

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ



SİSPLATİNİN NANOPARTİKÜLLER ARACILIĞIYLA HeLa HÜCRE HATTI  
ÜZERİNE ETKİSİ

Nisa TANDOĞAN

MAYIS 2011

**Biyoloji Anabilim Dalında** Nisa TANDOĞAN tarafından hazırlanan SİSPLATİNİN NANOPARTİKÜLLER ARACILIĞIYLA HELA HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİSİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Ortak Danışman

Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zekiye SULUDERE \_\_\_\_\_

Üye (Danışman) : Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN \_\_\_\_\_

Üye (Ortak Danışman) : Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK \_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Siyami KARAHAN \_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Nazife YİĞİT \_\_\_\_\_

11/05/2011

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. İhsan ULUER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### SİSPLATİNİN NANOPARTİKÜLLER ARACILIĞIYLA HeLa HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİSİ

TANDOĞAN, Nisa

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Mayıs 2011, 89 Sayfa

Bu çalışmada uygun dozda ve sürede HeLa kanser hücre hattında kitosan nanopartiküllerine yüklü sisplatinin salınımı ve hücrelerdeki apoptotik ve nekrotik etkisi ile glutatyon- S- transferaz pi (GST pi) izoenzim ekspresyonu araştırılmıştır. Amin gruplarını içeren düşük molekül ağırlığındaki kitosan polianyon yapıda çapraz bağlayıcı olan TPP (tripolifosfat) ile muamele edilerek kitosan nanopartikülleri sentezlendi. Kitosan nanopartiküllerin boyutu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile 100-200 nm arasında olduğu tespit edildi. Kitosan nanopartiküllerin Zeta boyutu 174 nm ve Zeta potansiyeli + 39 mV olduğu tespit edildi. Kitosan nanopartiküllerine yüklenen cisplatin zamana göre salınımı Graphite Furnace-Atomic Adsorption Spectrometer (GF-AAS) ile tespit edildi. Sisplatin (CDDP) yüklü kitosan nanopartikülleri kanser hücrelerine uygulanarak etkin dozda ilacın kanser hücrelerine aktarılması sağlandı. Sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin aktarıldığı hücrelerin ince yapı görüntüleri ve nanopartiküllerle etkileşimi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile gözlemlendi ve artan sisplatin dozuna bağlı olarak apoptotik etkinin arttığı tespit edildi. Sisplatin, kitosan

nanopartikülleri ve sislartin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisi testi ile tespit edildi. Kitosan nanopartiküllerinin sitotoksik olmadığı diğerlerinin sitotoksitesinin artan sislartin dozuyla birlikte arttığı gözlemlendi. Sislartin ve sislartin yüklü kitosan nanopartiküllerinin hücrelere uygulanmasının ardından kaspaz 3 antikoruyla yapılan immunositokimyasal ve ikili boyamalarla apoptotik etki ve ikili boyama ile nekrotik etki incelendi. Apoptotik indeks, yüksek sislartin dozunda sırasıyla % 60±5 ve % 53±4 ve ikili boyama sonucuyla paralel olduğu, ikili boyama sonucuna göre nekrotik indeks sırasıyla % 64.2±3 ve 60.3±2 olarak bulundu. Antioksidan bir enzim olan GST pi antikoruyla yapılan immunositokimyasal boyama ile GST pi - sislartin ilişkisine dayanarak HeLa kanser hücrelerindeki ekspresyonu gösterildi. Sonuçta hücrede GST pi ekspresyonu sislartin alımına bağlı olarak en yüksek % 63±2 bulundu.

**Anahtar Kelimeler :** Nanopartikül, Kitosan, Sislartin, SEM, Sitotoksite, Kaspaz 3, GST pi, Apoptoz, Nekroz

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF CISPLATIN BY MEANS OF NANOPARTICLES ON HeLa CELL LINES

TANDOĞAN, Nisa

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Serpil OĞUZTÜZÜN

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mustafa TÜRK

May 2011, 89 pages

In this study, the release of cisplatin, loaded on chitosan nanoparticles applied with the appropriate dose and duration in HeLa cancer cell line and its apoptotic, necrotic effects and the expression of glutathione-S-transferase pi isoenzymes in HeLa cancer cells were investigated. Chitosan nanoparticles were synthesized with low molecular weight chitosan by treating with cross-linking, TPP (tripolifosfat). Chitosan nanoparticles size were found to be between 100-200 nm with Scanning Electron Microscope (SEM) and Atomic Force Microscope (AFM). Chitosan nanoparticles 174 nm Zeta size and Zeta potential of + 39 mV was detected. The release of cisplatin loaded on nanoparticles was detected by Graphite Furnace-Atomic Adsorption Spectrometer (GF-AAS). Chitosan nanoparticles loaded with cisplatin (CDDP) and chitosan nanoparticles were incubated with HeLa cancer cells. Images of cells fine structure and their interaction with nanoparticles were observed with Scanning Electron Microscope (SEM). The cytotoxic effects of cisplatin, chitosan nanoparticles and chitosan nanoparticles loaded with cisplatin to HeLa cancer cells

were detected by WST-1 assay method. It was observed that chitosan nanoparticles were not toxic, but its toxicity was increased by increasing dose of cisplatin. After the cisplatin and nanoparticles loaded with cisplatin administration into HeLa cells, apoptotic index by the caspase-3 immunocytochemical and double stainings, necrotic index were examined. It was found that their indexes obtained by both staining were parallel,  $60\pm 5\%$ ,  $53\pm 4\%$  in high cisplatin dose respectively, and  $64.2\pm 3\%$ ,  $60.3\pm 2\%$  in necrotic index, respectively. The increasing apoptotic effect were determined. The relationship of GST pi expression and its substrate cisplatin doses were studied in HeLa cancer cells by immunocytochemical staining. GST pi expression was found as  $63\pm 2\%$ .

**Key Words:** Nanoparticle, Chitosan, Cisplatin, SEM, Cytotoxicity, Caspase 3, GST pi, Apoptosis, Necrosis

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi birikimlerini benimle paylaşan, tecrübeleriyle bana ışık tutan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK' e sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmama her zaman destek olarak, Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) çalışmaları dahil laboratuvar imkanlarını bize sunan ve değerli fikirlerini bizimle paylaşarak desteğini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE' ye teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın deneysel kısmındaki nanopartikül çalışmalarında sağladığı imkanlar için Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın. Prof. Dr. Emir Baki Denkbaşı ve öğrencisi Doğa KAVAZ' a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarında etkin maddem olan sisplatin' i temin eden Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA' ya teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda her zaman desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Refik Saydam Hıfzıssıhha Müdürlüğü Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Laboratuvar' ında görev yapan Kimyager Sayın Mustafa HACİÖMEROĞLU' na teşekkür ederim. Analizlerimin bir kısmını yapmama yardımcı olan Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarları Müdürlüğü'ne ve uzmanlarına, Uzman Murat KILIÇ, Uzman Ömer SONKAYA ve Uzman Ogün BOZKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım. Tezimin istatistiksel analizler kısmında bana yardımcı olan Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İstatistik Bölümü Öğr. Gör. Altan TUNÇEL' e teşekkürlerimi sunarım. İyi ve kötü günümde benim yanımda olan, beni motive eden ve desteklerini yıllardır esirgemeyen arkadaşlarım Gamze, Özlem, Tuba, Eda, Fatma ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans sırasındada özveriyle bana destek olan, cesaret veren, sabır ve anlayışını esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Kanser Tedavisi.....	6
1.2.1. Radyoterapi.....	6
1.2.1.1. Radyoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar.....	7
1.2.2. İmmünoterapi.....	7
1.2.2.1. İmmünoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar.....	8
1.2.3. Kemoterapi.....	8
1.2.3.1. Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar.....	9
1.3. Kanser Tedavisinde Hedefleme Çalışmaları.....	11
1.3.1. Kanser Tedavisinde kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	11
1.3.1.1. Mikrokapsüller.....	12
1.3.1.2. Mikroküreler.....	13
1.3.1.3. Nanotaşıyıcılar.....	13
1.3.1.3.1. Kitosan.....	15
1.3.1.4. Lipozomlar.....	17
1.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Etken Maddeler ve Çoklu İlaç Direnci.....	17
1.4.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan Etken Maddeler.....	17
1.4.1.1. Sisplatin.....	18
1.4.2. Çoklu İlaç Direnci.....	18
1.5. Glutasyon-S-Transferaz.....	19



1.5.1. Pi Sınıfı Glutasyon-S-Transferazlar.....	21
1.5.1.1. Glutasyon S-Transferaz pi ile Sisplatin İlişkisi.....	21
1.6. Glutasyon S-Transferazların Kanser Tedavisindeki Önemi.....	22
1.7. Literatür Özeti.....	23
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>26</b>
2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar.....	26
2.2. Kitosan Nanopartiküllerin Sentezlenmesi.....	27
2.3. Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	28
2.3.1. Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	28
2.3.1.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İle Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi.....	28
2.3.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) İle Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi.....	29
2.3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Zetasizer İle Boyut ve Yük Analizi.....	29
2.3.2.1. ZetaSizer Cihazı İle Zeta Boyut Analizi.....	30
2.3.2.2. ZetaSizer Cihazı İle Zeta Yük Analizi.....	30
2.4. Kitosan Nanopartiküllerinin Hücre Yüzeyi İle Etkileşimi ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Kanser Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İle Görüntülenmesi.....	31
2.5. Kitosan Nanopartiküllere Sisplatin (CDDP) Yüklenmesi.....	32
2.6. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin İlaç Salınımı ve İn Vitro İlaç Yükleme.....	32
2.6.1. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin İlaç Salınımı.....	32
2.6.2. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin İn Vitro İlaç Yükleme.....	33
2.7. Toksisitenin Belirlenmesi.....	34
2.8. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü.....	34
2.8.1. Kaspaz 3 Antikoru Kullanılarak Yapılan İmmünohistokimyasal Boyama Metodu.....	35

2.8.2. GST pi Antikoru Kullanılarak Yapılan İmmünohistokimyasal Boyama Metodu.....	36
2.8.3. İkili Boyama Metodu.....	37
2.9. İstatistiksel Analiz.....	38
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>39</b>
3.1. Kitosan Nanopartiküllerin Elde Edilmesi.....	39
3.1.1. Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri.....	40
3.1.2. Kitosan Nanopartiküllerin ZETA Sizer İle Boyut ve Yük Analizi.....	41
3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Hücre Yüzeyi İle Etkileşimi.....	46
3.3. Sisplatin (CDDP) Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinden Sisplatin Salınım Analizi.....	48
3.4. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Kanser Hücre Hattındaki Toksik Etki Sonuçları.....	49
3.5. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Kanser Hücre Hattındaki Apoptotik Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İle Gösterilmesi.....	53
3.6. Kaspaz 3 İmmünohistokimyasal Boyama ve İkili Boyama Sonuçları.....	55
3.6.1. Nekrotik İndeks Sonuçları.....	59
3.7. GST pi (Glutasyon-S-Transferaz pi) İzoziminin HeLa Kanser Hücrelerindeki Ekspresyonu.....	61
3.8. İstatistiksel Analiz.....	64
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....</b>	<b>69</b>
<b>5.KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Apoptozisin Genel Görünümü.....	2
1.2. Karsinogenezis’de Apoptozis İle İlgili Olabilecek Genler/Proteinle.....	5
1.3. Kitinin Kimyasal Yapısı.....	16
1.4. Kitosanın Kimyasal Yapısı.....	16
1.5. Glutasyonun (GSH) Ksenobiyotiklere Glutasyon Transferaz (GST) Katalizli Reaksiyonu.....	19
1.6. GST Süper Gen Ailesi.....	20
1.7. Sisplatin Direnç Mekanizması.....	22
2.1. Kitosan Nanopartiküllerin Hazırlanma Prosedürü.....	27
2.2. Taramalı Elektron Mikroskopunun Şematik Görüntüsü.....	28
2.3. AFM Sistemi Şematik Görünümü ve AFM Sistemi Çalışma Prensibi.....	29
3.1. Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi.....	39
3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri.....	41
3.3. Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Boyut Analizi.....	42
3.4. Kitosan Nanopartiküllerin Yüzdalik Dilime Karşılık Gelen Zeta Boyut Dağılımı.....	43
3.5. Kitosan Nanopartiküllerin Kimülant Fit Raporu.....	44
3.6. Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli.....	45
3.7. Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli Faz Grafiği.....	46
3.8. Kitosan Nanopartiküllerin HeLa Kanser Hücre Membranına Tutunduğunu Gösteren Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) görüntüsü...	47
3.9. Kitosan Nanopartiküllerin Sisplatin Salınım Profili.....	48
3.10. Farklı Dozlarda Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin HeLa Kanser Hücreleri Üzerindeki Apoptoik Etkiyi Gösteren Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüsü.....	54
3.11. Kaspaz 3 Antikoru Kullanılarak İmmünsitokimyasal Metot İle Boyanmış Apoptotik HeLa Hücrelerinin Fotoğrafları.....	57
3.12. İkili Boyama Metoduyla Elde Edilmiş Apoptotik HeLa Hücrelerinin Fotoğrafları.....	58

3.13. İkili Boyama Metodu İle Boyanmış Nekrotik HeLa Hücrelerinin Fotoğrafları.....	60
3.14. GST pi Antikoru Kullanılarak İmmünohistokimyasal Metot İle Boyanmış HeLa Hücrelerinin Fotoğrafları.....	63



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Kitosan Nanopartiküllerin HeLa Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksi Etkisi.....	50
3.2. Sisplatinin HeLa Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	51
3.3. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Kanser Hücreleri Üzerine sitotoksik etkisi.....	52
3.4. Farklı Dozlarda Sisplatinin HeLa Kanser Hücrelerine Uygulanmasıyla Oluşan Apoptotik İndeks.....	55
3.5. Farklı Dozlarda Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin HeLa Kanser Hücrelerine Uygulanmasıyla Oluşan Apoptotik İndeks.....	55
3.6. Farklı Dozlarda Kitosan Nanopartiküllerin HeLa Kanser Hücrelerine Uygulanmasıyla Oluşan Nekrotik İndeks.....	59
3.7. Farklı Dozlarda Sisplatinin HeLa Kanser Hücrelerine Uygulanmasıyla Oluşan Nekrotik İndeks.....	59
3.8. Farklı Dozlarda Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin HeLa Kanser Hücrelerine Uygulanmasıyla Oluşan Nekrotik İndeks.....	60
3.9. Farklı Dozlarda Sisplatinin HeLa Kanser Hücrelerine Uygulanmasıyla Oluşan GST pi Ekspresyonu.....	61
3.10. Farklı Dozlarda Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin HeLa Kanser Hücrelerine Uygulanmasıyla Oluşan GST pi Ekspresyonu.....	62
3.11. Sisplatin ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerini İçeren Her İki Grubun Kaspaz 3 Ekspresyonu İçin Mann-whitney U Testi Sonuçlar.....	64
3.12. Sisplatin ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerini İçeren Her İki Grubun GST pi Ekspresyonu İçin Mann-whitney U Testi Sonuçları.....	65
3.13. Sisplatin ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerini İçeren Her İki Grubun Kaspaz 3 Ekspresyonu İçin Grup İstatistikleri.....	66
3.14. Sisplatin ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerini İçeren Her İki Grubun Kaspaz 3 Apototik İndeksine (%) Göre Karşılaştırılması.....	67
3.15. Sisplatin ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerini İçeren Her İki Grubun GST pi Ekspresyonu İçin Grup İstatistikleri.....	67

3.16. Sisplatin ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerini İçeren Her İki Grubun GST pi Ekspresyonuna (%) Göre Karşılaştırılması.....	68
--	----



## SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
$\mu\text{g}$	Mikrogram
ml	Mililitre
L	Litre
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
kDa	Kilodalton
nm	Nanometre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
M	Molar
NaOH	Sodyum hidroksit
HCl	Hidroklorik asit
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
$\text{H}_2\text{O}_2$	hidrojen peroksit
z	Zeta potansiyeli
m V	Milivolt

## KISALTMALAR DİZİNİ

CDDP	Sisplatin
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
MDR	Çoklu İlaç Direnci
MDRP1	Çoklu İlaç Direnç Proteinini
TPP	Tripolifosfat
ATP	Adenozintrifosfat
P - gp	P - glikoprotein
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon – S – Transferaz
GSTP	Glutatyon – S – Transferaz pi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
GF – AAS	Graphitefurnace-Atomic Adsorption Spectrometer
FCS	Fotal Calf Serum
PBS	Fosfat Buffer Saline
DAB	Diaminobenzidine



# 1. GİRİŞ

Son zamanlarda kanser tedavisinde alternatif yöntemler geliştirilmekle birlikte genel olarak radyoterapi, kemoterapi, gen terapi ve immün terapi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde en bilindik kanser tedavi yöntemi ise kemoterapidir. Özellikle miseller, nanopartiküller, polimer-ilaç konjugatları ve lipozomlar gibi çok sayıda nanotaşıyıcılar antikanser ilaçların yan etkilerini azaltmak ve kanser kemoterapisinde antitümöral ilaç etkisini artırmak için çalışılmıştır [1]. Son zamanlarda ilgi, kontrollü salınım yeteneğine sahip nanopartiküllere odaklanmıştır [2]. Nanopartiküller, büyüklükleri 1-1000 nm (1µm) arasında olan, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan polimerik taşıyıcı sistemlerdir [3].

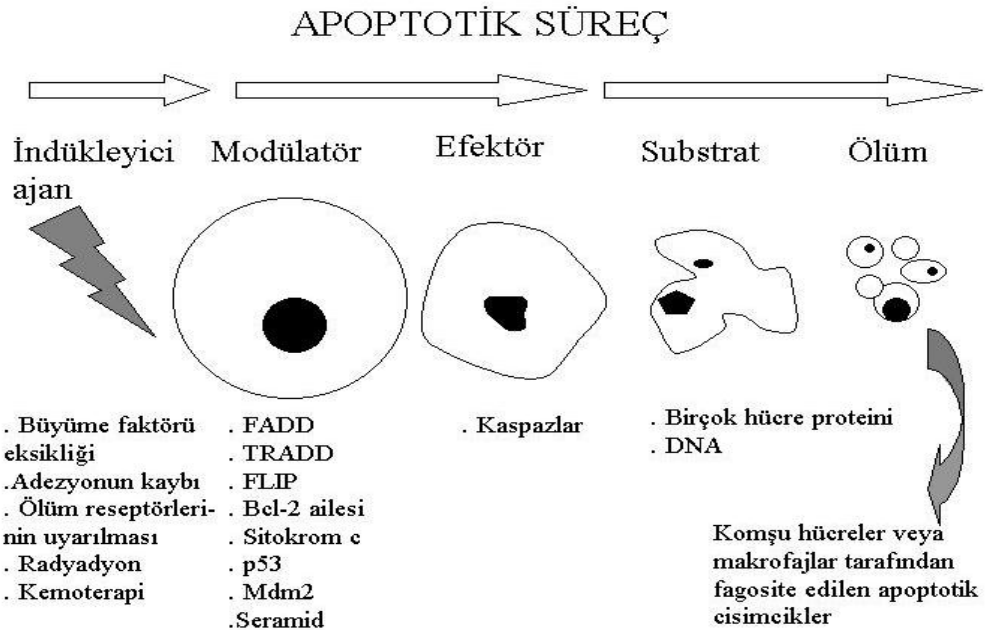
## 1.1. Kanser

Kanser hücresel işlevin temel yönlerini kontrol eden genlerdeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Tüm kanser hücreleri iki ortak özellik paylaşır. Bunlardan birincisi anormal hücre büyümesi ve bölünmesi, ikincisi ise hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılmasını ve istilasını (metastaz) engelleyen normal sınırlamalardaki anormalliklerdir. Bu işlevler normal hücrelerde uygun bir şekilde, zamanında ve yerinde ifade edilen genler tarafından denetlenmektedir. Fakat kanserli hücrelerde bu genler ya mutasyona uğrar ya da uygun olmayan şekillerde ifade edilirler. Hücreler yaşamları boyunca dışarıdan gelen çeşitli ajanlara maruz kalmaktadır. Bu ajanlar fiziksel (UV ve iyonize radyasyon), kimyasal (asbestos, anilin ve alkol) ve biyolojik (virüsler, mantar ve mantar zehiri) kanserojenlerdir. Hücrelerin bu ajanlara maruz kalmaları onların DNA'sında bir dizi değişikliğe yol açar. Bu değişiklikler mutasyon olarak tanımlanan tek bir baz çifti yer değişiminden, bir delesyondan ya da bir veya daha fazla baz çiftinin insersiyonundan meydana gelebildiği gibi kromozomun yapısında önemli bir değişikliğe içerebilir [4].

Kanser hücrelerini tehlikeli yapan, denetlenemeyen hücre çoğalması ve metastatik yayılmanın kombinasyonudur. Bir hücre, hücre büyümesi üzerindeki genetik

kontrolünü kaybederse, çok hücreli bir yığın, iyi huylu bir tümör (benign tumor) olabilir. Bu tip bir tümör ameliyatla alınabilir ve genellikle ciddi bir hasara yol açmaz. Buna rağmen, eğer tümördeki hücreler bu yapıdan kurtulabilme, kan dolaşımına girebilme, diğer dokuları istila edebilme ve ikincil tümörler oluşturabilme yetisini ele geçirmişlerse, o zaman malignant (kötü huylu, tehlikeli tümör) olurlar. Malignant tümörlerin tedavileri zordur ve tehlike oluşturabilirler. Hücreler komşu dokuları istila edip yok ettikleri gibi lenfatik veya dolaşım yoluyla vücudun diğer kısımlarına metastaz yaparlar [4]. Kanser hücreleri yaşamlarını devam ettirebilmek için anjiyogenez ile kendi beslenmelerini sağlarlar [5].

Normal bir hücrenin malign transformasyon süreci kabaca inisiyasyon ve promosyon olmak üzere iki aşamadan oluşur. İnisiyasyon, hücrede tamiri imkansız DNA hasarı oluşmasına karşın hücrenin Şekil 1.1’ de de görüldüğü gibi apoptozis adı verilen programlanmış hücre ölümüne gidemediği bir durumdur. Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde hücre ya hücresel döngüsünü durdurur ya DNA hasarını tamir eder ya da apoptozu seçer.



**Şekil 1.1.** Apoptozisin genel görünümü [6]

Hücrelerdeki mutasyonlar, onkogenlerin aşırı ifade edilmesi ve hücre döngüsü düzenleyicileri tümör gelişiminde önemli rol oynayan faktörlerdendir [7]. Hücresel döngü, sırasıyla G0, G1, S, G2, M fazlarından oluşmaktadır. Bununla birlikte, hücre döngüsünde bir sonraki aşamaya geçilmeden önce hücrenin kendi iç dengesini izlediği ve kontrol ettiği en az üç farklı kontrol noktası (G1/S, G2/M ve M) vardır. Bunlardan en önemlisi G1 fazından S fazına geçişi sağlayan G1/S kontrol noktasıdır. Bu kontrol noktasında hücre kendi boyutunu izler ve DNA' sının hasar görüp görmediğine karar verir. Eğer hücre uygun boyuta ulaşmayı başaramamış ya da DNA' sını hasar görmüş ise, hücre döngüsündeki ileri aşamalar bu koşullar doğrulana kadar durdurulur. Eğer hücre boyutu ve DNA bütünlüğü doğru ise hücre bu kontrol noktasını geçer ve S safhasına ilerler [4]. Döngüde rolü olan pek çok onkogen ve tümör baskılayan gen, G1 kontrol noktasındaki hatalarla ilişkilidir [8]. Çünkü hücre DNA'yı sentezlemeden önce DNA'nın bütünlüğü sağlanmalıdır. Bu sağlanmadan S fazına geçerse kontrolsüz hücre büyümesi ortaya çıkar. Mesela iyonizan radyasyon G1'den S fazına veya G2'den M fazına geçişi durdurmaktadır [9].

Tümör oluşumundan onkogenler, tümör baskılayan genler ve genomun kararlılığında önemli rol üstlenen genlerdeki mutasyonlar sorumludur [10]. Bundan dolayı kanser, hücresel genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak hücre proliferasyonunun kontrolünün kaybolması sonunda ortaya çıkmaktadır. Hücrenin üreme ve gelişmesindeki bu bozukluklardan, en az 40 hücresel genin sorumlu olduğu düşünülmektedir [11].

Karsinogenez çok faktörlü ve çok basamaklı bir olay olup, normal bir hücrenin kanser hücreğine dönüşmesi için çok sayıda mutasyonların olması gereklidir. Bunlar arasında; translokasyonlar, gen amplifikasyonları, nokta mutasyonları, hücresel onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu gibi mekanizmalar yer alır.

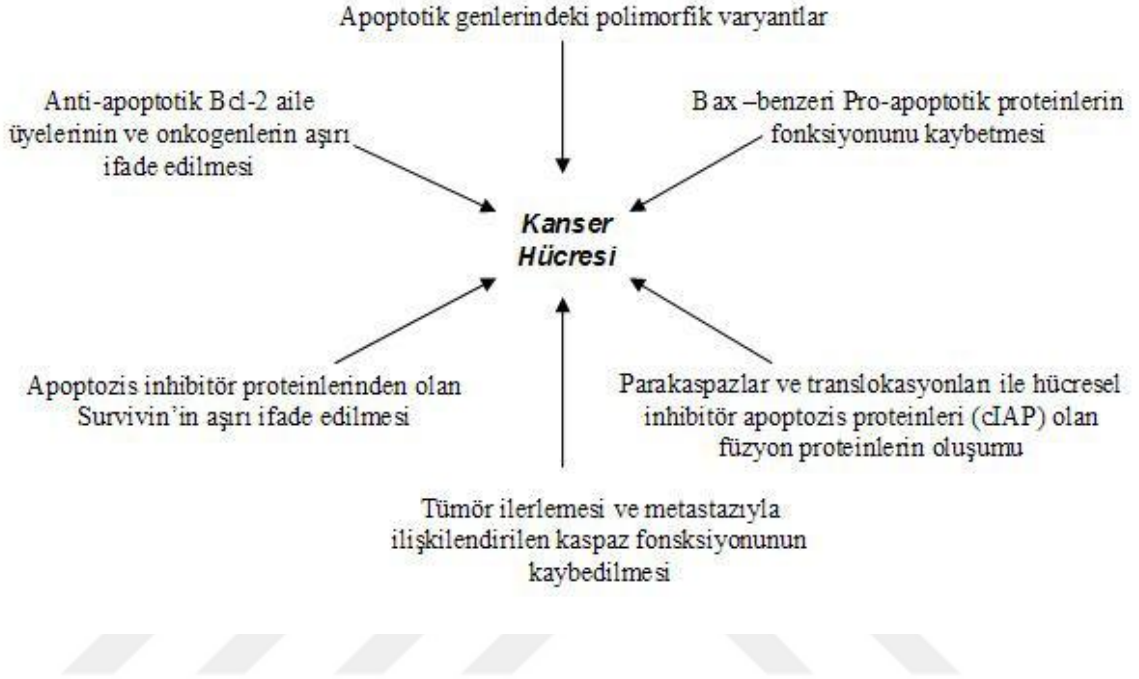
Kanserlerde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom kayıpları) ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da multipl baz değişiklikleri ya da DNA promotör bölge metilasyonu) oluşabilir. Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiojenез, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur [12,13]. Onkogenler,

protoonkogen denen normal hücrel genlerden gelişir. Protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin regülasyonunda önemli rol oynar. Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel disregülasyon ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Aktive olan protoonkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir. Protoonkogenler, hücre içi sinyal iletilicileri, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörleri olmak üzere beş kategoriye ayrılır [14].

Protoonkogenler değişik yollarla aktive olarak onkogen haline gelirler. Genin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ve en sık ras onkogen ailesinde görülür. Bir başka mekanizma da, genin ekspresyonunu regüle eden bölgede oluşan bir değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün aşırı miktarda üretilmesidir. Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatuar bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu ile de hücre içindeki DNA miktarı artar. Myc ailesi buna bir örnek oluşturur [15].

Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiasyon gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Transformasyona uğramış hücrelerin metastatik potansiyeli bölgesel mikroçevreden, anjiyogenezisten (yeni damar oluşumu), stroma-tümör ilişkisinden ve bulunduğu bölgesel dokunun sitokin içeriğinden etkilenebilmektedir [16]. İnvazyon ve anjiyogenezis benzer sinyal programlarını kullanırlar [17]. Tümör evreleri, birincil tümör kitlesinden koparak ayrılma, bazal membrandan ve intersitisiyal bağ dokudan geçerek invazyon, damara giriş ve dolaşıma katılma, endotel bazal membrana tutunma ve damardan çıkış, uzak dokularda çoğalma olarak özetlenebilir [18]. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör

baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunur [19] (Şekil 1.2.).



**Şekil 1.2.** Karsinogenezis’de apoptozis ile ilgili olabilecek genler/proteinler [20]

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır [21]. Sinyal iletiminde meydana gelen mutasyonlar hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin % 20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır [22]. Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır.

Sinyal iletiminde yer alan moleküllerin ve sinyal yollarının karsinogenezdeki rollerinin ortaya konması ve bu yollara özgül inhibitör ajanlar ile yapılan klinik

çalışmalar, kanser tedavisinde yeni ufukların açılmasını sağlayabilir. Bu yaklaşımların ortak hedefi, en etkin kanser tedavisine ulaşmaktır [23].

## **1.2. Kanser Tedavisi**

Kanser hastalıkları, insanların yaşam standardını olağanüstü etkileyen ve hatta onların ölümüne yol açabilen en önemli rahatsızlıklardan biri olarak önemini korumaktadır. Kanser tedavisinde çok farklı yöntemler kullanılmakla birlikte kesin bir sonuç elde edilememiştir. Tedavide kullanılan bazı yöntemler aşağıda verilmiştir [24].

### **1.2.1. Radyoterapi**

Radyoterapi, radyoaktif ışınlarla tedavi demek olup sadece uygulanan bölgeyi etkiler. Radyasyon, cerrahi müdahaleden önce kanserli bir tümörün küçültülmesi için, cerrahi müdahaleden sonra geriye kalan kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulması veya anti-kanser ilaçları ile ölümcül bir durumda olan bir tümörün ortadan kaldırılması için kullanılabilir. Radyasyon özellikle lenf düğümleri veya ses tellerindeki habis tümörler gibi belli lokalize kanser çeşitlerinin tedavisinde etkilidir. Radyasyon tedavisi, Co-60 ya da Lineer Hızlandırıcı gibi cihazlar aracılığıyla gerçekleştirilir. Radyoterapide kanser hücrelerinin bölünmesini engellemek amacıyla yüksek enerjili x ışınları kullanılır. Absorbe edilen radyasyonun birimi ‘ rad ‘ olarak bilinmektedir (1 rad: 1 kg maddenin 0,001 J enerji soğurmasıdır). Radyoterapi gören hasta tedavi süresince birkaç yüz rad’ lık radyasyona maruz kalır. Radyoterapi esnasında, uygulanan bölgeye x ışınları ile belirli oranda bir enerji verilmektedir. Hedef; hücrelerin genetik materyalinin moleküler yapısını bozarak, bölünmelerini engellemektir. Radyoterapi cilt, beyin, meme, prostat ve rahim kanseri tedavilerinde etkin olarak kullanılmaktadır [25].

### **1.2.1.1. Radyoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar**

Radyoterapinin amacı kanserli hücreleri yok etmektir, ama bu arada tedavi alanı içinde kalan sağlıklı hücreler de etkilenecektir. Radyoterapi bazen kan yapıcı sistemin ürettiği hücreleri etkileyebilir. Erişkin bir insanda kan hücrelerinin yapımı özellikle kemik iliği dokusunda gerçekleşir. Dolayısıyla radyoterapi alanı dahilindeki kemik dokusu hacmi arttıkça (omurga, kalça kemiği gibi) kanla ilgili yan etki riski de artar. Radyasyon tedavisinin uygulandığı her bölgede cilde ait birtakım yan etkiler gelişebilir. Bu yan etki riski, uygulanması planlanan toplam doz yükseldikçe artar. Yani daha çok 5 – 6 hafta süren uzun süreli tedavilerde ve tedavinin ileri dönemlerinde görülür. Koltuk altı, boyun gibi cilt dokusunun ince olduğu bölgelerde, anüs bölgesi, ağız içi gibi mukoza dokularında bu tip yan etki riski daha fazladır. Cilde ait yan etkiler, üzerine basmakla solan hafif kızarıklıklarla başlar (güneş yanığı gibi) ve sulu, açık yaralara kadar gidebilir. Bunların yanısıra bulantı, kusma, akciğer yetmezliği gibi sorunlarda yol açabilir [25].

### **1.2.2. İmmünoterapi**

Vücuttaki immün sistem, yabancı madde olarak adlandırılan maddelere karşı denetleyici bir sistem olarak hareket eder. Kanser hücreleri de yabancı olarak kabul edilirler. Yıllardan bu yana araştırmacılar kanser hücrelerine karşı doğal immün reaksiyonu artırmaya çalışmaktadırlar. Böylesi bir metod bir tedavi metodu olarak kullanıldığında, bu tekniğe immünoterapi denir. Beyaz kan hücreleri (lökosit) tarafından normal olarak üretilen ve lenfokinler olarak bilinen biyolojik aktif maddelerin kullanımı immünoterapiye dahildir. En iyi kanıtlanmış olan immünoterapi aktif maddesi, viral bir enfeksiyona cevap olarak vücut tarafından üretilen interferonlardır [25]. Araştırmacılar son zamanlarda interferon alfa denilen bir interferon çeşidi ile birkaç çeşit kanserin kontrol altına alınmasında başarı elde etmişlerdir [26]. Özellikle saçaklı hücreli lösemi denilen kanserlerde önemli gelişmeler elde edilmiştir.

### 1.2.2.1. İmmünoterapi Karşılaşılan Olumsuzluklar

İmmünoterapi sonrası enjeksiyon yerinde meydana gelen bir takım kızarıklık ve şişmeler gibi lokal tepkiler gözlemlenmiştir. Daha az görülmekle birlikte, hırıltılı solunum, burun ve boğazda kaşıntı, burun tıkanıklığı ve/veya burun akıntısı, koroner damar yetersizliği, öksürük, deride kızarıklık ve kaşıntı, soluk darlığı, göğüste sıkışma duygusu, dudaklarda ve göz kapaklarında şişme ve yutkunma zorluğu gibi yan etkiler de bildirilmiştir [27].

### 1.2.3. Kemoterapi

Kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapinin ana ilkesi; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya yok etmektir. Kemoterapide asıl amaç; hastayı tedavi etmek, yaşam süresini ve hastalıksız dönemi uzatmak, semptomları engellemek veya kontrol altına almak ve böylece yaşam kalitesini yükseltmektir [28]. Kemoterapide kullanılan ilaçlara “Antineoplastikler”, “Sitotoksik ajanlar” veya “Antikanser ilaçlar” olarak adlandırılmaktadır (29). Kanserin türüne göre kemoterapinin amaçlarını şöyle sıralayabiliriz [11].

**a)** Kanseri tedavi etmek; kanser hücrelerine ait izler tümüyle ortadan kalktığında kanser tedavi edilmiş sayılır.

**b)** Kanseri kontrol etmek; kanser hücreleri, tümörden ayrılarak kan dolaşımı veya lenf damarları yoluyla vücudun başka bölgelerine gidebilirler. Ulaştıkları bölgeye yerleşerek yeni tümörler oluşturabilirler. Genel olarak kanserin yayılımını önlemek ve büyümesini yavaşlatmak, kanserin kontrol altında tutulması olarak kabul edilir.

**c)** Kanserin yol açtığı belirtileri gidermek; bazı kemoterapi uygulamalarının temel amacı hastanın yaşam niteliğini yükseltebilmek için ağrı ve benzeri belirtileri ortadan kaldırmak ya da hafifletmektir.



Kanser tedavi yöntemleri arasında olan radyoterapi, hastalığın lokalize olduğu durumlarda etkili olurken, kemoterapinin en büyük avantajı, metastaz varlığında ya da hastalığın yaygın olduğu durumlarda uygulanabilir olmasıdır. İlk sitostatik ilaç olan nitrojen mustard, I. Dünya Savaşı sırasında kemik iliğinin baskılayıcı tepkisinin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır. O zamandan bu yana kansere karşı etkili olan ilaçların arayışı sürmüştür ve kemoterapinin amacı, hastalığın bulgularını hafifletmekten iyileştirmeye doğru bir ilerleme göstermiştir [30,31].

Kemoterapi ilaçlarının çoğu hücre gelişim hızını düşürmektedir. Bunu DNA ile etkileşerek (normal hücrelere oranla kanser hücrelerinin onarmakta etkisiz olduğu hasarlara yol açarak) veya hücre bölünmesine müdahale ederek yaparlar, bu da hücrenin daha fazla bölünmesini engellemekte ve genellikle apoptotik oluşuma yol açabilmektedir [25]. Ancak bazı durumlarda kanser hücreleri kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirebilmektedir. Geliştirilen bu direnç hücre membranında bulunan P-glikoproteini'nin çok sayıda eksprese edilmesi ile oluşmaktadır. Bu protein bir pompa görevi yapmakta ve hücre içerisindeki kemoterapötik ajanları hücre dışına atmaktadır. Çoklu ilaç direnci (multiple drug resistance-MDR) olan hücrelerde MDR gen amplifikasyonu olup, RNA'larında yüksek oranda P-glikoprotein yapıldığı düşünülmektedir.

### **1.2.3.1. Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar**

Kemoterapi yaygın kullanıma rağmen kemoterapi ile uygulanan ajanların tedavi edilmesi istenilen bölgeye ulaşmaları ve tölere edilebilmeleri oldukça zordur. Bu yüzden değişik yan etkilere ve ilaç direnci gelişimine sebep olmaktadır. Bu yan etkilerin derecesi ve görülme sıklığı, uygulanan kemoterapi cinsine, dozlarına, uygulama şekline, tedavi süresine, tedavi aralıklarına ve hastanın kişisel özelliklerine bağlı olarak değişiklikler gösterir. Kemoterapinin bireyde görülen yan etkileri, ilaçların özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte; bulantı, kusma, iştahsızlık, tat ve koku değişiklikleri, mukozit, diyare, konstipasyon, yorgunluk, halsizlik kanserli hastalarda en sık görülen semptomlar arasında yer almaktadır [28, 32].

Bulantı ve kusma; kemoterapinin önemli bir yan etkisidir. Bu durum bazı hastaların kemoterapiyi reddetmesine veya başlanmış olan tedavinin yarım kalmasına yol açar. İştahsızlık; pek çok nedeni olmakla birlikte; nörolojik disfonksiyon, tümörün gastrointestinal sisteme etkisi, tat ve koku duyularında bozulma, kronik bulantı ve kusma, psikolojik etmenler, artmış glikoneogenez, tümörün ürettiği sitokinler sonucunda gelişebilir. Tat ve koku değişiklikleri; uygulanan tedaviye bağlı olarak kanser hastalarında tat alma duyusunda kayıp (ageusia), artış (hypergeusia) ve azalma (hypogeusia) olabilir. Kemoterapi sırasındaki tat değişikliklerinin nedenleri arasında; ilaçların tükürüğe geçmesine bağlı koku ve tat değişiklikleri, çürük diş, kötü ağız hijyeni, enfeksiyonlar, geniz akıntısı, reflü sayılabilir [33].

Mukozit; oral mukozanın ülserasyonu ve enflamasyonu ile karakterize, kanser tedavilerine bağlı gelişen, hayatı tehdit eden enfeksiyonların kaynağı olabilen önemli bir yan etkidir [34].

Diyare; kemoterapi, anksiyete, stres gibi nedenlerle gastrointestinal sistemin aktif olarak bölünen epitelyal hücrelerinin hasarı sonucu oluşabilir. Diyare antineoplastik ilaç dozunda azalma ilaç uygulamasının geciktirilmesi ya da ara verilmesi gibi istenmeyen etkilere yol açabilir. İlaç ve radyasyon dozunun azaltılması ya da geciktirilmesi geçici olarak diyareyi düzeltebilir. Ancak bu durumda antineoplastik ilaca karşı duyarlılık azalır ve ilacın tedavi edici etki düzeyi sınırlandırıldığı için tümöre karşı cevabı negatif olarak etkiler. Konstipasyon; kemoterapinin nörotoksik etkisi, narkotik ajanların kullanımı, hareketsizlik, yeme alışkanlığında değişiklikler, dehidratasyon, hipokalsemi nedenleri ile gelişebilir. Ciddi ağrı, bulantı ve kusmaya neden olabilen konstipasyon hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir [35].

Yorgunluk; kanserli hastalarda sık görülen sorunlardan birisidir. Kemoterapinin yan etkisi olarak ortaya çıkan bulantı, kusma, diyare, ağrı, immobilité, anemi ve malnütrisyon gibi faktörlerle ilişkili olarak ortaya çıkar.

Halsizlik; kanser hastalarının en yaygın semptomlarından birisi olmasına rağmen sıklıkla göz ardı edilir. Kanserde halsizlik, normal insanlarda görülen halsizlikten

farklıdır. Normalde halsizlik aktiviteyle ilişkilidir ve dinlenmekle geçer, oysa kanserde görülen halsizlik şiddetli, aktiviteden bağımsız ve dinlenmekle düzelmeyen karakterdedir [36].

### **1.3. Kanser Tedavisinde Hedefleme Çalışmaları**

Uzun yıllardır ilaç alanındaki çalışmaların başlıca amacı yeni ürünler geliştirmek veya çeşitli hastalıkların tedavi edilebilmesinde kullanılan ilaçları yenilemek olmuştur. Ancak yapılan araştırmaların çok zaman alması, ekonomik ve etik sınırlamalar ve özellikle beklenen sonucu vermemesi araştırmacıları yeni arayışlara itmiştir. İlaç dozunu azaltma, dozlama aralığını uzatma, yan ve zararlı etkileri daha da azaltma ve ilacı hedef bölgeye yönlendirme çalışmaları bu amaca yöneliktir. Son yıllarda hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerin hedefli dokuya olan doğrudan taşınımları, ilaçların terapötik alandaki kullanım yelpazelerinin genişletmiştir. Ayrıca ilacın kullanılan efektif dozundaki ve hedefli olmayan bölgelerde ilaç konsantrasyonunda ki azalış (yan etkileri azaltmak için önemli), ilaç toksikliğinin bu sistemler içerisinde azaltılabilmesi ve eşit plazma konsantrasyonlarında terapötik etkisinin geliştirebilir olması da diğer etkenlerdendir [37, 38]. Tüm bu özelliklerin azaltılmasında ve geliştirilmesinde en fazla rol oynayan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. İlaç taşıyıcı sistemler; bir bileşenin bir başka kimyasal ile bir ilaç uygulama aygıtı ile ya da ilaç uygulama süreci ile salınım hızını, dokulara salınımı ya da her ikisini de kontrol eden sistemler olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda pek çok yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. İlaç taşıyıcı olan ve salınımı kontrol eden partiküler sistemler şunlardır: mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller ve lipozomlardır [39, 40].

#### **1.3.1. Kanser Tedavisinde kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler**

İlaçların hedefli olarak gerekli bölgeye gerekli olduğu kadar iletilebilmesi için spesifik olarak tasarlanmış taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi; hem tedavi etkinliğini arttırmak hem de anti kanser ajanların sistemik toksisitesini azaltmak yönünden kazançlı

olacaktır. Bu nedenle kanserin hastaları öldürmesinden önce söz konusu sistemlerin hızla geliştirilebilmesi büyük önem taşımaktadır [41].

Tümöral dokuya ulaşan kan damarları aracılığıyla hedeflenen manyetik özelliğe sahip nanotaşıyıcıların yüzeyine tümöre özgü ligandların sayesinde hedeflenen tümörlü dokuya ulaşımı sağlanır. Hedeflenen bölgeye taşınan etken madde (örneğin; antineoplastik ajan veya diğer biyomoleküller) yüklü nanotaşıyıcılar kanser hücreleri tarafından endositoz ile alınır ve etken maddenin aktifleşmesi sağlanır. Böylelikle tıbbi ilaçların nanoenkapsülasyonu ilaçların etkinliğini, duyarlılığını, tolere edilebilirliğini ve ilaçların terapötik indeksini artırır [42]. Başka bir alternatif tedavi yönteminde ise, manyetik nanopartiküller tümör dokusuna hedeflendikten sonra canlı sistemin dışından bir manyetik alan yardımıyla kontrol edilir. Bu alan sayesinde manyetik nanotaşıyıcılar içerisinde bulunan birimlerin moleküler hareketiyle lokal bir sıcaklık artışı sağlanır. Klinikte hipertemi olarak adlandırılan bu tedavi şekli normal hücre ve dokulara zarar vermeden kanser hücrelerini yok etmektedir.

Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen yeni nesil tedavi edici ajanlar sırasıyla; mikrokapsüller, mikroküreler, antikolar, immunotoksinler, kimerik proteinler ve nanotaşıyıcılar ile anti kanser ajanların taşınması şeklinde özetlenebilir.

### **1.3.1.1. Mikrokapsüller**

Mikrokapsülleme ise katı, sıvı ve gazın inert polimerik bir madde ile film halinde kaplanması işlemidir. Genel olarak etkin madde çekirdek, kaplama maddesi ise çeper adını almaktadır. Çekirdek maddeleri olarak; etkin maddeler (antibiyotikler, antihistaminikler, vitaminler), proteinler, hormonlar, enzimler ve boyalar kullanılmaktadır. Çeper maddeleri olarak ise; doğal ve sentetik hidrofilik ve hidrofobik özellikteki polimerler kullanılmaktadır. Mikrokapsüllerin porları immün sistem molekülleri ve virüslerin geçişine izin vermezken oksijen, insülin, glukoz gibi moleküllerin geçişine izin vermektedir. Mikrokapsüller biyoteknoloji, fotoğrafçılık, ziraat, farmasötik alanlarda kullanılmaktadır.

### **1.3.1.2. Mikroküreler**

Çapları birkaç mikrometreden birkaç yüz mikrometreye kadar çıkabilen, farklı yapıdaki matriks maddelerinin kullanılması ile hazırlanan monolitik (tek parça olan, başka bir kaynaktan katkı almamış) yapıdaki mikro taşıyıcılardır. Mikrokürelerin başlıca özellikleri; etkin maddeyi kontrollü bir şekilde salması, etkin maddenin yapı ve aktivitesini değiştirmemesi, etkin maddeyi hedef organ, doku ve hücreye taşınması, in vitro ve in vivo koşullarda dayanıklı olmasıdır [11].

Mikroküreleri hazırlamada kullanılan sentetik ve doğal polimerler, PEG, stiren, albümin, protein, karbonhidratlardır. Yaygın olarak kullanılan kitosan mikrokürelerden etkin madde salımını etkileyen parametreler arasında kitosanın molekül ağırlığı, konsantrasyonu, mikrokürelerin herbirine yüklenen etkin madde miktarı, çapraz bağlanma oranı, kullanılan çapraz bağlayıcı ve ilaç-kitosan oranı olduğu bildirilmiştir [43]. Mikroküre hazırlama yöntemleri ise emülsiyon polimerizasyonu; çözücü buharlaştırma yöntemi gibi yöntemlerdir.

Mikroküreler farmasötik uygulamalarının yanı sıra, lokal anestezipler, ortopedik implantlar gibi birçok değişik alanda da kendisine uygulama alanları bulmuştur.

### **1.3.1.3. Nanotaşıyıcılar**

Yeni nesil tedavi edici ajan uygulamaları nanoteknoloji ürünü olan kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler ya da akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Söz konusu taşıyıcılar genellikle uygun polimerik matrikslerden üretilen nano ölçekli partiküllerden oluşan sistemlerdir. Nanopartiküller mikron skalası altında genellikle polimerlerden (özellikle biyoçözünebilen cinsten) oluşturulmuş yapılardır. Nanopartiküller aktif ve pasif hedeflemenin her ikisinde de kullanılarak, normal hücrelerdeki toksisiteden kaçınırken kanser hücrelerinde ilacın intraselüler konsantrasyonunu artırabilir [44,45]. Bu taşıyıcı sistemler reseptör bağımlı endositozla hücreye girdiği zaman ilaç direnç mekanizmasından biri olan p-glikoproteinlerce tanınmadan geçerler [46]. Bu sistemleri akıllı kılan belirtilen taşıyıcıların hazırlanmasından sonra hedeflenecekleri

tümöral bölgede yer alan uygun reseptörleri tanıyacak olan ligandlar ile donatılmış olmalarıdır. Bu mantık ile hareket edecek olan taşıyıcılar hücresel mekanizmayla hareket edecekleri için özellikle çoklu ilaç direnci gibi önemli bir sorunun üstesinden gelebilecek ve lokal tedavi etkinliği ile sağlıklı hücre ve dokulara herhangi bir zarar vermeden etkinlik gösterebilecektir [41].

Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküllerin avantajları ise şöyle sıralanabilir (47,48);

- ❖ Yüksek aktif madde yükleme kapasitesine sahiptirler. Bu şekilde, aktif maddenin intrasellüler dağılımı artar.
- ❖ Polimerik partiküler yapı, katı matriks içine hapsedilmiş aktif maddeyi degradasyondan korur.
- ❖ Nanopartiküllerin polimerik yapıları aktif maddenin hedeflendirilmesini, salınımın kontrolünü ve sürdürülmesini sağlar. Hedeflenen bölgede enjeksiyonlarını takiben günler hatta haftalar süren bir aktif madde salınımına olanak verirler.
- ❖ Nanopartiküllerin yüzey özellikleri çeşitli ajanlarla modifiye edilerek retikuloendotel sistem (RES) makrofajları tarafından tanınması engellenir.
- ❖ Diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında polimerik nanopartiküller biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahiptirler.
- ❖ Nanopartiküller kolaylıkla sterilize edilebilen kolloidal partiküllerdir.
- ❖ Fizyolojik ortamda parçalanabilirler ve parçalanma ürünleri toksik değildir.
- ❖ Küçük partikül boyutları nanopartiküllerin küçük kapillerlere penetrasyonuna imkan verir ve hücreler tarafından tutulmalarını sağlar. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede istenen aktif madde salımı sağlanır.
- ❖ Aktif maddenin hedef bölgede salınımını sağladıkları için, aktif maddenin, diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisitesini azaltırlar.
- ❖ Aktif maddenin vücuttaki dağılımını ve terapötik aktifliğini düzenlerler.
- ❖ Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır.

Nanoparçacıkların nanokapsül ve nanoküre olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Nanokapsül diye tabir edilen alt sınıfta ilaç dış bir polimerik kabuk tarafından çevrelenmiştir ve bu kabuğun içerisinde özelliğine göre yağ ya da su içerisinde çözelti halinde yer alır. Nanoküre olarak adlandırılan diğer tipte ise parçacık çekirdekten dış kabuğa kadar aynı malzemeden oluşmuştur ve ilaç molekülleri bu polimerik zincirler üzerinde ya kovalent ya da fiziksel olarak tutuklanmıştır [49].

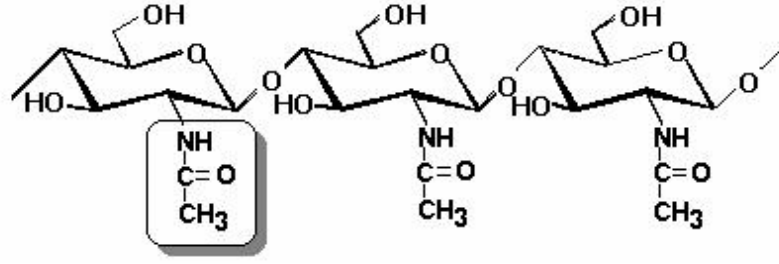
Nanoparçacık dizaynında kullanılacak polimer ve ilaçların uygulama yöntemi önemli yer tutar. Tedavide ilaçların ve taşıyıcı ajanların bozunmadan hedeflerine ulaşmaları ve yüksek verimli bir aktivite göstermeleri ancak ve ancak uygun dizayn edilmiş bir sistemle mümkün olabilir [11].

Yüksek verimli bir başarı elde etmek için kullanılacak ilaç moleküllerinin nanoyapılardan uygun zaman aralıklarında ya da uygulamaya başladıktan bir zaman sonra pasif ya da aktif olarak ortama difüzyonu kontrol edilmelidir [50]. Tümör alanındaki ilaç salım hızı nanopartikül yapısındaki polimerin molekül ağırlığı ve çapraz bağlanma konsantrasyonu ile ya da ilaç molekülünün parçacığa bağlanma şekli (kovalent ya da fiziksel adsorpsiyon) ile kontrol edilebilir.

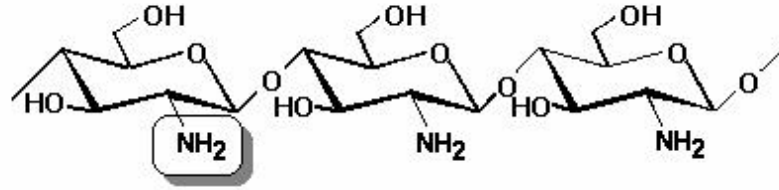
Şimdilerde ilaç ve gen taşınmasında kullanılacak olan nanopartikülleri formüle etmek için dendrimerler, insan serum albumin gibi proteinler, altın ve kitosan gibi diğer sentetik materyalleri içeren pek çok materyaller kullanılmaktadır [51,52].

#### **1.3.1.3.1. Kitosan**

Kitin, [ $\beta$ -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin], eklem bacaklıların iskeletlerinin esas maddesi olup bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında da yer almaktadır. Selülozda C2 karbonundaki hidroksil grubu yerine kitinde asetamido grubu bulunmaktadır (Şekil 1.3). Kitosan ise kitinin alkali ortamda deasetilasyonu sonucu elde edilen (1-4) bağlı D-glukozamin ünitelerinden oluşan lineer bir polisakkarittir (Şekil 1.4) [53]. Kitosan suda çözünmeyip sadece asidik çözücülerde ( $< 6.0$  pH) çözünmektedir.



Şekil 1.3. Kitinin kimyasal yapısı [53]



Şekil 1.4. Kitosanın kimyasal yapısı [53]

Kitosanın avantajları arasında doğada bol bulunması, normal biyolojik çevrede güvenli, toksik olmayan ve biyoyumlu-biyoparçalanabilir yapı göstermesi [54], epitelin membran geçirgenliğinin üstesinden gelebilmesi [55], enzimatik degradasyona karşı dayanıklı olması [56], ilaç/genlere direk bir şekilde taşınması ve nükleusa girebilmeleri [57] yer almaktadır.

Nanopartiküllerin yapımında kullanılan polimerlerin molekül ağırlıkları salınım mekanizmasının işleyişi açısından oldukça önemlidir. Yüksek molekül ağırlığına sahip bir polimerin in vitro ilaç salınımı daha yavaş olacaktır [58]. Dolayısıyla in vitro çalışmaların daha verimli olabilmesi için kullanılan polimerin molekül ağırlığı küçük olmalıdır. Bundan dolayı bu çalışmada düşük molekül ağırlıklı kitosan tercih edilmiştir.

Kitosan nanopartiküllerini hazırlamak için en az dört metod kullanılmaktadır. Bunlar iyonotropik jelasyon, mikroemülsiyon, emülsifikasyon solvent difüzyon ve polielektrolit komplekstir [59]. Yapılan bu çalışmada kitosan nanopartiküllerini elde etmek için iyonotropik jelasyon metodu kullanılmıştır. Bu metod kitosanın amin



grupları arasındaki elektrostatik etkileşime bağlı olup tripolifosfat (TPP) gibi polianyon gruplar ile negatif bir şekilde yüklenir [60]. Kitosan stabilize eden ajanların varlığında veya yokluğunda asetik asit içerisinde çözünür. Polianyon eklenerek, nanopartiküller manyetik karıştırıcıda şekillendirilir [61].

#### **1.3.1.4. Lipozomlar**

Lipozomlar aynı hücre zarı gibi yapıda keseciklerdir. Bu kesecikler, sistemik toksisiteyi minimuma indirirken tümörlü bölgelere ilacın maksimum miktarlarını ulaştırırlar [62]. Baş ve kuyruk grupları içeren fosfolipidlerden oluşmuşlardır. Baş kısmı hidrofilik bir karaktere sahip olup suyu sever ancak fosfolipidlerin kuyruk diye adlandırılan kısmı hidrofobik olup yapılarda su tarafından itilir.

