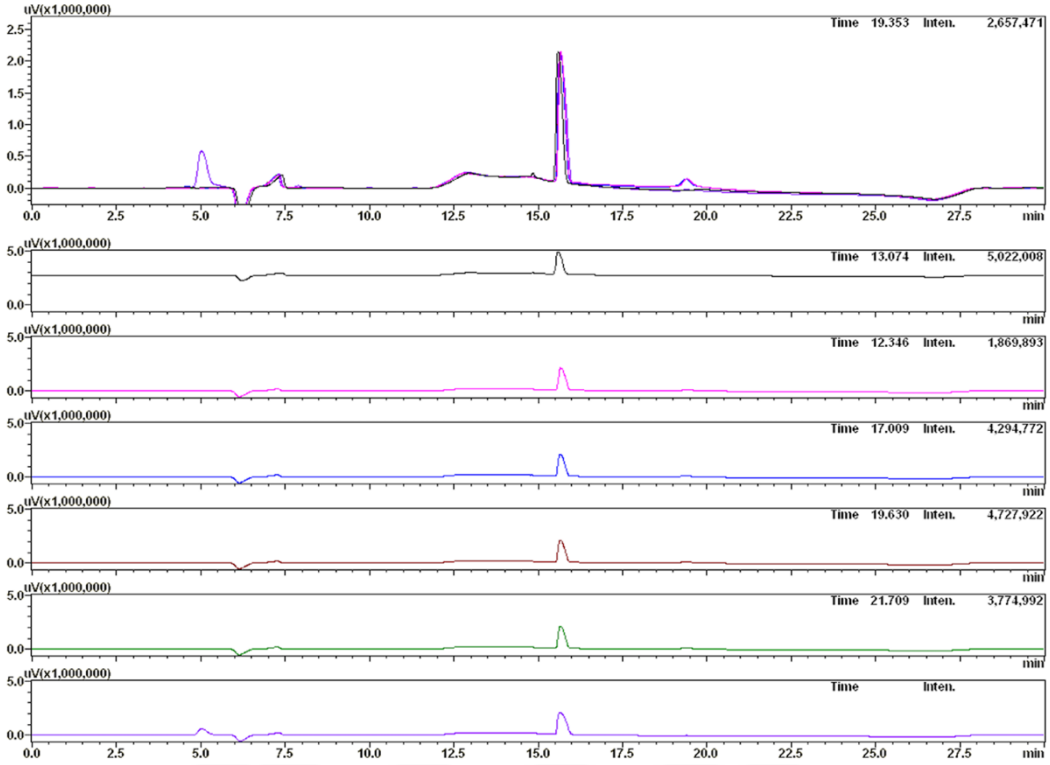


Şekil 4-12: Verapamilin 210 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 0,9935)

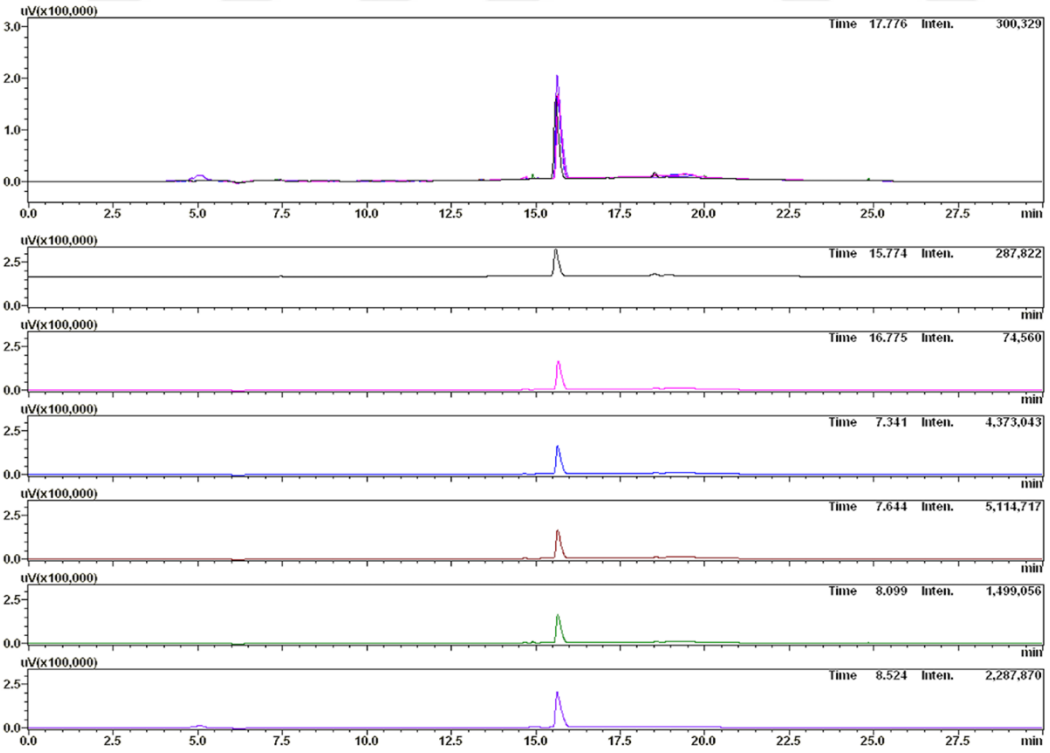


Şekil 4-13: Verapamilin 254 nm dalga boyundaki kalibrasyon grafiği (N = 3, R^2 = 1)

Ayrıca, verapamilin 37 ºC'deki stabilitesini kontrol etmek için su banyolu bir inkübatörde 14 günlük bir stabilizasyon çalışması yapıldı. 1 mg/ml standart verapamil %5'lik dekstroz içerisinde çözülerek inkübe edildi. Stabilite, LC-MS cihazı ile kromatografik olarak kontrol edildi. 14 gün sonunda pik alanlarında önemli bir değişim olmadığı ve molekülün stabilitesini koruduğu gözlendi (Şekil 4-14-15).



Şekil 4-14: 1 mg/ml verapamilin 1., 2., 4., 24. saat ve 7., 14. güne (yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla) ait stabilizasyon kromatogramları (210 nm)



Şekil 4-15: 1 mg/ml verapamilin 1., 2., 4., 24. saat ve 7., 14. güne (yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla) ait stabilizasyon kromatogramları (254 nm)

4.1.4. Nanopartiküllerin Üretilmesi, Karakterizasyonu ve Salım Profillerinin İncelenmesi

4.1.4.1. Enkapsülasyon Etkinliği (EE), İlaç Yükleme Kapasitesinin (DL) Belirlenmesi ve Dinamik, Elektroforetik Işık Saçılımı Analizleri

Çalışma kapsamında üretilen formülasyonların boyut, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI) ve reaksiyon verimi (RY) bilgileri Tablo 4-1'de verildi. Sadece boyanın yüklendiği OVP-1 ve boş olarak üretilen OVP-7 için EE ve DL hesaplanmadı. Diğer formülasyonlara ait %EE ve %DL değerleri Tablo 4-2'de verildi. Formülasyonlarda O; oksaliplatini, V; verapamili, P; PLGA'yı temsil etmektedir.

Boş nanopartikülleri ifade eden ve %75 reaksiyon verimi ile elde edilen OVP-7 için 232,10 ± 2,74 nm boyutlarında partiküller üretildi. 0,192 ± 0,002'lik PDI değeri yeterince monodispers partikülleri gösterirken -16,7 ± 1,30 mV'luk zeta potansiyel değeri stabil partiküllere işaret etti.

Sadece floresan boyanın yüklü olduğu OVP-1 için boyut 255,30 ± 4,62 nm, PDI değeri 0,225 ± 0,001 ve zeta potansiyel değeri -15,3 ± 2,45 mV olarak ölçüldü.

Sadece oksaliplatin ve verapamilin yüklü olduğu OVP-2 ve OVP-3 formülasyonlarının boyutları sırasıyla 290,6 ± 10,45 ve 288,70 ± 1,17 nm iken oksaliplatin ve verapamil bir arada yüklendiklerinde (OVP-4) boyut biraz artarak 300,4 ± 6,55 nm oldu. OVP-5 formülasyonunda oksaliplatin ve verapamilin yanı sıra floresan boyanın da yüklenmesi ile boyutta anlamlı bir fark olmadı ve boyut 299,70 ± 7,35 nm ölçüldü. OVP-2-5 için zeta potansiyel değerleri -12,8 ± 0,31 ile -14,5 ± 0,48 mV arasında değişti ve bu değerler boş nanopartiküllerin (OVP-7) zeta potansiyeli ile çok farklı değildi.

Tüm formülasyonlar için PDI değeri 0,3'ün altındaydı. Bu da bize üretilen nanopartiküllerin monodisperse yakın partiküller olduğunu gösterdi.

100 mg PLGA'nın kullanıldığı OVP-1-6 formülasyonları için reaksiyon verimi %43,5 ile %66,7 arasında değişti. 50 mg PLGA'nın kullanıldığı OVP-8-11 formülasyonları için reaksiyon verimi %27,3 ile %36,4 arasında değişti. PLGA miktarındaki düşüşle beraber reaksiyon veriminin azalması beklenen bir durumdu.

OVP-8-11 formülasyonlarında başlangıçtaki 100 mg yerine 50 mg PLGA kullanılarak nanopartikül başına düşen etken madde oranının arttırılması düşünüldü. OVP-8 ve OVP-9 için 5'er mg oksaliplatin ve verapamil kullanılırken OVP-10'da 10 mg verapamil kullanıldı. Oksaliplatin miktarı 5 mg'da sabit tutuldu, çünkü 10 mg oksaliplatin kullanılan OVP-6 formülasyonunda boyutta çok artış oldu. Oksaliplatin ve verapamil sabit tutulup PLGA miktarı düşürüldüğünde boyutta çok önemli bir değişiklik olmazken nanopartikül başına düşen etken madde oranında bir miktar artış olmuştur. Özellikle verapamilin miktarının 5 mg yerine 10 mg yapıldığı OVP-10'da boş nanopartiküllere yakın bir boyut elde edilirken hem oksaliplatin hem de verapamilin nanopartiküle oranında belirgin bir artış sağlandı (DL: O = %23, V = %41). Bu yüzden OVP-10 formülasyonu optimize nanopartikül olarak belirlendi. OVP-11 formülasyonunda, OVP-10 formülasyonundaki tüm değerler tamamıyla aynı tutulup immünfloresan görüntülerinde kullanılmak üzere sadece FITC eklendi.

Tablo 4-1: Nano-formülasyonların boyut, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI) ve reaksiyon verimi (RY) değerleri

Formülasyon	Boyut (nm)	Zeta potansiyeli (mV)	Polidispersite indeksi, PDI	Reaksiyon verimi, RY (%)
OVP-1	255,30 ± 4,62	-15,3 ± 2,45	0,225 ± 0,001	43,6
OVP-2	290,6 ± 10,45	-12,8 ± 0,31	0,247 ± 0,004	66,7
OVP-3	288,70 ± 1,17	-13,6 ± 0,23	0,221 ± 0,010	64,8
OVP-4	300,4 ± 6,55	-14,5 ± 0,48	0,238 ± 0,004	59,1
OVP-5	299,70 ± 7,35	-13,7 ± 0,34	0,242 ± 0,006	58,6
OVP-6	334,70 ± 5,21	-11,7 ± 0,21	0,239 ± 0,016	63,6
OVP-7	232,10 ± 2,74	-16,7 ± 1,30	0,192 ± 0,002	75,0
OVP-8	262,20 ± 2,48	-17,6 ± 4,17	0,218 ± 0,012	36,4
OVP-9	258,74 ± 3,52	-16,2 ± 3,63	0,223 ± 0,003	36,4
OVP-10	222,00 ± 0,84	-17,4 ± 2,87	0,084 ± 0,022	30,7
OVP-11	240,80 ± 1,82	-17,1 ± 2,45	0,111 ± 0,012	27,3

PDI: polidispersite indeksi, RY: reaksiyon verimi, OVP-1: 100 mg PLGA + 1 mg FITC, OVP-2: 5 mg oksaliplatin + 100 mg PLGA, OVP-3: 5 mg verapamil + 100 mg PLGA, OVP-4: 5 mg oksaliplatin + 5 mg verapamil + 100 mg PLGA, OVP-5: 5 mg oksaliplatin + 5 mg verapamil + 100 mg PLGA + 1 mg FITC, OVP-6: 10 mg oksaliplatin + 100 mg PLGA, OVP-7: 100 mg PLGA (yükleme yapılmamış, boş), OVP-8: 5 mg verapamil + 50 mg PLGA, OVP-9: 5 mg oksaliplatin + 50 mg PLGA, OVP-10: 5 mg oksaliplatin + 10 mg verapamil + 50 mg PLGA, OVP-11: 5 mg oksaliplatin + 10 mg verapamil + 50 mg PLGA + 1 mg FITC.

Tablo 4-2: Nano-formülasyonların enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) değerleri

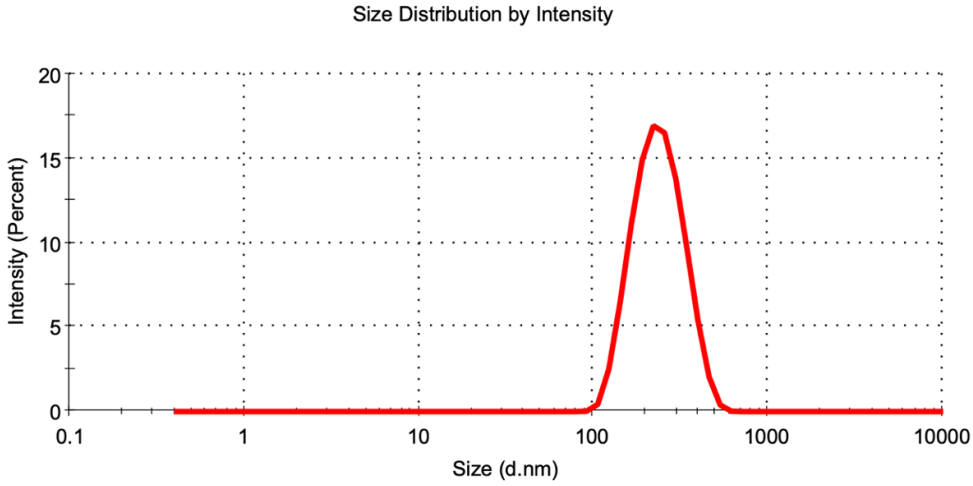
Formülasyon	Enkapsülasyon etkinliği, EE (%)		İlaç yükleme kapasitesi, DL (%)	
	Oksaliplatin (O)	Verapamil (V)	Oksaliplatin (O)	Verapamil (V)
OVP-1	-	-	-	-
OVP-2	78	-	8	-
OVP-3	-	57	-	4
OVP-4	35	56	2	4
OVP-5	42	65	3	6
OVP-6	90	-	18	-
OVP-7	-	-	-	-
OVP-8	-	85	-	12
OVP-9	90	-	2	-
OVP-10	90	82	23	41
OVP-11	90	79	28	44

EE: enkapsülasyon etkinliği, DL: ilaç yükleme kapasitesi, OVP-1: 100 mg PLGA + 1 mg FITC, OVP-2: 5 mg oksaliplatin + 100 mg PLGA, OVP-3: 5 mg verapamil + 100 mg PLGA, OVP-4: 5 mg oksaliplatin + 5 mg verapamil + 100 mg PLGA, OVP-5: 5 mg oksaliplatin + 5 mg verapamil + 100 mg PLGA + 1 mg FITC, OVP-6: 10 mg oksaliplatin + 100 mg PLGA, OVP-7: 100 mg PLGA (yükleme yapılmamış, boş), OVP-8: 5 mg verapamil + 50 mg PLGA, OVP-9: 5 mg oksaliplatin + 50 mg PLGA, OVP-10 (OVP): 5 mg oksaliplatin + 10 mg verapamil + 50 mg PLGA, OVP-11 (OVP-F): 5 mg oksaliplatin + 10 mg verapamil + 50 mg PLGA + 1 mg FITC.

4.1.4.2. Polimer Nanopartiküllerin Dinamik Işık Saçılımı ile Karakterizasyonu

Optimize olarak seçilen OVP-10 ve OVP-11 nanopartiküllerinin boyut grafikleri sırasıyla Şekil 4-16 ve 4-17'de verildi.

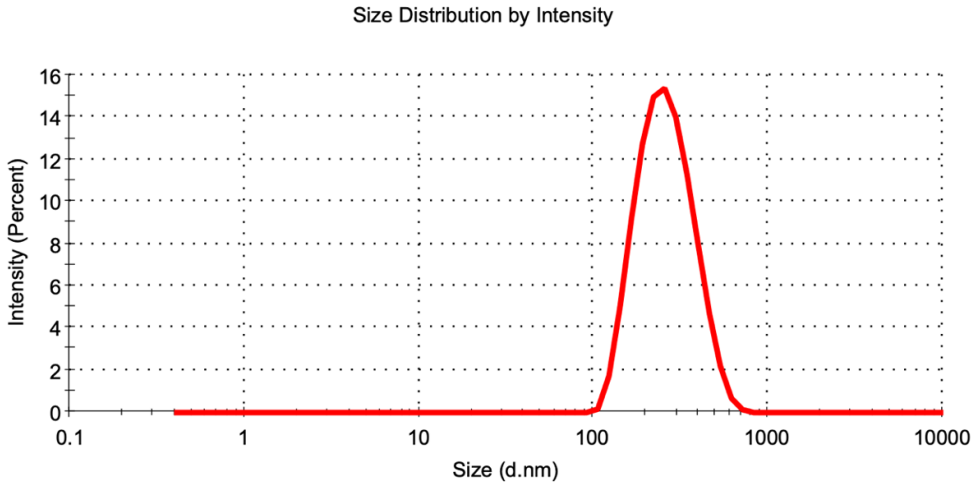
			Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	222,0	Peak 1:	245,1	100,0	78,79
PdI:	0,084	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept:	0,943	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality	Good				



Şekil 4-16: OVP nanopartiküllerinin boyut grafiği

OVP-F: oksaliplatin + verapamil + FITC.

			Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	240,8	Peak 1:	270,6	100,0	98,43
PdI:	0,111	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept:	0,968	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality	Good				

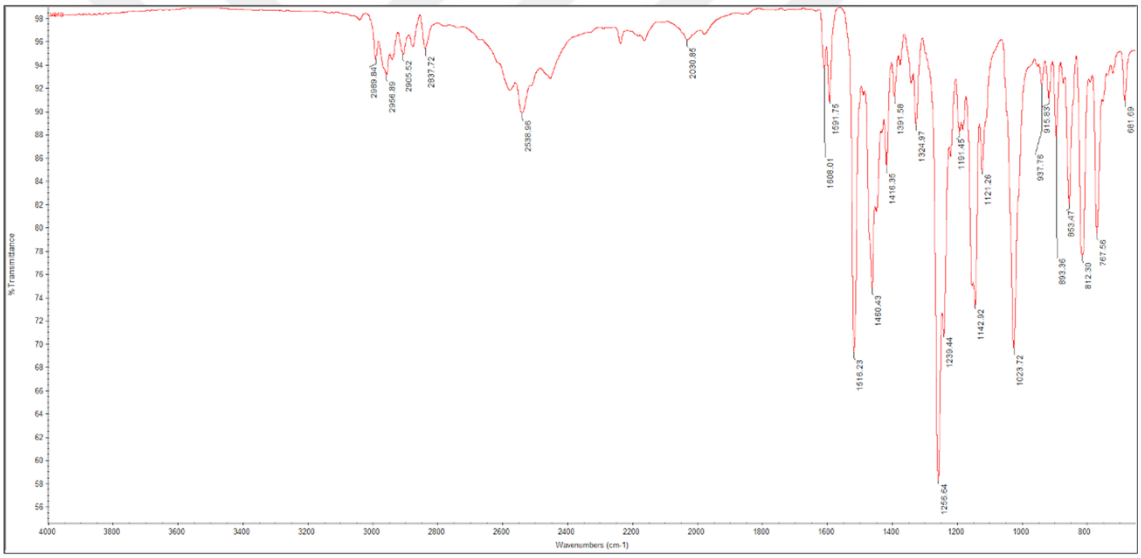


Şekil 4-17: OVP-F nanopartiküllerinin boyut grafiği

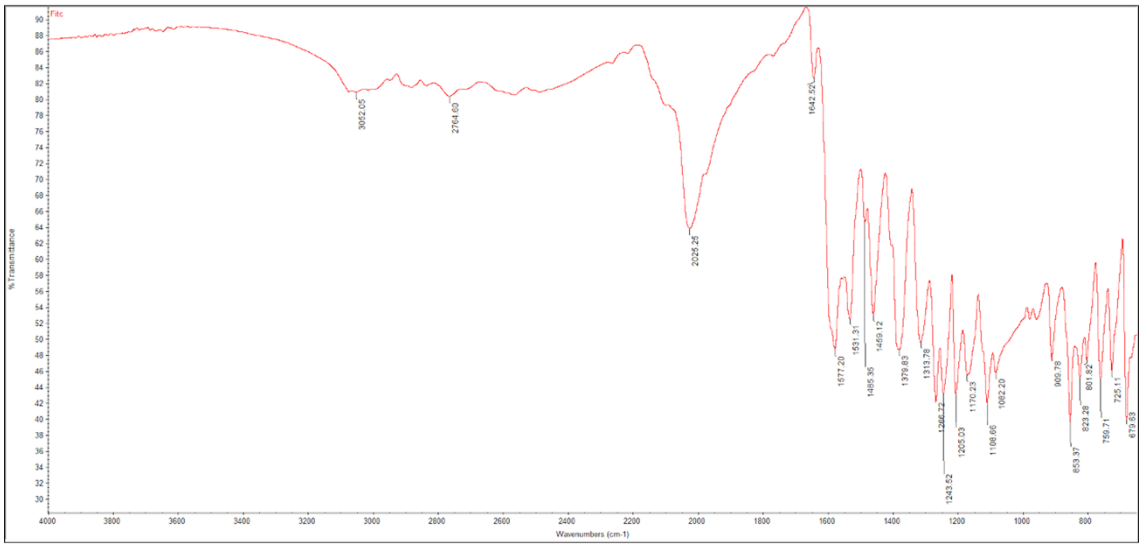
OVP-F: oksaliplatin + verapamil + FITC.

