

**VANADİL SÜLFAT VE NANO  
FORMLARININ KANSER  
HÜCRELERİNİN CANLILIĞI,  
MORFOLOJİSİ VE  
HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONUNA  
İN VİTRO ÇOK YÖNLÜ ETKİLERİ**

**Doktora Tezi**

**Djanan VEJSELOVA**

**Eskişehir, 2016**

**VANADİL SÜLFAT VE NANO FORMLARININ KANSER HÜCRELERİNİN  
CANLILIĞI, MORFOLOJİSİ VE HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONUNA  
İN VİTRO ÇOK YÖNLÜ ETKİLERİ**

**Djanan VEJSELOVA**

**DOKTORA TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Haziran, 2016**

*Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1403F089 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Djanan Vejselova'nın "Vanadil Sülfat ve Nano Formlarının Kansere Hücrelerinin Canlılığı, Morfolojisi ve Hücre İçi Lokalizasyonuna İn Vitro Çok Yönlü Etkileri" başlıklı tezi 22/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, **Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim dalında, Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU	.....
Üye	: Prof. Dr. Figen ERKOÇ	.....
Üye	: Prof. Dr. Engin ULUKAYA	.....
Üye	: Prof. Dr. Adnan AYHANCI	.....
Üye	: Yrd. Doç. Gökhan KUŞ	.....

.....  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

# VANADİL SÜLFAT VE NANO FORMLARININ KANSER HÜCRELERİNİN CANLILIĞI, MORFOLOJİSİ VE HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONUNA İN VİTRO ÇOK YÖNLÜ ETKİLERİ

**Djanan VEJSELOVA**

**Biyoloji Anabilim Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı  
Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Haziran, 2016**

**Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU**

Vanadyum bileşikleri kanser araştırmalarında ideal kanser tedavi ajanı olarak çokça yer almaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan metal bazlı kemoterapötiklerin birçok ağır yan etkileri bilinmektedir. Bu sebeple yan etkili olmayan ve düşük dozlarda sitotoksosite gösteren yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, kanserli hücrelere tedavi ajanının daha çok sokulması, en az yan etkiye sahip ajanların seçilmesi ve geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmada meme kanserinin tedavisi için vanadil sülfatın ve yeni sentezlenen vanadil sülfat yüklü katı lipid nanoformulasyonun potansiyel sitotoksik, antiproliferatif, proapoptotik etkileri, sebep olabileceği morfolojik ve ince yapısal değişiklikler insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerinde araştırılmıştır. Sitotoksosite MTT kolorimetrik testi ile, çekirdek, membran ve hücre iskeletindeki morfolojik değişiklikler ve hücre içi kalsiyum derişimi değişiklikleri konfokal, ince yapı değişiklikleri ise geçirimli elektron mikroskobunda (TEM), apoptoz indüklemeye özelliği akış sitometrisinde, hücre döngüsü ve antiproliferatif etkisi ise immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Vanadil sülfatın, nano formu daha fazla olmak üzere MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkiyle, hücre morfolojisinde ve ince yapısında hasar oluşturduğu, Siklin D1 ve B1 ve de E-kaderin ekspresyonunu arttırdığı ve apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir. Bu bulgular vanadyum tuzlarının ve nano formlarının kanser tedavisinde kullanımı için ileri araştırmalara ilham verici özelliktedir.

**Anahtar Sözcükler:** Kanser, Apoptoz, Vanadil sülfat, Vanadil sülfat-KLN, MCF-7.

**ABSTRACT**  
**MULTIPLE EFFECTS OF VANADYL SULPHATE AND NANO**  
**FORMULATIONS ON CANCER CELL'S VIABILITY, MORPHOLOGY AND**  
**INTRACELLULAR LOCALIZATION IN VITRO**

**Djanan VEJSELOVA**

**Department of Biology, Molecular Biology Section**  
**Anadolu University, Graduate School of Science, June, 2016**

**Supervisor: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU**

Vanadium compounds have been widely investigated in cancer research as ideal agents for cancer treatment. Most of the chemotherapeutic agents used during cancer therapy exert numerous strong side effects. Therefore, there is a need to develop new drugs without side effects and cytotoxic at low concentrations. The main issue of novel approaches on cancer therapy includes increasing drug delivery, selecting and developing anticancer agents with low side effects. The current research investigates the potential therapeutic effects of vanadyl sulphate and newly synthesized vanadyl sulphate loaded solid lipid nanoformulation (SLN) as cytotoxic, antiproliferative and proapoptotic effects on human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) including morphological and ultrastructural changes. Cytotoxicity was evaluated using the MTT colorimetric assay. Morphological changes on nuclei, cell membrane and cytoskeleton as well the changes in intracellular calcium concentration were investigated using confocal microscopy. Transmission electron microscopy (TEM) was used for detecting ultrastructural changes. Apoptosis induction and cell cycle arrest potential were investigated using flow cytometry and immunohistochemistry, respectively. Both vanadyl sulphate and vanadyl sulphate loaded SLN, the latter being more effective, induced apoptosis in MCF-7 cells being cytotoxic and antiproliferative by causing morphological and ultrastructural damages. E-cadherin, Cyclin B1 and D1 expression was augmented in treated MCF-7 cells. Our findings are encouraging for further investigations for use of vanadium compounds in cancer therapy.

**Keywords:** Cancer, Apoptosis, Vanadyl sulphate, Vanadyl sulphate-SLN, MCF-7.

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Djanan VEJSELOVA

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde beş yıl boyunca en büyük yol göstericim olan ve bilime, hayata ve insanca yaşamaya dair her değerli bilgi ve tecrübesini cömertçe paylaşan, sevecen ve yardımsever tavrıyla desteklerini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam; Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU ve tanıştığımız günden beri bilimsel olarak ve hayata dair her alanda ilerlememi maddi ve manevi olarak destekleyen değerli hocam; Prof. Dr. Figen ERKOÇ başta olmak üzere,

Tezimin gerçekleşmesinde gerekli olanakları sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Doktora çalışmalarım süresince maddi destek aldığım Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'e,

Deneylerim süresince TEM takip ve görüntülemeye destek aldığım, yardımsever ve özverili çalışma arkadaşım olan sevgili Uzm. Biyolog Arzu İŞCAN'a,

Beni yetiştiren, hayatım boyunca sevgi, şevkat ve desteklerini cömertçe gösterip güvende hissettiren, sabırlı ve hoşgörülü ailemin her bireyine başta biricik annem ve babam olmak üzere ayrı ayrı,

Uzun ve yoğun laboratuvar çalışmalarım sırasında hoşgörülü, sevgi dolu ve anlayışlı olan sevgili eşim ve değerli ailesine,

Son olarak da çalışmalarım sırasında hoşgörüsü ve samimiyetine sığındığım ve her anlamda desteğini aldığım tüm arkadaşlarım ve sevdiklerime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Djanan VEJSELOVA

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. Kanser.....	9
2.1.1. Meme kanseri.....	10
2.1.1.1. Meme kanseri nedenleri ve oluşum mekanizmaları.....	11
2.1.1.2. İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7.....	12
2.2. Vanadyum ve Vanadyum Bileşikleri.....	13
2.2.1. Vanadyum bileşiklerinin biyolojik özellikleri.....	13
2.2.2. Vanadyum bileşiği türleri.....	15
2.2.2.1. Vanadil sülfat.....	16
2.2.2.1.1. Vanadil sülfatın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	17
2.2.2.1.2. Vanadil sülfatın kullanım alanları.....	17
2.2.3. Hastalıkların tedavisinde vanadyum bileşiklerinin rolü.....	18
2.2.3.1. Vanadyum bileşikleri ve kanser ilişkisi .....	18
2.2.3.1.1. Vanadil sülfat ve kanser ilişkisi.....	20
2.3. Sitotoksisite Testleri.....	21
2.3.1. MTT kolorimetrik sitotoksisite testi.....	21
2.4. Katı Lipid Nanopartiküller.....	22
2.4.1. Katı lipid nanopartiküllerin yapısı.....	23
2.4.2. Katı lipid nanopartiküllerin kullanım alanları.....	23



2.4.3. Katı lipid nanopartiküllerin avantaj ve dezavantajları.....	25
2.4.4. Katı lipid nanopartiküllerin sentezlenmesi.....	26
2.4.4.1. Katı lipid nanopatiküllerin sentezleme yöntemleri.....	26
2.4.4.1.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi.....	26
2.4.4.1.2. Mikroemülsiyon yöntemi.....	28
2.4.4.1.3. Çözücü emülsifikasyon-evaporasyon veya çözücü difüzyon yöntemi.....	28
2.4.4.1.4. Yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon yöntemi.....	28
2.4.5. Katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyon metodları.....	29
2.5. Programlanmış Hücre Ölümü Apoptoz.....	30
2.5.1. Apoptoz ve kanser ilişkisi.....	34
2.5.2. Apoptoz tayin metodları.....	35
2.5.2.1. Konfokal mikroskopi.....	35
2.5.2.1.1. Morfolojik değişikliklerin apoptozdaki yeri.....	36
2.5.2.1.2. Hücre içi kalsiyum derişiminin apoptotik rolü.....	36
2.5.2.2. Geçirimli elektron mikroskopisi yöntemi (TEM) ile apoptoz tayini .....	37
2.6. Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizmaları.....	38
2.6.1. Hücre döngüsünde görev alan proteinler.....	39
2.6.1.1. Siklinler.....	41
2.6.1.1.1. Siklinlerin yapısı ve dağılımı.....	41
2.6.1.1.2. Siklinlerin hücre döngüsündeki rolü.....	42
2.7. Kaderinler.....	43
2.7.1. Kaderin çeşitleri.....	44
2.7.1.1. E-Kaderin.....	45
2.7.2. Kaderin-kanser ilişkisi.....	45
2.7.2.1. E-Kaderinin kanserdeki rolü.....	46
3. MATERYAL VE METOD.....	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. MCF-7 hücreleri.....	47
3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri.....	47
3.2. Metod.....	47

3.2.1. MCF-7 hücrelerinin çoğaltılması .....	47
3.2.2. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin sentezi .....	48
3.2.2.1. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	48
3.2.2.1.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü.....	48
3.2.2.1.2. Partikül yüzey morfolojisinin tayini.....	49
3.2.3. MTT kolorimetrik sitotoksosite testi.....	49
3.2.4. Konfokal mikroskopisi yöntemi.....	49
3.2.4.1. Hücredeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopisi ile tayini.....	49
3.2.4.2. Hücre içi kalsiyum değişimindeki değişikliklerin konfokal mikroskopisi ile tayini.....	50
3.2.5. Geçirimli elektron mikroskopisi yöntemi.....	50
3.2.5.1. Geçirimli elektron mikroskopisinde hücre takip yöntemi.....	50
3.2.6. Akış sitometri yöntemi.....	51
3.2.6.1. Akış sitometride aneksin V-FITC ve PI boyama yöntemi...51	
3.2.6.2. Akış sitometride hücre döngü analizi.....	51
3.2.7. İmmünohistokimyasal uygulamalar.....	52
3.2.7.1. MCF-7 hücrelerini sitosantrifüjde yayma yöntemi.....	52
3.2.7.2. Siklinlerin immünohistokimyasal işaretlenmesi.....	52
3.2.7.3. E-Kaderinlerin immünohistokimyasal işaretlenmesi.....	53
3.2.8. İstatistiksel analiz.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Vanadil Sülfat ve Vanadil Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyon Bulguları.....	54
4.1.1. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin partikül boyutunun ölçülmesine ait bulgular.....	54
4.1.2. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümü bulguları.....	55
4.1.3. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin tayini bulguları.....	55
4.2. MTT Kolorimetrik Sitotoksosite Bulguları.....	57
4.2.1. Vanadil sülfatın MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksosite	

bulguları.....	57
<b>4.2.2. Vanadil sülfatın yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.3. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3. Konfokal Mikroskopik Bulgular.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.1. Hücredeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.1.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.1.2. Vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>61</b>
<b>4.3.1.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>61</b>
<b>4.3.1.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>62</b>
<b>4.3.2. Hücre içi bazal kalsiyum derişimindeki değişikliğin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.2.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin hücre içi kalsiyum miktarının konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>64</b>
<b>4.3.2.2. Vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinde neden olduğu hücre içi kalsiyum derişimi değişikliğinin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>65</b>
<b>4.3.2.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu hücre içi kalsiyum derişimi değişikliğinin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>66</b>
<b>4.3.2.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu hücre içi kalsiyum derişimi değişikliğinin konfokal mikroskopik bulguları.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4. Geçirimli Elektron Mikroskopik Bulgular.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron</b>	

mikroskopik bulguları.....	67
4.4.2. Vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları.....	68
4.4.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları.....	71
4.4.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin elektron mikroskopik bulguları.....	72
4.5. Akış Sitometrisi Bulguları.....	73
4.5.1. Anneksin V-FITC ve PI boyamanın akış sitometrisindeki bulguları....	73
4.5.1.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI boyama bulguları.....	73
4.5.1.2. Vanadil sülfatın uygulanan MCF-7 hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI bulguları.....	74
4.5.1.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI bulguları.....	75
4.5.1.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI bulguları.....	76
4.5.2. Hücre döngüsü analizinin akış sitometrisindeki bulguları.....	76
4.5.2.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları.....	77
4.5.2.2. Vanadil sülfatın uygulanan MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları.....	77
4.5.2.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları.....	78
4.5.2.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları.....	78
4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	79
4.6.1. Siklinlerin immünohistokimyasal bulguları.....	79
4.6.1.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları.....	80

4.6.1.2. Vanadil sülfat uygulanan MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları.....	81
4.6.1.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları.....	82
4.6.1.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları.....	83
4.6.2. E-Kaderinlerin immünohistokimyasal ışık mikroskobu bulguları.....	83
4.6.2.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin immünohistokimyasal E-Kaderin işaretlemesi bulguları.....	84
4.6.2.2. Vanadil sülfatın uygulanan MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal E-Kaderin işaretlemesi bulguları.....	85
4.6.2.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal E-Kaderin işaretlemesi bulguları.....	85
4.6.2.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal E-Kaderin işaretlemesi bulguları.....	86
5. TARTIŞMA.....	87
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 4.1.</b> Vanadil Sülfat, Boş KLN ve Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonlarının Partikül Boyutu ve Polidispers İndeks Değerleri.....	54
<b>Tablo 4.2.</b> Boş KLN ve Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonlarının Zeta Potansiyel ve Elektriksel İletkenlik Değerleri.....	55
<b>Tablo 4.3.</b> Siklin B <sub>1</sub> ve Siklin D <sub>1</sub> Boyanmasının Semikantitatif Değerlendirme Tablosu.....	79
<b>Tablo 4.4.</b> Vanadil Sülfat, Vanadil Sülfat Yüklü KLN, Boş KLN Uygulanmış ve Kontrol MCF-7 Hücrelerinin E-Kaderin Boyanmasının Skorlama Tablosu.	84

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Vanadyum ve Vanadyum Bileşiklerinin Antikanser Etkileri.....	20
Şekil 2.2. Mitokondri Aracılı Kaspaz Bağımlı Apoptoz Yolağı.....	32
Şekil 2.3. Hücre Yüzey Reseptörleri Aracılığı ile Tetiklenen Apoptoz.....	33
Şekil 2.4. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz.....	34
Şekil 2.5. Hücre Döngüsü Denetim Mekanizmaları.....	41
Şekil 4.1. Vanadil Sülfatın MCF-7 Hücrelerine 24 Saatlik Uygulanması Sonucundaki Antiproliferatif Etkisi.....	58
Şekil 4.2. Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun MCF-7 Hücrelerine 24 Saatlik Uygulanması Sonucundaki Antiproliferatif Etkisi.....	59
Şekil 4.3. Vanadil Sülfat, Vanadil Sülfat Yüklü KLN, Boş KLN Formülasyonlarının Uygulandığı MCF-7 Hücreleri ve Kontrol Grubu MCF-7 Hücrelerine Ait Bazal Kalsiyum Ölçüm Sonuçları.....	64
Şekil 4.4. MCF-7 Kontrol Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri.....	65
Şekil 4.5. Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri .....	65
Şekil 4.6. Vanadil Sülfat KLN Formülasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri.....	66
Şekil 4.7. Boş KLN Formülasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri.....	67
Şekil 4.8. MCF-7 Kontrol Hücrelerinin Apoptotik Profili.....	74
Şekil 4.9. Vanadil Sülfatın IC <sub>50</sub> Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Apoptotik Profili.....	75
Şekil 4.10. Yeni Sentezlenen Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Apoptotik Profili.....	75
Şekil 4.11. Yeni Sentezlenen Boş KLN Formülasyonunun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Apoptotik Profili.....	76
Şekil 4.12. Kontrol MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	77
Şekil 4.13. Vanadil Sülfata 24 Saat Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	77
Şekil 4.14. Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun 24 Saat Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	78
Şekil 4.15. Boş KLN Formülasyonu ile 24 Saat İnkübe Edilen MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	78

## GÖRSELLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Görsel 4.1.</b> Vanadil Sülfat Kristalinin SEM Görüntüsü.....	56
<b>Görsel 4.2.</b> Boş KLN Formülasyonunun SEM Görüntüsü.....	56
<b>Görsel 4.3.</b> Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun SEM Görüntüsü.....	57
<b>Görsel 4.4. A.</b> Akridin Oranj ve Falloidin ile İkili Boyanmış Kontrol MCF-7 Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).....	60
<b>Görsel 4.4. B.</b> Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Kontrol MCF-7 Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).....	60
<b>Görsel 4.5.</b> Vanadil Sülfatın IC <sub>50</sub> Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Konfokal Mikroskopik Görüntüsü (40x).....	61
<b>Görsel 4.6.</b> Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun IC <sub>50</sub> Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Konfokal Mikroskopik Görüntüsü (40x).....	62
<b>Görsel 4.7.</b> Boş KLN Formülasyonunun 24 Saat Boyunca Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Konfokal Mikroskopik Görüntüsü (40x).....	63
<b>Görsel 4.8.</b> Kontrol MCF-7 Hücrelerine Ait TEM Görüntüsü (6000x).....	68
<b>Görsel 4.9.</b> Vanadil Sülfatın IC <sub>50</sub> Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü (6000x).....	69
<b>Görsel 4.10.</b> Vanadil Sülfatın IC <sub>50</sub> Konsantrasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü (8000x).....	69
<b>Görsel 4.11.</b> Vanadil Sülfatın 24 Saatlik IC <sub>50</sub> Konsantrasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü (7000x).....	70
<b>Görsel 4.12.</b> Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinin İnce Yapısal Değişiklikleri (8000x).....	70
<b>Görsel 4.13.</b> Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Tespit Edilen Genişlemiş Mitokondri Kompartımanı (10000x).....	71
<b>Görsel 4.14.</b> Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Meydana Gelen Krista Kaybı (10000x).....	71
<b>Görsel 4.15.</b> Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinde Tespit Edilen İnce Yapısal Değişiklikler (8000x).....	72
<b>Görsel 4.16.</b> Boş KLN Formülasyonunun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerindeki İnce Yapısal Değişiklikler (4000x).....	72



<b>Görsel 4.17.</b> Boş KLN Formülasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücresinin İnce Yapısı (8000x).....	73
<b>Görsel 4.18.</b> Kontrol MCF-7 Hücrelerinde Siklin B <sub>1</sub> Boyanmasının Işık Mikroskobu Görüntüsü (20x).....	80
<b>Görsel 4.19.</b> Kontrol MCF-7 Hücrelerinde Siklin D <sub>1</sub> Boyanması (20x).....	80
<b>Görsel 4.20.</b> Vanadil Sülfat Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin B <sub>1</sub> Boyanması (20x).....	81
<b>Görsel 4.21.</b> Vanadil Sülfat Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin D <sub>1</sub> Boyanması (40x).....	81
<b>Görsel 4.22.</b> Vanadil Sülfat Yüklü KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin B <sub>1</sub> Boyanması (20x).....	82
<b>Görsel 4.23.</b> Vanadil Sülfat Yüklü KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin D <sub>1</sub> Boyanması (10x).....	82
<b>Görsel 4.24.</b> Boş KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin B <sub>1</sub> Boyanması (20x).....	83
<b>Görsel 4.25.</b> Boş KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin D <sub>1</sub> Boyanması (20x).....	83
<b>Görsel 4.26.</b> Kontrol MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x).....	84
<b>Görsel 4.27.</b> Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x).....	85
<b>Görsel 4.28.</b> Vanadil Sülfat Yüklü KLN Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x).....	85
<b>Görsel 4.29.</b> Boş KLN Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x).....	86

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: American Type Culture Collection
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
CO <sub>2</sub>	: Karbon dioksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EPA	: Environmental Protection Agency (ABD Çevre Koruma Ajansı)
IC <sub>50</sub>	: İnhibitör Konsantrasyonu 50
KLN	: Katı Lipid Nanopartikül
MCF-7	: İnsan Meme Adenokarsinoması Hücre Hattı
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide sitotoksisite testi
nm	: Nanometre
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponu)
PI	: Propidyum iyodit
rpm	: Revolutions per minute
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
SEM	: Scanning Electron Microscope
TEM	: Transmission Electron Microscope
°C	: Santigrad derece
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

## 1. GİRİŞ

Kanser, genel tanımıyla hücrelerin kontrolsüz çoğalarak işlevini farklılaştırması ve doku ya da organın işlevini çoğunlukla geri dönüşümsüz olarak bozmasıyla oluşan bir hastalıktır. Kanser günümüzde en önemli halk sağlığı problemi olarak kendini göstermektedir. İstatistiksel araştırmalara göre kanser hastalığı dünyada ve Amerika’da meydana gelen ölüm sebepleri listesinde ikinci sırada yer almaktadır. Değişen yaşam koşulları, kötü alışkanlıklar, ağır çalışma şartları ve stres dışında genetik yatkınlığın da katkısıyla önümüzdeki 5 yıl içerisinde kanser hastalığının dünyadaki ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer alan kalp hastalıklarının da geçmesi öngörülmektedir [1]. Ölümle sonuçlanan kanser vakalarında ilk sırada akciğer kanseri yer alırken yine Amerika’da ve bazı diğer ülkelerde mortalitesi en yüksek ikinci kanser türü olarak meme kanseri gösterilmektedir [1]. Meme kanseri en genel anlamıyla meme dokusunda oluşan kanser olarak tanımlanmaktadır [2]. Meme kanserinin en yaygın tipi duktal karsinomadır. Bu kanser süt bezlerinden meme ucuna süt taşıyan süt kanallarında oluşmaktadır. Meme kanserinin başka bir türü olan lobüler karsinoma ise memenin süt bezlerinde meydana gelmektedir. Memede oluşan bu kanser tipleri, kaynaklandıkları süt bezleri veya süt kanallarından sağlıklı olan çevre dokularına yayıldıklarında invazif kanser adını almaktadırlar. Meme kanseri hem kadınlarda hem erkeklerde meydana gelebilen fakat görülme sıklığı erkeklerde daha seyrek olan bir hastalıktır [2]. Amerika’da gerçekleştirilen bir istatistiksel çalışmada erkeklerde görülen meme kanseri vakalarında, son yıllarda ciddi bir artış kaydettiği belirtilmektedir [1]. Bu artışın nedeni tam olarak açıklanamamış ve toplumun beslenme alışkanlıklarının değişmesinden kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir [1]. Meme kanseri, diğer kanser vakalarında olduğu gibi, son yıllarda artış göstermektedir.

