ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

2 BOYUTLU NANOMALZEMELERİN GLİOBLASTOMA FOTODİNAMİK TEDAVİSİNDE KULLANIMI

Aydan Fülden Ağan

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna

Haziran

2023

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Aydan Fülden Ağan

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna danışmanlığında Aydan Fülden Ağan tarafından hazırlanan bu çalışma 02/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA İmza:

Üye: Prof. Dr. Pınar Huri YILGÖR İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Üye: Doç. Dr. Önder METİN İmza:

Üye: Doç. Dr. Meral KEKEÇOĞLU İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

2 Boyutlu Nanomalzemelerin Glioblastoma Fotodinamik Tedavisinde Kullanımı

Aydan Fülden Ağan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna

Glioblastoma (GBM), beyinde glial hücrelerden kaynaklanan oldukça agresif bir tür beyin tümörüdür. Glioblastoma için tercih edilen standart tedavi cerrahi rezeksiyon, eş zamanlı radyoterapi ve kemoterapidir. Bu tedavilerin ardından hastalık nüksetme eğilimi gösterirken ölümcül prognozlu, hastalarda sağ kalımı oldukça düşürmektedir. Böylesi ölümcül bir tümör ile mücadele edebilmek için alternatif tedavi metotlarının geliştirilmesi kaçınılmazdır. Bu ihtiyaç doğrultusunda, planladığımız bu tez çalışmasında fotodinamik tedavi için kullanımı tercih edilen iki boyutlu nanomalzeme grafitik karbon nitrit ve MXene türevi molibden titanyum karbür kullanılmıştır. Glioblastoma tedavisi için etkin fotosensitizer dozu ve ışığa maruz kalma süreleri belirlenerek, fotodinamik tedavi potansiyeli ortaya konulmuştur. Fotodinamik tedavi günümüzde LED ışık veya lazer aracılığıyla gerçekleştirilebilmektedir. Çalışmamızda ışığın kanserli alana özgü olarak iletilebilmesi için; beyne implante edilebilen, biyouyumlu hidrojel mikroakışkan optik fiberler üretilmiştir. Bu sayede daha yüksek ışık kalitesi ve daha iyi optik hizalama amaçlanmıştır. Üretilen mikroakışkan optik fiberlerin optik ve mekanik karakterizasyonlarının yanı sıra ex-vivo etkinlik testleri gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında; ülkemizde ilk defa glioblastoma tedavisinde 2 boyutlu nanomalzeme grafitik karbon nitrit ve MXene kullanılarak pre-klinik aşamada fotodinamik tedavi protokolü oluşturulmuştur. Literatürde ilk defa beyne implante edilebilen fiber optik kablo ile kombine edilebilen mikroakışkan hidrojel optik fiber aracılı fotodinamik tedavi amacıyla biyomalzeme üretilmiş ve test edilmiştir.

2023, 141 sayfa

Anahtar kelimeler: Grafitik karbon nitrit, MXene, antitümör aktivite, fotodinamik tedavi, glioblastoma, mikroakışkan hidrojel optik fiber.

ABSTRACT

PhD Thesis

2D Nanomaterial Based Photodynamic Therapy Directed for Glioblastoma

Aydan Fulden Agan

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr. Acelya Yilmazer Aktuna

Glioblastoma (GBM) is a highly aggressive type of brain tumor arising from glial cells in the brain. Glioblastoma is usually treated with surgical resection, concurrent radiotherapy, and chemotherapy. While the disease tends to relapse after these treatments, it significantly reduces survival in patients with a fatal prognosis. In response to this need, the two-dimensional nanomaterials graphitic carbon nitrite and MXene derivative molybdenum titanium carbide, which are both preferred for photodynamic therapy, were used in this thesis. The effective photosensitizer dose and light exposure times for the treatment of glioblastoma were determined, and the potential for photodynamic therapy was revealed. Photodynamic therapy can be performed via LED light as well as using laser light to produce biocompatible hydrogel microfluidic optical fibers that can be implanted into the brain due to higher light quality and better optical alignment properties. Optical and mechanical characterizations of the produced microfluidic optical fibers as well as ex-vivo efficiency tests were carried out.In light of these findings, a photodynamic therapy protocol using 2-dimensional nanomaterial graphitic carbon nitrite and Molibden titanium carbur in the treatment of glioblastoma was developed in the pre-clinical stage for the first time in our country. For the first time in the literature, a biomaterial that can be combined with a fibers has been created and tested for the purpose of microfluidic hydrogel optical fiber mediated photodynamic therapy.

2023, 141 pages

Keywords: Graphitic carbon nitrite, MXene, antitumor activity, photodynamic therapy, glioblastoma, microfludic hydrogel optical fiber.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde akademik vizyonuyla bize her zaman yeni kapılar açan, ilmini ve tecrübelerini bizimle paylaşan her konuda örnek aldığım çok değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA'ya, Nanomalzemelerin temini ve karakterizasyonu konusunda yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yuri GOGOTSİ ve Sayın Doç. Dr. Önder METİN'e, TEM deneylerinde hücre kesitlerinin alınması ve analiz edilmesinde katkılarından ötürü Sayın Doç. Dr. Ahmet CEYLAN'a, öğretim görevlisi olarak çalışmaya başladığım Düzce Üniversitesi'nde akademik yaklaşımı bilen özümseyen ve özümsettiren sevgili hocalarım Sayın Doç. Dr. Meral KEKEÇOĞLU ve Sayın Dr. Öğretim Üyesi Salih Tunç KAYA'ya teşekkürü borç bilirim. Ankara Üniversitesi Yılmazer grup çalışma arkadaşlarım Cansu GÜRCAN ve Ömür BEŞBUL'a ve diğer grup üyelerine birlikte geçirdiğimiz bilgi alışverişinde bulunduğumuz her bir zaman için teşekkür ederim. Imperial College London'da araştırmalarımın gerçekleştirebilmem için bana laboratuvarını açan Sayın Dr. Ali KEMAL YETİŞEN'e ve ikinci danışmanımız olan Sayın Dr. Nan JIANG'a, laboratuvar koordinatörümüz Yubing HU'ya, fiber optik grubu sevgili çalışma arkadaşlarım Yuqian ZHANG ve Naihan ZHANG ve grup arkadaşım Eleni CHATZILAKOU'ya, teşekkür ederim. Lisans hayatımın başından beri yanımda olan beni her konuda yüreklendiren, her konuda her zaman desteğini ve dostluğunu esirgemeyen canım arkadaşım Öğr. Gör. Tuğçe ÇAPRAZLI'ya teşekkür ederim.

TEM analizinin gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarından faydalanmamızı sağlayan Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederim. Bu tezin gerçekleştirilmesinde Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine 21L0443001 numaralı tez destek projesi ile katkılarından dolayı teşekkür ederim.

2214-Yurt Dışı Doktora Sırası Bursu ile Imperial College London'da araştırmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu uzun doktora yolculuğumda her zaman yanımda olan beni destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkürleri sunarım. Her zaman, her koşulda, benimle gülen benimle ağlayan, her hafta Ankara'ya gidişlerimde bıkmadan beni destekleyen güzel kalpli sevgili eşim Dr. Kağan AĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **İ**

ONAY ..... **İİ**

ÖZET ..... **İİİ**

ABSTRACT ..... **İV**

TESEKKÜR ..... **V**

İCİNDEKİLER ..... **Vİ**

SEKİLLER DİZİNİ ..... **X**

CİZELGELER DİZİNİ ..... **XVİİİ**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **XİX**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **3**

2.1. BEYNİN GENEL YAPISI 3

2.2. GLİOBLASTOMA 3

2.3. FOTODİNAMİK TEDAVİ 4

2.3.1. Genel Bilgiler 5

2.3.2. Fotodinamik Tedavi Tarihi 7

2.3.3. Fotodinamik Tedavi Prensibi 8

2.3.4. Fotodinamik Tedavide Kullanılan Işık Kaynakları 9

2.3.5. Fotodinamik Tedavide Kullanılan Fotosensitizerler 11

2.3.6. Fotodinamik Tedavi ve Hücre Ölüm Mekanizmaları 12

2.3.6.1. Fotodinamik Terapide Nekrotik ve Apoptotik Hücre Ölümü 13

2.4. 2 BOYUTLU NANOMALZEMELER 14

2.4.1. 2 Boyutlu Nanomalzemelerin Fotodinamik Tedavide Kullanımı 15

2.4.1.1. Grafitik Karbon Nitrür 16

2.4.1.2. MXene 18

3. GEREKÇE VE AMAÇ 24

4. MATERYAL VE YÖNTEM 26

4.1. MATERYAL 26

4.2. YÖNTEM 27

4.2.1. LDH Protokolü 27

4.2.1.1. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Hücre Sayımı 28

4.2.1.2. Hücre Sayımı ve Kuyucuklara Hücre Ekimi 29

4.2.1.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi 30

4.2.1.4. Fotosensitizatör Ajanlar 31

4.2.1.5. LED Işık Uygulaması 31

4.2.2. Ölçüm ve Değerlendirmeler 32

4.2.2.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi 32

4.2.2.2. LDH Protokolü 32

4.2.2.3. Oksidatif Stressin İncelenmesi 33

4.2.2.4. Apoptoz ve Nekroz Tayini 34

4.2.2.5. 2 Boyutlu Nanomalzemelerin Hücre İçerisine Alım Mekanizmaları: Tem Mikroskopisi 36

4.3. HİDROJEL OPTİK FİBER ÜRETİMİ 37

4.4. HİDROJELİN OPTİK KARAKTERİZASYONLARI 38

4.4.1. Işık İletimi ve Işık Azalması Deneyleri 38

4.4.2. Işık Kırınımı Deneyi 39

4.5. HİDROJEL LİFLERİNİN MEKANİK TESTİ 40

4.6. MİKROAKIŞKAN TESTİ 40

4.7. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN ŞİŞME KARAKTERİZASYONLARI 41

4.8. EX VİVO MİKROAKIŞKAN HİDROJEL OPTİK FİBERİN TEST EDİLMESİ 42

4.9. SİNGLET OKSİJEN ÜRETİMİ VE ROS ÜRETİMİ DENEYLERİ 42

4.10. MİKROAKIŞKAN HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN MGP-CN ARACILI HÜCRE CANLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ 44

4.11. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN BİYOUYUMLULUKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ . 45

4.12. İSTATİSTİK ANALİZİ 46

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 47

5.1. HÜCRE CANLILIĞI SONUÇLARI 47

5.2. OKSİDATİF STRES SONUÇLARI 51

5.3. HÜCRESEL ÖLÜM MEKANİZMASI SONUÇLARI 54

5.4. 2 BOYUTLU NANOMALZEMELERİN HÜCRE İÇERİSİNE ALIM MEKANİZMALARI SONUÇLARI 57

5.5. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN OPTİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 61

5.6. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN TEST EDİLMESİ 67

5.7. MPG-CN'İN SİNGLET OKSİJEN VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ÜRETME POTANSİYELLERİNİN TEST EDİLMESİ 70

5.8. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN OPTİK VE MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN EX VİVO BEYİN DOKUSUNDA TEST EDİLMESİ 73

5.9. MİKROAKIŞKAN HİDROJEL OPTİK FİBER ARACILI *IN VITRO* FDT SONUÇLARI 77

5.10. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN BİYOUYUMLULUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ 79

6. TARTIŞMA VE SONUÇ 81

6.1. TARTIŞMA 81

6.2. SONUÇ 86

KAYNAKLAR 88

ÖZGECMİŞ 103

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR 109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Triplet ve singlet oksijen elektron dağılımını gösteren moleküler orbital diyagramları şematik gösterimi. 6

Şekil 2.2. FDT'de Tip I ve Tip II Mekanizmasının şematik gösterimi (21) 7

Şekil 2.3. $Mo_2Ti_2C_3$ ve g-C_3N_4 kullanılarak PDT uygulaması şematize. 2 boyutlu nanomalzeme $Mo_2Ti_2C_3$ ve g-C_3N_4 (solda), tümör dokusunun fotosensitizer ve ışığa maruz kalması (sağda). 15

Şekil 2.4. FDT uygulaması sonrası iki boyutlu nanomateryallerin ROS üretim diyagramı. 15

Şekil 2.5. g-C_3N_4 nanotabakasının sıvı-eksfoliasyon işlemi eldesinin şematik gösterimi (70) 16

Şekil 2.6. MAX ve MXene yapılarının periyodik tabloda gösterimi (M (geçiş metali), A (A grubu element), X (C veya N)) A katmanının seçici olarak aşındırılması metoduyla elde edilen 30 kadar MXene türü deneysel olarak sentezlenmiştir (yeşil renk ile belirtilen) (84) 19

Şekil 4.1. Hücre Morfolojisi (a) U 87 hücresi (40X), (b) L929 hücresi (40X) 28

Şekil 4.2. Kuyucuklara hücre ekimi 30

Şekil 4.3. 520 nm dalga boyunda LED ışığa maruz bırakılan U87 hücrelerinin nanomalzeme varlığında ve yokluğundaki ışık kaynağına maruziyetinin değerlendirilmesi. 31

Şekil 4.4. Akım sitometri Annexin V&PI boyama şematik gösterimi 35

Şekil 4.5. TEM mikroskobu ve hücre kesitlerini taşıyan gridlerin tutucuya yerleştirilmesi. 37

Şekil 4.6. (a) Silikon tüp içerisine monomer enjeksiyonu, (b) UV ışığı altında PEGDA, AM monomer kroslinki (c) Hidrojelin silikon tüp içerisinden çıkarılması. 38

Şekil 4.7. Işık iletimi deneyi şematize gösterimi 39

Şekil 4.8. Abbe 5 Refractometer (Bellingham + Stanley)..... 39

Şekil 4.9. Hidrojel optik fiberlerin mekanik stres ölçümleri. (a) Klemplenmiş hidrojel optik fiber (b) Klemplenmiş içi boş hidrojel optik fiber. Ölçek Çubuğu = 5mm 40

Şekil 4.10. Mikroakışkan hidrojel optik fiber üretimi (a) Mikroakışkan kanal içerisine floresan boya enjekte edilmiştir (b) 0,2 mm, 0,5 mm ve 0,8 mm mikroakışkan boşluk çapına sahip hidrojel optik fiberler. 41

Şekil 4.11. Mikroakışkan hidrojel fiber boyuna ve enine kesit gösterimi. (Fiber yeşil floresan boya ile kros link edilmiştir. Mikroakışkan boşluk içerisine floresan boya enjekte edilmiştir. Bu şekil 450 nm ışık ile altında Samsung Note 9 kamera ile görüntülenmiştir). 41

Şekil 4.12. Ex-vivo ışık zayıflatma deney düzeneği. 42

Şekil 4.13. Singlet oksijen üretim potansiyelinin test edilmesi için mpg-CN'in 520 nm lazer ışığa maruz bırakılması 43

Şekil 4.14. Fiber optik aracılı *in vitro* PDT deney düzeneği. U 87 hücreleri kuyucuklara ekildikten sonra 100 µg/mL mpg-CN'e 4 saat maruz bırakılmıştır. Ardından 520nm lazer ışığı ile 5 dakika muamele edilmiştir. (a-b) fiber optik lazer aracılı PDT ve domuz deri bariyeri ile PDT (c-d) fiber optik lazer ile bağlanmış hidrojel optik fiber aracılı PDT ve domuz deri bariyeri ile PDT (e-f) fiber optik lazer ile bağlanmış mikroakışkan kanallı hidrojel optik fiber aracılı PDT ve domuz deri bariyeri ile PDT 45

Şekil 4.15. Konfokal mikroskop ve Kalsein AM/EthD-1 boyama analizi 46

Şekil 5.1. U 87 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml) $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***p<0,001, varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen $Mo_2Ti_2C_3$ ve $Mo_2Ti_2C_3$ +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir)..... 48

Şekil 5.2. U 87 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml) mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W 520 nm

led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***p<0,001, varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen mpg-CN ve mpg-CN +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir) 48

Şekil 5.3. L 929 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml) $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W 520nm led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***p<0,001, varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen $Mo_2Ti_2C_3$ ve $Mo_2Ti_2C_3$ +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir) 49

Şekil 5.4. L 929 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W 520nm led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***p<0,001 varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen mpg-CN ve mpg-CN +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir) 50

Şekil 5.5. U 87 hücresinin 100 µg/ml konsantrasyonunda mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 0.5 ve 1 saatlik 50 W 520nm led ışık varlığında hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). L 929 hücresinin 100 µg/ml konsantrasyonunda mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 0.5 ve 1 saatlik 50 W 520nm led ışık varlığında hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). 51

Şekil 5.6. U87 hücresinin intraselüler ROS üretiminin değerlendirilmesi (20X) (Abcam 113851). (a) kontrol grubu, (b) sadece ışık uygulama grubu, (c) sadece mpg-CN uygulama grubu, (d) mpg-CN +520 nm LED ışık uygulama grubu, d) sadece $Mo_2Ti_2C_3$ uygulama grubu, (e) $Mo_2Ti_2C_3$+520 nm LED ışık uygulama grubu. (520 nm LED ışık maruziyet süreler 1 saattir.) 53

Şekil 5.7. U 87 hücresinin intraselüler ROS üretiminin mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ ve 520 nm Led ışığa maruz bırakılmış hücrelerde floresans miktarının ölçülmesi belirlenmesi (P<0,05; n=5)..... 54

Şekil 5.8. Akım sitometri apoptoz analizi; U 87 hücresinin mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ (100 µg/ml) ile muamele edilmesi ve 1 saat ışığa maruz bırakıldıktan 12 saat sonra hücreler toplanarak PI-AnnexinV Thermo (1809498) ile boyaması. Hücre popülasyonu akım sitometri aracılığıyla canlı, erken apoptotik, geç apoptotoik ve nekrotik hücrelerin % dağılımını belirlemek için 10.000 event değerlendirilmesi. 55

Şekil 5.9. 100 µg/ml mpg-CN ile muamele edilen U87 hücrelerinin Annexin V FITC/PI akım sitometri analizi. 100 µg/ml $Mo_2Ti_2C_3$ ile muamele edilen U87 hücrelerinin Annexin V FITC/PI akım sitometri analizi. 56

Şekil 5.10. U 87 hücresinin TEM analizi (kontrol grubu)..... 58

Şekil 5.11. U 87 hücresinin TEM analizi. mpg-CN ile muamele edilen U 87 hücrelerinde mpg-CN ‘in hücre içerisine alınımının TEM analizi. 59

Şekil 5.12. U 87 hücresinin TEM analizi. mpg-CN ile muamele edilen U 87 hücrelerinde mpg-CN ‘in hücre içerisine alınımının TEM analizi. 59

Şekil 5.13. U 87 hücresinin TEM analizi. mpg-CN ile muamele edilen U 87 hücrelerinde mpg-CN ‘in hücre içerisine alınımının TEM analizi. 60

Şekil 5.14. U 87 hücresinin TEM analizi. $Mo_2Ti_2C_3$ ile muamele edilen U 87 hücrelerinde $Mo_2Ti_2C_3$ ‘ün hücre içerisine alınımının TEM analizi. 60

Şekil 5.15. U 87 hücresinin TEM analizi. $Mo_2Ti_2C_3$ ile muamele edilen U 87 hücrelerinde $Mo_2Ti_2C_3$ ‘in hücre içerisine alınımının TEM analizi. 61

Şekil 5.16. Mikroakışkan kanal içeren hidrojel optik fiberin grafitik karbon nitrür ile glioblastoma tedavisinin şematik gösterimi. (a) Fotodinamik terapi minimal invaziv prosedürler hidrojel optik fiberin nanomalzeme (mpg-CN) salımı kanser tedavisi için beyne insert edilmesinin şematize edilmesi. (b) 520nm lazer ışığı ve nanomalzeme (mpg-CN) uygulamasının ardından kanser dokusunda ROS üretimine bağlı hücre ölümünün şematik gösterimi..... 62

Şekil 5.17. Hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) optik özelliklerinin test edilmesi. (a) Işık iletimi ölçümü için optik deney düzeneğinin gösterimi. Ölçek çubuğu=2cm. (b) Farklı çapraz bağlanma yoğunluklarına sahip optik hidrojel fiberlerin (AM-co-PEGDA)

mikroskobik görüntüleri (Ø=1 mm). i) %95 ii) %90 (c) 450 nm, 520 nm, 650 nm dalga boyundaki ışık kaynağı ile kombine edilen farklı uzunluklardaki (1 cm, 3 cm, 5 cm) hidrojel optik fiberlerin ışık iletimi Ölçek çubuğu=1cm. (d) 450 nm, 520 nm, 635 nm dalga boyundaki ışık kaynağı ile kombine edilen farklı çaplarda üretilmiş hidrojel optik fiberlerin (0,8 mm, 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm) ışık iletimi. Ölçek çubuğu=1 cm..... 63

Şekil 5.18. (a) Farklı dalga boyunda farklı monomer oranına sahip hidrojel optik fiber (AM-co-PEGDA) ışık iletimi. (b) Farklı lazer ışığında (450 nm, 520 nm, 635) farklı uzunluklardaki (1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm) hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) ışık zayıflaması 64

Şekil 5.19. Farklı AM konsantrasyonundaki kırılma indisinin değerlendirilmesi. Monomer solüsyonu (AM:PEGDA) ve (AM-co-PEGDA) (%2:3 wt/v seyreltme), havada muhafaza edilmiş hidrojeller, DI su içerisinde muhafaza edilmiş hidrojeller, PBS (pH 7.4) içerisinde muhafaza edilmiş hidrojellere ait kırılma indisi değerleri. 65

Şekil 5.20. 0,2 mm, 0,5 mm, 0,8 mm ve 1 mm çaplı içi boş yapıların 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm ve 3 mm çapındaki hidrojel optik liflerinin (AM-co-PEGDA) mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu = 200 mm..... 66

Şekil 5.21. Optik hidrojel optik fiberleri ışık azalmasını değerlendirilmesi. (a) 2 mm dış çapa sahip mikroakışkan boşluğu hava ile dolu olan hidrojel optik fiberleri ışık azalması. (b) 2 mm dış çapa sahip mikroakışkan boşluğu PBS ile dolu olan hidrojel optik fiberleri ışık azalması. 67

Şekil 5.22. Am-co-PEGDA hidrojel optik fiberlerin mekanik dayanıklılık özelliklerinin değerlendirmesi. (a) Mikroakışkan boşluk içermeyen hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) çekme gerilme testi. Ø=1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm. (b) Mikroakışkan boşluk içeren hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) çekme gerilme testi Fiber Ø=1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm. Mikroakışkan kanal Ø= 0,5 mm. (n=3). 68

Şekil 5.23. Am-co-PEGDA mikroakışkan hidrojel optik fiberlerin akışkan hızlarının değerlendirlmesi. (a) 0,2 mm, 0,5 mm, 0,8 mm mikroakışkan iç çapına sahip fiber içerisindeki PBS akış hızı (b) Mikroakışkan iç çapı 0,2 mm, 0,5 mm, 0,8 mm olan fiberlerin zamana bağlı akış hızı (µl/min). 69

Şekil 5.24. Fiber optik kablo ile Am-co-PEGDA mikroakışkan kanal içeren hidrojel optik fiberin birleştirilmesi I) Lazer ışığı kapalı iken mikro akışkan sistem, II) Beyaz ışık ile kombine edilen mikro akışan hidrojel optik fiber sistemi, III) 520 nm ışıkla kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber. (Dış Ø = 2mm, iç Ø = 0,5 mm)..... 69

Şekil 5.25. Farklı monomer oranlarındaki Am-co-PEGDA hidrojel optik fiberlerin (%95, %90, %80, %70, %60 AM-co-PEGDA) zamana bağlı şişme grafiği (n=3)..... 70

Şekil 5.26. DCFH2-DA molekülünün ROS varlığında oksidasyonu sonucu floresan DCF molekülüne dönüşümü (114)..... 71

Şekil 5.27. DPBF (1,3-Diphenylisobenfuran) molekülünün oksitlenmesi sonucu 1,2-dibenzoylbenzene (DBB) oluşumu (73,115)..... 71

Şekil 5.28. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış mpg-CN'ler. (i) mpg-CN (ii) 0,2 mg/ml distile su ile disperse edilmiş mpg-CN (iii) 0,02 mg/ml distile su ile disperse edilmiş mpg-CN, (iv) 0,002 mg/ml distile su ile disperse edilmiş mpg-CN. 72

Şekil 5.29. mpg-CN'in floresans yoğunluğu ve ROS floresans yoğunluğu. (a) 0,02 µg/ml mpg-CN'in 405 nm dalga boyunda uyarılması sonucu farklı dalga boylarındaki floresans yoğunluğu. (b) 0,02 µg/ml mpg-CN'in zamana bağlı ROS üretimi (n=3). 72

Şekil 5.30. Metilen mavisi ile mpg-CN'in lazer ışığına maruz bırakılarak singlet oksijen üretim potansiyellerinin farklı zaman aralıklarında (0, 20,40… 140s) değerlendirilmesi (a) 405 nm lazer ışığına maruz bırakılan mpg-CN'in singlet oksijen üretimi absorbans grafiği (b) 450 nm lazer ışığına maruz bırakılan mpg-CN'in singlet oksijen üretimi absorbans grafiği (c) 520 nm lazer ışığına maruz bırakılan mpg-CN'in singlet oksijen üretimi absorbans grafiği (d) 414 nm dalga boyunda metilen mavisi ve mpg-CN absorbans değerleri. (e) 520nm ışığa maruz bırakılan metilen mavisi singlet oksijen üretimi absorbans grafiği. 73

Şekil 5.31. Ex vivo kuzu beyni modelinde ışık yayılımı. 520 nm lazer optik kablo ile kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) insan kafatası modeli içerisine yerleştirilmiş beyin dokusu içerisine insert edilir. Ölçek çubuğu =2cm. 75

Şekil 5.32. (a) 520 nm lazer optik kablo ile kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) ex-vivo kuzu beyni dokusu içerisine yerleştirilmesi. Mikroakışkan kanal floresan boya ile belirtilmiştir. Sağda lazer ışığı kapalıyken ex-vivo kuzu beyni içerisine insert edilmiş mikroakışkan optik fiber gösterilmiştir. Ölçek çubuğu = 2cm. (b) (i) 520 nm lazer optik kablo ile kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) ex-vivo kuzu beyni dokusu içerisinde ışık dağılımının gösterilmesi. (ii) Lazer ışığı kapalı iken mikroakışkan hidrojel optik fiberin (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) ex-vivo kuzu beyni içerisine yerleştirilmesi. Ölçek çubuğu =2cm. 75

Şekil 5.33. (a) Beyin dokusuna insert edilen içi boş hidrojel optik fiberin, hava dolu hidrojel optik fiberin, PBS dolgulu hidrojel fiberin (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) beyin dokusunda ışık zayıflaması. Ölçek çubuğu = 2 cm. (b) 3 mm kalınlığında kesit alınan beyin dokusunda farklı dalga boylarında ışığın optik penetrasyon grafiği. 76

Şekil 5.34. Beyin dokusu içerisine insert edilen içi boş hidrojel optik fiberin (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) farklı hacimlerde mpg-CN'in zamana bağlı hacimsel akış hızı. 76

Şekil 5.35. U 87 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml) mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO_2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 10 dakika 520 nm lazer ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301) 77

Şekil 5.36. U 87 hücresinin 200 µg/ml mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO_2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 10 dakika 520 nm lazer ışığına maruz bırakılması. Fiber, hidrojel fiber, mikroakışkan hidrojel fiber ile domuz derisi bariyeri ile kombine edilmiş ışık kaynağı aracılı hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301) 78

Şekil 5.37. U 87 hücresinin 200 µg/ml mpg-CN varlığında 10 dk 520 nm lazer ışığına maruz bırakılması sonucu hücre canlılığının konfokal mikroskop aracılığıyla değerlendirilmesi (Thermo Calcein AM/Etbr-1) 79

Şekil 5.38. U87 hücrelerinin 24 saat, 48 saat ve 72 saat zaman süreyle AM-co-PEGDA optik fiberlere ile maruziyeti sonucu biyouyumluluğunun değerlendirilmesi (Thermo C20301) 80

Şekil 5.39. U87 hücrelerinin 24 saat, 48 saat ve 72 saat zaman süreyle AM-co-PEGDA optik fiberlere ile maruziyeti sonucu biyouyumluluğunun konfokal mikroskop aracılığıyla değerlendirilmesi (Thermo Calcein AM/Etbr-1)..... 80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. DSÖ 2016 Verilerine Göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri (10)..... 4

Çizelge 2.2. Biyouyumlu optik fiber ve dalga kılavuzu üretmek için tercih edilen materyaller ve üretim metotları (45)..... 10

Çizelge 2.3. 2 Boyutlu Nanomalzeme Grafitik Karbon Nitrür'ün *In Vitro* ve/veya *In Vivo* FDT/FTT Araştırmalarında Kullanımı..... 18

Çizelge 2.4. 2 Boyutlu Nanomalzeme Mxene'in *In Vitro* ve/veya *In Vivo* FDT/FTT Araştırmalarında Kullanımı..... 21

Çizelge 4.1. Kullanılan Hücre hatları ve üretim koşulları..... 26

Çizelge 4.2. LDH kit içeriği..... 32

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AM	Akrilamid
Apo1	Accumulation of Photosystem One1
BCL-2	B-Cell Lymphoma
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CD120	Cluster of Differentiation 120
CD95	Cluster of Differentiation 95
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCFH2-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DBB	1,2-dibenzoylbenzene
DCF	1,2-dibenzoylbenzene
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNA	Deoksiribonükleik Asit
eV	Elektron Volt
F	Flor
FAS	FAS Geni Tarafından Kodlanan Bir Protein
FS	Fotosensitizer
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFP	Yeşil Floresan protein

g-C_3N_4	Grafitik Karbon Nitrit
IDH	İzositrat Dehidrojenaz
LED	Light Emitting Diode
MB	Metilen blue
MoS_2	Molibden Disülfit
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NIPAM	N-izopropilakrilamid
NIR	Kızılötesine Yakın Spektroskopisi
nM	Nanometre
O	Oksijen
$^1O_2$	Singlet Oksijen
OH	Hidroksil
P55	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
PAI	Photo Acustic Imacing
PEGDA	Polietilen Glikol Diakrilat
PI	Propidyum İyodür
Rcf	Relative Centrifugal Force
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	Revolution Per Minute
Ti_3C_2	Titanyum Karbür

TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNFR1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
WHO	World Health Organization
WS_2	Tungsten Disülfür
WT	Wild Type

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organization) 2020 yılı verilerine göre; dünya çapında 19,2 milyon insan kanser olmuş ve 9,9 milyon kişi bu hastalık dolayısıyla hayatını kaybetmiştir. 2040 yılına kadar bu rakamların, 29-37 milyon kişiyi bulacağı tahmin edilmektedir (1). Dünyada ve ülkemizde kanser nedeniyle ölüm, tüm ölüm sebepleri içerisinde ikinci sırada yerini almıştır. Küresel olarak yaklaşık her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser dolayısıyla gerçekleşmektedir. Hastaların sağkalım oranı 14,6 ile 20,5 ay arasında değişmektedir. Bu tahminler doğrultusunda kanser tedavilerinin geliştirilmesi kaçınılmaz görünmektedir. Geleneksel kanser tedavilerinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi uygulamaları tercih edilirken hastada minumum yan etkiye sebep olabilecek güncel tedavilerin geliştirilmesi halen çağımızın en önemli ihtiyaçları arasında görülmektedir (2–5)

Merkezi sinir sistemi (MSS) primer tümörlerinin %77-81'ini oluşturan glioblastoma multiforme (GBM), yetişkinlerde en yaygın görülen malign primer beyin tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü tarafından sağ kalım oranı yaklaşık iki yıl kadar olan; astrositik ve oligodendroglial hücrelerde ortaya çıkan bu tümör IV. derece glioblastoma olarak derecelendirilmiştir. Glioblastoma tedavisinde; tıbbın ve cerrahinin bu kadar gelişmiş olmasına rağmen, bu kanserin agresyonunun yüksek olması sebebiyle hayatta kalma oranı oldukça düşüktür. GBM tedavisinde multidisipliner bir yaklaşım gerekmektedir. GBM'in standart tedavi prosedürü; cerrahi rezeksiyon ve sonrasında eşzamanlı radyoterapi ve kemoterapidir. Bu tedavilerde beynin karmaşık ve hassas yapısı invaziv tedavilerin uygulanabilirliğini güçleştirmekte ve güvenilir alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini kaçınılmaz kılmaktadır (2,6).

Bu tedavilerden birisi olan fotodinamik tedavi; ışığa duyarlı belli floresan özellikteki fotosensitizer olarak isimlendirilen maddelerin kanser dokusunda lokalize olması ve belli dalga boylarında ışık ile uyarılmasıyla spesifik ölüm mekanizmalarını aktifleşmesini sağlamaktadır. Fotosensitizer olarak nanopartiküllerin kullanımı ise çok güncel bir araştırma alanı olmakla birlikte sonuçları oldukça umut vadedici olmuştur.

2 boyutlu nanomalzemelerin tıpta kullanımına vurgu yapan bu tez çalışmasında; tıpta kullanımı henüz çok yeni olan, MXene türü titanyum karbür ($Mo_2Ti_3C_2$) ve grafitik karbon nitrür (mpg-CN) gibi 2 boyutlu nanomalzemelerinin, hücre kültüründe, glioblastoma

kanser hücresi üzerinde etkinliklerini araştırılmıştır. Deneyler sırasında etkin ışık dozu ve süresi, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, hücresel ölüm mekanizmaları ve hücre içerisine alım mekanizmaları ortaya konularak pre-klinik verilerin ortaya konulması sağlanmıştır. Ayrıca, glioblastoma fotodinamik tedavide en önemli limitlerden birisi olan ışık penetrasyonunu arttırabilmek amacıyla biyouyumlu implante edilebilir biyomalzeme üretilmiştir. Hidrojel fiber içerisine mikroakışkan kanal oluşturularak hem nanomalzemelerin akışına izin veren hem de optik fiberler ile kombine edilerek ışığın penetrasyonu arttıran kombine bir tedavi protokolü hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

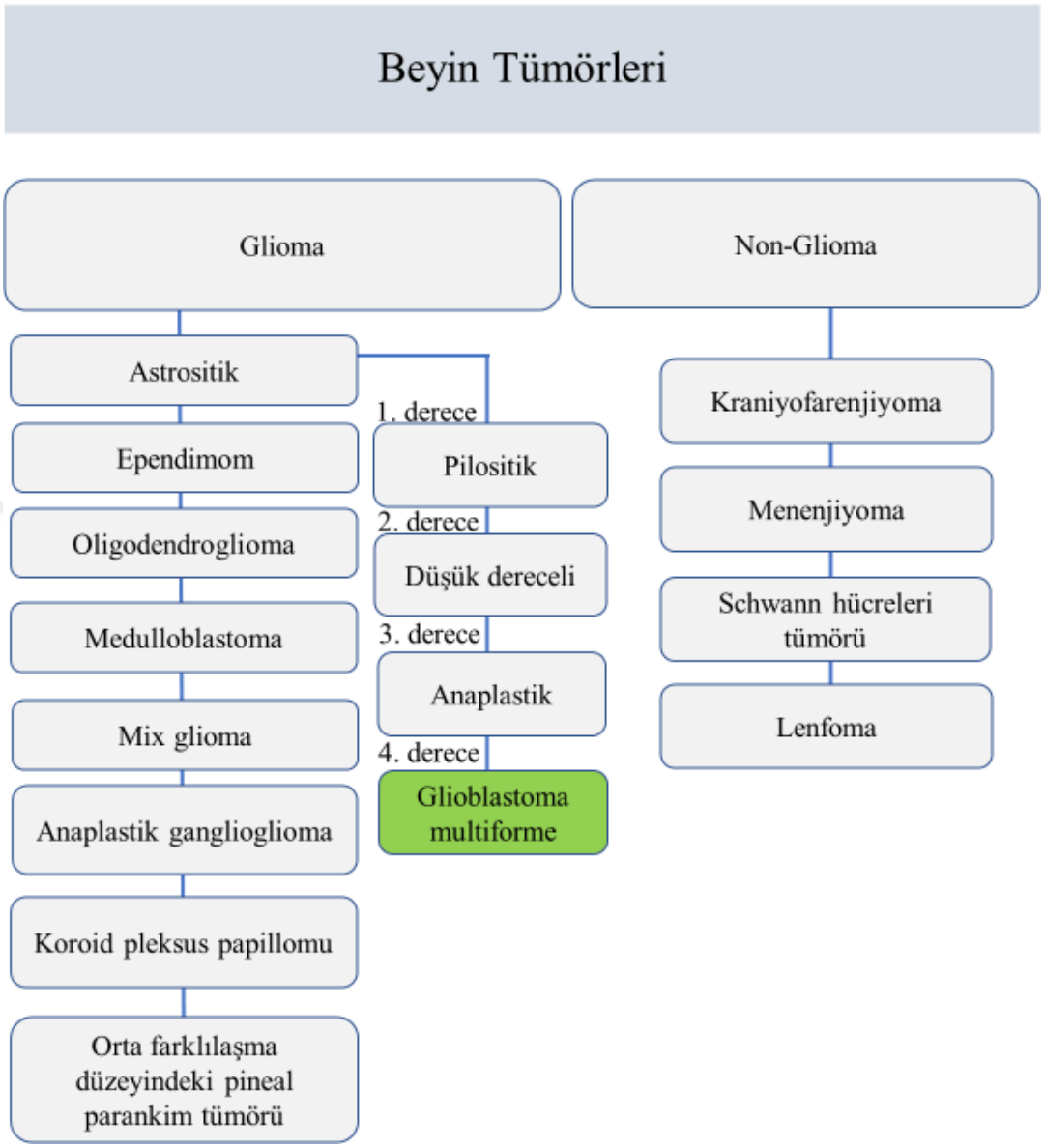
2.1. BEYNİN GENEL YAPISI

Merkezi sinir sisteminin (MSS) en önemli bölümü olan beyin insanlarda ortalama 1400-1500 gr ağırlığındadır. Ortalama yüz milyar nöron barındırır. Kendi içerisinde 4 bölüme ayrılan beyin serebrum, diencephalon (ara beyin), truncus cerebri (beyin sapı) ve serebellum olarak adlandırılır. Beynin en büyük kısmını oluşturan serebrum longitunal eksende iki hemisfere ayrılır. Her iki hemisfer ayrı ayrı sulcus centralis, sulcus lateralis, sulcus parieto-occipitalis olarak üç loba ve lobus frontali, lobus parietalis, lobus temporalis, lobus occipitalis olarak ise dört loba ayrılır. Omurilik ise omurga içerisinde bulunan MSS'nin en son parçasıdır. Omurilik dışta ak madde ve içte boz maddeyi içerir. Ara beyin serebral hemisfer ile beyin sapı arasında bulunmaktadır. Thalamus, hypotalamus, subthalamus, metathalamus, epithalamustan oluşur. Beyin sapı ise, soluma, yutkunma ve kalp ritminin düzenlenmesi gibi hayati fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumlu alanlara ev sahipliği yapar(7).

2.2. GLİOBLASTOMA

Glioblastoma; kanserlerin %1,5'inden ve kanserlere bağlı ölümler içerisinde de %2'lik bir kısımdan sorumludur. Bu dilim tüm kanserler içerisinde glioblastomaya bağlı ölümlerin 4. sırada olmasına sebep olmaktadır. Glioblastomanın erkeklerde görülme oranı kadınlara göre çok daha fazladır. Glioblastoma yetişkinlerde en fazla görülen beyin tümörü türü olmakla beraber beynin hemisferlerinde, subkortikal beyaz madde ve gri maddeye yerleşim göstermektedir. Hastaların tanı sonrası sağ kalımı yaklaşık 2 yıl kadardır (8). Glioblastomaların %90'ını izositrat dehidrojenaz 1 (IDH) mutant olmayan, primer glioblastomalar oluşturmaktadır. Primer glioblastoma; ilerleyen yaşla birlikte ortaya çıkan, glial hücrelerden köken alan IV. derece glioblastomalardır. IDH mutant, sekonder glioblastoma ise, genelde erken yaşlarda ortaya çıkan II. III. derece tümörler olup hastaların hayatta kalma süresi daha fazladır (9,10). Glioblastomanın çeşitli histopatoloji ve moleküler sınıflandırmaları zaman içerisinde ortaya konulmuş ve en son DSÖ'nün 2016 yılında yayınlamış olduğu farklı klinik ve histolojik bulguların da değerlendirildiği IDH mutasyonu, 1. Kromozom kısa kolu (1p), 19. Kromozom uzun kolunun (19q) kodelesyonuna gibi genetik değişikliklerine göre sınıflandırılmıştır (11).

Çizelge 2.1. DSÖ 2016 Verilerine Göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri (10)



Bu tür sınıflandırmaların en önemli gereklilik sebebi klinikte uygun tedavinin seçilebilmesi, adjuvan radyoterapi ve spesifik kemoterapi seçiminde önem arz etmesidir. Glioblastomada standart tedavi cerrahi rezeksiyon, eş zamanlı radyoterapi ve kemoterapidir. 2000'li yıllardan sonra kemoterapide temozolamid ilacı kullanılmıştır. Glioblastoma tedavisinde onkoloji, nöroşirurji, nöroloji ve radyasyon onkolojisi dahilinde multidisipliner bir tedavi protokolü uygulanmaktadır (12).

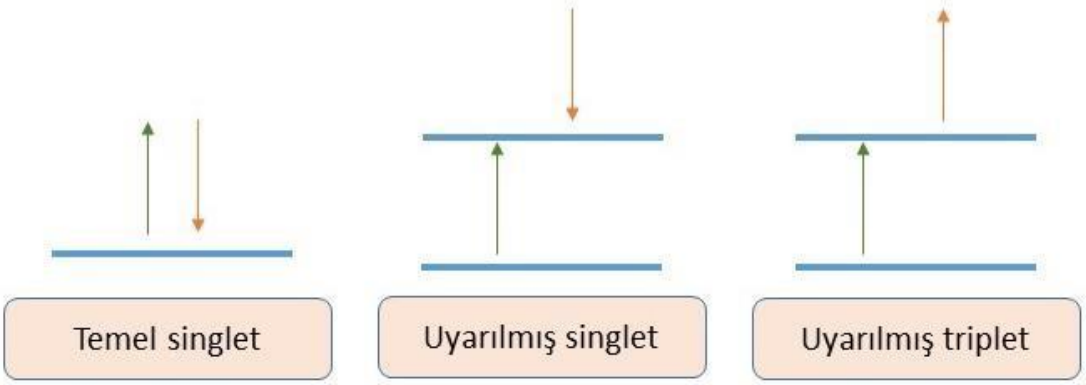
2.3. FOTODİNAMİK TEDAVİ

Kanser tedavilerinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi ve küçük molekül temelli tedavilerin kombinasyonları uygulanmaktadır. Kemoterapi uygulamalarında,

sistemik yan etkiler ortaya çıkmakla beraber, radyasyon tedavisinde kümülatif radyasyon dozu sınırlayıcı olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların neden olduğu toksisite, immün baskılanma ve diğer yan etkilerin azaltıldığı ya da ortadan kaldırıldığı alternatif tedavi arayışı halen daha bu yüzyılın en önemli sağlık sorunudur. Geleneksel kanser tedavilerinin yansıra geliştirilecek olan tedaviden beklenilen özellikler; güvenli kullanım sağlaması, etkinliğinin yüksek olması ve maliyetinin uygun olmasıdır (13). Bu ihtiyaçlardan yola çıkılarak araştırılan fotodinamik tedavi (FDT), tümöre özgün olarak bağlanan ışığa duyarlılaştırıcının (fotosensitizer) ve fotosensitizeri (FS) etkinleştirmek amacıyla belirli bir dalga boyunda ışığa maruziyetini içerir. Işık kaynağı aracılığıyla tümörün lokal olarak aydınlatılması FS etkinleştirilmesi sonucu, FS enerjisini moleküler oksijene aktarır. Bu sayede tümör hücresinin, temel hücresel makromolekülleri hedefleyerek, oksitleyebilen singlet oksijeni ($^1O_2$) gibi sitotoksik reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir (14). Bu nedenle FDT'de, sistemik toksisiteye neden olan kemoterapi ilaçlarının ve komşu normal dokulara zarar veren iyonlaştırıcı radyasyon tedavisinin aksine, biyolojik sistemler üzerinde toksik etkisi olmayan bileşenler kullanır (13).

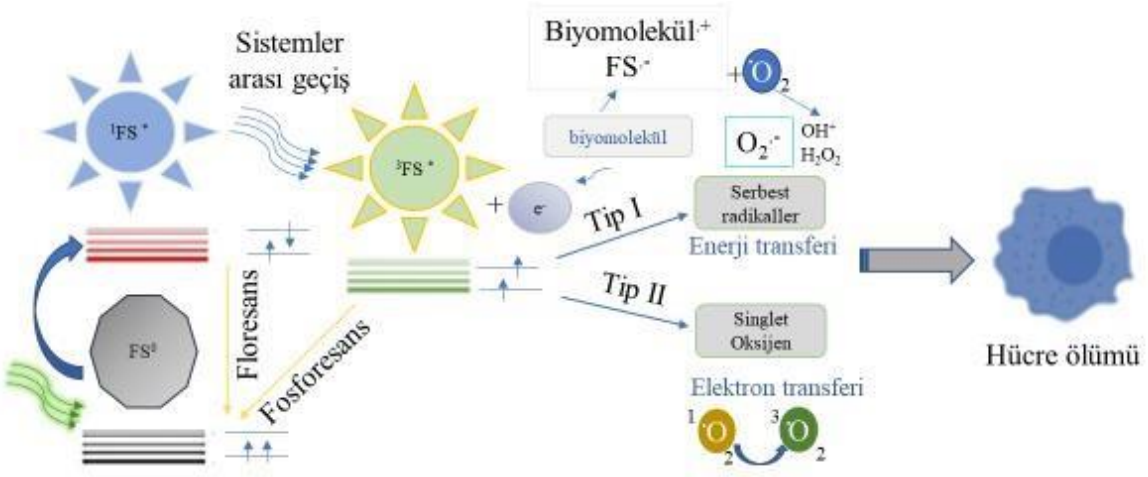
2.3.1. Genel Bilgiler

Bir molekülün ışık ya da ısı enerjisine maruz kalması sonucunda yapısında değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler molekülün elektronik, titreşim ve dönme enerji seviyelerinde değişiklik yaratabilir. Elektronik değişikliğe 200-800 nm arasında ışık enerjisi sebep olur. Bu elektronik değişim, titreşim ve dönme düzeylerinden meydana geldiği için bu durum atomlarda keskin soğurma çizgisi yerine, moleküler absorbsiyonda geniş bir soğurma bandına neden olur. Moleküldeki en yüksek enerjili elektronlar, spinleri temel düzeyde eşleşmiş, singlet olarak ifade edilmektedir. Singlet haldeki iki elektrondan bir tanesinin enerji alarak bir üst enerji seviyesine çıkması uyarılmış triplet halin oluşmasına neden olur. Uyarılmış singlet hal ile triplet hal arasındaki temel farklılık spinlerin farklı yönlenmesidir. Uyarılmış durumda zıt spinde bulunurken, triplet durumda paralel olarak bulunmaktadır (15,16).



Şekil 2.1. Triplet ve singlet oksijen elektron dağılımını gösteren moleküler orbital diyagramları şematik gösterimi.

Işık aracılığıyla uyarılmış fotosensitizerler iki tip davranış gösterirler ya floresan yayarak temel durumuna geri dönebilir ya da sistemler arası geçiş yaparak uyarılmış triplet durum (3FS*) oluşturmak için tersine döndüğü sistemler arası geçişe uğrayabilir (17). Triplet uyarılmış fotosensitizatör hücre zarı veya molekül gibi bir substratla doğrudan etkileşime girebilir. Sırasıyla bir radikal anyon veya katyon oluşturmak için bir proton veya bir elektron transfer edebilir. Süperoksit gibi oksijenli ürünler üretmek için oksijenle reaksiyona girer (Tip I reaksiyon). Diğer taraftan uyarılmış FS enerjisini singlet oksijen ($^1O_2$) oluşturmak için doğrudan moleküler oksijene (temel durumda bir üçlü) aktarabilir (Tip II reaksiyon). Tip I'in bir sonucu olarak oluşan yan ürünler ve tip II reaksiyonlar, FDT'deki hücrenin ölümüne ve terapötik etkiden sorumlu olur. Hedef tümör dokusunda singlet oksijen vasküler endoteli ve hücre membranını harap ederek dokunun parçalanmasına ve nekroza neden olur. Ortamın barındırdığı O_2 konsantrasyonu tedavinin başarısı açısından oldukça önemli olduğundan düşük olması durumunda tedavi etkinliği azalacaktır (18–20)



Şekil 2.2. FDT'de Tip I ve Tip II Mekanizmasının şematik gösterimi (21).

