

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEŞİL KİMYA YÖNTEMİYLE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN  
OLUŞTURULMASI, EPİGALLOKATEŞİN İLE KOMBİNASYONUN PLGA  
NANO-TAŞIYICILARINA YÜKLENMESİ VE MEME KANSERİ  
ÜZERİNDE ANTI-TÜMÖR ETKİLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO*  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**FATMA KAZDAL**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tıbbi Biyokimya Programı**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEŞİL KİMYA YÖNTEMİYLE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN  
OLUŞTURULMASI, EPİGALLOKATEŞİN İLE KOMBİNASYONUN PLGA  
NANO-TAŞIYICILARINA YÜKLENMESİ VE MEME KANSERİ ÜZERİNDE  
ANTI-TÜMÖR ETKİLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**FATMA KAZDAL  
(160606003)**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tıbbi Biyokimya Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT  
Eş Danışman: Dr. Fatemeh BAHADORİ**

**ŞUBAT 2021**



Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 160606003 numaralı Doktora Öğrencisi Fatma KAZDAL, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “YEŞİL KİMYA YÖNTEMİYLE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN OLUŞTURULMASI, EPİGALLOKATEŞİN İLE KOMBİNASYONUN PLGA NANO-TAŞIYICILARINA YÜKLENMESİ VE MEME KANSERİ ÜZERİNDE ANTI-TÜMÖR ETKİLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Eş Danışman :** **Dr. Fatemeh BAHADORİ** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

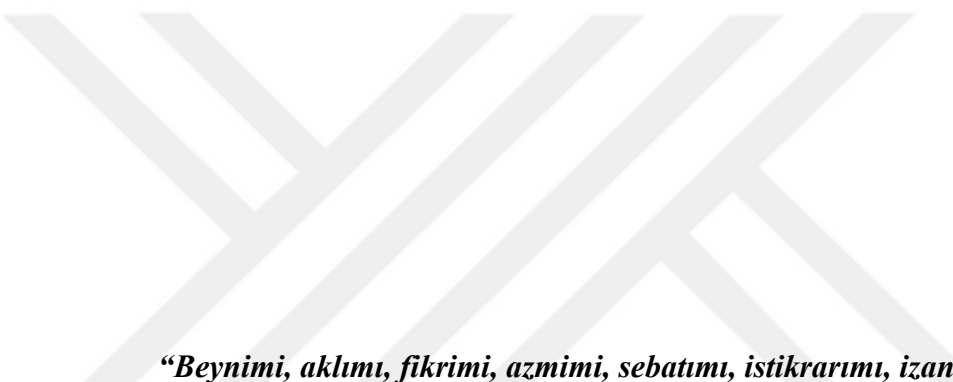
**Prof. Dr. Şehabettin SELEK** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Prof. Dr. Adı SOYADI** .....  
Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü

**(Varsa)** **Prof. Dr. Adı SOYADI** .....  
Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi

**(Varsa)** **Prof. Dr. Adı SOYADI** .....  
İstanbul Üniversitesi

**Teslim Tarihi** : 2021  
**Savunma Tarihi** : 10 Şubat 2021



*“Beynimi, aklımı, fikrimi, azmimi, sebatımı, istikrarımı, ızanımı, irfanımı,  
burhanımı, ufkumu ve muhayyilerimi büyüten” tüm zamanlara,*

## ÖNSÖZ

Öncelikle, desteği, sabrı, verdiği cesareti ve engin bilgilerinden dolayı, ilk öğrencisi onun deyimiyle “ilk göz ağrısı” olduğum danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Fatemeh Bahadori'ye, gerçek bir hoca ve bilim insanına minnettarım. Vizyonu, akademik kariyerim süresince bana ışık adeta şans olmuş, herşeyden öte kurulmuş olan manevi bağ en değerli kazanç olmuştur.

Aktüel sinir bilim bizlere diyor ki; “ İnsanların duygusal olarak bağlantı kurmadığı bir şeyi tam olarak öğrenmesi, kaydetmesi ve hatırlaması mümkün değildir.” Bu birlikteliğın ve çalışmanın başarısı, bu hipotezin bir kanıtıdır.

Profesör Dr. Abdürrahim Koçyiğit hocama engin bilgisi, en önemlisi her koşulda gösterdiği pozitif bakış açısı ve tevazusuyla sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Deneylerimi birlikte yürüttüğümüz Biyokimya laboratuvarının kıymetli araştırma görevlisi Ezgi Balkan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Evim gibi hissettiğim Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma, özellikle en küçüğümüz Moleküler Biyolog Esmâ Develi'ye fedakarlığından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak, destek ve cesaret kaynağı ailem, kuzenlerim bilakis Çevre Yüksek Mühendisi Sena İnceoğlu ve arkadaşlarım iyi ki varsınız...

Şubat 2021

Fatma Kazdal

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Fatma Kazdal  
İmza

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	viii
SEMBOLLER .....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY .....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2. GENEL BİLGİLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.1 Kanser .....	4
2.2 Meme Kanseri .....	6
2.3 Meme Kanseri Tedavisi .....	7
2.4 Kanser Tedavisinde Antioksidanlar ve Pro-oksidasyon (Fenton Reaksiyonunun Önemi) .....	9
2.5 Doğal Antioksidanlar .....	13
2.5.1 Epigallokateşin (EGC); antikanser mekanizması.....	19
2.6 Nano İlaç Taşıma Sistemleri .....	20
2.6.1 Pasif hedefleme .....	21
2.6.1.1 Yüksek geçirgenlik ve yüksek tutma etkisi (EPR effect).....	21
2.6.2 Nanopartiküller (NP).....	23
2.6.3 Nanopartiküllerin hücresel alınımı.....	24
2.7 Misel Nanopartikülleri.....	24
2.8. Poli laktik- ko- glikolik asit (PLGA).....	26
2.8.1. PLGA'nın fiziksel, kimyasal, biyolojik özellikleri ve ilaç taşıma sistemlerinde uygulanması.....	27
2.9. Yeşil Kimya ve Metal Nano Partiküllerin Hazırlanması.....	29
2.9.1 Bakır (Cu <sup>+</sup> <> Cu <sup>2+</sup> ) kompleksleri.....	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	40
3.1 Gereç .....	40
3.1.1 Cihazlar .....	40
3.1.2 Kimyasallar .....	40
3.2 Metod .....	41
3.2.1 Bitki yapraklarının toplanması .....	41



3.2.2 Bitki yaprağı ekstraktının hazırlanması.....	41
3.2.3 Bakır nanopartiküllerin sentezi.....	42
3.2.4 FITC işaretli PLGA nanomisellerin hazırlanması ve epigallokateşinin yüklenmesi.....	42
3.2.5 FITC-PLGA- EGC-Nano Cu birleşimi.....	43
3.2.6 Dondurarak kurutma.....	44
3.2.7. Dinamik ışık saçılımı kullanarak formülasyonun karakterizasyonu.....	44
3.2.7.1 Dinamik ışık dağılımı (DLS) boyutu.....	44
3.2.8 Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) kullanılarak formülasyonun karakterizasyonu.....	45
3.2.9 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak formülasyonun karakterizasyonu.....	45
3.2.10 Nanopartiküllerin 4T-1 üzerindeki antikanser etkisinin araştırılması.....	46
3.2.10.1 Hücre hazırlama.....	
3.2.10.2 Hücre kültürü.....	47
3.2.10.3 Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonunun (IC50) belirlenmesi.....	47
3.2.10.4 Sitotoksosite taraması için sulforhodamine B kolorimetrik test.....	48
3.2.11 <i>In vivo</i> hayvan çalışmaları.....	48
3.2.11.1 Meme kanseri indüksiyonu.....	48
3.2.11.2. Meme kanseri fare modeline hedeflenen serbest nano bakır, epigallokateşin yüklü nanopartiküller.....	49
3.2.11.3. <i>In Vivo</i> görüntüleme.....	50
3.2.12. Biyokimyasal analizler.....	50
3.2.12.1. Total antioksidan kapasite (TAS) ölçümü.....	50
3.2.12.2. Total oksidan kapasite (TOS) ölçümü.....	51
3.2.12.3. Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri.....	51
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>52</b>
4.1 Hazırlanan Serbest Nano Bakır, Epigallokateşin-PLGA, Epigallokateşin-Nano Bakır Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin DLS Sonuçları.....	
4.2 Dondurarak Kurutma.....	58
4.3 DSC Sonuçları.....	59
4.4 FT-IR Sonuçları.....	62
4.5 4T-1 Üzerindeki NP'lerin Hücre Kültürü İncelenmesi Sonuçları.....	65
4.6. <i>In vivo</i> Hayvan Çalışmaları.....	
4.6.1 Hayvan modelleri.....	67
4.6.2 Formülasyonların biyolojik dağılımı.....	67
4.6.3 Farelerde meme kanserine karşı farklı formülasyonların <i>in vivo</i> etkinliği.....	68
4.7 Oksidatif Stres Ölçümleri.....	69
4.8 Karaciğer ve Böbrek Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri.....	70
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>73</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>80</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>93</b>

## KISALTMALAR

<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>AST</b>	: Aspartat Aminotransferaz
<b>BHT</b>	: Bütillenmiş hidroksitolüen
<b>C</b>	: Kateşin
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>COX</b>	: Sitokrom C oksidaz
<b>Ctrl-1</b>	: Bakır taşıyıcı-1
<b>DDC</b>	: Dietildikarbamot
<b>DLS</b>	: Dynamic Light Scattering
<b>DSC</b>	: Differential Scanning Calorimetry
<b>ECG</b>	: Epikateşin gallat
<b>EGC</b>	: Epigallokateşin
<b>EGCG</b>	: Epigallokateşin gallat
<b>EGFR</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
<b>EPR</b>	: Enhanced Permeability And Retention
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>FGF2</b>	: Fibroblast Büyüme faktörü 2
<b>FT-IR</b>	: Fourier-Transform Infrared
<b>GC</b>	: Gallokateşin
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GTE</b>	: Yeşil çay ekstraktı
<b>IC50</b>	: Half Maximal Inhibitory Concentration
<b>IL-1a</b>	: İnterlökin 1-a
<b>IL-8</b>	: İnterlökin-8
<b>LOX</b>	: Lizil oksidaz
<b>MEK 1/2</b>	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
<b>MNP</b>	: Metal nanopartiküller
<b>MONP</b>	: Metaloksit nanopartiküller
<b>MRI</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NBEC</b>	: Normal Göğüs Epitel Hücreleri
<b>NF-κB</b>	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B
<b>NLP4</b>	: Nükleer protein lokalizasyon 4
<b>NPs</b>	: Nanopartiküller
<b>PdI</b>	: Polydispersity indeks
<b>PGA</b>	: Poli glikolik asit
<b>PLA</b>	: Poli laktik asit
<b>PLGA</b>	: Poli laktik ko glikolik asit
<b>RONs</b>	: Reaktif Oksijen ve Azot Türleri
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri

<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SRB</b>	: Sulforhodamine B
<b>T80</b>	: Tween 80
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktörü-a
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>VPR</b>	: Katlanmış protein yanıtı
<b>WHO</b>	: World Health Organization
<b>XIAP</b>	: X'e bağlı apoptoz inhibitörü



## SEMBOLLER

<b><math>\mu\text{L}</math></b>	: Mikrolitre
<b>Ag</b>	: Gümüş
<b>Au</b>	: Altın
<b>Cu</b>	: Bakır
<b><math>\text{CuSO}_4</math></b>	: Bakır sülfat
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>	: Hidrojen peroksit
<b>L</b>	: Litre
<b><math>\text{LOO}\cdot</math></b>	: Lipit peroksil radikali
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>Ni</b>	: Nikel
<b>nm</b>	: Nanometre
<b><math>\text{NO}\cdot</math></b>	: Nitrik Oksit
<b><math>\text{O}_2\cdot</math></b>	: Süperoksit anyonları
<b><math>\text{OH}\cdot</math></b>	: Hidroksil radikalleri
<b><math>\text{ONOO-}</math></b>	: Peroksinitrit anyonu
<b>Pd</b>	: Paladyum
<b>Pt</b>	: Platin
<b><math>\text{ROO}\cdot</math></b>	: Alkoksil radikalleri
<b>rpm</b>	: Dakikadaki tur sayısı

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1</b> : İnsan antioksidan savunma sistemleri, endojen (enzimatik ve enzimatik olmayan) ve diyet eksojen antioksidanları içerir.....	17
<b>Tablo 2.2</b> : Meyveler, sebzeler ve piyasada bulunan mevcut antioksidan konsantrasyonu örnekleri.....	18
<b>Tablo 3.1</b> : Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....	40
<b>Tablo 3.2</b> : Tez çalışmasında kullanılan katı ve sıvı kimyasal maddeler.....	41



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Normal hücrenin kanser hücresine dönüşüm aşaması.....	5
Şekil 2.2 : Meme kanseri ve patogenezi. ....	7
Şekil 2.3 : Risk faktörlerinin şematik diyagramı.....	9
Şekil 2.4 : Ekzojen antioksidanların yararlı ve zararlı etkileri.....	13
Şekil 2.5 : Epigallokateşinin kimyasal yapısı.....	20
Şekil 2.6 : Yeşil çay ekstresinden elde edilen EGC'nin zar akışkanlığına etkisi....	20
Şekil 2.7 : Gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi .....	22
Şekil 2.8 : Kanser tedavisi için ilaç taşıyıcı olarak kullanılan bazı nanopartiküller.	24
Şekil 2.9 : Polar çözücünde bir misel örneği.....	25
Şekil 2.10 : Kendiliğinden katlanmayla oluşan polimerik misel.....	26
Şekil 2.11 : PLGA'nın moleküler yapısı .....	29
Şekil 2.12 : Bitki özleri kullanılarak MNP sentezinin iki şematik özelliği .....	31
Şekil 2.13 : Metal iyonlarının nanopartikül haline getirilmesi.....	31
Şekil 2.14 : Nanopartiküllerin yeşil sentezi ,biyomedikal uygulamaları.....	33
Şekil 2.15 : Kanser hücrelerini hedef alan bakır koordinasyon bileşikleri .....	35
Şekil 2.16 : SMILE Yöntemi ile Cu (DDC) <sub>2</sub> NP'nin Hazırlanması.....	38
Şekil 3.1 : Bakır nanopartiküllerin sentezi açık renkten koyu renge doğru.....	42
Şekil 3.2 : Floresans özellikli FITC yüklü formülasyonlar.....	44
Şekil 3.3 : Hücre enjeksiyonu.....	49
Şekil 3.4 : Formülasyonun kuyruk enjeksiyonu.....	50
Şekil 4.1 : 7 mg epigallokateşin PLGA-EGC-Cu DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu.....	53
Şekil 4.2 : 15 mg epigallokateşin FITC-PLGA-EGC-Cu DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu	55
Şekil 4.3 : Nano Cu -'ın DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu.....	56
Şekil 4.4 : 15 mg PLGA -EGC DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu.....	58
Şekil 4.5 : Liyofilize formülasyonlar.....	59
Şekil 4.6 : PLGA termogramı.....	60
Şekil 4.7 : PLGA-EGC termogramı.....	60
Şekil 4.8 : PLGA-Cu termogramı.....	61
Şekil 4.9 : PLGA-EGC-Cu termogramı.....	61
Şekil 4.10 : PLGA IR spektrumu.....	62
Şekil 4.11 : Saf EGC IR spektrumu.....	63
Şekil 4.12 : Nano Cu IR spektrumu.....	63
Şekil 4.13 : PLGA-Cu IR spektrumu.....	64
Şekil 4.14 : PLGA-EGC IR spektrumu.....	64
Şekil 4.15 : FITC-PLGA-EGC-Cu IR spektrumu.....	65
Şekil 4.16 : 24. saatin sonunda formülasyonların sitotoksik aktivitesi.....	65
Şekil 4.17 : 48. saatin sonunda formülasyonların sitotoksik aktivitesi.....	66
Şekil 4.18 : 72. saatin sonunda formülasyonların sitotoksik aktivitesi.....	66
Şekil 4.19 : Aşılardan sonra oluşan tümörlerin kumpasla çift yönlü ölçümü.....	67
Şekil 4.20 : Formülasyonların tümör bölgesindeki tutulumlarının IVIS görüntüleri.	68
Şekil 4.21 : Farelerde meme kanserine karşı formülasyonların in vivo etkinliği.....	69
Şekil 4.22 : Serum oksidatif stres indeksi.....	70

<b>Şekil 4.23</b> : Karaciğer ve böbrek toksisite testi .....	71
<b>Şekil 4.24</b> : Böbrek toksisite testi (kreatinin).....	72
<b>Şekil 5.1</b> : Biyo-sentezlenmiş bakır nano partikülü.....	74
<b>Şekil 5.2</b> : EGCG'nin pro-oksidan etkileri.....	76
<b>Şekil 5.3</b> : EGCG'nin hücre kültüründe prooksidan etkileri.....	77



**YEŞİL KİMYA YÖNTEMİYLE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN  
OLUŞTURULMASI, EPİGALLOKATEŞİN İLE KOMBİNASYONUN PLGA  
NANO-TAŞIYICILARINA YÜKLENMESİ VE MEME KANSERİ  
ÜZERİNDE ANTI-TÜMÖR ETKİLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO*  
ARAŞTIRILMASI**

**ÖZET**

Fitokimyasal bileşikler genelde antioksidan özelliğe sahip olmakla birlikte, serbest demir ve bakır varlığında Fenton reaksiyonu gereği pro-oksidan etki gösterdiklerinden kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, fitokimyasalların biyoyarlanımlarının düşük olması, terapötik dozlarının yüksek olması ve selektivitelerinin istenilen düzeyde olmaması kanser tedavisinde kullanımlarını zorlaştırdığından, biyoyarlanımlarını artırıcı, daha düşük dozlarda etkinliğini artırmaya ve hedefe yönelik fitokimyasal tedavi yöntemleri geliştirmeye yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, metalik serbest bakır ve demir varlığında antioksidan fitokimyasalların, Fenton reaksiyonu olarak bilinen redoks reaksiyonu gereği pro-oksidan etki gösterdikleri, dolayısı ile kanser hücrelerini DNA hasarı yolu ile öldürme potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir. Özellikle bakırın, kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek konsantrasyonlarda olması, fitokimyasalların kanser hücreleri üzerinde selektivitesini de artırmaktadır. Dolayısı ile hedeflenen fitokimyasal bileşiklerin bakır ile birlikte nano teknolojik yöntemlerle hedef dokuya taşınmasıyla, hem fitokimyasal bileşiğin pro-oksidan etkinliğinin artırılması hem de sağlam dokulara zarar vermeden sadece kanser dokusunda etkili olmasının sağlanması düşünülmüştür. Amacımız, yeşil kimya yöntemi ile oluşturulan bakır nano-partiküllerini yeşil çayda fazla miktarda bulunan ve önemli bir antioksidan fitokimyasal olan epigallokateşin ile birlikte nano-taşıyıcılara yükleyerek epigallokateşinin (EGC) hedef kanser dokusuna taşınması ve anti-tümör etkinliğinin artırılmasıdır. Biyo-sentezlenmiş Cu nano-konjugatlar uzun süre oldukça kararlı ve *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde biyoyumlu olduğu bulunmuştur. Anti-oksidan fitokimyasal olarak EGC kullanılırken, bakır, yeşil kimya yöntemi ile metalik nano-partiküllere dönüştürülmüş ve her ikisi de poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nano misellerinin içine yüklenmiştir. Bunun için, öncelikler *in vitro* ortamda, yeşil kimya ile üretilen nano-bakır ile EGC PLGA nano-partikülünün farklı konsantrasyonlarının meme kanser hücreleri (4T-1) üzerine genotoksik, apoptotik ve sitotoksik etkileri analiz edilecek ve sağlam meme hücreleri ile karşılaştırılmıştır. EGC 'nin IC50'si DMSO ve PLGA-EGC-Cu'da 72 saat



içerisinde sırasıyla  $2,89 \text{ mg} \pm 1,8757$ ;  $7,37 \text{ mg} \pm 12,129$  iken, serbest nano bakırın IC50'si  $4,70 \text{ mg} \pm 0,3596$  olarak bulunmuştur. PLGA'daki epigallokateşin, DMSO'daki epigallokateşine kıyasla hücrelerin % 50'sinde ölüme neden olabilmesi için daha yüksek bir konsantrasyona ihtiyaç duymuştur. Aynı zamanda PLGA-EGC-Cu formülasyonunun 24 saat içerisinde 4T-1 hücrelerini öldürdüğü, canlı hücrelerin 48 ve 72 saat içerisinde proliferasyona uğradığını göstermektedir. *In vitro* ortamda etkin doz tespit edilmiş, sonrasında aynı kompleks *in vivo* ortamda deney hayvanlarına verilerek anti-tümör etkinliği araştırılmıştır. 4T-1 tümörlü nude farelerde, serbest EGC ve serbest nano bakıra göre PLGA-EGC-Cu kombine tedavi ile en iyi sonuçları vermiştir. Tümör hacmi, tedavi edilmeyen grup, nano Cu, PLGA-EGC-Cu ve PLGA-EGC tedavi grupları ile karşılaştırıldığında yaklaşık 15 kat, 3,5 kat ve 2.86 kat azalmıştır. PLGA nano taşıyıcısı FITC işaretli olacağından, farelere uygulanan nanopartikülerin tümörde tutulumu IVIS görüntüleme cihazı ile takip edilebilmiştir. Böylece, hem fitokimyasalın pro-oksidan etkisi artırılarak tümör hücreleri üzerine daha düşük dozlarda etkili olması, hem de kanser dokusuna yoğunlaştığından sağlam hücrelere zarar vermesi önlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Doğal Antioksidanlar, Hedefli Kanser Tedavisi, Bakır, ROS, Pro-oksidan , Kombin Terapi ,Yeşil Kimya

**PRODUCTION OF COPPER NANOPARTICLES BY THE GREEN  
CHEMISTRY METHOD, LOADING OF EPIGALLOCATECHIN  
COMBINATION ON PLGA NANO-CARRIERS AND INVESTIGATION OF  
THEIR *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTI-TUMOR EFFECTS ON BREAST  
CANCER**

**SUMMARY**

Although phytochemical compounds generally have antioxidant properties, they are used in cancer treatment because they show pro-oxidant effect due to Fenton reaction in the presence of free iron and copper ions. However, since the bioavailability of phytochemicals is low, their therapeutic doses are high and their selectivity is not at the desired level, making it difficult to use them in cancer treatment, studies to increase their bioadjectivity, increase their effectiveness at lower doses and develop targeted phytochemical treatment methods have recently gained importance. In recent studies, it has been shown that antioxidant phytochemicals in the presence of metallic free copper and iron have a pro-oxidant effect due to the redox reaction known as the Fenton reaction, and thus have the potential to kill cancer cells by DNA damage. In particular, the fact that copper is at higher concentrations in cancer cells than normal cells increases the selectivity of phytochemicals on cancer cells. Therefore, by transporting the targeted phytochemical compounds together with copper to the target tissue by nano-technological methods, it has been thought to increase the pro-oxidant activity of the phytochemical compound and to ensure that it is effective only in cancer tissue without damaging healthy tissues. Our aim is to transfer the epigallocatechin (EGC) to the target cancer tissue by loading the copper nanoparticles formed by green chemistry method with epigallocatechin, which is an important antioxidant phytochemical in green tea, to the target cancer tissue and to increase the anti-tumor activity. Bio-synthesized Cu nano-conjugates have long been found to be highly stable and biocompatible in *in vitro* and *in vivo* systems. While EGC was used as anti-oxidant phytochemical, copper was transformed into metallic nanoparticles by green chemistry method and both were loaded into poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanomelles. For this purpose, the genotoxic, apoptotic and cytotoxic effects of different concentrations of nano-copper produced with green chemistry and EGC PLGA nanoparticle on breast cancer cells (4T-1) will be analyzed and compared with intact breast cells. The IC<sub>50</sub> of EGC was 2.89 mg ± 1.8757 in DMSO and PLGA-EGC-Cu within

72 hours, respectively; While it was  $7.37 \text{ mg} \pm 12,129$ , the IC50 of free nano copper was found to be  $4.70 \text{ mg} \pm 0.3596$ . Epigallocatechin in PLGA required a higher concentration to cause death in 50% of cells compared to epigallocatechin in DMSO. It also shows that the PLGA-EGC-Cu formulation kills 4T-1 cells within 24 hours, and living cells proliferate within 48 and 72 hours. The effective dose was determined in vitro, and then the same complex was given to experimental animals in vivo to investigate anti-tumor activity. In nude mice with 4T-1 tumors, PLGA-EGC-Cu combined treatment yielded the best results compared to free EGC and free nanofiber. Tumor volume was reduced approximately 15-fold, 3.5-fold, and 2.86-fold compared to the untreated group, nano Cu, PLGA-EGC-Cu, and PLGA-EGC treatment groups. Since the PLGA nanocarrier will be FITC labeled, the uptake of the nanoparticles



applied to mice in the tumor could be followed by an IVIS imaging device. Thus, the pro-oxidant effect of the phytochemical was prevented from being effective on tumor cells at lower doses and damaging intact cells as it concentrated on cancer tissue.

**Keywords:** Natural Antioxidants, Targeted Cancer Therapy, Copper, ROS, Pro-oxidant, Combination Therapy, Green Chemistry



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, günümüzde tüm dünya ülkeleri için büyük sorun teşkil eden hastalıkların başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumunun (IARC) 2030 yılı için öngörüsü, kanserin ölüm nedenleri arasında birinci sırada olacağı yönündedir [1] . Günümüzde ilaçların etken maddelerinin nano- ilaç taşıma sistemlerine yükleyerek, etkilerini arttırmak, yan etkilerini azaltmak ve hedefli ve kontrollü salınımlarını sağlamak farmasötik araştırmaların en sıcak ve gündemde olan konularından biridir. Bu doğrultuda sayısı yüzleri bulan doğal ve/veya polimerik nano ilaç taşıma sistemi kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başlıca çalışma prensibi ilaç etkin maddesini, 200 nm' den daha küçük boyuttaki ilaç taşıma sistemine yüklemekten ibarettir. Tümör bölgesinde, damar endotelleri arasındaki boşluk yaklaşık 200 nm' dir. Bu boyuttan daha küçük olan ilaç-taşıyıcı kompleksler, tüm vücutta dolaşırlar ve sadece tümör bölgesinde bu aralıklardan damar çeperini geçip tümör bölgesinde yığılırlar. 200 nm'den küçük boyut, nano formülasyonun tümör bölgesinde birikmesini sağlıyor iken, aynı zamanda içinde taşıdığı anti-kanser ilacının stabilitesini de sağlamaktadır.

Kateşinler (C), polifenoller grubunda yer alan ve meyvelerde ve çay, şarap gibi içeceklerde ve çikolatada bulunan flavanollerdir. Bu grup flavanoller majör olarak kateşin, epikateşin (EC) ve epigallokateşin (EGC) alt gruplarını içermektedir. Kateşinler, doğal antioksidan aktiviteleriyle bilinirler ve bitkilerdeki bu polifenoller vasküler, viral, gastrointestinal ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılırlar [2].

Taze çay filizinde bulunan kateşinler ve oranları (% , kuru verim):

- Epigallokateşingallat (EGCG) %9-13,
- Epikateşingallat (ECG) %3-6,
- Epigallokateşin (EGC) %3-6,
- Epikateşin (EC) %1-3.
- Gallokateşin (GC) %3-4
- Kateşin(C) %1-2

Kateşinler yeşil çay yapraklarındaki ana biyoaktif bileşenleri oluşturur ve bir bardak yeşil çayda 100-200 mg kateşin bulunmaktadır [3]. Çay kateşinlerinin antioksidan aktiviteleri büyükten küçüğe doğru gallat>epigallokateşin>epikateşin gallat>epikateşin şeklinde sıralanmaktadır [4].

Alfa-, Beta- ve gama-hidroksi asitlerin poliester ve kopolimerleri son 20 yılda en yaygın olarak kullanılan sentetik biyoparçalanabilir polimerlerdir. Parçalanmaları zaman, sıcaklık, düşük molekül ağırlıklı safsızlıklar ve katalist konsantrasyona bağlıdır. Poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimeri olan poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) ilaç taşınmasında tasarımları ve performansları yönüyle en iyi tanımlanmış polimerlerdir. PLGA “altın standart” olarak kabul edilmektedir. PLA yüksek kristal yapısı nedeniyle oldukça serttir, PGA ise düşük kristal yapısı nedeniyle yumuşaktır. PLGA’nın parçalanma süresi birkaç günden birkaç yıla kadar değişebilmektedir. Bu polimerin molekül ağırlığına ve laktik asit-glikolik asit kısımlarına bağlıdır. Laktik asit birim sayısı arttıkça, molekül ağırlığı ve kristal yapı artar ve bunun sonucunda parçalanma yavaşlar. PLGA, FDA tarafından onaylı bir polimerdir, ancak henüz dünya piyasasında onaylı bir nanosistem mevcut değildir.

Nano ilaç taşıma sistemleri, terapötik molekülleri direk kanser tümör bölgesine taşıdıkları için az dozda yüksek etki sağlamaktadırlar. Bunun yanı sıra nano ilaç taşıma sisteminin içine hapsedilen aktif moleküllerin sudaki çözünürlüğü de artmakta ve en önemlisi stabilite kazanmaktadırlar. En önemli nano-ilaç taşıma sistemlerinden bir de misellerdir. Miseller özellikle son yıllarda ilaç ve genlerin taşınmasında büyük önem kazanmıştır [5]. Miseller bir ucu hidrofob (sudan kaçan) diğer ucu hidrofil (suyu seven) tek zincirli ya da dallanmış materyallerin (amfifilik materyallerin) sulu ortamda bir araya gelmesinden oluşan küresel yapılardır [6]. Suyu sevmeyen kısımlar sulu ortama girince sudan kaçarak birbirine tutunurlar ve suyu seven kısımları suya maruz bırakırlar, böylelikle küresel yapılar oluşmuş olur. Bu misellerin merkez (core=çekirdek) kısmı hidrofobik ve kabukları (Shell =dış kısmı) hidrofildir [7]. Sudaki çözünürlüğü az olan ilaçlar bu sisteme dâhil edildiğinde, misellerin suyu sevmeyen kısımlarına yakınlaşacaklarından, miselin içinde fiziksel olarak tuzağa düşeceklerdir. Misellere yüklenen ilacın inflamasyon bölgesini hedeflemesi Gelişmiş Geçirgenlik ve Alıkonma Etkisine (Enhanced Permeability and Retention (EPR) dayanmaktadır. EPR hedefli ilaç formülasyonlarının en bilinen fenomenidir [8].

Oksidatif stresin canlı hücrelere zararlı olduğu bilinen bir gerçektir. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) birçok hastalığın başlangıcı ve gelişmesinde büyük bir öneme sahiptir. Kanser bu hastalıkların en önemlisidir. Antioksidan moleküller, vitaminler veya antioksidan enzimler organizmaları ROS etkisinden koruyabilirler. Dolayısı ile, antioksidanlar kanserin önlenmesinde önemlidirler. Kanser hücrelerinin öldürülmesinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerinin temel etki mekanizması ise, fazla miktarda ROS üretimi yolu ile DNA hasarı sonucu hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesidir. Tedavide kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha fazla öldürülmesin esas nedeni, kanser hücrelerinden kaynaklanan endojen ROS ve antineoplastik ilaç nedeniyle oluşan eksojen ROS un kümülatif etkisidir.

Fitokimyasal etken maddeler genelde antioksidan özelliğe sahip olup, düşük dozları canlıda antioksidan etki gösterirken, yüksek dozları serbest demir ve bakır varlığında pro-oksidan etki göstermektedir [9]. Fitokimyasal etken maddelerin kanser tedavisinde kullanımını sınırlayan en önemli nedenlerden biri, genelde biyoyararlanımlarının düşük olması nedeni ile oral yoldan terapötik dozlara ulaşılmasının çok zor olmasıdır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan kürkümün ve C vitamini gibi etken maddeler için intravenöz kullanım tercih edilmektedir.

Son yıllarda bakırın antioksidan bileşikler ile birlikte kanser tedavisinde kullanımıyla ilgili çalışmalar artmıştır [10]. Bu noktadan hareketle çalışmamızda doğal ürünler arasında en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinen epigallokateşin bakır ile birlikte PLGA nanopartiküllere yüklenecektir. Bakır, misellere yüklenmeyecek kadar küçük bir atom olduğundan ayrıca iyonik halde son derece suda çözünür olduğundan metalik sıfır değerine indirgenerek PLGA'ya yüklenecektir. Bunun için yeşil kimya yönteminden yararlanacaktır.

Günümüzde polifenolik bileşiklerin pro-oksidan etkilerinden yararlanılarak kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu tür etken maddelerin yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) değerlerinin çok yüksek olması kanser tedavisinde kullanımını zorlaştırmaktadır. Araştırmanın önemi, hem bakır nanopartikül oluşturarak, hemde polifenolik bir bileşik olan epigallokateşin ile kombine ederek ve nanotaşıyıcıya yükleyerek etken maddenin pro-oksidan aktivitesini artırmak ve hedef dokuya taşınmasını sağlamaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kanser

Kanser, vücudun diğer bölgelerine yayılma veya istila etme potansiyeli olan anormal hücre büyümesini içeren bir genetik bozukluklar sınıfıdır. Protein bileşenlerinin genetik kodlamasını etkileyen mutasyonlar veya epigenetik değişimler nedeniyle, normal hücrelerin büyümesini kontrol eden yollarda deregülasyon meydana gelebilir ve kanser gelişimine yol açabilir (Şekil 2.1 ) [11].

İki gen sınıfı (yani, "proto-onkogenler" ve "tümör baskılayıcı genler") kanserin indüklenmesinde kritik rol oynar. Bu iki gen kümesi, hücre çoğalmasını ve büyümesini etkileyen çok sayıda protein türünü kodlar. Bu iki gen sınıfındaki her türlü mutasyon kanser gelişimine katkıda bulunur . İnsan genomundaki mutasyonlar, toplam gen setinin yüzde biri kadarında, farklı kanser türlerinin oluşumunu tetikleyebilir [12].

Olası belirti ve semptomlar arasında bir yumru, anormal kanama, uzun süreli öksürük, açıklanamayan kilo kaybı ve bağırsak hareketlerinde bir değişiklik yer alır. Bu belirtiler kansere işaret ederken başka nedenleri de olabilir. 100'den fazla kanser türü insanları etkiler.

Kanser dünya çapında ciddi bir sorundur ve ABD gibi bazı ülkelerde başlıca ölüm nedenlerinden biridir. [13] Kanser, yüksek nüks oranına sahip heterojen bir dizi hastalık olarak bilinir. Her yaştan, ırktan veya sosyoekonomik durumdan insanları etkiler.

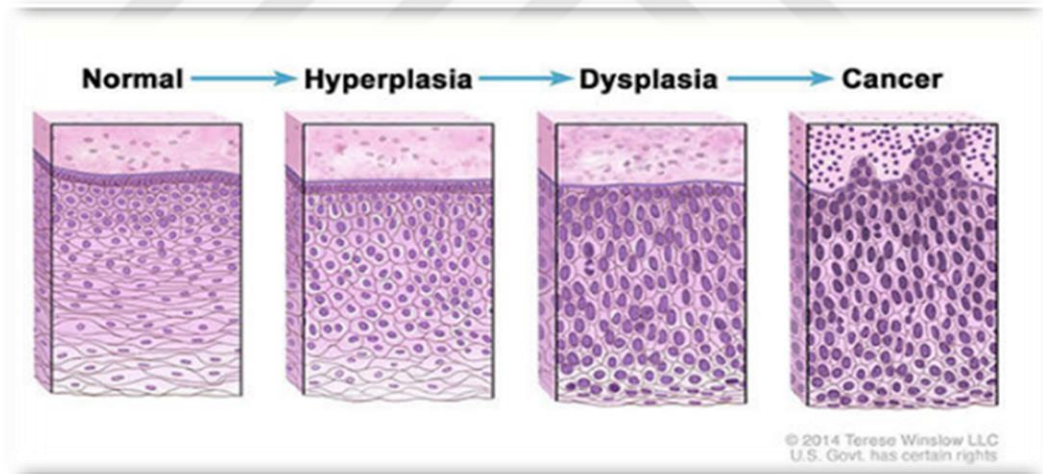
Tütün kullanımı, kanser ölümlerinin yaklaşık % 22'sinin sebebidir. Diğer % 10'u ise obezite, kötü beslenme, fiziksel aktivite eksikliği veya aşırı alkol kullanımından kaynaklanmaktadır [14]. Diğer faktörler arasında belirli enfeksiyonlar, iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma ve çevresel kirlenmeler yer alır [15]. Gelişmekte olan dünyada kanserlerin % 15'i *Helicobacter pylori*, hepatit B, hepatit C, insan papilloma virüsü enfeksiyonu, Epstein – Barr virüsü ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gibi enfeksiyonlara bağlıdır. Bu faktörler, en azından kısmen, bir hücrenin genlerini değiştirerek etki eder. Tipik olarak, kanser gelişmeden önce birçok genetik değişiklik



gereklidir. Kanserin yaklaşık % 5-10'u kişinin ebeveynlerinden kalıtsal genetik kusurlardan kaynaklanmaktadır. Kanser, belirli belirti ve semptomlar veya tarama testleri ile tespit edilebilir. Daha sonra tipik olarak tıbbi görüntüleme ile daha fazla araştırılır ve biyopsi ile doğrulanır.

Sigara içmemek, sağlıklı kiloda kalmak, çok fazla alkol almamak, bol sebze, meyve ve tam tahıl tüketmek, bazı bulaşıcı hastalıklara karşı aşı yapmak, çok fazla işlenmiş ve kırmızı et yememek veya kaçınmakla ve çok fazla güneş ışığına maruz kalmama bazı kanserlerin gelişme riski azaltılabilir [16].