Tümörlü dokulardaki kan damarlarında endotel tabakasındaki hücreler arasında sağlıklı bir bireydeki kadar sıkı bağlantı noktaları bulunmaz ve genellikle 400 nm aşağısındaki lipozomal yapılar bu boşluklardan rahatlıkla geçebilir. Doxorubicin, Camptothecin ve Daunorubicin gibi antikanser ilaçlarının taşınımı lipozomal sistemlerde günümüzde kullanılmaktadır [63].

### **1.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Etken Maddeler ve Çoklu İlaç Direnci**

#### **1.4.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan Etken Maddeler**

Kanser tedavisinde pek çok ilaç kullanılmakla beraber en çok bilineni cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II; CDDP) dir.

#### 1.4.1.1. Sisplatin

Son yıllarda kemoterapide çeşitli ilaç kombinasyonları kullanılmıştır. Yeni ilaç kombinasyonları ile beraber sisplatin kullanımıyla yüksek cevap oranı elde edilmiştir. Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) halen yaygın olarak antikarsinojenik olarak kullanılan önemli bir sitotoksik maddedir [64]. Bu maddelerin terapötik anlamda ve doza bağlı neden olduğu toksisite oranı oldukça yüksektir. Sisplatinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, etkin oksijen radikallerinin düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Sisplatin uygulamaları sonucu oluşan lipid peroksidasyona bağlı olarak dokularda MDA ve GSH düzeylerinde ve bazı koruyucu enzimlerin aktiviteleri ile antioksidan maddelerin düzeylerinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir [65,66]. Sisplatin klinikte genellikle ovaryum, testis ve idrar kesesi kaynaklı kanserlerin tedavisinde kullanılmakta olan platinum grubu bir ilaçtır. Sisplatin hücre içersine girerek DNA ile zincir içi ve zincirler arası köprüler kurarak kovalent bağlar yapar. Çeşitli deneysel çalışmalarda da sisplatinin C6 glioma hücrelerinde hücre siklus duraklamasına ve apoptozise yol açtığı gösterilmiştir [67,68].

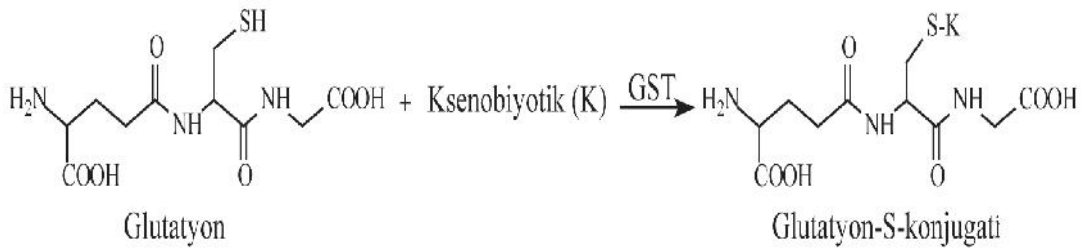
#### 1.4.2. Çoklu İlaç Direnci

Kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı geliştirdiği çoklu ilaç direnci (MDR, Multi Drug Resistance) kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. MDR, tek bir sitotoksik ajana maruz kalan kanser hücrelerinde, birçok kemoterapötik ilaca karşı gelişen direnç mekanizmasıdır [69]. MDR, ATP – bağlanma kaseti (ABC) protein ailesine ait membran proteinlerince düzenlenmektedir. Bu ailenin bilinen ve en çok çalışılan proteinleri, MDR1 genince kodlanan MDR1 (P-glikoprotein) ve MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) genince kodlanan MRP1 proteinleridir. Bu proteinlerin dışında MRP2, MRP3 ve BCRP/MXR1 proteinleri de MDR oluşumunda rol alan proteinlerdir. MDR proteinleri, ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak kemoterapötik ilaçların hücre dışına taşınmasını sağlayan ATPaz'lardır [70].

En önemli MDR proteinlerinden P-glikoprotein (P-gp) plazma membranında lokalizedir. P-gp aşırı eksprese eden hücreler, çeşitli ilaçlara (antrasiklinler, antibiyotikler, taxanlar, peptitler, hormonlar) karşı direnç göstermektedirler. MDR proteinleri kanser hücrelerinde aşırı eksprese olmaktadır. Bu sayede antikanser ilaçlara direnç göstermektedirler [11].

### 1.5. Glutasyon-S-Transferaz

Glutasyon transferazlar, tanımlandığından beri kullanılan ismiyle glutasyon S-transferazlar, endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (Şekil 1.5) [71, 72].



$\gamma$ -L-Glutamil-L-sisteinilglisin

**Şekil 1.5.** Glutasyonun (GSH) ksenobiyotiklere glutasyon transferaz (GST) katalizli reaksiyonu [71, 72]

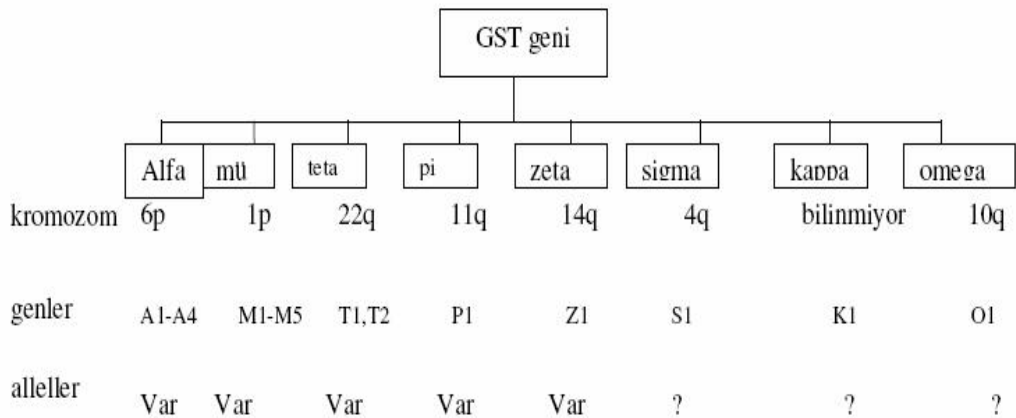
GST enzimlerinin büyük bir kısmı hücrenin sitoplazmasında çözülmüş olarak bulunur [73]. Bir kısmı ise endoplazmik retikulumda (mikromazomal) lokalize olmuştur. Sitozolik GST aktivitesinin mikrozomal aktiviteye göre 5 ile 40 kat daha fazla olduğu saptanmıştır [74]. Karaciğer, böbrek, testis, bağırsak ve adrenal bezlerde GST yüksek aktivite göstermektedir [75].

GST'ler muhtemelen tek bir ortak atadan gelirler ve bunların substrat özgüllüğünün ve farklılıklarının, dublikasyon, gen rekombinasyonu ve mutasyonların birikmesi ile yeniden şekillendiği düşünülmektedir [76].

Sitozolik GST izoenzimlerinin tümü molekül ağırlıkları 23 ve 28 kDa olan birbirinin aynı ya da farklı iki dimerik proteinden oluşurlar [77]. GST pi ve GST teta sınıfları homodimerik izoenzim formlarını temsil ederken, GST alfa ve GST mü sınıfları daha kompleks olup; homodimerik ve heterodimerik izoenzim form çeşitliliği gösterirler [78].

Sitozolik GST' lar dimerik proteinlerdir. Her bir alt ünitesi yaklaşık 25 kDa ağırlığındadır. Her bir alt ünite, iki farklı fonksiyonel bölgeden oluşan bir aktif konuma sahiptir. Bu fonksiyonel bölgeler, fizyolojik substratı (GSH) bağlayan hidrofilik G bölgesi ile yapısal olarak farklı elektrofilik substratları bağlayan hidrofobik H bölgesidir. GST izozimlerinin, hidrofobik H-bölgesindeki aminoasit kompozisyonunun farklılık göstermesi, enzim ailesinin substrat çeşitliliğinin nedenidir [79].

Memelilerde sitozolik GST'lar, kimyasal özellikleri, immünolojik reaktiviteleri ve amino asit diziliş benzerliklerine göre şekil 1.6' da gösterildiği gibi alfa ( $\alpha$ ), pi ( $\pi$ ), mü ( $\mu$ ), teta ( $\theta$ ), sigma ( $\sigma$ ), zeta ( $\zeta$ ) ve omega ( $\omega$ ) olarak 7 gruba ayrılırlar [80, 81].



**Şekil 1.6.** GST Süper gen ailesi [82]

### 1.5.1. Pi Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar

Çalışmaya konu olan Glutasyon-S-Transferaz (GST) izozimi Glutasyon-S-Transferaz pi (GSTpi) dir. Kromozom 11q 13'te haritalanmış olan GST P1 geni, GST P1-1 izoenzimini kodlar [83]. Akciğer, özafagus, böbrek ve plesanta gibi birçok organda eksprese edilir [84]. GST P1-1 enzimleri birçok farklı kanserde uygulanan kemoterapi ve radyoterapiye dirençlilik gösterir [85].

GST pi izoenziminin akciğer, gırtlak, kolon, karaciğer, meme gibi çeşitli insan kanser dokularında ve çeşitli kanser öncesi dokularda biriktiği rapor edilmiştir ve kanser araştırmalarında bir tümör belirleyici olarak kullanılmaktadır [86, 87].

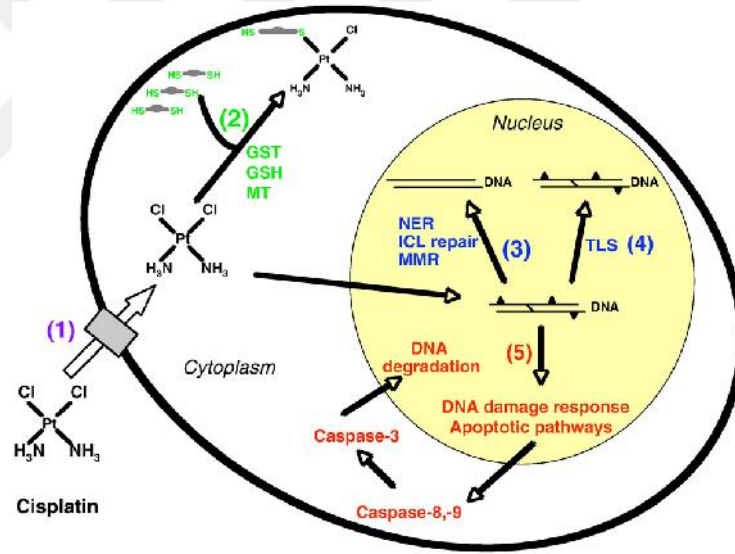
#### 1.5.1.1. Glutasyon S-Transferaz pi ile Sisplatin İlişkisi

Kanser tedavisinde etken madde olarak kullanılan sisplatinin etkisi hücrelerde meydana gelen dirençten dolayı sınırlandırılmaktadır. Sisplatin direnç mekanizması; sisplatine dirençli hücre hatlarının birkaç tipinde çalışılmış ve multifaktoryal olduğu görülmüştür. Bu göstermiştir ki; kanser hücreleri intraselüler ilaç birikiminin azalmasına yol açan (I) ilaç taşınmasındaki değişiklikler, (II) glutasyon ve metalloiyonlar gibi intraselüler temizleyicilerin seviyelerinin yükselmesinden dolayı gelişen ilaç detoksifikasyon sistemi, (III) artan nükleotid kesip çıkarma, DNA sarmalının içinde çapraz bağ ve yanlış eşleşme tamirinin eksikliğini içeren DNA tamirindeki değişiklikler, (IV) DNA hasarını tölere eden mekanizmalardaki değişiklikler ve son olarak (V) apoptotik hücre ölümü yollarındaki değişikliklerden dolayı sisplatin direnci gelişebilmektedir [88, 89] (Şekil 1.7).

Sisplatin direnci glutasyon ve metalloiyonun gibi intraselüler tiyol kaplı moleküller tarafından ilacın artan inaktivasyonu sonucunda ortaya çıkabilir.

Glutasyon, koruyucu bir tri-peptit olmasının yanı sıra serbest radikalleri temizler, hücrelerin redoks çevreden ve ksenobiyotik maddelerden korumasını sağlar. Glutasyon-S-Transferaz (GST) tarafından katalizlenen reaksiyonlarda, bir etken madde olan sisplatinin DNA gibi diğer hücrel moleküllere bağlanmasının engellenmesi

sonucunda glutatyon ile birleşebilir. Glutatyon sisteminin sispaltin direnci üzerindeki rolü, kanser doku ve hücre hatlarının her ikisinde de yaygın olarak çalışılmıştır. Ovaryan, servikal, akciğer, embriyonal ve mesane kanser hücre hatlarındaki Glutatyon veya GST' in konsantrasyonlarındaki artış sispaltin direnci ile ilişkilendirebilse de [90, 91] hepsinde gözlemlenememiştir [92]. Benzer bir şekilde kanser hastalarında sispaltin yanıt oranı ile glutatyon veya GST ekspresyonlarıyla ilişkili çalışmalarda elde edilen bulgular birbiriyle uyumsuzluk göstermiştir. Baş ve boyun kanserli veya küçük hücreli dışı akciğer karsinomuna sahip hastalarda gerçekleştirilen bazı çalışmalarda ise glutatyon ve GST ekspresyonlarının sispaltin direnci ve kötü klinik sonuçlar ile ilişkili olabileceği bulunurken [93], serviks, ovaryel kanser ve küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda sispaltin tedavisinden sonra oluşan yanıt oranı veya sağkalım ile GST ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [94].



Şekil 1.7. Sispaltin direnç mekanizması [88]

## 1.6. Glutatyon S-Transferazların Kanser Tedavisindeki Önemi

Son yıllarda yapılan çalışmalar, pi ve mü sınıf GST' ların, hücresel yaşam ve ölüm sinyal iletimine katılan, mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen-activated protein kinase-MAP kinase) yolağındaki düzenleyici rolünün de kemoterapötik

ilaçlara direnç gelişmesinde etkili olduğunu göstermiştir. GSTP'nin MAP kinazlardan biri olan ve istemli hücre ölümü yolağında anahtar enzim olan JNK ile (c-Jun N-terminal kinase 1) JNK-GSTP kompleksi oluşturarak JNK1'i inhibe ettiği ve böylece nihai etkisi istemli hücre ölümü olan JNK'nın etkisini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [95]. Pekçok antikanser bileşik, MAP-kinaz yolaklarını, özellikle JNK ve p38 yolaklarını, aktive ederek istemli hücre ölümüne sebep olmaktadır [96].

Artmış GSH/GST seviyelerinin kemoterapi tedavisinde bu sistemle metabolize olan pek çok ilacın (adriamisin, klorambusil, melfalan ve diğer nitrojen mustard vs.) metabolizmasını hızlandırarak; ilaçla hedeflenen etkiye ulaşamamasına, bir başka deyişle ilaca kazanılmış direnç gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir [97].

Bu nedenle kemoterapide, geleneksel elektrofilik kanser ilaçlarının (alkilleyici bileşiklerin) etkinliğinin düzenlenmesinde, GST inhibitörlerinin kullanımının faydalı olabileceği düşüncesi doğmuştur. Bu amaçla bu sistemi hedef alan çeşitli bileşikler geliştirilmiş ve hem deneysel olarak hem de klinikte denenmiştir [98].

Kemoterapötik bileşiklere gelişen direncin ortadan kaldırılmasındaki yeni tedavi yaklaşımlarından bir diğeri de, tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde salgılandığı bildirilen GST enziminden (özellikle GSTpi) terapötik amaçla yararlanmaktır. Bu yaklaşım kendisi inaktif olan ve tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde bulunan enzimler ile tercihan ve spesifik olarak toksinlerine dönüşen ön ilaçların uygulanmasıdır. Bu strateji bileşiğin normal dokulara toksisitesini azaltırken aktif bileşiğin tümör dokusuna artmış miktarda taşınmasını da mümkün kılmaktadır [99].

## 1.7. Literatür Özeti

Kim ve ark. (2008) [100] tarafından yapılan çalışmada sentezledikleri 300-500 nm boyutlarında glikol-kitosan nanopartiküllerini (HGC) antikanser ilaç taşıyıcısı olarak çalışmışlardır. Çalışmalarında, diyaliz metoduyla sisplatin, HGC nanopartikülleri içerisine enkapsüle ederek *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda sisplatinin 1 haftalık salınımı incelenmişler ve sisplatinin HGC nanopartiküllerinden belirli oranlarda

salındığı için daha yüksek antitümör etki fakat normal hücelere az sitotoksosite gösterdiğini gözlemlemiştir.

Çeşitli sentetik ve doğal polimerler, nanopartiküllerin üretimi için kullanılmaktadır. Günümüzde bir polisakkarit türevi olan kitosan bu alanda çok sık kullanılmaya başlanmıştır. Kitosan uygun biyolojik özelliklerinden dolayı ilaç taşınması için yardımcı farmasötikal madde ve biyomateryel olarak kullanılmaktadır [101]. Aynı zamanda biyoparçalanabilir bir yapıya ve düşük toksisiteye sahiptir [102].

Qi ve ark. (2006) [103] tarafından yapılan çalışmada hepataselüler karsinomanın büyümesi üzerine kitosan nanopartiküllerinin antitümör etkisini araştırmışlardır. Yaklaşık boyutları 40-100 nm arasında olan kitosan nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu sentezlenen nanopartiküllerin *in vivo* ve *in vitro* BEL7402 insan hepatoma hücre hattı üzerindeki antitümör etkisi incelenmiş ve yüksek antitümör etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, farklı boyutlardaki (40, 70, 100 nm) kitosan nanopartikülleri ile muamele edilen faredeki BEL7402 hücreleri üzerindeki tümör büyüme inhibitör oranları % 24,07, % 61,69, %58,98, %34,91 olarak bulunmuştur.

Campos ve ark. (2004) [104] tarafından yapılan çalışmada kitosan nanopartiküllerin oküler ilaç taşınma potansiyellerini konjektival hücre kültürlerinde ve *in vivo* da araştırmışlardır. Kitosan nanopartikülleri florasein ile işaretlenmiş ve bu konjugat 24 saat *in vivo* da takip edilmiş ve bu bölgede hücre yaşayabilirliğinin % 100 olduğunu bulmuşlardır

Son yıllarda kemoterapi de çeşitli ilaç kombinasyonları kullanılmıştır. Yeni ilaç kombinasyonları ile beraber sispilin kullanımıyla yüksek cevap oranı elde edilmiştir. Sispilin (cis-diamminedichloroplatinum II) halen yaygın olarak antikarsinogenik olarak kullanılan önemli bir sitotoksik maddedir [105]. Sispilin yaygın olarak testis, ovaryum, mesane, baş ve boyun, akciğer kanserlerinin (küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri) tedavisinde kullanılan önemli bir antikanser ajandır [106].

Cafaggi ve ark. (2007) [107] yapılan çalışmada 180-350 nm boyutlarında pozitif veya negatif iyon yüküyle yüklenen nanopartikülleri; bir katyonik polielektrot yani kitosan



ve N-trimethyl kitosanla bir anyonik sisplatin-aljinat kompleksinin elektrostatik etkileşimi ile hazırlanmışlardır. Bu partiküllerin çeşitli hücre hatları üzerindeki etkisi test edilmiş ve sisplatinin sitotoksik aktivitesinin pozitif nanopartiküllerde daha düşük olduğu bulunmuştur. Yapılan bu çalışma sonucunda; polikarboksilat polimerleriyle sisplatin kompleksleri yüksek potansiyel ilgiye sahip sisplatin-partikülat taşıyıcılara dönüşebilecektir. Araştırmalarında desteklediği gibi polimerik nanopartiküller aracılığıyla ilacın istenilen bölgeye taşınması hem ilacın toksisitesini azaltmakta hemde ilacın spesifik olarak kanserli hücreleri etkilemesini sağlamaktadır.

Yapılan bu çalışmanın amacı; sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygun dozda ve sürede HeLa kanser hücre hattı üzerine kitosan nanopartiküllerine yüklü kemoterapötik bir ilaç olan sisplatinin salınımı ve kullanılan hücre hattı üzerindeki apoptotik ve nekrotik etki ile birlikte GST pi ekspresyonu araştırılmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

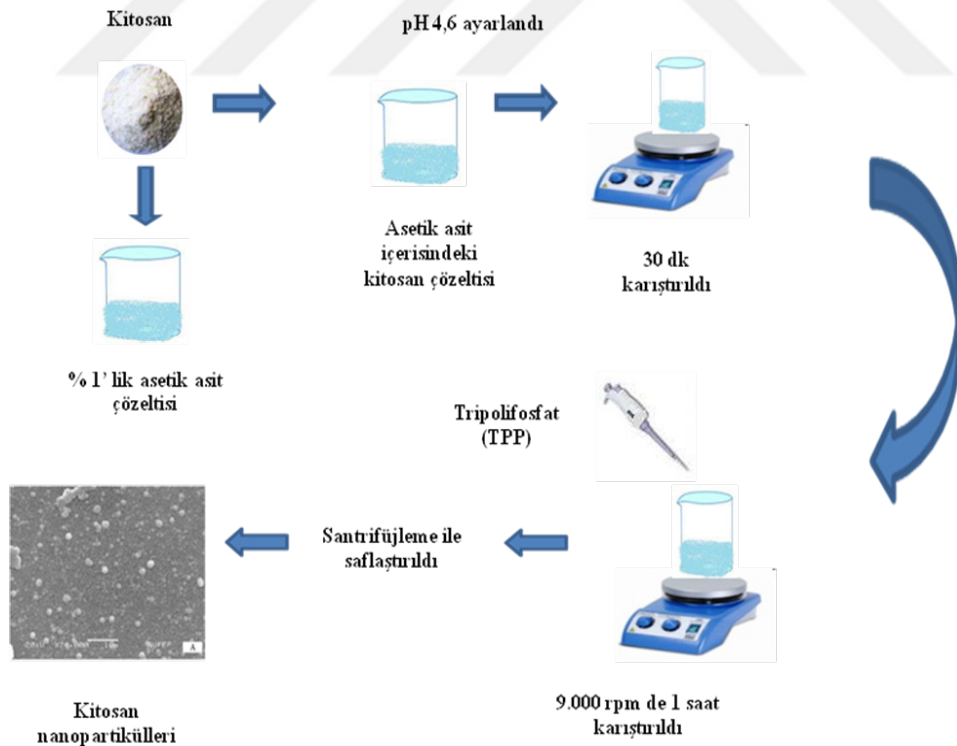
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, BD., USA), tripsin/10 mM EDTA (Etilendiamintetraasetat) (Sigma, ABD), PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD), kitosan (SIGMA, Japonya), asetik asit (Reidl-de Haén, Almanya), TPP (Sigma Aldrich, ABD), Primer antikor (Kaspaz 3) (Neomarkers Fremont, CA), Primer antikor (GST pi) (Lab Vision) Sekonder Antikor (Biotinylated secondary antikor) (Dako), WST-1 (Roche, Almanya), %30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solüsyonu (Sigma), Etanol (Merck, Almanya), Metanol (Merck, Almanya), Ksilol (Merck), Protein Blokajı (Normal Swine Serum, Normal Goat Serum) (Dako), ABC HRP (Avidin Biotin Complex Horse Radish Peroxidase) (Dako) Hematoksilen (Shandon), DAB (Diamino benzidin) (Dako), FBS (Fötal sığır serumu, Serva, İsrail), HeLa kanser hücresi (Hacettepe Temel Onkoljik Bilimler, Ankara), BSA (Merck, Almanya), Triton X100 (Roche, Almanya)

Elisa pleyt okuyucu (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader)

Laminar akış kabin (klas II Laminar Flow Cabinet, Labor ildam, Türkiye), UV sterilatör (Phlihips), karbondioksitli etüv (Nüve, Türkiye), ışık mikroskobu (Olympus CK2, Japonya), invert mikroskop (Leica BMI 6000, İsveç), dijital kamera (Olympus C-4000, Japonya), Ultrasantrifüj 3K30 (Sigma, Almanya), Liyofilizatör ( Hetovr 1, Hollanda), 96 gözlü hücre kültür kabı (BD, USA), hücre kültürü flaskları (BD, USA), 0,45 µm filtreler (Sartorius), etüv (Ultralab U – 120), santrifüj (Ultralab), yüksek devirli soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter Alegria X - 22), ZetaSizer ( Malvern Nano-ZS, terazi (Scaltec), manyetik karıştırıcı (Şimşek Labortechnik), santrifüj tüpleri (Nunc, Almanya), mikropipetler (Scaltec, Almanya), pipetler, çeşitli cam malzeme ve çeşitli plastik malzeme analitik düzeyde kullanılmıştır.

## 2.2. Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi

Sunulan bu çalışmada kitosan nanopartiküllerinin elde edilmesinde iyonik jelasyon metodu kullanıldı. Şekil 2.1.' de de gösterildiği gibi ilk aşamada 0,5 g kitosan % 1' lik asetik asit içerisinde çözünerek % 0,5' lik kitosan çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan % 0,5' lik kitosan çözeltisinin p H değerinin 4,6-4,8 arasında tutulabilmesi için 10 M'lık NaOH çözeltisi damla damla manyetik karıştırıcıda karışmakta olan kitosan çözeltisine ilave edildi. Bir süre karıştıktan sonra 0,5 g TPP (tripolifosfat) dH<sub>2</sub>O içerisinde çözünerek % 0,5' lik TPP çözeltisi hazırlandı. p H' ı ayarlanan kitosan çözeltisi ve TPP oranı 3:1 (v/v) olacak şekilde alındı ve TPP çözeltisi mikropipet yardımıyla damla damla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan kitosan çözeltisine ilave edildi. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 1 saat yüksek karıştırma hızında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 1 saatin sonunda 9.000 rpm de 15' er dakikalık aralıklarla santrifüj edildi. Her santrifüjden sonra dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve ependorfun dip kısmında kalan pelte halindeki kitosan nanopartikülleri toplandı [25].



Şekil 2.1. Kitosan nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü

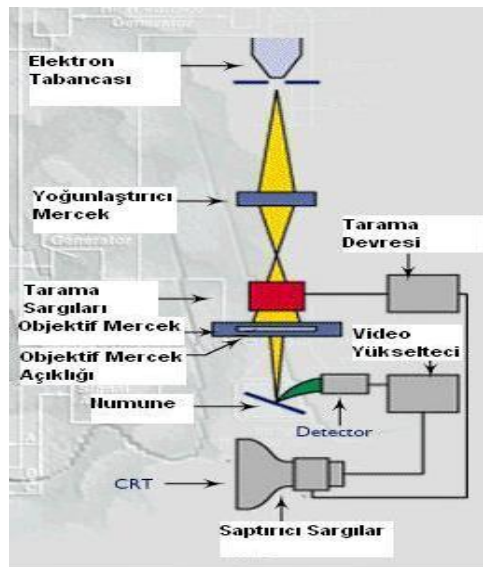
## 2.3. Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

### 2.3.1.Kitosan Nanopartiküllerinin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Sunulan bu çalışmada sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla (karakterizasyonu) Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ile Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) tekniklerinden yararlanılmıştır.