Meme dokusunda meydana gelen bu hastalığın teşhis ve tedavisi konusunda yapılan çalışmalarda meme dokusunun yapısı ve fonksiyonlarını bilmek gerekmektedir. Meme organı ilkel ve işlevi olmayan formda erkek memelilerde de mevcuttur. Meme bezi ergenlikte epitel dokusunda büyüme ve derinleşme olan tek organdır. Bu organ lobüler dallanma ve morfogenez, salgılamada değişiklik ve gerileme döngüsünü gebelik, süt verme ve eski haline geri dönme evrelerinde tekrar etmektedir [2]. Meme bezinin embriyonik kökeni ektodermdir. Memenin gelişimi ektodermdaki yağ tabakasının ilkel bir kanal şeklinde invazyonuyla meydana gelmiştir [3]. Epitel nodüller mezenkimden gelen parakrin sinyaller doğrultusunda dokunun farklılaşmasıyla meydana gelmektedir.

Endokrin sistemde meydana gelen hormonal değişiklikler doğrultusunda tbloalveolar yapı kazanan meme bezi fonksiyonel hale gelmektedir. Doğum sonrasında duktal büyüme ve alveolar büyüme Şeklinde gelişen meme organı ergenlik ve gebelik dönemlerinde hücre üremesi farklılaŐması ve ölümünün gerĉekleŐtięi organdır. Tam olarak gelişimini tamamlamış insan meme organında, arasında bağ doku bulunan yağ dokuda gömülü olarak 15-20 adet salgı lobu mevcuttur. Her bir salgı lobu, miyoepitelyal hücreler bulunan kübik epitel örtü ile ĉevrelenmiŐ süt kanalına aĉılan kanalcıklar iĉermektedir. Bu kanallar, sütü ampuladaki meme ucuna ileten süt kanalına aĉılmaktadır. Memenin geliŐmesi ve farklılaŐmasında farklı hormonlar ve büyüme faktörleri rol almaktadır. Bu endokrin faktörler dışında meme dokusunun normal olarak gelişiminde meme dokusundaki stromal ve parenkimal hücre elementleri aracılığıyla hücre-hücre etkileŐiminin olması gerekmektedir. Vücudun herhangi bir dokusunda olduğu gibi meme dokusunda da meydana gelen hücrenel değişiklikler, kontrolsüz ĉoęalma ve invazyon meme dokusunda kanser oluŐumuna yol aĉmaktadır. Dokudaki kanserleşme daha da ileri seviyeye ulaştığı zaman metastaz yaparak ĉevredeki sağlıklı dokulara ya da dolaŐım veya lenf sistemi aracılığıyla tüm vücuda yayılabilmekte ve sonuĉ olarak bireyde lme neden olabilmektedir [4].

Meme kanserinin oluŐmasında risk faktörleri önemli bir yere sahiptir. Meme kanseri risk faktörleri erkek ve kadınlarda farklılık göstermektedir. Erkeklerde, obezite ve büyük meme dokusuna sahip olmak risk faktörleri arasında yer almaktadır. Kadınlarda sayılan meme kanseri risk faktörleri erkeklere göre ĉok daha fazla sayıdadır. Bu risk faktörleri ileri yaş, daha önce geĉirilmif göğüs hastalığı veya meme kanseri hikayesi, erken menstruasyon, geĉ menopoŐ, hamile kalmamak ya da ilk hamileliği 30 yaş sonrası yaŐamak, oral yoldan doğum kontrolü uygulamak, ailede meme kanseri hikayesi olması, kalıtsal genetik değişikliklere sahip olmak, göğüs bölgesine radyoterapi uygulanmış olması, uzun süreli hormon tedavisi, memede yoğunluk artışı, alkol kullanımı, obezite, menopoŐ ve endokrin bozukluklara maruziyet olarak sıralanmaktadır [5]. Bireydeki meme kanserini teşhis etmede kullanılan yöntemler erkek ve kadınlarda ortaktır. Meme kanserinin teşhisi iĉin kullanılan metotlar genellikle mamogramlar ve klinik meme taramalarıdır. Meme kanseri teŐhisinden sonra tedaviye yönelik standart uygulamalar ise operasyon (cerrahi uygulama), radyasyon terapisi, kemoterapi, hormon terapisi ve hedefli terapidir [5]. Meme kanseri, dünyada ölümlle sonuĉlanan kanser türleri arasında beşinci sıradayken, dünyada kadınlarda görülen kanser nedenli ölüm vakalarında ilk sırada yer

almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada meme kanseri kadınlarda en sık rastlanan ve ölüme yol açma açısından da ikinci sırada yer alan kanser türü olarak ifade edilmiştir [5]. Yine aynı çalışmada beyaz ırktan olan Amerikalı kadınlarda tüm yaş gruplarında meme kanserinin en yüksek seviyede görüldüğü, Afrika kökenli Amerikalı kadınların ise 40 yaş öncesinde meme kanserinin daha yüksek oranda görüldüğü ve meme kanseriden ölüm oranının da bu grupta diğer ırklar ve etik gruplardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir [5].

Kanserin teşhisini takiben, ameliyat ile dokunun vücuttan uzaklaştırılması kadın hastalarda erken teşhis döneminde çoğunlukla %95 oranında hastanın kanserden kurtulmasıyla sonuçlanmaktadır. Erkek hastalarda ise meme dokusunun küçük olması nedeniyle bu işlem çok avantaj sağlayamamaktadır [5]. Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan sisplatin, rutenyum, altın, ferokifen gibi metal bazlı bileşikler anti-anjiyojenik ve anti-invazif özelliklerinden oksidatif hasar mekanizmalarına uzanan geniş etki yelpazesine sahip olduklarından kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemek için kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, birçok yan etkiye neden olmaları, uygulamalarının zor olması ve biyoyararlılıklarının kısıtlı olması nedeniyle, en önemlisi de kanser hücrelerinin bu ilçlara karşı direnç geliştirebilmesi sebebiyle günümüzde yeni antikanser ilaç araştırmalarına yönelik çalışmaların sayısı artmıştır [6]. Bu araştırmalar arasında yine metal bazlı bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımına yönelik araştırmalar belirgin bir şekilde yüksek oranda yer almaktadır. Metal bazlı bileşiklerden vanadyum bileşiklerinin yeni antikanser ilaç araştırmalarında potansiyeli yüksek olarak görülmekte ve yaygın olarak araştırılmaktadır [6]. Son yıllarda, vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin kanser hastalığı tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılmasına yönelik çalışmaların sayısı oldukça artmıştır [7]. Bir mikronütrient olarak tanımlanan vanadyumun insülin benzeri aktivite, hiperlipidemi ve hipertansiyonu ayarlama gibi birkaç biyolojik özelliği, geçtiğimiz yüzyılda tanımlanmıştır. Bu özellikleri dışında vanadyumun ve farklı vanadyum bileşiklerinin çoklu biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarla insan kaynaklı kanser hücreleri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur [8]. Vanadyum günlük diyetle alınan karabiber, maydonoz, mantar ve deniz ürünleri gibi birçok besinle vücudumuza girmektedir. Kan dolaşımına ulaşan vanadyum bileşikleri vanadil katyonlarına çevrilerek transferrin ve ferritin ile çok nadiren de hemoglobin, albumin ya da laktat, sitrat gibi moleküllerle kompleks oluşturur [9]. İnsan serumunda, sağlıklı bir bireyde 1-2 µg/L vanadyum konsantrasyonu mevcuttur. Vanadyumun insan vücudunda +4

ve +5 oksidasyon seviyelerinde bulunduğu gösterilmiştir. Vanadil katyonları +4 formundadır ve hücre membranından difüzyonla veya anyon kanalları aracılığıyla içeriye girerler. Ekstrasellüler sıvılarda ise vanadyum genellikle metavanadat (+5 oksidasyon seviyesinde) halinde bulunur. Hücre içine taşınan metavanadat glutatyon aracılığıyla  $VO^{2+}$  formuna indirgenmektedir. İnsan kanındaki vanadyum seviyesi 0.42  $\mu\text{g/L}$  ile 0.08  $\mu\text{g/L}$  aralığındadır. İdrarla vücuttan atılabilen vanadyumun idrardaki seviyesi 0.1  $\mu\text{g/L}$  ile 0.2  $\mu\text{g/L}$  aralığındadır ve tipik olarak kreatininin 1  $\mu\text{g/g}$  kadarını teşkil eder. Vanadyum başta böbrek olmak üzere karaciğer, kemikler ve dalak gibi birçok organda birikmektedir [9]. Vanadyum ve vanadyum bileşikleriyle yapılan çalışmalarda, insülinin vanadyum metabolizmasını düzenlemede görevli olduğunu fakat bu düzenleme mekanizmasının tam olarak henüz açıklanamadığı ifade edilmektedir [10]. Ratlarda gerçekleştirilen çalışmalarda oral yolla veya intraperitoneal olarak verilen vanadyum bileşiklerinin de beyin, pankreas, karaciğer, dalak, kalp, akciğer ve kemik dokularında biriktiği ve vanadyumun hayvanlarda eksik olmasının büyüme geriliği, üreme güçlüğü, böbrek, kalp ve beyinde metabolik ve hücresel fonksiyon bozukluğuna yol açtığı belirtilmektedir [11]. Vanadyumun karaciğer ve yağ dokusu gibi, insüline duyarlı dokularda hızlı metabolize edilebileceği çalışmalarda belirtilmiştir [7, 9]. Bu durum enfeksiyon, kanser gibi patolojik şartlar altında vanadyumun karaciğer, böbrek, akciğer, dalak, yağ doku, kalp, kemikler ve dişlerde birikmesinin nedeni olarak gösterilmektedir [12]. Ayrıca, vanadyumun ve bileşiklerinin normal hücrelere göre kanserli hücrelerde daha çok biriktiği bilinmektedir [13]. Vanadyum bileşiklerinin çekirdekte heterokromatin bölgesinde birikmesinin mitozu geçici olarak baskılayarak, hücre döngüsünü geç S ve G2 fazlarında geri dönüşümlü olarak durdurduğu araştırmacılar tarafından bulunmuştur [11].

Metal ve metal bazlı bileşiklerin kanser tedavisinde kullanımı 16. yy'a dayanmaktadır [11]. Vanadyum tuzlarının antikanser etkisi ilk kez 1965 yılında tespit edilmiş ve yayınlanmıştır. Bunu takiben vanadyumun antikanser etkisi biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar da dahil edilerek birçok malign hücre hattında araştırılmaya başlanılmıştır. Bu hücre hatları, B ve T hücreli lenfoma, hepatoma, osteosarkoma, testis, meme, rahim, böbrek, akciğer, nazofarinks ve özofagus karsinoma hücreleridir [11, 14]. Araştırmacılar (+4) sodyum metavanadat ve (+4) vanadil sülfatın vanadyum bileşikleri olarak antitümör etkisini birçok in vitro çalışmada lenfoma, T-hücreli lösemi, eritrolösemi, bazofilik lösemi, karaciğer kanseri hücreleri, ovaryum kanser hücreleri, testis kanser hücreleri, özofagus ve kemik tümörleri ve nöroblastomada araştırmış ve bu

hücreler üzerinde ileri derecede antitümör etkisi gösterdiğini ifade etmişlerdir [7, 15, 16]. Vanadyumun kanser hücresinin canlılığını inhibe ettiği  $\text{NaVO}_3$  uygulanmış insan akciğer kanseri A549 ve insan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde de gösterilmiştir [6].

Araştırmacılar vanadil sülfat ve bis malato ortovanadyum bileşiklerinin fare fibrosarkoma hücreleri (L929), rat feokromositoma hücreleri (PC12), insan karaciğer karsinoma hücreleri (HepG2) ve fare embriyonik fibroblast hücreleri (NIH/3T3) üzerine sitotoksik ve antitümör etkilerini araştırdıkları çalışmada, bu bileşiklerin NIH/3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin test edilen diğer kanser hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinden daha düşük olduğunu ve bu sitotoksitenin doza ve hücre tipine bağlı olarak değiştiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada vanadyum bileşiklerinin sitotoksik ve antikanser etkisinin uygulama konsantrasyonuna, uygulama süresine, hücre türüne ve bileşiğin kimyasal yapısına göre değiştiğini ifade etmişlerdir [17].

Vanadyum canlılara sindirim, solunum ve deri yoluyla girmektedir [13]. Vanadyumun normal hücrelerden daha çok kanserli hücrelerde biriktiği ve normal meme dokusuna göre kanserli meme dokusunda vanadyum seviyesinin arttığı araştırmalarda gösterilmiştir [13]. Vanadyum bileşiklerinin ideal veya ideale yakın antikanser ajan özelliklerini göstermelerinden yola çıkılarak son 20 yıldır vanadyumun antineoplastik ajan olarak kullanımına yönelim artmıştır ve başarılı bir kanser tedavisi için çok farklı vanadyum bileşikleri sentezlenmiştir [18]. Oral yolla vücuda alınan vanadyum tuzlarının gastrointestinal yolda emilim zorluğu ve neden oldukları birçok yan etki nedeniyle son yıllarda organik vanadyum bileşikleri gibi birçok biyoyararlılığı yüksek vanadyum bileşiği üretilmesi gündeme gelmiştir. Vanadil alginat polisakkaritleri bu bileşiklerdendir. Bu bileşikler vanadil sülfatın  $\text{pH}=12$  asitlikteki sulu solüsyonlarından vakum altında ısıtılması yöntemiyle elde edilmiştir. Bu bileşiklerin antiproliferatif etkinliği BEL-7402 insan hepatoma hücre hattında araştırılmış ve konsantrasyona bağlı olarak bu hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksositeye neden oldukları tespit edilmiştir [19].

Metal bazlı bileşiklerin kanser tedavisinde kullanılması yönündeki araştırmalar günümüzde hız kazanmıştır. Metal bazlı antikanser özelliğine sahip bileşiklerin, genelde lipofilik olmaları gerektiğinden, antikanser etkinlikleri kısıtlanmaktadır. Metal bazlı ajanların antikanser etkilerini gerçekleştirebilmeleri için hidrofobik olan hücre membranını aşmaları gerekmektedir. Lipoflik özellikleri yükseltilmiş ve apoptoz indükleme yoluyla antikanser etki gösteren ajanlardan antikanser ilaç üretimi konusunda gerçekleştirilen araştırmalar günümüzde artmıştır.  $\text{VOSO}_4$  ve  $\text{VO}(\text{acac})_2$  bileşikleri kinolin

ve piridinon ligandlı yeni sentezlenmiş vanadyum bileşikleriyle insan lösemi hücrelerine U937 uygulandığında apoptozun indüklendiği gösterilmiştir. Böylece lipofilik özelliği artmış ajanlarda daha güçlü sitotoksik etki meydana getirme özelliğinin olduğu ortaya konulmuştur [20].

Metal bazlı ajanlardan nanopartikül üretimi ve kanser tedavi ajanı olarak bu nanopartiküllerin araştırılması konusu günümüzde yaygın araştırma konuları arasına girmiştir. Katı lipid nanopartiküller (KLN) bu amaçla sentezlenen ilaç taşıma sistemleri arasında yer almaktadır. Katı lipid nanopartiküller yüksek potansiyelli özel ilaçların toksik yan etkilerini azaltmak ve tedavi etkinliğini arttırmak için geliştirilmiş ilaç taşıma sistemleridir. Bu partiküller yağ/su tipi mikroemülsiyonların dondurarak kurutulması veya katı lipid ve lipid karışımlarının yüksek basınçla homojenizasyonu sonucu oluşan, kolloid, yüzeyinde tek tabaka fosfolipid molekülü bulunan, katı hidrofobik çekirdekli ilaç taşıyıcı sistemlerdir [21, 22, 23].

Katı lipidlerden sentezlenen KLN'ler oda ve vücut sıcaklıklarında katı olan sürfaktantlar tarafından stabilize edilmiş partiküllerdir. KLN'ler katı matrisleri sayesinde taşıdıkları ilacı degradasyona karşı korur ve ilacın salınım şekillerinin kontrolünü sağlarlar. Diğer bir avantajları da toksik çözücü kullanmadan ve büyük çapta üretilebilir olmalarıdır [24]. En belirgin özellikleri ise düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisiteye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri ve dokulara ilaç hedeflenebilmesi gibi lipozom özelliğine sahip olmalarıdır. KLN'ler, taşınan etken maddenin kontrollü salınımını sağlama ve maddeyi bozulmalardan koruma gibi ilaç geliştirmede en çok aranan özelliklere sahiptir [25, 26].

Vanadil sülfatın katı lipid nanopartikül formunun sentezlenmemiş ve kanser hücrelerine uygulaması yapılmamış olması bu tez kapsamında sentezlediğimiz vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartikülün kanser araştırmalarında metal bazlı ilaçların kullanımı ve biyoyararlılığının artırılması konusunda yeni bilgiler içermesi ve kanser tedavisi araştırmalarında ilaç geliştirilmesi konusunda yeni yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

Vanadyum bileşiklerinin diğer bir etki mekanizması tümör hücrelerinde mitokondri membranı geçirgenliğini arttıran porların açılmasına yol açmalarıdır. Bu porlar sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya sızmasına, dolayısıyla da apoptozun indüklenmesine yol açmaktadır. Böylece vanadyum bileşiklerinin antiproliferatif etkisinin apoptozu indükleme yoluyla gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur [15].



Vanadyum bileşiklerinin çok sayıdaki biyolojik özelliği en başta hücre türü olmak üzere, vanadyum bileşiğinin türüne ve dozuna da bağlıdır. Vanadyum bileşiklerinin özellikle antiproliferatif ve proapoptotik özellikleri hücre türüne göre değişiklik göstermektedir [15]. Bir vanadyum tuzu olan vanadil sülfatın ve yeni sentezlediğimiz vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki çok yönlü etkileri henüz tam olarak araştırılmamıştır.

Günümüzde kullanılan antikanser ilaçlar, yan etkileri ve seçici olmamaları nedeniyle normal hücrelere de zarar vermektedir. Bu sebeple çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılacak yeni tedavi yaklaşımları ve yeni antikanser ajanların geliştirilmesi yönünde bir ihtiyaç doğmuştur. Bu araştırmalar, ideal bir antikanser ajanda bulunması gereken özelliklerin tamamını veya bir kısmını taşıyan ajanların geliştirilmesi ve kullanımına yönelik araştırmalardır. Vanadyum bileşikleri ideal bir antikanser ilaçta bulunması gereken antiproliferatif etki, sitotoksik/sitostatik etki (Apoptoz/Nekroz), invazyon/metastazı azaltma veya baskılama, hücrede direnç geliştirmeme gibi özelliklerini bazen ayrı ayrı, bazen de hepsini birden bulundurabilmektedir [28]. Vanadyum bileşiklerinin bu özelliklerinden yola çıkılarak bu tezde bir vanadyum tuzu olan vanadil sülfatın kanser hücreleri üzerindeki çok yönlü antiproliferatif ve apoptotik etkileri MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde incelenmiştir. Ayrıca, vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin normal hücrelere göre kanserli hücrelerde daha fazla biriktiği bilgisi baz alınarak böyle eğilimi olan vanadil sülfatı MCF-7 hücrelerine daha çok miktarda sokmak amacıyla vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopatiküller sentezlenip, MCF-7 hücreleri üzerindeki hücre canlılığı, hücre döngüsü ve çekirdek, hücre iskeleti ve membranı üzerine etkisi ve neden olabileceği hücre içi kalsiyum derişimi değişikliği araştırılmıştır. Farklı vanadyum bileşiklerinin farklı kanser hücreleri üzerinde meydana getirdiği ortak bir etki mevcuttur. Bu etki apoptoz indükleme etkisidir [17]. Vanadil sülfatın ve sentezlenen katı lipid nanopatikül formunun MCF-7 kanser hücresi içerisindeki etkilerinin araştırılması ile bu ajanların *in vivo* uygulanmasına yönelik aydınlatıcı bulguların ortaya konulması amacıyla ve mortalitesi ve tedavi maliyeti de çok yüksek olan meme kanseri hastalığının tedavisi için ilaç geliştirilmesinde yeni bir potansiyel ilaç ve ilaç geliştirme yaklaşımı sunulması amacıyla vanadyum bileşiklerinin geniş yelpazedeki biyolojik aktivitesi ve kanser hücrelerindeki apoptoz indükleme özelliğinden yola çıkılarak bu çalışmada bir vanadyum tuzu olan vanadil sülfatın ve yeni sentezlediğimiz vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopatikülün MCF-7 insan meme kanseri

hücrelerinin canlılığı, morfolojisi, ince yapısı üzerine sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri çok yönlü olarak araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak komşu dokulara yayılması (invazyon) veya kaynaklandığı organdan uzak bir yere, lenf ya da kan yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan bir hastalıktır. Kanser hücreleri iki temel kalıtsal özellik ile diğer hücrelerden farklıdır. Bu özellikler kanser hücrelerinin normal hücre bölünmesinin aksine sınırsızca bölünerek çoğalması ve normalde kendilerinin dışındaki diğer hücelere özel alanlara yayılıp yerleşebilme özellikleridir. Kanser hücrelerinin diğer özellikleri aşağıdaki gibidir;

- **Klonal köken;** kanser hücrelerinin çoğu, tek kanserleşmiş hücreden, bazıları da birden çok sayıda kanserleşmiş hücreden köken almaktadır.

- **İmmortalite;** kanser hücreleri ölümsüzdür. Sınırsızca bölünerek neredeyse sonsuz sayıda hücre oluşturma yeteneğine sahiptirler.

- **Genetik instabilite;** kanser hücreleri bölündükçe hücre proliferasyonunu kontrol eden DNA'daki yanlış baz eşleşmelerini tanıma gibi DNA tamir mekanizmalarının bozulduğu hücreleri meydana getirirler.

- **Metastaz;** kanserli hücrelerin ekstrasellüler matrikse yapışmadan sorumlu proteinlerinin kaybolması, hücreler arası etkileşimlerinin bozulması, bazal membrana tutunma anomalileri ve bazal membranın üretimindeki anomali gibi nedenlerden diğer yakın veya uzak dokulara yayılmasını ifade etmektedir.

- **Kontakt inhibisyon ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı;** kanser hücrelerinde normal hücrelerin aksine, kültür ortamında substratuma yapışarak üreme özellikleri ve çoğaldıktan sonra üremelerinin durması (kontakt inhibisyon) özellikleri kaybolmuştur. Bu hücreler yarı katı bir besi ortamında substratuma tutunma ihtiyacı hissetmeden bölünebilmektedir [29].