Kanser genellikle radyasyon tedavisi, cerrahi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavinin bazı kombinasyonlarıyla tedavi edilir. Ağrı ve semptom yönetimi, bakımın önemli bir parçasıdır. Palyatif bakım, ilerlemiş hastalığı olan kişilerde özellikle önemlidir. Hayatta kalma şansı, kanserin türüne ve tedavinin başlangıcındaki hastalığın derecesine bağlıdır. Tanı anında 15 yaşın altındaki çocuklarda, gelişmiş dünyada beş yıllık sağkalım oranı ortalama % 80'dir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kanser için ortalama beş yıllık sağkalım oranı % 66'dır.



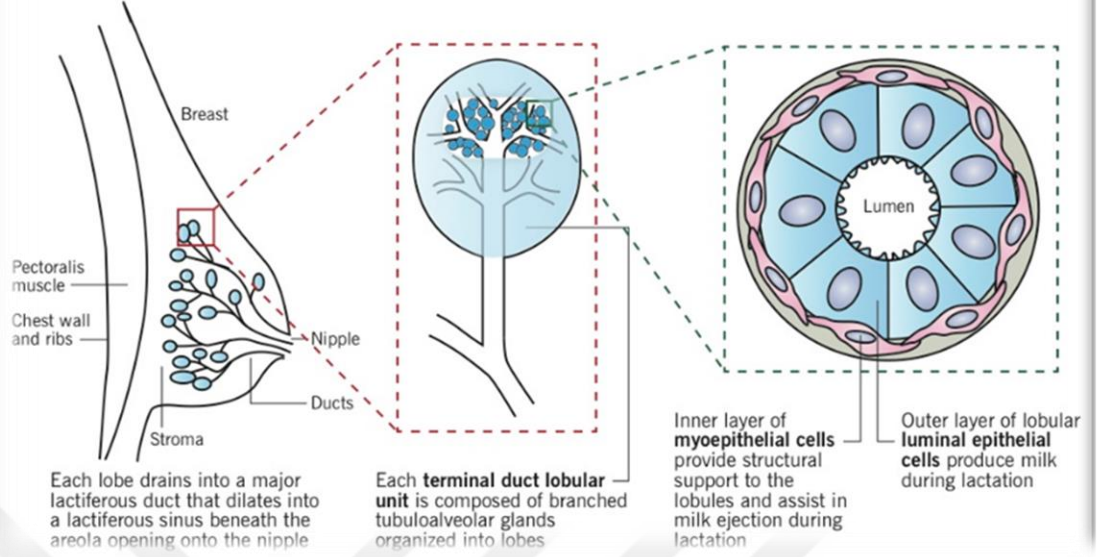
**Şekil 2.1** Normal hücrenin kanser hücresine dönüşüm aşaması.

## 2.2 Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında dünya çapında kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. 2015 yılında yaklaşık 570.000 ölüme karşılık gelmektedir. Tüm dünyada her yıl 1,5 milyondan fazla kadına (kanserli tüm kadınların % 25'i) meme kanseri tanısı konulmuştur [17]. Amerika'da 2017'de kadınlar arasında tüm yeni kanser vakalarının % 30'unun (252.710) meme kanseri olduğu tahmin edilmektedir [18]. Meme dokusu, süt üretmek için lobüllerden, lobüllerden meme ucuna süt taşımak için kullanılan kanallar ve bağ ve yağ dokularından oluşan stromadan oluşur. Meme kanseri bahsedilen bu üç dokudan herhangi birinde meydana gelebilir, ancak genellikle tümörün kaynağı ya “kanalları kaplayan hücreler (duktal karsinom) ya da bezlerdir (lobüler karsinom)” (Şekil 2.2) [19]. Diğer bazı durumlarda, tümör lobüllerde ve stromada nadir durumlarda oluşmaya başlar. Kanser hücreleri istilacı hale gelirse, lenf düğümleri veya kan akışı yoluyla vücuttaki diğer dokulara yayılır ve metastatize olurlar.

Meme kanseri metastatik bir kanserdir ve genellikle kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi uzak organlara geçebilir, bu esas olarak tedavi edilemezliğinden sorumludur. Hastalığın erken teşhisi, iyi bir prognoza ve yüksek bir hayatta kalma oranına yol açabilir. Kuzey Amerika'da, meme kanseri hastalarının 5 yıllık bağıl sağkalım oranı, bu hastalığın zamanında tespiti nedeniyle % 80'in üzerindedir [20]. Mamografi, meme kanserinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir tarama yaklaşımıdır ve ölüm oranını etkili bir şekilde azaltmaya yardımcı olduğu kanıtlanmıştır. Mamografiden daha hassas olan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) gibi diğer tarama yöntemleri de son on yılda uygulanmış ve çalışılmıştır [21]. Cinsiyet, yaşlanma, östrojen, aile öyküsü, gen mutasyonları ve sağlıksız yaşam tarzı gibi meme kanseri gelişme olasılığını artıracak çok sayıda risk faktörü vardır [22]. Göğüs kanseri ile ilgili BRCA1 / 2, HER2, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), c-Myc, Ras gibi birçok gen tanımlanmıştır. Hem onkogenlerin hem de anti-onkogenlerin mutasyonları ve anormal büyümesi, tümör başlangıcı ve ilerlemesi süreçlerinde anahtar rol oynar. Çoğu meme kanseri kadınlarda görülür ve vaka sayısı kadınlarda erkeklere oranla 100 kat daha fazladır [18]. Amerika'da meme kanseri görülme oranı her geçen yıl artmasına rağmen, erken taramaların yaygınlaşması ve gelişmiş tıbbi tedaviler nedeniyle ölüm oranı azalmaktadır. Biyolojik tedaviler son yıllarda geliştirilmiş ve meme kanserine faydalı olduğu kanıtlanmıştır.

The breast is composed of glandular and stromal tissue. Glandular tissue includes the ducts and lobules. **Stroma** comprises area between lobes.



Şekil.2.2 Meme kanseri ve patogenezi.

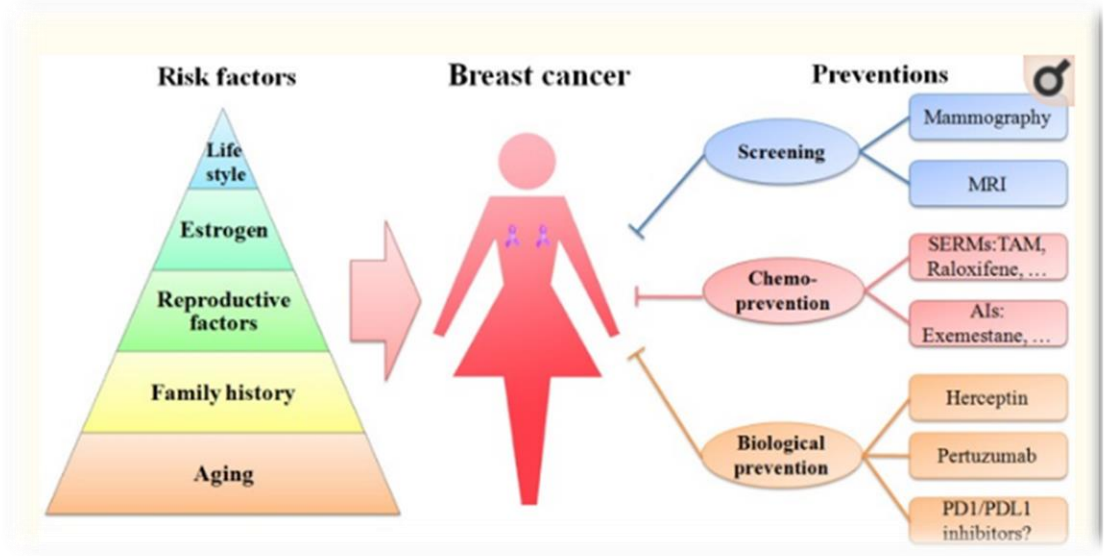
### 2.3 Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanseri teşhisi konmuş kadınlar için çeşitli tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Bu hastalığın cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve endokrin tedavisi gibi geleneksel tedavi yaklaşımları, son yıllarda lokal olarak ilerlemiş veya metastatik meme kanseri olan hastalar için daha verimli hale gelmesine rağmen, bu tedavi yöntemleri, yanıt sıklığı ve içsel ve edinilmiş direncin gelişimi ile ilgili olarak hala geniş sınırlamalara sahiptir. Tedavi seçenekleri birleştirildiğinde, kanseri tamamen ortadan kaldırma şansı büyük ölçüde artar. Tam meme ışınlaması veya hızlandırılmış kısmi meme ışınlaması ile eşleştirilmiş cerrahi, meme kanseri olan bireylerde hayatta kalma oranlarını artırmak için kanıtlanmış bir yöntemdir. Tüm meme ışınlaması ile birlikte cerrahi, meme koruyucu kanser tedavilerinin standardıdır. Hızlandırılmış kısmi meme radyasyonu, göğüs kanseri hastalarına önemli ölçüde daha düşük radyasyon dozu sağlayabildiğinden, tüm meme ışınlamasına kabul edilebilir bir alternatiftir. Bu tedavilerin temel amacı kanseri sonlandırmak, metastaz oluşumunu ve nüksü önlemektir. Bu tedavilerin her biri tedavi söz konusu olduğunda biraz etkili olabilir, ancak daha etkilidirler ve birden fazla terapi kullanıldığında remisyon şansı büyük ölçüde azalır. Ayrıca meme kanserinin tipine ve düzeyine göre yukarıda belirtilen tedavilerden bazılarını içeren harmanlanmış bir terapi de kullanılabilir [11]. Radyasyon tedavisinde kanserli bölgeyi hedef almak için röntgen ve gama ışınları gibi

özel radyasyon kullanılır. Ancak radyasyonun ciltte tahriş, yakındaki dokulara zarar verme ve yorgunluk gibi yan etkileri de vardır.

Östrojen veya progesteron reseptörleri için pozitif test yapan tümörlerin çoğunluğu için hormon tedavisi, fonksiyonel bir tedavi yöntemi olarak kabul edilir. Bu tür tümörler, gelişimlerini hızlandırmak için hormon kullanırlar. Hormon tedavisi tek başına veya adjuvan veya neoadjuvan kemoterapi sonrası kanserin nüksetmesini veya meme kanserinden ölümü önleyebilir. Bazı durumlarda hormon tedavisi, tümör boyutunu küçültmek ve ameliyatı daha kolay hale getirmek için ameliyattan önce kullanılır. Bu uygulama neoadjuvan hormonal tedavi olarak bilinir. Diğer bazı durumlarda, meme kanserinin nüksetme riskini azaltmak için ameliyattan sonra hormon tedavisi kullanılır. Bu yaklaşım, adjuvan hormonal tedavi olarak adlandırılır. Bununla birlikte, hormonal tedavinin hormon reseptör negatif meme kanseri türlerine karşı etkili olmadığı burada belirtilmelidir.

Yüksek verimli teknolojilerin uygulanmasına dayalı olarak, meme kanserinin moleküler ve immünolojik fenotipinin daha iyi anlaşılması, bu heterojen hastalığın farklı alt tiplerinin tanımlanmasına ve karakterizasyonuna yol açmıştır. Dahası, bu, daha yüksek özgüllük ve daha düşük toksisite ile direnci ortadan kaldıran veya en aza indiren immünoterapiler de dahil olmak üzere daha bireyselleştirilmiş, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bununla birlikte, meme kanserindeki immünoterapilerin klinik etkililiği şu ana kadar beklendiği kadar yüksek değildir. Tümörler ve bağışıklık sistemi arasındaki dinamik etkileşime ilişkin artan bilginin, bu hastalıkta gelişmiş immünoterapilerin tasarımı için anahtar bir sorun olduğu varsayılmaktadır. Breast Care'in 'Meme Kanseri İmmünoterapisine' odaklanan güncel sayısı, meme kanserindeki en son teknolojiyi ve tümör immünolojisi / immünoonkolojisinin başlıca konularını, aynı zamanda bireyselleştirilmiş immünoterapilerin temelini de temsil eden moleküler ve immünolojik profillemenin kullanımıyla vurgulamaktadır [12].



**Şekil 2.3:** Risk faktörlerinin şematik diyagramı piramit tarzı bir yapıda tasvir edilmiştir. Piramit çizelgesinde gösterilen yaş, aile öyküsü, üreme faktörleri, östrojen ve yaşam tarzı meme kanserinin beş önemli risk faktörüdür. Göğüs kanserini önlemek için tarama (mamografi ve MRI), kemoprevansiyon (SERM'ler ve AI'ler ile) ve biyolojik önleme (Herceptin ve pertuzumab kullanılarak) şu anda kullanılmaktadır. PD1 / PDL1 inhibitörleri, immünoterapi ilaçlarıdır ve TNBC tedavisinde umut verici stratejiler olabilir [13].

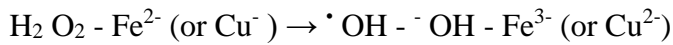
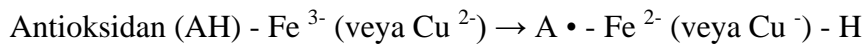
## 2.4 Kanser Tedavisinde Antioksidanlar ve Pro-oksidasyon (Fenton Reaksiyonunun Önemi)

İnsanlar, UV radyasyonu, mikroplar, alerjenler ve vücutta reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artıran artmış ozon, sigara dumanı ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi çeşitli kirleticiler de dahil olmak üzere çeşitli çevresel stres faktörlerinin varlığında yaşarlar.[14-18]. ROS, süperoksit anyonları ( $O_2 \cdot^-$ ) gibi oksiradikaller (yani oksijen merkezli serbest radikaller) içeren eşleştirilmemiş bir elektron içeren veya içermeyen ara oksijen taşıyan metabolitler olarak tanımlanabilir. Hidroksil radikalleri ( $OH \cdot$ ), alkoksil radikalleri ( $RO \cdot$ ) ve peroksiradikaller ( $ROO \cdot$ ), hipokloröz asit ( $HOCl$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi radikal olmayanlar ve tekli oksijen ( $O_2$ ), diğer bileşenleri oksitleyebilir ve bunları serbest radikallere döndürebilir, çoğu zaman çok sayıda yeni radikal oluşumuna yol açan bir zincirleme reaksiyona neden olur [19-21]. Radikal zincir reaksiyonu tipik olarak sistem anaerobik hale gelinceye veya substrat [örn., Membran yağ asitleri (LH)] tükenene kadar devam

eder; ancak zincir reaksiyonu, iki radikal olmayan ürünler oluşturduğunda veya zincir kırıcı antioksidanların (örn., E vitamini ve polifenoller) varlığıyla durdurulabilir [22]. Akut aerobik, anaerobik ve yoğun kapsamlı egzersiz gibi fiziksel stres faktörleri aşırı reaktif oksijen üretimine neden olabilir [23]. Bu bağlamda, oksijenin monoelektronik indirgenmesinden kaynaklanan süperoksit radikalının ( $O_2 \cdot^-$ ) OH, RO, ROO $\cdot$  ve  $H_2O_2$  dahil ROS'un öncüsü olduğu düşünülmektedir. Örneğin, süperoksit radikali ( $O_2 \cdot^-$ ) azot merkezli bir radikal olan nitrik oksit ( $\cdot NO$ ) ile reaksiyona girebilir, yüksek derecede reaktif bir molekül, peroksinitrit anyonu (ONOO $^-$ ), reaktif oksijen ve azot türleri ( RONS), DNA parçalanmasına ve lipid oksidasyonuna neden olabilir [19, 21]. Hayvan deneyleri, immobilizasyon stresi ve uyku yoksunluğu gibi stresli durumların, bu tür toksik oksijen metabolitlerinin aşırı üretimini teşvik ettiğini göstermiştir [24]. Duygusal stres ve depresif ruh hali de büyük bir serbest oksijen radikal oluşumu ile ilişkilidir [25, 26]. Oksijenden türetilen radikal türlerin aşırı üretimi, yağ ve karbonhidratlarda aşırı diyetlerden kaynaklanabilir ve antioksidan vitaminlerde nispeten eksiktir [19, 27]. Oksidatif stresi tercih eden ROS oluşumunu artıracak diğer durumlar veya yollar arasında alkol veya farmakolojik ajanların metabolizması, terapötik (x-ışını) radyasyonu, hipertermi, inflamasyon ve aşırı demir yükü bulunur. Bu nedenle, antioksidan sistemimizin, günlük hayatımızda rutin olarak meydana gelebilen, oksidatif stresin başlamasından kaçınan, kardiyovasküler hastalıklar (KVVH), kanser, ve nörodejeneratif hastalıklar, muhtemelen toplamda 100'den fazla ilişkili hastalık gibi kronik komplikasyonlar dahil bir dizi insan hastalığı için nedensel veya ilişkili bir risk faktörü oluşturan bu stresli koşullara karşı etkili olması gerekir [19, 28, 29]. Ayrıca, C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve polifenoller gibi ekzojen indirgeyici bileşikler olmadan eksik olan antioksidan sistemimiz, NAD(P)H oksidaz ve ksantin oksidaz tarafından katalize edilen işlemler ve mitokondriyal solunum sürecindeki gibi moleküler oksijen kullanarak normal hücrel metabolizma sırasında üretilen fazla oksijen türevi reaktif türleri bastırarak rolüne sahiptir ( burada solunan oksijenin% 85'i metabolize edilir) [25].

*In vitro* çalışmalar polifenol ve karışımları gibi bitki besin bileşenlerinin sitoprotektif aktivitesini ve oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne karşı önleyici etkilerini vurgulamıştır [30]. Bu nedenle, fitokimyasalların antioksidan aktivitesi iyi bilinmesine rağmen, ayrıca yüksek dozlarda veya metal iyonlarının varlığında belirli koşullar altında pro-oksidan aktiviteleri gösterebilirler. Pro-oksidan veya antioksidan aktivite

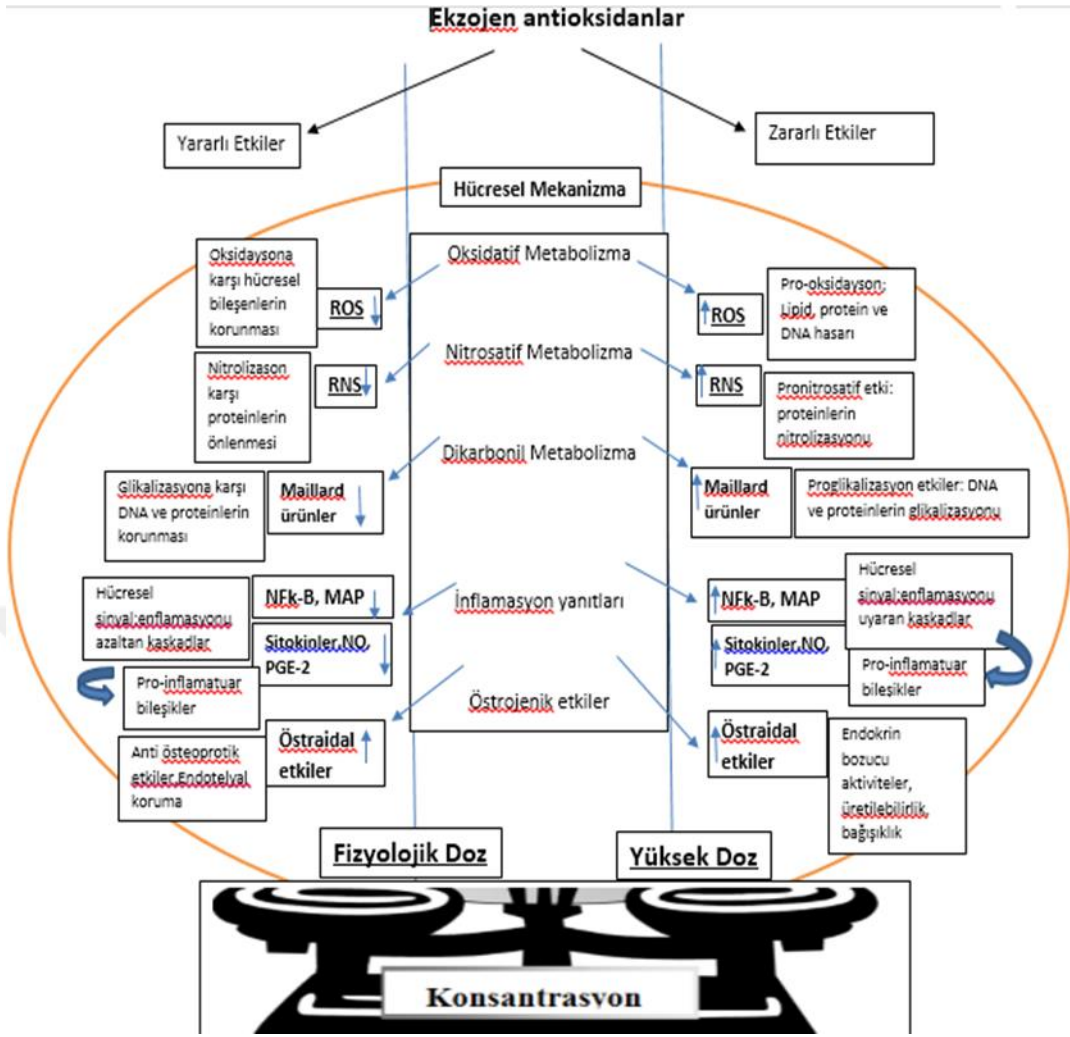
büyük ölçüde konsantrasyonlarına bağlıdır. Bu bağlamda, hücre modellerini kullanan son çalışmalar, kuersetin, epikateşin ve epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ve gallik asit gibi antioksidanlar olarak bilinen birkaç polifenolün pro-oksidatif aktivitesini vurgulamıştır [31-36]. Örneğin, yüksek dozlarda, kuersetin'in (50 uM) izole mitokondri ve kültürlenmiş hücreler içinde süperoksit radikali ( $O_2 \cdot^-$ ) üretimini güçlendirebildiği gösterilmiştir [32]. Başka bir çalışmada, kuersetinin antioksidan aktivitesi düşük dozlarda (0.1-20 uM) gözlemlenirken, daha yüksek konsantrasyonlar (> 50 uM) hücre sağkalımını ve canlılığını, tiyol içeriği, total antioksidan kapasitesini ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon S-transferaz aktivitelerini azaltmaktadır [33]. Düşük konsantrasyonlarda (10-25 uM) flavonoidlerin (kuersetin ve fisetin) sıçan H4IIE hücrelerini  $H_2O_2$  ile indüklenen sitotoksositeye, DNA iplik kopmalarına ve apoptoza karşı koruduğu, ayrıca yüksek konsantrasyonların (50–250  $\mu M$ ) sitotoksositeye, DNA hasar ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki flavonoidlerin, otoksidasyon (örn., Mirisetin ve quercetagenin) ve redok döngüsü ile (örn., Kuersetin) ile ROS üretebildiği de gösterilmiştir [37-39]. Antioksidan konsantrasyonuna ek olarak, metal iyonlarının varlığının önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Geçiş metallerinin varlığında EGCG'nin izole ve hücresele DNA'da oksidatif hasara neden olduğu ortaya çıkmıştır. [34]. Fenolikler gibi diyet antioksidanları, kapasitelerinin azaltılması ve bitkilerde bu bileşiklerin önemli özellikleri olan demir ve bakır geçiş metalleri gibi şelat oluşturmaları nedeniyle metal iyonlarının varlığında pro-oksidan aktivite sergileyebilirler [34]. Bununla birlikte, antioksidanların güçlü indirgeme gücü, metal iyonlarını, özellikle  $Fe^{3+}$  ve  $Cu^{2+}$ 'yı da etkileyebilir ve Fenton reaksiyonu yoluyla peroksitlerden kaynaklanan yüksek derecede reaktif hidroksil radikal konsantrasyonları, potansiyel olarak zararlı radikaller oluşturma yeteneklerini artırır [19].



Bu koşullar hemokromatoz durumunda olduğu gibi demir tarafından aşırı yüklenmiş organizmalarda sorun yaratabilir. Sonuç olarak, çeşitli fenoliklerin metal şelatlama aktivitesi, metal iyonlarının pro-oksidan kapasitesinin azalmasına neden olabilir, bununla birlikte fenolikler, metalleri katalitik aktivitelerini koruyacak veya arttıracak şekilde şelatlayarak pro-oksidanlar olarak da işlev görebilirler [40]. *In vitro* olarak, pH'ın, fenolik bileşiklerin oksidoredüksiyonlarını etkilediği, biyolojik dokuların pH'ının, fenoliklerin antioksidan / proksidan aktivitelerini ve şelatlama aktivitesini

etkileyebileceğini düşündürmektedir. Örneğin, pH'da bir azalma, muhtemelen komplekslerin çözünürlüğünün artması nedeniyle fenoliklerin demire karşı daha az şelatlama etkisine neden olur. Bununla birlikte, pH etkisi çeşitli fenolikler için farklı olabilir. PH 7.4'te bazı fenolikler, düşük pH'da (5.8) antioksidan özelliklere (Ör. P-resorsiklik asit) sahip olduğu bildirilen proksidan aktiviteler sergilerken, diğerleri antioksidan aktiviteler (örn., Hidrobenzoik asit) sergilemiştir [40] [41]. Antioksidan fenolikler, serbest radikalleri temizlerken, aromatik halka çevresindeki eşlenmemiş elektronların delokalizasyonu ile stabilize edilen daha az reaktif fenoksil radikalleri oluşturabilirler. Bununla birlikte, bu radikaller nispeten stabil olmalarına rağmen, hücrel hasarı indükleyen pro-oksidan aktiviteler de sergileyebilirler. Son zamanlarda yapılan bir derlemede, bireysel diyetopolifenollerin pro-oksidan aktivitesi ve mitokondriyal disfonksiyon ve sonuç olarak apoptozu indükleme yetenekleri olası bir antikanser mekanizması olarak önerilmiştir [34]. Doğal bileşiklerin yararlı veya zararlı etkilerinin, yakın ilişkili olan nitrojen ve dikarbonil metabolizmaları, enflamatuar süreçlerin dahil olduğu (anti-) oksidatif özelliklerinden bağımsız olarak da meydana gelebileceğini belirtmek gerekir [42]. Aslında, iltihaplanma, nitrozatif stres (reaktif nitrojen türlerinin aşırı üretiminden kaynaklanan) ve karbonil stresi (reaktif dikarbonil bileşiklerinin aşırı birikmesinden kaynaklanan) oksidatif stresi şiddetlendirebilir veya provoke edebilir ve bunun tersi de geçerlidir [19]. Antioksidanların oksidatif metabolizma üzerindeki iki fazlı etkilerinin yanı sıra, doğal bileşiklerin enflamatuar reaksiyonlar üzerinde çift taraflı etki gösterebildiği de bildirilmiştir. Örneğin, düşük dozlarda Beta-karoten, insan HL-60 hücrelerinde antioksidan ve anti-enflamatuar özellikler sergilerken, oysaki yüksek dozlarda pro-oksidan aktivite ve pro-enflamatuar etkiler [pro-enflamatuar mediyatörlerinin üretiminde bir artış, tümör nekroz faktörü-a (TNFa) ve interlökin-8 (IL-8)] rapor edilmiştir [43, 44].





**Şekil 2.4 :** Ekzojen antioksidanların oksidatif, nitrosatif ve dikarbonil metabolizmaları ve potansiyel olarak konsantrasyonlarına bağlı olarak enflamatuar süreçler gibi diğer yollar dahil hücrel tepkiler üzerindeki çift taraflı etkileri: fizyolojik dozlar yararlı etkilere yol açarken, yüksek dozlar zararlı etkilere neden olabilir.

## 2.5 Doğal Antioksidanlar

Antioksidanların insan yaşamı ve sağlığı üzerindeki temel rolü ve medyada ilginin artması, genel popülaritesi nedeniyle, bu bileşiklere genel halk tarafından talep son zamanlarda artmaktadır. Antioksidanlar, oksitlenebilir bir bileşiğe (örneğin DNA, proteinler, lipitler veya karbonhidratlar) kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunduğu, ROS varlığından kaynaklanan oksidatif hasarı geciktiren veya önleyen maddeler olarak tanımlanmıştır [45]. Yüksek dozlarda ROS zararlı hale gelir,

patofizyolojik etkiler gösterirken, düşük dozlarda normal fizyolojik etkiler için yararlı olabilirler [19, 46, 47]. Antioksidan savunma sistemimiz, SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon (GSH) gibi endojen (enzimatik ve enzimatik olmayan) antioksidanları ve C vitamini, E vitamini gibi eksojen antioksidanlarla ana diyet kaynağı olan karotenoid ve polifenoller içerir (Tablo 2.1) [25, 48-50]. Endojen ve eksojen antioksidanlar, membran akışkanlığını ve membran proteinlerine zarar verebilen, reseptörleri, enzimleri ve iyon kanallarını inaktive ederek, hücre ölümüyle sonuçlanan membran bütünlüğünü bozan lipid peroksidasyon süreçlerini önlemek için GSH veya C vitamini ile E vitamininin rejenerasyonu sırasında olduğu gibi redoks homeostazını koruma veya yeniden kurmaya (örn. Sinerjik olarak) etki eder [26]. Kateşinler membran yüzeylerinin yakınında hidrofilik radikalleri şelatlayarak E vitamini tüketimini önleyebilirken, E vitamini serbest radikal zincir reaksiyonlarını (zincir kırıcı antioksidan) durdurmak için hidrojen verici olarak lipid peroksid radikallerini (LOO •) temizler [22]. Besinler (örn. Vitaminler) ve fitokimyasallar (ör. Polifenoller) dahil olmak üzere doğal olarak oluşan antioksidanlar açısından zengin gıdaların alınması, “beş günlük kampanya” gibi birçok sağlık kuruluşu tarafından yaygın olarak önerilmiştir. Aslında insanlar bu antioksidan bileşiklerini kendiliğinden (de novo) sentezleyemezler; ve bitki besinleri (ör. elma, erik, muz, domates, patates, soğan, brokoli, vb.) bu antioksidanların doğal kaynağını oluşturur [51]. Gıdalardaki doğal oluşumlarına ek olarak, takviye, izole bileşenlerle takviye ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidan katkı maddelerinin alımı, bütillenmiş hidroksitolüen (BHT), tert-butil hidrokinon (TBHQ) ve propil, oktil ve dodesil gallatlar (başlangıçta işlenmiş gıdaların korunmasını sağlamak ve işlenmiş gıdaların raf ömrünü arttırmak için kullanılır) başka antioksidan kaynakları oluşturur [52, 53]. *In vitro* çalışmalar, polifenoller ve karışımlar gibi bitki besin bileşenlerinin sitoprotektif aktivitesini ve bunların oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümüne karşı önleyici etkilerini vurgulamıştır. Hayvan deneylerinde, elma, zeytinyağı ve bal gibi bazı doğal gıda maddelerinin uzun süreli alımının, beyinde oksidatif stres, bilişsel bozulma ve anksiyete dahil yaşlanma ile ilişkili çeşitli yan etkileri tersine çevirdiği gösterilmiştir. Ayrıca izole edilmiş polifenollerin (örn. Kuersetin, rutin ve epigallokateşin-3-gallate), sıçan modellerinde belirli koşullar (örn. Farmakolojik tedavi, iskemi-reperfüzyon) tarafından indüklenen oksidatif stres toksisitesini tersine çevirebildiği de gösterilmiştir [54]. Bitkisel gıdalardan özgün antioksidanlar, diğerlerinin yanı sıra, kemirgenlerde antidepresan ve anksiyolitik etkiler gibi

sitoprotektif aktiviteler ve ilginç farmakolojik özellikler sergilemiştir. Eksojen antioksidanların tüketici sağlığı üzerindeki potansiyel olumsuz etkileri, muhtemelen ilk olarak, yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidatif özelliklerden kaynaklanan, kemirgenlerde ve maymunlarda daha yüksek dozlarda kanserojenlik ve toksisitelerinin ardından BHA ve BHT dahil sentetik antioksidanlar ile ilgilidir [55]. Şaşırtıcı bir şekilde, BHA'nın hayvan modellerinde çeşitli kanserojenlere karşı antikanserojenik aktivite sergilediği de rapor edilmiştir. Bu anlaşmazlık, uygulanan dozlarla ve belki de tedavi süresiyle açıklanabilir.

Dünyanın belirli bölgelerinde, insanların günlük BHA ve BHT dozları yakl. 0.1 mg / kg arasındadır. Bu sentetik antioksidanların 2.000 mg / kg 'nın yaklaşık LD50 (öldürücü doz) 'i çoğu hayvan için rapor edilmiş ve bu katkı maddelerinin kronik maruziyette insan sağlığı üzerindeki toksisitesi hakkındaki soruyu gündeme getirmiştir. İlginç bir şekilde, gıda maddelerinde bulunan BHT ve BHA gibi yüksek antioksidan konsantrasyonları, pro-oksidan aktivitelerden dolayı uzun raf ömrü sonucundan ziyade, gıda maddelerinin bozulmasını artırabilir [56]. Sonuç olarak, tüketici tarafından muhtemelen güvenlik ve kabulden dolayı, gıda ve farmasötik preparatlardaki sentetik antioksidanların yerini doğal antioksidanlarla değiştirme eğilimleri ortaya çıkmıştır [53].

İnsanlarla ilgili olarak, antimitojenite, antikarsinojenite ve yaşlanmayı geciktirme dahil olmak üzere diyet bileşenlerinin sağlığa yararlı işlevlerinin çoğu, antioksidan özellikleriyle ilişkili olarak tartışılmıştır. Epidemiyolojik araştırmalar, doğal olarak oluşan antioksidanlar açısından zengin diyetlerin hastalık gelişimi ve ilerlemesi üzerindeki önleyici etkisinin araştırılmasında anahtar rol oynamıştır [57]. Gerçekte, düzenli meyve ve sebze tüketiminin, muhtemelen kanser veya kardiyovasküler hastalıklar gibi oksidatif stresle bağlantılı kronik insan hastalıklarının gelişmesine karşı bitkisel besinlerin sağladığı korumadan dolayı, düşük ölüm oranıyla ters ilişkili olduğu gösterilmiştir [58]. Bununla birlikte, belirli gıda maddelerinin, örneğin elma ve soğanın, akciğer kanseri ve koroner kalp hastalığına karşı koruma sağladığı varsayılmıştır. Epidemiyologlar, elma ve soğanın akciğer kanserine karşı sağlığa yararlı etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* hayvan çalışmalarında karsinojenlere karşı güçlü kemopreventif aktivitesi sayesinde birkaç hatta kuersetin gibi tekil bileşenlere atfedilebileceğini öne sürmüşlerdir [59].

Bununla birlikte, bitkisel besin tüketiminin sağlık açısından avantajlı etkilerinin belirli bir bileşiğe değil, fitokimyasal ve besin komplekslerinin ilave veya sinerjistik

faaliyetlerini takiben bütün meyve ve sebzeye atfedilebileceğine dair artmaya devam eden kanıtlar vardır. Daha önceki epidemiyolojik ve gözlemsel çalışmalar, artan karotenoid alımının, sindirim sistemi kanseri veya akciğer kanseri gibi belirli kanser türlerini geliştirme riskinin azalması ve KVH belirteçleri riskinin azalmasıyla birlikte olabileceğini öne sürerken, insanlarda yapılan birçok bireysel takviye denemesi, sağlık açısından yararlı etkilerle sonuçlanmazken, antioksidan bileşiklerin, yüksek dozlarda veya sinerjik bileşiklerin bulunmadığı gibi belirli koşullar altında toksik olabileceği öne sürülmüştür [60]. Örneğin, birkaç yıl boyunca tek başına beta-karoten (20 mg / gün), beta-karoten ve retinol (30 mg / gün beta-karoten ve 25.000 IU retinilpalmitat) takviyesi, sigara içenlerde akciğer kanseri insidansını artırmıştır.

Bununla birlikte, özellikle sağlıklı deneklerde beta-karoten kullanan bazı takviye denemelerinin kansere bağlı ölüm oranlarında artış bulmadığı da belirtilmelidir veya azalmış kanser insidansına bağlı olarak genel ölüm oranının azaldığı bile bulunmuştur. Doğal antioksidan kaynakları ile uzun vadeli takviye çalışmaları neredeyse hiç yoktur; bununla birlikte, karotenoidler gibi doğal antioksidan kaynaklarını kullanan kısa süreli destekleme çalışmaları, oksidatif stres belirteçlerinin azaldığını ve kan lipidlerinin iyileştiğini göstermiştir [61].

Özgün antioksidanların yararlı aktivitelerinin yokluğu ve hatta toksik etkileri bu bileşenlerin doğal matrikslerinin dışında sergiledikleri doza bağlı davranışla açıklanabilir, bu da diyet lifi ve flavonoidler, fenolik asitler, birkaç karotenoid, besleyici özelliği olmayan fitokimyasallar, temel elementleri içeren bütün gıdalar gibi (vitaminler, mineraller) kompleks karışımların önemli özelliklerini vurgulayabilir [62]. Birkaç çalışma, izole edilmiş C vitamini, E vitamini veya beta-karoten formları ile takviyenin yararlı etkileri olmadığını göstermiştir. Örneğin, 30 sağlıklı bireyin diyetlerini yüksek dozlarda C vitamini (500 mg / gün) ile takviye etmek, yüksek dozlarda pro-oksidatif etkilere işaret ederek, lenfositlerden DNA'da oksidatif hasar artışına neden olmaktadır. Başka bir çalışmada, E vitamini ve C vitamini takviyesi, sigara içenlerde oksidatif DNA hasarını azaltmada başarısız olmuştur. Buna karşılık, C vitamini yönünden zengin meyve ve sebzeleri tüketen sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan bazı araştırmalar, oksidatif DNA hasarı seviyelerini düşürmüştür. Fizyolojik koşullarda, C vitamininin antioksidan özelliklerinin olası pro-oksidan aktivitesine ağır bastığı öne sürülmüştür [62]. *In vitro* çalışmalar, C vitamini ve E vitaminin hızla tüketilmesinin oksidatif strese neden olduğunu gösterdi. Bunun tersine, E vitamini eksikliğin de transgenik sıçanlarda oksidatif stres bozukluklarına neden olduğu

gösterilmiştir. Bu nedenle, C vitamini ve E vitamini arasındaki sinerjik eylemler, lipid peroksidasyonuna karşı önleyici faaliyetlerde önemli görünmektedir [19].