#### 2.3.1.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İle Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

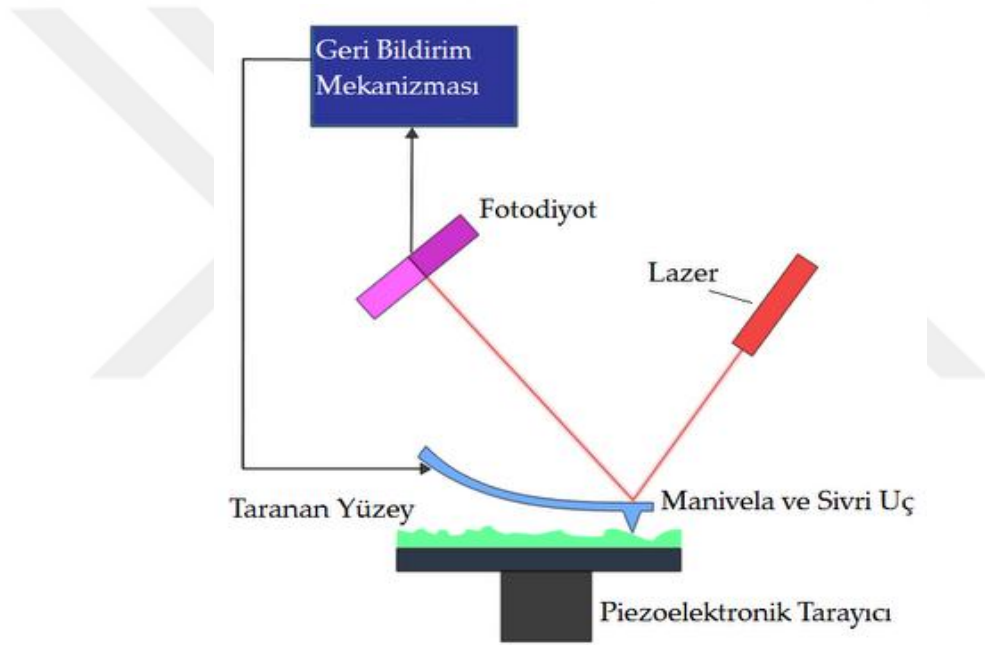
Taramalı Elektron Mikroskopu optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır [108] (Şekil 2.1). Kitosan nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, kitosan nanopartiküller standart uygulama gereği ince bir altın film tabakasıyla kaplanarak nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) görüntüleri alınmış ve nanopartiküllerin boy dağılımı belirlenmiştir.



Şekil 2.2. Taramalı elektron mikroskopunun şematik görünütüsü (109)

### 2.3.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) İle Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

1980' li yıllarda geliştirilmiş olan atomik kuvvet mikroskopu (AFM) nanoboyuttaki değerlendirmeleri yapabilmek için görüntüler almaya yarayan taramalı uç mikroskoplardan biridir [109]. Şekil 2.2.' de görüldüğü gibi Sivri uç yüzeyi tarar ve yüzey ile arasındaki kuvvet ölçülür. Aynı zamanda şekle bakıldığında manivelanın (sivri uç) biraz eğildiğini görülür. İşte bu eğilme miktarına göre atomik kuvvet ölçülür [110]. Yapılan çalışmada sentezlenen kitosan nanopartiküller direkt AT 5500 Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) ünitesine yerleştirilmiş ve numunelerin boy dağılımları incelenmiştir.



Şekil 2.3. AFM sistemi şematik görünümü ve AFM sistemi çalışma prensibi (111)

### 2.3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Sizer İle Boyut ve Yük Analizi

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerin boyut dağılımlarını belirlemek ve SEM ile AFM çalışmalarından elde edilen sonuçlar ile karşılaştırmak için Malvern' nin Nano-ZS ZetaSizer cihazından yararlanılmıştır.

### **2.3.2.1. ZetaSizer Cihazı İle Zeta Boyut Analizi**

Parçacıklar kendilerini saran çözücü molekülleri sayesinde rastgele gerçekleştirdikleri Brownian hareketi ile belirli bir hızda hareket ederler. Partikül boyutu büyüdükçe Brownian hareketi yavaşlamaktadır. Malvern' nin Nano-Zs ZetaSizer cihazı ile partiküllerin çözücü içerisindeki hareket etme hızı, yani difüzyon katsayısı ölçülmekte ve ölçüm sonunda elde edilen difüzyon katsayısı bizi hidrodinamik çapa götürmektedir. Eğer partiküller büyükse, sinyal yavaş değişecek ve korelasyon uzun sürecek, eğer partiküller küçükse ve hızlı hareket ediyorsa o zaman korelasyon daha hızlı bir şekilde gözden kaybolacaktır. Bu prensip ile çalışan Malvern' nin Nano-ZS ZetaSizer cihazı kullanılarak kitosan nanopartiküllerinin boyut analizi yapıldı.

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerin süpernatantı ölçüm için polistiren kaplı küvet içerisine konulup 25 C° sıcaklığa ayarlanmış sıcaklık kontrollü bir bölme içerisine yerleştirildi. 633 nm lik lazerin küvet içerisindeki çözeltiden geçmesini sağlayan bu sistem ile kitosan nanopartiküllerin boyut analizi yapıldı.

### **2.3.2.2. ZetaSizer Cihazı İle Zeta Yük Analizi**

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerin Zeta potansiyelinin belirlenmesi için Malvern' nin Nano – ZS cihazı kullanılmıştır. Zeta potansiyeli koloidal parçacıklar arasındaki etkileşimin iyi bir göstergesi olup yapılan ölçümler koloidal sistemlerin kararlılığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Sulu sistemde dağıtılmış koloidal partiküllerin çoğu belirli bir yüzey yüküne sahiptir. Partikül yüzeyinde net yükün oluşması, çevresindeki iyonların dağılımını etkiler ve böylece partikül ile zıt yüke sahip olan iyonların yüzeye daha yakın hale gelmesini sağlar. Böylece, her partikülün çevresinde iki kısımdan oluşan elektriksel çift tabaka oluşur. Bu kısımlar; iyonların kuvvetli bir şekilde bağlandığı bir iç tabaka (Stern tabaka) ve iyonların daha gevşek olduğu bir dış (difüze) bölgedir. Bu difüze bölge içinde, her partikülün aynı kararlılığı gösterdiği kavramsal bir sınır bulunmaktadır. Bu sınırdaki potansiyel Zeta potansiyelidir. Cihaz ölçtüğü birim elektrik alanındaki partikül hızından Henry eşitliğini kullanarak ölçmek istediğimiz zeta potansiyel değerini hesaplamaktadır.

Çalışmada sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin süpernatantı ölçüm için polistiren kaplı küvet içerisine konularak 25 C° da açıklanan prensiple çalışan Malvern' nin Nano-ZS ZetaSizer cihazı ile Zeta potansiyeli ölçüldü.

#### **2.4. Kitosan Nanopartiküllerinin Hücre Yüzeyi İle Etkileşimi ve Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Kanser Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İle Görüntülenmesi**

Sentezlenen kitosan nanopartikülleri ilaç yüklenmeden önce HeLa kanser hücre hattı üzerine uygulanmış ve hücre yüzeyi ile etkileşimi ve sisplatin yüklü kitosasn nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerinde yarattığı apoptotik etki Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) tekniğinden yararlanılarak gösterilmiştir.

Kitosan nanopartiküllerinin hücre yüzeyi ile etkileşiminin incelenmesi için HeLa kanser hücrelerinin ayrı ayrı iki tane 6 kuyucuklu platelere ekimi yapıldı. Kuyucuklu platelerdeki hücreler belirli sayıya ulaştıktan sonra birinci plate 75 µg/ml boş kitosan nanopartikülleri uygulandı. İkinci plate ise 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra her bir kuyucuk PBS (pH 7,2) ile yıkandı. Yıkama sonrasında her bir kuyucuğa % 0,3'lük gluteraldehit ile muamele edildi. +4 °C' da 30 dk bekletildi. Daha sonra 2 defa PBS (pH 7,2) ile muamele edilerek +4 °C' da bekletildi. En son aşamada ise PBS alınarak her bir kuyucuğa % 70' lik alkol ilave edildi. Yükselen alkol serilerinde değiştirme yapıldıktan sonra amilasatata geçirilmiş, kritik noktada kurutma cihazında CO<sub>2</sub> ile kurutuldu. Kurutulan örnekler SEM staplarına çift taraflı bant ile yapıştırıldıktan sonra Polaron SC SO<sub>2</sub> kaplama cihazında altınla kaplandı. Yapılan bu aşamalardan sonra JEOL JSM 6060 taramalı elektron mikroskop (SEM) ile incelemesi yapıldı. İnceleme sonucunda HeLa kanser hücrelerinin yüzeyine tutunan kitosan nanopartiküllerinin görüntüsü ile sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa kanser hücrelerinde apoptoza uğrayan HeLa kanser hücrelerinin morfolojik özellikleri JEOL JSM 6060 taramalı elektron mikroskop (SEM) ile IOKV hızlandırıcı voltajda, görüntüler dijital ortama aktarılmıştır.

## **2.5. Kitosan Nanopartiküllere Sisplatin (CDDP) Yüklenmesi**

Bölüm 2.2. de belirtilen prosedüre göre sentezlenen kitosan nanopartikülleri ultra santrifüj ile 40.000 g' de 10 °C' da 1 saat santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üzerlerindeki süpernatantlar atıldı. Çöken kısım ise liyofilize edilerek toz hale getirildi.

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerinden 100 mg alınıp 2,5 ml enjeksiyonluk su ile karıştırılarak 15 dakika sonikatörde sonike edildi. Bu sayede partiküler yapının gevşemesi sağlandı. Bu karışımın üzerine 2,5 mg/ml sisplatin ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 100 rpm' de 3 saat karıştırıldı. Sisplatin yüklenen kitosan nanopartikülleri 14.500 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve ependorfun dip kısmında toplanan sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri HeLa kanser hücre hattına uygulanmak üzere toplandı.

## **2.6. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin İlaç Salınımı ve In Vitro İlaç Yükleme**

Sentezlenen kitosan nanopartikülleri ultra santrifüj ile 40.000 g' de 10 °C' da 1 saat santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üzerlerindeki süpernatantlar atıldı. Çöken kısım ise liyofilize edilerek toz hale getirildi. Liyofilize edilen kitosan nanopartikülleri sisplatin yüklenerek belirli zaman aralıklarında nanopartiküllerden ilacın ne kadarını serbest bıraktığı graphite furnace-atomic adsorption spectrometer (GF-AAS) ile tespit edildi.

### **2.6.1. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin İlaç Salınımı**

Liyofilize edilen kitosan nanopartiküllerinden 100 mg alınarak 10 ml steril distile su içerisine ilave edildi. Elde edilen karışımdaki kitosan nanopartiküllerinin yapısının yumşaması için 15 dakika sonikatörde sonike edildi. Sonike edilen karışımın üzerine 10 mg/ml sisplatin ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 1000 rpm' de 3 saat karıştırıldı.



3 saatin sonunda 20 ml'lik bu karışımdan 1 ml alınarak 0,1 µm filtreden geçirildi ve sadece sisplatin tayini için saklandı. Miktarı azalan karışımın üzerine 1 ml steril distile su ilave edilerek 20 ml' ye tamamlandı.

20 ml olan karışım 12, 24, 48, 72, 96 saatlik ilaç salınımını ölçmek için 4 ml' lik karışımlara bölündü. Her 4 ml' lik karışım süresi dolduğunda alınarak 0,1 µm' lik filtreden geçirildi ve steril ependorf içerisine koyularak graphite furnace-atomic adsorption spectrometer (GF-AAS) ile analiz edildi.

20 ml olan karışım 12, 24, 48, 72, 96 saatlik ilaç salınımını ölçmek için 4 ml' lik karışımlara bölündü. Her 4 ml' lik karışım süresi dolduğunda alınarak 0,1 µm' lik filtreden geçirildi ve steril ependorf içerisine koyuldu. Numuneler Graphite furnace-atomic adsorption spectrometer (GF-AAS) cihazı ile inceleme yapılmadan önce ilk olarak distile su içersindeki 1 mg/ml sisplatin çözeltisi  $50 \times 10^{-3}$  µg/L olacak şekilde seyreltildi. Seyreltilen çözeltinin pH ı hidroklorik asit (HCl) kullanılarak 0,5'e ayarlandı. pH 0,5 olan çözeltiden standart çözelti hazırlandı. Graphite furnace-atomic adsorption spectrometer (GF-AAS) cihazı kullanarak standart çözeltiden, standard grafik elde edildi. Farklı zaman dilimlerinde elde edilen solüsyonlar yüksek devirli santrifüjde santrifüj edilerek nanopartiküllerin çöktürülmesi sağlandı. Santrifüj sonrasında süpernatantlar alınarak GF-AAS cihazı kullanılarak ve önceden elde edilen standarda göre hesaplandı [111].

### **2.6.2. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin In Vitro İlaç yükleme**

HeLa tümör hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak hücre hatları hazırlanmıştır. Hücreler % 10 FCS, % 1 antibiyotik içeren DMEM-F12 kültür ortamında flasklarda 37 °C'de karbondioksit etüvünde inkübe edilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca kadar 2 gün ara ile besi ortamının vasatı değiştirilmiştir. Belli sayıya ulaşan kültürler tripsin ile kaldırılarak 24 kuyucuklu platelere (50.000 hücre/well) ekimi yapılmıştır. 24 kuyucuktaki hücreler belli bir sayıya ulaştıklarında serum ve antibiyotik içeren vasatlar serum ve antibiyotik içermeyen vasat ile değiştirilmiştir. Sisplatin (7,5, 15, 30, 50, 75,

100 µg/ml) ve sisplatin (7.5, 15, 30, 50, 75, 100 µg) yüklü kitosan nanopartikülleri kültür ortamında HeLa kanser hücrelerine uygulandı.

## **2.7. Toksisitenin Belirlenmesi**

Kitosan nanopartiküllerinin, sisplatinin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 metodu ile incelenmiştir.

İlk aşamada HeLa kanser hücrelerinin 96 kuyucuklu platelere her bir kuyucuğa  $5 \times 10^3$  hücre düşecek şekilde ekimi yapıldı. Kuyucuklu platelerdeki hücreler belirli bir sayıya ulaştığında farklı miktarlardaki kitosan nanopartikülleri (7,5, 15, 30, 50, 75, 100 µg/ml), sisplatin (7,5, 15, 30, 50, 75, 100 µg/ml) ve sisplatin (7,5, 15, 30, 50, 75, 100 µg) yüklü kitosan nanopartikülleri uygulanarak 48 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak sadece medium, negatif kontrol olarak  $H_2O_2$  li medium hücrelere uygulandı. 48 saat sonunda her kuyucuğa 15 µl WST-1 çözeltisi ilave edildi. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 96 kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 420-480 nm'de okundu. WST-1 toksisite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez.

## **2.8. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü**

HeLa kanser hücrelerinde apoptozun belirlenmesinde Kaspaz 3 immünohistokimyasal metod ve ikili boyama metodu, nekrozun belirlenmesinde ise ikili boyama metodu kullanılmıştır. Bununla birlikte antioksidan enzim ailesinden olan ve sisplatinin substratı olduğu bilinen GSTpi ( Glutasyon-S-Transferaz pi ) antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama ile sisplatinin uygulandığı HeLa kanser hücrelerinde GST pi ile sisplatin arasındaki ilişki gösterildi [112].

## 2.8.1. Kaspaz 3 Antikoru Kullanılarak Yapılan İmmünohistokimyasal Boyama

### Metodu

24 kuyucuklu plakelere her bir kuyucuğuna 2 ml medium içinde 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapılarak karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri belirtilen süre ve miktarlarda hücrelere uygulandı. Uygulama sonucunda öncelikle süpernatandaki yüzen kalkmış hücreler yapışan 15 ml'lik falkon tüpe toplandı. Plate yüzeyinde yapışık olan hücreler ise süpernatanın alınımını takiben, kuyucuklar 1 ml PBS ile 2 kez yıkandı ve ardından 200 µl tripsin – EDTA eklenerek, 5 dakika beklendi ve hücreler toplanıp aynı falkona ilave edildi. 4000 devir/dak santrifüj edilerek hücreler elde edildi. Santrifüj bittikten sonra süpernatanın aspire edilmesini takiben, pellet 1 ml PBS ile tek hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hazırlandı. Sitosantrifüj lamları (poli L lizimli) etiketlenerek hücrelerin toplanacağı bölge işaretlendi. Ardından santrifüj içine yerleştirilerek, 1 ml'lik hücre süspansiyonunun tamamı eklendi. 2.200 rpm'de 4 dakika sitosantrifüj edildi. Lamalar çıkarılarak oda ısısında bir gece kurumaya bırakıldı ve süre sonunda formalin ile fikse edildi. Lamalar önce % 0.2'lik Triton X 100 ile daha sonra PBS'de çözünmüş % 8'lik BSA ile 1 saat muamele edildi. 1 saatin sonunda BSA hafifce lamellerin kenarından aspire edilerek üzerine yıkama yapılmadan 100 µl primer antikor (1:300, Kaspaz 3:PBS) pipetlendi. Buz üzerinde 1 saat bekletildi. Sekonder antikor uygulaması için her bir lamel üzerine 100 µL Biotinden (link şişesi) uygulanarak oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. 2 ml PBS ile 2 x 3 dk yıkandı ve PBS aspire edildi. Her bir lamel üzerine Streptavidin HRP şişesinden 100 µl uygulanarak oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Lamellerin kenarından Streptavidin dikkatlice aspire edildi. 2 ml PBS ile 2 x 3 dk yıkandı ve fazla PBS aspire edildi. Hemen ardından lameller karanlıkta 100 µl DAB ile muamele edildi. Yaklaşık 4-5 dakika süre sonunda DAB'lı lameller distile su ile yıkandı. 2 x 3 dk lameller üzerine 100 µL Hematoksilen uygulandı ve 3 – 4 dakika kadar bekletip hemen önce çeşme suyu ile yıkayıp daha sonrada 2 x 3 dk distile su ile yıkandı. Gliserol damlatılıp mikroskop altında incelendi.

## **2.8.2. GSTpi (Glutasyon-S-Transferaz pi) Antikoru Kullanılarak Yapılan İmmünohistokimyasal Boyama Metodu**

24 kuyucuklu plakelere her bir kuyucuğuna 2 ml medium içinde 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapılarak karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri belirtilen süre ve miktarlarda hücrelere uygulandı. Uygulama sonucunda öncelikle süpernatandaki yüzen kalkmış hücreler yapışan 15 ml' lik falkon tüpe toplandı. Plate yüzeyinde yapışık olan hücreler ise süpernatanın alımını takiben, kuyucuklar 1 ml PBS ile 2 kez yıkandı ve ardından 200 µl tripsin – EDTA eklenerek, 5 dakika beklendi ve hücreler toplanıp aynı falkona ilave edildi. 4000 devir/dak santrifüj edilerek hücreler elde edildi. Santrifüj bittikten sonra süpernatanın aspire edilmesini takiben, pellet 1 ml PBS ile tek hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hazırlandı. Sitosantrifüj lamları (poli L lizimli) etiketlenerek hücrelerin toplanacağı bölge işaretlendi. Ardından santrifüj içine yerleştirilerek, 1 ml' lik hücre süspansiyonunun tamamı eklendi. 2.200 rpm'de 4 dakika sitosantrifüj edildi. Lamalar çıkarılarak oda ısısında bir gece kurumaya bırakıldı ve süre sonunda formalin ile fikse edildi. Lamalar önce % 0.2' lik Triton X 100 ile daha sonra PBS'de çözünmüş % 8'lik BSA ile 1 saat muamele edildi. 1 saatin sonunda BSA hafifce lamellerin kenarından aspire edilerek üzerine yıkama yapılmadan 100 µl primer antikör (1:100, GST pi:PBS) pipetlendi. Buz üzerinde 1 saat bekletildi. Sekonder antikör uygulaması için her bir lamel üzerine 100 µL Biotinden (link şişesi) uygulanarak oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. 2 ml PBS ile 2 x 3 dk yıkandı ve PBS aspire edildi. Her bir lamel üzerine Streptavidin HRP şişesinden 100 µl uygulanarak oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Lamellerin kenarından Streptavidin dikkatlice aspire edildi. 2 ml PBS ile 2 x 3 dk yıkandı ve fazla PBS aspire edildi. Hemen ardından lameller karanlıkta 100 µl DAB ile muamele edildi. Yaklaşık 4-5 dakika süre sonunda DAB'lı lameller distile su ile yıkandı. 2 x 3 dk lameller üzerine 100 µL Hematoksilen uygulandı ve 3 – 4 dakika kadar bekletip hemen önce çeşme suyu ile yıkayıp daha sonrada 2 x 3 dk distile su ile yıkandı. Gliserol damlatılıp mikroskop altında incelendi.

### 2.8.3. İkili Boyama Metodu

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A kullanılır. – 20 °C’de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A RNA’yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA’yı yok eder. Hoechst boyama: +4 °C’da saklanır (33342). Apoptotik hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidium Iodide: +4 °C’de saklanır. DNA’yı ve RNA’yı boyar. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. HeLa kanser hücrelerinin 6’lı well platalere her bir well de  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekimi yapıldı ve hücreler 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatörde çoğaltıldı. Çoğaltılan hücrelerin içinde bulunduğu mediumlar (üst solüsyon) alınarak atıldı. Daha sonra üzerine belirli dozlarda kitosan nanopartikülü, sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartikülü uygulandı. 48 saat 37 °C’de CO<sub>2</sub> inkübatörde hücreler bekletildi (Normalde hücre büyümesi 1 günlüktür ama burada 2 gün bekletilir.). Daha sonra önceden hazırlanan stok solüsyonlar ile boyama yapıldı. Bu stok solüsyonların hazırlanışı şu şekildedir:

Ribonükleaz A’dan 1ml PBS’de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlanır.

Hoechst ise 1 ml PBS’de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlanır.

Propidium Iodide 1ml PBS’de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlanır.

Solüsyonlar kullanılana kadar – 20 °C’de saklanır.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre

Hoechst stoktan 500 mikrolitre

Propidium Iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlanır.

6 kuyucuklu platelerde ekili hücrelerin üzerindeki süpernatant falkona toplanır. Hücrelerin üzerine 1 mL PBS ilave edilir. Platelerdeki hücrelerin yüzeyine 200 mikrolitre tripsin ilave edilir. Tripsinin ilave edilmesindeki amaç, platelerde altta kalan hücrelerin çıkarılmasını sağlamaktır. Üstteki hücrelerde ise apoptozu gözlemlenecektir. Tripsin 4 dk 37 °C'de bekletilir. 2 mL medium ilave edilir ve buradan kopmuş hücreler falkona toplanır. Dip kısma bütün hücreler toplansın 4 dk 800 rpm'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Üzerlerine 100 mikrolitre double staining solüsyonu pipetaj yapılır. Karanlıkta 15 – 20 dakika 37 °C'de inkübe edilir. Temiz lam üzerine bu karışımdan 17 mikrolitre konulup lamelle kapatılır. Lamelin kenarları tırnak cilasıyla kapatılır. Hazırlanan örnekler flouresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480 – 520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

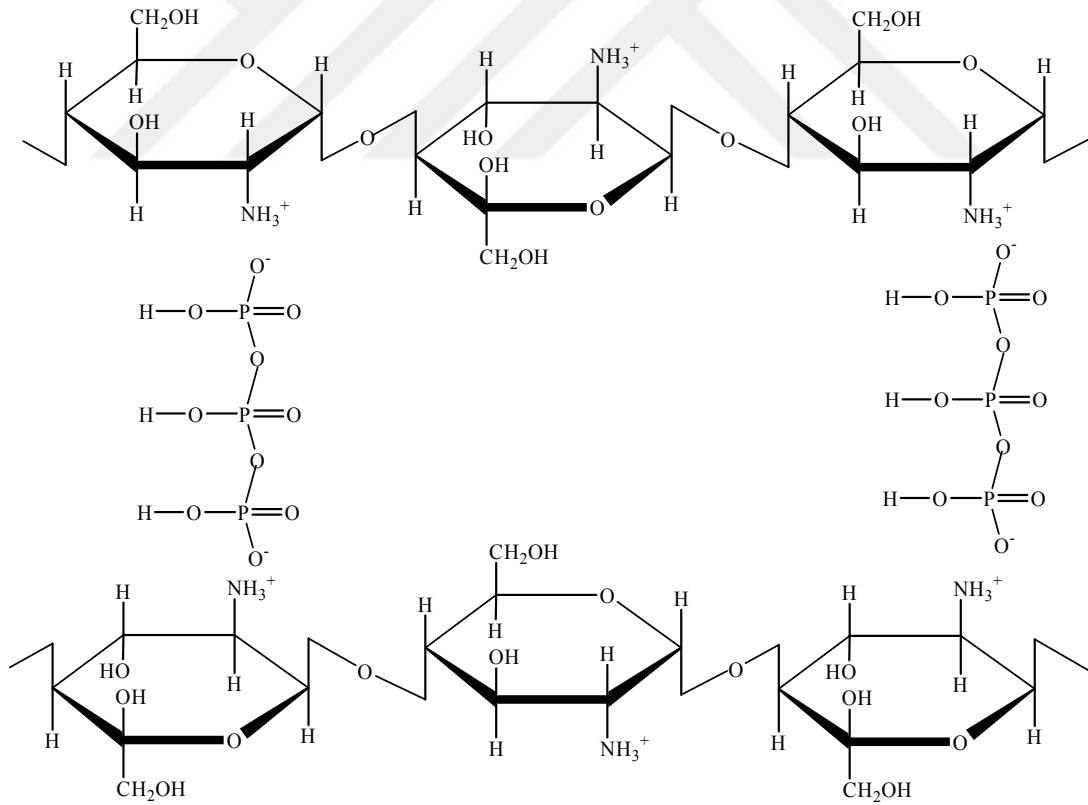
## **2.9. İstatistiksel Analiz**

Yapılan bu çalışmada, sisplatin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve sisplatin yüklü ( $\mu\text{g}$ ) kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerinde sebep olduğu kaspaz 3 ve GST pi ekspresyonları yüzdesine göre ayrı ayrı istatistiksel olarak değerlendirildi. Her iki grup için kaspaz 3 ve GST pi ekspresyonları arasındaki farklılığın olup olmadığını anlamak için Mann-whitney U testi yapıldı. Komogorav-Smirnov Uyum iyiliği testinden elde edilen sonuca göre T-Testi uygulandı.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. Kitosan Nanopartiküllerin Elde Edilmesi

Sunulan çalışmada kitosan nanopartiküllerin sentezi iyonik jelasyon metoduna dayanılarak gerçekleştirildi. İyonik jelasyon asitli sulu çözeltilerde artı yüklü polielektrolit olarak davranan kitosanın polianyonlarla kompleks yapması ilkesine dayanır [113]. Kitosan nanopartiküllerinin sentezi sırasında polikatyonik bir bileşik olan kitosana polianyonik bir bileşik olan ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPP (Tripolifosfat) nin ilave edilmesinin ardından şekil 3.1’ de gösterildiği gibi “-” ve “+” yüklerin birbirleriyle etkileşimleri sonucunda meydana gelen bağlar içi nanopartiküllerin elde edilmesini sağladı.