Kanser hücreleri bir diğer ismi ile neoplastik hücreler tek bir kütle içinde küme halinde durduklarında bu tümör yapısı iyi huylu (benign) olarak isimlendirilirken bu hücreler diğer dokulara yayılma özelliği kazanmışsa tümör kötü huylu (malign) ya da kanser olarak isimlendirilmektedir. Kanserlerin sınıflandırılması köken aldıkları doku ya da hücre tipine göre yapılmaktadır. Buna göre epitel hücre kökenli kanserler karsinom, bağ dokusu veya kas dokusu kökenliler sarkom, kan hücrelerinden köken alanlar lösemi olarak adlandırılmaktadır. Kanserler, çeşitli hücre tiplerinin farklılaşmasıyla meydana geldiklerinden, birbirinden farklı hastalıklar olarak nitelendirilmektedir. Örneğin, bazal

hücrelerden köken alan, sadece belli bölgede yayılma gösteren ve çok nadir durumlarda metastaz yapan bazal hücreli karsinom ile derinin pigment hücrelerinden türeyen, ileri derecede metastaz özelliği taşıyan melanom özellikleri birbirinden tamamen farklı kanserlerdir [30]. Kanserli hücrelerin oluşumu ve gelişimi genetik olduğu kadar çevresel faktörlere de bağlıdır. Kanser hastalığına yaklaşım çoğunlukla kaçınılabilir bir hastalık olarak görme şeklindedir fakat yatkınlık olması durumunda tüm etmenleri bertaraf edip bu hastalığa yakalanmamak çoğunlukla mümkün görülmemektedir. Kanser oluşumu ve gelişimi farklı doku ve organlarda meydana geldiğinden oluştukları dokuya veya organa göre isimlendirmeleri gerçekleştirilmektedir. Örneğin, akciğerde oluşan kanser akciğer kanseri, midede oluşan kanser mide kanseri, karaciğerde oluşan kanser karaciğer kanseri, memede oluşan kanser de meme ya da meme kanseri olarak isimlendirilmektedir. Toplumların bu farklı kanser türlerine yakalanma yatkınlığı ve bunun insidansı da farklılık göstermektedir. Örneğin, ABD'nin Connecticut eyaletinde yaşanan beyaz ırkta kolon kanseri insidansı yüksek iken ABD, New Orleans'da yaşayan zencilerde akciğer kanseri insidansı yüksektir. Bunların insidansının en düşük olduğu bölge insanları ise sırasıyla, Kanada'nın Nova Scotia bölgesi ve Hindistan'ın Mandras bölgesidir. Meme kanserinin en sık görüldüğü toplum Hawaiililer iken en az görüldüğü toplum ise Yahudi olmayan İsrailililerdir [30].

### **2.1.1. Meme kanseri**

Meme kanseri kadınlarda en yaygın olarak görülen ve mortalitesi yüksek kanserlerde ikinci sırada yer alan kanser türüdür [31]. Bu kanser hastalığı meme dokusunun duktal ve lobular epitelinde oluşmaktadır. Çok sinsi ilerlemesi nedeniyle teşhis ve tedavisinde çok dikkatli olunması gerekmektedir [32]. Meme kanseri olan kadınların yaklaşık 1/3'lük kısmında metastaz gelişmekte ve bunun sonucunda kadınlarda ölüm görülmektedir. Amerika'da 8 kadından birinin İngiltere'de ise 12 kadından birinin meme kanserine yakalanmakta ve endüstrileşmiş ülkelerde bu sayı gitgide artmaktadır. Meme kanseri erkeklerde de görülmektedir. Meme kanserine hassas olan erkeklerin sayısının Amerika'da yıllık 1500 kişiye ulaştığı ve bu erkeklerden 270'inin meme kanserini yenemeyerek öldüğü belirtilmiştir [33]. İnsan meme kanseri yaygın olarak metastaz yapan bir kanser türüdür. Lenf nodları dışında metastazın gerçekleşebileceği bölgeler kemikler, karaciğer ve akciğerlerdir [33]. Meme kanseri belirtileri göstermeyen kadınların 1/3'lik bir kısmına ilk muayenede meme kanseri teşhisi konulmakta ve hatta ilk teşhis sırasında bu hastalarda metastazın meydana gelmiş olduğu görülmektedir [31].

MCF-7 hücreleri ile farklı laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda bu hücrelerin DNA parçalanması geçirebileceği, östrojen ve antiöstrojenlere farklı hassasiyetlerinin olduğu, farklı östrojen reseptörlerini (ER) ifade ettikleri, ER-mRNA ve farklı tümörjenite ve proliferatif özelliklerinin olduğu kaynaklarda belirtilmektedir. Böylesine agresif ve yaygın bir kanser türü olan meme kanserinin araştırılmasında insan meme kanseri hücre hattı MCF-7'nin *in vivo* ortamda çok az heterojenite göstermesi nedeni ile yeni bir araç olarak kullanılmaktadır [33].

#### **2.1.1.1. Meme kanseri nedenleri ve oluşum mekanizmaları**

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinin oluşum ve gelişiminde hem genetik hem de çevresel etmenler rol oynamaktadır [30]. Hücrelerde, proliferasyon, hücre hacminin korunması, katı maddelerin taşınımı, enzim aktivitesi, salgı, invazyon, hücreler arası haberleşme gibi birçok biyolojik fonksiyonun gerçekleşmesinde görev alan iyon kanallarında meydana gelen anomaliler kanser oluşumu ve gelişiminde büyük role sahiptir. Ayrıca meme kanseri hücreleri hormon duyarlılığı, kemik dokulara metastaz gibi agresiflik özelliklerine sahiptir [30].

Bu metastazın özellikle kemik dokuya gerçekleşmesinin moleküler mekanizması henüz tamamen açıklanmamıştır fakat kemik dokuya kanser hücrelerinin yerleşmesi, büyümesi, koloni oluşturması ve hayatta kalmayı sürdürmesi için gerekli mikro çevreyi sağlaması kemik dokuya olan metastazın nedeni olarak görülmektedir [34].

Hücre adezyon moleküllerinin normal hücrelerde hücre-hücre yapışmasında görevli olduğu ve bu moleküllerin kaybının veya anomalisinin hücre-hücre adezyonunun kaybına neden olarak kanserleşme ve metastaza yol açtığı kaynaklarda açıkça belirtilmektedir. Bu hücre adezyon moleküllerinden E-kaderinin iki hücre arasında yer alan bölgede kemirgen ve insan meme karsinoması hücrelerinde *in vitro* koşullarda eksprese edilmemesi, meme kanserinin *in vitro* koşullarda invazyon özelliği göstermeyeceği şeklinde araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bunun aksine, kültür ortamında MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı ailesine ait bir çeşit hücre hattında hücre yüzeyinde E-kaderin eksprese etmesine rağmen invazyon görüldüğü bulunmuştur [36]. *In vivo* koşullarda ise E-kaderinlerin kaybının birçok epitelyal kökenli karsinomada olduğu gibi meme kanserinin de oluşum ve metastaz nedenlerinden biri olduğu gösterilmiştir. Meme kanserinin en yaygın tipi olan duktal karsinoma vakalarının %50'sinde E-kaderin ekspresyonunun azalmış olduğu, daha az görülen lobular karsinoma

vakalarının %6'sında ise E-kaderin ekspresyonunun tamamen yok olduğu gösterilmiştir [32].

Meme kanserinin oluşumunda gen mutasyonlarının da rolü büyüktür. Bu kanser türünde birçok genin tamamen mutant olduğu bilinmektedir. Meme kanserindeki bu mutasyonların hangilerinin hangi tip meme kanserini oluşturmada etkili olduğunun bilinmemesinin yanı sıra normal bir meme dokusu hücresinin kanser hücresine dönüştürülmesinde kaç adet genin mutasyona uğraması gerektiği de bilinmemektedir [37].

Kanserin oluşumu için bu mutasyonların tamamının aynı hücrede aynı anda bulunması gerekli değildir. Mutasyona uğrayan genlerden biri de p53 genidir. Bu durum meme kanseri vakalarında yaklaşık %50'lik bir payla kanser hücresinin 16'ncı kromozomunun uzun kolundaki heterozigotluk kaybından kaynaklanmaktadır [32].

Meme kanserinde retinoblastoma proteininin deregülasyonunu gerçekleştirecek hatta eksprese edilmesini baskılayacak gen mutasyonlarının da meydana geldiği bilinmektedir. Siklin-D'nin ekspresyonunun artması, Ras sinyalleşme yolağındaki HER-2neu geninin aşırı ifadesi şeklindeki mutasyonlar da meme kanseri oluşum mekanizmaları arasında kaynaklarda yer almaktadır [37].

#### **2.1.1.2. İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7**

İnsan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri ATCC (American Type Culture Collection)'dan temin edilmiş olup epitelyal kökenli, 69 yaşındaki Kafkas kökenli (Beyaz ırk) bir kadından elde edilmiş olan aderent hücrelerdir. Esas ATCC numarası HTB-22 olan MCF-7 hücreleri Ref onkojenine, O antijenine ve östrojen reseptörüne sahip hücrelerdir. Bu hücrelerin jenerasyon süresi 29 saattir. MCF-7 hücreleri diğer insan meme kanseri hücre hatlarından sitoplazmik östrojen reseptörü aracılığıyla östradiolü işlemesi ve çoğalma sırasında kubbemsi öbekler oluşturmasıyla ayırt edilmektedir. ATCC'den temin edilen tüm hücre hatları gibi MCF-7 hücreleri de donmuş olarak alınmakta ve ATCC'nin önerdiği besi yerlerinde (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM; Roswell Park Memorial Institute Medium, RPMI) , %95 nem; %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37°C'de çoğaltılmaktadır. Bu hücrelerin çoğalma özelliği tümör nekroz faktör alfa (TNF alfa) tarafından baskılanmıştır. MCF-7 hücrelerinin üretildiği besi yeri içeriğinde %10 fetal dana serumu (FBS) ve kontaminasyonları önlemek amaçlı olarak %1 oranında antibiyotik bulunmaktadır [38].

## 2.2. Vanadyum ve Vanadyum Bileşikleri

Vanadyum elementi İŖveçli kimyacı Nils Sefstrom tarafından 1830 yılında keŖfedilen ve ismini güzellik ve bereket tanrısı Vanadis'den alan ve yerkürede en çok bulunan elementler arasında 22. sırada bulunan bir elementtir. Vanadyum periyodik cetvelde dördüncü kısmında, VB grubuna dahil, ilk geçiŖ serisini oluŖturan d-blokta bulunan grimsi renkli metalik bir elementtir. Vanadyumun atom numarası 23'dr ve -1, 0, +2, +3, +4 ve +5 gibi farklı oksidasyon seviyelerinde bulunabilmektedir. Biyolojik sistemlerde +3 (vanadik), +4 (vanadil) ve +5 (vanadat) oksidasyon seviyeleri oldukça yaygındır. Vanadil formu biyolojik sistemlerde en stabil formdur. Vanadyum birçok memeli dokusunda i eleman olarak yer almakta ve genellikle mikronutrient olarak isimlendirilmektedir. Bu element memelilerin gerektiği gibi büyüyüp geliŖmesi için fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları nedeniyle önemlidir [39]. Diğer metal elementlerden ayrı olarak vanadyumun normal hücre metabolizması için eser miktarlarda gerekli olan 40 mikronutrient arasında yer alması vanadyumu değerli kılmaktadır. Besin maddesi olarak ilk önce sucul canlılarda bulunarak dikkatleri ekmiŖtir. Hücrede DNA'nın genom instabilitesine yol açılarak kanser oluŖumunu vanadyum önlemektedir. Vanadyumun vücuda alınışı genellikle besin yoluyla olmaktadır. Tavuk, balık, karaciğer, ıspanak, karabiber, maydonoz, meyve ve sebzeler vanadyumun ana kaynaklarıdır. Beslenme tarzına bağlı olarak insanların günlük diyetinde 10 µg -60 µg vanadyum yer almakta, insan vücudunda depolanması ise 100 µg miktarında olmaktadır [37].

Vanadyum ve farklı vanadyum bileŖikleri yeni biyolojik regülatörler olarak isimlendirilmektedir. Bu isimlendirme vanadyumun biyolojik sistemlerdeki bifazik etkisinden kaynaklanmaktadır. Bu etki vanadyum bileŖiklerinin dŖk konsantrasyonlarda biyolojik sistemlerde esansiyel özelliğe sahipken daha yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermeleri ile ortaya çıkmaktadır.

### 2.2.1. Vanadyum bileŖiklerinin biyolojik zellikleri

Vanadyumun doğada multivalent olarak bulunmasının kompleks kimyasal yapısından kaynaklandığı belirtilmektedir. Bu kompleks yapı vanadyumun biyolojik ve biyokimyasal özelliklerini doğurmaktadır. Vanadyumun ve bileŖiklerinin vücuttaki emilimi, atılması ve birikme mekanizması henüz tam olarak anlaŖılamamıŖtır. Vanadyumun alınan miktarının %10 kadarının ince barsaktan emildiği yönünde bazı bilgiler mevcuttur [40]. Aynı Ŗekilde tam aydınlatılamamıŖ bir mekanizma ile besinle

alınan vanadyumun duodenuma geçmeden önce midede katyonik vanadil formlarına dönüştüğü rapor edilmiştir [41]. Şimdiye kadar belirtilen özellikleri ve etkilerinden başka vanadyum bileşiklerinin ATPaz, protein kinaz, ribonükleaz ve fosfataz aktivitesine yol açma, genotoksik ve mutajenik etkilerle birçok DNA veya RNA enzimini stimüle veya inhibe etme, testis hücrelerinde *in vivo*'da 24 saat uygulamadan sonra DNA'da tek zincir kırıklarına neden olma gibi bir çok sitotoksik etkilere sahip olduğu kaynaklarda yer almaktadır [41]. Aynı zamanda, Jurkat T lenfositleri ve rat bazofilik lösemisi mast hücrelerinde kalsiyum sinyalleşmesini indükleme ve kalsiyum salınımı teşvikli kalsiyum kanallarının aktivasyonuna neden olduğu belirtilmiştir [40, 42]. Biyolojik sistemlerdeki vanadyum bileşiklerinin en önemli biyolojik özellikleri antidiyabetik ve antikarsinojenik etkileridir. Vanadyumun anyonik transport sistemi aracılığıyla anyonik vanadat formunun vanadil formuna göre beş kat daha fazla alındığı bilinmektedir. *In vivo*'da vanadil formunun vanadata okside olduğu kaynaklarda belirtilmektedir. Kana geçen vanadat tekrar vanadil formuna dönüşürken kanda aynı zamanda vanadat olarak da bulunmaktadır. Kandaki vanadat formları transferrin ile vanadil formları ise hem albumin hem de transferrin ile dokulara hızlıca taşınmaktadır. Bu sayede vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin bol bulunduğu besinlerin çokça tüketilmesinden sonra kan parametrelerinde hiç bir toksik etkiye rastlanmamaktadır [41]. Vücutta emilememiş vanadyum, dışkıyla dışarıya atılmaktadır. Farklı uygulama yöntemleriyle organizmaya uygulanan vanadyumun farklı oranlarda emildiği, dışkıyla atılan vanadyum miktarına bakılarak anlaşılabilir fakat dışkıda tayin edilen vanadyum vücutta emilen veya atılan vanadyum miktarının bir göstergesi değildir. Örneğin, parenteral yolla uygulanmış vanadyumun %10'u dışkıyla dışarı atılmaktadır. Vanadyumun safra ve idrarla da dışarıya atıldığı gösterilmiştir [41].

Vanadyum ve vanadyum bileşikleri hem *in vitro* hem de sistematik toksisite özelliği göstermektedirler. Vanadyum bileşiklerinin farklı ATPazların, ribonükleazların, protein kinaz ve fosfatazların aktivitesini engellediği bilinmektedir [41]. Bu bileşiklerin farklı DNA ve RNA enzimlerini inhibisyon veya aktivasyon şeklinde etkileyerek mutajenik ve genotoksik özellik gösterdiği bulunmuştur [41]. Vanadyum bileşiklerinin kandaki tiroid hormonlarını denetlemesi gibi önemli bir özelliği de vardır. Vanadyum eksikliği vücutta tiroid kütlesi ve tiroid/vücut kütlesi oranını azaltarak vücut tiroid metabolizmasını kötü yönde etkilemektedir. Ayrıca bu bileşikler glukoz ve lipid metabolizmalarını da etkilemektedir. Vanadyum bileşiklerinin eksikliği ve dolayısıyla da vanadyum



eksikliğinin organizmada, özellikle tavuk ve ratlarda gelişme geriliği, döllenme bozuklukları, lipid metabolizması bozulması ve böbrek, beyin ve kalpteki  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [41].

### 2.2.2. Vanadyum bileşii türleri

Vanadyum elementinin farklı yapıda bileşiklerinin ticari formları mevcuttur. Bu bileşiklerin birçoğu hayvan model sistemlerinde diyabet tedavisi için kullanılmıştır. Bu uygulamalardaki vanadyum bileşikleri ağız yolu ile alınabilen farklı vanadyum bileşikleridir ve oksidasyon seviyeleri IV'dür. Bu farklı bileşiklere örnek vermek gerekirse, naglivan bis(N-octylcysteineamido) oxovanadium (IV), bis(maltolato) oxovanadium, bis(maltolato) oxovanadium etil türevleri, bis(picolinato) oxovanadium, bis(cysteine methyl ester) oxovanadium gibi birçok vanadyum bileşii örnek vardır. Bu vanadyum bileşikleri, asidik şartlar altında çok kısa ömürlü olduklarından, bunların türediği ana maddelerin mide koşullarında oluşabileceği belirtilmiştir [43].

Vanadyumun farklı oksidasyon seviyelerinde bileşikleri mevcuttur. Oksidasyon seviyesi (IV) ve (V) olan vanadyum bileşiklerinin kimyası, insülin gibi davranarak kan şekeri seviyesini düşürdükleri kaynaklarda yer almaktadır. Örneğin oksidasyon seviyesi (IV) olan  $\text{VO}(\text{acac})_2$ ,  $\text{VO}(\text{Et-acac})_2$  ve  $\text{VOSO}_4$  bileşikleri *in vivo* modellerde kan glukoz seviyelerini düşürürken oral yoldan uygulanan (V) oksidasyon seviyeli vanadyum bileşiklerinin de aynı etkiyi gösterdiği belirtilmiştir [43]. Vanadyumun fizyolojik şartlara en uygun bileşikleri vanadil sülfat, sodyum metavanadat, sodyum ortovanadat ve vanadyumdur [41]. Bu bileşiklerin toksisitesi değerklerinin artmasıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Vanadyum (IV) bileşiklerinin serbest radikal oluşumunu tetikleyerek DNA zincir kırıklarına yol açtığı, ticari formu en bol bulunan vanadyum bileşii olan vanadyum pentaoksidin ise akciğer kanseri hücrelerinde ve testis hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda hücrelerde DNA'da tek zincir kırıklarına neden olduğu belirtilmektedir [41]. Siklopentadienil organometalik kompleksler de denilen vanadyum (IV) bileşikleri vanadocene dichloride, vanadocene dibromide, bis(methyl cyclopentadienyl) vanadium dichloride, vanadocene diiodide, vanadocene di-pseudohalides ve en aktif form olan vanadocene diselenocyanate bileşikleri spermisidal aktiviteye sahiptirler [44].

Vanadyum bileşiklerinin etkisi oksidasyon seviyelerine göre değişiklik göstermektedir ve kimyasal yapılarının kompleks olması nedeniyle etkilerinin tam olarak

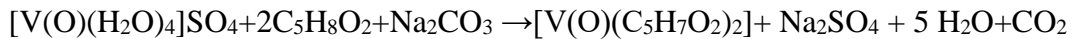
ortaya konulması zordur. Vanadyum bileşiklerinden (III), (IV) ve (V) oksidasyon seviyesinde olan bileşiklerin etkileri birbirilerinden farklıdır. Bu bileşiklerin her biri DNA’da zincir kırıkları meydana getirirken vanadyum (III) trioksitin yapısal koromozom hasarına neden olduğu, vanadyum (IV) tetraoksitin yapısal kromozom değişikliklerine neden olduğu vanadyum (V) pentaoksidin ise sadece DNA’da tek zincir kırığına yol açtığı belirtilmektedir [45].

### 2.2.2.1. Vanadil sülfat

Vanadil (IV) sülfat (VOSO<sub>4</sub>), vanadyum elementinin en çok bilinen inorganik bileşikleri arasında yer almaktadır ve yüksek stabilitesinden dolayı vanadyumun laboratuvalarda en çok yer alan şeklidir. Vanadil sülfatın vanadil iyonu (VO<sup>2+</sup>), en stabil diatomik iyon olarak adlandırılmaktadır [46]. Vanadyumun petrol kalıntılarında saflaştırılması sırasında ara madde olarak oluşan vanadil sülfat vanadyumun başlıca ticari formudur [47]. Daha önceleri de bahsedilmiş olduğu üzere vanadil sülfat bazı gıdalar (meyve, sebze, tahıl ve baharatlar) ve deneysel ilaçların yapısında da bulunmaktadır ve insüline benzer etki gösterme özelliği mevcuttur [48]. Vanadil sülfat genellikle vanadyum pentaoksidin kükürt dioksitle redüksiyonu sonucunda elde edilmektedir. Bileşiğin bu şekildeki eldesini ifade eden reaksiyon aşağıda yer almaktadır;



Bu reaksiyonda sulu çözeltide tuz pentahidrat şeklinde kristalize olur ve beşinci su molekülü katı haldeki metale bağlanmaz. Oluşan bu komplekste iyon oktahedraldir ve okzo, 4 ekvatoryel su ligandına ve monodentat sülfata sahiptir [46]. V=O bağının uzunluğu 1.6 Å’dir ve V–OH<sub>2</sub> bağından yaklaşık olarak 0.5 Å kadar daha kısadır. Bu sülfat iyonu çözelti içinde hızlıca disosiyasyon olmaktadır. En yaygın olarak bulunan vanadyum bileşiği olan vanadil sülfat kolay ulaşılabilirliği sebebiyle diğer vanadil asetilasetonat gibi birçok vanadil türevlerinin de öncüsü konumuna gelmiştir [49]. Vanadil asetilasetonatın oluştuğu reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Asidik solüsyonlarda vanadil sülfat oksitlendiğinde sarımtırak vanadil (V) türevleri meydana getirmektedir. Örneğin çinko ile redüklenen vanadil sülfat yeşil rengi ile karakterize vanadyum (III) ve mor rengi ile karakterize vanadyum (II) türevlerini oluşturmaktadır. Suda çözünürlüğü yüksek sülfatların içinde, doğada en nadir rastlanan türev vanadil sülfattır. Bu bileşiğin susuz (anhidroz) formu olan pauflerite bir mineraldir

[50]. Sulu formları hexahidrat (stanleyite), pentahidratlar (minasragrite, orthominasragrite [51] ve anorthominasragrite) ve trihydrate–bobjonesite [52] formları da vanadil sülfat kadar olmasa da doğada nadir bulunan formlarıdır.

#### **2.2.2.1.1. Vanadil sülfatın fiziksel ve kimyasal özellikleri**

Vanadil sülfat mavi renkli toz ya da kristal halinde bir bileşiktir. Diğer bir adı vanadium (IV) oxide sulfate hydrate olan vanadil sülfatın kimyasal formülü  $VOSO_4 \cdot xH_2O$ 'dir ve erime noktası  $105^\circ C$ 'dir. Önerilen depolama şartlarında stabil bir bileşiktir. Vanadil sülfatın molekül ağırlığı  $163.00 \text{ g/mol}$ 'dür ve suda çözünürlüğü oldukça yüksektir. Bu bileşik nemli ortamda ve kuvvetli oksitleyici maddelerle bir arada depolanamayacak bir yapıya sahiptir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) vanadil sülfatın %0.1 veya daha büyük oranda bulunan hiçbir içeriğini muhtemel, olası ve onaylanmış kanserojen olarak tanımlamamıştır [53].