2.3.2. Fotodinamik Tedavi Tarihi

Işığın, üç bin yılı aşkın bir süredir rahatsızlıkları iyileştirmek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Antik Mısır, Hindistan ve Çin medeniyetleri tarafından sedef hastalığı, raşitizm, vitiligo ve kanser gibi cilt hastalılarını tedavi etmek amacıyla ışık kullanılmıştır. Antik Yunan medeniyetinde, hekim Herodot tarafından tüm vücut hastalıklarında ışığın kullanılarak tedavi edilmesine ''*heliotherapy*'' adı verilmiştir (22). 1900 yılında Profesör Herman Von Tappeniner'ın öğrencisi Oscar Raab kimyasalın ışık ile uyarılması sonucu sitotoksisite oluşmasını, paramesyum üzerinde gerçekleştirdiği deneylerde ortaya koyarak, tıpta floresan boyaların kullanımının öncüsü olmuştur. Ardından Ludwig-Maximilians Üniversitesi Farmakoloji Enstitüsü'nün direktörü Herman Von Tappeiner ve A. Jesionek, beyaz ışık ve eozini bir arada kullanarak cilt tümörünün tedavi ederek, bu çığır açan buluşa "fotodinamik eylem" adını vermiştir. Niels Finsen, 1901 yılında çiçek hastalığı ve kutanöz tüberkülozu ışık ile tedavi etmiştir. 1903 yılında fototerapi alanındaki çalışmaları doyasıyla Nobel Ödülü'nü almıştır (23). 1907 yılında Münih Üniversitesi Farmakoloji Enstitüsü direktörü Herman Von Tappeiner ve dermatolog A. Jesionek, eosin ve ışık kullanarak cilt tümörünü tedavi ederek ''Fotodinamik'' terimini ilk kez kullanmıştır (23,24). 1912 yılında Friedrich Meyer-Bertzh hematoporfirini kendine enjekte ederek denemiş ve aktivitesi için kendisini güneş ışığına maruz bırakmıştır. Işık ciltte ödem ve lekelere sebep olmuştur (24,25). Bu çalışma sonucu hematoporfirinin fotosensitizatör olduğu ortaya konulmuştur. Bunun üzerine 1913 yılında F. Meyer-Bertz insan tedavisinde kullanmak üzere hematoporfirin kullanmıştır. 200 mg hematoporfirin intravenöz olarak uygulanmış ve hasta ışığa maruz bırakılmıştır. Bu çalışma insanlar üzerinde bildirilen ilk fotodinamik terapi

deneyidir (26). 1924 yılında Albert Policard fareler üzerinde kanserli hücrelerin fotosensitizatör ve ışık kullanımına daha hassas olduğunu ifade etmiştir. Bu sayede porfirin türevleri FDT'de kullanılmak üzere sentezlenmiştir. 1942'de Auler ve Banzer hematoporfirinin kötü huylu tümörlerde çevre dokulara göre daha hassasiyetli olduğu nekrozla seçici ölümünün gerçekleştiğini ortaya koymuştur (27). 1972'de Diamond ve arkadaşları sıçanlarda oluşturdukları tümör modelini tedavi etmek için FDT uygulayarak tümör büyümesini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (28). 1987 yılına gelindiğinde ise Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi Fotofrin isimli ilacın klinikte kullanıma izin vermesi ile kanser tedavisinde kullanımı başlamıştır (24). Kullanımı oldukça yaygın olan Fotofrin, ilk kez 1993 yılında mesane kanseri tedavisinde kullanılmıştır. Ardından Fotofrin kısmen saflaştırılarak erken evre akciğer, mide, servikal displazi için uygulanmıştır. Fotofrin FDT için onaylanan ilk fotosensitizerdir. İlerleyen yıllarda farklı fotosensitizerler FDA onayı almış olmakla birlikte Avrupa'da baş ve boyun tümörlerinde kullanılmak üzere temoporfin (Foscan) onaylanmıştır (24)

2.3.3. Fotodinamik Tedavi Prensibi

Fotodinamik terapi toksik olmayan kimyasal ışığa duyarlı bir madde, ışık kaynağı ve moleküler oksijenin varlığında gerçekleşir. Işık kaynağı aracılığıyla aktifleştirilen ışığa duyarlı maddenin aracılığıyla temel enerji seviyesinin kimyasal enerjiye dönüştürülmesi ve kimyasal enerjinin de moleküler oksijene aktarılarak hücresel ölüm mekanizmalarının aktifleştirilmesi ile fotodinamik terapi gerçekleşir. FDT temelde iki ana unsur olan, ışığa duyarlı maddenin vücuda uygulanması ve hedef bölgede toplanması ve bu maddenin aktif hale gelmesini sağlayan ışığın istenilen bölgeye uygulanmasını içerir (29). FDT' de tip I reaksiyon olarak değinilen elektron transfer reaksiyonları ile ROS oluşturabilir ya da tip II reaksiyonda olduğu gibi singlet oksijen ($^1O_2$) oluşturabilir (30). Singlet oksijeninde reaktivitesi oldukça fazladır. Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileşime girdiğinde mevcut enerjisini ya transfer eder ya da kovalent tepkimeye girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bir diğeri de lipid peroksidasyonu başlattığı doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikali oluşturmasıdır (31,32). Burada önemli olan her iki mekanizmanın da oluşabilmesi için ortamda yeteri kadar oksijen bulunmalıdır. Öte yandan ışığa duyarlılaştırıcı olarak kullanılan materyalin karanlıkta aktifleşmiyor olması gerekmektedir. FDT'de kullanılan fotosensitizerin 600-900 nm dalga boyunda görünür olduğu bilinmektedir. Daha yüksek dalga boylarında ise enerji transferi yoluyla sitotoksik tekli oksijen üretmek için yeterli

enerjiye sahip değildir. Bu nedenle, terapötik pencerede gelen ışığın dokuya nüfuz etmesi oldukça önemlidir. Fotosensitizerin toksik olmaması gerekmektedir (17). Işık kaynağı olarak, görünür bölge ve yakın kızıl ötesi kullanılır. Işığın dalga boyu ise kullanılan fotosensitizerin özelliğine göre değişmektedir (33).

Etkin bir FDT için gereklilikler ifade edilecek olursa;

1) Uygun ışık kaynağı ve oksijen aracılığıyla singlet oksijen ($^1O_2$) ya da ROS türlerini oluşturabilmeli
2) Doğrudan hücresel hasara yol açmalı
3) Tümör dokusunda vasküler hasar sonucu indirekt iskemik etki oluşturulmalı
4) Fotoaktif maddenin indirek etkileri ve immün yanıtın başlatılması
5) Apoptoz oluşması gerekmektedir (33).

Tüm bu değişkenler optimum düzeyde sağlanabildiğinde kanser hastalarına düzenli bir şekilde fotosensitizer verilir. Uygun dalga boyunda ışık kaynağının kullanılmasıyla fotosensitizer maddenin uyarılarak reaktif oksijen türleri oluşturmasını sağlar. FDT sonucu hücresel bazı mekanizmaları aktifler (apoptoz ve nekroz yolakları), vasküler hasar (mikrovasküler yıkım) ve immün yanıtın oluşturulmasından sorumlu tutulur. FDT hedef bölgede sitokin ve kemokinlerin oluşumuna neden olmaktadır (34,35).

2.3.4. Fotodinamik Tedavide Kullanılan Işık Kaynakları

En iyi bilinen ışık kaynağı güneş, yaşamın devamlılığı için çok önemlidir. Bitkilerin klorofil pigmentinin ışık enerjisini kullanarak organik bileşikler üretmesi yaşamın olmazsa olmazı oksijenin üretilmesinde ana bileşendir. Fotodinamik terapide ilk denemeler ışık kaynağı olarak güneş ışığından faydanılanarak gerçekleştirilmiştir (36).

Fotodinamik terapinin üç bileşeninden birisi olan ışık, fotosensitizerin aktifleşmesinde rol oynamaktadır. FDT'de ışık kaynağının dalga boyu, dozu, süresi, çeşidi tedaviye uygun tasarlanmalıdır. Işığın dalga boyu fotosensitizere göre değişkenlik gösterir (36). Işık dalga boyu "λ" karakteri ile gösterilir. Işığın dalga karakterinin art arda gelen iki tepe arasındaki uzaklıktır. Tercih edilen ışık kaynağının dalga boyu ile ışığın ulaşabildiği derinlik arasındaki ilişkilidir. Doku içerisinde ışığın kırınım durumu ve hemoglobin gibi bazı moleküller tarafında absorbe edilmesi bu durumu etkiler. 800 nm dalga boyunun üstünde ışık fotonlarının enerjisi dalga boyuyla ters orantılıdır. Bu nedenle 800 nm üzerinde singlet

oksijen molekülü oluşması beklenmez (33). Klinik uygulamalar için 600-800 nm terapötik pencere olarak belirlenmiştir (37).

FDT'de en çok tercih edilen argon pompalı ayarlanabilir boya lazerleri ve geniş bir dalga boyu aralığında kullanılabilen LED (Light emitted diodes) lambalardır (38). Yüksek ışık gücü olmamakla birlikte ucuz ve küçüklerdir. Silikon ana maddesinin üzerine yaymak istediği dalga boyunun ayarlanabilmesi için galyum, arsenit, alüminyum, fosfat, indiyum, nitrit ile kaplanır (36).

FDT'de yaygın olarak kullanılan diğer bir ışık kaynağı ise optik fiber kablolardır. Fiber optik kablolar ve dalga kılavuzları, fiber optik telekominikasyonda kullanılmakla birlikte optik tekniklerin gelişmesiyle ışık ve canlı maddenin etkileşimi, lazer tedavisi, fototerapi ve biyosensör, optogenetik gibi alanlarda kullanılmaktadır (39–43). Görünür ve kızıl ötesi ışığın dokulara penetrasyon derinliği, dokularda absorpsiyon ve saçılma özelliklerinde dolayı sınırlıdır (<3 mm). Işığın optik penetrasyonunu arttırmak amacıyla implante edilebilen ışık yayan diyotlar ve hücre bazlı lazer geliştirme çalışmalarının yanı sıra implante edilebilen fiberler geliştirilmiştir (39,44,45).

Çizelge 2.2. Biyouyumlu optik fiber ve dalga kılavuzu üretmek için tercih edilen materyaller ve üretim metotları (46)

Kategori	Malzeme	Üretim Metodu
İnorganik materyaller	Silika, fosfat, silicon, oksinitrit	Termal çizim, litografi
Doğal materyaller	İpek, selüloz, bakteri hücreleri	Termal çizim, baskı, kalıpla üretim
Hidrojel	Agaroz jel, PEG, aljinat	Kalıpla üretim
Sentetik polimerler	PLLA, PLA, PLGA	Termal çizim, kalıpla üretim
Çok işlevli	COC, PC, CPE	Termal çizim

2.3.5. Fotodinamik Tedavide Kullanılan Fotosensitizerler

Fotosensitizerler, fotodinamik ışık kaynağından absorbe edilen ışığın biyomoleküllere transferini sağlayan kimyasal bileşenlerdir. FDT'de bu enerji transferi sonucu reaktif oksijen türleri ortaya çıkar. Fotosensitizerlerin ortak özelliği ise, proliferasyonu çok yüksek kanser hücrelerini hedefleyerek bu hücrelerde birikebilmesidir. İdeal bir fotosensitizerin; kimyasal olarak saf olması, tümör dokusunu hedefleyerek birikmesi, normalden hızlı uzaklaşabilme kabiliyetinin olması, karanlıkta toksik olmaması, suda çözdürülerek uygulanmalarından ötürü suda çözünürlüğü iyi olması, terapötik pencere içinde yüksek soğurma özelliğinin olması, belirli dalga boyunda ışık ile etkinliği sonucu yüksek verimle singlet oksijen ($^1O_2$) oluşturabilmesi beklenir (22,47–49).

En önemlisi, fotosensitizerlerin dokulara daha derin nüfuz etmesine izin vermek için 700 nm'nin üzerindeki ışık dalga boyları tarafından etkinleştirilmesi gerekir. Bunun nedeni, hemoglobin gibi endojen moleküllerin 700 nm'nin altında güçlü bir ışık absorpsiyonuna sahip olması ve dolayısıyla hedef dokulardaki etkili ışığın penetrasyon derinliğini sınırlandırmasıdır. Bu ve bunun gibi pek çok neden dolayısıyla da ideal bir fotosensitizer olarak nitelendirilebilecek herhangi bir ilacı bulmak veya geliştirmek oldukça zordur (13).

Fotosensitizerlerin özellikleri lipofilikliği, yüklü grupların türü ve sayısı, yük-kütle oranı, halka ve çekirdek türü ve sayısı gibi kimyasal ve fiziksel parametrelere bağlı olarak değişebilmektedir (50).

1970-1980'lerin başında porfirin bazlı birinci nesil fotosensitizerler üretilmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan birinci nesil fotosensitizer hematoporfirin türevli fotofrindir. Bunlar ilk kullanılan ve klinik denemelerde en etkili bulunan fotosensitizerlerdir. Hematoporfirinin; karanlıkta minimal toksisitesi ve suda çözünürlüğünün yüksek olması gibi birçok avantajı varken, kızılötesi bölgedeki absorbansının düşük olması derin tümör tedavilerinde penetrasyon yeteneğini ve dolayısıyla tedavideki başarılarını sınırlandırmaktadır (33,51).

İkinci nesil fotosensitizerler, klorinler, ftalosiyaninler, bakteriyoforiler, teksafirinler gibi porfirin veya porfirin bazlı ya da ksantenler, siyaninler ve kurkuminoidler porfirin bazlı olmayan kimyasallardan oluşmaktadır. İkinci nesil fotosensitizerler, 630 nm daha uzun dalga boylarında ışığı absorplayabilen, kimyasal olarak saf fotosensitizerlerdir. Genel olarak hematoporfirin türevlerine kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda tümör dokusuna

lokalize olmuş ve dolayısıyla da daha iyi bir antitümör aktivite göstermiştir (52). Bu yüksek konsantrasyona kısa sürede ulaşabiliyor olması da tedavi sürecini kısaltabilmek açısından faydalı olmuştur. Burada önemli olan etkenlerden birisi de fotosensitizerin hidrofobiklik derecesidir. Ancak hidrofobik özellik hücre membranına entegre olmada ve hücre içerisine yerleşmesine izin verse dahi, yüksek hidrofobiklik fizyolojik ortamda sulu çözeltide agregatlar oluşturabilir ve bu da ROS türleri üretme verimini etkileyebilir. Bu durum klinik başarıyı da etkileyeceğinden ötürü fotosensitizerin hidrofiliklik ve lipofiliklik derecesi arasında bir denge olmalıdır (53). Bu fotosensitizerlerin çözünürlüğünü geliştirmek için amfifilik olan türevlerini sentezlemek amacıyla hidrofilik polar gruplar eklenmiştir. Bunun yanı sıra, sülfonat veya karboksil grupları anyonik grupların eklenmesiyle fotosensitizerin sitoplazmada lokalize olduğu, katyonik gruplarla işlevselleştirildiğinde mitokondriyal membrandan geçerek mitokondride biriktiği bildirilmiştir. Ancak tüm bu gelişmelere rağmen hücre içerisinde fotosensitizerin hangi mekanizmaları kullanarak lokalize olduğu çok açık değildir (20,53,54).

Üçüncü nesil fotosensitizerler teslimat ve hedefleme yetenekleri açısından ikinci nesil fotosensitizerlerin gelişmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu grup fotosensitizerlerin fosfolipit zincirleri, monoklonal antikorlar, proteinler gibi biyomoleküllerin eklenmesiyle özgünlüğün arttırılması hedeflenmiştir. Bunların aktiviteleri in-vitro yöntemlerle incelenmiş olup, in-vivo seçiciliği yeterince yüksek olamadığı için klinik uygulamada çok az bir kısmı değerlendirilmiştir (13).

2.3.6. Fotodinamik Tedavi ve Hücre Ölüm Mekanizmaları

Fotodinamik terapide, hücresel ölüm mekanizmalarının anlaşılabilmesi için öncelikle fotosensitizerin hücreye ne şekilde lokalize olduğu bilinmelidir. Kanser hücresinde mitokondri, lizozomlar, plazma membranı, endoplazmik retikulum potansiyel hedeftir (55). Bu aşamada en önemli husus fotosensitizerin sahip olduğu fizikokimyasal özelliklerdir. Örneğin; hidrofobik bir fotosensitizerin intravenöz uygulanmasından sonra dolaşım sistemi aracılığıyla kanserli dokudaki lipoproteinlere seçici olarak bağlanır. Fotosensitizer ajanın lipofilik karakteri ile tümör seçiciliğinin belli bir dereceye kadar arttığı bilinmektedir. Reseptör aracılı endositozun ardından, fotosensitizer molekül tercihen plazma, mitokondriyal membran, endoplazmik retikulum, nükleer ve lizozomal membranlar dahil olmak üzere tümör hücrelerinin lipofilik bölmelerinde birikir (55). Kanser hücrelerinde düşük pH seviyesi fotosensitizerin hücre içerisine alınmasında önemli bir etkendir. Bu

durum tümör dokusundaki zayıf oksijen kaynakları ve glikolitik aktivite ile doğrudan ilişkilidir. Hidrofilik fotosensitizerler karakterinden ötürü plazma membranından sitoplazmaya yayılma eğilimindedirler. Özetle; fotosensitizerin birincil lokalizasyonunun yeri lipofilik veya hidrofilik karakterine bağlıdır. Suda çözünebilen fotosensitizerler ise, damarlanmayı hedef alarak dokunun besinsiz ve oksijensiz kalmasını sağlayarak hiper proliferasyon yapan hücreleri dolaylı yoldan öldürür (55).

Fotosensitizerler hücre çekirdeğinde birikme eğiliminde değildirler. Bu nedenle de DNA hasarı ve mutasyona neden olma ihtimali oldukça düşüktür. Plazma, mitokondri ve bazen nükleer membranlar da dahil olmak üzere hücresel membranların hasar görmesini sağlayarak kanserli hücre ölümünü apoptoz, nekroz ya da her ikisinin bir arada etki etmesiyle gerçekleştirir (55).

2.3.6.1. Fotodinamik Terapide Nekrotik ve Apoptotik Hücre Ölümü

Fotodinamik terapide, yüksek enerji içeren ışık, toksikasyonuna neden olabilecek fotosensitizer, mitokondri etrafında lokalize olan fotosensitizer kullanımı ve hücrenin beslenememesi gibi durumlarda nekroza bağlı olarak ölüm gerçekleşebilmektedir. Nekroza bağlı olarak plazma, mitokondri ve nükleer membranlar hasara görerek hücre şişer, sınırları düzensizleşir, hücre membranı dağılır ve sitoplazmik atıklar intersitisyal alana dağılır. Bu aşamada ana etken lizozomal enzimin serbest kalmasıdır (56).

Apoptoz, doku gelişimi ve evriminin kontrolü ve doku homeostazı için gerekli olan normal bir fizyolojik süreçtir. Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranı etrafında toplanır ve yoğunlaşarak hücre içerinin dağılması önlenerek doku iltihabınında önüne geçilmiş olur. Bunun aksine, nekroz, plazma membran bütünlüğünün kaybolduğu, hücrelerin parçalandığı ve doku iltihabının tetiklendiği yüksek düzeyde hücre hasarından kaynaklanır. FDT'ye bağlı apoptoz mekanizmasında kaspazlar, hücre yüzeyinde başlatılan mekanizmalar, mitokondriyal aktivasyon ve Bcl-2 ailesini içeren dört farklı bileşen sorumludur (57).

Kaspazlar genellikle "başlatıcı" olarak sınıflandırılır veya efektör kaspazlar, canlı hücreleri apoptozdan koruyan proteinleri ayırır ve inaktive eder. Mitokondri, apoptotik yolların çoğunda merkezi işlem organelleri olarak ortaya çıkmıştır (58). Hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinden veya hasarlı bölgelerden gelen sinyaller mitokondri üzerinde birleşerek hem mitokondriyal membranların geçirgenleşmesine, iç membran transmembran

potansiyelinin (ΔΨm) dağılmasına ve sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör gibi apoptozla ilgili proteinlerin salınmasına yol açar. Bunun yanı sıra apoptoz, plazma membranında "ölüme neden olan sinyal komplekslerinin" (DISC'ler) aktivasyonu ile hızla indüklenir. DISC'ler, hücre dışı ligandlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesine ait olan hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girdiğinde oluşur. Ölüm reseptörleri Fas (CD95 veya Apo1 olarak da adlandırılır) ve TNFR1 (ayrıca p55 veya CD120a olarak da adlandırılır) en iyi karakterize edilenlerden ikisidir (58,59). Bcl-2 aile üyeleri, birçok apoptotik uyaranla indüklenen apoptozu, özellikle mitokondri düzeyinde düzenler. Bu büyük protein ailesinin anti-apoptotik üyeleri arasında Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Al ve Boo; pro-apoptotik üyeler arasında Bax, Bad, Bok, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk ve Mtd bulunur (56,57).

2.4. 2 BOYUTLU NANOMALZEMELER

Boyutluluk kavramı, nanomalzemeleri diğer malzemelerden ayıran bir özelliktir. Hacimli bir malzemenin boyutları nano ölçeğe indirgendiğinde, genel davranışlarının değişmesiyle birlikte pek çok emsalsiz özellikte ortaya çıkmaktadır (60).

İki boyutlu nanomalzemeler (2B), bir boyutu olan 100 nm'den büyük olan ultra ince nanopartiküllerdir (61). 2B nanomalzemelerin hayatımıza girişi 2004 yılında grafenin keşfi ile olmuştur. Grafitin pul pul dökülmesi yoluyla tek katmanlı grafen nano yaprakları elde edilmiştir (62). 2B nanomalzemeler 2004 yılından bu yana bilim camiasında büyük ilgi görmüş olup pek çok farklı yapıda ortaya konulmuştur. Ortaya çıkan bu 2B malzemeler, elektronik cihazlarda, su ayırma, enerji depolama ve biyomedikal alanları içeren geniş bir uygulama yelpazesi için mükemmel potansiyeller taşımaktadır (14,60,63,64). Manchester Üniversitesi araştırmacılarından Aravind Vijayaraghavan ''grafenin bükülebilir, esnetilebilir, son derece hafif, ısı ve elektriği iletebilen bir materyal olması dolayısıyla grafenin pek çok açıdan mükemmel bir malzeme'' olduğunu ifade etmiştir (65).

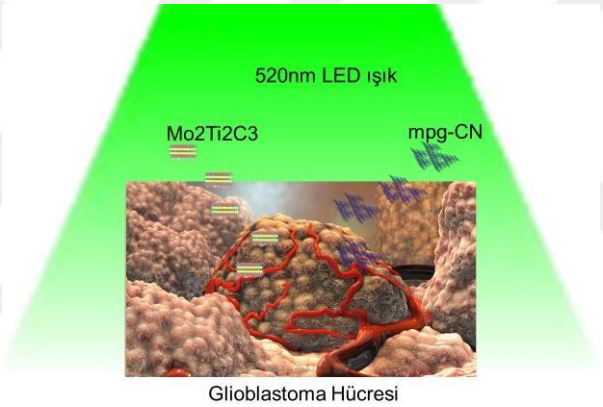
Yıllar süren araştırmalardan sonra grafit fazlı karbon nitrür (g-C_3N_4), siyah fosfor (BP), molibden disülfür (MoS_2) ve tungsten disülfür (WS_2) gibi grafenin ardından bir dizi nanomalzeme başarıyla geliştirilmiştir (60). Bu malzemeler benzer morfolojilere sahip olsa da boyut, kalınlık, substrat bileşimi ve yüzey modifikasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterirler.

2B nanomalzemelerin diğer nanomalzemelere göre avantajlı olduğu bilinmektedir. Bu avantajlar;

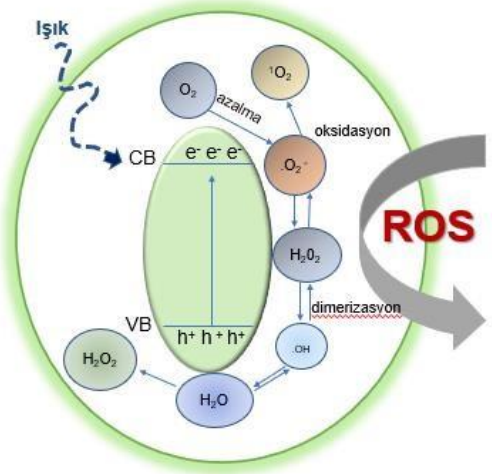
- ✓ 2B nanomalzemelerin katman sayılarının değiştirilebilir olması, optik özellikleri ve diğer plazmonik metallerle entegre olabilmesi,
- ✓ 2B nanomalzemelerin yüzey modifikasyonu sonrası, geniş yüzey alanı; kemoterapotik ilaçlar, fotosensitizerler, immün etiketler ve doğal peptitler gibi moleküllerin bağlanabilir olması şeklinde tanımlanabilir (66–68).

2.4.1. 2 Boyutlu Nanomalzemelerin Fotodinamik Tedavide Kullanımı

Bu tez çalışmasında iki boyutlu nanomalzeme MXene ($Mo_2Ti_3C_2$) grafitik karbon nitrür (g-C_3N_4) kullanılarak *in vitro* fotodinamik tedavi protokolü gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3. $Mo_2Ti_2C_3$ ve g-C_3N_4 kullanılarak PDT uygulaması şematize. 2 boyutlu nanomalzeme $Mo_2Ti_2C_3$ ve g-C_3N_4 (solda), tümör dokusunun fotosensitizer ve ışığa maruz kalması (sağda).

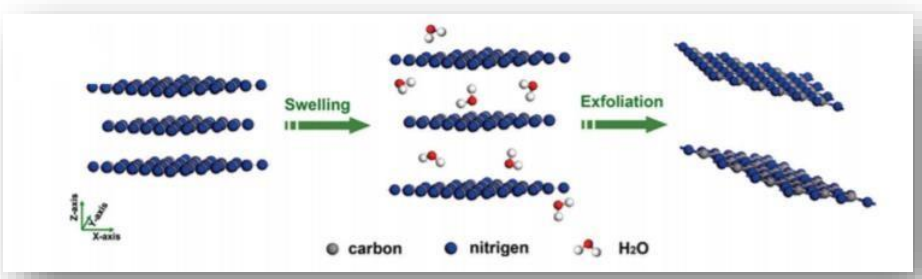


Şekil 2.4. FDT uygulaması sonrası iki boyutlu nanomateryallerin ROS üretim diyagramı.

2.4.1.1. Grafitik Karbon Nitrür

İlk kez 1834 yılında Liebig tarafından ‘’melon’’ olarak tanımlanan bir polimerik türev olan grafitik karbon nitrür en eski polimerik sentetik polimer türevidir (69). 1922 yılında grafitik karbon nitrür ile yapılan araştırmalar, tekrarlanan tri-s-triazinden oluşan bu yapıyı polimerik malzeme olarak tanımlamıştır. Grafitik karbon nitritin beş allatropu (α-CN, β-CN, g-CN, psödokübik-CN ve kübik-CN) arasında termodinamik özellikleri açısından en kararlı olanı CN fazıdır (70).

g-CN yeryüzünde en bol bulunan iki elementten oluşan karbon (C) ve nitrojen (N)’in yanı sıra tipik bir bant aralığına sahip bir 2B katmanlı yapıyı gösteren bazı seyyar H atomlarından oluşan polimerik bir yarı iletken malzemedir. 2,7 eV (454 nm) ışık ile aktifleştirilebilen bir nanomalzemedir (71). g-CN doğada oldukça fazla bulunan C ve N’un sp^2 hibritleşmesiyle oluşan grafit benzeri yapıları içerir. Bu katmanlarına ayrılmış g-CN’in grafene benzer özellikleri dolayısıyla grafene alternatif olabileceği fikri öne atılmıştır (72). Üre, tiyoüre, melamin, siyamid, disiyadiamid gibi pek çok farklı g-CN öncülü kullanılarak üretilmeye çalışılmıştır. Bu öncülerinin seçimi ve reaksiyon koşulları C/N oranı, spesifik yüzey alanı, gözeneklilik, absorpsiyon kenarı ve boyutları g-CN fizikokimyasal özelliklerini etkileyebilmektedir. Mezo-gözenekli g-CN üretiminde tercih edilen yöntem bir silis şablonunun mevcudiyetinde guanidin hidroklorür (GndCL) öncüsünün termal polikondenzasyonu ile üretilmektedir (73).



Şekil 2.5. g-C_3N_4 nanotabakasının sıvı-eksfoliasyon işlemi eldesinin şematik gösterimi (74).

Fotokatalitik özellikleri açısından bu malzemeler umut verici olsa da hızlı elektron boşluk çifti rekombinasyonu, düşük elektron iletkenliği, sınırlı spesifik yüzey alanı ve belli reaksiyon bölgeleri içermesi g-CN’in hali hazırda geliştirilmesi gereken özelliklerdir.

Bu araştırmada kullanılan mpg-CN'in Koç Üniversitesi Kimya bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Önder Metin ve ekibi tarafından karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Fotokatalitik etkinliği XRD, FT_IR, XPS, BET ve katı hal NMR teknikleri ile analiz edilmiştir. Bu malzeme XRD analizleri sonucu 27.5 tipik ana kırınım noktası gösterirler. Bu katmanlar arası istifleme mesafeleri 0,323 nm olarak hesaplanmıştır. Mpg-CN katman için kırınım sinyallerine karşılık gelen kırınım noktasını ($2\theta=13.2°$) tespit etmek oldukça zordur. GndCl doğrudan havada 500 ve 650°C arasında ısıtıldığında, g-C_3N_4 numunesi için bu iki karakteristik kırınım tepe noktası aynı anda görünürken, 13.0° tepe noktasının yoğunluğu artarken, 27.3° tepe noktası artan sıcaklıkla birlikte biraz daha yüksek açılara kayar. Sentezlenen mpg-CN'in FTIR spektrumları 3000-3500 cm'de bulunan geniş ve kıvrımlı bantlarla oldukça benzer özellikler sergiler ve karşılık gelen N–H uzantıları ile ilişkilendirilebilirler. Yüzey kimyası ve mpg-CN yüzeylerinde bulunan fonksiyonel gruplar XPS analizi ile değerlendirilmiş esas olan C ve N elementlerini içerdiği gösterilmiştir. XPS verilerinin N1s bölgesi, 399, 400.7 ve 04.7 eV'da bulunan üç farklı N1s durumunu ortaya koymaktadır (75).

Bugüne kadar g-C_3N_4 fotokatalitik özelliği dolayısıyla endüstriyel uygulamalarda kullanılmıştır (74,76). Bununla birlikte biyomedikal alanında kullanımı gündeme gelen g-C_3N_4, FDT için umut verici olmuştur. g-C_3N_4 fotokatalitik özelliği sayesinde ışığa duyarlılaşmakta ve kanser hücrelerinde birikerek singlet oksijeni ($^1O_2$) varlığında reaktif oksijen (ROS) üretimiyle kanser hücrelerinin ölmesini sağlamaktadır (77–79). FDT ajanı olarak g-C_3N_4 kullanılarak, bu tip ROS üretiminin, kanser hücrelerini ve yakındaki vaskülarizasyonu yok etmesi ve böylelikle tümörün gerekli besinleri almasını engellemesi beklenir. Bu nedenle kanser hücrelerini doğrudan öldürmeye ek olarak FDT, antivaskülarizasyon yoluyla da tümörleri küçültür veya yok eder (80). Literatürde g-C_3N_4 aracılı fotodinamik tedavinin hem apoptoza hem de nekroz aracılı hücre ölüm mekanizmalarına yol açtığı ortaya konmaktadır (69).

Kanser tedavilerinde kullanımı güncel olan grafitik karbon nitrür (g-C_3N_4) nanomalzemesinin *in vitro* ve/veya *in vivo* FDT/FTT etkisinin araştırıldığı çalışmalar aşağıdaki tabloda detaylı olarak belirtilmiştir.

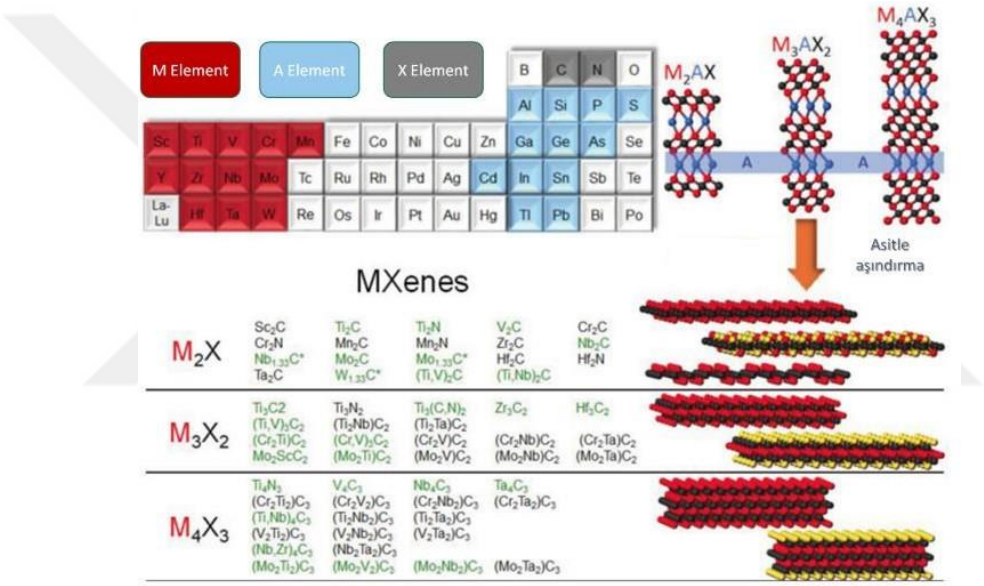
Çizelge 2.3. 2 Boyutlu Nanomalzeme Grafitik Karbon Nitrür'ün *In Vitro* ve/veya *In Vivo* FDT/FTT Araştırmalarında Kullanımı

	Materyal modifikasyon	**Kanser tipi**	***In vitro*/*In vivo***	**Tedavi Yöntemi**	**Referans**
GRAFİT KARBON NİTRİT	Fe_3O_4@g-C_3N_4–UCNPs–PEG	HeLa hücresi	*In vitro* (MTT)	FTT	(82)
	g-C_3N_4@PDA	Meme kanseri hücresi MCF 7	*In vitro* (CCK-8)	FDT	(83)
	CuSe ve g-C_3N_4	HeLa hücresi	*In vitro* (MTT) *In vivo* (fare sol sub axilla enj.)	FDT&FTT kombine terapi	(84)
	g-C_3N_4	Sıçan osteosarkom hücresi UMR-106	*In vitro* (MTT) *In vivo*	FDT	(85)
	g-C_3N_4	Hela hücresi Fare servikal karsinoma hücresi U14	*In vitro* (MTT) *In vivo* (fare subkutan enj.)	FTT	(86)

2.4.1.2. MXene

MXene 2011 yılında *Advanced Materials* dergisinde Prof. Dr. Yuri Gogotsi ve ekibi tarafından keşfi ile bilim dünyasına tanıtılmıştır. MAX fazlarının seçici bir şekilde ayrıştırılması ile sentezlenen karbür, nitrür ve karbonitrürden oluşur. MAX fazlarının

prekürsör katmanlı karbürlerinden, A grubunun bulunduğu 12-16 elementini içerir. MXenes, $M_{n+1}X_nT_x$ formülü ile tanımlanır ve n=1-3'tür. M geçiş metali, X karbon veya nitrojen T ise değişken yüzey sonlandırmasını ifade etmektedir. MXeneler, hidroksil (−OH), oksijen (−O) veya florin (−F) gibi, onlara hidrofilik bir yapı kazandıran ve esnek yüzey modifikasyonu, işlevselleştirme ve ölçeklenebilir işlenebilirliğe izin veren bol miktarda yüzey sonlandırıcı fonksiyonel gruplar içerir (87). MXene diğer 2B nanomalzemelerde olduğu gibi aşırı incelik, yüksek yüzey alanı, yüksek yüzey-hacim oranı ve mekanik tokluk dahil olmak üzere topolojilerinden kaynaklanan biyotıp uygulamaları için uygundur (88). Bugüne kadar yaklaşık 30 kadar MXene yapısı deneysel olarak sentezlenmiştir.



Şekil 2.6. MAX ve MXene yapılarının periyodik tabloda gösterimi (M (geçiş metali), A (A grubu element), X (C veya N)) A katmanının seçici olarak aşındırılması metoduyla elde edilen 30 kadar MXene türü deneysel olarak sentezlenmiştir (yeşil renk ile belirtilen) (89)

MXene tabanlı 2B fototermal nanosistemlerin dikkat çekici bir örneği Ti_3C_2'dir. Ti_3AlC_2 substratından Ti_3C_2 nanosheets sentezlemek için hidroflorik asit ile aşındırma ve tetrapropilamonyum hidroksit interkalasyonunun kombine işleminden oluşan iki aşamalı bir pul pul dökülme yöntemi geliştirilmiştir. Ti_3C_2 nanosheets, metalik içeriklerin insan vücuduna sızmasını önlemek için faz değiştirebilir laktik-co-glikolik asit ile kaplanmıştır, bu nedenle biyouyumluluğu yüksektir (90). MXene'ler 1 Gpa basınç altında soğuk preslenerek 300µm kalınlığında peletlerin dirençli grafen ile karşılaştırılabilecek özelliktedir. Örneğin Ti_3C_2Tx diskleri 22 Ω^{-1}, Ti_2CTx diskleri 339 Ω^{-1} dirence sahiptir. MXene'ler için dirençlilik değerine ve yüzey kimyasına bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Kimyasal buhar biriktirme yöntemi ile üretilmesi halinde daha geniş alana sahip ve yüksek kalitede 2B MXene türevleri üretilir. Metalik yarı iletken malzeme olan MXene türleri termoelektrik olarak aday malzemeler olduğu bilinmektedir (91). Optik özelliklerine göre UV-Vis spektrumu, MAX ve MXene arasında net bir fark gösterir; MXene, 300 nm yakınında önemli bir absorpsiyona ve 800 nm civarında geniş bir absorpsiyona sahipken, MAX, 200–1000 nm aralığında zayıf bir absorpsiyon gösterir (92).

MXene'in biyomedikal alanında kullanımının uygun olmasında etkili olan faktörler,

- ✓ Yüzeylerinde bulunan fonksiyonel grupları dolayısıyla (-OH, -O, -F) hidrofilik özellikte olmalarıdır.
- ✓ Biyouyumluluğu toksik olmaması dolayısıyla yüksektir. Bazı geçiş metalleri biyolojik sistemlerde durağandır. Bunun yanı sıra karbon nitrit gibi ana elementlerinin biyolojik sistemlerin ana elementlerindendir. Deney hayvanlarında gerçekleştirilen araştırmalar sonucu MXenlerin farelerin vücudundan atılabileceğini doğrulamıştır (93).
- ✓ Nano boyutta olması biyolojik sistemlerde immun sistemden kurtularak uzun süre dolaşımda kalmasına imkân tanır.
- ✓ Hem in-vivo fotoakustik görüntüleme (PAI) hem de fototermal terapi (FTT) için fırsatlar sağlayan yakın kızılötesi (NIR) bölgede güçlü absorpsiyon sergiler. Ek olarak, farklı yüzey modifikasyonları ile MXene'i esnek bir şekilde işlevselleştirilebilir ve yeni biyomedikal uygulamaların yolunu açar (94).

MXeneler enerji depolamadan, elektromanyetik girişim kalkanına, li-ion pillere kadar pek çok şekilde kullanım alanı bulmuştur (88,95–97). Bu malzeme yüksek biyouyumluluk, fotostabilite ve yüzey/hacim oranına sahiptir. Bu malzemeden yapılan floresan problar genleri ve hedefleme parçalarını, kanser hücrelerini tanıyarak bu hücrelere iletmektedir. Bu hedeflenen hücrelere kılavuzlu ve kontrollü olarak materyal salımlarını mümkün kılmaktadırlar. MXene FTT amacıyla kullanıldığı pek çok çalışma olmakla beraber, FDT için ışığa duyarlılaştırıcı (FS) olarak kullanımı başlangıç aşamasındadır (98).

MXene geleneksel fototermal ajanlarla karşılaştırıldığında geniş yüzey alanı, yüksek ışıktan yüksek ısıya dönüşüm verimliliğini oldukça etkili hale getirmektedir. Ayrıca, NIR ışığının hedef dokuya derinlemesine nüfuz etmesini, hızlı iyileşmeyi ve minimum invazivliği sağlar. Bu durum MXene'in medikal kullanımda gelecekteki önemini vurgulamaktadır (99).

Bu araştırmada kullanmış olduğumuz $Mo_2Ti_2C_3$ Drexel Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Yuri Gogotsi ve ekibi tarafından sentezlenmiş olup biyolojik dokularla etkileşimi henüz keşfedilme aşamasındadır. 2015 yılından itibaren Mo_2TiC_2Tx ve $Mo_2Ti_2C_3T_xMo$ katmanları tarafından sıkıştırılmış Ti katmanlarına sahip MXeneler ve aralarındaki C-atomlarının oktahedral bölgede işgali kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu MXene, yüzeyde Mo-katmanlarına (dış metal katman) ve iç metal katmanlar olarak Ti-katmanına sahiptir, Mo-katmanlarının yüzey özelliklerinin çoğunu düzenlediği ve hatta elektrokimyasal cevaba hükmettiği rapor edilmiştir (100–102). Farklı bir araştırmada $Mo_2Ti_2C_3$ karakterizasyon değerlendirmelerinde kırınım düzlemlerinin 2θ=9.53, 19.04, 28.61, 35.01, 44.8 ve 56.89 civarında konumlandığı C. kırınım tepe noktalarındaki (004) ve (006) daha düşük açılara kayma, genişlemiş *d* -aralığını ve 0.257 nm'den 0.466 nm'ye artan bir *c* -kafes parametresine sahiptir. Diğer piklerin yokluğu, Al'nin $Mo_2Ti_2AlC_3$'ten başarıyla uzaklaştırıldığını ve $Mo_2Ti_2C_3$ sentezini göstermiştir. XPS analizleri sonucu ise $Mo_2Ti_2C_3$ ana yapısal ve yüzey fonksiyonel gruplarının (Mo, Ti ve C) karşılık gelen bağlanma enerjilerine sahip tepe noktalarını göstermiştir (103).

Kanser tedavilerinde kullanımı henüz çok güncel olan MXene nanomalzemesinin *in vitro* ve/veya *in vivo* FDT/FTT etkisinin araştırıldığı çalışmalar aşağıdaki tabloda detaylı olarak belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. 2 Boyutlu Nanomalzeme Mxene'in *In Vitro* ve/veya *In Vivo* FDT/FTT Araştırmalarında Kullanımı

	Materyal modifikasyon	**Kanser tipi**	***In vitro/In vivo***	**Tedavi Yöntemi**	**Referans**
MXENE	Ti_3C_2-IONPs	Meme kanseri hücresi 4T1	*In vitro* (CCK-8) *In vivo* (balb/c nude fare subkutan enj.)	FTT	(104)
	Ta_4C_3-IONP-SPs	Meme kanseri hücresi 4T1	*In vitro* (CCK-8) *In vivo* (fare iv enj.)	FTT	(105)
	MnOx/Ta_4C_3	Meme kanseri hücresi	*In vitro* (CCK-8)	FTT	(106)

		4T1	*In vivo* (babl/c nude fare subkutan enj.)		
	$GdW_{10}@Ti_3C_2$	Meme kanseri hücresi 4T1	*In vitro* (CCK-8) *In vivo* (fare iv enj.)	FTT	(107)
	$MnOx/Ti_3C_2$-SP	Meme kanseri hücresi 4T1 Glioblastoma hücresi U87	*In vitro* (CCK-8) *In vivo* (nude fare iv enj.)	FTT	(108)
	$MnOx/Ti_3C_2$−SP	Meme kanseri hücresi 4T1	*In vitro* (CCK-8) *In vivo* (balb/c fare iv enj.)	FTT	(109)
	Ti_3C_2	Kolon kanseri hücresi HCT 116 Ovaryum kanseri hücresi A2780	*In vitro* (MTT) *In vivo* (nude fare iv enj.)	FDT/FTT	(110)
	$MnOx/Ti_3C_2$	Hela hücresi	*In vivo* (fare iv enj.)	FDT/FTT	(111)
	Ti_2C MXene	A375, HaCaT, MCF-7 MCF-10A hücreleri	*In vitro* (MTT)	FTT	(112)
	Ti_3C_2@Au-PE	Meme kanseri hücresi 4T1	*In vitro* (CCK-8) *In vivo* (nude fare subkutan enj.)	FTT/RT	(113)

	Ti_3C_2-SP	Meme kanseri hücresi 4T1	*In vitro* *In vivo* (fare iv enj.)	FTT	(114)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

2014 yılında Manchester Üniversitesi araştırmacıları tarafından 2 boyutlu nanomalzeme grafenin keşfi ile grafen ve diğer iki boyutlu nanomalzemelerin üretilmesi hız kazanmış ve tıpta kullanımına yönelik araştırmalar her geçen gün artmıştır (115). Bu nanomalzemelerin fotokatalitik özelliklerinden ötürü kanser tedavilerinde kullanılabileceği öngörülmüştür. Bu amaçla geliştirilen fotodinamik tedavi (FDT) protokolü, kötü huylu kanserli hücrelere karşı seçici bir sitotoksik aktivite uygulayabilen, minimal invaziv bir terapötik prosedürdür. Bu prosedür, bir ışığa duyarlı hale getirici maddenin (2 boyutlu nanomalzeme; grafen, siyah fosfor, MXene, grafitik karbon nitrit vd.) uygulanmasını ve ardından duyarlılaştırıcının bir soğurma bandına karşılık gelen bir dalga boyunda ışınlanmasını içerir (116). Oksijen varlığında, bir dizi olay doğrudan tümör hücresi ölümüne, mikrovasküler sistemde hasara ve lokal bir inflamatuar reaksiyonun indüksiyonuna yol açar. Klinik çalışmalar, FDT'nin özellikle erken evre tümörlerde iyileştirici olabileceğini ortaya koymuştur. Cerrahi olarak müdahale edilemeyen kanserlerde sağkalımı uzatabilir ve yaşam kalitesini önemli ölçüde artırabilir. Minimal normal doku toksisitesi, ihmal edilebilir sistemik etkiler, büyük ölçüde azaltılmış uzun vadeli morbidite, içsel veya edinilmiş direnç mekanizmalarının eksikliği ve organ fonksiyonlarını koruyucu etkileri, onu kombinasyon tedavileri için değerli bir terapötik seçenek haline getirir (116).

Literatür bilgileri eşliğinde; bu tez çalışmamızın hipotezi,

(1) 2 boyutlu nanomalzeme $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN glioblastoma fotodinamik tedavisinde fotosensitizer olarak kullanılabilir,

(2) Beyin tümörü fotodinamik terapisinde ışığın penetrasyonunu ve nanomalzemenin eşzamanlı iletimini biyouyumlu ve beyne implante edilebilen hidrojel optik fiber kablo üretilerek gerçekleştirilebilir, olarak belirlenmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın amaçları şunlardır;

Bu projenin ana amacı; glioblastoma için 2 boyutlu nanomalzeme kullanılarak *in vitro* koşullarda etkin bir fotodinamik tedavi protokolü oluşturulmasıdır.