Dozu ayarlamamanın sağlık üzerindeki önemini gösteren bir başka örnek, yeşil çayda bulunan bir antioksidan olan EGCG, oksidatif strese karşı önerilen önleyici etkinliği nedeniyle başka preparatlarda da pazarlanmaktadır. Farmakolojik dozlarda (30 ve 60 mg / kg) EGCG'nin farelerde anksiyeteyi ortadan kaldırdığı kanıtlanmıştır; bununla birlikte, bu çay polifenolü farelerin 24 saatten daha kısa bir sürede ölümüne (% 100 ölüm) neden olmuştur, bunun nedeni muhtemelen 100 mg / kg'ın üzerinde fark edilen yüksek hepatotoksitesidir [35]. Yeşil çay kateşinleri arasında, daha yüksek dozlarda en sitotoksik olanın, aynı zamanda en bol çay kateşini olan EGCG olduğu ortaya çıkmıştır [35]. İlginç bir şekilde, yeşil çay kanser gelişimine [63] karşı kemopreventif potansiyele sahip sağlıklı bir içecek olarak görülmesine rağmen, çok sık tüketildiğinde (> 1 L / gün) çay, kuzey İran veya Hindistan gibi bazı ülkelerde artan yemek borusu kanseri insidansı ile ilişkilendirilmiştir. Bunun sıcak çay tüketimine bağlı olduğu tartışılmış olsa da, ayrıca yeşil çayın ağız boşluğunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebildiği gösterilmiştir [64].

Genel olarak, antioksidanlar diyet takviyeleri olarak verildiğinde konsantre formda izole edilmiş (sentetik veya konsantre) bileşikler içerir. Örneğin, tipik bir vejetaryen diyet, piyasada bulunan bu antioksidanın pek çok takviyesinin tek bir dozundan 20 kat daha az kuersetin içerir. İzole edilmiş karotenoid, EGCG ve C vitamini konsantrasyonları da yaygındır. Örneğin, karotenoid takviyeleri çoğunlukla β-karoten, likopen veya lutein ve ksantin içerir ve genellikle tipik bir günlük alımın çeşidini içerir.

**Tablo 2.1:** İnsan antioksidan savunma sistemleri, endojen (enzimatik ve enzimatik olmayan) ve diyet eksojen antioksidanları içerir.

<b><u>Endojen Antioksidan</u></b> <b><u>Enzimatik Antioksidan</u></b>	<b><u>Eksojen Antioksidan</u></b> <b><u>Meyve,sebzelerdeki başlıca diyet antioksidanları ve tahıllar</u></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Süperoksit dismutaz (SOD): süperoksit radikalini detoksifiye eden enzim (O<sub>2</sub> · )</li><li>• Katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx): peroksitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimler (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı CAT ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hem de ROOH'a karşı GPx)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vitaminler: C vitamini, E vitamini</li><li>• Eser elementler: çinko, selenyum</li></ul>

**Tablo 2.1:** İnsan antioksidan savunma sistemleri, endojen (enzimatik ve enzimatik olmayan) ve diyet eksojen antioksidanları içerir (devamı).

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glutatyon redüktaz: glutatyon rejenerasyonunda rol oynayan enzim</li> <li>• Tioredoksin redüktaz: protei oksidasyonuna karşı korumada yer alan enzim</li> <li>• Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz: NADPH'nin rejenerasyonunda rol oynayan enzim</li> <li>• <u>Enzimatik olmayan antioksidanlar (temel hücre içi indirgeme ajanları)</u></li> <li>• Glutatyon (GSH), ürik asit, lipoik asit, NADPH, koenzim Q, albümin, bilirubin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Karotenoidler: b-karoten, likopen, lutein, zeaksantin</li> <li>• Fenolik asitler: klorojenik asitler, gallik asit, kafeik asit vb</li> <li>• Flavonoller: quercetin *, kaempferol *, myricetin *</li> <li>• Flavanoller: proantosiyandinler ve kateşinler</li> <li>• Antosiyandinler: siyanidin * ve pelagonidin *</li> <li>• İzoflavonlar: genistein *, daidzein * ve glisitin *</li> <li>• Flavanonlar: naringenin *, eriodictyol * ve hesperetin *</li> <li>• Flavonlar: luteolin * ve apigenin *</li> </ul>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

\* ve glukozitleri.

**Tablo 2.2** Meyveler, sebzeler ve piyasada bulunan mevcut antioksidan konsantrasyonu örnekleri.

Diyet antioksidanları	Zengin diyet kaynakları	Gıdalarda konsantrasyon (mg / 100 g)	Takviyelerde konsantrasyon *** (mg / kapsül)
C vitamini	Dolmalık biber, turunçgiller	10–170	100–1000
Kuersetin	Elma, soğan	4–46	100–800
Karotenoidler	Yapraklı sebzeler, erik, domates, karpuz, havuçlar	0.2–10	5–15
EGCG	Yeşil çay	5–450*	25–360
Selenyum	Balık (süt ürünleri, patates, pirinç)	1–150*	0.07–0.20
E vitamini	Balık, et, yapraklı sebzeler	0.2–10	400 IU**
İzoflavonoidler	Soya, fasulye, yer fıstığı	0.1–155	50–150

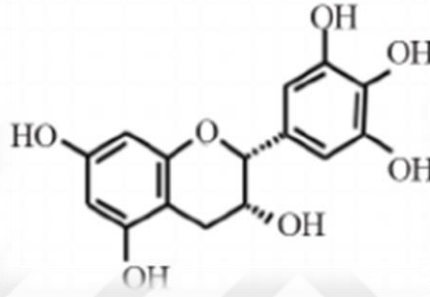
\* ug / 100 g; # mg / fincan (yaklaşık 225 mL çay içeceği); \*\* 1 IU alfa tokoferol = 0.667 mg; \*\*\* İnternet verileri

### 2.5.1 Epigallokateşin (EGC); antikanser mekanizması

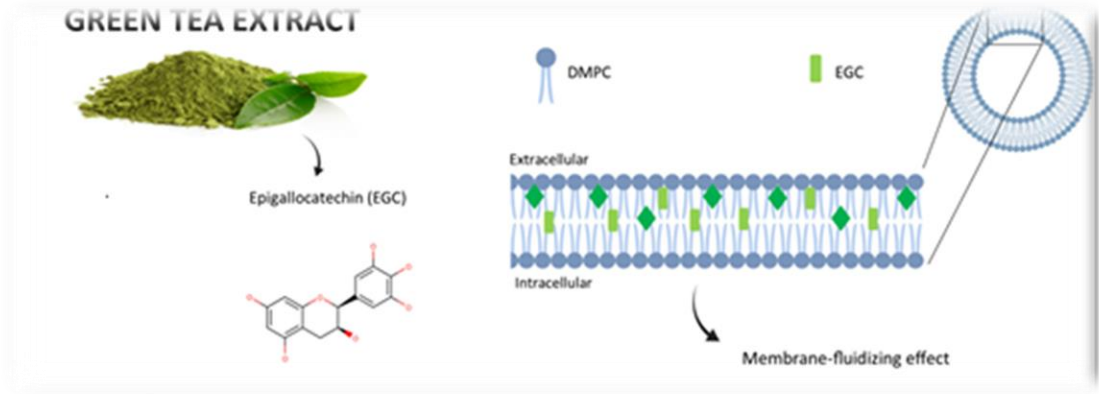
Son zamanlarda, çay (*Camellia sinensis*) kateşinleri, sayısız sağlık yararları nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Çay, dünyada en çok tüketilen içeceklerden biridir ve zengin bir polifenol kaynağıdır [65]. Çayın deneysel karsinogeneze karşı inhibe edici etkisi, akciğer, deri, yemek borusu, karaciğer ve mide kanserlerini içeren birçok hayvan modelinde gösterilmiştir. Dahası, son epidemiyolojik araştırmalar, yeşil çayın akciğer, kolon, mesane ve prostatta tümör gelişimini engellediğini göstermektedir. Yeşil çay tüketiminin artması, insan meme kanserinin prognozunun iyileşmesi ile de ilişkilidir [66]. Poli-fenoller, yeşil çay ekstraktının (GTE) ana bileşenleridir ve toplam bileşiminin yaklaşık% 90'ını oluşturur. GTE'de bulunan en bol bileşen, toplam fenolik içeriğin yaklaşık% 40-55'ini oluşturan EGCG, ardından (-)yaklaşık% 10-20'lik bir katkı ile EGC'dir (Şekil.2.5) [67]. Bu polifenol bileşiklerinin, radikal süpürme ve metal şelatlama fonksiyonlarının yanı sıra antimitojenik aktiviteleri nedeniyle antioksidatif aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir [68]. Son yıllarda, yeşil çay polifenollerinin, özellikle de EGCG'nin kanser terapötik potansiyeli giderek daha fazla takdir edilmektedir. EGCG'nin hücre büyümesini inhibe ettiği ve normal hücreler üzerinde çok az etkisi olan veya hiç etkisi olmayan çeşitli insan kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. EGCG ile indüklenen apoptozun, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi [69] ve transkripsiyon faktörü NFκB inhibisyonu aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Diğer yeşil çay polifenolünde, EGC'nin büyümesini engellediği bildirilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücreleri; ancak, etki mekanizması iyi bilinmemektedir. Meme kanseri hücrelerinin büyümesinin engellenmesi, hücre döngüsü ilerlemesinde herhangi bir değişiklik olmaksızın bir apoptoz indüksiyonundan kaynaklanmaktadır. Dahası, meme kanseri hücrelerinde EGC ile tetiklenen apoptoz, Fas'a bağımlı yolları içerir [70]. EGC'nin meme kanseri hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-231'in büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği, EGC'de bulunan üçüncü fenolik fonksiyona sahip olmayan EC'nin ise meme kanseri hücrelerinin büyümesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığını gösterilmiştir. Bu sonuç, daha önce akciğer kanseri hücreleri PC-9 ve kolon kanseri hücreleri HT-29 [71] 'te bildirildiği gibi polifenol bileşiklerinin büyüme inhibitör etkisinde trifenolik yapıya ihtiyaç duyulacağını göstermektedir. Burada EGC'nin özellikle göğüs kanseri hücrelerinin büyümesini engellediğini, ancak normal göğüs epitel hücreleri (NBEC) üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermektedir. Meme kanserlerinin

yaklaşık% 20-50'sinde mutant p53 ve p53 mutasyonları sıklıkla kötü prognozla ilişkili olduğundan [72], EGC ilerlemiş meme kanserleri için tamamlayıcı bir tedavi sunabilir. Yabani tip p53'e sahip hücrelerin genel olarak radyasyona veya kemoterapötik ajanlara duyarlı olduğu, buna karşın doğal tip p53 geninden yoksun hücrelerin hala apoptoza uğradığı ancak nispeten daha yüksek dozlara ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir. EGC'nin apoptozu indükleyerek meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini gösterilmiştir. Bu apoptoz indüksiyonu Fas ve Bcl-2 proteinlerini içerir ve hormonal ve p53 'ten bağımsızdır.

(-)-epigallocatechin (EGC)



Şekil.2.5 Epigallokateşinin kimyasal yapısı



Şekil.2.6 Yeşil çay ekstresinden elde edilen EGC'nin zar akışkanlığına etkisi.

## 2.6 Nano İlaç Taşıma Sistemleri (NİTs)

NİTs'ler, en az bir boyutun nanometre ölçeği (1-100 nm) aralığında olduğu veya üç boyutlu uzayda temel birimler olarak bunlardan oluşan malzemeyi ifade eder [73]. İlaç dağıtımını optimize etmenin etkili bir yolu olarak NİTs'ler, eczacılık ve modern biyotıp alanında bir araştırma etkin noktası haline gelmiştir [74]. NİTs'lerin



araştırılması, 40 yıldan fazla bir süredir bir nano-ilaç taşıyıcı kitlesi yaratmaktadır. Malzemelerin bileşimine göre NİTS'lerde kullanılan nanomalzemeler organik, inorganik ve kompozit malzemeler olarak ayrılabilir.

NİTS'lerin hedeflenen tasarımı, gelişimin erken aşamalarında kanserin teşhisi ve tedavisine odaklanır, ancak son araştırmalar, lezyon hücrelerin hedeflenebileceğini, hatta birden çok fizyolojik engelle sahip tümör dokularından daha kolay hedeflenebileceğini savunmaktadır.

Geleneksel preparatlar karşılaştırıldığında, nano taşıyıcı ilaçların kan dolaşımındaki metabolik süresi uzayabilir. PH değeri , sıcaklığı , ışığı , ultrason veya biyolojik enzimi, hedeflenen nanotransporter ilaçların oranının daha uzun süre çalışması için kontrol edilebilir.

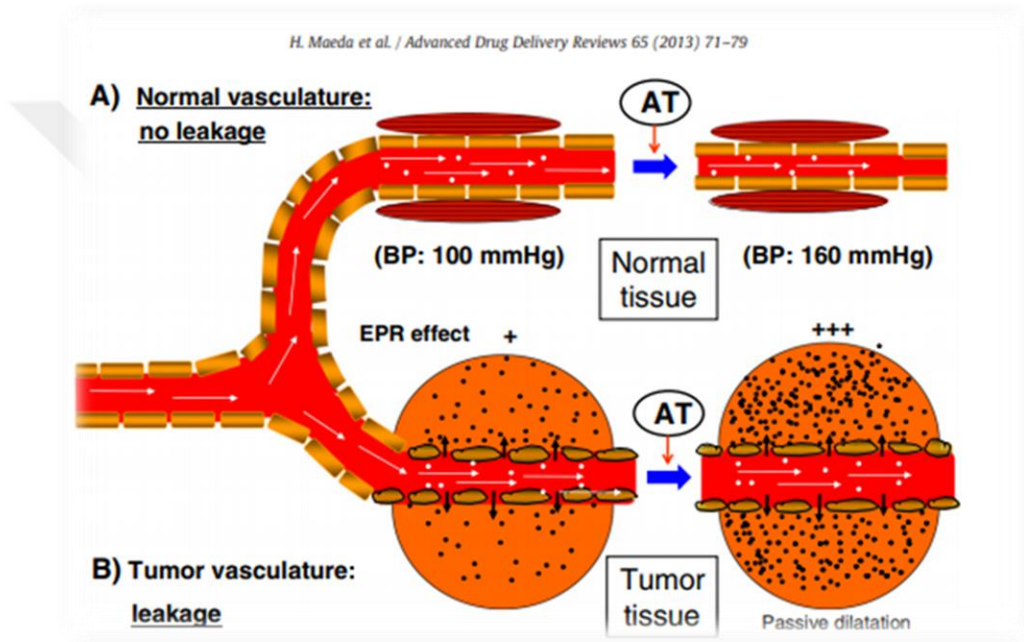
### **2.6.1 Pasif hedefleme**

Pasif hedefleme durumunda, nanopartiküller (NP) sistemleri, tümör doku biyolojisinden yararlanılarak kanser tedavisi için başarıyla geliştirilmiştir. Normal doku vasküler biyolojisi organize bir yapıya sahipken, tümör vaskülatürü düzensiz dallanmış ve düzensizdir [75]. Tümörlerde ayrıca yüksek vasküler yoğunluk, artmış vasküler geçirgenlik ve bozulmuş lenfatik drenaj vardır, bu katı tümörler ve iltihaplı dokuya bağlıdır [76]. Bu özellikler birlikte, NP'lerin tümör dokusunda tercihli olarak birikmesine izin veren EPR etkisi olarak bilinir. NP'ler, tümör dokusunda daha uzun tutulma sürelerine sahiptir, bu da diğer dokulara göre daha yüksek konsantrasyonlara neden olur. Bu pasif hedefleme sürecine aracılık eden özellikler arasında partikül bileşimi, boyut, şekil ve yüzey özellikleri bulunur [77]. Böylece, NP'ler fizikokimyasal özelliklerini optimize ederek belirli bir doku veya hücreyi daha iyi hedefleyecek şekilde tasarlanabilir.

#### **2.6.1.1 Yüksek geçirgenlik ve yüksek tutma etkisi (EPR effect)**

Pasif hedefli taşıma, esas olarak EPR etkilerinden yararlanır (Şekil 2.7) [78]. EPR, bazı moleküllerin veya partiküllerin tümör dokularında birikme eğiliminde olduğu gerçeğini ifade eder [79]. Normal dokudaki mikrovasküler endotel hücre boşluğu yoğun ve sağlamdır ve genellikle yüksek moleküler ağırlıkta ilaç yüklü NİTS'lerin vasküler duvardan geçmesi kolay değildir. Tümör dokusu kan damarları açısından zengindir ve yapısal bütünlük açısından zayıftır [80]. Yüksek moleküler ağırlıktaki ilaç yüklü NİTS'ler seçici olarak vasküler duvardan geçebilir ve tümör dokusunda kalabilir.

Çok sayıda çalışma, partikül boyutu <100 nm olan nano-ilaç taşıyıcılarının EPR ile katı tümör dokularına yerleştirilebileceğini ve hedeflenebileceğini göstermiştir. Doğrudan uygulama yöntemiyle karşılaştırıldığında, nano ilaç taşıyıcı, ilacın tümör dokusunda birikmesini 10 kattan fazla artırarak biyoyararlanımı büyük ölçüde artırabilir [81]. Vasküler endotelial geçirgenlik, NİTS'lerin lümen tarafından plağın iç kısmına iletilmesi için etkili bir araç sağlar. Dolaşıma giren nano ilaç taşıyıcıları ayrıca enflamatuar hücreler (monositler veya makrofajlar) tarafından yutulur ve bu ilaç taşıyan hücreler plak enflamasyonuna geçerek ilaçların başka bir yolla verilmesine izin verir.



**Şekil.2.7** Gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi [81]

Nanomalzemelerin bir kısmının boyutu ve yüzey özellikleri nedeniyle, intravenöz enjeksiyon sırasında kandan hızla temizlenir, bu da nanomalzemeleri uzun döngü süreleri gerektiren ilaçlar için uygunsuz hale getirir. Bu durumda nano kaplama teknolojisi, belirli bir gizleme için nano sisteme uygulanabilir ve kaplama maddesinin uygulama hızı da kontrol edilebilir ve ayarlanabilir. NİTS'ler üzerindeki geliştiriciler, parçacık tasarımında poli (etilen glikol) (PEG) kullanmıştır. Aslında PEG, yüzeye aşılandığında hidratlanmış bir katman oluşturabilen esnek bir hidrofilik polimerdir ve yüzeydeki proteinlerin adsorpsiyonunu etkin bir şekilde azaltır [82].

## 2.6.2 Nanopartiküller (NP)

Nanopartiküller (NP'ler), bir boyutu en az 100 nm'den küçük olan partikül maddeleri içeren geniş bir malzeme sınıfıdır [83]. Genel şekle bağlı olarak bu malzemeler 0D, 1D, 2D veya 3D olabilir . Araştırmacılar, boyutun bir maddenin fiziksel-kimyasal özelliklerini, örneğin optik özelliklerini etkileyebileceğini keşfettiklerinde, bu malzemelerin önemi anlaşılmıştır.

NP'ler (Şekil 2.8) basit moleküller değildir ve bu nedenle üç katmandan oluşur;

(a) Çeşitli küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif maddeler ve polimerler ile işlevselleştirilebilen yüzey tabakası.

(b) Her yönden çekirdekten kimyasal olarak farklı olan kabuk tabakası ve

(c) NP'nin esasen merkezi kısmı olan ve genellikle NP'nin kendisini ifade eden çekirdek [84]. Bu tür istisnai özellikleri nedeniyle, bu materyaller multidisipliner alanlardaki araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir.

Nano ölçekli malzemelerin üretimi, tarım, gıda ve tekstil gibi endüstriyel alanları olumlu yönde etkilemiştir. Özellikle, nanopartiküllerin tıbbi uygulamalarında olağanüstü ilerleme kaydedilmiştir. Ayrıca, çözünürlüğün iyileştirilmesi ve topikal uygulama imkanı gibi fonksiyonel ve görsel avantajları nedeniyle nanopartiküllerin kozmetik sektöründe kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [85].

İlaç dağıtımını amacıyla nanoteknoloji ve nano taşıyıcıların kullanılması aşağıdaki avantajlara sahiptir:

A: İlaç özelliklerinin geliştirilmesi:

-Çözünürlüğü ve kararlılığı artırmak [86]

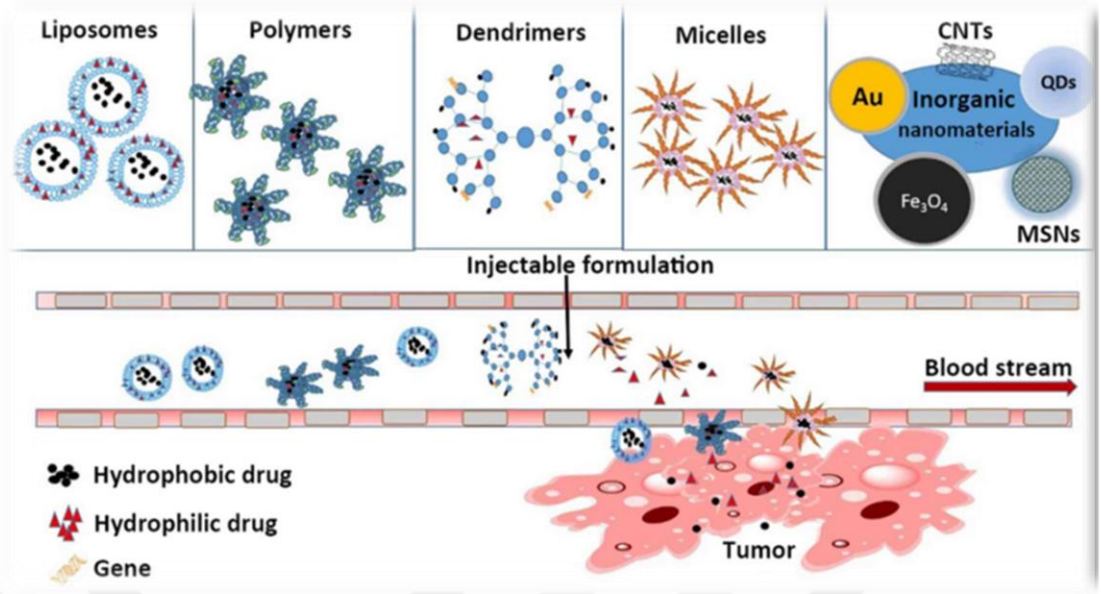
-Hedeflenen ilaç dağıtımının bir sonucu olarak biyolojik dağılımın ve biyoyararlanımın artırılması [87]

B: Doza bağlı özelliklerin geliştirilmesi:

- Uygulanan dozun azaltılması

-İstenmeyen yan etkileri azaltmak veya hatta ortadan kaldırmak.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında genellikle iki farklı yaklaşım benimsenir: yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya. Yukarıdan aşağıya yöntemde mikron boyutundaki büyük malzemeler öğütme, homojenizasyon ve sonikasyon gibi farklı yöntemler kullanılarak nano boyuta dönüştürülür. Ancak aşağıdan yukarıya yöntemde amaç, çözeltilerde kimyasal sentez ve kendiliğinden birleşim gibi çeşitli yöntemlerle moleküler düzeydeki maddelerin nanometre boyutuna yükselmesini sağlamaktır [85].



**Şekil 2.8:** Kanser tedavisi için ilaç taşıyıcı olarak kullanılan bazı nanopartiküller.

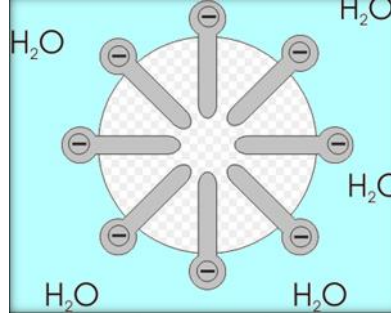
### 2.6.3 Nanopartiküllerin Hücresel Alınımı

NP'lerin hücresel alınımının boyutları, şekilleri ve yüzey yükleri ve kimyaları dahil fizikokimyasal özelliklerinden etkilendiği bildirilmiştir [88]. "NP'ler, plazma membranının pasif penetrasyonu ile de hücelere girebilir" [89]. NP'lerin penetrasyon ve yapışma verimliliği, boyut, yüzey yükü ve bileşim gibi fiziksel özelliklerine bağlıdır. Daha küçük ve pozitif yüklü NP'lerin hücre zarlarından geçtiği ve yırttığı ve önemli sitotoksik etkilere yol açtığı belgelenmiştir [113]. 500 nm'den büyük çaplara sahip parçacıkların bile hücre zarlarına nüfuz ettiği ve deforme ettiği gözlenmiştir. Yüzey yapısının ve şarj seviyesinin dikkatli tasarımı, membranın bozulmasını azaltabilir veya önleyebilir [90]. "Hücrelerin içinde bulunan hedef molekül ilaçlar, biyolojik etkilerini göstermeden önce hücre zarına girmeli ve endozomdan kaçmalıdır" [91].

### 2.7 Misel nanopartikülleri

Miseller, polimerik veya lipid bazlı amfifilik moleküllerin harici bir enerji gerektirmeden sulu ortamda kendiliğinden birleşmesiyle oluşan küçük boyutlu (5-100 nm) parçacıklardır. Sferiyodların iç kısmı hidrofobiktir ve yağda çözünen ilaçlar için bir taşıyıcı görevi görür ve dış kısım hidrofilitir [92]. Hidrofobik bölgeden oluşan çekirdek, bir rezervuar görevi görür ve ilacın çözünmesini önler, hidrofilik kabuk ise esas olarak misel yapıya sulu çözünürlük ve sterik stabilite verir (Şekil 2.9). Bu

teknikle, paklitaksel ve dosetaksel gibi çözülmeyen ilaçlar, hidrofilikliklerini arttırmak ve nihai olarak biyoyararlanımlarını kolaylaştırmak için suda çözünen bir tabaka ile kaplanabilir. Hidrofilik kabuk, *in vivo* koruma sağlar ve dolaşımı uzatır, artırılmış geçirgenlik ve alıkoyma (EPR effect) sağlar.



**Şekil 2.9:** Polar çözücünde bir misel örneği.

Amfifilik moleküller belli bir konsantrasyona ulaştıktan sonra yalnızca sulu ortamda misel oluşturur, bu süreçte kümelenme meydana gelebilir, böylece sistemin serbest enerjisi azalır. Bu eşik konsantrasyon değeri, kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak adlandırılır ve amfifilik moleküllerin yapısına bağlı olarak farklılık gösterir. Düşük CMC'ye sahip sistemler seyreltmeye daha dirençlidir. Misel içeren disperse sulu sistem su ile seyreltildiğinde, sistemde monomer olarak bulunan amfifilik moleküllerin konsantrasyonu azalır ve misel, konsantrasyonu CMC değerine geri döndürmek için gereken miktara bölünür. Bu durumda, misellere yüklenen ilaç da sulu ortamda salınır. Enjeksiyondan ve büyük kan hacmiyle temastan sonra, yüksek CMC'li miseller, ilacın aniden salınmasıyla çökmeye neden olabilir ve bu da emboli ile sonuçlanabilir. Bu nedenlerden dolayı tedavilerde düşük CMC değerleri tercih edilmektedir.

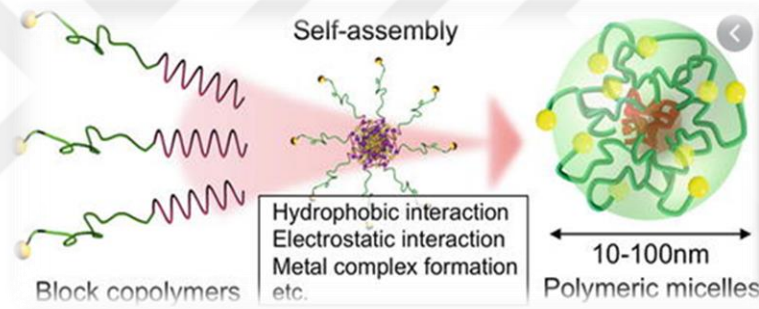
Miseller, kolay hazırlanmaları, yüksek miktarda ilaç taşıyabilmeleri, yapılarında oldukça stabil olmaları ve farklı amaçlara hizmet etmek üzere değiştirilebilir olmaları nedeniyle tercih edilen ilaç taşıyıcılarıdır. Ek olarak, fosfolipidlerle hazırlanan miseller, kabul edilebilir bir toksisite profili sergiler [85]. Genexol-PM ve Nanoxel-PM, Güney Kore'de onaylanmış misel formülasyonlarıdır.

Misel nanopartiküller bir çekirdek ve bir kabuk yapısına sahiptir. PEG genellikle hidrofilik bir kabuk olarak kullanılır; hidrofobik alanlara sahip kabuklar arasında PLA, PLGA [93], polistiren, poli (siyanoakrilat), poli (vinilpirrolidon) ve polikaprolakton bulunur. Bu kopolimerler, doğal biyobozunurlukları ve biyoyumluluklarının yanı sıra

hidrofobik ilaçları hapsedme yeteneklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Paklitaksel (Genexol-PM) ile yüklenmiş bir birincil mPEG-PLA polimerik misel (Şekil 2.10), 2007'de FDA tarafından onaylanmıştır [94]. Serbest Taksol formülasyonu ile yüklenmiştir ve aşırı duyarlılık reaksiyonları, hiperlipidemi ve periferik nöropati gibi toksik etkilerin şiddetini azalttığı gösterilmiştir.

Tıbbın yükselişiyle birlikte, misel nanopartiküller pasif hedefli kanser tedavisi için giderek daha önemli hale gelmiştir. Misel yüzeyindeki peptid modifikasyonu, hassas hedefleme için etkili bir şekilde kullanılabilir. Miselle kovalent bağlarla sahip integrin bağlayıcı sekans peptitleri, tümörleri aktif olarak hedefleyebilir [95].

Biyolojik olarak parçalanabilir ilaç verme sistemlerinin en büyük yararı, ilaç yükünün belirli bir bölgeye kontrollü salımı ve metabolik yollarla vücuttan atılması için toksik olmayan maddelere indirgenmesidir [96].



Şekil 2.10: Kendiliğinden katlanmayla oluşan polimerik misel.

## 2.8 Poli laktik- ko- glikolik asit (PLGA)

Polimer bazlı NP'ler ilaç biyoyararlanımını artırır ve olumsuz yan etkileri en aza indirir [97]. PLGA, ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmak üzere sunulan bir polimerdir ve genellikle biyoyumlu NP'leri tasarlamak için kullanılır. PLGA, ilaç taşıma sistemlerinde kullanım için en iyi araştırılmış polimer olarak bilinir ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmak üzere biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin "altın standardı" olarak adlandırılır. Bugüne kadar PLGA, kontrollü ilaç taşıma sistemlerinde en yaygın kullanılan polimerdir. Bu sentetik polimerin başarısının nedeni, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyoyumluluğu ve uygun salım kinetiğidir. PGA ve PLA ile birlikte PLGA, 1960'larda cerrahi dikişler olarak keşfedilmiştir. PLGA, doğurganlığı düzenleyen hormonlar, büyüme hormonları, steroid hormonları, anti-enflamatuar

ilaçlar, sitokinler, kemoterapötikler, antibiyotikler, narkotik antagonistler, insülin ve aşılarda dahil olmak üzere çeşitli "küçük moleküllü ilaçlar, peptitler ve proteinler" salınması için kullanılmıştır [98]. Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında, PLGA'nın enjekte edilebilir mikroküreler veya nanoküreler gibi çeşitli biçimlerde tasarlanması daha kolaydır.

### **2.8.1 PLGA'nın fiziksel, kimyasal, biyolojik özellikleri ve ilaç taşıma sistemlerinde uygulanması**

PLGA, ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmak üzere sunulan bir polimerdir ve genellikle biyouyumlu NP'leri tasarlamak için kullanılır [12]. PLGA, vücuttan atılan, toksik olmayan ürünlere (H<sub>2</sub>O ve CO<sub>2</sub>) ayrılan en iyi karakterize edilmiş biyolojik olarak parçalanabilir kopolimerlerden biridir. Polimerik NP'si, ester bağlarının monomerik anyonlarına (laktat ve glikolat) hidrolizi yoluyla *in vivo* bozunur. D-Laktat, atılmadan önce daha fazla metabolize edilmezken, L-laktat, akciğerler yoluyla atılan CO<sub>2</sub>'ye dönüştürülür ve Krebs döngüsüne giren piruvata dönüştürülür. Öte yandan glikolat, ya doğrudan böbrek sistemi yoluyla atılır ya da daha sonra glisin, serin ve piruvata dönüştürülen glioksilata oksitlenebilir. İkincisi tekrar Krebs döngüsüne girebilir ve CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya metabolize edilir [99, 100]. Tipik olarak PLGA, LA ve GA'nın katalize edilmiş bir halka açma kopolimerizasyonu ile üretilir (Şekil 2.11) [101]. PGA, suda çözünürlüğü düşük ve fizyolojik koşullar altında hızlı bozunma oranı olan kristalin hidrofilik bir polimerdir. Aksine, PLA, düşük mekanik mukavemete sahip sert ve hidrofobik bir polimerdir. Her ikisinin de bir kopolimeri olarak PLGA, polimerik içeriğin, monomerlerinin kendine özgü özelliklerini miras alarak, LA / GA oranına ve moleküler ağırlığına dayalı olarak, bozunma oranını güçlü bir şekilde etkiler. Örneğin, LA / GA oranında bir artışla, genel PLGA hidrofobikliği artar, bu da daha düşük bozunmaya ve dolayısıyla daha yavaş ilaç salım hızına yol açar [102]. Ayrıca, polimerin nihai molekül ağırlığı, elde edilen formülasyonların degradasyonunu ve ilaç salım kinetiğini de etkiler; yani, moleküler ağırlığında bir azalma ile hem bozunma hem de ilaç salım oranları artar [103]. Akabinde, bozunma, salım kinetiği ve moleküler ağırlığı NP'lerin formülasyonunun aynı zamanda boyutuyla ilişkilidir. Bunlar, PLGA NP'lerin terapötik performansı için çok önemli faktörlerdir.

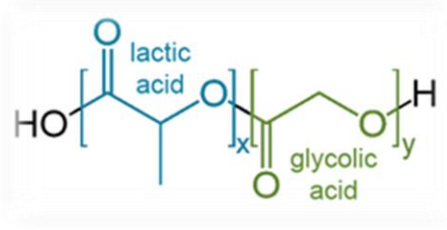
Daha büyük boyutlu formülasyonların daha yüksek ilaç yükleme potansiyeline rağmen, daha düşük bir nano boyut aralığına ulaşmak, NP'lerin biyolojik engellerin

üstesinden gelme ve hastalık bölgesine ulaşma yeteneği için esasen önemlidir. Artan moleküler ağırlık ile, PLGA NP'lerin degradasyonu ve ilaç salımı, sırasıyla% 95, 66, 50 ve 23'ün 18. gününde fizyolojik koşullar altında yük salımı ile azalmıştır. LA / GA oranı, bozunma süresinin ve ilaç salım hızının uyarlanmasında etkili bir parametredir. GA içeriği ne kadar yüksekse, ortaya çıkan bozulma oranı o kadar hızlıdır [103]. Bunun tersine ilaç salımı, LA içeriğindeki artışla uzar (LA / GA: 50/50, 75/25, 100/0'dan daha hızlı salım kinetiği göstermiştir) [104]. Bu nedenle, bu polimerik özellikler ve bunların boyutları, PLGA formülasyonlarının hidrofobikliğini, ilaç yükleme etkinliğini ve farmakokinetik profilini uyarlamak için önemlidir.

Kanser tedavisinin sonucunu etkileyen bir diğer önemli faktör, PLGA NP'lerin şeklidir. Bugüne kadar, çubuk- [105], iğne [106] ve silindirik [107] NP'ler sentezlenmiş ve hücre alım, internalizasyon, biyolojik dağılım ve kan yarı ömrü ile ilgili en sık kullanılan küresel şekilli PLGA NP'lerle karşılaştırılmıştır. Örneğin, iğne şeklindeki PLGA NP'ler, endotel hücre membranlarını daha verimli bir şekilde geçer ve siRNA'yı, küresel şekilli analoglarına kıyasla hücresel sitoplazmaya (*in vitro*) iletir. Alım mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır, ancak üç olası yola daraltılmıştır: Endositoz, doğrudan uygulama ve / veya olası zar bozulmasıyla birlikte zar bölümü. Internalizasyon, küresel benzerliklerine kıyasla üç kat artırılmış etki ile % 150 daha yüksektir [106]. Bununla birlikte, iğne şeklindeki PLGA NP önemli ölçüde sitotoksositeye neden olabilir. Endositozdan sonra iğne şeklindeki parçacıklar, lizozom membranına zarar verebilecekleri lizozomlardadır ve bu sayede apoptoz sinyal yollarını aktive eder ve sonunda hücre apoptozunu indükler [108].

PLGA NP'lerin özgün özelliklerinin yanında, yüzey modifikasyonları hedefleme stratejisi, biyoyumluluk ve kandaki yarı ömrü açısından önemli bir rol oynar. Örneğin PEG (PEGilasyon) ile yüzey modifikasyonu, opsonizasyonu ve mononükleer fagosit sistemi tarafından alınımı önleyerek artırılmış kan dolaşımı süresi ve geliştirilmiş farmakokinetik ile gizli bir partikül veren formülasyonun hidrofiliğini artırır [109]. Bununla birlikte, aynı nedenlerden ötürü, hedef hücreler tarafından hücre alım (tedaviye bağlı olarak zorunlu olabilir) da azaltılabilir ve bu partiküllerin hedefleme yetenekleri, yüzeyin tam kimyasal bileşimine büyük ölçüde bağlıdır. Örneğin Khalil ve ark. tek emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ile PEGilasyonlu ve PEGilasyonsuz kurkumin (CUR) yüklü PLGA NP'leri sentezlenmiş ve her iki formülasyonu da serbest ilaçla karşılaştırarak PEGilasyonun ilacın ve PLGA partikülünün farmakokinetik özelliklerini iyileştirebileceğini göstermiştir.