#### **2.2.2.1.2. Vanadil sülfatın kullanım alanları**

Vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin sahip oldukları biyolojik özelliklerinden dolayı farmakolojik ve terapötik önemleri vardır. Vanadyumun farmakolojik uygulamaları kandaki kolesterol, trigliserit ve glukoz seviyelerinin düşürülmesi, diüretik ve natriüretik etkileri, antikarsinojenik etkileri, kan damarlarının kasılması ve hemoglobin ve miyoglobinin oksijene olan ilgisini arttırma etkilerini kapsamaktadır [41]. Vanadil sülfatın deneysel hipertansif yapılan ratlarda, düşük dozlarda uygulanmasıyla kan basıncını düşürdüğü belirtilmiştir. Solunum, sindirim, deri gibi farklı yollarla organizmaya giren vanadyum, özellikle karaciğer, böbrek ve kemik gibi organlarda birikebilmektedir. Vanadil sülfat geçmişte ve günümüzde de kas yapıcı olarak vücut geliştirmede kullanılmakta ve ağırlık çalışan atletlerin performansını arttırmada kullanılmaktadır [41].

İnorganik bileşiklerin çağın hastalığı haline gelmiş olan kanserin tedavisindeki kullanımları 1931 yılından beri bilinmektedir [41]. Vanadyum bileşiklerinden vanadil sülfatın ( $VOSO_4$ ), ratlarda oluşturulan meme kanserini etkili bir şekilde önlediği tespit edilmiştir [41]. Vanadil sülfat, ince bağırsak pH koşullarında çözünmeyen vanadil hidroksit halinde bulunmaktadır. Bu özelliğinden dolayı oral uygulanan vanadil sülfat özellikle Wistar ratlarda leiomyelosarkomaya karşı ileri derecede etkili bulunmuştur [54]. Vanadil sülfatın uygulama alanlarından biri de diyabet tedavisidir. İnsüline bağımlı olmayan diyabette hastalara uygulanan vanadil sülfatın glukoz konsantrasyonunu hiçbir

toksik etkiye neden olmadan %20'lik bir oranla hızlıca düşürdüğü ve hiperinsulinemi durumunda karaciğerden glukoz salınımını azalttığı çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca vanadil uygulamasının diyabetli olmayan ratlarda böbrek taşı oluşumunu ve böbrek ve testis tümörlerinin oluşumunu engellediği gösterilmiştir [41].

### **2.2.3. Hastalıkların tedavisinde vanadyum bileşiklerinin rolü**

Vanadyum ve vanadyumun farklı bileşiklerinin kanser ve diyabet gibi hastalıkların gelişimini kontrol etmede pozitif etkiye sahip olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. Bu araştırmalarda çok düşük dozlarda vanadyum alınımının kanser gibi ölümcül hastalıkların önlenmesinde etkili olmasına vurgu yapılmıştır [41]. Vanadyum ve bileşiklerinin bazı yan etkilerinin olmasının yanı sıra iyi bir terapötik potansiyele sahip olduğu kabul edilmektedir. Vanadyumun yan etkileri, hafif mide-barsak rahatsızlığı (diyare), koroner arter hastalarında uzun süreli uygulamalarda anoreksiya, karın ağrısı ve kilo kaybı gibi etkilerdir [55, 56, 57]. İnsanlarda oral olarak vanadyum uygulanmasının kan hücreleri, kan akışkanlığı ve biyokimyasına etkisinin olmadığı fakat DNA zincir kırıklarına neden olabileceği bazı çalışmalarda belirtilmiştir [57]. Vanadyum bileşiklerinin hücrede yaptığı etkilerin hücreden hücreye farklılık gösterdiği kaynaklarda belirtilmiştir. Bazı insan tümörlerinde vanadyum bileşiklerinin düşük dozlarda tümörü stimüle ederken yüksek dozlarda koloni oluşumunu engellediği gösterilmiştir [57]. Araştırmalarda vanadatların fare embriyo fibroblastlarında hücre siklusunu G<sub>2</sub>/M fazında durdurduğunu, p53'e sahip hücrelerde ise S fazına geçişi teşvik ettiğini gösterilmiştir [57].

Gerçekleştirilen çeşitli kanser çalışmalarının sonucu olarak vanadyumun dokularda metal oluşturacak serbest radikal salınımı, enzimatik ve antioksidan savunmanın değiştirilmesi gibi yollardan hücrede oksidatif strese yol açtığı bulunmuştur [13, 58]. Ayrıca vanadyum uygulanan tümör hücrelerinde vanadyumun nükleik asitin çok olduğu bölgelerde biriktiği de ortaya konulmuştur [59].

#### **2.2.3.1. Vanadyum bileşikleri ve kanser ilişkisi**

Kanser tedavisi, kullanılan ilaçlar açısından oldukça maliyetlidir. Ayrıca, böbrek, karaciğer, kemik gibi hayati organlara zarar vermesi, saç dökülmelerine neden olması gibi yan etkileri bulunan yöntemleri kapsamaktadır. Birçok kanser ilacının sitotoksositeye neden olduğu ve birçok yan etkiler oluşturduğu bilinmesine rağmen, klinikte uygulamalarının yapıldığı bilinmektedir. Belirtilen nedenlerden dolayı yan etkisi

olmayan ve sitotoksikite göstermeyen kanser ilaçlarının geliştirilmesi bilimsel araştırmalarda ilk hedeflerdendir [30].

Vanadyum bileşiklerinin ideal bir antikanser ajanda bulunması gereken antiproliferatif etki, sitotoksik/sitostatik etki (Apoptoz/Nekroz), invazyon/metastazı azaltma veya baskılama, hücrede direnç geliştirmeme gibi özelliklerini bazen ayrı ayrı bazen de hepsini birden bulundurabildiği kaynaklarda belirtilmektedir (şekil 2.1.) [27]. Vanadyumun normal hücrelerden daha çok kanserli hücrelerde biriktiği ve normal meme dokusuna göre kanserli meme dokusunda vanadyum seviyesinin arttığı araştırmalarda gösterilmiştir [13]. Vanadyum bileşiklerinin ideal veya ideale yakın antikanser ajan özelliklerini göstermelerinden yola çıkılarak son 20 yıldır vanadyumun antineoplastik ajan olarak kullanımına yönelim artmıştır ve başarılı bir kanser tedavisi için çok farklı vanadyum bileşikleri sentezlenmiştir [18].

Dünyada yapılan klinik ve klinik öncesi deneylerden elde edilen sonuçlara göre vanadyumun insanda kanseri saptama, önleme ve tedavi etmede yüksek potansiyeli olan çok işlevli bir element olduğu da ortaya çıkarılmıştır [11]. Vanadyumun zamanla kanser hücrelerinin metastazı sırasında, hücre adezyon moleküllerini değiştirerek metastazı inhibe etme etkisi ve antineoplastik ilaçlara karşı geliştirilen direnci kırma özelliği olduğu da gösterilmiştir [11]. İnsan ve diğer canlılar bu geçiş metaline, atmosferdeki vanadyum kökenli kirlilik içeren duman, petrol yakıtı, petrol arıtımından serbestleşen havadan ve tüketilen besinler ile maruz kalmaktadır [13]. Vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin antikanser etkisi uzun yıllardan beri araştırılmıştır. Vanadyum tuzları ile yapılan ilk antikanser araştırması 1965 yılında yayınlanmıştır [11, 13, 60]. Vanadyum bileşiklerinin antitümörijenik etkisi T hücreli lösemi, B hücre lenfoması, testis, meme, rahim, böbrek, akciğer, gırtlak ve yutak kanseri hücre hatlarında farklı şekillerde araştırılmıştır [11, 13, 61, 62]. Vanadyum tuzları düşük dozda (0,5 µM) H35-19 rat hepatoma hücreleri üzerinde *in vitro*'da hücre morfolojisini çok etkilemeyen konsantrasyon olarak tespit edilirken bu konsantrasyonun üzerindeki uygulanan dozlar hücre organellerine zarar vermiş ve daha yüksek derecede sitotoksik etkili bulunmuştur [35]. A549 ve DU145 kanser hücre hatları ile yapılan başka bir çalışmada bu hücre hatları üzerinde vanadil sülfatın pro-apoptotik faktör özelliği gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu çalışmalar sonucunda vanadyumun antikanser etkisi vurgulanmıştır [62].



Şekil 2.1. Vanadyum ve Vanadyum Bileşiklerinin Antikanser Etkileri  
Kaynak: Evangelou, 2002, s. 3

### 2.2.3.1.1. Vanadil sülfat ve kanser ilişkisi

Doğada bol miktarda bulunan vanadyumun farklı bileşikler halinde, oral yoldan uygulanması hızlıca absorbe olup dokulara yayılmasına sebep olmaktadır. Bu yolla alınan vanadyumun özellikle kemik dokuda olmak üzere akciğerler, böbrekler, dalak ve kas gibi farklı dokularda biriktiği bilinmektedir [34]. Bu bilgiler doğrultusunda vanadil (IV) komplekslerinin *in vitro* koşullarda osteosarkom hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi araştırılmış ve antitümör etki gösterdikleri bulunmuştur [34]. Ayrıca vanadyum tuzlarının antitümör etkisinin vurgulandığı çalışmaların sayısı da son yıllarda artmıştır. Bir vanadyum tuzu olan vanadil sülfatın ve  $\text{NaVO}_4$ 'ün rat hepatoma hücre hattı H35-19'un canlılığı, morfolojisi ve proliferasyonu üzerine olan etkisi araştırılmış ve karşılaştırıldığı diğer vanadyum tuzlarıyla neredeyse aynı derecede etkili olduğu bulunmuştur [35]. Yine aynı çalışmada elektron mikroskobu incelemeleri sonucunda düşük dozdaki vanadyum tuzlarının düşük konsantrasyonda ( $0.5 \mu\text{M}$ ) hücre morfolojisini çok fazla bozmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda ( $2.5\text{-}5.0 \mu\text{M}$  ve üstü dozlar) hücre organellerine zarar verdiği ve daha yüksek sitotoksosite eğiliminde olduğu bulunmuştur [35].

Otokrin üremede görevli genlerin indüklenmesi neoplastik fenotipin gelişmesinde önemli bir aşamadır. Bu genler büyüme faktörleri ve reseptörleri düzenleyen genlerdir. Bu sebeple bu genlerin, reseptör ve büyüme hormonlarının arasındaki bağlantıyı çözmek

birçok tümör tipindeki patogenezi ve büyümeyi anlamada çok önemlidir. Vanadil sülfatı akciğer ve prostat adenokarsinoma hücreleri üzerinde canlılık inhibisyonu ve otokrin büyüme açısından değerlendiren araştırmacılar, vanadil sülfatın bu hücreler üzerinde inhibe edici etki gösterdiğini ve hücrelerde vanadil sülfat uygulamasından sonra apoptozun meydana geldiğini; hücreleri apoptoz yoluyla öldürdüğünü ortaya koymuşlardır [62]. Buna ilaveten diğer bir araştırmacı grubun gerçekleştirdiği çalışmada vanadil sülfatın HeLa hücreleri ve insan lenfositleri üzerinde DNA'da farklı hasarlara yol açtığı gösterilmiştir [63].

### **2.3. Sitotoksosite Testleri**

Sitotoksosite testleri aktif maddelerin hücreler üzerindeki toksik etkisini belirleme testleridir. Birçok sitotoksosite testi bulunmaktadır. Bu sitotoksosite testlerinden en yaygın olarak kullanılan test 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) testidir. Bu testin alternatifi olarak kullanılan diğer bir sitotoksosite testi de sulforodamin B (SRB) testidir. MTT testi canlı hücrelerdeki işlevi devam eden mitokondrinin MTT boyasını parçalamasına dayanmaktadır [64]. Çok hızlı, hassas ve düşük maliyetli bir testtir. SRB testi de az maliyetli, hassas ve kullanışlı bir sitotoksosite ölçüm metodudur. SRB metodu kültür flaskına yapışarak üreyen hücre hatları için uygun bir metottur. SRB yöntemi sulforodamin B'nin, trikloro asetik asit (TCA) ile fikse edilen hücrelerin proteinlerinde bazik amino asit kalıntılarına elektrostatik ve pH bağımlı olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır. Bu boya zayıf asidik koşullarda hücreye bağlanırken, zayıf bazik koşullarda hücrelerden ayrılmaktadır. Her iki sitotoksosite testinde de okumalar eliza cihazında ve 540 nm'de gerçekleştirilmektedir.

#### **2.3.1. MTT kolorimetrik sitotoksosite testi**

MTT *in vitro* koşullarda hücre metabolizmasını, canlılığını ve sitotoksositeyi ölçmek için kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek doğruluğa sahiptir. Sitotoksosite testlerinden en yaygın olarak kullanılan test olan MTT'nin protokolü ilk kez Mossman tarafından 1983 yılında geliştirilmiştir. MTT ile sitotoksosite ölçüm prensibi canlı ve sağlıklı mitokondriye sahip hücrelerin mitokondrilerinin uygulanmış olan sarı renkli (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) tetrazolyum tuzunun tetrazolyum halkasını parçalayarak mor renge çevirmesi esasına dayanmaktadır [64]. Bu reaksiyonda tetrazolyum tuzu, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimine

spesifik olarak bağlanmaktadır. Tetrazolium halkasının parçalanması ile soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor, suda çözünmeyen formazan kristali ürününe dönüşür. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözülür. Çözülmüş olan bu boya konsantrasyona bağlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbanı vermektir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Böylece, direkt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir [65].

#### **2.4. Katı Lipid Nanopartiküller**

Nanopartikül yapıdaki ilaç taşıma sistemleri 1000 nm'den küçük etken maddeleri morfolojik özelliklerini değiştirerek hedef bölgeye taşıyan ve bu bölgede kontrollü madde salınımı gerçekleştiren taşıyıcı sistemlerdir. İlaç taşıma sistemleri lipozom, misel, dendrimer, katı lipid nanopartikül gibi sistemlerden oluşmaktadır [66, 67]. Lipofilik ilaç taşıma sistemlerinin temelini teşkil eden ilk yağ emülsiyonu 1960 yılında parenteral besleme için Intralipid Wretling tarafından sentezlenmiştir. Lipofilik ilaç taşıma sistemlerinin ilk örnekleri Diazemuls ve Düziprivan isimli ticari ürünlerdir [68]. İlaç taşıyıcı emülsiyonların raf ömrünün az olması, kümeleşme ve ilacı hapsedememe şeklindeki stabilite sorunları vardır. Bu sorunlar emülsiyonların zeta potansiyeline bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [69].

Lipozomlar yüksek potansiyele sahip ilaçların hastalıkların tedavisindeki etkinliğinin artırılması ve toksik yan etkilerinin azaltılması amacıyla üretilen diğer bir ilaç taşıma sistemleridir. Bangham, lipozomları 1965 yılında fosfolipid veziküller lipozomlar şeklinde yeniden adlandırmıştır. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerin ilk ticari formları 1986 yılında sentezlenmiştir. Bundan yola çıkılarak üretilen farmasötik ürünler 1980'li yıllarda sentezlenmiştir [70]. Emülsiyonlarda olduğu gibi lipozom formülasyonlarında da sentez ve stabilite sorunları ortaya çıkmıştır. Bu sorunlar, sentezinin zorluğu, sınırlı dispersiyon stabilitesi, ilaç sızması, düşük aktivite ve bağışıklık sisteminin mononükleer fagositleri tarafından sindirilme şeklinde kaynaklarda belirtilmiştir [70].

Polimerik nanopartiküller biyodispersz veya biyodisperszitesi olmayan polimerlerden sentezlenen diğer bir ilaç taşıma sistemleridir. Polimerik nanopartiküller hedefe spesifik yönlendirilebilmeleri ve taşıdıkları ilaçların kontrollü salınımını gerçekleştirmelerinden dolayı diğer sistemlere göre daha avantajlı sistemler olarak



değerlendirilmektedir fakat bu nanopartiküllerin çok miktarda üretilmeleri sorun teşkil ettiğinden kullanımları çok fazla yer bulamamıştır [22].

İlaç taşıyıcı sistemlere 1991 yılında dahil olan katı lipid nanopartiküller (KLN) kolloidal taşıyıcı sistemlere getirilen yeni bir alternatif olarak, farklı ilaç taşıma sistemlerinin stabilite, uzun raf ömrü ve taşıdıkları ilacın degrade olmaması, kontrollü salınım ve tolere edilebilme özelliklerinin mevcut olduğu sistemler olarak ortaya çıkmıştır. KLN'ler yağ-su mikroemülsiyonlarının dondurularak kurutulması ve katı lipid ve lipid karışımlarının yüksek basınç altında homojenizasyonu ile sentezlenen katı nanopartiküllerdir. Vücut sıcaklığında ve oda sıcaklığında katı halde bulunurlar. Bu nanopartiküllerin katı haldeki matrisi taşıdıkları ilacın bozulmasını dolayısıyla da biyolojik aktivitesini kaybetmesini engellediği gibi, kontrollü ilaç salınımına da olanak sağlamaktadır. Bu nanopartiküller kolloid boyutta olup yüzeylerinde tek bir fosfolipid tabakası mevcut olan ve tek katı ve hidrofobik özellikteki çekirdeği olan ilaç taşıyıcısı olarak kullanılan nanopartiküllerdir. Boyutları lipozom ve nanopartiküller arasında bir boyuttur [22, 23, 70].

KLN'lerin insanlarda farmasötik ajan olarak kullanılabilmesi ispatlanmış ve onaylanmıştır [71]. Bu nanopartiküllerin fizyolojik tolere edilebilirliği yüksektir. Toksik olmayan çözücülerle ve yüksek miktarlarda üretilebilen katı lipid nanopartiküller, diğer ilaç taşıyıcı sistemlere göre çok daha avantajlı hale gelmiştir [71].

#### **2.4.1. Katı lipid nanopartiküllerin yapısı**

Katı lipid nanopartiküllerin yapısında katı lipidler, su ve kıvam arttırıcılar (emülgatör) vardır. Bu katı lipidler nanopartiküllerin yüzeyinde, bir tabaka fosfolipid molekülü, merkezinde ise bir adet katı hidrofobik çekirdek bulunmaktadır. Nanopartikülün boyutu 50-100 nm arasındadır. Trigliserid, yağ asiti, steroid ve mumlar KLN'lerin yapısında katı lipidler olarak bulunabilmektedir. KLN'nin yapısına giren emülgatörlerin oranı %1-5 arasındadır ve partikül stabilizasyonu da bu emülgatörlerin kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Lesitin, monogliseridler ve polisorbattlar, nanopartikülün uygulama alanı dikkate alınarak sentez için kullanılacak emülgatörler arasında yer almaktadır [25, 71].

#### **2.4.2. Katı lipid nanopartiküllerin kullanım alanları**

Katı lipid nanopartiküller, diğer nanopartiküller ve farmasötik ajanlar farklı kullanım alanlarında yer almaktadır; ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır [22,

23, 63]. Kullanım şekline bağılı olarak taşıdıkları etken maddenin özelliklerine göre katı lipid nanopartiküller farklı amaçlarla kullanılabilirler. Örneğin antikanser özellikteki all-trans retinoik asit yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle katı lipid nanopartiküllere yüklenmiş ve antikanser etkinliğinin katı lipid halinde olmayan all-trans retinoik asite göre daha yüksek olduğu yani biyoyararlanımının artmış olduğu gösterilmiştir [72, 73].

Topikal olarak uygulanan katı lipid nanopartiküller iyi tolere edilebildikleri ve deri üzerinde film oluşturmaları özellikleri ile örtücü etki göstermektedirler. Bu tip uygulama yapıldığında kimyasal yapısı dayanıksız bileşiklerin nanopartikül içinde korunarak etken maddenin kontrollü salınımı gerçekleştirildikleri gösterilmiştir. Böyle kontrollü ilaç salınımı yapan katı lipid nanopartiküller akıllı katı lipid nanopartiküller olarak adlandırılmış ve tedaviye çok yeni ve etkili bir yaklaşım oluşturdukları araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [69].

Enflamatuar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde de katı lipid nanopartiküller kullanılmaktadır. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan antiinflamatuvar ve bağışıklık baskılayıcı etkisi olan maddeler katı lipid nanopartikül olarak uygulandığında etken maddenin deriden penetrasyonunun ve antiinflamatuvar aktivitesinin çok daha güçlü olduğu belirtilmiştir. Örneğin, karragen ile tetiklenen sıçan pençe ödeminde, uygulanan katı lipid nanopartikül dispersiyonunun antiinflamatuvar aktivitesinin, katı lipid mikroemülsiyonundan daha güçlü olduğu bulunmuştur [74].

Katı lipid nanopartiküller sahip oldukları etken maddeleri kimyasal bozulmaya karşı koruma, yüklenen aktif bileşenin kontrollü salınımı, film tabakası oluşturarak örtücü etki gösterme, ultraviyole bloke etme gibi avantajlı özelliklerine bağılı olarak kozmetik alanlarda da uygulanabilmektedir. Ayrıca güneşten koruyucu ajanlar için de taşıma sistemi olarak kullanılmaktadırlar [75]. Bunun dışında, akciğerlere uygulandıklarında bronşlarda ve alveollerde depolanabildikleri için etken maddeyi kontrollü salmak ve buna ilaveten de akciğer makrofajlarına ilaç hedeflemek amaçlı da kullanılabilirler [69]. Hedefli ilaç olarak hepatik neoplazma ve hepatit gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılabilirler çünkü işleme maruz kalmamış katı lipid nanopartiküller i.v. uygulandığında karaciğerin Kupffer hücrelerinde birikmektedir. İlaçların beyine hedeflenmesinde de yine katı lipid nanopartiküller kullanılabilir. Beyine hedeflemede katı lipid nanopartikülün kan-beyin bariyerindeki endotel hücrelerine yapışabilmesi ve beyin tarafından alınması için partikül yüzeyine kan proteinlerinin (apolipoproteinler) absorpsiyonu gerçekleşmektedir [21]. Adezyona bağılı olarak yapışma özelliğine sahip

olan katı lipid nanopartiküller göz hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir. Tavşan gözünde gerçekleştirilen bir çalışmada, tobramisin katı lipid nanopartikül formülasyonunu her bir tavşanın bir göz altı konjunktival kesesine 100 µL hacminde uygulanmış, aynı tavşanın diğer gözünün alt konjunktival kesesine ise referans bir göz damlası uygulanmıştır [27]. Deneyler sonucunda tobramisin katı lipid nanopartikül dispersiyonunun referans göz damlasına göre, göz salgısında daha yüksek tespit edildiği açıklanmıştır. Yani katı lipid nanopartikül dispersiyonu uygulandığında gözdeki görüntüyü bozmadan daha yüksek etken madde konsantrasyonuna ulaşarak, ilacın gözde daha uzun süre kalması sağlanmıştır [27]. Katı lipid nanopartiküllerin çok farklı bir kullanım alanı da aşılarda adjuvan olarak kullanılmalarıdır. Vücudun katı lipid nanopartikülleri çok iyi tolere etmesi ve bu partiküllerin biyodegradasyona uğrayabilmeleri nedeniyle klasik adjuvanlara göre, daha çok tercih edilmelerine yol açmıştır [69].