4.1.4.3. FT-IR ve SEM Analizleri

Optimize olarak seçilen OVP-10 ve OVP-11 nanopartiküllerin yüzey fonksiyonel grup bilgileri FT-IR ile değerlendirildi. Nanopartiküllerin yüzeyine etken madde tutunması olup olmadığının anlaşılması için tüm örneklere ve etken maddelerin kendilerine FT-IR analizi yapıldı (Şekil 4-18-22). Analizler sonucunda yükleme yapılan nanopartiküllerin FT-IR spektrumlarında spesifik PLGA bantları görülmekte ve yüklenen etken maddelere ait bantlar görülmemektedir. Ayrıca etken madde yüklü nanopartiküllerin FT-IR spektrumları boş PLGA nanopartiküllerinin spektrumu ile benzer karakter sergiledi. Yani hem OVP-10'da hem de OVP-11'de yüzeye tutunma görülmedi. Bu durum, enkapsülasyonun başarılı olarak gerçekleştiğini göstermektedir.

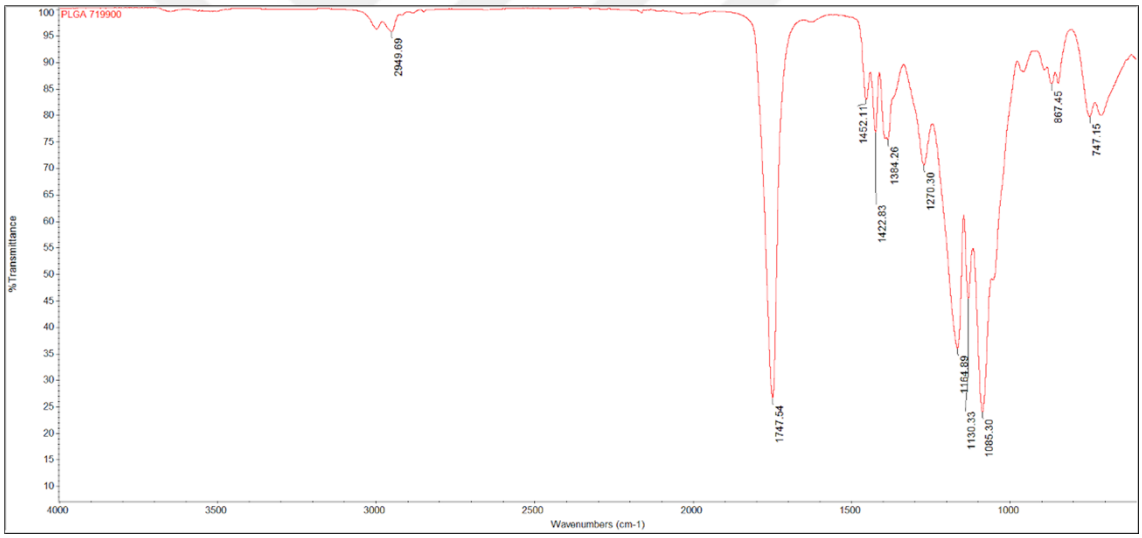


Şekil 4-18: Verapamile ait FT-IR spektrumu



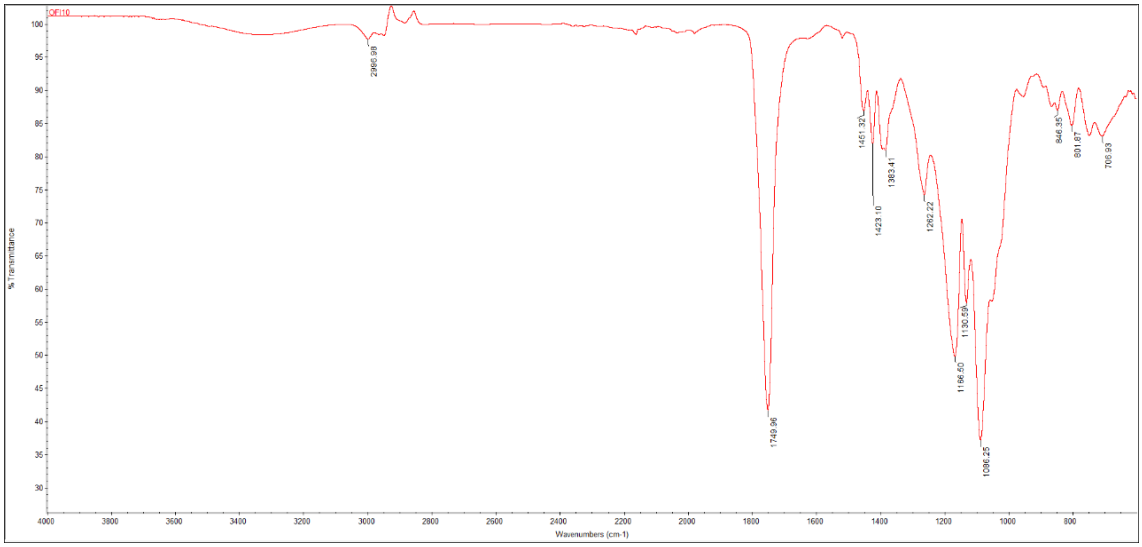
Şekil 4-19: FITC boyasına ait FT-IR spektrumu

FITC: Floresan izotiyosiyanat.



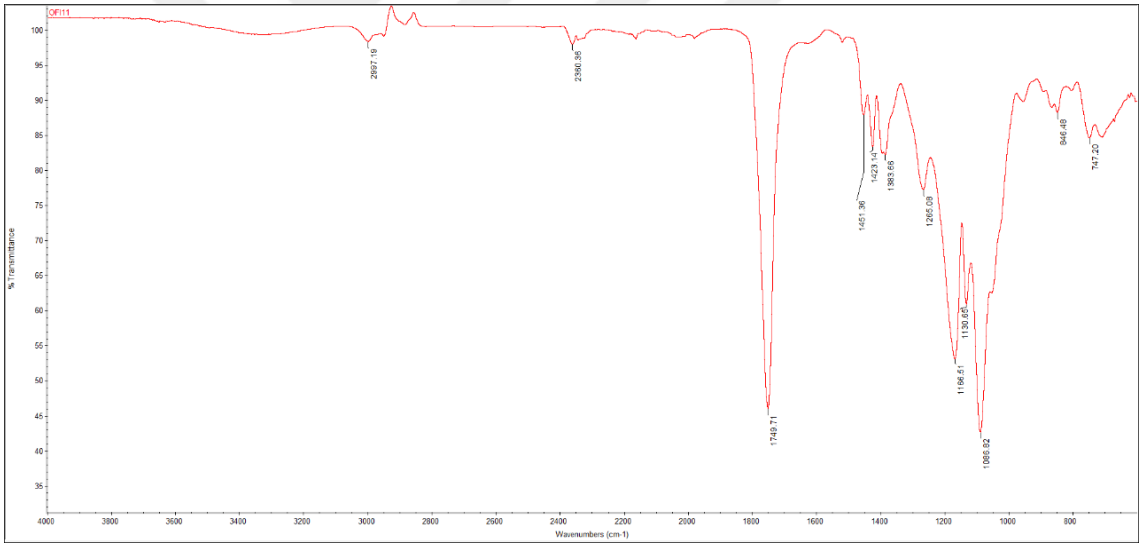
Şekil 4-20: Boş PLGA nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu

PLGA: poli(laktik-ko-glikolik asit).



Şekil 4-21: OVP-10'a ait FT-IR spektrumu

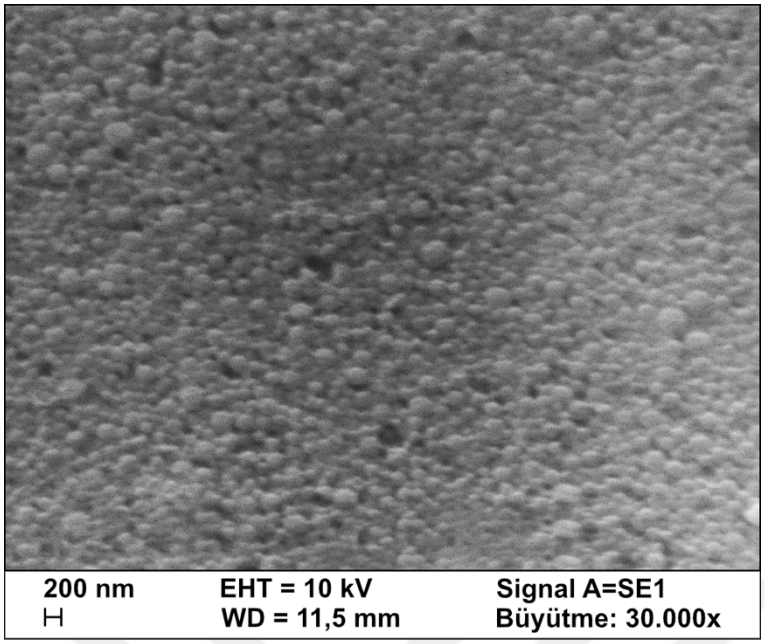
OVP-10: 10 numaralı OVP formülasyonu, OVP: oksaliplatin + verapamil.



Şekil 4-22: OVP-11'e ait FT-IR spektrumu

OVP-11: 11 numaralı OVP-F formülasyonu, OVP-F: oksaliplatin + verapamil + FITC.

Optimize olarak seçilen OVP-10 nanopartiküllerinin morfolojik açıdan incelemesini yapmak için SEM görüntüsü alındı. Şekil 4-23'de verilen görüntüye göre homojen ve eşit boyut dağılımlı küresel yapıdaki pürüzsüz partiküllerin varlığı belirlendi.



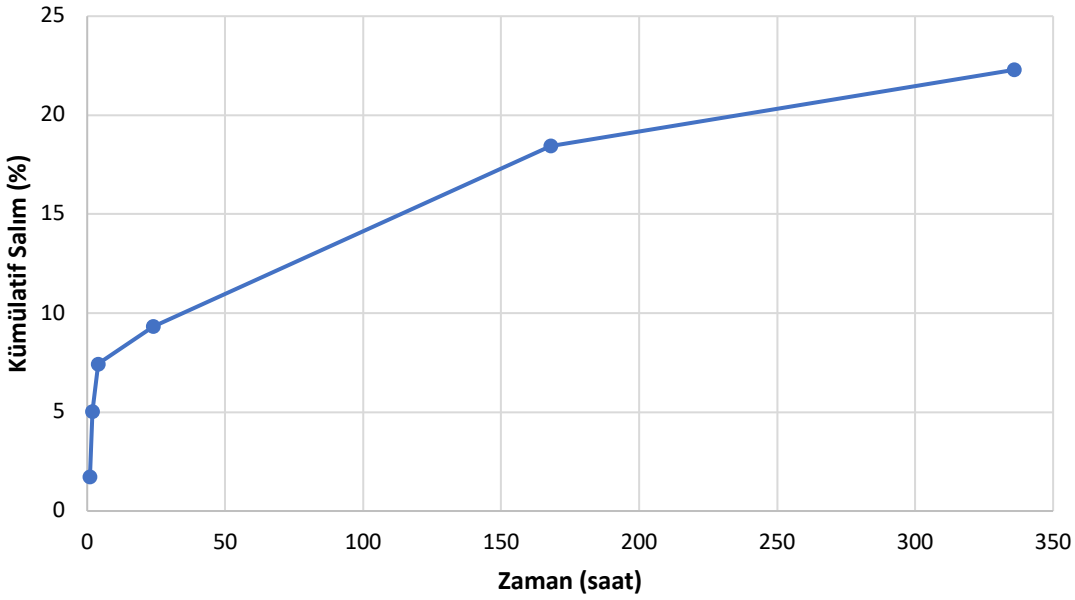
Şekil 4-23: OVP-10'a ait SEM görüntüsü

OVP-10: 10 numaralı OVP formülasyonu, OVP: oksaliplatin + verapamil.

4.1.4.4. In Vitro İlaç Salımı

5 mg OVP-10 nanopartikülü 5 ml %5'lik dekstrozda disperse edilip 37 °C'de inkübe edildi. Örnek, belirli zamanlarda santrifüj edilip üst fazı ayrıldıktan sonra taze dekstroz eklenip inkübasyona devam edildi. Salım profilini incelemek için belirli sürelerde ayrılan üst fazlar LC-ESI-MS ile analiz edilip salınan etken madde miktarı kantitatif olarak tespit edildi. Şekil 4-24'de etken maddenin LC-ESI-MS'de oluşturulan kalibrasyon eğrisi verilmiştir.

Salım profili incelendiğinde ilk 4 saat içerisinde %7,4'lük hızlı salımın ardından 24. saat sonunda kümülatif salım %9,3'e ulaşmıştır. 48. saat itibarıyla kontrollü yavaş salımla beraber yaklaşık %12'ye ulaşmıştır. 7. gün sonunda malzemenin %18'i salınmıştır. Yapılan inceleme 14. gün sonunda sonlandırılmıştır (Şekil 4-24).

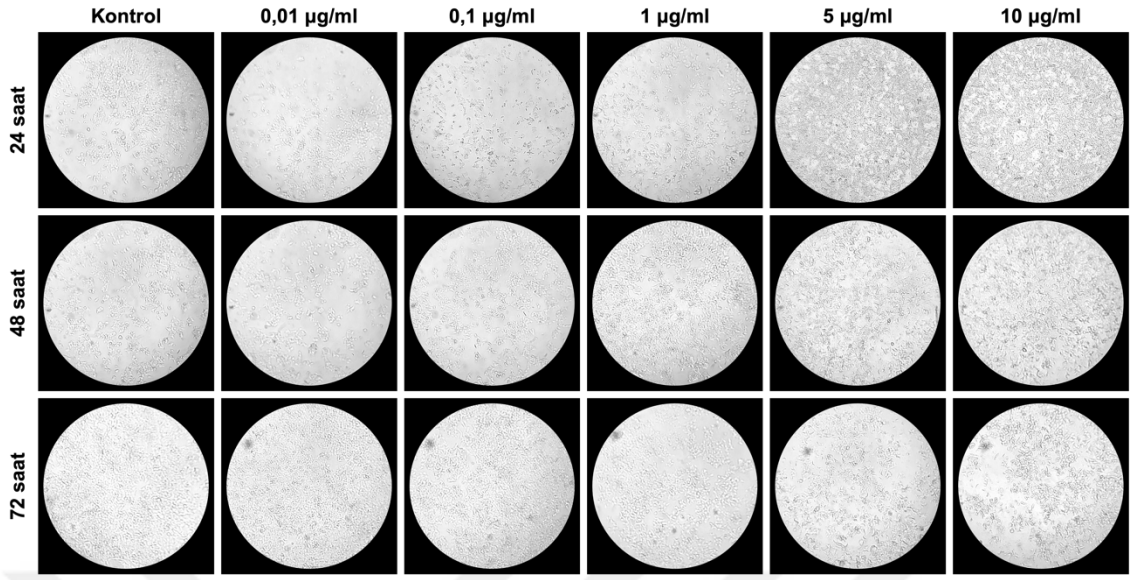


Şekil 4-24: OVP nanopartiküllerinin salım profili

OVP: oksaliplatin + verapamil.

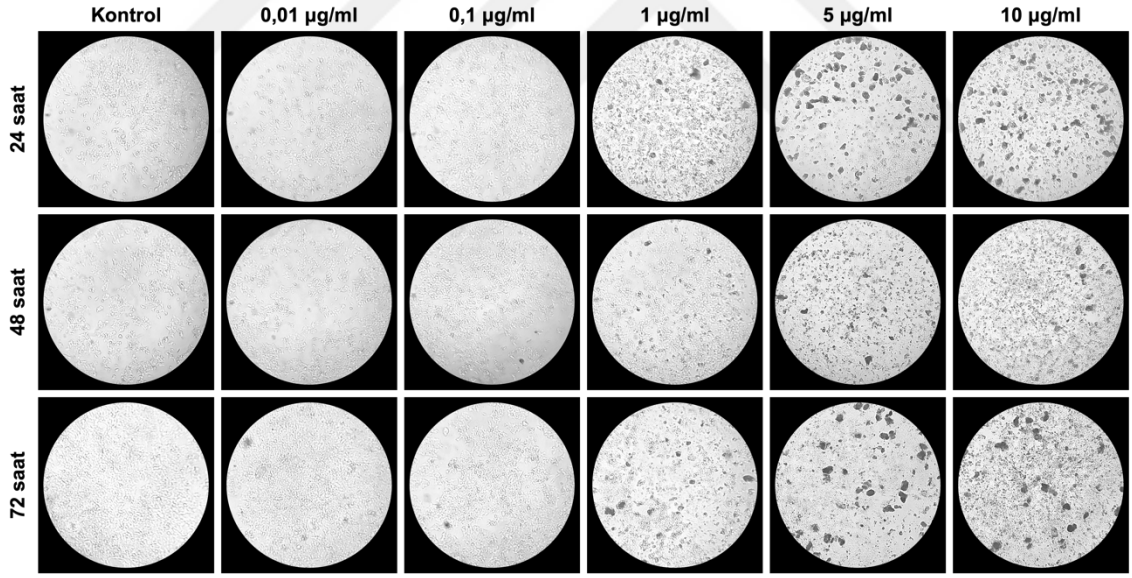
4.2. Sitotoksisite Sonuçları

24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ve PLGA ile ayrı ayrı muamele edilen HCT-116 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri incelendi. OVP konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu gözlenirken, PLGA konsantrasyonunda artış olmasına rağmen hücrelerin canlılıklarını koruduğu görüldü (Şekil 4-25-26).



Şekil 4-25: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin konsantrasyona bağlı ışık mikroskobu görüntüleri

OVP: oksaliplatin + verapamil.

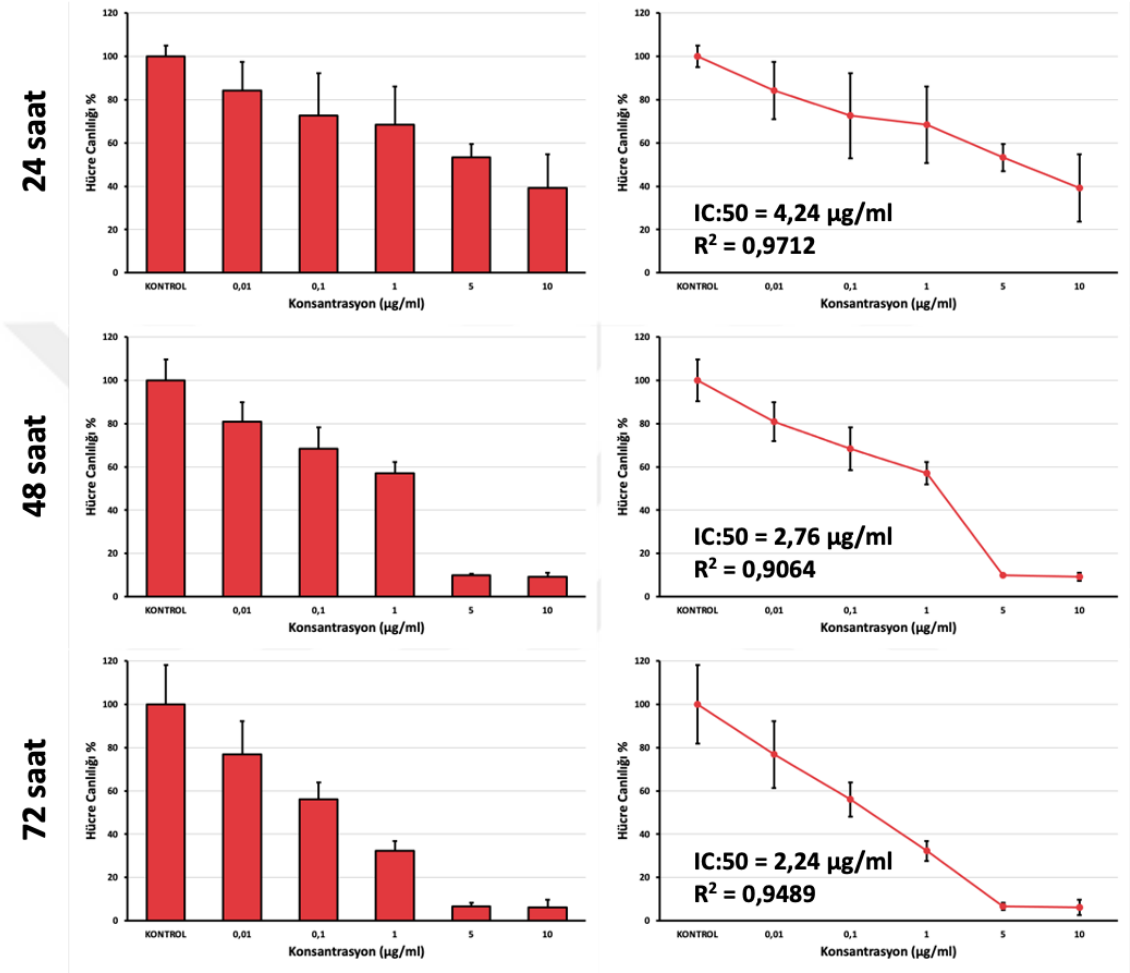


Şekil 4-26: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin konsantrasyona bağlı ışık mikroskobu görüntüleri

PLGA: poli(laktik-ko-glikolik asit).

