

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**PEMETREXED YÜKLÜ MANYETİK  
ALBUMİN NANOPARTİKÜL  
HAZIRLANMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE AKCİĞER  
KANSERİ HÜCRE HATLARINDA  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ayşe ÜNAL**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay HAMARAT ŞANLIER**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Biyokimya Yüksek Lisans Programı**

**Bornova-İZMİR**

**2019**



Ayşe ÜNAL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “PEMETREXED YÜKLÜ MANYETİK ALBUMİN NANOPARTİKÜL HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27/08/19 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Seray Saurice

Raportör Üye

: Prof. Dr. Hülya Aygün

Üye

: Prof. Dr. Sevil ÜNAL





**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “PEMETREXED YÜKLÜ MANYETİK ALBUMİN NANOPARTİKÜL HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27 / 08 / 2019



Ayşe ÜNAL



## ÖZET

### PEMETREXED YÜKLÜ MANYETİK ALBÜMİN NANOPARTİKÜL HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ÜNAL, Ayşe

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Ağustos 2019, 100 Sayfa

Albumin, plazmada en bol bulunan küresel bir proteindir ve hemen hemen tüm amino asitleri yapısında barındırır. Ayrıca, albümin karaciğerde yaklaşık olarak 0.7 mg/saat hızında sentezlenir. Albumin ilaç taşıyıcı sistem olarak; protein yapıda olması, biyobozunur olması, toksik olmaması, biyoyumlu olması ve kolay bulunabilir olması gibi nedenlerle nanopartikül yapısında tercih edilir. Pemetrexed, küçük hücreli dışı akciğer kanseri için kullanılan sitotoksik ajanlardan biridir ve güçlü bir timidilat sentaz inhibitörüdür. Ancak Pemetrexed uygulamasından sonra, hayatı tehdit edici komplikasyonlar yaşanabilir. Bu çalışmada, manyetik nanopartiküller ile pem akciğer kanserili bölgeye hedeflenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle pemetrexed yüklü manyetik albumin nanopartiküller hazırlanmıştır.

Albumin nanopartiküller, sığır serum albümini kullanılarak desolvasyon yöntemiyle sentezlendi. Nanopartikülün hazırlanması sırasında, birçok çalışmada kullanılan toksik glutaraldehit yerine genipin çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı. BSA, genipin, manyetik nanopartikül, reaksiyon süresi ve ilaç miktarı optimizasyonları yapıldı. İlacın farklı pH'larda salınması izlenerek serbest pemetrexed ve hazırlanan ilaç sistemi karşılaştırıldı. Karakterizasyon çalışmaları, SEM, FTIR ve zeta boyut analizi ile gerçekleştirildi. Sentezlenen nanopartikülün hidrodinamik boyutu  $191,6 \pm 41,57$  nm ve PDI değeri 0,340 olarak bulundu. Buna ek olarak, zeta potansiyel değeri  $-19,2 \pm 4,37$  olarak tespit edildi. Negatif olan bu zeta potansiyel değeri nanopartikülün hücre içine alınmasına yardımcı olur. Yapılan tüm optimizasyon çalışmalarından sonra, hazırlanan ilaç taşıma sistemi, etkinliği araştırmak için farklı akciğer kanseri hücre hatlarına (A549-luc-C8 ve CRL5807) uygulandı. Dış manyetik alan uygulanarak tümör bölgesine yöneltilebilecek bu ilaç taşıma sisteminin akciğer kanseri tedavisi için potansiyele sahip olduğu yapılan in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Pemetrexed, manyetik hedefleme, albumin nanoparçacık, in vitro, kontrollü ilaç salımı





## ABSTRACT

### PREPARATION OF PEMETREXED LOADED ALBUMIN NANOPARTICLES AND INVESTIGATION OF THEIR EFFICACY IN LUNG CANCER CELL LINES

ÜNAL, Ayşe

MSc in Biochemistry Department.

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

August 2019, 100 Pages

Albumin is the most abundant spherical protein in plasma and contains almost all amino acids in its structure. Furthermore, albumin is synthesized in the liver at a rate of about 0.7 mg / h. Albumin as drug delivery system; It is preferred in nanoparticle structure due to its protein structure, biodegradability, nontoxic, biocompatible and easily available. Pemetrexed is one of the cytotoxic agents used for non-small cell lung cancer and is a potent inhibitor of thymidylate synthase. However, life-threatening complications may occur after Pemetrexed administration. In this study, it was aimed to target the lung cancer site with magnetic nanoparticles. Therefore, pemetrexed loaded magnetic albumin nanoparticles were prepared.

Albumin nanoparticles were synthesized by desolvation method using bovine serum albumin. During the preparation of the nanoparticle, genipin was used as cross-linker instead of toxic glutaraldehyde, which was used in many studies. BSA, genipin, magnetic nanoparticle, reaction time and drug quantity were optimized. Free pemetrexed and prepared drug system were compared by monitoring the release of the drug at different pHs. Characterization studies were performed by SEM, FTIR and zeta size analysis. The synthesized nanoparticle had a hydrodynamic size of  $191.6 \pm 41.57$  nm and a PDI of 0.340. In addition, the zeta potential value was  $-19.2 \pm 4.37$ . This negative zeta potential value aids in the uptake of the nanoparticle into the cell. After all optimization studies, the drug delivery system was applied to different lung cancer cell lines (A549-luc-C8 and CRL5807) to investigate efficacy. In vitro studies have shown that this drug delivery system, which can be directed to the tumor site by applying external magnetic field, has the potential for lung cancer treatment.

Keywords: Pemetrexed, magnetic targeting, albumin nanoparticle, in vitro, controlled drug release



## ÖNSÖZ

Günümüzde kanser en önemli sağlık sorunlarından bir tanesi olmakla birlikte birçok insan kanser tedavisinin getirdiği yan etkilerden dolayı acı çekmektedir. Bu nedenle, tezimde akciğer kanser tedavisine yönelik bir taşıma sistemi geliştirdim ve manyetik olarak hedefleyerek yan etkileri azaltmaya çalıştım. Geliştirdiğim bu sistemin ileride insanlara faydalı olacağına inanıyorum.

Akademiye ilk adım olan yüksek lisansımın adım adım sonuna geldiğim bu günlerde, eğitimim boyunca edindiğim bilgiler ile birlikte bilime, ülkeme ve en önemlisi insanlara nasıl faydalı olabileceğimin düşünüyorum. Bu dönemde bir bilim insanı olarak üzerime düşen görevleri yerime getireceğimin ve bu yolda yılmadan yorulmadan yürümek istediğimin de farkına vardım.

Tez çalışmam boyunca bilgisinden, tecrübesinden faydalandığım, mesleği sevdiiren, çalışmaya araştırmaya teşvik eden, yanında çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Şenay Şanlıer'e, hem bir abla gibi yardıma koşan hem de çalışmayı öğreten sevdiiren sevgili Dr. Güliz Ak'a, her zaman güler yüzü ile yardımcı Buket Özel'e, her zaman her koşulda sevgisini eksik etmeyen her zaman yanımda olan en büyük destekçim annem Filiz Yavuz ve babam Fikret Yavuz'a, başım sıkıştığında her zaman yardıma koşan, sırdaşım, dostum olarak yardımcı olan ve destekleyen sevgili Alican Erhan Nebioğlu ve Tuğba Karakayalı'ya çok teşekkür ederim.

İZMİR

21.08.2019

  
Ayşe ÜNAL



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>ÖNSÖZ</b> .....	xi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xvii
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xix
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xxi
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>2.1. Kanser</b> .....	3
<b>2.1.1. Kanser Tipleri</b> .....	3
<b>2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri</b> .....	5
<b>2.1.3. Kansere Neden Olabilecek Etkenler</b> .....	6
<b>2.1.4. Kanserin Belirtileri</b> .....	9
<b>2.1.5. Kanser Tedavisi</b> .....	9
<b>2.2. Akciğer Kanseri</b> .....	12
<b>2.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi</b> .....	13
<b>2.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi</b> .....	13
➤ <b>Sigara İçimi</b> .....	14
➤ <b>Beslenme</b> .....	14
➤ <b>Maruziyet</b> .....	14
➤ <b>Radyasyon</b> .....	15
➤ <b>Çevresel Etkenler</b> .....	15
➤ <b>Geçirilmiş Akciğer Hastalıkları</b> .....	15
➤ <b>Genetik Duyarlılık</b> .....	15
<b>2.3. Kemoterapi İlaçları</b> .....	15
<b>2.3.1. Kemoterapi İlaçları Sınıflandırılması</b> .....	16
➤ <b>Antimetabolitler</b> .....	17

## İÇİNDEKİLER (DEVAM)

➤	<b>Anti-Tümör Antibiyotikler</b> .....	18
➤	<b>Bitkisel Kaynaklı Ajanlar</b> .....	19
➤	<b>Hormon ve Hormon Antagonistleri</b> .....	19
➤	<b>Diğer Kemoterapi İlaçları</b> .....	20
2.3.2.	<b>Pemetrexed</b> .....	20
2.4.	<b>İlaç Taşıyıcı Sistemler</b> .....	22
2.4.1.	<b>Nanopartiküller</b> .....	23
2.4.2.	<b>Lipozomlar</b> .....	24
2.4.3.	<b>Dendrimerler</b> .....	25
2.4.4.	<b>Miseller</b> .....	25
2.4.5.	<b>Monoklonal Antikorlar</b> .....	25
2.5.	<b>İlaç Hedefleme</b> .....	26
2.5.1.	<b>İlacın Doğrudan Hedeflenmesi</b> .....	26
2.5.2.	<b>Pasif Hedefleme</b> .....	26
2.5.3.	<b>Fiziksel Hedefleme</b> .....	27
2.5.3.	<b>Aktif Hedeflendirme</b> .....	28
➤	<b>Ligant Aracılı Aktif Hedeflendirme</b> .....	28
➤	<b>Stimulasyona Bağlı Aktif Hedeflendirme</b> .....	28
2.6.	<b>Albumin</b> .....	29
2.6.1.	<b>Bovine Serum Albumin</b> .....	29
3.	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	31
3.1.	<b>Materyal</b> .....	31
3.2.	<b>Metod</b> .....	31
3.2.1.	<b>Bradford Reaktif Hazırlanması ve Standart Grafiğinin Çizilmesi</b> .....	31
3.2.2.	<b>BSA Optimizasyonu</b> .....	32
3.2.3.	<b>Genipin Optimizasyonu</b> .....	33
3.2.4.	<b>Süre Optimizasyonu</b> .....	33
3.2.5.	<b>Magnetit Sentezi</b> .....	33
3.2.6.	<b>Magnetit Miktarı Optimizasyonu</b> .....	33
3.2.7.	<b>İlaç Miktarı Optimizasyonu ve Karakterizasyon</b> .....	34
3.2.8.	<b>İlaç Salım Çalışmaları</b> .....	34

## İÇİNDEKİLER(DEVAM)

3.2.9. <i>in vitro</i> Sitotoksisite Çalışmaları.....	34
4. BULGULAR.....	37
4.1. Bradford Standart Grafiğinin Çizilmesi .....	37
4.2. BSA Optimizasyonu .....	37
4.3.Genipin Optimizasyonu .....	39
4.4. Süre Optimizasyonu .....	41
4.5. Magnetit sentezi .....	43
4.6. Magnetit Miktarı Optimizasyonu .....	43
4.7. İlaç Miktarı Optimizasyonu ve Karakterizasyon .....	45
4.8. İlaç Salım Çalışmaları .....	50
4.9. <i>in vitro</i> Sitotoksisite Çalışmaları.....	53
5.TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	63
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	65
TEŞEKKÜR.....	71
ÖZGEÇMİŞ .....	73





## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sekiller

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> Pemetrexed disodyum heptahidrat (L-Glutamik asit, N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-1H-pirrolo[2,3-d]primidin-5-yl)etil]benzoyl]-,disodyum tuzu, heptahidrat; $C_{20}H_{19}N_5Na_2O_6 \cdot 7H_2O$ ; Mw = 597.49; CAS number: 150399-23-8)(Nature Publishing Group, 2005).....	21
<b>Şekil 2.2.</b> Pemetrexed Etki Mekanizması (Şekil Molina J.R., Adjei A.A.,2003, The Role of Pemetrexed (Alimta® , LY231514) in Lung Cancer Therapy makalesinden alınmıştır.).....	22
<b>Şekil 2.3.A)</b> Nanopartikül Yapısı (Sakallıoğlu H., 2013) <b>B)</b> Nanokapsül ve Nanoküre yapısı(Çelik M.,2014) .....	24
<b>Şekil 2.4.A)</b> Misel Yapısı <b>B)</b> Dendrimer Yapısı (Çelik M.,2014) .....	25
<b>Şekil 2.5.</b> EPR Etkisi (Şekil Sarıyer Ö. ve Çomoğlu T., 2017, Nanotaşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme makalesinden alınmıştır.).....	27
<b>Şekil 2.6.</b> Fiziksel Hedeflendirme (Şekil Çelik M., 2011, Farmasötik Biyoteknolojide İlaç Hedefleme adlı Bitirme Ödevinden Alınmıştır.) .....	28
<b>Şekil 3.1.</b> Reaksiyon düzeneği .....	32
<b>Şekil 4.1.</b> Bradford standart grafiği .....	37
<b>Şekil 4.2.</b> BSA Optimizasyonuna ait Zeta Boyut Ölçümleri A) 25 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait B) 50 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait C) 75 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait D) 100 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait.....	38
<b>Şekil 4.3. A)</b> 10 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, <b>B)</b> 20 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, <b>C)</b> 10 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, <b>D)</b> 10 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP.....	40
<b>Şekil 4.4.</b> Zeta Boyut Sonuçları A) 20 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, B) 50 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, C) 100 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP.....	41
<b>Şekil 4.5.</b> SEM görüntüleri A) 15 saat B) 18 saat C) 24 saat D) 36 saat.....	42
<b>Şekil 4.6.</b> Magnetite ait FTIR .....	43
<b>Şekil 4.7.</b> Artan Konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP'ler.....	43
<b>Şekil 4.8.A)</b> 1,5 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP <b>B)</b> 3 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP, <b>C)</b> 4,5 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP, <b>D)</b> 6 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP <b>E)</b> 7,5 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP .....	45
<b>Şekil 4.9.</b> Artan Konsantrasyonda Magnetit Miktarının Görüntüsü .....	45
<b>Şekil 4.10.</b> Pemetrexed Standart Grafiği (Suda) .....	46
<b>Şekil 4.11. A)</b> 1,5 mg/mL konsantrasyona sahip Pem içeren BSA-NP, <b>B)</b> 3 mg/mL konsantrasyona sahip Pem içeren BSA-NP, <b>C)</b> 4,5 mg/mL konsantrasyona sahip Pem içeren BSA-NP .....	47
<b>Şekil 4.12.</b> Optimum Koşullarda Hazırlanan A) BSA-NP zeta boyut, <b>B)</b> Pem yüklü BSA-NP zeta boyut .....	48
<b>Şekil 4.13.</b> Optimum Koşullarda Hazırlanan A) BSA-NP zeta Potansiyel, <b>B)</b> Pem yüklü BSA-NP zeta Potansiyel.....	48
<b>Şekil 4.14.</b> BSA, Pemetrexed ve Pem Yüklü BSA-NP ait FTIR Spektrumu.....	49

## ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

### Sekiller

### Sayfa

Şekil 4.15. Asetat Tamponu Standart Grafiği .....	50
Şekil 4.16. pH=5.5 Asetat Tamponu serbest Pem İlacına ait Salım Grafiği .....	50
Şekil 4.17. pH=5.5 Asetat Tamponu Pem yüklü BSA-NP'lere ait İlaç Salım Grafiği .....	51
Şekil 4.18. pH=7.4 Fosfat Tamponu Pemetrexed Standat Grafiği .....	51
Şekil 4.19. pH=7,4 Fosfat Tamponu Serbest Pem Salım Grafiği.....	52
Şekil 4.20. pH=7.4 Fosfat Tamponu Pem yüklü BSA-NP'lere ait İlaç Salımı.....	52
Şekil 4.21. A549 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksisite (48 saat) .....	46
Şekil 4.22. CRL 5807 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksisite (48 saat) .....	46
Şekil 4.23. A549 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksisite (72 saat) .....	47
Şekil 4.24. CRL 5807 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksisite (72 saat) .....	47

## TABLolar DİZİNİ

<u>Tablolar</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 3.1.</b> Protein tayini için kullanılan çözeltiler.....	32
<b>Tablo 4.1.</b> BSA Optimizasyonu Protein Bağlanma Yüzdeleri .....	377
<b>Tablo 4.2.</b> Artan BSA Konsantrasyonu ile Hazırlanan Nanopartiküllere ait Hidrodinamik Boyut ve Poli Dispersite İndeksi Sonuçları .....	399
<b>Tablo 4.3.</b> Genipin Konsantrasyonu optimizasyonu için % BSA bağlanma verimleri (1. Deneme).....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b> 9
<b>Tablo 4.4.</b> Genipin Konsantrasyonu optimizasyonu için % BSA bağlanma verimleri.....	40
<b>Tablo 4.5.</b> Süre optimizasyonu için % BSA bağlanma verimleri .....	42
<b>Tablo 4.6.</b> Magnetit Konsantrasyonu için % BSA bağlanma verimleri .....	4444
<b>Tablo 4.7.</b> İlaç Konsantrasyonu için % BSA bağlanma verimleri .....	4646
<b>Tablo 4.8.</b> Zeta Boyut ve Zeta Potansiyel Sonuçları .....	499
<b>Tablo 4.9.</b> A549 ve CRL 5807 hücre hattına ait IC <sub>50</sub> Değerleri.....	55



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
>	Büyüktür
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
g	Gram
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
v	Hacim

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ATP	Ademozin Trifosfat
BSA	Bovine (Sığır) Serum Albumini

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM)

BSA-NP	BSA Nanopartikül
DHFR	Dihidrofolat Redüktaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü
EPA	ABD Çevre Koruma Ajansı
EPR	Artan Geçirgenlik ve Tutunma
FBS	Fetal Bovine Serum
FPGS	Folipoliglutamat Sentaz
FTIR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrosfotometre
GARFT	Glisinamid Ribonükleotit Formiltransferaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSA	Human (İnsan) Serum Albumini
IARC	Uluslararası Kanser Ajansı
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MNP	Manyetik Nanopartikül
m-RNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MRP	Çok İlaça Karşı Dirençli Proteinler
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
NSLC	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM)**

P-BSA-NP	Pemetreksed Yüklü BSA Nanopartikül
PDI	Poly Dispersity Index
PEG	Polietilenglikol
Pem	Pemetreksed
RES	Retiküloendotelyal Sistem
RFC	İndirgenmiş Folat Taşıyıcı
RNA	Ribonükleik Asit
SCLC	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TS	Timidilat Sentaz
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü





## 1.GİRİŞ

Kanser en basit tanımıyla hücrelerin kontrolsüz ve anormal olarak çoğalması olarak tanımlanabilir. Bu hüreler oluşmaya başladığı bölgede kalabildiği gibi kan ve lenf sistemi ile vücutta yol alabilir ve ulaştıkları bölgelerde yeni tümörler oluşturabilirler. Kanser, tüm dünyada önde gelen sağlık sorunlarından biri olmuştur. Amerika’da ikinci önde gelen ölüm nedenidir (Rebecca L. et al., 2017). Ülkemizde ise 2015 yılında yayınlanan kanser istatistiklerine göre kanser ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) verilerine göre, akciğer kanseri, erkeklerde görülen kanserler arasında ülkemizde ilk sırada, dünyada ise prostat kanserini takip ederek ikinci sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise, ülkemizde beşinci sırada ve dünyada ise meme ve kolorektal kanserleri takip ederek üçüncü sırada yer almaktadır (TC Sağlık Bakanlığı, 2015).

Kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi temel yaklaşımlar bulunmaktadır. Cerrahi ve radyoterapi sadece erken tanı konulan ve vücuda yayılım göstermeyen kanserlerde tek başına etkili iken kemoterapi kanserin hangi evresinde olursa olsun kullanılan etkili bir yöntemdir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar kanser hücrelerin bölünmelerini durdurmakta ya da yok etmektedir. Ancak kullanılan bu ilaçlar kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de etki etmekte ve ciddi hayatı tehdit eden yan etkilere neden olmaktadır. Farmasötik açıdan ilacın hedef dokuya taşınması ve bu bölgede etki etmesi en büyük sorun olmuştur. İlaç kullanımında ortaya çıkan bu sorunların çözümünde nanoteknolojiden yararlanılarak ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmeye başlanmıştır (National Cancer Institute, Kutluk ve Kars, 1992). Kanser tedavisinde de lipozomlar, nanaopartiküller, nano ve mikrokabarcılar gibi birçok taşıyıcı sistem tasarımı ortaya atılmıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında akciğer kanser tedavisine yenilikçi bir yaklaşım getirilerek, manyetik hedefli BSA nanopartiküller geliştirilmiş ve ilaç yüklenerek in vivo denemeler yapılmıştır.

Nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak sıklıkla tercih edilen yapılardır. Boyutları 10- 1000 nm aralığında değişiklik gösteren, polimerler kullanılarak hazırlanan, etken maddelerin partikül içinde çözündüğü, bağlandığı, hapsedildiği ya da adsorbe edildiği küresel yapılardır (Çorman, 2010 ; Tüylek 2017). Yüzey özellikleri, boyutları, üretim kolaylığı, manipülasyon kolaylığı ve hedeflendirilmeye yatkınlıkları gibi nedenlerle tercih edilirler. Buna ek olarak biyoyaralanımlarının ve ilaç salım kapasitelerinin yüksek olması da nanaopartikülleri mükemmel bir taşıyıcı sistem yapar. Nanopartiküllerin yapımında sığır serum albümini (BSA) gibi maddeler sıklıkla tercih edilir. Albümin karaciğerde sentezlenen tek zincirden oluşan protein yapıdır. Kan plazmasında en yaygın bulunan proteindir. Çeşitli maddelerin kanda taşınmasına yardımcı olur. Buna ek olarak, kan ile doku arasında suyun dengelenmesine yardımcı olur, ontotik basıncı düzenler. Albümin biyoyumlu olması toksik olmayışı ve biyoyaralanımının yüksek olması nedeniyle nanopartiküllerde kullanılır (Tatar D., 2007). Bu nedenlerle

bu tez çalışmasında da BSA nanopartiküllerin sentezlenmesi ve hedeflendirilmesi amaçlanmıştır.

Sadece nanopartiküllerin sentezlenmesi ilaç taşıyıcı sistemler için yeterli değildir. Sentezlenen bu sistemin hedef bölgeye ulaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle çeşitli ilaç hedefleme stratejileri geliştirilmiştir. İlaç hedeflemede amaç; olası yan etkilerin azaltılması, ilacın hedef bölgede etkinliğinin artırılması ve buna bağlı olarak dozun azaltılarak hedef bölgeye yüksek oranda etken maddenin ulaşması ve ilaç hedeflemede kullanılan reseptöre bağlı olarak ilacın hedef bölgeye ulaşmaya kadar salımının minimumda tutulması ve hedef bölgede etkinliğini tam olarak göstermesi bulunmaktadır. Doğrudan uygulama, pasif ve aktif hedefleme gibi birçok hedefleme stratejisi bulunmaktadır (Canefe K. Ve Duman G.,1994). Manyetik hedefleme bu stratejilerden bir tanesidir. Manyetik nanopartiküller uygulanan manyetik alana cevap verirler ve manyetik alanda hareket ettirilebilirler. Bu özellikleri sebebiyle taşıyıcı sistemleri kolaylıkla hedef bölgeye ulaştırabilir ve hedef bölgede etkinlik gösterebilirler. Bu nedenle bu tez çalışmasında manyetik hedefli BSA nanopartiküller içine kemoterapötik ilaç olan pemetrexed yüklenmiş ve karakterize edilmiştir.

Kemoterapi kelimenin tam anlamıyla ilaç tedavisi anlamına gelmektedir. Kanser tedavisinde ise kemoterapi yine aynı anlama gelmekte olup hücreleri öldüren (sitotoksik) ilaçlarla muamele anlamına gelmektedir. kanser hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlara antineoplastik ilaçlar ya da kemoterapötikler adı verilmektedir. Antimetabolitler, kemoterapötik ajanların bir sınıfıdır ve hücre yapı taşlarının sentezinde rol alan enzimlerin sentezini bozarak ya da enzimlerin yerine geçerek etki gösterirler (TC Milli Eğitim Bakanlığı, 2017). Pemetrexed folat antimetabolitleri sınıfına aittir. Pemetexed, Malign plevral mezotelyoma ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi türlerin tedavisinde sıklıkla kullanılır. Ancak ateş, kusma, nefes darlığı, trombosit sayısında düşme, depresyon, kan kreatinin düzeyinin artması gibi birçok yan etkisi mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, bir kemoterapi ilacı olan pemetrexedin yan etkilerinin azaltılması ve hedefli tedavinin yardımıyla hedef dokuda tedavi dozunda ve daha etkin olması amaçlanmıştır. Bu nedenle, manyetik hedefli BSA nanopartiküller geliştirilmiş ve pemetrexed ile bağlanıp karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından in vitro salım ve hücre kültürü çalışmaları yapılmış serbest ilaç ile nano yapı kıyaslanmıştır. Nano yapının etkinliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar lerileyen çalışmalar (in vivo/ex vivo) için umut vaat etmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

İnsan vücudu, farklı tiplerde hücrelerden oluşur. Hücreler büyür, kontrollü olarak çoğalırlar ve yaşlandıklarında veya zarar gördüklerinde, kontrollü olarak ölümler ve yerlerini yeni hücreler alır (Demir D.,2013) . Ancak kanser geliştiğinde, bu düzenli süreç bozulur. Hücreler gittikçe daha fazla anormal hale geldikçe, eski veya hasarlı hücreler ölmeleri gerektiğinde hayatta kalır ve ihtiyaç duyulmadığında yeni hücreler oluşur. Bu ekstra hücreler durmadan bölünebilir ve tümör adı verilen büyümeler oluşturabilir (National Cancer Institute 2015, Kutluk ve Kars, 1992). Kanser en basit tanımı ile hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması anlamına gelmektedir. Bu kontrolsüz çoğalma sırasında hücrelerde yapısal farklılıklar meydana gelir: hücreler ya normalde yaptığı işlevlerini yapamamaya başlar ya da normalde olmayan bazı yeni işlevler kazanır (Kutluk ve Kars, 1992). Kanserli tümörler malign olarak adlandırılırlar. Yakındaki dokulara yayılabilirler. Buna ek olarak, bu tümörler büyüdükçe, bazı kanser hücreleri ayrılabilir ve vücuttaki uzak yerlere kan veya lenf sistemi yoluyla seyahat edebilir ve orijinal tümörden uzakta yeni tümörler oluşturabilir. Malign tümörlerin aksine, benign tümörler yakındaki dokulara yayılmazlar. Ancak, iyi huylu tümörler bazen oldukça büyük olabilir. Çıkarıldığında, genellikle nüksetmezler bunun aksine kötü huylu tümörler tekrarlayabilirler. Ancak bir istisna olarak benign beyin tümörü vücuttaki herhangi bir yerdeki benign tümörlerin aksine hayatı tehdit edebilir (National Cancer Institute, 2015).