Glioblastoma fotodinamik tedavisinde literatürde ilk defa MXene türevi olan $Mo_2Ti_2C_3$'ün fotodinamik tedavide potansiyel fotosensitizer olma özelliklerinin değerlendirilmesi,

Daha önce farklı kanser türlerinde fotodinamik etkinliği bilinen mpg-CN'in $Mo_2Ti_2C_3$ ile *in vitro* fotodinamik etkinliğinin karşılaştırılması ve elde edilen aday potansiyel nanomateryal ile ileri çalışmalara devam edilmesi,

Fototıp uygulamalarında kullanıma uygun biyouyumlu hidrojel optik fiberlerin üretilmesi ve üretilen hidrojel optik fiberlerin mikroakışkan kanallara sahip olması,

Mikroakışkan kanala sahip olan hidrojel optik fiberlerin ışığı etkili bir şekilde iletmesi, mekanik dayanıklılığının ve esnekliğinin yüksek olması, mikroakışkan kanaldan nanomateryalin doğrudan salınımına izin vermesi,

In-vitro veriler ışığında seçilecek nanomateryalin glioblastoma hücreleri içerisine girerek, hücrelerdeki moleküler hücreler varlığında malzeme ve ışık varlığında hücrelerin apoptotik yolla ölümünü sağlaması amaçlanmaktadır. Plazma, mitokondri ve bazen nükleer membranlar da dahil olmak üzere hücresel membranların hasar görmesini sağlayarak kanserli hücre ölümünü apoptoz, nekroz ya da her ikisinin bir arada etki etmesiyle gerçekleştirir (55). Projemizde apoptoza bağlı hücre ölümü hedeflenerek, yüksek enerji içeren ışıktan ve toksikasyona neden olabilecek yüksek dozda fotosensitizer kullanımından kaçınılması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hattı Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Yılmazer Laboratuvar bünyesinde mevcut bulunan stok hücre hatlarından temin edilmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan Hücre hatları ve üretim koşulları

Tarih	Pasaj No	Hücre hattı	Kullanılan besiyeri katalog numaraları	Ortam içeriği
26.01.2021	11	U87 glioblastoma hücresi	BI 01-025-1A LOT no:2036691	EMEM Medium+%10 FBS+%1 Penisilin/streptomisin
09.02.2021	16	L929 fibroblast hücresi	BI 01-025-1A LOT no:2036691	EMEM Medium+%10 FBS+%1 Penisilin/streptomisin

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar; LDH kiti (Thermo), DCFD2A Abcam (ab113851), Alexa Flour 488 Annexin V &PI Thermo (1809498), DAPI (Thermo Scientific), Gluteraldehit, Akrilamid (Sigma-Aldrich), PEGDA (700 Da) (Sigma-Aldrich), 2-hydroxy-2-methylpropiophenone (2-HMP) (Sigma-Aldrich), DPBF %98 (Sigma-Aldrich), (DCFH-DA) (Sigma Aldrich), PBS (Sigma-Aldrich).

Bu çalışmada kullanılan başlıca cihazlar; buzdolabı (Arçelik), derin dondurucu (-80 °C) (Thermo), sıvı azot tankı (International Cryogenics, Inc.), CO_2 inkübatörü (Panasonic), floresan mikroskop (Zeiss), su banyosu (Memmert), etüv (Memmert), laminar akımlı sınıf

II kabin (Labogene Scanlaf Mars), Mikropipet 8 kanallı (Brand), mikropipet seti (0.5-1 µl, 1-5 µl, 5-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) (Brand), soğutmalı santrifüj (Hermle Labortechnik GmbH), otoklav (Clasic prestige medikal), serolojik pipet (Hirschmann), elisa okuyucu (Clariostar BMG labtech), Terazi (Radwag), TEM mikroskopu (FEI, Tecnai G^2 Spirit Biotwin), akım sitometri (BD, Accuri C6 plus), saf su cihazı (Milipore), jel elektroforez (mikoplazma testi için) (Biorad), floresan mikroskobu (Evos), sonikatör (Elma Sonic), etüv (Memmert), (UV (365 nm, 5 mW cm^{-2}: Spectroline), silikon tüp, silika fiber, T-cube LED driver (LEDD1B; Thorlabs), LED (MCWHF2; Thorlabs), abbe 5 refraktometer (Bellingham + Stanley), power meter (Thorlabs PM100USB power meter), mekanik stres cihazı Lloyd EZ 5.

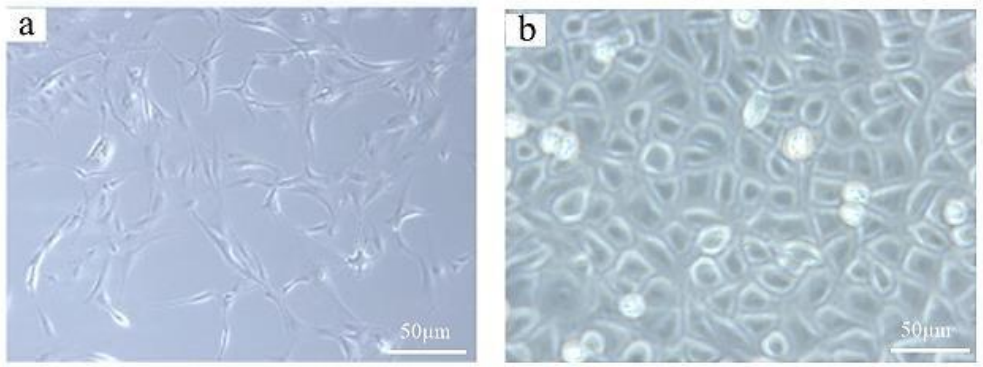
Bu çalışmada kullanılan araç gereçler, santrifüj tüpü (eppendorf), neubar lamı (Isolab), mikropipet ucu (Greiner), flask T75, T25 (Sarsted), Serolojik pipetler 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Sarsted), cryovial tüp (Sarsted).

4.2. YÖNTEM

Bu tez çalışmasının materyal seçimi, hücre kültürü çalışmaları Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın desteklenmesi için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü 21L0443001 nolu ‘’2 Boyutlu Nanomalzemelerin Glioblastoma Fotodinamik Tedavisinde Kullanımı’’ başlıklı lisansüstü tez projesinden faydalanılmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan grafitik karbon nitrit Koç Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Önder Metin tarafından, MXene ise Philadelphia Drexel Üniversitesi Nanoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yury Georgievich Gogotsi tarafından temin edilmiştir. Bu tez çalışmasında hidrojel optik fiber üretimi karakterizasyon ve optimizasyon çalışmaları Imperial College London Kimya Mühendisliği Biyosensör Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hücrelerin ultra ince kesitleri ve Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) görüntülerinin eldesi Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Laboratuvarlarında Doç. Dr. Ahmet Ceylan’ın yardımlarıyla tarafından gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. LDH Protokolü

Bu tez çalışmasında ATCC (American Type Culture Collection)’den ticari olarak temin edilen iki farklı kanser hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar U87 (insan glioblastoma) ve L 929 (fare fibroblast) hücre hatlarıdır.



Şekil 4.1. Hücre Morfolojisi (a) U 87 hücresi (40X), (b) L929 hücresi (40X).

Bu tez çalışmasında, gerçekleştirilen literatür araştırması sonucunda U87 ve L 929 hücre hatları kullanılmıştır. U87 ve L 929 hücre hatlarının kültür edilebilmeleri için; sterilizasyonu ultraviyole ışık ile sağlanan laminar sınıf II kabin kullanılmıştır. U87 ve L 929 hücre hatları için; Esensial Minumum medium içine %1 penisilin streptomisin ve %10 fetal bovin serum (FBS) eklenmesiyle besiyeri hazırlanmıştır. L929 ve U87 hücre hatları hazırlanan bu besiyerinde; koşulları 37 °C sıcaklığında ve %5 CO_2 yoğunluğunda olan inkübatörde inkübe edilmiştir.

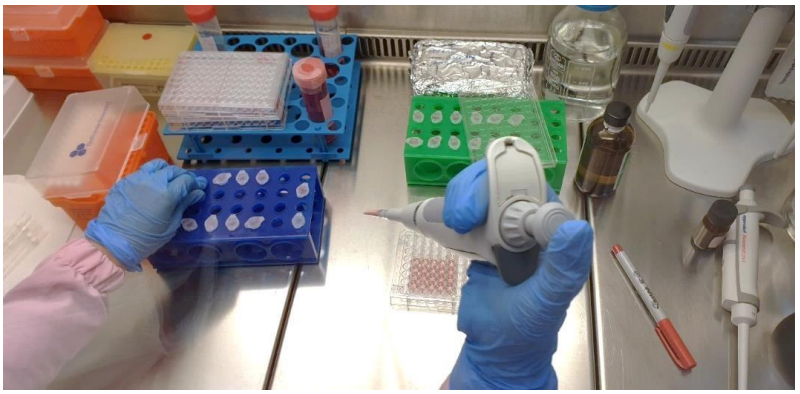
4.2.1.1. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Hücre Sayımı

Sıvı azot tankında, %10 DMSO içeren besiyerinde saklanan U 87 ve L 929 hücreleri, çalışma öncesinde 37 °C de hazırlanmış su banyosu içerisinde kapak kısmı batmayacak şekilde 1 dk bekletilerek oda sıcaklığına getirilmiştir. Ardından içerisinde hücrelerin bulunduğu criyo tüpün etrafı %70'lik alkol ile temizlenerek laminar sınıf II kabin içerisine alınmıştır. Hücreler 75 cm^2 flaska Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu (MEM) içerisinde kültüre edilmiştir. Hücreler gün aşırı kontrol edilmiştir. Kültür edilen hücrelerin devamlılığını sağlamak ve metabolik atıklardan uzaklaştırabilmek amacıyla hücreler pasajlanmıştır. Hücreleri kaldırabilmek amacıyla tripsin-EDTA çözeltisi kullanılmıştır. İnkübatörde bulunan hücrelerin bulunduğu flasklar sterilize edildikten sonra kabin içerisine alınmıştır. Alt kültürleme için öncelikle besiyeri aspire edilmiştir. Ardından serum ve metabolik atıkları uzaklaştırabilmek amacıyla 2 ml PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Bu sayede ölü hücrelerden uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından 1,5 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 2-3 dakika 37 °C'de, %5 CO_2 inkübatörde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler invert mikroskop ile kontrol edilerek hücrelerin kalktığına emin olunduktan sonra yapışan hücrelerin birbirinden ayrılması amacıyla kültür kabına hafifçe

vurulmuştur. Eklenen tripsin miktarının 3 katı kadar (4,5 ml) besiyeri kültür kabının tüm yüzeyini kaplayacak şekilde ilave edilerek tripsin aktivitesi durdurulmuştur. Ardından 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan pelet üzerine 2ml besiyeri eklenerek hücrelerin dağılması sağlandıktan sonra 13-14 ml besiyeri ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu pipetör yardımıyla hafifçe pipetlenerek hücrelerin birbirinden ayrılmaları sağlanmıştır. 75 cm^2'lik flasklara 13 ml kadar taze besiyeri eklendikten sonra bir miktar hücre süspansiyonu eklenerek her bir alt kültüre hücre kodu, pasaj numarası, tarih yazılarak inkübatöre kaldırılmıştır. Böylelikle pasajlama işlemi tamamlanmış olur.

4.2.1.2. Hücre Sayımı ve Kuyucuklara Hücre Ekimi

75 cm^2'lik flasklarda bulunan besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ardından 5mL PBS çözeltisi ile yıkanarak ortamdaki ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından 1.5 mL tripsin-EDTA eklerek 2 dk 37 °C'de, %5 CO_2 inkübatörde hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Tripsinin 3 katı kadar (4,5 mL) besiyeri eklenen hücre süspansiyonu falkon tüpe alınmıştır. Bu falkon tüpler 5 dk boyunca +4' de 600 rcf' de santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet çözdürülmüştür. 15 ml falkon tüp içerisinde bulunan pelet üzerine 5 mL taze besiyeri eklenerek pipetör yardımıyla hafifçe pipetaj yapılarak hücrelerin homojen dağıtılması sağlanmıştır. Homojenize edilen hücre süspansiyonunudan 10 µL, naubauer lamı ve üzerini kapatan lamel arasına mikropipet yardımı ile konulur. Hücreler ters ışık mikroskobunda naubauer lamında sayılır. Naubauer lamında 4 büyük kare bulunmaktadır. Bu 4 büyük kareden her birinin alanı 1 mm^2'dir. Naubauer Lamı ve üzerine lamel ile kapatılan boşluk ise 0,1 mm'dir. Yani lam üzerindeki her bir karenin hacmi 0,1 mm^3' tür. Naubauer lamına hücre solüsyonu eklendikten sonra bu dört büyük karedeki hücreler sayılır ve ortalaması alınmıştır. Sayım sonucu ortalaması alınan hücre sayısı 10^4 ile çarpılarak 1 mL hücre süspansiyonunda bulunan toplam hücre sayısı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Kuyucuklara hücre ekimi

4.2.1.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi

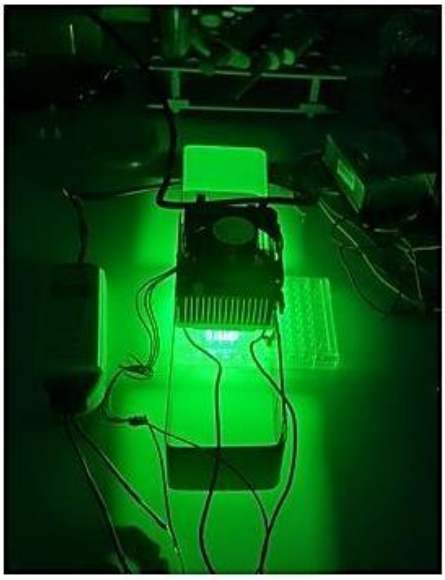
Hücrelerin kültür devamlılığının sağlanması, deneylerin tekrarlanması ve farklı çalışmalarda aynı pasajın kullanılabilmesi amacıyla dondurulması gerekmektedir. Bu dondurma işlemi için birkaç farklı kriyoprezarvasyon solüsyonu olmakla birlikte, bu aşamada önemli olan hücrelerin sağlıklı bir şekilde saklanmasıdır. Bu amaçla 9:1 oranında hazırlanmış olan FBS ve DMSO (dimetilsülfoksit) solüsyonu uygun bir dondurma solüsyonu olmuştur (%90 FBS, %10 DMSO). 25 cm^2'lik flasklarda bulunan besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve 2 mL PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Flaskın bir köşesinden hücrelerin üzerine 1,5 mL tripsin-EDTA eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Bu eklenen miktarın 3 katı kadar (4,5 mL) besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu 5 dk +4 °C' de 600 rcf'de santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet üzerine 3 ml 9:1 oranında hazırlanmış FBS/DMSO dondurma solüsyonu eklenmiştir. Hafif pipetaj yapılarak dondurma solüsyonunun homojen karışması sağlanmıştır. Ardından süspansiyon 1'er mL olacak şeklide cryoviyallere aktarılmıştır. Her bir tüpün üzerine hücre ismi, pasaj numarası ve tarih yazılmıştır. Tüpler Mr frosty kademeli dondurma kabına konularak -80 °C' ye kaldırılmıştır. Bir gün sonra tüpler -80 °C' den alınıp -196°C'lik ısıya sahip olan azot tankına kaldırılmıştır. Deneylerin tekrar edilmesi gereken durumlarda hücreler 37 °C' deki su banyosunda içerinde 1 damla buz kristali kalıncaya kadar çözdürülerek hızlıca dondurma solüsyonunu uzaklaştırmak ve hücrelerin zarar görmesini engellemek için üzerine 5-6 ml besiyeri eklenir. Ardından 75 cm2'lik flaska alınarak 1 gün inkübasyona bırakılır. Ertesi gün DMSO artıklarından kurtulmak için besiyeri değiştirilir.

4.2.1.4. Fotosensitizatör Ajanlar

Çalışmada kullanılan fotosensizatör ajanlar MXene $Mo_2Ti_2C_3$ 3,9 mg/mL (temin edilen konsantrasyon) ve grafitik karbon nitrit 2 mg/mL (hazırlanan konsantrasyon) stok konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar hücreler eklenene kadar +4 °C' de karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Grafitik karbon nitrit 2 saat kadar sonikasyon cihazı aracılığıyla sonike edilmiştir. Ardından son konsantrasyonu 0, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Malzeme ile 4 saat muamele edilen uygulama grupları, 4 saat sonunda taze besiyeri eklenerek ışığa maruz bırakılmıştır. Işık uygulamasının ardında bir gece inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

4.2.1.5. LED Işık Uygulaması

96 kuyucuklu kültür kabına hücrelerin ekilmesinin ardından 0, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL dozlarında fotosensitizer ajan $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN eklenmiştir. Her bir saat dilimi için farklı bir kültür kabı hazırlanarak bir saat ışığa maruz bırakılmıştır. Fotodinamik terapi protokolünün optimizasyonu için kullanılan ışık kaynağının dalga boyu ve uygulama süreleri belirlenmeye çalışılmıştır. Her iki malzemenin de optimizasyonu için farklı dalga boyunda ışık denenmiştir. $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN için uygulanan ışık şiddeti 50W ve dalga boyu 520 nm'dir.



Şekil 4.3. 520 nm dalga boyunda LED ışığa maruz bırakılan U87 hücrelerinin nanomalzeme varlığında ve yokluğundaki ışık kaynağına maruziyetinin değerlendirilmesi.

4.2.2. Ölçüm ve Değerlendirmeler

4.2.2.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra fotosensitizatör olarak bilinen malzemeler eklenmiş ve uygulama gruplarına ışık tedavisi yarım saat ve bir saat uygulanmıştır. Bu aşamada hücrelerin ışık ve malzeme varlığında ölüm miktarının numerik olarak ortaya konulabilmesi amacıyla Thermo LDH sitotoksisite kiti kullanılmıştır. Laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi tüm vücutta hemen hemen her hücrede bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Bu enzimin hücre dışına çıkması hücre ölümünün veya hücre membranının hasarlandığını ifade eder. LDH enzimi oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında yer almaktadır.

4.2.2.2. LDH Protokolü

4.2.2.2.1. Thermo LDH protokolü

Çizelge 4.2. LDH kit içeriği

İçerik	**Miktar**	**Saklama koşulu**
C20301		-20°C'de ışıktan korunak saklandı.
Substrat mix	5 vial	
Assay buffer	5x600µl	
Lizis buffer	1x12 ml	
Stop solüsyonu	1x60 ml	
LDH pozitif kontrol	1x30 ml	
Absorbans dalga boyu: 490 nm ve referans dalga boyu 680nm		

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat inkübe edildi. Lysis buffer ve stop solüsyonu oda ısısında yaklaşık 20 dakika bekletildi. Substrat stok solüsyonu hazırlamak için; liyofilize substrat ürününe, 11.4 ml dH_20 substrat karışımına eklenerek nazikçe pipetlenmiştir. Assay buffer oda ısısında ışıktan korunarak çözdürülmüştür. Reaksiyon

karışımı hazırlamak amacıyla ise 600µl assay buffer stok solüsyonu, 11,4 ml substrat karışımı birleştirilerek nazikçe pipetlenmiş ve ışıktan muhafaza edilmiştir.

Modifiye edilmiş LDH protokolüne göre;

1. 96 kuyucuktaki her bir 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı. Yerine 100 µl taze besiyeri eklendi.
2. Her bir kuyucuğa 10 µl lizis buffer eklenerek hücreler al ver yapıldı.
3. 96 kuyucuklu plate 45 dakika CO_2 inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
4. Her bir grup için besiyerleri eppendorfta toplanarak 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Her bir kuyucuğa 50 µl reaksiyon mix ile 30 dakika oda ısında inkübe edildi.
6. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek, ardından hafifçe vurarak karıştırıldı. Stop solüsyonu eklendikten 1-2 saat içerisinde absorbans okuması gerçekleştirildi. Kuyucuklardaki kabarcıklar mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
7. Işıktan muhafaza edilen plateler ELISA okuyucuda 490 nm ve 680 nm'de absorbans değeri ölçüldü.
8. Absorbans değerini hesaplamak için 490nm-680nm değeri birbirinden çıkartıldı.
9. Son olarak & canlılık grafiği çizilmiştir.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left[\frac{\text{Compound-treated LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}} \right] \times 100$$

formülü ile hesaplandı.

4.2.2.3. Oksidatif Stressin İncelenmesi

DCFDA (2 ',7'-dichlorofluorescein diasetat) hücre içindeki hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesini ölçen florojenik bir boyadır. Hücreye difüze olduktan sonra floresan olmayan DCFDA, reaktif oksijen türleri ile oksitlenir ve floresan bir bileşik olan DCF (2',7'–dichlorofluorescein)'ye dönüşür. Hücrelerdeki ROS düzeylerini belirlemek amacıyla DCFDA kiti (ABCAM, DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, ab113851) kullanılmıştır. Tedarikçi firmanın geliştirmiş olduğu protokol takip edilmiştir. Hücreler 24 kuyucuklu plakalara ekilerek ($25x10^3$ her kuyucukta) 37 °C'de % 5 CO_2 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından 4 saat 100 µg/ml konsantrasyondaki malzeme ile muamele edilmiştir. 4 saat sonunda malzeme uzaklaştırılarak taze besiyeri eklenmiştir.

Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler iki defa 1:10 dH_2O ile dilüe edilen 1X PBS ile yıkanmıştır. 1:1000 dilüe edilmiş DCFDA solüsyonu eklenen hücreler 45 dakika 37 °C etüvde karanlıkta bekletilmiştir. Işık grupları bir saat 50W 520nm ışığa maruz bırakılmıştır. Hücreler soğuk formaldehit ile 15 dakika süre ile fikse edilmiştir. Ardından 5 dakika kadar formaldehitin uçmasına izin verilmiştir. Nukleus boyama amacıyla 6, diamidino-2-fenilindol (DAPI) kullanılmıştır. Hücreler EVOS Floresan mikroskop altında incelenmiştir. Bu metod ile hücre çekirdekleri mavi, oksidatif stres oluşturan hücreler ise yeşil görünmektedir. Bu teknik sayesinde hücrelerde FDT protokolü sonrasında meydana gelen oksidatif stres ortaya konulmuştur.

4.2.2.4. Apoptoz ve Nekroz Tayini

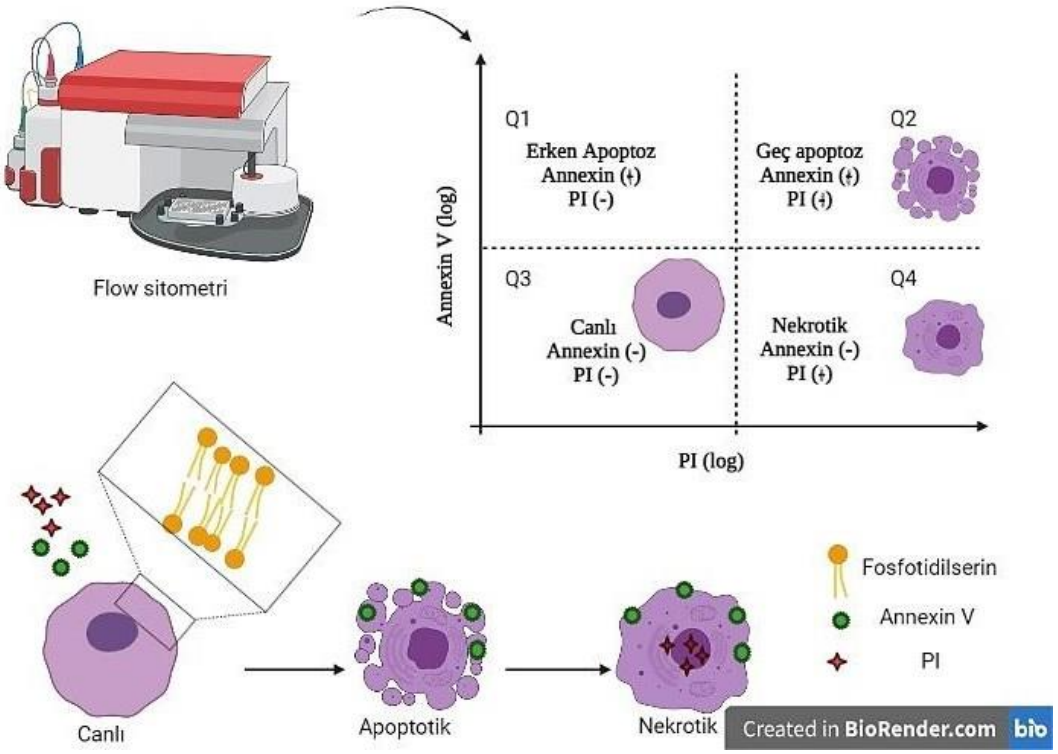
Apoptoz ve nekroz tayini yapmak üzere kullandığımız akım sitometri, akışkan sistem içerisinde akmakta olan hücrelerin, lazer ışığı ile aydınlatılarak ışığın kırınımına göre elde edilen sinyallerin analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu sinyallerin kaynağı, hücre büyüklük, granülarite ya da hücreye bağlanan florokromlar aracığı ile ortaya çıkmaktadır. Her bir hücre lazer demeti içerisinden geçerken kırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilerek, optik filtreler ve aynalar yardımıyla farklı dalga boylarına ayrılarak sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyallerde histogram olarak ekranda sunulur (117).

Sağlıklı hücrelerin membranı plazma zarının iç ve dış tabakalarında bulunan lipitlerden oluşur. Bu lipitlerden biri olan ve plazma zarının iç kısmında bulunan fosfatidilserin (PS) sadece sitoplazmaya maruz kalır. Hücre, membran yapısını bozacak herhangi bir durumla karşılaştığında sitoplazmaya bakan PS'e floresan etiketli Annexin V'e bağlanır. Bu durum apoptotik hücrelerde görülürken, nekrotik hücreler, propidyum iyodür (PI)'un hücre zarını geçerek DNA'yı boyar.

Bu analiz için T 25 flasklara her bir flask 400.000 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiş ve bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Her bir uygulama grubu için bir adet T 25 flask kullanılmıştır. Bir gece inkübasyonda tutulan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak, 100 µg/ml uygulama dozunda malzeme ile 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından 1 saat 520 nm ışığa maruz bırakılan hücreler 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün hücreler 1 ml PBS ile yıkanır ve 1 ml tripsin ile kaldırılır. Eppendorflara

toplanır. Ardından 5 dk 600 rcf'de santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır. Soğuk PBS ile yıkanan hücreler 5 dk 600 rcf'de santrifüj edilir.

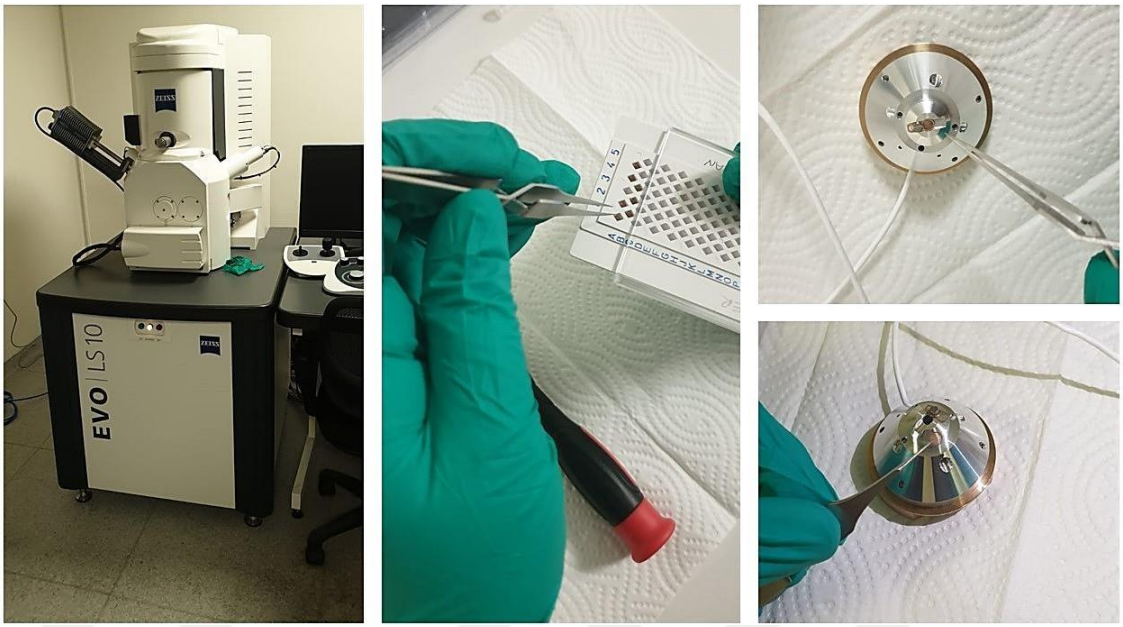
Bu aşamada kullanılan boya Alexo flour 488 Annexin V & PI (Thermo 1809498) kit protokolüne göre; soğuk PBS ile yıkanmış hücreler 1X annexin binding buffer ile her bir örnek için 100 µl olacak şekilde süspanse edildi. Ardından 5 dk 600 rcf'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Propidium iyodür solüsyonu 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Ardından her 100 µl için 1:5 oranında Alexo flour eklendi. Oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Her bir örnek için 400 µl 1X annexin binding buffer eklenerek, nazikçe pipetlendi. Örnekler okuma esnasında buz üzerinde muhafaza edildi. Akım sitometri cihazında analiz gerçekleştirmeden önce sırasıyla FACS solüsyonu, deterjan ve dH_2O ile 5 dakika cihazın temizlenmesi sağlandı. Akım sitometri cihazında analiz gerçekleştirilirken her bir örnek 10.000 event okuma gerçekleştirildi. Her bir farklı grubun okunmasından önce sırasıyla 3 dakika deterjan ve dH_2O ile 5 dakika cihazın temizlenmesi sağlandı. Analiz için nokta grafiği seçilmiştir. Grafikte her bir çeyrek hücreler hakkında bilgi vermektedir. Q1 erken apototik (PI^-/Annexin V^+), Q2 geç apoptotik (PI^+/Annexin V^+), Q3 canlı (PI^-/Annexin V^-), Q4 nekrotik hücreler (PI^+/Annexin V^-) şeklinde tanımlanır ve bu hücreler yüzde olarak hesaplanır.



Şekil 4.4. Akım sitometri Annexin V&PI boyama şematik gösterimi

4.2.2.5. 2 Boyutlu Nanomalzemelerin Hücre İçerisine Alım Mekanizmaları: Tem Mikroskopisi

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) yüksek enerjili elektronların kullanılmasıyla ince kesitlerdeki örneklerin incelemesi için kullanılan bir mikroskopidir. Nanometre seviyesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütmelerde malzemenin kristalagrofik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasına olanak sağlayan bu cihaz aracılığıyla hücre içerisine nanomalzemenin alım mekanizması tespit edilebilecektir (Ateş, 2018). TEM analizi, nanomalzemenin plazma zarını geçme yeteneğini, hücre içi trafiği ve bozunma yollarına kadar bir takım hücresel süreçleri görüntüleyerek malzemenin hücre için etkileşim mekanizmalarını ortaya koymaya yardımcı olmuştur. T25 flasklara % 60-70 dolulukta U 87 hücreleri hücre ekildi. Ertesi gün 2 ml besiyeri içerisinde 100 µg/ml konsantrasyonunda $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN uygulanarak 4 saat inkübe edildi. Malzeme aspire edildikten sonra PBS ile yıkandı. 1:1 oranda %2 gluteraldehit, MEM ile hazırlanarak 2 ml flaska eklendi. 15 dk oda ısısında beklendi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra, %2'lik 2 ml gluteraldehit tek başına eklendi, çalkalayıcıda 15 dk oda ısısında inkübe edildi. Hücreler, scraper ile iyice kazınarak toplandı ve 15 ml'lik falkonlara aktarıldı (Bu aşamada tripsin hücrelerin yuvarlaklaşmasına sebep olacağından scraper tercih edilir). 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Bu aşamada kontrol ve nanomalzeme ($Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN) ile muamele edilmiş hücre süspansiyonları santrifüjlenerek ve peletler yaklaşık 2 saat 4 °C'de %3 glutaraldehit solüsyonu (pH 7.3) ile sabitlendi. Hücre süspansiyonları daha sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile durulanarak ve %1 osmiyum tetraoksit (OsO_4) solüsyonu (pH 7.3) ile sabitlenerek, 2 saat 4 °C'de inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra dereceli bir alkol serisinde her biri 5 dakika süreyle dehidre edildi. Suyu giderilmiş peletler üç kez her biri 1 saat propilen oksit ile gömülerek ve 2 saat 1:1 oranında bir reçine/propilen oksit karışımı ile muamele edildi. Ultra ince kesitler uranil asetat ile boyanarak ve kurşun sitrat ile karşıt boyandı. Grid üzerindeki örnekler transmisyon elektron mikroskobu (Zeiss EVOLS10) ile incelenmiştir. Bu teknik sayesinde nanomalzemelerin hücre içine alım mekanizmaları ortaya konulmuştur.

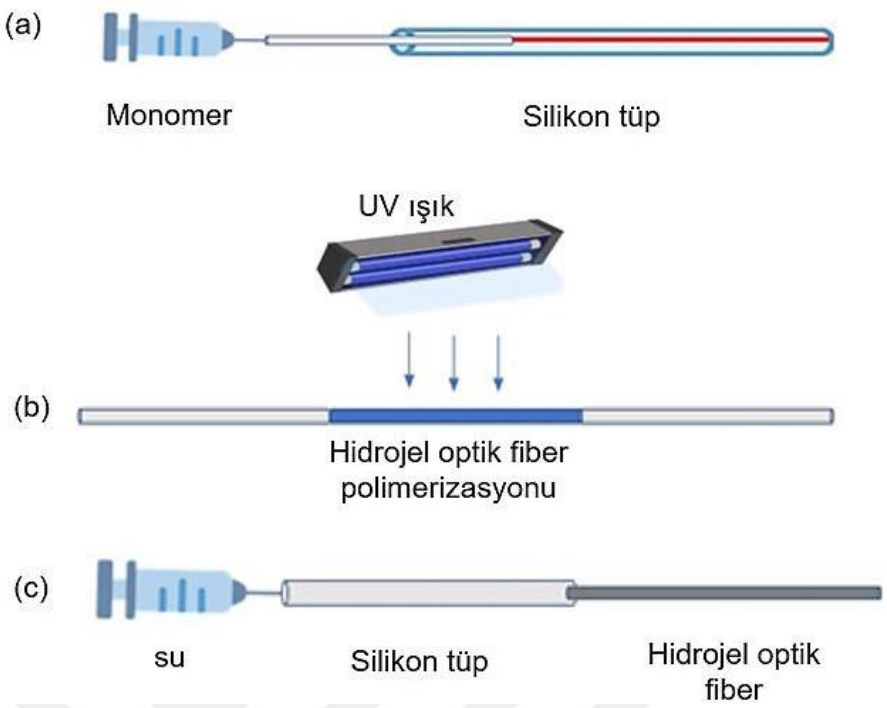


Şekil 4.5. TEM mikroskobu ve hücre kesitlerini taşıyan gridlerin tutucuya yerleştirilmesi.

4.3. HİDROJEL OPTİK FİBER ÜRETİMİ

Monomer çözeltisi içerisine akrilamid (AAm) (%95-60 mol) (Sigma-Aldrich), poli (etilen glikol) diakrilat (PEGDA, çapraz bağlayıcı) (700 Da) (%5-40 mol) (Sigma-Aldrich) eklenerek (2/3 wt/v) deiyonize su içinde foto başlatıcı olan 2-hidroksi-2-metilpropiyofenon (2-HMP) (Sigma-Aldrich) (%2, v/v) ile karıştırılmıştır.

Monomer solüsyonu, 0,45 um gözenekli bir şırınga filtresi kullanılarak partiküllerden arındırılmıştır. Monomer solüsyonu (900 µL), bir şırınga kullanılarak 10 cm'lik bir tüp (ID: 3, 2, 2.5, 2, 1.5, 1 mm) silikon tüp kalıbına enjekte edildi. Monomer çözeltisi, kalıbın 3 dakika süreyle UV'ye (365 nm, 5 mW cm^{-2}: Spektrolin) maruz bırakılmasıyla polimerize edildi. Kroslink olan hidrojel fiber, bir şırınga kullanılarak su basıncı uygulanarak silikon tüpten çıkarıldı. Elde edilen hidrojel fiber etanol ve su (1:1, v/v) ile durulandı ve distile su içerisinde muhafaza edildi. Mikroakışkan fiber üretmek için 0,2 mm, 0,5 mm ve 0,8 mm çapındaki silika fiberler (Thorlabs) kullanılmıştır. Monomer solüsyonu enjektör yardımı ile silikon tüpe aktarıldıktan sonra kroslink olan hidrojel fiberin ortasına silika fiber sabitlendi. Silika fiber croslinking gerçekleştikten sonra dikkatli bir şekilde hidrojel fiberin içerisinden geriye doğru çekilerek çıkarıldı. Hidrojel optik fiber, silikon fibere sabitlenmiş enjektör aracılığıyla su basıncı altında silikon tüpten çıkarıldı. Üretilen hidrojeller, etanol ve su (1:1, v/v) ile durulandı ve distile su içerisinde muhafaza edildi. Üretilen hidrojeller, floresan mikroskobu (Leica) altında görüntülendi.

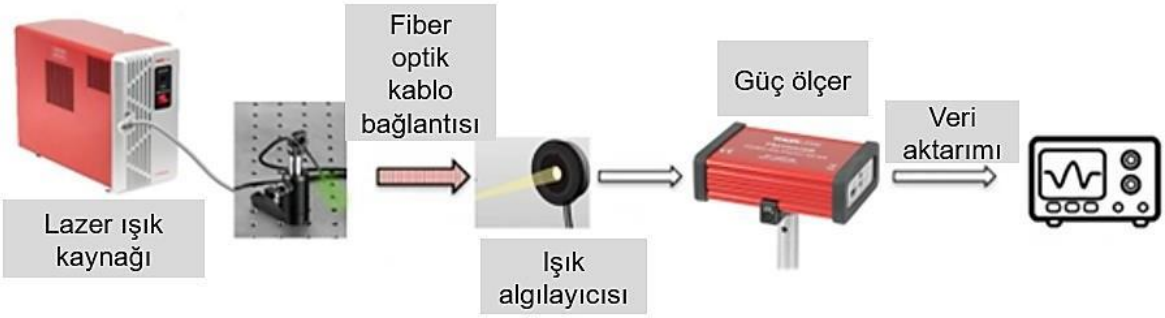


Şekil 4.6. (a) Silikon tüp içerisine monomer enjeksiyonu, (b) UV ışığı altında PEGDA, AM monomer kroslinki (c) Hidrojelin silikon tüp içerisinden çıkarılması.

4.4. HİDROJELİN OPTİK KARAKTERİZASYONLARI

4.4.1. Işık İletimi ve Işık Azalması Deneyleri

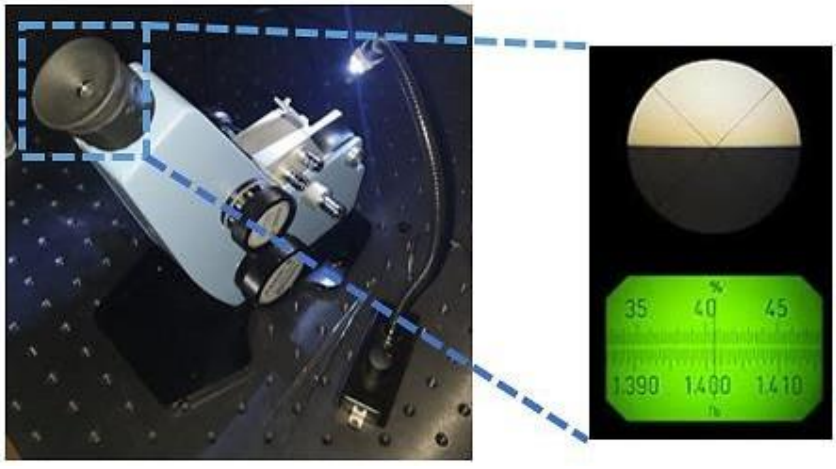
Işık yoğunluğunu kontrol etmek için T-cube LED sürücüsü (LEDD1B; Thorlabs) kullanıldı. Işık kaynakları olarak bir fiber-bağlı LED (MCWHF2; Thorlabs) ve 405 nm, 450 nm, 520 nm, 532 nm ve 635 nm 0,45mw ışık kaynağı kullanıldı. Hidrojeller 1 cm uzunluğunda bir neşter yardımıyla tek seferde çok dikkatli bir şekilde kesildi. Kesilen yüzeyin düzgün olmasına özen gösterildi. Işık iletimini ve ışık zayıflamasını test etmek için bir güç ölçer (Thorlabs PM100USB power meter) kullanıldı. 1 cm boyunda kesilen hidrojel fiber optik cihaz ile tarandı. Işık zayıflamasını göstermek için, fotoğrafları çekmek için bir akıllı telefon Samsung Galaxy Note 9 kamerası kullanıldı.



Şekil 4.7. Işık iletimi deneyi şematize gösterimi

4.4.2. Işık Kırınımı Deneyi

Işık kırınımını test etmek için 150 µl monomer solüsyonu damla halinde bir noktaya bırakıldıktan sonra lam yardımıyla ince bir film oluşturulması sağlandı. Monomer çözeltisi, 3 dakika süreyle UV'ye (365 nm, 5 mW cm^{-2} Spektrolin) maruz bırakılmasıyla polimerize edildi. Ardından çok dikkatli bir şekilde pens yardımıyla ince film tek parça halinde yüzeyden alındı. Elde edilen ince film hidrojeller farklı deney solüsyonları olan distile su, PBS, Tris tampon çözeltisi içerisinde iki gün süreyle bekletildikten sonra test edildi. Kırılma indisi, oda sıcaklığında Abbe 5 Refraktometre (Bellingham + Stanley) cihazı ile test edildi.

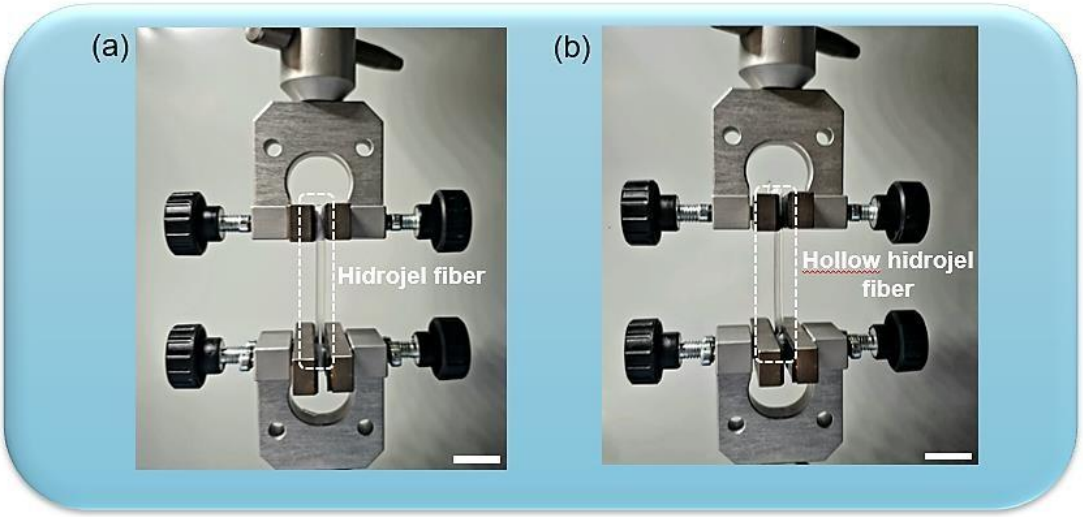


Şekil 4.8. Abbe 5 Refractometer (Bellingham + Stanley)

4.5. HİDROJEL LİFLERİNİN MEKANİK TESTİ

Hidrojel liflerinin mekanik özelliklerini analiz etmek için çekme gerilimi Lloyd EZ 50 cihazı aracılığıyla ölçüldü. Hidrojel fiberler, 5 cm uzunluğunda kesilerek cihazın klempleri arasına yerleştirildi. Hidrojellerin her iki ucu sabitlenmek amacıyla selpak ile çevrelendi. Klempler daha sonra gerilim stresini ölçmek için 4.8 mm/dakika hızında gerildi. (Şekil 4.9.)

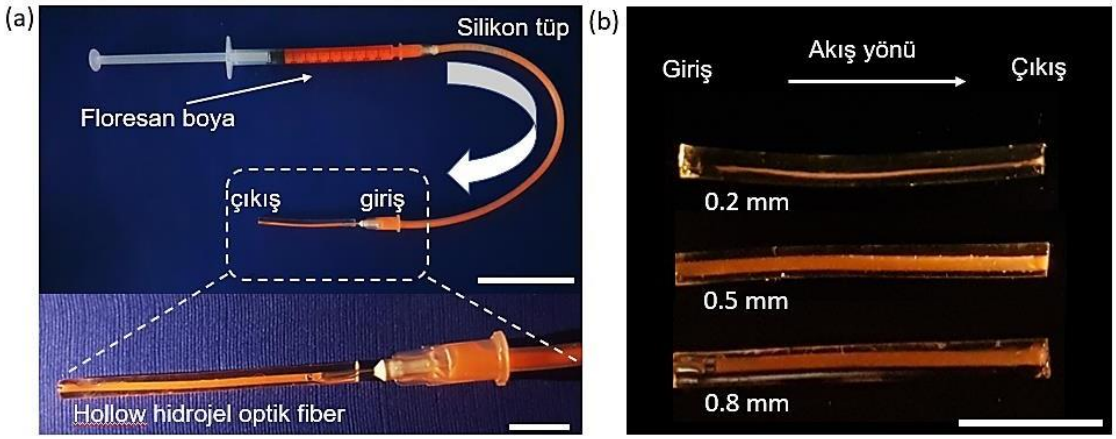
Hidrojelin kenetli uçlarının her ikisi de bir doku ile kaplanarak hidrojelin tutuşu arttırılmıştır. İstenmeyen dehidrasyonu önlemek ve hidrojel fiberleri nemli tutmak için ultrasonik buhar makinası kullanıldı.



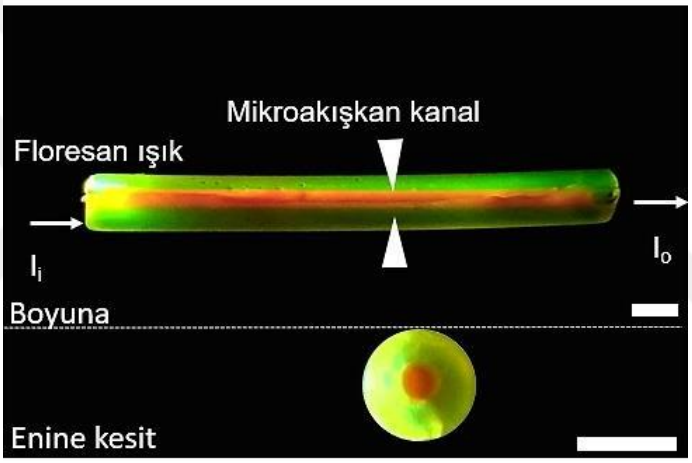
Şekil 4.9. Hidrojel optik fiberlerin mekanik stres ölçümleri. (a) Klemplenmiş hidrojel optik fiber (b) Klemplenmiş içi boş hidrojel optik fiber. Ölçek Çubuğu = 5mm

4.6. MİKROAKIŞKAN TESTİ

Mikroakışkan hızını test etmek için bir perfüzyon sistemi hazırlandı. Hidrojel içi boş fiberin akış hızını ve hızını değerlendirmek için hidrojel enjektör ucu silikon tüp ile birleştirildi ve uç enjektör iğnesi ile birleştirildi. Akış hızını test etmek için PBS kullanıldı. Akış hızını tespit edebilmek amacıyla enjektör pompası kullanıldı. Test için herhangi bir sızıntı olmadığını tespit edebilmek ve akışı gözlemleyebilmek için floresan boya kullanıldı.



Şekil 4.10. Mikroakışkan hidrojel optik fiber üretimi (a) Mikroakışkan kanal içerisine floresan boya enjekte edilmiştir (b) 0,2 mm, 0,5 mm ve 0,8 mm mikroakışkan boşluk çapına sahip hidrojel optik fiberler.



Şekil 4.11. Mikroakışkan hidrojel fiber boyuna ve enine kesit gösterimi. (Fiber yeşil floresan boya ile kros link edilmiştir. Mikroakışkan boşluk içerisine floresan boya enjekte edilmiştir. Bu şekil 450 nm ışık ile altında Samsung Note 9 kamera ile görüntülenmiştir).