**Şekil 2.11:** PLGA'nın moleküler yapısı. X ve y, her birimin tekrarlamaya sayısını gösterir (x = laktik asit birimi sayısı, y = glikolik asit birimi sayısı).

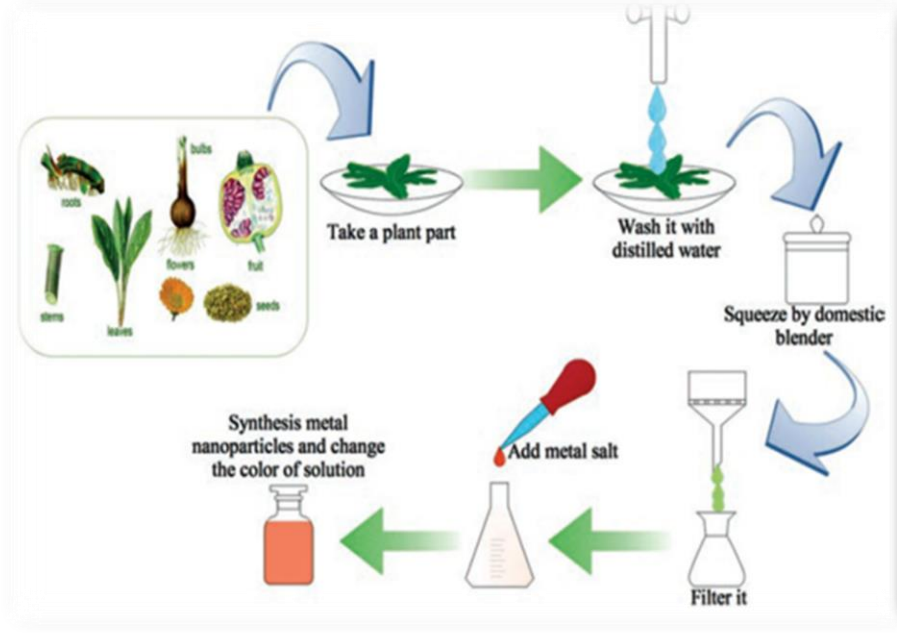
## 2.9 Yeşil Kimya ve Metal Nano Partiküllerin Hazırlanması

Yeşil nanoteknoloji, nanomalzemelerin üretim ve uygulamasının olumsuz etkilerini azaltmak ve nanoteknoloji risklerini azaltmak için mükemmel bir çözümdür [110]. Yeşil kimya sektörünün esas yönü, tasarım veya üretim ve kimyasal ürünlerle ilgili olarak tehlikeli madde kullanımını veya üretimini düşüren veya ortadan kaldıran bir grup öğelerin kullanılmasıdır. Yeşil nanoteknoloji, mevcut çevresel sorunları ortadan kaldırdığı anlamına gelen kirliliği ortadan kaldırarak veya azaltarak nanomateryaller veya ürün tasarımı üzerinde girişimci bir etkiye sahiptir.

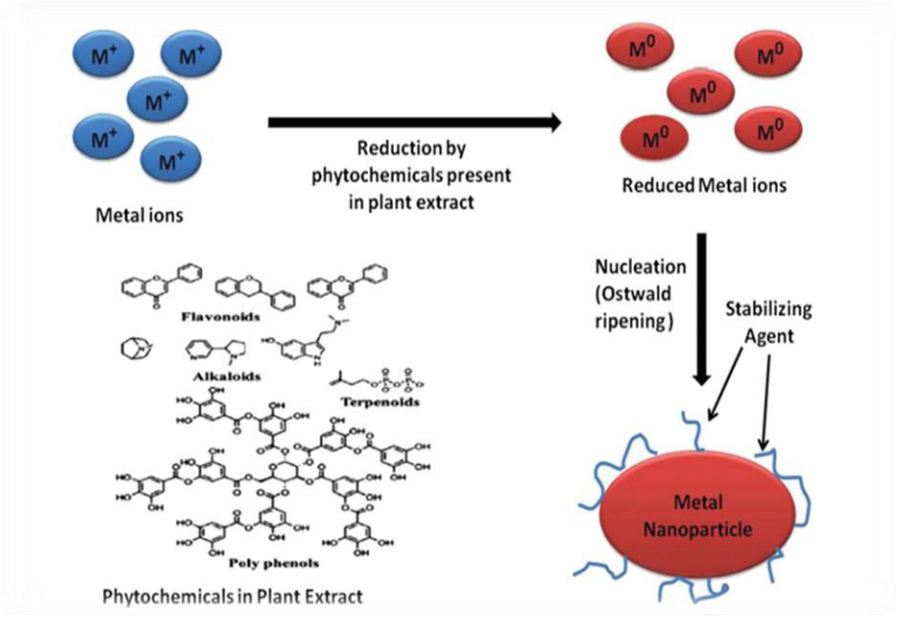
Metal nanopartiküller (MNP'ler) ve metal oksit nanopartiküller (MONP'ler) çok sayıda alanda kullanılmaktadır. Yeni nano tabanlı varlıklar güçlü bir şekilde üretiliyor ve endüstriyel ve imalat sektörlerini etkilemek için günlük kişisel bakım ürünleri, kozmetikler, ilaçlar, ilaç dağıtımı ve giysilere dahil ediliyor, bu da nanomalzemelerin ticarileştirilmesi ve nano destekli cihazın sürekli olarak büyüyeceği anlamına geliyor. Yeşil sentez ve geleneksel kimyasal sentez yöntemleri gibi birçok yöntemle hazırlanabilirler. Bitkilerin büyük bir çoğunluğu mikroorganizma ve enzimlere kıyasla sürdürülebilir ve yenilenebilir özellik taşımaktadırlar, ışık enerjisinin neredeyse % 75'ini kimyasal enerjiye dönüştürür, antioksidanlar ve şeker gibi kimyasallar içerirler ve nanopartiküllerin üretiminde temel rol oynarlar [111]. Bitkiler, MNP ve MONP'lerin yeşil sentezi için ana fabrika olarak kabul edilmektedir ve şimdiye dek bunları incelemek için farklı bitki türleri kullanılmıştır, ancak bu hazırlığı gerçekleştirmek için belirlenen koşullar dikkate alınmalıdır. İndirgeyici bileşiklere sahip bitkiler, soy metallerin sentezi için tercih edilen seçenektir. Altın (Au), gümüş (Ag), platin (Pt) ve paladyum (Pd) gibi asil metaller ve bakır (Cu) ve nikel (Ni) gibi diğer metaller optik, elektronik, mekanik, manyetik ve kimyasal özellikler, farklı teknolojik uygulamalara yol açar. Çok çeşitli indirgeyici maddeye sahip bitkiler, soy

MNP'lerin üretimi için uygun adaylardır. Daha yeşil biyomalzemelerin üretimi için mükemmel kaynaklar bitkilerdir ve biyoteknoloji ve gen transferi gibi birçok alanda önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Üretilen biyolojik nanomateryaller, ilaç endüstrisinde yeni ilaç hazırlama, ilaç taşıma gibi harika bir uygulamaya sahiptir. Organik çözücüler ve kimyasal reaktifler, MNP'ler hazırlanmasında kullanılmaz.

MNP'lerin ve MONP'lerin yeşil sentezi, biyolojik sistemler kullanılarak yeşil kimya ilkelerine bağlı olan alternatiflerden biri olarak kabul edilir [112]. MNP'lerin ve MONP'lerin yeşil sentezi prokaryotik veya ökaryotik organizmalar (mikroorganizmaları, bitkileri ve hayvanları içeren) veya bunların parçalarını kullanarak gerçekleştirilir ve hücre içi [113] veya hücre dışı olarak gerçekleşebilir. Bitkilerin birincil ve ikincil metabolitleri, Şekil 2.12'te gösterildiği gibi bir hedef metal iyon azaltımı gerçekleştirerek MNP'ler ve MONP'ler üretmek için kullanılır. MNP'ler ve MONP'lerin hazırlanması ve özellikleri, sıcaklık, pH ve reaktif konsantrasyonu gibi farklı koşullarla ayarlanabilir [111]. Bilim adamları, MNP'lerin ve MONP'lerin yeşil sentezini gerçekleştirmek için bitkilerin organ / doku özütlerini veya bütün organizmalarını [114, 115] kullandılar (Şekil 2.12). Yapraklar, tohumlar, kabuklar, kökler ve meyveler gibi çeşitli bitki parçaları, farklı özelliklere sahip nano nesne üretimi için bir fabrikadır [116], ancak araştırmacılar özel fitokimyasal profili dikkate almalıdır. Metalik eşlerinin varlığı ve MNP'lerin ve MONP'lerin yüzeyinin stabilizasyonu nedeniyle amino asitler, sitrik asit, flavonoidler, fenolik bileşikler [117], terpenoidler, heterosiklik bileşikler [118], enzimler, peptidler, polisakkaritler, saponinler ve tanenler gibi primer bileşikler metal iyonlarının indirgenmesinden sorumludur.



Şekil 2.12: Bitki özleri kullanılarak MNP sentezinin iki şematik özelliği [119]



Şekil 2.13: Bitki ekstraktlarındaki mevcut fitokimyasallar tarafından indirgenen metal iyonlarının stabilize edici ajan tarafından nanopartikül hale getirilmesi [111].

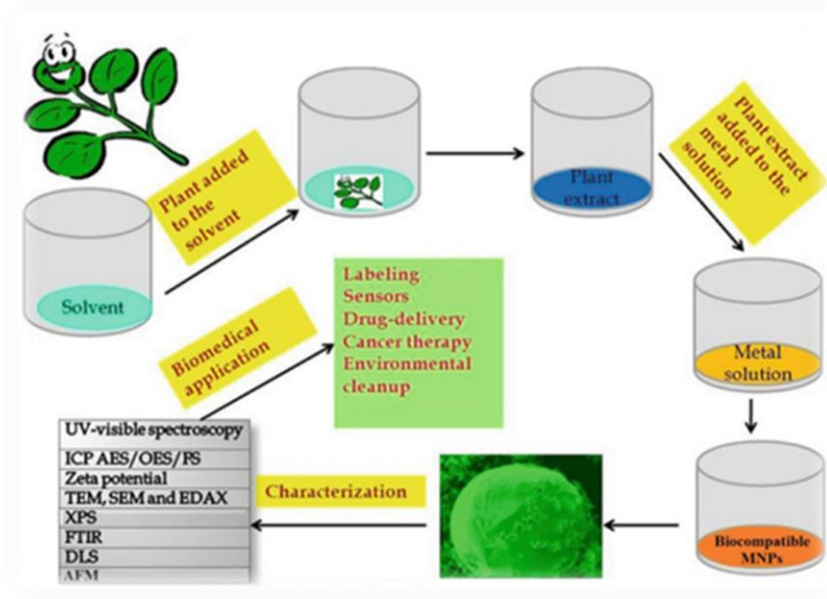
Bitkilerin çoğu, ışık enerjisinin yaklaşık % 75'ini güneşten alıp kimyasal enerjiye dönüştürme kabiliyetine sahip oldukları için mikrop ve enzimlere kıyasla sürdürülebilir ve yenilenebilir kaynak özelliklerine sahiptir, bu da pahalı üretim yöntemleri gerektirir [120]. Ayrıca bitkiler, antioksidanlar ve şekerler gibi kimyasallar içerir ve nanopartiküllerin üretiminde önemli rol oynarlar [121]. Proteinler ve

karbonhidratlar, indirgeyici ajanlar olarak görev yapan ve MNP'lerin oluşumundan ve metal iyonu indirgenmesinden sorumlu olan bitki özlerinin önemli bileşenleridir . Bitki özlerindeki fonksiyonel amino grupları ve proteinler, metal iyonunun indirgenmesinde önemli bir rol oynar [108]. Huang vd. - C - O - C -, - C - O -, - C = C - ve - C = O - gibi alkaloidlerin, flavonların ve antrasenlerin fonksiyonel gruplarının MNP sentezine yardımcı olduğunu tartışmışlardır. Kesharwani vd. , metal iyonu indirgememesinin bitki yaprağı ekstraktında bulunan kinonlar ve plastohidrokinon molekülleri yardımıyla gerçekleştirilebileceğini öne sürmüştü ve bu da hücre dışı MNP sentezinin bitkilerdeki biyomoleküller ve heterosiklik bileşikler tarafından yapılabileceğini göstermektedir. Bitkileri kullanarak MONP sentezinin tam vizyonu şimdiye kadar tam olarak anlaşılmamış olsa da, bitkilerin fitokimyasalları MNP gibi MONP üretimine yol açmıştır.

İlk olarak, bitki ekstresindeki fitokimyasallar metal indirgememesinden sorumludur. Atmosferden veya bozunmuş fitokimyasallardan üretilen oksijen, indirgenmiş metal iyonlarını birbirine bağlar. Elektrostatik çekim, metal oksit iyonlarını birbirine bağlayacak ve nanopartiküllerin oluşumuna yol açacaktır. Aralarında agregasyonu önleyen fitokimyasallarla stabilize edilirler. Süperoksit-kaynaklı Fenton reaksiyonu, ROS'un [120] ana kaynağıdır ve bitkilerin karboksil ve hidroksil grupları ile fenolik bileşikler tarafından bastırılır.

Süreç aşağıdaki adımlarla özetlenebilir:

- (1) Bakır, gümüş, altın, çinko, titanyum, demir ve nikel gibi metaller, fitokimyasallar ile metal oksitlerin oluşmasına neden olur.
- (2) Fitokimyasallar kullanılarak metal iyonları büyüme ve stabilizasyon aşamalarından geçecektir.
- (3) Oksijen, fitokimyasalların bozunması ile veya atmosfer tarafından ve büyüme ve stabilizasyon aşamalarından önce, Şekil 2.13'te belirtildiği gibi metal iyonuna bağlanacaktır, bu da MONP üretim mekanizmasının literatürde açıklanan farklı yöntemlerle de yürütülebileceğini açıklamaktadır [111].



**Şekil 2.14:** Nanopartiküllerin yeşil sentezi için kaynak olarak bitkilerin şematik bir gösterimi, nanopartiküllerin özellikleri ve biyomedikal uygulamaları (47).

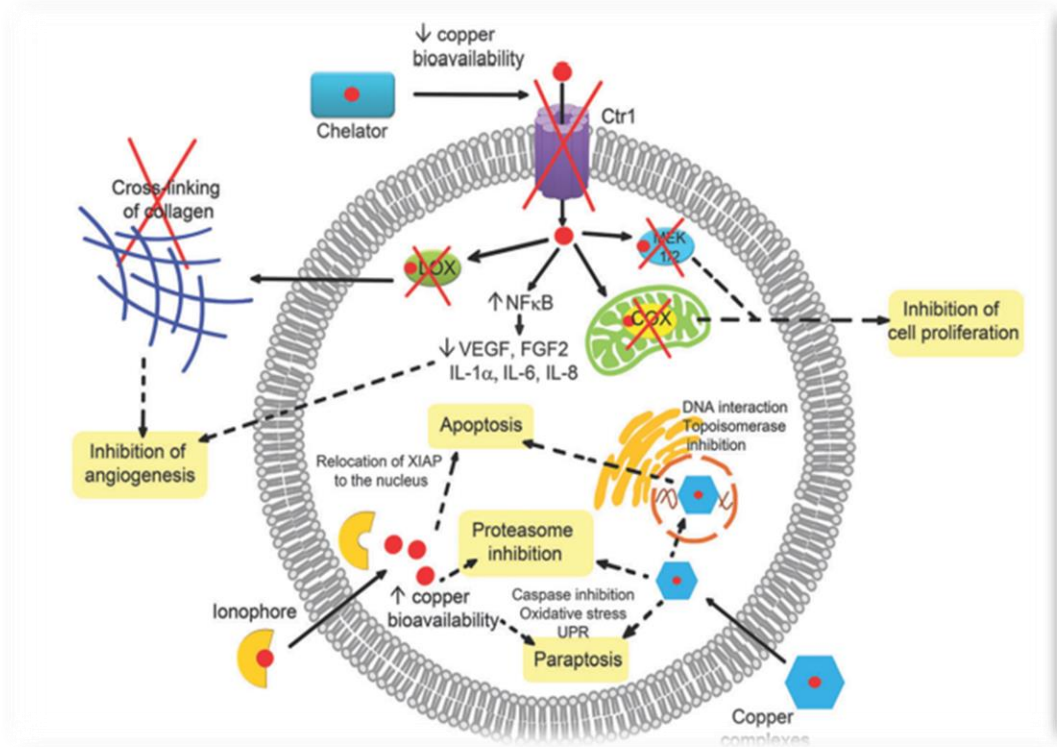
Flavonoidler, MNP ve MONP sentezi için temel bir ajan olarak kabul edilir. Flavonoidler, bir grup fenolik bileşik olarak kabul edilen antosiyaninleri, izoflavonoidleri, flavonoller, kalkanları, flavonları ve flavanonları [114] içerir. Aglikonlar flavonoidlerin ana yapısıdır. Benzen halkasının varlığı, flavonollerin, flavanonların veya bunların hidro türevlerinin kategorize edilmesine dayanır. C2 - C3 çift bağı ve 3-pozisyonundaki hidroksil grubu, flavonoller, flavanonlardan ayırır [139]. İç mekanizma; flavonoidlerde keton karboksilik aside dönüşümü; karbonil grupları veya  $\pi$ -elektronları [114] ile  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  gibi metal iyonlarının oluşumuna yol açar. Kısaca flavonoidler; büyüme, küresel yapılaşma (spherical) ve stabilizasyon yoluyla nanopartikül üretmek için şelasyon ve indirgemedir sorumludur. Flavonoidler içeren bitki yaprağı özleri, diğer fitokimyasallara göre daha etkilidir, çünkü flavonoidler nano kompozisyon toksisitesini azaltır ve stabilize edici bir ajan görevi görürler. Metal oksitlerden üretilen ROS, antioksidan aktiviteleri nedeniyle flavonoidler tarafından azaltılabilir [151,152]. Flavonoidler hepatoprotektif [153], antikanser [154,155] ve antiviral [156 - 159] özelliklere sahiptir.

### 2.9.1 Bakır ( $\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$ ) Kompleksleri

Bakır, tüm yaşam formları boyunca korunan, yaşam süreçlerinde yer alan temel bir mikro besindir. Bakırın, istemeden ROS'un üretimine yol açabilen oksidasyon-indirgeme (redoks) reaksiyonlarını katalize etme yeteneği, vücut içindeki bakırın sıkı bir şekilde homeostatik düzenlenmesini gerektirir. Pek çok kanser türü, artmış intratümöral bakır ve / veya değişmiş sistemik bakır dağılımı sergiler. Bakırın büyüme, anjiyogenez ve metastaz dahil olmak üzere tümör ilerlemesinin birçok yönü için sınırlayıcı bir faktör olarak hizmet ettiğinin anlaşılması, bu süreçleri inhibe etmek için terapiler olarak bakıra özgü şelatörlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Başka bir terapötik yaklaşım, hücre içi bakır seviyelerini artırmak için hücelere bakır veren spesifik iyonoforları kullanır [122]. Hücre içi bakır zorla arttırıldığında normal ve kanserli hücreler arasındaki terapötik pencere, antikanser özelliklere sahip bakır-iyonoforların geliştirilmesinin temelidir. Ayrıca şu anda kemoterapi olarak kullanılan koordinasyon komplekslerinde platinin yerine bakırın kullanılması da araştırılmaktadır. Platin temelli ilaçlarla karşılaştırıldığında, umut verici bakır uyumlu kompleksler, normal hücelere karşı daha az toksisite ile daha güçlü antikanser ajanları olabilir ve tekrarlayan platin tedavisi ile ilişkili kemo-direnci potansiyel olarak atlatabilirler.

Farelerde bakırın kanser gelişimi üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Uzun süre önce, 10 gün boyunca koloidal bir çözelti şeklinde günlük olarak uygulanan bakırın (0.75 mg) fare karsinom modelinde kanser büyümesini geciktirebildiği gösterilmiştir. Ek olarak, 26 hafta boyunca subkutan enjeksiyonla uygulanan bakır asetat (haftada kg başına 2 mg), sıçanlarda kimyasal (dimetiltrozamin) indüksiyonunun neden olduğu karaciğer karsinogenezinin başlamasını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu bulgular, oral gavaj yoluyla günlük olarak uygulanan bakırın ( $\text{CuSO}_4$ ) (14 hafta boyunca  $42.6 \text{ mgkg}^{-1}$ ), kimyasal olarak indüklenen bir sıçan modelinde meme tümörünün büyümesini arttırdığı yeni bir çalışma ile tam olarak tezat oluşturmaktadır [123]. Benzer şekilde, pankreas adacık hücresi karsinomu (RIP1-Tag2 modeli) geliştirmek için genetik olarak tasarlanmış farelerin içme suyuna 20 mM bakır ( $\text{CuSO}_4$ ) eklenmesi kanser büyümesini hızlandırmıştır [124].  $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$  kaynaklı akciğer kanseri taşıyan farelerde, yüksek seviyelerde bakır (125 mM  $\text{CuSO}_4$ ) ile desteklenmiş içme suyu sağlandığında da hızlanmış kanser büyümesi gözlenmiştir [125].

Bakırın anjiyogenez, kanser büyümesi ve metastazı desteklediğinin farkına varılmasıyla birlikte kötü huylu dokulardaki yüksek bakır, antikanser tedavileri için bakır koordinasyon bileşiklerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bakır biyoyararlanımını azaltmak için bakır şelatlama, birden fazla kanser türü için anjiyogenezi inhibe etme stratejisi olarak klinik çalışmalarda araştırılmıştır ve araştırılmaya devam etmektedir (örn., Clinicaltrials.gov id # NCT00003751, NCT00176800, NCT01837329, NCT02068079, NCT00405574). Tanım gereği, bakır şelatörler bakır iyonlarını vücuttan uzaklaştırır ve bu nedenle terapötik önermeleri, kanser ilerlemesini sınırlamak için bakıra bağlı habis süreçleri engeller [122]. Hücre içi bakır seviyelerini yükselten bakır-iyonoforlar ve doğrudan sitotoksik etkiler uygulayan diğer bakır kompleksleri, aynı zamanda yoğun araştırma ve klinik çalışmaların odak noktasıdır. Bu bileşikler mekanik olarak bakır şelatörlerinden farklıdır ve bakırın çıkarılması yerine hücre içi bakır seviyelerini yükseltir ve / veya yeniden dağıtır.



**Şekil 2.15:** Kanser hücrelerini hedef alan bakır koordinasyon bileşikleri. Şelatörler bakıra el koyarak, anjiyogenez, metastaz ve tümör büyümesini için kullanılamaz hale getirir. Buna karşılık, ionoforlar, hücelere bakır girişini kolaylaştırır ve genellikle biyolojik olarak kullanılabilir hücre içi bakır sağlar. Farklı bakır koordinasyon bileşikleri arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, proteazom

inhibisyonu, ROS üretimi, DNA etkileşimleri, topoizomeraz inhibisyonu, paraptoz ve apoptoz dahil olmak üzere atfedilen sayısız antikanser aktivitesi vardır. ( COX = sitokrom c oksidaz, Ctr1 = bakır taşıyıcı 1, FGF2 = fibroblast büyüme faktörü 2, IL-1a = interlökin-1a, LOX = lisil oksidaz, MEK1 / 2 = mitojenle aktive olan protein kinaz, NF-kB = nükleer faktör-kappa B, UPR = katlanmamış protein yanıtı, VEGF = vasküler endotelyal büyüme faktörü, XIAP =X'e bağlı apoptoz inhibitörü ) [122].

Sisplatin ve karboplatin gibi platin bazlı terapötiklerin çeşitli kanser türleri için tedavilerdeki başarısı yan etkileri azaltmak ve kemo direncin üstesinden gelmek amacıyla DNA'yı hedefleyen başka metal koordinasyon bileşiklerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu amaçla, birçok bakır koordinasyon bileşiği sınıfı *in vitro* olarak tasarlanmış ve karakterize edilmiştir, ancak klinik öncesi hayvan modellerinde yalnızca birkaçı değerlendirilmiştir [126, 127]. Platin bazlı terapötikler, etkilerini, transkripsiyon için gerekli proteinlerin bağlanmasına müdahale eden bitişik DNA bazları üzerindeki nitrojenlere bağlanarak gösterir. Son zamanlarda, bir grup araştırmacı, nükleazlar gibi metaloenzimler için aktif bölgeler sağlayan DNA omurgasındaki iki komşu fosfatı hedefleyen iki bakır merkez içeren yeni kompleksler geliştirmişlerdir [128]. Bakır içeren bu bileşikler, DNA sentezini inhibe eder ve sisplatinden çok daha yüksek etkili çoklu kanser hücre tiplerinin hücre ölümünü indükler. Sisplatin ile gözlenen kemorezistenin üstesinden gelmek için çaba sarf eden Pivetta ve arkadaşları (2015), sisplatin ile ikili kombinasyonda kullanılan bir veya iki 1,10-fenatrolin molekülü içeren üç bakır koordinasyon bileşiğinin etkisini değerlendirmiştir [129]. Kombinasyon terapisinde sisplatine dirençli olduğu belirlenen hücrelere karşı bile net bir sinerjistik etki gözlenmiştir. Teşvik edici olan da, kombinasyon halinde uygulandığında her ilacın tek ajan olarak kullanıldıklarına kıyasla daha düşük bir dozda kullanılabilinmesidir.

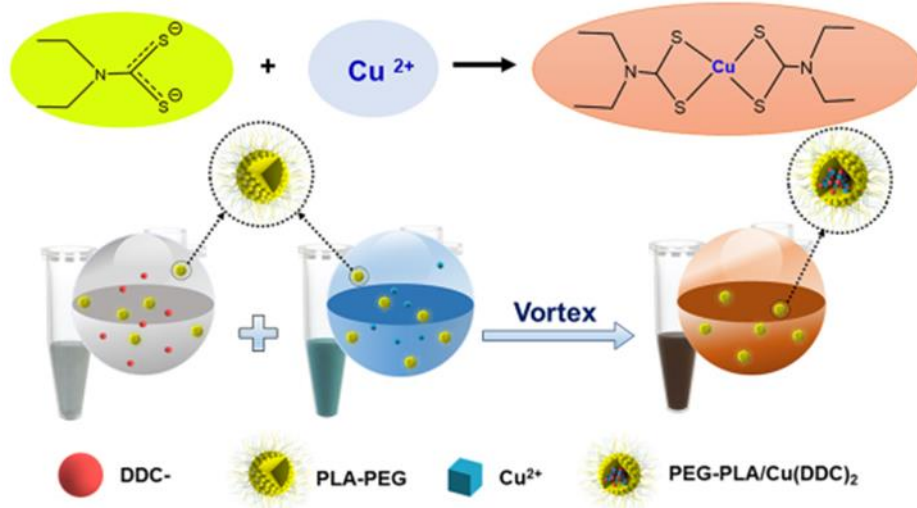
Alkol bağımlılığını tedavi etmek için kullanılan disülfiramın (DSF), çeşitli malign tümörlerde anti-kanser etkileri olduğu birçok klinik olmayan çalışmada bildirilmiş ve meme kanseri hastaları için klinik denemeler yapılmıştır [10]. Son zamanlarda, DSF bir antikanser ajan olarak yeniden tasarlanarak bakır iyonlarıyla ( $Cu^{2+}$ ) birleştirildiğinde mükemmel antikanser aktivite göstermiştir [130]. Elde edilen veriler, DSF'nin *in vitro* sitotoksitesinin bakıra bağlı olduğunu göstermektedir [4, 9]. DSF ve bakır reaksiyonu, ROS oluşturur. DSF / Cu'nun, nükleer protein lokalizasyon 4 (NPL4) proteinini hedefleyerek proteazom / poli-Ub protein degradasyon



basamaklarını inhibe ettiği gösterilmiştir. DSF / Cu ayrıca kanser kök hücrelerini inhibe edebilir [131] ve dirençli kanseri, P-gp'yi inhibe ederek kemoterapi ilaçlarına duyarlı hale getirebilir. DSF / bakırın antikanser aktivitesi büyük ölçüde aktif metabolit olan bakır dietilditiokarbamat (Cu (DDC)<sub>2</sub>) oluşumuna bağlıdır.

Serumda, DSF, iki dietilditiokarbamat (DDC) molekülü oluşturmak için hızla indirgenir. DDC, başlıca bakır (II) (Cu) ve çinko [132-134] olmak üzere iki değerlikli geçiş metal iyonlarının çok güçlü bir şelatörüdür. Elde edilen veriler, DSF'nin in vitro sitotoksitesinin bakıra bağlı olduğunu göstermektedir [134]. Bakır desteği olmayan serumsuz ortamda DS, kanser hücre dizilerindeki sitotoksitesini tamamen kaybeder. Cu, redoks reaksiyonlarında çok önemli bir rol oynar. DDC, Cu ile temas ettiğinde, aralarındaki kenetleme reaksiyonu, DNA, protein ve lipidlere zarar veren ve kanser hücresi ölümüne yol açan ROS [135] oluşumunu tetikler. ROS, yüksek kimyasal reaktiviteleri nedeniyle çok kısa ömürlü son derece geçici türlerdir ve dokularda ancak çok kısa mesafelere nüfuz edebilir. Kanser hücrelerini hedeflemek için, DSF ve Cu reaksiyonu kanser hücrelerinin içinde veya yakınında gerçekleşmelidir.

DDC ve Cu reaksiyonundan üretilen ROS' a ek olarak, DDC ve Cu reaksiyonundan türetilen son ürün olan bio (N, Ndiethyldithiocarbamato) bakır (II) (Cu-DDC), kanser hücrelerinde de sitotoksiktir. DSF / Cu ayrıca kanser kök hücrelerini inhibe edebilir ve dirençli kanseri, P-gp'yi inhibe ederek kemoterapi ilaçlarına duyarlı hale getirebilir. Bu nedenle, önceden oluşturulmuş Cu (DDC)<sub>2</sub> kompleksi uygulanmasının, daha yüksek aktif ilaç konsantrasyonları ve daha iyi antikanser etkinliği elde etmek için daha etkili bir yaklaşım olması beklenmektedir. Cu (DDC)<sub>2</sub>'nin suda düşük çözünürlüğü nedeniyle, Cu (DDC)<sub>2</sub> çözünürlüğünü arttırmak ve böylece onu klinik kullanım için kabul edilebilir hale getirmek için tasarlanmış bir formülasyon geliştirmeye büyük ihtiyaç vardır [136]. Cu (DDC)<sub>2</sub>'nin iletilmesi için nanoteknoloji tabanlı yaklaşımlar kullanılmıştır. Önceki çalışmalarda, Cu(DDC)<sub>2</sub>'nin nanopartiküllere (NP'ler) doğrudan yüklenmesi (Şekil 2.16) sadece düşük ilaç yükleme etkinliği ve düşük ilaç konsantrasyonu sağlamıştır. Yakın zamanda, enjekte edilebilir bir Cu (DDC)<sub>2</sub> formülasyonu hazırlamak için Metaplex teknolojisi veya PRCosomes geliştirilmiştir [137]. Bu çığır açan teknoloji lipozomları, lipozomların hidrofilik çekirdeği içindeki bakır iyonlarından (Cu<sup>2+</sup>) ve dietilditiokarbamattan (DDC-) Cu (DDC)<sub>2</sub> NP'leri sentezlemek için bir nano-ölçekleme kabı olarak kullanılmıştır. Oluşturulan Cu (DDC)<sub>2</sub> NP'ler lipozomların içine dahil edilerek lipozom membranları tarafından stabilize edilmiştir.



**Şekil 2.16:** SMILE Yöntemi ile Cu (DDC)<sub>2</sub> NP'nin Hazırlanması [10].

Nanoteknoloji alanı, modern malzeme bilimindeki en aktif araştırma alanlarından biridir. En az bir boyutta boyu yaklaşık 1 nm'den 100 nm'ye kadar uzanan boyuta sahip parçacıklar olarak adlandırılan nanopartiküller, boyut, dağılım ve morfoloji gibi belirli özelliklere dayalı olarak tamamen yeni veya geliştirilmiş özellikler sergiler. Nano ölçekli malzemelerin ve yapıların uygulanması, nanobilim ve nanoteknolojinin gelişmekte olan bir alanıdır. Nanopartiküller, güneş enerjisi dönüşümü, kataliz, ilaç ve su arıtma alanlarındaki teknolojik ve çevresel zorluklara çözümler sağlar. Özellikle bakır nanopartiküller, makro ölçekte benzerlerine kıyasla sıklıkla benzersiz ve önemli ölçüde değiştirilmiş fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergiledikleri için büyük önem kazanmıştır [138]. Bakır nanopartiküller, benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri ve düşük maliyetli hazırlıkları nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi görmüştür. Bakır nanopartiküllerin ısı transfer sistemleri, süper güçlü malzemeler, sensörler ve katalizörler gibi çeşitli uygulamaları vardır. Antimikrobiyal aktivite, dezenfekte etme özelliği ve matrise bağlı partiküller olarak stabilite gibi diğer özellikleri, hastane ekipmanlarını kaplamak için duvar boyalarında ve sıvalarda kullanım için daha fazla kullanılabilir. Bakır nanopartiküllerin sentezi, nanoteknolojide akademik ve daha da önemlisi uygulama araştırmalarının aktif bir alanıdır.

Çalışmalarda, hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak işlev gören doğal mevcut tıbbi bitkilerin ekstraksiyonları kullanılarak altın nanokonjugatların sentezi için yeşil kimya yaklaşımına başvurulmaktadır. Bununla birlikte, nanokonjugatlar, bitkilerin ekstraktlarında anti-kanser ilaçlarının (örneğin flavonlar ve polifenoller)

varlığına bağı olarak kanser hücrelerine karşı sitotoksiktir. Sonuçlar, in situ biyosentezlenmiş nanokonjugat bazlı ilaç verme sistemlerinin kanser tedavisi ve diğer biyomedikal uygulamalara yönelik gelecekteki terapötik uygulamasını tamamen desteklemektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Gereç

##### 3.1.1 Cihazlar

Tezde kullanılan cihazlar aşağıdaki verilmiştir.

Cihaz Adı	Marka
<i>In Vivo</i> Görüntüleme Sistemi (IVIS)	Perkin Elmer
Hücre Kültürü Kabini (Class II)	Safe Fast Classic Faster Air
Karbondiyoksit İnkübatörü	ESCO - Panasonic
Multiplaka Okuyucu	Thermo Varioskan
Soğutmalı Santrifüj	Hermle
Derin Dondurucu (-20°C / -80°C)	Uğur / Haier
Buzdolabı (-4)	Uğur
Hassas Terazı	Mettler Toledo
Deiyozize su cihazı	Sartorius Stedim
Vorteks	Stuart
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Manyetik Karıştırıcı	Biocote, Stuart CB162
Sıcak su banyosu	Hellma Analytics
Buz makinası	Maestrogen Inc
Liyofilizatör	LABCONCO FreeZone. 25 plus
Diferansiyel taramalı kalorimetri	DSC 250 TA Instruments Inc.
5 ml tek kullanımlık küvet	Sartorius stedim Biotech
Dinamik Işık Tarama Modeli	Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments
96 kuyucuklu düz tabanlı polistiren doku kültürü plakaları	
4T1 (ATCC® CRL-2539™) hücre hattı	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>FT-IR</i>	Bruker alpha

**Tablo.3.1** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

##### 3.1.2 Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan katı ve sıvı kimyasal maddeler aşağıda belirtilmiştir.

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Marka</b>
Poli (D,L-laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) (50:50, mol wt 30,000-60,00); FITC işaretli PLGA Epigallokateşin	Sigma-Aldrich  PHOSPHOREX 25221 Chem Faces, No.:CFN97549
Copper (II) Sulfate Pentahyd	Merck. 102790
Aseton Trizma baz Trikloroasetik asit Sulfirhoradamin B Asetik asit Dimetil sulfoxide (DMSO) Trypsin-EDTA	Merck, T1503- sigma Lot # SLBN7135V Sigma Sigma Sigma-Aldrich Lot # SZBD2130V Sigma Lot #SHBC3313V Gibco-Invitogen, USA, Lot # 1697439
Phosphate Buffered Saline,	Gibco-Invitogen, USA ,Lot#20031084R 20031084R

**Tablo 3.2:** Tez çalışmasında kullanılan katı ve sıvı kimyasal maddeler.

### 3.2 Yöntem

#### 3.2.1 Bitki Yapraklarının Toplanması

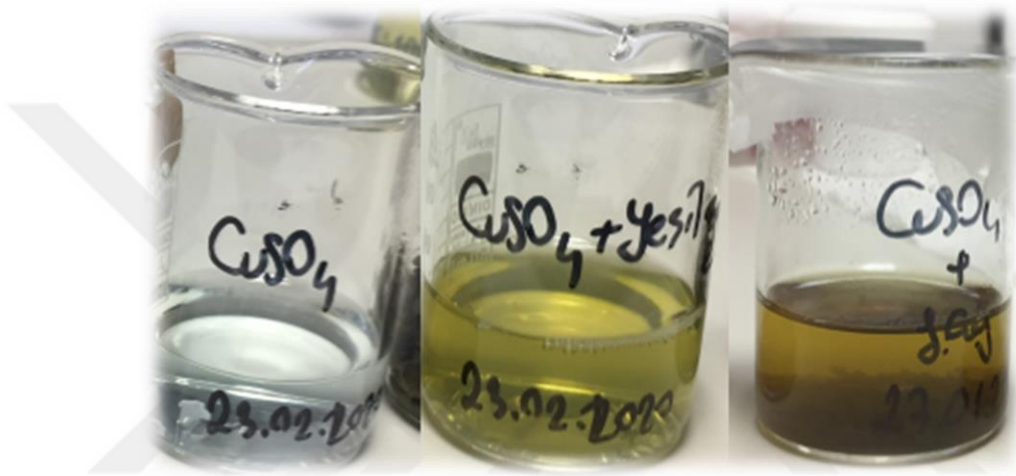
*Camellia sinensis* (yeşil çay) yaprakları, Doğu Karadeniz Bölgesi, Rize'den son sürüm toplama vakti olan Eylül ayı gibi toplanmıştır. Toplanan yapraklar sıkıca paketlenerek ardından laboratuvara aktarılmıştır. Daha sonra iki kez distile su ile yıkanmış ve iki hafta boyunca oda sıcaklığında karanlık halde tutulmuştur. Kurutulan yapraklar, blender kullanılarak toz haline getirilmiştir.