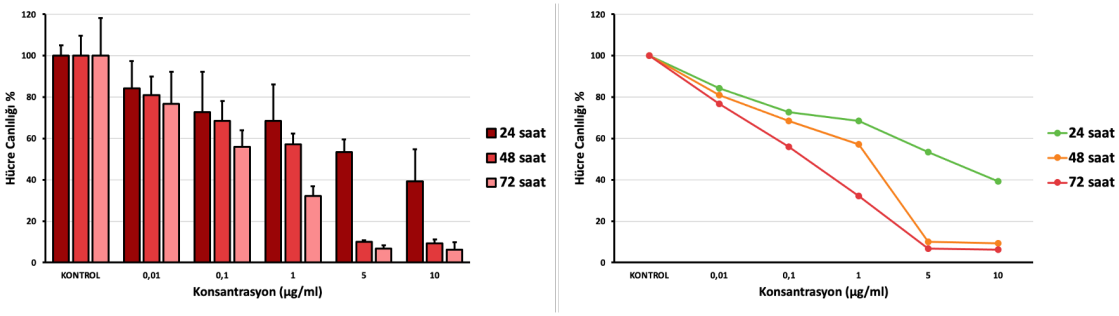
HCT-116 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ile muamele edildi. IC50 değerleri ve MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlendi. Hücre canlılıklarında konsantrasyondaki artışa bağlı olarak azalma olduğu belirlendi. 48 ve 72 saat sonunda 5 ve 10 µg/ml oksaliplatin ile muamele edilen hücrelerin

canlılık yüzdelerindeki azalmanın diğer hücrelere kıyasla daha fazla olduğu belirlendi. 48 ve 72 saat sonunda 10 µg/ml oksaliplatin verilen hücrelerin canlılık yüzdeleri sırasıyla %9 ve %6 olarak belirlendi (Şekil 4-27-28).



Şekil 4-27: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları

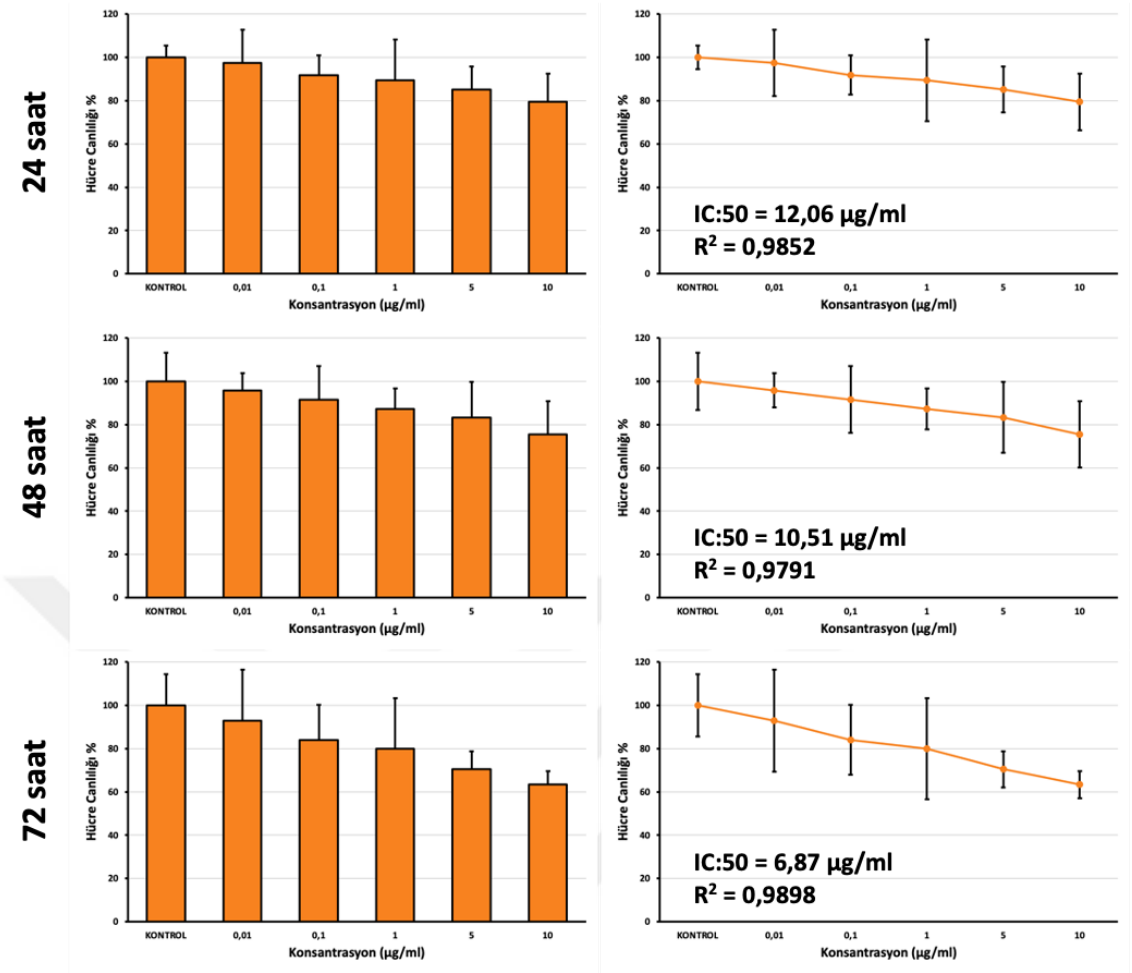
24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, tüm konsantrasyonlarda hücre canlılık yüzdelerinin kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.



Şekil 4-28: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi

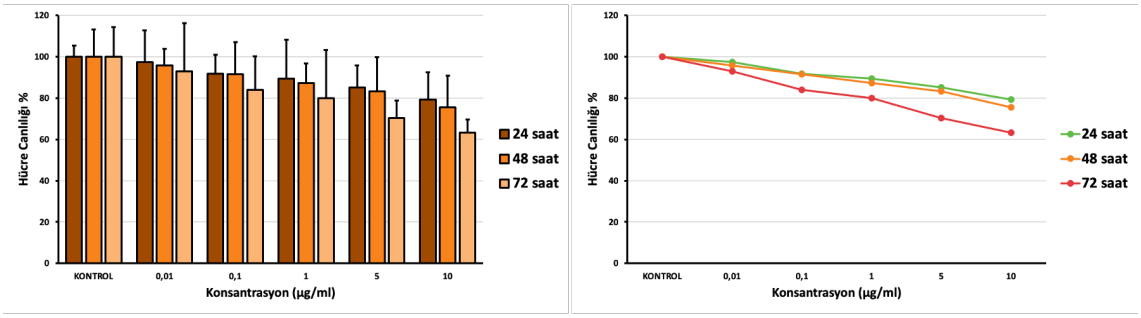
24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, tüm konsantrasyonlarda hücre canlılık yüzdelerinin kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.

HCT-116 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml verapamil ile muamele edildi. IC50 değerleri ve MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlendi. Hücre canlılıklarında konsantrasyondaki artışa bağlı olarak 72 saat sonunda 0,1 ve 1 µg/ml verapamil verilen hücrelerdeki canlılık sırasıyla %84 ve %80 olarak belirlenirken, en yüksek doz olan 10 µg/ml verapamil verilen hücrelerdeki canlılığın %63 olduğu belirlendi. 24 ve 48 saat sonunda 10 µg/ml verapamil verilen hücrelerdeki canlılık sırasıyla %79 ve %76 olarak belirlendi. Diğer canlılık değerleri, bu değerlerden daha yüksek olarak belirlendi (Şekil 4-29-30).



Şekil 4-29: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları

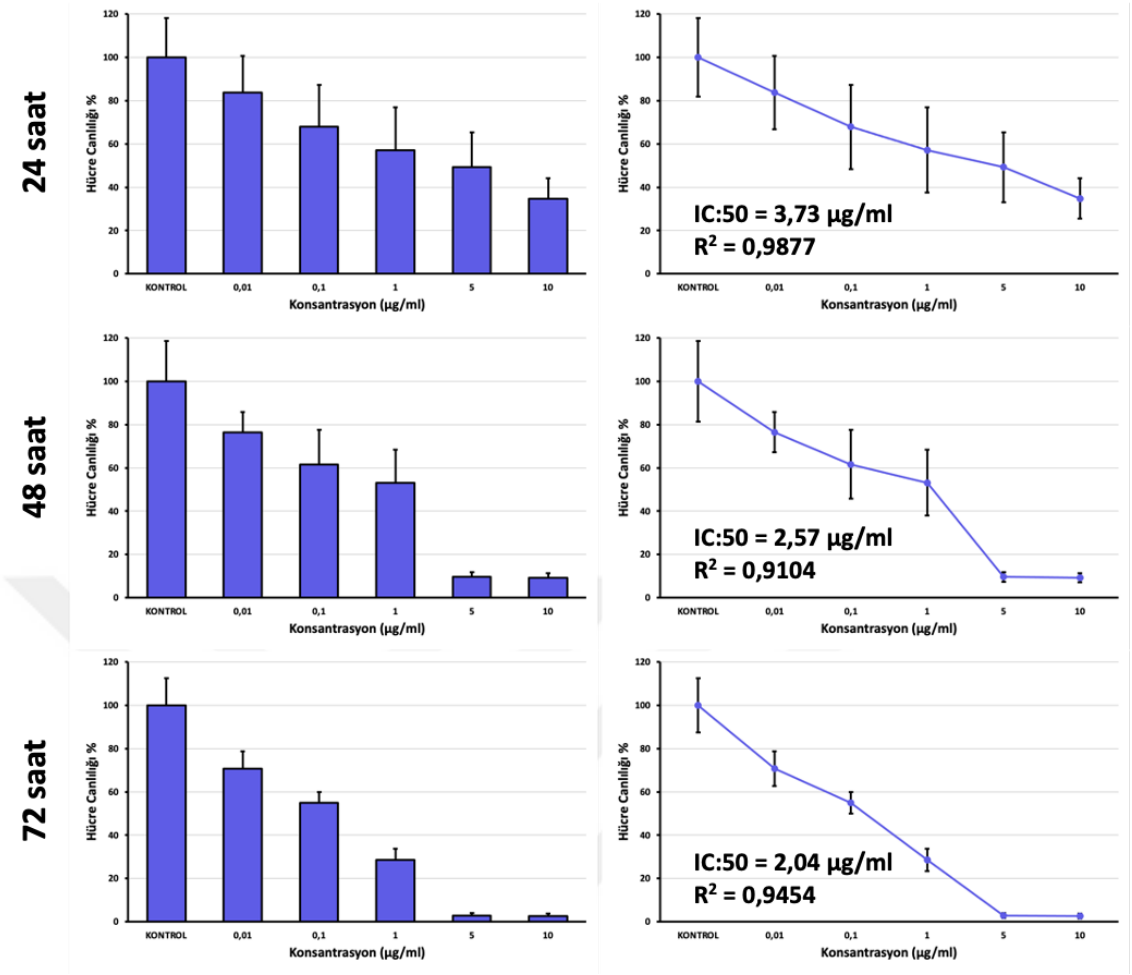
24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 24 ve 72 saat için 5 ve 10 µg/ml, 48 saat için ise 10 µg/ml verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinde, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede farklılık belirlenmedi ($p>0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.



Şekil 4-30: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi

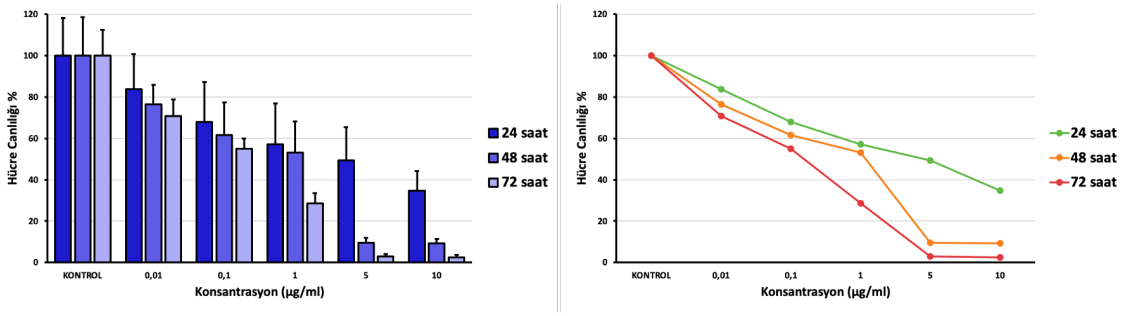
24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 24 ve 72 saat için 5 ve 10 µg/ml, 48 saat için ise 10 µg/ml verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinde, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede farklılık belirlenmedi ($p>0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.

HCT-116 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ve verapamil ile muamele edildi. IC50 değerleri ve MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlendi. Hücre canlılıklarında konsantrasyondaki artışa bağlı olarak azalma olduğu belirlendi. 48 ve 72 saat sonunda 5 ve 10 µg/ml oksaliplatin ve verapamil ile muamele edilen hücrelerin canlılık yüzdelerindeki azalmanın diğer hücrelere kıyasla daha fazla olduğu belirlendi. 48 ve 72 saat sonunda 10 µg/ml oksaliplatin verilen hücrelerin canlılık yüzdeleri sırasıyla %6 ve %2,5 olarak belirlendi (Şekil 4-31-32).



Şekil 4-31: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ve verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları

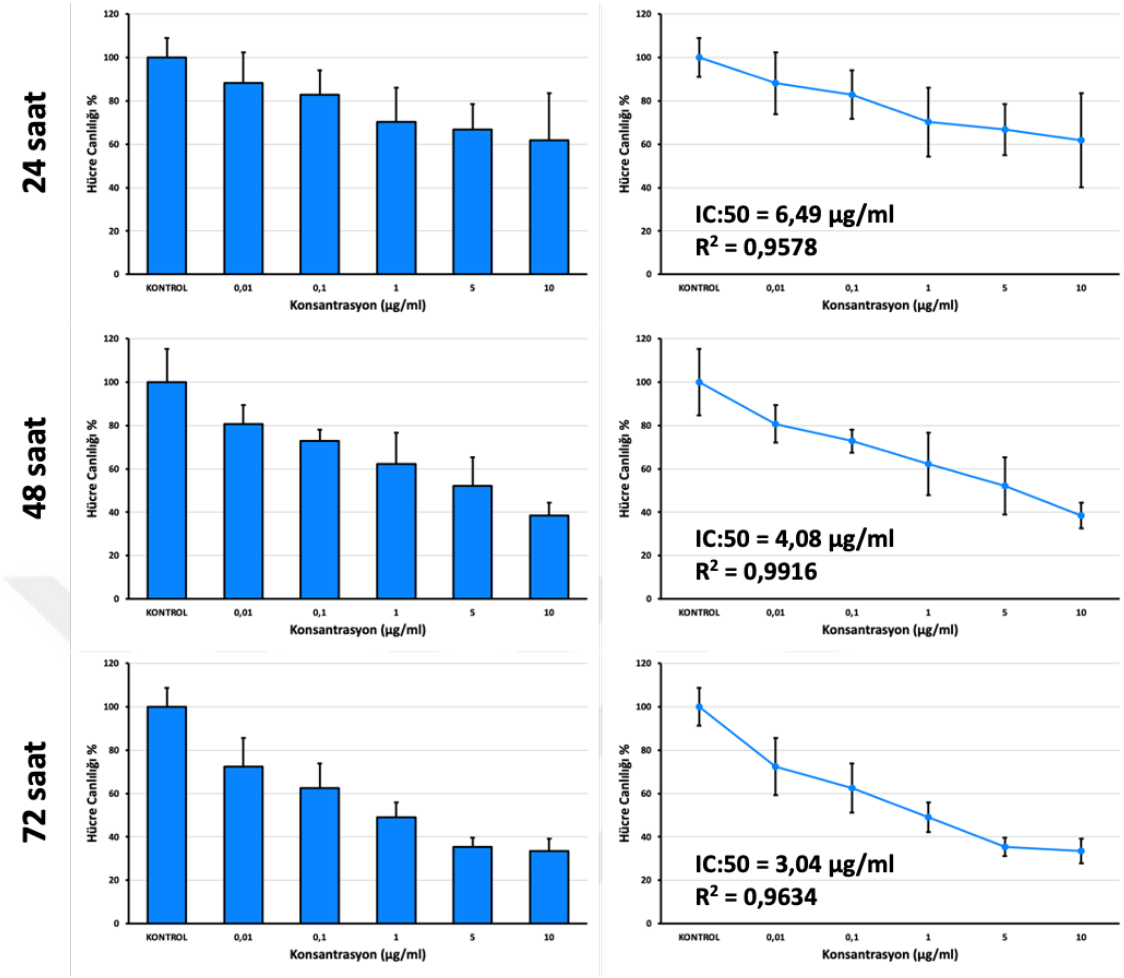
24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca 0,01 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinin, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.



Şekil 4-32: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin ve verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi

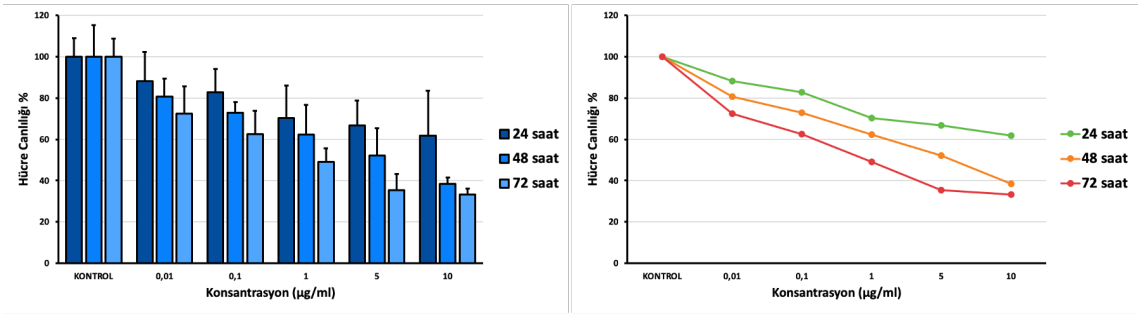
24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca 0,01 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinin, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.

HCT-116 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ile muamele edildi. IC50 değerleri ve MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlendi. Hücre canlılıklarında konsantrasyondaki artışa bağlı olarak azalma olduğu belirlendi. 48 ve 72 saat sonunda 5 ve 10 µg/ml OVP ile muamele edilen hücrelerin canlılık yüzdeleri sırasıyla %39 ve %33 olarak belirlendi (Şekil 4-33-34).