4.7. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN ŞİŞME KARAKTERİZASYONLARI

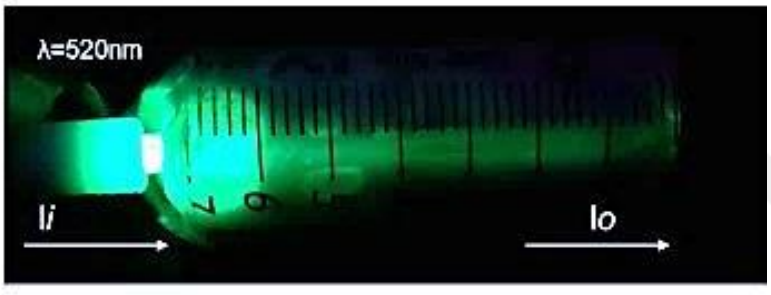
Dinamik fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) kullanılarak 37 °C'lik sabit bir sıcaklıkta kurumaya bırakılan iki gün süreyle kontrol edilmiştir. Maximum kurumanın gerçekleştiğinden emin olunduktan sonra şişme testi başlatılmıştır. Şişme çalışmaları, 3 mm çapında ve 5 cm uzunluğunda hidrojel numuneleri ile gerçekleştirildi. Hidrojellerin kuru ağırlıkları kaydedildikten sonra, 25 mL PBS içeren beherlere daldırılarak şişme deneyleri başlatıldı. Belirli zaman aralıklarında ağırlık ölçümü için alınan hidrojeller, yüzeylerinin hafifçe kurutulmasıyla tartıldı ve tekrar şişme ortamına konuldu.

Denge su içeriği (EWC) = [(şişmiş ağırlık-kuru ağırlık) / kuru ağırlık] x 100

Her hidrojel için zamana karşı şişme oranları hesaplanarak ve sonuçlar % denge su içeriği olarak değerlendirildi.

4.8. EX VİVO MİKROAKIŞKAN HİDROJEL OPTİK FİBERİN TEST EDİLMESİ

Mikro akışkan optik fiberin ışık iletim performansının test edilebilmesi amacıyla ex vivo model kullanılmıştır. Ex vivo model olarak kuzu beyin dokusu tercih edilmiştir. Doku içerisinde ışık zayıflaması deneyi için 2 mm dış çapı olan fiberler kullanılmıştır. 520 nm dalga boyunda ışık kaynağına FC konnektör ile bağlanmış hidrojel optik fiberler 1 cm aralıkla doku içerisinde geri çekilerek test edilmiştir. 1, 2, 3, 4, 5, 6 cm uzaklıkta dokunun ışık azalması güç ölçer aracılığıyla (Thorlabs PM100USB power meter) test edilmiştir. Bu test gerçekleştirilirken boşluk içermeyen fiberler, mikroakışkan kanalı hava ile dolu fiberler, mikroakışkan kanalı PBS ile dolu fiberler değerlendirilmiştir.



Şekil 4.12. Ex-vivo ışık zayıflatma deney düzeneği.

Beyin dokusu içerisinde ışığın iletimini test etmek için calipper yardımıyla kesilen doku parçaları mikroplaka okuyucu aracılığıyla ölçülmüştür.

Optik penetrasyon derinliği, ışığın dokuya ne kadar derin nüfuz edebildiğinin ölçüsüdür. Hesaplama için: $\delta=1/\alpha$ Absorpsiyon katsayısı $(\alpha)=2.303xA/t$ denklemi ile açıklanmaktadır.

4.9. SİNGLET OKSİJEN ÜRETİMİ VE ROS ÜRETİMİ DENEYLERİ

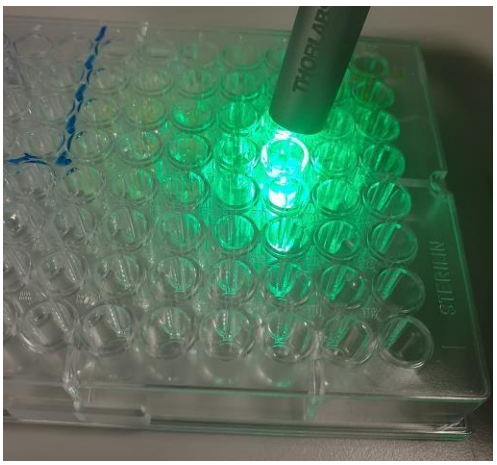
Ultraviole veya görünür ışığın bir fotonunun yoğunluğu ışığa duyarlı hale getirici molekül FS tarafından yakalanır ve uyarılmış bir durum olan IPS* üretilir ve bu durum hızla böyle bir uyarılmış üçlü duruma, 3PS* dönüşür. 3PS* süresi 1PS* süresinden daha büyük olduğu için, enerji 3PS'den çözünmüş oksijen molekülüne iletilerek singlet oksijen üretilebilir.

Bu durum şu denklem (1) ile açıklanabilir:

$$PS \xrightarrow{h\nu} {}^1PS^* \longrightarrow {}^3PS^* \xrightarrow{O_2} PS + 0_2\,({}^1\Delta g)$$

Yeni bir döngü için fotonu absorbe etmek amacıyla, 3PS* durumundan PS durumuna geçerler. Sonuç olarak, daha ağartılmadan önce, her bir PS molekülü bir tekli oksijen molekülü ile etkileşerek kendi molekülünü oluşturabilir. Üretilen bu singlet oksijen miktarı, singlet oksijen kuantum verimini belirler(118).

Singlet oksijen tespitinde birkaç farklı $^1O_2$ kimyasal tuzağı kullanılmaktadır. En iyi bilinen floresan moleküllerinden biri bileşik olan 1,1,3-difenilizobenzofuran (DPBF) araştırmamızda tercih edilmiştir ((118) Fotosensitizatör nanomateryal mpg-CN 2mg/ml stok solüsyon olarak hazırlandıktan sonra 1:10 dilüe edilmiştir. Elde edilen dilüsyonlar 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda sonike edilmiştir. Mpg-CN ve 15/µM DPBF içeren bir solüsyonlar hazırlandı. Ardından 96 kuyucuklu plate'de bir dakika süreyle 520 nm LED ışığına farklı şekilde maruz bırakıldı. Singlet oksijen üretilmesini ifade eden DPBF'in absorpsiyon bandı 414 nm'dir. Absorbans, bir mikroplaka okuyucu (Molecular Devices, ABD) kullanılarak ölçüldü. Buradan elde edilen sinyal üretilen singlet oksijen miktarı ile ilişkilendirilebilir ve singlet oksijen kuantum verimini belirlemek için kullanılabilir. Bu araştırmada da mpg-CN ve ticari olarak temin edilebilen ışığa duyarlı hale getirici metilen mavisinin tekli oksijen üretme kapasitesi karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.13. Singlet oksijen üretim potansiyelinin test edilmesi için mpg-CN'in 520 nm lazer ışığa maruz bırakılması

Işınlama süresinin eğimi (S), ağartılmış absorpsiyon (- ΔA) grafiğine karşı tekli oksijen üretim hızıyla orantılıdır. Uyarılmış durum FS ve DPBF arasında hiçbir doğrudan etkileşimin DPBF absorbans kaybına yol açmamasını sağlamak için kontroller

yapılmalıdır. Singlet oksijen üretim hızı, ışınlama süresine karşı ağartılmış absorpsiyon (-ΔA) grafiğinin eğimi (S) ile doğru orantılıdır.

Değerlendirilecek bileşiğin tekli oksijen veriminden elde edilen absorpsiyon verileri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

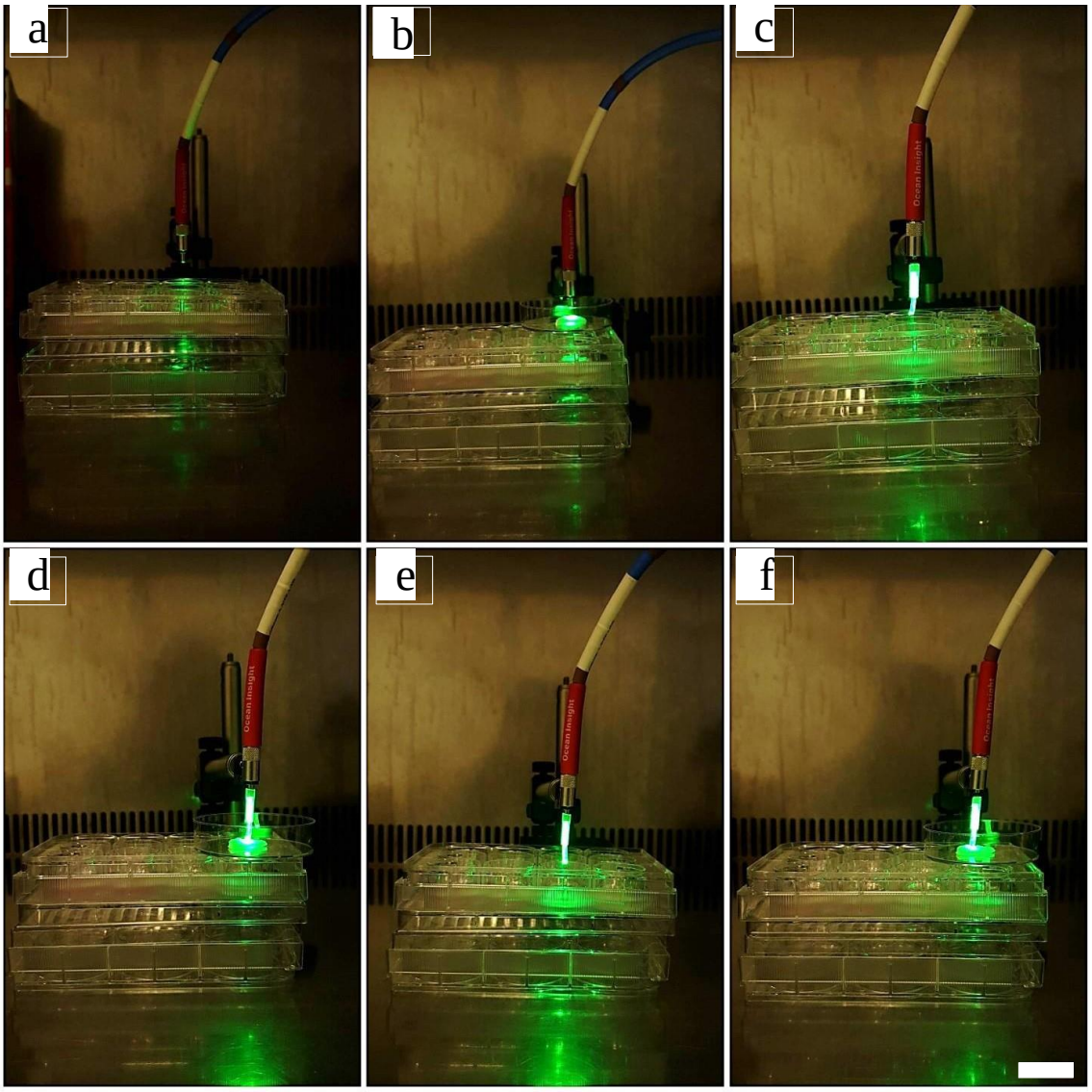
$$\Phi_{\Delta}(U) = \Phi_{\Delta}(St) \times \frac{S(U)}{S(St)}$$

4.10. MİKROAKIŞKAN HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN MGP-CN ARACILI HÜCRE CANLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Optik ve mekanik özellikleri belirlenmiş olan mikroakışkan optik fiberlerden 2cm dış çap ve 0.5 mm iç kanal hacmine sahip hidrojel optik fiber silikon hidrojel optik fiber ile bağlanmıştır. Ardından her bir kuyuda 15.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara hücreler ekilmiştir, ekilen hücreler 24 saat % 5 CO_2 37 ^oC 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresini tamamlayan hücrelerin medyumları uzaklaştırılarak mpg-CN süspansiyonu eklenmiştir. Mpg-CN uygulama grupları 4 saat % 5 CO_2 37 ^oC 'de inkübasyona bırakıldıktan sonra mpg-CN süspansiyonu uzaklaştırılarak kuyucuklar PBS ile yıkanmış ve 100 µl yeni medyum eklenmiştir. Uygulama grupları sadece lazer ışığı ve mikroakışkan hidrojel optik fiber aracılı 520nm lazer ışığına 5dk süreyle maruz bırakılmıştır. Bu aşamada hücrelerin ışık ve malzeme varlığında ölüm miktarının numerik olarak ortaya konulabilmesi amacıyla LDH sitotoksisite kiti (Thermo CyQuant C20302) kullanılmıştır.

Hücre canlılığının değerlendirilebilmesi amacıyla kalsein AM ve etidyum bromür homodimer-1 boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücre içi esteraz aktivitesini belirtmek için yeşil floresan kalsein-AM ile ve plazma zarı bütünlüğünün kaybını belirtmek için kırmızı floresan etidyum homodimer-1 ile aynı anda boyayarak canlıları ölü hücrelerden hızlı bir şekilde ayrılması sağlanır. 2 µM kalsein AM ve 4 µM EthD-1 solüsyonu PBS içerisinde hazırlanır. EthD-1 PBS içerinde 1:500 oranında dilüe edilir. Ardından Kalsein Am aynı solüsyon içerinde 1:2000 oranında dilüe edilir. Ardından hazırlanan solüsyon ışıktan korunarak vortekslenir. 12 kuyucuklu plakalara ekilmiş hücreler üzerinden medyum uzaklaştırılır. Ardından 2 defa PBS ile yıkanır. Kuyucukların üzerini tamamen kaplayacak miktarda (400-500 µL) Kalsein Am/EthD-1 solüsyonu eklenir. 30 dakika % 5 CO_2 37 ^oC

‘de inkübasyona bırakılır. Ardından 2 defa PBS ile yıkanan hücreler konfokal mikroskopta görüntülenir. Kalsein AM 454/517nm ve EthD-1 için 528/617nm Ex/Em olacak şekilde ayarlanır.



Şekil 4.14. Fiber optik aracılı *in vitro* PDT deney düzeneği. U 87 hücreleri kuyucuklara ekildikten sonra 100 µg/mL mpg-CN’e 4 saat maruz bırakılmıştır. Ardından 520nm lazer ışığı ile 5 dakika muamele edilmiştir. (a-b) fiber optik lazer aracılı PDT ve domuz deri bariyeri ile PDT (c-d) fiber optik lazer ile bağlanmış hidrojel optik fiber aracılı PDT ve domuz deri bariyeri ile PDT (e-f) fiber optik lazer ile bağlanmış mikroakışkan kanallı hidrojel optik fiber aracılı PDT ve domuz deri bariyeri ile PDT.

4.11. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN BİYOUYUMLULUKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Üretilen hidrojel optik fiberler hacminin 3 katı kadar medyum ile oda ısısında 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamele edilmiştir. Ardında 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelerin

medyumu uzaklaştırılarak 2 gün süreyle hidrojel optik fiberler ile muamele edilmiş medyuma maruz bırakılır. Ardından hücre canlılığı için fotodinamik tedavi potansiyelinin test edilmesinde kullandığımız LDH sitotoksisite kiti (Thermo CyQuant C20302) ile test edilmiştir. Diğer taraftan 12 kuyucuklu plakalara ektiğimiz U87 hücreleri aynı şekilde muamele edilmiş medyumlara 2 gün maruz bırakılarak ardından Kalsein Am ve EthD-1 ile boyanarak konfokal mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 4.15. Konfokal mikroskop ve Kalsein AM/EthD-1 boyama analizi

4.12. İSTATİSTİK ANALİZİ

Çalışmamızın kantitatif bulguları ortalama standart sapma (n=5) olarak ifade edildi. Verileri incelemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı ve p değeri 0,05 veya daha düşük olan durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Her grubun kontrol grubuyla karşılaştırılmasında Dunnet testi tercih edildi. Analizler için GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanıldı.

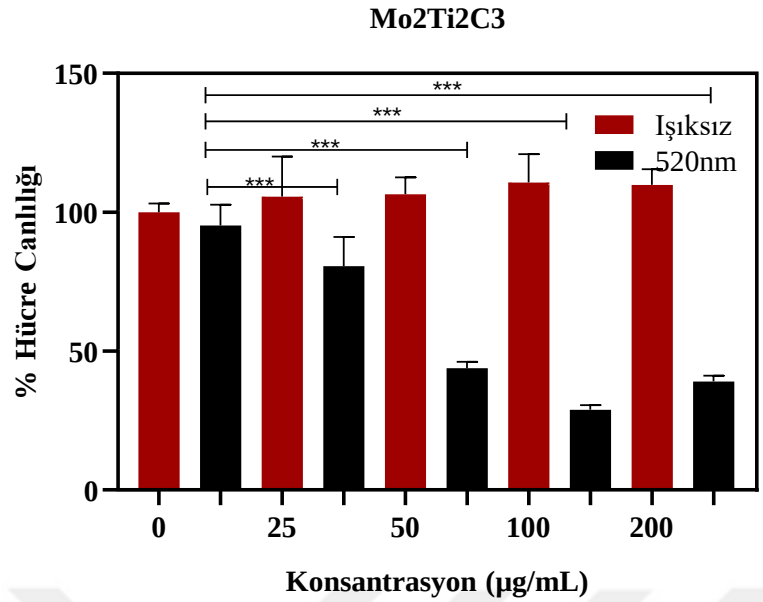
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. HÜCRE CANLILIĞI SONUÇLARI

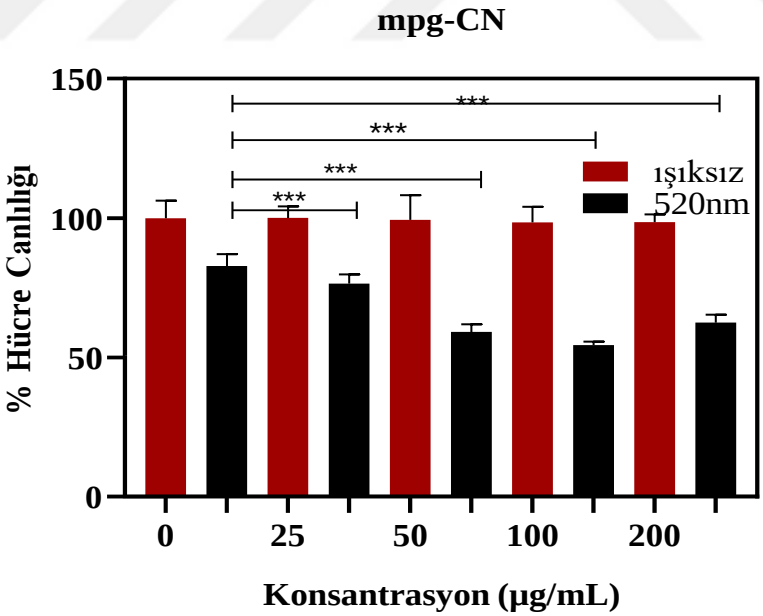
Hücre canlılığının değerlendirebilmesi amacıyla U87 glioblastoma ve L929 fibroblast hücreleri kullanıldı. Hücreler farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml) $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN'e 4 saat maruz bırakılmıştır. Fotodinamik terapi etkinliğinin değerlendirildiği ışık uygulama grupları 1 saat 50W 520 nm ışığa maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığının değerlendirilmesi amacıyla LDH sitotoksisite kiti (Thermo C20301) kullanılmıştır. $Mo_2Ti_2C_3$ hücre canlılığının U 87 hücrelerinde ışık uygulanmayan gruplarda 0, 25, 50, 100, 200 µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığında herhangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 5.1.). Işık uygulama gruplarında ise artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı 25 µg/ml %88, 50 µg/ml %43, 100 µg/ml %28, 200 µg/ml %37 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.1.).

mpg-CN hücre canlılığının U 87 hücrelerinde ışık uygulanmayan gruplarda 0, 25, 50, 100, 200 µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığında herhangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 5.2.). Işık uygulama gruplarında ise artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı 25 µg/ml %80, 50 µg/ml %62, 100 µg/ml %54, 200 µg/ml %63 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.2.).

$Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN'in glioblastoma hücre hattı U87 hücresi üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde 1 saat 50W 520 nm ışığa maruz bırakılan gruplar arasında tüm parametreler karşılaştırılmış, en az iki grup arasında herhangi bir farklılığın olup olmadığını test etmek için "tek yönlü varyans analizi" (one-way ANOVA) yöntemi Dunnet testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. 50 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlar istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık *** $p<0,001$ şeklinde gösterilmiştir.



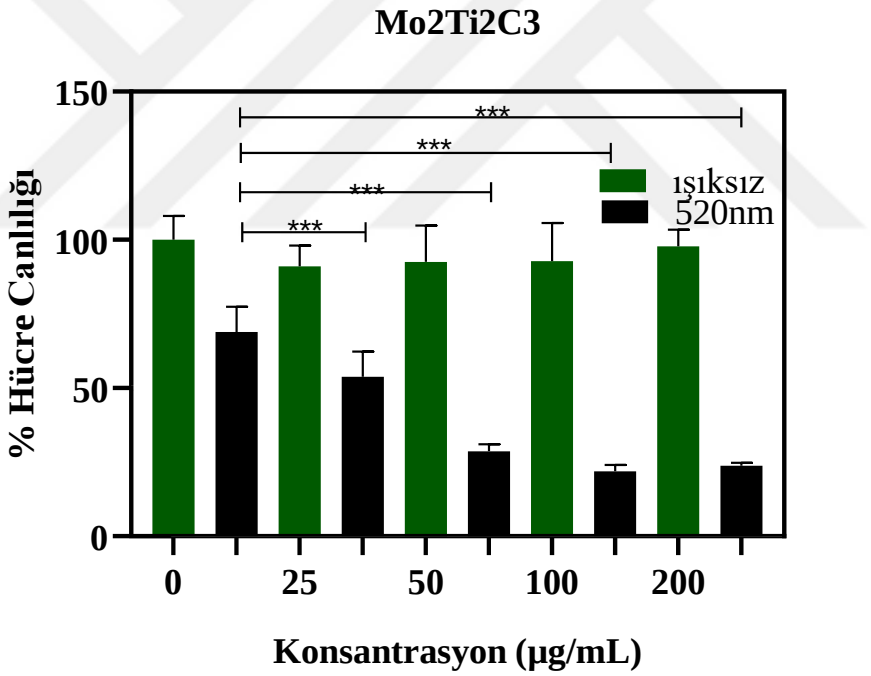
Şekil 5.1. U 87 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml) $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***p<0,001, varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen $Mo_2Ti_2C_3$ ve $Mo_2Ti_2C_3$ +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir).



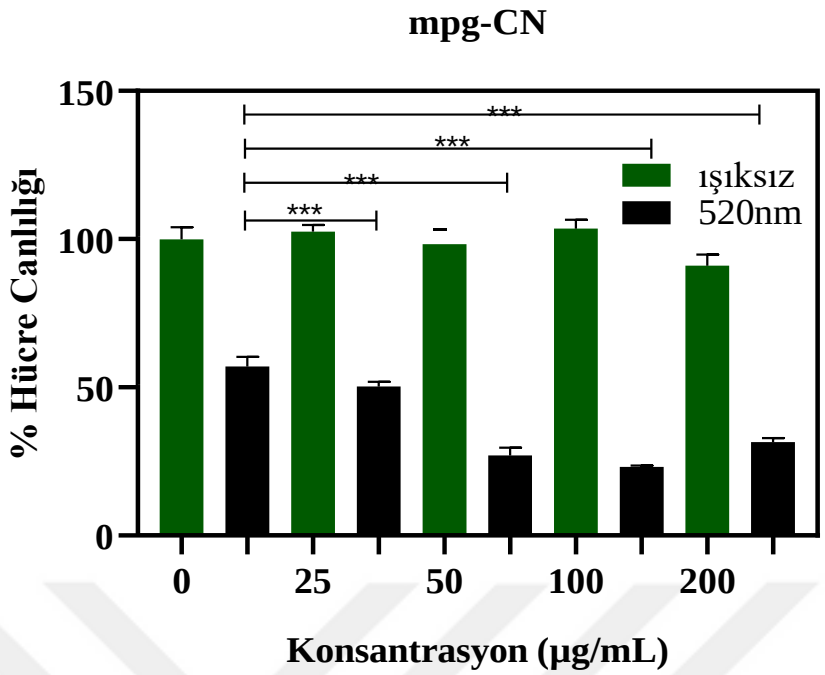
Şekil 5.2. U 87 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml) mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W 520 nm led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***p<0,001, varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen mpg-CN ve mpg-CN +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir).

$Mo_2Ti_2C_3$ hücre canlılığının L929 hücrelerinde ışık uygulanmayan gruplarda 0, 25, 50, 100, 200 µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığında herhangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 5.3.). Işık uygulama gruplarında ise artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı 25 µg/ml %53, 50 µg/ml %28, 100 µg/ml %21, 200 µg/ml %23 hücre canlılığı tespit edilmiştir. 50 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlar istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık *** $p<0,001$ şeklinde gösterilmiştir.

Mpg-CN'e maruz bırakılan ışık uygulanan gruplarda 25 µg/ml %50, 50 µg/ml %27, 100 µg/ml %23, 200 µg/ml %31 hücre canlılığı tespit edilmiştir. (Şekil 5.4.). 50 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlar istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık *** $p<0,001$ şeklinde gösterilmiştir.

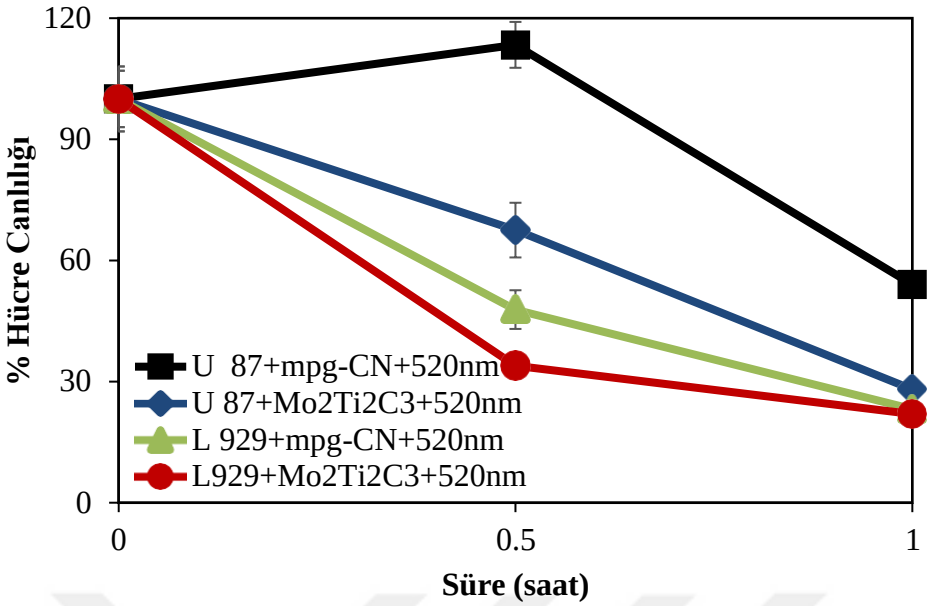


Şekil 5.3. L 929 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml) $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W 520nm led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***$p<0,001$, varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen $Mo_2Ti_2C_3$ ve $Mo_2Ti_2C_3$ +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir).



Şekil 5.4. L 929 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 µg/ml mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 1 saat 50 W 520nm led ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). (***p<0,001 varyans analizi ve Dunnet ikili karşılaştırmasıyla elde edilen mpg-CN ve mpg-CN +ışıkla tedavi edilen grupların hücre canlılık seviyeleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermiştir).

Fotodinamik tedavide fotosensitizerin optimum uygulama dozu 100 µg/ml olarak belirlendikten sonra bu dozda farklı zaman aralıklarında (0.5 saat, 1 saat) uygulama grupları oluşturulmuştur. Bu zaman dilimlerinde $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN'in glioblastoma hücresi U87 üzerinde hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN'e maruz bırakılan her iki grupta 1 saatlik uygulama gruplarının sırasıyla %28 ve %54 canlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. Bu doğrultuda glioblastoma tedavisinde optimum uygulama dozu ve uygulama süresi 100 µg/ml ve 1 saat olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.5.). Diğer taraftan fibroblast hücresi L929 üzerinde $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN'in zamana bağlı (0.5 saat, 1 saat) hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda maruz bırakılan her iki grupta 1 saatlik uygulama gruplarının sırasıyla %21 ve %23 canlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 5.5.).



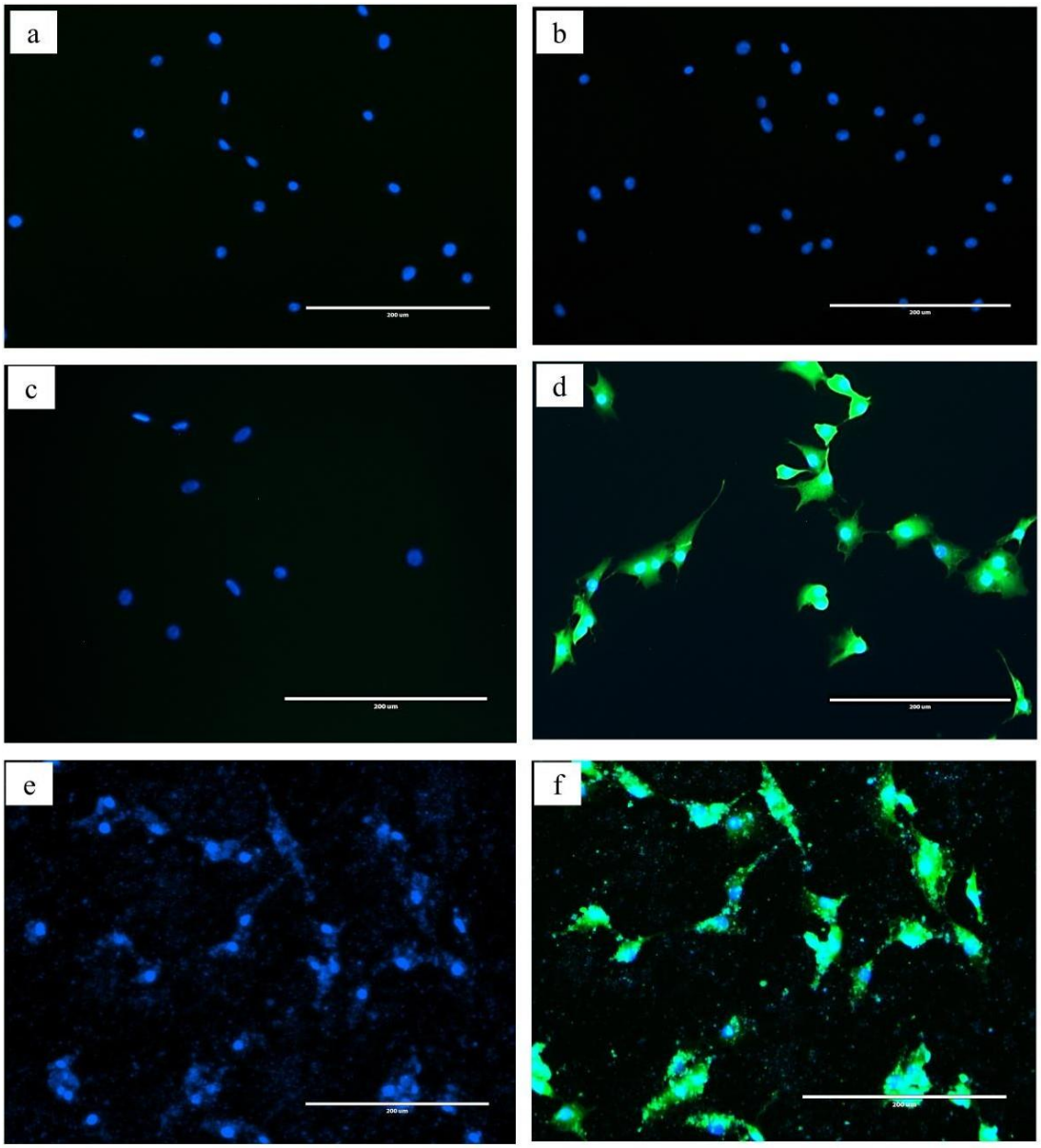
Şekil 5.5. U 87 hücresinin 100 µg/ml konsantrasyonunda mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 0.5 ve 1 saatlik 50 W 520nm led ışık varlığında hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301). L 929 hücresinin 100 µg/ml konsantrasyonunda mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ varlığında 4 saat 37 °C'de CO2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 0.5 ve 1 saatlik 50 W 520nm led ışık varlığında hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301).

5.2. OKSİDATİF STRES SONUÇLARI

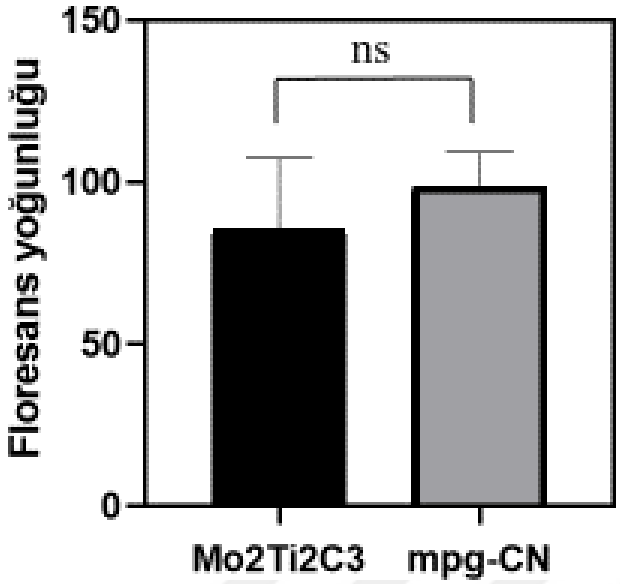
Fotodinamik tedavinin temeli olan ROS üretimi, kanserli hücreleri öldürmede önemli bir rol oynar. ROS esas olarak süperoksit anyonu ($O2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) ve tekli oksijen ($^1O_2$) içerir. ROS fizyolojik sınırlar içerisinde hücrelerde sinyal iletiminde rol oynar, ancak ROS seviyesi anormal şekilde yükseldiğinde, geri dönüşü olmayan hücre hasarına neden olmaktadır. FDT sırasında üretilen ROS, tümör hücrelerinde DNA/RNA ve protein gibi biyolojik makromolekülleri oksitleyerek tümör hücresi apoptozunu indüklemesiyle bilinir (119). FDT sırasında ortaya çıkan oksidatif stresi tespit edebilmek amacıyla (2 ',7' -dichlorofluorescein diasetat) hücre içindeki hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesini ölçen fluorojenik boya kullanılmaktadır. Hücreye difüze olduktan sonra floresan olmayan DCFDA, reaktif oksijen türleri ile oksitlenir ve floresan bir bileşik olan DCF (2',7'–dichlorofluorescein)'ye dönüşür. Bu sayede floresan mikroskobunda GFP kanalında ROS üreten hücreler yeşil floresans ışıma vermektedir. Hücrelerin çekirdeklerini boyamak amacıyla DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) tercih edilmiştir. Bu değerlendirmede hücre çekirdekleri mavi renkte boyanırken, ROS proliferasyonu olan hücreler yeşil floresan vermektedir.

Hücre canlılığı analizinden elde ettiğimiz sonuçlara göre ROS üretiminin değerlendirilmesinde U 87 hücresi, her iki nanomalzeme içinde 100 µg/ml'lik konsantrasyonda 50W 520 nm LED ışığa 1 saat maruz bırakılmıştır.

Şekil 5.6.'da herhangi bir ışığa ve nanomalzemeye maruz bırakılmamış kontrol grubunda, sadece ışığa maruz bırakılan grupta ve $Mo_2Ti_2C_3$ uygulanan gruplarda ROS üretimini değerlendirebileceğimiz yeşil floresans tespit edilmemiştir. Öte yandan $Mo_2Ti_2C_3$+ışığa maruz bırakılan hücre gruplarında yeşil floresan aktivite görülmektedir. Şekil 5.6.'da mpg-CN 'ün ROS üretme potansiyeli test edilmiş ve kontrol grubu, sadece 520nm ışığa maruz bırakılan kontrol grubu ve sadece mpg-CN ile muamele edilen uygulama grubunun herhangi bir ROS belirteci olan floresan aktivite göstermediği tespit edilmiştir. mpg-CN+ışık uyguladığımız grupta ROS belirteci yeşil floresan aktivite tespit edilmiştir. Şekil 5.7'de ise her iki nanomalzemenin intraselüler ROS belirtici yeşil floresan miktarları Image-j programı ile analiz edilmiş ve her iki grup arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir.



Şekil 5.6. U87 hücresinin intraselüler ROS üretiminin değerlendirilmesi (20X) (Abcam 113851). (a) kontrol grubu, (b) sadece ışık uygulama grubu, (c) sadece mpg-CN uygulama grubu, (d) mpg-CN +520 nm LED ışık uygulama grubu, d) sadece $Mo_2Ti_2C_3$ uygulama grubu, (e) $Mo_2Ti_2C_3$+520 nm LED ışık uygulama grubu. (520 nm LED ışık maruziyet süreler 1 saattir.)



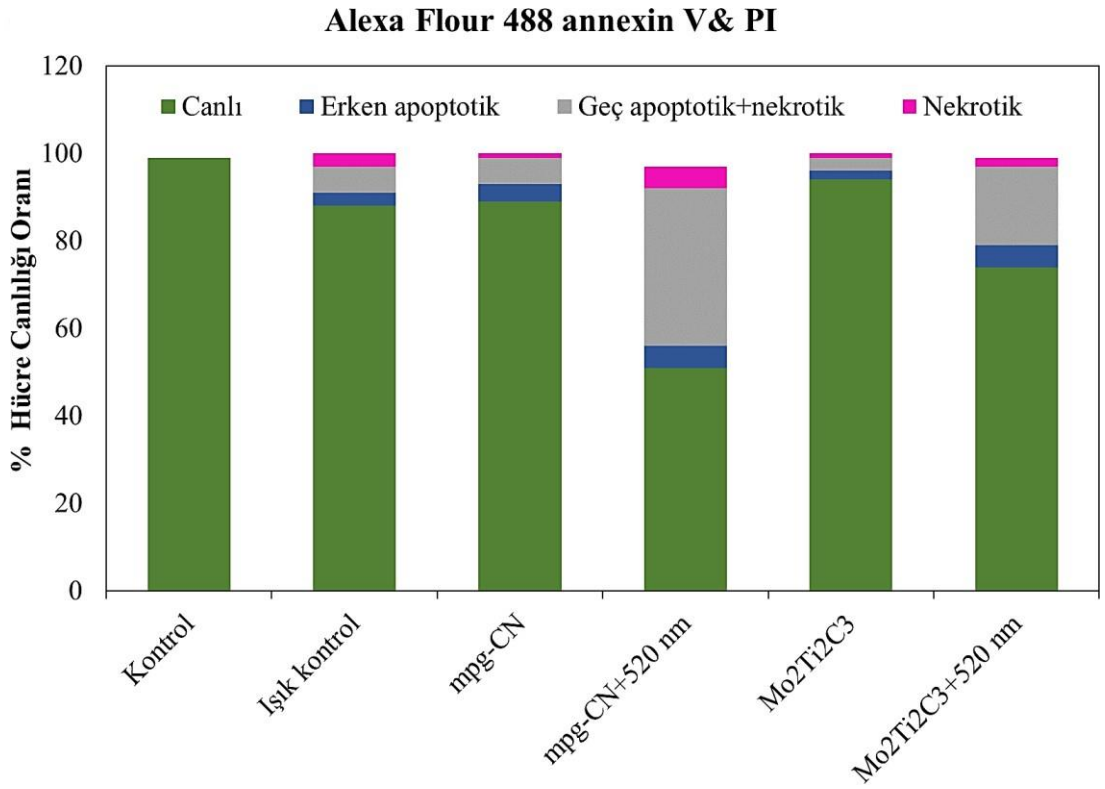
Şekil 5.7. U 87 hücresinin intraselüler ROS üretiminin mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ ve 520 nm Led ışığa maruz bırakılmış hücrelerde floresans miktarının ölçülmesi belirlenmesi ($P<0,05$; $n=5$)

5.3. HÜCRESEL ÖLÜM MEKANİZMASI SONUÇLARI

Fotodinamik tedavinin temelini oluşturan apoptotik hücre ölümü ya ekstrinsik olarak ölüm reseptörleri aracılığıyla ya da intrinsik olarak mitokondri aracılığıyla gerçekleşir. Ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen ölüm FDT stresin sebep olduğu sitokin salınımına bağlı hücre ölümüdür. Diğer taraftan FDT mitokondriyal hücre ölümünde mitokondriyal membran geçirgenliği çok önemli ölümcül bir olaydır. Burada Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından kontrol edilen p-53'ten bağımsız bir ölüm gerçekleşmektedir. Öte yandan, ışığa duyarlı hücrelerde otofajik ölüm gerçekleşebilmektedir. Bu durumda, otofajik bozunmanın arttırılması, apoptotik sinyallemede kusurları olan kanser hücrelerinde bir yedek foto öldürme mekanizması sağlayabilir. Bu nedenle kanser hücrelerinin FDT sonucu hangi mekanizma ile öldüğünü bilmek oldukça önemlidir (80).

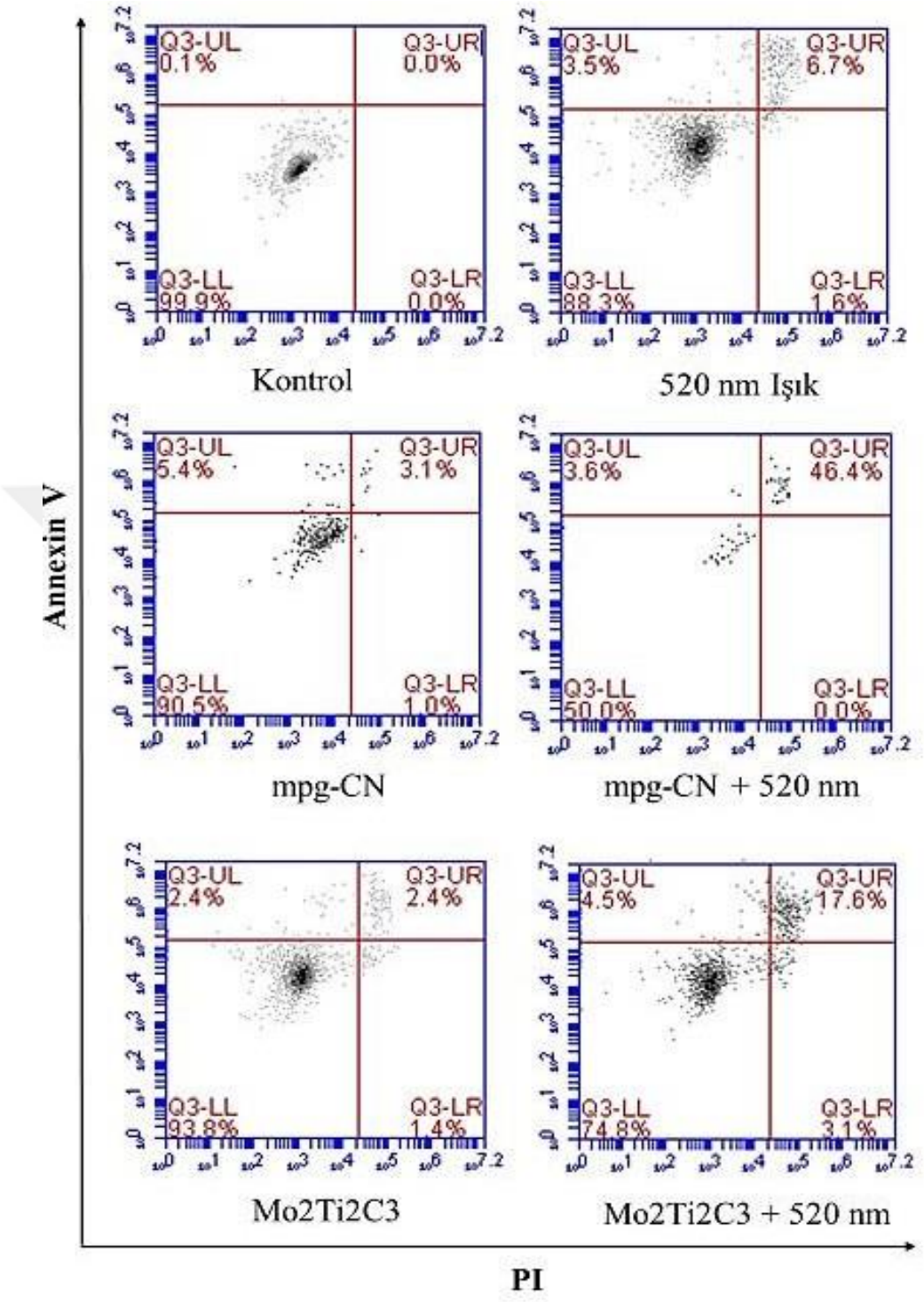
Glioblastoma hücrelerinin hangi yolakla ölüme gittiğini tespit edebilmek amacıyla Alexa flour Annexin V & PI ikili boyaması tercih edilmiştir. Bu boyama yöntemi aracığıyla hücrede plazma zarının iç kısmında bulunan fosfotidilserin hücre membranının bozulması sonucu floresan etiketli Annexin V'e bağlanır. Diğer taraftan nekrotik hücreler ise doğrudan propidyum iyodür'ün hücre içerisine girerek hücreleri boyaması ile ayırt edilmiştir. Bu analizin gerçekleştirilmesi amacıyla akım sitometri kullanılmıştır. Hücre canlılığı deneyinden elde edilen veriler ışığında 100 µg/ml dozunda 1 saat 50W 520nm

ışığa maruz bırakılan $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN uygulama gruplarının ölüm mekanizmaları değerlendirilmiştir. Şekil 5.8.'de görüldüğü üzere, ışık uygulanmayan kontrol grubunda hücre canlılığı %100'dür. Işık uygulanan kontrol gruplarında hücre canlılığı ışığa duyarlı ölüme bağlı olarak %88'dir. Işık uygulanmayan mpg-CN maruz bırakılan uygulama grubunda hücre canlılığı %89'dur (Şekil 5.8.). Işık uygulanan mpg-CN maruz bırakılan uygulama grubunda hücre canlılığı %50'dir. Bu grupta apoptotik sürece girmiş hücre %44 iken %6 oranında nekrotik hücre ölümü tespit edilmiştir. (Şekil 5.8.). Şekil 5.8'e göre ışık uygulanmayan $Mo_2Ti_2C_3$ grubunda ise hücre canlılığı %94'tür. Işık uygulanan $Mo_2Ti_2C_3$ maruz bırakılan uygulama grubunda hücre canlılığı %74'tir. Bu grupta apoptotik sürece girmiş hücre %23 iken %3 oranında nekrotik hücre ölümü tespit edilmiştir (Şekil 5.8.).



Nekrotik	0	3	1	5	1	2
Geç apoptotik+nekrotik	0	6	6	36	3	18
Erken apoptotik	0	3	4	5	2	5
Canlı	99	88	89	51	94	74

Şekil 5.8. Akım sitometri apoptoz analizi; U 87 hücresinin mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ (100 µg/ml) ile muamele edilmesi ve 1 saat ışığa maruz bırakıldıktan 12 saat sonra hücreler toplanarak PI-AnnexinV Thermo (1809498) ile boyaması. Hücre popülasyonu akım sitometri aracılığıyla canlı, erken apoptotik, geç apoptotoik ve nekrotik hücrelerin % dağılımını belirlemek için 10.000 event değerlendirilmesi.