Hücre kontrolünün bozulup bir hastalık olarak kanserin ortaya çıkması, kanser türlerine göre farklılık gösterse bile yaklaşık 15 ila 20 yıl arasında değişmektedir. Kanserler köken aldıkları doku ve organlara göre adlandırılırlar (Kutluk ve Kars, 1992). Örnek vermek gerekirse, akciğer kanseri akciğer hücrelerinde başlar ve beyin kanseri beyin hücrelerinde başlar. Kanserler ayrıca, bir epitelial hücre veya skuamöz bir hücre gibi, onları oluşturan hücre tipi ile tarif edilebilir.

#### 2.1.1. Kanser Tipleri

Yüzden fazla kanser çeşidi vardır. Kanser tipine göre bulgu ve tedavi yöntemleri değişkenlik göstermektedir. Kanserin başlıca tiplerini sınıflandırmak gerekirse;

##### ➤ **Karsinoma**

En sık görülen kanser türüdür. Vücudun iç ve dış yüzeylerini örten hücreler olan epitel hücreleri tarafından oluşturulurlar. Mikroskop altında bakıldığında genellikle

sütun benzeri bir şekilde sahip birçok epitel hücresi türü vardır. Farklı epitel hücre tiplerinde başlayan karsinomların spesifik isimleri vardır:

Adenokarsinom, sıvı veya mukus üreten epitel hücrelerinde oluşan bir kanserdir. Meme, kolon ve prostat kanserlerinin çoğu adenokarsinomdur.

Bazal hücreli karsinom, epiderminin alt veya bazal tabakasında başlayan bir kanserdir. Deri ya da iç organları kapsayan kanser türlerindedir.

Skvamöz hücreli karsinom, derinin dış yüzeyinin hemen altında yatan epitelyal hücreleri olan skuamöz hücrelerde oluşan bir kanserdir.

Geçiş hücresi karsinomu, geçiş epiteli veya ürotelium adı verilen bir tür epitel dokusunda oluşan bir kanserdir. Mesane, üreter ve böbreklerin bazı kanserleri, geçiş hücreli karsinomlardır.

#### ➤ **Sarkoma**

Kas, yağ, kan damarları, lenf damarları ve fibröz doku dahil kemik ve yumuşak dokularda oluşan kanserlerdir.

#### ➤ **Lösemi**

Kemik iliğinin kan oluşturucu dokusunda başlayan kanserlerdir. Bu kanserler, katı tümörlerden oluşurmaz. Bunun yerine, kanda ve kemik iliğinde çok sayıda anormal beyaz kan hücresi birikerek normal kan hücrelerinin azalmasına neden olur. Düşük seviyedeki normal kan hücreleri vücudun dokularına oksijen almasını, kanamayı kontrol etmesini veya enfeksiyonlarla savaşmasını zorlaştırabilir. Hastalığın ne kadar çabuk kötüye gittiğine (akut veya kronik) ve kanserin başladığı kan hücresi türüne (lenfoblastik veya miyeloid) göre gruplanan dört yaygın türü vardır.

#### ➤ **Lenfoma**

Lenfositlerde başlayan kanserdir. Bunlar bağışıklık sisteminin bir parçası olan hastalıklarla savaşan beyaz kan hücreleridir. Lenfomada, lenf bezlerinde ve lenf damarlarında ve vücudun diğer organlarında anormal lenfositler oluşur. İki ana lenfoma türü vardır:

Hodgkin lenfoma - Bu hastalığı olan kişilerin Reed-Sternberg hücreleri olarak adlandırılan anormal lenfositleri vardır. Bu hücreler genellikle B hücrelerinden oluşur.

Non-Hodgkin lenfoma - Bu lenfositlerde başlayan büyük bir kanser grubudur. Kanserler hızlı veya yavaş büyüyebilir ve B hücrelerinden veya T hücrelerinden oluşabilir.

### ➤ **Multipl Miyelom**

Multipl miyelom, başka bir immün hücre tipi olan plazma hücrelerinde başlayan kanserdir. Miyelom hücreleri adı verilen anormal plazma hücreleri, kemik iliğinde birikir ve tüm vücuttaki kemiklerde tümörler oluşturur.

### ➤ **Melanom**

Melanom, melanosit hücrelerinde başlayan kanserdir. Melanomların çoğu ciltte oluşur, ancak melanomlar göz gibi diğer pigmentli dokularda da oluşabilir.

### ➤ **Beyin ve Omurilik Tümörleri**

Farklı beyin ve omurilik tümörleri vardır. Bu tümörler, oluşturdukları hücre tipine ve tümörün ilk olarak merkezi sinir sisteminde olduğu yere göre adlandırılır. Örneğin, astrositik bir tümör, sinir hücrelerini sağlıklı tutmaya yardımcı olan astrositler adı verilen yıldız şeklindeki beyin hücrelerinde başlar.

### ➤ **Diğer Tümör Tipleri**

Germ hücre tümörleri sperm veya yumurtalara yol açan hücrelerde başlayan bir tümör türüdür. Bu tümörler vücutta hemen hemen her yerde oluşabilir ve iyi huylu veya kötü huylu olabilir.

Nöroendokrin Tümörleri ise sinir sisteminden gelen bir sinyale yanıt olarak kana hormon salgılayan hücrelerden oluşur. Normalden fazla hormon üretebilen bu tümörler birçok farklı semptomlara neden olabilir. Nöroendokrin tümörleri iyi huylu veya kötü huylu olabilir.

Karsinoid tümörler bir tür nöroendokrin tümördür. Genellikle gastrointestinal sistemde bulunan yavaş büyüyen tümörlerdir. Karsinoid tümörler karaciğere veya vücuttaki diğer bölgelere yayılabilir ve serotonin veya prostaglandinler gibi maddeler salgılayabilir ve karsinoid sendromuna neden olabilir (National Cancer Institute, 2015).

## **2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri**

**Klonal orijin:** Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğmasına rağmen bazı kanser türlerinin birden fazla malign klonla sahiptir. Bu klonlar ya

dokunun birden fazla hücrenin karsinojene maruz kalmasıyla “field defect” ya da bazı kalıtsal hasarlar sonucu oluşurlar.

**Ölümsüzlük:** İmmortalitenin mekanizmalarından biri telomerlerdir. Hücre bölünürken, çoğu hücre tipinde telomerler kısalır. Ancak, kanser hücrelerinde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde kademeli olarak azalır. Tamamıyla diferansiye olmuş hücre istirahat “senescent” durumuna girer ve ardından çoğalma kapasitesini yitirerek ölür. Fakat, çoğu kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuç olarak telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalmaya devam eder. Genlerdeki kalıtsal hasarlar sonucu oluşurlar.

**Genetik:** DNA tamirindeki ve DNA “mismatche”lerini tanımadaki defektler kanser hücrelerinin heterojen olmasına neden olur. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt vermeye başlarlar. Buna ek olarak klonların yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de giderek artar. Bu durum metastaza neden olur.

**Kontakt inhibisyonun kaybı:** Kültür ortamında büyüyen normal hücreler substrata tutunurlarsa bölünebilirler. Konfluent hale geldiklerinde besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin nütrientleri içerse bile bölünme özelliklerini kaybederler. Kanser hücreleri ise normal hücrelerin aksine substrata yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye devam edebilirler. Hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyümeye devam edebilirler.

**Proliferasyonun sürekli artışı:** Kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler.

**Metastaz:** Benign tümörlerde veya normal hücrelerde karşılaşılmaz. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücrel proteinlerin kaybı ya da anormalliklerinden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metalloproteaz gibi bazı enzimlerle bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır (Lowitz B.B. ve Casciato D.A., 2000).

### 2.1.3. Kansere Neden Olabilecek Etkenler

Kanserde şimdiye kadar araştırılan konulardan birisi de kanserin sebepleridir. Kanserinin sebepleri ve oluşum mekanizmaları halen tam olarak

bilinmemekle birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarla bazı bilgiler elde edilmiştir. Bir kişinin neden kanser geliştirdiğini ve diğerinin neden olmadığını bilmesi genellikle mümkün değildir. Ancak araştırmalar, belirli risk faktörlerinin kişide kanser gelişimine neden olduğunu göstermiştir.

➤ **Yaş:** İleri yaş, kanser genelinde ve birçok bireysel kanser türü için en önemli risk faktörüdür. Ancak hastalık her yaşta ortaya çıkabilir. Örneğin, kemik kanserine en sık 20 yaşın altındaki bireylerde rastlanır.

➤ **Alkol:** Çok miktarda ve uzun süreli alkol alımı ağız, boğaz, yemek borusu, gırtlak, karaciğer ve meme kanseri riskini arttırabilir.

➤ **Karsinojenler:** Kansere, bazı genlerdeki değişiklikler neden olur. Bu genetik değişikliklerin bazıları, hücre bölünmesi sürecinde DNA replikasyonu sırasında doğal olarak meydana gelebileceği gibi DNA'ya zarar veren karsinojenlerin de bir sonucu olabilir. Çeşitli meslek gruplarında çalışan insanların karsinojenlerle temaslarının ve buna ek olarak, organ nakillerinden sonra kullanılan bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçların kanser oluşumuna yol açtığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Mesleki nedenlere bağlı oluşan kanserlerin tüm kanser türlerinin yaklaşık % 4'ünü oluşturduğu düşünülmektedir. Ulusal Toksikoloji Programı'nın 14. Kanser Raporuna göre, aşağıda listelenen maddeler, insan sağlığını etkileme olasılığı en yüksek olan kanserojen maddeler arasındadır. Ancak, bir maddenin kanserojen olarak tanımlanması, ancak maddenin mutlaka kansere neden olacağı anlamına gelmez. Pek çok faktör, kansere maruz kalan bir kişinin, maruz kalma miktarı ve süresi ve bireyin genetik arka planı dahil, kanser geliştirip geliştirmeyeceğini etkiler

- Aflatoksin
- Aristolochic Asitler
- Arsenik
- Asbest
- Benzen
- Benzidin
- Berilyum
- 1,3-Bütadien
- Kadmiyum
- Kömür katranı
- Kristal Silika
- Etilen oksit
- Formaldehit
- Hexavalent Krom Bileşikleri
- Kömürün Ev Yanmasından Kaynaklanan İç Ortam Emisyonları
- Mineral Yağlar
- Nikel Bileşikleri
- Radon
- Çevresel Tütün Dumanı
- Sülfürik Asit İçeren Güçlü İnorganik Asit Buharları
- trikloroetilen
- Vinil Klorür
- Talaş

➤ **Beslenme Alışkanlıkları:** Sindirim sistemi kanserleri gibi bazı kanser türleri ile beslenme alışkanlıklarının bağlantılı olduğu bilinmektedir. Kanser oluşmasına neden olabilecek bileşenler aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Akrilamidler; patates gibi bazı yiyeceklerin yüksek ısıya maruz kalması ile ortaya çıkan bir kimyasaldır. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, akrilamid maruziyetinin birkaç kanser türü için riski arttırdığını bulmuştur.

Kömürleşmiş et; HCA ve PAH olarak adlandırılan bazı kimyasallar kırmızı veya beyaz etin yüksek sıcaklık yöntemleri kullanılarak pişirilmesi ile oluşur. Yüksek HCA ve PAH seviyelerine maruz kalmak kansere neden olabilir, ancak böyle bir maruz kalımın insanlarda kansere neden olup olmadığı belirsizdir.

➤ **Hormonlar:** östrojen, insan kanserojenleri olarak bilinir. Bu hormonların hem kadınlarda hem de erkeklerde temel fizyolojik rolleri olmasına rağmen, belirli kanser riskleri ile de ilişkilidirler. Örneğin, birleşik menopozal hormon tedavisi (kadınlık hormonu progesteronunun sentetik bir versiyonu olan östrojen ve progestin) almak bir kadının meme kanseri riskini artırabilir. Araştırmalar ayrıca bir kadının meme kanserinin östrojen ve progesteron ile ilgili olduğunu göstermiştir. Uzun süre ve/veya bu hormonların yüksek seviyelerine maruz kalmak, artan meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir.

➤ **Radyasyon:** İyonlaştırıcı radyasyon adı verilen belirli dalga boylarında radyasyon, DNA'ya zarar vermek ve kansere neden olmak için yeterli enerjiye sahiptir. İyonize radyasyon, radon, x ışınları, gama ışınları ve diğer yüksek enerjili radyasyon formlarını içerir. Başta lösemiler ve epitelyal kanserler olmak üzere iyonize radyasyonun çeşitli kanserlere yol açtığı görülmüştür.

➤ **Hava kirliliği:** Tek başına ya da sigara kullanımıyla birlikte akciğer kanserlerinin ortaya çıkmasında yaklaşık % 10 oranında rol oynamaktadır.

➤ **Virüsler:** Bazı virüslerin deney hayvanlarında kansere yol açtığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İnsanlarda da bazı virüslerin kansere yol açtığı ortaya konmuştur. Örnek vermek gerekirse, Hepatit-B virüsünün karaciğer kanseri ile, Epstein-Barr virüsünün Burkitt lenfoma ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

➤ **Ultraviyole:** Güneş ve bronzlaşma kabinleri ultraviyole (UV) radyasyonu yayar. UV radyasyonuna maruz kalmak cildin erken yaşlanmasına ve cilt kanserine yol açabilecek cilt hasarlarına neden olur. Deri rengi açık insanlar, açık havada çalışanlar ve kontrolsüz şekilde güneş ışığına maruz kalanlarda deri kanserleri daha sık görülmektedir.

➤ **Sigara:** Tütün kullanımı kanserin ve kanserden ölümlerin önde gelen bir nedenidir. Sigara ile akciğer kanserinin ilişkisi kesin olarak kanıtlanmış olup, sigara ayrıca larenks, ağız boşluğu, yutak, mesane ve pankreas kanserleri riskini de arttırmaktadır.



➤ **Genetik:** Kanserin tek nedeni kalıtsal bozukluklar değildir. Ancak kansere sebep olan genetik bozulmalar, eğer vücudun üreme hücreleri olan germ (yumurta ve sperm) hücrelerinde ise, kanser genetik olarak taşınabilir. Ancak kansere neden olan bir mutasyon mevcut olsa bile, mutasyonu miras alan herkes mutlaka kanser geliştirmez. Bazı ailelerde ise, hiç bir ailevi geçiş olmadığı halde bazı kanserler daha sık görülmektedir örneğin, meme, kalın barsak, mide kanserleri. Kalıtsal genetik mutasyonlar tüm kanserlerin yaklaşık %5-10'unda önemli bir rol oynar. Genetik olarak ortaya çıkan kanserlere örnek olarak meme kanseri verilebilir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde oluşan kalıtsal mutasyonlar, kadınlarda meme ve yumurtalık kanseri riskinin artmasına neden olduğu bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ancak her bir insanın kanseri, genetik değişikliklerinden benzersiz olarak farklılık gösterir. Sonuç olarak kanser tek bir sebebe değil birden çok sebebe bağlı olarak gelişen bir hastalıktır (National Cancer Institute, Kutluk ve Kars, 1992).

#### 2.1.4. Kanserin Belirtileri

Kanserin belirtileri hastalığın bulunduğu organa ve vücuttaki yayılım derecesine göre çeşitlilik gösterir. Buna ek olarak aynı hastalık kişiden kişiye de değişiklikler gösterebilir. Kanser belirtilerinin çeşitliliğine rağmen, aşağıda sıklıkla karşılaşılan belirtiler özetlenmiştir. Ancak bu belirtilerin iyi huylu tümörler veya diğer problemlerden de kaynaklanabileceği unutulmamalıdır.

- Vücutta oluşan nedensiz şişlikler
- Cilt değişiklikleri
- Sebepsiz ve iyileşmeyen yaralar
- Değişik bölgelerde olağan dışı kanama
- Meme değişiklikleri
- Hiçbir neden olmaksızın oluşan kilo kaybı
- Yutma zorluğu
- Ses kısıklığı veya geçmeyen öksürük
- Bağırsak alışkanlıklarındaki değişiklikler
- Yemek yeme ile ilgili sorunlar
- Açıklanamayan gece terlemeleri
- Zayıf veya çok yorgun hissetmek

#### 2.1.5. Kanser Tedavisi

Bilindiği gibi birçok kanser türü ve buna bağlı olarak da birçok kanser tedavisi vardır. Tedavi kanser türüne ve ne kadar yayılmış olduğuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Kanserli hastaların çoğu kemoterapi ve radyasyon tedavisi ile yapılan cerrahi tedavi gibi bir kombinasyona sahiptir. Uygulanan bu tedaviler birçok yan etkiyi de beraberinde getirmektedir. Ayrıca immünoterapi, hedefli tedavi ve hormon tedavisi günümüzde kullanılan alternatif tedavi yöntemlerindedir. Kanser tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler;

## ➤ Cerrahi

Cerrahi, eski zamanlardan beri kullanılan tümörü vücuttan uzaklaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Buna ek olarak tanı konulması, metastazın önlenmesi ve önleyici olarak da cerrahi yöntemleri kullanmak mümkündür. Ancak cerrahi yöntemler bazı riskleri de beraberinde getirir. Kısaca özetlemek gerekirse;

- ❖ **Ağrı:** Ameliyattan sonra, birçok hasta ameliyat bölgesinde ağrı hisseder.
- ❖ **Enfeksiyon:** Enfeksiyon ameliyattan sonra meydana gelebilecek bir diğer problemdir. Enfeksiyon tedavisi alınan antibiyotiklerle tedavi edilebilir.
- ❖ **Diğer riskler:** Kanama, yakındaki dokulara hasar ve anestezi reaksiyonlarıdır.

## ➤ Radyoterapi

Radyoterapi diğer bir adıyla radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek veya tümörlerinin DNA'larına zarar vererek küçültmek için yüksek doz radyasyon kullanan bir kanser tedavi yöntemidir. X-ışınları, gamma ışınları, elektronlar gibi iyonize ışınlar radyoterapide kullanılır. External beam ve internal beam olarak iki ana tür radyoterapi çeşidi vardır. Radyasyon tipi türü kanserin türüne, tümör boyutuna, tümörün vücutta bulunduğu bölgeye, yaşa bağlı olarak seçilir.

**External Radyasyon Tedavisi:** Yerel bir tedavidir, vücudun belirli bir bölümü tedavi edilir. Birçok kanser bu yöntemle tedavi edilir.

**Internal Radyasyon Tedavisi:** Vücuduna radyasyon kaynağı yerleştirilen bir tedavidir. Radyasyon kaynağı katı veya sıvı olabilir. Katı bir kaynağa sahip iç radyasyon terapisine brakiterapi denir. Radyasyon kaynağı içeren tohumlar, şeritler veya kapsüller, vücuda tümörün içine veya yakınına yerleştirilerek vücudun belirli bir bölümü tedavi edilir. Böylece radyoterapinin yan etkisi olan sağlam dokuların hasarı büyük ölçüde azaltılmış olur. Baş ve boyun, meme, serviks, prostat ve göz kanserleri tedavi edilebilir (National Cancer Institute, 2015; TC. Sağlık Bakanlığı).

## ➤ Kemoterapi

Kanser hücrelerini yok etmek veya bu hücrelerin büyümesini kontrol altına almak amacıyla çeşitli ilaçlar kullanılarak yapılan tedavi türüdür (TC. Sağlık Bakanlığı). Cerrahi ve radyoterapi sadece erken tanı konulan ve vücuda yayılım göstermeyen kanserlerde tek başına etkili iken kemoterapi kanserin hangi evresinde olursa olsun kullanılan etkili bir yöntemdir. Kemoterapi 1940'lı yıllarda mustard gazının kan hücrelerine etki ettiğinin gözlenmesi ile kullanılmaya başlanmış ve halen kullanılmaya devam etmektedir. Kemoterapi sistemik bir tedavidir. Hastalığın başladığı yere bağlı kalmayıp yayılmış olan tüm kanserli hücrelere etki eder. Kemoterapide kullanılan ilaçlar kanser hücrelerin bölünmelerini durdurmakta ya da yok etmektedir. Ancak kullanılan bu ilaçlar kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de etki etmekte ve ciddi hayatı tehdit eden yan etkilere neden olur.

Bu yan etkilere örnek olarak: anemi, iştah kaybı, kanama ve çürük, kabızlık, sayıklama, ishal, ödem, yorgunluk, saç dökülmesi, enfeksiyon ve nötropeni, lenfödem, bellek veya konsantrasyon sorunları, ağız ve boğaz sorunları, mide bulantısı ve kusma, sinir problemleri, ağrı ve uyku sorunları gösterilebilir. Bu yan etkiler geçici olabildiği gibi kalıcı olup kalbe, akciğerlere, üreme organlarına etki edebilir (National Cancer Institute, 2015).

### ➤ **İmmünoterapi**

Bağışıklık sisteminizin kanserle savaşmasına yardımcı olan bir kanser tedavisi türüdür. Bir çeşit biyolojik tedavi türüdür. Kanseri tedavi etmek için canlı organizmalar kullanılır. Tedavide çeşitli immünoterapi türleri kullanılır. Bu tedaviler, bağışıklık sisteminin kansere doğrudan saldırmasına ya da bağışıklık sistemini daha genel bir şekilde uyarmasına yardımcı olabilir.

**Kontrol Noktası İnhibitörleri:** Bağışıklık sisteminin bir tümöre daha güçlü yanıt vermesine yardım eder. Bu ilaçlar doğrudan tümörü hedef almaz. Bunun yerine, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi saldırılarını önler.

**Adoptive hücre transferi:** T hücrelerinin kanserle savaşma yeteneğini artırır.

monoklonal antikorlar: Laboratuarda üretilen immün sistem proteinleridir. Bu antikorlar, kanser hücrelerinde bulunan spesifik hedeflere bağlanmak için tasarlanmıştır.

**Tedavi aşıları:** Bağışıklık sisteminizin kanser hücrelerine verdiği tepkiyi artırır (National Cancer Institute, 2018; Kutluk ve Kars, 1992).

### ➤ **Hormon Tedavisi**

Hormon tedavisi, büyümek için hormon kullanan kanser büyümesini yavaşlatan veya durduran bir kanser tedavisidir. Hormon tedavisi, vücudun hormon üretme yeteneğini veya hormonların görevini yerine getirmesini engeller. Bu nedenle yan etkilere neden olur. Bu yan etkiler, aldığınız hormon tedavisi tipine ve vücudunuzun buna nasıl tepki vereceğine bağlı olarak değişir (National Cancer Institute, 2015).

### ➤ **Hedefli Tedavi**

Kanser hücrelerinde, büyümelerine, bölünmelerine ve yayılmalarına yardımcı olan değişiklikleri hedefleyen bir tür kanser tedavisidir. Hedefe yönelik tedavilerin birçoğu, tümörlerin büyümesine ve yayılmasına neden olan spesifik proteinlere etki ederek kanseri tedavi etmektedirler. Bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini yok etmesine yardım etmektedirler. Hedefli tedaviler kanser hücrelerini işaretleyerek bağışıklık sisteminin kanserli hücreleri bulmasını ve apoptozunu kolaylaştırır.

Kanserin kontrolsüz büyümesini yavaşlatırlar. Anjiyogenez inhibitörleri olarak adlandırılan bazı hedefli tedaviler, bir kan kaynağının oluşmasını engelleyecek şekilde tasarlanmıştır. Kan desteği olmadan tümör hücreleri büyüyemez ya da kan damarlarının ölmesine neden olarak tümörün küçülmesine yardımcı olur. Bazı monoklonal antikorlar toksinler, kemoterapi ilaçları ve radyasyonla birleştirilir. Bu monoklonal antikorlar, kanser hücrelerinin yüzeyindeki hedeflere bağlandığında, hücreler, sitotoksik maddeleri alır ve hedef hücrelerin ölmesine neden olur (National Cancer Institute, 2018).

## 2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, anormal hücrelerin akciğerlerde kontrolsüz bir şekilde bölünmesine neden olan bir durumdur (Medical News Today, 2018). Akciğer kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki en yaygın kanser türlerinden biri olmakla birlikte bugüne kadar kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Ulusal Kanser Enstitüsü'ne (NCI) göre, 2018'de 234.000'den fazla Amerikalıya akciğer kanseri teşhisi kondu. Tahmini 154.000 Amerikalı, 2018'de akciğer kanserinden hayatını kaybetmiştir. Akciğer kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm kanser ölümlerinin yüzde 25'ini oluşturur (Cancer treatment center of America). Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan globocan 2012 verilerine göre Türkiye'de ve Dünya'da erkeklerde en sık görülen kanser türünün akciğer kanseri olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra yine IARC tarafından yayınlanan çalışmada akciğer kanseri görülme sıklığı kadınlarda Türkiye'de beşinci sırada Dünyada ise dördüncü sırada olduğu rapor edilmiştir. (TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2017) . Akciğer kanserinin iki ana türü vardır: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (SCLC) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (NSCLC). SCLC, akciğer kanserlerinin yüzde 20'sinden daha azını oluşturur ve tipik olarak tütün içmesinden kaynaklanır Erken teşhisi zordur. NSCLC en sık görülen akciğer kanseri türüdür. NSCLC, her 10 tanıdan yaklaşık dokuzu oluşturur. Beyin, karaciğer, kemik iliğine metastaz yapar ve tipik olarak SCLC'den daha yavaş büyür. Üç temel NSCLC türü vardır:

**Adenokarsinom:** tüm akciğer kanseri vakalarının yüzde 30 ila 35'ini ve NSCLC'nin yaklaşık yarısını oluşturan en yaygın akciğer kanseri şeklidir. Adenokarsinom, akciğerin dış bölgesinde bulunur.

**Skuamöz hücre:** daha büyük bronşların trakeadan akciğere veya ana hava yolu dallarından birinde birleştiği akciğerde merkezi olarak bulunur. Skuamöz hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık yüzde 30'undan sorumludur ve genellikle sigara ile bağlantılıdır.