Şekil 4-33: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları

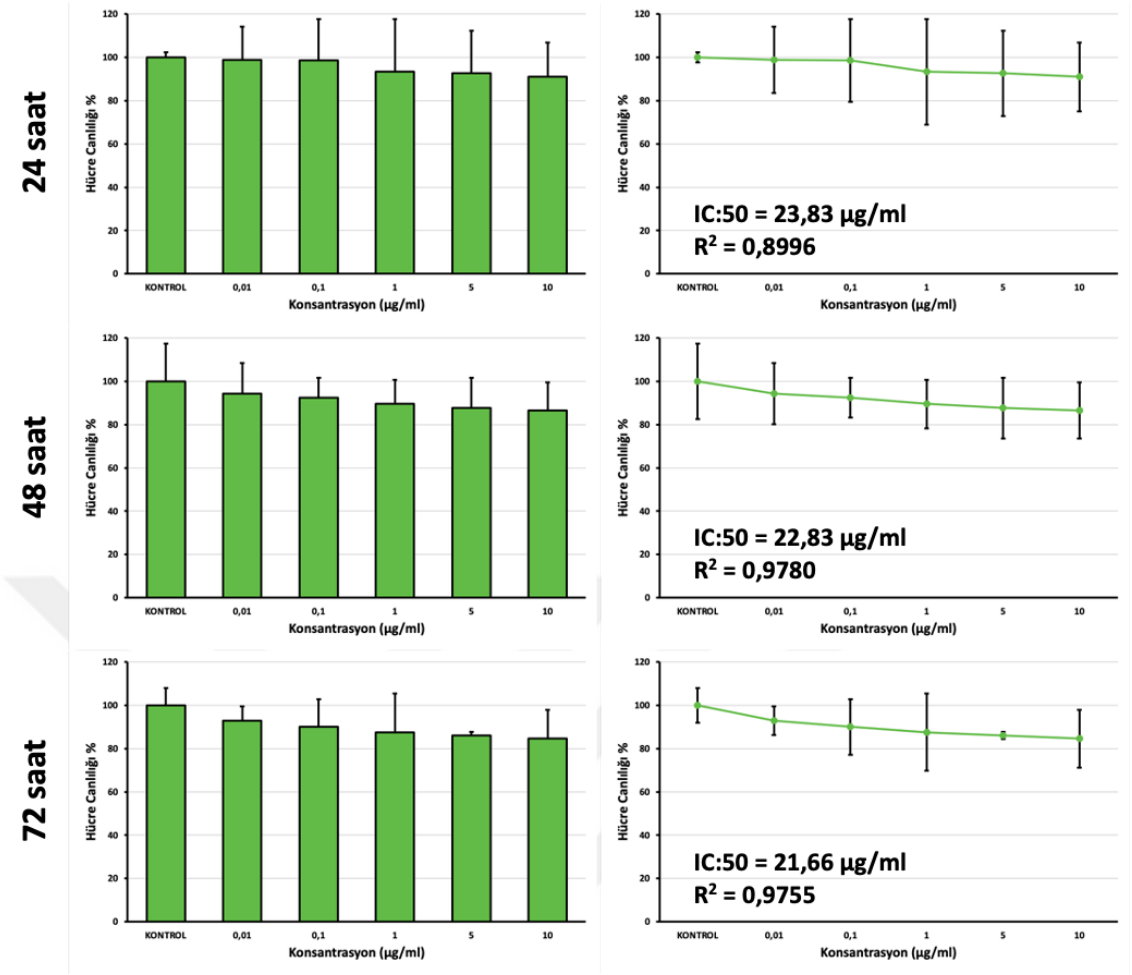
OVP: oksaliplatin + verapamil. 24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca 0,01 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinin, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.



Şekil 4-34: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi

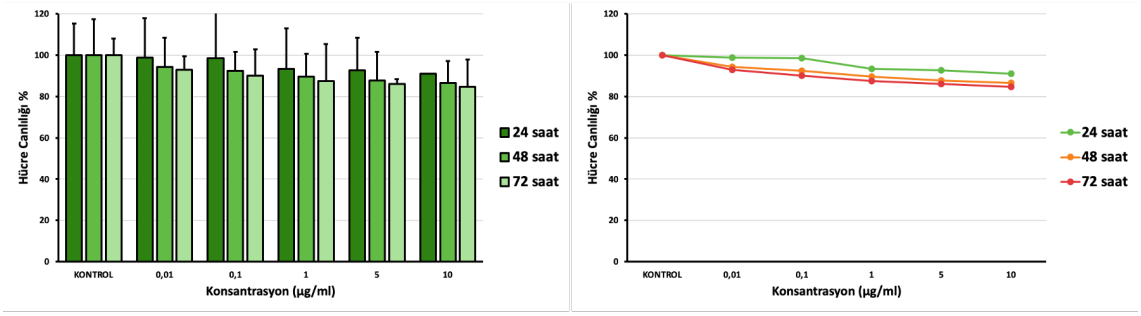
OVP: oksaliplatin + verapamil. 24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca 0,01 µg/ml OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinin, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.

HCT-116 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edildi. IC50 değerleri ve MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlendi. Hücre canlılıklarında en düşük değer, 72 saat sonunda 10 µg/ml konsantrasyonda %85 olarak belirlendi. Bu sonuç literatürde de belirtildiği gibi PLGA'nın hücreler üzerinde ciddi bir sitotoksik etki doğurmadığı şeklinde yorumlandı (Şekil 4-35-36).



Şekil 4-35: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları

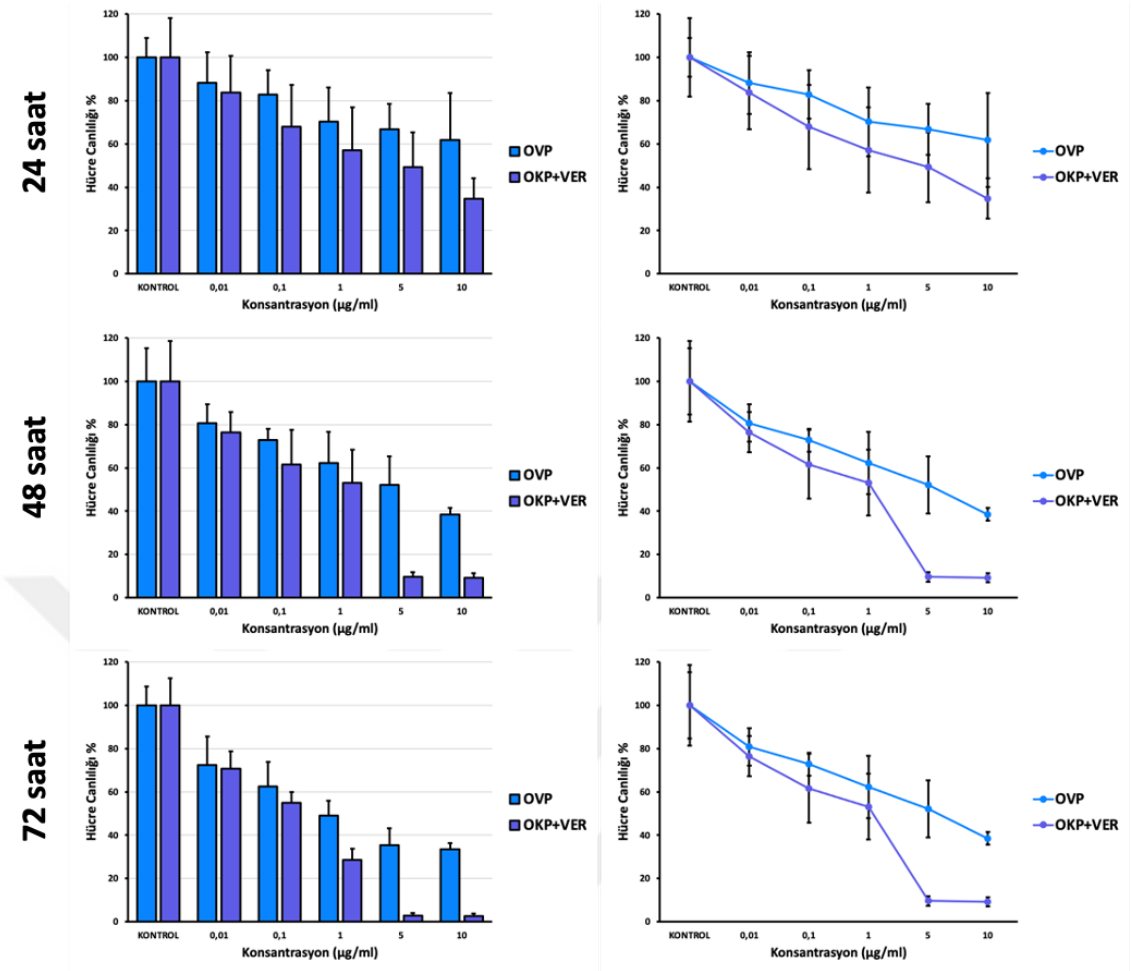
PLGA: poli(laktik-ko-glikolik asit). 24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 72 saat için 5 ve 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinde, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede farklılık belirlenmedi ($p>0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.



Şekil 4-36: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının aynı grafikte gösterimi

PLGA: poli(laktik-ko-glikolik asit). 24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında, 72 saat için 5 ve 10 µg/ml boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdeleri dışındaki hücre canlılık yüzdelerinde, diğer konsantrasyonlarda kontrole kıyasla anlamlı derecede farklılık belirlenmedi ($p>0,05$). Veriler ortalama ± SD değerleri kullanılarak sunuldu. Sonuçların istatistiksel analizinde ANOVA ve ardından Bonferroni doğrulaması yapıldı.

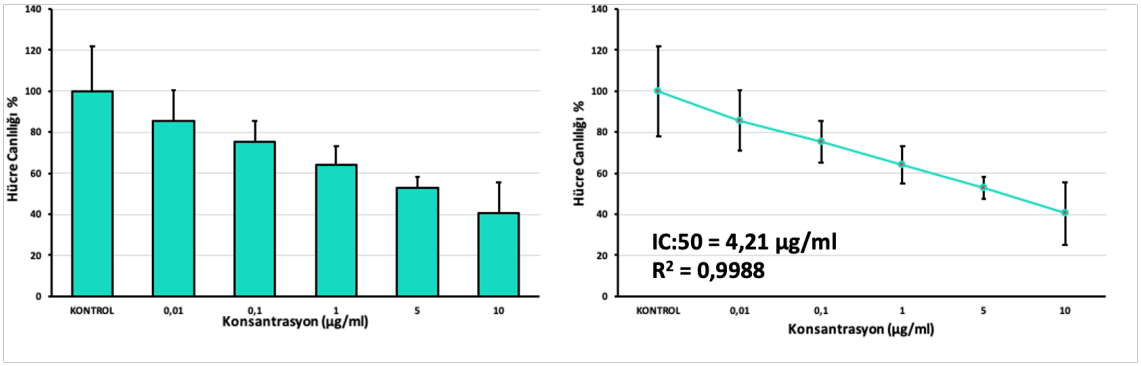
Oksaliplatin ve verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin hücre canlılık değerleri, OVP-10 ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin hücre canlılık değerleri ile karşılaştırıldı. Zaman ve konsantrasyon artışına bağlı olarak aynı konsantrasyonlarda oksaliplatin ve verapamil ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin hücre canlılıklarının OVP-10 ile muamele edilen hücrelerden daha az olduğu belirlendi. Hücre canlılıkları arasındaki bu fark ilaç salınımının kontrollü olarak gerçekleştiğinin göstergesi olarak yorumlandı (Şekil 4-37).



Şekil 4-37: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin (OKP) ve verapamil (VER) ile muamele edilen HCT-116 hücreleri ve OVP ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının karşılaştırılması

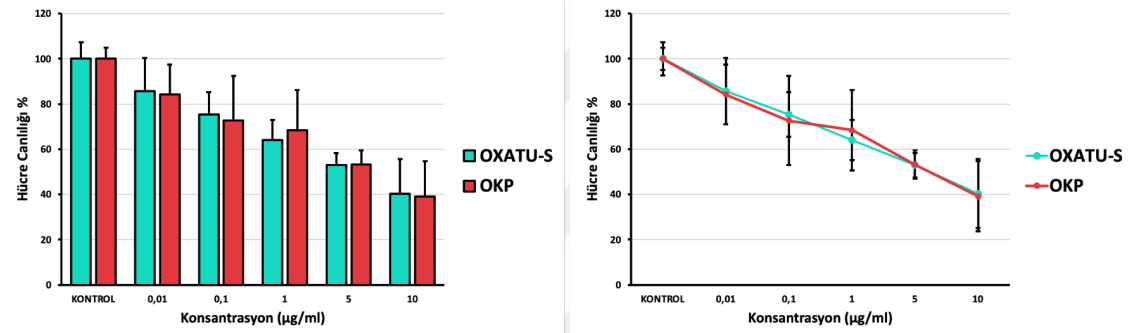
OKP: oksaliplatin, VER: verapamil, OVP: oksaliplatin + verapamil.

OXATU-S'nin HCT-116 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin oksaliplatin (OKP) ile benzer olup olmadığı incelendi. HCT-116 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OXATU-S ile muamele edildi. IC50 değerleri ve MTT analizi ile hücre canlılıkları belirlendi (Şekil 4-38). Hücre canlılıklarında oksaliplatin ile benzer şekilde konsantrasyondaki artışa bağlı olarak azalma olduğu belirlendi. 24 saat sonunda oksaliplatin ve OXATU-S ile muamele edilen hücrelerin canlılık yüzdelerindeki azalmanın birbirine yakın değerler olduğu belirlendi (Şekil 4-39).



Şekil 4-38: 24 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml OXATU-S ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçları

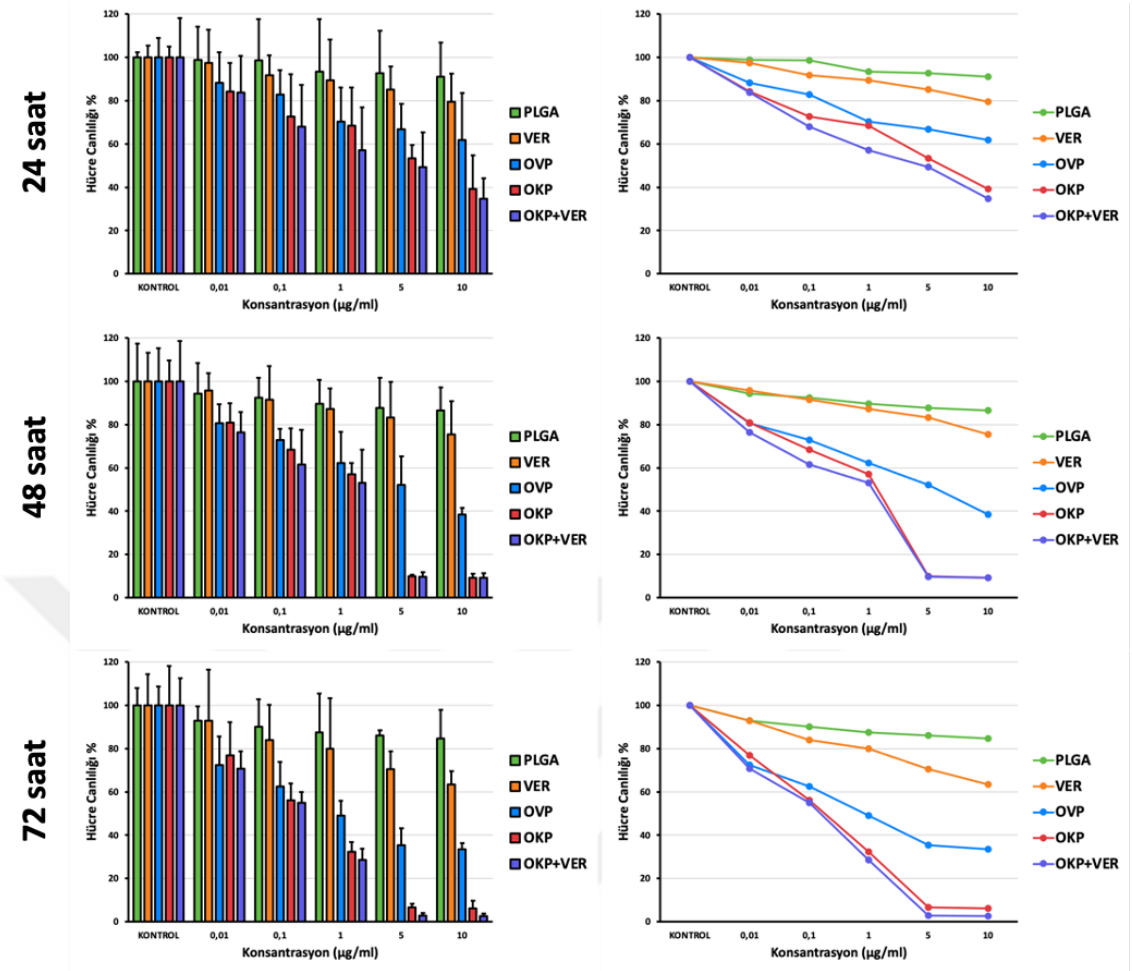
OXATU-S: eczaneden alınan oksaliplatin ilacı.



Şekil 4-39: 24 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin (OKP) ve OXATU-S ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının karşılaştırılması

OKP: oksaliplatin, OXATU-S: eczaneden alınan oksaliplatin ilacı.

Oksaliplatin, verapamil, oksaliplatin ve verapamil, OVP ve boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin hücre canlılık değerleri birbirleri ile karşılaştırıldı. Verapamil ve boş PLGA'nın sitotoksik etkilerinin daha az olduğu belirlendi. Oksaliplatin ve verapamilin birlikte verildiği durumdaki sitotoksik etkilerinin ayrı ayrı verildikleri duruma kıyasla daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4-40).

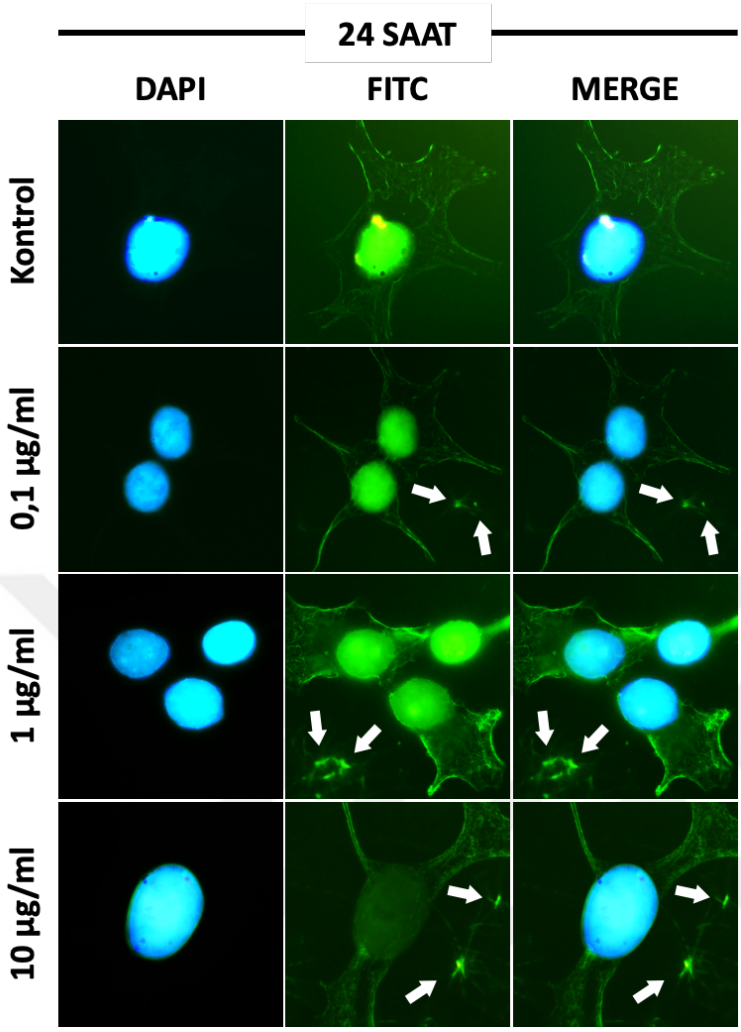


Şekil 4-40: 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml oksaliplatin, verapamil, oksaliplatin ve verapamil, OVP ve boş PLGA ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen sitotoksisite sonuçlarının karşılaştırılması

OKP: oksaliplatin, VER: verapamil, OVP: oksaliplatin + verapamil, PLGA: poli(laktik-ko-glikolik asit).

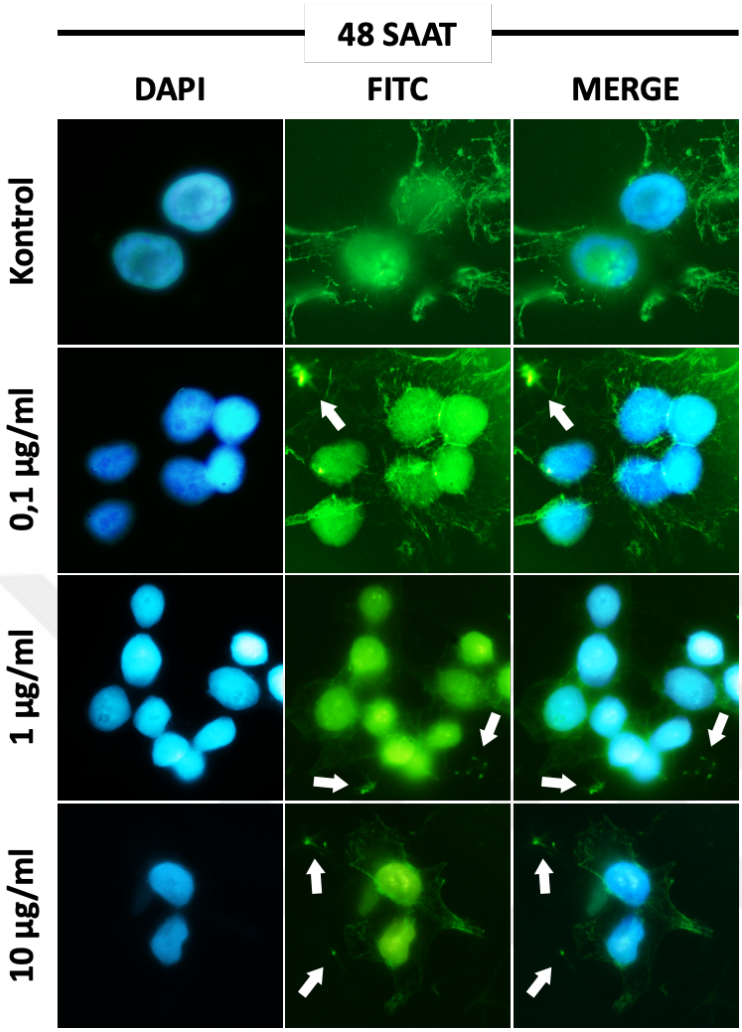
4.3. İmmünfloresan Görüntüleme Sonuçları

İmmünfloresan boyama çalışmaları için HCT-116 hücreleri kullanıldı. Hücrelere 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,1; 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında OVP-F uygulandı. Hücrelerin aktin iskeleti (F-aktin) Falloidin-FITC, çekirdeği DAPI ile boyandı. İmmünfloresan görüntüleme işlemi floresan mikroskobundaki uygun filtreler kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 4-39-41). HCT-116 hücrelerine uygulanan OVP-F'nin ilaç salımı ok işaretleri ile gösterildi. Uygulanan OVP-F dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak HCT-116 hücrelerinin aktin iskeletinin yapısının bozulduğu görüldü (Şekil 4-41-43).