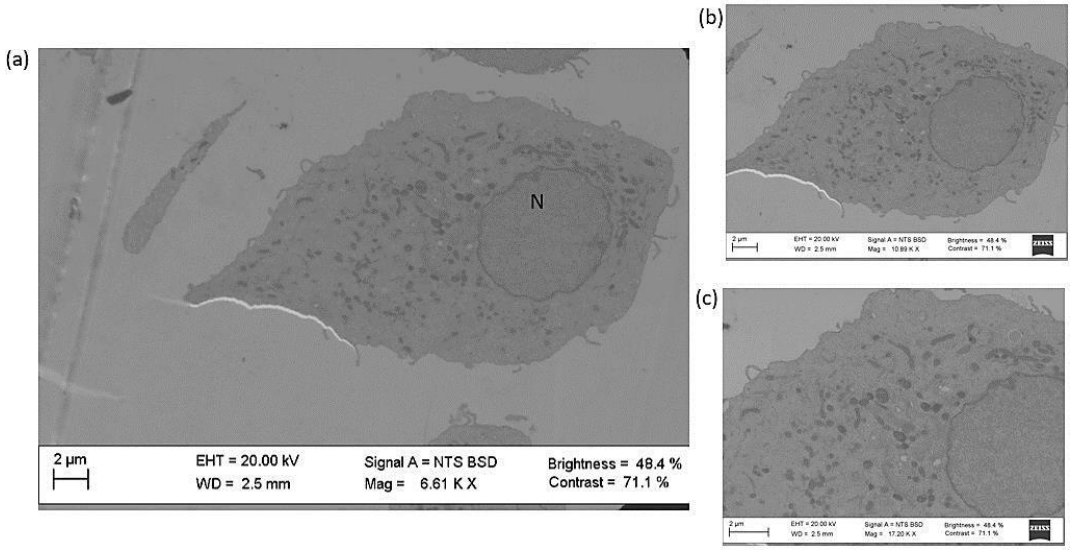


Şekil 5.9. 100 µg/ml mpg-CN ile muamele edilen U87 hücrelerinin Annexin V FITC/PI akım sitometri analizi. 100 µg/ml $Mo_2Ti_2C_3$ ile muamele edilen U87 hücrelerinin Annexin V FITC/PI akım sitometri analizi.

5.4. 2 BOYUTLU NANOMALZEMELERİN HÜCRE İÇERİSİNE ALIM MEKANİZMALARI SONUÇLARI

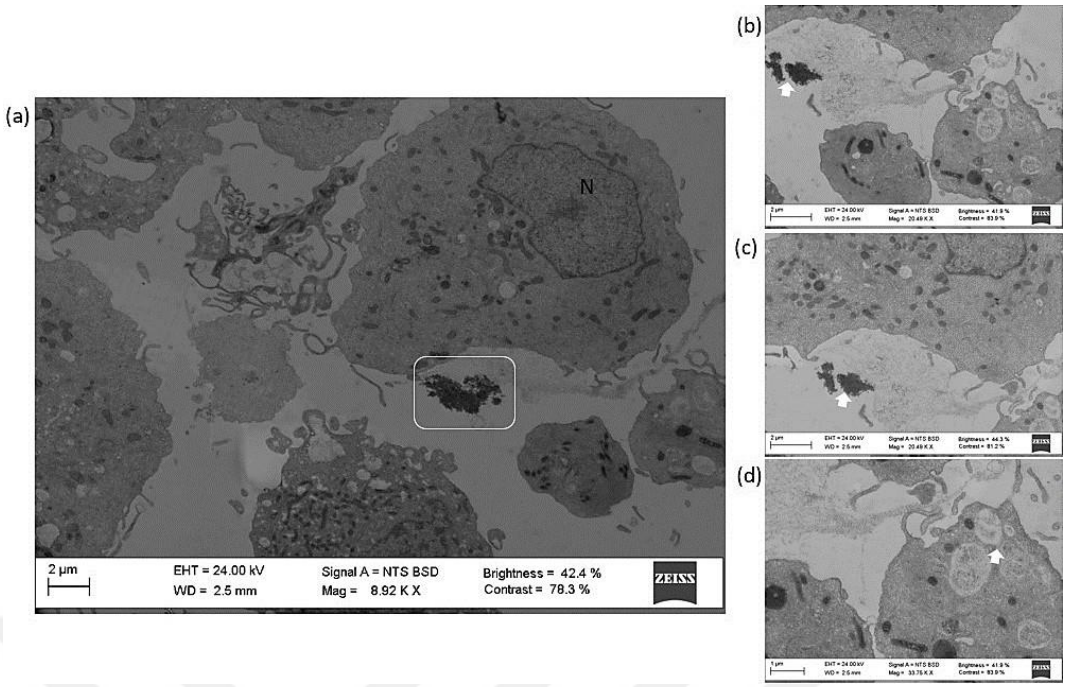
Nanomalzemeler, hücre tarafından içsel mekanizmaların uyarılması sonucu hücre içerisine alınmaktadır. Nanomalzemelerin hücre içerisine alınmasından sorumlu mekanizma endositozdur. Klatrin aracılı endositozda, reseptör-ligand bağlanması, plazma zarının sitozolik tarafında "kaplanmış çukurların" (klatrin) alımını ve oluşumu ile gerçekleşir. Klatrin, nanomalzeme çevresinin sarılmasında, vezikül çıkıntılarının oluşumunda ve sıkıştırılmasında görev alır. Klatrin aracılı endositoz, virüsler tarafından kullanılan en yaygın endositik yoldur. Caveolin bağımlı endositoz, plazma zarının sitozolik tarafında firkete benzeri caveolin katlarının birleştirilmesini içerir ve ~50-80 nm çapında bir şişe şeklinde caveola oluşturur. Klatrin ve caveolin endositoz için ek itici güç sağlarken, clathrin ve caveolin bağımsız endositoz, reseptör-ligand bağlanması yoluyla da meydana gelebilir. Konjuge ligandları olmayan nanomalzemeler, spesifik olmayan etkileşimler yoluyla da endositoz gerçekleştirebilir. Endositoz gerçekleşirken; elektrostatik, van der Waals, hidrofobik kuvvetler, ligand-reseptör bağlanması gibi etkileşimler endositozu harekete geçiren mekanizmalardır(120).

Nanomalzemelerin hücre içerisine alımı fotodinamik tedavinin gerçekleşebilmesi için en önemli unsurdur. Bu nedenle projede kullandığımız her iki nanomalzemenin de hücre içerisine ne şekilde lokalize olduğu bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla U87 hücreleri 100 µg/ml uygulama dozlarında 1 gün süreyle $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN ‘e maruz bırakılmıştır. Hücre peletlerinden ultra ince kesitlerin alınmasının ardından gridlere yerleştirilen hücre kesitleri transmisyon elektron mikroskobunda (Zeiss EVOLS10) değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucu Şekil 5.10. (a) (b) (c)’de herhangi bir nanomalzemeye maruz bırakılmamış kontrol grubu U87 hücresi farklı magnifikasyonlarda gösterilmiştir. Burada herhangi nanomalzemeye maruz bırakılmayan kontrol grubu hücrelerinde, hücre membranı ve organelleri normal görünümündedir.

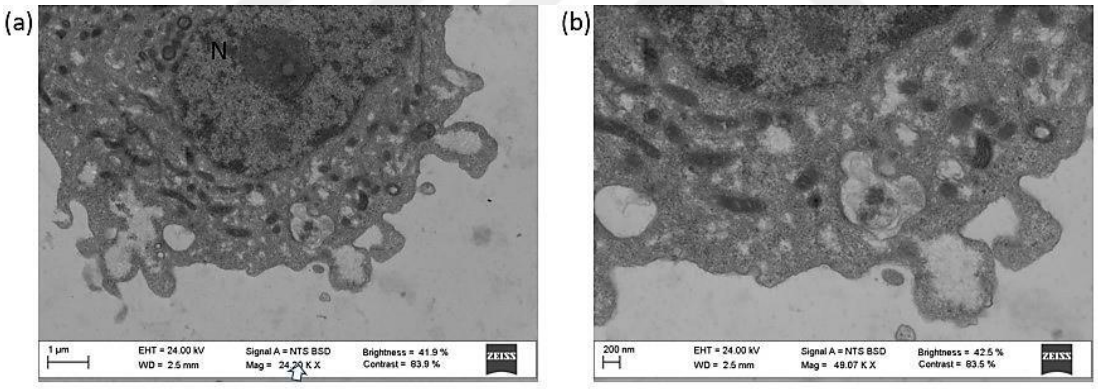


Şekil 5.10. U 87 hücresinin TEM analizi (kontrol grubu).

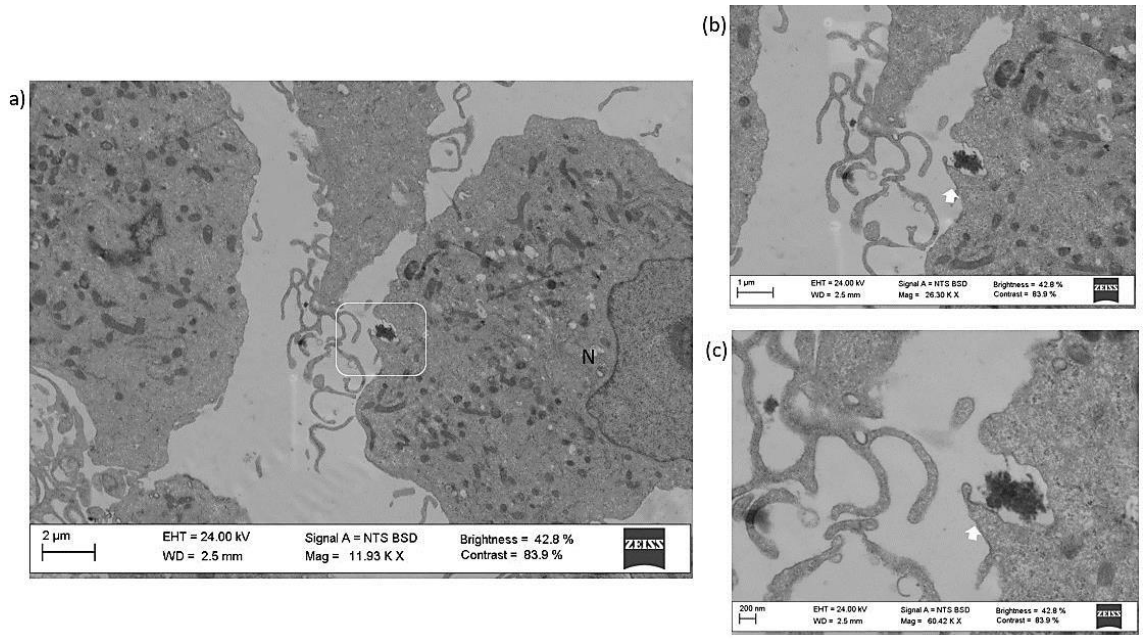
Mpg-CN ile muamele edilen U87 hücre grubunda hücrenin endositoz gerçekleştirmek üzere almaçlar oluşturduğu görülmektedir (Şekil 5.11. (a) (b) (c)). Şekil 5.11.'de kare kutu içerisinde gösterilen hücre içerisine alımı gerçekleştirilecek olan mpg-CN'dir. Şekil 5.10. (b) (c)'da ise beyaz okla gösterilen mpg-CN iken hemen yukarısında malzemeyi hücre içerisine almak üzere oluşturulan almaçlar görülmektedir. Şekil 5.11. (d)'de beyaz okla endositoz aracılı hücre içerisine alınmış mpg-CN görülmektedir. Şekil 5.12. (a) (b)'de ise hücre dışına almaçlarını uzatmış ve endositoz gerçekleştirmiş U87 hücreleri gösterilmiştir. Şekil 5.13. (a) ise beyaz kare içerisinde hücre içerisine alınmakta olan mpg-CN görülmektedir. Yüksek çözünürlükte görüntülenen Şekil 5.13. (b) (c)'te ise okla hücre içerisine alınmakta olan mpg-CN'i ve aynı zamanda hücre almaçlarını ayrıntılı bir şekilde görülmektedir.



Şekil 5.11. U 87 hücresinin TEM analizi. mpg-CN ile muamele edilen U 87 hücrelerinde mpg-CN 'in hücre içerisine alınımının TEM analizi.

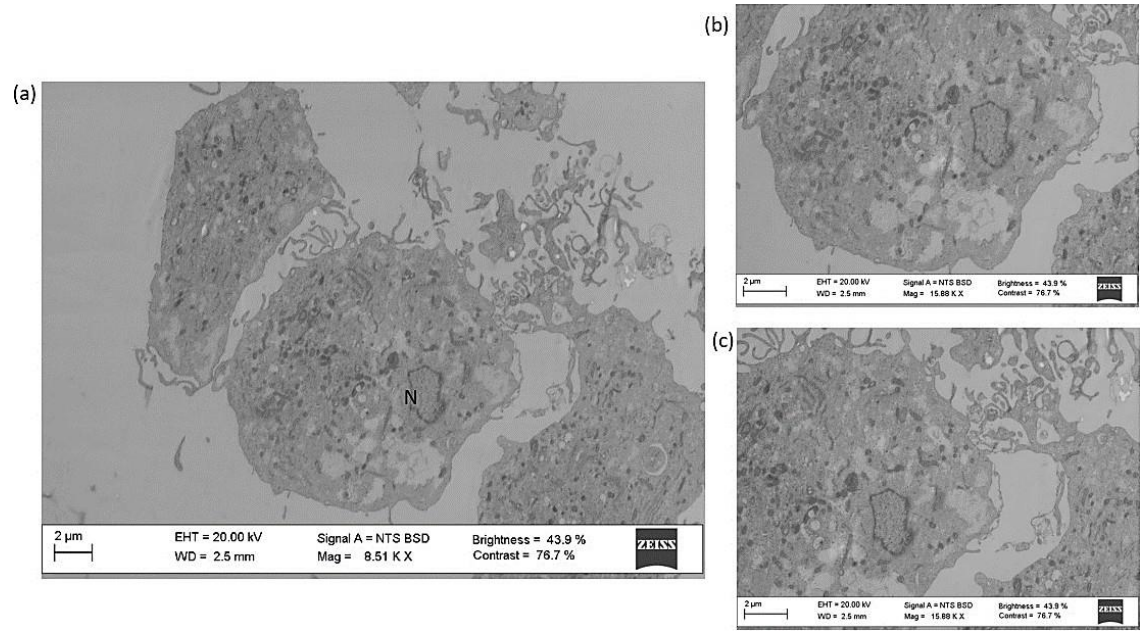


Şekil 5.12. U 87 hücresinin TEM analizi. mpg-CN ile muamele edilen U 87 hücrelerinde mpg-CN 'in hücre içerisine alınımının TEM analizi.

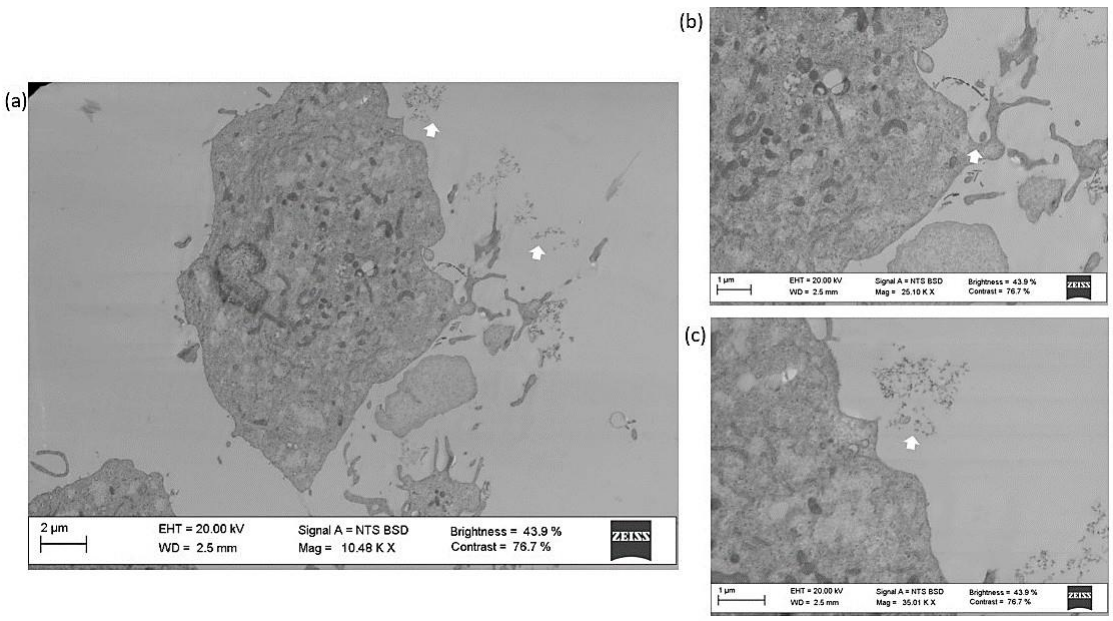


Şekil 5.13. U 87 hücresinin TEM analizi. mpg-CN ile muamele edilen U 87 hücrelerinde mpg-CN ‘in hücre içerisine alınımının TEM analizi.

$Mo_2Ti_2C_3$ ile muamele edilen U87 hücre grubunda hücrenin endositoz gerçekleştirmek üzere kollar oluşturduğu görülmektedir (Şekil 5.14. (a), (b) (c)). Şekil 5.15. (a) (c)’de ise hücre içerisine alınacak olan $Mo_2Ti_2C_3$ ve hücre almaçları görülmektedir. Şekil 5.15. (b)’de ise hücre içerisine alınmakta olan $Mo_2Ti_2C_3$’ü ve hücre almaçları ayrıntılı bir şekilde görülmektedir.



Şekil 5.14. U 87 hücresinin TEM analizi. $Mo_2Ti_2C_3$ ile muamele edilen U 87 hücrelerinde $Mo_2Ti_2C_3$ ‘ün hücre içerisine alınımının TEM analizi.



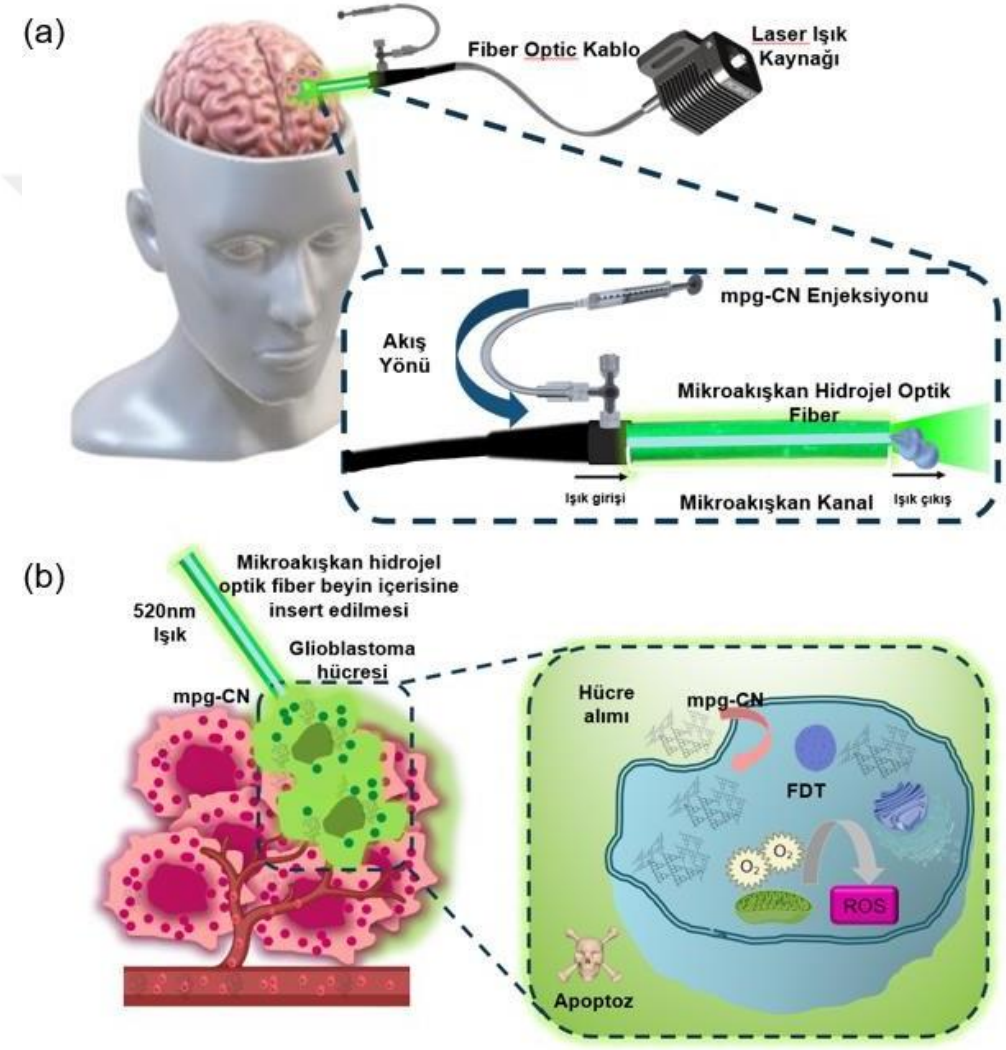
Şekil 5.15. U 87 hücresinin TEM analizi. $Mo_2Ti_2C_3$ ile muamele edilen U 87 hücrelerinde $Mo_2Ti_2C_3$ 'in hücre içerisine alınımının TEM analizi.

5.5. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN OPTİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Optik fiberler ve dalga kılavuzlarının ışık iletimini etkili bir şekilde kontrol edebildiği ve modüle edebildiği bilinmektedir. Son yıllarda, biyomedikal uygulamalarda bu cihazlar aracılığıyla derin dokuya ışık iletimi hedeflenerek biyolojik algılama, stimülasyon ve terapi alanında birçok yenilikçi uygulamalar geliştirilmektedir. Bu nedenle de kullanılan fiber ve dalga kılavuzlarının biyouyumlu ve implante edilebilir olması tercih edilmektedir (121).

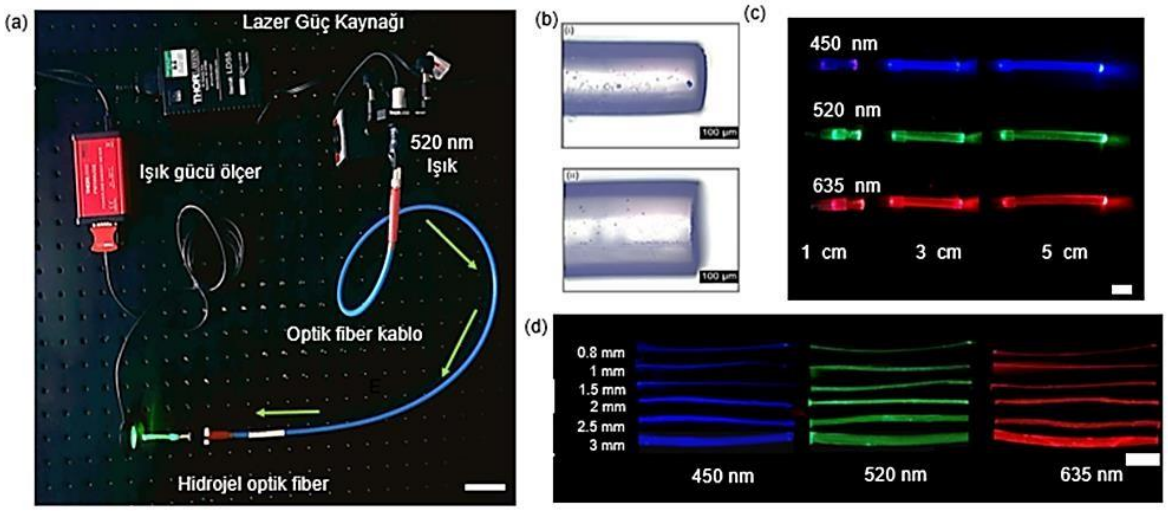
Görünür ve yakın kızıl ötesi ışıkların dokularda etkileşimi incelendiğinde, doku içerisinde ışığın absorpsiyona uğraması ve saçılmasından dolayı biyolojik dokulara (<3mm) nüfuz etme derinliği oldukça sınırlıdır. İmplant edilebilir ışıkların özellikle optogenetik ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanıldığı bilinmektedir. Işığın hidrojel optik fiberler içerisinde iletilebilmesi için transparan olması, kırılma indeksinin düşük olması ve ışığın hidrojel fiber boyunca iletimi oldukça önemlidir Bir maddenin ışığı kırma özelliğini belirleyen refraktif indeks, ışığın madde içerisinde nasıl ilerlediğini belirtir. Hidrojellerin kırılma indeksi hidrojellerin optik özelliklerini belirleyen önemli bir özelliktir. Hidrojelin içerdiği hidrofobikliği, su miktarı ve sıcaklığı gibi özellikleri refraktif indeksi etkilemektedir (121).

Şekil 5.16.'da optik fiber ile kombine edilen mikroakışkan hidrojel optik fiber aracılı fotodinamik tedavi protokolü şematize edilmiştir. Mikroakışkan kanal içerisinden bir önceki araştırmalarımızın sonucu olarak insan beyni glioblastoma hücre U87 hücresi üzerinde terapötik etkinliğini belirlediğimiz nanomalzeme mpg-CN tercih edilmiştir. Bu uygulama ile beyne implante edilebilen hidrojel optik fiber içerisinden mpg-CN akışı gerçekleştirilerek etkili minimal invaziv glioblastoma tedavi protokolü oluşturulmuştur.



Şekil 5.16. Mikroakışkan kanal içeren hidrojel optik fiberin grafitik karbon nitrür ile glioblastoma tedavisinin şematik gösterimi. (a) Fotodinamik terapi minimal invaziv prosedürler hidrojel optik fiberin nanomalzeme (mpg-CN) salımı kanser tedavisi için beyne insert edilmesinin şematize edilmesi. (b) 520nm lazer ışığı ve nanomalzeme (mpg-CN) uygulamasının ardından kanser dokusunda ROS üretimine bağlı hücre ölümünün şematik gösterimi.

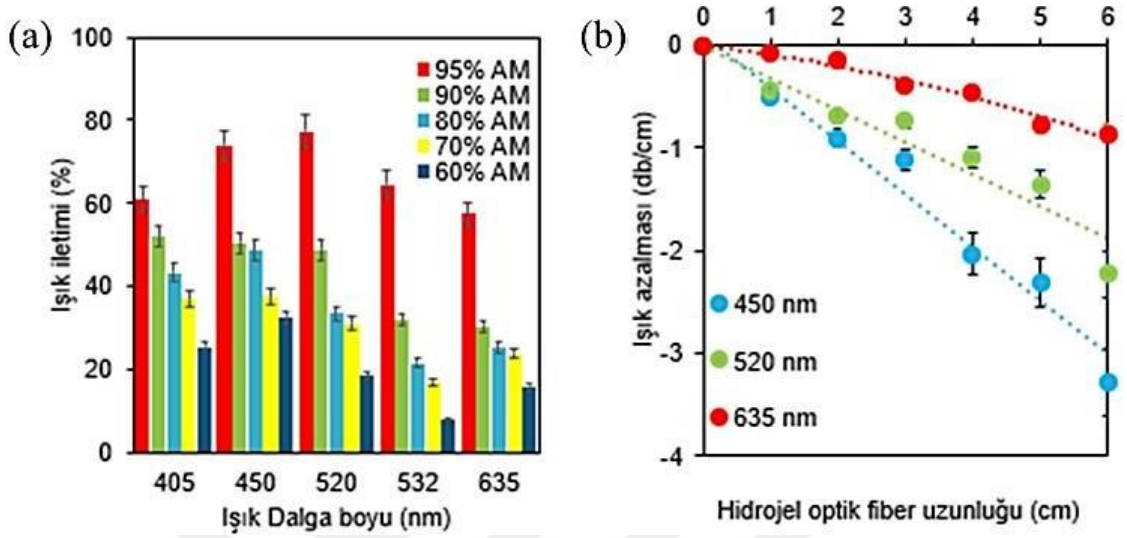
Beyne implante edilebilen hidrojel optik fiberlerin optik özelliklerini test edebilmek amacıyla hazırlanan optik deney düzeneği Şekil 5.17. (a)'da gösterilmiştir. Burada güç kaynağına bağlı fiber optik kablo konnektör yardımıyla hidrojel optik fiber ile birleştirilmiştir. Işık gücü ölçer aracığıyla ışığın iletim şiddeti değerlendirilmiştir. Farklı monomer konsantrasyonlarında üretilen hidrojeller Şekil 5.17. (b) i) %95 ii) %90'de gösterilmiştir. Üretilen hidrojellerin kabarcık içermemesi, yüzey pürüzsüzlüğü, şeffaflığı ışık iletimini doğrudan etkileyeceği için mikroskop altında incelenmiştir. Üretilen hidrojellerin farklı uzunluklarda (1 cm, 3 cm, 5cm) ve farklı ışık kaynakları ile ışık iletimi Şekil 5.17. (a) deney düzeneği kullanılarak test edilmiştir. Şekil 5.17. (c) ise bu farklı uzunluklardaki fiberlerin 450 nm, 520 nm ve 635 nm ışık kullanıldığında ışık iletimi gösterilmiştir. Şekil 5.17. (d) ise 450 nm, 520 nm ve 635 nm ışık kaynağı kullanılarak farklı çaplarda üretilen optik fiberlerin ışık iletimini gösterilmiştir.



Şekil 5.17. Hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) optik özelliklerinin test edilmesi. (a) Işık iletimi ölçümü için optik deney düzeneğinin gösterimi. Ölçek çubuğu=2cm. (b) Farklı çapraz bağlanma yoğunluklarına sahip optik hidrojel fiberlerin (AM-co-PEGDA) mikroskobik görüntüleri (Ø=1 mm). i) %95 ii) %90 (c) 450 nm, 520 nm, 650 nm dalga boyundaki ışık kaynağı ile kombine edilen farklı uzunluklardaki (1 cm, 3 cm, 5 cm) hidrojel optik fiberlerin ışık iletimi Ölçek çubuğu=1cm. (d) 450 nm, 520 nm, 635 nm dalga boyundaki ışık kaynağı ile kombine edilen farklı çaplarda üretilmiş hidrojel optik fiberlerin (0,8 mm, 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm) ışık iletimi. Ölçek çubuğu=1 cm.

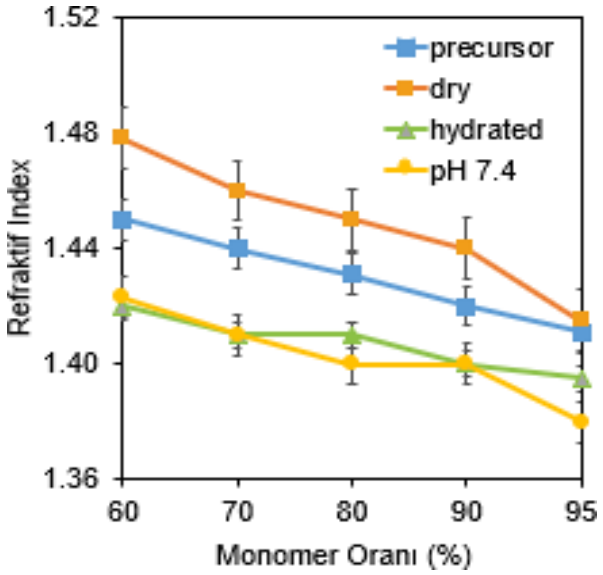
Farklı monomer oranlarında üretilen hidrojellerin ve farklı dalga boylarında ışık iletimi karşılaştırıldı. Güç ölçer ile ölçülen AM-co-PEGDA hidrojel farklı monomer oranlarında (%60-95) ve görünür dalga boyunda (405 nm, 450 nm, 520 nm, 532 nm, 650 nm) gösterilmiştir. Işık, yüksek çapraz bağ yoğunluğunda olduğundan çok daha fazla iletilir. Yüksek çapraz bağ yoğunluğu (%95 AM) konsantrasyonu, optimum ışık geçirgenliği dalga

boyu 450 ve 520 nm'dir (Şekil 5.18. (a)). Farklı uzunluklardaki (1, 2, 3, 4, 5, 6 cm) hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) ışık zayıflaması fiberin uzunluğu ile doğru orantılı olarak azalmıştır (Şekil 5.18. (b)).



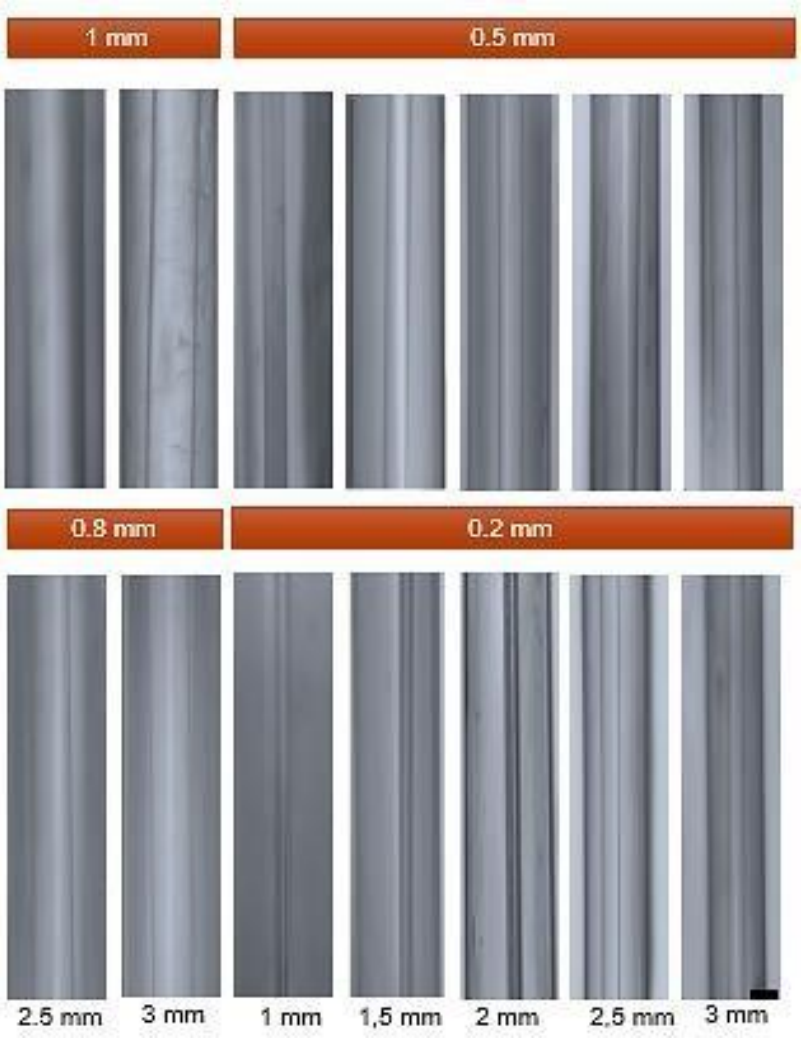
Şekil 5.18. (a) Farklı dalga boyunda farklı monomer oranına sahip hidrojel optik fiber (AM-co-PEGDA) ışık iletimi. (b) Farklı lazer ışığında (450 nm, 520 nm, 635) farklı uzunluklardaki (1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm) hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) ışık zayıflaması.

Hidrojel optik fiberlerin refraktif indeks değerleri doğrudan ışık kırınımını ve ışık iletimini etkileyeceği için Şekil 5.19.'da farklı konsantrasyonlarda üretilen hidrojellerin refraktif indeksi (RI) akrilamid konsantrasyonu arttıkça 1,49'dan 1,38'e düşmüştür. Refraktif indeksin artan konsantrasyonlarda azalması bu araştırmada kullanılacak olan hidrojelin monomer yüzdesinin belirlenmesini sağlamıştır. Refraktif indeks değeri düştükçe hidrojel içerisinde ışığın ilerleme hızı artacaktır.



Şekil 5.19. Farklı AM konsantrasyonundaki kırılma indisinin değerlendirilmesi. Monomer solüsyonu (AM:PEGDA) ve (AM-co-PEGDA) (%2:3 wt/v seyreltme), havada muhafaza edilmiş hidrojeller, DI su içerisinde muhafaza edilmiş hidrojeller, PBS (pH 7.4) içerisinde muhafaza edilmiş hidrojellere ait kırılma indisi değerleri.

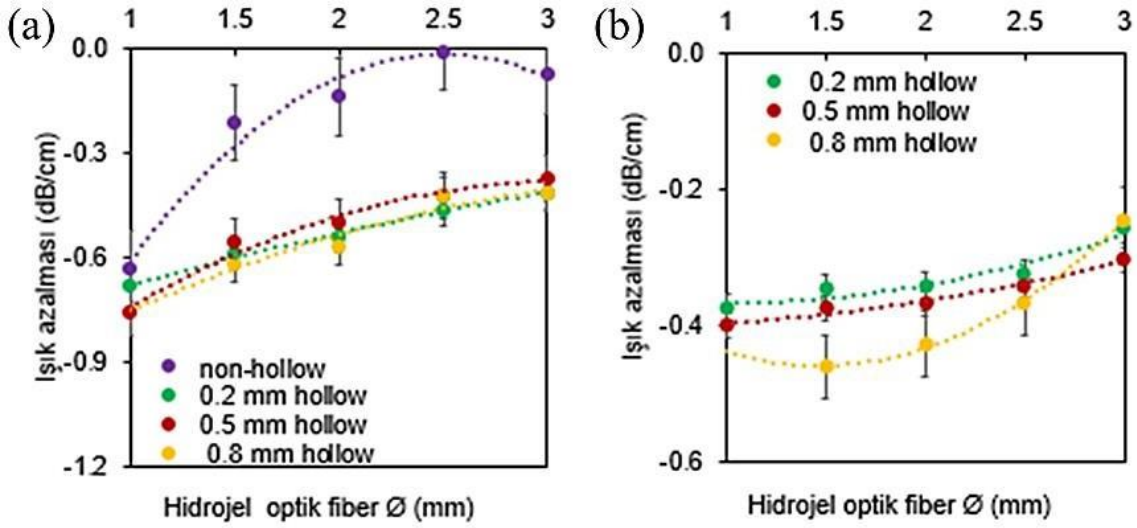
Mikroakışkan hidrojel optik fiberlerin üretilebilmesi amacıyla silikon tüp içerisine monomer enjeksiyonunun ardından silikon optik fiber aracılıyla hidrojel optik fiberler içerisinde mikroakışkan boşluk oluşturulmuştur. Şekil 5.20.'de farklı çaplarda (1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm ve 3 mm) optik hidrojel fiberler içerinde 0,2 mm, 0,5 mm, 0,8 mm ve 1mm çapında mikroakışkan boşlukları Leica floresan mikroskop altında görüntülenmiştir.



Şekil 5.20. 0,2 mm, 0,5 mm, 0,8 mm ve 1 mm çaplı içi boş yapıların 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm ve 3 mm çapındaki hidrojel optik liflerinin (AM-co-PEGDA) mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu = 200 mm.

Üretilen mikroakışkan hidrojel optik fiberlerin ışık azalmasını test edebilmek amacıyla 1 cm uzunluğundaki hidrojel optik fiberler fiber optik kablo ile bağlanmıştır. Mikroakışkan boşluğu hava ile dolu olan ve mikroakışkan boşluğu PBS ile dolu olan iki gruba ayrılan hidrojel optik fiberlerin ışık azalması değerlendirilmiştir. Şekil 5.21. (a) (b)'de gösterilen boşluk içermeyen ve 0,2 mm, 0,5 mm ve 0,8 mm çapında mikroakışkan boşluk içeren ve hava ile doldurulan grupta ışık azalması değerlendirilmiştir. Mikroakışkan boşluk içermeyen optik fiberde ışık azalması fiber çapı arttıkça artmıştır. Diğer taraftan boşluk içeren fiberlerde ışık azalması en fazla 3 mm dış çapı ve 0,5 mm ve 0,8 mm iç çapa sahip olan fiberlerde görülmüştür. Diğer taraftan mikroakışkan boşluğu PBS ile doldurulmuş fiberlerde ışık azalması hava ile dolu olan fiberlere göre daha azdır. İçerisi PBS ile doldurulan hidrojel optik fiberlerin ışık azalması iç çapı ile doğru orantılı olarak

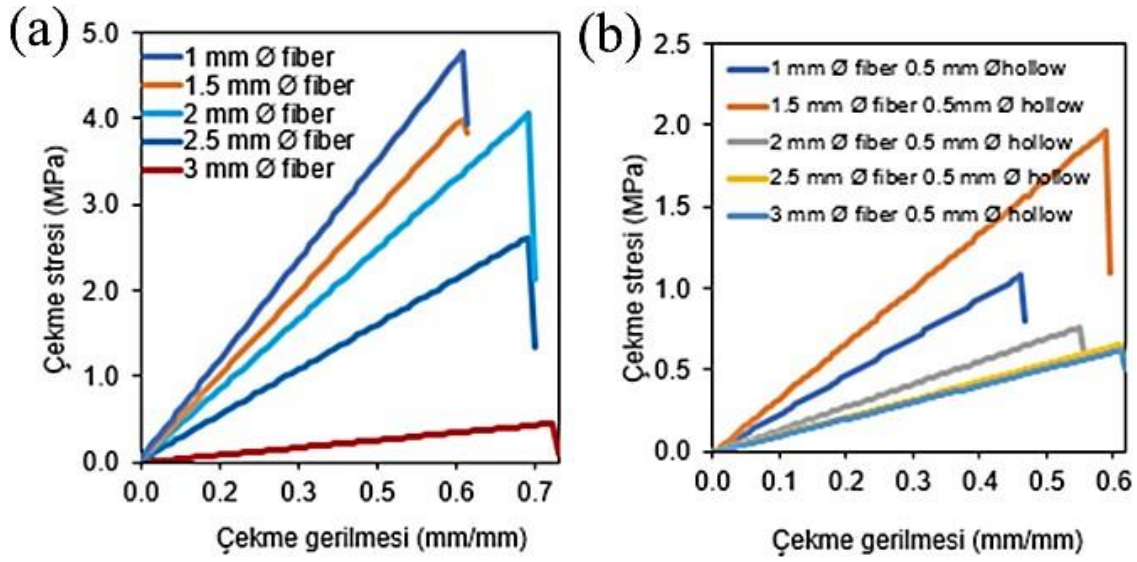
artmaktadır. Sadece 3 mm dış çapa ve 0,8 mm iç çapa sahip olan fiberde ışığın azalması diğer fiberlere nazaran daha azdır.



Şekil 5.21. Optik hidrojel optik fiberleri ışık azalmasını değerlendirilmesi. (a) 2 mm dış çapa sahip mikroakışkan boşluğu hava ile dolu olan hidrojel optik fiberleri ışık azalması. (b) 2 mm dış çapa sahip mikroakışkan boşluğu PBS ile dolu olan hidrojel optik fiberleri ışık azalması.

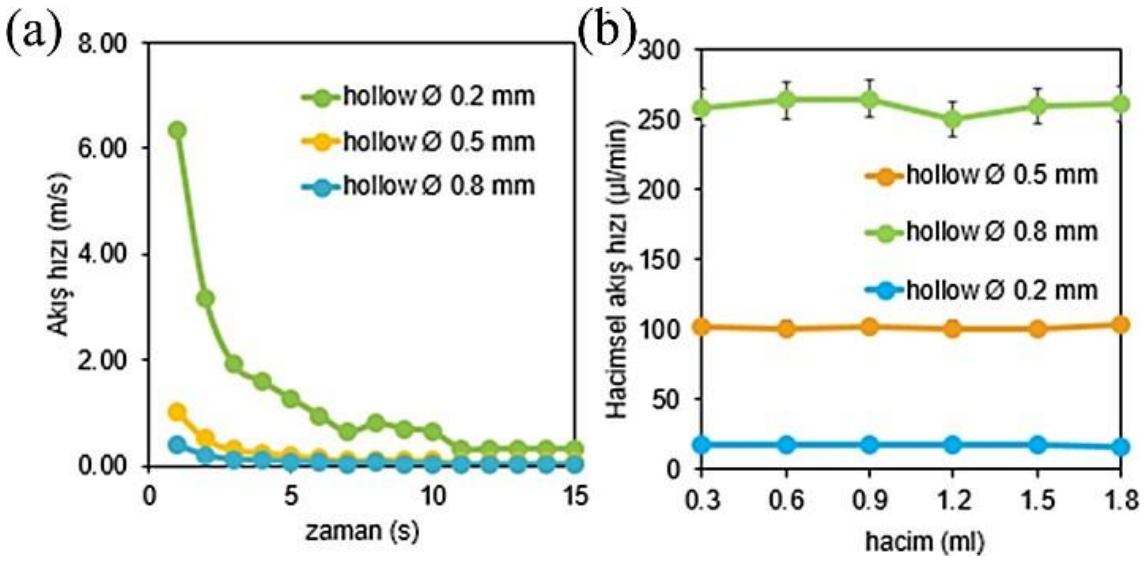
5.6. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN TEST EDİLMESİ

Mikroakışkan hidrojel optik fiberlerin mekanik stres dayanıklılığının test edilmesi amacıyla çekme gerilme dayanıklılık testleri gerçekleştirildi. Bu testi gerçekleştirebilmek amacıyla Lloyd EZ 50 analiz cihazı kullanıldı. 5 cm uzunluğunda kesilen hidrojel optik fiberler cihazın her iki klempi arasına sabitlendikten sonra 4,8 min^{-1} hızında gerilmiştir. Gerilme stresi dayanıklılığı en yüksek 3 mm çapa sahip fiberde görülürken, en düşük stres 1 mm fiberlerde ortaya çıkar (Şekil 5.22. (a). Şekil 5.22. (b)'de ise 0,5 mm mikroakışkan boşluğuna sahip içi boş fiberlerin çekme stresi değerlendirilmiştir. Çekme dayanıklılığı en az olan 1 mm çapındaki mikroakışkan fiber iken çekme gerilimine karşı en çok stres 1.5 mm'lik fiberde ortaya çıkmıştır. Çekme stresine en dayanıklı fiberler ise 2.5 mm ve 3 mm çapındaki fiberlerdir.

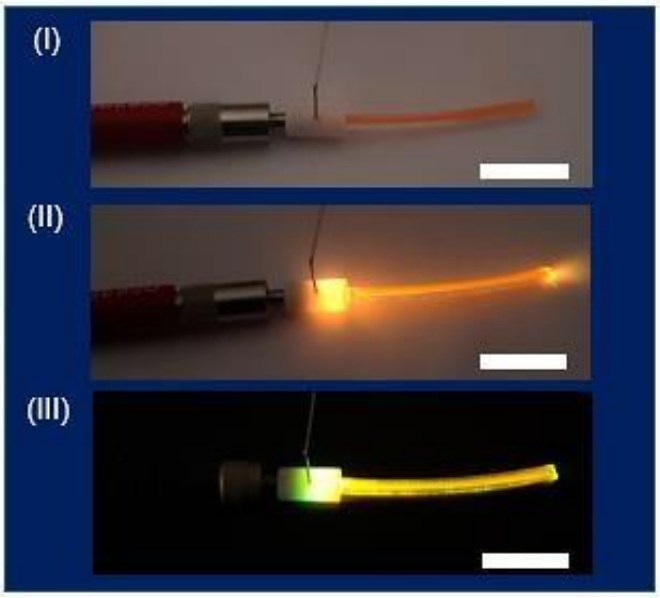


Şekil 5.22. Am-co-PEGDA hidrojel optik fiberlerin mekanik dayanıklılık özelliklerinin değerlendirmesi. (a) Mikroakışkan boşluk içermeyen hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) çekme gerilme testi. Ø=1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm. (b) Mikroakışkan boşluk içeren hidrojel optik fiberlerin (AM-co-PEGDA) çekme gerilme testi Fiber Ø=1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm. Mikroakışkan kanal Ø= 0,5 mm. (n=3).

Mikroakışkan sistemlerde özellikle beyin gibi hassas dokulara uygulama yapılacaksa uygulanacak materyalin karakteristiği kadar uygulanan sıvının akış hızı önemlidir. Akış hızı şekil 5.23. (a)'de $S = \pi . (Ø /2)^2 .h/t$ formülü ile hesaplanmıştır. 0,2 mm, 0,5 mm ve 0,8 mm çapındaki mikroakışkan fiberlerde birim zamanda en fazla akış hızı 0,2 mm ve en az akış hızı 0,8 mm çapındaki fiberde tespit edilmiştir. Hacimsel akış hızı değerlendirildiğinde 0,3 ml, 0,6 ml, 0,9 ml, 1,2 ml, 1,5 ml, 1,8 ml hacimlerde 0,2 mm, 0,5 mm ve 0,8 mm iç çapındaki mikroakışkan sistemlerin akış hacminde başlangıç değerlerine göre değişkenlik olmamıştır. 0,2 mm hidrojel optik fiber için 15 µl/dakika, 0,5 mm için 100 µl/dakika ve 0,8 mm için 250 µl/dakikadır.