**Büyük hücreli farklılaşmamış karsinom:** Büyük hücreli farklılaşmamış karsinom akciğer kanseri hızla büyür ve yayılır ve akciğerde herhangi bir yerde bulunabilir. Bu tip akciğer kanseri genellikle tüm NSCLC vakalarının yüzde 10 ila 15'ini oluşturur. Büyük hücreli farklılaşmamış karsinom hızlı bir şekilde büyümeye ve

yayılmaya meyillidir (Cancer treatment center of America). Akciğer kanserleri inatçı öksürük, kanlı balgam, ağrı, ses kısıklığı, boyunda şişme, omuz ve kol ağrısı sık tekrarlayan akciğer enfeksiyonları ile ortaya çıkar (Kutluk T. ve Kars A., 1992). Tüm kanserlerin % 13.4' ünü akciğer kanseri oluştururken, tüm kanser ölümlerinin % 28.4' ünden akciğer kanseri sorumludur. ABD'de akciğer dışı kanserlerde beş yıllık sağkalım % 52 iken, akciğer kanserinde % 14 olup, artan tedavi olanaklarına rağmen mortalite daha da artmıştır (Bunn PA, 2000 ).

### 2.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlangıcında nadir olarak rastlanan bir hastalıkken, 1950 yılından itibaren sıklığı artmıştır (Loeb LA et al., 1984). Bu artışta risk faktörlerinin yanı sıra, hem epidemiyolojik verilerin elde edilebilirliğinin artması, hem de ortalama yaşam süresinin artmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Kadınlarda akciğer kanseri insidansı 1960 yılında 6/100000 iken, 1990 yılında bu oran > 40/100000 olarak bildirilmiştir (Rivera MP et al., 2004). 2000 yılında, dünyada tanı koyulan akciğer kanserli olgu sayısının 1.2 milyon olduğu ve akciğer kanserli olguların tüm kanserli olguların % 12.3'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir (Ginsberg MS et al., 2007). 2008 yılı WHO verilerine göre erkeklerde akciğer kanseri en sık görülen kanserdir (erkeklerde tüm yeni vakaların % 16,5'i). Akciğer kanseri, hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir. Erkeklerde prostat kanseri daha yaygın iken kadınlarda ise meme kanserine daha sık rastlanmaktadır. Tüm yeni kanser vakalarının yaklaşık % 13'ünü akciğer kanseri oluşturur. Amerikan Kanser Derneği'nin 2019'da ABD'deki akciğer kanseri tahminleri:

- Yaklaşık 228.150 yeni akciğer kanseri vakası (erkeklerde 116,440 ve kadınlarda 111,710)
- Akciğer kanserinden yaklaşık 142.670 ölüm (erkeklerde 76.650 ve kadınlarda 66.020) (Amerikan Kanser Derneği)

Akciğer kanseri, hem erkekler hem de kadınlar arasında en önemli kanser ölüm nedenidir. Akciğer kanseri çoğunlukla yaşlılarda görülür.

### 2.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer kanseri için risk faktörleri sigara, çevre ve mesleki maruziyet ve olasılıkla diyet ve genetik faktörlerdir (Çınar Z., 2010). Akciğer kanseri çoğunlukla çevresel maruziyetle ilişkili olmasına rağmen çevresel karsinojenlere karşı hassasiyet bireysel olarak farklılık gösterebilmektedir. Hastalığın oluşumu, çevresel etiyolojik ve koruyucu ajanlara maruziyet ile bunlara karşı bireysel yatkınlığın etkileşimi ile ilişkilidir. Ayrıca sigara ve asbest gibi birden fazla faktörün bir arada bulunması, bir veya birden fazla çevresel etkenle beraber genetik

yatkınlığın birlikteliği hastalığın ortaya çıkmasında sinerjistik etkiye neden olduğu bildirilmektedir (Uçar O., 2010).

### ➤ **Sigara İçimi**

Sigara içmek, akciğer kanseri için en önemli risk faktörüdür. Akciğer kanseri ölümlerinin yaklaşık % 80'inin sigaradan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sigara içenler arasında akciğer kanseri riski, sigara içmeyenlere göre çok daha fazladır. Düşük katranlı veya "hafif" sigaralar, normal sigara kadar akciğer kanseri riskini artırır. Başkalarının dumanını solumak, akciğer kanseri gelişme riskini artırabilir. İkin-ci el sigara dumanının her yıl akciğer kanserinden 7.000'den fazla ölüme neden olduğu düşünülmektedir (American Cancer Society). Sigara kullananlarda bronş karsinomu gelişme riskini etkileyen faktörler kısaca; sigara içme süresi, başlama yaşı, içilen sigara tipi ve günlük tüketilen sigara sayısı olarak listelenebilir. Sigara dumanı, karsinojenlerin DNA'da hatalı kodlama ve mutasyon oluşturmasına neden olmaktadır. Sigara karsinojenler, kokarsinojenler (kendileri karsinojen olmayan ancak diğer maddelere karsinojen özellik kazandıranlar) ve tümör promotörleri olmak üzere binlerce madde içermektedir. Sigara dumanı 6000 kadar kimyasal maddeden oluşmakta olup bunlardan yaklaşık elli beşinin karsinojen olduğu bilinmektedir.

### ➤ **Beslenme**

Beslenmenin akciğer kanseri üzerinde hem koruyucu hem de zarar verici etkisi yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Antioksidan ve vitaminler sayesinde sebze ve meyveler, koruyucu gıda grubunda yer almaktadır. Flavonoid içeren elma, greyluft, kırmızı şarap, domates, havuç, brokoli ve çayın akciğer kanserine karşı koruyucu olabileceği tespit edilmiştir. Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerince zengin beslenmenin akciğer kanserini azalttığı gösterilmiştir. Yeşil ayın kanserden koruyucu özelliği olduğu ve metastazı önlediği ancak doymuş yağlarca ve kolesterolce zengin beslenmenin akciğer kanseri riskini arttırdığı, folat eksikliğinin ise bronşiyal epitelde premalign lezyonlara sebep olduğu öne sürülmüştür (zbaşoğlu K., 2013). İçme suyunda arsenik seviyesi yüksek olan Güneydoğu Asya ve Güney Amerika'nın bazı bölgelerinde yapılan araştırmalar, akciğer kanseri riskinin daha yüksek olduğunu ortaya çıkardı (American Cancer Society).

### ➤ **Maruziyet**

Katran ve is içeren ortamlarda çalışan işçilerde akciğer kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. Arsenik, krom, nikel gibi çok sayıda metale, mesleki maruziyet durumunda da akciğer kanserini arttırdığı düşünülmektedir. Yapılan alışmalar asbest ile çalışan insanların akciğer kanserinden ölme olasılıkları birkaç kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Büyük miktarlarda asbeste maruz kalan insanlar da, plevrada başlayan bir tür kanser olan mezotelyoma gelişme riski daha yüksektir.

### ➤ Radyasyon

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)'ya göre, radon akciğer kanserinin ikinci önde gelen nedeni ve sigara içmeyenler arasında önde gelen nedenlerden biridir. Akciğer kanserinin iyonize radyasyonla ortaya çıkan kanserlerden biri olduğunu gösterilmiştir. Radon, uranyumun radyuma bozunması sürecinde doğal olarak ortaya çıkan renksiz, kokusuz, radyoaktif bir gazdır. Radondan salınan  $\alpha$  partikülleri solunum epiteli hücrelerinde DNA hasarına yol açabilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda uranyum madeni işçilerinde akciğer kanseri olduğu gösterilmiştir (American Cancer Society, Özbaşıoğlu K., 2013).

### ➤ Çevresel Etmenler

Akciğer kanserine atmosfer kirliliği, biyolojik yakıt, kimyasal ürünler etken olarak gösterilebilir. Havadaki düşük konsantrasyonlardaki karsinojenler akciğer kanseri riskini arttırabilir. Fosil yakıtların yakılması ile ortaya çıkan poliaromatik hidrokarbonlar, arsenik, nikel, krom, kömür dumanı, egzoz dumanı havayı kirleten önemli karsinojen etkenlerdir. Akciğer kanseri riskini arttırabilecek diğer kanserojenlere ise uranyum gibi radyoaktif cevherler, arsenik, berilyum, kadmiyum, silika, vinil klorür, nikel bileşikleri, krom bileşikleri, kömür ürünleri, hardal gazı ve klorometil eterler gibi solunan kimyasalları, dizel egzoz sayılabilir.

### ➤ Geçirilmiş Akciğer Hastalıkları

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) başta olmak üzere fibrozisle seyreden restriktif hastalıklar, silikozis, diğer pnömokonyozlar, idiyopatik pulmoner fibrozis (İPF) akciğer kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir. Herhangi bir nedenle akciğerde oluşan fibrotik yara dokusu akciğer kanser riskini arttırır.

### ➤ Genetik Duyarlılık

Ailesel soy ağacının analizi, akciğer kanserinin diğer kanserlerle birlikte belli ailelerde daha çok görüldüğünü kanıtlanmıştır. Birçok çalışmada akciğer kanserli hastaların ailelerinde, kontrollere nazaran 2–5 kez daha fazla akciğer kanserine rastlandığı gösterilmiştir (Özbaşıoğlu K., 2013).

## 2.3. Kemoterapi İlaçları

Konakçıya zarar vermeden hastalığa sebep olan etkenlere toksik ya da öldürücü etki yapan kimyasal maddelere kemoterapötikler denir. Kemoterapötikler mikroorganizmalardan elde edilmez bu yönüyle antibiyotiklerden ayrılır. Kemoterapi kelimenin tam anlamıyla ilaç tedavisi anlamına gelmektedir. Kanser tedavisinde ise kemoterapi yine aynı anlama gelmekte olup hücreleri öldüren (sitotoksik) ilaçlarla muamele anlamına gelmektedir. kanser hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlara antineoplastik ilaçlar ya da kemoterapötikler adı

verilmektedir. Tedavide kullanılan bu ilaçların dezentajlarından bir tanesi de kanser hücresinin yanı sıra normal vücut hücrelerine (özellikle hızlı yenilenen hücreler) de etki etmesidir. Bu durum istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu etkiler kısaca;

**Kemik iliği baskılanması:** Lökopeni ve anemi ile karşılaşılabilir.

**Nefrotoksisite:** Böbrek hasarına neden olabilirler.

**Hepatik fonksiyon değişiklikleri:** Fibrozis gözlenebilir.

**Akciğer toksisitesi:** Çocuklarda öksürük, dispne, ateş ve siyanoza ortaya çıkabilir.

**Nörotoksisite:** Ense sertliği ve baş ağrısı gözlenebilir.

**Lenfotoksisite:** Lenfoid dokuların hızlı çoğalan hücrelerinin çoğalmasını yavaşlatır.

**Teratojenik etkiler:** Gebelerde düşüklere neden olur.

**Kanserojenik ve mutojenik etki:** Kromozom bozuklukları ile birlikte karsinojik etkiler de gözlenebilir.

**Gastrointestinal sistem toksisitesi:** İshal, kusma, bulantı, ağız ve bağırsaklarda yara oluşması gözlenebilir.

**Üreme sistemine etkileri:** Sperm ve ovum yapımının bozulması, adet düzensizliği ve kısırlık ortaya çıkabilir.

**Alopesi:** Saç, kıl ve tüylerde dökülmelere rastlanır.

**Alerjik reaksiyonlar:** Cilt döküntüleri gibi çeşitli alerjik reaksiyonlara rastlanabilir.

**Bağışıklık sisteminin baskılanması:** Sık sık enfeksiyon gelişimi ortaya çıkabilir.

### 2.3.1. Kemoterapi İlaçları Sınıflandırılması

Çalışma şekillerine, kimyasal yapılarına ve diğer ilaçlarla olan etkileşimlerine göre birkaç gruba ayrılır. Bazı ilaçlar birden fazla yola ve birden fazla gruba ait olabilirler.

#### ➤ Alkilleiyici İlaçlar



Alkilleyici ajanlar DNA çift zincirinde birden fazla noktaya kovalent olarak bağlanır. DNA üzerindeki bu değişiklikler protein ve enzimleri alkilleyerek işlevlerini bozar. Hücrede solunum durur. Bu durum hücre bölünmesinin durmasına neden olurlar. Bu ilaçlar lösemi, lenfoma, Hodking lenfoma, miyeloma, sarkoma gibi birçok farklı kanser tedavisinde kullanılabilir. Kemik iliği ve lenfoid dokuda uzun süreli hasara neden olabilir. Bu durum akut lösemiye neden olabilir. Alkilleyici ajanların neden olduğu lösemi doz bağımlıdır anlamı düşük dozlarda risk azdır ancak toplam miktarındaki artışla birlikte risk de artar. Bununla birlikte teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkileri de vardır. Alkilleyici ilaçlar çeşitli gruplara ayrılır:

❖ **Azotlu di-(2-kloroetil) türevleri:**

**Mekloreタミン:** Azotlu hardal gazından I. Dünya Savaşı zamanında üretilmiştir. Lenfatik kanserlerde kullanılmaktadır.

**Siklofosamid ve İfosamid:** Lenfoma türlerinde ve meme kanserinde tercih edilir.

- ❖ **Etilenimler:** Trietilen melamin, Tiotepa ve Alteramin ilaçları bu grupta yer almaktadır.
- ❖ **Alkilsülfonatlar:** Busolfan ve Treosulfan ilaçları bu grupta yer almaktadır.
- ❖ **Nitrozoüre grubu ilaçlar:** Santral sinir sistemine etki ederler. Bu nedenle beyin tümörlerinin tedavisinde tercih edilir. Kamustin bu grupta yer almaktadır.
- ❖ **Triazen ve hidrazen türevleri:** Dakarbazin ve Prokarbazin ilaçları örnek olarak verilebilir.

Cisplatin gibi platinyum ilaçlar, temozolomid ve prokarbazin etki mekanizmaları açısından alkilleyici ajanlara benzerlik göstermektedir. Testis, over, mesane, prostat, serviks gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılır. En ciddi hayatı tehdit edici istenmeyen etkileri akut ve kronik böbrek yetmezliğine neden olmasındır.

➤ **Antimetabolitler**

Hücre yapı taşlarının sentezinde rol alan enzimlerin sentezini bozar ya da enzimlerin yerine geçerek etki gösterirler. Bu grupta bulunan ilaçlar:

- ❖ **Folik asit antimetabolitleri:** Protein sentezini baskılayarak hücre ölümüne neden olur. Örnek olarak:

**Metotreksat:** Dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder. Pürin nükleotidlerinin biyosentezinin durmasına neden olarak DNA ve RNA sentezi için gerekli olan ATP yapımını engeller. Bu ajanlar hücrelerin kromozomları kopyalanırken S fazı boyunca hücrelere hasar verir. Solid tümörlerin tedavisinde kullanılır.

**Raltirekset:** Timidilat sentetaz enzimini indükler. İleri evre kolon kanseri, over ve meme kanseri gibi tümörlerin tedavisinde kullanılır.

❖ **Pürin antimetabolitleri:** Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılır. Örnek olarak:

**6-Merkaptopurin ve Tioguanin:** DNA ve RNA sentezini bozar.

**Fludarabin:** Adenin analogu olarak etki gösterir.

❖ **Pirimidin antimetabolitleri:** Pirimidin sentezini durdurur. Örnek olarak:

**Sitozin arabinozid:** Deoksisitidinin nükleozid analogu olarak görev alır. Lenfositik lösemi ve bazı malign lenfomaların tedavisinde kullanılır.

**5-Fluorourasil:** Timin sentezini durdurarak DNA sentezini bozar.

**Gemsitabin:** Deoksisitidin analogu olarak işlev yapar. NSCLC tedavisinde sıklıkla kullanılır.

### ➤ **Anti-Tümör Antibiyotikler**

Kanser hücreleri DNA'nın yapısını bozarak hücre bölünmesine engel olur. Birçok farklı atitumor antibiyotik vardır:

**Daktinomisin:** Guanin-Sitozin baz çiftlerinin arasına interşelasyon yaparak DNA sentezini ve m-RNA sentezini engeller. Yumuşak doku kanserlerinde ve Willm's tümörü tedavisinde tercih edilir. Kemik iliğini baskılanması gibi birçok yan etkisi bulunmaktadır.

**Daunorubusin:** Topoizomeraz 2 enzimine bağlanarak DNA hasarı yaratır. Lösemi tedavisinde kullanılır.

**Doksorubusin:** Daunorubusin bir türevidir. Meme ve mide kanserleri, lenfomalar gibi bir çok tümörün tedavisinde kullanılır. Kardiyotoksiktir.

**Bleomisin:** Serbest radikaller oluşturarak DNA hasarı oluşturur. Testis tümörü tedavisinde kullanılır. Akciğerde pnömonitis ve fibrozise neden olur.

**Mitoksantron:** Meme ve prostat tedavisinde kullanılır.

### ➤ **Bitkisel Kaynaklı Ajanlar**

Çeşitli bitkilerden elde edilerek kanser tedavisinde kullanılırlar. Mitozun metafaz döneminde görülen mikrotübüllerini etkileyerek hücre bölünmesini durdurur. Ancak hücre çoğalması için gerekli olan proteinleri yapan enzimlere tüm hücre döngüsünde zarar verebilirler. Meme kanseri, karaciğer, miyeloma, lenfoma ve lösemi gibi birçok kanser tedavisinde kullanılabilir. Bu ilaçlar sinir hasarına neden olabilir. Örnek vermek gerekirse;

**Vinblastin:** Cezayir menekşesinden elde edilir. Testis kanseri ve lenfoma gibi bazı tümörlerin tedavisi için tercih edilir.

**Vinkristin:** Lenfom, nöroblastoma akciğer kanseri gibi tümörlerin tedavisinde etkilidir. Yüksek miktarları otonom nörapatiye neden olmaktadır.

**Paklitaksel:** Over ve metastatik meme kanserinde, küçük hücreli akciğer kanserinde bazı baş ve boyun kanserlerinde tercih edilir.

**Dosetaksel:** Meme kanserinde ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılır.

### ➤ **Hormon ve Hormon Antagonistleri**

Hormon duyarlı tümörlerde tedavi sonucu tümör gelişimi, tümör büyüme hızı yavaşlatılır. Kemoterapiden kaynaklanan bulantı ve kusmayı önlemek için kullanılır. Ayrıca kemoterapiden önce alerjik reaksiyonu önlemek için kullanılır. Örnek olarak:

**Glukokortikoid hormonlar:** Lenfoid dokuda proliferasyonu inhibe ederek çalışırlar. Glukokortikoid hormonlar lösemi, Hodgking lenfomalarda kullanılırlar. Buna ek olarak diğer ilaçların yan etkilerini azaltmak için de kullanılır. Bu grup içinde Prednizon en sık kullanılan ilaçtır.

**Antiandrojenler:** Androjenlerin etkisini bloke eder. Prostat kanseri tedavisinde kullanılır.

**Gonodotropin salgılatıcı hormon:** Löprolid ve Goserelin prostat kanseri tedavisinde kullanılır.

**Progestinler:** Progesteron hormonuna benzer etki gösterir. Endometrium karsinomu, metastatik renal karsinom, meme kanseri ve prostat kanserinde kullanılır.

**Östrojenler:** Meme ve prostat kanseri tedavisi için tercih edilir. Bu grup ilaçlara Tamoksifen (östrojen antagonisti) örnek olarak verilebilir.

### ➤ Diğer Kemoterapi İlaçları

Bazı kemoterapi ilaçları farklı yollarla görevini yerine getirir. Diğer kategorilerin hiçbirine uymaz. Bu ilaçlara örnek olarak:

**L-Asparaginaz:** Çocukluk dönemi akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılan bir tür enzimdir. Kemik iliğini bakılamaması bu ilacı diğer kemoterapi ilaçlarından ayırır ve büyük bir avantaj sağlar. Ancak pıhtılaşma faktörlerine etki etmesi istenmeyen etkilerinden biridir.

**Thalidomide:** Angiogenesis artırarak kanser hücrelerinin gelişimi için ihtiyaç duyduğu kan damarları yapımını engeller. Bu durum, kanser hücrelerinin büyümesini ve gelişimini etkiler.

**Gefitinib:** Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederek eki eder. EGFR hedefe yönelik tedavide sıklıkla hedefleme ajanı olarak kullanılır.

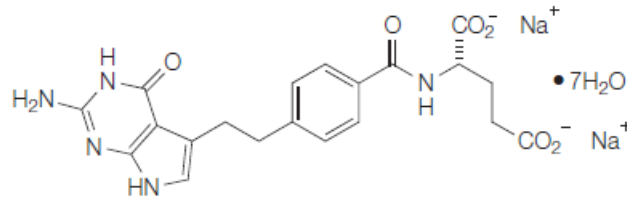
**Bortezomib:** Borik asit türevidir. Hücre içi proteinlerin yapısını bozar.

**Sisplatin, Karboplatin:** Metastatik testis kanseri gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılır.

**Etopozid ve Prokarbazin:** Etopozid akciğer, testis ve diğer bazı kanserlerin tedavisinde kullanılır. (Türker ve Dizdar, 2017)

### 2.3.2. Pemetrexed

Şubat 2004'te, hücre proliferasyonu için gerekli olan folat bağımlı reaksiyonları hedefleyen bir antikanser ilaç olan pemetrexed disodyum (Alimta; Eli Lilly), nadir görülen kanser malign plevral mezotelyoma tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk ilaç oldu (*Nature Publishing Group, 2005*).



**Şekil 2.1.** Pemetrexed disodyum heptahidrat (*L-Glutamik asit, N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-1H-pirrol[2,3-d]primidin-5-yl)etil]benzoyl]-,disodyum tuzu, heptahidrat; C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>•7H<sub>2</sub>O; Mw = 597.49; CAS number: 150399-23-8*)( Nature Publishing Group, 2005)

Pemetrexed 2.3.1. numaralı bölümde de bahsedildiği gibi folat antimetabolitleri sınıfına aittir. Diğer tüm kemoterapötikler gibi Pemetrexed'in de birçok yan etkisi mevcuttur.

Sıklıkla görülen yan etkiler :

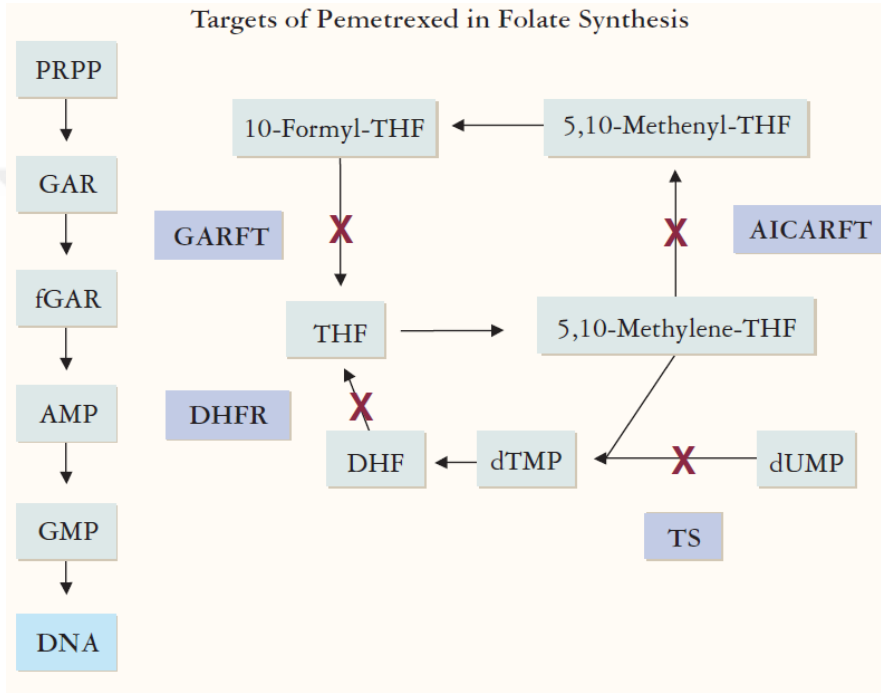
- |                             |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| • Kanlı tükürük             | • Solgun ten                | • Gürültülü                 |
| • Göğüs ağrısı              | • Yüzde kırmızı noktacıklar | nefes alıp verme            |
| • Ateş                      | • Ani                       | • Normal olmayan            |
| • Üşümek                    | başlangıçlı baş ağrıları    | • Normal olamayan yorgunluk |
| • Öksürük                   | • Nefes darlığı             |                             |
| • Koordinasyon kaybı        | • Boğaz ağrısı              |                             |
| • Acılı ve zor idrara çıkma | • Ani görüş değişiklikleri  |                             |
| • Karın ağrısı              |                             |                             |

Nadir rastlanan yan etkiler ise:

- |  |  |
|--|--|
| • Trombosit sayısında düşme. (Kanama riski artar)                              | • Ağızda yara                                |
| • Kanda kreatinin düzeyi artabilir.  | • El veya ayaklarda karıncalanma veya uyuşma |
| • Ateş   | • Depresyon                                  |
| • Grip benzeri şikâyetler: ateş, titreme, genel ağrı, baş ağrısı, iştahsızlık. | • Döküntü, ciltte kızarıklık                 |

Pemetrexed antifolat olarak çalışır. İndirgenmiş folat taşıyıcı (RFC) yoluyla hücrelere taşınır ve folik asite benzer şekilde yüksek afiniteye sahip folat reseptör-a'ya bağlanır. Buna ek olarak Pemetrexed çok ilaca dirençli proteinler (MRP) için substrat olarak görünmektedir. Hücrelere alındığında, aktif pentaglutamati poliglutamata çevirir. Bu reaksiyon folipoliglutamata sentaz (FPGS) ile katalize edilir. Pemetrexed'in diğer klasik antifolatlar ile karşılaştırıldığında, FPGS için en iyi substratlardan biri olduğu saptanmıştır. Pemetrexed'in pentaglutamat formu, baskın hücre içi formudur. Timidilat sentaz (TS) inhibisyonunda monoglutamata formundan 60 kattan fazla etkilidir. Poliglutamasyon pemetrexedi yakalayarak hücre içinde tutulmasını sağlar.

Hücre içine alınan Pemetrexed, pürin ve pirimidin sentezi ile ilgili çoklu enzim hedeflerini inhibe eder. Hedeflerden biri TS'dir. Folat bağımlı bir enzim olan TS, deoksiüridin monofosfatın deoksimidin monofosfata dönüşümünü katalize eder. TS'nin inhibisyonu, DNA sentezi için gerekli olan timidinin azalmasına neden olur. TS'ye ek olarak, glisinamid ribonükleotit formiltransferaz (GARFT) ve purin sentezinde rol oynayan folat bağımlı bir enzim olan dihidrofolat redüktazı (DHFR) da inhibe eder. Böylece hem normal hem de kanser hücre bölünmesi için gerekli genetik metaryellerin oluşumu engellenmiş olur. Bu durum istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına neden olur.