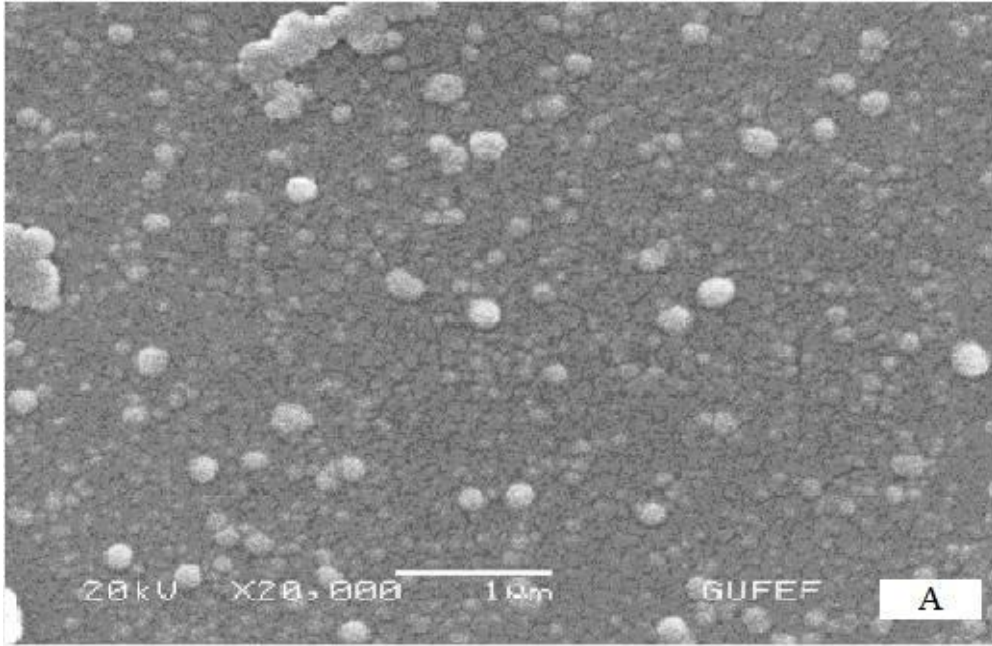


Şekil 3.1. Kitosan nanopartiküllerin sentezi

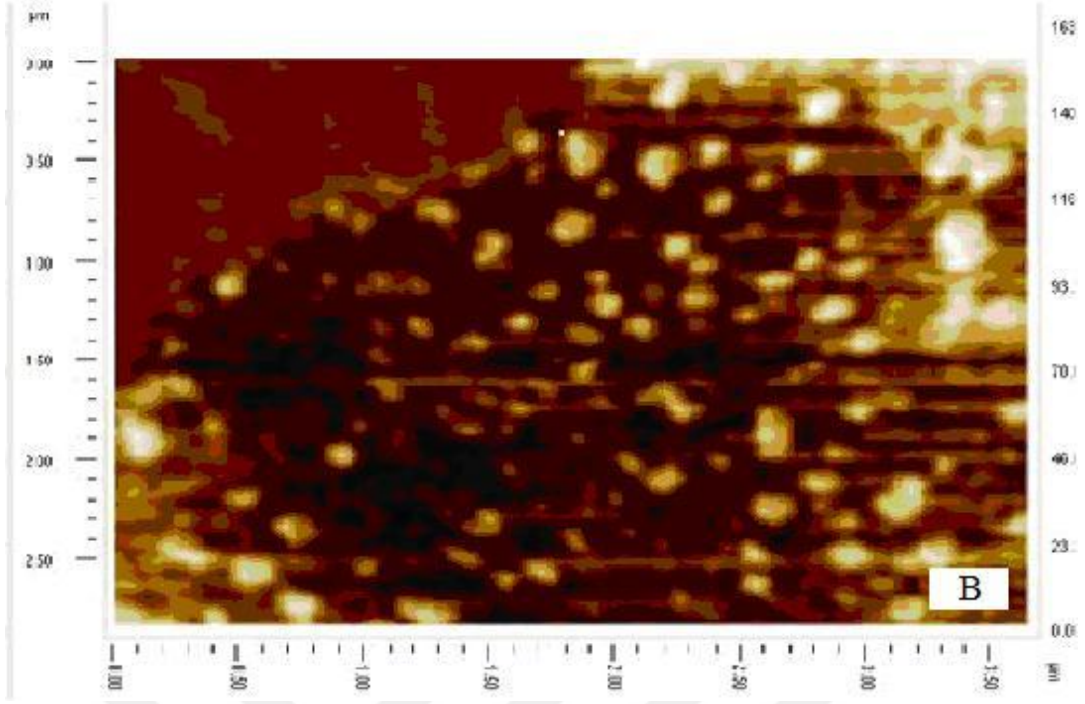
### 3.1.1. Kitosan Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Sunulan çalışmada sentezlenen kitosan nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek üzere yapılan Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) çalışmalarına ait Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) fotoğrafları Şekil 3.2 (A) ve (B) de gösterilmiştir.

İncelemeler sonucunda elde edilen SEM ve AFM fotoğrafından da anlaşılacağı gibi kitosan nanopartiküllerin ortalama boyutunun 100-200 nm arasında olduğu ve sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin düzgün ve küresel formda olduğu anlaşılmaktadır.





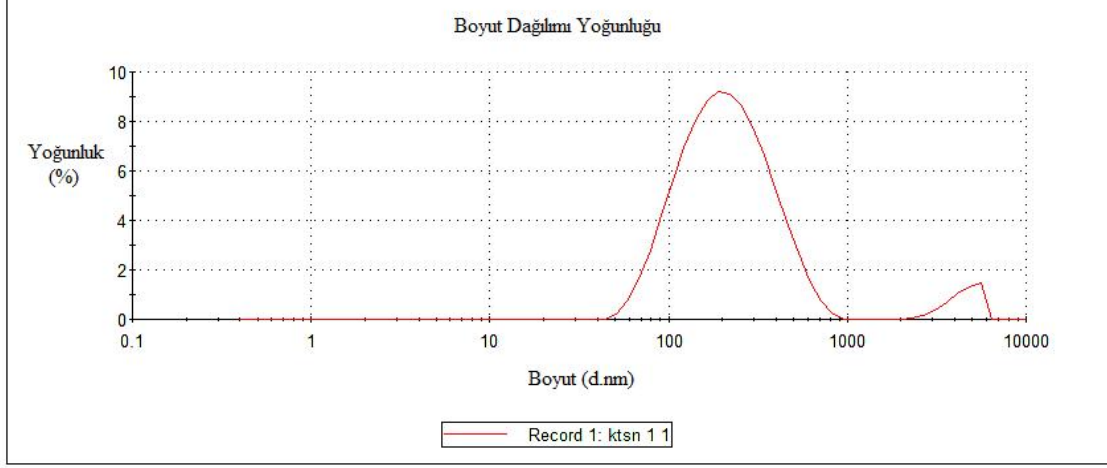


**Şekil 3.2.** Kitosan nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, **A)** Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) fotoğrafı, **B)** Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) fotoğrafı

### 3.1.2. Kitosan Nanopartiküllerin Zeta Sizer İle Boyut ve Yük Analizi

Kitosan nanopartiküllerinin boyut analizi SEM ve AFM görüntüleme tekniklerine ek olarak Malvern'nin Nano-ZS ZetaSizer cihazı kullanılarak yapıldı ve nanopartiküllerin Zeta boyutu elde edildi. Yapılan Zeta boyut analizine göre kitosan nanopartiküllerin Zeta boyutunun şekil 3.3' de gösterildiği gibi ortalama 174 nm olduğu tespit edildi.

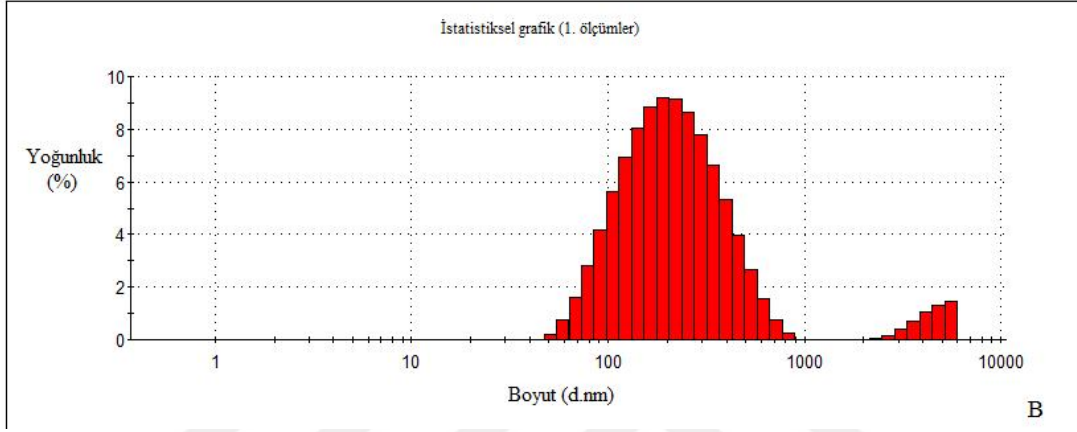
	Boyut (d.nm) :	Yoğunluk (%) :	Genişlik (d.nm) :
<b>Z-Average (d.nm):</b> 174,5	<b>Peak 1:</b> 235,7	94,9	134,3
<b>Pdl:</b> 0,393	<b>Peak 2:</b> 4511	5,1	876,4
<b>Intercept:</b> 0,948	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality:</b> Good			



**Şekil 3.3.** Kitosan nanopartiküllerin Zeta boyut analizi

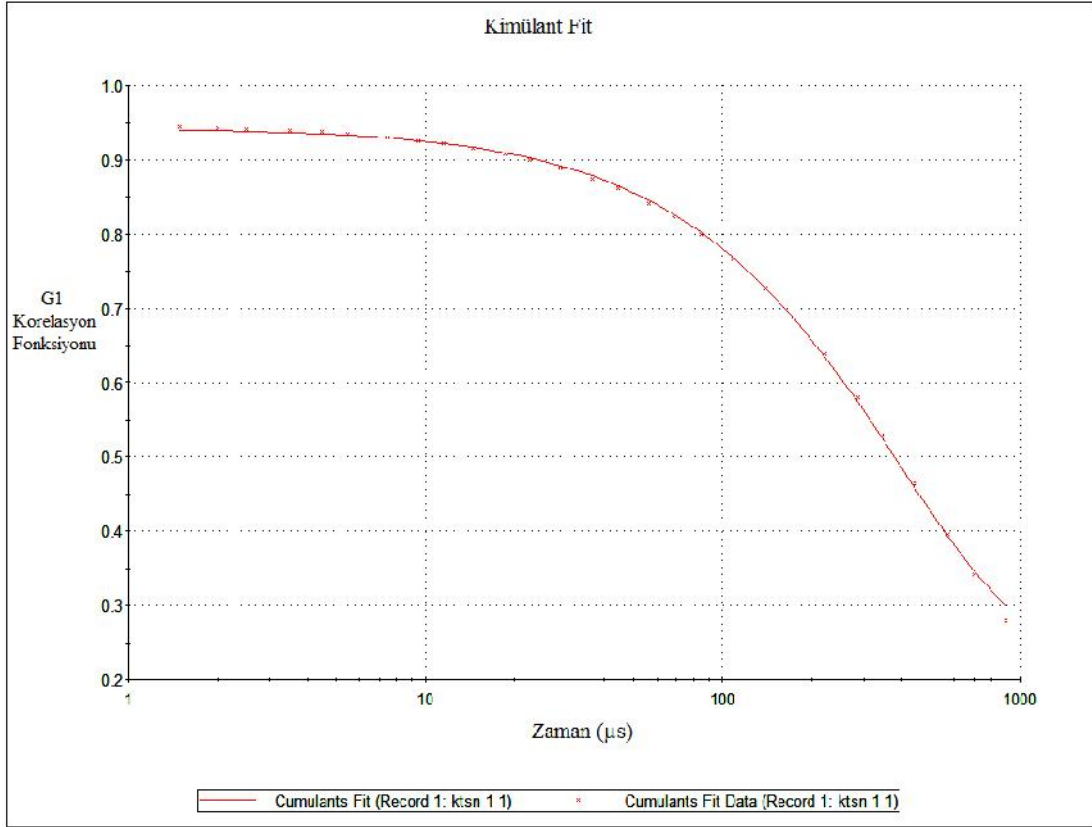
Kitosan nanopartiküllerin yüzdeler karşılık gelen boyut dağılımı ise şekil 3.4' de gösterilmiş olup en düşük yüzdeler karşılık gelen nanopartikül boyut dağılımının 68,06 nm olduğu en yüksek yüzdeler karşılık gelen boyut dağılımının ise 190,1 nm olduğu tespit edildi.

Boyut (d.nm)	Yoğunluk Oranı (%)	Boyut (d.nm)	Yoğunluk Oranı (%)	Boyut (d.nm)	Yoğunluk Oranı (%)	Boyut (d.nm)	Yoğunluk Oranı (%)
0,4000	0,0	5,615	0,0	78,82	2,8	1106	0,0
0,4632	0,0	6,503	0,0	91,28	4,2	1281	0,0
0,5365	0,0	7,531	0,0	105,7	5,6	1484	0,0
0,6213	0,0	8,721	0,0	122,4	7,0	1718	0,0
0,7195	0,0	10,10	0,0	141,8	8,1	1990	0,0
0,8332	0,0	11,70	0,0	164,2	8,8	2305	0,0
0,9649	0,0	13,54	0,0	190,1	9,2	2669	0,2
1,117	0,0	15,69	0,0	220,2	9,1	3091	0,4
1,294	0,0	18,17	0,0	255,0	8,6	3580	0,7
1,499	0,0	21,04	0,0	295,3	7,8	4145	1,0
1,736	0,0	24,36	0,0	342,0	6,6	4801	1,3
2,010	0,0	28,21	0,0	396,1	5,3	5560	1,5
2,328	0,0	32,67	0,0	458,7	3,9	6439	0,0
2,696	0,0	37,84	0,0	531,2	2,7	7456	0,0
3,122	0,0	43,82	0,0	615,1	1,6	8635	0,0
3,615	0,0	50,75	0,2	712,4	0,7	1,000e4	0,0
4,187	0,0	58,77	0,7	825,0	0,2		
4,849	0,0	68,06	1,6	955,4	0,0		



Şekil 3.4. Kitosan nanopartiküllerin yüzdelerle karşılık gelen Zeta boyut dağılımı

Malvern' nin Nano-ZS cihazı ZetaSizer ile yapılan ölçümler sonucunda elde edilen ve kitosan nanopartiküllerin ortalama çapının, polidispersite ile ilgili ölçüm datalarının kalitesini gösteren kümülant fit raporu Şekil 3.3' de gösterilmektedir.



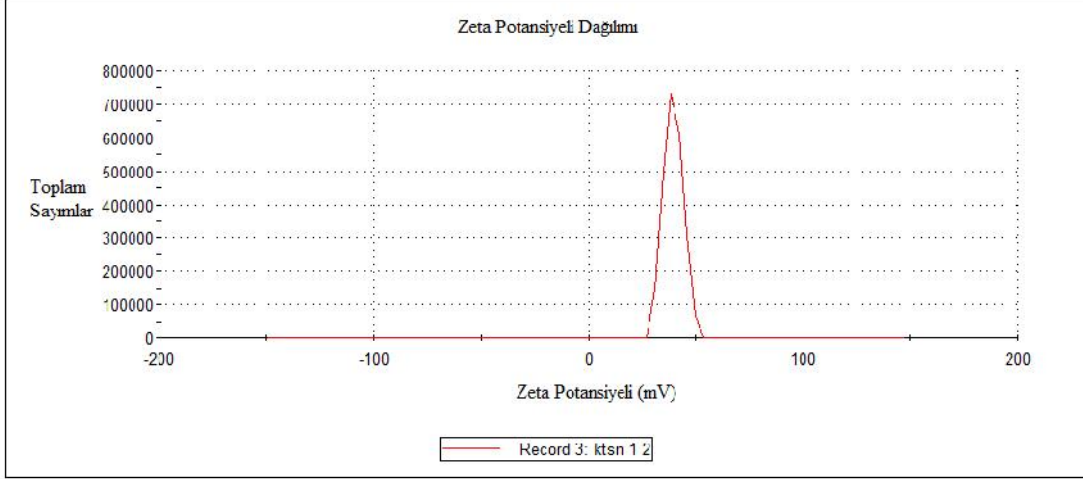
**Şekil 3.5.** Kitosan nanopartiküllerin kimulant fit raporu

Yapılan incelemeler sonucunda kitosan nanopartiküllerin boyut analizlerinin yapılmasını sağlayan SEM, AFM ve Malvern'nin Nano-ZS ZetaSizer cihazı sonuçlarının birbirini desteklediği tespit edildi.

Nanopartiküllerin Zeta yükü olarak ifade edilen Zeta potansiyeli koloidal parçacıklar arasındaki etkileşimin iyi bir göstergesi olup koloidal sistemlerin kararlılığını değerlendirmek için kullanılır. Sunulan çalışmada sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin kararlılığının belirlenmesini sağlayan Zeta potansiyeli ölçümü Malvern'nin Nano-ZS ZetaSizer cihazı kullanılarak yapıldı. Nanopartiküllerin ölçümler sonucunda elde edilen Zeta potansiyelinin + 30 mV' tan büyük - 30 mV' tan ise küçük potansiyele sahip olması onların kararlı olduklarının bir göstergesidir. Kitosan nanopartiküllerin Zeta potansiyeli Şekil 3.6. da gösterildiği gibi + 39,5 mV olarak bulundu ve kararlı olduğu tespit edildi.

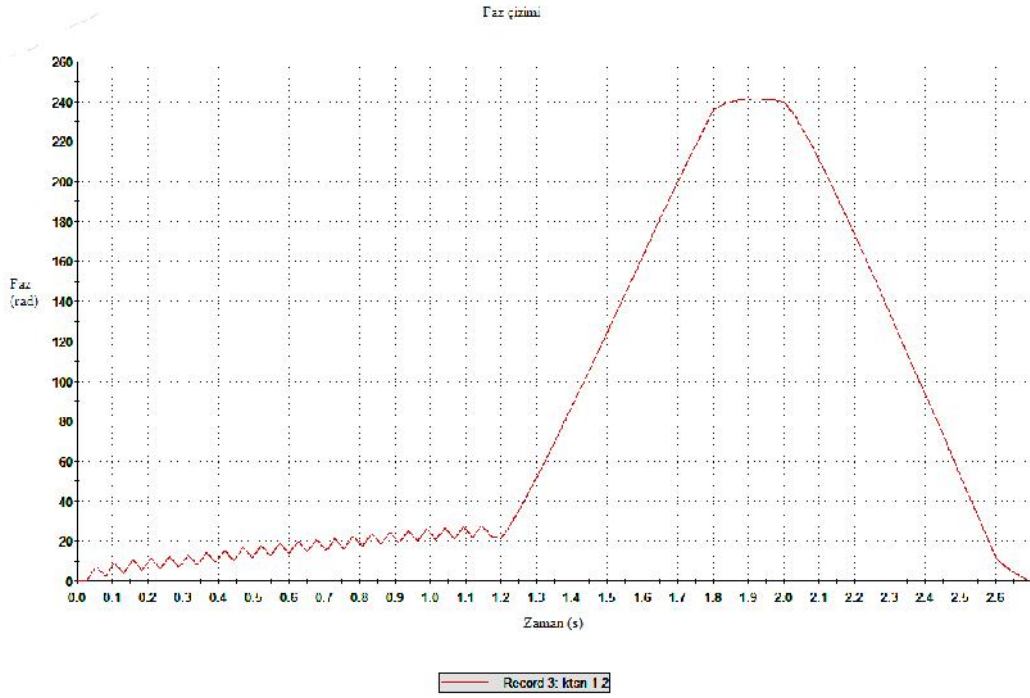
	Oran (mV)	Alan (%)	Genişlik (mV)
<b>Zeta Potential (mV): 39,5</b>	<b>Peak 1: 39,5</b>	<b>100,0</b>	<b>4,47</b>
<b>Zeta Deviation (mV): 4,47</b>	<b>Peak 2: 0,00</b>	<b>0,0</b>	<b>0,00</b>
<b>Conductivity (mS/cm): 4,61</b>	<b>Peak 3: 0,00</b>	<b>0,0</b>	<b>0,00</b>

**Result quality : Good**



**Şekil 3.6.** Kitosan nanopartiküllerin Zeta potansiyeli

Kitosan nanopartiküllerin Zeta potansiyeli ile eş zamanlı olarak yapılan Zeta potansiyeli faz grafiği ise Şekil 3.7' de gösterilmektedir.

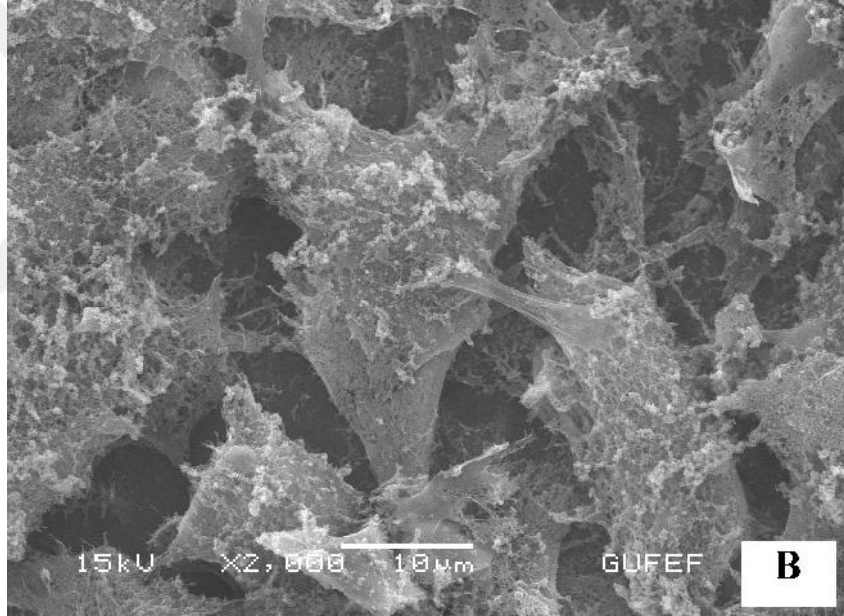
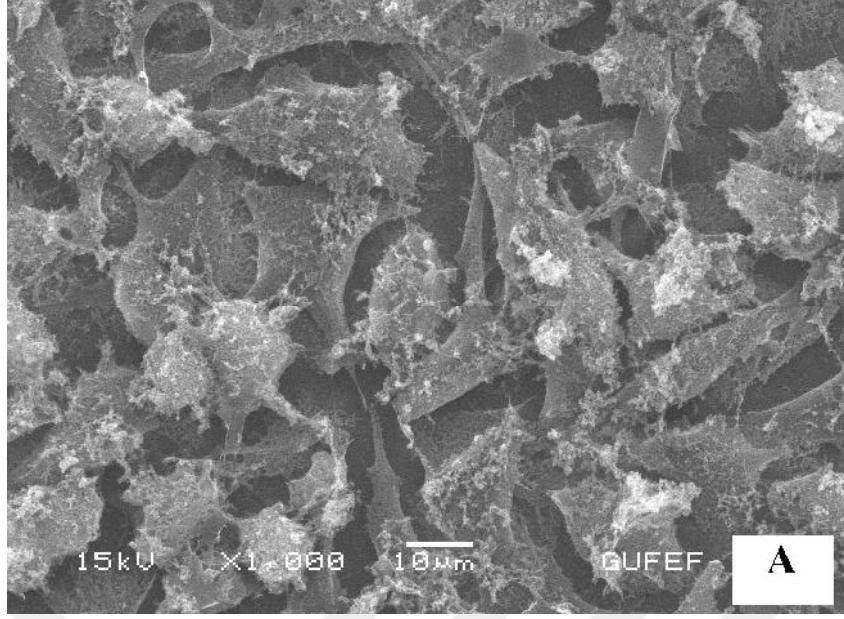


**Şekil 3.7.** Kitosan nanopartiküllerinin Zeta potansiyeli faz grafiği

Ölçümlerimiz sonucunda Zeta potansiyelinin + 39,5 mV olması, ölçüm sırasında süspansiyon içerisindeki bütün nanopartiküllerin birbirini itme eğilimi içerisinde olduğununun yanısıra nanopartiküllerin bir araya gelmesini sağlayan bir eğilim bulunmadığını ve dağılma kararlılığının olduğunu göstermektedir.

### **3.2. Kitosan Nanopartiküllerin Hücre Yüzeyi İle Etkileşimi**

Sunulan çalışmada amin grubuna sahip kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücre hattına uygulandı. Bu uygulama sonucunda amin gruplarından dolayı pozitif yüke sahip olan kitosan nanopartiküllerinin negatif yüke sahip hücre yüzeyi ile etkileşime geçerek HeLa kanser hücre membranına tutundukları ve membran üzerinde parçalandıkları Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) tekniği ile tespit edildi. İncelemede elde edilen sonuç Şekil 3.8’ de SEM ile alınan görüntülerde gösterilmektedir.

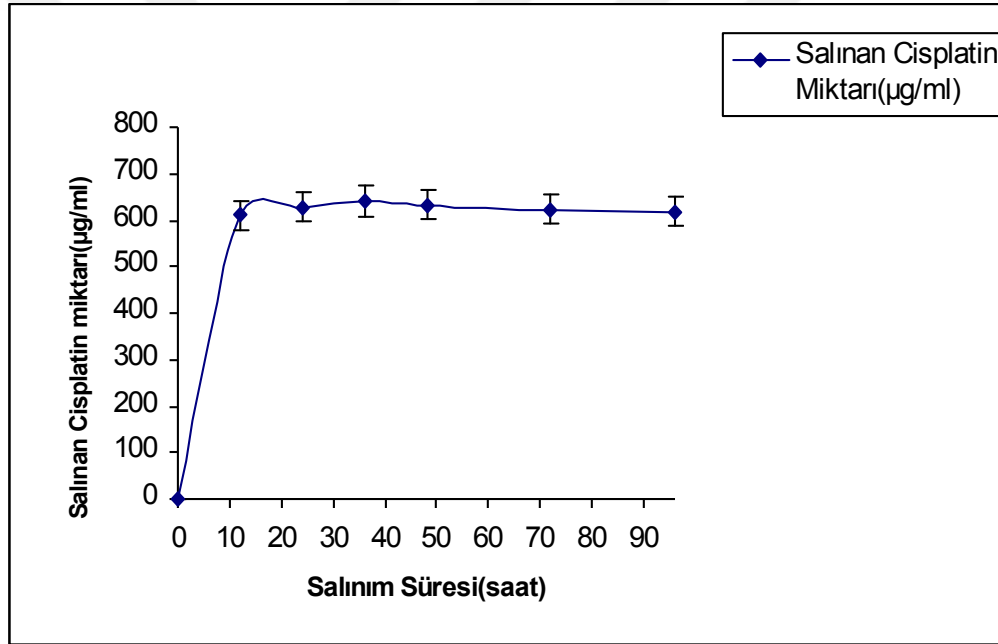


**Şekil 3.8.** A ve B şekillerindeki kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücre membranına tutunduğunu gösteren Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) fotoğrafı

### 3.3. Sisplatin (CDDP) Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinden Sisplatin Salınım

#### Analizi

Sunulan çalışmada 100-200 nm arasındaki boyutlarda sentezlenen ve daha sonra liyofilize edilen kitosan nanopartiküllerinden 100 mg alınarak 2,5 mg/ml sisplatin (CDDP) yüklenmiş ve belirli zaman aralıklarında (12, 24, 48, 72, 96 saat) nanopartiküllerden sisplatin salınımı takip edilmiştir. Kitosan nanopartiküllerine yüklü olan sisplatinin (CDDP) zamana göre salınımını tespit etmek amacıyla Graphite furnace-atomic adsorption spectrometer (GF-AAS) cihazı kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.9' da sunulmuştur.



Şekil 3.9. Kitosan nanopartiküllerinden sisplatin salınım profili

12 saate sisplatinin çoğu salındı. Toplam geçen süre sonunda salınım miktarında 12 saatten sonra farklı bir değişiklik gözlenmemiştir.



### **3.4. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Kanser Hücre Hattındaki Toksik Etki Sonuçları**

Sunulan bu çalışmada kitosan nanopartiküllerinin, etken bir madde olan sisplatinin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygulandığı HeLa kanser hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi WST-1 metodu ile belirlenmiştir.

Bölüm 2.9' da belirtilen prosedüre göre yapılan WST-1 metodu formazan boyası içerisinde tetrazolyum tuzlarının enzimatik redüksiyonunu içermektedir. Yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmemektedir. Pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' li medium, negatif kontrol olarak sadece medium, hücrelere uygulanmıştır. Kitosan nanopartiküllerin, sisplatinin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin toksik etkisi bölüm 2.9' da verilen formüle göre hesaplanmıştır.

Kitosan nanopartiküllerinin, sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücreleri ile etkileştirilmesi sonucunda hücre canlılığını belirten veriler ve her uygulamaya ait HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubunun canlılığını belirten veriler çizelge 3.1, çizelge 3.2 ve çizelge 3.3' de gösterilmiştir.

WST-1 sitotoksosite sonuçlarına göre HeLa kanser hücrelerinin kontrol gruplarında yüksek oranda canlılığın korunduğu tespit edilmiştir. Her türlü uygulama için ortak olarak bulunan sonuç HeLa kanser hücrelerine uygulanan kitosan nanopartiküllerinin, sisplatinin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin dozu arttıkça hücrelerin canlılığının kontrol grubuna göre azalmasıdır.