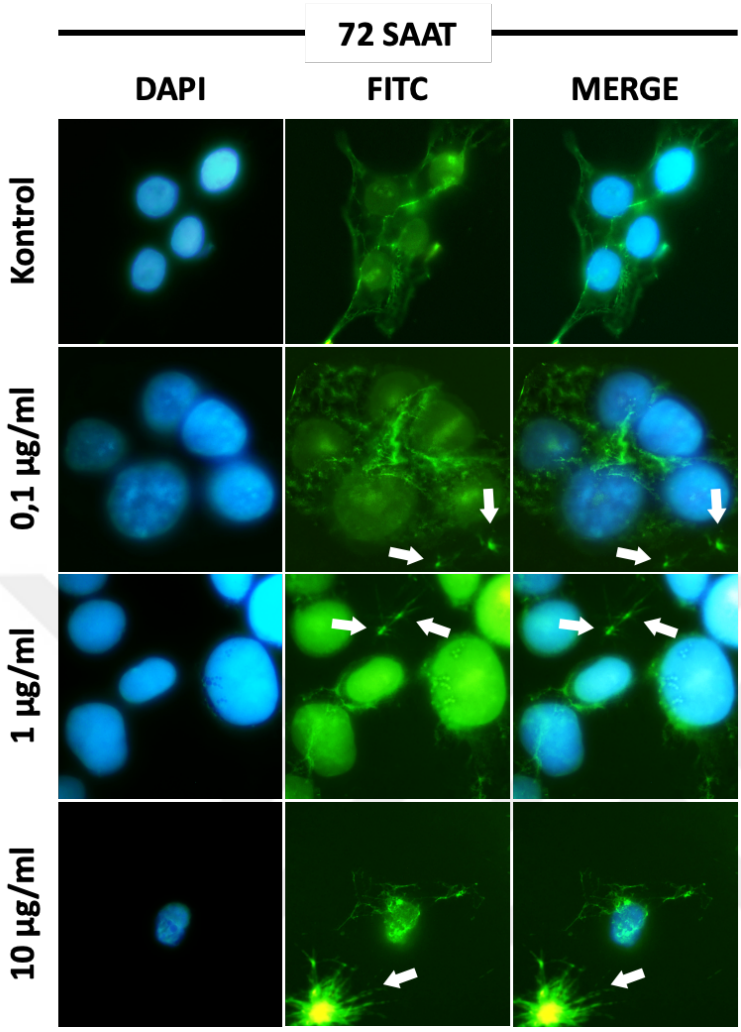
Şekil 4-41: 24 saat boyunca 0,1; 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında OVP-F'ye maruz kalan HCT-116 hücrelerinin çekirdek ve aktin iskeleti görüntüsü

Hücrelerin aktin iskeleti Falloidin-FITC, çekirdeği DAPI ile boyandı. OVP-F'nin ilaç salımı ok işaretleri ile gösterildi (Büyütme 100x).



Şekil 4-42: 48 saat boyunca 0,1; 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında OVP-F'ye maruz kalan HCT-116 hücrelerinin çekirdek ve aktin iskeleti görüntüsü

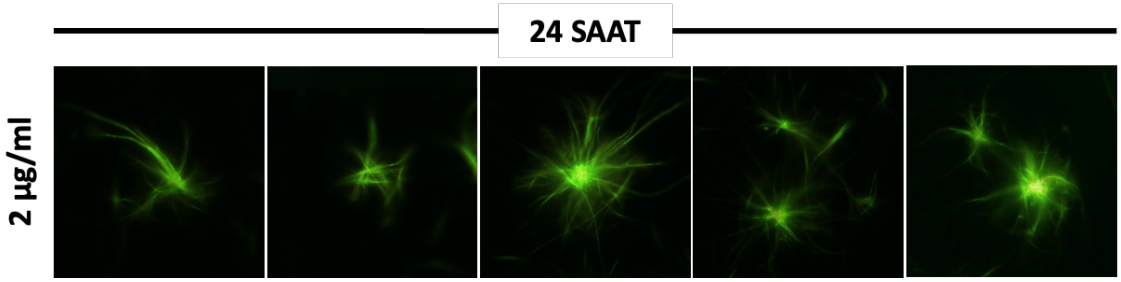
Hücrelerin aktin iskeleti Falloidin-FITC, çekirdeği DAPI ile boyandı. OVP-F'nin ilaç salımı ok işaretleri ile gösterildi (Büyütme 100x).



Şekil 4-43: 72 saat boyunca 0,1; 1 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında OVP-F'ye maruz kalan HCT-116 hücrelerinin çekirdek ve aktin iskeleti görüntüsü

Hücrelerin aktin iskeleti Falloidin-FITC (yeşil), çekirdeği DAPI (mavi) ile boyandı. OVP-F'nin ilaç salımı ok işaretleri ile gösterildi (Büyütme 100x).

HCT-116 hücrelerine uygulanan OVP-F'lerin 24 saat sonundaki ilaç salımları tek başlarına da görüntülendi (Şekil 4-44).



Şekil 4-44: 24 saat boyunca 2 µg/ml konsantrasyonunda Falloidin-FITC yüklü OVP-F'nin salım görüntüsü

Oksaliplatin, verapamil ve Falloidin-FITC (yeşil) PLGA-NP'lerine birlikte yüklendi (Büyütme 100x).

5. TARTIŞMA

2020 yılında belirlenen 19,3 milyon kanser vakasının %11,7'sini meme, %11,4'ünü akciğer, %10'unu kolorektal, %7,3'ünü prostat ve %5,6'sını mide kanserleri oluşturmaktadır. Ayrıca, bu kanser vakalarının yaklaşık 10 milyonu ölümle sonuçlanmıştır (Sung ve ark. 2021). En yaygın görülen üçüncü kanser türü olan KRK, genetik, yaşam tarzı, obezite ve çevresel faktörler ile ilişkili olup, erkeklerdeki insidansı ve mortalitesi kadınlarınkinden gelişmiş ülkelerde 3-4 kat daha fazladır (Kasi et al., 2019). KRK tedavisi, kemoterapi ile birlikte ilaç tedavisi uygulanarak gerçekleştirilmektedir. İlaç tedavisinde, floropirimidinler ile altın ve platin içeren antikanser ilaçları kullanılmaktadır (Hishinuma ve ark. 2020; Mármol ve ark. 2017; Zhang C ve ark. 2022). Ancak, uygulanan tedaviye de bağlı olarak mKRK hastalarının %50'sinde ilaç direnci görülmektedir (van der Jeught ve ark. 2018). Oluşan ilaç direncine bağlı olarak P-gp hücre membran proteinlerinin ekspresyonunda ve aktivitesinde artış gerçekleştiği belirlenmiştir (van den Kerkhof ve ark. 2020). P-gp, hücre içine giren ilacın hücre dışına atılmasına aracılık ederek tedavinin başarısız olmasına neden olur (Kolesnikova ve ark. 2019). P-gp ekspresyonunun inhibe edilmesinde yaygın olarak, bir kalsiyum kanal bloklayıcısı olan verapamil tercih edilmektedir (Wang H ve ark. 2013). Diğer yandan, kemoterapide nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite ve miyelosupresyon gibi ciddi istenmeyen etkilerin ortaya çıkması da söz konusudur. Bu etkiler nedeniyle tedavide uygulanan dozların sınırlandırılması veya tedavinin sonlandırılması gerekmektedir (Wlodarczyk ve ark. 2018). Bu durumun önüne geçebilmek adına hedefe yönelik uyarlanabilen ve ilaç salım yeteneğine sahip nanopartiküller tercih edilmektedir (Alkahtani ve ark. 2021). Bu nanopartiküllerin en bilineni de FDA tarafından da onaylanmış olan PLGA'dır (Risnayanti ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasında, platin içeren bir antikanser ilaç olan oksaliplatin tercih edilmiştir. Bu ilacın hücrelerde direnç oluşturmasını önlemek amacıyla da verapamil kullanılmıştır. Ayrıca, ilaca bağlı oluşabilecek nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite ve miyelosupresyon gibi istenmeyen etkilerin önüne geçilebilmesi için ilaç ve inhibitör PLGA nanopartikülleri içerisine enkapsüle edilmiştir. Daha önce oksaliplatinin taşınması ile ilgili çalışmalar olmasına karşılık, oksaliplatinin verapamil ile birlikte PLGA nanopartiküllerine yüklenmesi ve kolorektal karsinoma hücrelerine (HCT-116) verilmesi yoluyla gerçekleştirilmiş herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Yapılan bir çalışmada, oksaliplatinin HCT-116 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir (Mohammadian ve ark. 2017). Mohammadian ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada, 10 μM konsantrasyonunda oksaliplatin ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin 24 saat sonundaki canlılık yüzdeleri yaklaşık %35 iken, bizim çalışmamızdaki aynı konsantrasyona karşılık gelen canlılık yüzdeleri %40 olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamız ile Mohammadian ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmanın canlılık sonuçları benzerlik göstermektedir. Yapılan bir diğer çalışmada verapamilin, aşırı ABCB1 (MDR1, P-gp) ekspresyonu görülen SW620 kolorektal kanser hücre hatlarında, ABCB1 ekspresyonunu inhibe ederek ilaç direncini tersine çevirdiği belirlenmiştir (Liu C ve ark. 2021). Verapamilin doksorubisin ile birlikte metoksi poli (etilen glikol)-poli (l-laktik asit) (MPEG-PLA) nanopartiküllerine enkapsüle edildiği başka bir çalışmada, A2780 ve SKOV3 yumurtalık kanseri hücre hatlarında ilaç direncini tersine çevirdiği belirlenmiştir (Zheng W ve ark. 2018). CaCo-2 kolorektal kanser hücre hattı ile yapılan bir diğer çalışmada, verapamilin, hücre canlılığın 24 saat sonunda %15, 48 saat sonunda ise %20'ye kadar ilacın hücre dışına akışını azaltabildiği rapor edilmiştir (Liu J ve ark. 2019). Diğer bir çalışmada, tümör hücrelerindeki P-gp ekspresyonunun düşük seviyelerde tutulmasında verapamilin rol oynayabileceği ve bu sayede oksaliplatinin etkinliğinin arttırılabileceği bildirilmiştir (Zhang T ve ark. 2019). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, HCT-116 kolorektal karsinoma hücre hattına verapamil tek başına uygulandığında hücre canlılığında ciddi bir artış belirlenmezken, oksaliplatin ve verapamil birlikte uygulandığında ilacın etkinliğine katkı sağladığı yapmış olduğumuz sitotoksisite deneyleri ile belirlenmiştir. Oksaliplatin ve verapamil birlikte verildiğinde hücre canlılıklarında oksaliplatinin tek başına verildiği duruma kıyasla %11'e varan azalmalar görülmüştür (Şekil 4-27-28, 31, 38).

Başka bir çalışmada, oksaliplatinin HCT-116 hücre hattında ilaç direnci oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Huang WS ve ark. 2016). Diğer bir çalışmada ise, dirençli HCT-116 hücrelerindeki P-gp seviyelerinde azalma meydana gelmesi halinde, dirençli hücrelerin oksaliplatine karşı hassasiyetinin arttığı belirlenmiştir (Zhang X ve ark. 2021). Çalışmamızda, oksaliplatin ve verapamilin PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilmesiyle elde edilen OVP nanopartikülleri HCT-116 hücrelerine uygulanarak hücreler üzerindeki sitotoksik etkiler belirlenmiştir (Şekil 4-33-34). Yapılan hücre canlılığı deneylerinin sonunda, 1 ve 10 μg/ml dozları için 24 saat sonundaki hücre canlılık değerleri %62 ve %67 olarak ölçülürken, aynı konsantrasyonlarda 72 saat

sonundaki hücre canlılık değerleri sırasıyla %33 ve %35 olarak belirlendi. Başka bir değişle 72 saat sonunda hücre canlılıklarının %67'ye kadar azaldığı tespit edilmiştir. HCT-116 hücrelerine OVP uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık değerleri, oksaliplatin ve verapamil uygulandığında elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında, OVP ile yapılan sitotoksisite deneylerinden elde edilen canlılık yüzdeleri 72 saat sonunda %72 ile %33 arasında iken, oksaliplatin ve verapamilin birlikte uygulandığı hücrelerin 72 saat sonundaki canlılık yüzdelerinin %71 ile %3 arasında olduğu belirlendi. Bu durum, OVP'nin oksaliplatin ve verapamilin salımını kontrollü şekilde yapmasından kaynaklanmaktadır. Yaptığımız çalışmalarda, OVP'nin ilk 4 saat içerisinde %7,4'lük hızlı salım gerçekleştirildiği belirlenmiştir. 24 saat sonunda bu değer %9,3'e ulaşmıştır. 48 saat sonunda ise bu değerin yaklaşık %12 olduğu görülmüştür (Şekil 4-24). OVP uygulanan HCT-116 hücrelerinin sitotoksisite deneylerinde, 0,01; 0,1 ve 1 µg/ml dozlarının uygulandığı hücrelerin canlılık yüzdeleri, 24 saat sonunda %88-70, 48 saat sonunda %81-62, 72 saat sonunda %72-49 olarak belirlenmiştir (Şekil 4-34). Çalışmamızda üretmiş olduğumuz OVP'nin, özellikle mKRK'nın neden olduğu sistemik toksisite düşünüldüğünde, kontrollü ilaç salımının tedavinin süresinin ve etkinliğinin arttırılmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

Yapılan bir diğer çalışmada, altın nanoparçacıklarına oksaliplatinin enkapsüle edilerek HCT-116 hücrelerine taşındığı bildirilmiştir (Tummala ve ark. 2016). Başka bir çalışmada, oksaliplatin yüklü hidrojellerin HCT-116 hücrelerine doza bağlı kontrollü sitotoksisite sergilediği belirlenmiştir (Ullah ve ark. 2019). Diğer bir çalışmada, PLGA nanotaşıyıcılarına başarılı bir şekilde yüklenen oksaliplatinin CaCo-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri rapor edilmiştir (Zumaya ve ark. 2022). Bizim çalışmamızda, PLGA nanopartiküllerine oksaliplatin ve verapamil yükleyerek elde ettiğimiz OVP polimerlerinin, HCT-116 kolorektal karsinoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin, uygulanan dozdaki ve maruziyet süresindeki artışa bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 4-33-34). Yapmış olduğumuz çalışmada, enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) değerleri belirlenerek, oksaliplatinin ve verapamilin PLGA nanopartiküllerine başarılı bir şekilde enkapsüle edildiği tespit edilmiştir (Tablo 4-2). Bu bulgular, PLGA nanopartikülüne ilaç ve inhibitörün etkili bir şekilde yüklenebildiğini göstermesi nedeniyle önemlidir.

Yapılmış olan bir çalışmada, verapamilin FT-IR spektrumundan elde edilen sonuçlar (Ramu ve ark. 2016) bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Şekil 4-18). Bir diğer çalışmadaki FITC'in FT-IR spektrumundan elde edilen sonuçlar incelendiğinde (Akilo ve ark. 2016), bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzer olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4-19). Başka bir çalışmada, PLGA spektrumundan elde edilen sonuçlar (Basu ve ark. 2016) bizim çalışmamızdaki sonuçlarla yakınlık göstermektedir (Şekil 4-20). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, oksaliplatin ve verapamil yüklü PLGA nanopartiküllerinin yüzey fonksiyonel grup bilgileri FT-IR ile incelendiğinde, nanopartikül yüzeyine tutunma olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4-18-22). Bu durum, enkapsülasyonun başarılı olarak gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Yapılan bir çalışmada, retinoik asit ve oksaliplatin yüklenen PLGA nanopartiküllerinin boyutları 505.6 ± 64.30 ve PDI değeri 0.199 iken (Oliveira ve ark. 2020), bizim çalışmamızda bu değerler sırasıyla 222,00 ± 0,84 ve 0,084 ± 0,022 olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, hazırlanmış olan galaktozamin ile fonksiyonelleştirilen PLGA nanopartiküllerinin boyutu 255,6 ± 4,08 olarak belirlenmiştir (Mohammadi ve ark. 2020). Çalışmamızda oksaliplatin ve verapamil yüklenen PLGA nanopartiküllerin boyutu 222,00 ± 0,84 nm, oksaliplatin, verapamil ve Falloidin-FITC yüklenen PLGA nanopartiküllerin boyutu 240,80 ± 1,82 nm olarak belirlenmiştir (Tablo 4-1). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile Mohammadi ve ark.'larının sonuçları kıyaslandığında, üretmiş olduğumuz nanopartiküllerin boyutlarının daha küçük olduğu gözlenmiştir. Başka bir çalışmada, üretilen PLGA nanopartiküllerinin PDI değeri 0,23 ± 0,05 olarak belirlenmiştir (Todaro ve ark. 2022). Bu değer bizim çalışmamızdaki PDI değerleri 0,237 ± 0,001 ve 0,231 ± 0,005 ile benzerlik göstermektedir (Tablo 4-1). Todaro ve ark.'larının çalışmasında, pioglitazon yüklü PLGA nanopartiküllerinin %EE değerleri nanoçökeltme ve tek emülsifikasyon çözücü buharlaştırma teknikleri için sırasıyla %58 ± %8 ve %26 ± %7 olarak belirlenmiştir. Aynı nanopartiküllerin %DL değerleri nanoçökeltme ve tek emülsifikasyon çözücü buharlaştırma teknikleri için sırasıyla %4,01 ± %0,27 ve %2,27 ± %0,07 olarak belirlenmiştir. Bu değer ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızın %EE ve %DL değerlerinin çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-2). Bu durum, enkapsülasyon etkinliğinin ve ilaç yükleme kapasitesinin oldukça fazla olduğunu ortaya koymaktadır.

Başka bir çalışmada, PLGA nanopartiküllerine ait olan SEM görüntüleri elde edilmiştir (Wu ve ark. 2018). Görüntüler, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz SEM görüntüleri ile benzerlik göstermektedir (Şekil 4-23). Başka bir çalışmadaki NP'ler incelendiğinde, elde edilen NP boyutlarının 220 ± 54 nm oldukları görülmüştür (de Solorzano ve ark. 2016). Bu NP boyutları bizim ürettiğimiz NP'lerin boyutları ile karşılaştırıldığında (222,00 ± 0,84 nm), bizim üretmiş olduğumuz NP'lerin arasındaki boyut farklılıkları 0,84 nm ile sınırlı iken, de Solorzano ve ark'larının çalışmasındaki NP'lerin boyut farklılıklarının 54 nm'ye kadar çıktığı görülmektedir. Bu durum, bizim ürettiğimiz NP'lerin çok daha homojen dağıldığı anlamına gelmektedir (Tablo 4-1). Üretmiş olduğumuz NP'lerin SEM görüntüleri incelendiğinde bu homojen dağılım açıkça görülmektedir (Şekil 4-23).

Bir diğer çalışmada, HCT-116 hücre hattı ile yapılan bir immünfloresan boyama yapılmıştır (Zhang X ve ark. 2018). Çalışmadaki immünfloresan boyama görselleri incelendiğinde, HCT-116 hücrelerinin aktin iskeleti ve çekirdek yapılarındaki konsantrasyon artışına bağlı meydana gelen bozulmaların bizim çalışmamızla benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Yapmış olduğumuz immünfloresan boyama çalışmalarında, oksaliplatin ve verapamilin HCT-116 hücrelerinin aktin iskeletindeki sitotoksik etkileri açıkça görülmektedir (Şekil 4-39-41). Kullanılan oksaliplatin ve verapamil konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak HCT-116 hücrelerinin aktin iskeletlerinde ve çekirdeklerinde yapısal bozulmalar meydana gelmiştir. Aynı bozunmalar, maruziyet sürelerindeki artışa bağlı olarak da görülebilmektedir. Ayrıca, ilaç salınımları da Falloidin-FITC boyası yüklenmiş olan OVP-F polimerlerinin ilaç salımları da belirlenmiştir (Şekil 4-42). HCT-116 hücrelerinin aktin iskeletlerinde ve çekirdeklerinde meydana gelen yapısal bozulmalar, PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilmiş halde hücrelere verilen oksaliplatin ve verapamilin *in vitro* ortamda etkili şekilde sağıldığını ortaya koymaktadır. Oksaliplatin ve verapamilin birlikte HCT-116 hücrelerine verildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmadaki tedavinin uygulanması ile ilaç tedavi etkinliğinin arttırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, ilaç direncinin tedavi üzerindeki etkisinin ortadan kaldırılması ya da en aza indirilmesi de bu sayede mümkün olacaktır. Buna ek olarak, ilacın kontrollü salınması nedeniyle, sağlıklı doku ve hücreler üzerindeki etkinin en aza indirilmesi de sağlanacağından, tedavinin yan etkilerinin çok daha düşük olacağı

düşünülmektedir. Böylece tedaviye daha uzun süre devam edilebilmesi mümkün hale gelebilir. Öte yandan, çalışmamızda elde edilen OVP nanopartiküllerine HCT-116 hücrelerini hedefleyecek özgünlük kazandırılarak, hedefe yönelik bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilebilir. Bu sistemin ilaç taşıyıcıların özgünlüğünün belirlenmesinde moleküler modellemeden yararlanılabilir. Ayrıca, OVP nanopartiküllerinin üretiminde yapılacak değişikliklerle OVP'nin ilaç salım süreleri düzenlenebilir.