**Şekil 2.2.** Pemetrexed Etki Mekanizması (Şekil Molina J.R., Adjei A.A.,2003, The Role of Pemetrexed (Alimta® , LY231514) in Lung Cancer Therapy makalesinden alınmıştır.)

Kısaltmalar: AICARFT: aminoimidazol karboksamid ribonükleotid formiltransferaz; AMP: adenozin monofosfat; DHF: dihidrofolat; DHFR: dihidrofolat redüktaz; dUMP: deoksiüridin monofosfat; dTMP: deoksitimidin monofosfat; fGAR: formilglisinamid ribonükleotit; GARFT: glisinamid ribonükleotit formiltransferaz; GMP: guanozin monofosfat; PRPP: 5- fosfo-D-ribosil-1 pirofosfat; THF: tetrahidrofolat; TS: timidilat sentaz. (Adjei A.A., 2004 Pharmacology and Mechanism of Action of Pemetrexed; Molina J.R., Adje A.A., 2003, The Role of Pemetrexed (Alimta®, LY231514) in Lung Cancer Therapy).

## 2.4. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Farmasötik açıdan ilacın hedef dokuya taşınması ve bu bölgede etki etmesi en büyük sorun olmuştur. İlaç kullanımında ortaya çıkan bu sorunların çözümünde nanoteknolojiden yararlanılarak ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmeye başlanmıştır.

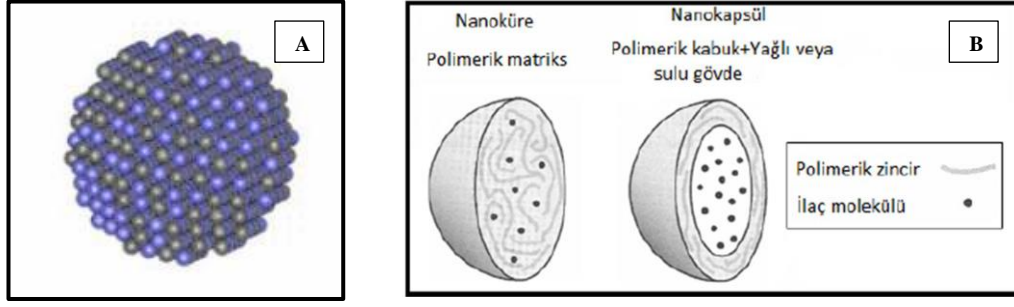
Nanometre, metrenin milyarda biri olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknoloji ise nano boyuttaki maddelerin bilimi olarak tanımlanmıştır. Nanofarmasötik ise nano boyuttaki ilaçları ve taşıyıcı sistemleri içinde barındırmaktadır. Nanoteknoloji ile birlikte ilaç taşıyıcılar geliştirilmiş kan-beyin bariyeri, bronşiyoller gibi çeşitli biyolojik yapıları aşarak ilaçların hedef dokuya taşınması sağlanmıştır. Geliştirilen bu sistemler ile birlikte düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar bile çok kolay çözünebilir, ilaç toksisitesi azaltılabilir ve biyoyararlanımı daha yüksek ilaçlar ortaya çıkabilir.

Buna ek olarak, hedef bölgeye ilaçları seçici bir biçimde ulaştırabilen yöntemlerin geliştirilmesi ile birlikte ilaç taşıma sistemleri en önemli araştırma konusu olmuştur. Böylece, ilaç sadece hastalıklı bölgeye etki eder, kanda etkin bir miktarda ve uzun süre kalır ve belirli bir hızda ve yeterli miktar da salım işlevi gerçekleşir. Böylece istenmeyen etkiler ortadan kalkar. Ancak tüm bu avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da mevcuttur: üretimi zordur, genetik hasara ve mutasyona sebep olabilirler.

#### **2.4.1. Nanopartiküller**

Nanopartiküller; boyutları 10-1000 nm aralığında değişiklik gösteren, polimerler kullanılarak hazırlanan, nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan, etken maddelerin partikül içinde çözüldüğü, bağlandığı, hapsedildiği ya da adsorbe edildiği kolloidal partiküllerdir. Etken madde nanokürede homojen olarak dağılmış halde bulunurken nanokapsüllerde ise etken madde polimerik bir membran ile çevrili olarak bulunur. Hedeflendirmede nanopartiküllerin tercih edilmesinin iki temel nedeni vardır: küçük partikül boyutlarına sahip olması nedeniyle etken maddenin hedef bölgede toplanması ve uzun süre kontrollü etken madde salımı yapabilmesidir. Buna ek olarak, nanopartiküller yüzeyleri kolaylıkla kaplanabildiğinden hedeflemeye uygundur. Nanopartiküllerin tercih edilmesinin bir diğer avantajı ise, etken maddenin stabilitesini arttırmasıdır. Ayrıca, etken madde yükleme kapasiteleri yüksek olduğundan ilaç salımı ve biyoyararlanımı yüksektir.

Nanokapsüller veziküler sistemlerdir. Bu özellikleri sayesinde damarlardan kolaylıkla geçebilirler ve kolaylıkla dolaşıma katılırlar. Yüzeyi artan ilacın çözünürlüğü ve biyoyararlanım artar böylece ilaç uygulanacağı bölgeye kolaylıkla hedeflendirilebilir. Buna ek olarak, taşıyıcı sistemlere PEG gibi hidrofilik maddeler bağlanarak etken maddenin dolaşımında daha uzun kalması sağlanabilir. Nanopartiküllere birden fazla etken madde yüklenebildiği gibi birden fazla hedeflendirici de bağlanabilir. Nanokürelerde ise ilaçlar homojen olarak dağıtılmış ya da yüzeye adsorbe edilmiştir. Doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak hazırlanabilir. Nanopartiküller, hücreye fagositoz yoluyla alınırlar ve hücre içine alınan nanopartiküller burada bulunan lizozomal enzimler tarafından parçalanırlar (Çorman, 2010 ; Tüylek 2017).



Şekil 2.3. A)Nanopartikül Yapısı (Sakallıoğlu H., 2013) B) Nanokapsül ve Nanoküre yapısı (Çelik M.,2014)

#### 2.4.1.1. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller uygulanan manyetik alana cevap verirler ve manyetik alanda hareket ettirilebilirler. Bu özellikleri sebebiyle kanser tedavisine yönelik ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla tercih edilmektedir.

**Ortak Çöktürme ile Manyetik Nanopartikül Sentezi:** Bazik ortamda, oda sıcaklığında ya da yüksek sıcaklıklarda,  $Fe^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  iyonları güçlü karıştırıcı altında çöktürülmesiyle elde edilen nanopartiküllerdir.

**Mikroemülsiyon ile Manyetik Nanopartikül Sentezi:** Misellerin yardımıyla oluşturulan nanopartiküllerdir.

**Hidrotermal sentez ile Manyetik Nanopartikül Sentezi:** 200°C de  $FeCl_3$ , etilen glikol, sodyum asetat ve polietilen glikol ile basınçlı ortamlarda hazırlanan nanopartiküllerdir.

**Termal parçalanma ile Manyetik Nanopartikül Sentezi:** Demir-oleat organik çözücülerde oleik asit varlığında kaynatılır. Böylece yapı termal yolla parçalanırken açığa çıkan demir ortamdaki oksijen varlığında magnetite dönüşür. (Sakallıoğlu, 2013)

#### 2.4.2. Lipozomlar

Lipozomlar, boyutları nanometreden birkaç mikrometrelere kadar değişen fosfolipid çift katman içeren biyouyumlu, non-immünolojik geri dönüşümlü veziküler yapılardır. Lipozomlar, etken maddelerin etkinliğini arttıracak ve toksik özelliklerini azaltacak şekilde, çok seçici olarak maddelerin taşınmasında kullanılmaktadır (Yurdakul ve ark., 2007).

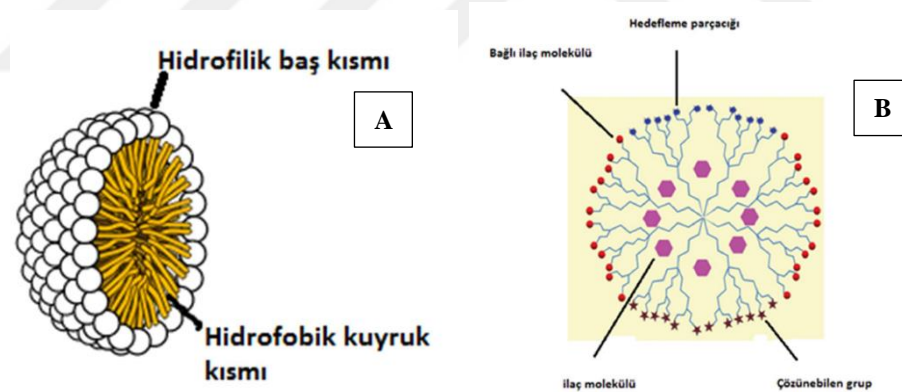


### 2.4.3. Dendrimerler

Birbirini tekrar eden monomerlerin dallanma yapmasıyla oluşan küresel moleküllerdir. İç içe girmiş yapıları, dalları arasına istenilen moleküllerin eklenebilmesi ve reaktif olabilen uç grupları ile karakterize edilir. Çekirdek ve etrafında bulunan dallanma birimleri ile dallanmış fonksiyonel gruplardan oluşur. Dendrimerler bu fonksiyonel gruplardaki değişimlerle farklılar. Dallanma birimleri ile birlikte dendrimerler de büyür. Yapı içerisinde ilaç enkapsülasyonu, kovalent bağ oluşumu ve ilaçta bulunan fonksiyonel grup ile etkileşimi sayesinde ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilmektedir.

### 2.4.4. Miseller

Küresel şekilli, hidrofobik bloklardan oluşan bir çekirdek ve polimer zincirleriyle dayanıklı hale getirilmiş dış kabuktan oluşan partiküllerdir. Miseller, biyoyararlanımı arttırmaları ve dolaşımda uzun süre kalırlar. Boyutlarının nanometre cinsinden olması, damarlanmanın zayıf olduğu bölgelerde toplanmasını sağlamaktadırlar. Ligantlarla yardımıyla hedeflendirilmeye uygundur. Yüksek oranda, tekrarlı ve kolay olarak sentezlenebilirler. Etkin madde sağlıklı dokuda salınmaz böylece istenmeyen etkiler önlenmiş olur (Sayner Ö.,2017; Çelik M., 2014;Tüylek, 2017).



Şekil 2.1.A) Misel Yapısı B) Dendrimer Yapısı (Çelik M.,2014)

### 2.4.5. Monoklonal Antikorlar

Sonsuz bölünme yeteneğine sahip tümör hücreleriyle antikor üretebilen memeli hücrelerinin kaynaştırılmasının sonucu olarak sürekli antikor üretebilen 'hibridoma' hücrelerinden elde edilir. Tek bir tip hibrid hücreden oluşması nedeniyle bu hücrelere monoklonal hücreler denmektedir. Monoklonal antikorlar kanser gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanılır. Diğer ilaçlar ile kıyaslandığında daha az toksik etki gösterir. (Tüylek, 2017)

## 2.5. İlaç Hedefleme

Vücuda alınan ilacın hedef bölgeye taşınmasının iki önemli faydası bulunmaktadır. Bunlardan ilki ilacın, hedef bölgede etkinliğini sağlamaktır. Bir diğeri ise etken maddenin tedavi dozunun hedef organı etkilemesidir. Böylelikle olası yan etkiler önlenmiş olacaktır. Buna ek olarak bu durum ilacın terapötik indeksini de arttırmaktadır. İlaç hedeflemenin temelinde; yan etkilerin azaltılması, dozun azaltılarak hedef bölgeye yüksek oranda etken maddenin ulaşması ve ilaç hedeflemede kullanılan reseptöre bağlı olarak ilacın hedef bölgeye ulaşmaya kadar salımının minimumda tutulması ve hedef bölgede etkinliğini tam olarak göstermesi bulunmaktadır. İlaç hedefleme yöntemleri kısaca:

- Hedef bölgeye ilacın direkt uygulanması
- İlacın pasif olarak hedef bölgede toplanması
- Hedef bölgeye fiziksel hedeflendirme
- Hedef bölgeye spesifik etkenlerin kullanılmasıyla aktif hedeflendirme (Canefe K. Ve Duman G.,1994, Ankara Ecz. Fak. Der)

### 2.5.1. İlacın Doğrudan Hedeflenmesi

İlacın doğrudan doğruya hedef bölgeye uygulanmasıdır. Örnek vermek gerekirse; artrit tedavisinde ilaç doğrudan eklemine içine uygulanır.

### 2.5.2. Pasif Hedefleme

Doğal fizyolojik süreçler ya da pasif etkenler aracılığıyla hedef bölgelere ilacın taşınmasıdır. Pasif hedeflendirme ilaçları hedef bölgeye ulaştırmak amacıyla normal ve patolojik dokular arasındaki anatomik farklılıklardan faydalanır. Pasif hedeflemede ilaç taşıyıcı sistemin bazı özellikleri çok önemlidir. Bu özellikler aşağıda sıralanmıştır:

**Partikül Boyutu:** in vivo dağılım, metabolize olması, toksik etkisi ve ilaç salımı gibi özellikler partikül boyutuna bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Küçük partiküllerden ilaç salımı daha hızlı olmaktadır.

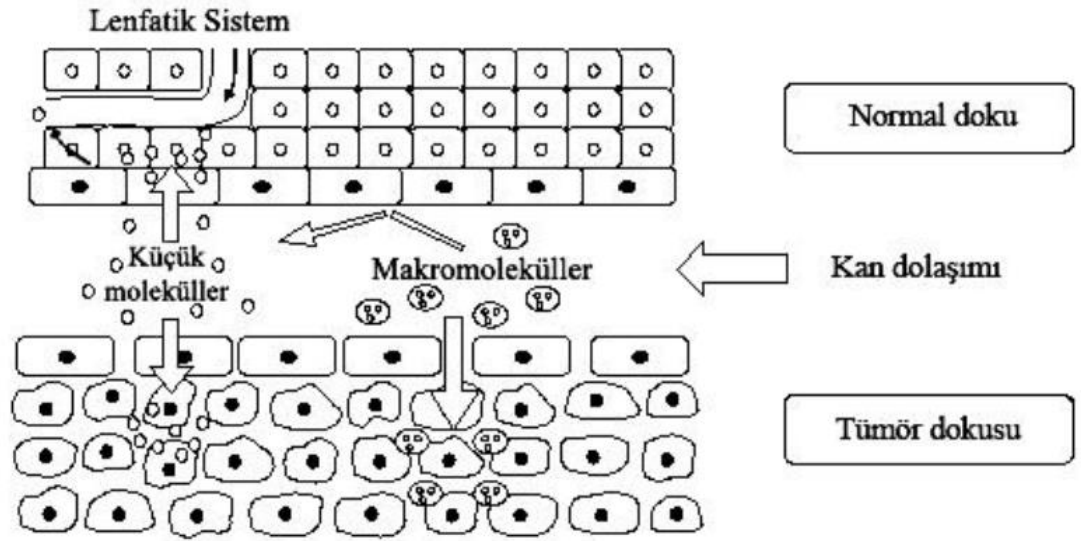
**Yüzey Özellikleri:** Nanopartiküllerin hidrofobik olması ilaç dolaşımında daha uzun süre kalmasına ve böylelikle hedef bölgeye ulaşmasına yardımcı olur. Taşıyıcının yüzeyini polisorbata 80 gibi maddelerle kaplamak taşıyıcının hidrofilik karakterde olmasına yardımcı olmaktadır.

**Etken Madde Yükleme:** Etkin madde yükleme kapasitesi taşıyıcının özelliğine bağlı olarak farklılık göstermektedir.

**Etkin Madde Salımı:** Salım oranı boyutuna ve içinde bulunan etken madde miktarına bağlı olarak değişim göstermektedir.

Kanser hücrelerinin damarlanması sağlıklı dokudan farklıdır. Tümörlerdeki damarların bu farklılığı ilaç taşıyıcı sistemin kan damarlarından kendiliğinden geçmesine yardımcı olur. Bu durum artan geçirgenlik ve tutunma (EPR) etkisi olarak adlandırılır. EPR etkisi ilaç taşıyıcı sistem ve ilaç molekülü vücuttan atılmadığı ve dolaşımında uzun süre kaldığı süre avantajlıdır. Bu nedenle ideal bir ilaç taşıyıcı sistemde olması gereken özellikleri olarak taşıyıcının boyutu 10-100 nm arasında olması, nötr veya anyonik yükte olması ve son olarak Retiküloendotelial Sistem (RES) etkisinden kaçınması sayılabilir.

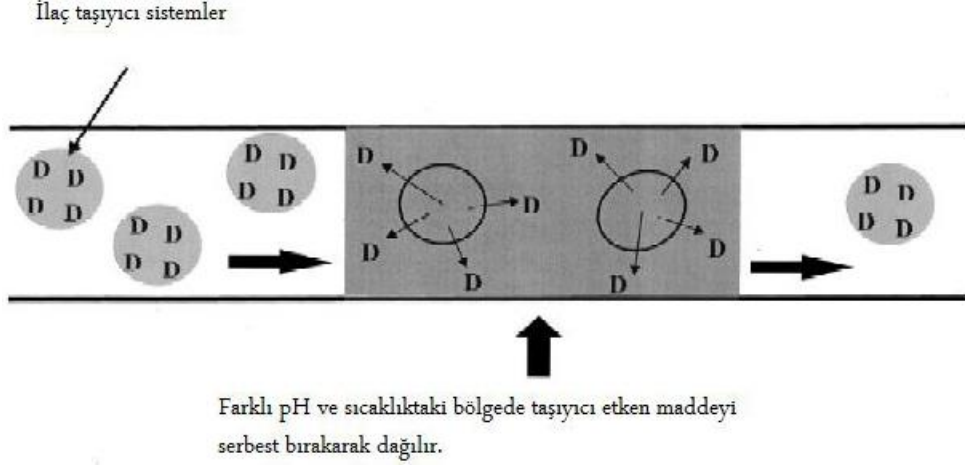
Pasif hedeflendirmede çeşitli kısıtlamalar bulunmaktadır. Pasif hedeflendirmenin etkinliği anjiyogenezise bağlı olarak değişim göstermektedir. Katı tümörlerde yüksek interstisyel basınç nedeniyle ilaç alımı ve homojen dağılımı zorlaşır. Bu yüksek interstisyel basınç EPR ile ilişkilidir. Küçük moleküller kolaylıkla difüze olurken büyük moleküller tümörde daha çok tutunarak daha yavaş salınır.



**Şekil 2.2.** EPR Etkisi (Şekil Sarıyer Ö. ve Çomoğlu T., 2017, Nanotaşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme makalesinden alınmıştır.)

### 2.5.3. Fiziksel Hedefleme

Tümör dokuları normal dokulara kıyasla daha asidiktir. Bu farklanmadan yararlanarak yapılan hedeflendirme fiziksel hedeflendirme olarak adlandırılmaktadır.



**Şekil 2.3.** Fiziksel Hedeflendirme (Şekil Çelik M., 2011, Farmasötik Biyoteknolojide İlaç Hedefleme adlı Bitirme Ödevinden Alınmıştır.)

### 2.5.3. Aktif Hedeflendirme

İlaç taşıyıcı sistemin ligand-reseptör gibi etkileşimlerle hedef hücreye taşınmasına aktif hedefleme denir. Hedeflendirmede pH gibi kimyasal ve manyetik alan fiziksel faktörlerden ya da hücrelere spesifik bağlanmadan çoğunlukla yararlanılır. Aktif hedeflendirme ligant yoğunluğuna ve yüküne, taşıyıcı sistemin boyuta ve şekline, yüzey yüküne bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

#### ➤ Ligant Aracılı Aktif Hedeflendirme

Hedef bölgede bulunan reseptörlere uygun olarak tasarlanan/seçilen ligantlar yardımıyla yapılan aktif hedeflendirmedir. Hücre yüzeyinde bulunan bu reseptörlere hedeflendirme yapılmasının amacı; ilaç taşıyıcıların hücreden alımını artırarak hedef bölgede etken madde yoğunluğunu arttırmak ve tümör hücrelerini yok etmektir. Ligant aracılığıyla hedeflenen bu sistemler tümör damarlarını yok ederek tümörün büyümesini durdururlar ya da tamamen yok ederler. Transferrin, folat, folik asit kullanılan ligatlardan bazılarıdır.

#### ➤ Stimulasyona Bağlı Aktif Hedeflendirme

İnternal Stimulasyon ile hedeflendirmede ilaç taşıyıcılar dolaşımında ilaç salımı yapmazken tümör bölgelerine vardıklarında ortamın özelliklerine bağlı olarak ilaç salımını gerçekleştirir. Örnek vermek gerekirse disülfidlerin tiyollere dönüşümü biyolojik yollardaki prosedürlerden bir tanesidir. Geri dönüşümlü olarak indirgenme reaksiyonu gerçekleştirirler. Disülfid bağına sahip polimerler bu özellikleri nedeniyle hedeflendirmede kullanılırlar. Manyetik alan yardımıyla hedeflendirme, ışığa duyarlı polimerler yardımıyla hedeflendirme, ultrasonik dalga

yardımla hedeflendirme, enzim aracılı hedeflendirme aktif hedeflendirme metodlarından bazılarıdır. (Sarıyer Ö. ve Çomoğlu T., 2017; Çelik M., 2011)

## 2.6. Albumin

Albümin karaciğerde sentezlenen 610 amino aside sahip tek zincirden oluşan protein yapıdır. Kan plazmasında en yaygın bulunan proteindir. Yağ asidi ve çeşitli maddelerin kanda taşınmasına yardımcı olur. Buna ek olarak, kan ile doku arasında suyun dengelenmesine yardımcı olur, onkotik basıncı düzenler. Albüminin görevlerini kısaca özetlemek gerekirse;

- Onkotik Basıncın %74'ünü oluşturarak kanda bulunan suyu damar içinde tutar.
- Yağ metabolizmasında önemli göreve üstlenirler.
- Serbest radikalleri indirger böylelikle, dokularda tahribatı engeller.
- Kandan bilirubin gibi toksik maddelerin taşınmasını sağlar.
- Hayati öneme sahip hormonların taşınmasını sağlarlar.
- Bazı vitaminleri taşırlar.
- Tamponlayıcı bir görevi bulunur.

Hemostatik dengenin kurulmasına yardımcı olurlar (TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu).

### 2.6.1. Bovine Serum Albumin

Sığır kan plazmasında bulunan temel globular proteindir. Az sayıda triptofan, metiyonin ve çok sayıda sistein ile yüklü aspartik asit, glutamik asit, lizin ve arginin amino asitlerinden oluşur. BSA içeriğinde bulunan glisin ve isolösin sayısı ortalama bir proteine kıyasla daha azdır. DNA parçalanması sırasında bazı enzimleri stabilize eder. Toksik olmayışı, biyoyumlu olması ve biyoyararlanımının yüksek olması gibi nedenlerle nanopartikül üretiminde sıklıkla tercih edilir (Tatar D., 2007).



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Nanopartikül sentezinde kullanılan Albumin (Fraction V) ve etanol (HPLC grade-%99.9) Merck; Genipin (HPLC,98%) Sigma ve pemetrexed disodyum anhidrus (%98) Ak Scientific firmalarından temin edildi. Magnetit sentezinde kullanılan, demir (2) klorür tetra hidrat (% 98) Alf Easer ve demir (3) klorür hegzahidrat ISOLAB, Amonyum hidroksit solüsyonu Sigma-Aldrich firmaların sağlandı. Bradford reaktifi hazırlamada kullanılan Commassie brilliant blue G-250 Fluka, fosforik asit (85-88%) Sigma Aldrich ve teksol ise Tekkim firmalarında alındı. A549-luc hücre hattı Perkin Elmer, CRL-5807, hücreleri ise Amerikan Kültür Koleksiyonu (ATCC)'dan temin edilmiştir. Penisilin-Streptomisin, fetal sığır albümini (FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640, Sigma Aldrich firmalarından temin edildi. Denemede kullanılan tüm diğer kimyasallar analitik saflıktadır.

Denemede kullanılan cihazlar; peristaltik pompa (ISOLAB), Shaker (IKA KS 130 basic), manyetik karıştırıcı (IKA RH Basic 2), Sıcak su banyosu (mimmert), sonik banyo (Elma E-120H).

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Bradford Reaktifi Hazırlanması ve Standart Grafiğinin Çizilmesi

Çalışma süresince tüm protein analizleri Bradford (1976) prensibine göre yapıldı. Bu yöntemin temelinde organik bir boyar madde olan Commassie brilliant blue G-250'nin proteinlerdeki (+) yüklü gruplara bağlanarak proteinleri renklendirir ve 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

##### **Bradford Reaktifinin Hazırlanması:**

40 mg Coomassie brilliant blue tartılarak % 96'lık 50 mL etanolde çözüldü. Ardından çözeltiliye 100 mL % 85'lik fosforik asit eklenerek adi süzgeç kağıdı ile süzülerek saf su ile 1L'ye tamamlandı.

##### **Standart Grafiğinin Çizilmesi:**

0,02; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 mg/mL olacak şekilde BSA çözeltileri hazırlandı. Ardından aşağıdaki tabloda bulunan miktarlar plastik küvetlere pipetlenerek karanlıkta 10 dakika reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda köre karşı 595 nm'de absorpsiyon değerleri okundu. Kör olarak saf su kullanıldı. Her deney 3 kez tekrarlandı ve ortalama alınarak standart grafiği çizildi.

**Tablo 3.1.** Protein tayini için kullanılan çözeltiler.

Standart BSA Konsantrasyonu (mg/ mL)	Stok BSA çözeltisi ( $\mu$ L)	Bradford Reaktifi (ml)
0,02	100	2
0,05	100	2
0,10	100	2
0,15	100	2
0,20	100	2

### 3.2.2. BSA Optimizasyonu

BSA nanopartikülleri (BSA-NP'ler), Ak ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemin küçük modifikasyonları ile sentezlendi (2014). BSA optimizasyonu için 25 - 100 mg BSA, 1 ml su içinde çözülerek reaksiyon ortamına alındı. Oda sıcaklığında sabit hızla (480 rpm) karıştırılırken peristaltik pompa yardımıyla sabit hızda damla damla 4 ml etanol (desolvasyon ajanı) ilave edildi. Reaksiyon düzeneği Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Ardından 100 $\mu$ l genipin (% 0,02) eklendi (Shahgholian ve ark., 2017) ve 24 saat reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda reaksiyona girmeyen proteinleri nanopartiküllerden uzaklaştırmak için santrifüj yapıldı. Ardından naopartiküller saf su ile yıkanarak tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatantlarda bulunan bağlanmayan protein miktarı, Bradford protein analizi (Bradford 1976) ile tespit edildi ve optimum BSA miktarı zeta ölçüm (Malvern Nano ZS 90 Zetasizer) sonuçlarının da yardımıyla saptandı.