**Çizelge 3.1.** Kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	<b>Kitosan Nanopartikül Miktarı (µg/ml)</b>	<b>Canlı Hücre Yüzdesi (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	99,96±1
<b>Kitosan Nanopartikülü</b>	7,5	99,60±1
	15	98,3±2
	30	93,4±2
	50	90,7±2
	75	88,12±2
	100	85,67±2

Sunulan çalışmada ilk olarak kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi incelenmiş ve WST – 1 metoduna göre elde edilen veriler çizelge 3.1’de sunulmuştur. Elde edilen verilere göre HeLa kanser hücre hattına ait kontrol grubunun canlı hücre yüzdesinin % 99,96±1 olduğu tespit edildi. Kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi incelendiğinde ise 7,5 µg/ml miktardaki kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücreleri üzerindeki canlılık yüzdesi % 99,96±1 iken 100 µg/ml kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki canlılık yüzdesinin % 85,67±2 olduğu bulunmuştur. Canlı hücre yüzdesi ilk uygulanan miktardan son uygulanan miktara kadar incelendiğinde kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücreleri üzerinde yarattığı sitotoksik etkinin kontrol grubuna göre yok denilecek kadar az olduğu ve hücrelerin canlılığını koruduğu gözlenmiştir.

**Çizelge 3.2.** Sisplatinin HeLa kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	<b>Sisplatin Miktarı (µg/ml)</b>	<b>Canlı Hücre Yüzdesi (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	98,78±1
<b>Sisplatin</b>	7,5	69,2±2
	15	42,32±4
	30	31,23±4
	50	20,64±5
	75	9,85±6
	100	3,19±3

İkinci aşamada etken madde olarak kullanılan sisplatinin sitotoksik etkisinin inceleneceği kanser grubu olan HeLa kanser hücre hattına ait kontrol grubunun canlı hücre yüzdesinin % 98,78±1 olduğu tespit edildi. HeLa kanser hücrelerine uygulanan sisplatin dozunun 7,5 µg/ml olduğu durumda kontrol grubuna göre canlı hücre yüzdesinin belirgin bir şekilde azaldığı ve % 69,2±2 olduğu bulunmuştur. HeLa kanser hücrelerine 100 µg/ml dozda uygulanan sisplatinin ise kontrol grubuna göre yüksek derecede hücre canlılığını azalttığı ve % 3,19±3 olduğu bulunmuştur. Bu durumda HeLa kanser hücrelerine uygulanan sisplatinin dozu arttıkça antitümöral etkisinden dolayı yaklaşık olarak hücre canlılığınının 7,5 µg/ml dozda uygulanan sisplatinde % 29 oranında azalttığı, 100 µg/ml dozunda uygulanan sisplatinin ise % 95 oranında azalttığı gözlenmiştir.

**Çizelge 3.3.** Sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

	<b>Kitosan Nanopartikülüne Yüklü Sisplatin Miktarı (µg)</b>	<b>Canlı Hücre Yüzdesi (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	99,54±1
<b>Kitosan Nanopartikülü - Sisplatin</b>	7,5	74,61±3
	15	49,3±4
	30	37,2±2
	50	28,34±3
	75	21,67±2
	100	13,86±2

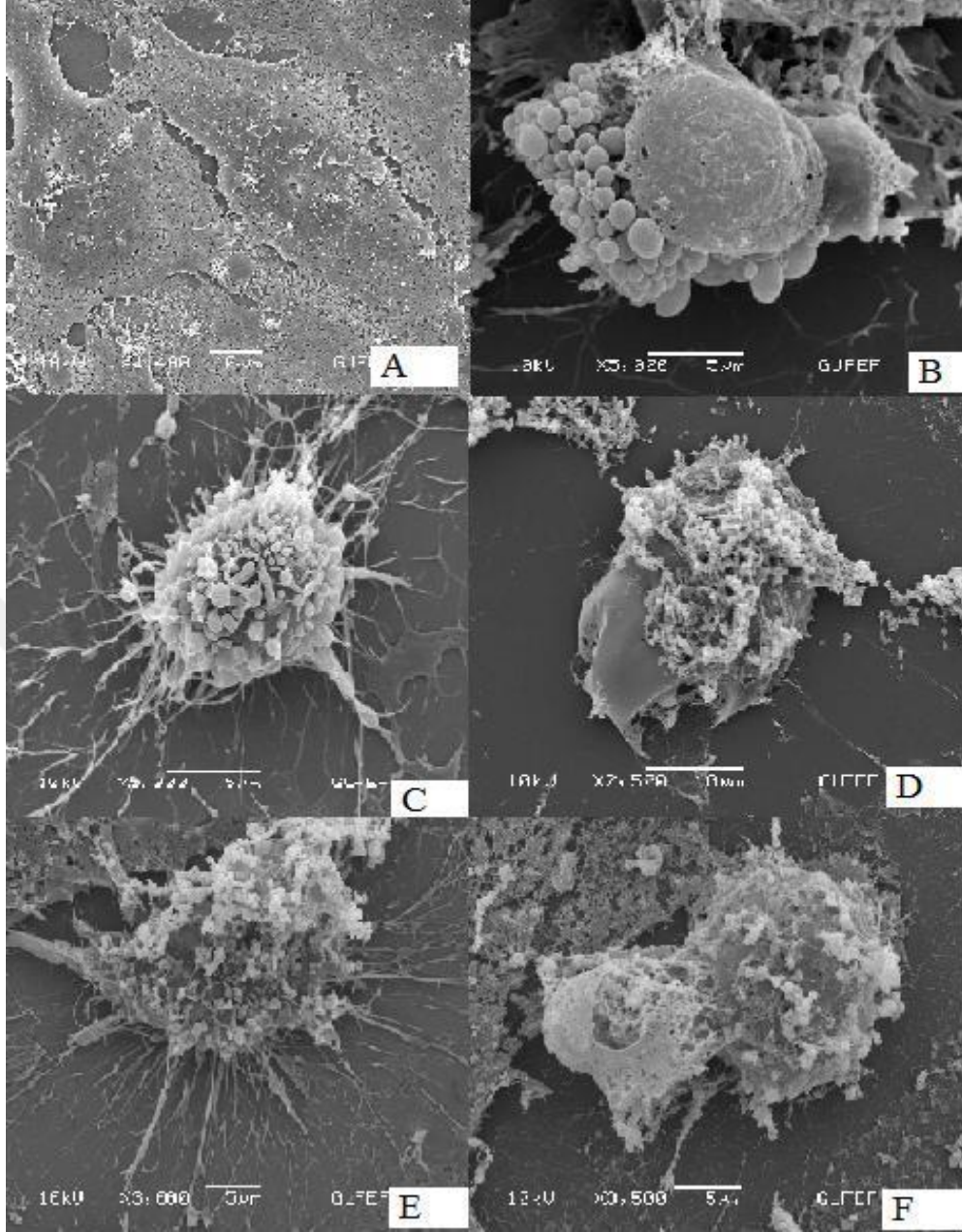
Üçüncü aşamada ise sisplatin yüklenen kitosan nanopartiküllerin sitotoksik etkisinin inceleneceği kanser grubu olan HeLa kanser hücre hattına ait kontrol grubundaki hücrelerin canlılığının korunduğu ve canlılık yüzdesinin % 99,54±1 olduğu tespit edilmiştir. HeLa kanser hücrelerine uygulanan sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerine yüklenen sisplatin dozunun 7,5 µg/ml olduğu uygulamada HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubuna göre canlılığın azaldığı ve canlı hücre yüzdesinin % 74,61±3 olduğu tespit edilmiştir. Fakat HeLa kanser hücrelerinin canlılığının aynı dozda sadece sisplatin uygulanan miktara göre % 4,63 oranında arttığı tespit edilmiştir. HeLa kanser hücrelerine uygulanan sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerine yüklenen sisplatin dozunun 100 µg/ml olduğu uygulamada ise HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubuna göre hücre canlılığını azalttığı ve canlı hücre yüzdesinin % 13,86±2 olduğu tespit edilmiştir. Fakat sisplatin yüklenerek uygulanan kitosan nanopartiküllerin aynı dozda sisplatin uygulanan HeLa kanser hücrelerinin canlılığının göre % 10 oranında arttığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre sadece kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi çok düşük miktarlarda bulunmuştur. Sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri ile sadece sisplatinin (CDDP) uygulandığı HeLa kanser hücrelerinde ise sitotoksik etkinin birbirine yakın bulunduğu çok az farkla sisplatinin toksik etkisinin fazla olduğu gözlenmiştir.

### **3.5. Sisplatin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin HeLa Kanser Hücre Hattındaki Apoptotik Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İle Gösterilmesi**

HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubunun morfolojik durumu, sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin farklı dozlarının HeLa kanser hücreleri üzerinde yarattığı apoptotik etki ve buna bağlı olarak hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler SEM ile tespit edilmiş ve Şekil 3.10’ da resimlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubunda apoptoza çok fazla rastlanılmamıştır. Fakat sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin artan dozuna bağlı olarak apoptoz ve buna bağlı olarak hücrede meydana gelen küçük cepcikler “membrane blebs” leri belirgin bir şekilde fark edilmektedir. Kanseri hücrelerinde metabolik aktivite arttığı için sitoplazma ve çekirdekte değişiklikler görülür. Hücre çekirdeğindeki genetik materyalin artması önemli bir bulgudur. Hücre tipinin değişmesi, sitoplazmadaki azalma, duvar düzensizlikleri diğer yapısal değişikliklerdir.

Şekil 3.10 incelendiğinde HeLa kanser hücrelerine ait kontrol grubunun normal hücreye göre morfolojik yapısının farklı olduğu ve kanser hücrelerinin çekirdeğindeki genetik materyalin artmasının sebep olduğu normal hücre çekirdeğine göre büyük bir çekirdeğe ve sitoplazmanın azalmasından doğan duvar düzensizliklerine sahip olduğu anlaşılmaktadır. 50 µg/ml’ dan 1000 µg/ml doza kadar sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygulandığı HeLa kanser hücrelerinin görüntüsüne bakıldığında, artan sisplatin dozuna bağlı olarak HeLa kanser hücrelerinde apoptozun arttığı ve buna bağlı olarak hücre membranında “bleb” yani cepciklerin oluştuğu gözlenmektedir. Apoptotik hücrelerin membranında meydana gelen bu cepcikler içlerine sitoplazma, sıkıca paketlenmiş organelleri ve bazı durumlardada çekirdek parçalarını alarak hücreden ayrılır. Bu sayede makrofajlar tarafından normal hücrelerden kolayca ayırt edilerek yok edilir. Bu morfolojik değişikliğin en düşük sisplatin dozu olan 50 µg/ml’ de apoptotik oluşuma yol açtığı ve en yüksek sisplatin dozu olan 1000 µg/ml’ de ise cepciklerin daha çok arttığı ve hücrenin membran düzeninin daha fazla bozulduğu gözlenmektedir.



**Şekil 3.10.** Farklı dozlarda sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini gösteren Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) görüntüsü **A)** Normal kontrol grubu, **B)** 50 µg/ml sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri uygulanmış, **C)** 100 µg/ml sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri uygulanmış, **D)** 250 µg/ml sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri uygulanmış, **E)** 500 µg/ml sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri uygulanmış, **F)** 1000 µg/ml sisplatin yüklü kitosan nanopartikülleri uygulanmış HeLa kanser hücrelerinde apoptoz

### 3.6. Kaspaz 3 İmmünohistokimyasal Boyama ve İkili Boyama Sonuçları

Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin gösterilmesi için iki farklı metod kullanılmıştır. HeLa kanser hücrelerinin Kaspaz 3 immünohistokimyasal metod ve ikili boyama metodu yardımıyla apoptotik hücreler gösterilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Farklı dozlarda sisplatinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasıyla oluşan apoptotik indeks

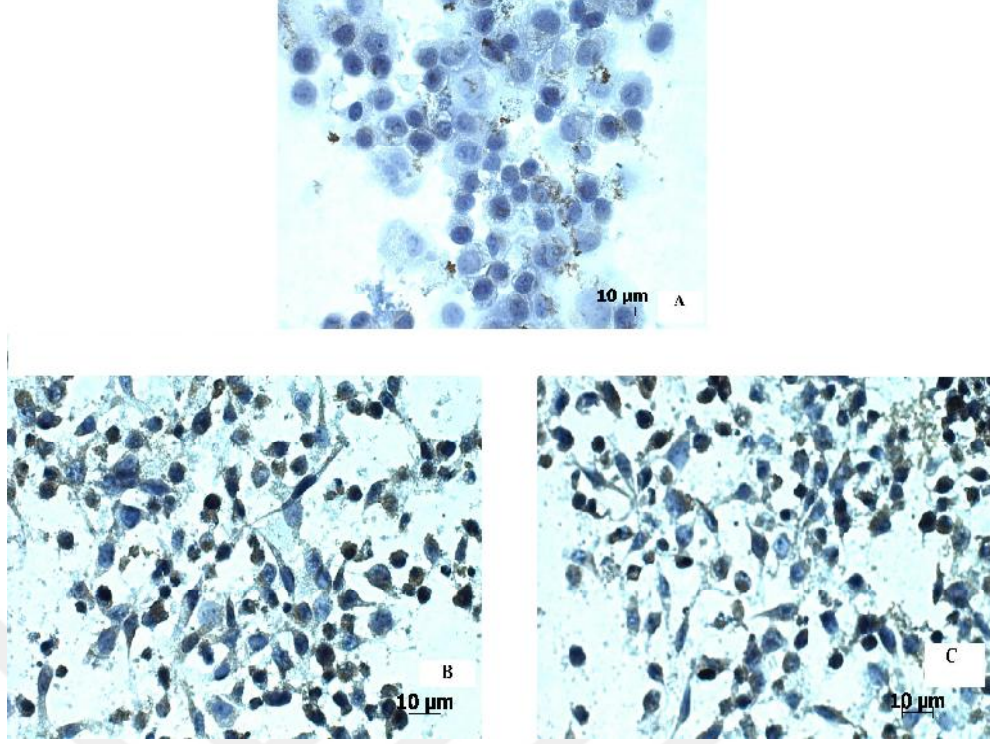
	<b>Sisplatin Miktarı (µg/ml)</b>	<b>Kaspaz 3 Apoptotik İndeks (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	5±1
<b>Sisplatin</b>	7,5	29±3
	15	42±2
	30	45±2
	50	58±4
	75	60±5

**Çizelge 3.5.** Farklı dozlarda sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasıyla oluşan apoptotik indeks

	<b>Kitosan Nanopartikülüne Yüklü Sisplatin Miktarı (µg)</b>	<b>Kaspaz 3 Apoptotik İndeks (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	5±1
<b>Kitosan Nanopartikülü - Sisplatin</b>	7,5	21±1
	15	30±2
	30	58±3
	50	52±5
	75	53±4

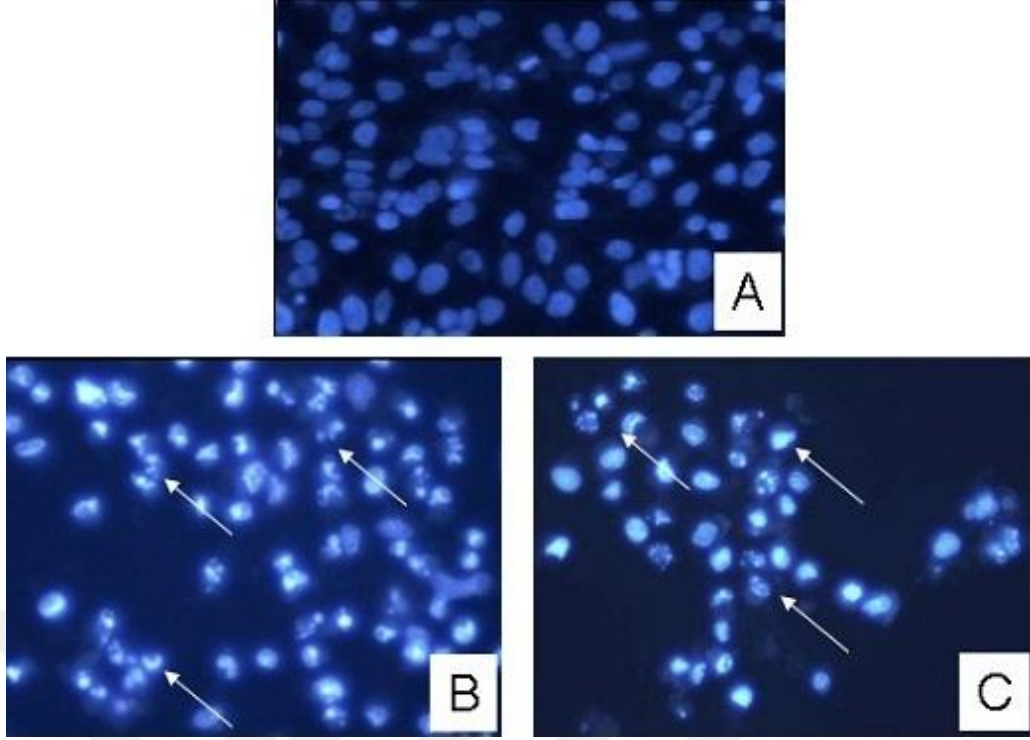
Çizelge 3.4 ve çizelge 3.5’ de gösterildiği gibi çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasının ardından sırasıyla Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyama ve ikili boyama metodu sonucunda elde edilen apoptotik hücrelerin görüntüsü şekil 3.11 ve şekil 13.12’ de gösterilmiştir. Kaspaz 3 antikorunu kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda apoptoza uğramış hücrelerin sitoplazmaları kahverengi boyanırken, apoptoza uğramayan hücrelerin sitoplazmaları ise mavi-mor renkte görülmektedir. İkili boyama metodunda ise ikili boyama solüsyonu içerisinde bulunan hoest (33342) floresan boyası DNA’ ya bağlanarak mavi floresan ışık altında hücre çekirdeklerinin mavi renge boyanmasını sağlar. Apoptotik hücre çekirdekleri parçalanmış, diğerlerinden daha parlak mavi renkte ve çekirdek sınırlarının bozulması gibi özellikleriyle diğer apoptoza uğramayan ve soluk mavi renk çekirdeğe sahip olan kanser hücrelerinden ayırt edilebilir.





**Şekil 3.11.** Kaspaz 3 antikorunu kullanılarak immünohistokimyasal metot ile boyanmış apoptotik HeLa hücrelerinin fotoğrafları (A) Normal kontrol grubu, (B) 50 µg/ml konsantrasyondaki sisplatinin uygulandığı HeLa hücrelerinin fotoğrafı, (C) 50 µg sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa hücrelerinin fotoğrafı

Kaspaz 3 antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre kontrol grubunda apoptoza çok fazla rastlanmamıştır. Belirli dozlarda tek başına sisplatin uygulanan HeLa kanser hücrelerindeki apoptotik indeksin, sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerine göre yüksek olduğu bulunmuştur. Sisplatinin düşük ve yüksek dozlarının uygulandığı HeLa kanser hücrelerindeki apoptotik indeksler sırasıyla 7.5 µg/ml dozda % 29±3, 75 µg/ml dozda ise % 60±5 olduğu elde edilmiştir. 7.5 µg ve 75 µg sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa kanser hücrelerindeki apoptotik indeksler sırasıyla % 21±1 ve % 53±4 olduğu elde edilmiştir.



**Şekil 3.12.** İkili boyama metoduyla elde edilmiş apoptotik HeLa hücrelerinin fotoğrafları **A)** Normal kontrol grubu, **B)** 30 µg/ml konsantrasyondaki sisplatinin uygulandığı HeLa hücrelerinin fotoğrafı, **C)** 30 µg sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa hücrelerinin fotoğrafı

İkili boyamadan elde edilen apoptotik indeks sonuçlarına göre HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubunda apoptoza rastlanılmamıştır. 30 µg/ml sisplatin uygulanan hücreler üzerindeki apoptotik etkinin kaspaz 3 ile paralel olduğu, 30 µg sisplatindeki apoptotik indeksin ise kitosan nanopartiküllerine yüklü sisplatinden fazla olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kaspaz 3 immünohistokimyasal boyama ve ikili boyama sonuçları birbirlerine yakın elde edilmiştir. Sisplatin tek başına kullanıldığında apoptotik etkisinin sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerine göre yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

### 3.6.1. Nekrotik İndeks Sonuçları

Kitosan nanopartikülleri, sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa kanser hücreleri ikili boyama solüsyonu içerisinde bulunan propodium iyodid floresan boyası ile boyandığında nekroza uğramış hücrelerin çekirdekleri kırmızı floresan ve yeşil floresan ışık altında kırmızı olarak görülmekte olup hücrelerin nekroza uğradığını göstermektedir. İkili boyama metoduyla boyanan HeLa kanser hücrelerinin nekrotik indeksi sırasıyla çizelge 3.6, 3.7 ve 3.9' da, nekroza uğrayan HeLa kanser hücrelerinin fotoğrafları Şekil 3.13' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Farklı dozlarda kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasıyla oluşan nekrotik indeks

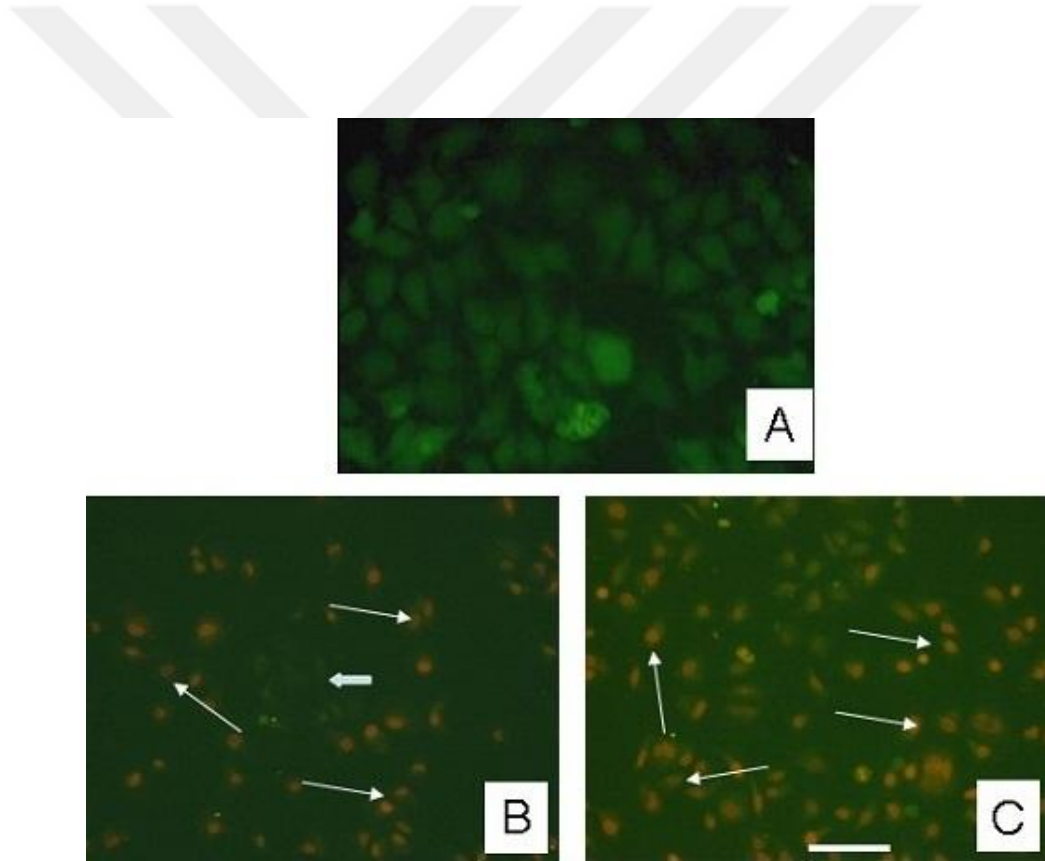
	<b>Kitosan Nanopartikül Miktarı (µg/ml)</b>	<b>Nekrotik indeks (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	1±1
<b>Kitosan Nanopartikülü</b>	7,5	2±1
	15	3,7±2
	30	5,2±2
	50	8,4±2
	75	11,3±2

**Çizelge 3.7.** Farklı dozlarda sisplatinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasıyla oluşan nekrotik indeks

	<b>Sisplatin miktarı (µg/ml)</b>	<b>Nekrotik indeks (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	2±1
<b>Sisplatin</b>	7,5	21,8±2
	15	33,3±2
	30	44,6±2
	50	56,5±3
	75	64,2±3

**Çizelge 3.8.** Farklı dozlarda sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasıyla oluşan nekrotik indeks

	<b>Kitosan Nanopartikülüne Yüklü Sisplatin Miktarı (µg)</b>	<b>Nekrotik indeks (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	3±1
<b>Kitosan Naopartikül – Sisplatin</b>	7,5	16,4±2
	15	28,5±2
	30	39,8±2
	50	52,2±2
	75	60,3±2



**Şekil 3.13.** İkili boyama metodu ile boyanmış nekrotik HeLa hücrelerinin fotoğrafları  
A) Normal kontrol grubu, B) 30 µg/ml konsantrasyondaki sisplatinin uygulandığı nekrotik HeLa hücrelerinin fotoğrafı, C) 30 µg sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı nekrotik HeLa hücrelerinin fotoğrafı

İkili boyama metoduyla yapılan boyama sonucunda elde edilen nekroz sonuçlarına göre kontrol grubunda nekroza çok fazla rastlanılmamıştır. Sadece kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki nekrotik etki 7.5 µg/ml konsantrasyonda % 2 iken, 75 µg/ml konsantrasyonda oluşturduğu nekrotik indeks % 11,3 olarak bulunmuştur. 7,5 µg/ml sisplatinin uygulandığı HeLa hücrelerindeki nekrotik indeks % 21,8, 75 µg/ml sisplatinin yarattığı nekrotik indeks ise % 64.2 olarak bulunmuştur. 7.5 µg/ml sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa kanser hücrelerindeki nekrotik indeks yaklaşık olarak % 16,4 iken, 75 µg/ml konsantrasyondaki sisplatinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki nekrotik indeksi % 60,3 olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; sadece kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin olmamasıyla beraber nekrotik etkisine de rastlanılmamıştır. Sisplatinin sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllere göre nekrotik etkisinin fazla olduğu gözlenmiştir.

### 3.7. GST pi (Glutasyon-S-Transferaz pi) İzoziminin HeLa Kanser Hücrelerindeki Ekspresyonu

Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin farklı dozlarda uygulandığı HeLa kanser hücreleri üzerindeki etkisine GST pi antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama metodu ile bakılmıştır.

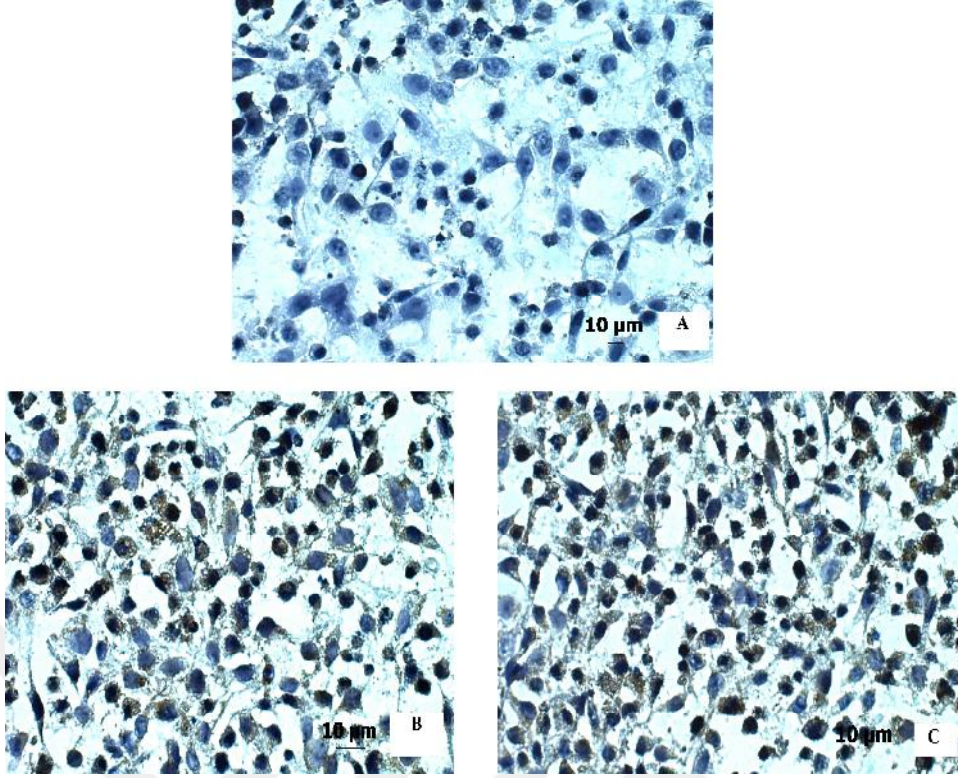
**Çizelge 3.9.** Farklı dozlarda sisplatinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasıyla oluşan GST pi ekspresyonu

	Sisplatin Miktarı (µg/ml)	GST pi Ekspresyonu (%)
<b>Kontrol</b>	—	10±1
<b>Sisplatin</b>	7,5	61±3
	15	38±4
	30	68±3
	50	67±2
	75	10±5

**Çizelge 3.10.** Farklı dozlarda sislpatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasıyla oluşan GST pi ekspresyonu

	<b>Kitosan Nanopartikülüne Yüklü Sislpatin Miktarı (µg)</b>	<b>GST pi Ekspresyonu (%)</b>
<b>Kontrol</b>	—	10±1
<b>Sislpatin</b>	7,5	69±1
	15	75±3
	30	39±2
	50	60±3
	75	63±2

Çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan sislpatin ve sislpatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasının ardından GST pi immünohistokimyasal boyama metodu sonucunda elde edilen GST pi ekspresyonları sırasıyla çizelge 3.9 ve çizelge 3.10’ da, hücrelerin görüntüsü Şekil 3.14’ de gösterilmiştir. GST pi antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda GST pi ekspresyonu olan hücrelerin sitoplazmaları kahverengi boyanırken, GST pi ekspresyonu olmayan hücrelerin sitoplazmaları ise mavi-mor renkte görülmektedir.