KAYNAKLAR

Akilo, O. D., Choonara, Y. E., Strydom, A. M., du Toit, L. C., Kumar, P., Modi, G., & Pillay, V. (2016). AN in vitro evaluation of a carmustine-loaded Nano-co-Plex for potential magnetic-targeted intranasal delivery to the brain. International Journal of Pharmaceutics, 500(1–2). https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.043

Alas, M., Saghaeidehkordi, A., & Kaur, K. (2021). Peptide-Drug Conjugates with Different Linkers for Cancer Therapy. In Journal of Medicinal Chemistry (Vol. 64, Issue 1). https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01530

Aldossary, S. A. (2019). Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. Biomedical and Pharmacology Journal, 12(1). https://doi.org/10.13005/bpj/1608

Alkahtani, S., Alarifi, S., Albasher, G., Al-Zharani, M., Aljarba, N. H., Almarzoug, M. H., Alhoshani, N. M., Al-Johani, N. S., Alothaid, H., & Alkahtane, A. A. (2021). Poly Lactic-Co-Glycolic Acid-(PLGA-) Loaded Nanoformulation of Cisplatin as a Therapeutic Approach for Breast Cancers. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021. https://doi.org/10.1155/2021/5834418

Alqaheem, Y., & Alomair, A. A. (2020). Microscopy and spectroscopy techniques for characterization of polymeric membranes. Membranes, 10(2). https://doi.org/10.3390/MEMBRANES10020033

Anna, M., Mara, M., Artem, S., Eleonora, C., Gerry, M., & Lello, Z. (2019). Multi-omics profiling of calcium-induced human keratinocytes differentiation reveals modulation of unfolded protein response signaling pathways. Cell Cycle, 18(17). https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1642066

Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut, 66(4). https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912

Ashry, M., El-Sahra, D. G., Gaber, D. A., Mustafa, M. A., & Abdel-Wahhab, K. G. (2021). Nephroprotective effect of costus (Saussurea costus) ethanolic extract on oxaliplatin®-induced nephrotoxicity in adult male wistar rats. Pakistan Journal of Biological Sciences, 24(8). https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.830.839

Bandu, R., Ahn, H. S., Lee, J. W., Kim, Y. W., Choi, S. H., Kim, H. J., & Kim, K. P. (2015). Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometric (LC/ESI-MS/MS) study for the identification and characterization of in vivo metabolites of cisplatin in rat kidney cancer tissues: Online Hydrogen/Deuterium (H/D) exchange study. PLoS ONE, 10(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134027

Basu, T., Pal, B., & Singh, S. (2016). Synthesis and Characterization of Ramipril Embedded Nanospheres of Biodegradable Poly-D,L-Lactide-co-Glycolide and Their Kinetic Release Study. Advanced Science, Engineering and Medicine, 8(6). https://doi.org/10.1166/asem.2016.1878

Beklen, H., Gulfidan, G., Arga, K. Y., Mardinoglu, A., & Turanli, B. (2020). Drug Repositioning for P-Glycoprotein Mediated Co-Expression Networks in Colorectal Cancer. Frontiers in Oncology, 10. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01273

Bengoechea-Alonso, M. T., & Ericsson, J. (2009). A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1. Journal of Biological Chemistry, 284(9). https://doi.org/10.1074/jbc.M807906200

Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. In Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease (Vol. 1863, Issue 5). https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010

Bian, M., Fan, R., Zhao, S., & Liu, W. (2019). Targeting the Thioredoxin System as a Strategy for Cancer Therapy. Journal of Medicinal Chemistry, 62(16). https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01595

Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A., & Christou, N. (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. In Cancer Science (Vol. 111, Issue 9). https://doi.org/10.1111/cas.14532

Boakye, D., Jansen, L., Halama, N., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2021). Early discontinuation and dose reduction of adjuvant chemotherapy in stage III colon cancer patients. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 13. https://doi.org/10.1177/17588359211006348

Boonjob, W., Sklenářová, H., Barron, L., Solich, P., & Smith, N. (2015). Renewable sorbent material for solid phase extraction with direct coupling of sequential injection analysis-bead injection to liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407(19). https://doi.org/10.1007/s00216-015-8752-9

Boroughs, L. K., & Deberardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. In Nature Cell Biology (Vol. 17, Issue 4). https://doi.org/10.1038/ncb3124

Bradshaw, P. C. (2021). Acetyl-coa metabolism and histone acetylation in the regulation of aging and lifespan. Antioxidants, 10(4). https://doi.org/10.3390/antiox10040572

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(6). https://doi.org/10.3322/caac.21492

Calderon, L. E., Keeling, J. K., Rollins, J., Black, C. A., Collins, K., Arnold, N., Vance, D. E., & Ndinguri, M. W. (2017). Pt-Mal-LHRH, a Newly Synthesized Compound Attenuating Breast Cancer Tumor Growth and Metastasis by Targeting Overexpression of the LHRH Receptor. Bioconjugate Chemistry, 28(2). https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00610

Chen, L., Zhang, Z., Hoshino, A., Zheng, H. D., Morley, M., Arany, Z., & Rabinowitz, J. D. (2019a). NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. Nature Metabolism, 1(3). https://doi.org/10.1038/s42255-019-0043-x

Chen, L., Zhou, L., Wang, C., Han, Y., Lu, Y., Liu, J., Hu, X., Yao, T., Lin, Y., Liang, S., Shi, S., & Dong, C. (2019b). Tumor-Targeted Drug and CpG Delivery System for Phototherapy and Docetaxel-Enhanced Immunotherapy with Polarization toward M1-Type Macrophages on Triple Negative Breast Cancers. Advanced Materials, 31(52). https://doi.org/10.1002/adma.201904997

Chen, Q., Yang, Y., Lin, X., Ma, W., Chen, G., Li, W., Wang, X., & Yu, Z. (2018). Platinum(iv) prodrugs with long lipid chains for drug delivery and overcoming cisplatin resistance. Chemical Communications, 54(42). https://doi.org/10.1039/c8cc02791a

Cheong, C. K., Nistala, K. R. Y., Ng, C. H., Syn, N., Chang, H. S. Y., Sundar, R., Yang, S. Y., & Chong, C. S. (2020). Neoadjuvant therapy in locally advanced colon cancer: A meta-analysis and systematic review. Journal of Gastrointestinal Oncology, 11(5). https://doi.org/10.21037/jgo-20-220

Chevali, V., & Kandare, E. (2016). Rigid biofoam composites as eco-efficient construction materials. In Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100214-8.00013-0

Cho, Y. C., & Ahn, S. il. (2020). Fabricating a Raman spectrometer using an optical pickup unit and pulsed power. Scientific Reports, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-68650-7

Cluntun, A. A., Lukey, M. J., Cerione, R. A., & Locasale, J. W. (2017). Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. In Trends in Cancer (Vol. 3, Issue 3). https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.01.005

Cormerais, Y., Vučetić, M., Parks, S. K., & Pouyssegur, J. (2021). Amino acid transporters are a vital focal point in the control of mtorc1 signaling and cancer. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 22, Issue 1). https://doi.org/10.3390/ijms22010023

Correia, A., Silva, D., Correia, A., Vilanova, M., Gärtner, F., & Vale, N. (2018). Study of new therapeutic strategies to combat breast cancer using drug combinations. Biomolecules, 8(4). https://doi.org/10.3390/biom8040175

Corte-Rodríguez, M., Espina, M., Sierra, L. M., Blanco, E., Ames, T., Montes-Bayón, M., & Sanz-Medel, A. (2015). Quantitative evaluation of cellular uptake, DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines: Comparison of different Pt-containing drugs. Biochemical Pharmacology, 98(1). https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.112

Dariya, B., Aliya, S., Merchant, N., Alam, A., & Nagaraju, G. P. (2020). Colorectal cancer biology, diagnosis, and therapeutic approaches. Critical Reviews in Oncogenesis, 25(2). https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2020035067

de Solorzano, I. O., Uson, L., Larrea, A., Miana, M., Sebastian, V., & Arruebo, M. (2016). Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: Effect of passive mixing. International Journal of Nanomedicine, 11. https://doi.org/10.2147/IJN.S108812

Deepty, M., Srinivas, C., Kumar, E. R., Mohan, N. K., Prajapat, C. L., Rao, T. V. C., Meena, S. S., Verma, A. K., & Sastry, D. L. (2019). XRD, EDX, FTIR and ESR spectroscopic studies of co-precipitated Mn–substituted Zn–ferrite nanoparticles. Ceramics International, 45(6). https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.01.029

Dehaini, D., Fang, R. H., & Zhang, L. (2016). Biomimetic strategies for targeted nanoparticle delivery. Bioengineering & Translational Medicine, 1(1). https://doi.org/10.1002/btm2.10004

Deli, T., Orosz, M., & Jakab, A. (2020). Hormone Replacement Therapy in Cancer Survivors – Review of the Literature. In Pathology and Oncology Research (Vol. 26, Issue 1). https://doi.org/10.1007/s12253-018-00569-x

den Uijl, M. J., Schoenmakers, P. J., Pirok, B. W. J., & van Bommel, M. R. (2021). Recent applications of retention modelling in liquid chromatography. In Journal of Separation Science (Vol. 44, Issue 1). https://doi.org/10.1002/jssc.202000905

Dey, P., Kimmelman, A. C., & Depinho, R. A. (2021). Metabolic codependencies in the tumor microenvironment. In Cancer Discovery (Vol. 11, Issue 5). https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1211

Dodson, M., Castro-Portuguez, R., & Zhang, D. D. (2019). NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. In Redox Biology (Vol. 23). https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101107

Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. In Annual Review of Biochemistry (Vol. 78). https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540

Dong, X., Yang, A., Bai, Y., Kong, D., & Lv, F. (2020). Dual fluorescence imaging-guided programmed delivery of doxorubicin and CpG nanoparticles to modulate tumor microenvironment for effective chemo-immunotherapy. Biomaterials, 230. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119659

Doonan, B. B., Schaafsma, E., Pinto, J. T., Wu, J. M., & Hsieh, T. chen. (2017). Application of open-access databases to determine functional connectivity between resveratrol-binding protein QR2 and colorectal carcinoma. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal, 53(7). https://doi.org/10.1007/s11626-017-0174-x

Du, D., Liu, C., Qin, M., Zhang, X., Xi, T., Yuan, S., Hao, H., & Xiong, J. (2022). Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma. In Acta Pharmaceutica Sinica B (Vol. 12, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.019

Du, W., Chen, C., Sun, P., Zhang, S., Zhang, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, R., Yan, C., Fan, C., Wu, J., & Jiang, X. (2020). Eliciting an immune hot tumor niche with biomimetic drug-based multi-functional nanohybrids augments immune checkpoint blockade-based breast cancer therapy. Nanoscale, 12(5). https://doi.org/10.1039/c9nr09835f

Enofe, N., Morris, A. D., Liu, Y., Liang, W., Wu, C. S., Sullivan, P. S., Balch, G. G., Staley, C. A., Gillespie, T. W., & Shaffer, V. O. (2020). Receipt of Adjuvant Chemotherapy in Stage II Colon Cancer and Overall Survival: A National Cancer Database Study. Journal of Surgical Research, 252. https://doi.org/10.1016/j.jss.2020.02.016

Epp, J. (2016). X-Ray Diffraction (XRD) Techniques for Materials Characterization. In Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3

Fadley, C. S. (2010). X-ray photoelectron spectroscopy: Progress and perspectives. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 178–179(C). https://doi.org/10.1016/j.elspec.2010.01.006

Fang, R. H., Kroll, A. v., Gao, W., & Zhang, L. (2018). Cell Membrane Coating Nanotechnology. In Advanced Materials (Vol. 30, Issue 23). https://doi.org/10.1002/adma.201706759

Fu, Y., Ye, Y., Liu, X., Zhu, G., Xu, Y., Sun, J., Wu, H., Feng, F., Wen, Z., Jiang, S., Li, Y., & Zhang, Q. (2021). Analyzing microsatellite instability and gene mutation in circulating cell-free DNA to monitor colorectal cancer progression. Translational Cancer Research, 10(6). https://doi.org/10.21037/tcr-20-2762

Gandioso, A., Shaili, E., Massaguer, A., Artigas, G., González-Cantó, A., Woods, J. A., Sadler, P. J., & Marchán, V. (2015). An integrin-targeted photoactivatable Pt(iv) complex as a selective anticancer pro-drug: Synthesis and photoactivation studies. Chemical Communications, 51(44). https://doi.org/10.1039/c5cc03180j

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. International Journal of Molecular Sciences, 22(23). https://doi.org/10.3390/ijms222312827

Ghashghaeinia, M., Köberle, M., Mrowietz, U., & Bernhardt, I. (2019). Proliferating tumor cells mimick glucose metabolism of mature human erythrocytes. In Cell Cycle (Vol. 18, Issue 12). https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1618125

Gholizadeh, O., Yasamineh, S., Amini, P., Afkhami, H., Delarampour, A., Akbarzadeh, S., Karimi Matloub, R., Zahedi, M., Hosseini, P., Hajiesmaeili, M., & Poortahmasebi, V. (2022). Therapeutic and diagnostic applications of nanoparticles in the management of COVID-19: a comprehensive overview. In Virology Journal (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12985-022-01935-7

Giacomini, I., Ragazzi, E., Pasut, G., & Montopoli, M. (2020). The pentose phosphate pathway and its involvement in cisplatin resistance. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 21, Issue 3). https://doi.org/10.3390/ijms21030937

Giechaskiel, B., & Clairotte, M. (2021). Fourier transform infrared (Ftir) spectroscopy for measurements of vehicle exhaust emissions: A review. In Applied Sciences (Switzerland) (Vol. 11, Issue 16). https://doi.org/10.3390/app11167416

Glimelius, B., Tiret, E., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013). Rectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 24(SUPPL.6). https://doi.org/10.1093/annonc/mdt240

Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2017). Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. In Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9

Gong, Y., Zhi, K., Nagesh, P. K. B., Sinha, N., Chowdhury, P., Chen, H., Gorantla, S., Yallapu, M. M., & Kumar, S. (2020). An elvitegravir nanoformulation crosses the blood–brain barrier and suppresses HIV-1 replication in microglia. Viruses, 12(5). https://doi.org/10.3390/v12050564

González, J. J., Ortega, E., Rothemund, M., Gold, M., Vicente, C., de Haro, C., Bautista, D., Schobert, R., & Ruiz, J. (2019). Luminescent Gold(I) Complexes of 1-Pyridyl-3-anthracenylchalcone Inducing Apoptosis in Colon Carcinoma Cells and Antivascular Effects. Inorganic Chemistry, 58(19). https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01901

Groarke, R., Vijayaraghavan, R. K., Powell, D., Rennie, A., & Brabazon, D. (2021). Powder characterization-methods, standards, and state of the art. In Fundamentals of Laser Powder Bed Fusion of Metals. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824090-8.00006-8

Grothey, A., Sobrero, A. F., Shields, A. F., Yoshino, T., Paul, J., Taieb, J., Souglakos, J., Shi, Q., Kerr, R., Labianca, R., Meyerhardt, J. A., Vernerey, D., Yamanaka, T., Boukovinas, I., Meyers, J. P., Renfro, L. A., Niedzwiecki, D., Watanabe, T., Torri, V., … Iveson, T. (2018). Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. New England Journal of Medicine, 378(13). https://doi.org/10.1056/nejmoa1713709

Gu, Z., Wang, Q., Shi, Y., Huang, Y., Zhang, J., Zhang, X., & Lin, G. (2018). Nanotechnology-mediated immunochemotherapy combined with docetaxel and PD-L1 antibody increase therapeutic effects and decrease systemic toxicity. Journal of Controlled Release, 286. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.011

Haji, G., Wiegman, C. H., Michaeloudes, C., Patel, M. S., Curtis, K., Bhavsar, P., Polkey, M. I., Adcock, I. M., & Chung, K. F. (2020). Mitochondrial dysfunction in airways and quadriceps muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Respiratory Research, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12931-020-01527-5

Han, Y., Chen, P., Zhang, Y., Lu, W., Ding, W., Luo, Y., Wen, S., Xu, R., Liu, P., & Huang, P. (2019). Synergy between auranofin and celecoxib against colon cancer in vitro and in vivo through a novel redox-mediated mechanism. Cancers, 11(7). https://doi.org/10.3390/cancers11070931

Hanover, J. A., Krause, M. W., & Love, D. C. (2010). The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. In Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects (Vol. 1800, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.017

Harrington, G. F., & Santiso, J. (2021). Back-to-Basics tutorial: X-ray diffraction of thin films. Journal of Electroceramics, 47(4). https://doi.org/10.1007/s10832-021-00263-6

Hashiguchi, Y., Muro, K., Saito, Y., Ito, Y., Ajioka, Y., Hamaguchi, T., Hasegawa, K., Hotta, K., Ishida, H., Ishiguro, M., Ishihara, S., Kanemitsu, Y., Kinugasa, Y., Murofushi, K., Nakajima, T. E., Oka, S., Tanaka, T., Taniguchi, H., Tsuji, A., … Sugihara, K. (2020). Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. International Journal of Clinical Oncology, 25(1). https://doi.org/10.1007/s10147-019-01485-z

Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. In Cancer Cell (Vol. 38, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001

Hazafa, A., Rehman, K. U., Jahan, N., & Jabeen, Z. (2020). The Role of Polyphenol (Flavonoids) Compounds in the Treatment of Cancer Cells. In Nutrition and Cancer (Vol. 72, Issue 3). https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1637006

Heydarzadeh, S., Moshtaghie, A. A., Daneshpoor, M., & Hedayati, M. (2020). Regulators of glucose uptake in thyroid cancer cell lines. In Cell Communication and Signaling (Vol. 18, Issue 1). https://doi.org/10.1186/s12964-020-00586-x

Hishinuma, E., Rico, E. G., & Hiratsuka, M. (2020). In vitro assessment of fluoropyrimidine-metabolizing enzymes: Dihydropyrimidine dehydrogenase, dihydropyrimidinase, and β-ureidopropionase. In Journal of Clinical Medicine (Vol. 9, Issue 8). https://doi.org/10.3390/jcm9082342

Hong, L., Chen, J., Wu, F., Wu, F., Shen, X., Zheng, P., Shao, R., Lu, K., Liu, Z., Chen, D., Liang, G., Cai, Y., Zou, P., & Xia, Y. (2020). Isodeoxyelephantopin Inactivates Thioredoxin Reductase 1 and Activates ROS-Mediated JNK Signaling Pathway to Exacerbate Cisplatin Effectiveness in Human Colon Cancer Cells. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580517

Hsu, H. J., Bugno, J., Lee, S. R., & Hong, S. (2017). Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery. In Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology (Vol. 9, Issue 1). https://doi.org/10.1002/wnan.1409

Huang, J., Günther, B., Achterhold, K., Cui, Y. tao, Gleich, B., Dierolf, M., & Pfeiffer, F. (2020). Energy-Dispersive X-ray Absorption Spectroscopy with an Inverse Compton Source. Scientific Reports, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-65225-4

Huang, W.-S., Hsieh, M.-C., Huang, C.-Y., Kuo, Y.-H., Tung, S.-Y., Shen, C.-H., Hsieh, Y.-Y., Teng, C.-C., Lee, K.-F., Chen, T.-C., Lee, K.-C., & Kuo, H.-C. (2016). The Association of CXC Receptor 4 Mediated Signaling Pathway with Oxaliplatin-Resistant Human Colorectal Cancer Cells. PLOS ONE, 11(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159927

Ishiguro, M., Ueno, H., Kanemitsu, Y., Hamaguchi, T., Shida, D., & Shimada, Y. (2018). Current clinical practice of adjuvant chemotherapy for patients with “high-risk” Stage II colorectal cancer in Japan: A questionnaire survey in the JCOG Study Group. Japanese Journal of Clinical Oncology, 48(12). https://doi.org/10.1093/jjco/hyy150

Jeong, W. J., Ro, E. J., & Choi, K. Y. (2018). Interaction between Wnt/β-catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of β-catenin and RAS by targeting the Wnt/β-catenin pathway. In npj Precision Oncology (Vol. 2, Issue 1). https://doi.org/10.1038/s41698-018-0049-y

Ji, Z., Liu, G. H., & Qu, J. (2022). Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. In Journal of Genetics and Genomics (Vol. 49, Issue 4). https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.11.005