#### 3.2.2 Bitki Yaprığı Ekstraktının Hazırlanması

*Camellia sinensis* yaprağının tozu 5 gr tartılarak 100 ml distile su içerisinde 50° C 'de 20 dakika süreyle kaynatılmıştır. Ekstrakt, Whatmann No1 filtre Kağıdı ile filtre edilir. Süzüntü, daha sonra kullanılmak üzere 4 ° C'nin altında sıkı bir sızdırmaz paket içinde saklanmıştır.

### 3.2.3 Bakır Nanopartiküllerin Sentezi

20 ml *Camellia sinensis* ekstresi reaksiyon için 80ml 1mM CuSO<sub>4</sub> karışıma eklenmiştir. Blank, 20ml *Camellia sinensis* ekstresine 80ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır (Şekil.3.1). Cu<sup>+</sup> indirgenmesi , açık renkten koyu renge doğru renk değişimi ile olmuştur. Gece boyu bekletilen karışım, ertesi gün 10.000 rpm, 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme ile süpernatant çökelek'ten arındırılmıştır. Çökelek nano bakırın kendisidir.



Şekil.3.1 Bakır nanopartiküllerin sentezi açık renkten koyu renge doğru kendini gösterir.

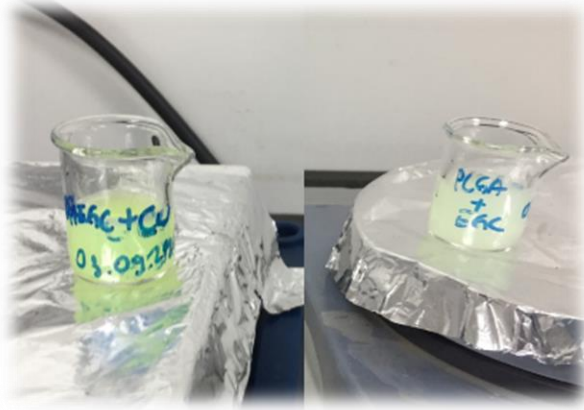
### 3.2.4 FITC İşaretli PLGA nanomisellerin hazırlanması ve Epigallokateşinin yüklenmesi

PLGA nano partikülleri yağ-su emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Kararlı ve tek dağılımlı bir formülasyona yol açabilecek optimize edilmiş epigallokateşin miktarını bulmak için farklı miktarlarda epigallokateşin kullanılmıştır. 50 mg PLGA-2,5 mg FITC ve 15 mg epigallokateşin ayrı ayrı 2,5ml asetonda çözülmüştür. PLGA ve epigallokateşin çözeltileri karıştırılıp, 0,05 ml'lik nano enjektörlerle 19 ml su ve sürfaktan olarak 1 ml 0.05 (v / v) homojenize T80 (polyoxyethylene-polyoxypropylene) (F68; w/v) içeren 20 ml'lik suya damlatılmıştır. Tween 80 kullanım amacı suyun yüzey gerilimini azaltarak sulu ortama verilecek PLGA'nın daha rahat nüfuz etmesini

sağlamaktır. Ayrıca amfifilik özelliğe sahip PLGA'nın açık zincir hâlinde daha uzun süre kalmasına yardımcı olacaktır. Agregat oluşumunu engellemek veya istenilen partikül boyutunu yakalayabilmek için çözeltiyi yavaşça ve küçük hacimli enjektörle eklemek önemlidir. 12 saat (veya daha uzun) aseton tamamen uçuncaya kadar, geniş beherde manyetik karıştırıcıda 250 rpm'de karıştırılmıştır. Bu esnada, aseton içinde moleküler seviyede olan polimerik taşıyıcı, asetonun uçmasıyla sulu ortamda toplanarak kürecik oluşturacak ve moleküler seviyedeki saf bileşiği ve nano bakırı içinde tuzağa düşüreceklerdir. NP'leri içeren sonuç süspansiyon distile su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır ve daha sonraki değerlendirmeler için 25 ° C'de tutulmuştur [139]. Dinamik Işık Saçılması (DLS), birkaç gün içinde çökelmeyi kontrol etmenin yanı sıra çözeltilerde herhangi bir agrega olup olmadığını kontrol etmek için kullanılmıştır.

### 3.2.5 FITC-PLGA- EGC-Nano Cu birleşimi

PLGA-EGC üretimi sırasında nano-Cu, 19 ml su ve sürfaktan olarak 1 ml 0.05 (v / v) homojenize T80 (polyoxyethylene-polyoxypropylene) (F68; w/v) içeren 20 ml'lik suya eklenerek, PLGA-EGC nano-taşıyıcının içinde tuzağa düşerken, Cu nanopartiküllerinin de onlarla birlikte tuzağa düşmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2:** Floresans özellikli FITC yüklü formülasyonlar nanopartiküllerin oluşması için aseton tamamen uçuncaya kadar bir gece boyunca geniş beherde magnetik karıştırıcıda 250 rpm’de karıştırılmıştır.

### 3.2.6 Dondurarak kurutma

Endüstriye bir formülasyon getirilmesi durumunda, malzemenin saklama yöntemini vurgulamak önemlidir. Dondurarak kurutma, malzemeyi dondurarak ve ardından donmuş suyun doğrudan katı fazdan gaz fazına süblimleşmesini sağlamak için çevredeki basıncı düşürerek çalışan bir dehidrasyon işlemidir [140]. Formülasyonlar, gece boyunca vakum altında kurutulmak üzere Liyofilizatora yerleştirilmeden önce gece boyunca  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuştur [141]. Suyu uçurulmuş toz madde edilmesi, DSC, FTIR cihazlarında karakterize edilmesi amacıyla liyofilizatora konulmuştur. Numuneler 0.407 Bar,  $-118\text{F}$  sıcaklığında 24 saat liyofilizatörde kalmıştır. Liyofilize numuneler 4-8 hafta süresince buzdolabında ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) tutulur.

### 3.2.7 Dinamik ışık saçılımı kullanarak formülasyonun karakterizasyonu

#### 3.2.7.1 Dinamik ışık dağılımı (DLS) boyutu

Dinamik ışık saçılımı, partiküllerin boyutu, şekli ve esnekliği hakkında bilgi sağlamanın yanı sıra, partikül ve çevresi arasındaki etkileşimler hakkında fikir verir [140]. Nanopartiküllerin partikül boyutu tek kullanımlık küvetle lazer saçan ışıkla Zetasizer Nano ZSP'yi kullanarak ölçülmüştür. (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Birleşik Krallık) Ölçüm yöntemi olarak belirli standartlar girilmektedir. Numunenin türü polimer, her bir küvet için  $25^{\circ}\text{C}$ 'de, 5 okuma 3'er dakika şeklindedir.



### **3.2.8 Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) kullanılarak formülasyonun karakterizasyonu**

DSC, bir numunenin ve referansın sıcaklığını artırmak için gereken ısı miktarındaki farkın sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü termoanalitik bir tekniktir. Hem numune hem de referans, deney boyunca neredeyse aynı sıcaklıkta tutulur. Genel olarak, bir DSC analizi için sıcaklık programı, numune tutucu sıcaklığı zamanın bir fonksiyonu olarak doğrusal olarak artacak şekilde tasarlanmıştır. Referans numune, taranacak sıcaklık aralığı üzerinde iyi tanımlanmış bir ısı kapasitesine sahip olmalıdır. DSC, biyomakromoleküllerin termodinamik özelliklerini incelemek için sağlam bir teknik olarak bilinir. Proteinler, polinükleotidler ve lipid düzeneklerinde açılma veya faz geçişlerini izleme yeteneği, yalnızca bu önemli moleküller için termodinamik stabilite hakkında veri sağlamaz, aynı zamanda açılma süreçlerinin ayrıntılarını incelemeyi ve biyopolimerlerin erimesine dahil olan ara durumların özelliklerini analiz etmeyi mümkün kılmıştır [142]. En iyi şekilde, nanopartikül bileşenlerinin ilişkisinin incelenmesi sulu sistemde misel formunda yapılmalıdır. Bununla birlikte, PBS tuzları ve en önemlisi suyun kendisi de dahil olmak üzere sistem bileşenleri, toplam sistem kütlesinin çok yüksek bir oranını kaplar ve ilaç ve taşıyıcı miktarını nispeten düşük bırakır. Bu yüzden sulu sistemde önemli ve iyi pikler gözlemlemek zordur. Bu zorluğun üstesinden gelmek ve liyofilizasyondan sonra formülasyonun stabil olduğu gösterildiğinden, liyofilize formülasyonların, ilaçsız formülasyonların ve diğer bileşenlerin DSC'si, 5°C / dakika hızında DSC 250 TA tipi diferansiyel taramalı kalorimetre düşük dinamik nitrojen (20 ml / dakika) kullanılarak ölçülmüştür .

### **3.2.9 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak formülasyonun karakterizasyonu**

PLGA, nano bakır ve epigallokateşin etkileşimlerinin belirlenmesi için FTIR çalışması yapılmıştır. Epigallokateşin içeren ve içermeyen her bileşenin ve formülasyonun IR spektrumları elde edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Örnekler direkt eklenmiş ve ölçümler oda sıcaklığında 400 ile 4000 cm<sup>-1</sup> arasında 25 tarama ile yapılmıştır. Kızılötesi (IR) spektroskopisi, organik veya inorganik bileşiklerin karakterize edilmesinde kullanılan bir araçtır [143]. IR spektrumu, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslara karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin parmak izini göstermektedir [144]. Her maddenin kendine has bir spektrumu vardır. Bunun tek

istisnası optik izomerlerdir. Organik madde spektrumlarının özellikle de  $2000\text{ cm}^{-1}$  den sonra gelen kısmı daha ayrıntılıdır. Bu bölgeye parmak izi bölgesi denir ve spektrumu iki kat genişleterek alınır. Böylece madde hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edilmektedir. Veri, farklı moleküler bağlardan kaynaklanan farklı titreşim frekanslarını temsil eder. Yüzey alanı nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin çok büyük bir rol oynadığı ve ayrıntılı olarak anlaşılması gerektiği anlamına gelir. Nanopartiküllerin teknolojideki potansiyelini artırmak istiyorsak bu önemlidir. Buna ek olarak, nanopartikül yüzeyinin işlevselleştirilmesi ve kontrol edilmesi de önemlidir çünkü bu, araştırmacıların özelliklerini belirli uygulamalar için özelleştirmelerine olanak tanır. Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, bir dizi avantaj sağlayan bir yöntemdir. FT-IR spektroskopisi, ilgili kimyasal bağların titreşim frekanslarını ölçerek, sistemde bulunan farklı fonksiyonel gruplara ilişkin değerli bilgiler sağlar. FTIR, fonksiyonel grupların nanopartiküller üzerindeki yüzey adsorpsiyonunu araştırmak için arayüzlerin yerinde analizini sağlar [145]. Moleküllerin titreşim uyarma enerjisi, kızılötesi radyasyona karşılık gelen  $10^{-13}$ – $10^{-14}$  Hz aralığındadır [146]. Bu, IR spektroskopisinin nanopartikül yüzeylerine uyum sağlamış, kendiliğinden birleşmiş fonksiyonel grupların titreşim geçişlerini gözlemlemek için kullanılabilmesi ve hem nicel hem de nitel analizlerin gerçekleştirilebileceği anlamına gelir. Kullanıcılar bu teknikle elde edilen moleküler verilerle, nanopartiküllerin yüzeyinde kendi kendine bir araya gelen düzenleyici fonksiyonel grupların yapısal ve konformasyonel değişiklikleri saptamalarını sağlar. FTIR spektroskopisi, UV-Vis ve NMR spektroskopisine çok iyi bir tamamlayıcı olarak hizmet edebilir ve çoğu analitik yöntem gibi, diğer tekniklerle birleştirildiğinde en iyi sonucu verir.

### **3.2.10 Nanopartiküllerin 4T-1 üzerindeki antikanser etkisinin araştırılması**

Bu deneyde, epigallokateşin (EGC), nano bakır (Cu), PLGA, PLGA-EGC, PLGA-EGC-Cu, nanopartikülleri 4T-1 insan meme kanseri hücre hattına karşı antikanser aktivitesi incelenmiştir. 4T1, BALB / c fare suşunun meme bezi dokusundan türetilen bir meme kanseri hücre soyudur [158]. 4T1 hücreleri epitelyaldır ve 6-tyoguanine dirençlidir [158]. Klinik öncesi araştırmalarda, 4T1 hücreleri akciğer, karaciğer, lenf düğümleri, beyin ve kemiğe metastaz yapabildikleri için meme kanseri metastazını

incelemek için kullanılmıştır [159]. Hücrelerin canlı dokularda oldukça agresif olduğu bilinmektedir [160].

### **3.2.10.1 Hücre Hazırlama**

Hücreler çözünmesi için 37° C'de su banyosuna yerleştirilmiştir. Çözündükten sonra içerik, 5 ml taze medium içeren steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Hücreler, toksik DMSO'yu uzaklaştırmak için santrifüjlenmiştir. Hücreler, santrifüjlemeden sonra taze ortamda süspansiyon edilmiştir. Hücreler,% 60-70 oranında büyütülüp, bu noktada ortam değiştirilerek hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra iki kez PBS (10-20 mi) ile yıkanmıştır. Daha sonra 2 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 37° C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler, ayrıldıklarında çözelti içinde yuvarlak ve yüzer görünüm almışlardır. Tek bir hücre süspansiyonu elde edildiğinde, ortam hacmi olarak 10 kat tripsin eklenmiştir. Hücre süspansiyonu, steril bir 15 ml konik santrifüj tüpüne aktararak, hücreler, oda sıcaklığında santrifüjde 1500 rpm'de 5 dakika süreyle döndürülmüştür. Süpernatant atılmış ve pellet alınmıştır. Hücreler, 1 ml taze ortam içinde yeniden süspansiyon edilmiş ve vortekslenmiştir. Bir hemositometre kullanılarak hücre sayısını saymak için vortekslenmiş hücre çözeltisinden 15 ul alınmıştır. Hücre konsantrasyonu, 90 ul medium içinde 1x10<sup>4</sup> hücrelik konsantrasyonuna ayarlanmıştır.

### **3.2.10.2 Hücre kültürü**

96 kuyucuklu plakalara 90 ul ortam uygulanmıştır. Optimize edilmiş formülasyon ve seyreltilmiş formları hazırlanmıştır. Çözeltilerin seyreltilmesi, dört ardışık çözeltide konsantrasyon %50 azaltılarak gerçekleştirilmiştir. Paklitaksel en yüksek konsantrasyonlarında kontrol olarak kullanılmıştır. Ölçümler 24, 48 ve 72 saatlerde yapılmış ve her biri 3 kez tekrarlanmıştır.

### **3.2.10.3 Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyonunun (IC50) Belirlenmesi**

Tüm numuneler 96 kuyucuklu plakalarda üçlü tekrar şeklinde 10 ul uygulanmış ve 90 ul 4T-1 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler, 100µl / kuyucuk soğuk % 20 (w / v) trikloroasetik asit ilave edilerek sabitlenmiş, 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süpernatant çıkarılmış ve kuyucuklar soğuk distile su ile yıkanıp çeker ocakta kurutulmuştur. Hücreler daha sonra % 1 asetik asit içinde % 0.4 (w / v) sülförhodamin B ile her bir kuyucuğa 100 ul konularak boyanmış

ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra fazla boya 5 kez % 1 asetik asit ile yıkanmış ve kuyucuklar çeker ocakta kurutulmuştur. Bağlanmış boya 200 ul / kuyucuk tris bazı (10 mm) ile pH 10'da 5 dakika süreyle çözündürülmüştür. Optik yoğunluk, ELISA kuyucuk okuyucu [187], [188] kullanılarak 515 nm'de ölçülmüştür.

#### **3.2.10.4 Sitotoksosite Taraması için Sulforhodamine B Kolorimetrik Test**

Sulforhodamine B (SRB) deneyi, hücresel protein içeriğinin ölçümüne dayalı olarak hücre yoğunluğunun belirlenmesi için kullanılır. Burada tarif edilen yöntem, bileşiklerin 96 kuyucuklu bir formatta yapışan hücrelere toksisite taraması için optimize edilmiştir. Bir inkübasyon süresinden sonra, hücre % 10 (ağırlık / hacim) trikloroasetik asit ile sabitlenir ve 30 dakika boyanır, ardından fazla boya, tekrar tekrar % 1 (hacim / hacim) asetik asit ile yıkanarak çıkarılır. Proteine bağlı boya, bir mikrolaka okuyucu kullanılarak 510 nm'de optik yoğunluk (OD) belirlemesi için 10 mM Tris baz solüsyonunda çözündürülür. Sonuçlar, 20 kat hücre sayısı aralığında doğrusaldır ve duyarlılık, florometrik yöntemlerle karşılaştırılabilir. Yöntem, yalnızca birkaç gün içinde çok sayıda numunenin test edilmesine izin vermekle kalmaz, aynı zamanda yalnızca basit ekipman ve ucuz reaktifler gerektirir [147].

### **3.2.11 *In vivo* hayvan çalışmaları**

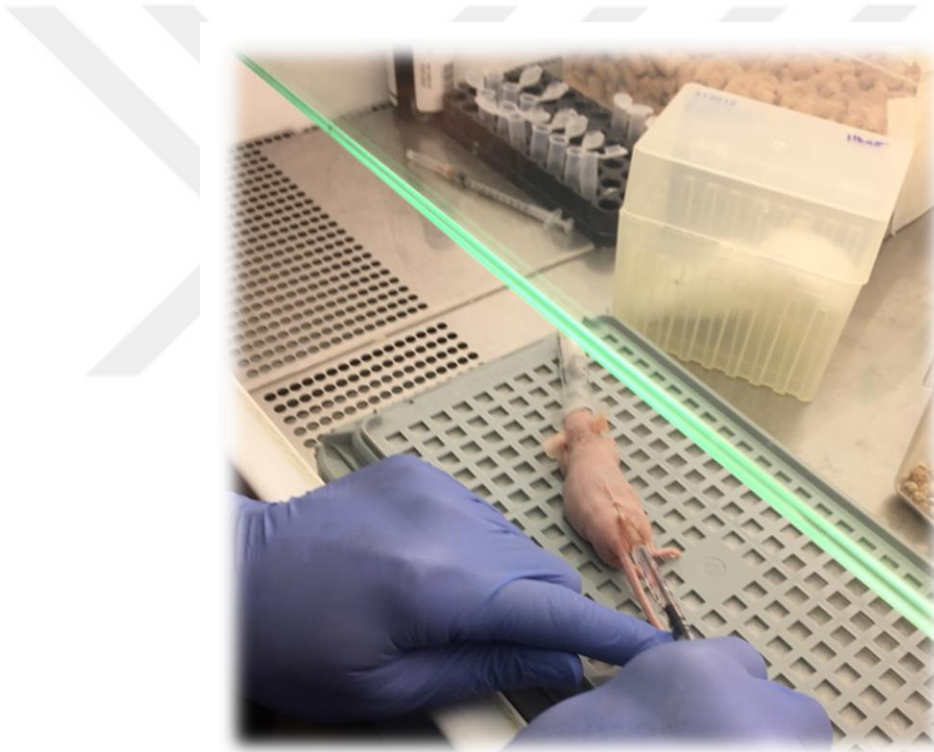
#### **3.2.11.1 Meme kanseri indüksiyonu**

##### **4T-1 Hücre Bakımı ve Enjeksiyona Hazırlık**

4T-1 hücreleri, % 10 ısıyla inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS), 50 birim / mL penisilin ve 50 mg / mL streptomisin ile nemlendirilmiş % 5 CO<sub>2</sub> ortamı altında desteklenen RPMI 1640 kültür ortamında muhafaza edilmiş ve kültürlenmiştir. "Enjeksiyon için hücre süspansiyonlarını hazırlamada, yapışan hücreler önce fosfat tamponlu salin, pH 7.4 (PBS) ile çalkalanmış ve ardından tripsin-etilendiamin tetraasetik asit ile kısaca inkübe edilmiştir (tripsin-EDTA, % 0.25 / % 0.038)" [197]. Hücreler süspansiyon edildikten sonra enzimatik sindirim FBS ile inhibe edilerek, hücreler peletlenmiş ve PBS içinde üç kez yıkanmıştır. Hücreler, daha önce 4T-1 hücreleri için tarif edilen aynı yöntemle sayılarak ve her fareye enjekte edilecek 190 ul PBS içinde 250000 hücre olarak bölünmüştür.

## Hayvan modelleri

Medipol üniversitesinden nude dişi fareler satın alınmıştır. Hayvanlar, yiyecek ve suya serbest erişimle 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüde barındırılmıştır. Tümör modeli yapmak için 7-9 haftalık dişi fareler seçilmiştir. Tüm deney gruplarındaki fareler, 150 ul steril PBS içinde süspansiyon edilmiş 250000 hücre ile aşılanmıştır (Şekil 3.3). 4T-1 hücreler farelerin sağ sırtlarının böbrek üstü hizasına subkutan olarak enjekte edilmiştir. Yaklaşık 3 haftalık bir süre boyunca katı tümörlerin oluşmasına izin verilmiştir. Tümör taşıyan hayvan grupları, teste devam etmek için dört gruba ayrılmıştır; test, tümörleri, pergeller kullanılarak deriden ölçüldüğü üzere, ana eksen boyunca 5-7 mm'lik bir ortalama çapa ulaştığında başlatılmıştır.

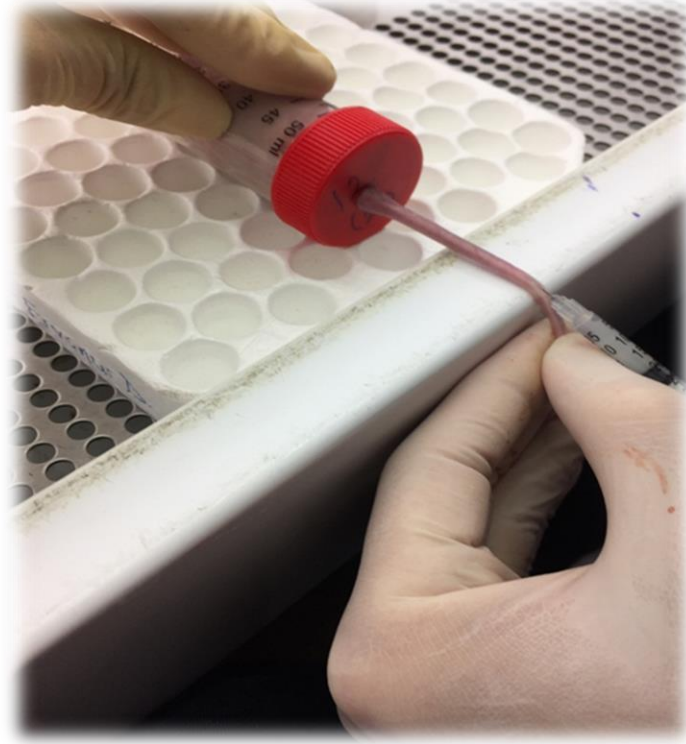


Şekil 3.3 : Hücre enjeksiyonu.

### 3.2.11.2 Meme kanseri fare modeline hedeflenen serbest nano bakır, epigallokateşin yüklü nanopartiküller

Tümör boyutu 5-7 mm'ye ulaştığında, tedaviye, nano Cu, PLGA-EGC ve PLGA-EGC-Cu'ın beş kişilik üç fare grubuna uygulanmasıyla başlanmıştır. Beş fareden oluşan başka bir grup, tedavi olmaksızın kontrol grubu olarak tutulmuştur. Kuyruk veninden

uygulanan enjeksiyon miktarı her formülasyondan 190 ul idi (Şekil 3.3). Tümörlerin boyutu iki hafta içinde gün aşırı ölçüldü.



**Şekil 3.4:** Formülasyonun kuyruk enjeksiyonu.

### **3.2.11.3 *In Vivo* Görüntüleme**

Görüntüleme, Haziran 2015 Living Image® 4.5.1 Software ile PerkinElmer tarafından donatılmış IVIS® Spectrum kullanılarak yapılmıştır. Görüntüleme düzeneği, 150 W halojen lamba ile donatılmış, ışık geçirmez bir kutudan oluşmaktadır.

### **3.2.12 Biyokimyasal analizler**

*In vivo* sonlandırılmasıyla lityum heparinli tüpe alınan hayvan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra plazmalarına ayrılmıştır. Plazma örneklerinden karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite ölçülmüştür.

#### **3.2.12.1 Total antioksidan kapasite (TAS) ölçümü**

Formülasyonların plazma total antioksidan kapasite düzeyleri, Erel (2004) tarafından geliştirilen yöntem ile çalışılmıştır. Testin prensibi ABTS- radikalinin oluşturduğu

mavi-yeşil rengin ortama ilave edilen örnekteki antioksidanlar ile azalması esasına dayanmaktadır. ABTS (2,2'-azinobis-3-thylenbenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS-radikalini oluşturmak üzere bir peroksidaz olan metmiyoglobin (HX-Fe<sup>2+</sup>) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilmiştir. Oluşan ferrilmiyoglobin ABTS ile ABTS-radikalini oluşturmak üzere reaksiyona girer. ABTS-radikali kısmen stabil, mavi-yeşil renktedir. İlave edilen örnekteki antioksidanların oranına göre renk oluşumu inhibe olur. Bu renk değişimi Varioskan Multimode Reader (Thermoscientific) ile 600 nm'lik dalga boyunda ölçülmüştür. TAS hesaplanmasında bir anti-oksidan olan Vitamin C (askorbik asit) standart olarak kullanılmıştır.

### **3.2.12.2 Total oksidan kapasite (TOS) ölçümü**

Formülasyonların plazma total oksidan düzeyleri (TOS) Erel (2005) tarafından geliştirilen yöntem ile belirlenmiştir. Test, asidik ortamda çeşitli oksidan türlerin varlığında demir iyonunun demir iyonuna oksidasyonuna ve demir iyonunun ksilenol turuncu ile ölçülmesine dayanır. Bu yöntemde, oksidanlar demir-o-dianisidin kompleksini demir iyonuna oksitler. Üretilen ferrik iyon, renkli bir ksilenol turuncu-ferrik iyon kompleksi yapar. Renk yoğunluğu, numunenin oksidan miktarı ile ilişkili olacaktır. Bu renk değişimi Varioskan Multimode Reader (Thermoscientific) ile 530 nm'lik dalga boyunda ölçülmüştür. TOS hesaplanmasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standart olarak kullanılmıştır.

### **3.2.12.3 Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri**

Alınan serum örnekleri biyokimya otoanalizörlerinde çalışılmıştır. Karaciğer fonksiyon testlerinden alanin aminotransferaz (ALT), aspartataminotransferaz (AST); böbrek fonksiyon testlerinde ise, üre, kreatinin değerleri ölçülmüştür [148].

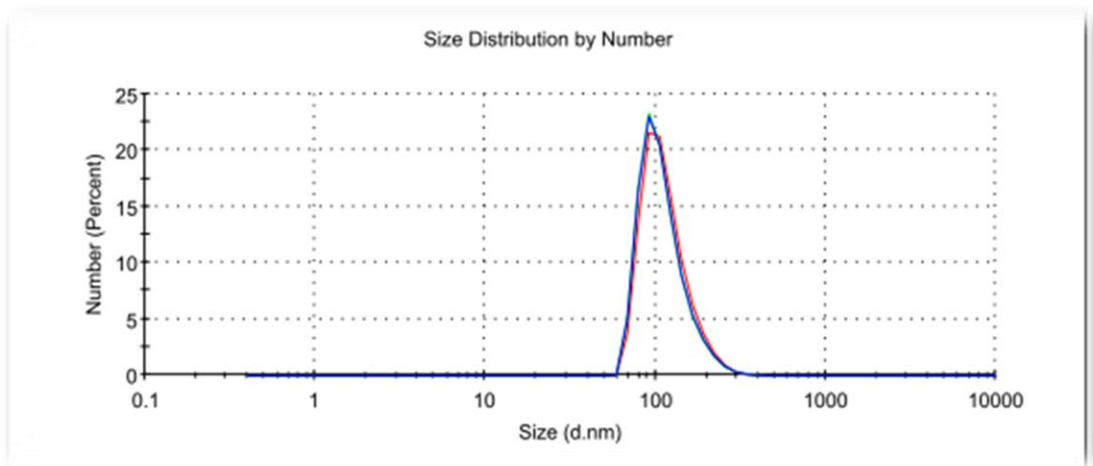
## 4. BULGULAR

### 4.1. Hazırlanan serbest nano bakır, epigallokateşin-PLGA, epigallokateşin-nano bakır yüklü PLGA nanopartiküllerinin DLS Sonuçları

Genel hedeflerimiz, epigallokateşin ve nano bakır yüklü miselleri hazırlamak, karakterize etmek, *in vitro* ve fare modellerinde 4T-1 hücrelerine karşı biyokimyasal olarak değerlendirmektir. NP'lerin hedefi intravenöz bir formülasyon olarak kullanılması, bu nedenle optimize edilmiş formülasyonun tamamen monodispers olması ve enjekte edilebilir NP'ler için kabul edilen bir boyut olması gerekir. Parçacık boyutu, *in vivo* NP'lerin kaderini belirleyen ana parametredir. Malvern Zetasizer Nano ZSP ile hacim, sayı ve saçılma yoğunluğu ile ilgili çeşitli bulgular elde edilmiştir. "Sayı dağılımı, farklı boyuttaki kaplardaki partikül sayısını ortaya çıkarır. Hacim dağılımı, farklı boyutlu kaplardaki toplam partikül hacmini gösterir. Yoğunluk dağılımı, farklı boyuttaki kaplardaki parçacıklar tarafından ne kadar ışık saçıldığını tanımlar" [149].

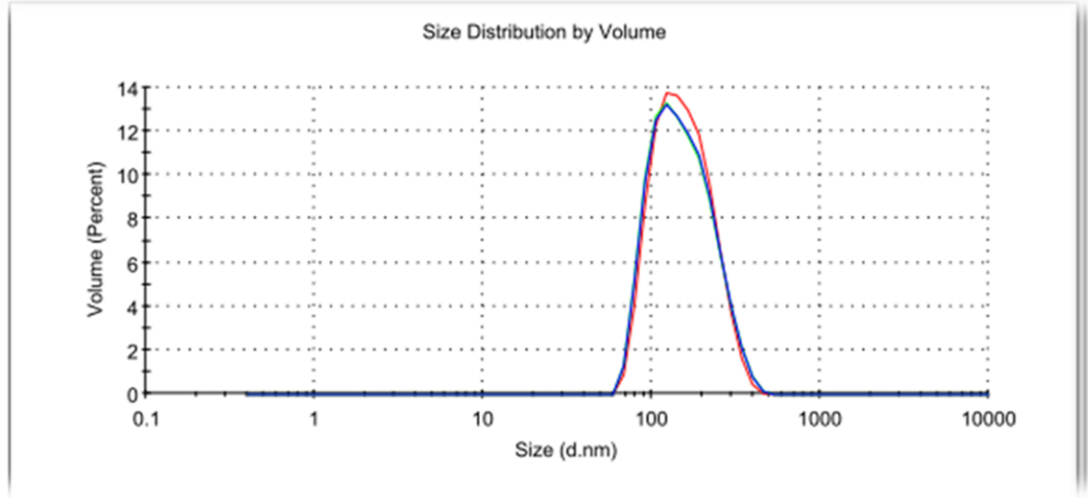
İlk aşamada 7 mg epigallokateşin, 50 mg PLGA'ya yüklenmiştir. DLS sonucunun (Şekil.4.1.a,b,c) gösterdiği gibi, nanopartikülün sayıya göre boyutu 111,9 nm'de mükemmeldir. Hacimce boyut dağılımı, partiküllerin % 100'nün 160.9 nm, yoğunluğa göre boyut dağılımında, 173.5 nm olduğudur.

#### a) Sayıya göre boyut dağılımı

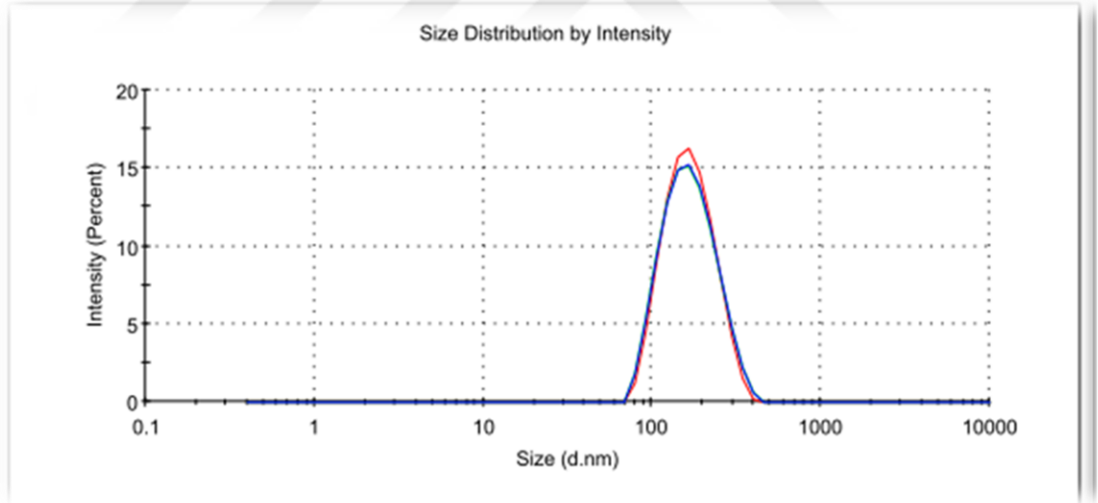


#### b) Hacime göre boyut dağılımı





c) Yoğunluğa göre boyut dağılımı

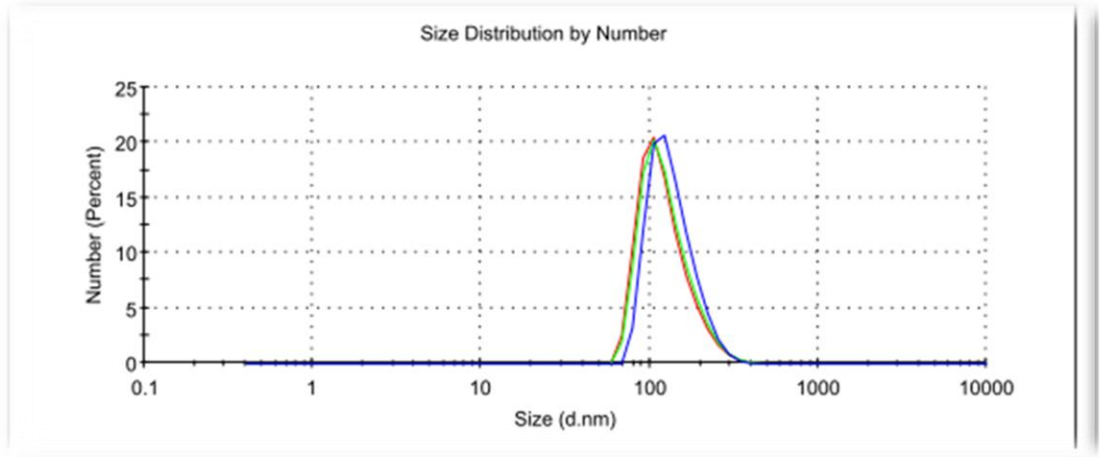


**Şekil.4.1** 7 mg epigallokateşin PLGA-EGC-Cu DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu

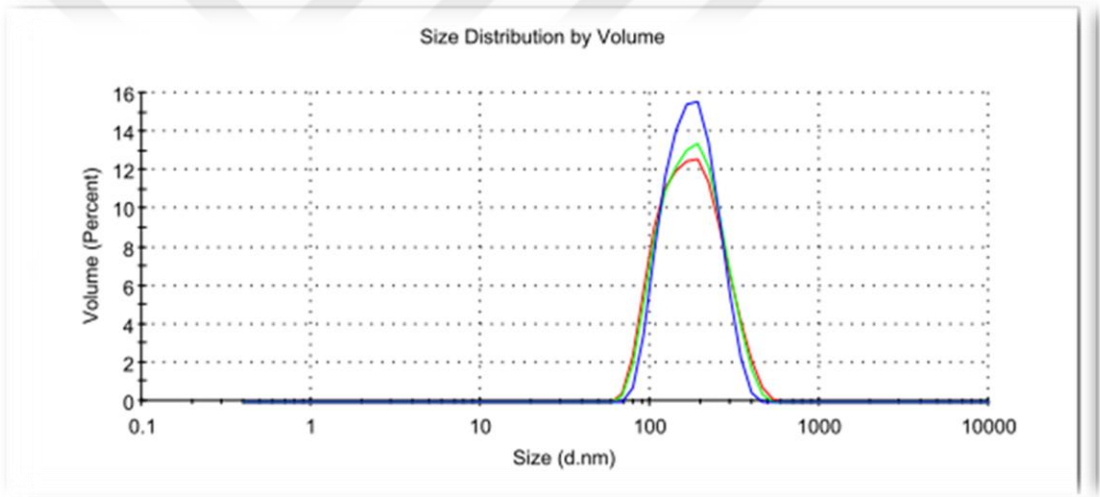
Nano taşıyıcının ilaç taşıma kapasitesini gözlemlemek aynı zamanda tedavide çıkabileceğimiz en yüksek dozu optimize etmek amaçları arasındaydı. Bu nedenle bir sonraki adımda, yüklenen epigallokateşin ilaç miktarı 15 mg' a çıkarılmıştır.