#### **2.4.3. Katı lipid nanopartiküllerin avantaj ve dezavantajları**

Katı lipid nanopartiküller diğer ilaç taşıma sistemleriyle karşılaştırıldığında, kolloidal boyutta olmaları, ilaç yükleme kapasitelerinin yüksek olması, toksik kalıntı bırakmamaları, biyodispers olmaları, kontrollü ve hedefli ilaç salınımına olanak sağlamaları, çok miktarda üretilebilmeleri ve endüstriyel üretimlerinde kolay bulunabilir ve çok maliyetli olmayan donanımları gerektirmeleri gibi önemli avantajlara sahiptir [76, 77, 78]. Bu nanopartiküller, lipozom ve emülsiyonların ve buna ilaveten katı partiküllerin de avantajlarının toplamına sahip olan, ekonomik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Katı lipid nanopartiküllerin hem sistemik hem de sitotoksik etkilerinin düşük olması ayrıca çözücülerinden organik kalıntı bırakmamaları ve endüstriyel boyutlarda üretilebilmeleri gibi pozitif özellikleri yağ emülsiyonlarında da mevcuttur. Hedeflenebilir ilaç özelliği ise, lipozomlarda da bulunan avantajlı bir özelliktir. Katı polimerik nanopartiküllerin özelliği olan kontrollü etken madde salımı ve kimyasal degradasyondan etken maddenin korunması özellikleri de katı lipid nanopartiküllerin avantajları arasındadır [25, 26]. Önemli bir avantajları da kolloidal büyüklükte olup lipofilik ve hidrofilik etken maddelerin yüklenebilir olmasıdır. Otoklav veya gama ışınları ile steril edilebilir olmaları, uzun süre stabilize durumda kalabilmeleri ve yüzey morfolojisi ve özelliklerinin değiştirilmesiyle dokulara özel ilaç hedeflemesi yapılabilir olması en önemli avantajları arasındadır [7, 26, 69, 70, 79]. Kolloidal ilaç taşıma sistemlerinden katı lipid

nanopartiküllerin tercih edilmesi 12-36 ay gibi uzun bir kimyasal stabiliteye sahip olmalarıdır [79]. Katı lipid nanopartikülün içindeki etken madde çok uzun süre stabil kalamayacağından, sıvı dispersiyon dondurularak veya püskürterek kurutma yoluyla katı toz haline getirildikten sonra saklanmalıdır. Bu kurutma işlemleri sırasında partikül agregasyonu azaltmak için kriyoprotektanların kullanımı gereklidir. Granülat veya tozların kapsüllere veya tablete dönüştürülmesi nanopartikülün raf ömrünü uzatmakta ve uzun süre kullanım açısından avantajlı hale getirmektedir [71].

Katı lipid nanopartiküller, burada bahsedilen avantajları dışında az da olsa kullanım sınırlılıklarına da sahiptirler. Bu dezavantajlı özellikler, etken madde yükleme kapasitelerinin nispeten düşük olması, kolloidal yapılarından dolayı ortamda farklı kolloidal formülasyonların da bulunabilme riski ve stoklama süresince meydana gelen polimorfik geçişler sebebiyle etken madde sızması gibi kullanım sınırlılıklarıdır [22, 71].

#### **2.4.4. Katı lipid nanopartiküllerin sentezlenmesi**

Günümüzde hastalıkların tedavisinde kontrollü ve hedefli ilaç salınımı uygulamalarına yönelik araştırmalar artmıştır [71]. Bu araştırmalar kapsamında kolloidal ilaç taşıma sistemleri ve bunların avantajlı özelliklerinin kombinasyonlarına sahip olan katı lipid nanopartiküller de çok araştırılan konulardır. Katı lipid nanopartiküllerin endüstriyel boyutta üretilebilir olması ve diğer kullanım avantajları nanopartikülün kullanım alanını belirlemektedir. Bu özellikler de katı lipid nanopartikülün sentezlenme yöntemindeki farklılıklardan ve partikül sentezinde kullanılan maddelerin farklılıklarından kaynaklanmaktadır [71]. Birçok nanopartikül sentezleme yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler, yüksek basınçlı homojenizasyon (sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon), mikroemülsiyon, çözücü emülsifikasyon/evaporasyon/çözücü difüzyon ve yüksek hızda karıştırma ya da ultrasonikasyon yöntemleridir [22].

##### **2.4.4.1. Katı lipid nanopartiküllerin sentezleme yöntemleri**

###### **2.4.4.1.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi**

Katı lipid nanopartiküllerin sentezlenmesinde güvenilir ve etkili olarak kullanılan bir yöntem olan yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, çok kısa bir mesafeden, çok yüksek hızla, partiküllerin mikrondan daha küçük parçalara ayrılması esasına dayanmaktadır. Bu sentez işlemi, yüksek basınçlı homojenizatörler ile gerçekleştirilmektedir. Bu homojenizatörler yüksek basınç altında (100-2000 bar), mikron seviyedeki bir delikten sıvıyı iter ve kısa bir süre sonra yüksek bir hıza (>1000

km/saat) ulaşan sıvı, yüksek kayma gerilimi ve kavitasyon kuvvetleriyle parçacıkları çok küçük boyutlara kadar parçalayabilmektedir [71]. Yüksek basınç altında gerçekleştirilen homojenizasyon yöntemi sıcak veya soğuk olarak iki türde uygulanabilmektedir:

### ***Sıcak homojenizasyon yöntemi***

Yüksek basınçlı homojenizasyon çeşiti olan sıcak homojenizasyon, emülsiyon homojenizasyonu olarak da nitelendirilmektedir. Bu yöntemde, lipidin erime noktasının üstündeki sıcaklıklarda çalışılmaktadır [71]. Sıcak homojenizasyonda, erime noktasının 5-10<sup>0</sup>C üzerindeki bir sıcaklıkta eritilmiş olan lipid içerisinde etken madde dispers edilir ve sıvı emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızda karıştırarak sıcak pre-emülsiyon sentezlenmiş olunur. Pre-emülsiyonun homojenizatörle homojenize edilmesi sonucu sıcak nanoemülsiyonu elde edilir [22]. Nanoemülsiyon rekristalize olması için oda sıcaklığında bekletilir. Soğuk ve rekristalize nanoemülsiyon, sentezlenen katı lipid nanopartikülleri oluşturmaktadır [22, 24]. Bu sentez yönteminde kullanılan lipid türüne göre, nanoemülsiyonun rekristalizasyonu için oda sıcaklığından daha düşük sıcaklıklarda bekletilmesi gerekmektedir. Sıcak homojenizasyon yöntemi, sıcağa duyarlılığı az olan etken maddelerin sentezlenmesi için kullanılan bir yöntemdir [24].

### ***Soğuk homojenizasyon yöntemi***

Soğuk homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon yöntemindeki dezavantajları ortadan kaldırmak için geliştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde katı lipid nanopartiküle yüklenecek olan etken maddenin degradasyonu, sulu fazda dağılması, rekristalizasyonunun zorluğu gibi sıcak homojenizasyonda karşılaşılabilecek dezavantajlar yaşanmamaktadır [71]. Soğuk homojenizasyon yönteminde etken madde erimiş lipidin içinde çözülür veya disperse edildikten sonra kuru buz ya da sıvı azot içinde hızla soğutulur. Soğuduktan sonra katılaştıran lipid, mikropartikül (50-100 µm) şeklinde öğütülerek, soğuk emülgatör çözeltisinde disperse edilir. Bu süspansiyonun normal şartlar altında yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilmesiyle katı lipid nanopartikül sentezi tamamlanmış olur [22, 24, 71].

Sıcak ve soğuk homojenizasyon yöntemleri lipid oranı %40'a kadar olan nanopartiküllerin sentezlenmesi için uygun metotlar olup partikül boyutu dar aralıkta olan dağılımlar vermektedir [22].

#### **2.4.4.1.2. Mikroemülsiyon yöntemi**

Mikroemülsiyon yöntemi Gasco ve arkadaşları [79] tarafından geliştirilen mikroemülsiyonları dilüe ederek katı lipid nanopartikül sentezlemeye dayanan bir yöntemdir [79]. Mikroemülsiyon yönteminde önce lipid eritilir. Daha sonra, su, emülgatör ve koemülgatör karışımı ısıtılarak eritilen lipid ile aynı sıcaklığa getirilir. Bu iki ısıtılmış karışımın birbiriyle karıştırılmasıyla elde edilen saydam, sıcak ve termodinamik stabil mikroemülsiyon, termostatlı şırıngada soğuk su (2–3<sup>0</sup>C) içinde mekanik olarak karıştırılarak disperse edildikten sonra, suyun (1:25 ile 1:50'den fazla su) fazlası ultrafiltrasyon ya da liyofilizasyon ile uzaklaştırılarak katı lipid nanopartikül sentezlenmiş olunur [22, 24, 71].

#### **2.4.4.1.3. Çözücü emülsifikasyon-eyaporasyon veya çözücü difüzyon yöntemi**

Çözücü emülsifikasyon-eyaporasyon yöntemi, ısı uygulaması olmadan gerçekleştirilen ve bu açıdan yüksek sıcaklıklarda degrade olan etken maddelerden nanopartikül sentezlenmesi için avantajlı olarak görülen bir katı lipid nanopartikül sentezleme yöntemidir. Bu yöntemde, lipid, suyla karışmayan ya da kısmen karışabilen organik bir çözücüde çözülerek sulu bir faz içinde emülsifiye edilir. Emülsiyondaki çözücü bir vakum altında buharlaştırılarak ortalama büyüklüğü organik fazdaki lipid konsantrasyonuna bağlı olan lipid nanopartiküllerin oluşumu ve dibe çökmesi sağlanmaktadır [71, 79]. Çözücü difüzyon yöntemi olarak da bilinen bu yöntemde, organik çözücülerin kullanılması ve çok miktarlarda ürün üretiminin zor olması, dezavantaj olarak görülmektedir [24]. Çözücü difüzyon yöntemi ile nanopartikül sentezlenmesi sırasında toksisitesi düşük çözücüler tercih edilmelidir. Araştırmacılar, düşük toksisiteli olarak kabul edilen benzil alkol ve bütil laktat kullanarak gliserin monostearat nanopartiküllerinin sentezini gerçekleştirmiştir [72].

#### **2.4.4.1.4. Yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon yöntemi**

Yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemleri, beraber kullanılan, kısmen yüksek sıcaklıklarda uygulanan, çok kolay ve yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Her yöntemde olduğu gibi bu yöntemlerde de dezavantajlar vardır. Yüksek hızda karıştırma yönteminin dezavantajı, partikül boyutu geniş bir aralıkta değişen ve mikrometre büyüklüğüne varabilen partiküllerin sentezlenmesi, dolayısıyla da stoklama sırasında partiküllerin büyümesidir. Ultrasonikasyon yönteminin dezavantajı ise, partiküllere metal kontaminasyonu olması durumudur [22, 71]. Bu dezavantajlardan yola

çıkarak, araştırıcılar yöntemi modifiye etmiş ve organik çözücülerini kullanmadan, kaliteli katı lipid nanopartikül üretilebilecek daha basit, düşük maliyetli ve etkili bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yeni yöntemin nanopartikül üreticileri tarafından yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemine göre daha çok tercih edileceği düşünölmektedir [80, 81].

Hangi yöntemle sentezlenmiş olursa olsun katı lipid nanopartiküllerin stabil ve uzun ömürlü olmaları için, kurutularak saklanmaları gerekmektedir [71]. Sentezden sonra daha uzun süre saklamak için nanopartiküllerin sterilize edildikten sonra saklanmaları gerekmektedir. Katı lipid nanopartiküllerin sterilizasyonunda, içerikleri ve sentezlenme yöntemlerine bağlı olarak, otoklav, gama ışınları veya filtrasyon gibi farklı sterilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır [71]. İçeriği ve üretim şeklinden dolayı sterilizasyonu gerçekleştirilemeyecek olan katı lipid nanopartiküllerin ise, aseptik koşullar altında sentezlenmesine dikkat edilmesi gerekmektedir [24]. Nemli ve basınçlı olan otoklavlama işlemeine dayanıklı olmayan partiküllerin sterilizasyonunda, yine yapısı ve üretim şekline dikkat edilerek, gama ışınlama veya filtreleme ile sterilizasyon tercih edilebilmektedir. Tüm bu işlemlerin gerçekleştirilmesi sırasında uygun sterilizasyon yönteminin uygulandığından emin olunarak sentezlenmiş olan katı lipid nanopartiküllerin uzun süre stabil ve kullanıma uygun kalması sağlanabilmektedir [71].

#### **2.4.5. Katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyon metodları**

Katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyonunda en çok kullanılan kriterler, partikül büyüklüğü ve dağılımı, partikül şekli ve zeta potansiyel değerleridir [25]. Partiküllerin boyutu ve dağılımı kolloidal taşıyıcı sistemlerde hazırlama yöntemine bağlı olarak değişen, önemli fizikokimyasal özelliklerdir. Nanopartikül sentezleme yöntemindeki basınç, devir sayısı, emülgatör türü ve miktarı gibi parametreler partikül boyutunu etkilemektedir. Basınç ve devir sayısı partikül boyutunu küçöltebilirken, belli bir orana kadar arttırılan emülgatör miktarının da partikül boyutunu küçölttüğü belirtilmiştir [25]. Emülgatörler partikül yüzeyini kaplayan damlacıklar oluşturduktan sonra stabil hale getirilen damlacıklar ve katılaşma işleminde sonra sentezlenmiş olan nanopartikülün büyüklüğü nanometre boyutlarına gelmektedir [25]. Partikül boyutunun ölçölmesinde en çok kullanılan yöntemler foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırılımı yöntemi (LD)'dir. Bu yöntemler dışında, daha seyrek olarak, ölçüm sırasında kolloidal sistemin stabilizasyonunu bozacak elektrolitler kullanıldığında ve çok küçük

nanopartiküllerin boyutlarının ölçümü için Coulter Counter yöntemi de kullanılmaktadır [71]. Katı lipid nanopartiküllerin morfolojik yapısını ya da şekillerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler atomik kuvet mikroskopisi (AFM) ve elektron mikroskopi yöntemleridir. AFM yönteminde vakumsuz olarak, düz silikon yüzeye sabitlenen nanopartiküller görüntülenebilmektedir. Elektron mikroskopi yönteminde ise uygun çözücüde süspansiyon edilen nanopartiküller grid yüzeyine yerleştirilerek vakumlu kolon altında görüntülenmektedir [25].

Katı lipid nanopartikülün zeta potansiyelinin ölçülmesi sentezlenmiş olan partiküllerin raf ömrü konusunda oldukça fikir verici bir işlemdir. Bu ölçümde nanopartikülün yük durumu belirlenmektedir. Her sistem için geçerli olmamakla birlikte yüksek zeta potansiyele sahip nanopartiküllerde partiküllerin birbirini elektriksel olarak itmesi söz konusu olduğundan agregasyon riskinin az olacağı tahmin edilir. Düşük zeta potansiyele sahip nanopartiküllerde bu durumun tam tersi düşünülmektedir. Eğer sentezlenen taşıma sistemi sterik stabilizatör içeriyorsa, stabilizatör adsorbsiyon meydana getireceğinden, zeta potansiyelde bir düşüş söz konusu olacaktır [71].

## **2.5. Programlanmış Hücre Ölümü Apoptoz**

Hücre sayısının sabit tutulması çok hücreli canlılarda normal organizma yapısının ve fizyolojik işleyişinin devam ettirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu sayının sabit tutulması için hücrelerin çoğalması ve ölümü arasında biyolojik bir dengenin sağlanması ve devam ettirilmesi gerekmektedir. Bu dengenin hücre ölümü kısmında yer alan, önceden programlanmış fizyolojik hücre ölümü şekli apoptozdur. Apoptoz terimi 1972 yılında Kerr ve arkadaşları [82] tarafından kullanılmıştır. Araştırmacılar, bu terimi ölen hücrede gelişen karakteristik yapısal değişiklikler süreci, apoptoz olarak tanımlamıştır [83]. Apoptoz tanımlandıktan sonra hücre çoğalmasının araştırılması kadar hücre ölümünün, apoptozun regülasyon mekanizmaları ve etkileyen faktörlere de önem verilerek araştırılmaya başlanmıştır [79, 84].

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, gelişimini tamamlamış dokuların erken oluşma, gelişme ve işlevini kazanması döneminde etkin rol oynayan nedenleri, belirtileri ve oluşum şekliyle diğer hücre ölümlerinden farklılık gösteren bir hücre ölüm mekanizmasıdır [85]. Apoptoz terimi, hücrenin intiharı veya hücre ölümü anlamlarını da taşımaktadır [86]. Apoptotik hücre ölümü patolojik hücre ölümü olan nekrozdan biyolojik ve morfolojik olarak farklı şekilde gerçekleşmektedir [87]. Nekrotik hücre

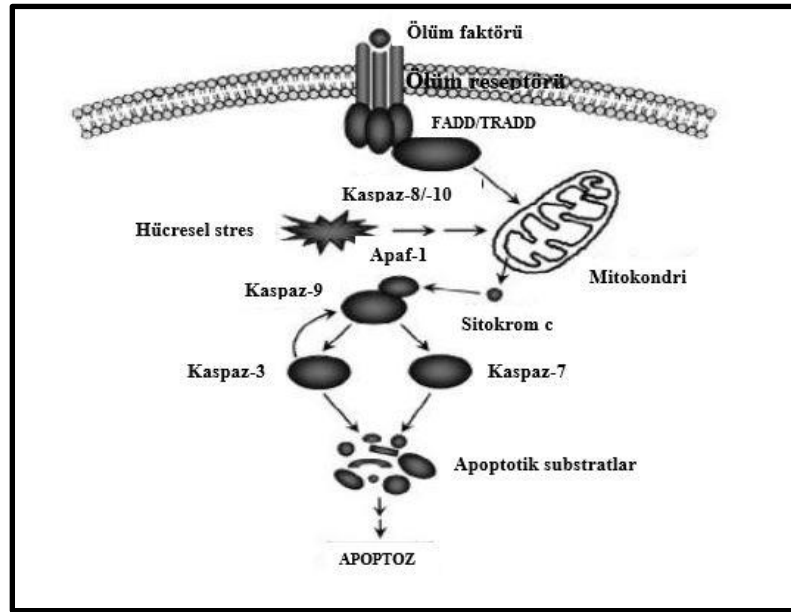


ölümünde dokuda kimyasal ve fiziksel hasardan sonra patolojik olarak hücre ölümü gerçekleşirken süreç içerisinde mitokondri ve diğer organeller hasar görür, hücre membranı seçici geçirgenlik özelliğini kaybeder ve sonunda şişerek patlar ve parçalanır. Bu parçalanma sonucunda nekrozla ölen hücrenin içeriği dokuya yayılarak enflamatuvar bir tablo oluşturur. Apoptoz yoluyla ölen hücrede ise, hücreler büzülerek küçülür ve yoğunlaşır, yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar oluşur ve çekirdek zarına yakın bölgelerden başlamak üzere kromatin yoğunlaşması görülür. İleri apoptotik evrede çekirdeğin tamamen yoğunlaşmasıyla DNA fragmentasyonu gerçekleşir. Son aşamada hücre membranla kaplı birçok apoptotik cisimler halinde parçalanır. Apoptotik cisimler komşu hücreler veya fagositler tarafından sindirilerek dokudan uzaklaştırılır dolayısıyla nekrozdan farklı olarak enflamatuvar reaksiyonlar gerçekleşmez. Enflamatuvar cevap oluşmadığından dolayı komşu hücrelere ve dokulara zarar verilmeden hücre ölümü ve dokudan uzaklaştırılması gerçekleştirilir [88]. Embriyonal gelişim sürecinde apoptotik hücre ölümü yüksek oranda gerçekleşmektedir. Hücreler gelişme faktörleri, hormon ve sitokinlerin olmadığı durumlarda apoptotik ölüm yolunu seçerler. Bu faktörler dışında apoptozun çok sayıda iç ve dış mekanizmalar tarafından tetiklendiği kaynaklarda belirtilmektedir [89]. Bu dış ve iç faktörler kimyasal maddeler, toksinler, iyonizan radyasyon, reaktif oksijen radikalleri (ROS), yaşlanmadan kaynaklanan hasarlarla birlikte çekirdek, mitokondri, hücre membranı ya da bir hücre içi bölgeden gelen apoptotik tetikleme uyarıları şeklinde sayılabilmektedir [90].

Apoptoz, kaspazlardan bağımsız ve kaspazlara bağlı olarak gerçekleşebilmektedir. İnaktif durumda sitoplazmada bulunan kaspazlar, sistein aktif merkezli, birbirilerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad şeklinde ilerleyen, sistein proteaz enzimleridir. Kaspaz kelimesi "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs (CASPASE)" olarak türetilmiş bir kelimedir [91]. Bu kaspazlardan efektör kaspazlar aktin, fodrin gibi hücre iskeleti proteinlerini, çekirdek proteini lamin A'yı, DNA tamir proteinleri ADP-riboz ve polimeraz (PARP) gibi proteinleri parçalayarak, tipik apoptotik hücre morfolojisinin oluşumunu gerçekleştirirler [92].

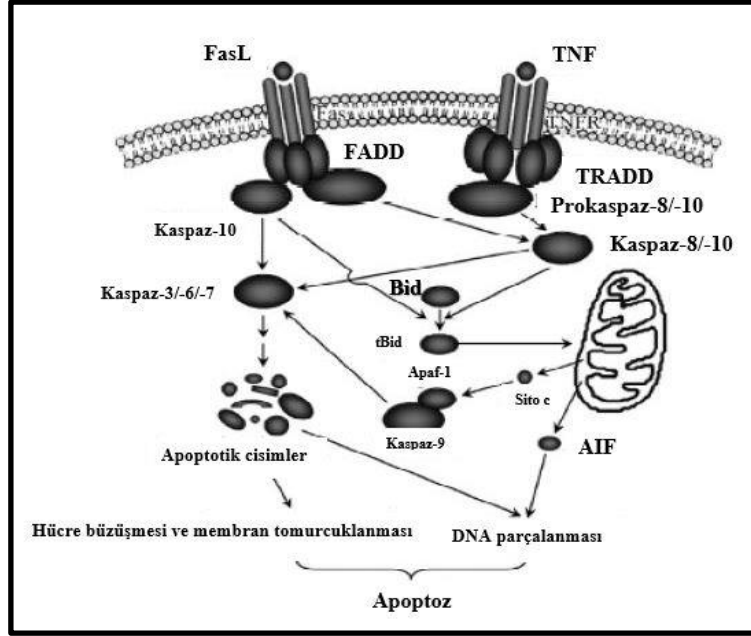
Kaspaz bağımlı yol üç ayrı yol olarak incelenmektedir; mitokondri/sitokrom-c aracılı yol, hücre yüzey reseptörleri aracılı yol ve endoplazmik retikulum aracılı yol [91]. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozda, mitokondri iç zarında bulunan solunum zinciri proteini sitokrom c'nin mitokondri membranından dışarıya salınması, apoptozun geri dönüşümsüz olarak devam edeceğini göstermektedir. Sitoplazmaya sitokrom c salınması

sırasında apoptoz indükleyici faktör (AIF) de sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmada Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)'e bağlanarak, aktif hale getirir ve ATP ile birlikte apoptozom kompleksini oluştururlar. Apoptozom inaktif durumdaki prokaspaz-9'u aktive ederek aktif kaspaz 9'u oluşturur. Kaskad devam eder ve aktif kaspaz 9 prokaspaz 3'ü aktifleştirir. Bu aktif kaspaz 3 deoksiribonükleaz inhibitörü (ICAD)'ı inaktive eder ve kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) salınarak kromatin kondenzasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonu gerçekleşir ve mitokondriyel yolda kaspaz bağımlı apoptoz meydana gelmiş olur (Şekil 2.2.). Kaspazlara bağımsız gerçekleşen apoptoz sürecinde de mitokondri en büyük rolü oynayan hücre organelidir. Bu yol mitokondriden salınan apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün indüklemesiyle oluşur ve nükleazların etkilenmesiyle apoptoz gerçekleşir [92].