**Şekil 3.1.** Reaksiyon düzeneği



### 3.2.3. Genipin Optimizasyonu

25 mg BSA, 1 ml su içinde çözülerek reaksiyon ortamlarına alındı. Oda sıcaklığında sabit hızla (480 rpm) karıştırılırken peristaltik pompa yardımıyla sabit hızda damla damla 4 ml etanol damlatıldı. Ardından her bir reaksiyon kabına 100µl 10 mM, 20 mM, 50 mM ve 100 mM genipin eklendi ve 24 saat reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda reaksiyona girmeyen proteinleri nanopartiküllerden uzaklaştırmak için 13000 rpm de santrifüj yapıldı. Ardından naopartiküller saf su ile yıkanarak tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatantlarda bulunan bağlanmayan protein miktarı, Bradford protein analizi (Bradford 1976) ile saptandı ve optimum genipin konsantrasyonu SEM görüntülerinin (Thermo Scientific Apreo S) de yardımıyla belirlendi (Butler ve ark., 2003).

### 3.2.4. Süre Optimizasyonu

25 mg BSA, 1 ml su içinde çözülerek reaksiyon ortamlarına alındı. Oda sıcaklığında sabit hızla karıştırılırken peristaltik pompa yardımıyla sabit hızda 4 ml etanol ilave edildi. Ardından 100µl 20mM genipin eklendi ve her bir reaksiyon 15;18;24 ve 36 saat reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda santrifüj yapıldı. Ardından naopartiküller saf su ile yıkanarak tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatantlarda bulunan bağlanmayan protein miktarı, Bradford protein analizi (Bradford 1976) ile bulundu ve optimum süre SEM görüntülerinin de yardımıyla belirlendi.

### 3.2.5. Magnetit Sentezi

Manyetik nanopartiküller (MNP) kopresipitasyon yöntemiyle sentezlendi. Bu amaçla,  $Fe^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  tuzları mol oranları 1:2 olacak şekilde çözüldü. Çalışmada, 1 mol  $FeCl_2$  ve 2 mol  $FeCl_3$  60°C sabit sıcaklıkta ceketli reaktör içinde 3000 rpm karıştırma hızında oksijensizleştirilmiş saf suda çözüldü. Bu işlem süresince ortamdan sürekli olarak  $N_2$  gazı geçirildi. Ardından çözeltiye derişik amonyum hidroksit çözeltisi eklenerek ortam alkali pH (pH 10) olacak şekilde eklendi. Sabit sıcaklık (60°C) ve kuvvetli karıştırma altında çekirdekleşme için 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan nanopartiküller manyetik dekantasyon ile ayrılarak distile su ve etanol ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkanan nanopartiküller 60°C sıcaklıktaki etüvde gece boyu kurutulularak MNP kristalleri elde edildi (Şanlier ve ark. 2018). Kuruyan nanopartiküllerin FTIR yardımıyla doğrulandı.

### 3.2.6. Magnetit Miktarı Optimizasyonu

Sentezlenen magnetitler 1,5; 3; 4,5; 6; 7,5 mg/mL olacak şekilde saf su da disperse edildi. 50 mg BSA, 500 µL su içinde çözülerek reaksiyon ortamlarına alındı. Ardından her bir reaksiyon ortamına 500 µL olacak şekilde 1,5-7,5 mg/mL magnetit reaksiyon ortamına ilave edildi. Oda sıcaklığında sabit hızla (480 rpm) karıştırılırken peristaltik pompa yardımıyla sabit hızda damla damla 4 ml etanol

ilave edildi. Ardından 100 µl 20 mM genipin eklendi ve 18 saat reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda santrifüj işlemleri yapılarak optimum magnetit konsantrasyonu belirlendi.

### 3.2.7. İlaç Miktarı Optimizasyonu ve Karakterizasyon

İlaç miktarını tayin edebilmek için öncelikle suda çözünen pemetrexed ile standart grafiği çizilerek 227 nm’de absorpsiyon değerleri okundu. Ardından, 100 mg BSA, 250 µL saf su içinde çözülerek reaksiyon ortamlarına alındı ve disperse edilen magnetit 500 µL olacak şekilde reaksiyon ortamına ilave edildi. Ardından 1,5; 3; 4,5; 5; 7,5 mg/mL 250 µL pemetrexed saf su içerisinde çözülerek her bir reaksiyon ortamına alındı. Oda sıcaklığında sabit hızla karıştırılırken peristaltik pompa yardımıyla sabit hızda 4 ml etanol ilave edildi. Ardından 100 µl 20 mM genipin eklendi ve 18 saat reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda santrifüj işlemleri yapıldı. Üst fazlarda ve yıkama sularında ilaç analizi yapıldı. Optimum ilaç konsantrasyonu belirlendi. Hazırlanan son ilaç taşıyıcı sistemin karakterizasyon çalışmaları zeta boyut ve potansiyel analizi, SEM görüntüleri, FTIR ile gerçekleştirildi

### 3.2.8. İlaç Salım Çalışmaları

Salım yüzdelerini hesaplayabilmek için önceikle pH=7,4 fosfat tamponu ve pH=5,5 asetat tamponunda hazırlanan pemetrexed için standart grafikleri çizildi. *in vitro* salım çalışmaları 37°C de ve MWCO değeri 12.000-14.000 olan diyaliz membranı kullanılarak gerçekleştirildi (Ak ve ark., 2018). Optimum koşullarda sentezlenen pemetrexed yüklü BSA nanopartiküller 1mL pH fizyolojik ortamın taklidi olan 7,4 PBS (tuzlu fosfat tamponu) ve tümör mikroçevresinin taklidi olan pH 5,5 asetat tamponu içerisinde ayrı ayrı çözülerek membranlara yerleştirildi. Hazırlanan diyaliz membranları 10 mL PBS ve asetat bulunan ortama alınarak salım başlatıldı. Sabit hacmi korumak için taze ortam her seferinde değiştirildi ve 48 saat boyunca salım profili izlendi. Alınan örneklerdeki ilaç miktarları spektrofotometrik olarak tayin edildi. 3 tekrarlı olacak şekilde salım profilleri tayin edildi.

### 3.2.9. *in vitro* Sitotoksite Çalışmaları

İlaç taşıyıcı sistemin kanser tedavi potansiyelini incelemek amacıyla A549-luc ve CRL-5807 hücre hatları üzerinde canlılık analizi yapılarak sistemin etkinliği belirlendi. Hazırlanan sistem ve serbest pemetrexed için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Canlılık testi için mitokondriyal enzim aktivitesine bağlı ölçüme imkan sağlayan MTT analizi yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

### Hücre Hatları

A549-luc hücre hattı % 10 fetal sıgır serumu (FBS) ve 100 units/ml penisilin -100 µg/ml streptomycin ve 2 mM L-glutamine içeren DMEM ortamı içerisinde çoğaltıldı. Hücreler % 5 CO<sub>2</sub> içeren ve 37°C sıcaklık koşullarında idame ettirildi. Hücreler flasksı %95-98 oranında kapladığında pasajlandı.

CRL-5807 hücre hattı ise % 10 FBS ve 100 units/ml penisilin -100 µg/ml streptomycin ve 2 mM L-glutamine içeren RPMI ortamı içerisinde büyütüldü. Hücrelerin büyümesi amacıyla % 5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklık koşulları sağlandı (Şanlıer et al 2018).

### **Hücrelerin Canlılığının Kontrol Edilmesi**

Kültüre edilen hücrelerin canlılıklarını ve sayılarını takip etmek amacıyla, Tripan mavisi boyası testi kullanıldı. Buna göre, 50 µl süspanse hücrelere 50 µl boya karıştırılarak, ışık mikroskobu altında hücrelerin canlılığı ve sayısı “Neubauer” lam kullanılarak değerlendirildi. Bu amaçla, “Neubauer” lamda bulunan 4x4’ lük karelerden oluşmuş 4 alan sayıldı. Tripan mavisi boyası testi gereğince boyayı içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı içine almayanlar ise canlı olarak değerlendirildi. Canlı hücre toplamının ortalaması alınarak 20.000 ile çarpılmasıyla, ml başına düşen canlı hücre sayısı saptandı. Aynı işlem ölü hücreler için de gerçekleştirildiğinde, ml başına düşen ölü hücre sayısı belirlendi. Hücre canlılığı ise, toplam hücre sayısının canlı hücrelere % olarak oranlanmasıyla belirlendi.

### **Sitotoksisite Çalışmaları**

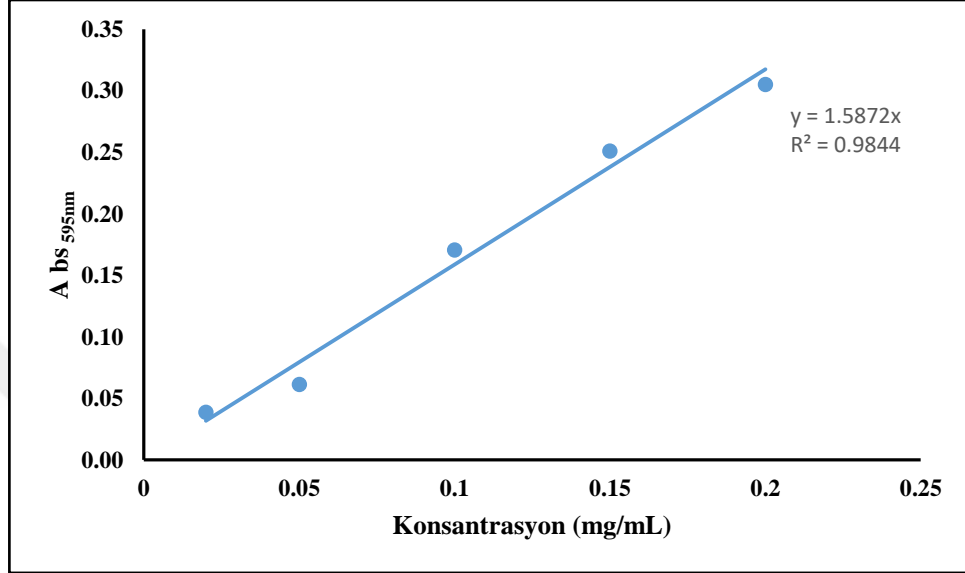
Hücreler, 96-kuyucuklu platelerde başlangıç yoğunluğu  $5 \times 10^3$  hücre/100 µL olacak şekilde ayarlanarak ve serbest pemetrexed ve Pemetrexed yüklü BSA-NP eklenmesinden önce 24 saat adhere olması için inkübe edildi. Doz aralıkları her iki örnek için de 100-1,563 µg/mL olacak şekildedir. Hücrelere uygun doz aralığında ilaç gruplarının uygulamasının ardından geçen 24., 48. ve 72. saat inkübasyonlarından sonra ilaç içeren ortamlar kuyucuklardan uzaklaştırılarak yerine 90 µL FBS içermeyen taze ortam eklendi. 10 µL MTT (5mg/mL steril PBS-7,4 içerisinde) çözeltisi eklenerek 4 saat 37°C’de inkübe edildi. Süre sonunda MTT içeren üst faz atılarak oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO ile çözüldü ve 15 dakika beklendi. Kantitatif ölçüm, süre sonunda bir mikropilaya okuyucusunda (Polarstar Omega) 540 nm dalga boyunda ölçülerek kolorimetrik olarak değerlendirildi. İlaç gruplarının hücreler üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri saptanarak sonuçlar karşılaştırıldı (Ak ve arkadaşları, 2018).



## 4.BULGULAR

### 4.1. Bradford Standart Grafiğinin Çizilmesi

Deney boyunca tüm protein analizlerinde kullanılacak standart grafik aşağıda verilmiştir:



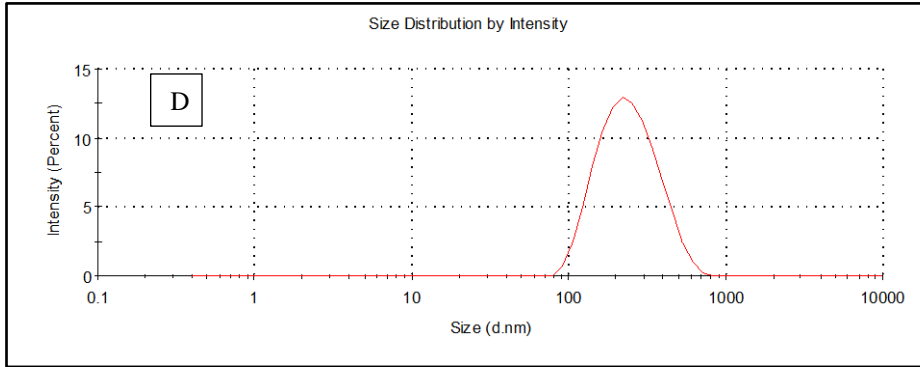
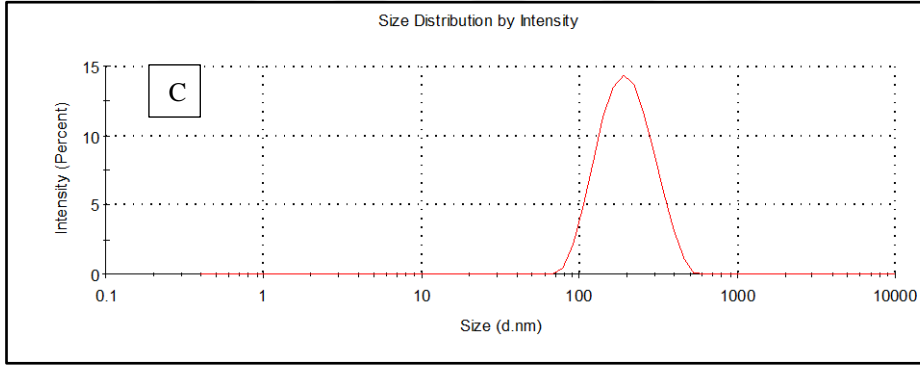
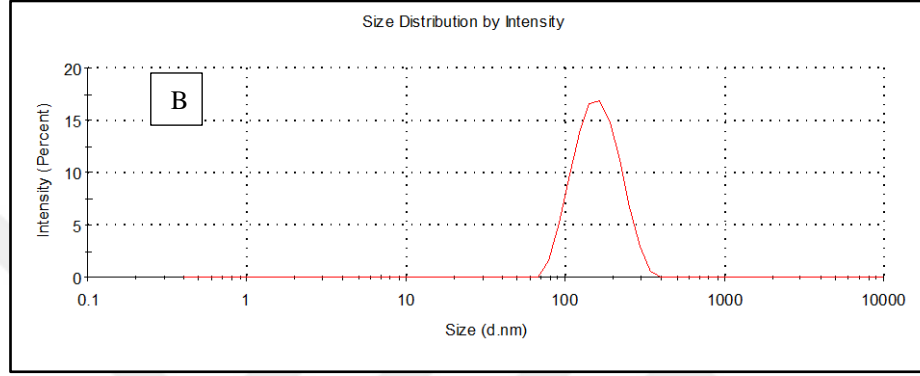
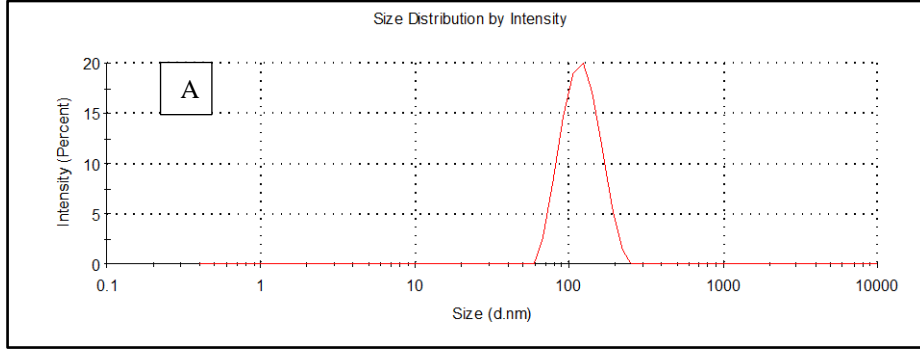
Şekil 4.1. Bradford standart grafiği

### 4.2. BSA Optimizasyonu

Tablo 4.1. BSA Optimizasyonu Protein Bağlanma Yüzdeleri

Konsantrasyon (mg/mL)	Bağlanma Yüzdesi
100	96,92±0,004
75	96,424±0,002
50	88,964±0,003
25	80,893±0,001
10	61,386±0,002

Tablo 4.1’de protein bağlanma yüzdeleri arasında farklanma görülmektedir. Tabloya göre artan BSA konsantrasyonu ile birlikte bağlanma yüzdeleri de artmaktadır. Buna ek olarak, nanopartiküllerin hidrodinamik boyutları artan BSA konsantrasyonu ile birlikte artmaktadır.



**Şekil 4.2.** BSA Optimizasyonuna ait Zeta Boyut Ölçümleri A) 25 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait B) 50 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait C) 75 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait D) 100 mg/mL BSA konsantrasyonuna ait

PDI indeksi nanopartiküllerin çözelti içerisinde homojen dağılımını göstermektedir. Artan BSA konsantrasyonu ile birlikte PDI indeksi artmakta, hmojen dağılım azalmaktadır. Artan konsatrasyon ile birlikte artan boyut ve hidrodinamik çap nanopartikül oluşumunu olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle optimum BSA konsantrasyonu 25 mg/mL olarak kabul edilmiştir.

**Tablo 4.2.** Artan BSA Konsantrasyonu ile Hazırlanan Nanopartiküllere ait Hidrodinamik Boyut ve Poli Dispersite İndeksi Sonuçları

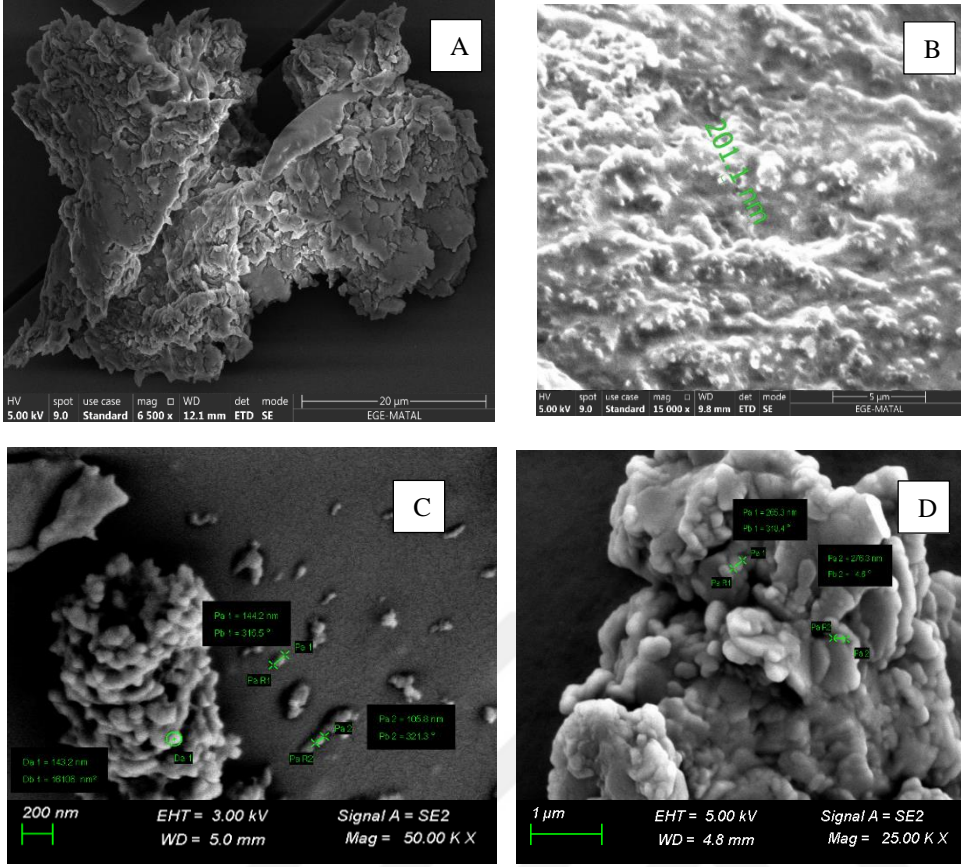
BSA Konsantrasyonu (mg/mL)	Hidrodinamik Boyut (nm)	PDI
25	115,4±32,93	0,047
50	165±52,42	0,097
75	208±79,14	0,113
100	217±109,8	0,182

### 4.3.Genipin Optimizasyonu

**Tablo 4.3.** Genipin Konsantrasyonu optimizasyonu için % BSA bağlanma verimleri

Genipin Konsantrasyonu mM	% Protein Bağlanma
10	24.79
20	76.83
50	61.36
100	44.37

Protein bağlanma yüzdelerinin hesaplanmasının ardından kurutulan nanopartiküllerin SEM ile görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.3 A'da görüldüğü gibi nanopartikül yapısı oluşmamıştır. Şekil 4.3 B, C ve D'de görüldüğü gibi yuvarlağa yakın nanopartikül formları oluşmuş ve boyutları 150-250 nm aralığında değişim göstermektedir. Ancak artan çapraz bağlayıcı miktarı ile birlikte yapının daha rijit olduğu ve ilaç bağlamaya vb. uygulamalara uygun olmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle optimum genipin konsantrasyonu 20 mM olarak kabul edilmiştir. Kalan tüm denemeler seçilen bu optimum konstantrasyona uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

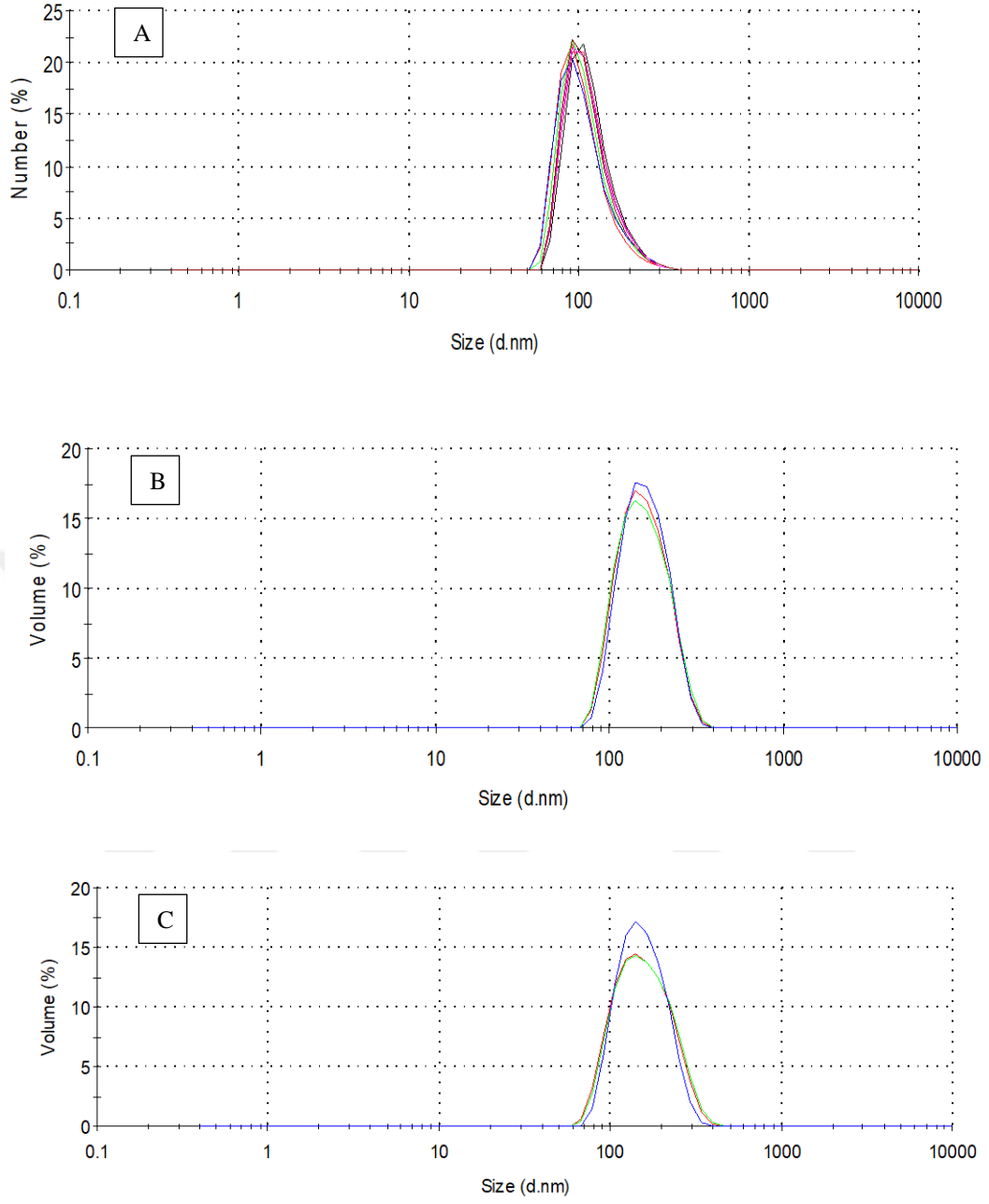


**Şekil 4.3.** A) 10 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, B) 20 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, C) 50 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, D) 100 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP

**Tablo 4.4.** Artan Genipin Konsantrasyonu ile değişen Zeta Boyut ve Potansiyel Sonuçları

Genipin Konsantrasyonu (mM)	Hidrodinamik Boyut (nm)	PDI
20	147.4	0,014
50	156,1	0,044
100	152,8	0,088





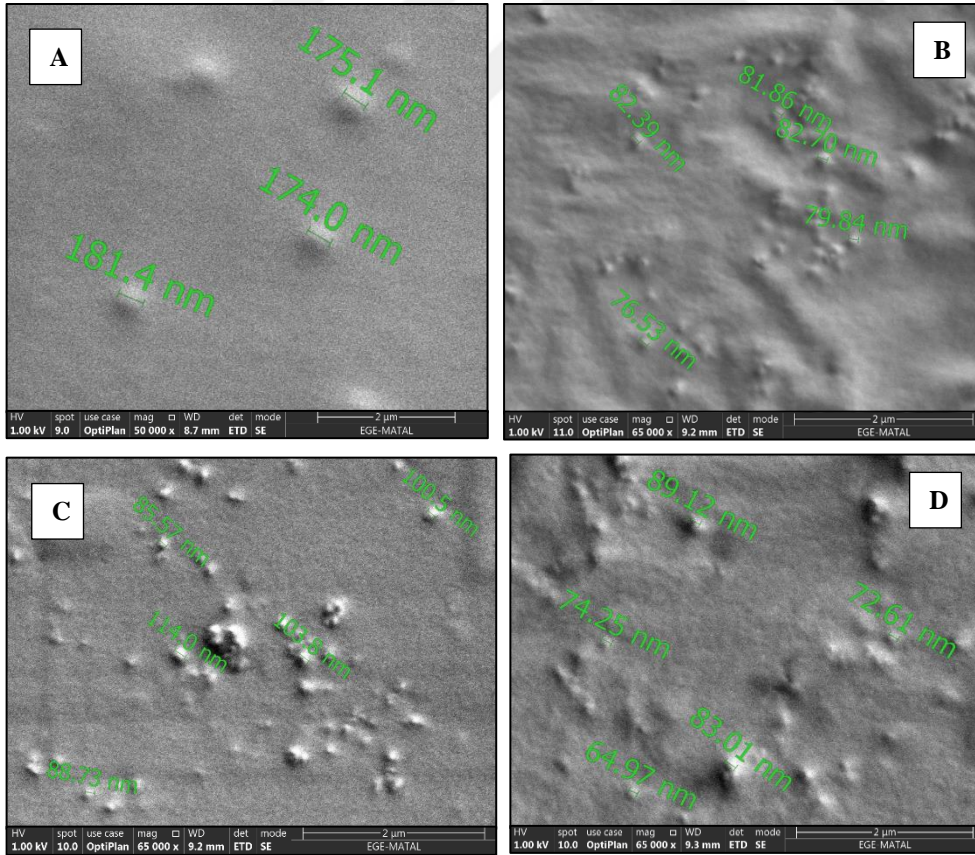
**Şekil 4.4.** Zeta Boyut Sonuçları **A)** 20 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, **B)** 50 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP, **C)** 100 mM Konsantrasyona sahip Genipin eklenmiş BSA-NP.