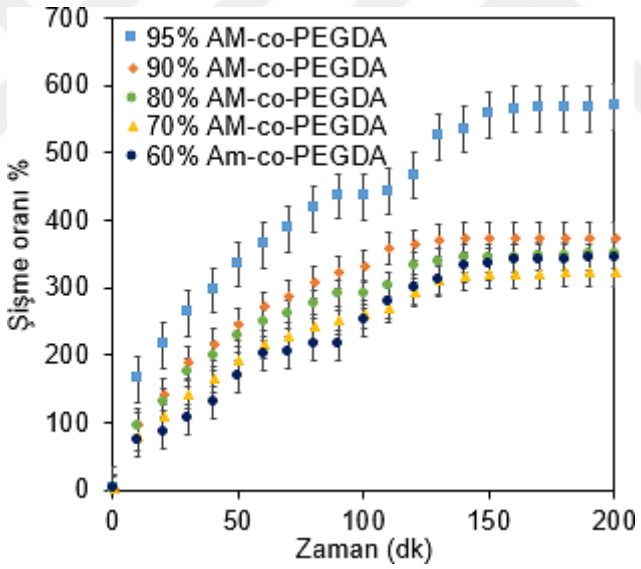
Şekil 5.23. Am-co-PEGDA mikroakışkan hidrojel optik fiberlerin akışkan hızlarının değerlendirilmesi. (a) 0,2 mm, 0,5 mm, 0,8 mm mikroakışkan iç çapına sahip fiber içerisindeki PBS akış hızı (b) Mikroakışkan iç çapı 0,2 mm, 0,5 mm, 0,8 mm olan fiberlerin zamana bağlı akış hızı (µl/min).



Şekil 5.24. Fiber optik kablo ile Am-co-PEGDA mikroakışkan kanal içeren hidrojel optik fiberin birleştirilmesi I) Lazer ışığı kapalı iken mikro akışkan sistem, II) Beyaz ışık ile kombine edilen mikro akışan hidrojel optik fiber sistemi, III) 520 nm ışıkla kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber. (Dış Ø = 2mm, iç Ø = 0,5 mm)

Am-co-PEGDA hidrojelinin su tutma kapasitesi Akrilamid ve PEGDA monomer konsantrasyonuna göre değişkenlik göstermektedir. Hidrofilik bir monomer olan PEGDA'nın su tutma kapasitesinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Hidrofilik

monomer akrilamid ise PEGDA ile kopolimerizasyona uğradığında hidrojelin porozitesini arttırmaktadır ve su tutma kapasitesinde artışa neden olmaktadır. Ayrıca hidrofilik grupların hidrojen bağları yoluyla su molekülüne bağlanması sonucu hidrojelin su tutma kapasitesini arttırır. Şekil 5.25.'te farklı monomer oranlarında polimerize edilmiş AM-co-PEGDA hidrojel optik fiberler 2 gün süreyle oda ısında kurumaya bırakılmıştır. Hidrojellerin su kaybının tamamen gerçekleştiğinden emin olduktan sonra hidrojeller pH 7.4 PBS solüsyonu içerisine daldırılmıştır. Zamana bağlı şişme oranı yüzdeleri Denge su içeriği (EWC) = [(şişmiş ağırlık-kuru ağırlık) / kuru ağırlık] x 100 formülü ile hesaplamıştır. Farklı konsantrasyonlarda polimerize edilen hidrojel optik fiberler, 150. Dakikadan sonra son ağırlığa ulaşmıştır. Hidrojellerin şişme oranları % 95 oranında hazırlanan AM-co-PEGDA hidrojelinin zamana bağlı ağırlık artışının yaklaşık 5.6 kat, % 90 3.7 kat, % 80 3.4 kat, % 70 3.2 kat ve % 60 3.4 kat kadar olduğu tespit edilmiştir. % 60 oranında hazırlanan AM-co-PEGDA hidrojelinin 90. dk'da şekilsel bütünlüğünün bozulmuş olması su tutma kapasitesinin değerlendirilmesinde artışa neden olmuştur.

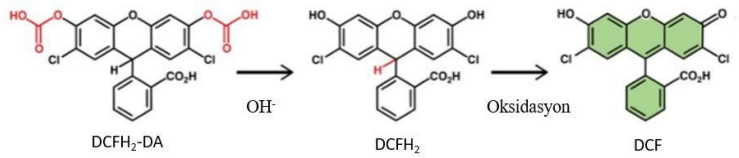


Şekil 5.25. Farklı monomer oranlarındaki Am-co-PEGDA hidrojel optik fiberlerin (%95, %90, %80, %70, %60 AM-co-PEGDA) zamana bağlı şişme grafiği (n=3).

5.7. MPG-CN'İN SİNGLET OKSİJEN VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ÜRETME POTANSİYELLERİNİN TEST EDİLMESİ

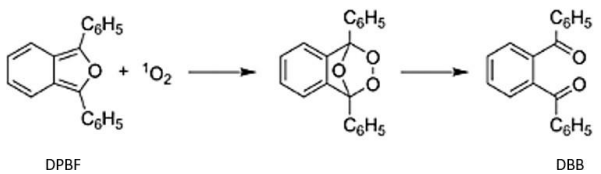
Singlet oksijen, oksijen molekülünün uyarılması ve aktivasyonu sonucu oluşan reaktif bir oksijen türüdür. Oksijenin fotosensitizasyonu sunucu singlet oksijene dönüşebilen bir elektron transferi gerçekleşir. Bu mekanizmalar, klasik olarak Tip I ve Tip II mekanizmaları olarak tanımlanmıştır. Tip I reaksiyonlarda fotosensitizatör uyarılarak bir

elektron normal oksijene aktarılır. Bu durumda oluşan, süperoksit anyon radikalleri (O2•-), hidroksil radikalleri (HO•) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) diğer radikallerle tepkimeye girerek reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilir. Bazı durumlarda ROS, hücre içinde fonksiyonlarının bozulmasına yol açan stresi tetikleyebilir. Böyle bir durum oksidatif stres olarak tanımlanır ve hücresel savunma mekanizmalarının eşzamanlı olarak bozulmasıyla birlikte artan ROS üretimi ile karakterize edilir (122). Bir fotosensitizerin ROS üretimini test etmede DCFH (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) molekülü kullanılır. DCFH molekülleri, Işık ile uyarılmış fotosensitizerin üretmiş olduğu ROS varlığında DCF (2',7'-dichlorofluorescein) bileşiğine dönüşür. DCF floresans özelliğe sahip olduğundan ROS üretiminin gerçekleşmesi halinde floresans değerinin artması beklenir(123,124).



Şekil 5.26. DCFH2-DA molekülünün ROS varlığında oksidasyonu sonucu floresan DCF molekülüne dönüşümü (125)

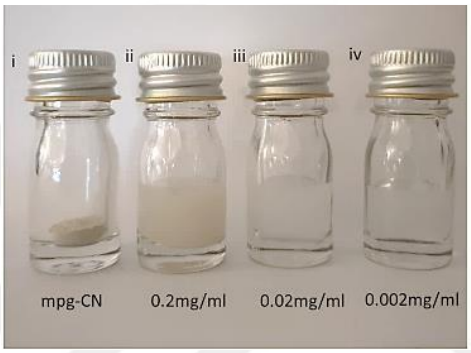
Tip 2 reaksiyonlarda fotosensitizatör molekülün uyarılması sonucu bir enerji transferi sonucu oluşur. Bu reaksiyonda, fotosensitizatör maddenin uyarılması ile oksijen molekülünün enerjisinin yükselmesine neden olur. Bu enerjisi yüksek oksijen molekülü kimyasal reaksiyona girerek singlet oksijen ($^1O_2$) adı verilen reaktif oksijen türünü oluşturur. Singlet oksijen üretimini test edebilmek amacıyla hızlı ve duyarlı bir yöntem olan DPBF (1,3-Diphenylisobenfuran) fotosensitizatör molekülü kullanılır. Singlet oksijen varlığında DPBF molekülündeki karbon-karbon çift bağını oksitleyerek Bir peroksit 1,2-dibenzoylbenzene (DBB) oluşumuna neden olur. DPBF peroksit oluşumu sonucu spektrofotometre ile ölçülen DPBF singlet oksijen varlığında DPBF'in (126)oksidasyonu sonucu absorbans değerinde azalma gözlenir. DPBF 414 nm aralığında en yüksek absorbans değerini gösterir (125)



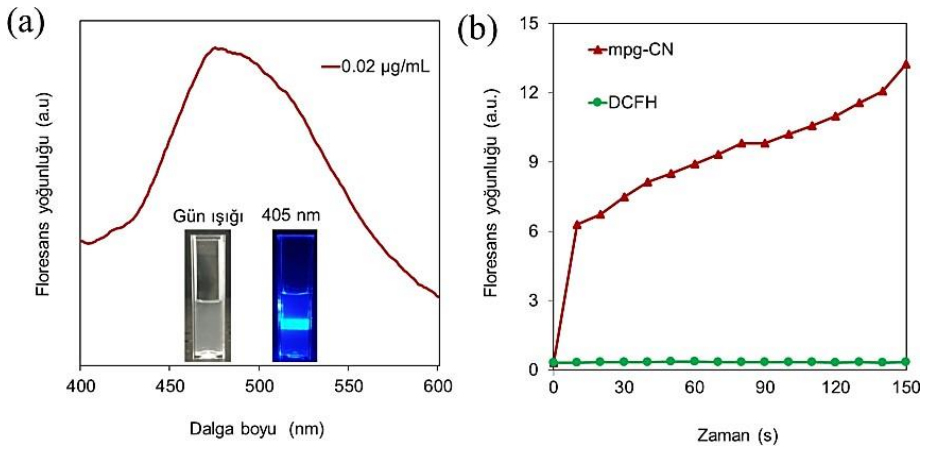
Şekil 5.27. DPBF (1,3-Diphenylisobenfuran) molekülünün oksitlenmesi sonucu 1,2-dibenzoylbenzene (DBB) oluşumu (78,126)

Metilen mavisi (MB), singlet oksijen üretimini test etmek için tercih edilen singlet oksijen üretme verimi oldukça yüksektir. Metilen mavisinin fotosensitizasyonu özellikleri dolayısıyla referans olarak kullanılabilir, düşük maliyetli ticari olarak temin edilebilme özellikleri dolayısıyla da tercih edilmektedir. Mpg-CN'in singlet oksijen kuantum verimini tespit etmede referans fotosensitizer olarak kullanılmıştır (Şekil 5.27.).

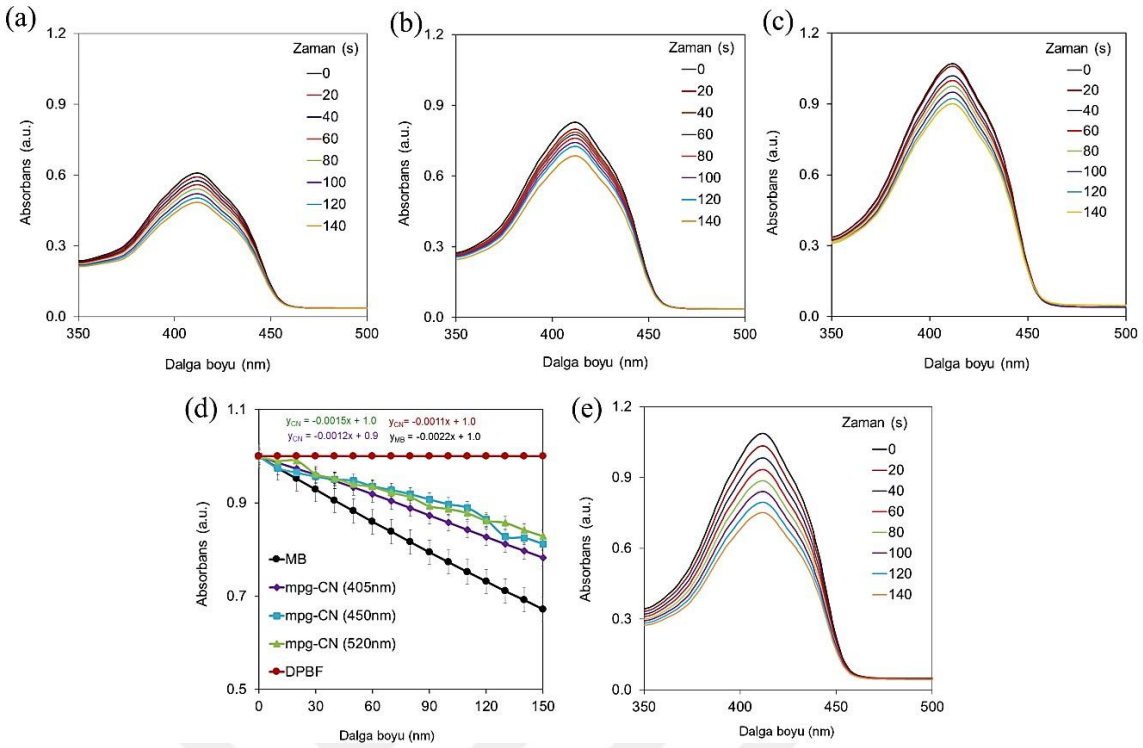
Singlet oksijen kuantum verimi (Φ); bir fotosensitizerin uyarılması sonucu üretilen singlet oksijen ($^1O_2$) sayısının, kullanılan foton sayısına oranını ifade etmektedir (127). 414 nm'de elde edilen verilere göre 405 nm, 450nm ve 520nm ışığa maruz bırakılan mpg-CN'in sırasıyla singlet kuantum verimi % 61, % 49 ve % 45 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.28.).



Şekil 5.28. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış mpg-CN'ler. (i) mpg-CN (ii) 0,2 mg/ml distile su ile disperse edilmiş mpg-CN (iii) 0,02 mg/ml distile su ile disperse edilmiş mpg-CN, (iv) 0,002 mg/ml distile su ile disperse edilmiş mpg-CN.



Şekil 5.29. mpg-CN'in floresans yoğunluğu ve ROS floresans yoğunluğu. (a) 0,02 µg/ml mpg-CN'in 405 nm dalga boyunda uyarılması sonucu farklı dalga boylarındaki floresans yoğunluğu. (b) 0,02 µg/ml mpg-CN'in zamana bağlı ROS üretimi (n=3).



Şekil 5.30. Metilen mavisi ile mpg-CN'in lazer ışığına maruz bırakılarak singlet oksijen üretim potansiyellerinin farklı zaman aralıklarında (0, 20,40… 140s) değerlendirilmesi (a) 405 nm lazer ışığına maruz bırakılan mpg-CN'in singlet oksijen üretimi absorbans grafiği (b) 450 nm lazer ışığına maruz bırakılan mpg-CN'in singlet oksijen üretimi absorbans grafiği (c) 520 nm lazer ışığına maruz bırakılan mpg-CN'in singlet oksijen üretimi absorbans grafiği (d) 414 nm dalga boyunda metilen mavisi ve mpg-CN absorbans değerleri. (e) 520nm ışığa maruz bırakılan metilen mavisi singlet oksijen üretimi absorbans grafiği.

5.8. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN OPTİK VE MEKANİK ÖZELLİKLERİNİN EX VİVO BEYİN DOKUSUNDA TEST EDİLMESİ

Absorpsiyon ve saçılma, ana doku optik parametreleri, ışık dağıtımını etkiler ve PDT performansı üzerinde bir etkiye sahiptir. Dokularda, kırmızı ışık tipik olarak 0,1 cm'den 0,3 cm'ye geçer. Gelen optik enerjinin 1/e'ye (yaklaşık %37) düştüğü derinliğe penetrasyon derinliği olarak adlandırılır. Ex vivo ve in silico çalışmalar, fotonların geri kalan %37'sinin 2–5 cm derinliğe kadar beyin bölgelerine nüfuz edebildiğini göstermiştir (128).

Fotodinamik tedavide ışığın penetrasyonu oldukça önemlidir. Işığın penetrasyon özelliklerine göre gruplandırabileceğimiz uygulamalar,

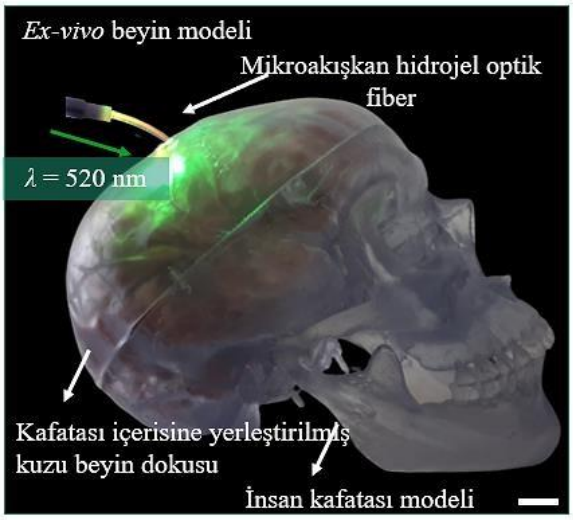
Yüzeysel FDT; düşük ışık penetrasyon derinliğine sahip (<2 mm) cilt tedavilerini içerir.

İnterstisyel FDT; 1cm'den büyük tümörleri iğneler, kataterler ve optik fiberlerin yardımıyla tedavi edebilir ancak yüzeysel FDT'deki gibi ışık penetrasyon limitasyonuna neden olabilecek ışıklar kullanılır.

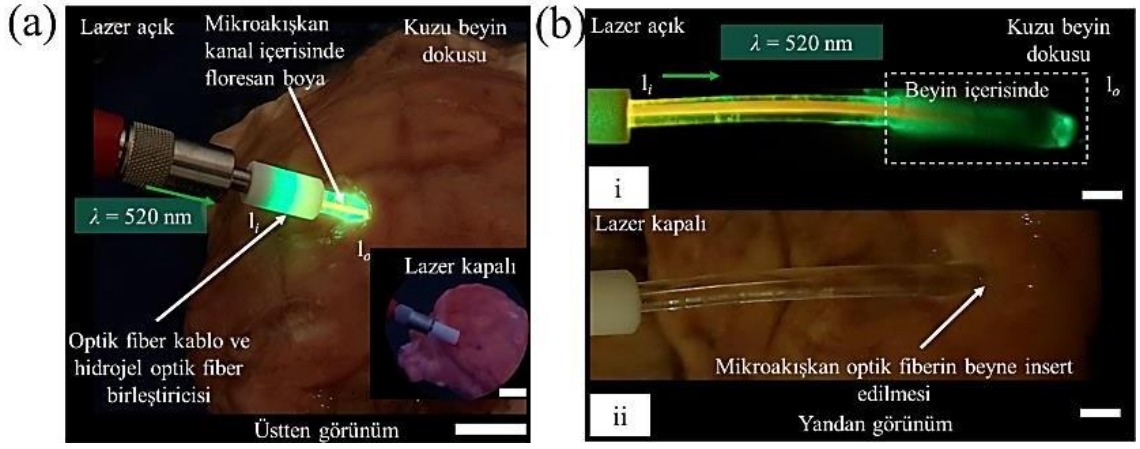
Derin PDT; geleneksel ışık kaynaklarının dışında daha derine nüfuz etmeyi amaçlayan NIR radyasyonu, yeni doğrusal olmayan optik tekniklerle uyarılan gelişmiş fotosensitizerleri, iyonlaştırıcı radyasyonu, kendinden aydınlatmalı bileşikleri ve gelişmekte olan implantları içerebilmektedir(129).

520nm dalga boyundaki bir lazerin beyin dokusunda penetrasyon derinliği yaklaşık 1-3 cm kadardır. Lazer ışığı ile kombine edilmiş hidrojel optik fiberin beyin dokusu içerisindeki azalmasını değerlendirmek amacıyla oluştuğumuz deney sisteminde 1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm uzaklığa bağlı ışık azalması mikroakışkan kanala sahip olmayan fiber, çapı 2 mm mikroakışkan kanal çapı 0.5 mm olan ve mikroakışkan kanalı boş ve PBS ile dolu olan 1 cm uzaklıkta yaklaşık 6.5 db/cm'tir. Kanal içermeyen fiberde 5 cm uzaklığa kadar ışık azalması 12 db/cm kadarken, 6 cm 13 db/cm'dir. Mikroakışkan kanala sahip kanalı boş olan fiberde 2 cm uzaklıkta 9 db/cm iken, 6 cm uzaklıkta 14 db/cm'dir. Mikroakışkan kanalı PBS ile dolu olan fiberde 2cm uzaklıkta 6 db/cm iken 6 cm uzaklıkta 14 db/cm'dir (Şekil 5.33 (a) (b)).

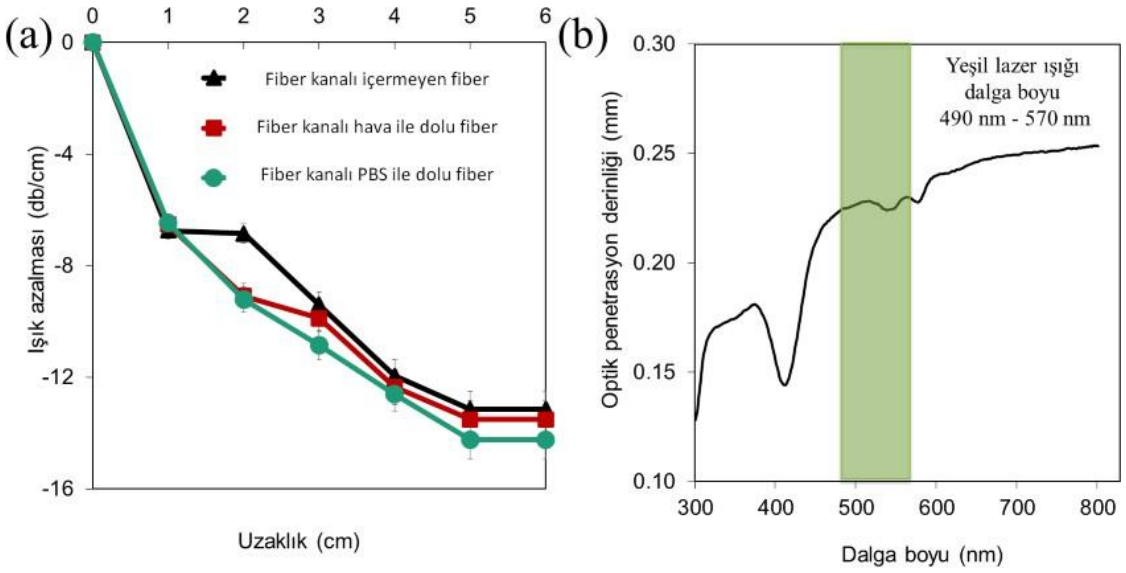
Diğer taraftan ışığın optik penetrasyonu 5 mm kalınlığında kesit alınmış beyin dokusunda değerlendirilmiştir. Buna göre yeşil lazer ışığına denk gelen aralıkta ışığın optik penetrasyonunun 0.2 cm ile 0.25 cm aralığındadır.



Şekil 5.31. Ex vivo kuzu beyni modelinde ışık yayılımı. 520 nm lazer optik kablo ile kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) insan kafatası modeli içerisine yerleştirilmiş beyin dokusu içerisine insert edilir. Ölçek çubuğu =2cm.

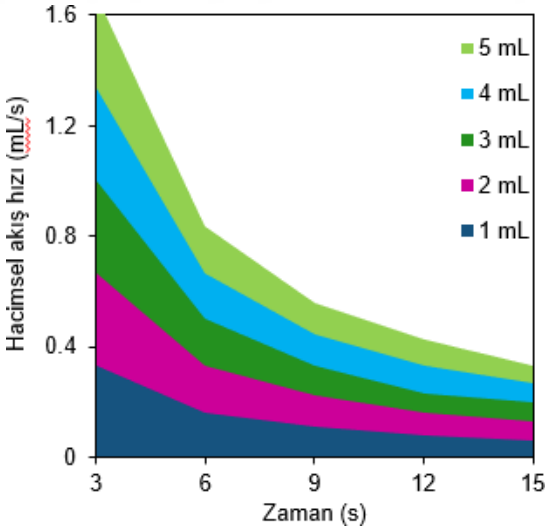


Şekil 5.32. (a) 520 nm lazer optik kablo ile kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) ex-vivo kuzu beyni dokusu içerisine yerleştirilmesi. Mikroakışkan kanal floresan boya ile belirtilmiştir. Sağda lazer ışığı kapalıyken ex-vivo kuzu beyni içerisine insert edilmiş mikroakışkan optik fiber gösterilmiştir. Ölçek çubuğu = 2cm. (b) (i) 520 nm lazer optik kablo ile kombine edilmiş mikroakışkan hidrojel optik fiber (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) ex-vivo kuzu beyni dokusu içerisinde ışık dağılımının gösterilmesi. (ii) Lazer ışığı kapalı iken mikroakışkan hidrojel optik fiberin (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) ex-vivo kuzu beyni içerisine yerleştirilmesi. Ölçek çubuğu =2cm.



Şekil 5.33. (a) Beyin dokusuna insert edilen içi boş hidrojel optik fiberin, hava dolu hidrojel optik fiberin, PBS dolgulu hidrojel fiberin (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) beyin dokusunda ışık zayıflaması. Ölçek çubuğu = 2 cm. (b) 3 mm kalınlığında kesit alınan beyin dokusunda farklı dalga boylarında ışığın optik penetrasyon grafiği.

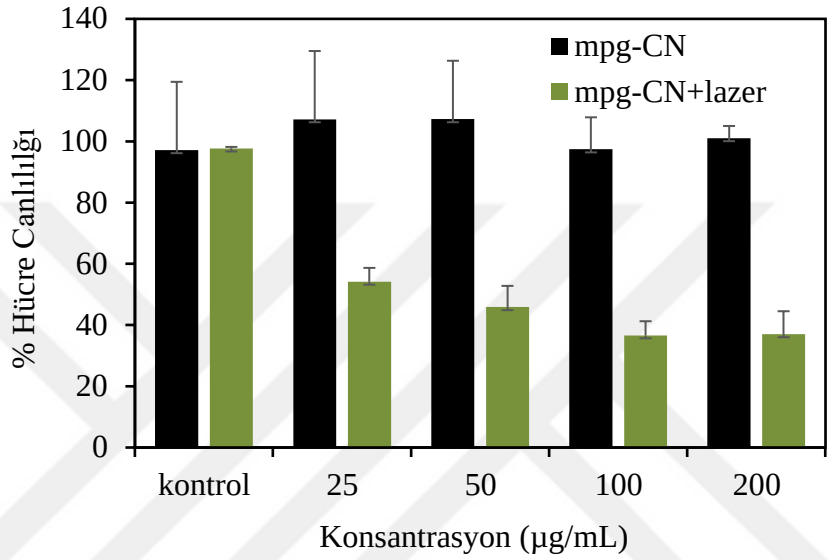
Beyin dokusu içerisinde mpg-CN'in dış çapı 2 mm iç çapı 0.5 mm olan optik fiber içerisindeki akış hızı değerlendirilen hidrojel optik fiberlerin hacimsel akış hızının 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml'lik hacimlerde zamana bağlı akış hızı % 75 oranında düşmüştür (Şekil 5.34.).



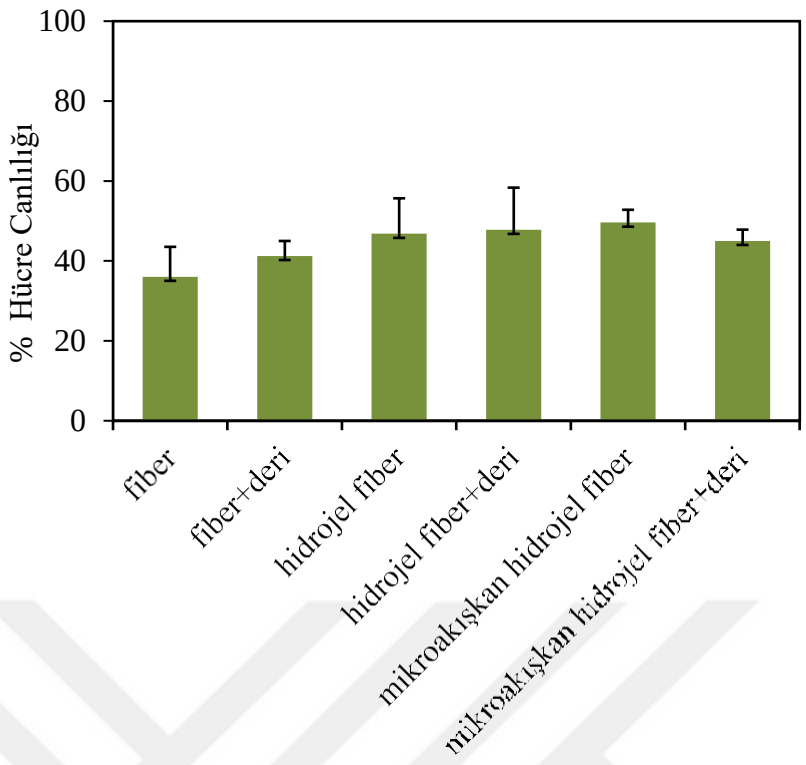
Şekil 5.34. Beyin dokusu içerisine insert edilen içi boş hidrojel optik fiberin (dış çap: 2 mm iç çap: 0,5 mm) farklı hacimlerde mpg-CN'in zamana bağlı hacimsel akış hızı.

5.9. MİKROAKIŞKAN HİDROJEL OPTİK FİBER ARACILI *IN VITRO* FDT SONUÇLARI

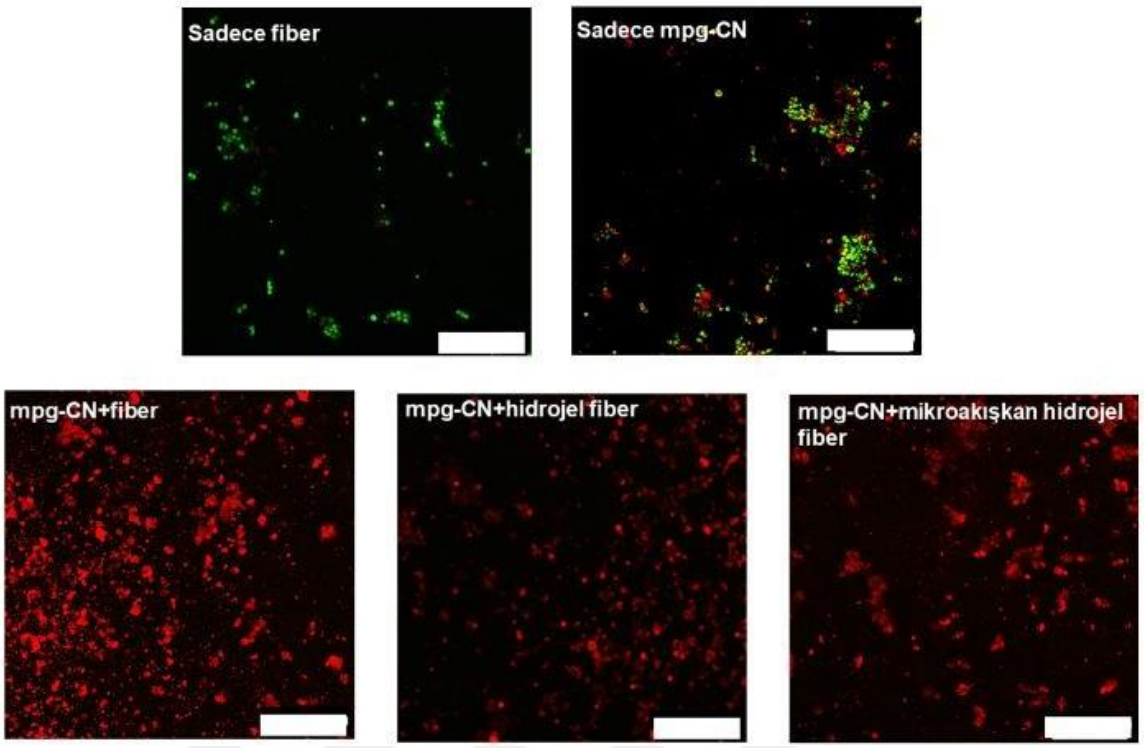
Hidrojellerin tıpta kullanımı yaygınlaştıkça sensör ve tedavi amaçlı kullanımları oldukça ilgi görmüştür. Bunun sebebi hidrojel optik fiber biyolojik dokularda oksijenasyon, glukoz sensörü olarak kullanılmalarından, nanopartikül gömülü optogenetik uygulamalara ve yahut ışık aracılı tedavilerde ışık iletimine kadar pek çok alan bulmuştur (130–132).



Şekil 5.35. U 87 hücresinin farklı konsantrasyonlarda (0, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml) mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO_2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 10 dakika 520 nm lazer ışık varlığında ve yokluğunda hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301).



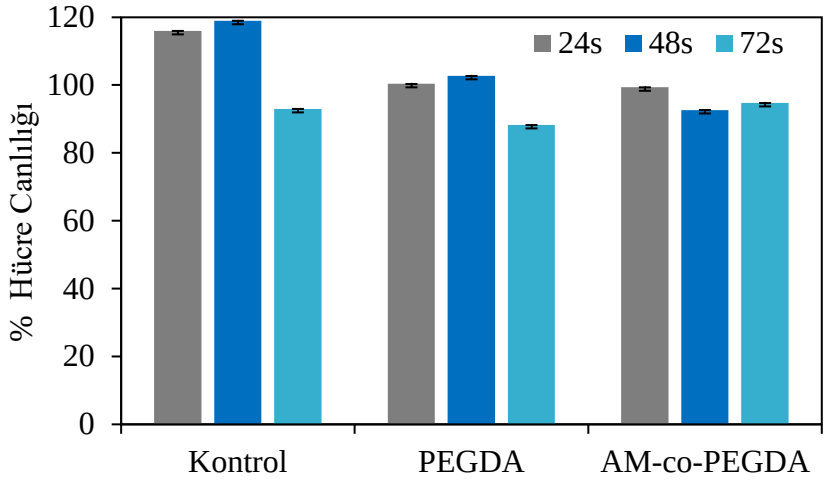
Şekil 5.36. U 87 hücresinin 200 µg/ml mpg-CN varlığında 4 saat 37 °C'de CO_2 inkübatörde inkübasyonunu takiben 10 dakika 520 nm lazer ışığına maruz bırakılması. Fiber, hidrojel fiber, mikroakışkan hidrojel fiber ile domuz derisi bariyeri ile kombine edilmiş ışık kaynağı aracılı hücre canlılığının göreceli olarak değerlendirilmesi. (Thermo C20301).



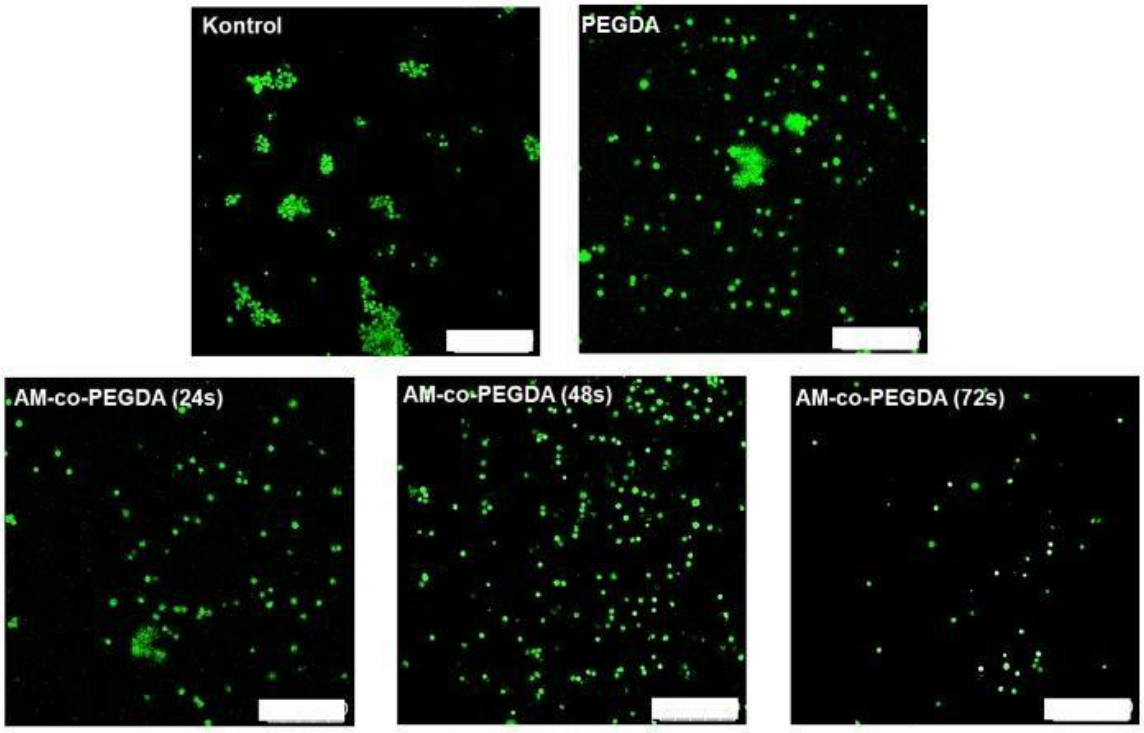
Şekil 5.37. U 87 hücresinin 200 µg/ml mpg-CN varlığında 10 dk 520 nm lazer ışığına maruz bırakılması sonucu hücre canlılığının konfokal mikroskop aracılığıyla değerlendirilmesi (Thermo Calcein AM/Etbr-1)

5.10. HİDROJEL OPTİK FİBERLERİN BİYOUYUMLULUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Biyouyumlu malzemelerin geliştirilmesinde önemli bir aşama olan sitotoksisite ve biyouyumluluk testleri yeni bir materyal üretilirken neden olabileceği olası komplikasyonları toksisiteyi değerlendirebilmek amacıyla değerlendirilmesi gerekmektedir. Bir malzemenin üretilmesinin ardından *in vivo* uygulamalara geçilmeden önce ilgili hücre modelinde sitotoksisite değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Bu test Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) 10993-5'te tanımlanmıştır. Bu standardizasyona göre gerçekleştirdiğimiz AM-co-PEGDA fiberinin 24 saat, 48 saat, 72 saat zaman aralıklarında değerlendirilmesi sonucu toksik etki göstermediği ortaya konulmuştur (Şekil 5.38., Şekil 5.39.).



Şekil 5.38. U87 hücrelerinin 24 saat, 48 saat ve 72 saat zaman süreyle AM-co-PEGDA optik fiberlere ile maruziyeti sonucu biyouyumluluğunun değerlendirilmesi (Thermo C20301).



Şekil 5.39. U87 hücrelerinin 24 saat, 48 saat ve 72 saat zaman süreyle AM-co-PEGDA optik fiberlere ile maruziyeti sonucu biyouyumluluğunun konfokal mikroskop aracılığıyla değerlendirilmesi (Thermo Calcein AM/Etbr-1)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Glioblastoma, tüm gliomaların %60-70'ini oluşturan, malignite karakterlere göre sınıflandırıldığında 4. derece olarak değerlendirilen santral sinir sisteminin en yaygın görülen tümörüdür. Cerrahi rezeksiyon tedavide etkin gibi görünse de tümörü çevreleyen hücrelerde tekrar ortaya çıkabilmektedir. Glioblastoma vakalarının %7'i sadece bir yıl içerisinde tekrar eder. Genel sağ kalım oranı ise 12-15 ay kadardır hastaların sadece 5 yıllık sağkalım oranı sadece %13'tür (133–136). Bu tümörle ilgili geçmişten bugüne fazlasıyla bilgi birikimi oluşmuş olmasına rağmen non invaziv ve minimal invaziv tedavisine yönelik sonuçlar halen yeterli değildir(137).

Fotodinamik terapi (FDT) geçmişten günümüze hastalıkların tedavisinde kullanılmakla birlikte farklı nano boyuttaki malzemelerin keşfi ile çok daha etkili bir yöntem olarak yerini almıştır. Fotosensitizerler hem kanserli hücre hem de normal hücreler tarafından hücre içerisine alınabilirler. Sağlıklı hücreler zamanla fotosensitizer ortadan kaldırabilirken, lenfatik yetersizlik nedeniyle tümör hücreleri için bu mümkün değildir. Işık maruziyeti sonucu lokalize aktivasyon ile tümör dokularında fotosensitizatör tutulması, FDT'yi kanser için seçici bir tedavi haline getirir. FDT sonucu, hücrede biyomoleküllerin oksidasyonu ile gelişen süreç hücre sinyalizasyonu ve gen ekspresyonunda ciddi bir değişikliğe neden olarak seçici bir sitotoksisiteye neden olacaktır. Fotosensitizerler özellikle hücrede mitokondri, lizozom, plazma zarı, golgi aygıtı ve endoplazmik retikulumda birikmektedir. Mevcut kanser tedavilerinde ana problem olan içsel apoptotik sürecin indüklenememesi iken, FDT'de bu sorun içsel hücre ölüm yolaklarının aktifleşmesi ile büyük oranda ortadan kaldırılmıştır (138).

Fotodinamik terapide en önemli üç bileşenden birisi olan fotosensitizer seçimi bu projenin ana konusudur. Bu amaçla son yıllarda biyomedikal alanda kullanımı ile öne çıkan nanomalzemeler MXene ve grafitik karbon nitrit'in FDT kanser tedavisindeki etkisi değerlendirilmiştir. Literatürde 2 boyutlu nanomalzemelerin FDT'de kullanımına dair çalışma sayısı sınırlı olmakla birlikte, MXene türevi olan $Mo_2Ti_2C_3$'ün kanser tedavisinde kullanımına yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

MXeneler, aşırı incelik, yüksek yüzey-hacim oranı ve mekanik tokluk gibi etkileyici özelliklerinden kaynaklanan diğer iki boyutlu nanomalzeme sınıflarının tüm avantajlarını

paylaşır. MXene'ler işlevselleştirilebilecek bol miktarda reaktif bölge sağlarken hem birinci (650-950 nm) hem de ikinci biyolojik pencerede (1.000-1.350 nm) yakın kızılötesi (NIR) bölgede güçlü absorpsiyon sergiler ki bu da maksimum doku penetrasyonunu mümkün kılabilmektedir (138)

MXene türevi Ti_3C_2, Nb_2C, Ta_4C_3, MoC_2, TiN, Ti_2C gibi nanomateryallerin fotodinamik kanser tedavisinde etkinliği in-vitro ve in-vivo yöntemlerle araştırılmıştır (109,110,113). Ta_4C_3-IONP-SP, MnOx/Ta_4C_3, Ti_3C_2-SP, MnOx/Ti_3C_2−SP nanomateryallerinin 808nm NIR lazer uygulaması sonucu 4T1 meme kanseri hücresine lazer uygulanan gruplarda hücre canlılığı ve kalsein AM ve PI boyama konfokal mikroskopi incelemeleri sonucunda bu projeden elde edilen sonuçlarla benzer bulgular elde etmişlerdir(105,114,139). Projede kullandığımız ışık kaynağının dalga boyu doku penetrasyonu için çok daha düşük olmasına rağmen diğer çalışmalarla benzer sonuçların elde edilmesi $Mo_2Ti_2C_3$'ün dokudaki lokalizasyonu ve ROS üretme kapasitesinin daha yüksek olabileceğini göstermektedir. İnsan glioblastoma hücresi U118 ve U251 üzerinde selüloz hidrojel ile entegre edilen Ti_3C_2'ün 808 nm'de FTT etkinliği araştırılmıştır. Bu araştırma ile literatürde ilk defa MXene türevlerinin glioblastoma hücresi üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre, hücre canlılığı sonuçları 78 µg/ml uygulama dozunda %50'nin üzerindedir. Diğer taraftan aynı dozda HepG2 hücresinde kalcein AM/PI boyama sonucu hücre ölümünü ifade eden kırmızı ışıma görülmemiştir (140). Bu sonuçlar bize hücre türüne spesifik olarak uygulama dozu ve yönteminin değişebileceğini göstermektedir. Bir diğer çalışma ise, MXene türevi Ti_2C_PEG'in, HaCaT, A375, MCF-10A ve MCF-7 gibi hücre grupları üzerinde 808 nm ışığa maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Her bir hücre grubu 62.5 µg/ml ve üzerindeki dozlarda %100 ROS üretmiştir. 50 µg/ml uygulama dozunda hücre canlılığı %50'nin altında tespit edilmiştir. (112). Literatürdeki araştırmalar değerlendirildiğinde $Mo_2Ti_2C_3$'ün terapötik olarak etkili dozları, literatürdeki mevcut diğer MXene bazlı FDT/FTT ajanı ile karşılaştırıldığında benzerlik göstermiştir.

g-C_3N_4'de tıpkı $Mo_2Ti_2C_3$ gibi yüksek yüzey-hacim oranlarına sahip olmasını yanı sıra, düşük toksisite, yüksek stabilite, iyi biyouyumluluk ve yüksek fotolüminesans kuantum verimleri nedeniyle çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır. g-C_3N_4'in FDT'de kullanımlarına ilk örneği Lin ve ark. 2014'te, g-C_3N_4 nano tabakalarının tekli oksijen üretmek için fotosensitizatör olarak kullanıldığı, 440-450 nm'de düşük güç yoğunluğunda (20 mW/cm^{-2}) ışığa maruz kalındığında HeLa hücrelerinin ölümü ile ilk sonuçlar elde edildi. Ma ve arkadaşları ise FeIII ile modifiye edilmiş g- C_3N_4 nano tabakalarının, kanser

hücrelerinde O_2 üretmek için H_2O_2'yi parçalamada olağanüstü katalitik yetenek gösterdiği, böylece tümör hipoksisini azalttığı ve FDT sonucunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Fe3O4@g-C_3N_4–UCNPs–PEG'in HeLa hücresi ile gerçekleştirilen FTT sonucu 200 ug/ml uygulama dozlarında yaklaşık %50 hücre canlılığı tespit edilmiştir (82) g-C_3N_4@PDA'nın 660nm 30 mW cm^{-2}'de MCF7 hücresinde FDT etkisi değerlendirildiğinde hücre canlılığı 100 ug/ml uygulama dozunda yaklaşık %60 civarındadır. ROS üretme kapasitesinin kalsein AM/PI ile değerlendirildiği MCF-7 hücrelerinde 150 µg/ml konsantrasyonundaki g-C_3N_4@PDA'a 660nm ışığa maruz bırakıldığı uygulama grubunda hücre ölümünü ortaya koymuştur(83). Glioblastoma hücresinde FDT test edilen mezoporlu manyetik karbon nitrit kurkumin yükleyerek FDT etkinliği araştırılmıştır. Bu araştırmada C6 hücresi kullanılmış olup mavi ışık hücrelerin %60'ını öldürmüştür. Apoptoz deneyi sonucunda en yüksek hücre ölümü ışık ile uygulama gerçekleştirilen grupta %70 oranında olmuştur. Bu oran bu projede elde ettiğimiz apoptotik hücre ölümüyle kıyaslandığında desteklemektedir. Bu projede U87 hücresinin mpg-CN'e 50W 520nm ışığa maruz kalması sonucu apoptotik hücre ölümü %50 oranındadır (141)

UCNPs@g-C_3N_4 nanopartikülünün HeLa hücresinde 980nm lazer ışınına maruziyeti sonucu UCNPs@g-C_3N_4-PEG grubunda 100ug/ml dozunda hücre canlılığı yaklaşık %50 oranında iken, UCNPs@g-C_3N_4-Au25-PEG bu oran ~%10 kadardır. Bu sonuçlar g-C_3N_4 ile Au konjugasyonunun FDT etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Öte yanda PEG gibi hidrofilik moleküller yüklenmesi g-C_3N_4'in sulu matris içindeki stabiliteleri de arttırmaktadır. Bu özellik, intravenöz uygulamaları açısından oldukça önemlidir (108). g-C_3N_4'ün FDT etkinliğinin araştırıldığı ekibimiz tarafından gerçekleştirilen araştırmada, g-C_3N_4 muamele edilmiş, 50W 490nm ışığa maruz bırakılan A549 ve MDA-MB-435 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla 100 µg/ml dozlarında %40 civarındadır. Bu araştırma her iki hücrede de nanomalzemenin bu projede olduğu gibi etkili bir şekilde hücre içerisine alındığını göstermiştir(81).

Bu proje aracılığıyla glioblastoma tedavisine yönelik kullanılmasını ön gördüğümüz mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ için *in vitro* koşullarda analizleri gerçekleştirilmiş olup her iki nanomalzemenin sitotoksik etkinliği insan glioblastoma hücresinde ortaya konulmuştur.