**Şekil 3.14.** GST pi antikoru kullanılarak immünsitokimyasal metot ile boyanmış HeLa hücrelerinin fotoğrafları **A)** Normal kontrol grubu, **B)** 50 µg/ml konsantrasyondaki sisplatinin uygulandığı HeLa hücrelerinin fotoğrafı, **C)** 50 µg sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa hücrelerinin fotoğrafı

Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna bakıldığında hücrelerin sisplatine karşı dirençli bir hücre olmadıkları elde edilmiştir. Sisplatin dozunun artırılması ile hücrelerde GST pi ekspresyonu artırmıştır. 7.5 µg/ml ve 75 µg/ml sisplatin uygulanan HeLa kanser hücrelerindeki GST pi ekspresyonları sırasıyla % 61±3 ve % 10±5 elde edilmiştir. 7,5 µg ve 75 µg sisplatin yüklenen kitosan nanopartiküllerinin uygulandığı HeLa kanser hücrelerindeki GST pi ekspresyonları sırasıyla % 69±1 ve % 63±2 olarak elde edilmiştir. Sadece sisplatin uygulanan HeLa kanser hücrelerinde GST pi ekspresyonunun, sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

### 3.8. İstatistiksel Analiz

Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulanmasının ardından HeLa kanser hücrelerindeki kaspaz 3 ve GST pi ekspresyonlarının her iki grup arasında anlamlı farkın olup olmadığı, nitel verilerle dağılımın normal olmadığı ve denek sayısının 30'dan küçük olduğu nicel veriler için uygulanan Mann-whitney U testi yapılarak bulundu.

Her iki grup için Kaspaz 3 ekspresyonu yüzdesine göre yapılan Mann-whitney U testi istatistiksel analiz sonuçlarında  $p(0,748) > 0,05$  olduğu için fark bulunamamış ve elde edilen istatistiksel veriler çizelge 3.11' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.11.** Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerini içeren her iki grubun kaspaz 3 ekspresyonu için Mann-whitney U testi sonuçları

Grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ort.
Kaspaz 3 1,00	18	39,8333	19,42482	4,57847
2,00	18	36,0000	19,67979	4,63857

Test İstatistikleri <sup>b</sup>	
	Kaspaz 3
Mann-Whitney U	16,000
Wilcoxon W	37,000
Z	-,321
Asymp. Sig. (2-tailed)	,748
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818 <sup>a</sup>
a. Bütünü için doğrulamadı	
b. Mevcut Grup: grup	

Her iki grup için GST pi ekspresyonu yüzdelere göre yapılan Mann-whitney U testi sonuçlarında  $p(0,42) > 0,05$  olduğundan bu iki grup arasında fark bulunamamıştır. Analiz sonucunda elde edilen veriler çizelge 3.12' de gösterilmiştir.



**Çizelge 3.12.** Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerini içeren her iki grubun GST pi ekspresyonu için Mann-whitney U testi sonuçları

Test İstatistikleri <sup>b</sup>	
	GST pi
Mann-Whitney U	13, 000
Wilcoxon W	34, 000
Z	-, 806
Asymp. Sig. (2-tailed)	, 420
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	, 485 <sup>a</sup>
a. Bütünü için doğrulamadı	
b. Mevcut Grup: VAR00007	

		Dereceler	
VAR0007	N	Ortalama Derece	Top. Derece
VAR0006 1, 00	6	5, 67	34, 00
2, 00	6	7, 33	44, 00
Total	12		

Sisplatin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve sisplatin ( $\mu\text{g}$ ) yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasının ardından yapılan immünohistokimya boyama sonuçlarından elde edilen her iki grup için kaspaz 3 ve GST pi ekspresyonlarının yüzdesine göre Komogorav-Smirnov Uyum iyiliği testi yapılarak normal dağılıma sahip olup olmadığı, dağılımın normal ve varyansların eşit olduğu durumlarda uygulanan T-Testi ile bulundu.

**Çizelge 3.13.** Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerini içeren her iki grubun kaspaz 3 ekspresyonu için grup istatistikleri

Grup		İstatistikleri		
Grup	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ort.
Kaspaz 3	1,00	39, 8333	19, 42482	4, 57847
	2,00	36, 0000	19, 67979	4, 63857

İstatistiksel analiz sonucunda Komogorav-Smirnov Uyum iyiliği testine göre normal dağılıma sahip olduğu bulunan kaspaz 3 ekspresyonu için T-Testi ile istatistiksel analizi yapıldı. Grup istatistik sonuçları çizelge 3.13’ de gösterilmektedir.

Grup istatistikleri incelenerek sisplatin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve sisplatin ( $\mu\text{g}$ ) yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygulandığı HeLa kanser hücrelerinin kaspaz 3 apoptotik indeksine (%) göre ortalama ve standart sapmaları elde edilmiştir.

Sisplatin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve sisplatin ( $\mu\text{g}$ ) yüklü kitosan nanopartikül gruplarının Levene’s test sonucuna göre  $p(0,532) > 0,05$  olduğundan varyansların eşit olduğu varsayılarak grupların kaspaz3 (%) apoptotik indeksine göre karşılaştırmalarında bu iki grup arasında  $p(0,056) > 0,05$  olduğu için fark bulunamamış ve çizelge 3.14’ de gösterilmiştir. Ayrıca bu iki grup için eşanlı güven aralıklarında çizelge 3.14’ de mevcuttur. Varyansların eşit olduğu varsayımı altında bu iki grubun ortalamaları arasındaki farkı içeren aralıklardan biri  $[-9,412; 17,08]$  aralığıdır.

**Çizelge 3.14.** Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerini içeren her iki grubun kaspaz 3 apototik indeksine (%) göre karşılaştırılması

		Varyansların eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitlik için t-test						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama farklılıkla	Std. hata farklılıkları	%95 lik güvenilirlik düzeyi	
									En düşük	En yüksek
Kaspaz -3	Kabul edilen eşit varyanslar	,399	,532	,588	34	,560	3,83333	6,51757	9,412	17,08
	Kabul edilmeyen eşit varyanslar			,588	33,994	,560	3,83333	6, 51757	9,412	17,08

İstatistiksel analiz sonucunda Komogorav-Smirnov Uyum iyiliği testine göre normal dağılıma sahip olduğu bulunan GST pi ekspresyonu için T-Testi ile istatistiksel analizi yapıldı ve grup istatistik sonuçları çizelge 3.15' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.15.** Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerini içeren her iki grubun GST pi ekspresyonu için grup istatistikleri

Grup İstatistikleri					
Grup		N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ort.
GST pi	1,00	18	42,33	25,786	6,078
	2,00	18	52,67	22,824	5,380

Grup istatistikleri incelenerek sisplatin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve sisplatin ( $\mu\text{g}$ ) yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygulandığı HeLa kanser hücrelerinin GST pi ekspresyonuna (%) göre ortalama ve standart sapmaları elde edilmiştir.

Sisplatin ( $\mu\text{g/ml}$ ) ve sisplatin ( $\mu\text{g}$ ) yüklü kitosan nanopartikülü içeren her iki grubun Levene's test sonucuna göre  $p (0,532) > 0,05$  olduğundan varyansların eşit olduğu varsayılarak grupların GST pi ekspresyonuna (%) göre karşılaştırmalarında bu iki grup arasında  $p (0,056) > 0,05$  olduğu için fark bulunamamış ve çizelge 3.16' da gösterilmiştir. Ayrıca bu iki grup için eşanlı güven aralıklarında çizelge 3.16' da mevcuttur. Varyansların eşit olduğu varsayımı altında bu iki grubun ortalamaları arasındaki farkı içeren aralıklardan biri  $[-26,83; 6,162]$  aralığıdır.

**Çizelge 3.16.** Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerini içeren her iki grubun GST pi ekspresyonuna (%) göre karşılaştırılması

		Varyansların eşitliği için Levene's Test		Ortalama eşitlik için t-test						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama farklılıklar	Std. hata farklılıkları	%95 lik güvenilirlik düzeyi	
GST pi	Kabul edilen eşit varyanslar	1,271	,267	-1,273	34	,212	-10,333	8,117	26,83	6,162
	Kabul edilmeyen eşit varyanslar			-1,273	33,51	,212	-10,333	8,117	-26,83	6,171

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada; kitosan nanopartikülleri, sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisi ile beraber sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin apoptotik ve nekrotik etkisi ile GST pi ekspresyonu incelenmiştir.

Amin grupları içeren kitosan bir polianyon olan TPP (tripolifosfat) ile muamele edilerek kitosan nanopartikülleri sentezlenmiştir. Kitosan nanopartiküllerin boyutunun Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile incelenmesi sonucunda 100 – 200 nm arasında olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen kitosan nanopartikülleri Zeta sizer cihazı ile Zeta boyut ve Zeta potansiyeli analizi yapılmış sırasıyla ortalama boyutlarının 174 nm, Zeta potansiyelinin ise + 39,5 mV olduğu ve kararlı yapıya sahip oldukları bulunmuştur.

Kitosan nanopartikülleri boş halde HeLa kanser hücrelerine uygulandıktan sonra hücrenin negatif yükünden dolayı pozitif yüklü amin grupları sayesinde hücre yüzeyine tutunduğu SEM ile gösterilmiştir.

Birçok kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan sisplatin kitosan nanopartiküllerine yüklenecek 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlik salınımları graphite furnace-atomic adsorption spectrometer (GF-AAS) ile incelenmiştir. Salınımın ilk 12 saatlik takibinde sisplatinin belirli bir miktarının salındığı sonraki zaman dilimlerinde ise 12 saatlik salınımdan farklı miktarda salınımın olmadığı saptanmıştır.

Kitosan nanopartikülleri, sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi için WST-1 testi kullanılmıştır. Yapılan teste göre HeLa kanser hücrelerine ait kontrol grubunun canlılık yüzdesi % 99,96±1 olarak bulunmuştur. Sentezlenen kitosan nanopartikülleri HeLa kanser hücrelerine uygulanmış ve kitosanın sitotoksik etkisinin yok denilecek kadar az olduğu tespit edilmiştir. En düşük doz olan 7,5 µg/ml’ de canlılık yüzdesi % 99,6±1 iken en yüksek doz olan 75µg/ml’ de canlılık yüzdesi % 85,67±2 olarak elde

edilmiştir. Kemoterapötik bir ilaç olan sisplatinin uygulandığı HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubunun % 98,78±1 canlılık yüzdesi gösterdiği ve sisplatinin uygulandığı hücrelerde en düşük doz olan 7,5 µg/ml' de canlılık yüzdesi % 69,2±2 iken en yüksek doz olan 75 µg/ml' de canlılık yüzdesi % 3,19±3 olarak elde edilmiştir. Artan sisplatin dozu HeLa kanser hücrelerinin canlılık yüzdesinin azalmasına sebep olduğundan doz ile canlılık yüzdesi ters orantılı olarak bulunmuştur. Sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygulandığı HeLa kanser hücrelerinin kontrol grubu % 99,54±1 canlılık yüzdesine sahip olduğu ve en düşük doz olan 7.5 µg/ml' de canlılık yüzdesi % 74,61±3 iken en yüksek doz olan 75µg/ml de canlılık yüzdesi % 13,86±2 olarak elde edilmiştir. Kitosan nanopartiküllere yüklü sisplatinin tek başına uygulanan sisplatinine göre sitotoksik etkisinin yüksek olmadığı bulunmuştur.

HeLa kanser hücrelerin kontrol grubu ve HeLa kanser hücrelerine uygulanan sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin hücreler üzerinde yarattığı apoptotik etki SEM ile incelenmiş ve gösterilmiştir. 50 µg/ml' den 1000 µg/ml' ye kadar uygulanan sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin dozu arttıkça apoptotik etki de artmakta ve hücrelerin morfolojik özelliklerinde doza bağlı artan değişiklikler oluşmaktadır.

Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerinde oluşturduğu apoptotik etki kaspaz 3 immünohistokimyasal boyama ve ikili boyama metodu ile incelenmiştir. Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyama sonucunda elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunda apoptotik indeks % 5±1 elde edilmiştir. HeLa kanser hücrelerine uygulanan sisplatin dozu arttıkça HeLa kanser hücrelerindeki apoptotik indekste artış gözlenmiştir. Sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerine yüklenen sisplatin dozundaki artış sisplatindeki apoptotik etki kadar artış olmasada HeLa kanser hücrelerindeki apoptotik indeks artan dozla beraber artmaktadır. Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasının ardından yapılan diğer bir boyama şekli ise ikili boyama metodudur. Bu boyama metodu ile apoptotik ve nekrotik hücreler incelenmiştir. Apoptotik indeks sonuçları kaspaz 3 immünohistokimyasal boyama ile paralel bulunmuş ve sisplatinin artan dozuyla beraber apoptotik indekste artış olmuştur. Nekrotik indeks sonuçlarına bakıldığında ise HeLa kanser hücreleri kontrol grubunda en yüksek %

3±1 nekrotik indeks saptanmıştır. Sadece sisplatin uygulanan HeLa kanser hücrelerinde en yüksek sisplatin dozunda (75 µg/ml) nekrotik indeks % 64,2±3 iken sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin içerdiği en yüksek sisplatin dozunda (75 µg) ise nekrotik indeks % 60,3±2 olarak gözlenmiştir. Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin nekrotik etkisi arasında pek bir fark olmamasına karşın sisplatin ilk uygulandığı anda kitosan nanopartiküllere yüklü halinde daha hızlı etki etmiş ve HeLa kanser hücrelerini nekroza uğratmıştır.

GST pi immünohistokimyasal boyama ile sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa kanser hücrelerindeki GST pi ekspresyonu incelenmiştir. Kontrol grubunda GST pi ekspresyonuna % 10±1 oranında rastlanılmış ve HeLa kanser hücrelerine farklı dozlarda sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulanmasının ardından yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda kontrol grubuna göre GST pi ekspresyonunda artan sisplatin dozuyla beraber genel bir artış gözlenmiştir.

Son olarak sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin etkisini birbirleriyle kıyaslamak için Mann – whitney U testi ve T-Testini istatistiksel analizi kullanıldı. İstatistiksel anlam P<.0,05 de kuruldu. İstatistiksel sonuca göre Mann – whitney U testine ve T – Testi analizine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Kitosan pek çok avantaja sahip olduğu gibi kitosandan yapılan polimerler pek çok ilacın hapsedilmesinde kullanılmaktadır. Campos ve arkadaşları [104] tarafından yapılan çalışmada kitosan nanopartikülleri sentezlenerek çeşitli konsantrasyonlarda Chang konjektival hücrelerine uygulanmış ve Trypan Blue ile sitotoksik etkisi incelenmiştir. 0,25, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/ml konsantrasyonlarda kitosan nanopartiküllerinin in vitro ortamda uygulanmasının ardından hücre canlılığı (%) sırasıyla % 95,2, % 98,4, % 91,25 ve % 96,15 olarak bulunmuştur. Kitosan nanopartiküllerin toksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Grenha ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada farklı kitosan : TPP (w/w) oranlarında hazırlanan kitosan nanopartikülleri elde edilmiş ve Zetaizer cihazı kullanılarak elde edilen kitosan nanopartiküllerin Zeta boyutuna ve Zeta potansiyeline bakılmıştır. Kitosan ve

TPP oranı 3.6:1, 4:1, 5:1 ve 6:1 (w/w) olduğunda Zeta boyutu 300 – 390 nm ve Zeta potansiyelinin +34 - +45 mV arasında olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar ve yapılan pek çok çalışma kitosan nanopartiküllerin kararlı bir yapıda olduğunu desteklemektedir [114].

Biyoparçalanabilir ve biyoadeziv bir polimer olan kitosan, toksik, iritan ve alerjik değildir [115]. Sunulan çalışmada sentezlenen kitosan nanopartikülleri HeLa kanser hücrelerine uygulanmış ve WST – 1 sitotoksikite testi ile kitosan nanopartiküllerin sitotoksik etkisinin en yüksek doz olan 100 µg/ml de bile HeLa kanser hücrelerinin % 85.67±2 canlılık yüzdesine sahip olduğu bulunmuştur. Sisplatinin antitümör aktivitesinin kromozomal DNA ile etkileşiminden kaynaklandığına inanılır. Bu etkileşimde sisplatin hücrede çekirdek içerisine girerek DNA da kırıklar oluşturmakta ve hücrenin ölümüne yol açmaktadır. Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasının ardından yapılan WST-1 sitotoksikite testinin sonucunda sitotoksik etkisinin artan dozla beraber oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Mattheolabakis ve arkadaşları [116] tarafından yapılan çalışmada PLGA – mPEG nanopartikülleri sentezlenmiş ve sisplatin yüklenerek kolorektal adenokarsinom HT29 hücrelerine uygulanmıştır. Uygulamanın ardından MTT metodu ile sitotoksikitesine bakılmış ve sonuçta serbest sisplatin ve sisplatin yüklü nanopartiküllerin sitotoksik etkisinin sisplatin dozuyla (1 – 12.5 µg/ml) doğru orantılı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir. Cisdiamminedichloroplatinum (II) (CDDP) olarak bilinen sisplatin, DNA sentezinde değişiklikler ve hücre ölümüyle sonuçlanan, DNA'nın nükleofilik bölgelerine bağlanan metal bazlı onkojenik bir ajandır. Tseng ve arkadaşları [117] tarafından yapılan çalışmada jelatin nanopartikülleri (GP) sentezlenmiş ve sisplatin (CDDP) yüklenerek biotinylated-EGF (bEGF) ile modifiye edilerek ve A549 (insan adenokarsinom) ve HFL1 (insan akciğer fibroblast) hücrelerine uygulanmıştır. CDDP, CDDP-GP ve CDDP-GP-bEGF'nin sitotoksik etkisi MTT metodu ile incelenmiştir. Burada hücrelere uygulanan ajanların artan doza bağlı sitotoksik etkisinin serbest sisplatinle benzer olduğu ve sisplatinin sitotoksik etkisinin inkübasyon süresine bağlı olarak arttığını gözlemlemişlerdir.



Sunulan çalışmada kitosan nanopartiküllerine yüklü sisplatin miktarı arttıkça sitotoksik etkide artmış ve HeLa kanser hücrelerinin apoptozuna ve nekrozuna sebep olmuştur. Apoptoz yolağında görev yapan bir enzim olan kaspaz 3 antikoru aracılığıyla immünohistokimyasal boyama yapılarak sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin hücrelerdeki apoptotik etkisine bakılmış ve 7.5 µg/ml – 75 µg/ml arasındaki dozlarda uygulanan sisplatinin artan dozla beraber hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin arttığı ve sitotoksikite ile paralel bir etki gösterdiği elde edilmiştir. Gryparis ve arkadaşları [118] tarafından yapılan çalışmada PLGA – mPEG nanopartiküllerine sisplatin yüklenerek LNCaP prostat kanser hücrelerine uygulanmış ve antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Serbest sisplatinin ve sisplatin yüklü nanopartiküllerin, sisplatin konsantrasyonu arttıkça antitümör aktivitesinde arttığını gözlemlemişlerdir. Moreno ve arkadaşları [119] tarafından yapılan çalışmada bioparçalanabilir laktik asit – glikolik asit kopolimeri (PLGA) kullanılarak mikropartikül ve nanopartiküller sentezlenmiş ve sisplatin yüklenmiştir. Kolon adenokarsinom DHD/K12PROb hücre hattına mikropartikül, nanopartikül ve serbest sisplatin (2.5, 10, 18, 50 ve 100 µM) uygulanarak nötral kırmızı boyası ile hücre canlılığı incelenmiştir. Uygulama sonrasında serbest ve enkapsüle olan sisplatinin farklı konsantrasyonlardaki uygulamalarından sonra kaspaz 3 aktivasyonuna bakılmış ve kaspaz 3 aktivitesinin ilk 10 saatte artmaya başladığı ve doza bağlı olarak farklı zaman aralıklarında artışlar tespit edilmiştir. Serbest sisplatinin düşük dozda ( 2,5 µM ve 10 µM ) sebep olduğu maksimum kaspaz 3 aktivasyonu 72 saatte olurken yüksek dozda (50 µM) 24 saatte gözlenmiştir. Hücrelerde sisplatin dozuna bağlı olarak kısa sürede kaspaz 3 aktivasyonu artırmaktadır. Sisplatin kaspaz sinyal yolağıyla beraber apoptozise sebep olur. Bu yolaktaki reseptörlerden biriside sisplatinin sebep olduğu apoptoziste önemli rol oynayan kaspaz 3' tür. Cummings ve arkadaşları [120] tarafından yapılan çalışmada tavşan renal proksimal tübüler hücrelerine (RPTC) kemoterapötik bir ajan olan sisplatin uygulanmıştır. Hücrelerde sisplatinin sebep olduğu apoptozis sinyalinde P53, kaspaz 3, 8 ve 9, mitokondrinin rolü incelenmiştir. *İn vitro* ortamda RPTC hücrelerine sisplatin uygulanmasının ardından 2. ve 4. saatlerde kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesinde önemli bir artış gözlenirken RPTC hücrelerinin uygulama yapılmayan kontrol grubunda kaspaz aktivitesine rastlanılmamıştır. Kaspaz 3 aktivitesi 8, 12 ve 24. saatlerde sırasıyla 5,4, 12,4 ve 54,7 kat artmıştır. Artan zamana bağlı olarak hücreler üzerinde sisplatinin etkisi artmış ve

buna bağlı olarak kaspaz aktivitesinde artırmıştır. Horky' ve arkadaşları [121] tarafından yapılan çalışmada HeLa kanser hrelerine sisplatin uygulanarak nkleolinin morfolojik değişiklikleri ile TUNEL boyama ve programlı hücre ölümü markırlarının indüksiyonunu karşılaştırmışlar ve sisplatin uygulanan HeLa hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonunu araştırmışlardır. Herhangi bir uygulama yapılmazken HeLa hücrelerinin kaspaz 3 aktivitesi ve TUNEL boyama sonuçları negatif bulunurken, hücelere sisplatin uygulandıktan 6 saat sonra kaspaz 3 aktivasyonu sitoplazmik ve perinükleer kısımda pozitif bulunurken, 12 saat sonra ise TUNEL pozitif bulunmuştur.

Sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerinin HeLa kanser hücrelerine uygulanmalarının ardından antioksidan bir enzim olan GST pi ekspresyonlarına bakılmıştır. Terapötik bir etkiye sahip olan sisplatin GST pi' nin substratı rolündedir. GST enzim ailesinden olan GSTP1-1 kemoterapötik ajanları içeren substratların büyük bir kısmıyla indirgenmiş glutatyon konjugasyonunu katalizler ve bir detoksifikasyon enzimi olarak rol oynar [122]. Hücreye alınan sisplatin çekirdek içerisine girer ve DNA da kırıklar oluşturarak hücreyi lme götürmektedir. Bazı çalışmalara göre, GST pi ekspresyonunun ADR, melfalon, sisplatin, siklofosfamid ve klorambusil gibi antikanser ajanların *in vivo* kanser dokularına verilmesinin ardından terapide meydana gelen dirençli çeşitli hücre hatlarında da yükseldiğini göstermektedir [123]. Sisplatin hücreye girdiği zaman, GST' nin fizyolojik substratı olan sitoplazmik GSH' ın inaktivasyonu hücreyi savunmasız hale getirir. Hücre içerisine sisplatinin alınmasıyla beraber sitozolde eksprese olan GST pi detoksifikasyon enzimi ile birleşerek bir kompleks oluşturur. Kompleks oluşumunun ardından aktif sisplatin miktarı azalır ve hücre yaşamına devam eder. Yapılan bu çalışmada ise sisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin uygulandığı HeLa hücrelerindeki GST pi ekspresyonları araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 7,5 g/ml – 75 g/ml doz aralığında sisplatin miktarının artması GST pi ekspresyonunda artırmıştır. Bu artış sisplatinin hücreye etkisini azaltmıştır. Uygulamaların ardından yapılan WST – 1 sitotoksisite sonuçlarında doza bağlı olarak toksisitenin artması, hücre içerisine alınan sisplatinin etkisinin GST pi izoenzimi ile yeteri kadar azaltılamadığı anlaşılmaktadır. Artan toksisiteyle beraber GST pi ekspresyonunda artmış fakat bu hücrelerin canlılığını yüksek oranda

korumasına yetmemiştir. Bunun yanısıra çoklu reaktif substratların glutatyonla bağlanmasını katalizleyen GST enzim ailesi üyelerinin yüksek ekspresyonu sisplatin tedavisinde düşük yanıt oranı ile ilişkilendirilebilir Goto ve arkadaşları [124] tarafından yapılan çalışmada GSTP1 (GSTpi 1) sisplatin-glutatyon adüktlerin oluşumuyla sisplatin detoksifikasyonunda doğrudan rol oynayarak GSTP1 bu platin bileşenlerine karşı direnç kazanılmasında rol oynar. Son klinik çalışmalar GSTP1' in genotipi ve kemoterapötik ajanların sitotoksitesisi arasında ilişki olduğunu doğrulamıştır. *In vitro* çalışmalar GSTP1' i özellikle platin içeren bileşenlerin detoksifikasyonu ile bağlantılı bulmuştur [125].