#### 4.4. Süre Optimizasyonu

**Tablo 4.5.** Süre optimizasyonu için % BSA bağlanma verimleri

Süre (saat)	% Protein Bağlanma
15	79.222
18	81.223
24	69.255
36	62.094

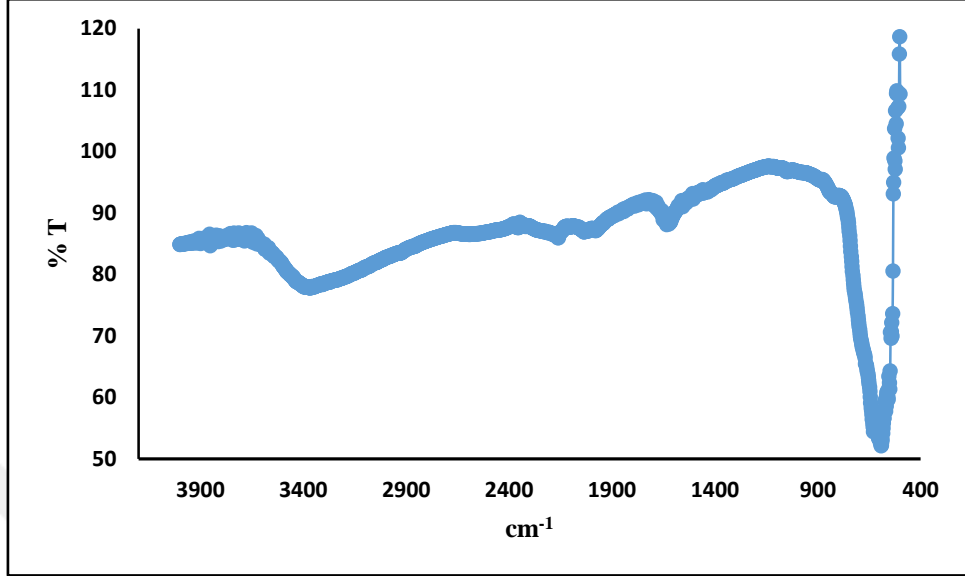
Tablo 4.5'te görüldüğü gibi en yüksek protein bağlanma oranı 18. saatte görülmüştür. Bununla birlikte, SEM görüntüleri incelendiğinde 15. saat sonrası oluşan partiküllerin boyutunun 65-100 nm aralığında olduğu ve aralarında anlamlı bir farklanmanın olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle protein bağlama miktarı en yüksek olan 18. saat optimum olarak kabul edilip diğer tüm denemelerde kullanılmıştır.



**Şekil 4.5** SEM görüntüleri A) 15 saat B) 18 saat C) 24 saat D) 36 saat

#### 4.5. Magnetit sentezi

FTIR spektrumuna göre, 550-600  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen ve keskin tepe noktası, Fe-O için karakteristiktir.



Şekil 4.6. Magnetite ait FTIR

#### 4.6. Magnetit Miktarı Optimizasyonu



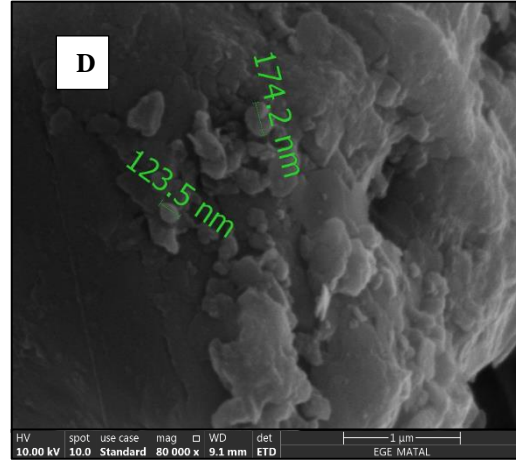
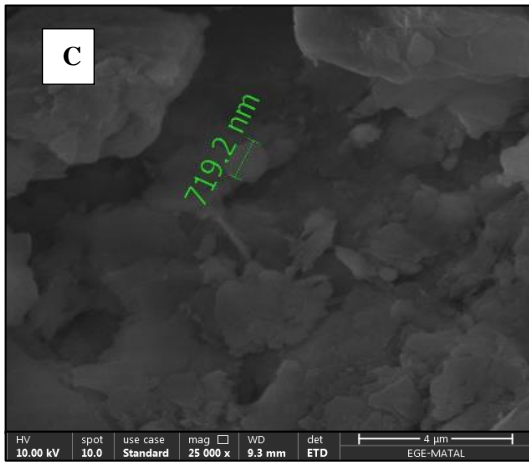
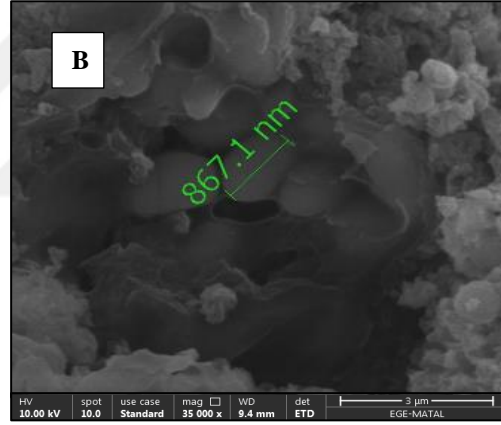
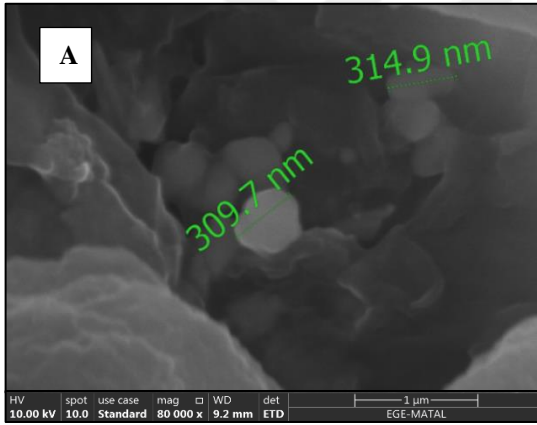
Şekil 4.7. Artan Konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP'ler

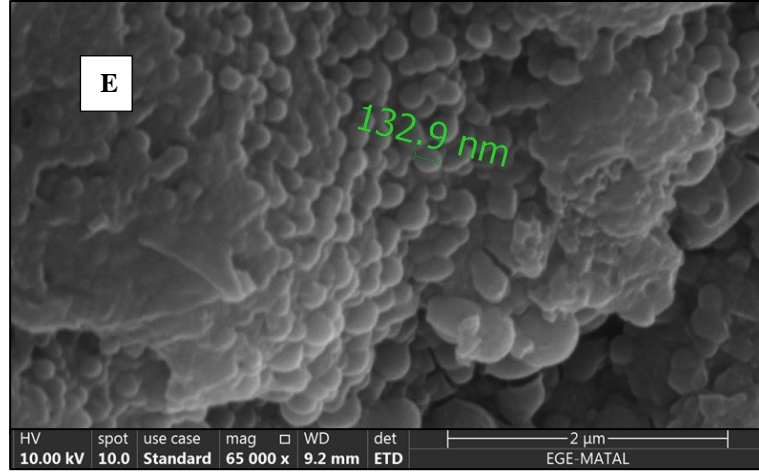
Tablo 4.7'de görüldüğü gibi artan konsantrasyonlarda magnetit bulunan nanopartiküllerde protein bağlanma miktarında anlamlı bir farklanma gözlenmemiştir.

**Tablo 4.6.** Magnetit Konsantrasyonu için % BSA bağlanma verimleri

Magnetit Konsantrasyonu (mg/mL)	% Protein Bağlanma
1.5	92.285
3	89.279
4.5	94.711
6	93.004
7.5	94.837

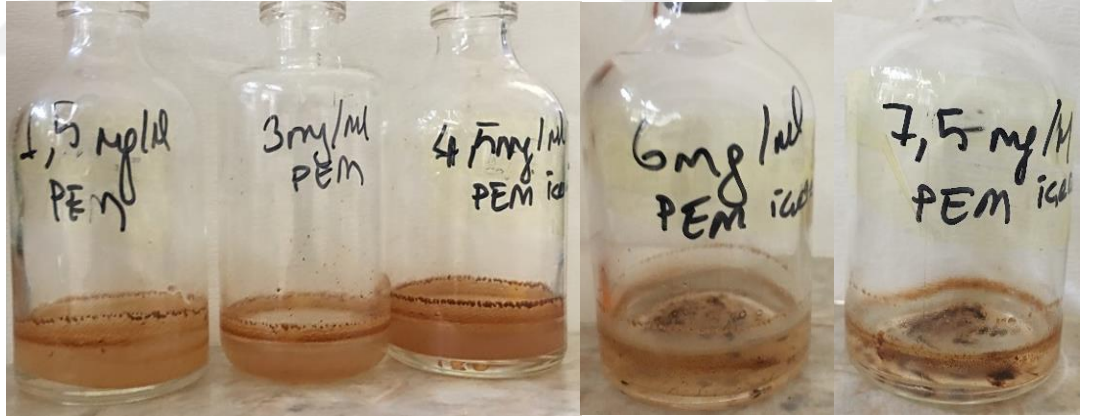
Şekil 4.8 A, B ve C’de görüldüğü gibi BSA-NP’lerde artan magnetit miktarı ile birlikte boyutun arttığı ve yapının yuvarlaktan çıkıp elipse doğru kaydığı gözlenmiştir. Ancak şekil 4.7 D ve E’de görüldüğü gibi artan magnetit konsantrasyonu ile birlikte yapı küçük ve yuvarlak bir görünüme kavuşmuştur. Buna ek olarak en yüksek protein bağlama verimi de yine 7,5 mg/mL magnetit içeren BSA-NP’dedir. Tüm bu nedenlerle optimum olarak 7,5 mg/mL seçilmiştir.





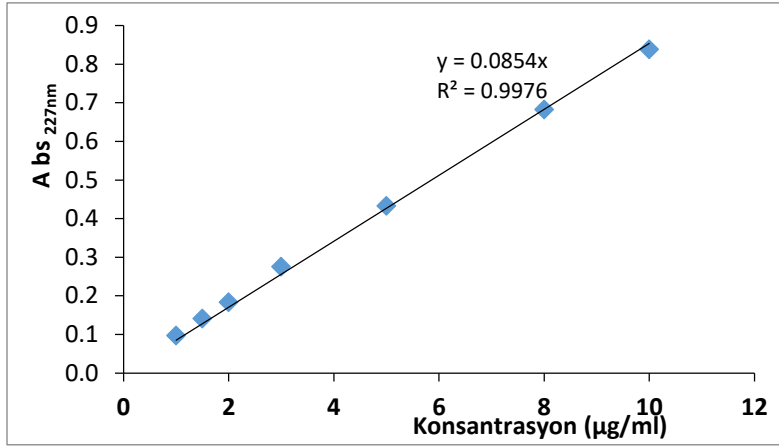
**Şekil 4.8.** A) 1,5 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP B) 3 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP, C) 4,5 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP, D) 6 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP E) 7,5 mg/mL konsantrasyonda Magnetit içeren BSA-NP

#### 4.7. İlaç Miktarı Optimizasyonu ve Karakterizasyon



**Şekil 4.9.** Artan Konsantrasyonda Magnetit Miktarının Görüntüsü

Şekil 4.9’da görüldüğü gibi 6 mg/mL ve 7,5 mg/mL konsantrasyona sahip Pem çözeltisi içeren BSA-Magnetit çözeltisi üzerine etanol damlatılır damlatılmaz magnetit ile ilaç şelat yaptığı gözlemlendi. BSA-NP’lere ilaç yükleme verimini hesaplayabilmek için öncelikle pemetexedin standart grafiği çizildi.



Şekil 4.10. Pemetrexed Standart Grafiği (Suda)

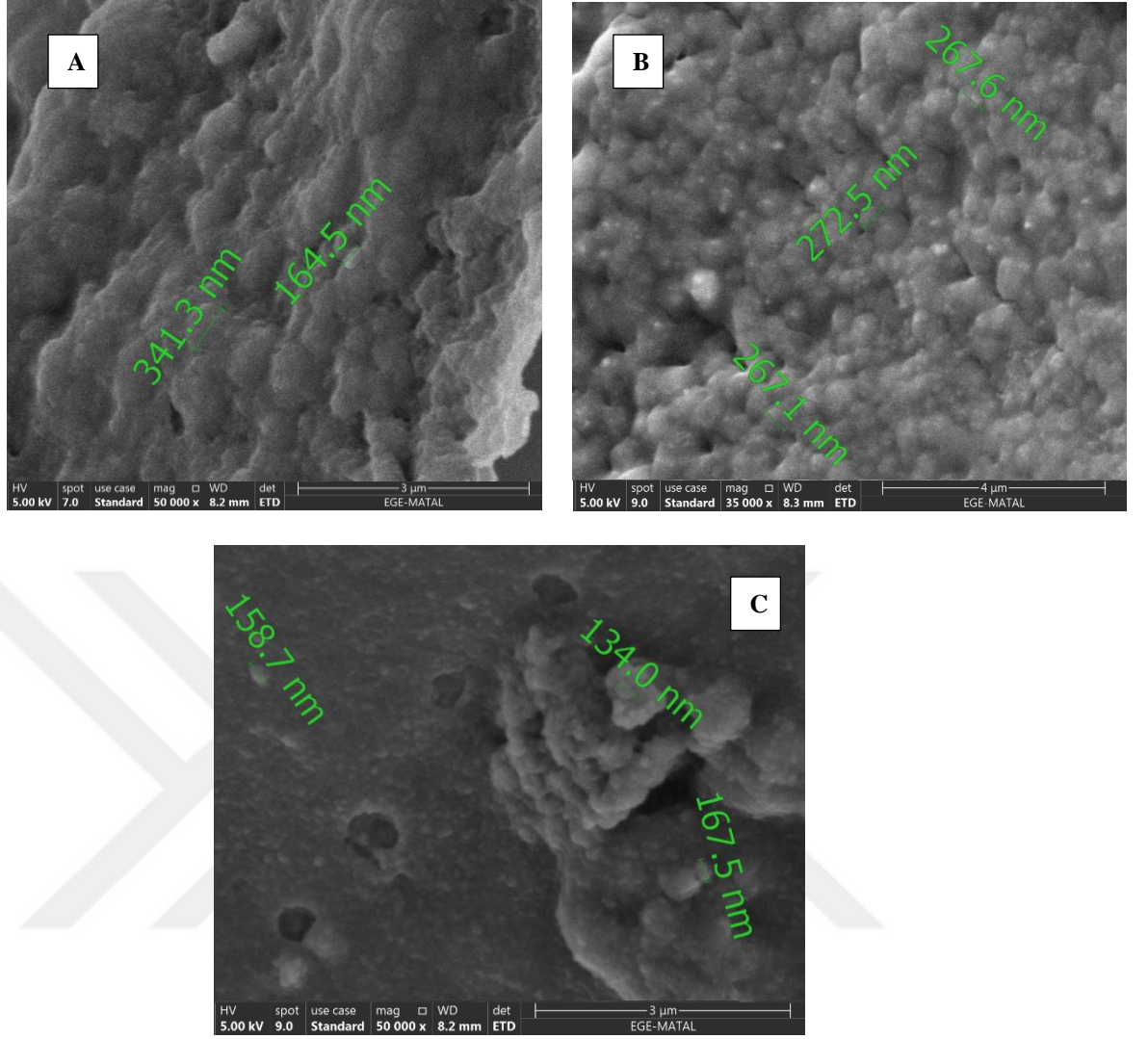
İlaç bağlama verimleri ve bağlanan ilaç miktarları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Tablo 4.7. İlaç Konsantrasyonu için % BSA bağlanma verimleri

Başlangıç Konsantrasyonu (mg/ml)	Bağlanan İlaç Miktarı (mg)	% İlaç Bağlanma
1,5	0,256	29,834
3	0,964	61,782
4,5	3,194	84,850

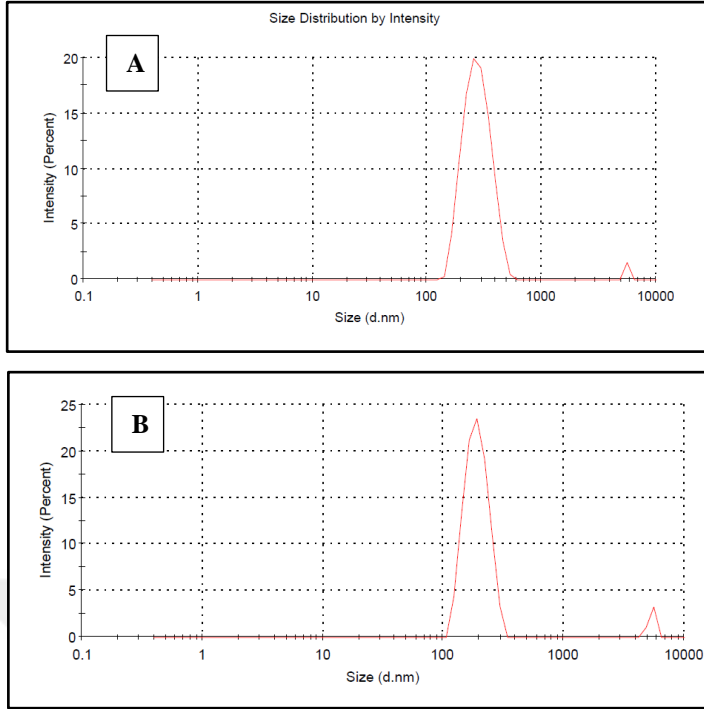
Şekil 4.11’de görüldüğü gibi SEM görüntüleri her artan ilaç miktarı ile birlikte nanopartikül boyutunun küçüldüğünü göstermiştir. İlaç bağlama verimleri ve SEM görüntülerinden yol çıkılarak 4,5 mg/mL konsantrasyona sahip ilaç içeren BSA-NP’lerin optimum olduğuna karar verilmiştir. Bu aşamadan sonra Pem yüklü BSA-NP’lerin (P-BSA-NP) karakterizasyonu yapılmıştır.



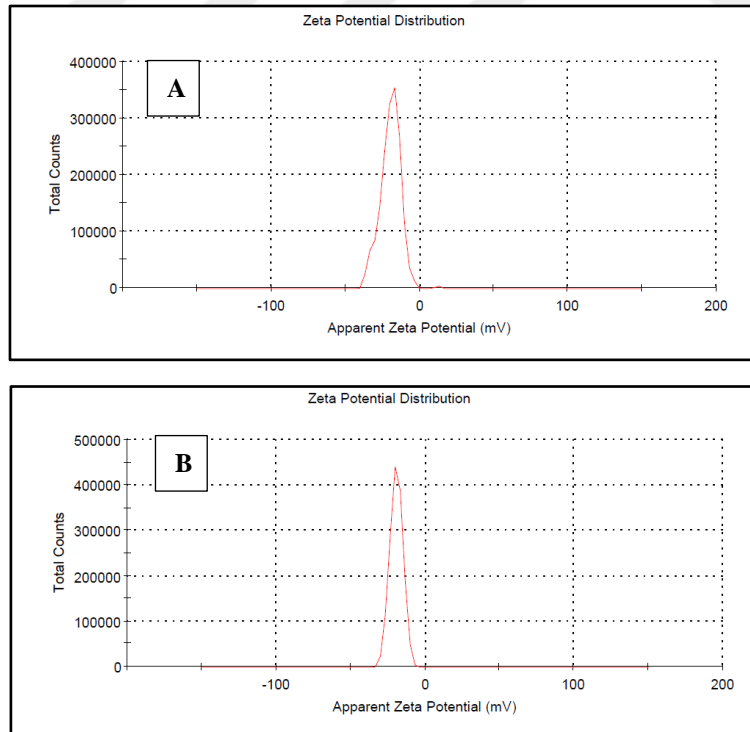


**Şekil 4.11.** A) 1,5 mg/mL konsantrasyona sahip Pem içeren BSA-NP, B) 3 mg/mL konsantrasyona sahip Pem içeren BSA-NP, C) 4,5 mg/mL konsantrasyona sahip Pem içeren BSA-NP

Şekil 4.12, 4.13'de ve Tablo 4.8'de BSA-NP ve P-BSA-NP'lerin Zeta boyut ölçümleri gösterilmiştir. Buna sulu formda ölçülen zeta sonuçları ve kuru formda çekilen SEM görüntüleri arasında küçük farklanmalar bulunmaktadır. Bu durum zeta ile boyut ölçümü sırasında partiküllerin üzerinde oluşan hidrat zarfından kaynaklanmaktadır. Sonuçlarımız literatür verileri ve birbirleri ile uyumludur.



**Şekil 4.12.** Optimum Koşullarda Hazırlanan **A)** BSA-NP zeta boyut, **B)** Pem yüklü BSA-NP zeta boyut



**Şekil 4.13.** Optimum Koşullarda Hazırlanan **A)** BSA-NP zeta Potansiyel, **B)** Pem yüklü BSA-NP zeta Potansiyel.

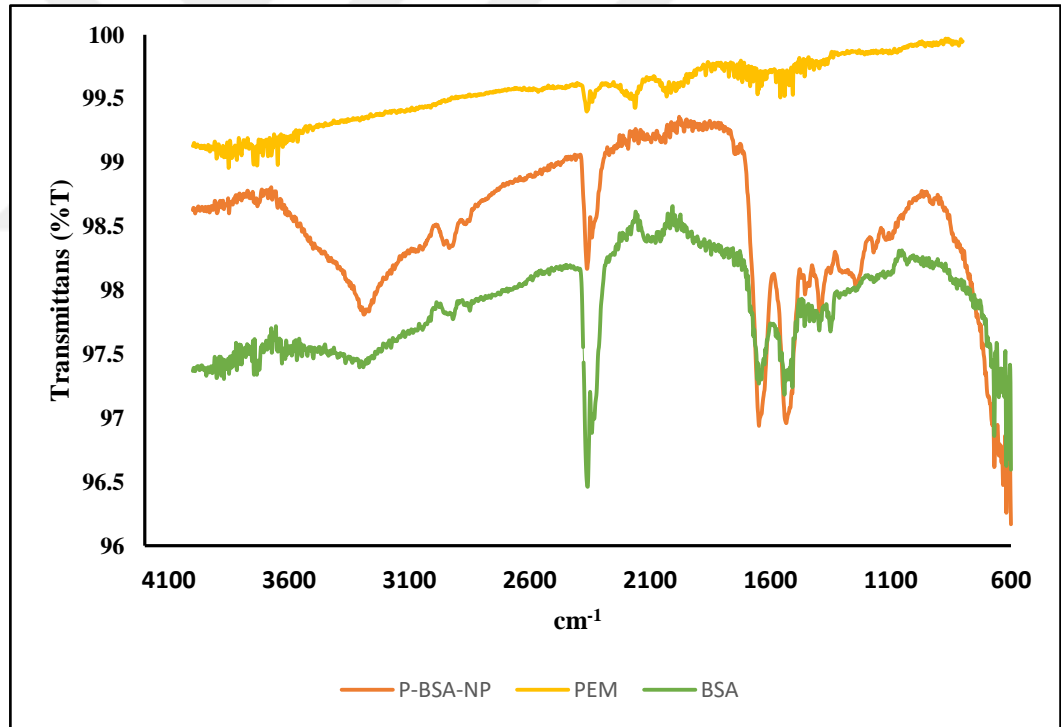


Tablo 4.8’de görüldüğü gibi nanopartiküllerin yüzeyi negatif yüke sahiptir. Bu durum hedeflendirme açısından büyük bir avantajdır. Buna ek olarak ilaç yüklü olmayan nanopartiküller ile ilaç yüklü nanopartiküller arasında yük olarak anlamlı bir farklanmanın olmadığı görülmüştür.