Jiang, J., Zhang, L., Chen, H., Lei, Y., Zhang, T., Wang, Y., Jin, P., Lan, J., Zhou, L., Huang, Z., Li, B., Liu, Y., Gao, W., Xie, K., Zhou, L., Nice, E. C., Peng, Y., Cao, Y., Wei, Y., … Huang, C. (2020). Regorafenib induces lethal autophagy arrest by stabilizing PSAT1 in glioblastoma. Autophagy, 16(1). https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1598752

Jiang, L., Zhang, J., Xu, Q., Wang, B., Yao, Y., Sun, L., Wang, X., Zhou, D., Gao, L., Song, S., & Zhu, X. (2021). YAP promotes the proliferation and migration of colorectal cancer cells through the Glut3/AMPK signaling pathway. Oncology Letters, 21(4). https://doi.org/10.3892/ol.2021.12573

Jin, H., Wan, C., Zou, Z., Zhao, G., Zhang, L., Geng, Y., Chen, T., Huang, A., Jiang, F., Feng, J. P., Lovell, J. F., Chen, J., Wu, G., & Yang, K. (2018). Tumor Ablation and Therapeutic Immunity Induction by an Injectable Peptide Hydrogel. ACS Nano, 12(4). https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08148

Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. In Journal of Nanobiotechnology (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8

Joye, T., Sidibé, J., Déglon, J., Karmime, A., Sporkert, F., Widmer, C., Favrat, B., Lescuyer, P., Augsburger, M., & Thomas, A. (2019). Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure. Analytica Chimica Acta, 1063. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.011

Kadiyala, P., Li, D., Nunez, F. M., Altshuler, D., Doherty, R., Kuai, R., Yu, M., Kamran, N., Edwards, M., Moon, J. J., Lowenstein, P. R., Castro, M. G., & Schwendeman, A. (2019). High-Density Lipoprotein-Mimicking Nanodiscs for Chemo-

immunotherapy against Glioblastoma Multiforme. ACS Nano. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06842

Kale, V. P., Amin, S. G., & Pandey, M. K. (2015). Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. In Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes (Vol. 1848, Issue 10). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.034

Kano, S., Tada, T., & Majima, Y. (2015). Nanoparticle characterization based on STM and STS. In Chemical Society Reviews (Vol. 44, Issue 4). https://doi.org/10.1039/c4cs00204k

Kasi, P. M., Shahjehan, F., Cochuyt, J. J., Li, Z., Colibaseanu, D. T., & Merchea, A. (2019). Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer. Clinical Colorectal Cancer, 18(1). https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.10.002

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. In Arabian Journal of Chemistry (Vol. 12, Issue 7). https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011

Kim, S., Heo, S., Brzostowski, J., & Kang, D. (2021). Endosomal mtorc2 is required for phosphoinositide-dependent akt activation in platelet-derived growth factor-stimulated glioma cells. Cancers, 13(10). https://doi.org/10.3390/cancers13102405

Kolesnikova, M., Sen'Kova, A., Tairova, S., Ovchinnikov, V., Pospelova, T., & Zenkova, M. (2019). Clinical and prognostic significance of cell sensitivity to chemotherapy detected in vitro on treatment response and survival of leukemia patients. Journal of Personalized Medicine, 9(2). https://doi.org/10.3390/jpm9020024

Kono, K. (2012). Dendrimer-based bionanomaterials produced by surface modification, assembly and hybrid formation. Polymer Journal, 44(6). https://doi.org/10.1038/pj.2012.39

Konrad, S. F., Vanderlinden, W., & Lipfert, J. (2022). Quantifying epigenetic modulation of nucleosome breathing by high-throughput AFM imaging. Biophysical Journal, 121(5). https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.01.014

Kremer, D. M., Nelson, B. S., Lin, L., Yarosz, E. L., Halbrook, C. J., Kerk, S. A., Sajjakulnukit, P., Myers, A., Thurston, G., Hou, S. W., Carpenter, E. S., Andren, A. C., Nwosu, Z. C., Cusmano, N., Wisner, S., Mbah, N. E., Shan, M., Das, N. K., Magnuson, B., … Lyssiotis, C. A. (2021). GOT1 inhibition promotes pancreatic cancer cell death by ferroptosis. Nature Communications, 12(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-24859-2

Küçükgüven, M. B., & Çelebi-Saltik, B. (2020). Different Aspects of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Cancer Stem Cells, their Niche and Targeted Therapy. Current Stem Cell Research & Therapy, 16(3). https://doi.org/10.2174/1574888x15666200921163326

Kumar, A., & Dixit, C. K. (2017). Methods for characterization of nanoparticles. In Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1

Lammer, A. D., Cook, M. E., & Sessler, J. L. (2015). Synthesis and anti-cancer activities of a water soluble gold(III) porphyrin. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 19(1–3). https://doi.org/10.1142/S1088424615500236

Lang, T., Liu, Y., Zheng, Z., Ran, W., Zhai, Y., Yin, Q., Zhang, P., & Li, Y. (2019). Cocktail Strategy Based on Spatio-Temporally Controlled Nano Device Improves Therapy of Breast Cancer. Advanced Materials, 31(5). https://doi.org/10.1002/adma.201806202

Lee, S. W., Zhang, Y., Jung, M., Cruz, N., Alas, B., & Commisso, C. (2019). EGFR-Pak Signaling Selectively Regulates Glutamine Deprivation-Induced Macropinocytosis. Developmental Cell, 50(3). https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.043

Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., & Antal, I. (2019). Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. In Scientia Pharmaceutica (Vol. 87, Issue 3). https://doi.org/10.3390/scipharm87030020

Leone, R. D., Zhao, L., Englert, J. M., Sun, I. M., Oh, M. H., Sun, I. H., Arwood, M. L., Bettencourt, I. A., Patel, C. H., Wen, J., Tam, A., Blosser, R. L., Prchalova, E., Alt, J., Rais, R., Slusher, B. S., & Powell, J. D. (2019). Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion. Science, 366(6468). https://doi.org/10.1126/science.aav2588

Li, H. J., Du, J. Z., Du, X. J., Xu, C. F., Sun, C. Y., Wang, H. X., Cao, Z. T., Yang, X. Z., Zhu, Y. H., Nie, S., & Wang, J. (2016). Stimuli-responsive clustered nanoparticles for improved tumor penetration and therapeutic efficacy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(15). https://doi.org/10.1073/pnas.1522080113

Li, M., Li, J., Guo, X., Pan, H., & Zhou, Q. (2020). Absence of HTATIP2 expression in A549 lung adenocarcinoma cells promotes tumor plasticity in response to hypoxic stress. Cancers, 12(6). https://doi.org/10.3390/cancers12061538

Liang, C., Huang, Y., He, L., Chen, X., Ma, Z., Dong, D., Tian, J., Liang, C., & Liu, Z. (2016). The development and validation of a CT-based radiomics signature for the

preoperative discrimination of stage I-II and stage III-IV colorectal cancer. Oncotarget, 7(21). https://doi.org/10.18632/oncotarget.8919

Liang, C., Zhao, J., Lu, J., Zhang, Y., Ma, X., Shang, X., Li, Y., Ma, X., Liu, M., & Wang, X. (2019). Development and characterization of MDR1 (MDR1a/B) CRISPR/Cas9 knockout rat model. Drug Metabolism and Disposition, 47(2). https://doi.org/10.1124/dmd.118.084277

Liang, X., Ye, X., Wang, C., Xing, C., Miao, Q., Xie, Z., Chen, X., Zhang, X., Zhang, H., & Mei, L. (2019). Photothermal cancer immunotherapy by erythrocyte membrane-coated black phosphorus formulation. Journal of Controlled Release, 296. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.027

Lim, J. K. M., & Leprivier, G. (2019). The impact of oncogenic RAS on redox balance and implications for cancer development. In Cell Death and Disease (Vol. 10, Issue 12). https://doi.org/10.1038/s41419-019-2192-y

Lin, R., Tao, R., Gao, X., Li, T., Zhou, X., Guan, K. L., Xiong, Y., & Lei, Q. Y. (2013). Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth. Molecular Cell, 51(4). https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.002

Liu, C., Xing, W., Yu, H., Zhang, W., & Si, T. (2021). ABCB1 and ABCG2 restricts the efficacy of gedatolisib (PF-05212384), a PI3K inhibitor in colorectal cancer cells. Cancer Cell International, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12935-021-01800-7

Liu, J., Zhang, N., Li, N., Fan, X., & Li, Y. (2019). Influence of verapamil on the pharmacokinetics of oridonin in rats. Pharmaceutical Biology, 57(1). https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1688844

Liu, X., & Ghosh, D. (2019). Intracellular nanoparticle delivery by oncogenic KRAS-mediated macropinocytosis. International Journal of Nanomedicine, 14. https://doi.org/10.2147/IJN.S212861

Liu, Y., Chen, X. G., Yang, P. P., Qiao, Z. Y., & Wang, H. (2019a). Tumor Microenvironmental pH and Enzyme Dual Responsive Polymer-Liposomes for Synergistic Treatment of Cancer Immuno-Chemotherapy. Biomacromolecules, 20(2). https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01510

Liu, Y., Luo, J., Chen, X., Liu, W., & Chen, T. (2019b). Cell Membrane Coating Technology: A Promising Strategy for Biomedical Applications. In Nano-Micro Letters (Vol. 11, Issue 1). https://doi.org/10.1007/s40820-019-0330-9

Liu, Y., Zhao, T., Li, Z., Wang, L., Yuan, S., & Sun, L. (2018). The role of ASCT2 in cancer: A review. In European Journal of Pharmacology (Vol. 837). https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.007

Loganayagam, A., Arenas Hernandez, M., Corrigan, A., Fairbanks, L., Lewis, C. M., Harper, P., Maisey, N., Ross, P., Sanderson, J. D., & Marinaki, A. M. (2013). Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. British Journal of Cancer, 108(12). https://doi.org/10.1038/bjc.2013.262

Lu, Y. Y., Wu, C. H., Hong, C. H., Chang, K. L., & Lee, C. H. (2021). GLUT-1 enhances glycolysis, oxidative stress, and fibroblast proliferation in Keloid. Life, 11(6). https://doi.org/10.3390/life11060505

Luiz, J. P. M., Toller-Kawahisa, J. E., Viacava, P. R., Nascimento, D. C., Pereira, P. T., Saraiva, A. L., Prado, D. S., LeBert, M., Giurisato, E., Tournier, C., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., Quesniaux, V., Ryffel, B., & Alves-Filho, J. C. (2020). MEK5/ERK5 signaling mediates IL-4-induced M2 macrophage differentiation through regulation of c-Myc expression. Journal of Leukocyte Biology, 108(4). https://doi.org/10.1002/JLB.1MA0520-016R

Lykhach, Y., Kozlov, S. M., Skála, T., Tovt, A., Stetsovych, V., Tsud, N., Dvořák, F., Johánek, V., Neitzel, A., Mysliveček, J., Fabris, S., Matolín, V., Neyman, K. M., & Libuda, J. (2016). Counting electrons on supported nanoparticles. Nature Materials, 15(3). https://doi.org/10.1038/nmat4500

Manor, J., Feldblum, E. S., Zanni, M. T., & Arkin, I. T. (2012). Environment polarity in proteins mapped noninvasively by FTIR spectroscopy. Journal of Physical Chemistry Letters, 3(7). https://doi.org/10.1021/jz300150v

Manzanares, D., & Ceña, V. (2020). Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. In Pharmaceutics (Vol. 12, Issue 4). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371

Mao, L., Li, Y., Zhao, J., Li, Q., Yang, B., Wang, Y., Zhu, Z., Sun, H., & Zhai, Z. (2017). Transforming growth factor-β1 contributes to oxaliplatin resistance in colorectal cancer via epithelial to mesenchymal transition. Oncology Letters, 14(1). https://doi.org/10.3892/ol.2017.6209

Marcolino, T. F., Pimenta, C. A. M., Neto, R. A., Castelo, P., Silva, M. S., Forones, N. M., & Oshima, C. T. F. (2020). p53, Cyclin-D1, β-catenin, APC and c-myc in Tumor Tissue from Colorectal and Gastric Cancer Patients with Suspected Lynch Syndrome by the Bethesda Criteria. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 21(2). https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.2.343

Maree, J., & Potgieter, T. (2018). Palliative chemotherapy: The perspectives and experiences of south african nurses. Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing, 5(1). https://doi.org/10.4103/2347-5625.217443

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., & Yoldi, M. J. R. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 18, Issue 1). https://doi.org/10.3390/ijms18010197

Mauri, E., Giannitelli, S. M., Trombetta, M., & Rainer, A. (2021). Synthesis of nanogels: Current trends and future outlook. In Gels (Vol. 7, Issue 2). https://doi.org/10.3390/gels7020036

Mauri, G., Sartore-Bianchi, A., Russo, A. G., Marsoni, S., Bardelli, A., & Siena, S. (2019). Early-onset colorectal cancer in young individuals. In Molecular Oncology (Vol. 13, Issue 2). https://doi.org/10.1002/1878-0261.12417

McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. In Nature Reviews Molecular Cell Biology (Vol. 12, Issue 8). https://doi.org/10.1038/nrm3151

McNeil-Watson, F. (2013). Electrophoretic Light Scattering. In Encyclopedia of Biophysics. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_288

Mercer, J., & Helenius, A. (2012). Gulping rather than sipping: Macropinocytosis as a way of virus entry. In Current Opinion in Microbiology (Vol. 15, Issue 4). https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.05.016

Mikalayeva, V., Ceslevičienė, I., Sarapinienė, I., Žvikas, V., Skeberdis, V. A., Jakštas, V., & Bordel, S. (2019). Fatty acid synthesis and degradation interplay to regulate the oxidative stress in cancer cells. International Journal of Molecular Sciences, 20(6). https://doi.org/10.3390/ijms20061348

Mirzaei, S., Gholami, M. H., Hashemi, F., Zabolian, A., Farahani, M. V., Hushmandi, K., Zarrabi, A., Goldman, A., Ashrafizadeh, M., & Orive, G. (2022). Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. In Drug Discovery Today (Vol. 27, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.020

Misono, T. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). In Measurement Techniques and Practices of Colloid and Interface Phenomena. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5931-6_10

Miyo, M., Konno, M., Nishida, N., Sueda, T., Noguchi, K., Matsui, H., Colvin, H., Kawamoto, K., Koseki, J., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Gotoh, N., Matsuda, F., Satoh, T., Mizushima, T., Shimizu, H., Doki, Y., Mori, M., & Ishii, H. (2016). Metabolic Adaptation to Nutritional Stress in Human Colorectal Cancer. Scientific Reports, 6. https://doi.org/10.1038/srep38415

Mjos, K. D., & Orvig, C. (2014). Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. In Chemical Reviews (Vol. 114, Issue 8). https://doi.org/10.1021/cr400460s

Mohammadi, G., Fathian-Kolahkaj, M., Mohammadi, P., Adibkia, K., & Fattahi, A. (2020). Preparation, Physicochemical Characterization and Anti-Fungal Evaluation of Amphotericin B-Loaded PLGA-PEG-Galactosamine Nanoparticles. Advanced Pharmaceutical Bulletin. https://doi.org/10.34172/apb.2021.044

Mohammadian, M., Zeynali, S., Azarbaijani, A. F., Khadem Ansari, M. H., & Kheradmand, F. (2017). Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. Research in Pharmaceutical Sciences, 12(6). https://doi.org/10.4103/1735-5362.217432

Mu, W., Chu, Q., Liu, Y., & Zhang, N. (2020). A Review on Nano-Based Drug Delivery System for Cancer Chemoimmunotherapy. In Nano-Micro Letters (Vol. 12, Issue 1). https://doi.org/10.1007/s40820-020-00482-6

Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. In Interface Science and Technology (Vol. 28). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00006-7

Nassar, D., & Blanpain, C. (2016). Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 11. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438

Neugut, A. I., Lin, A., Raab, G. T., Hillyer, G. C., Keller, D., O'Neil, D. S., Accordino, M. K., Kiran, R. P., Wright, J., & Hershman, D. L. (2019). FOLFOX and FOLFIRI Use in Stage IV Colon Cancer: Analysis of SEER-Medicare Data. Clinical Colorectal Cancer, 18(2). https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.01.005

Nilsson, L. M., Plym Forshell, T. Z., Rimpi, S., Kreutzer, C., Pretsch, W., Bornkamm, G. W., & Nilsson, J. A. (2012). Mouse genetics suggests cell-context dependency for myc-regulated metabolic enzymes during tumorigenesis. PLoS Genetics, 8(3). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002573

Noreen, F., Küng, T., Tornillo, L., Parker, H., Silva, M., Weis, S., Marra, G., Rad, R., Truninger, K., & Schär, P. (2019). DNA methylation instability by BRAF-mediated TET silencing and lifestyle-exposure divides colon cancer pathways. Clinical Epigenetics, 11(1). https://doi.org/10.1186/s13148-019-0791-1

O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. In Nature Reviews Clinical Oncology (Vol. 16, Issue 3). https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8

Oliveira, A. L. C. de S. L., de Araújo Júnior, R. F., de Carvalho, T. G., Chan, A. B., Schomann, T., Tamburini, F., de Geus-Oei, L. F., & Cruz, L. J. (2020). Effect of oxaliplatin-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles combined with retinoic acid and cholesterol on apoptosis, drug resistance, and metastasis factors of colorectal cancer. Pharmaceutics, 12(2). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020193

Onodera, T., Momose, I., & Kawada, M. (2019). Potential anticancer activity of auranofin. In Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Vol. 67, Issue 3). https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00767

Otten, M. T. (1989). High-angle annular dark-field imaging on a TEM/STEM system. Proceedings, Annual Meeting, Electron Microscopy Society of America, 47. https://doi.org/10.1017/s042482010015304x

Ou, W., Byeon, J. H., Thapa, R. K., Ku, S. K., Yong, C. S., & Kim, J. O. (2018). Plug-and-play nanorization of coarse black phosphorus for targeted chemophotoimmunotherapy of colorectal cancer. ACS Nano, 12(10). https://doi.org/10.1021/acsnano.8b04658

Park, J. H., Pyun, W. Y., & Park, H. W. (2020). Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. In Cells (Vol. 9, Issue 10). https://doi.org/10.3390/cells9102308

Parodi, A., Molinaro, R., Sushnitha, M., Evangelopoulos, M., Martinez, J. O., Arrighetti, N., Corbo, C., & Tasciotti, E. (2017). Bio-inspired engineering of cell- and virus-like nanoparticles for drug delivery. In Biomaterials (Vol. 147). https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.020

Pattni, B. S., Chupin, V. v., & Torchilin, V. P. (2015). New Developments in Liposomal Drug Delivery. In Chemical Reviews (Vol. 115, Issue 19). https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046

Paul, B., Lewinska, M., & Andersen, J. B. (2022). Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer. In JHEP Reports (Vol. 4, Issue 6). https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100479

Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. In European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (Vol. 93). https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018

Perinelli, D. R., Cespi, M., Bonacucina, G., & Palmieri, G. F. (2019). PEGylated polylactide (PLA) and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) copolymers for the

design of drug delivery systems. In Journal of Pharmaceutical Investigation (Vol. 49, Issue 4). https://doi.org/10.1007/s40005-019-00442-2

Pinweha, P., Rattanapornsompong, K., Charoensawan, V., & Jitrapakdee, S. (2016). MicroRNAs and oncogenic transcriptional regulatory networks controlling metabolic reprogramming in cancers. In Computational and Structural Biotechnology Journal (Vol. 14). https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.05.005

Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. The Clinical Biochemist. Reviews, 30(1).