Sayı, hacim ve yoğunluğa göre boyut dağılımı, sırasıyla 136.9 nm, 181.1 nm, 186.3 nm'de monodispers (% 100) bir pik göstermiştir (şekil 4.2. a,b,c).

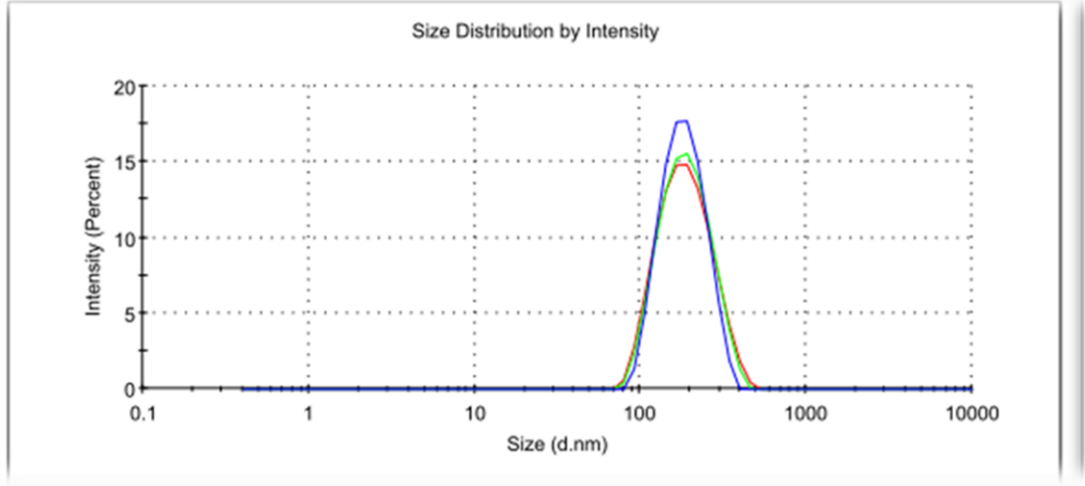
a) Sayıya göre boyut dağılımı



b) Hacime göre boyut dağılımı



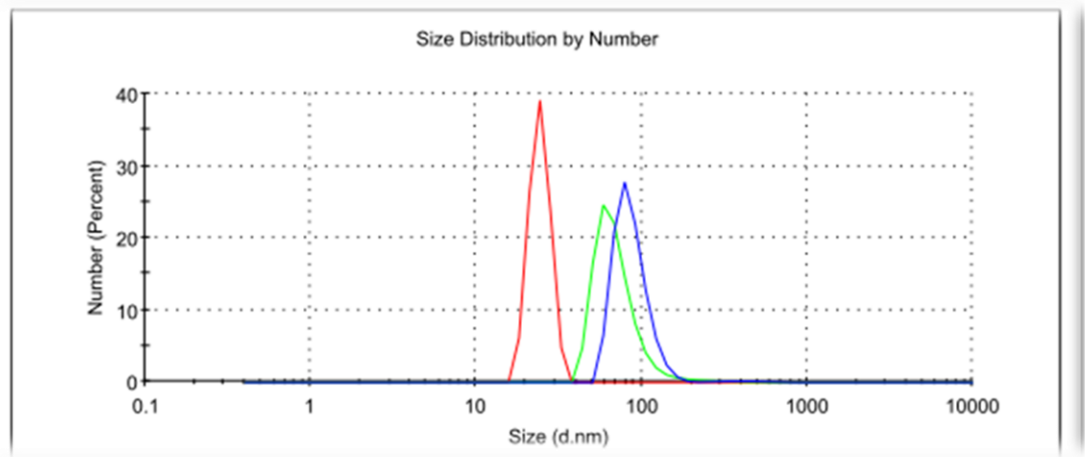
c) Yoğunluğa göre boyut dağılımı



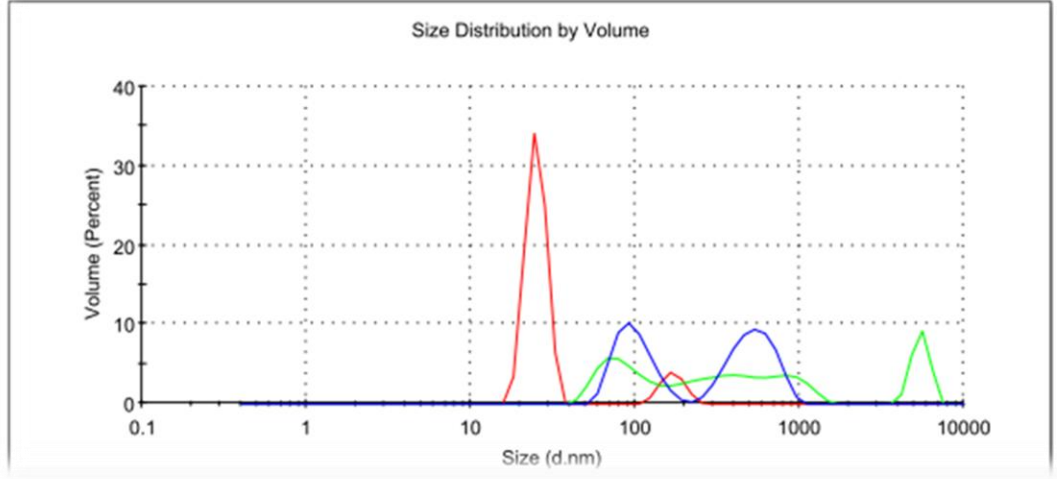
**Şekil 4.2:** 15 mg epigallocateşin FITC-PLGA-EGC-Cu DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu

Bir sonraki formülasyon, 20 ml *Camellia sinensis* ekstresi reaksiyon için 80ml 1mM CuSO<sub>4</sub> karışıma eklenmiş, yeşil kimya yöntemiyle elde edilmiş indirgenmiş serbest nano bakır partikülleridir. Sayıca dağılım % 99.1 'de 86.54 nm, hacimce dağılım % 46.6 'da 100.7 nm iken yoğunluk dağılımı % 40.9 ' da 111.5 nm boyutlarındadır (Şekil 4.3).

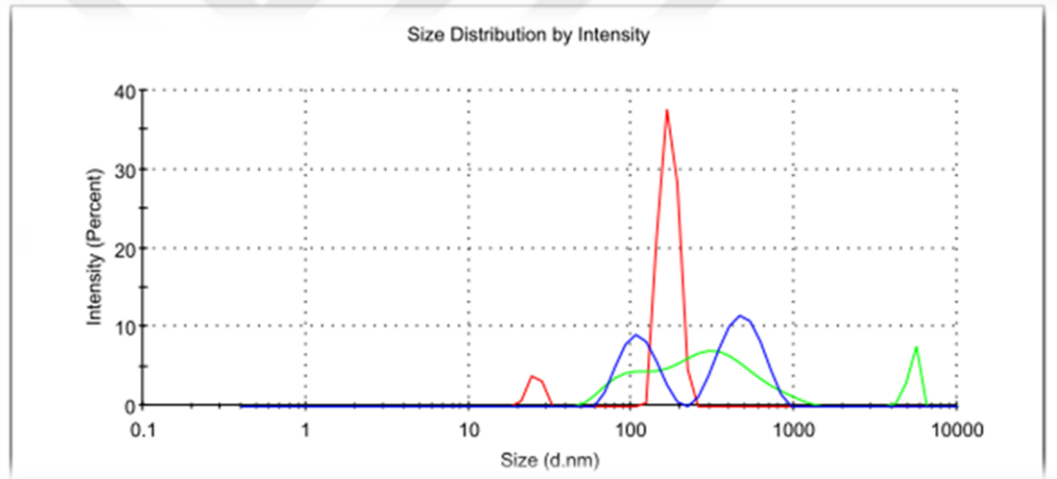
a) Sayıya göre boyut dağılımı



b) Hacme göre boyut dağılımı



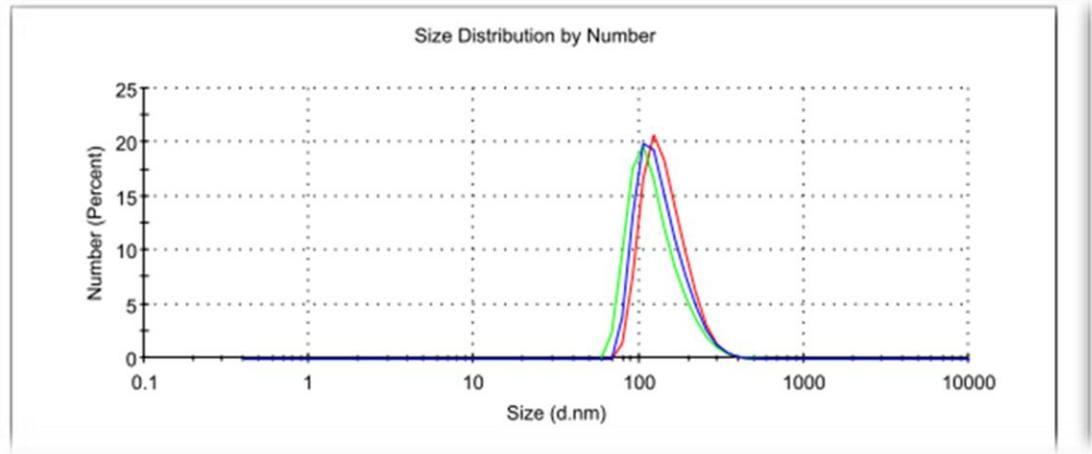
c) Yoğunluğa göre boyut dağılımı



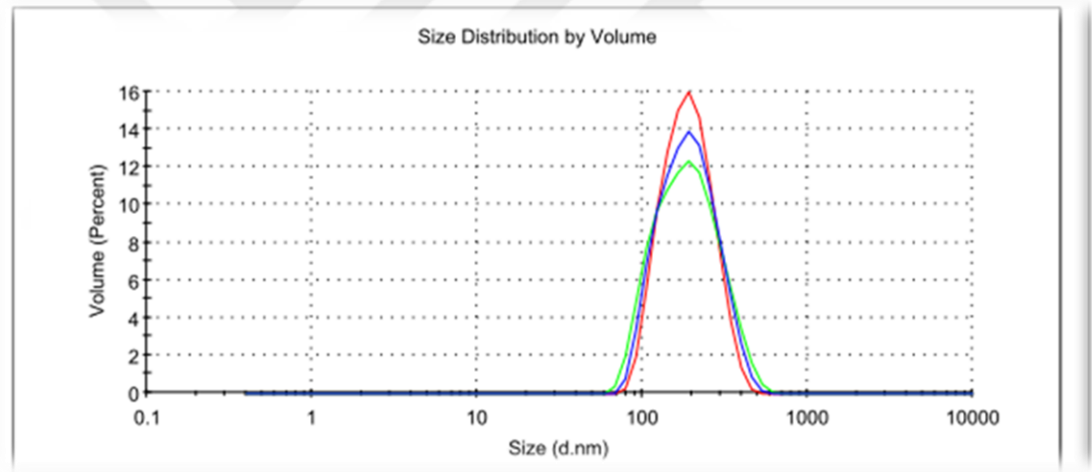
**Şekil 4.3:** Nano Cu<sup>2+</sup>'in DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu

Bir sonraki formülasyon, optimize edilmiş ilaç miktarına dönüşen 15 mg epigallokateşin 50 mg PLGA içermektedir. Tüm boyut dağılımlarında tamamen tek tip pikler (% 100) göstermiştir (Şekil 4.4). Sayı, hacim ve yoğunluk pikleri sırasıyla 138.6 nm, 200.3 nm ve 204.5 nm şeklindedir.

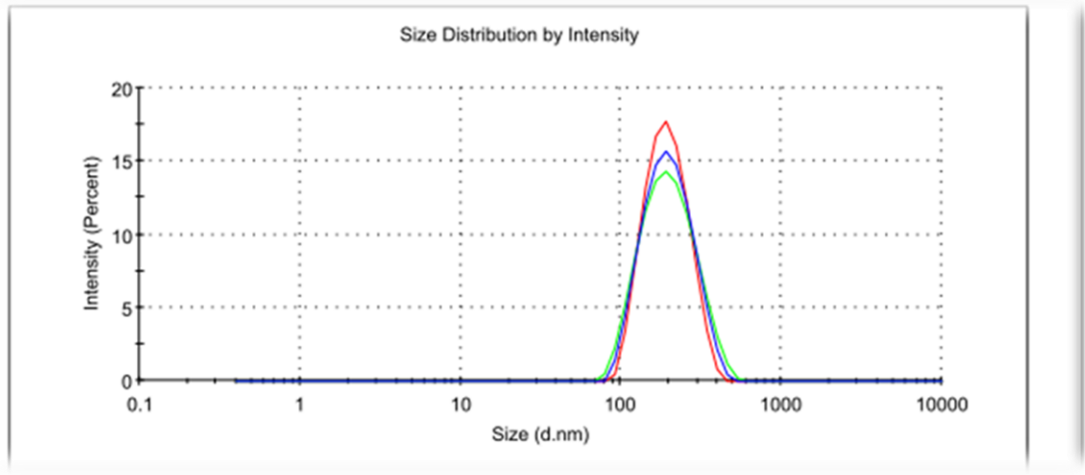
a) Sayıya göre boyut dağılımı



b) Hacme göre boyut dağılımı



c) Yoğunluğa göre boyut dağılımı



**Şekil 4.4:** 15 mg PLGA- EGC DLS sonuçları a) boyut dağılım sayısı, b) boyut dağılım hacmi ve c) boyut dağılım yoğunluğu

Parçacık boyutu, parçacıkların dağılım, yuvarlanma, bağlanma ve diğer sistemlerle olan etkileşiminde rol oynayan önemli bir faktördür [198]. Ek olarak, partikül boyutu NP'lerin yapışmasını ve birikmelerini ve fagositozunu etkiler.

#### **4.2 Dondurarak kurutma**

Liyofilizasyon veya kriyodezikasyon olarak da bilinen dondurarak kurutma, ürünün dondurulmasını, basıncın düşürülmesini ve ardından süblimasyon yoluyla buzun çıkarılmasını içeren düşük sıcaklıkta bir dehidrasyon işlemidir . İşlemden kullanılan düşük sıcaklık nedeniyle rehidre edilen ürünün kalitesi mükemmeldir ve ürünün orijinal şekli korunur [150]. Dondurarak kurutmanın birincil uygulamaları arasında biyolojik (örn., Bakteriler ve mayalar), biyomedikal (örn., Cerrahi transplantlar), gıda işleme (örn., Kahve) ve koruma yer alır.

Formülasyonlar, vakum altında gece boyunca kurutma için liyofilizöre yerleştirilmeden önce gece boyunca  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuştur. Şekil 4.5, liyofilize formülasyonun fiziksel görünümünü göstermektedir.



**Şekil 4.5** Liyofilize formülasyonlar

### **4.3 Diferansiyel tarama kalorimetrisi sonuçları**

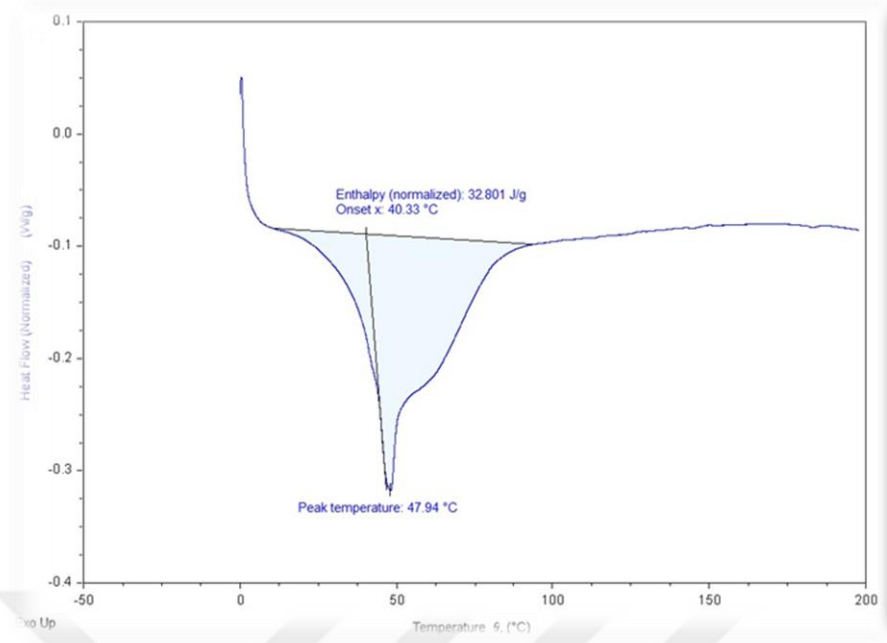
Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), ekli ve ekli olmayan ilaç molekülleri ile çift katmanlı fosfolipidlerin faz geçişlerini incelemek için kullanılır. Burada bu yöntem, epigallokateşin ve nano bakırın, PLGA taşıyıcılarına dahil edilmesini göstermek için kullanılır.

Sulu ortamda buluna PLGA, nano bakır, PLGA-EGC, PLGA-EGC-Cu nanopartikülleri önceden tanımlanmış dondurarak kurutma prosedürü ile hazırlanmış, DSC analizi için hazır hale getirilmiş ve termogramları elde edilmiştir.

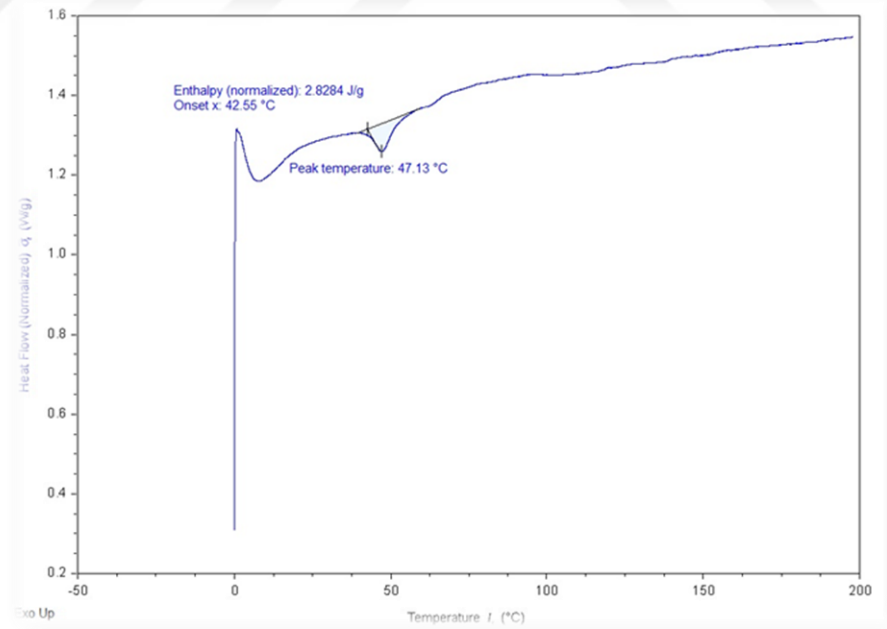
PLGA, 47.94° C'de bir erime sıcaklığı göstermiştir (Şekil 4.6). Bununla birlikte, PLGA-EGC'nin misel oluşumu ve liyofilizasyondan sonra erime termogramı kaybolmuş gibi görünmektedir. Muhtemelen, EGC PLGA'nın yapısını bozmuş, etrafında dağılmış olmalı ki, yeni yapı amorf bir hale gelerek herhangi bir pik vermemiştir (Şekil 4.7).

PLGA nano bakır ile konjuge edildiğinde bu erime sıcaklığı 50.11 ° C'ye yükselmiştir (Şekil 4.8). EGC nin bozduğu PLGA yapısı, bakırın sisteme girişiyle stabilite kazanmıştır. Demek oluyor ki bakır nano taşıyıcının merkezine doğru yerleşmiştir .

PLGA-EGC-Cu 69.95° C'de bir erime sıcaklığı göstermiştir (Şekil 4.9).

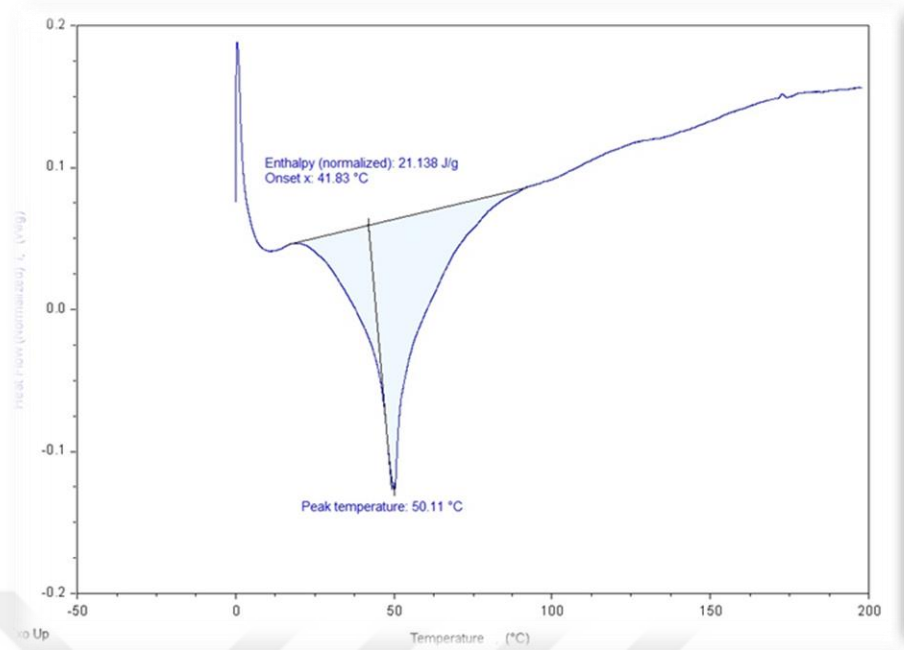


Şekil 4.6: PLGA termogramı.

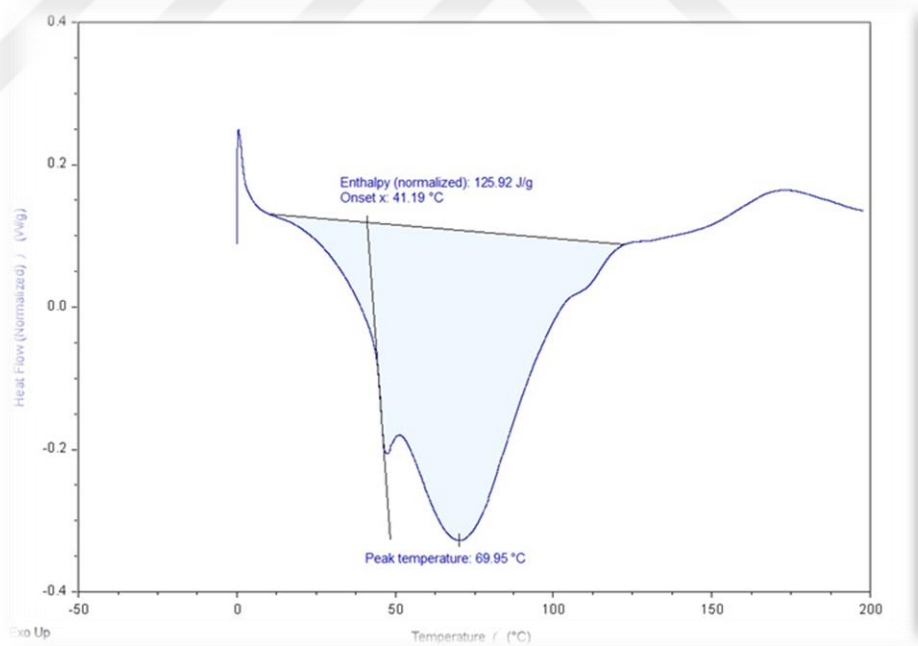


Şekil 4.7: PLGA-EGC termogramı.





Şekil 4.8 : PLGA-Cu termogramı.

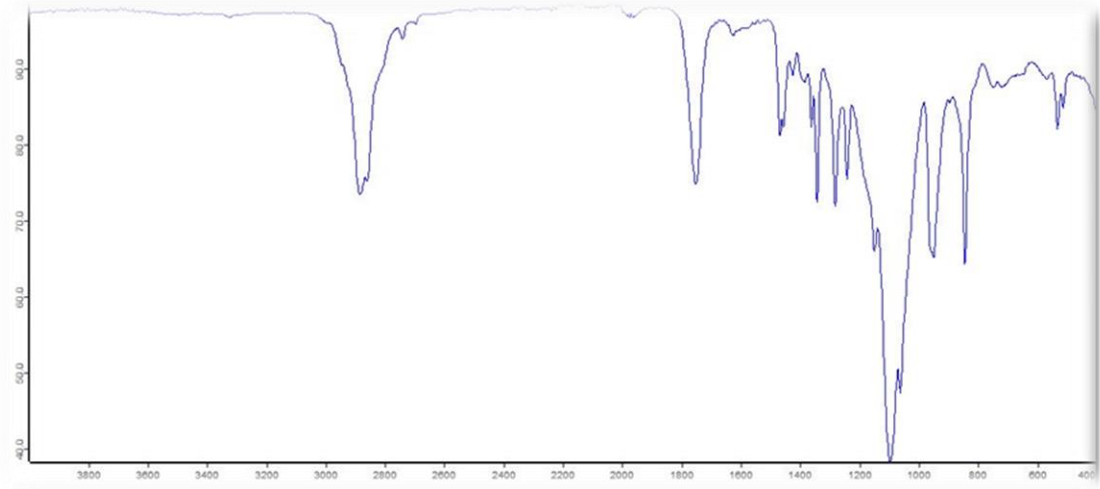


Şekil 4.9: PLGA-EGC-Cu termogramı.

#### 4.4 FT-IR sonuçları

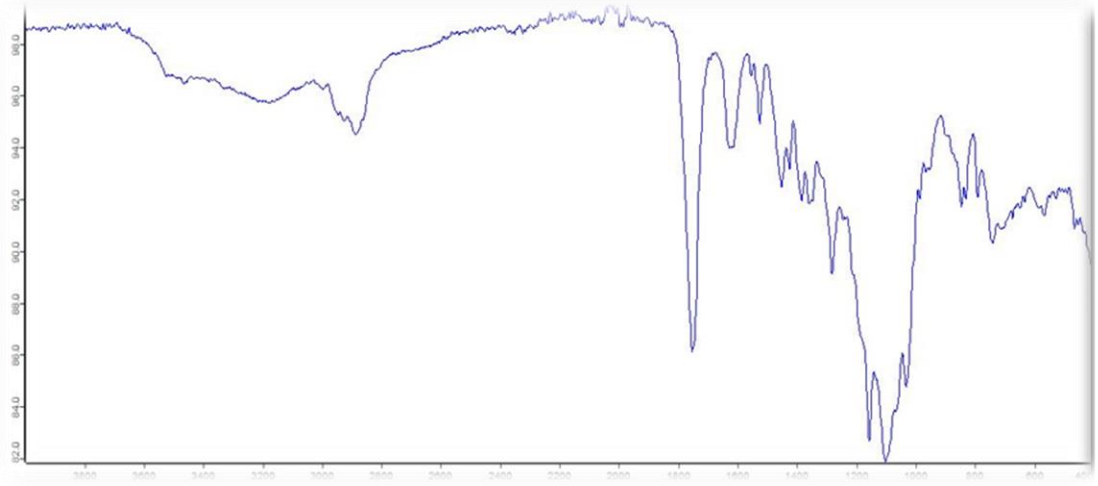
Sentezlenen formülasyonun ve bileşenlerinin IR karakterizasyonu için bir Alpha platinum ATR cihazı kullanılmıştır.

Serbest PLGA nanopartikülleri için FTIR spektrumu (Şekil 4.10),  $-CH_3$  gerilimi ( $1375\text{ cm}^{-1}$ ),  $-CH_2$  gerilimi  $1450\text{ cm}^{-1}$ , karbonil  $-C=O$  gerilimi ( $1745\text{ cm}^{-1}$ ),  $C-O$  gerilimi ( $1083-1165\text{ cm}^{-1}$ ) ve  $-OH$  gerilimi ( $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ ) şeklinde polimerin karakteristik bantlarını göstermektedir [151].



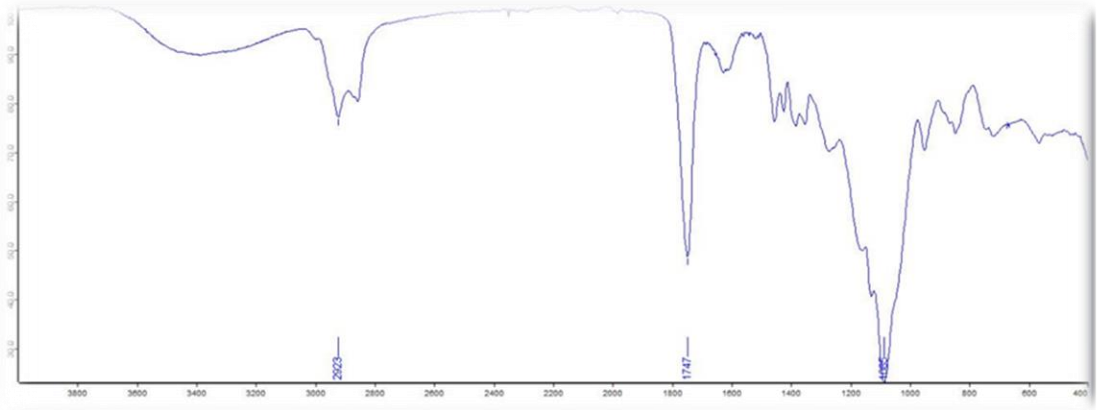
Şekil 4.10 : PLGA IR spektrumu.

Saf epigallokateşin için FTIR spektrumu (Şekil 4.11),  $-C=O$  gerilimi ( $1691\text{ cm}^{-1}$ ),  $O-H$  gerilimi ( $3482\text{ cm}^{-1}$  ve  $3357\text{ cm}^{-1}$ ) karakteristik bantları sergilenmiştir. Aromatik halka için karakteristik pikler ( $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ ) şeklindedir.  $1348\text{ cm}^{-1}$ ,  $1222\text{ cm}^{-1}$   $O-C=O$  gerilimi,  $1148\text{ cm}^{-1}$  ve  $1097\text{ cm}^{-1}$   $O-H$  eğilimi,  $1041\text{ cm}^{-1}$   $C-O-C$  eğilimi,  $853.35\text{ cm}^{-1}$ ,  $825.38\text{ cm}^{-1}$  aromatik  $C-H$  gruplarını göstermektedir.



**Şekil 4.11:** Saf EGC IR spektrumu.

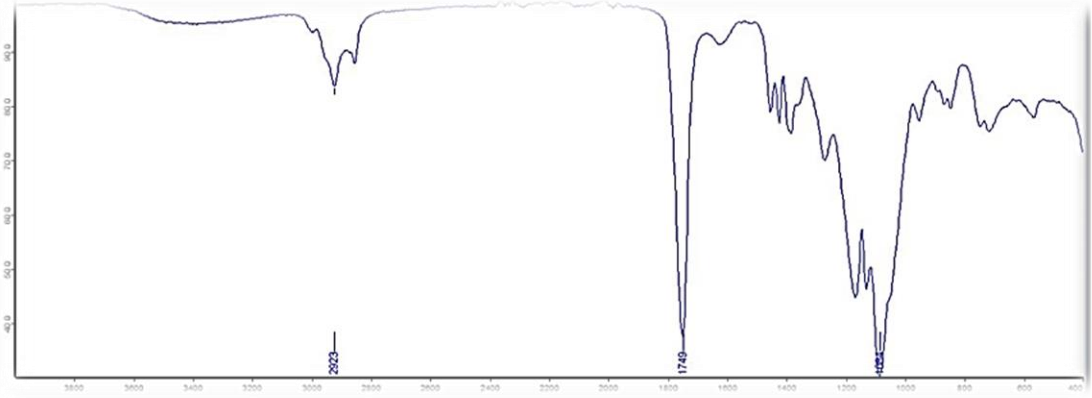
Sentezlenmiş bakır NP'ler için FTIR ölçümleri, indirgeme ve kapatma ajanları olarak işlev gören olası biyomoleküllerin belirlenmesine yardımcı olan şekil 4.12' de verilmiştir. Nano bakır için FTIR spektrumu (şekil 4.12), saf epigallokateşin FTIR spektrumu ile oldukça benzerdir. Nano bakır, yeşil kimya yöntemiyle yeşil çay tarafından indirgendiğinden, bu benzerlik bakırın etrafının fenolik bileşikler tarafından sarıldığıının aslında bir ispatıdır.



**Şekil 4.12:** Nano Cu IR spektrumu.

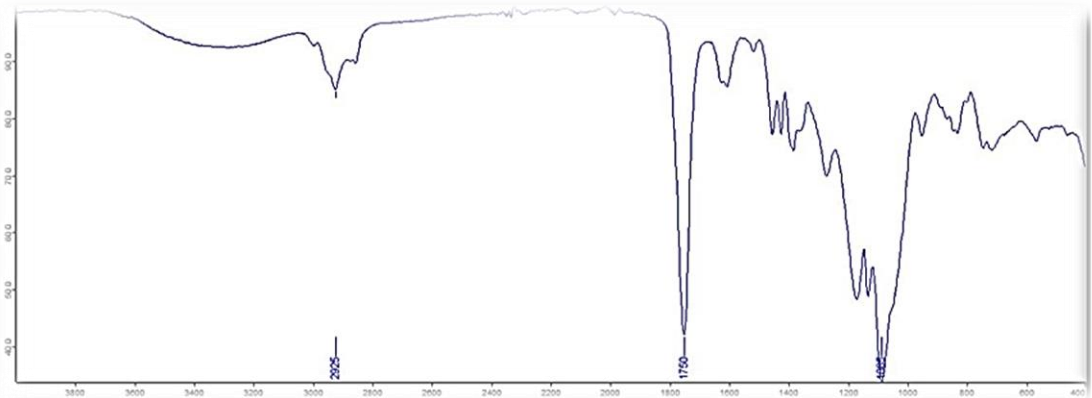
PLGA-Cu nanopartikülleri için FTIR spektrumundaki ilk pik (Şekil 4.13), CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub> gerilimi 1375-1450 cm<sup>-1</sup> bandına karşılık gelmektedir. Ancak bu pik, serbest PLGA

nanopartikülleri spektrumunun ilk piki (Şekil.4.10) ile karşılaştırıldığında daha kısadır. PLGA'nın hidrofobik yapısından dolayı CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub> 'ler iç tarafta konumlanmıştır. Kapsüle olan bakır iç tarafta CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>'ler üzerinde kalır, IR ışını bakırı tam olarak göremez ve pik küçük kalır.



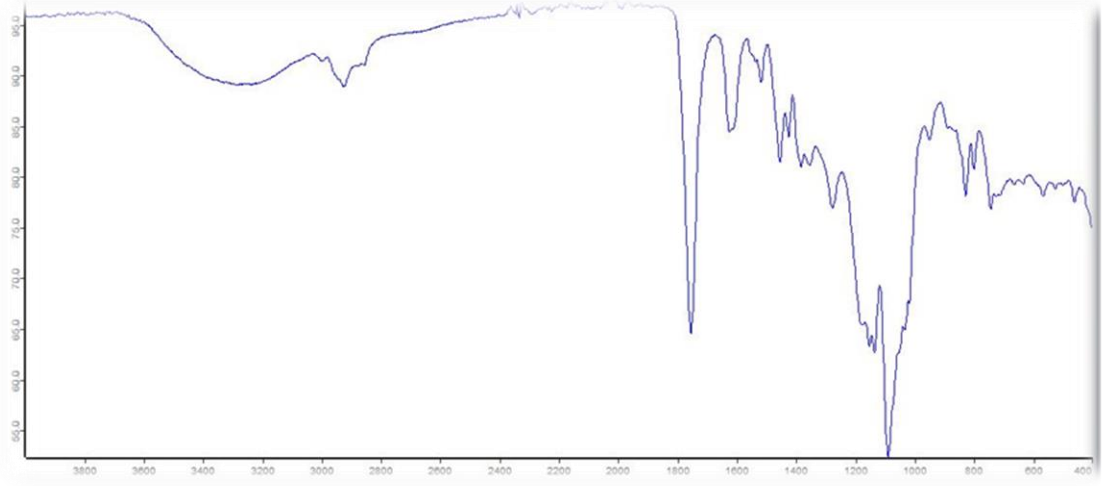
**Şekil 4.13:** PLGA-Cu IR spektrumu.

Epigalloateşin yüklü PLGA nanopartikülleri (Şekil 4.14) FTIR spektrumu -OH gerilimi 3482 cm<sup>-1</sup> ve 3357 cm<sup>-1</sup> bandına karşılık gelmiştir. Ek olarak, bu FTIR ölçümü, saf epigallokateşin spektrumu (Şekil 4.11) ile benzemektedir. Bu da, PLGA nanopartikülleri içinde epigallokateşinin kapsüllenmediğini, EGC'nin PLGA yüzeyinde olduğunu doğrulamaktadır.