**Tablo 4.8.** Zeta Boyut ve Zeta Potansiyel Sonuçları

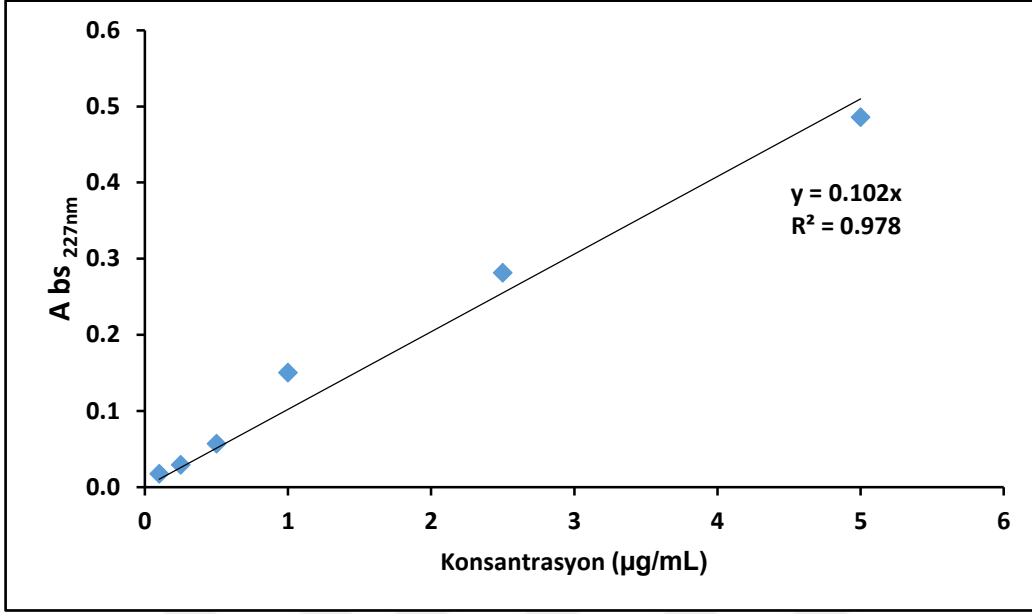
	Hidrodinamik Boyut	PDI	Zeta Potansiyel
<b>BSA-NP</b>	279±72,40	0,419	-19,6±6,64
<b>Pem yüklü BSA-NP</b>	191,6±41,57	0,340	-19,2±4,37

Şekil 4.14’de nanopartikül yapısının doğrulanması için; BSA, Pem ve P-BSA-NP’e ait FTIR görüntüsü bulunmaktadır.



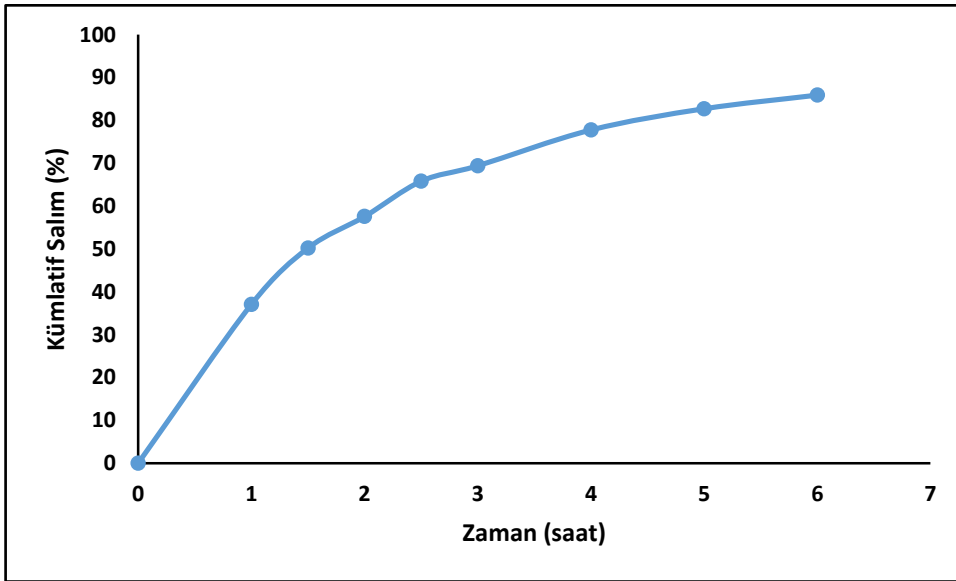
**Şekil 4.14.** BSA, Pemetrexed ve Pem Yüklü BSA-NP ait FTIR Spektrumu

#### 4.8. İlaç Salım Çalışmaları

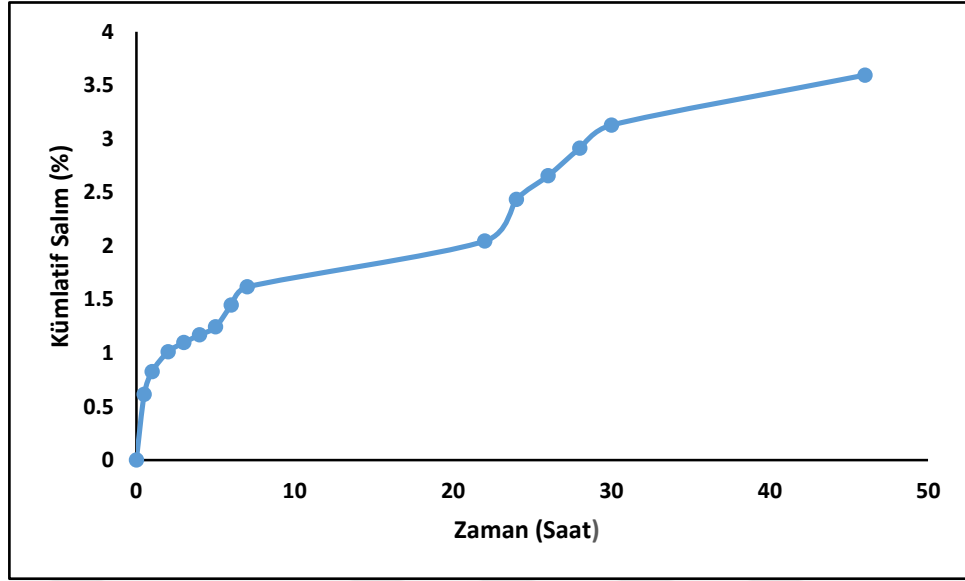


Şekil 4.15. pH=5.5 Asetat Tamponu Pemetrexed Standart Grafiği

Asetat tamponunda hazırlanan ilaca ait standart grafiğinden yola çıkılarak salıma ait grafikler çizilmiş ve serbest ilacın 6 saate yaklaşık % 85'ini salındığı gözlenmiştir. Buna ek olarak sentezlenen nanopartikülün ise 46 saatte yaklaşık % 4 salım yaptığı gözlenmiştir.

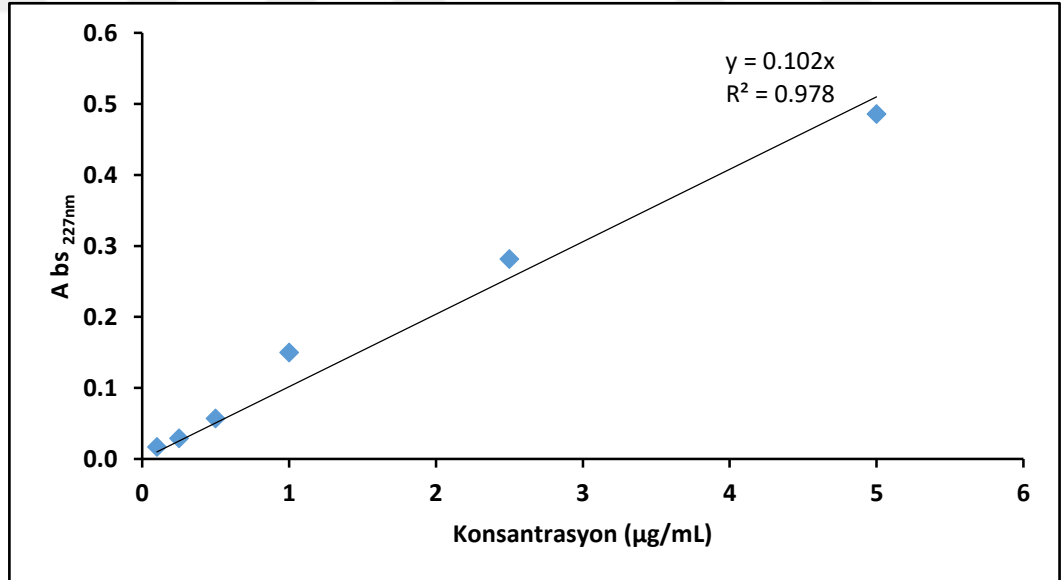


Şekil 4.16. pH=5.5 Asetat Tamponu serbest Pem İlacına ait Salım Grafiği



Şekil 4.17. pH=5.5 Asetat Tamponu Pem yüklü BSA-NP'lere ait İlaç Salım Grafiği

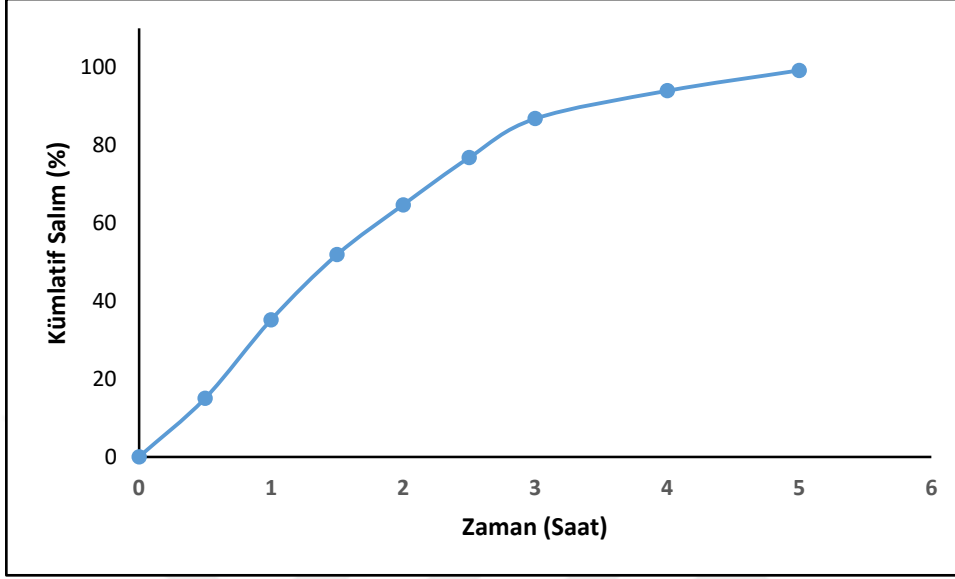
Fosfat tamponu ile ilaç salım çalışmaları yapılmadan önce, pemetrexed için standart grafiği çizildi.



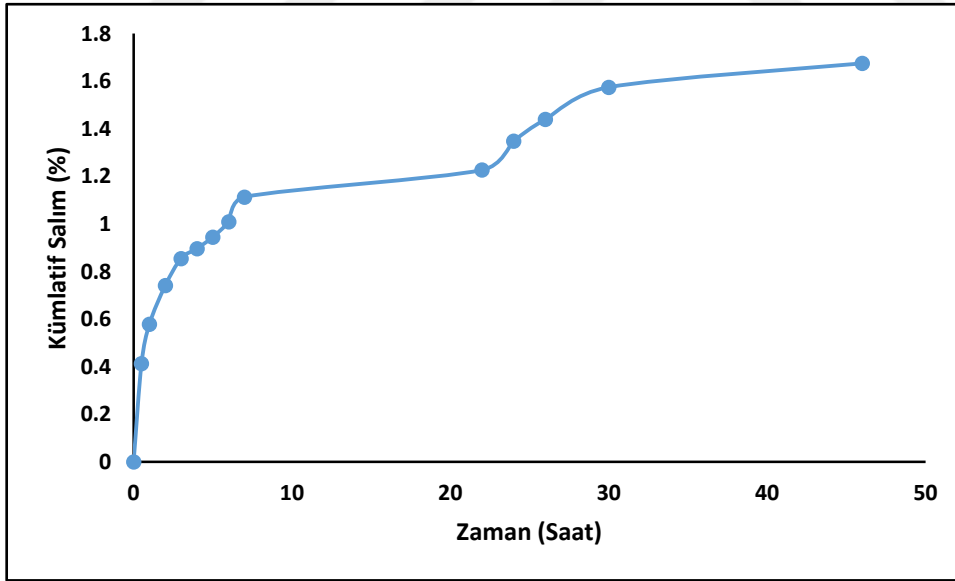
Şekil 4.18. pH=7.4 Fosfat Tamponu Pemetrexed Standat Grafiği

Fosfat tamponunda hazırlanan ilaca ait standart grafiğinden yola çıkılarak salıma ait grafikler çizilmiş ve serbest ilacın 5 saate tamamen salındığı

gözlenmiştir. Buna ek olarak sentezlenen nanopartikülün ise 46 saatte yaklaşık % 2 salım yaptığı gözlenmiştir.



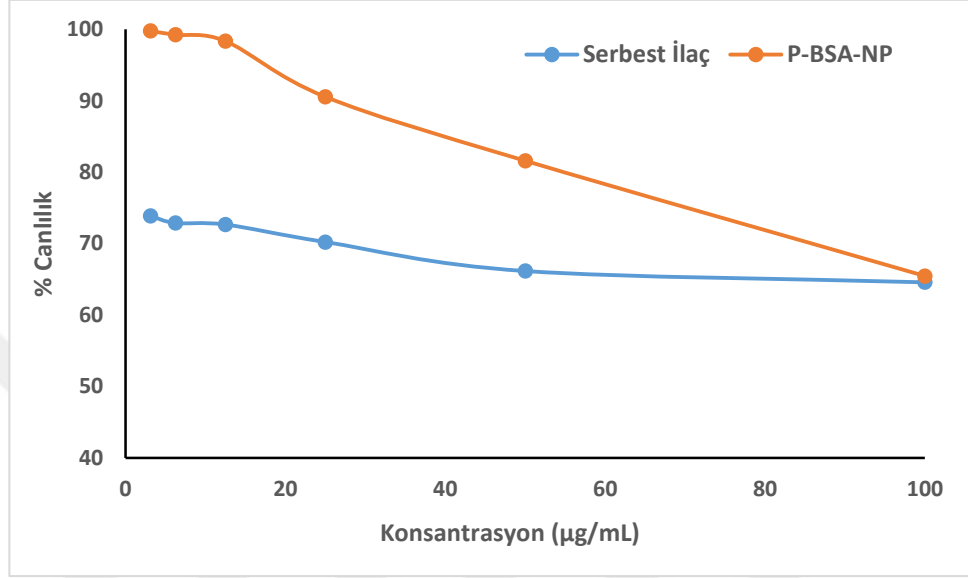
Şekil 4.19. pH=7,4 Fosfat Tamponu Serbest Pem Salım Grafiği



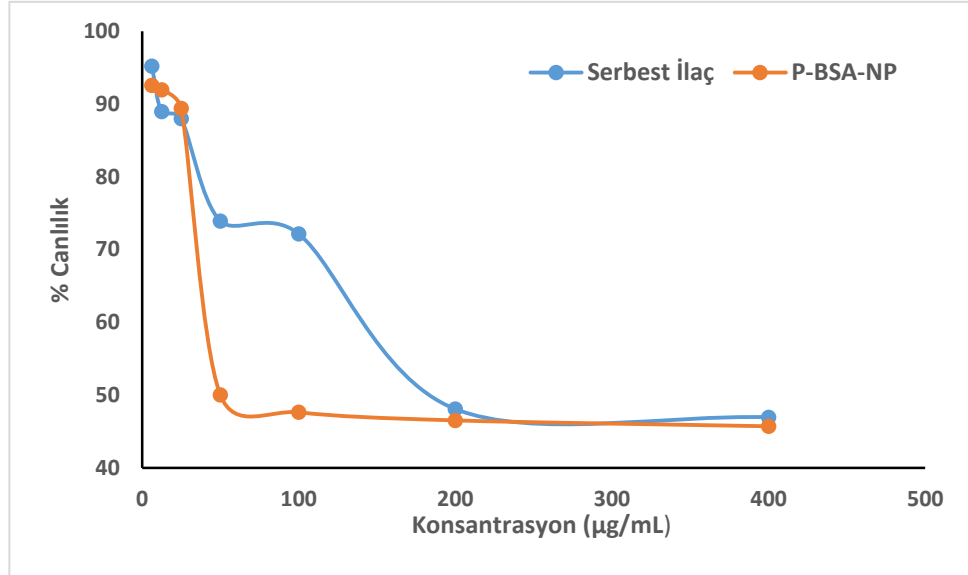
Şekil 4.20. pH=7.4 Fosfat Tamponu Pem yüklü BSA-NP'lere ait İlaç Salımı

#### 4.9. *in vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

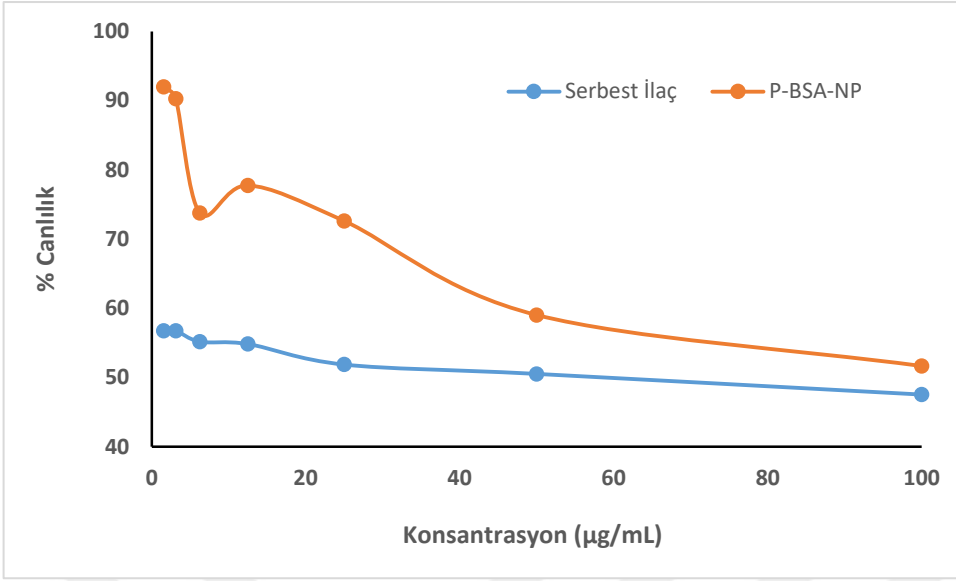
Hazırlanan pemetrexed yüklü manyetik BSA nanopartiküller iki farklı hücre hattına uygulanmış ve doz bağımlı sitotoksosite sonuçları ile elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir:



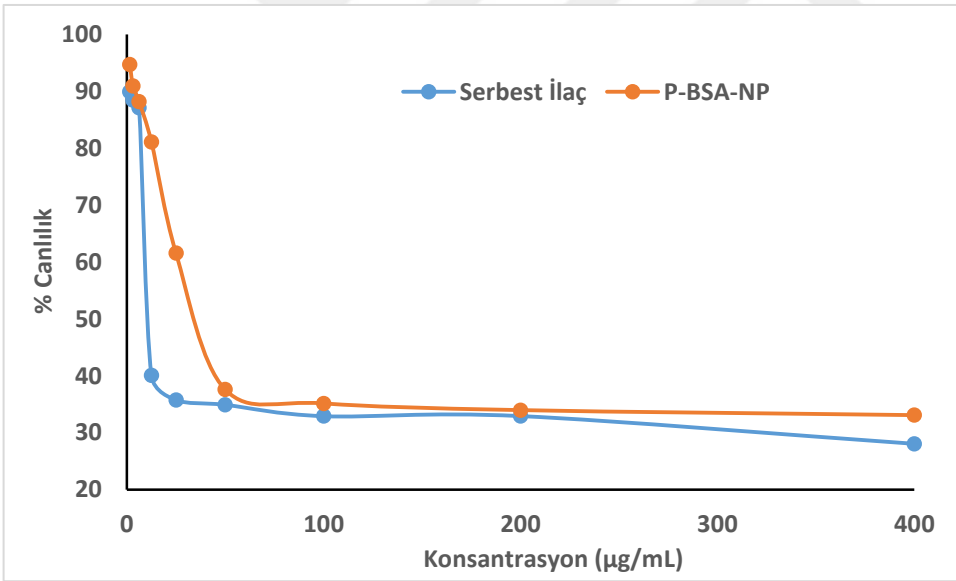
Şekil 4.21. A549 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksosite (48 saat )



Şekil 4.22. CRL 5807 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksosite (48 saat )



Şekil 4.23. A549 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksosite (72 saat )



Şekil 4.24. CRL 5807 hücre hattına ait doz bağımlı sitotoksosite (72 saat )

48 saat ve 72 saate ait  $IC_{50}$  değerleri hesaplanmış ve aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

**Tablo 4.9.** A549 ve CRL 5807 hücre hattına ait IC<sub>50</sub> Değerleri (µg/mL)

	<b>48 Saat</b>	<b>72 Saat</b>
<b>A549</b>		
Serbest Pemetreksed	88.08	18.79
P-BSA-NP	210.6	69.49
<b>CRL 5807</b>		
Serbest Pemetreksed	228.1	21.5
P-BSA-NP	127.6	51.14





## 5.TARTIŞMA

Farmasötik açıdan ilacın hedef dokuya taşınması ve bu bölgede etki etmesi en büyük sorun olmuştur. Kanser tedavisinde de ilacın tümörlü bölgeye gidene kadar diğer doku ve organlara zarar vermesinin sonucu ortaya çıkan istenmeyen etkiler en büyük sorundur. Ancak gelişen teknoloji ile birlikte kanser tedavisinde hedeflendirilmiş ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada, akciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere pemetrexed yüklü manyetik BSA nanopartiküller geliştirildi. Burada amaç, sentezlenen nanopartikülün içeriğinde bulunan manyetik nanopartiküller ile (magnetit) manyetik alandan yararlanarak akciğere ulaşması sağlanan ilacın etkinliğinin artması, sadece tümörlü bölgeye etki ederek diğer doku ve organlara zarar vermemesi ve ayrıca kontrollü olarak salım yapmasıdır. Bu nedene ilk olarak biyoyumlu, toksik olmayan BSA nanopartiküller sentezlendi.

BSA-NP'ler desolvasyon yöntemi ile sentezlendi. Sentezde ilk olarak uygun BSA miktarı belirlendi. Farklı konsantrasyonda BSA içeren reaksiyon ortamlarında protein bağlanma verimleri hesaplandı. Buradan yola çıkılarak 25mg/mL konsantrasyon sahip BSA'nın nanopartikül oluşturmak için en ideali olduğu tespit edildi. Ak ve ark., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, doksorubisin yüklü manyetik BSA nanopartiküllerin boyutları ve protein bağlama miktarına bakılarak 25 mg/mL BSA konsantrasyonunun optimum olduğu belirtilmiştir. Langer ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada 25 ile 100 mg/mL aralığında insan serum albümini (HSA) konsantrasyonları ile çalışma yapmışlar ve artan HSA miktarı ile polidispersite indeksinin (PDI) yükseldiğini ayrıca, protein bağlama miktarlarında anlamlı bir fark olmadığını saptamışlardır. PDI nanopartiküllerin büyüklüğünün dalımını ifade eder ve partikülün homojen dağılımı için beklenen PDI 0,5'in altında olmalıdır. Bu nedenle partikül boyutu 155 nm ile en düşük olan 50 mg/mL HSA optimum olarak seçilmiştir. Buna ek olarak etanol damlatma hızının etkisini de ölçerek en uygun hızın dakikada 1 mL olduğunu da bulmuşlardır. Yaptığımız bu çalışmada, benzer olarak 25 mg/ mL BSA konsantrasyonunun boyutunu 123 nm olarak saptandı. Bununla birlikte polidispersite indeksi yine 0,047 olarak en düşük 25mg/L BSA konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Buna ek olarak Sripriyalakshmi ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada 50 mg/mL BSA konsantrasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin boyutları yine bizim çalışmamıza benzer olarak, 125 nm olarak tespit edilmiştir.

Çapraz bağlayıcılar ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Glutaraldehit, formaldehit, etilen glikol gibi çapraz bağlayıcılar düşük konsantrasyonlarda bile hücre büyümesini engelleyen, toksik bileşiklerdir. Buna ek olarak bu tip çapraz bağlayıcılar ile çalışırken düşük pH, yüksek sıcaklık ve metanol konsantrasyonu gereklidir. Bu durum sentezlenen ilaç taşıyıcı açısından da dezavantaj yaratmaktadır. Bu durumun üstesinden gelmek amacıyla genipin gibi doğal çapraz bağlayıcı maddelere ihtiyaç duyulmuş ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmıştır. Genipin doğal olarak elde edilmesinin yanı sıra biyolojik dokularda ve biyopolimerlerde kovalent bağlanma ile mükemmel çapraz bağlanma kabiliyeti

olduğu içinde ilaç taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanılır (Manickam ve ark., 2014). Bu nedenle, bu çalışmada sıklıkla kullanılan glutaraldehit yerine genipin çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı. Çalışmanın ikinci adımında doğal bir çapraz bağlayıcı olan genipin konsantrasyonunu optimize edildi. İlk olarak Shahgholian ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmaya benzer olarak oluşturulan deneme sonucunda SEM görüntülerinde nano yapının oluşmadığı gözlemlendi. Bu nedenle Butler ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmaya benzer olarak kurulan denemede 10 mM genipin ile hazırlanmış reaksiyonda nano yapının oluşmadığı ve 20 mM genipin konsantrasyonu sonrası artan konsantrasyonlarda protein bağlanma veriminin düştüğü ancak bu konsantrasyonlarda nanopartikül boyutunun ise neredeyse aynı olduğu görülmüştür. Bu nedenle 20 mM optimum olarak kabul edilmiştir.

Üçüncü adım olarak yapılan süre optimizasyonu denemesinde, nanopartikül oluşması için gerekli en uygun süre belirlendi. Protein bağlama oranları ve SEM görüntüleri kıyaslandı. En yüksek protein bağlama oranının 18 saat reaksiyonda olduğu buna ek olarak 18 saat ve sonrasında oluşan partiküllerin boyutunun 65-100 nm aralığında olduğu ve aralarında anlamlı bir farklanmanın olmadığı gözlenmiştir. 15 saat reaksiyon sonunda ise nano yapı oluşmadığı gözlenmiştir. Bu durumda 15 saatin yapı oluşumu için yeterli olmadığı ve 18 saatin ise optimum koşullarda nanopartikül sentezlemeye elverişli olduğu gözlenmiştir.

Magnetit, biyoyumlu ve FDA onaylı bir yapıdır. Klinik olarak Endorem™, Feridex® ve Resovist® gibi ticari formlara sahip bir MRI kontrast maddesidir. Bu nedenle ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılması tercih edilir (Zhao ve ark. 2009). İlaç hedefleme bu yapının manyetik alanda hareket etmesine dayanır. Güçlü mıknatıslar ile hedef bölgeye ulaştırılabilirler. Bu çalışmada manyetik nanopartikül sentezi kopresipitasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin kimyasal yapısının doğrulanması amacıyla FTIR analizleri gerçekleştirildi. 550-600 cm<sup>-1</sup> aralığında gözlenen şiddetli pik Fe-O bağına ait olup magnetit yapısı ile karakterizedir. Şanlıer ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada yine aynı yöntem ile manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve 567 cm<sup>-1</sup> deki şiddetli pikin magnetik nanopartikül yapısına ait olduğu gösterilmiştir.