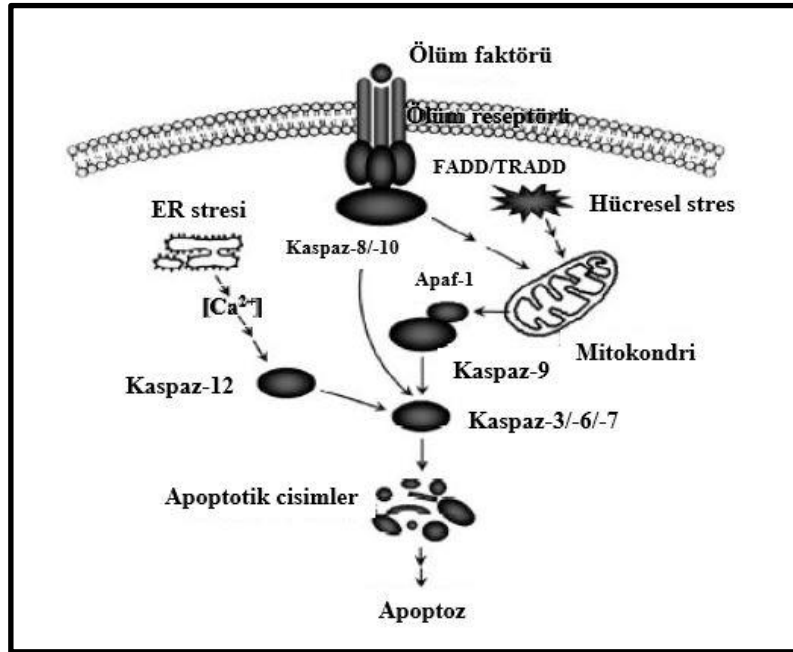
**Şekil 2.2.** Mitokondri Aracılı Kaspaz Bağımlı Apoptoz Yolağı  
**Kaynak:** Fan, 2005, s. 2

Hücre yüzey reseptörleri ile tetiklenen apoptozda (Şekil 2.3.) Fas-ligand ve tümör nekroz faktör (TNF) gibi moleküllerin, hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla, sitoplazmaya, kaspaz-8'i aktive edici sinyaller gönderilir. Hücre yüzeyinde Fas ekspresyonu başlar ve sitotoksik T hücreleri de Fas-L yapımı için sinyaller alır ve Fas-Fas ligand bağlanması ile prokaspaz-8 ve prokaspaz-2 aktive olur ve apoptoz gerçekleşir [91].



**Şekil 2.3.** Hücre Yüzey Reseptörleri Aracılığı ile Tetiklenen Apoptoz  
**Kaynak:** Fan, 2005, s. 3

Endoplazmik retikulum aracılığıyla gerçekleşen apoptotik yol (Şekil 2.4.) ise, hücre içi kalsiyum seviyeleri yükseldiğinde endoplazmik retikulum membranındaki prokaspaz-12'nin aktifleşerek sitoplazmaya geçmesi ve burada kaspaz-9 ile birleşerek kaspaz kaskadını aktive etmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Bu kaskatta yer alan kaspazlar poliADP riboz polimeraz, DNA bağımlı protein kinaz, nükleus membran proteinleri laminler ve DNA'nın parçalanmasına yol açan nükleazları baskılayan DNA fragmentasyon faktörü 45 proteini gibi hücre içi birçok proteini ayrıca tümör baskılayıcı retinoblastom genini ve hücre iskeleti proteinlerini etkileyerek apoptotik hücre ölümünü gerçekleştirmektedir [91].



Şekil 2.4. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz  
Kaynak: Fan, 2005, s. 5

### 2.5.1. Apoptoz ve kanser ilişkisi

Birçok fizyolojik ve patolojik şartlarda da meydana gelen programlı hücre ölümü immün sistemde cevap oluşturma, embriyonik gelişim, hormona bağlı doku kültürü gibi fizyolojik durumlarda esansiyeldir. Bu olaylarda apoptozun sürekli ve dengeli olması, canlılığın ve işlevin devamı için önemlidir. Bu kritik denge apoptoz düzenleyici mekanizmalar sayesinde gerçekleştirilmektedir. Hücre döngüsünde G1 evresi ile S evresine geçişin kontrolü kanser hastalıklarının çoğunda bozulmuştur. Bozulmuş denetimden kolaylıkla geçen hücrenin sınırsızca çoğalıp kanserleşmesi meydana gelmektedir. Kanser ilerlemesinin önlenmesi için özellikle G1 ve S evrelerindeki kontrolün sağlanması ve bu evrelerde etkili olacak ilaçların tedavide kullanımına gidilmesi gerekmektedir. Tam denetlenemeyen apoptoz birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu durumun neden olduğu patolojik vakalara hepatotoksisite, iskemi, kalp hastalıkları, AIDS, merkezi sinir sistemi dejenerasyonları, otoimmün hastalıklar ve en önemlisi de kanser örnek verilebilir. Pre-neoplastik hücrelerde yapılan çalışmalarda tümör tetikleyici ajanlar kullanılarak apoptozun inhibe edilmesinin tümör gelişiminin tetiklenmesinde önemli olduğu vurgulanmıştır [61, 93]. Memeli hücrelerinde hücre döngüsü kontrol noktaları adı verilen sıkı denetim noktaları ve Cdk protein kinazlar ile denetim altında tutulmaktadır. Patojenite seyri olmayan yani normal hücrelerde DNA

hasarı meydana geldiğinde hücre döngüsü bu kontrol noktalarında durdurulur ve hasarın tamir edilmesine fırsat sağlanır. Bu tamir işlemi gerçekleştirildiğinde hücre kontrol noktalarından geçiş için uyarılır ve sağlam ve stabil genetik yapıya hücre bölünmeye devam edebilmektedir. Hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun indüklenmesi için p53'ün ekspresyonuna ihtiyaç vardır. Bcl-2'nin fazlaca ekspresyonu öncül kanser hücrelerinin ömrünü uzatarak malign transformasyonları kolaylaştırmaktadır. Bax proteininin çokça ekspresyonu ise apoptozun indüklenmesini sağlamaktadır [94]. Hücre döngüsü durdurulduktan sonra hasarı tamir edilemeyen hücreler G1 evresinde sentezlenen p53'ün Bax ekspresyonunda artışa neden olması ve böylece Bcl-2/Bax oranı dengesini değiştirmesi ile apoptoza yönlendirilmektedir. Böylece hasarlı hücre bölünme yoluna gidip çoğalamaz ve biyolojik denge korunarak sağlam hücrelerin çoğalmasına olanak sağlanır. İnsan papilloma virüsü, Epstein-Barr virüsü ve Adenovirüs tip 12 gibi virüsler p53'ü inaktive ederek veya Bax'a bağlanarak apoptozu engellerler. Bu virüslerle enfekte hücreler hücre ölüm mekanizmalarından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogeneze yol açarlar [95].

## **2.5.2. Apoptoz tayin metodları**

### **2.5.2.1. Konfokal mikroskopisi**

Hücrelerde meydana gelen büzüşme, yoğunlaşma, membran tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması, DNA ve çekirdek parçalanması ve apoptotik cisim oluşumu gibi morfolojik değişiklikler tipik apoptoz göstergeleridir [88]. Bu tipik apoptotik değişiklikler konfokal mikroskop ve floresan boyalar kullanılarak hücrelerin konfokal mikroskopunda görüntülenmesiyle apoptoz tayini gerçekleştirilebilmektedir. Konfokal mikroskopisi yöntemi hücreleri incelemek için güçlü donanımlar sunmaktadır. Lazer konfokal mikroskopisi yöntemi, boyamalardan sonra elde edilen görüntülerden üç boyutlu resimlerin oluşturulmasına da olanak sağlamaktadır. Bu donanımlar sayesinde birçok hücre içi organel ve tüm komponentlerin ayrıntılı incelenmesinde konfokal mikroskop yaygın olarak kullanılmaktadır. Çekirdek ve/veya aktin filamentlerinin eşzamanlı olarak uygun floresan boyalarla boyanması hücrelerin yeri ve şeklinin görüntülenmesini kolaylaştırmaktadır. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla da hücre çekirdeğini görünür hale getirebilmektedir [96]. Konfokal mikroskopisi yönteminde canlı veya ölü, apoptotik veya nekrotik tüm hücreleri boyayabilen Hoechst boyası kullanılabildiği gibi sadece ölü (nekrotik, DNA'sı

hasarlanmış) hücreleri boyayabilen propidium iyodit boyası kullanılabilir. Hoechst boyası ile membranı sağlam olan (canlı/apoptotik) hücreler boyanırken membran bütünlüğü bozulmuş (nekrotik) hücreler ise propidium iyodit ile boyanmaktadır. Bu şekilde boyanan hücreler konfokal mikroskopta uygun eksitasyon aralığında görüntülenebilir ve tanınabilirler. Konfokal mikroskopi yöntemi kullanılarak yeni sentezlenen bileşiklere maruz bırakılmış hücrelerin ölü ya da canlı olduğu gözlenebilmektedir. Ayrıca, ölü hücrelerin ölüm yolu ya da apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayrımı çekirdek morfolojisine bakılarak da yapılabilmektedir. Hücre iskeleti ve çekirdek morfolojisi için falloidin ve akrinin oranj boyaları kullanılarak tipik apoptotik değişikliklerin oluşup oluşmadığı saptanabilmektedir [97].

#### **2.5.2.1.1. Morfolojik değişikliklerin apoptozdaki yeri**

Apoptotik hücre ölümü, en toksik ilaçların bu yolla hücre ölümünü gerçekleştirmesi ve tümör baskılayıcı genlerin ve onkoproteinlerin bu yolda beraber rol oynaması nedeniyle araştırmacılar tarafından her zaman ilgi çekici bulunmuştur [98]. Apoptoz yoluyla ölen hücrelerde kaspaz bağımlı apoptotik yolda aktif (efektör) kaspazlar hücre iskelet elemanlarının aktin, fodrin gibi proteinleri, çekirdek zarının integrasyonunda görevli lamin A'yı, ADP-riboz ve polimeraz (PARP) gibi DNA tamirinde rol alan proteinleri parçalayarak da hücrede önemli morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bu morfolojik değişiklikler tipik apoptotik hücre morfolojisini göstermektedir [92]. Yine morfolojik belirteçlere bakıldığında nekrotik hücrelerden farklı olarak apoptotik hücrelerde hücrenin büzülerek küçüldüğü, membranlarının dışa çıkıntılar şeklinde tomurcuklanma yaptığı, çekirdek kromatininin yoğunlaştığı görülmektedir. Buna ilaveten, ileri apoptotik evrede hücre çekirdeğinin yoğunlaştığı ve DNA'nın parçalanması gerçekleştikten sonra, her biri membranla kaplı birçok apoptotik cisimciklerin oluştuğu görülmektedir [88]. Tüm bu morfolojik değişiklikler göz önüne alındığında, morfolojik değişikliklerin apoptozdaki yeri ve önemi ortaya konmakta ve morfolojik değişikliklerin apoptozda en önemli belirteçlerden olduğu açıktır.

#### **2.5.2.1.2. Hücre içi kalsiyum derişiminin apoptotik rolü**

Hücre içi kalsiyum, kalmodulin gibi birçok hücre içi proteinlerle, protein kinazlar gibi enzimler ile etkileşerek hücre sinyalleşmesinde kilit rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum depolanma yerleri endoplazmik retikulum (ER) ya da sarkoplazmik retikulumdur (SR) [99]. Bu depolardan kalsiyum salınımı hücre yüzeyindeki G proteini

reseptörünün uyarılması ve sinyalleşme kaskadıyla inozitol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>)'ın da aktifleşmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Endoplazmik retikulumdan kalsiyumun salınması için IP<sub>3</sub> endoplazmik retikulum yüzeyindeki IP<sub>3</sub> reseptörüyle etkileşir ve uyarılan reseptör kalsiyumun endoplazmik retikulumdan sitozole aktığı bir kanal olarak çalışır. Endoplazmik retikulum ve sarkoplazmik retikulumdaki kalsiyum depolarının boşaltılması, ER/SR kalsiyum adenozin trifosfataz (ATPase) enziminin inhibisyonu ile de gerçekleşebilmektedir çünkü enzimin görevi kalsiyumu sitozolden bu depolara pompalamaktır [100]. Bu kaynaklar dışında, hücre içi kalsiyumun, hücre dışı kaynaklardan da hücre membranındaki kalsiyumun geçebileceği büyüklükteki kanallar aracılığıyla girmesi sonucu artabildiği bilinmektedir [101, 102].

Apoptotik hücre ölümü çok sayıda ve türde mediyatör tarafından düzenlenmektedir. Bu mediyatörler, kalsiyum gibi iyonlar, seramid gibi moleküller, *c-myc* gibi genler ve p53 gibi proteinler ve bunlara ilaveten, mitokondri gibi organeller olabilir. Mediyatörlerin bir kısmı belli hücre tiplerine özeldir bir kısmı da apoptozun tetiklenme türüne göre değişebilmektedir. Apoptozun gerçekleşmesi sırasında kalsiyum iyonunun hücre içine sürekli olarak girdiği kaynaklarda vurgulanmaktadır. Bunun yanı sıra apoptozun gerçekleşmesi için, hücreye kalsiyum iyonunun girmesi elzem şartlar arasında gösterilmemektedir [91]. Bu iyon endonükleazların aktif hale getirilmesinde, genlerin düzenlenmesinde, proteaz enzimlerinin aktifleştirilmesinde görev aldığı gibi hücre iskeletinin organizasyonunda da rol almaktadır. Hücre içi kalsiyum seviyelerinin dengede tutulmasında görevli olan organel endoplazmik retikulum (ER)'dur. Hücre içi kalsiyum seviyesi yükseldiğinde ER membranındaki prokaspaz-12 aktif hale gelir ve sitoplazmaya geçerek kaspaz-9 ile etkileşir ve apoptotik kaskadı başlatır. Apoptotik kaskad başlatıldığında, hücre irreversibl bir ölüm sürecine girmiştir. Aktif kaspazların DNA-bağımlı protein kinaz, laminler, DNA fragmantasyon faktörü 45 proteini gibi hedefleri parçalamasıyla hücre apoptoz sürecini tamamlamış olur [91].

### **2.5.2.2. Geçirimli elektron mikroskopisi yöntemi (TEM) ile apoptoz tayini**

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) yönteminde, önceden takip edilerek blok haline getirilmiş, mikrotomda kesilerek ince kesitler halinde gridlere yerleştirilmiş örneklere elektron tabancasından elde edilen elektronların 60-150 KV (genel ortalama 100 KV) arasında bir değerde hızlandırma voltajı ile yönlendirilmesiyle ve örnekten geçen elektronların floresan ekran üzerine düşerek görüntülenmesini sağlayan bir

mikroskobik araştırma yöntemidir. Elektronların yönlendirilmesi elektromanyetik lensler kullanılarak yapılır. Geçirimli elektron mikroskobu görüntülenecek numuneyi 300000 kez büyütebilme (yüksek çözünürlük), iletken ya da yalıtkan numunelerin incelenmesine olanak sağlama gibi avantajları yanında, maliyetli olması ve kullanımının uzmanlık gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir [103].

Apoptotik hücre ölümü tipik morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Bu değişiklikler kromatin yoğunlaşması, sitoplazma ve çekirdek parçalanması, tek veya birden fazla internükleozomal alanlardan DNA'nın parçalanması, apoptotik cisimlerin oluşması, hücre membranında tomurcukların oluşması gibi karakteristik apoptoz göstergeleridir [104]. Buna ilaveten apoptozda en çok etkilenen ve başrol oyuncusu olarak gösterilen mitokondri ayrıca yine çok etkilenen zarlı organellerden ER ve tüm hücre iskeleti de hasarlanmaktadır. Tüm bu karakteristik değişikliklerin incelenmesi ve görüntülenmesinde TEM önemli bir araçtır. Apoptozun tipik morfolojik ve ince yapısal değişikliklerinin en kolay ve doğru görüntülediği yöntem elektron mikroskopi yöntemidir. Bu yöntem ile apoptoz tayini "altın standard" olarak gösterilmektedir. Hücrelerin mitokondri, lizozom, ER, çekirdek gibi organellerinde meydana gelen değişiklikler, bu yöntemle rahatlıkla gösterilebilmektedir [105].

Geçirimli elektron mikroskobunda apoptotik hücrede meydana gelen ince yapısal değişikliklerin incelenmesi için, öncelikle hücrelerin TEM'de biyolojik numune takibine uygun olarak takip edilip bloklar haline getirilmesi gerekmektedir. Bu bloklardan mikrotom cihazında önce yarı ince kesitler alınarak hücrelerin dağılımına ışık mikroskobunda bakıldıktan sonra yarı ince kesitte incelenecek bölge işaretlenerek ince kesitler (70-100 nm) alınmaktadır. Bu ince kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat boyalarıyla boyanarak hücrelerin membran, çekirdek ve organelleri daha belirgin hale getirilip TEM'de görüntüleri elde edilebilmektedir [106].

## **2.6. Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizmaları**

Hücre döngüsü, hücre içeriğinin iki katına çıkmasıyla hücre bölünmesini kapsayan hücrenin ve canlılığın devamlılığını sağlayan bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Döngüde iki katına çıkan DNA, bölünme sonucunda oluşan iki yeni yavru hücreye eşit olarak gitmektedir. Bir memeli hücresinde DNA'nın iki katına çıkması yaklaşık 10-12 saat süren sentez (S) evresi'nde gerçekleşmekte, kromozomların ayrılması ve hücre bölünmesi ise yine memeli hücresinde yaklaşık 1 saat süren mitoz (M) evresi'nde gerçekleşmektedir. M



evresi ile S evresi arasında G1 evresi S evresi ile Mitoz evresi arasında ise G2 evresi yer almaktadır. Özetlenecek olursa ökaryotik hücre döngüsü sırasıyla G1, S, G2 ve M evrelerinden oluşmaktadır. G1, S ve G2 evresi beraber interfaz evresini oluşturmaktadır. Laboratuvar koşullarında üretilen insan hücrelerinde hücre döngüsünün 24 saatlik süresinin ilk 23 saatinde interfaz son 1 saatinde ise mitoz gerçekleşmektedir. Hücre döngüsünde uzun interfaz evresinde DNA iki katına çıkmakta aynı zamanda da hücrenin tüm protein içeriği ve organelleri iki katına çıkmaktadır. İnterfaz evresindeki aşamaların uzunluğu mitoz geçilmeden önceki tüm hazırlıkların doğru olarak yapılmış olduğundan emin olunması amaçlıdır. İnterfazın en uzun evresi G1 evresidir. Bu evrede hücreler arasındaki sinyal ve hücre dışı koşullar uygun olmadığında hücreler G1 evresindeki ilerleme gecikir. Bu evrede hücreler G0 (G sıfır) evresi olarak adlandırılan durgunluk evresine girerek hücre döngüsüne devam etmez ve uygun şartların oluşmasını beklerler. Dış sinyaller, büyüme faktörleri gibi şartlar yeniden oluştuğunda bu hücreler G1 evresindeki denetim noktasına ilerler ve bu noktayı da geçen hücreler artık sinyallerin yokluğunda da döngüde ilerlemeye devam etmektedirler.

Hücre döngüsünde meydana gelen tüm olayların denetim mekanizması, hücre türlerine göre farklıdır. Hücrelerde bu denetimden sorumlu özel proteinler olduğu 1980'li yıllarda ortaya çıkmıştır. Ayrıca hücre döngüsünde denetim noktaları yer almaktadır. Döngünün ilgili evresinde gerçekleşmesi gereken işlemler gerçekleşmemişse bu denetim noktalarında hücre döngüsü durdurulmaktadır. Örneğin DNA'sı hasarlanmış bir hücrenin döngüsü DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesi için G1 ve G2 evrelerinde yavaşlatılmakta ve tamir gerçekleştirildiğinde döngü ilerlemektedir [30].

### **2.6.1. Hücre döngüsünde görev alan proteinler**

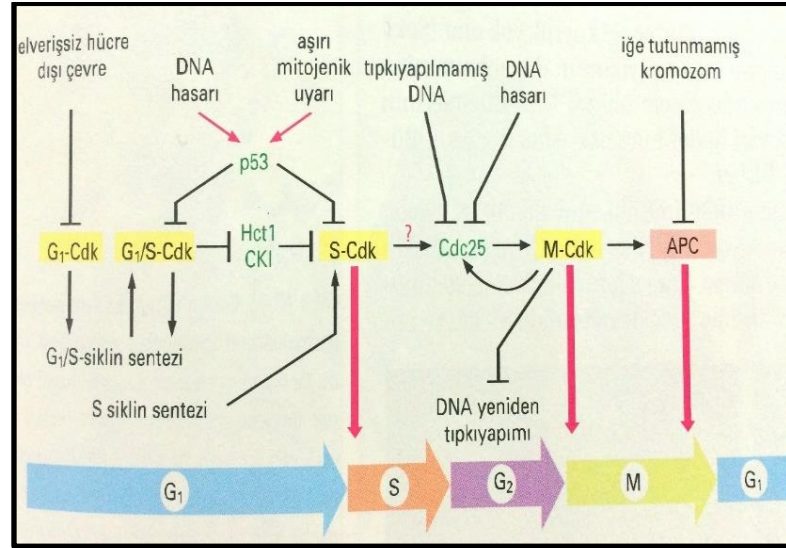
Hücre döngüsünde siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ailesi, temel göreve sahip protein kinaz ailesidir. Hücre döngüsü sırasında bu protein kinazların etkisi, artma veya azalma şeklinde değişmektedir ve bunlar hücre içi proteinlerin fosforillenmesinde değişikliklere yol açmaktadır. Cdk'lardaki bu değişiklikler siklin proteinlerine bağlıdır. Cdk'lar ancak siklinlere bağlı olduklarında etkindirler. Döngünün ilerlemesi için farklı Cdk'lar farklı siklin proteinleriyle birleşir ve siklinlerin yıkımı sonucunda Cdk aktivitesi sona ermektedir. Omurgalı hücrelerinde Cdk'lar 4 grupta incelenmektedir. Bunlardan G1-Cdk kompleksi siklin D ile Cdk4 veya Cdk6'nın birleşmesiyle, G1/S Cdk kompleksi siklin E ile Cdk2'nin birleşmesiyle, S-Cdk kompleksi siklin A ile Cdk2'nin birleşmesiyle ve M-

Cdk kompleksi de siklin B ile Cdk1'in birleşmesiyle oluşmaktadır. Bu komplekslerden herbiri farklı proteinleri fosforillemektedir. Bu komplekslerin aktive edilmesinde esas görev alan Cdk aktive edici kinaz (CAK)'ın Cdk aktif bölgesine yakın bir amino asiti fosforillemesiyle Cdk-siklin kompleksi aktive edilmiş olur. Bu aktif bölgenin Wee1 protein kinaz tarafından fosforillenmesiyle kompleksin etkinliği engellenirken Cdc25 fosfatayı tarafından defosforillenmesiyle ise kompleks etkinliği artırılmaktadır. Cdk-siklin komplekslerinin bir diğer engelleyicisi de Cdk engelleyici proteinlerdir (CKI). CKI'nın (memeli hücrelerinde p27 proteininin) bağlanmasıyla aktif bölgesi değişen Cdk protein kinazının etkinliği değişmekte ve etkisiz hale gelmektedir.