Popova, N. v., Deyev, I. E., & Petrenko, A. G. (2013). Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. In Acta Naturae (Vol. 5, Issue 18). https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-3-62-73

Qi, L., Luo, Q., Zhang, Y., Jia, F., Zhao, Y., & Wang, F. (2019). Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. In Chemical Research in Toxicology (Vol. 32, Issue 8). https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00204

Qiao, H., Chen, X., Chen, E., Zhang, J., Huang, D., Yang, D., Ding, Y., Qian, H., Feijen, J., & Chen, W. (2019). Folated pH-degradable nanogels for the simultaneous delivery of docetaxel and an IDO1-inhibitor in enhancing cancer chemo-immunotherapy. Biomaterials Science, 7(7). https://doi.org/10.1039/c9bm00324j

Ramu, B., Kumar, S. U., Srikanth, G., & Rajkamal, B. (2016). Formulation and Evaluation of Sustained Release Verapamil Hydrochloride Using Natural Polymers. International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences And Research, 1(02). https://doi.org/10.21477/ijapsr.v1i2.10179

Rashid, M., Zadeh, L. R., Baradaran, B., Molavi, O., Ghesmati, Z., Sabzichi, M., & Ramezani, F. (2021). Up-down regulation of HIF-1α in cancer progression. In Gene (Vol. 798). https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145796

Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. In Przeglad Gastroenterologiczny (Vol. 14, Issue 2). https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072

Ren, P., Yue, M., Xiao, D., Xiu, R., Gan, L., Liu, H., & Qing, G. (2015). ATF4 and N-Myc coordinate glutamine metabolism in MYCN-amplified neuroblastoma cells through ASCT2 activation. Journal of Pathology, 235(1). https://doi.org/10.1002/path.4429

Rezvantalab, S., & Keshavarz Moraveji, M. (2019). Microfluidic assisted synthesis of PLGA drug delivery systems. In RSC Advances (Vol. 9, Issue 4). https://doi.org/10.1039/C8RA08972H

Risnayanti, C., Jang, Y. S., Lee, J., & Ahn, H. J. (2018). PLGA nanoparticles co-delivering MDR1 and BCL2 siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer. Scientific Reports, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-25930-7

Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., & Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship. In Clinics (Vol. 73). https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s

Rottenberg, S., Disler, C., & Perego, P. (2021). The rediscovery of platinum-based cancer therapy. In Nature Reviews Cancer (Vol. 21, Issue 1). https://doi.org/10.1038/s41568-020-00308-y

Sahare, S., Ghoderao, P., Khan, S. B., Chan, Y., & Lee, S. L. (2020). Recent progress in hybrid perovskite solar cells through scanning tunneling microscopy and spectroscopy. In Nanoscale (Vol. 12, Issue 30). https://doi.org/10.1039/d0nr03499a

Salazar-Beltrán, D., Hinojosa-Reyes, L., Ruiz-Ruiz, E., Hernández-Ramírez, A., & Luis Guzmán-Mar, J. (2017). Determination of phthalates in bottled water by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography with uv detection. Talanta, 168. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.060

Sampath, U. G. T. M., Ching, Y. C., Chuah, C. H., Sabariah, J. J., & Lin, P. C. (2016). Fabrication of porous materials from natural/synthetic biopolymers and their composites. In Materials (Vol. 9, Issue 12). https://doi.org/10.3390/ma9120991

Sandru, F., Dumitrascu, M., Petca, A., Carsote, M., Petca, R.-C., & Ghemigian, A. (2021). Melanoma in patients with Li Fraumeni syndrome (Review). Experimental and Therapeutic Medicine, 23(1). https://doi.org/10.3892/etm.2021.10998

Sara, J. D., Kaur, J., Khodadadi, R., Rehman, M., Lobo, R., Chakrabarti, S., Herrmann, J., Lerman, A., & Grothey, A. (2018). 5-fluorouracil and cardiotoxicity: a review. In Therapeutic Advances in Medical Oncology (Vol. 10). https://doi.org/10.1177/1758835918780140

Sarogni, P., Palumbo, O., Servadio, A., Astigiano, S., D'Alessio, B., Gatti, V., Cukrov, D., Baldari, S., Pallotta, M. M., Aretini, P., Dell'Orletta, F., Soddu, S., Carella, M., Toietta, G., Barbieri, O., Fontanini, G., & Musio, A. (2019). Overexpression of the cohesin-core subunit SMC1A contributes to colorectal cancer development. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 38(1). https://doi.org/10.1186/s13046-019-1116-0

Schmitt, M., & Greten, F. R. (2021). The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. In Nature Reviews Immunology (Vol. 21, Issue 10). https://doi.org/10.1038/s41577-021-00534-x

Sherwani, M. A., Tufail, S., Muzaffar, A. F., & Yusuf, N. (2018). The skin microbiome and immune system: Potential target for chemoprevention? In Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine (Vol. 34, Issue 1). https://doi.org/10.1111/phpp.12334

Shinji, S., Yamada, T., Matsuda, A., Sonoda, H., Ohta, R., Iwai, T., Takeda, K., Yonaga, K., Masuda, Y., & Yoshida, H. (2022). Recent Advances in the Treatment of Colorectal Cancer: A Review. In Journal of Nippon Medical School (Vol. 89, Issue 3). https://doi.org/10.1272/jnms.JNMS.2022_89-310

Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Anderson, W. F., Miller, K. D., Ma, J., Rosenberg, P. S., & Jemal, A. (2017). Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. In Journal of the National Cancer Institute (Vol. 109, Issue 8). https://doi.org/10.1093/jnci/djw322

Singh, R. K., Kumar, D., & Gourinath, S. (2021). Phosphoserine Aminotransferase has Conserved Active Site from Microbes to Higher Eukaryotes with Minor Deviations. Protein & Peptide Letters, 28(9). https://doi.org/10.2174/0929866528666210215140231

Song, Q., Yin, Y., Shang, L., Wu, T., Zhang, D., Kong, M., Zhao, Y., He, Y., Tan, S., Guo, Y., & Zhang, Z. (2017). Tumor Microenvironment Responsive Nanogel for the Combinatorial Antitumor Effect of Chemotherapy and Immunotherapy. Nano Letters, 17(10). https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b03186

Stern, T., Kaner, I., Laser Zer, N., Shoval, H., Dror, D., Manevitch, Z., Chai, L., Brill-Karniely, Y., & Benny, O. (2017). Rigidity of polymer micelles affects interactions with tumor cells. Journal of Controlled Release, 257. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.013

Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. In Cell Systems (Vol. 9, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3). https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tenchov, R., Bird, R., Curtze, A. E., & Zhou, Q. (2021). Lipid Nanoparticles from Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. In ACS Nano (Vol. 15, Issue 11). https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996

Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. In Nutrients (Vol. 11, Issue 1). https://doi.org/10.3390/nu11010164

Todaro, B., Moscardini, A., & Luin, S. (2022). Pioglitazone-Loaded PLGA Nanoparticles: Towards the Most Reliable Synthesis Method. International Journal of Molecular Sciences, 23(5). https://doi.org/10.3390/ijms23052522

Tummala, S., Kumar, M. N. S., & Pindiprolu, S. K. (2016). Improved anti-tumor activity of oxaliplatin by encapsulating in anti-DR5 targeted gold nanoparticles. Drug Delivery, 23(9). https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1199606

Turiel-Fernández, D., Gutiérrez-Romero, L., Corte-Rodriguez, M., Bettmer, J., & Montes-Bayón, M. (2021). Ultrasmall iron oxide nanoparticles cisplatin (IV) prodrug nanoconjugate: ICP-MS based strategies to evaluate the formation and drug delivery capabilities in single cells. Analytica Chimica Acta, 1159. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338356

Ullah, K., Ali Khan, S., Murtaza, G., Sohail, M., Azizullah, Manan, A., & Afzal, A. (2019). Gelatin-based hydrogels as potential biomaterials for colonic delivery of oxaliplatin. International Journal of Pharmaceutics, 556. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.020

Utsunomiya, S., & Ewing, R. C. (2003). Application of high-angle annular dark field scanning transmission electron microscopy, scanning transmission electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry, and energy-filtered transmission electron microscopy to the characterization of nanoparticles in the environment. Environmental Science and Technology, 37(4). https://doi.org/10.1021/es026053t

van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D., & The ESMO Guidelines Working Group. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 25. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu260

van de Velde, C. J. H., Boelens, P. G., Tanis, P. J., Espin, E., Mroczkowski, P., Naredi, P., Pahlman, L., Ortiz, H., Rutten, H. J., Breugom, A. J., Smith, J. J., Wibe, A., Wiggers, T., & Valentini, V. (2014). Experts reviews of the multidisciplinary consensus conference colon and rectal cancer 2012: Science, opinions and experiences from the experts of surgery. European Journal of Surgical Oncology, 40(4). https://doi.org/10.1016/j.ejso.2013.10.013

van den Kerkhof, M., Mabille, D., Hendrickx, S., Leprohon, P., Mowbray, C. E., Braillard, S., Ouellette, M., Maes, L., & Caljon, G. (2020). Antileishmanial aminopyrazoles: Studies into mechanisms and stability of experimental drug resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(9). https://doi.org/10.1128/AAC.00152-20

van der Jeught, K., Xu, H. C., Li, Y. J., Lu, X. bin, & Ji, G. (2018). Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. In World Journal of Gastroenterology (Vol. 24, Issue 34). https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3834

Vaupel, P., & Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. In Journal of Physiology (Vol. 599, Issue 6). https://doi.org/10.1113/JP278810

Vijayan, V., Uthaman, S., & Park, I. K. (2018). Cell membrane-camouflaged nanoparticles: A promising biomimetic strategy for cancer theragnostics. In Polymers (Vol. 10, Issue 9). https://doi.org/10.3390/polym10090983

Vladár, A. E., & Hodoroaba, V. D. (2019). Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. In Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00002-X

Wang, C. Y., Hsieh, M. K., Hu, Y. J., Bit, A., & Lai, P. L. (2022). Monocarboxylate Transporter 1-Mediated Lactate Accumulation Promotes Nucleus Pulposus Degeneration Under Hypoxia in A 3d Multilayered Nucleus Pulposus Degeneration Model. European Cells and Materials, 43. https://doi.org/10.22203/eCM.v043a06

Wang, D., & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. In Nature Reviews Drug Discovery (Vol. 4, Issue 4). https://doi.org/10.1038/nrd1691

Wang, F., Li, S., Houerbi, N., & Chou, T. F. (2022). Temporal proteomics reveal specific cell cycle oncoprotein downregulation by p97/VCP inhibition. Cell Chemical Biology, 29(3). https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.11.005

Wang, H., Li, X., Chen, T., Wang, W., Liu, Q., Li, H., Yi, J., & Wang, J. (2013). Mechanisms of verapamil-enhanced chemosensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs: Glutathione reduction and MRP1 downregulation. Oncology Reports, 29(2). https://doi.org/10.3892/or.2012.2156

Wang, H., Liu, Y., He, R., Xu, D., Zang, J., Weeranoppanant, N., Dong, H., & Li, Y. (2020). Cell membrane biomimetic nanoparticles for inflammation and cancer targeting in drug delivery. In Biomaterials Science (Vol. 8, Issue 2). https://doi.org/10.1039/c9bm01392j

Wang, H., Tang, Y., Fang, Y., Zhang, M., Wang, H., He, Z., Wang, B., Xu, Q., & Huang, Y. (2019). Reprogramming Tumor Immune Microenvironment (TIME) and Metabolism via Biomimetic Targeting Codelivery of Shikonin/JQ1. Nano Letters, 19(5). https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00021

Wang, L., Zhao, X., Fu, J., Xu, W., & Yuan, J. (2021). The Role of Tumour Metabolism in Cisplatin Resistance. In Frontiers in Molecular Biosciences (Vol. 8). https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.691795

Wang, T., Yao, W., He, Q., Shao, Y., Zheng, R., & Huang, F. (2018). L-leucine stimulates glutamate dehydrogenase activity and glutamate synthesis by regulating mTORC1/SIRT4 pathway in pig liver. Animal Nutrition, 4(3). https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.002

Wang, Z., Li, Y., Mao, R., Zhang, Y., Wen, J., Liu, Q., Liu, Y., & Zhang, T. (2022). DNAJB8 in small extracellular vesicles promotes Oxaliplatin resistance through TP53/MDR1 pathway in colon cancer. Cell Death and Disease, 13(2). https://doi.org/10.1038/s41419-022-04599-x

Wen, J., Min, X., Shen, M., Hua, Q., Han, Y., Zhao, L., Liu, L., Huang, G., Liu, J., & Zhao, X. (2019). ACLY facilitates colon cancer cell metastasis by CTNNB1. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 38(1). https://doi.org/10.1186/s13046-019-1391-9

Wielandt, A. M., Hurtado, C., Moreno C, M., Villarroel, C., Castro, M., Estay, M., Simian, D., Martinez, M., Vial, M. T., Kronberg, U., & López-Köstner, F. (2020). Characterization of Chilean patients with sporadic colorectal cancer according to the three main carcinogenic pathways: Microsatellite instability, CpG island methylator phenotype and Chromosomal instability. Tumor Biology, 42(7). https://doi.org/10.1177/1010428320938492

Wlodarczyk, M. T., Dragulska, S. A., Camacho-Vanegas, O., Dottino, P. R., Jarzęcki, A. A., Martignetti, J. A., & Mieszawska, A. J. (2018). Platinum(II) Complex-Nuclear Localization Sequence Peptide Hybrid for Overcoming Platinum Resistance in Cancer Therapy. ACS Biomaterials Science and Engineering, 4(2). https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00921

Wolf, A. M. D., Fontham, E. T. H., Church, T. R., Flowers, C. R., Guerra, C. E., LaMonte, S. J., Etzioni, R., McKenna, M. T., Oeffinger, K. C., Shih, Y.-C. T., Walter, L. C., Andrews, K. S., Brawley, O. W., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Siegel, R. L., Wender, R. C., & Smith, R. A. (2018). Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(4). https://doi.org/10.3322/caac.21457

Wu, X., Wu, Y., Ye, H., Yu, S., He, C., & Chen, X. (2017). Interleukin-15 and cisplatin co-encapsulated thermosensitive polypeptide hydrogels for combined immuno-chemotherapy. Journal of Controlled Release, 255. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.011

Wu, X., Zhou, J., & Patel, T. R. (2018). Generation of ultra-small PLGA nanoparticles by sequential centrifugation. In Methods in Molecular Biology (Vol. 1831). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8661-3_2

Xia, Y., Long, J. Y., Shen, M. Y., Dong, N., Guo, H. L., Hu, Y. H., Lu, X. P., Ding, X. S., Chen, F., & Qiu, J. C. (2021). Switching Between LC-ESI-MS/MS and EMIT Methods for Routine TDM of Valproic Acid in Pediatric Patients With Epilepsy: What Clinicians and Researchers Need to Know. Frontiers in Pharmacology, 12. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.750744

Yamashita, M. (2021). Auranofin: Past to Present, and repurposing. In International Immunopharmacology (Vol. 101). https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108272

Yang, J., Zhang, Q., Chang, H., & Cheng, Y. (2015). Surface-Engineered Dendrimers in Gene Delivery. In Chemical Reviews (Vol. 115, Issue 11). https://doi.org/10.1021/cr500542t

Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. Annual Review of Biomedical Engineering, 19. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546

Yang, T., Wang, S., Li, H., Zhao, Q., Yan, S., Dong, M., Liu, D., Chen, X., & Li, R. (2020). Lathyrane diterpenes from Euphorbia lathyris and the potential mechanism to reverse the multi-drug resistance in HepG2/ADR cells. Biomedicine and Pharmacotherapy, 121. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109663

Yi, J., Zhu, J., Wu, J., Thompson, C. B., & Jiang, X. (2020). Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(49). https://doi.org/10.1073/pnas.2017152117

Zayed, A., Jones, G. D. D., Reid, H. J., Shoeib, T., Taylor, S. E., Thomas, A. L., Wood, J. P., & Sharp, B. L. (2011). Speciation of oxaliplatin adducts with DNA nucleotides. Metallomics, 3(10). https://doi.org/10.1039/c1mt00041a

Zeng, P., Lu, W., Tian, J., Qiao, S., Li, J., Glorieux, C., Wen, S., Zhang, H., Li, Y., & Huang, P. (2022). Reductive TCA cycle catalyzed by wild-type IDH2 promotes acute myeloid leukemia and is a metabolic vulnerability for potential targeted therapy. Journal of Hematology and Oncology, 15(1). https://doi.org/10.1186/s13045-022-01245-z

Zerhouni, M., Martin, A. R., Furstoss, N., Gutierrez, V. S., Jaune, E., Tekaya, N., Beranger, G. E., Abbe, P., Regazzetti, C., Amdouni, H., Driowya, M., Dubreuil, P., Luciano, F., Jacquel, A., Tulic, M. K., Cluzeau, T., O'Hara, B. P., Ben-Sahra, I., Passeron, T., … Rocchi, S. (2021). Dual covalent inhibition of PKM and IMPDH

targets metabolism in cutaneous metastatic Melanoma. Cancer Research, 81(14). https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2114

Zhang, C., Hemmert, C., Gornitzka, H., Cuvillier, O., Zhang, M., & Sun, R. W. Y. (2018). Cationic and Neutral N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Complexes: Cytotoxicity, NCI-60 Screening, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian Thioredoxin Reductase, and Reactive Oxygen Species Formation. ChemMedChem, 13(12). https://doi.org/10.1002/cmdc.201800181

Zhang, C., Liu, J., Huang, G., Zhao, Y., Yue, X., Wu, H., Li, J., Zhu, J., Shen, Z., Haffty, B. G., Hu, W., & Feng, Z. (2016). Cullin3-KLHL25 ubiquitin ligase targets ACLY for degradation to inhibit lipid synthesis and tumor progression. Genes and Development, 30(17). https://doi.org/10.1101/gad.283283.116

Zhang, C., Xu, C., Gao, X., & Yao, Q. (2022). Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. In Theranostics (Vol. 12, Issue 5). https://doi.org/10.7150/thno.69424

Zhang, J., Li, X., Han, X., Liu, R., & Fang, J. (2017). Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. In Trends in Pharmacological Sciences (Vol. 38, Issue 9). https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.001

Zhang, J. Y., Hwang, J., Isaac, B. J., & Stemmer, S. (2015). Variable-angle high-angle annular dark-field imaging: Application to three-dimensional dopant atom profiling. Scientific Reports, 5. https://doi.org/10.1038/srep12419

Zhang, T., Yang, G., Liu, Y., & Fan, P. (2019). Verapamil enhances the sensitivity of oxaliplatin to tumor cells by influencing the PARP pathway. Die Pharmazie, 74(12). https://doi.org/10.1691/ph.2019.9715

Zhang, W., Xiong, H., Pang, J., Su, Z., Lai, L., Lin, H., Jian, B., He, W., Yang, H., & Zheng, Y. (2020). Nrf2 activation protects auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity independent on mitochondrial ROS production. Toxicology Letters, 331. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.04.005

Zhang, X., Selvaraju, K., Saei, A. A., D'Arcy, P., Zubarev, R. A., Arnér, E. S., & Linder, S. (2019). Repurposing of auranofin: Thioredoxin reductase remains a primary target of the drug. Biochimie, 162. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.015

Zhang, X., Shan, S., Shi, J., Li, H., & Li, Z. (2021). Polyphenol from millet bran increases the sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin by blocking the ganglioside GM3 catabolism. Food and Function, 12(1). https://doi.org/10.1039/d0fo02232b

Zhang, X., Sui, T., Ma, Q., Shao, H., Hu, X., Sheng, H., Ma, Z., & Luo, G. (2018). Cantharidin suppresses HCT116 colorectal carcinoma cell proliferation and

migration by changing the cytoskeleton structure. Journal of Traditional Chinese Medical Sciences, 5(3). https://doi.org/10.1016/j.jtcms.2018.07.004

Zhang, Y., Hao, J., Du, Z., Li, P., Hu, J., Ruan, M., Li, S., Ma, Y., & Lou, Q. (2021). Inhibition of hepatocyte nuclear factor 1β contributes to cisplatin nephrotoxicity via regulation of nf-κb pathway. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 25(6). https://doi.org/10.1111/jcmm.16316

Zhao, L., Zhao, Y., Schwarz, B., Mysliwietz, J., Hartig, R., Camaj, P., Bao, Q., Jauch, K. W., Guba, M., Ellwart, J. W., Nelson, P. J., & Bruns, C. J. (2016). Verapamil inhibits tumor progression of chemotherapyresistant pancreatic cancer side population cells. International Journal of Oncology, 49(1). https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3512

Zhao, P., Wang, Y., Kang, X., Wu, A., Yin, W., Tang, Y., Wang, J., Zhang, M., Duan, Y., & Huang, Y. (2018). Dual-targeting biomimetic delivery for anti-glioma activity: Via remodeling the tumor microenvironment and directing macrophage-mediated immunotherapy. Chemical Science, 9(10). https://doi.org/10.1039/c7sc04853j

Zhao, X., Fu, J., Du, J., & Xu, W. (2020). The role of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase in cancer. In International Journal of Biological Sciences (Vol. 16, Issue 9). https://doi.org/10.7150/ijbs.41051

Zheng, W., Li, M., Lin, Y., & Zhan, X. (2018). Encapsulation of verapamil and doxorubicin by MPEG-PLA to reverse drug resistance in ovarian cancer. Biomedicine and Pharmacotherapy, 108. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.039

Zheng, Z. G., Zhu, S. T., Cheng, H. M., Zhang, X., Cheng, G., Thu, P. M., Wang, S. P., Li, H. J., Ding, M., Qiang, L., Chen, X. W., Zhong, Q., Li, P., & Xu, X. (2021). Discovery of a potent SCAP degrader that ameliorates HFD-induced obesity, hyperlipidemia and insulin resistance via an autophagy-independent lysosomal pathway. Autophagy, 17(7). https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1757955

Zhou, F., Feng, B., Yu, H., Wang, D., Wang, T., Liu, J., Meng, Q., Wang, S., Zhang, P., Zhang, Z., & Li, Y. (2016). Cisplatin prodrug-conjugated gold nanocluster for fluorescence imaging and targeted therapy of the breast cancer. Theranostics, 6(5). https://doi.org/10.7150/thno.14556

Zhuge, W., Chen, R., Vladimir, K., Dong, X., Zia, K., Sun, X., Dai, X., Bao, M., Shen, X., & Liang, G. (2018). Costunolide specifically binds and inhibits thioredoxin reductase 1 to induce apoptosis in colon cancer. Cancer Letters, 412. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.006

Zumaya, A. L. V., Rimpelová, S., Štějdířová, M., Ulbrich, P., Vilčáková, J., & Hassouna, F. (2022). Antibody Conjugated PLGA Nanocarriers and Superparmagnetic

Nanoparticles for Targeted Delivery of Oxaliplatin to Cells from Colorectal Carcinoma. International Journal of Molecular Sciences, 23(3). https://doi.org/10.3390/ijms23031200

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRELERİNDE OKSALİPLATİN'İN İLAÇ TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%10	%1	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
3	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Istanbul Medeniyet Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
8	ankara.baskenthastaneleri.com İnternet Kaynağı	<%1
	titck.gov.tr	