Bir diğer adım olarak magnetit optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Artan magnetit konsantrasyonu ile protein bağlanma yüzdelerinde bir farklanma görülmezken SEM görüntüleri 1,5 ve 3 mg/mL manyetik nanopartikül konsantrasyonuna sahip nanopartiküllerde yapının tam olarak oluşmadığı küresel yakın şekillerin olmadığı gözlemlendi. Ayrıca artan magnetit konsantrasyonu ile birlikte boyutun küçüldüğü gözlemlendi. Bu nedenle yaklaşık 132 nm yuvarlak nanopartiküller oluşturan, 7,5 mg/mL konsantrasyonda manyetik nanopartikül içeren BSA-NP lerin optimum olarak saptandı.

Pemetrexed, folat metabolizması ve pürin ve pirimidin sentezinde rol alan üçten fazla enzimi inhibe eden yeni, çok hedefli bir antifolatdır. Bu ajan, çeşitli tümörlerde faz II denemelerinde kullanılan geniş bir antitümör aktivitesine sahiptir. Lokal ilerlemiş veya metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılır. Ancak uygulama sonrası gelişen birçok hayatı tehdit edici yan etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle ilaç taşıyıcı sistemde akciğer kanser tedavisi için Pem tercih edilmiştir. Çalışmanın son optimizasyonu olan ilaç konsantrasyonu belirlenmesi, SEM ve ilaç bağlama oranları yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte ilaç bağlama verimi de artmıştır. 6 mg/mL ve 7,5 konsantrasyona sahip ilaçla ise manyetik nanopartiküller ile şelat oluşturup çökmüş ve reaksiyona girmeden kalmıştır. Buna ek olarak çekilen SEM görüntülerine göre yuvarlak 1,5mg/mL ilaç içeren nanopartiküllerin boyutlarının 300 nm civarında olduğu ve şekil, 3 mg/mL ilaç içeren nanopartiküllerin boyutlarının 200 nm'den büyük olduğu ve 4,5 mg/mL ilaç içeren nanopartiküllerin boyutlarının ise 130-160 nm aralığında olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar, kanser tedavisi için geliştirilen nanopartiküller için ideal boyut gereksinimleri 70 ila 200 nm arasında olduğunu göstermiştir (Ak G., 2014). Bu nedenle 4,5mg/mL konsantrasyon optimum olarak seçildi. Ak ve ark. tarafından yapılan çalışmada, yapıya Doxorubicin ilacı yüklenmiş ve hidrodinamik boyutları  $129 \pm 14.80$  nm, PDI ise  $0,162 \pm 0,010$  olarak bulunmuştur. Ayrıca ilaç yükleme verimleri de yaklaşık % 65 olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da hidrodinamik boyut 190 nm ve PDI 0,340 olarak saptandı.

Karakterizasyon çalışmaları, FTIR spektrumu, SEM görüntüleri, zeta boyut ve hidrodinamik çap ölçümleri ile gerçekleştirildi. Son formülasyonun FTIR spektrumuna göre,  $600 \text{ cm}^{-1}$  de görülen keskin pik magnetit yapısında bulunan Fe-O bağının neden olduğu gözlemlendi. Buna ek olarak  $1100-1200 \text{ cm}^{-1}$  aralığında görülen güçlü C-O pikleri BSA yapısında bulunan amino asitlerin yapıları ile karakterizedir. Nanopartikül yapısında  $1530 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen keskin pik ilaç yapısında bulunan N-O bağına ait olduğu görüldü ve böylece ilacın yapıya katıldığı gösterildi.  $1640 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik ise C=N stretching bağına ait olup protein yapıdan kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte nano yapıda  $2350 \text{ cm}^{-1}$  de görülen C=O=C stretching piki hem pemetrexed hem de protein yapıda olduğu için pikin şiddetinin arttığı gözlemlendi. Ek olarak,  $3270 \text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan OH stretching piki alkol yapısında bulunan OH bazlıdır. SEM görüntüleri yardımı ile yapının yuvarlak ve boyutlarının  $130-150 \text{ nm}$  olduğu tespit edildi. İlaç yüklü BSA nanopartiküllerin yuvar olduğu Ak G. ve ark. yaptıkları çalışmada SEM yardımıyla, Xie L. ve ark. (2012) ve Li ve ark. (2008) yaptıkları çalışmalarda ise TEM yardımıyla gösterilmiştir. İlaç yüklü BSA nanopartikülün hidrodinamik çapı da benzer olarak 190 nm olarak bulunmuştur. SEM görüntüleri ve hidrodinamik boyut boyut ölçümleri arasında gözlenen fark hidrodinamik çap ölçülürken nanopartikülün sulu formda olmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan zeta potansiyel verileri nanopartikül yapısının  $-19.4 \text{ mV}$  olduğunu göstermiştir. Bu durum nanopartiküllerin hücre içine alınması açısından büyük bir avantajdır. Li ve ark. tarafından (2008) yapılan bir çalışmada sodyum ferulat hapsedilen BSA nanopartiküller suda çözülmüş ve zeta potansiyelleri ölçülmüş ve  $-25 \text{ mV}$  olarak bulunmuştur. Xie L. ve

ark. tarafından yapılan bir diğerk çalışmada (2012) BSA nanopartiküllerin yüzeyi PEG gibi farklı fonksiyonel gruplarla kaplanmış ve zetapotansiyel ölçümü gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyonuna bağılı olarak nanopartiküllerin yüklerinin -36 ile -44 mV değıştiğı görülmüştür.

Salım çalışmaları fizyolojik pH taklidi yapan pH=7,4 fosfat tamponunda ve tümör mikroçevresi taklidi yapan pH 5,5 asetat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Her iki tamponda da serbest ilaç çok hızlı salınmış ancak ilaç yüklü nanopartiküller de salım çok yavaş gerçekleşmiştir. Ak G. ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada manyetik nanopartikül içeren BSA nanopartiküllere Doksorubisin (Dox) ilacı yüklemişler ve pH 5,6 ve 7,4'de ilaç salım profiliini incelemişlerdir. Nanopartiküllerden Dox'un 50 saat sonunda % 16-18'inin salındığı gözlenmiştir. Bu çalışmada ise pH 5,5 asetat tamponunda BSA nanopartiküllerden Pem'in 48 saat sonunda yaklaşık % 3.5 salındığı pH 7.4 fosfat tamponunda ise 48 saat sonunda ancak %1,6 salındığı gösterildi. İlacın fizyolojik pH da çok yavaş salınması hedefleme stratejisi açısından çok önemli bir avantajdır.

Sitotoksisite denemeleri, serbest pemetreksed ve pemetrekset yüklü manyetik BSA nanopartiküller hücre büyüme ortamlarında dağıtılarak hücrelere uygulandı. A549 ve CRL 5807 hücrelerinin ilaç grupları ile 24, 48 ve 72. saatlik inkübasyonundaki canlılıkları MTT analizleri ile belirlendi. Besi ortamında inkübe edilen kontrol grubu hücrelerinde saptanan canlılık miktarı %100 kabul edilerek ilaç örnekleri uygulanan hücrelerde canlılık hesaplamaları yapıldı. Hücre canlılık grafikleri excel programı ile çizildi. İlaçların log(konsantrasyon)una karşı hücrelerin canlılık yüzdeleri ise Prism 8.0 programı ile hesaplandı. 24 saat için anlamlı bir sonuç alınmadı. Tüm ilaç gruplarının artan ilaç konsantrasyonu ile daha fazla sitotoksisite oluştuğı tespit edildi. Zeybek ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada manyetik BSA nanopartiküllere DOX yüklenmiş ve A549 hücre hattına uygulanmış ve MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. Deneme sonunda, DOX yüklü BSA nanopartiküllerin IC50 değıeri 1.68 µM olarak bulunmuştur. İlaç içeren nanopartiküllerin canlılık üzerindeki etkisine bakıldığında ilaçların nanopartiküllerden yavaş salınması nedeniyle nanopartiküllerin toksik etkisi serbest ilaçlara göre daha yüksek dozda gözlemlenmiştir. Çalışmada 2 farklı hücre hattı birbiri ile kıyaslanmış ve CRL 5807 hücre hattında nanopartikülün toksik etkisinin daha fazla olduğı gözlendi. A549 hücre hattında 48 saatte manyetik nanopartiküllerin serbest ilaca kıyasla yaklaşık 4 kat etkili olduğı (186 µM serbest; 447 µM ilaç yüklü nanopartikül) saptandı Buna ek olarak yine 48 saatte CRL 5807 hücre hattında da benzer bir sonuç elde edilerek yaklaşık 2 kat etki elde edildiğı bulundu. Bu durum sentezlenen nanopatikülün etkinliğini gösterdi. Ayrıca CRL 5807 hücre hattında daha düşük dozda sitotoksisitenin yüksek olduğı gözlendi.

	<b>48 Saat</b>	<b>72 Saat</b>
<b>A549</b>		
Serbest Pemetreksed	186 $\mu\text{M}$	3.98 $\mu\text{M}$
P-BSA-NP	44.7 $\mu\text{M}$	14.7 $\mu\text{M}$
<b>CRL 5807</b>		
Serbest Pemetreksed	48.3 $\mu\text{M}$	4.58 $\mu\text{M}$
P-BSA-NP	27.07 $\mu\text{M}$	10.85 $\mu\text{M}$





## 5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, günümüzde ölüm nedenlerinin başında yer alan kanser tedavisine yeni bir yaklaşım ile ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Özellikle akciğer kanseri erkeklerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Pemetreksed yüklü manyetik hedefli geliştirilen BSA sistemi küçük hücreli dışı akciğer kanser tedavisinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Çalışmayı diğer nanopartiküllerden ayıran en büyük yenilik toksik olan glutaraldehit yerine doğal bir çapraz bağlayıcı olan genipinin kullanılmasıdır.

BSA nanopartiküller desolvasyon yöntemi ile sentezlendi, gereken tüm optimizasyonlar yapıldı ve tüm karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. SEM görüntüleri yapının küresel olduğunu, zeta potansiyel sonuçları negatif yüklü olduğunu ve bu sayede hedeflemeye uygun olduğunu gösterdi. Ayrıca FTIR sonuçları yapıyı doğruladı. Buna ek olarak hidrodinamik boyut ise kanser tedavisi için ideal olduğunu gösterdi. Ardından gerçekleştirilen in vitro salım ve sitotoksikite çalışmaları nanopartikül sisteminin potansiyelini gösterdi.

İn vivo sonuçlarından yola çıkılarak çalışma in vivo, ex vivo çalışmalar için potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, ilerleyen çalışmalar için kullanılabilir.





## KAYNAKLAR DİZİNİ

**Adjei A. A.**, 2004, Pharmacology and Mechanism of Action of Pemetrexed, *Clinical Lung Cancer*, Vol. 5, Suppl. 2, S51-S55.

**Ak G., Yılmaz H., Güneş A., Hamarat Sanlier S.**, 2018, “In Vitro And In Vivo Evaluation Of Folate Receptor Targeted A Novel Magnetic Drug Delivery System For Ovarian Cancer Therapy”, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, DOI: 10.1080/21691401.2018.1439838, 46 (sup1):926-937.

**Ak G., Yılmaz Habibe ve Hamarat Sanlier Senay**, 2014, Preparation of magnetically responsive albumin nanospheres and in vitro drug release studies, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 42: 18–26.

**American Cancer Society**, ‘Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Nedenleri, Risk Faktörleri ve Önleme’ <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8704.00.pdf>, (Erişim Tarihi: 27.04.2019).

**Amerikan Kanser Derneği**, <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8703.00.pdf>, (Erişim tarihi: 29.04.2019).

**Bunn P.A.**, 2000 Epidemiologic aspects of lung cancer., *Cancer J Clin*, 50:7-33.

**Butler M., Ng Y.F., Pudney P. D. A.**, 2003, Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 41, 3941–3953.

**Cancer treatment center of America**, ‘Akciğer Kanseri Hakkında’ <https://www.cancercenter.com/cancer-types/lung-cancer/about>, (Erişim tarihi: 29.04.2019).

**Cancer treatment center of America**, ‘Akciğer Kanseri Türleri’, <https://www.cancercenter.com/cancer-types/lung-cancer/types>, (Erişim tarihi: 29.04.2019).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

**Canefe K.,Duman G.,** 1994, İlaçların Seçici Taşınması ve Hedeflendirilmesi, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 23,1-2.

**Çelik M.,** 2014, Farmasötik Biyoteknolojide İlaç Hedefleme Teknikleri, Bitirme Ödevi, T.C. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.

**Çınar Z.,** 2010, İleri Evre Akciğer Kanserinde Tedavi Öncesi Doku Ve Serum MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 Düzeylerinin Klinikopatolojik Faktörler ile İlişkisi ve Prognostik Önemi, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta 2010: 71.

**Çorman M.E.,** 2010, Moleküler Baskılanmış Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu Ve Lizozim Saflaştırılmasında Kullanılması, Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü.

**Demir D.,** 2013, Dosetaksel İçeren Nanopartiküllerin Formülasyonu Ve İn Vitro Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı.

**Ginsberg MS, Grewal RK, Heelan RT.,** 2007 Lung cancer. *Radiol Clin North Am* 45: 21-43

**Hamarat Şanlier Ş., Ak G., Yılmaz H., Ünal A., Bozkaya Ü.F., Taniyan G., Yıldırım Y.,Yıldız Türkyılmaz G.,** 2018, Development of Ultrasound-Triggered and Magnetic-Targeted Nanobubble System for Dual-Drug Delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108 (2019) 1272-1283.

**Kutluk T., Kars A.,** 1992, Kanser Konusunda Genel Bilgiler, TC. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü.

**Lie F.Q, Sua H, Wang J., Liu J.-Y., Zhua Q.-G., Fei Y.B., Pan Y.H., Hu J.H.,** 2008, Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting, *International Journal of Pharmaceutics* 349 (2008) 274–282.

**Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, Abbotts J, Laszio J.,** 1984 Smoking and lung cancer: An overview. *Cancer Research* 44: 5940- 58.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)**

**Lowitz B.B. ve Casciato D.A.**, ‘Medical Oncology & Principles Of Cancer Biology’, Manual of Clinical Oncology, 4th edition, Philadelphia 2000, 768 pages, ISBN 0 781 72159 8.

**Manickam B., Sreedharan R. ve Elumalai M.**, 2014 ‘Genipin’ – The Natural Water Soluble Cross-linking Agent and Its Importance in the Modified Drug Delivery Systems: An Overview , Current Drug Delivery, 2014, 11, 139-145.

**Medical News Today**, Cattamanchi A., 2018, ‘Akciğer Kanseri Hakkında ne Bilmeli’ <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323701.php>, (Erişim tarihi: 29.04.2019).

**Molina J.R., Adje A.A.**, 2003, The Role of Pemetrexed (Alimta®, LY231514) in Lung Cancer Therapy, Clinical Lung Cancer, Vol. 5, No. 1, 21-27.

**National Cancer Institute**, ‘Hedefli Tedavi’ <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>, (Erişim tarihi: 28.04.2019).

**National Cancer Institute**, ‘Hormon Tedavisi’ <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy>, (Erişim tarihi: 28.04.2019).

**National Cancer Institute**, ‘Kanser nedir?’ <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, Erişim tarihi: 27.04.2019).

**National Cancer Institute**, ‘Kanser Tedavi’ <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy#1>, (Erişim tarihi: 28.04.2019).

**National Cancer Institute**, ‘Kemoterapi’, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>, (Erişim tarihi: 28.04.2019).

**Nature Publishing Group**, Pemetrexed disodium, 2005, Hot Drugs | Cancer, **S16**, [www.nature.com/reviews/drugdisc](http://www.nature.com/reviews/drugdisc)

**Özbaşoğlu K.**, 2013, Akciğer Kanseri Ve Akciğer Kanserinde Kullanılan Tümör Markırları, Bitirme Tezi, T.C. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Bölümü.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

**Rivera MP, Stover DE.**, 2004 Gender and lung cancer. *Clin Chest Med*, 25: 391-400

**Sakallıoğlu H.**, 2013, Manyetik Nanopartiküller Üzerine Desteklenmiş Schiff Bazı Türevi Metal Komplekslerinin Sentezleri ve Katalitiketkinliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

**Sayiner Ö., Çomoğlu T.**, 2016, Nanotaşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme, Ankara Ecz. Fak. Derg. 40(3):62-79.

**Shahgholian N., Rajabzadeh G., Malaekheh-Nikouei B.**, 2017, Preparation and evaluation of BSA-based hydrosol nanoparticles cross-linked with genipin for oral administration of poorly water-soluble curcumin, *International Journal of Biological Macromolecules*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.083>

**Tatar D.**, 2007, BSA-Dekstrin Konjugatlarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilimdalı.

**TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı**, Kemoterapi, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-tedavisi/kanser-tedavisi-nelerdir/434-kemoterapi.html>, (Erişim Tarihi: 27.04.2019).

**TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu**, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017.

**TC Sağlık Bakanlığı**, Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu Finansal Analiz Daire Başkanlığı, 2013, Human Albümin.

**Türker A. ve Dizdar Ö.**, 2017, Kemoterapötikler, Meslek içi sürekli eğitim dergisi T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri, Kemoterapötik İlaçlar.

**Tüylek Z.**, 2017, İlaç Taşıyıcı Sistemler Ve Nanoteknolojik Etkileşim, *Bozok Tıp Derg* 2017;7(3):89-98.

**Uçar O.**, 2010, Akciğer Kanseri PET/BT Bulguları İle Bilinen Prognostik Faktörlerin Karsılaştırılması, Uzmanlık Tezi, T. C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana 2010: 75.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)**

**Xie L., Tong W., Yu D., Xu J., Lib J. and Gao C.,** 2012, Bovine serum albumin nanoparticles modified with multilayers and aptamers for pH-responsive and targeted anti-cancer drug delivery, *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 6053.

**Yurdakul A. ve Atav R.,** 2007, Lipozomların Yapısı Ve Sınıflandırılması, *Tekstil ve Konfeksiyon* 4/2007.

**Zeybek A.,Şanlı-Mohamed G., Ak G., Yılmaz H. ve H.Şanlıer Ş.,** 2014, In vitro Evaluation of Doxorubicin-Incorporated Magnetic Albumin Nanospheres, *Chem Biol Drug Des* 2014; 84: 108–115.

**Zhao, H., Saatchi, K., Hafeli, U.O.,** 2009. “Preparation of biodegradable magnetic microspheres with poly(lactic acid)-coated magnetite”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1356–1363.



## TEŞEKKÜR

Akademik kariyerime başladığım günden beri tecrübeleri ile bana ışık tutan, mesleği sevdiiren, çalışmaya araştırmaya teşvik eden, yılmadan yoluma devam etmemi sağlayan Tez Danışmanım sayın Prof. Dr. Şenay Şanlıer'e, bir abla sıcaklığı ve şefkatiyle her zaman destek olan, yol gösteren sevgili Dr. Güliz Ak'a teşekkür ederim. Her zaman her koşulda koşulsuz şartsız en büyük destekçim, en büyük dayanağım olan, her zaman güç veren sevgili annem Filiz Yavuz'a ve tüm kaprislerimi çeken ama her zaman sevgisini gösteren babam Fikret Yavuz'a ve şu an yanımda olamasa da bugünlere gelmemde katkısı olan anneannem Müjgan Dinçyiğit'e teşekkür ederim. Son olarak sırdaşım, dostum olarak her zaman bana yardımcı olan ve destekleyen sevgili Alican Erhan Nebioğlu ve Tuğba Karakayalı'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma 17 FEN 005 nolu Pemetrexed Yüklü Manyetik Albumin Nanopartikül Hazırlanması, Karakterizasyonu Ve Akciğer Kanseri Hücre Hatlarında Etkinliğinin Araştırılması adlı projeye Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (BAP) tarafından desteklenmiştir.





## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : AYŞE ÜNAL

**Doğum Tarihi** : 23.04.1993

**Öğrenim Durumu** :

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi, İzmir	2016
Y. lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi, İzmir	Devam ediyor

### A. MAKALELER

**Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)**

**A1.** Hamarat Şanlıer Ş., Ak G., Yılmaz H., Ünal A., Bozkaya Ü.F., Taniyan G., Yıldırım Y., Yıldız Türkyılmaz G., Development Of Ultrasound-Triggered And Magnetic Targeted Nanobubble System For Dual-Drug Delivery, Journal of Pharmaceutical Sciences, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.030>, 2018, Vol. 108, Issue 3, p1272–1283.

### B. BİLDİRİLER

**B.1. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**

**B1.1.** Hamarat Şanlıer Ş., Ak G., Yılmaz H., Taniyan G., Ünal A., Bozkaya F., “Synthesis of Nanobubbles for Dual Therapy and Dual Targeting, Research Into Its Biocompatibility and Pharmacokinetic Studies”, Poster bildiri, b Bosna-Hersek, 27-31 Mayıs 2016.

**B1.2.** Şanlıer Ş., Ak G., Bozkaya Ü.F., Ünal A., Yıldırım Y., Yılmaz H., Boyacıoğlu H., Taniyan G., Yalçın M., “In Vivo Evaluation of Ultrasound-Mediated and Magnetic Targeted Nanobubble Formulations for Lung Cancer Treatment in Tumor-Bearing Mice”, Poster bildiri, 3<sup>rd</sup> International Conference

on Engineering and Natural Science, ICENS, Budapeşte, Macaristan, 3-7 Mayıs 2017.

**B1.3.** Şanlıer Ş., Ünal A., Ak G., Durur Y. D., Kılınçoğlu M., Gökhan S., “Preparation of Gemcitabine Loaded Magnetic Trimethylchitosan Nanoparticles For Use As A Chemotherapeutic Agent”, Poster bildiri, 3<sup>rd</sup> International Conference on Engineering and Natural Science, ICENS, Budapeşte, Macaristan, 3-7 Mayıs 2017.

**B1.4.** Ünal A., Ak G., Şanlıer Şenay, “Preparation of Gemcitabine Loaded Magnetic Chitosan Nanoparticles and In Vitro Cytotoxicity Studies on Lung Cancer Cells”, Sözlü bildiri, The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, JATUSPAB-2, Trabzon, Türkiye, 11-12 Eylül 2017

**B1.5.** Şanlıer Ş., Ak G., Ünal A., Bozkaya Ü.F, Yılmaz H., Yıldırım Y., Bakan B., Karabay Yavaşoğlu N.Ü., Oltulu F., Yavaşoğlu A., “In Vitro Evaluation of Magnetic Targeted and Ultrasound Mediated Nanobubble System for IV Injection and/or Inhaler Application for Use in Lung Cancer Treatment in Tumor Bearing Mice ”, Poster bildiri, The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, JATUSPAB-2, Trabzon, Türkiye, 11-12 Eylül 2017

## **B.2. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

**B2.1.** Ünal A., Bozkaya Ü.F., ‘Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Dual İlaç İçeren Bubble Hazırlanması ve Karakterizasyonu’, Poster Bildiri, Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü 4. Kariyer Günleri ve Bitirme Projeleri Sergisi, 16-17 Haziran 2016

## **C. Ulusal kuruluşlarca desteklenen araştırma projeleri**

**C1.** “Akciğer Kanseri Kulllanılmak Üzere iv. Enjeksiyon ve/veya İnhaler Uygulamaya Yönelik Manyetik ve Ultrases Hedefli İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi ve İn vitro/İN vivo/Ex vivo Araştırmaları” 213M672 nolu TÜBİTAK 1003 Projesi, **Bursiyer**, 2015-2016.

- C2.** “Pemetrexed yüklü manyetik albumin nanopartikül hazırlanması, karakterizasyonu ve akciğer kanseri hücre hatlarında etkinliğinin araştırılması”, 2017 FEN 005 nolu proje, **Araştırmacı**, 2017- devam ediyor.
- C3.** “Glioblastoma Tedavisine Yönelik Kati Lipid Taşıyıcılar İle Nanoteknolojik Yeni Bir Yaklaşım” 117 S241 nolu TÜBİTAK 1001 Projesi, **Bursiyer**, 2018- devam ediyor.

#### **D. Alanında ulusal bilimsel nitelikli ödüller**

**D1.** Onur Derecesi- Lisans Mezuniyeti, 2016.

#### **E. BİLİMSEL TOPLANTI DÜZENLEMEK**

##### **E1. Ulusal sempozyum, kongre, kollokyum ve sanatsal etkinlik düzenlemede üye olarak çalışmak**

**E1.1.** “Kişiselleştirilmiş kanser tedavisinde hücre kültürü, proteomik & genomik uygulamalar kursu”, Teknik ekip, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi, 1-4 Şubat 2016,

##### **E2. Katılınan Ulusal ve Uluslararası Yaz Okulları, Eğitimler ve Yarışmalar**

**E2.1.** Kanser Biyolojisi ve Genetiği Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2013

**E2.2.** Temel Kök Hücre Eğitim Semineri, EGEKÖK, 2014

**E2.3.** 7.Geleneksel Bilim ve Teknoloji Sempozyumu: Kişiyeye Özgü İlaç Tedavisi, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2015

**E2.4.** Karizma Etkisi, Motivasyon ve Kendini Yönetme Eğitimi, Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015

**E2.5.** Pozitif Yaşam Becerileri Psikolojik Enerji ve Stres Yönetimi Eğitimi, Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015

**E2.6.** Zor Koşullar Altında Hedef Yönetimi ve Kendi İşini Kurmak, Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015

**E2.7.** İletişimde Başarı Stratejileri Eğitim, Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015

**E2.8.** İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi (GMP), Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015

- E2.9.** Laboratuvar Akreditasyonu Eğitimi (ISO/IEC 17025), Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015
- E2.10.** Sürekli İyileştirme ve Geliştirme Eğitimi (KAİZEN), Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015
- E2.11.** İyi Hijyen Uygulamaları Eğitim Sertifikası (GHP), Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015
- E2.12.** İyi Laboratuvar Uygulamaları Eğitim (GLP), Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015
- E2.13.** Özel Akademik Batı Dilleri Eğitim Kurumu, Milli Eğitim Bakanlığı Özel Akademik Batı Dilleri Eğitim Kurumu, 2016, Yaşamartı Eğitim Merkezi, 2015
- E2.14.** Deneysel Hayvanları Kullanımı Sertifikası, Dokuz Eylül Üniversitesi HADYEK, 2016,
- E2.15.** 2. Deneysel Çalışmalarda Görüntüleme Yöntemleri Çalıştay, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, 2017.
- E2.16.** 4. Onkolojide Araştırma Uygulamaları Kursu- Onkolojide Deneysel Hayvan Çalışmaları, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, 2018.
- E2.17.** BD Akan Hücre Ölçer Çalıştay, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, 2018.

#### **F. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler**

Biyokimyagerler Derneği

#### **G. STAJLAR**

**G1.** Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Ağustos 2017.