Araştırmamız kapsamında 2 boyutlu nanomalzeme mpg-CN ve MXene türevi $Mo_2Ti_2C_3$'ün *in vitro* koşullarda U 87 insan glioblastoma hücresi üzerinde etkisinin tedavi edici etkisinin karşılaştırılması amaçlandı. Bu amaçla optimum uygulama dozunun

belirlenmesi amacıyla 25 µg/ml, 50 µg/ml 100 µg/ml ve 200 µg/ml dozlarında mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ 520 nm dalga boyunda ışığa 1 saat maruz bırakılarak değerlendirilmiştir. Her iki malzemenin ışık ile muamele edilmediği taktirde toksik etkisinin olup olmadığını araştırmak için nanomalzemeye maruz bırakılmıştır. Işık uygulanmayan U 87 hücrelerde herhangi bir sitotoksisite görülmemiştir. 1 saat 520nm ışık uygulanan $Mo_2Ti_2C_3$ grubunda 50 µg/ml %43, 100 µg/ml %28, 200 µg/ml %37 hücre canlılığı tespit edilmiştir. 1 saat 520nm ışık uygulanan mpg-CN grubunda 50 µg/ml %62, 100 µg/ml %54, 200 µg/ml %63 hücre canlılığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler ışığında U 87 hücresi uygulama grubunda 1 saat 520nm ışığa maruz bırakılan hücrelerin hücre canlılığında 100 µg/ml uygulama dozunun *in vitro* uygulamada etkin doz olarak belirlenmiştir.

Sağlıklı hücre grubu L929 fare fibroblast hücresinde gerçekleştirilen hücre canlılığı deneylerine göre; ışık uygulanmayan L929 hücrelerde herhangi bir sitotoksisite görülmemiştir. 1 saat 520nm ışık uygulanan $Mo_2Ti_2C_3$ grubunda 50 µg/ml %28, 100 µg/ml %21, 200 µg/ml %23 hücre canlılığı tespit edilmiştir. 1 saat 520nm ışık uygulanan mpg-CN grubunda 50 µg/ml %27, 100 µg/ml %23, 200 µg/ml %31 hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında fibroblast hücrelerinin 520 nm ışık ve malzeme varlığında hücre canlılığında düşüş kullandığımız her iki malzemenin glioblastoma hücresini spesifik tanıyacak şekilde fonksiyonelleştirilebileceği öngörüsünü ortaya çıkarmıştır.

Diğer yandan bu hücrelerin sitotoksisitelerinden sorumlu ROS üretimini kalitatif olarak ortaya koymak amacıyla genel stres indikatörleri karboksi-H2DCFDA kullanılmıştır. $Mo_2Ti_2C_3$ ve mpg-CN ‘e maruz bırakılan ışık uygulanmayan U87 hücrelerinde yeşil floresans görülmezken, 520nm ışığa 1 saat maruz bırakılan gruplarda ROS belirteci yeşil floresan ışık verdiği floresan mikroskop aracılığıyla ortaya konulmuştur. Hangi tip ROS üretimi olduğunu ortaya koymak için mitokondriyal membran potansiyeli (mito measurements), süperoksit anyon ve NO ölçümleri gibi değerlendirmeleri ilerideki araştırmalara temel oluşturacaktır.

Öte yandan bu malzemelerin hücreyi hangi mekanizma ile ölüme götürdüğü, malzemenin bir toksisite sonucu mu yoksa tedavi sonucumu öldüğünü ortaya koyacağından ötürü apoptoz ve nekroz tayini yapılmıştır. Akım sitometri ile gerçekleştirilen bu analiz sonucunda kontrol (naive) grubunun hücre canlılığının %89,37 oranında iken, 100 µg/ml dozunda uygulanmış olan mpg-CN grubunun hücre canlılığı %89,37 oranında bulunmuştur. 520nm ışığa 1 saat maruz bırakılan mpg-CN grubundaki hücre canlılığı ise

%50,68 ‘e düşmüştür. Diğer taraftan 100 µg/ml dozunda $Mo_2Ti_2C_3$ uygulanan grupta ise hücre canlılığı %94,08 iken, 520nm ışığa 1 saat maruz bırakılan $Mo_2Ti_2C_3$ grubunda hücre canlılığı %74,38’e düşmüştür. Bu *in vitro* deney sonuçlarına göre mpg-CN’in U87 insan glioblastoma hücresi üzerindeki tedavi edici özelliği $Mo_2Ti_2C_3$’ den daha yüksektir. Bu durumda her iki malzemenin hücre içerisine alımı ve lokalizasyonu da oldukça önemlidir. Her iki malzemenin hücre içerisine alımını koymak için TEM analizi sonuçlarına göre mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$ grubunun hücre içerisine endositoz aracığıyla alımı ortaya konulmuştur.

Bu proje ile literatürde ilk olarak iki boyutlu iki farklı nanomalzemenin non-invaziv glioblastoma tedavisinde kullanmaya yönelik potansiyelleri araştırılmıştır. Bu sonuçlar daha önce farklı kanser türlerinde FDT etkisi belirlenmiş ve etkinliği bilinen mpg-CN için destekler nitelikte olup, $Mo_2Ti_2C_3$ için ilk defa bir kanser hücresinde çalışılmış olması literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Projemizin ikinci aşamasında hücre foto-terapötik etkinliğinin daha yüksek olduğunu belirlediğimiz mpg-CN ile gerçekleştirilmiştir. Literatürde ilk defa içi boşluklu hidrojel optik fiber üretilerek ışık ve malzemenin tek bir aracı ile uygulanabilecek biyouyumlu implante edilebilir malzeme geliştirilmiştir. Bu sayede ışığın beyin dokusu içerisinde dağılım ve saçılma gibi özellikleri limitasyonları azaltmıştır. Fiber uzunluğuna bağlı ışığın azalması, Ca ile kaplanmış AM-co-PEGDA fiber ile gerçekleştirilen bir araştırmada 2 cm çapındaki cm uzunluktaki fiberin ışık azalması 2 dB iken bu proje mikroakışkan kanalı bulunmayan fiberin ışık azalması 0.2 dB’dir. Diğer taraftan projemizde yine fiber uzunluğuna bağlı ex vivo incelemeler sonucu beyin dokusu içerisine implante edilmiş Am-co-PEGDA hidrojelinin ışık azalma profili 0.5 db/cm^{-1} iken, N-izopropilakrilamid (NIPAM)-PEGDA hidrojel optik fiberinin ışık azalması 0.65 db/cm^{-1} tespit edilmiştir. Bu oran daha önce test edilen diğer çalışmalarla da benzerlik göstermiştir(132). Hidrojel optik fiberlerin şişme kapasitelerine göre ışığı iletme ve mekanik stres özellikleri doğrudan ilişkilidir. %5 PEGDA içeren hidrojel ile gerçekleştirilen bir araştırmada zamana bağlı şişme oranı %800 olarak bulunurken bizim üretmiş olduğumuz Am-co-PEGDA hidrojelinde bu oran %600 olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan fotodinamik tedavide kullanılmak üzere üretilen N/izoproakrilamid ve PEGDA kopolimerizasyonu ile üretilen hidrojel optik fiberin şişme oranı %160 olarak tespit edilmiştir(142,143) .

Fototıp uygulamalarında fiber optik sistemlerle kombine hidrojel optik fiberlerin kullanımı son yıllarda multidisipliner araştırmalarında artmasıyla ortaya çıkmış çok güncel bir araştırma alanıdır. Hidrojellerin biyouyumlulukları, ışığı iletme potansiyelleri ve mekanik özellikleri dolayısıyla tercih edilebilmektedir (121,144–155). Aljinat-poliakriamid hidrojelinin optogenetik uygulama amacıyla fare beynine implante edilmesi sonucu silika fiberin neden olabileceği tahribatı ortadan kaldırabilecek biyouyumlu hidrojel optik fiberler kullanılmıştır (153). Diğer taraftan *in vivo* fotodinamik tedavide kullanılmak üzere üretilen N/izoproakrilamid/PEGDA hidrojeli aracılı fototermal terapide herhangi bir sitotoksisite tespit edilmezken, kanser dokusunda fototermal tedavi etkinliğini göstermiştir(132). Bizim gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında ise üretmiş olduğumuz mikroakışkan hidrojel optik fiberlerin *in vitro* veriler açısından umut vaad edici olmasının yanı sıra fotodinamik tedavide ilaç uygulamasının bir aracı ile gerçekleştirilebilecek olmasından dolayı avantaj sağlayacaktır. Bu fiberlerin optogenetik uygulamalarda çok aşamalı ilaç enjeksiyonları açısından da avantaj sağlaması öngörülmektedir. Tüm bu sonuçlar bizim elde etmiş olduğumuz *in vitro* verileri destekler nitelikte olup hidrojel aracılı fototıp uygulamalarında kullanılabilecektir.

6.2. SONUÇ

Kanser fotodinamik tedavisinin iki önemli komponenti fotosensitizer molekül ve ışık kaynağı üzerinde durduğumuz bu tez çalışmamızda iki farklı fotosensitizeri in-vitro ortamda glioblastoma hücreleri üzerinde FDT etkinliği test edilmiştir. Bu araştırma ile literatürde ilk defa $Mo_2Ti_2C_3$'ün FDT'de fotosensitizer olarak kullanımı sonucu gelecek vaat eden sonuçlar elde edilmiştir. Bu testler sonucunda da U87 hücrelerinin fotosensitizer nanopartikül mpg-CN ve $Mo_2Ti_2C_3$'ü hücre içerisine aldığını TEM analizi ile ortaya konulmuştur. Her iki nanopartikülün farklı dalga boylarında hücre canlılığı değerlendirildikten sonra 5W gücünde 520 nm dalga boyundaki LED ışık ile in-vitro analizler gerçekleştirilmiştir. Her iki nanopartikülünde hipotezimizi destekleyici olarak FDT sonucu glioblastoma hücrelerinde ROS oluşturduğu ortaya konulmuştur. İki nanopartikülünde 100 µg/ml ve üzerindeki dozlar için hücrelerin %50'sinden fazlasını öldürdüğü tespit edilmiştir. 100 µg/ml dozunda test edilen her iki nanomalzemenin 5W gücünde 520 nm dalga boyundaki LED ışığa maruz kalma süreleri yarım saat ve bir saatlik periyotlarda 1 saatlik ışığa maruziyet süresinin kullanımı hücre canlılığı açısından tercih sebebi olmuştur. Fotodinamik tedavide ROS türlerinin oluşumu sonucu oksidatif stres gelişerek apoptotik ölümü desteklemektedir. Bu çalışmada her iki nanopartikülünde FDT

sonucu apoptotik hücre ölümü gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda her iki nanopartikülün in-vitro FDT etkinliği karşılaştırıldığında mpg-CN ile araştırmalarımıza devam etmeye karar verilmiştir. Tezin ikinci glioblastoma tedavisinde kafatası ve BOS gibi bariyerlerin FDT uygulama esnasında non-invaziv metotlara yanıtının sınırlı olabileceği kanısıyla minimal invaziv metotla beyne implante edilebilen biyouyumlu hidrojel optik fiberlerin ışık iletiminde kullanımı amacıyla hidrojel üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Üretilen hidrojeller aynı zamanda fotosensitizer salınımı gerçekleştirebilmesi amacıyla üretilen hidrojel optik fiberlerin içerisine mikro akışa izin kanallar oluşturulmuştur. Bu üretilen fiberler LED ışık kaynağına göre çok daha güçlü olan 520 nm lazer ışık kaynağı ile birleştirilerek üretilen hidrojel optik fiberin ışığı doğrudan iletmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda test ışık iletimi test edilen hidrojellerin kırılma indeksleri, ışık iletimi ve fiber uzunluğuna bağlı ışık azalması test edildiğinde % 95 Am-co-PEGDA monomer oranındaki hidrojelin ışığı iletmedeki başarısı ortaya konulmuştur. Ayrıca mikroakışkan kanal içerisinden iletimi gerçekleştirilecek olan mpg-CN'in ROS üretimi ve hücre içi üretimi arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca üretilen hidrojellerin mikroakışkan kanalları içerisinde sıvı akış hızları belirlenmiştir. Tüm bu analizle sonucunda 2 mm dış ve 0.5 mm çapında mikroakışkan kanala sahip fiberin in-vivo uygulamalar için uygun olacağına karar verilmiştir. Ex-vivo analizler sonucu fiberin kuzu beyin dokusuna implante edilebildiği ve ışık azalmasını doku içerisinde test edilmesi sonucu 5 cm uzunluğundaki fiberin in-vivo uygulamalarda etkin olabileceği kanısına varılmıştır. Üretilen fiberlerin in-vitro etkinliğinin validasyonu için U87 hücreleri sitotoksisiteleri test edilmiş ve sonuçta hidrojel optik fiberlerin ve mikroakışkan optik fiberlerin 520 nm dalga boyunda lazer ışığın 100 µg/mL mpg-CN nano materyaline maruz bırakılmış U87 hücreleri üzerinde 10 dakika süresince uygulanmasının tedavide kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Bu bilgiler ışığında üretilen hidrojel optik fiberler fonksiyonelleştirilerek FDT uygulaması eş zamanlı sensör aracılığı ile PH, sıcaklık oksijen seviyesi ya da farklı bir biyomarker'ın tespiti gerçekleştirilebilir. Hidrojel üretimini ışık geçirgenliği arttırmak için hidrojelle dip coating yapılarak fonksiyonelleştirilebilir. Bu çalışma ile hidrojellerin ışık iletiminde ve biyosensör uygulamalarında kullanıldığı bilinmektedir. Ancak non invazif FDT tedavi protokolü oluşturularak mikroakışkan fiber optik üretimi ve kullanımı ilk defa bu tez çalışması ile ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ışığında mikroakışkan hidrojel optik fiber aracılı *in vivo* fotodinamik tedavi protokolü oluşturulabilir.

KAYNAKLAR

1. International Agency for Research on Cancer World Health Organization (2023). https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table [Internet]. World Health Organization. 2023 [10 Nisan 2023]. Erişim adresi: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table

2. Rong L, Li N, Zhang Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. C. 41, Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. BioMed Central Ltd; 2022.

3. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, vd. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. New England Journal of Medicine. 20 Şubat 2014;370(8):709-22.

4. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, vd. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. New England Journal of Medicine. 2014;370(8):699-708.

5. Wen PY, Reardon DA. Neuro-oncology in 2015: Progress in glioma diagnosis, classification and treatment. C. 12, Nature Reviews Neurology. Nature Publishing Group; 2016.

6. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, vd. Glioma. C. 1, Nature Reviews Disease Primers. Nature Publishing Group; 2015.

7. Mehmet Y. İnsan Anatomisi. 2000. 262-266 s.

8. Progress M, Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. 2008.

9. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. Human Cancer Biology. 2009;15(19):6002-7.

10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, vd. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2007;114(2):97-109.

11. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Ph D, vd. Neuro-Oncology System Tumors Diagnosed in the United States in 2009 – 2013. 2016.

12. Buatti JM, Marcus RB, Mendenhall WM, Friedman WA, Bova FJ. Accelerated Hyperfractionated Radiorherapy for Malignant Gliomas. 1999;(September).

13. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. Chem Rev. 2015;115(4):1990-2042.

14. Sharman WM, Allen CM, Lier Van JE. Role of Activated Oxygen Species in Photodynamic Therapy. 2000;369(1):1689-99.

15. Borden WT, Ho R, Stuyver T, Chen B. Dioxygen : What Makes This Triplet Diradical Kinetically Persistent ? 2017.

16. Jarvi MT, Niedre MJ, Patterson MS, Wilson BC. The Influence of Oxygen Depletion and Photosensitizer Triplet-state Dynamics During Photodynamic Therapy on Accurate Singlet Oxygen Luminescence Monitoring and Analysis of Treatment Dose Response. 2011;223-34.

17. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1(4):279-93.

18. Macdonald IANJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. 2001;105-29.

19. Manuscript A, Cells C, Hypoxia U. Photoactivation Switch from Type II to Type I Reactions by Electron-Rich Micelles for Improved Photodynamic Therapy of Cancer Cells Under Hypoxia. 2012;156(3):276-80.

20. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization Ana. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014;1(4):279-93.

21. Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 2002;66(2):89-106.

22. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. Photochem Photobiol. 2001;74(5):656.

23. Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S. Porphyrins in Photodynamic Therapy-A Search for Ideal Photosensitizers. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2002;(0512):187-207.

24. DW Kufe D, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland james F, vd. Cancer Medicine. 6th editio. Decker B, editör. 2003.

25. Kessel D. Photodynamic therapy: from the beginning Early glimmers. 2004; 1000:3-7.

26. Meyer-Betz F. Untersuchung uber die biologische(photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. Dtsch Arch Klin Med. 1913; 112:476-503.

27. Policard A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examines a la lumiere de Wood. CR Soc Biol, 1924; 91:1423-4.

28. Diamond I, Mcdonald AF, Wılson CB, Granelli SG, Nielsen S, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant tumours. Lancet. 1972; 2:1175-7.

29. Review Y, Examination P, First OF, Used GP, Therapy P. Yearly review precilinical examination of first and second generation photosensitizier used photodynamic therapy. 1991;54(6).

30. Jiang L, Ma J. Photogeneration of Singlet Oxygen (102) and Free. 2009;5762.

31. Mitra S, Cassar SE, Niles DJ, Puskas JA, Frelinger JG, Foster TH. Photodynamic theraphy mediates the oxygeb-independent activation of hypoxia-inducible factor 1α. American Association for Cancer Reserch. 2006;5(12):3268-74.

32. Medycznej RA, Academiae A, Bialostocensis M. Levels of lipid peroxidation in A549 cells after PDT *in vitro*. Annales Academiae Medicae Bialostocensis. 2004; 49:82-4.

33. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D. Photodynamic Therapy. J Natl Cancer Inst. 1998;90(12):889-905.

34. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. 2013;24-9.

35. Garg AD, Nowis D. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. 2010;1050-71.

36. Görgülü A. Boradiazaindasen Türevi Yeni Fotodinamik Terapi Reaktifinin Tasarım, Sentez ve Karakterizasyonu. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi; 2008.

37. Sibata CH, Colussi NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2000; 33:869-80.

38. Guillermo Garcia-Manero, Hui Yang, Shao-Qing Kuang, Susan O'Brien, Deborah Thomas and HK. Photodynamic Theraphy of Cancer: An Update. Bone. 2005;23(1):1-7.

39. Humar M, Kwok SJJ, Choi M, Yetisen AK, Cho S, Yun SH. Toward biomaterial-based implantable photonic devices. C. 6, Nanophotonics. Walter de Gruyter GmbH; 2017. s. 414-34.

40. Gaitan B, Inglut CT, Liu Y, Chen Y, Huang HC. Depth-resolved imaging of photosensitizer in the rodent brain using fluorescence laminar optical tomography. 2001.

41. Zhou Z, Shi Z, Cai X, Zhang S, Corder SG, Li X, vd. The Use of Functionalized Silk Fibroin Films as a Platform for Optical Diffraction-Based Sensing Applications. Advanced Materials. 18 Nisan 2017;29(15).

42. Kim J, Gutruf P, Chiarelli AM, Heo SY, Cho K, Xie Z, vd. Miniaturized Battery-Free Wireless Systems for Wearable Pulse Oximetry. Adv Funct Mater. 05 Ocak 2017;27(1).

43. Yun SH, Kwok SJJ. Light in diagnosis, therapy and surgery. C. 1, Nature Biomedical Engineering. Nature Publishing Group; 2017.

44. Nizamoglu S, Gather MC, Yun SH. All-biomaterial laser using vitamin and biopolymers. Advanced Materials. 06 Kasım 2013;25(41):5943-7.

45. Kim T Il, McCall JG, Jung YH, Huang X, Siuda ER, Li Y, vd. Injectable, cellular-scale optoelectronics with applications for wireless optogenetics. Science (1979). 12 Nisan 2013;340(6129):211-6.

46. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. Journal of Controlled Release. 2013;166(2):182-94.

47. Kuhn DA, Vanhecke D, Michen B, Blank F, Gehr P, Petri-Fink A, vd. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. Beilstein Journal of Nanotechnology. 2014;5(1):1625-36.

48. Tekinay AB. Therapeutic Nanomaterials. 2016; [10 Nisan 2023]. Erişim adresi:https://www.wiley.com/en-gb/Therapeutic+Nanomaterials-p-9781118987452

49. Allison RR, Mang TS, Wilson BD. Photodynamic therapy for the treatment of nonmelanomatous cutaneous malignancies. Semin Cutan Med Surg. 1998;17(2):153-63.

50. Peng Q, Moan J, Nesland JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. Ultrastruct Pathol. 1996;20(2):109-29.

51. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1(1):27-42.

52. Ormond AB, Freeman HS. Dye sensitizers for photodynamic therapy. Materials. 2013;6(3):817-40.

53. Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. Photochem Photobiol. 1996;64(3):469-85.

54. Patito IA, Rothmann C, Malik Z. Nuclear transport of photosensitizers during photosensitization and oxidative stress. Biol Cell. 2001;93(5):285-91.

55. Lukšienė Ž. Photodynamic therapy : mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. Medicina (Lithuania). 2003;39(12):1137-50.

56. Verlag F. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. 2003; 19:7-19.

57. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what , where , why , and how. Photochem Photobiol Sci. 2002;1(February):1-21.

58. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. American Journal of Pathology. 2000;157(5):1415-30.

59. Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors : Signaling and Modulation. 2012;1305(1998).

60. Li M, Luo Z, Zhao Y. Recent advancements in 2D nanomaterials for cancer therapy. Sci China Chem. 2018;61(10):1214-26.

61. Chimene D, Alge DL, Gaharwar AK. Two-Dimensional Nanomaterials for Biomedical Applications: Emerging Trends and Future Prospects. Advanced Materials. 2015;27(45):7261-84.

62. Novoselov KS, Geim AK, Morozov S V., Jiang D, Zhang Y, Dubonos S V., vd. Electric field in atomically thin carbon films. Science (1979). 2004;306(5696):666-9.

63. Sun Y, Gao S, Lei F, Xiao C, Xie Y. Ultrathin Two-Dimensional Inorganic Materials: New Opportunities for Solid State Nanochemistry Published as part of the Accounts of Chemical Research special issue “2D Nanomaterials beyond Graphene ”. Acc Chem Res. 2015;48(1):3–12.

64. Wang F, Wang Y, Liu Y hsin, Morrison PJ, Loomis RA, Buhro WE. Two-Dimensional Semiconductor Nanocrystals : Properties , Templated Formation , and Magic-Size Nanocluster Intermediates Published as part of the Accounts of Chemical Research special issue “ 2D Nanomaterials beyond Graphene ” . Acc Chem Res. 2014; 48:13-21.

65. Vijayaraghavan A. Graphene – Properties and Characterization. Springer Handbook of Nanomaterials. 2013. 1-1221 s.

66. Peng B, Ang PK, Loh KP. Two-dimensional dichalcogenides for light-harvesting applications. Nano Today [Internet]. 2015;10(2):128-37. Erişim adresi: http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2015.01.007

67. Lin X, Zhu J, Wei B. Hybrid nanostructures of metal_two-dimensional nanomaterials for plasmon-enhanced applications. C. 45, Chemistry Society Rev. 2016. s. 3145.

68. Li L, Kim J, Jin C, Ye GJ, Qiu DY, Da Jornada FH, vd. Direct observation of the layer-dependent electronic structure in phosphorene. Nat Nanotechnol. 2017;12(1):21-5.

69. Eken Korkut S, Küçükkeçeci H, Metin Ö. Mesoporous Graphitic Carbon Nitride/Black Phosphorus/AgPd Alloy Nanoparticles Ternary Nanocomposite: A Highly Efficient Catalyst for the Methanolysis of Ammonia Borane. ACS Appl Mater Interfaces. 19 Şubat 2020;12(7):8130-9.

70. Liu J, Wang H, Antonietti M. Graphitic carbon nitride “reloaded”: Emerging applications beyond (photo)catalysis. Chem Soc Rev. 2016;45(8):2308-26.

71. Dong G, Zhang Y, Pan Q, Qiu J. A fantastic graphitic carbon nitride (g-C3N4) material: Electronic structure, photocatalytic and photoelectronic properties. C. 20, Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. Elsevier; 2014. s. 33-50.

72. McCaw DL, Bryan JN. Photodynamic therapy. Cancer Management in Small Animal Practice. 2009;90(12):163-6.

73. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, vd. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. C. 106, Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson SAS; 2018. s. 1098-107.

74. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. C. 3, Nature Reviews Cancer. 2003; 380-7.

75. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. Nat Rev Cancer. 2006;6(7):535-45.

76. Taheri H, Unal MA, Sevim M, Gurcan C, Ekim O, Ceylan A, vd. Photocatalytically Active Graphitic Carbon nitride as an Effective and Safe 2D Material for *In Vitro* and *In Vivo* Photodynamic Therapy. Small Nano Micro. 2020.

77. Feng L, Yang D, He F, Gai S, Li C, Dai Y, vd. A Core–Shell-Satellite Structured Fe3O4@g-C3N4–UCNPs–PEG for T1/T2-Weighted Dual-Modal MRI-Guided Photodynamic Therapy. Adv Healthc Mater. 2017;6(18):1-13.

78. Wang H, Lin Q, Yin L, Yang Y, Qiu Y, Lu C, vd. Biomimetic Design of Hollow Flower-Like g-C3N4@PDA Organic Framework Nanospheres for Realizing an Efficient Photoreactivity. Small. 2019;15(16):1-8.

79. Xu M, Yang G, Bi H, Xu J, Feng L, Yang D, vd. Combination of CuS and g-C3N4 QDs on upconversion nanoparticles for targeted photothermal and photodynamic cancer therapy. Chemical Engineering Journal. 2019; 360:866-78.

80. Chu X, Li K, Guo H, Zheng H, Shuda S, Wang X, vd. Exploration of Graphitic-C3N4 Quantum Dots for Microwave-Induced Photodynamic Therapy. ACS Biomater Sci Eng. 2017; 3(8):1836-44.

81. Feng L, He F, Liu B, Yang G, Gai S, Yang P, vd. G-C3N4 Coated Upconversion Nanoparticles for 808 nm Near-Infrared Light Triggered Phototherapy and Multiple Imaging. Chemistry of Materials. 2016; 28(21):7935-46.

82. Naguib M, Kurtoglu M, Presser V, Lu J, Niu J, Heon M, vd. Two-dimensional nanocrystals produced by exfoliation of Ti3AlC2. Advanced Materials. 2011; 23(37):4248-53.

83. Lukatskaya MR, Kota S, Lin Z, Zhao MQ, Shpigel N, Levi MD, vd. Ultra-high-rate pseudocapacitive energy storage in two-dimensional transition metal carbides. Nat Energy. 2017; 6.

84. Hantanasirisakul K, Gogotsi Y. Electronic and Optical Properties of 2D Transition Metal Carbides and Nitrides (MXenes). C. 30, Advanced Materials. Wiley-VCH Verlag; 2018.

85. Xuan J, Wang Z, Chen Y, Liang D, Cheng L, Yang X, vd. Organic-Base-Driven Intercalation and Delamination for the Production of Functionalized Titanium Carbide Nanosheets with Superior Photothermal Therapeutic Performance. Angewandte Chemie-International Edition. 2016;55(47):14569-74.

86. Chen K, Qiu N, Deng Q, Kang MH, Yang H, Baek JU, vd. Cytocompatibility of Ti3AlC2, Ti3SiC2, and Ti2AlN: *In Vitro* Tests and First-Principles Calculations. ACS Biomater Sci Eng. 2017;3(10):2293-301.

87. Lin H, Gao S, Dai C, Chen Y, Shi J. A Two-Dimensional Biodegradable Niobium Carbide (MXene) for Photothermal Tumor Eradication in NIR-I and NIR-II Biowindows. J Am Chem Soc. 2017;139(45):16235-47.

88. Er D, Li J, Naguib M, Gogotsi Y, Shenoy VB. Ti3C2 MXene as a high capacity electrode material for metal (Li, Na, K, Ca) ion batteries. ACS Appl Mater Interfaces. 23 Temmuz 2014;6(14):11173-9.

89. Shahzad F, Alhabeb M, Hatter CB, Anasori B, Hong SM, Koo CM, vd. Electromagnetic interference shielding with 2D transition metal carbides (MXenes). Science (1979). 09 Eylül 2016;353(6304):1137-40.

90. Anasori B, Lukatskaya MR, Gogotsi Y. 2D metal carbides and nitrides (MXenes) for energy storage. C. 2, Nature Reviews Materials. Nature Publishing Group; 2017. s. 1-17.

91. Gazzi A, Fusco L, Khan A, Bedognetti D, Zavan B, Vitale F, vd. Photodynamic therapy based on graphene and MXene in cancer theranostics. C. 7, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.; 2019. s. 295.

92. Soleymaniha M, Shahbazi MA, Rafieerad AR, Maleki A, Amiri A. Promoting Role of MXene Nanosheets in Biomedical Sciences: Therapeutic and Biosensing Innovations. Adv Healthc Mater. 2019;8(1):1-26.

93. Liu Z, Zhao M, Lin H, Dai C, Ren C, Zhang S, vd. 2D magnetic titanium carbide MXene for cancer theranostics. J Mater Chem B. 2018;6(21):3541-8.

94. Liu Z, Lin H, Zhao M, Dai C, Zhang S, Peng W, vd. 2D superparamagnetic tantalum carbide composite MXenes for efficient breast-cancer theranostics. Theranostics. 2018;8(6):1648-64.

95. Dai C, Chen Y, Jing X, Xiang L, Yang D, Lin H, vd. Two-Dimensional Tantalum Carbide (MXenes) Composite Nanosheets for Multiple Imaging-Guided Photothermal Tumor Ablation. ACS Nano. 2017;11(12):12696-712.

96. Zong L, Wu H, Lin H, Chen Y. A polyoxometalate-functionalized two-dimensional titanium carbide composite MXene for effective cancer theranostics. Nano Res. 2018;11(8):4149-68.

97. Lin H, Chen Y, Shi J. Insights into 2D MXenes for Versatile Biomedical Applications: Current Advances and Challenges Ahead. Advanced Science. 2018;5(10).

98. Dai C, Lin H, Xu G, Liu Z, Wu R, Chen Y. Biocompatible 2D Titanium Carbide (MXenes) Composite Nanosheets for pH-Responsive MRI-Guided Tumor Hyperthermia. Chemistry of Materials. 2017;29(20):8637-52.

99. Liu G, Zou J, Tang Q, Yang X, Zhang Y, Zhang Q, vd. Surface Modified Ti3C2 MXene Nanosheets for Tumor Targeting Photothermal/Photodynamic/Chemo Synergistic Therapy. ACS Appl Mater Interfaces. 2017;9(46):40077-86.

100. Huang K, Li Z, Lin J, Han G, Huang P. Two-dimensional transition metal carbides and nitrides (MXenes) for biomedical applications. Chem Soc Rev. 2018;47(14):5109-24.

101. Szuplewska A, Kulpińska D, Dybko A, Jastrzębska AM, Wojciechowski T, Rozmysłowska A, vd. 2D Ti 2 C (MXene) as a novel highly efficient and selective agent for photothermal therapy. Materials Science and Engineering C. 2019;98(December 2018):874-86.

102. Tang W, Dong Z, Zhang R, Yi X, Yang K, Jin M, vd. Multifunctional Two-Dimensional Core-Shell MXene@Gold Nanocomposites for Enhanced Photo-Radio Combined Therapy in the Second Biological Window. ACS Nano. 2019;13(1):284-94.

103. Lin H, Wang X, Yu L, Chen Y, Shi J. Two-Dimensional Ultrathin MXene Ceramic Nanosheets for Photothermal Conversion. Nano Lett. 2017;17(1):384-91.

104. Grafen A. The formal darwinism project in outline. Biol Philos. 2014;29(2):155-74.

105. Liu Y, Meng X, Bu W. Upconversion-based photodynamic cancer therapy. Coord Chem Rev. 2019; 379:82-98.

106. Dunphy CH. Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. 2003;

107. Kochevar IE, Redmond RW. Photosensitized production of singlet oxygen. Methods Enzymol. 01 Ocak 2000; 319:20-8.

108. Ming L, Cheng K, Chen Yu, Yang R, Chen D. Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy. Cancer Med. 2020; 10:257-68.

109. Zhang S, Gao H, Bao G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. ACS Nano. 2022; 14:15.

110. Nazempour R, Zhang Q, Fu R, Sheng X. Biocompatible and implantable optical fibers and waveguides for biomedicine. Materials. 25 Temmuz 2018;11(8).

111. Younis MR, He G, Qu J, Lin J, Huang P, Xia XH. Inorganic Nanomaterials with Intrinsic Singlet Oxygen Generation for Photodynamic Therapy. C. 8, Advanced Science. John Wiley and Sons Inc; 2021.

112. Liu X, Xiao M, Xue K, Li M, Liu D, Wang Y, vd. Heteroaromatic Hyperbranched Polyelectrolytes: Multicomponent Polyannulation and Photodynamic Biopatterning. Angewandte Chemie-International Edition. 23 Ağustos 2021;60(35):19222-31.

113. Klosowski EM, de Souza BTL, Mito MS, Constantin RP, Mantovanelli GC, Mewes JM, vd. The photodynamic and direct actions of methylene blue on mitochondrial

energy metabolism: A balance of the useful and harmful effects of this photosensitizer. Free Radic Biol Med. 01 Haziran 2020; 153:34-53.

114. Reiniers MJ, Van Golen RF, Bonnet S, Broekgaarden M, Van Gulik TM, Egmond MR, vd. Preparation and Practical Applications of 2′,7′-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays. Anal Chem. 04 Nisan 2017;89(7):3853-7.

115. Ercin U, Aribas YK, Tefon Aribas AB, Bilgihan A, Bilgihan K. Singlet oxygen formation during accelerated and hyperaccelerated corneal cross-linking: *in vitro* study. Eye (Basingstoke). 01 Kasım 2021;35(11):3147-51.

116. Wilkinson F. Quantum yield for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. lournal of Physic and Chemistry. 1992;22(1):113-50.

117. Li T, Xue C, Wang P, Li Y, Wu L. Photon penetration depth in human brain for light stimulation and treatment: A realistic Monte Carlo simulation study. J Innov Opt Health Sci. 01 Eylül 2017;10(5).

118. Algorri JF, Ochoa M, Roldán-Varona P, Rodríguez-Cobo L, López-Higuera JM. Light technology for efficient and effective photodynamic therapy: A critical review. C. 13, Cancers. MDPI AG; 2021.

119. Guo J, Liu X, Jiang N, Yetisen AK, Yuk H, Yang C, vd. Highly Stretchable, Strain Sensing Hydrogel Optical Fibers. Advanced Materials. 01 Aralık 2016;28(46):10244-9.

120. Yetisen AK, Jiang N, Fallahi A, Montelongo Y, Ruiz-Esparza GU, Tamayol A, vd. Glucose-Sensitive Hydrogel Optical Fibers Functionalized with Phenylboronic Acid. Advanced Materials. 18 Nisan 2017;29(15).

121. Chen G, Hou K, Yu N, Wei P, Chen T, Zhang C, vd. Temperature-adaptive hydrogel optical waveguide with soft tissue-affinity for thermal regulated interventional photomedicine. Nat Commun. 01 Aralık 2022;13(1).

122. Witthayanuwat S, Pesee M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. Survival analysis of Glioblastoma Multiforme. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 01 Eylül 2018;19(9):2613-7.

123. Werner M, Lyu C, Stadlbauer B, Schrader I, Buchner A, Stepp H, vd. The role of Shikonin in improving 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy and chemotherapy on glioblastoma stem cells. Photodiagnosis Photodyn Ther. 01 Eylül 2022;39.

124. Davis ME. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. Clin J Oncol Nurs. 01 Ekim 2016;20(5):1-8.

125. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. Surg Neurol Int. 2014;5(Supplement).

126. Figueiredo E, Slavin K, Ganau M, Chen CC, Cramer SW. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. Frontiers in Surgery | www.frontiersin.org. 2020; 1:81.

127. Ciofani G, Soto F, Leporatti S, Pedro Viana Baptista I, Vitale F, Yilmazer A, vd. Photodynamic Therapy Based on Graphene and MXene in Cancer Theranostics. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology | www.frontiersin.org. 2019; 7:295.

128. Lin H, Wang Y, Gao S, Chen Y, Shi J. Theranostic 2D Tantalum Carbide (MXene). Advanced Materials. 2018;30(4):1-11.

129. Xing C, Chen S, Liang X, Liu Q, Qu M, Zou Q, vd. Two-Dimensional MXene (Ti3C2)-Integrated Cellulose Hydrogels: Toward Smart Three-Dimensional Network Nanoplatforms Exhibiting Light-Induced Swelling and Bimodal Photothermal/Chemotherapy Anticancer Activity. ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10(33):27631-43.

130. Yadav P, Zhang C, Whittaker AK, Kailasam K, Shanavas A. Magnetic and Photocatalytic Curcumin Bound Carbon Nitride Nanohybrids for Enhanced Glioma Cell Death. ACS Biomater Sci Eng. 2019;

131. Haryanto, Kim S, Kim JH, Kim JO, Ku S, Cho H, vd. Fabrication of poly(ethylene oxide) hydrogels for wound dressing application using E-beam. Macromol Res. Şubat 2014;22(2):131-8.

132. Chen G, Hou K, Yu N, Wei P, Chen T, Zhang C, vd. Temperature-adaptive hydrogel optical waveguide with soft tissue-affinity for thermal regulated interventional photomedicine. Nat Commun. 01 Aralık 2022;13(1).

133. Yuk H, Wu J, Zhao X. Hydrogel interfaces for merging humans and machines. C. 7, Nature Reviews Materials. Nature Research; 2022. s. 935-52.

134. Guo J, Yang C, Dai Q, Kong L. Soft and stretchable polymeric optical waveguide-based sensors for wearable and biomedical applications. C. 19, Sensors (Switzerland). MDPI AG; 2019.

135. Choi M, Choi JW, Kim S, Nizamoglu S, Hahn SK, Yun SH. Light-guiding hydrogels for cell-based sensing and optogenetic synthesis *in vivo*. Nat Photonics. Aralık 2013;7(12):987-94.

136. Pisano F, Pisanello M, Lee SJ, Lee J, Maglie E, Balena A, vd. Depth-resolved fiber photometry with a single tapered optical fiber implant. Nat Methods. 01 Kasım 2019;16(11):1185-92.

137. Johannsmeier S, Torres-Mapa ML, Dipresa D, Ripken T, Heinemann D, Heisterkamp A. Hydrogels for targeted waveguiding and light diffusion. Opt Mater Express. 01 Ekim 2019;9(10):3925.

138. Fu R, Luo W, Nazempour R, Tan D, Ding H, Zhang K, vd. Implantable and Biodegradable Poly(l-lactic acid) Fibers for Optical Neural Interfaces. Adv Opt Mater. 05 Şubat 2018;6(3).

139. Heo YJ, Shibata H, Okitsu T, Kawanishi T, Takeuchi S. Long-term *in vivo* glucose monitoring using fluorescent hydrogel fibers. Erişim adresi: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1104954108

140. Guo J, Luo Y, Yang C, Kong L. In situ surface-enhanced Raman scattering sensing with soft and flexible polymer optical fiber probes. Opt Lett. 01 Kasım 2018;43(21):5443.

141. Teh DBL, Bansal A, Chai C, Toh TB, Tucker RAJ, Gammad GGL, vd. A Flexi-PEGDA Upconversion Implant for Wireless Brain Photodynamic Therapy. Advanced Materials. 01 Temmuz 2020;32(29).

142. Wang L, Zhong C, Ke D, Ye F, Tu J, Wang L, vd. Ultrasoft and Highly Stretchable Hydrogel Optical Fibers for *In Vivo* Optogenetic Modulations. Adv Opt Mater. 20 Ağustos 2018;6(16).

143. Choi M, Humar M, Kim S, Yun SH. Step-Index Optical Fiber Made of Biocompatible Hydrogels. Advanced Materials. 01 Temmuz 2015;27(27):4081-6.

144. Liu B, Zhu H, Zhao D, Nian G, Qu S, Yang W. Hydrogel Coating Enabling Mechanically Friendly, Step-Index, Functionalized Optical Fiber. Adv Opt Mater. 01 Ekim 2021;9(20).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Aydan Fülden Ağan

Adres: [1]Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Gölbaşı/ANKARA

[2]Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Merkezi Merkez/DÜZCE

EĞİTİM VE AKADEMİK KARİYER

2022- 2023	**Araştırmacı** Imperial College London– Kimya Mühendisliği Bölümü
2018- devam	**Öğretim Görevlisi** Düzce Üniversitesi-Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Merkezi
2017- devam	**Doktora** Ankara Üniversitesi– Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Bölümü ***Tez Başlığı:*** *İki boyutlu nanomalzemelerin glioblastoma fotodinamik tedavisinde kullanımı*
2016-2018	**Yüksek Lisans** Ankara Üniversitesi – Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Perfüzyon Bölümü ***Tez Başlığı:*** *Kardiyopleji solüsyonlarının hücre membrane stabilisitesi üzerine etkisi*
2010-2013	**Yüksek Lisans** Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi- Biyoloji Bölümü ***Tez Başlığı:*** *Macrovıpera lebetına (lınnaeus, 1758) (reptılıa:vıperıdae) zehrinin farelerin bazı dokuları üzerine toksik etkileri* ***Debrecen Üniversitesi***– Biyoloji Bölümü (Erasmus öğrenci değişim programı 2011-2012)
2006-2010	**Lisans** Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi- Biyoloji Bölümü

HAKEMLI DERGILERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Kaya, S. T., Agan, K., **Fulden-Agan, A.,** Agyar-Yoldas, P., Ozarslan, T. O., Kekecoglu, M., & Kaya, A. (2022). Protective effect of propolis on myocardial ischemia/reperfusion injury in males and ovariectomized females but not in intact females. *Journal of Food Biochemistry*.
2. Yaşar, M., Saraç, G., Gök, A., Sipahi, N., & **Ağan, A. F.** (2022). Investigation of the Acute Subacute Toxicity of KL-21® Supplementary Food Product in Rats. *International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research*. https://doi.org/10.53811/ijtcmr.1121162
3. Altay Ünal, M., Bayrakdar, Fatma, Nazir, H., Besbinar, O., Gurcan, C., Lozano, N., Arellano, L. M., Yalçın, S., Panatli, O., Çelik, D., Alkaya, D., **Agan, A.,** Fusco, L., Yildiz Yüzük, S., Deloglu Gemma, I., Akcali, K. C., Kostarelos, K., & Yilmazer, A. (2021). Graphene Oxide Nanosheets Interact and Interfere with SARS-CoV-2 Surface Proteins and Cell Receptors to Inhibit Infectivity _ Enhanced Reader.pdf. *Small Nano Micro*, 1–13.
4. **Ağan, A. F.**, & Kekeçoğlu, M. (2020). Melittin and cancer treatment: Nanotechnological perspective. *Uludag Aricilik Dergisi*, *20*(2), 221–231.
5. Agan, K., Zarringhalami, R., **Agan, A. F.**, & Yasar, M. (2020). *Anticancer Effect of Food Supplements on Saos-2 Osteosarcoma Cell*. 19–25.
6. Sarac, G., Yoldas, P. A., Kaya, E., & **Agan, A. F.** (2020). *Antiproliferative Effect of IST-GLIO ® Supplement Food Product on C6 Glioma Cells Mustafa Yasar*. *1*(2).
7. Yasar, M., **Agan, A. F.**, Beyazcicek, E., Gok, A., Agan, K., & Coskun, S. K. (2020). *Systemic Investigation of Acute Toxicity of Some Food Supplements on the Market in Turkey*. 1–11.
8. Yaşar, M., Saraç, G., Sipahi, N., Yoldaş, P. A., Ağan, K., & **Ağan, A. F.** (2020). *Effect of DVD-REG ® Food Supplement on Acute and Sub-Acute Toxicity on Rats DVD-REG ® Takviye Edici Gıda Ürününün Akut Sub -Akut Toksisitesinin Sıçanlar Üzerinde Araştırılması*. *2*(1), 10–24.
9. Yasar, M., Senogul, O., **Agan, A. F.,** Sipahi, N., Sirin, N., & Agan, K. (2020). *Effect of My Guard ® Food Supplement on Acute and Subacute Toxicity on Rats*. 26–34.
10. Zarringhalami, R., Hanachi, P., Kaya, E., **Ağan, A. F.,** Ağan, K., & Donmez, M. (2020). Investigation of total phenolic content of tilia dasystyla and polygonatum orientale desf extracts and their cytotoxic effect on the osteogenic sarcoma (Saos-2) cancer cell line. *International Journal of Cancer Management*, *13*(2).
11. **Yücel Ağan, A. F.,** & Hayretdağ, S. (2019). The effects of Macrovipera lebetina venom on mice. *Toxin Reviews*, *38*(2), 87–92.

SÖZLÜ VE POSTER SUNUMLAR

2019	**Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı aritmilerde yaşa bağlı farklılıklar -** *International Symposium on Cellular Therapy in Cardiovascular Medicine: Stem Cell Opportunity (Poster sunumu)*
2019	**Zerdeçal içerikli takviye gıdalarının Saos-2 osteosarkom hücre hattı üzerindeki iyileştirici etkisinin karşılaştırılması -** *2. International Traditional and Complementary Medicine Congress (Poster sunumu)*
2017	**Kardiyopleji solüsyonlarının hücre membran stabilitesi üzerindeki etkisi -** *IV. Perfusion Symposium (Sözlü sunum)*
2012	**Macrovipera lebetina (Linnaeus, 1758) (Reptilia: Viperidae) Zehrinin Farelerin Kalp ve Akciğer Dokuları Üzerindeki Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması -** *8. Turkish Toxicology Association Congress with international participation (Poster sunumu)*

ÖDÜLLER ve BURSLAR

Tübitak	**Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 2214 Doktora Sırası Araştırma Bursu** (2021-2022) Imperial College London- Kimya Mühendisliği Bölümü
Erasmus	**Erasmus Plus Personel Hareketliliği (2021)** University College of London- Nörobilim Enstitüsü (7 gün)
Erasmus	**Erasmus Plus Personel Hareketliliği (2018)** Sevilla Universitesi (7 gün)
Sözlü sunum birincilik ödülü	**Ulusal IV. Perfüzyon Sempozyumu (2017)** Antalya, Turkiye **Title:** *Kardiyopleji solüsyonlarının hücre membrane stabilisitesi üzerine etkisi*
Erasmus	**Erasmus öğrenci değişim programı (2011-2012)** *Debrecen Üniversitesi*

TAMAMLANAN PROJELER

2020-2021	Kanser Hastalıklarının Tedavisinde Belirtilen Aksitinib ve Sorafenib Tabletlerinin Pilot/Proses Validasyon Üretimi, Biyoeşdeğerlik Çalışmaları, Safsızlıklar Üzerinde Genotoksik Çalışmalar, TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu), TEYDEB Programı (Teknoloji ve İnovasyon) Destek Programları Müdürlüğü)
	Sorumluluklar: Bu projenin gerçekleşmesi için gerekli konsorsiyumun oluşturulması için ortakların bulunması ve toplantılarının organize edilmesidir. Genotoksisite testlerinin gerçekleştirilmesidir.
2018-2020	Cinsiyete Bağlı Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Propolisin Etkisi: Östrojenin Rolü, Düzce Üniversitesi (BAP projesi)
	Sorumluluklar: Projenin ilk aşaması menopoz dönemindeki dişi sıçanlara oral propolis uygulanmasıdır. Projenin ikinci aşaması miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinin oluşturulmasıdır. EKG ve kan basıncı parametrelerinin kontrolü, hayvanların diseksiyonu. Projenin üçüncü aşaması, doku ve kan örneklerinden ELISA testi ve miyokardiyal enfarktüs bölgelerinin boyanmasıdır.
2018-2020	Üniversitemizin Sağlıkta Uzmanlık Alanı Kapsamında Düzce Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Araştırması, Düzce Üniversitesi (BAP projesi)
	Sorumluluklar: Bu projede asıl görevim projeyi yazmak ve raporlamak.
2020-2022	2 Boyutlu Nanomalzeme Siyah Fosfor ve Arı Zehri Bileşeni Melittin Kompleksinin Glioblastoma Fotodinamik Tedavisinde Terapötik Etkisi, Düzce Üniversitesi (BAP projesi)
	Sorumluluklar: Projenin ilk aşaması glioblastoma hücrelerinin hücre kültüründe üretilmesi, hücrelere 2D nanomateryal uygulanması ve LED ışığına maruz bırakılmasıdır. Projenin ikinci aşaması, hücrelerin

	hücre canlılığı testlerinin, apoptoz-nekrozun değerlendirilmesi için akış sitometrisinin, floresan mikroskopi ile ROS üretim testinin gerçekleştirilmesidir.
2020-2022	Glioblastoma Tedavisinde İki Boyutlu Nanomalzemelerin Fotodinamik Kullanımı, Ankara Üniversitesi (BAP projesi) Sorumluluklar: Projenin ilk aşaması glioblastoma hücrelerinin hücre kültüründe üretilmesi, hücrelere 2D nanomateryal uygulanması ve LED ışığına maruz bırakılmasıdır. Projenin ikinci aşaması, hücrelerin hücre canlılığı testlerinin, apoptoz-nekrozun değerlendirilmesi için akış sitometrisinin, floresan mikroskopi ile ROS üretim testinin ve hücreye madde alım mekanizmasının anlaşılması için TEM'in yapılmasıdır.