**Şekil 4.14:** PLGA-EGC IR spektrumu.

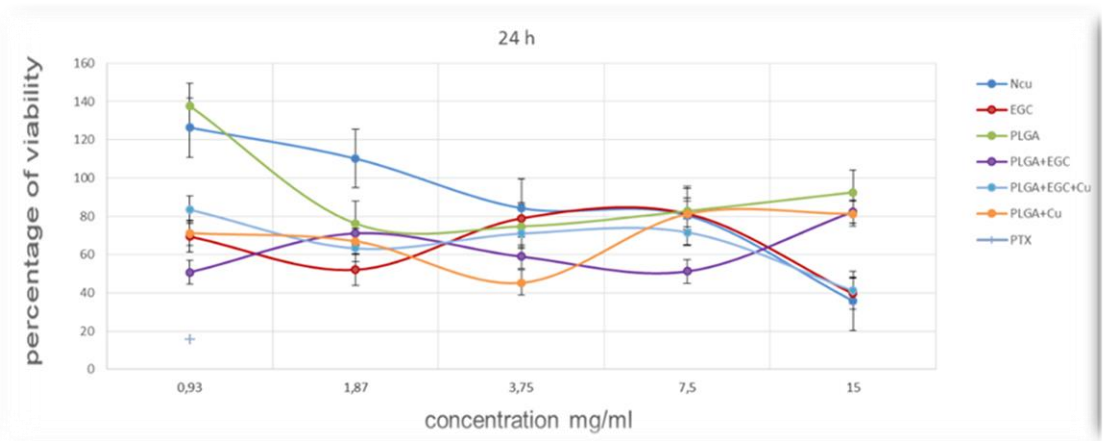
Epigalloateşin ve bakır yüklü PLGA nanopartikülleri (Şekil 4.15) FTIR spektrumu, epigalloateşin yüklü PLGA nanopartikül (Şekil 4.14) spektrum sonucuna benzemektedir. Metaforik olarak, bakır içeride ağa takılan bir balık gibi kalmıştır.



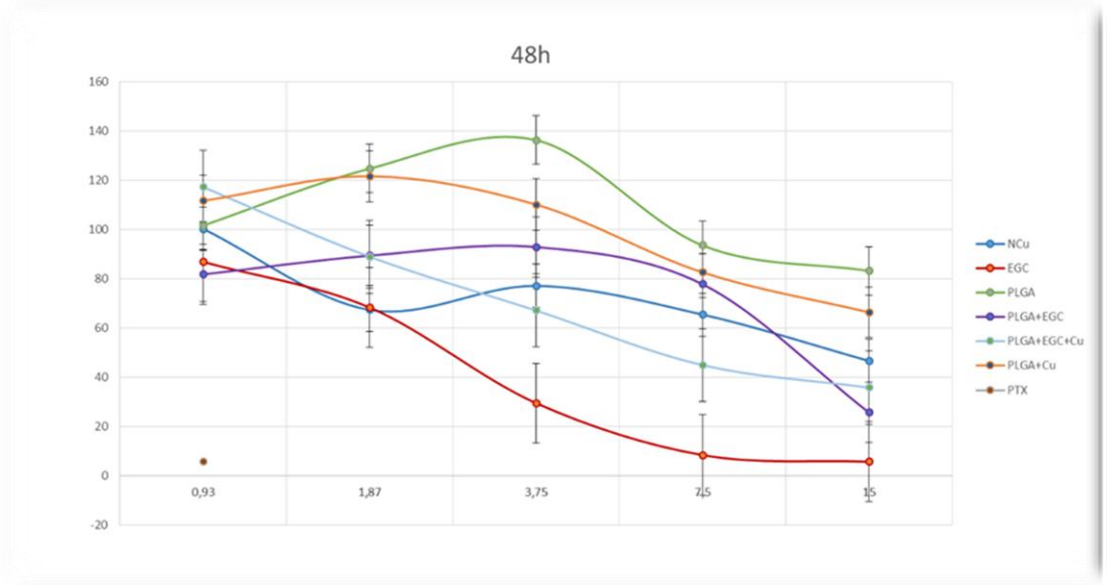
Şekil 4.15 : FITC-PLGA-EGC-Cu IR spektrumu.

#### 4.5 4T-1 üzerindeki nanopartiküllerin hücre kültürü incelenmesi sonuçları

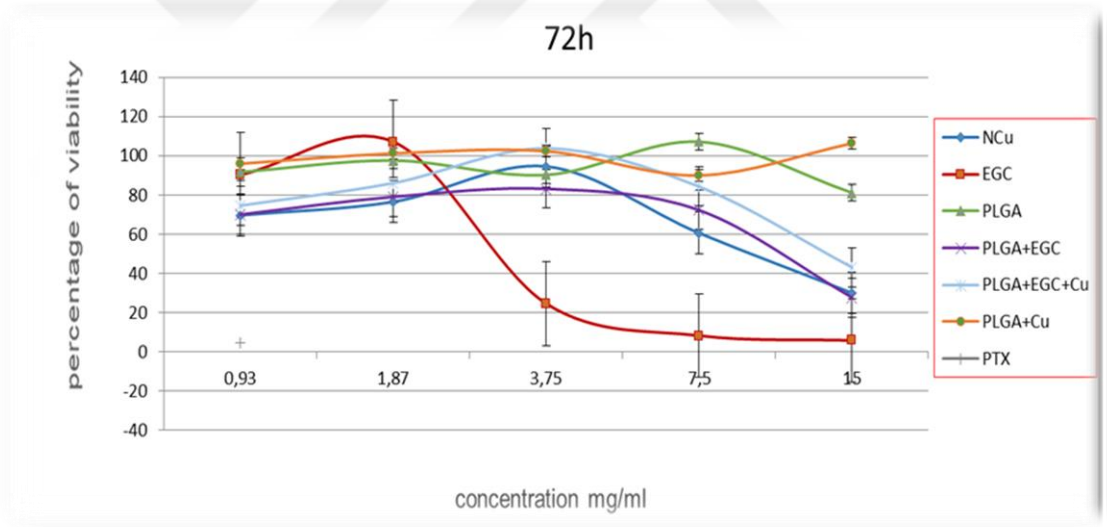
Aşağıdaki grafikler 5 farklı konsantrasyonda, her bir konsantrasyonun üç tekrarı şeklinde nano Cu, EGC, PLGA, PLGA-EGC, PLGA-Cu, PLGA-EGC-Cu ve paklitaksel sitotoksitesini 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca kontrollerle birlikte göstermektedir.



Şekil 4.16: 24. saatin sonunda formülasyonların sitotoksik aktivitesi.



**Şekil 4.17:** 48. saatin sonunda formülasyonların sitotoksik aktivitesi.



**Şekil 4.18:** 72. saatin sonunda formülasyonların sitotoksik aktivitesi.

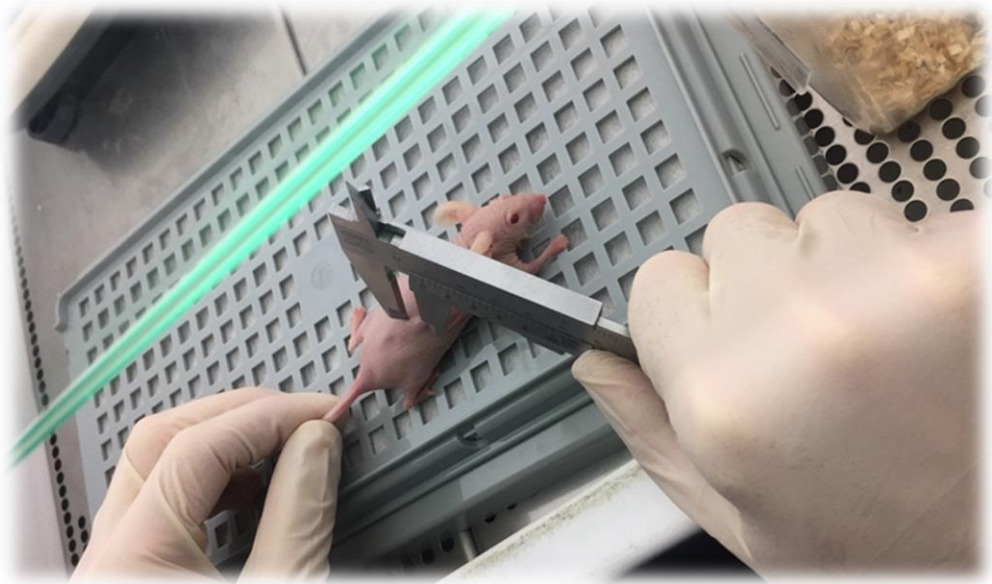
Yukarıdaki tüm grafikler (Şekil 4.16-18), üç bağımsız deneyin ortalama miktarına göre çizilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, her durumda epigallokateşin ve bakır miktarı aynıdır. PLGA'daki epigallokateşin ve PLGA-Cu, serbest epigallokateşin ve serbest bakır ile karşılaştırıldığında hücrelerin % 50'sinde ölüme neden olabilmek için daha yüksek bir konsantrasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu muhtemelen PLGA-epigallokateşin ve PLGA-Cu'nun salım süresinden kaynaklanmaktadır.

Şekil.4.17’de görüldüğü gibi 48. saatteki sitotoksik aktivitede PLGA-EGC-Cu formülasyonu antioksidan etki göstererek canlılık yüzdesini en düşük konsantrasyonda arttırmış, konsantrasyon miktarı arttıkça pro-oksidan etki göstererek kararlı bir şekilde canlılığı azaltmıştır. Serbest epigallokateşin ve serbest bakır ikinci konsantrasyonda aynı davranışı göstererek kesişmiş, serbest epigallokateşinin bu konsantrasyonundan sonra hücrelerin % 50'sinde ölüm gözlemlenmiştir.

#### **4.6 In vivo hayvan çalışmaları**

##### **4.6.1 Hayvan modelleri**

Şekil 4.19’da, 4T-1 hücrelerinin aşılanmasından iki hafta sonra ortaya çıkan tümörün bir örneğini gösterir.



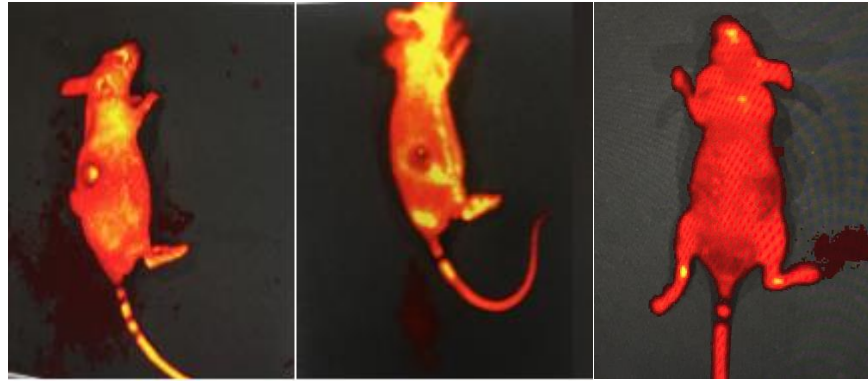
**Şekil 4.19:** Aşılamadan iki hafta sonra ortaya çıkan tümörlerin kumpasla çift yönlü ölçümü.

##### **4.6.2 Formülasyonların biyolojik dağılımı**

Şekil 4.20, IVIS cihazında görüntü alabilmek amacıyla, floresans özellikli bir nano taşıyıcı olan FITC’ye yüklenmiş formülasyonların tümör bölgesindeki birikimlerini göstermektedir. Tümör bölgesi hayvanın sırt kısmında siyaha yakın renkte bir çukur olarak gözükmemektedir. Tümör bölgelerinin dışında gözlemlenen floresan, hayvanın

yiyeceklerinin kaynaklanmaktadır. Gelecek çalışmalarda floresans içermeyen diyetler kullanmak süreci daha kolaylaştıracaktır.

Tedavi sırasında kullandığımız ilaçların farmakinetik özellikleri göz önüne alındığında, IVIS görüntüleri enjeksiyondan 15. dakika, 30. Dakika, 3. ve 24. saat sonrasında görüntülenmiştir. Nano taşıyıcıların Şekil.4.20’de görüldüğü gibi maksimum birikimi FITC-PLGA-EGC-Cu ve ardından FITC-PLGA-EGC’de olmuştur. EPR etki teorisi ile tamamen uyumludur.



**FITC-PLGA-EGC-Cu**

**FITC-PLGA-EGC**

**Kontrol**

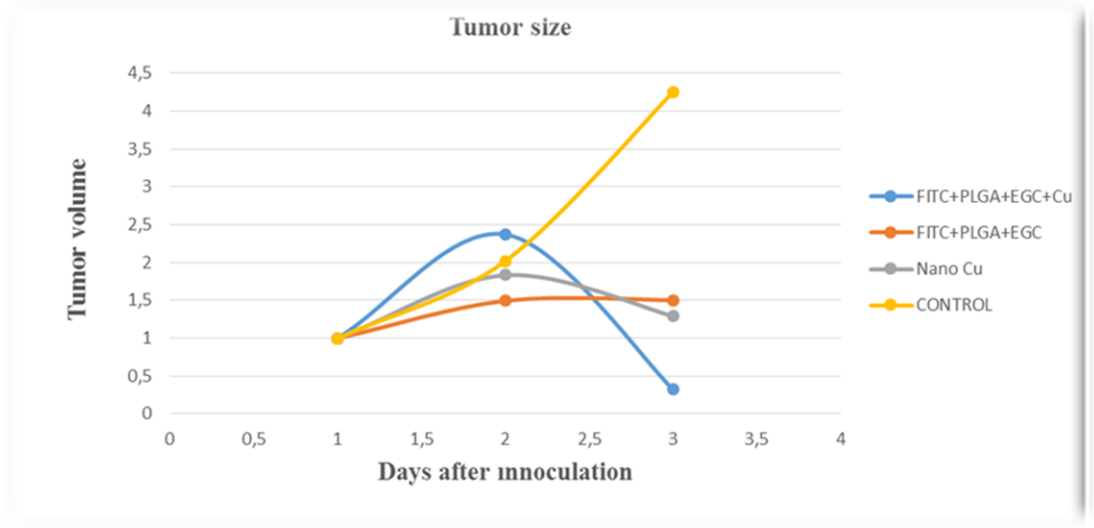
**Şekil.4.20** Formülasyonların tümör bölgesindeki tutulumlarının IVIS görüntüleri 430-580 nm aralığında alınmıştır.

#### **4.6.3 Farelerde meme kanserine karşı farklı formülasyonların *in vivo* etkinliği**

Çıplak fareler, kanserojenezin ve kemoterapötik ajanların etkinliğinin araştırılmasında model olarak küresel olarak kullanılmaktadır [152]. Şekil 4.21, farklı tedavilerin yanıt profillerini temsil etmektedir. Tüm olgularda tümör hacmi ilk günlerde yaklaşık iki kat artarken, ikinci günden sonra tedavi edilmeyen gruptaki tümör hacmi, diğer gruplarda tedavinin ilk gününe kıyasla deneyin sonunda yaklaşık 4 kat artmış, aday formülasyon PLGA-EGC-Cu grubundaki tümör hacmi, diğer iki gruba oranla neredeyse 1,5 kat daha küçülmüştür.

Şekilde açıkça görüldüğü gibi, 15 mg / kg epigallokateşin içeren formülasyonlarla tedavide önemli farklar elde edilir. FITC-PLGA-EGC formülasyonu ile serbest nano bakır grubu neredeyse benzer davranış göstermişlerdir. FITC-PLGA-EGC-Cu grubu ile tedavi en iyi sonuçları göstermiştir. Tümör hacmi, tedavi edilmeyen grup, FITC-PLGA-EGC-Cu , nano Cu ve FITC-PLGA-EGC ile tedavi edilen gruplara kıyasla sırasıyla yaklaşık 15 kat, 3,5 kat ve 2.86 kat azalmıştır.



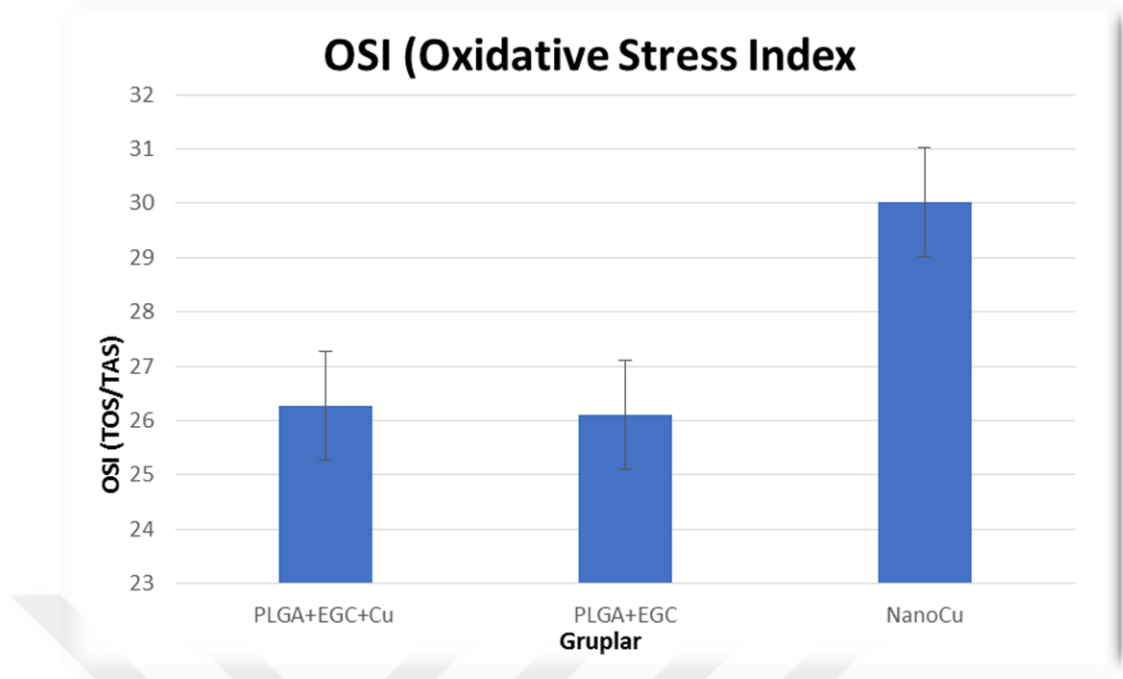


**Şekil 4.21:** Farelerde meme kanserine karşı formülasyonların *in vivo* etkinliği.

Tedavileri tamamlanan, tümör boyutları gibi *in vivo* etkinlikleri tamamlanmış fareler sakrifikasyona tabi tutulmuştur. Farelerin kanları, tümör , karaciğer ve böbrek dokuları biyokimyasal ve immünohistokimyasal analizler için ayrılarak kaldırılmıştır.

#### 4.7 Oksidatif Stres Ölçümleri

Oksidatif stres göstergelerinden olan, total antioksidan kapasite ve total oksidan kapasite fotometrik metotlarla ölçülmek üzere, hayvan kanları sakrifikasyon sırasında jel içeren biyokimyasal tüplere alınmış, kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan serum örneklerinde oksidatif stres indeksi (TOS/TAS ) elde edilmiştir.

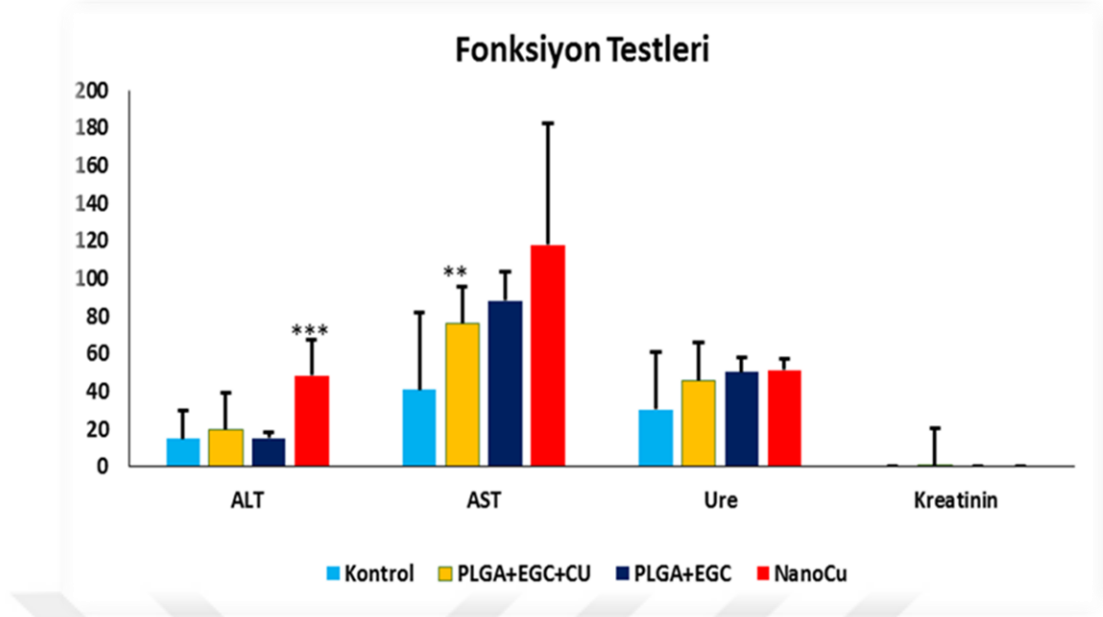


**Şekil 4.22** : Serum oksidatif stres indeksi.

TOS'un TAS'a oranı, oksidatif stres derecesinin bir göstergesi olan oksidatif stres indeksini (OSI) vermektedir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi nano Cu, PLGA-EGC ve kombine tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırdığında, bir nano taşıyıcı tarafından enkapsüle olmayan dolayısıyla kanda sürekli sirkülasyonda olan serbest nano bakırın oksidatif stres indeksindeki en yüksek artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Nano bakır tek başına oldukça oksidan iken, kombine tedavide oksidatif stres düşmüştür.

#### **4.8 Karaciğer ve Böbrek Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri**

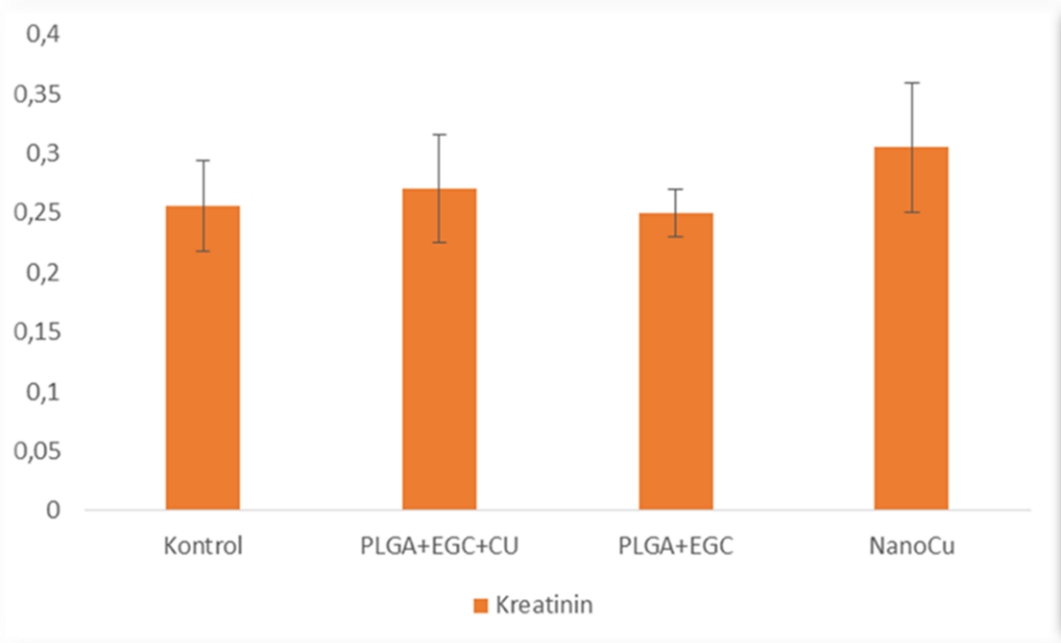
İntrakardiyak hayvan kanları jelli biyokimya tüpüne alınıp 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra böbrek fonksiyon testleri ( Üre, Kreatinin) ile karaciğer fonksiyon testleri (AST, ALT) rutin biyokimya otoanalizörlerinde çalışılmıştır (Şekil 4.23-4.24).



\* = p<0,05; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p<0,001 & - = p<0,05; -- = p<0,01; --- = p<0,001

**Şekil 4.23:** Karaciğer ve böbrek toksisite testi.

Kontrol grubuna göre karaciğer enzimlerinden ALT değeri, nano Cu grubunda anlamlı bir şekilde artmış, kombine formülasyonlardan PLGA-EGC’de bu değer kontrol grubundan bile düşük seyrederken, PLGA-EGC-Cu kombinasyonunda nispeten anlamlı bir yükseliş gözlemlenmemiştir. AST değerleri ALT sonuçlarına göre ciddi bir artış göstermiş ancak kombine tedavi yine tekli tedaviye göre sonuçlarda istatistiksel olarak daha anlamlı ve etkili olmuştur. Sonuçlar kontrol grubundaki değerler gibi normale yaklaşamamıştır ancak hepatotoksik hasarı bir miktar düzeltmiştir.



\* = p<0,05; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p<0,001 & - = p<0,05; -- = p<0,01; --- = p<0,001

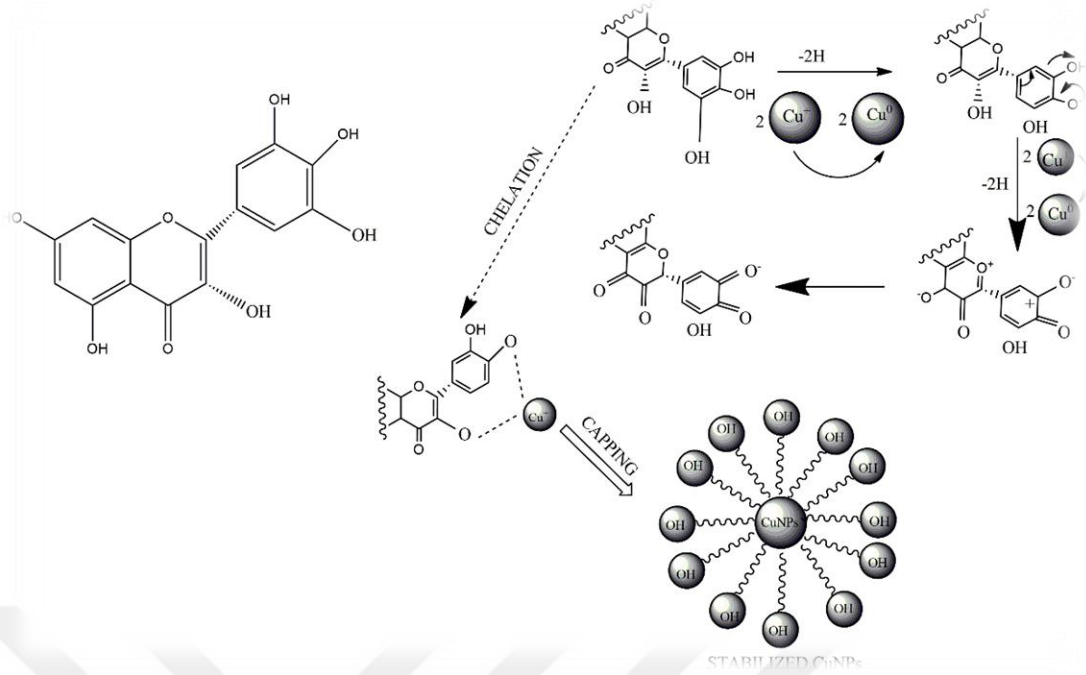
**Şekil 4.24:** Böbrek toksisite testi (kreatinin).

Şekil 4.23'te görüldüğü üzere üre, kreatinin gibi böbrek fonksiyon testleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre tüm formülasyonlar hemen hemen aynı değerde yükselirken, PLGA-EGC-Cu kombinasyonu diğer gruplara nispeten daha az toksik etki göstermiştir. Şekil 4.24'te kreatinin fonksiyon test sonucunda PLGA-EGC kombinasyonu kontrol grubuyla aynı değerdeyken, nano bakır tüm değerlerde olduğu gibi bir artış sergilemiştir. PLGA-EGC-Cu kombine tedaviyle birlikte artan değer istatistiksel olarak anlamlı değildir.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, yeşil çayın (*Camellia sinensis*) bileşiminde bulunan insan sağlığını ve hastalığını etkileme potansiyeli nedeniyle temel araştırma kapsamında bir polifenol olan epigallokateşin (EGC), PLGA nano taşıyıcılarına yüklenmiştir. Epigallokateşin zayıf emilim gösterir aynı zamanda plazma yarı ömürleri kısadır. Çözünürlük düşük olduğunda, minimum etkili dozu elde etmek için daha yüksek miktarlarda ilaç kullanılmalıdır ve sonuç olarak yan etkiler artacaktır. Öte yandan ilaç, misellerin içine hapsedildiğinde vücudun sert ortamından korunabilir ve vücutla daha az temas yan etkileri azaltır.

Basit, hızlı, temiz, verimli, çevre dostu ve ekonomik olarak ucuz yeşil kimya yöntemiyle yeşil çay ekstraktı kullanarak biyo-sentezlenmiş bakır nano-partiküllerin (nano Cu<sup>0</sup>) tasarladık ve ürettik (Şekil.5.1). Yeşil çay özütü, bakır nano-partiküllerin oluşumundan, stabilizasyonundan ve bakırın etrafının sarılmasından (capping) sorumluydu. *Camellia sinensis* ekstresi kullanılarak 1 mM bakır sülfat çözeltisi ile bakır nanopartiküllerin yeşil sentezi, 3 ila 4 saat içinde orta büyüklükte nanopartiküllerin oluşumunda iyi verim vermiştir. Biyo-sentezlenmiş bakır nano-konjugatlar uzun süre oldukça kararlı ve *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde biyoyumlu olduğu bulunmuştur. Çalışmalar, hem tek ajan olarak hem de diğer tedavilerle kombinasyon halinde antikanser tedavileri olarak bakır kombinasyonlarının kapsamlı araştırmasını hak edecek kadar kanıt hazırlamıştır. Bununla birlikte, bakırın kanser etiyojisi ve patogenezinde oynadığı rolü daha iyi anlama ve bakırı hedef alan veya kullanan tedaviler için hangi kanser türlerinin uygun olduğunu tanımlama ihtiyacı da önemlidir [122].



**Şekil 5.1:** Yeşil kimya yöntemiyle yeşil çay ekstraktı kullanarak biyo-sentezlenmiş bakır nano-partikülü (nano Cu<sup>0</sup>).

EGC, radikalleri temizleme ve metal iyonunu şelatlama konusunda dikkate değer bir potansiyele sahiptir. Bu, A halkası, B halkası ve D halkasında dihidroksi ve trihidroksi gruplarının varlığına bağlanabilir (şekil 5) [153]. Bu yetenek sayesinde nano bakırı şelatlamış ve bir hibrit oluşturmuş, PLGA'ya yüklenerek farklı kombinasyonlarda formülasyonlar elde edilmiştir.

Formülasyonun farklı stabilite çalışmalarında stabil olduğu bulunmuştur. Bunlar arasında liyofilizasyon, formülasyonun ticari kullanımı durumunda en olası seçim olabilir. Formülasyonların ve bileşenlerinin FT-IR ve DSC ile karakterizasyonu, epigallokateşin ve nano bakırın PLGA ile ilişkisini doğrulamıştır. DSC sonucuna göre yapıyı oldukça bozmuş, etrafında dağılmış PLGA-EGC, aynı zamanda saf EGC FT-IR sonucuna benzeyerek aslında EGC'nin amfifilik bir materyal olan PLGA miselinin etrafında olduğunu göstermiştir. Şekil.4'te membran akışkanlığını sağlayan ve çift katlı yapı arasında kalan EGC bu sonucu bir kez daha doğrulamaktadır.

Epigallokateşinin IC<sub>50</sub>'si DMSO ve PLGA-EGC-Cu'da 72 saat içerisinde sırasıyla 2,89 mg ± 1,8757; 7,37 mg ± 12,129 iken, serbest nano bakırın IC<sub>50</sub>'si 4,70 mg ± 0,3596 olarak bulunmuştur. PLGA'daki epigallokateşin, DMSO'daki epigallokateşine kıyasla hücrelerin % 50'sinde ölüme neden olabilmesi için daha yüksek bir konsantrasyona ihtiyaç duymuştur. Bu muhtemelen epigallokateşinin ihtiyaç duyduğu salım süresinden kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda PLGA-EGC-Cu

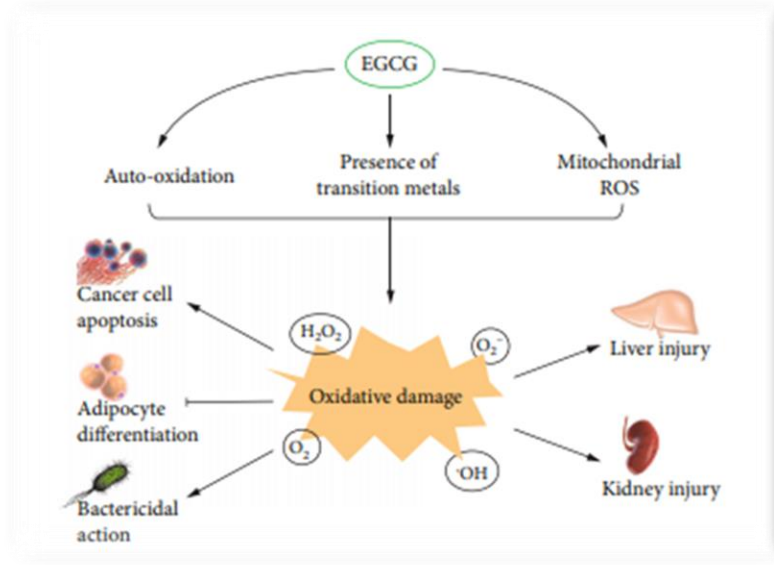
formülasyonunun 24 saat içerisinde 4T-1 hücrelerini öldürdüğü, canlı hücrelerin 48 ve 72 saat içerisinde proliferasyona uğradığını göstermektedir. Bu, 72 saat içerisinde aday formülasyonun IC50 miktarının artmasının nedenlerinden biri olarak gösterilebilir. Serum ve tümör dokusundaki bakır konsantrasyonu, sağlıklı deneklerinkinden önemli ölçüde daha yüksektir [154]. Tümör tedavisi için uygulanan formülasyonların içerdiği bakır pro-oksidatif bir ajan olarak kullanılmış, sağlıklı hücrelere göre daha yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerine (ROS) sahip kanser dokusunda ROS'u daha da indükleyerek oksidatif stres durumlarını hızlandırmış ve 24 saat içerisinde etkili bir şekilde agresif 4T-1 meme kanseri hücrelerini öldürmüştür.

Nano bakır , PLGA-EGC-Cu formülünü PLGA-EGC'den daha etkili hale getirmiştir. 4T-1 tümörlü nude farelerde, serbest EGC ve serbest nano bakıra göre PLGA-EGC-Cu kombine tedavi ile en iyi sonuçları vermiştir. Tümör hacmi, tedavi edilmeyen grup, nano Cu, PLGA-EGC-Cu ve PLGA-EGC tedavi grupları ile karşılaştırıldığında yaklaşık 15 kat, 3,5 kat ve 2.86 kat azalmıştır. Bu sonuçlar birlikte, biyosentezlenmiş bakır nano partikül bazlı ilaç taşıma sistemlerinin yakın gelecekte kanser terapötikleri için alternatif bir ilaç olarak faydalı olabileceğini göstermektedir.

Yukarıda bahsedilen açıklamalara dayanarak, bu projenin ilk amacı, PLGA ile yapılan epigallokateşin ve indirgenmiş bakır yüklü stabilize edilmiş nanomiselleri tasarlamak ve karakterize etmektir. Bir sonraki adımda, bu partiküllerin 4T-1 kanser hücreleri üzerindeki *in vitro* etkinliği araştırılmıştır. Bu nano ilacın *in vivo* etkisi, projenin bu bölümünün nihai amacı olarak nude fare üzerinde test edilmiştir.

Projenin bu bölümünde amaç, epigallokateşinin stabilitesini ve biyoyararlanımını PLGA'ya yükleyerek artırmaktır. Daha önce yayınlanan optimize edilmiş verilere göre hazırlanan formülasyonun karakterizasyonundan sonra nano-epigallokateşin ile birlikte uygulamada nano-bakırın *in vitro* antikanser etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde *in vivo* çalışma, elde edilen *in vitro* sonuçları daha güvenilir hale getirir.

Epigallokateşin (EGC) önemli çay kateşinlerinden biri olmasına rağmen literatür geçmişi zayıftır dolayısıyla EGC hakkında sınırlı miktarda veriye ulaşılabilmektedir. Yapılan çalışmalar yüzdesel olarak çayda major polifenolik bileşik epigallokateşin gallat (EGCG) üzerinde yoğunlaşmış ve Şekil 5.2'de oto-oksidasyon, mitokondriyal ROS ve geçiş metalleri ( $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  vs.) varlığında pro-oksidan etkileri gösterilmiştir.