Glutatyon; DNA etkileşimini önleyen ve sitoplazmada metal bileşiklerin içerdiği toksik olan fonksiyonel gruplarla birleşerek sisplatin gibi ajanların DNA' ya olan zararlı etkilerine karşı koyan bir tripeptittir. Shiga ve arkadaşları [126] tarafından yapılan çalışmada sisplatine bağlı neoadjuvan kemoterapi alan baş ve boyun kanseri 68 hastadan tedavi öncesi biyopsiler alınarak kemoterapi direnciyle tümör markırların bir serisinin ekspresyonlarını çalışmışlardır. p53, Glutatyon S-Transferaz pi (GSTpi), thymidylate synthase (TS), c-erbB2 ve MDRP (çoklu ilaç direnci proteini) ekspresyonları immünohistokimyasal olarak incelemiş ve GST pi ile TS ekspresyonlarının neoadjuvan tedavi sonrası genel sağkalım azalması ile anlamlı bir ilişki olduğu bulundu. Hastaların % 53' ünde GST pi ekspresyonunun olduğu ve neoadjuvan tedavide kısa genel sağkalım ve yüksek GST pi ekspresyonları arasında önemli bir ilişki olduğunu gözlemlemişlerdir. GST pi neoadjuvan kemoterapi alan hastalara göre hastalığı tekrar nüks eden hastalarda tedaviye yanıtın önemli bir belirleyicisidir. Yapılan bu çalışmada GST pi'nin tedaviye olan yanıtın zayıf belirleyicisi olarak bulmalarına rağmen genel sağkalımla daha güçlü ilişkiye sahip olduğu bulunmuştur. Nishimura ve arkadaşları [127] tarafından yapılan çalışmada baş ve boyun kanserli hastalardan biyopsi ile alınan örneklerin parafin bloklarından GST pi, mü ve alfa izoenzimlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Platinuma bağlı kemoterapi, neoadjuvan kemoterapi ve hastalığın tekrar nüks etmesinden dolayı kemoterapi alan hastalarda yapılan inceleme sonucunda hastaların yanıt oranının GST ile ilişkisine bakmışlardır. Kemoterapi alan hastalarda yüksek GST ekspresyonuna sahip olanların tedaviye yanıt oranının % 19 olmasına rağmen düşük GST ekspresyonunu sahip olanlarda ise % 88 olduğu bulunmuştur. Neoadjuvan

kemoterapi alan hastalarda ise düşük GST ekspresyonlarına sahip hastaların tedaviye yanıt oranının % 100 olmasına rağmen yüksek GST ekspresyonlarına sahip olanlarda ise tedaviye yanıt oranının % 44 olduğunu bulmuşlardır. Hastalığın nüks etmesinden sonra yapılan kemoterapide ise yüksek GST ekspresyonlarına sahip hastaların tedaviye yanıt oranının % 8,6, düşük GST ekspresyonlarına sahip hastaların ise % 70 olduğu bulunmuştur. GST pi, mü ve alfa antikorlarıyla yapılan immünohistokimya boyama sonucunda lezyonlarda mü ve alfa ekspresyonlarının gözlenmesine rağmen sinyalin tümör hücrelerinin geniş bir kısmında GST pi' nin önemli bir destekleyici konumda olduğunu tespit etmişlerdir.

Cisplatin ve sisplatin yüklü kitosan nanopartiküllerin HeLa kanser hücrelerine uygulanmasının ardından immünohistokimyasal boyama aracılığıyla kaspaz 3 ve GST pi arasındaki ilişki incelendiğinde her iki enzimin birbiriyle zıt bir ilişki içerisinde olduğu görülmektedir. Sunulan çalışmada apoptotik indeksin düşük olduğu durumlarda GST pi ekspresyonunun kaspaz 3 ekspresyonundan fazla olduğu elde edilmiştir. Yapılan başka çalışmalar apoptozisin önlenmesinde GST' lerin rolünün olduğunu desteklemiştir. Sonuçlar incelendiğinde GST pi' nin hücrelerdeki ekspresyonunun artması kaspaz 3 aktivitesini yüksek oranda engellemekte ve hücrenin apoptoza uğramasını azaltmaktadır [128]. Elde edilen apoptotik indeksin GST pi ekspresyonlarıyla genelde zıt bir etki gösterdiği görülmektedir. Sisplatin uygulanan HeLa kanser hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonunun artmasıyla beraber GST pi ekspresyonlarında arttığı veya birbirine yakın olduğu durumlar da elde edilmiştir. Çünkü sisplatin dozunun fazla olması kaspaz 3 aktivasyonunu artırmakla beraber GST pi ekspresyonunda artmasına yol açıyor olabilir. Goto ve arkadaşları [129] tarafından yapılan çalışmada HCT8 insan kolonik kanser hücreleri, A549 insan akciğer adenokarsinoma hücreleri ve T98G glioblastoma hücrelerinde sisplatin, irinotekan hidroklorid (CPT-11), etopozid (VP-16) ve 5-florourasil (5-FU) antikanser ilaçların sebep olduğu GST pi' nin nükleer transferini incelemişlerdir. Sisplatin (50 µM), CPT-11 (20 µM), VP-16 (20 µM) veya 5-FU (µM) uygulanan her hücre hattına uygulandıktan 6 saat sonra GST pi seviyesinde bir artış meydana gelmiştir. Nükleer GST pi' nin tedavi öncesi azalması, sisplatin ve doxorubicine' nin sebep olduğu apoptozisin artmasının bir faktörü olabilmektedir.

Jin ve arkadaşları [130] tarafından yapılan çalışmada HeLa hücrelerinde sisplatin ve histon deasetilaz inhibitörleri ile yapılan kombine tedavinin etkisi araştırılmıştır. Hücreler sisplatin, SAHA (suberoylanilide hidroksamik asit), sirnitol veya HDAC (histon deasetilaz) inhibitörlerinin birisi ve sisplatinin bir kombinasyonunun farklı konsantrasyonlarıyla inkübe edildikten sonra MTT metodu ile hücre canlılığı üzerinde inhibitör etkisine bakmışlardır. Sisplatinin hücre canlılığını daha çok azalttığını gözlemlemişlerdir. Sisplatin, SAHA (suberoylanilide hidroksamik asit) veya sirnitol, yalnız veya kombinasyonlarıyla 24 saat uygulandıktan sonra immünblotlama metodu ile HeLa hücrelerindeki kaspaz 3 aktivasyonu ölçülmüştür. SAHA ve yalnızca sirnitol minimal kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olurken, yalnızca sisplatinin sebep olduğu kaspaz 3 aktivasyon seviyesi kolayca görünmektedir. Özellikle SAHA/sisplatin ve sirnitol/sisplatin kombinasyonlarının güçlü kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sunulan çalışma ile literatür taramaları pek çok yönüyle uygunluk göstermiştir. Bunlardan bir kısmı; kitosan nanopartiküllerinin toksik olmadığı, serbest halde sisplatinin nanopartiküllere yüklü halinden daha toksik ve antitümör etkinsinin daha yüksek olduğu, sisplatin dozu ve uygulama zamanı arttıkça hücreler üzerindeki etkisinin arttığı ve kaspaz aktivitesini arttırdığı, GST pi izoenziminin kemoterapide kullanılan ajanlara karşı gösterilen yanıt oranını etkilediği ve yüksek GST pi ekspresyonlarında yanıt oranının düşük, düşük GST pi ekspresyonlarında ise yanıt oranının yüksek olduğu bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- [1] Konishi, M., Tabata, Y., Kariya, M., Suzuki, A., Mandai, M., Nanbu, K., Takakura, K., Fujii, S., In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *J. Control Release* 92(3): 301–313, 2003.
- [2] Lyon, A.L., Musick, M.D., Natan, M.J., Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing. *Anal. Chem.* 70(24): 5177-5183, 1998.
- [3] Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil S., Couvreur, P., Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? *Int. J. Pharm.* 298(2): 274-292, 2005.
- [4] Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., *Genetik Kavramlar*. Palme Yayıncılık. 8. Basım. Ankara, 2009.
- [5] Jones, A., Harris, A.L., New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumour growth and target for therapy. *Cancer J. Sci. Am.* 4(4): 209–217, 1998.
- [6] Levin, B., Apoptosis. *Genes VI*. In: Levin B. (ed). Chapter 36. New York: Oxford University Press, 1122-1129, 1997.
- [7] Engelson, IB., Stefansson, I.M., Beroukhim, R., Sellers, W.R., Meyerson, M., Akslen, L.A., Salveseni, H.B., HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. *Int J Oncol.* 32 (2): 307-316, 2008.
- [8] Massagué, J., G1 cell-cycle control and cancer. *Nature.* 432, 298-306, 2004.
- [9] Valenzuela, M.T., Mateos, S., Ruiz de Almodovar, J.M., McMillan, T.J., Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after gamma-irradiation. *Radiother. Oncol.* 54(3): 261 – 271, 2000.
- [10] Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10(8): 789–799, 2004.
- [11] M. Uluğ, quercetin ve quercetin/polietilenimin kompleksinin HeLa ve fibroblast hücrelerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2010.
- [12] Akbulut, H., Akbulut, K.G., Karsinogenez In: İçli F, ed. *Tıbbi Onkoloji*. Antip Afı Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar 23-38, Ankara, 1997.

- [13] Lecture, G.F.F., Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest*. 109, 14-19, 1996.
- [14] Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C., Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. *Solunum* 5(3): 127-138, 2003.
- [15] Roth, J.A., Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer* 12(2): 3-15, 1995.
- [16] Fidler, I.J., Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol.* 12(2): 89–96, 2002.
- [17] Hunter, K.W., Host genetics and tumour metastasis. *Br. J. Cancer* 90, 752–755, 2004.
- [18] Ekmekci A. Gen, Genetik Değişim ve Hastalıklar. 1st ed., 217-245, Gazi Kitabevi. Ankara, Türkiye, 2006.
- [19] McCormick, F., Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 15(12): 53 – 56, 1999.
- [20] Ekmekçi, A., Konaç, E., Önen İ.H., Gen polimorfizm ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal* 21(3): 282-295, 2008.
- [21] Hanahan, D., Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57 – 70 , 2000.
- [22] Blume-Jensen, P., Hunter, T., Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411, 355 – 364, 2001.
- [23] Doğan, A. L., Güç, D., Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 35: 34 – 42, 2004.
- [24] Jain, R.K., Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46 (1): 149 – 168, 2001.
- [25] B. Aslan, Teragnoz amaçlı fonksiyonel özelliklere sahip polimerik nanokürelerin hazırlanması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2009.
- [26] Tagliaferri, P., Caraglia, M., Budillon, A., Marra, M., Vitale, G., Viscomi, C., Masciari, S., Tassone, P., Abbruzzese, A., Venuta, S., *Cancer Immunology Immunotherapy* 54 (1): 1–10, 2005.
- [27] Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M., Anichini, A., Cancer Immunotherapy With Peptide-Based Vaccines: What Have We Achieved? Where Are We Going? *J.N.C.I. J. Natl. Cancer Inst.* 94(11): 805–818, 2002.

- [28] Arslan, Ö., Vural, H., Kömürçü, G., Özet, A., Kemoterapi Alan Kanser Hastalarına Verilen Eğitimin Kemoterapi Semptomlarına Etkisi. C.Ü.Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi 10(1): 15-28, 2006.
- [29] Kayaalp, O., Tıbbi Farmakoloji, Cilt: 1, s.372, 378-380, 384-400, Feryal Matbaacılık, Ankara, 2000
- [30] D. Gürel, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi uygulanan hastaların yaşam kalitesi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi. Hemşirelik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2007.
- [31] S. Arslan, Kanserli hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi. Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2000.
- [32] Gülbeyaz, C., Onkoloji hemşireliğinde kanıta dayalı semptom yönetimi. s.43-119, 3P-Pharma Publication Planning, İstanbul, 2007.
- [33] Berberoğlu, U., Aydın A., Onat, H., Gastrointestinal komplikasyonlar. s.759-776, Logos Yayıncılık, Onkoloji el kitabı, İstanbul, 2006.
- [34] Yavuzşen, T., Kömürçü, G., Kanser hastalarında halsizlik semptomunun değerlendirilmesi ve birlikte görülen klinik problemler. Gülhane Tıp Dergisi 50(2): 141-146, 2008.
- [35] Ünsar, S., Fındık, Ü., Kurt, S., Özcan, H., Kanserli Hastalarda Evde Bakım ve Semptom Kontrolü. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi 2(5): 89-106, 2007.
- [36] Ertem, G., Kanser hastalarında beslenme ve hemşirelik yaklaşımı. Dirim Tıp Gazetesi 83: 56-63, 2008.
- [37] Arruebo, M., Fernandez-Pacheco, R., Ibarra, M.R., Santamaria, J., Magnetic Nanoparticles for drug delivery. Nanotoday 2(3): 22–32, 2007.
- [38] Ritter, J. A., Ebner, A.D., Daniel, K.D., Stewart, K. L., Application of high gradient magnetic separation principles to magnetic drug targeting. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 280(2-3): 184–201, 2004.
- [39] Gupta, Y., Jain, A., Jain, P., Jain, S.K., Design and development of folate appended liposomes for enhanced delivery of 5-FU to tumor cells. Journal of Drug Targeting 15(3): 231–240, 2007.



- [40] Jain, S.K., Chaurasiya, A., Gupta, Y., Jain, A., Dagur, P., Joshi, B., Katoch, V.M., Development and characterization of 5-FU bearing ferritin appended solid lipid nanoparticles for tumour targeting. *J. Microencapsul.* Aug. 25(5): 289–297, 2008.
- [41] Vasir, J.K., Labhasetwar, V., Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment* 4(4): 363-374, 2005.
- [42] Fassas, A., Buffels, R., Kaloyannidis, P., Anagnostopoulos, A., Safety of high-dose liposomal daunorubicin (daunoxome) for refractory or relapsed acute myeloblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 122(1): 161–163, 2003.
- [43] Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* 274(1-2): 1-33, 2004.
- [44] Maeda, H., The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* 41, 189-207, 2001.
- [45] Allen, T.M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2, 750-63, 2002.
- [46] Larsen, A.K., Escargueil, A.E., Skladanowski, A., Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol. Ther.* 85(3): 217-29, 2000.
- [47] Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Couvreur, P., Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? *Int. J. Pharm.* 298(2): 274-292, 2005.
- [48] Cui, Z., Lockman, P.R., Atwood, C.S., Hsu, C.H., Gupte, A., Allen, DD., Mumper, RJ., Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59(2): 263-272, 2005.
- [49] Letchford, K., Burt, H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65(3): 259–269, 2007.

- [50] Maeda, H., The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* 41, 189–207, 2001.
- [51] Fenske, D.B., Cullis, P.R., Liposomal nanomedicines. *Expt. Opin. Drug Deliv.* 58(1): 25–44, 2008.
- [52] Cheng, Y., Wang, J., Rao, T., He, X., Xu, T., Pharmaceutical applications of dendrimers: promising nanocarriers for drug delivery. *Front. Biosci.* 13: 1447–1471, 2008.
- [53] Sandford, P.A., Chitosan commercial uses and potential applications, in: G. Skjak-Brack, T. Anthonsen, P. Sandford (Eds.), *Chitin and Chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, Elsevier Science Publishers Ltd, England, pp. 51-69, 1989.
- [54] Chandy, T., Sharma, CP., Chitosan as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 18(1): 1–24, 1990.
- [55] Pan, Y., Li, Y., Zhao, H., Zheng, J., Xu, H., Wei, G., Hao, J., Cui, F., Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249(1-2): 139–147, 2002.
- [56] Lee, M., Nah, J.W., Kwon, Y., Koh, J.J., Ko, K.S., Kim, S.W., Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *J Control Release*; 18(4): 427–431, 2001.
- [57] Dass, CR., Contreras, K.G., Dunstan, D.E., Choong, P.F.M., Chitosan microparticles encapsulating PEDF plasmid demonstrate efficacy in an orthotopic metastatic model of osteosarcoma. *Biomaterials* 28(19): 3026–3033, 2007.
- [58] Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., Vigneron, C., Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *J. Control. Release* 60 (2–3): 179–188, 1999.
- [59] Tiyaboonchai, W., Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. *Naresuan Univ. J.* 11(3): 51-66, 2003.
- [60] Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L. and Alonso, M. J., Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63: 125–132, 1997.

- [61] Bodmeier, R., Chen, H.G., Paeratakul, O., A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm. Res.* 6(5): 413–417, 1989.
- [62] O'Brien, M. E. R., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D.G., Tomczak, P., Ackland, S.P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C., Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 15(3): 440–449, 2004.
- [63] Chen, Q., Krol, A., Wright, A., Needham, D., Dewhirst, M. W., Yuan, F., Tumor microvascular permeability is a key determinant for antivascular effects of doxorubicin encapsulated in a temperature sensitive liposome, *International Journal Of Hyperthermia* 24(6): 475–482, 2008.
- [64] Mora, LO., Antunes, L.M., Francescato, HD., Bianchi, ML. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 47: 517- 522, 2003.
- [65] Priuska, E.M., Schacht, J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem. Pharmacol.* 50(11): 1749- 1752, 1995.
- [66] Naziroğlu, M., Karaoğlu, A., Aksoy, A.O., Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 195(2-3): 221- 230, 2004.
- [67] Krajci, D., Mares, V., Lisa, V., Bottone, MG., Pellicciari, C., Intranuclear microtubules are hallmarks of an usual form of cell death in cisplatin-treated C6 glioma cells. *Histochem. Cell Biol.* 125(1-2): 183-191, 2006.
- [68] Noda, S., Yoshimura, S., Sawada, M., Naganawa, T., Iwama, T., Nakashima, S., Sakai, N., Role of ceramide during cisplatin-induced apoptosis in C6 glioma cells. *J. Neurooncol.* 52(1): 11-21, 2001.
- [69] Wei, D., Mei, Y., Liu, J., Quantification of doxorubicin and validation of reversal effect of tea polyphenols on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Biotechnology Letters.* 25(4): 291 – 294, 2003.

- [70] Boumendjel, A., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Perrotton, T., Di Pietro, A., Anticancer Multidrug Resistance Mediated by MRP1: Recent Advances in the Discovery of Reversal Agents. *Medicinal Research Reviews*. 25(4): 453 – 472, 2005.
- [71] Armstrong, R.N., Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10(1): 2-18, 1997.
- [72] Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51-88, 2005.
- [73] Pacifici, G.M., Fracchia, G.N., Human Glutathione Transferase In Advances in Drug Metabolism in Man. Off. Pub of the Eur. Comm. Luxemburg, 1995.
- [74] Vural, N. Toksik maddelerin metabolizması. *Toksikoloji*, Ankara Üniv. Yayinevi, s.73, 2005.
- [75] Parkinson, A., Biotransformation of xenobiotics in Caseretti and Doll's Toxicology (Klassen C.D. ed), Mc Grow-Hill Company, Newyork, 2001.
- [76] Parl, F.F., Glutathione s transferase Genotypes and cancer risk. *Cancer Letters* 221(2):123-129, 2005.
- [77] Mannevrík, B., Danitelsan, U.H., Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 23(3): 283-337, 1988.
- [78] Pemple, S.E., Taylor, J.B., An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.* 287(3): 957-963, 1992.
- [79] Armstrong, R.N., Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10(1): 2-18, 1997.
- [80] Hayes, J.D., McLellan, L.I., Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31(4): 273-300, 1999.
- [81] Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastal, S., Jermin, L. S., Schulte, C. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrnyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Georghegan, K. F., and Pandit, J., Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798-24806, 2000.
- [82] Strange, R., Spteri, M., Ramachandra, S., Fryer, A., Glutathione Stransferase family of enzymes. *Mutation Research* 482(1-2): 21-26, 2001.

- [83] Moscow, J.A., Towvsted, A.J., Goldsmith, M. E., Whang-Peng, J., Vickers, P.J., Poisson, R., Legault-Poisson, S., Myers, C.E., Cowan, K.H., Isolation of the human anionic glutathione transferase cDNA and relation of its gene expression to estrogen receptor content in primary breast cancer. *Proc Natl. Acad. Sci USA*. 85(17): 6518-6522, 1988.
- [84] Moscow, J.A., Faichld, CR., Madden, M.J., Ransom, D.T., Wieand H.S., O'Brien, E.E, Poplack, D.G., Cossman, J., Myers, C.E., Cowan, K.H., Expression of anionic glutathione s transferase and p-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res*. 49, 1422-1428, 1989.
- [85] A. Özaydın, Glutasyon S-Transferaz GST-M1 ve GST T-1 polimorfizmlerinin glutasyonla ilişkili detoksifikasyon sistemlerine etkisi, Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2000.
- [86] Howie, A.F., Forrester, L.M., Glancey, M.J., Schlager, J.J., Powis, G., Beckett, G.J., Hayes, J.D., Wolf, C.R., Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. *Carcinogenesis* 11(3): 451–458, 1990.
- [87] Hirata, S., Odajima, T., Kohama, G., Ishigaki, S. and Niitsu, Y., Significance of glutathione S-transferase as a tumor marker in patients with oral cancer. *Cancer* 70(10): 2381–2387, 1992.
- [88] Kartalou, M., Essigmann, J.M., Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res*. 478(1-2): 23–43, 2001.
- [89] Rabik, C.A., Dolan, M.E., Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agent. *Cancer Treat. Rev*. 33(1): 9–23, 2007.
- [90] Mellish, K.J., Kelland, L.R., Harrap, K.R., In vitro drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *Br. J. Cancer* 68(2): 240–250, 1993.
- [91] Jansen, B.A.J., Brouwer, J., Reedijk, J., Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs, *J. Inorg. Biochem*. 89(3-4): 197–202, 2002.
- [92] Kawai, H., Kiura, K., Tabata, M., Yoshino, T., Takata, I., Hiraki, A., Chikamori, K., Ueoka, H., Tanimoto, M., Harada, M., Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. *Lung Cancer* 35(3): 305–314, 2002.

- [93] Yang, P., Ebbert, J.O., Sun, Z., Weinshilboum, R.M., Role of glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *J. Clin. Oncol.* 24(11): 1761–1769, 2006.
- [94] Miyatake, K., Gemba, K., Ueoka, H., Nishii, K., Kiura, K., Tabata, M., Shibayama, T., Takigawa, N., Kawaraya, M., Tanimoto, M., Prognostic significance of mutant p53 protein, P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in patients with unresectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 23, 2829–2836, 2003.
- [95] Townsend, D.M., Tew, K.D., The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369-7375, 2003.
- [96] Ono, K., Han, J., The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cell Signal.* 12, 1-13, 2000.
- [97] Tew, K.D., Dutta, S., Schultz, M., Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26(2-3): 91-104, 1997.
- [98] Mahajan, S., Atkins, W.M., The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(11): 1221-1233, 2005.
- [99] Zhao, G., Wang, X., Advance in Antitumor Agents Targeting Glutathione-S-Transferase. *Curr. Med. Chem.* 13(12): 1461-1471, 2006.
- [100] Kim, J., Kim, YS., Park, K., Lee, S., Nam YH., Min, HK., Jo, HG., Park JH., Choi, K., Jeong, YS., Park, RW., Kim, IS., Kim, K., Kwon, IC. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release* 127(1): 41–49, 2008.
- [101] Felt, O., Buri, P., Gurny, R., Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24(11): 979– 993, 1998.
- [102] Onishi, H., Machida, Y., Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 20(2): 175–182, 1999.
- [103] Qi, L., Xu, Z., Chen, M., In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles. *European Journal of Cancer* 43(1): 184 -193, 2007.

- [104] Campos, A., Diebold, Y., Carvalho E.L.S., Sánchez, A., and Alonso M.J. Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: *in Vitro* Stability, *in Vivo* Fate, and Cellular Toxicity. *Pharmaceutical Research*, 21(5): 803-810, 2004.
- [105] Antunes, L.M., Darin, J.D., Bianchi, M.P., Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats. *Pharmacol. Res.* 41(4): 405-411, 2000.
- [106] Rosenberg, B., Platinum complexes for the treatment of cancer. *Interdisc. Sci. Rev.* 3(2): 134–147, 1978.
- [107] Cafaggi, S., Russo, E., Stefani, R., Leardi, R., Caviglioli, G., Parodi, B., Bignardi, G., Totero, D.D, Aiello, C., Viale, M. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex. *Journal of Controlled Release* 121(1-2): 110–123, 2007.
- [108] [http://www1.gantep.edu.tr/~sem\\_lab/index.php](http://www1.gantep.edu.tr/~sem_lab/index.php) (Erişim tarihi : 05.12.2010)
- [109] D. Kavaz, Biyokimyasal uygulamalar için manyetik özelliğe sahip biyopolimerik nanokürelerin hazırlanması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2009.
- [110] <http://nanoturkiye.blogspot.com/2008/04/nano-101-atomik-kuvvet-mikroskopu.html> (erişim tarihi: 05.12.2010)
- [111] Döker, S., Malcı, S., Doğan, M., and Salih. B. New poly(N-(hydroxymethyl) methacrylamide-1allyl-2-thiourea) hydrogels prepared by radiation induced polymerisation; selective and adsorption, recovery and pre-concentration of Pt(II) and Pd(II). *Analytica Chimica Acta.* 553:(1-2) 73-82, 2005.
- [112] Ada, K., Turk, M., Oguztuzun,S., Kilic, M., Demir, M., Tandogan,N., Ersayar, E., Ozturk, L. Cytotoxicity and apoptotic effects of nickel oxide nanoparticles in cultured HeLa cells. *Folia Histochem. Cytobiol.*:48(4): 524-529, 2010.
- [113] Janes, K.A., Calvo, P., Alonso, M.J., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug. Delivery, Rev.* 47(1): 83-97, 2001.
- [114] Grenha, A., Seijo, B., Remuñán-López, C., Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25(4-5): 427–437, 2005.

- [115] Rao, S.B., Sharma, C.P., Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *J. Biomed. Mater. Res.* 34(1): 21-28, 1997.
- [116] Mattheolabakis, G., Taoufik, E., Haralambous, S., Roberts, ML., Avgoustakis, K., In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71(2): 190–195, 2009.
- [117] Tseng, C., Su, W.Y., Yen, K.C., Yang, K.C., Lin, F.H., The use of biotinylated-EGF-modified gelatin nanoparticle carrier to enhance cisplatin accumulation in cancerous lungs via inhalation. *Biomaterials* 30(20): 3476–3485, 2009.
- [118] Gryparis, CE., Hatzia Apostolou, M., Papadimitriou, E., Avgoustakis K., Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67(1): 1–8, 2007.
- [119] Moreno, D., Ilarduya, C.T., Banderes E., Bunuales, M., Azcona, M., Garcia-Foncillas J., Garrido. M.J. Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68(3): 503–512, 2008.
- [120] Cummings, BS., Schenellmann. RG., Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase 3-Dependent and –Independent Pathways. *THE Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 302(1): 8–17, 2002.
- [121] Horky, M., Wurzer, G., Kotala, Vl., Anton, M., Vojtesek, B., Vacha I. and Wesierska-Gadek, J. Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *Journal of Cell Science* 114, 663-670, 2000.
- [122] Cowan, K. H., Batist, O., Tulpule, A., Shinha, B. K., and Myers, C. E. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9328-9332, 1986.
- [123] Teicher, B.A., Holden, S.A., Kelley, M.J., Shea, T.C., Cucchi, C.A., Rosowsky, A., Henner, W.D., and Frei, E., Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.* 47: 388-393, 1987.



- [124] Goto, S., Iida, T., Cho, S., Oka, M., Kohno, S., Kondo, T., Overexpression of glutathione *S*-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic. Res.* 31:549–58, 1999.
- [125] Sweeney, C., McClure, G.Y., Fares, M.Y., Stone, A., Coles, B.F., Thompson, P.A., Sweeney, C., McClure, G.Y., Fares, M.Y., Stone, A., Coles, B.F., Thompson, P.A., Korourian, S., Hutchins, L.F., Kadlubar, F.F., Ambrosone, C.B., Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione *S*-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res.* 60: 5621–4, 2000.
- [126] Shiga, H., Heath, E. I., Rasmussen, A. A., Trock, B., Johnston, P. G., Forastiere, A. A., Langmacker, M., Baylor, A., Lee, M., and Cullen, K. J. Prognostic value of p53, glutathione *S*-transferase, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatinbased chemotherapy in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 5: 4097–4104, 1999.
- [127] Nishimura, T., Newkirk, K., Sessions, R.B., Andrews, P.A., Trock, B.J., Rasmussen, A.A., Montgomery, E.A., Bischoff, E.K., and Cullen, K.J., Immunohistochemical Staining for Glutathione *S*-Transferase Predicts Response to Platinum-based Chemotherapy in Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research* 1: 1859- 1865, 1996.
- [128] Dasgupta R.K., Adamson, P.J., Davies, F.E., Rollinson, S., Roddam, P.L., Ashcroft, A.J., Dring, A., Fenton, J.A.L., Child, J.A., Allan, J.M., Morgan, G.J., Polymorphic variation in GSTP1 modulates outcome following therapy for multiple myeloma. *Blood* 102(7): 2345-2350, 2003.
- [129] Goto, I., Kamada, K., Soh, Y., Ihara, Y., Kondo, T., Significance of Nuclear Glutathione *S*-Transferase in Resistance to Anti-cancer Drugs. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 1047–1056, 2002.
- [130] Jin, K.L., Park, J.L., Noh, E.J., Hoe, K.L., Lee J.H., Kim, J.H., Nam J.H., The effect of combined treatment with cisplatin and histone deacetylase inhibitors on HeLa cells. *J. Gynecol. Oncol.* 21(4):262-268, 2010.