Hücre döngüsünde G1 evresindeki ilerleme ve S evresinin başlangıcının denetlenmesi kanser vakalarında sıklıkla bozulmuş durumdadır. Bu durum hücrenin sınırsızca çoğalıp kanserleşmesine yol açmaktadır. Kanser vakalarındaki ilerlemenin önlenmesi için bu iki evredeki proteinlerin ve bunların denetleyici moleküllerinin ayrıntılı olarak bilinmesi gerekmektedir. G1 evresinde Cdk kompleksinin etkinliği E2F gen düzenleyici proteinine bağlıdır. E2F proteini G1 siklinleri, S siklinleri ve geçiş noktalarında görevli proteinlerin promotör bölgesine bağlanarak ve döngü ilerlemesini engelleyen retinoblastom (Rb) proteini ile etkileşerek etkisini göstermektedir. G1 evresinde Rb'a bağlanan E2F proteini S evresi proteinlerinin transkripsiyonunu engeller. Hücreye bölünmesi yönünde gelen dış sinyaller varlığında G1-Cdk kompleksi birikerek Rb'un fosforillenmesi gerçekleştirilir. Fosforillenmiş Rb'un E2F proteinine olan ilgisi azalır ve ayrılan Rb E2F proteininin S evresi için gerekli proteinlerin gen ifadesini gerçekleştirmesine olanak sağlar. Serbest E2F proteini kendi ifadesini de arttırmaktadır [30].

DNA'sı hasarlı bir hücre, döngüde ilerleyemez ve p53 proteininin aktive edilmesiyle veya daha farklı bir mekanizma ile apoptoz yoluna gidebilmektedir. p53 proteini hücre döngüsünde tümör baskılayıcı protein olarak görev yapmakta ve DNA'daki hasarlı bölgeye bağlanarak hücre döngüsünü G1 evresinde yavaşlatarak, DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesine olanak sağlamaktadır. Hasarın tamir edilememesi durumunda hücre G1 evresinden p53 aracılığıyla apoptoza yönlendirilmektedir. Tümör baskılayıcı p53 proteini ifade edemeyen veya mutasyona uğramış hücreler p53 proteini normal olan hücrelere göre daha uzun süre hayatta kalmaktadır ve hasarlı DNA'sına rağmen apoptoza yönlendirilemedikleri için kontrolsüzce çoğalarak dokuda kanserleşmeye neden olabilmektedirler. Ayrıca p53 proteini apoptozda dengeleri hassas

olan Bax / Bax, Bax / Bcl-2, Bcl-2 / Bcl-2 oranlarını düzenlediğinden hücre döngüsünde önemli role sahiptir [95]. DNA'sı hasarlanmamış hücrede ise p53 proteini çok kararsız ve az miktarda bulunmaktadır. Bu durum p53'ün bir ubiquitin ligaz olarak görev yapan Mdm2 proteiniyle etkileşmesinden kaynaklanmaktadır. DNA hasarı durumunda p53'ü fosforilleyen kinazlar artmakta ve dolayısıyla da p53'ün Mdm2'ye bağlanması azalmaktadır. Böylece yıkımı azalan p53'ün hücre içi birikimi ve dolayısıyla da gen ekspresyonu artmaktadır. Ayrıca bu p53 birikimi ekspresyon olarak p21'i etkinleştirerek, DNA hasarı sonrasında G1/S Cdk kompleksi ve S Cdk kompleksinin etkinliklerini baskılayarak hücre döngüsünü durdurma yoluna sokmaktadır [29, 30].



Şekil 2.5. Hücre Döngüsü Denetim Mekanizmaları  
Kaynak: Alberts, 2008, s. 123

### 2.6.1.1. Siklinler

Hücre döngüsünde Cdk protein kinazların en önemli denetleyicisi siklin proteinleridir. Siklin ismi, hücre döngüsünde sürekli ve döngüsel olarak yapım ve yıkım olaylarına maruz kalmalarından kaynaklanmaktadır. Bu proteinlerin tanımlanması Cdk'lara bağlanarak çalıştıkları hücre döngüsü evresine göre gerçekleştirilmektedir. Buna göre siklinler G1 siklinler, G1/S siklinler, S-siklinler ve M-siklinler olarak sınıflandırılmaktadır. G1 dışındaki siklin sınıflarının her biri tüm ökaryot hücrelerde varlığı gerekli siklinleri kapsamaktadır. G1 evresindeki siklinler D grubu siklinlerdir. Memeli hücrelerinde üç tip D grubu siklin mevcuttur. Bunlar D1, D2 ve D3 siklinlerdir. G1/S siklinler E grubu siklinlerdir. S-siklinler A grubu, M-siklinler ise B grubu

siklinlerdendir. Siklin proteinlerinin hücre döngüsündeki esas görevi, Cdk'lara sıkıca bağlanarak onların protein kinaz aktivitesini gerçekleştirmesini sağlamaktır [30].

#### **2.6.1.1.1. Siklinlerin yapısı ve dağılımı**

Normal hücrelerde hücre döngüsü boyunca eksprese edilen proteinlerin bilinmesi hücre döngüsünün kontrol mekanizmalarının açığa kavuşturulmasında önemlidir. Siklinler normal ve kanser hücrelerinin hücre döngüsünde anahtar role sahip proteinlerdir. Çekirdek proteini olan siklin 36,000 ( $M_r$  36K) molekül ağırlığına sahiptir. Bu protein çeşitli insan hücrelerinde olduğu gibi, fare, hamster ve kuş hücrelerinde de tanımlanmıştır [107]. Siklinlerin insan hücrelerinde bölünen hücre çekirdek antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) ile birçok ortak özelliğe sahip olduğu ve bu iki proteinin aslında aynı olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [108]. Siklin proteini DNA polimeraz  $\delta$ 'nın katalitik aktivite göstermesi için gerekli bir yardımcı proteindir ve hücre döngüsünün başlamasında kritik role sahiptir [107, 108, 109]. Erken S fazında siklin nükleoplazmanın çekirdekçikler hariç tamamında dağınık olarak bulunmaktadır. Hücrenin S fazında ilerlemesiyle bu protein daha belirgin olarak boyanmaktadır. İleri S fazında DNA sentezinin en üst düzeyde olduğu evrede siklin proteini yeniden dağılım göstererek çekirdekte nokta şeklinde boyanmalar halinde görünmektedir. Bu boyanma şekilleri senkronize olmadan çoğalan insan normal amniyon hücrelerinde de gösterilmiştir. Bu durum siklin dağılımının hücrenin transforme olmasıyla ilişkili olmadığını göstermektedir. Siklinin çok az miktarlarda bölünmekte olmayan normal hücrelerde ve dokularda olduğu gibi bölünen normal ve tümör hücreleri dahil transforme hücrelerde de sentezlendiği ve hücre proliferasyonu ve DNA sentezinde merkezi eleman niteliğinde olduğu bildirilmiştir [107, 108].

#### **2.6.1.1.2. Siklinlerin hücre döngüsündeki rolü**

Siklinler hücre döngüsünün ilerlemesinde ve kontrolünde anahtar role sahip proteinlerdir. Hücre döngüsünde Cdk'lara bağlanarak onların protein kinaz aktivitesini göstermesini sağlamaktadırlar. Siklin proteininin Cdk protein kinaza bağlanması sonucunda Cdk'nın kapalı olan aktif merkezi açılarak kısmen aktif hale gelmesi sağlanmaktadır. Uygun siklinin bağlanmasıyla açılan Cdk aktif merkezine yakın bir amino asitin Cdk etkinleştirici kinaz (CAK) tarafından fosforillenmesiyle Cdk yapısında meydana gelen küçük konformasyonel değişiklik Cdk proteinini tamamen aktif hale getirmekte ve böylece bu yapıya özel hücre döngüsü olayı tetiklenmektedir. Farklı siklin

proteinleri farklı evrelerde farklı Cdk'lara bağlanarak görev yapmaktadır. Bu durum mayalarda farklıdır. Mayalarda tek bir Cdk proteini tüm siklin gruplarına bağlanabilmekte ve hücre döngüsünün her evresinde farklı siklinlerle kompleks oluşturarak hücre döngüsünün tamamını kontrol edebilmektedir. İlk evredeki D grubu siklinler G1 siklinleridir ve Cdk4 veya Cdk6 ile kompleks oluşturarak geç G1'deki başlangıç ya da kısıtlama noktasından geçiş için hücreyi uyarırlar. Bu durum hücrelerin çoğunda mevcuttur. E siklinler G1 evresi sonunda Cdk2 ile bağlanarak kompleks oluştururlar ve hücreyi DNA duplikasyonuna yönlendirmede görevlidirler. Siklin A'lar S evresinde Cdk2 ile kompleks oluştururlar ve bu kompleksin oluşumu DNA duplikasyonunun başlaması için sinyal teşkil etmektedir. Siklin B'ler Cdk1'i aktive ederek mitoz olaylarının başlamasını sağlarlar.

Siklin proteinlerinin kompleks oluşturdukları Cdk proteinini aktif hale getirmenin dışında oluşturdukları her bir kompleksin farklı substrat proteinini fosforilleyerek farklı hücre döngüsü olaylarını denetledikleri belirtilmektedir. Oluşan her bir siklin-Cdk kompleksi döngünün farklı evrelerinde farklı etkiler de gösterebilmektedir. Bu durum hücre döngüsünün ilerlemesiyle sentezlenmiş olan substrat proteinlerinin farklı evrelerdeki çeşit ve miktarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Mitoz proteinleri örnek verilecek olursa, bu proteinlerin bazılarının sadece G2 evresinde bulunması ve fosforillenmeye uygun olması literatürde yer almaktadır. Dolayısıyla sadece bu evredeki siklinler ve oluşturdukları kompleks bu evredeki mitotik pteoinleri fosforilleyebilmektedir [108].

## **2.7. Kaderinler**

Hücreler birbirilerine ve hücre dışı matrikse, hücre adezyon molekülleri (CAM) denilen hücre yüzey proteinleri aracılığıyla yapışmaktadır. CAM'lar  $Ca^{2+}$ -bağımlı ve  $Ca^{2+}$ -bağımsız olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Kaderinler  $Ca^{2+}$ -bağımlı hücre-hücre adezyonunu sağlayan temel CAM'lardandır. Omurgalı ve omurgasızlarda hücre tipine bağlı olarak bir ya da daha fazla tipte ifade edilmektedir. Kaderinler erken embriyonik gelişim döneminde hücreleri bir arada tutan adezyon molekülleri'dir. Hücre kültürü ortamında hücre dışı  $Ca^{2+}$  'un uzaklaştırılmasıyla embriyonik dokularda dağılma ve dolayısıyla da erken ölüm meydana geldiği gösterilmiştir. Birçok kaderin proteini hücre membranını bir kez kat eden 700-750 amino asitlik transmembran proteinlerdir. Bu proteinler plazma zarıyla birleşerek dimer ve oligomer oluşturmaktadırlar. Hücre dışında

kalan kaderin kısmı katlanarak immünoglobulinlere benzer yapı oluşturur. Bu yapı  $Ca^{2+}$ 'un bağlanmasıyla sertleştiğinde daha dayanıklı hale gelmektedir.  $Ca^{2+}$  uzaklaştıkça da daha gevşek ve proteolitik enzimlerce yıkıma daha açık hale gelmektedir. Kaderinler alfa, beta ve gama-katenin proteinleriyle sitoplazmik domeynlerinden bağlanır. Bu proteinler kaderinleri hücre iskeletiyle bağlantılı konuma getirmektedir [30].

### 2.7.1. Kaderin çeşitleri

Kaderinler epidermiste ve diğer epitel dokularda homotipik interselüler adezyona aracılık eden moleküllerdir. Bulunan ilk kaderinler, buldukları hücre tipine göre isimlendirilmiştir. Epidermis hücrelerinde bulunan kaderinler E-Kaderin, sinir, kas ve göz merceği hücrelerinde bulunan kaderinler N-Kaderin ve plasenta ve epidermis hücrelerinde bulunan kaderinler de P-Kaderin olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, farklı kaderin çeşitlerinin, farklı dokularda da bulunduğu ortaya konulmuştur. Bu kaderin çeşitleri dışında birçok özgün kaderin mevcuttur. Desmozom kaderinleri ve protokaderinler çok geniş bir kaderin ailesidirler. Bu geniş kaderin ailesine, adezyon özelliği olan kaderinler dışında, T-Kaderin ve Fat proteini gibi, yapıştırma özelliği olmayan proteinler de girmektedir.

Tüm kaderin çeşitleri klasik kaderinler ve özgün kaderinler olarak iki grupta incelenen kaderin üst ailesine dahildirler. Klasik kaderinler E-Kaderin, N-Kaderin, P-Kaderin ve VE-Kaderini kapsar ve bunlar sırasıyla epitel hücrelerinin adezyon noktalarında, nöron, kalp ve iskelet kası, mercek ve fibroblastların adezyon noktaları ve kimyasal sinapslarında, plasenta, epidermis ve meme epiteli adezyon noktalarında ve endotel hücrelerinin adezyon noktalarında yer almaktadırlar. Klasik kaderinlerden E-Kaderinlerin etkisizleştirilmesiyle farelerin embriyonik dönemin blastosit evresinde embriyo bütünleşmemesi sonucunda öldüğü, N-Kaderinlerin etkisizleştirilmesiyle embriyonik kalp kusurları nedeniyle ölümün gerçekleştiği, P-Kaderinlerin etkisizleştirilmesiyle fare embriyolarında anormal meme bezi gelişimi gözleendiği ve VE-Kaderinlerin etkisizleştirilmesiyle de endotel hücrelerin apoptozuyla anormal damar gelişimi meydana geldiği çalışmalarda belirtilmiştir. Özgün kaderinler desmozokolin, desmoglein, T-Kaderin, Fat ve protokaderinleri kapsar ve bunlardan ilk ikisi deri hücrelerinin desmozomlarında bulunurken T-Kaderin, Fat ve protokaderinler sırasıyla nöronlar ve kas hücrelerinde, epitel ve merkezi sinir sistemi hücrelerinde ve nöronların kimyasal sinapslarında bulunmaktadır. Özgün kaderinlerden desmozokolin, T-Kaderin ve

protokaderinlerin etkisizleştirilmesiyle nasıl bir etki ortaya çıkacağı henüz aydınlatılmamışken dezmozoglein etkisizliğinde keratinosit hücrelerinde hücre-hücre adezyonu kaybı nedeniyle kabarcıklı deri hastalığının ortaya çıktığı Fat etkisizliğinde ise tümörlerin oluştuğu belirtilmiştir [30].

### **2.7.1.1. E-Kaderin**

E-Kaderinler epitel hücrelerde hücre-hücre adezyonunu sağlayan kaderin üst ailesine ait, en iyi tanımlanan klasik kaderin molekülleridir. E-kaderin 123 kD ağırlığında bir hücre yüzey glikoproteinidir ve  $Ca^{2+}$  varlığında epitel hücreleri arasında adezyonu sağlamaktadır. Bu glikoproteine uvomorulin, L-CAM, cell-CAM ya da arc-1 de denir. Normal epitel hücrelerinde E-Kaderinlerin daha çok hücre kenar kısımlarında eksprese edilirken tümörlü hücrelerde farklı bölgelerde eksprese edildikleri kaynaklarda ifade edilmektedir [30]. Genelde olgun epitel hücrelerinin adezyon noktalarında yoğunlaşmış hücre kabuk aktin ve iskeletini birbirine bağlarlar. E-Kaderinlerin fare embriyosunun sekiz hücreli gelişim dönemindeki morfolojik değişikliklerin oluşumu ve embriyo sıkışmasının meydana gelmesinde sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu sıkışma sayesinde blastomerler birbirine sıkıca bağlanarak paketlenmenin gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. Paketleme durdurulacağı zaman E-Kaderinlere karşı oluşturulan antikolar E-kaderinleri etkileyerek gelişim evresini kontrol etmektedir. E-Kaderinler omurgalılarda nöral tüp oluşumu sırasında ektodermden kopma gerçekleşirken nöral tüp hücreleri E-Kaderinlerini kaybeder ve diğer kaderin türlerini alırlar. Bu sırada ektodermden kalan hücreler E-Kaderin ekspresyonuna devam etmektedir. Bu şekilde kaderinlerin ifadesi ve kaybolması embriyonik gelişim evresi ve meydana gelen oluşumlarla uyum içerisinde devam etmektedir [30].

### **2.7.2. Kaderin-kanser ilişkisi**

Hücre-hücre adezyonunun insan kanser vakalarında oldukça düşük olduğu bilinmektedir. Hücre adezyonunun azalması hücre proliferasyonu sırasında kontakt inhibisyonun kaybı dolayısıyla da hücrelerin büyüme kontrolü sinyallerinden kaçmasına neden olmaktadır. Hücre döngüsünde, döngüyü kontrol eden siklin bağımlı kinazları inhibe eden p27 proteini, E-Kaderinler tarafından arttırılarak hücre proliferasyonunun durdurulduğu bilinmektedir [110]. Gelişen kanser türlerinde hücre-hücre adezyonunun kaybı, kanser hücrelerini ilk oluşum noktasından ayırarak ve ileri karsinojenik evreler olan invazyon ve metastaza yönlendirebilmektedir. Kaderinlerin kanser ve tümör

oluşumundaki rolü tek açıdan incelenecek kadar basit değildir. Bu ilişkiyi açıklamak için, hücre adezyon moleküllerini, bağlandıkları hücre iskelet elemanını, dahil oldukları sinyal yolunu ve bunun eksikliğinde veya hasarında meydana gelecek patolojik durumları ayrıntılı olarak ele almak gerekmektedir. Kaderinlerin ve özellikle de klasik kaderinlerden E-Kaderinlerin ekspresyonunun azalması, normal hücrelerde kanserleşmenin tek ve en etkili nedenlerinden olmasa da, kanser hücrelerinde E-Kaderin kaybı veya hasarının tümör hücrelerini daha agresif ve de invazyon ve metastaza uygun hale getirdiği kaynaklarda belirtilmiştir [111]. E-Kaderin kaybı hücre-hücre adezyonunu ortadan kaldırıp, kanserli hücreleri daha hareketli hale getirerek, uygun şartlar altında daha invazif hale dönüştürebilmektedir [111].

#### **2.7.2.1. E-Kaderinin kanserdeki rolü**

Kanser ve metastazın gelişim basamaklarından birincisinin hücre-hücre adezyonunun kaybı ve hareketlilik ile invazyonun artması olarak belirtilirken, bu durumun E-Kaderinlerin kaybı ile gerçekleşebildiği kaynaklarda ifade edilmektedir [112]. Hücre döngüsünde, p21'in baskılanması E-Kaderinler tarafından gerçekleştirilerek, hücre döngüsünün henüz tam olarak açıklanamayan bir mekanizmayla durdurulduğu ve hasarlı hücrenin döngü kontrol mekanizmalarından kaçmasını sağladığı literatürde yer almaktadır [110]. İnsanda görülen kanser vakalarında E-Kaderin/Katenin kompleksinin hücre adezyonunu sağlaması dışında sinyalleri nükleus ve hücre iskeletine doğrudan ya da bağlantı kompleksleri yoluyla ileten bir kompleks olduğu ifade edilmektedir [113]. Tümör hücrelerinde, fonksiyonel olarak E-Kaderinin yeniden düzenlenmesinin tümör tipini invazif biçimden benign epitel fenotipine çevirebildiği çalışmalarda bulunmuştur [114]. E-Kaderin-Katenin aracılı hücre-hücre adezyon mekanizmasında meydana gelen değişiklikler prostat kanser vakalarının yarısına yakın bir kısmında görülmekte ve böylece hücrelerin metastatik gücünün artmasıyla kanser daha da şiddetlenmektedir. Aynı zamanda, dendritik epidermal T hücrelerinin keratinositlere adezyonunda da E-Kaderinlerin rol oynadığı düşünülmektedir. İnsan meme kanserinde E-Kaderin ekspresyonunun invazyon ve metastaza yol açabildiği bilinmektedir [115]. İnsanda görülen kanser türlerinde genellikle hücre-hücre adezyonunun düşük olduğu kaynaklarda belirtilmiştir [115].



### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. MCF-7 hücreleri**

MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı American Type Culture Collection'dan (ATCC) temin edilmiştir. Esas ATCC numarası ve kodu HTB-22 olan MCF-7 hücreleri ATCC'nın önerdiği protokol doğrultusunda çoğaltılarak -196°C'de sıvı azotta stoklanmıştır.

##### **3.1.2. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri**

Dimetil sülfoksit (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid); Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10 mg/mL streptomisin), Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma); osmium tetraoksit, glutaraldehit, araldit, propilen oksit, uranil asetat, kurşun sitrat (Electron Microscopy Science); hücre siklus kiti (Cell Cycle DNA test plus reagent Kit, BD, Pharmingen, USA) ve Annexin V apoptosis detection kit (BD, Pharmingen, USA); phalloidine, Anti-E kaderine (Thermo Scientific), etil alkol, fluo-3, ATP, vanadium (IV)-oxid sulphate pentahydrate pure (VOSO<sub>4</sub>) (Riedel-de Haen cat: 14229 Lot: s29267-275, CA); Anti-siklin B1 ve Anti-siklin D1 (Santa Cruz, CA, USA) firmalarından temin edilmiştir. 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik flask (TPP, İsviçre); 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP, İsviçre); cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), pastör pipetler, enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), steril falkon tüpler (15 ve 50 mL) (TPP, İsviçre); steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), kriyotüp, yuvarlak lamel (Biolab) ve bakır grid (EMS, USA) firmalarından temin edilmiştir.