DEVAM EDEN PROJELER

2020-	Glioblastoma Tedavisinde Arı Zehirinin Antitümör Etkisinin Moleküler Mekanizması, Düzce Üniversitesi (BAP Projesi) Sorumluluklar: İlk sorumluluğum projeyi ve sonuç raporunu yazmaktır. İkinci sorumluluğum ise proje ortaklarını bir araya getirmek, proje toplantılarını organize etmek.
2021-	Doksorubisinin neden olduğu testis hasarında erkek arı larvalarının olası koruyucu etkisinin belirlenmesi, Düzce Üniversitesi (BAP Projesi) Sorumluluklar: Projenin ilk aşaması olan deney gruplarına doksorubisin enjeksiyonu. İkinci aşama tedavi gruplarına sonda ile apilarnilin verilmesidir. Üçüncü aşama, deney gruplarının diseksiyonu, ELISA, histopatoloji ve genotoksisite ve moleküler testler için doku ve kan örneklerinin toplanmasıdır.

SERTİFİKALAR

2017	Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası, Ankara, Sertifika (Kurs Katılım)
2018	Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Ürünlerinde Kalite ve Standardizasyon Çalıştayı, Düzce Üniversitesi (Düzenleme kurulu üyesi)
	2. Deney Hayvanlarının Kullanımı Kursu, Düzce Üniversitesi (Düzenleme kurulu üyesi)
2018	22. Perfüzyon Eğitimi ve Öğretimi Konferansı (EcOPEaT, Milano/İtalya) (Konferans katılımı)
2019	İyi Klinik Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları, Düzce Üniversitesi (Düzenleme kurulu üyesi)
2019	Arı Zehiri Çalıştay ve Üretim Kursu, Düzce Üniversitesi (Düzenleme kurulu üyesi)
2019	Geleneksel Tıpta Tıbbi Mantarlar, Düzce Üniversitesi (Düzenleme Kurulu Üyesi)
2020	Hücre kültürü uygulamaları kursu, Düzce Üniversitesi, Düzce Üniversitesi (Düzenleme kurulu üyesi)
2021	1. Uluslararası Apiterapi Kongresine Katılım, Medipol Üniversitesi, İstanbul (Konferans Katılımı)
2022	UCL Nörobilim Sempozyumu, University College London, Londra (Sempozyum katılımı)

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Atıf/Citation: Ağan AF, Kekeçoğlu M, 2020. Melittin ve Kanser Tedavisi: Nanoteknolojik Bakış Açısı, (Melittin and Cancer Treatment: Nanotechnological Perspective), U.Arı.D.-U.Bee.J. 20(2): 221-231, DOI: 10.31467/uluaricilik.784365

DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE

MELİTTİN VE KANSER TEDAVİSİ: NANOTEKNOLOJİK BAKIŞ AÇISI

Melittin and Cancer Treatment: Nanotechnological Perspective

Aydan Fülden AĞAN[1], Meral KEKEÇOĞLU[2]

[1]Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi (DAGEM), Düzce, TÜRKİYE,

[1]Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, TÜRKİYE, Aydan Fülden AĞAN, ORCID No: 0000-0002-4319-6264
Yazışma Yazarı / Corresponding Author: E [redacted]

[2]Düzce Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konuralp, Düzce, TÜRKİYE,

[2]Düzce Üniversitesi, Arıcılık Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi (DAGEM), Düzce, TÜRKİYE, ORCID No: 0000-0002-2564-8343, E [redacted]

Geliş Tarihi / Received: 23.08.2020 Kabul Tarihi / Accepted: 13.09.2020 DOI:10.31467/uluaricilik.784365

ÖZ

Kanser, insan sağlığını tehdit eden en önemli sağlık sorunlarından birisi olmaya devam etmektedir. Günümüzde kanser hastalığını tedavilerinde cerrahi yöntemler, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi, kanser aşıları gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak başta kemoterapi olmak üzere bu tedavi yöntemlerinin bazı yan etkilere neden olması, doğal ürünlere olan ilgiyi arttırmıştır. Arı zehrinin peptit bileşenlerinden biri olan melittin, kanser tedavisinde kullanılan en önemli etken maddelerinin başında gelir. Melittinin anti-kanser etkinliği daha önce yapılan araştırmalarla çeşitli kanser türlerinin tedavisinde pre-klinik olarak test edilmiştir. Ancak bu pre-klinik sonuçların kliniğe uygulanabilmesi için, başta melittinin neden olduğu hemolitik aktivite, spesifik olmayan toksisite ve bozunma gibi sorunların üstesinden gelinmelidir. Bu amaçla melittinin çeşitli nanopartiküller ile bir araya getirilerek, melittinin kanserli hücreyi hedefleyebileceği platformlar sunulmuştur. Bu derlemede, henüz çok güncel ve halen geliştirilmekte olan arı zehri bileşenlerinin çeşitli kanser türlerinin tedavisine yönelik in-vitro ve in-vivo uygulamalarına dair mevcut literatür, nanoteknolojik uygulamalar açısından bir araya getirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Kanser, Arı Zehri, Melittin, Nanoteknoloji.

ABSTRACT

Cancer continues to be one of the most important health problems threatening human health. Recently, methods such as surgical methods, chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy, cancer vaccines are used in the treatment of cancer. However, the fact that these treatment methods, especially chemotherapy, cause some side effects, the interest in natural products has incrased. Melittin, one of the peptide components of bee venom, is one of the most important active ingredients used in cancer treatment. The anti-cancer efficacy of Melittin has been pre-clinically tested in treatment of various types of cancer with previous research. However, in order for these pre-clinical results to be applied to the clinic, problems such as hemolytic activity caused by melittin primarily, nonspecific toxicity and degradation should be overcome. In this review, the current literature on the in-vitro and in-vivo applications of bee venom components for the treatment of various cancer types, which are very current and still under development, are brought together in terms of nanotechnological applications.

Key words: Cancer, Bee Venom, Melittin, Nanotechnology.

EXTENDED ABSTRACT

Goal: Anti-cancer activity of bee venom has been revealed in many different studies from past to present. Bee venom contains more than 15 different peptides, among them, the anti-cancer potential of melittin has been revealed. Due to the lytic structure of melittin, it affects the healthy cell structure with its release to the body. In this review, where the cancer cell-focused release of melittin is targeted, it is focused on targeting cancer cells by combining melittin with different nanotechnological platforms.

Discussion: Although the subject of nanotechnology is still developing and new materials are discovered in the world, it is quite an innovative approach to combine such materials with natural components known to have anti-cancer activity. In addition, it can be quite difficult to synthesize nanoparticles and synthesize them together with melittin, a natural peptide. The research that melittin-nanoparticle complexes synthesized by overcoming such difficulties target cancer tissue has been the subject of this review. Nanoparticles, which are very current in biomedical use in recent years, have been brought together with melittin and anti-cancer activities have been tried to be revealed.

Conclusion: Besides the use of natural products, the use of active ingredients obtained from natural products is quite common in chemotherapeutic drug development researches. Combining these components with the nanoparticle is a highly innovative approach, but the synthesis of these nanoparticle complexes requires knowledge and experience. Therefore, multidisciplinary work in academia and industry is expected to yield much more productive results in cancer research.

GİRİŞ

Kanser, dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde farklılaşıp çoğalması sonucu, farklı dokulara yayılabilen (metastaz) ölümcül bir hastalıktır. Kanser vakalarına sebep olabilecek pek çok farklı etken olabilmekle beraber, bunların başında genetik faktörler gelmektedir. Bu faktörleri sağlıksız beslenme ve çevresel kirleticiler izlemektedir (Frankish, 2003). Bu etkenler tek başına kanser sebebi olabildiği gibi çoğunlukla farklı etkenlerin bir araya gelmesiyle ortaya çıkarlar (Siegel, Miller, ve Jemal, 2016). Her yıl 10 milyondan fazla yeni hastaya kanser teşhisi konulmaktadır. Dünya çapında ölümlerin yaklaşık %12'lik bir kısmını ise kanser vakaları oluşturmaktadır (Frankish, 2003). 2030 yılına kadar yaklaşık 21,7 milyon kişinin kanser dolayısıyla ölebileceği tahmin edilmektedir (Torre vd., 2015). Dolayısıyla her geçen gün daha az yan etkiye sahip olan ve daha etkili tedavi protokolleri araştırılmaktadır. Kanser hastalarında radyasyon tedavisi, cerrahi, kemoterapi, immunoterapi ve hormon tedavileri kullanılmaktadır. Bu tedaviler içerisinde kemoterapi halen en etkin kullanılan tedavi yöntemidir. Kemoterapi uygulamalarında kullanılan kemoterapötikler hastanın immün sistemini baskılaması nedeniyle çok ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir (Ferlay vd., 2015; Lai, Visser-Grieve, ve Yang, 2012; Siegel vd., 2016). Bu durum kanser tedavisinde alternatif tedavilere yönelimi arttırmıştır (Aliyazicioglu, 2019; Kim, Park, ve Lee, 2019; C. C. Liu vd., 2014; Phan, 2014). Bu anlamda; doğal ürünlerden elde edilen bir takım etkin bileşikler kanser tedavisinde umut vadedici olmuştur.

Çeşitli canlı organizmaların genellikle kendini savunmak amacıyla kullanmış olduğu toksinler; diğer organizmaları öldürebilen veya yaralayabilen protein ve peptitleri içerir. Bu bileşenlerin kanser üzerindeki etkisi anti-kanser aktivite olabiliyorken bazı bileşenleri anjiyogenezi ve tümör gelişimini inhibe edebilmektedir (Oršolić, 2012). Bu bağlamda özellikle arı zehri anti-kanser etkinliği açısından ciddi bir potansiyele sahiptir (Aliyazicioglu, 2019; Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2013; Le, Suh, ve Oh, 2019; Moga, Dimienescu, Arvătescu, Ifteni, ve Pleş, 2018; Oršolić, 2012). Bu anti-kanser etki çeşitli patolojik fizyolojik durumlarda ortaya çıkan apoptoza bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Wong, 2011). Bu süreç çeşitli hücresel sinyal mekanizmalarının etkisi altında ortaya çıkmaktadır. Arı zehrinin NCI-H1299 akciğer kanseri üzerinde etkisinin araştırıldığı çalışmada kanserli hücrelerin apoptoza uğradığı, COX-2 mRNA ekspresyonun ve PGE2 sentezinin arı zehri tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir (Jang vd., 2003). Diğer bir akciğer kanseri hücreleri üzerine gerçekleştirilen araştırmada, ölüm reseptörü 3 (DR3) ekspresyonu artması NF-κB yolağının inhibisyonu ile apoptotik hücre ölümünü indüklenmiştir (Kollipara vd., 2014). Arı zehrinin prostat kanseri üzerinde etkileri in-vitro ve in-vivo koşullarda araştırılması sonucu NF-κB yolağının inaktivasyonu yoluyla kanserli hücre ölümünün gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Choi vd., 2014). Arı zehri ve melittinin SKOV3 ve PA-1 yumurtalık kanseri hücrelerinde ölüm reseptörlerinin

indüksiyonu ve JAK2/STAT3 yolağının inhibisyonu yoluyla apoptotik hücre ölümünü indüklediğini tespit edilmiştir (Jo vd., 2012a).

Arı Zehri

Arı zehri, arıların kendilerini korumak için kullandıkları kimyasal bir savunma maddesidir. Arı zehri, arının karın boşluğunda bulunan zehir bezinden salgılanır. Oldukça etkili ve karmaşık bir karışım olan bu toksin içeriğinde melittin (zehir içeriğinin en büyük bileşeni), apamin, adolapin, mast hücresi degranüle edici (MCD) peptit, enzimler (fosfolipaz A_2 ve hiyalüronidaz) ve ayrıca çeşitli farmasötik özelliklere sahip olan histamin, dopamin ve norepinefrin gibi peptit olmayan bileşenleri içermektedir (Habermann, 1972; Raghuraman ve Chattopadhyay, 2007).

Melittin arı zehri içerisinde en fazla bulunan 26 aminoasitten oluşan bir peptittir. Melittinin aminoasit dizisi Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln olarak tanımlanmıştır (Gevod, 1984). Fosfolipaz A_2, kuru zehrin %10-12'lik bir kısmını oluşturan yüksek alerjen özelliğe sahip olması dolayısıyla canlı hücre membranını harap etmektedir (Lad ve Thomas Shier, 1979). Apamin ise en küçük nörotoksik bileşeni olmakla beraber en iyi bilinen özelliği Ca^{+2} ile aktive olan K^+ kanallarını inhibe etmektedir (Banks vd., 1979). Adolapin anti-inflamatuar, ağrı kesici ve COX inhibitör olmasıyla bilinmektedir. Aynı zamanda fosfolipaz A_2 inhibitörüdür (K. Koburova, S. Michailova, 1985). MCD peptit ise çok düşük oranda histamin salgılamaktadır. Öte yandan mast hücrelerini inhibe etmektedir (Billingham, Morley, Hanson, Shipolini, ve Vernon, 1973; Habermann, 1972; Hanson, Morley, ve Soria-Herrera, 1974).

Arı zehri; geleneksel tıpta romatoid artrit, multiple skleroz gibi kronik rahatsızlıklarının yanı sıra tümör ve cilt hastalıkları da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (J. Chen ve Lariviere, 2010; S. Y. Chen, Zhou, ve Qin, 2018; Senel, Kuyucu, ve Süslü, 2014). Arı zehrinin kanserin önlenmesinde etkili olan hücresel ölüm mekanizmalarını (apoptozu ve nekroz) tetiklediği tespit edilmiştir (Park vd., 2011). Arı zehrinin in-vitro ve in-vivo ortamda gerçekleştirilmiş olan araştırmalarda kanser hücrelerinin çoğalmasını ve tümör büyümesini inhibe ettiği ortaya konmuştur (Huh vd., 2010; Ip vd., 2008; Li vd., 2006; Ling vd., 2005; Moon vd., 2006; Moreno ve Giralt, 2015; Oršolić, Šver, Verstovšek, Terzić, ve Bašić, 2003; Russell vd., 2004; Soman vd., 2009; Tu, Wu, Hsieh, Chen, ve Hsu, 2008). Arı zehrinin kendisi nosiseptif ve nörotoksik olarak etki ederken, güncel çalışmalarla beraber arı zehrinin anti-mutajenik, anti-inflamatuar ve anti-nosiseptif ve anti-kanser etkileri ortaya konmuştur (Huh vd., 2010; Ip vd., 2008; Li vd., 2006; Ling vd., 2005; Moon vd., 2006; Moreno ve Giralt, 2015; Oršolić vd., 2003; Russell vd., 2004; Soman vd., 2009; Tu vd., 2008; Varanda, Monti, ve Tavares, 1999).

Arı Zehrinin Anti Kanser Etkisi

Son dönemde kanser araştırmalarında alternatif ve doğal ürünlerin rolü oldukça artmıştır. Arı zehri tümör hücresi büyümesini inhibe etmekle beraber, apoptozu indükleyerek hücre ölümüne sebep olabilmektedirler. Bu doğal bileşiklerin insan tümörlerinde alternatif bir ilaç olarak kullanımı üzerine araştırmalar günden güne artmaktadır (Gajski, Domijan, ve Garaj-Vrhovac, 2010; Gajski ve Garaj-vrhovac, 2015; Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2008, 2010, 2011; X. Liu, Chen, Xie, ve Zhang, 2002; Oršolić, 2012; Orsolic vd., 2003; Oršolić vd., 2003; Orsolic v.d. 2003a, Orsolic v.d. 2003b , Son vd., 2007). Arı zehrinin apoptozu indüklemesiyle kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği öne sürülmüş ve bu alanda etkinliğinin ortaya konulmasını amaçlayan araştırmalar; meme (Jeong vd., 2014), hepatosellüler karsinom (X. Wang vd., 2015), yumurtalık (Jo vd., 2012b), prostat (Park vd., 2011), melanom (Tu vd., 2008), akciğer (Choi vd., 2014), lösemi (Moon vd., 2006) ve servikal (Oršolić, 2009) kanser türlerinde ortaya konmuştur.

Arı zehrinin anti-kanser özelliği bilinmesine rağmen nano-platformlar ile buluşturularak doku ya da organ spesifik kullanımına yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Biniecka vd., 2017; Daniluk vd., 2019; H. Liu vd., 2019; Qi vd., 2019; Rady vd., 2017).

Anti Kanser Tedavi ve Nanomalzeme

Birçok canlının kendini korumak amacıyla üretmiş olduğu, farmakolojik olarak aktif peptit ve proteinler biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinin gelişmesiyle, terapötik ilaç tedavisi için iyi bir aday olmuştur. Bu ilaçların oral yolla uygulanmasında ilacın bir kısmı sindirim sisteminde parçalanarak elimine olduğundan beklenen etki sağlanamamaktadır. Bu etkiyi azaltabilmek ya da ortadan kaldırabilmek amacıyla lipozom, mikroemülsiyonlar, mikropartikül taşıyıcılar ve nanopartiküller kullanılmaktadır. Diğer yandan nanopartiküllerin polimer yapısı ilacı dış etkenlerden

koruyarak salınımını kolaylaştırmaktadır (Yang, Cui, Shi, Cun, ve Wang, 2009). Nanopartiküller aracılığıyla; ilaç salınımında ilacın bozunması, çeşitli toksik olabilecek etkileri ya da düşük terapötik etkinlik gibi bir takım sorunlar aşılabilecektir (McClements, 2018; Muhamad, Plengsuriyakarn, ve Na-Bangchang, 2018; Riley ve Vermerris, 2017; L. Wang, Zheng, ve Xie, 2018).

Nanopartiküllerin kanser tedavisinde kullanımı pek çok farklı yaklaşımla araştırılmaktadır (Peer vd., 2007; Yezhelyev vd., 2006). İdeal bir nanotaşıyıcı, melittin gibi sitolitik özellik gösteren peptitlerin sitotoksisitesini güvenli bir şekilde iletmek için koruma yeteneğine sahip olmakla kalmayacak, aynı zamanda nanopartikülün kullanım oranını ve anti-kanser verimliliğini artırmak için fizikokimyasal özellikleri optimize edecektir (Huang vd., 2013).

Bal arısı zehrinden elde edilen melittin, membran yapısını fiziksel ve kimyasal olarak bozar ve hücre membranının geçirgenliğini arttırır (Soman vd., 2009). Melittin hücre zarının fosfolid yapısını eriterek, hızlıca hücre içerisine taşınır, organel zarlarını deforme eder ve biyokimyasal değişikliklere sebep olabilir (Soman vd., 2009). Melittinin lipofilikliğini arttırmak için sodyum dodesil sülfat (SDS) ile birleştirilmiş ve melittin/SDS kompleksinin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri meme kanseri hücresi MCF-7 üzerinde MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium bromür) yöntemi ile test edilmiştir. Bu çalışmada melittin ve Mel/SDS arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Yang vd., 2009).

Diğer bir yandan farklı bir nanopartikülden faydalanılan araştırmada; sitolitik peptitler ve standart kemoterapötik ilaçlarla kombine terapisinin sinerjik etkili olabileceği nanoemülsiyon-peptit kompleksi araştırılmıştır. Bu kompleks spesifik olmayan amfipatik peptit melittini bir perflorokarbon nanoparçacığın dış lipid tek tabakasına dahil edilerek sitolitik peptitler için bir nano ölçekli salınım aracı geliştirilmesi amaçlanmıştır. Perflorokarbon nanopartikülleri gibi sentetik nano ölçekli araçların, hem yerleşik katı tümörleri hem de prekanseröz lezyonları öldürmek için esnek, pasif ve aktif moleküler hedefleme ile güçlü bir sitolitik peptit (melittin) modeli sağlayabildiği gösterilmiştir (Soman vd., 2009).

Kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlardan birisi olan tam (complete) ya da parçalanmış (fragmentated) antikorların lipozomlara konjuge edilmesi aracılığıyla ilaçların neden olduğu yan etkiler azaltılabilmektedir. Bu amaçla; kötü prognozlu meme ve yumurtalık kanserlerinde kullanılan ilaçlardan birisi olan transtuzumab, insan epidermal büyüme faktörünü (HER2) hedeflemektedir. Transtuzumab taşıyan ve melittin içeren pegile immünolipozomlar insan epidermal büyüme faktörünü (HER2) hedefleyerek, HER2 ekspresyon seviyelerinde korelasyon halinde azalma tespit edilmiştir (Barrajón-Catalán vd., 2010).

Melittin bazı kanser tedavilerinde özellikle in-vivo uygulamalarda hücre zarını parçalayıcı (sitolitik) etkisinden ötürü kan hücrelerinde hemolize sebep olabilmektedir. Hemolitik etkiyi azaltabilmek amacıyla hedef proteine odaklanan antikorlar ile konjuge edilen melittin formülasyonu çözüm olmuştur. Bu konjugasyonların lipozom ile oluşturulması fosfolipid iki tabakalı membranlar melittin tarafından bozulabileceği için uygun olmamıştır. Araştırma verilerine göre R-melittin pozitif yükünün ve sitotoksisitesinin çok küçük lipit nanopartiküller içinde başarılı bir şekilde korunduğunu ortaya koymuştur. R-melittin damar içi enjeksiyon yoluyla uygulanmasıyla tümör büyümesini inhibe ettiği ortaya konmuştur (Huang vd., 2013).

Kanser dokusunun hedeflendiği araştırmalarda dolaşıma verilen etken maddenin etkin bir şekilde ulaştırılabilmesi için araştırmalar devam etmektedir. Bu araştırmalardan nano ölçekli düzeyde, sert çekirdekli misel (RCM) sistemleri amfifilik PS67-b-PAA27 (polistiren-b-poliakrilik asit) (PRCM) veya fosfolipidler (lesitin PC) (LRCM) ile kapsülleme yapılmıştır. In-vitro deneylerde meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF7 kullanılmıştır. Melittinin lipid kapsüllenmiş (Lipobee) ve polimerik kapsüllenmiş (Polybee) formülasyonları hücre sitotoksisite deneyleri MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolium bromür) testi ile gerçekleştirilmiş ve sonuçta Lipobee, kapsüle edilmemiş melittine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek anti-kanser etkinlik göstermiştir (Misra, Ye, Kim, ve Pan, 2015).

Jallouk'un 2015 yılında gerçekleştirdiği araştırmasında tümör dokusunda aşırı eksprese edilen önemli bir proteaz matris metalloproteinaz-9 (MMP-9) tarafından aktive edilebilen bir melittin türevi sentezlemiştir, bu melittinin perflorokarbon nanopartiküller üzerinde yüklenmesi sağlanmıştır. Bu sayede daha önceki araştırmalarda karşılaşılan sistemik uygulama zorlukları ve zayıf farmakokinetik özelliklerinin sebep olduğu olumsuzluklar ortadan kaldırılabilecektir. In-vivo denemelerinde melanom

fare modelinde damar içi uygulanmış ve tümör büyüme oranını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Nanopartiküllere bağlı ilaç dört kat daha hızlı bir şekilde MMP-9 aktivasyonunu sağlamıştır (Jallouk 2015).

Mellitinin hemolitik etkisini dolaşımda da göstermiş olduğu için bu sorunun üstesinden gelebilmek ve aynı zamanda da etkisini kaybetmeden kanserli dokuya ulaşabilmesini sağlamak amacıyla araştırmalar devam etmektedir. Bei ve ark. 2015, bu ikilemi ortadan kaldırmaya yönelik önemli bir gelişme kaydetmişlerdir. Zitteriyonik glikol kitosanı disülfür bağı ile bir araya getirerek mellittin taşınımı sağlamaya çalışmıştır. Zitteriyonik özelliği dolayısıyla süksinik anhidrid modifiye glikol kitosan (SA-GCS) fizyolojik pH'da negatif yüklenirken, melittin pozitif yüklenir ve birlikte kompleks bir yapı oluşturabilirler. Bu yapı hava oksidasyonu ile daha da stabil bir hal alır. Bu formülasyonlar HCT-116 kolon kanseri hücresi, MCF-7 meme kanseri hücreleri, SKOV-3 yumurtalık kanseri hücrelerinde uygulanmış ve özellikle kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116) 5 uM'lik konsantrasyonu %100 etkili bulunmuştur. Bu araştırma sonucu melittinin dolaşımda neden olduğu hemolitik etki büyük oranda ortadan kaldırılmıştır (Bei, Bindu, Remant, ve Peisheng, 2015).

İran bal arısı zehrinden melittin saflaştırılmış ve akım sitometri analizi sonuçlarına göre, melittinin 1 ug/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda servikal kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Zarrinnahad vd., 2018).

İlaç salınımındaki zorlukları aşmak amacıyla pek çok farklı nanopartikül kullanılmakla birlikte son zamanlarda iki boyutlu nanopartiküllerin ilaç salınımında kullanımı gündeme gelmiştir. Karbon nanopartiküllerinin biyouyumluluğu ve küçük boyutları sayesinde biyomedikal alanda kullanımı artmaktadır. Grafen oksitli nano taşıyıcılar, kanser ilacı, doksorubisini doğrudan hücrenin çekirdeğine iletmek için kullanılmıştır (Zhou, Zhou, ve Xing, 2014). Nanodiamond aracılı doksorubisinin meme kanserinin akciğer metastazını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Xiao vd., 2013). Diğer taraftan karbon nanopartiküllerinin, in-vitro hücre kültüründe glioma hücreleri üzerinde litik ajan olan melittin ile nanopartiküller aracılı salınımı araştırılmıştır. Melittinin U87 insan glial tümör hücresi hedefleyebilmesi amacıyla saf grafen (GN), nanografen oksit (nGO), grafit (G), nanodiamond (UDD) ve hiyerarşik nanoporöz karbonlar (HNC'ler) kullanılmıştır. Bu araştırma sonucunda UDD, GN ve nGO nanopartikülleri melittine kıyasla çok daha öldürücü olmakla beraber karbon nanopartiküllerin kanser tedavisinde kullanımı için umut verici olduğu tespit edilmiştir (Biniecka vd., 2017).

Meme kanseri hücre hattı (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerinde gerçekleştirilen araştırmada nano partiküllerin kanser hücreleri üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. Bu amaçla grafen oksit, saf grafen ve elmas kullanılmıştır. Araştırmada geçirimli elektron mikroskopisi, zeta potansiyeli ölçümleri ve hücre canlılığı ve membran bütünlüğü değerlendirilmiştir. Sonuçta nano grafen oksit ile melittin kompleksinin melittine göre daha güçlü toksik etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Grafen oksit, saf grafen ve elmas ve melittin kompleksleri melittine kıyasla nekroz seviyesini azaltmış fakat tamamen ortadan kaldırmamıştır (Daniluk vd., 2019).

Diğer bir güncel araştırmada ise grafen oksit (GO) bazlı manyetik nanokompozitlerin (PEG-GO-Fe3O4) ve PEG-GO-Fe3O4/MEL kompleksleri insan rahim ağzı kanseri HeLa hücrelerinde incelenmiştir. Sonuçta PEG-GO-Fe3O4/MEL'in HeLa hücreleri üzerindeki toksik etkisini belirgin bir şekilde artırmakla kalmayıp aynı zamanda hücre zarında hücre lizisi yaparak por oluşumuna neden olmuştur (Qi vd., 2019).

Nanopartikül aracılığı ile kanser tedavisinde farklı bir yaklaşım olan fototermal terapi (FTT), nanomateryallerin fotosensisitizatör olarak kullanılarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi aracılığıyla immunojenik hücre ölümüdür. Glioblastoma tedavisine yönelik düşük toksisite ve yüksek biyouyumluluğu olan, fototermal kanser tedavisin hedeflendiği araştırmada, Melittin-RADA$_{32}$-Indocyanine green (ICG) hidrojel (MRI hidrojel) sentezlenmiştir. Bu çalışmada, glioblastomaların FTT'si için peptit hidrojel omurgasında mellitin ve hidrojel matrisinde ICG içeren yeni bir Melittin-RADA32-Indosiyanin yeşili (ICG) hidrojel ("MRI hidrojel") sentezlenmiştir. C6 glioma hücresinde in-vitro ve in-vivo analizleri gerçekleştirilen araştırmada sitotoksik özellikleri karşılaştırıldığında yakın özellik göstermiştir. In-vivo analizlerinde MRI hidrojeli uygulanan hayvanlarda biyodağılımı, tümör büyüklüğü, PAT görüntüleri analiz edilmiştir. Sonuçta MRI hidrojeli grupları kontrol gruplarına kıyasla tümör boyutunu ve tümör rekürrens oranını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Jin vd., 2017). Aljinat, biyouyumluluk, düşük immunojenite

ve suda çözünürlük gibi önemli biyolojik özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde alternatif bir taşıyıcı olarak önem kazanmıştır. Bu çalışma aljinattan bir oligopeptid-yan zincirinin türetilmesinin melittin için spesifik bir bağlanma yeri sunduğunu ve kanser kemoterapisinde daha etkin rol alabildiğini göstermiştir (Wattanakul vd., 2019a). Bu alanda geliştirilen oligopeptit-aljinat nano partiküllerine, melittinin yüklenmesi ile doksorubisin yükleme etkinliği iki kattan fazla attırabilmiştir. Bunu test etmek amacıyla Caco-2 hücresinde 2.5 uM serbest melittin uygulanmış ve neredeyse hiçbir etkinlik göstermemiştir. Bu oligopeptit-aljinat nanopartiküllerine melittinin yüklenmesi ile hücrelerin %80'inden fazlası ölmüştür. (Wattanakul vd., 2019)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser biyolojisi araştırmalarındaki ilerlemelere rağmen kanser halen yaygın ve ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir. Güncel tedavilerde karşılaşılan sorunların başında ise tedavi yöntemlerinin kanser hücresinin yanında normal sağlıklı hücreyi de olumsuz etkilemesidir. Bu nedenle de kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Nanopartiküllerin biyomedikal anlamda kullanımı son günlerde kanser tedavisinde umut vadeden bir yaklaşımdır. Teknolojik yöntemlerin yanı sıra doğal ürünlerin kullanımı da kanser hastalarının tercih ettiği yaklaşımlardır.

Melittin bal arısı zehrinden elde edilen doğal bir üründür. Ayrıca yapılan çalışmalara göre potansiyel bir anti-kanser ajandır. Ancak mellitinin in-vivo ve in-vitro olarak doğrudan uygulaması bazı olumsuz sonuçları doğurmuştur. Bunu ortadan kaldırmak için melittin lipozoma konjuge edilmiş ya da lipozom içerisine gömülmüştür. Bu araştırmalar sonucu melittinin anti-kanser etkinliği artırılırken melittinin lipofilikliğinin artırılmasının hedeflendiği araştırmada herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. Öte yandan melittin, grafen ve türevleri gibi iki boyutlu nanopartiküllere tutturularak oluşturulan komplekslerinde anti-kanser etkinliği oldukça fazla artmıştır. Kanser tedavisinde kullanılacak melittin iki boyutlu nanopartiküller ile birlikte uygulandığında terapötik etkinliği arttırılabilecek hatta kemoterapötik ajan olarak kullanımı önerilebilecektir. Pek çok kemoterapötik ajan gibi melittin hücre ölümünde etkili olup kanser metastazının durdurulması ve invazyonunun önlemesinde etkili olmuştur. Nanopartiküllerin belli dalga boylarında fotosensitizatör özelliğinden faydalanılarak kanserli hücreleri hedeflemesi ve reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir. Bu araştırmalara en güncel yaklaşım ise nanopartikülün etkinliğini arttırmak üzere mellitin ile iki boyutlu fototermal özellik gösteren iki boyutlu nanopartikülün bir araya getirilerek hem spesifik ışıma alanının oluşturulduğu hem de hemolizin önlenebildiği konjugasyanlar oluşturulmuştur. Bu konudaki araştırmalar yenilikçi iki boyutlu nanopartiküllerin kullanımı ile terapötik etkinliği arttırılabilecek hatta kemoterapötik ajan olarak kullanımı önerilebilecektir. Sonuç olarak, bu derlemede melittin ve nanopartikül kombinasyonları kullanımının, sağlıklı hücreye zarar vermeden kanser hücresini hedefleyebileceği böylece melittinin terapötik etkinliği artırabileceği ortaya konmuştur. Arı zehrinin bütüncül olarak veya içerisindeki bileşenlerin (melittin, apamin vb.) ayrı ayrı nanoteknolojik yöntemler ile daha fazla çalışma yapılarak araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Aliyazicioglu, R. 2019. Therapeutic Effects of Bee Venom. *Chemical Science International Journal*, *26*(1), 1–5. https://doi.org/10.9734/csji/2019/v26i130078.

Banks, B. E. C., Brown, C., Burgess, G. M., Burnstock, G., Claret, M., Cocks, T. M., ve Jenkinson, D. H. 1979. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*, *282*(5737), 415–417. https://doi.org/10.1038/282415a0.

Barrajón-Catalán, E., Menéndez-Gutiérrez, M. P., Falco, A., Carrato, A., Saceda, M., ve Micol, V. 2010. Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: Correlation with their HER2 expression level. *Cancer Letters*, *290*(2), 192–203. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.09.010.

Bei, C., Bindu, T., Remant, K. C., ve Peisheng, X. 2015. Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. *J. Mater. Chem. C*, *3*(1), 25–29. https://doi.org/10.1039/b000000x.

Billingham, M. E. J., Morley, J., Hanson, J. M., Shipolini, R. A., ve Vernon, C. A. 1973. An Anti-Inflammatory peptide from bee venom. *Nature*, *245*(5421), 163–164.

https://doi.org/10.1038/245163a0.

Biniecka, P., Bugajska, Ż., Daniluk, K., ve Jaworski, S. 2017. Carbon nanoparticles as transporters of melittin to glioma grade IV U87 cells in in vitro model. *Annals of Warsaw University of Life Sciences - SGGW - Animal Science*, *56*(1), 23–32. https://doi.org/10.22630/aas.2017.56.1.3.

Chen, J., ve Lariviere, W. R. 2010. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology*, C. 92, ss. 151–183. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.06.006.

Chen, S. Y., Zhou, P., ve Qin, Y. 2018. Treatment of Rheumatoid Arthritis by Bee-venom Acupuncture. *Zhen ci yan jiu = Acupuncture research*, *43*(4), 251–254. https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.170506.

Choi, K. E., Hwang, C. J., Gu, S. M., Park, M. H., Kim, J. H., Park, J. H., Hong, J. T. 2014. Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells. *Toxins*, *6*(8), 2210–2228. https://doi.org/10.3390/toxins6082210.

Daniluk, K., Kutwin, M., Grodzik, M., Wierzbicki, M., Strojny, B., Szczepaniak, J., ve Sosnowska, M. 2019. *Use of Selected Carbon Nanoparticles as Melittin*. 1–20.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., … Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359–E386. https://doi.org/10.1002/ijc.29210.

Frankish, H. 2003. 15 million new cancer cases per year by 2020, says WHO. *The Lancet*, *361*, 1278. https://doi.org/10.1038/nm862.

Gajski, G., ve Garaj-Vrhovac, V. 2008. Genotoxic potential of bee venom (Apis Mellifera) on human peripheral blood lymphocytes in vitro using single cell gel electrophoresis assay. *Journal of Environmental Science and Health-Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, *43*(11), 1279–1287.

Gajski, G., ve Garaj-Vrhovac, V. 2010. Increased frequency of sister chromatid exchanges and decrease in cell viability and proliferation kinetics in human peripheral blood lymphocytes after in vitro exposure to whole bee venom. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, *45*(12), 1654–1659. https://doi.org/10.1080/10934529.2010.506144.

Gajski, G., ve Garaj-Vrhovac, V. 2011. Bee venom induced cytogenetic damage and decreased cell viability in human white blood cells after treatment in vitro: A multi-biomarker approach. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *32*(2), 201–211. https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.05.004.

Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V. 2013. Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *36*(2), 697–705. https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.009.

Gajski, G., ve Garaj-vrhovac, V. 2015. *Goran Gajski and Vera Garaj-Vrhovac*. 88–98. https://doi.org/10.1080/10934520802177862.c

Gevod, V. S. 1984. Melittin and the 8-26 fragment Differences in Ionophoric Properties as Measured by Monolayer Method. *45*(June), 1079–1083.

Habermann, E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science*,*177*(4046), 314–322. https://doi.org/10.1126/science.177.4046.314.

Hanson, J. M., Morley, J., ve Soria-Herrera, C. 1974. Anti-inflamatuary propery of 401 (MCD peptide), A peptide from the venom of the bee, Apis mellifera (L.). *British Journal of Pharmacology*, *50*(3), 383–392. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1974.tb09613.x.

Huang, C., Jin, H., Qian, Y., Qi, S., Luo, H., Luo, Q., ve Zhang, Z. 2013. Hybrid melittin cytolytic peptide-driven ultrasmall lipid nanoparticles block melanoma growth in vivo. *ACS Nano*, *7*(7), 5791–5800. https://doi.org/10.1021/nn400683s.

Huh, J. E., Baek, Y. H., Lee, M. H., Choi, D. Y., Park, D. S., ve Lee, J. D. 2010. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by

inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice. *Cancer Letters*, *292*(1), 98–110. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.11.013.

Ip, S. W., Liao, S. S., Lin, S. Y., Lin, J. P., Yang, J. S., Lin, M. L., Chung, J. G. 2008. The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo*, *22*(2), 237–246.

Jallouk, A. P., Palekar, R. U., Marsh, J. N. M., Pan, H., Pham, C. T. N., Schlesinger, P. H., ve Wickline, S. A. 2017. Delivery of a Protease-Activated Cytolytic Peptide Prodrug by Perfluorocarbon Nanoparticles. Physiology & behavior, 176(3), 139–148. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Jang, M. H., Shin, M. C., Lim, S., Han, S. M., Park, H. J., Shin, I., Kim, C. J. 2003. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *Journal Pharmacological Sciences*, *91*(2), 95–104. https://doi.org/10.1254/jphs.91.95.

Jeong, Y. J., Choi, Y., Shin, J. M., Cho, H. J., Kang, J. H., Park, K. K., Chang, Y. C. 2014. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *68*, 218–225. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.022.

Jin, H., Zhao, G., Hu, J., Ren, Q., Yang, K., Wan, C., Zou, Z. 2017. Melittin-Containing Hybrid Peptide Hydrogels for Enhanced Photothermal Therapy of Glioblastoma. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *9*(31), 25755–25766. https://doi.org/10.1021/acsami.7b06431.

Jo, M., Park, M. H., Kollipara, P. S., An, B. J., Song, H. S., Han, S. B., Hong, J. T. 2012a. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *258*(1), 72–81. https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.009.

Jo, M., Park, M. H., Kollipara, P. S., An, B. J., Song, H. S., Han, S. B., Hong, J. T. 2012b. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *258*(1), 72–81. https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.009.

Kim, H., Park, S. Y., ve Lee, G. 2019. Potential therapeutic applications of bee venom on skin disease and its mechanisms: A literature review. *Toxins*, *11*(7), 4–6. https://doi.org/10.3390/toxins11070374.

Koburova, K. L., Michailova, S. G., Shkenderov, S. V. 1985. Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin bee venom polypeptide. *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica*, *11*(2), 50–55.

Kollipara, P. S., Kim, J. H., Won, D., Lee, S. M., Sung, H. C., Chang, H. S., Hong, J. T. 2014. Co-culture with NK-92MI cells enhanced the anti-cancer effect of bee venom on NSCLC cells by inactivation of NF-κB. *Archives of Pharmacal Research*, *37*(3), 379–389. https://doi.org/10.1007/s12272-013-0319-8

Kuschner. 2017. Delivery of a Protease-Activated Cytolytic Peptide Prodrug by Perfluorocarbon Nanoparticles. *Physiology & behavior*, *176*(3), 139–148. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Lad, P. J., ve Thomas Shier, W. 1979. Activation of microsomal guanylate cyclase by a cytotoxic polypeptide: Melittin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *89*(1), 315–321. https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)90980-X.

Lai, D., Visser-Grieve, S., ve Yang, X. 2012. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Bioscience Reports*, *32*(4), 361–374. https://doi.org/10.1042/BSR20110125.

Le, Q. V., Suh, J., ve Oh, Y. K. 2019. Nanomaterial-Based Modulation of Tumor Microenvironments for Enhancing Chemo/Immunotherapy. *AAPS Journal*, *21*(4). https://doi.org/10.1208/s12248-019-0333-y.

Li, B., Gu, W., Zhang, C., Huang, X. Q., Han, K. Q., ve Ling, C. Q. 2006. Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402 induced by melittin. *Onkologie*, *29*(8–9), 367–371. https://doi.org/10.1159/000094711.

Ling, C. Q., Li, B., Zhang, C., Zhu, D. Z., Huang, X.

Q., Gu, W., ve Li, S. X. 2005. Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene on hepatocellular carcinoma. *Annals of Oncology*, *16*(1), 109–115. https://doi.org/10.1093/annonc/mdi019.

Liu, C. C., Yang, H., Zhang, L. L., Zhang, Q., Chen, B., ve Wang, Y. 2014. Biotoxins for cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(12), 4753–4758. https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.12.4753.

Liu, H., Hu, Y., Sun, Y., Wan, C., Zhang, Z., Dai, X., Lin, Z. Z. 2019. Co-delivery of Bee Venom Melittin and a Photosensitizer with an Organic-Inorganic Hybrid Nanocarrier for Photodynamic Therapy and Immunotherapy. *ACS Nano*, *56*(11), 0–16. https://doi.org/10.22630/aas.2017.56.1.3.

Liu, X., Chen, D., Xie, L., ve Zhang, R. 2002. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *54*(8), 1083–1089. https://doi.org/10.1211/002235702320266235.

McClements, D. J. 2018. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *253*, 1–22. https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.02.002.

Misra, S. K., Ye, M., Kim, S., ve Pan, D. 2015. Defined nanoscale chemistry influences delivery of peptido-toxins for cancer therapy. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125908.

Moga, M. A., Dimienescu, O. G., Arvătescu, C. A., Ifteni, P., ve Pleş, L. 2018. Anticancer activity of toxins from bee and snake venom-an overview on ovarian cancer. *Molecules*, *23*(3), 1–21. https://doi.org/10.3390/molecules23030692.

Moon, D. O., Park, S. Y., Heo, M. S., Kim, K. C., Park, C., Ko, W. S., Kim, G. Y. 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *International Immunopharmacology*, *6*(12), 1796–1807. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.07.027.

Moreno, M., ve Giralt, E. 2015. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, *7*(4), 1126–1150. https://doi.org/10.3390/toxins7041126.

Muhamad, N., Plengsuriyakarn, T., ve Na-Bangchang, K. 2018. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: A systematic review. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 3921–3935. https://doi.org/10.2147/IJN.S165210.

Oršolić, N. 2009. Potentiation of bleomycin lethality in hela and V79 cells by bee venom. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *60*(3), 317–326. https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1936.

Oršolić, N. 2012. Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, *31*(1–2), 173–194. https://doi.org/10.1007/s10555-011-9339-3.

Orsolic, N., Knezevic, A., Sver, L., Terzic, S., Hackenberger, BK., Basic, I. 2003a. Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, *1*(4), 216–226. https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2003.00029.x.

Oršolić, N., Šver, L., Verstovšek, S., Terzić, S., ve Bašić, I. 2003b. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon*, *41*(7), 861–870. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00045-X.

Park, M. H., Choi, M. S., Kwak, D. H., Oh, K. W., Yoon, D. Y., Han, S. B., Hong, J. T. 2011. Anti-cancer effect of bee venomin prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-κB. *Prostate*, *71*(8), 801–812. https://doi.org/10.1002/pros.21296.

Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., ve Langer, R. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, *2*(12), 751–760. https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387.

Phan, N. K. 2014. Biological therapy: a new age of

cancer treatment. *Biomedical Research and Therapy*, *1*(2), 32–34. https://doi.org/10.7603/s40730-014-0006-5.

Qi, J., Chen, Y., Xue, T., Lin, Y., Huang, S., Cao, S., Lin, Z. 2019. *Graphene Oxide Based Magnetic Nanocomposites for Melittin Delivery to Cervical Cancer HeLa Cells*. 0–16.

Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M., ve Mukhtar, H. 2017. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, *402*(608), 16–31. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010.

Raghuraman, H., ve Chattopadhyay, A. 2007. Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience Reports*, *27*(4–5), 189–223. https://doi.org/10.1007/s10540-006-9030-z.

Riley, M. K., ve Vermerris, W. 2017. Recent advances in nanomaterials for gene delivery-A review. *Nanomaterials*, *7*(5), 1–19. https://doi.org/10.3390/nano7050094.

Russell, P. J., Hewish, D., Carter, T., Sterling-Levis, K., Ow, K., Hattarki, M., Kortt, A. A. 2004. Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: In vitro and in vivo studies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *53*(5), 411–421. https://doi.org/10.1007/s00262-003-0457-9.

Senel, E., Kuyucu, M., ve Süslü, I. 2014. Honey and bee venom in dermatology: A novel possible alternative or complimentary therapy for psoriasis vulgaris. *Ancient Science of Life*, *33*(3), 190. https://doi.org/10.4103/0257-7941.144626.

Siegel, R. L., Miller, K. D., ve Jemal, A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *66*(1), 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21332.

Soman, N. R., Baldwin, S. L., Hu, G., Marsh, J. N., Lanza, G. M., Heuser, J. E., Schlesinger, P. H. 2009. Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(9), 2830–2842. https://doi.org/10.1172/JCI38842.

Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K., ve Hong, J. T. 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology and Therapeutics*, *115*(2), 246–270. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.004.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., ve Jemal, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *65*(2), 87–108. https://doi.org/10.3322/caac.21262.

Tu, W. C., Wu, C. C., Hsieh, H. L., Chen, C. Y., ve Hsu, S. L. 2008. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon*, *52*(2), 318–329. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.06.007.

Varanda, E. A., Monti, R., ve Tavares, D. C. 1999. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct-and indirect-acting mutagens. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, *19*(6), 403–413. https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6866(1999)19:6<403:AID-TCM4>3.0.CO;2-2.

Wang, L., Zheng, M., ve Xie, Z. 2018. Nanoscale metal-organic frameworks for drug delivery: A conventional platform with new promise. *Journal of Materials Chemistry B*, *6*(5), 707–717. https://doi.org/10.1039/c7tb02970e.

Wang, X., Xiong, L., Yu, G., Li, D., Peng, T., Luo, D., ve Xu, J. 2015. Cathepsin S silencing induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *American Journal of Translational Research*, *7*(1), 100–110.

Wattanakul, K., Imae, T., Chang, W. W., Chu, C. C., Nakahata, R., ve Yusa, S. ichi. 2019. Oligopeptide-side chained alginate nanocarrier for melittin-targeted chemotherapy. *Polymer Journal*, *51*(8), 771–780. https://doi.org/10.1038/s41428-019-0191-6.

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *30*(1), 87. https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87.

Xiao, J., Duan, X., Yin, Q., Zhang, Z., Yu, H., ve Li, Y. 2013. Nanodiamonds-mediated doxorubicin nuclear delivery to inhibit lung metastasis of breast cancer. *Biomaterials*, *34*(37), 9648–

9656. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.056.

Yang, L., Cui, F., Shi, K., Cun, D., ve Wang, R. 2009. Design of high payload PLGA nanoparticles containing melittinsodium dodecyl sulfate complex by the hydrophobic ion-pairing technique. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *35*(8), 959–968. https://doi.org/10.1080/03639040902718039.

Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., ve O'Regan, R. M. 2006. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, *7*(8), 657–667. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70793-8.

Zarrinnahad, H., Mahmoodzadeh, A., Hamidi, M. P., Mahdavi, M., Moradi, A., Bagheri, K. P., ve Shahbazzadeh, D. 2018. Apoptotic Effect of Melittin Purified from Iranian Honey Bee Venom on Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *24*(4), 563–570. https://doi.org/10.1007/s10989-017-9641-1.

Zhou, T., Zhou, X., ve Xing, D. 2014. Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier. *Biomaterials*, *35*(13), 4185–4194. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.044.