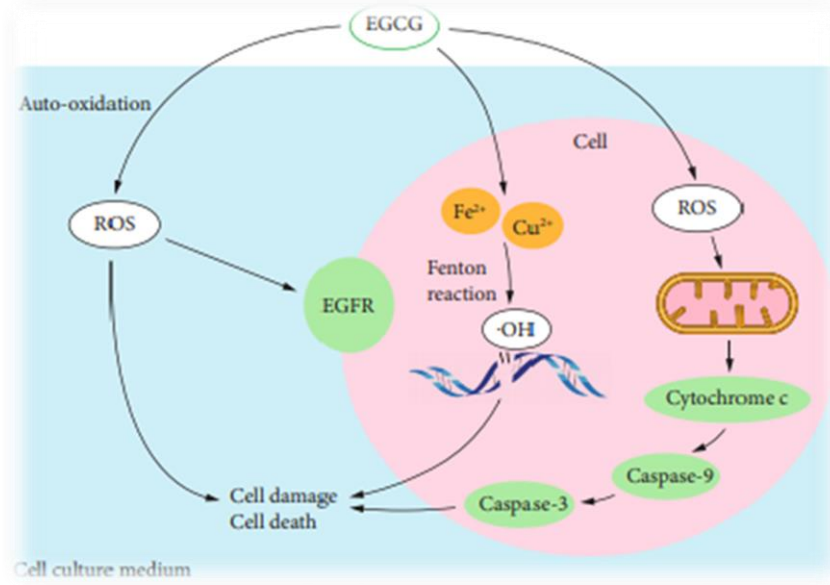


**Şekil 5.2** EGCG'nin pro-oksidan etkileri[155].

Hücre kültürü çalışmalarına dayalı olarak EGCG'nin antikanser aktivitesindeki pro-oksidan etkisinin rolü, insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerinde düşük ve yüksek konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde denenmiştir. 10-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGCG konsantrasyonu 48. saat sonunda kaspaz-9'u aktive ederek hücre büyümesi inhibisyonu ve apoptoz indüklerken [156], 10-400  $\mu\text{M}$  konsantrasyonun 6. saati sonunda olay farklı seyretmiş ve hücre nekroza gitmiştir [157]. Düşük dozlarda JNK, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ile indüklenen apoptoz, yüksek dozlarda ise ROS üretimi ve ATP seviyelerindeki farklılıklar ile ilgili olan nekrozu indüklemektedir. Çalışmanın ana amaçlarından biri literatürde yeterli veriye ulaşılmayan epigallokateşinin pro-oksidan dozla insan meme kanseri 4T-1 hücrelerinde apoptoza neden olmasıydı.

Genel olarak, tipik hücre kültürü koşulları altında, EGCG'nin (i) hücre kültürü ortamında otooksidatif reaksiyon yoluyla hücre dışı ROS, (ii) hücresel mitokondride ROS ve (iii) hücre girişi üzerine Fenton reaksiyonu yoluyla hücre içi ROS ürettiği bilinmektedir (Şekil.5.3).





**Şekil 5.3:** EGCG'nin hücre kültüründe prooksidan etkileri [155].

Bu üç yol, kanser hücrelerine farklı şekilde katkıda bulunur, ancak sonunda hücre hasarına ve ölüme neden olur. Kanserın başlaması ve ilerlemesi genellikle birkaç aşamaya ayrılır. EGCG bir antioksidan görevi gördüğünde, kanser önleme aşamasında antioksidan kapasitesini daha etkili bir şekilde artırabilir, EGCG bir pro-oksidan olarak davrandığında, tümör büyüme aşamasını baskılamada daha kritik olabilir [155]. Hücrelere pro-oksidan etkisi, DNA ve lipidler dahil olmak üzere hücre yapılarına oksidatif hasar olarak belirlenmiştir. Bu oksidatif hasar, EGCG tarafından üretilen aşırı ROS'tan kaynaklanmaktadır. EGCG'nin bir ROS üretimini nasıl indüklediği yaklaşımları arasında, otooksidasyon işlemler, geçiş metallerrinin varlığı ve mitokondriyal ROS vardır. Bir yandan, EGCG'nin prooksidan etkileri, yararlı etkiler sergiler, yani kanser hücresi apoptozunu indükler, adiposit farklılaşmasını inhibe eder ve bakterisidal etkiye neden olabilir. Yüksek doz EGCG, ROS'u aşırı üretir ve vücutta antioksidan savunmanın zarar görmesine neden olur. Kısmi organlar, özellikle de karaciğer, farklı boyutlarda hasarlanmalara dahil olabilir.

Hayvan deneylerinde, EGCG'nin neden olduğu toksisitenin ciddiyeti doz, uygulama yolu ve tedavi süresi ile ilişkilidir [158, 159]. Biyokimyasal ve histopatolojik analiz, farelerin karaciğer örneklerinin farklı derecelerde karaciğer hasarı sergilediğini gösterdi. Plazma alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesinin karaciğer fonksiyon indeksleri doza bağlı olarak artmıştır [155].

Şekil.4.23 toksisite grafiği, hepatotoksitenin uygulama yoluyla organik olarak bağlantılı olduğunu göstermiş, serbest bakırın neden olduğu toksisiteyi, PLGA-EGC azaltmıştır.

Oksidasyon ve antioksidasyon arasındaki denge (redoks dengesi), sağlıklı bir biyolojik sistemin sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir. Bitkisel besinlerin faydalarına iki ana faktör yatkınlık yaratıyor gibi görünmektedir: (1) bu doğal gıda matrislerinde besin ve besin olmayan maddelerin genel olarak düşük konsantrasyonu ve (2) fitokimyasalların ve besin maddelerinin kompleks karışım profillerinin ilave veya sinerjik etkileri şeklindedir.

Bir hücrenin redoks durumu ve salınımı hücresel işleyişini belirler. Düşük dozlarda ROS, hücresel sinyal, gen ekspresyonu, immün yanıtların düzenlenmesi ve antioksidatif savunma mekanizmalarının teşvik edilmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonda önemli bir role sahiptir [19, 46]. Örneğin, memeli hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile en az 40 farklı genin aktive edilebileceği gösterildi. Bu nedenle, yüksek dozlardaki antioksidanlar, pro-oksidanlar olarak hareket etmelerine rağmen, optimal hücresel işlev için gerekli olan fizyolojik konsantrasyonlarda bulunan ROS ile etkileşim potansiyellerini takiben redoks dengesini bozarak hücresel disfonksiyona yol açabilir [46].

Yüksek konsantrasyonlarda, ROS, lipid peroksidasyonuna ve proteinler ve DNA gibi diğer hassas biyomoleküllerin oksidasyonuna yol açan toksik bileşiklerdir [28]. Bu durum ortaya çıktığında, hücreler oksidan üretimi ve antioksidan koruma arasındaki dengesizlik ile karakterize edilen oksidatif stres durumuna girerler. Oksidatif stres, örneğin gen ekspresyonunda, protein ekspresyonunda, hücresel sinyallemede, membran akışkanlığında değişikliklere neden olarak hücresel işlev bozukluğuna neden olabilir ve potansiyel olarak hücre ölümüyle sonuçlanabilir [160].

EGC'nin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara dayanan pro-oksidan ve antioksidan dozla birlikte oluşacak potansiyel toksisitelerini gösterecek az klinik araştırma vardır. Bu tezde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, uygun dozun belirlenmesi literatüre ve ilerleyen çalışmalara faydalı olacaktır. EGC'nin antioksidan ve prooksidan potansiyeli, doz seviyelerine ve kanser bölgesinin biyolojik ortamıyla bağlantılıdır.

Bu dozlar bazı durumlarda toksik olabilir. Dahası, Fenton reaksiyonu nedeniyle, geçiş metal seviyeleri önemli ölçüde yüksek olduğunda, pro-oksidan etkileri ortaya çıkarmak için gereken dozu önemli ölçüde daha düşük olacaktır [161]. Bu nedenle, minimum olumsuz etkilerle sağlıklı etkiler sunmak için dozajı optimize etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

1. Xiaomei, M. ve Herbert, Y. (2006). Global burden of cancer. *Yale J Biol Med*, 79(3-4), 85-94.
2. Gerhäuser, C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1941-1954.
3. Akram, S., Amir, R. M., Nadeem, M., Sattar, M. U. ve Faiz, F. (2012). Antioxidant potential of black tea (*Camellia sinensis* L.)-A review. *Pak J Food Sci*, 22(3), 128-132.
4. Vinson, J. A. ve Dabbagh, Y. A. (1998). Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, 18(6), 1067-1075.
5. Dagar, A., Kuzmis, A., Rubinstein, I., Sekosan, M. ve Onyuksel, H. (2012). VIP-targeted cytotoxic nanomedicine for breast cancer. *Drug delivery and translational research*, 2(6), 454-462.
6. Koo, O. M., Rubinstein, I. ve Onyuksel, H. (2005). Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(3), 193-212.
7. Poree, D. E., Giles, M. D., Lawson, L. B., He, J. ve Grayson, S. M. (2011). Synthesis of amphiphilic star block copolymers and their evaluation as transdermal carriers. *Biomacromolecules*, 12(4), 898-906.
8. Matsumura, Y. ve Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 46(12 Part 1), 6387-6392.
9. Kocyigit, A., Koyuncu, I., Taskin, A., Dikilitas, M., Bahadori, F. ve Turkkan, B. (2016). Antigenotoxic and antioxidant potentials of newly derivatized compound naringenin-oxime relative to naringenin on human mononuclear cells. *Drug and chemical toxicology*, 39(1), 66-73.

10. Chen, W., Yang, W., Chen, P., Huang, Y. ve Li, F. (2018). Disulfiram copper nanoparticles prepared with a stabilized metal ion ligand complex method for treating drug-resistant prostate cancers. *ACS applied materials & interfaces*, 10(48), 41118-41128.
11. **Ghazwani, M.** (2016) *Targeted dual functional nanoparticles for the treatment of cancer and liver fibrosis*: University of Pittsburgh.
12. Seliger, B. (2018). Immunotherapy of breast cancer. *Breast Care*, 13(1), 5-6.
13. Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., ve ark. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387.
14. Pryor, W. A. ve Stone, K. (1993). Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 686(1), 12-27.
15. Halliwell, B. (1984). Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Medical biology*, 62(2), 71.
16. Splettstoesser, W. D. ve Schuff-Werner, P. (2002). Oxidative stress in phagocytes—"the enemy within". *Microscopy research and technique*, 57(6), 441-455.
17. Saunders, C. R., Das, S. K., Ramesh, A., Shockley, D. C. ve Mukherjee, S. (2006). Benzo (a) pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 26(5), 427-438.
18. Maiese, K. (2009). Environmental stimulus package: Potential for a rising oxidative deficit. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(4), 179-180.
19. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. ve Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
20. Rammal, H., Bouayed, J. ve Soulimani, R. (2010). A direct relationship between aggressive behavior in the resident/intruder test and cell oxidative status in adult male mice. *European journal of pharmacology*, 627(1-3), 173-176.
21. Halliwell, B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in biochemical sciences*, 31(9), 509-515.
22. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. ve Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
23. Bloomer, R. J. ve Goldfarb, A. H. (2004). Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Canadian journal of applied physiology*, 29(3), 245-263.
24. Kumar, A., Goyal, R. ve Prakash, A. (2009). Possible GABAergic mechanism in the protective effect of allopregnenolone against

- immobilization stress. *European journal of pharmacology*, 602(2-3), 343-347.
25. Bouayed, J. (2010). Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current Nutrition & Food Science*, 6(1), 13-18.
  26. Bouayed, J., Rammal, H. ve Soulimani, R. (2009). Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(2), 63-67.
  27. Bloomer, R. J. ve Fisher-Wellman, K. H. (2009). Systemic oxidative stress is increased to a greater degree in young, obese women following consumption of a high fat meal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(1), 19-25.
  28. Bouayed, J. ve Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), 228-237.
  29. Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
  30. Romier-Crouzet, B., Van De Walle, J., During, A., Joly, A., Rousseau, C., Henry, O., ve ark. (2009). Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1221-1230.
  31. Watjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkotter, A., ve ark. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of nutrition*, 135(3), 525-531.
  32. De Marchi, U., Biasutto, L., Garbisa, S., Toninello, A. ve Zoratti, M. (2009). Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(12), 1425-1432.
  33. Robaszkiewicz, A., Balcerzyk, A. ve Bartosz, G. (2007). Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell biology international*, 31(10), 1245-1250.
  34. Galati, G. ve O'brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303.
  35. Galati, G., Lin, A., Sultan, A. M. ve O'Brien, P. J. (2006). Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), 570-580.
  36. Jönsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I. M. ve Narimantas, Č. (1999). Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS letters*, 462(3), 392-396.

37. Gaspar, J., Rodrigues, A., Laires, A., Silva, F., Costa, S., Monteiro, M., ve ark. (1994). On the mechanisms of genotoxicity and metabolism of quercetin. *Mutagenesis*, 9(5), 445-449.
38. Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickançaité, E. ve Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free radical biology and medicine*, 26(1-2), 107-116.
39. Hodnick, W. F., Kung, F. S., Roettger, W. J., Bohmont, C. W. ve Pardini, R. S. (1986). Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: A structure-activity study. *Biochemical pharmacology*, 35(14), 2345-2357.
40. Decker, E. A. (1997). Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition reviews*, 55(11), 396-398.
41. Moran, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abian, J. ve Becana, M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 861-870.
42. Yamagishi, S.-i. ve Matsui, T. (2010). Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(2), 101-108.
43. Palozza, P., Serini, S., Torsello, A., Boninsegna, A., Covacci, V., Maggiano, N., ve ark. (2002). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by  $\beta$ -carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: Possible involvement of a redox mechanism. *International journal of cancer*, 97(5), 593-600.
44. Yeh, S.-L., Wang, H.-M., Chen, P.-Y. ve Wu, T.-C. (2009). Interactions of  $\beta$ -carotene and flavonoids on the secretion of pro-inflammatory mediators in an in vitro system. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 386-393.
45. Halliwell, B. ve Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*, 281(1-2), 9-19.
46. Martin, K. ve Barrett, J. (2002). Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Human & experimental toxicology*, 21(2), 71-75.
47. Elahi, M. M., Kong, Y. X. ve Matata, B. M. (2009). Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 259-269.
48. Ratnam, D. V., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. ve Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
49. Biehler, E. ve Bohn, T. (2010). Methods for assessing aspects of carotenoid bioavailability. *Current Nutrition & Food Science*, 6(1), 44-69.

50. Andre, C. M., Larondelle, Y. ve Evers, D. (2010). Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. *Current Nutrition & Food Science*, 6(1), 2-12.
51. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
52. **Madhavi, D. L., Deshpande, S. ve Salunkhe, D. K.** (1995). *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*. CRC Press.
53. Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ve ark. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72(2), 145-171.
54. Itagaki, S., Oikawa, S., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T. ve Iseki, K. (2010). Protective effects of quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Food chemistry*, 118(2), 426-429.
55. Branen, A. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52(2), 59.
56. **Akoh, C. C.** (2017). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. CRC press.
57. Hertog, M. G., Van Poppel, G. ve Verhoeven, D., Year editör^editörler. Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables. PROCEEDINGS-PHYTOCHEMICAL SOCIETY OF EUROPE; 1996: OXFORD UNIVERSITY PRESS INC.; Published.
58. Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R. ve Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 154-160.
59. Deschner, E. E., Ruperto, J., Wong, G. ve Newmark, H. L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12(7), 1193-1196.
60. Gallicchio, L., Boyd, K., Matanoski, G., Tao, X., Chen, L., Lam, T. K., ve ark. (2008). Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, 88(2), 372-383.
61. Lin, J., Cook, N. R., Albert, C., Zaharris, E., Gaziano, J. M., Van Denburgh, M., ve ark. (2009). Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(1), 14-23.
62. Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E., Mistry, N., Mistry, P. ve Lunec, J. (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 392(6676), 559-559.
63. Dufresne, C. J. ve Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of nutritional biochemistry*, 12(7), 404-421.



64. Vignes, M., Maurice, T., Lanté, F., Nedjar, M., Thethi, K., Guiramand, J., ve ark. (2006). Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain research*, 1110(1), 102-115.
65. Ambigaipalan, P., Oh, W. Y. ve Shahidi, F. (2020). Epigallocatechin (EGC) esters as potential sources of antioxidants. *Food Chem*, 309, 125609.
66. Vergote, D., Cren-Olivé, C., Chopin, V., Toillon, R. A., Rolando, C., Hondermarck, H., ve ark. (2002). (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. *Breast cancer research and treatment*, 76(3), 195-201.
67. Andrade, S., Loureiro, J. A. ve Pereira, M. C. (2020). Green tea extract-biomembrane interaction study: The role of its two major components, (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1863(1), 183476.
68. Kuroda, Y. ve Hara, Y. (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 436(1), 69-97.
69. Yang, G.-Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E. J. ve Yang, C. S. (1998). Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 19(4), 611-616.
70. Vergote, D., Cren-Olivé, C., Chopin, V., Toillon, R.-A., Rolando, C., Hondermarck, H., ve ark. (2002). (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. *Breast cancer research and treatment*, 76(3), 195-201.
71. Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Sueoka, E., ve ark. (1998). Cancer inhibition by green tea. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 307-310.
72. **Ozbun, M. A. ve Butel, J. S.** (1995). Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis. *Advances in cancer research* Cilt 66, ss. 71-141): Elsevier.
73. Zhou, X., Hao, Y., Yuan, L., Pradhan, S., Shrestha, K., Pradhan, O., ve ark. (2018). Nano-formulations for transdermal drug delivery: a review. *Chinese Chemical Letters*, 29(12), 1713-1724.
74. Matoba, T., Koga, J. I., Nakano, K., Egashira, K. ve Tsutsui, H. (2017). Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of cardiology*, 70(3), 206-211.
75. Jain, R. K. ve Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(11), 653-664.
76. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. ve Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular

- therapeutics: a review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 65(1-2), 271-284.
77. Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Hu, Y., Han, H. S., Watson, N., ve ark. (2008). Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nature materials*, 7(7), 588-595.
  78. Holback, H. ve Yeo, Y. (2011). Intratumoral drug delivery with nanoparticulate carriers. *Pharmaceutical research*, 28(8), 1819-1830.
  79. Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H. ve Atyabi, F. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International journal of nanomedicine*, 6, 877-895.
  80. Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 131-135.
  81. Maeda, H., Nakamura, H. ve Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 71-79.
  82. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. ve Gambhir, S. S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (London, England)*, 6(4), 715-728.
  83. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., ve ark. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110.
  84. Shin, W.-K., Cho, J., Kannan, A. G., Lee, Y.-S. ve Kim, D.-W. (2016). Cross-linked Composite Gel Polymer Electrolyte using Mesoporous Methacrylate-Functionalized SiO<sub>2</sub> Nanoparticles for Lithium-Ion Polymer Batteries. *Scientific Reports*, 6(1), 26332.
  85. Eskandari, Z., Bahadori, F., Celik, B. ve Onyüksel, H. (2020). Targeted Nanomedicines for Cancer Therapy, From Basics to Clinical Trials. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 23, 132-157.
  86. Iijima, M., Nagasaki, Y., Okada, T., Kato, M. ve Kataoka, K. (1999). Core-polymerized reactive micelles from heterotelechelic amphiphilic block copolymers. *Macromolecules*, 32(4), 1140-1146.
  87. Park, J. H., Lee, S., Kim, J.-H., Park, K., Kim, K. ve Kwon, I. C. (2008). Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science*, 33(1), 113-137.
  88. Treuel, L., Jiang, X. ve Nienhaus, G. U. (2013). New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *Journal of the Royal Society, Interface*, 10(82), 20120939.
  89. **Andronescu, E. ve Grumezescu, A. M.** (2017). *Nanostructures for drug delivery*. Elsevier.

90. Lin, J., Zhang, H., Chen, Z. ve Zheng, Y. (2010). Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS nano*, 4(9), 5421-5429.
91. Patel, M. P., Patel, R. R. ve Patel, J. K. (2010). Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 536-557.
92. Bahadori, F., Topçu, G., Eroğlu, M. S. ve Önyüksel, H. (2014). A new lipid-based nano formulation of vinorelbine. *AAPS PharmSciTech*, 15(5), 1138-1148.
93. Gundogdu, N. ve Cetin, M. (2014). Chitosan-poly (lactide-co-glycolide) (CS-PLGA) nanoparticles containing metformin HCl: preparation and in vitro evaluation. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27(6), 1923-1929.
94. Ahn, H. K., Jung, M., Sym, S. J., Shin, D. B., Kang, S. M., Kyung, S. Y., ve ark. (2014). A phase II trial of Cremorphor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 74(2), 277-282.
95. Gao, Y., Zhou, Y., Zhao, L., Zhang, C., Li, Y., Li, J., ve ark. (2015). Enhanced antitumor efficacy by cyclic RGDyK-conjugated and paclitaxel-loaded pH-responsive polymeric micelles. *Acta biomaterialia*, 23, 127-135.
96. Marin, E., Briceño, M. I. ve Caballero-George, C. (2013). Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *International journal of nanomedicine*, 8, 3071-3090.
97. Cooper, D. L. ve Harirforoosh, S. (2014). Effect of formulation variables on preparation of celecoxib loaded polylactide-co-glycolide nanoparticles. *PloS one*, 9(12), e113558.
98. Hines, D. J. ve Kaplan, D. L. (2013). Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 30(3), 257-276.
99. Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A. ve Prétat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, 161(2), 505-522.
100. Danhier, F. ve Prétat, V. (2015). Strategies to improve the EPR effect for the delivery of anti-cancer nanomedicines. *Cancer Cell & Microenvironment*, 2.
101. Rezvantalab, S., Drude, N. I., Moraveji, M. K., Güvener, N., Koons, E. K., Shi, Y., ve ark. (2018). PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 9(1260).
102. Engineer, C., Parikh, J. ve Raval, A. (2011). Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 25(2).
103. Xu, Y., Kim, C. S., Saylor, D. M. ve Koo, D. (2017). Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer

- applications: A review of experiments and theories. *Journal of biomedical materials research part B: applied biomaterials*, 105(6), 1692-1716.
104. Horisawa, E., Hirota, T., Kawazoe, S., Yamada, J., Yamamoto, H., Takeuchi, H., ve ark. (2002). Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit. *Pharmaceutical research*, 19(4), 403-410.
  105. Bowerman, C. J., Byrne, J. D., Chu, K. S., Schorzman, A. N., Keeler, A. W., Sherwood, C. A., ve ark. (2017). Docetaxel-loaded PLGA nanoparticles improve efficacy in taxane-resistant triple-negative breast cancer. *Nano letters*, 17(1), 242-248.
  106. Kolhar, P., Doshi, N. ve Mitragotri, S. (2011). Polymer Nanoneedle-Mediated Intracellular Drug Delivery. *Small*, 7(14), 2094-2100.
  107. Chu, K. S., Hasan, W., Rawal, S., Walsh, M. D., Enlow, E. M., Luft, J. C., ve ark. (2013). Plasma, tumor and tissue pharmacokinetics of Docetaxel delivered via nanoparticles of different sizes and shapes in mice bearing SKOV-3 human ovarian carcinoma xenograft. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(5), 686-693.
  108. Zhang, B., Lung, P. S., Zhao, S., Chu, Z., Chrzanowski, W. ve Li, Q. (2017). Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
  109. Turecek, P. L., Bossard, M. J., Schoetens, F. ve Ivens, I. A. (2016). PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*, 105(2), 460-475.
  110. Hutchison, J. E. 2008. Greener nanoscience: a proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology. ACS Publications; s.
  111. El Shafey, A. M. (2020). Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 304-339.
  112. Rajawat, S. ve Qureshi, M. S. (2014). Electrolytic Deposition of Silver Nanoparticles Under “Principles of Green Chemistry”. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 39(1), 563-568.
  113. El-Said, W. A., Cho, H. Y., Yea, C. H. ve Choi, J. W. (2014). Synthesis of metal nanoparticles inside living human cells based on the intracellular formation process. *Advanced materials*, 26(6), 910-918.
  114. Kumar, V. ve Yadav, S. (2012). Synthesis of different-sized silver nanoparticles by simply varying reaction conditions with leaf extracts of *Bauhinia variegata* L. *IET nanobiotechnology*, 6(1), 1-8.
  115. Marchiol, L. (2012). Synthesis of metal nanoparticles in living plants. *Italian Journal of Agronomy*, e37-e37.

116. Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O. ve Pérez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol*, 31(4), 240-248.
117. Sivaraman, S. K., Elango, I., Kumar, S. ve Santhanam, V. (2009). A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. *Current Science (00113891)*, 97(7).
118. Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., ve ark. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18, 105104.
119. **Gholami-Shabani, M., Gholami-Shabani, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Jamzivar, F. ve Razzaghi-Abyaneh, M.** (2017). Green nanotechnology: biomimetic synthesis of metal nanoparticles using plants and their application in agriculture and forestry. *Nanotechnology* ss. 133-175): Springer.
120. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
121. Vaseghi, Z., Tavakoli, O. ve Nematollahzadeh, A. (2019). New insights into mechanistic aspects and structure of polycrystalline Cu/Cr/Ni metal oxide nanoclusters synthesized using *Eryngium campestre* and *Froriepia subpinnata*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 36(3), 489-499.
122. Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S. ve Cater, M. A. (2015). Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics*, 7(11), 1459-1476.
123. Skrajnowska, D., Bobrowska-Korczak, B., Tokarz, A., Bialek, S., Jezierska, E. ve Makowska, J. (2013). Copper and resveratrol attenuates serum catalase, glutathione peroxidase, and element values in rats with DMBA-induced mammary carcinogenesis. *Biological trace element research*, 156(1-3), 271-278.
124. Ishida, S., Andreux, P., Poitry-Yamate, C., Auwerx, J. ve Hanahan, D. (2013). Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19507-19512.
125. Brady, D. C., Crowe, M. S., Turski, M. L., Hobbs, G. A., Yao, X., Chaikuad, A., ve ark. (2014). Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. *Nature*, 509(7501), 492-496.
126. Santini, C., Pellei, M., Gandin, V., Porchia, M., Tisato, F. ve Marzano, C. (2014). Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chemical reviews*, 114(1), 815-862.
127. Tisato, F., Marzano, C., Porchia, M., Pellei, M. ve Santini, C. (2010). Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Medicinal research reviews*, 30(4), 708-749.
128. Jany, T., Moreth, A., Gruschka, C., Sisichka, A., Spiering, A., Dieding, M., ve ark. (2015). Rational design of a cytotoxic dinuclear Cu<sub>2</sub> complex that binds by molecular recognition at two neighboring

- phosphates of the DNA backbone. *Inorganic chemistry*, 54(6), 2679-2690.
129. Pivetta, T., Lallai, V., Valletta, E., Trudu, F., Isaia, F., Perra, D., ve ark. (2015). Mixed copper–platinum complex formation could explain synergistic antiproliferative effect exhibited by binary mixtures of cisplatin and copper-1, 10-phenanthroline compounds: An ESI–MS study. *Journal of inorganic biochemistry*, 151, 107-114.
130. Skrott, Z., Mistrik, M., Andersen, K. K., Friis, S., Majera, D., Gursky, J., ve ark. (2017). Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature*, 552(7684), 194-199.
131. Wang, Z., Tan, J., McConville, C., Kannappan, V., Tawari, P. E., Brown, J., ve ark. (2017). Poly lactic-co-glycolic acid controlled delivery of disulfiram to target liver cancer stem-like cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(2), 641-657.
132. Cen, D., Brayton, D., Shahandeh, B., Meyskens, F. L. ve Farmer, P. J. (2004). Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *Journal of medicinal chemistry*, 47(27), 6914-6920.
133. Liu, P., Brown, S., Goktug, T., Channathodiyil, P., Kannappan, V., Hugnot, J., ve ark. (2012). Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *British journal of cancer*, 107(9), 1488-1497.
134. Morrison, B. W., Doudican, N. A., Patel, K. R. ve Orlow, S. J. (2010). Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. *Melanoma research*, 20(1), 11-20.
135. Tawari, P. E., Wang, Z., Najlah, M., Tsang, C. W., Kannappan, V., Liu, P., ve ark. (2015). The cytotoxic mechanisms of disulfiram and copper (II) in cancer cells. *Toxicology Research*, 4(6), 1439-1442.
136. Wehbe, M., Anantha, M., Shi, M., Leung, A. W.-y., Dragowska, W. H., Sanche, L., ve ark. (2017). Development and optimization of an injectable formulation of copper diethyldithiocarbamate, an active anticancer agent. *International journal of nanomedicine*, 12, 4129.
137. Wehbe, M., Chernov, L., Chen, K. ve Bally, M. B. (2016). PRCosomes: pretty reactive complexes formed in liposomes. *Journal of Drug Targeting*, 24(9), 787-796.
138. Padma, P. N., Banu, S. T. ve Kumari, S. C. (2018). Studies on green synthesis of copper nanoparticles using Punica granatum. *Annual Research & Review in Biology*, 1-10.
139. Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H. ve Kawashima, Y. (1999). Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International journal of pharmaceuticals*, 187(2), 143-152.

140. **Ünsoy, G.** (2013) *The Synthesis and characterization of doxorubicin and bortezomib loaded magnetic nanoparticles for targeting tumor cells*: MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY.
141. **Bahadori, F.** (2011) *Isolation and structure elucidation of vinca alkaloids from vinca species and investigation of cytotoxic activity of vinorelbine loaded nanodrug delivery systems*: Fatemeh Bahadori
142. Spink, C. H. (2008). Differential scanning calorimetry. *Methods in cell biology*, 84, 115-141.
143. Ono, D., Bamba, T., Oku, Y., Yonetani, T. ve Fukusaki, E. (2011). Application of Fourier transform near-infrared spectroscopy to optimization of green tea steaming process conditions. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112(3), 247-251.
144. Lin, S.-Y. ve Wang, S.-L. (2012). Advances in simultaneous DSC–FTIR microspectroscopy for rapid solid-state chemical stability studies: some dipeptide drugs as examples. *Advanced drug delivery reviews*, 64(5), 461-478.
145. Mudunkotuwa, I. A., Al Minshid, A. ve Grassian, V. H. (2014). ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid–solid interface in environmentally and biologically relevant media. *Analyst*, 139(5), 870-881.
146. **Lewis, D. ve Glasstone, S.** (1960). *Elements of physical chemistry*. Macmillan.
147. Vichai, V. ve Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1116.
148. Debele, T. A., Lee, K.-Y., Hsu, N.-Y., Chiang, Y.-T., Yu, L.-Y., Shen, Y.-A., ve ark. (2017). A pH sensitive polymeric micelle for co-delivery of doxorubicin and  $\alpha$ -TOS for colon cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(29), 5870-5880.
149. Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Salameh, N. M., Jamous, R. M. ve Hamadeh, A. M. (2016). Complementary and alternative medicine use among cancer patients in Palestine with special reference to safety-related concerns. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 104-122.
150. Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of food engineering*, 49(4), 311-319.
151. Pool, H., Quintanar, D., Figueroa, J. d. D., Marinho Mano, C., Bechara, J. E. H., Godínez, L. A., ve ark. (2012). Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2012.
152. Steele, V. E. ve Lubet, R. A., Year editör^editörler. The use of animal models for cancer chemoprevention drug development. Seminars in oncology; 2010: Elsevier; Published.
153. Gan, R.-Y., Li, H.-B., Sui, Z.-Q. ve Corke, H. (2018). Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(6), 924-941.

154. Wang, F., Jiao, P., Qi, M., Frezza, M., Dou, Q. P. ve Yan, B. (2010). Turning tumor-promoting copper into an anti-cancer weapon via high-throughput chemistry. *Current medicinal chemistry*, 17(25), 2685-2698.
155. Ouyang, J., Zhu, K., Liu, Z. ve Huang, J. (2020). Prooxidant Effects of Epigallocatechin-3-Gallate in Health Benefits and Potential Adverse Effect. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
156. Tang, Y., Zhao, D. Y., Elliott, S., Zhao, W., Curiel, T. J., Beckman, B. S., ve ark. (2007). Epigallocatechin-3 gallate induces growth inhibition and apoptosis in human breast cancer cells through survivin suppression. *International journal of oncology*, 31(4), 705-711.
157. HSUUW, Y. D. ve CHAN, W. H. (2007). Epigallocatechin gallate dose-dependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1095(1), 428-440.
158. Lambert, J. D., Kennett, M. J., Sang, S., Reuhl, K. R., Ju, J. ve Yang, C. S. (2010). Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food and chemical toxicology*, 48(1), 409-416.
159. Ramachandran, B., Jayavelu, S., Murhekar, K. ve Rajkumar, T. (2016). Repeated dose studies with pure Epigallocatechin-3-gallate demonstrated dose and route dependant hepatotoxicity with associated dyslipidemia. *Toxicology reports*, 3, 336-345.
160. Bouayed, J., Rammal, H. ve Soulimani, R. (2009). Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2.
161. Farhan, M., Khan, H. Y., Oves, M., Al-Harrasi, A., Rehmani, N., Arif, H., ve ark. (2016). Cancer therapy by catechins involves redox cycling of copper ions and generation of reactive oxygen species. *Toxins*, 8(2), 37.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Fatma KAZDAL

**Doğum Tarihi ve Yeri** :

**E-posta** :

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2012, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji
- **Yükseklisans** : 2016, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD, Biyoteknoloji

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi (TÜBİTAK MAM), Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Nisan 2010 – Staj, Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Trans-Genetik Araştırma Laboratuvarı; Türkiye'de ve dünyada sığır klonlaması; sığır türünü klonlayan tek laboratuvarıdır. Tedavi stratejileri geliştirmek için temel hücre kültürü yöntemlerini, insan ve hayvan hastalıklarının moleküler mekanizmalarını incelemek ve / veya transgenik hayvanlar üretmenin amacını anlamak.
- Zigomed Üreme Tedavi Merkezi, Medical Park Hastane Grupları • Ağustos 2009 - Androloji ve embriyoloji laboratuvarında staj, OPU, Denudasyon, ICSI, ET, Spermiyogram analizi ve tohumlama için sperm yıkama çalışmaları takip edildi.
- Padova Üniversitesi, İtalya, Erasmus Plus Değişim Programı ,Staj,
- International Best Poster Presentation, "Pre-formulation Of Solid Preparations Based On Nano-montmorillonite", Awarded Institution: , 24th World Nano Conference , ITALY, 08 May 2018.

### DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Kazdal F., Bahadori F., Demirel, Balkan E., Koçyiğit A.,** 2020. Yeşil kimya yöntemiyle oluşturulan PLGA-bakır hibrit nanopartiküllere yüklenen

epigallokateşinin meme kanseri üzerindeki in vitro ve in vivo anti-tümör etkilerinin incelenmesi. *International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry( BioTecBioChem2020)* , Aralık 16-18, 2020 Ankara, Turkey.

#### **DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:**

- F. KAZDAL, Inhibition of Amyloid  $\beta$  Aggregation Using Optimized Nano Encapsulated Formulations of Plant Extracts with High Metal Chelator Activities., *CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY*, 2019, 1389-2010, 1, 1, 1.
- F. KAZDAL, "quality-by-design Model In Optimization Of Peg-plga Nano Micelles For Targeted Cancer Therapy, *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 2018, 1773-2247, 48, 2018, 393-402.
- S. B. K. Z. B. F. E. Z. ÇERÇİ B.H. & F. KAZDAL, "investigation Of Pharmacokinetics Of Orally Administered Montmorillonit Using Fluorophore Compounds, Poster presentation, 24th World Nano Conference, 07 May 2018, 08 May 2018, Italy.
- S. B. Ç. B. B. F. K. F. E. Z KÜÇÜK Z. & F. KAZDAL, "pre-formulation Of Solid Preparations Based On Nano-montmorillonite, Poster Presentation, 24th World Nano Conference, 07 May 2018, 08 May 2018, Italy.
- F. KAZDAL & E. Z. K. A. Ş. V. Ö. Ö. B BAHADORİ F., In-vitro Investigation Of Changes In Efficacy And Toxicity Of Nano-paclitaxel During Co-applications With Antioxidant Natural Compounds, Oral presentation, In-vitro Investigation Of Changes In Efficacy And Toxicity Of Nano-paclitaxel During Co-applications With Antioxidant Natural Compounds", 07 May 2018, 08 May 2018, Italy.
- Ç. B. K. Z. B. F. K. F. E. Z SEVİM B.B. & F. KAZDAL, Optimization Of A New Controlled Release Oral Dexketoprofen Formulation, Poster presentation, , 24th World Nano Conference, 07 May 2018, 08 May 2018, Italy.
- Ç. B. K. F. K. T BAHADORİ F. & F. KAZDAL, "apolipoprotein E4 Mediated Targeting Of Blood Brain Barrier Using Nanomicellar Metal Chelators For Treatment Of Alzheimer?s Disease, Oral presentation , 3rd International Conference On Integrative Biology, 04 August 2015, 06 August 2015.

- F. KAZDAL & B. F. E. A. ÇELİK B., "plant Extracts As Metal Chelators For Treatment Of Alzheimer's Disease, Poster presentation, 3rd International Conference On Integrative Biology, 04 August 2015, 06 August 2015.
- K. F. Ç. B. BAHADORİ F. & F. KAZDAL, A Novel Nano Formulation For Synthetic And Plant Based Metal Chelators With Blood -brain Barrier Targeting Property For Treatment Of Alzheimers Disease, Oral presentation, 11th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (isops-11), 09 June 2015, 12 June 2015.
- A. Ş. BÜYÜK, G. SÖNMEZ, F. KAZDAL & F. BAHADORİ, Nano-celecoxib With Enhanced Anti-inflammatory Efficacy, Poster Sunumu, Ivek International Pharmaceuticals and Pharmacy Congress, 28 November 2014, 30 November 2014.

#### **Sertifika bilgisi**

- Deneý Hayvanları Kullanım Sertifikası; Sertifika Tarihi: 05.2015; Bezmialem Vakıf Üniversitesi'nden Kurum
- Certificate of Recognition , i08.2015, OMICS International Conferenceseries in **Valencia**
- Certificate of Completion, 07.2014, CHINA MEDICAL UNIVERSITY- **TAIWAN** : This is to certify that 2014 Summer Program which consist of 24 hours of Health and Society- Exchange in International Experience , Taiwan
- Certificate in English Studies, 01.2013 , Language Studies International, **London UK** ;has successfully completed the following course as "Upper-Intermediate Level"

#### **TÜBİTAK Bursları ve Destekleri**

117Z892, Türkiye Denizlerindeki Bazı Makroalglerin Fitokimyasal İncelenmesi ve Biyoaktif Bileşiklerinin Belirlenmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 13.09.2019 - 01.07.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.06.2018 - 15.03.2021.

#### **Diğer Beceriler ve İlgi Alanları**

- Beceriler ve Uzmanlık: Örgütsel / yönetimsel, analitik ve gözlem becerileri.
- Çok dilli konuşmacı: Türkçe (Anadili), İngilizce, İspanyolca (Başlangıç).

- Topluluklar: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde tüm öğrencileri içeren öğrenci temsilciliği
- Ümraniye belediyesinde bilimsel ve sosyal bir projenin sahibi ve yöneticisiyim. Bunun dışında “<https://www.neoldu.com/fatmakazdalhotmail-com-517bp-p1.htm>” adlı bir haber sitesinde güncel bilimsel yazıları paylaştığım bir bloğa sahibim.