#### **3.2. Metod**

##### **3.2.1. MCF-7 hücrelerinin çoğaltılması**

Sıvı azot tankında -196°C'de stokta bulunan MCF-7 hücreleri tanktan çıkarılmış, çözüldükten sonra tüp içeriği %10 serum (Fetal Bovine Serum/FBS) içeren RPMI besi yeri içine alınarak, 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücreler yeni besi yeri içinde süspanse edilerek kültür flasklarına alınıp, 37°C'de, %5 karbon dioksit ve uygun nem standartlarını içeren inkübatörde inkübe edilmişlerdir. Tamamen hücrelerle kaplanmış flask içindeki besi yeri bir pipet yardımıyla

uzaklaştırılarak, PBS ile hafifçe yıkanmasından sonra 1x tripsin/EDTA solüsyonuyla inkübatörde hücreler kaldırılmıştır. Flask tabanından kalkan hücrelerin üstüne, tripsinin iki katı hacminde besi yeri eklenmiş ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan hücre pelleti üzerindeki besi yeri dökülerek yeniden besi yeri ilave edilmiş ve karıştırma işleminden sonra hücreler eşit oranlarda ayrı yeni flasklara bölünmüştür. Bu şekilde çoğaltılan hücreler 8. pasajda deneylerde kullanılmıştır. Hücrelerin bulunduğu flasklardan bazıları PBS ile yıkandıktan sonra, 1x tripsin/EDTA yardımıyla kaldırılıp yine iki katı besi yeri eklendikten sonra santrifüjlenmiş ve elde edilen hücre pelleti besi yerinde süspansiyon edilerek %5 oranında DMSO eklendikten sonra kriyo tüplerde dondurulup sıvı azotta stoklanmıştır.

### **3.2.2. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin sentezi**

Vanadil sülfat yüklü KLN hazırlamak için sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. KLN hazırlanmasında %3 lipid, %5 etken madde ve %1,2 oranında Tween 80 kullanılmıştır. Önce lipid 80°C'de çözünerek vanadil sülfat eklemesi yapılmış ve Tween 80 ilave edilerek ultra turaks ile 20500 rpm'de yaklaşık 1 dakika karıştırılarak vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonu elde edilmiştir. Boş katı lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında yine aynı yöntem kullanılmıştır fakat bunda vanadil sülfat eklemesi yapılmamıştır. Elde edilen süspansiyonlar oda sıcaklığında soğutulmuş ve 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek kullanıma kadar siyah cam şişede ve duzdolabında +4 °C'de saklanmıştır [69, 75].

#### **3.2.2.1. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin**

##### ***karakterizasyonu***

##### **3.2.2.1.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü**

Vanadil sülfat yüklü KLN'lerin zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için hazırlanan katı lipid nanopartiküller NaCl ile iletkenliği 50 µS'ye ayarlanmış distile suda seyreltilerek süspansiyon edilmiş ve cihazın küvetine yerleştirilmiştir. Küvetten yapılan ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olarak ayarlanmıştır. Her ölçüm ard arda üç kez tekrarlanmış ve elde edilen ortalama değerler kullanılmıştır [75].

### **3.2.2.1.2. Partikül yüzey morfolojisinin tayini**

Partikül yüzey morfolojisini incelemek amacıyla sentezlenen vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartikülleri, boş katı lipid nanopartikülleri ve vanadil sülfat kristalinin taramalı elektron mikroskobu (SEM)'de görüntülenmesi ve aynı zamanda da boyut ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçüm için boş katı lipid nanopartiküller, vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküller ve vanadil sülfat solüsyonlarından karbon bant yapıştırılan örnek tutucu (Stub)'lara birer damla damlatılarak örnekler desikatörde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler 1 dakika boyunca altın ile kaplandıktan sonra SEM (Zeiss UltraPlus) örnek tutucusuna yerleştirilerek morfolojik yapıları ve boyutları belirlenmiş ve görüntülenmiştir [116].

### **3.2.3. MTT kolorimetrik sitotoksitesite testi**

MCF-7 hücreleri 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına, kuyu başı  $2 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakaya ekilen hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de ve %5 karbon dioksitli ortamda inkübe edilmiştir. MCF-7 hücreleri, vanadil sülfat, boş KLN ve vanadil sülfat yüklü KLN'lerle, 40-170  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuğa 20  $\mu\text{L}$  MTT boyası (5 mg/mL) ilave edilerek,  $37^\circ\text{C}$ 'de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plakadaki her kuyucuk içeriğindeki sıvı kısım boşaltılarak canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için 200  $\mu\text{L}$  DMSO eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Oluşan renk değişimi, ELx808-IU (Bio-Tek, USA) plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Deney 3 kez tekrarlanmıştır. Vanadil sülfat ve KLN ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol olarak kabul edilmiştir. Her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır [64]. Uygulanan vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN'lerin MCF-7 hücreleri üzerindeki  $\text{IC}_{50}$  konsantrasyonu bu canlılık değerleri kullanılarak Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın geliştirmiş olduğu TRAP Version 1-22 programında hesaplanmıştır. Boş KLN'lerin uygulandığı grupta, kontrol grubu ile aynı canlılık yüzdeleri elde edildiği için  $\text{IC}_{50}$  konsantrasyonu hesaplanmamıştır.

### **3.2.4. Konfokal mikroskopi yöntemi**

#### **3.2.4.1. Hücredeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi ile tayini**

Konfokal mikroskopi yöntemi ile vanadil sülfat ve yeni sentezlenen vanadil sülfat yüklü-KLN ve boş KLN formülasyonunun MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu

morfolojik değişiklikler incelenmiştir. Konfokal mikroskopta inelenecek MCF-7 hücrelerinin hazırlanması için öncelikle  $3 \times 10^5$  hücre/kuyu yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen hücreler vanadil sülfat, vanadil sülfat KLN ve boş KLN formulasyonunun  $IC_{50}$  konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler fosfat tamponu (PBS)'de yıkanarak glutaraldehitte fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra yeniden PBS ile yıkanan hücreler akridin oranj ve falloidin boyaarı ile ikili boyanarak, hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopta (Leica TCS-SP5 II) Leica Confocal Software Version 2.00 yazılımı kullanılarak incelenmiş ve görüntülenmiştir [97].

### **3.2.4.2. Hücre içi kalsiyum derişimindeki değişikliklerin konfokal mikroskopi ile tayini**

Hücre içi kalsiyum derişimindeki değişiklikleri belirlemek amacıyla her kuyuda  $3 \times 10^5$  hücre olmak üzere MCF-7 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara steril yuvarlak lameller üzerinde ekilmiş ve 24 saat  $37^\circ C$ , %5 karbon dioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Lameller üzerinde üreyen hücreler 24 saat boyunca aynı şartlar altında inkübatörde vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN ile inkübe edilmiş. Kontrol grubu ise hiçbir maddeye maruz bırakılmamıştır. MCF-7 hücrelerinin ekildiği her lamel yıkandıktan sonra Fluo-3 boyası ve pluronik asit içeren solusyonda etüvde 1 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda yıkanan lameller konfokal mikroskobun yuvarlak lamel tutucu yuvasına yerleştirilerek konfokal mikroskop (Leica TCS-SP5 II) tablasına yerleştirilir. Örnekler üzerine ATP solusyonu eklenerek, (Leica TCS-SP5 II) Leica Confocal Software Version 2.00 programında GFP lazer ayarında hücre içi kalsiyum derişimleri ve grafikleri elde edilmiştir [117].

### **3.2.5. Geçirimli elektron mikroskopi yöntemi**

#### **3.2.5.1. Geçirimli elektron mikroskobunda hücre takip yöntemi**

Geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) ince yapı değişikliklerini incelemek amacıyla  $1 \times 10^6/mL$  yoğunluğundaki MCF-7 hücreleri 12 ayrı flaska her grup için 3'er tekrarlı olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat boyunca karbon dioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formlarının  $IC_{50}$  konsantrasyonları 3'er flaska uygulanmış ve 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. Üç flask MCF-7 hücresi ise kontrol hücresi olarak hiçbir maddeye maruz bırakılmadan inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda flasklarda glutaraldehit ile fikse edilen MCF-7

hücreleri doku takibine alınmış ve gece boyu +4°C’de glutaraldehit içinde fikse edilmiştir. Süre sonunda tampon ile yıkanan hücreler osmiyum tetraoksit içerisinde sekonder fiksasyona tabi tutulmuştur. Osmiyumun hücrelerden tampon çözeltisinde yıkanmasını takiben etil alkol serisinde (%50, %70, %90, %96 ve absolü etil alkol) dehidrate edilmiştir. Dehidratasyondan sonra, propilen oksitte şeffaflaştırılan hücreler resine alıştırıldıktan sonra kalıplara yerleştirilerek resinle bloklanmış ve 60°C’de etüvde 48 saat polimerizasyonu yapılan bloklar kesit almaya hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan bloklar traşlanarak 80-100 nm ince kesitleri alınmıştır. İnce kesitler bakır gridlere alınarak uranil asetat ve kurşun sitratta boyanarak geçirimli elektron mikroskobunda 120 KV’de (Biotwin FEI, USA) görüntülenmiştir [106].

### **3.2.6. Akış sitometri yöntemi**

#### **3.2.6.1. Akış sitometrinde anneksin V-FITC ve PI boyama yöntemi**

Akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI boyamak için öncelikle MCF-7 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara  $5 \times 10^5$  hücre her kuyuda olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat 37°C, %5 karbon dioksitli etüvde çoğaltılmıştır. Süre sonunda MCF-7 hücreleri vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN’nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler flastktan kaldırılmış ve 2 kere PBS’de santrifüjlenerek yıkanmıştır. Yıkanan hücrelerin 1 mL’deki sayısı hesaplanmıştır. Akış sitometri tüpüne 5 µL annexin ve 5 µL PI boyaları ilave edildikten sonra,  $1 \times 10^6$  hücre/mL hücre süspansiyonundan 100 µL boyaların üzerine aktarılarak ve oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika bekletildikten sonra akış sitometri cihazında (BD FACSCalibur™, ABD) analiz edilmiştir (Annexin V-FITC apoptosis detection kit, BD, Pharmingen).

#### **3.2.6.2. Akış sitometride hücre döngü analizi**

Akış sitometrisinde hücre döngüsünün analizinde CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (BD Pharmingen, ABD) kullanılmıştır. Bu kitin prensibinde iyonik olmayan bir deterjan kullanılarak hücre membran lipidleri çözülmekte ve tripsin kullanılarak da hücre iskeleti ve çekirdek proteinleri elimine edilmektedir. Hücredeki RNA bir enzim kullanılarak uzaklaştırılmakta ve çekirdek kromatini spermin ile stabilize edilmektedir. Propidyum iyodür (PI) stokiyometrik olarak izole edilmiş olan hücre çekirdeğine bağlanmış ve boyanan çekirdekler 580-650 nm dalga boyunda akış sitometride ışımaya yapar. DNA’sı analiz edilecek MCF-7 kontrol hücrelerine ( $5.0 \times 10^5$ ) 24 saat boyunca vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN’nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları

uygulanmıştır. Tüm deney gruplarına ait MCF-7 hücreleri ayrı ayrı tüplerde toplanıp 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatanı boşaltılmıştır. Tripsinli tampon olan A solusyonundan her tüpe 250 µL ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılarak oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir. Sürenin sonunda her tüpe 200 µL olmak üzere RNaz tamponu (tripsin inhibitörü) olan B solusyonu eklenmiş ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Her tüpe PI boya solusyonu olan C solusyonundan 200 µL ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılarak buzdolabında karanlık ortamda buz içerisinde 10 dk inkübe edilmiştir. Elli µm'lik filtreden geçirilen hücre örnekleri akış sitometri cihazında (BD FACSCalibur™, ABD) analiz edilmiştir.

### **3.2.7. İmmünohistokimyasal uygulamalar**

#### **3.2.7.1. MCF-7 hücrelerini sitosantrifüjde yayma yöntemi**

İmmünohistokimyasal işaretlemelerin yapılabilmesi için her kültür flaskına  $1.0 \times 10^6$  yoğunluğunda MCF-7 hücreleri ekilerek 37°C, %5 karbon dioksitli etüvde 24 saat çoğaltılmıştır. Çoğalan hücrelerin bulunduğu flasklardan 3 tanesine vanadil sülfat IC<sub>50</sub> konsantrasyonu, diğer 3 tanesine vanadil sülfat yüklü KLN'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ve kalan 3 tanesine de boş KLN IC<sub>50</sub> konsantrasyonu uygulanmıştır. Diğer bir seri 3 adet flask ise uygulama yapılmayan kontrol MCF-7 hücreleri olarak ayrılmıştır. Tüm flasklar etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra %4 glutaraldehit içerisinde tespit edilmiş ve flasklardan kazınan hücreler sitosantrifüj cihazında (Thermo Scientific Shandon CytoSpin 3) önceden temizlenen polilizinli lamaların yerleştirildiği numune yerleştirme ünitesine yerleştirilmiştir. Cihaza konulan hücre miktarı bitene dek sitosantrifüjde yayma işlemi devam ettirilmiştir. İşlem sonunda üzerine hücrelerin yayılmış olduğu lamalar cihazdan çıkarılarak temiz bir kurutma kağıdı üzerinde, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan bu lamlardaki hücrelere üzerinde immünohistokimyasal işaretlemeler gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.7.2. Siklinlerin immünohistokimyasal işaretlenmesi**

Sitosantrifüjde yayması gerçekleştirilen MCF-7 hücrelerinin bulunduğu lamalar metanolde 10 dk -20°C'de bekletilmiş ve akan çeşme suyunda yıkanmıştır ve distile sudan geçirilmiştir. Lamalar üzerinde bulunan hücrelerin etrafı doku sınırlama kalemikle çizilmiş ve tween 20'li PBS içinde 3 dk bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra kapalı ve nemli bir küvete alınan lamlardaki hücrelerin yüzeyini örtecek şekilde %3'lük hidrojen peroksit damlatılarak 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda lamalar tween 20'li PBS

içinde 3 dk yıkanmış ve ultra V blok tutucu solusyon damlatılarak 5 dk bekletilmiştir. Ultra V blok tutucudan süzdürülen lamalar üzerine primer antikolar (Anti-siklin B<sub>1</sub> ve Anti-siklin D<sub>1</sub>, Santa Cruz, CA) damlatılarak yine aynı nemli ve kapalı küvet içerisinde 1 saat boyunca bekletilmiştir. Lamlar fosfat tamponu ile 3 dk PBS’de yıkandıktan sonra amplifier (sinyal arttırıcı) damlatılarak 20 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve yine 3 dk PBS’de yıkandıktan sonra sekonder antikor-HRP polimer (biotinylated goat anti-polyvalent+streptavidin) damlatılarak 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Yine 3 dk PBS’de yıkanan lamalar üzerine AEC kromojen damlatılarak kiremit kırmızısı renk oluşuncaya kadar bekletilmiş ve akan çeşme suyunda yıkandıktan sonra hematoksilende 30 saniye boyanmıştır. Akan çeşme suyunda yıkanan lamalar %1’lik amonyaka 3 kez yıkanmış, tekrar akan çeşme suyunda yıkanmış ve distile suda çalkalanmıştır. Bu aşamadan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılan lamalar üzerine su bazlı kapama maddesi damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan lamlardaki MCF-7 hücrelerindeki işaretlemeler ışık mikroskobunda (Leica DM6000 B) incelenerek görüntülenmiştir.

### **3.2.7.3. E-Kaderinlerin immünohistokimyasal işaretlenmesi**

Vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN’nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarının 24 saat uygulandığı MCF-7 hücreleri ve kontrol MCF-7 hücreleri sitosantrifüjde yayılmış ve metanolde fikse edildikten sonra %3’lük hidrojen peroksitte bekletilmiştir. Daha sonra üzerlerine ultra V blok tutucu solusyon damlatılarak 5 dk bekletilen lamalar üzerine Anti-E-kaderin (Primer antikor, Thermo Scientific) damlatılmış ve nemli ve kapalı boyama küveti içinde 1 saat inkübe edilmiştir. Sinyal arttırıcı solusyonun da uygulandığı lamalar oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiş ve sekonder antikor-HRP polimer (biotinylated goat anti-polyvalent+streptavidin) ile 30 dk bekletilmiş ve sonra AEC kromojenle muamele edildikten sonra hematoksilin boyaması yapılarak incelemek üzere lamel kapatılmış ve ışık mikroskobunda (Leica DM6000 B) görüntülenmiştir.

### **3.2.8. İstatistiksel analiz**

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)’nın geliştirmiş olduğu TRAP Version 1-22 programı kullanılarak IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ve % 95 güven aralıkları hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Vanadil Sülfat ve Vanadil Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin

#### Karakterizasyon Bulguları

#### 4.1.1. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin partikül boyutunun ölçülmesine ait bulgular

Sentezlenen nanopartiküllerin fiziksel kararlılıkları ve etkinlikleri, partikül büyüklüğüne göre farklılık göstermektedir [118]. Bu nedenle, çalışmamızda yeni sentezlediğimiz vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının 0. günde 25°C’de parçacık boyutları ölçülmüştür. Vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının partikül boyutlarının, sırasıyla 288,1 nm ve 293,8 nm olduğu tespit edilmiştir. Vanadil sülfatın yine aynı şartlar altında ölçülen partikül boyutunun ise 15040 nm, 15,04 µm olduğu saptanmıştır. Yine aynı şartlar altında gerçekleştirilen polidispers indeks ile parçacık dağılımı değerlendirmesinde vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN partiküllerinin indeksinin sırasıyla 0,853 ve 0,638 olduğu tespit edilmiştir. Polidispers indeksi sıfıra yakın olan ürünlerin homojen dağılım gösterdiği kabul edilmiştir (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.** Vanadil Sülfat, Boş KLN ve Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonlarının Partikül Boyutu ve Polidispers İndeks Değerleri

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm)		Polidispers İndeksi (PI)	
	Ortalama (n=3)	S.S.	Ortalama (n=3)	S.S.
Vanadil Sülfat	15040	1,0528	7,750	0,98
Boş KLN	293,8	1,5701	0,638	0,53
Vanadil sülfat yüklü KLN	288,1	0,0125	0,853	0,77



#### 4.1.2. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümü bulguları

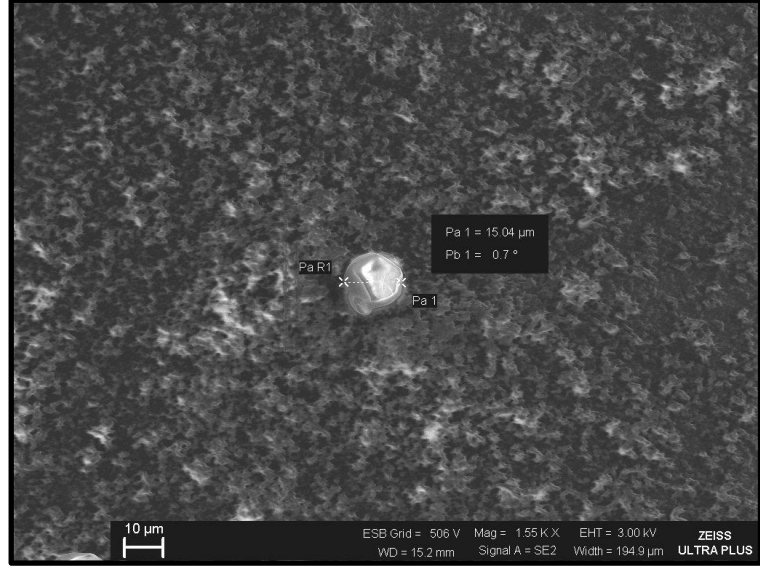
Zeta potansiyel ölçümü, katı lipid nanopartiküllerin yüzeyindeki net yükün belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir [119, 120]. Partiküller, zeta potansiyel değerlerine göre farklı kararlılık derecelerine sahip olabilmektedir [119]. Çalışmamızda, yeni sentezlenen partiküllerin elektrostatik kararlılığını belirlemek amacıyla, elektriksel iletkenliklerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN partiküllerinin ölçülen zeta potansiyel değerleri sırasıyla 21,6 ve 20,5 mV olarak tespit edilmiştir. Bu partiküllerin elektriksel iletkenlik değerleri ise sırasıyla 4,67 ve 3,73 mS.cm<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** Boş KLN ve Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonlarının Zeta Potansiyel ve Elektriksel İletkenlik Değerleri

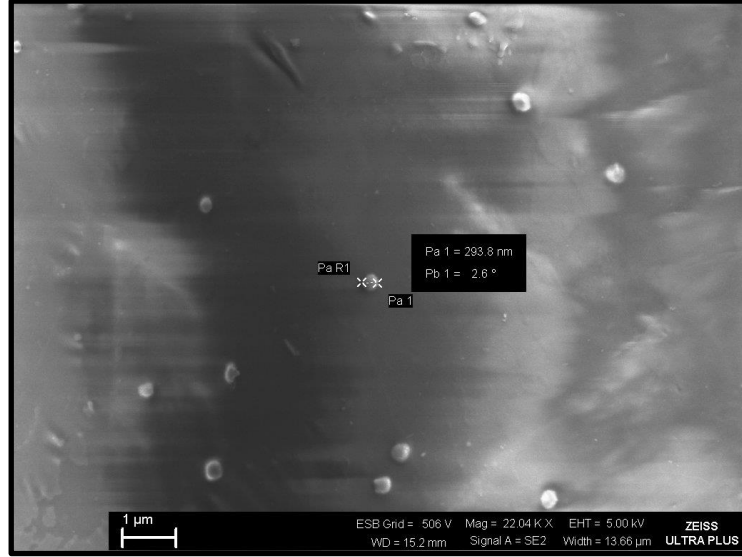
Formülasyonlar	Zeta Potansiyel (mV)		Elektriksel İletkenlik (mS.cm <sup>-1</sup> )	
	Ortalama (n=3)	S.H.	Ortalama (n=3)	S.S.
Boş KLN	-20,5	2,54	3,73	1,1230
Vanadil sülfat yüklü KLN	-21,6	1,98	4,67	0,0987

#### 4.1.3. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin yüzey morfolojisi bulguları

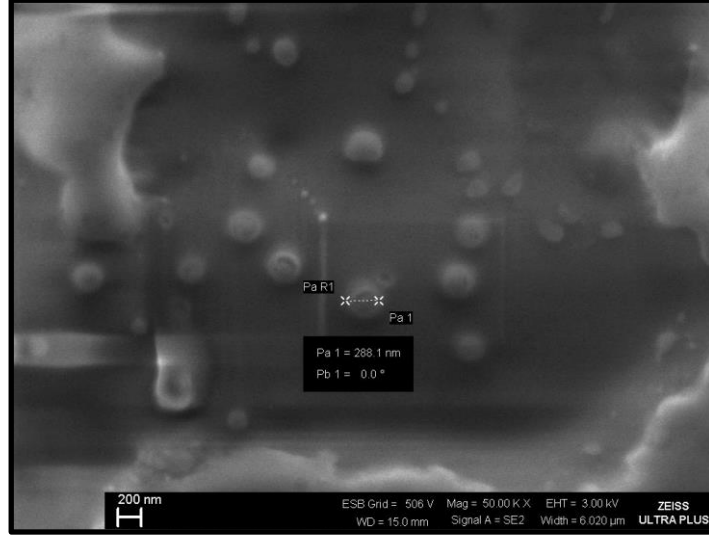
Vanadil sülfat ve yeni sentezlenmiş vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının partikül morfolojisi taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenmiştir. Bu inceleme sırasında çekilen görüntüler sırasıyla Görsel 4.1, Görsel 4.2. ve Görsel 4.3'de gösterilmiştir. Bu ölçümde, vanadil sülfatın kristal yapılı olup, boyutunun 15,04 µm olduğu, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının partikül boyutları ise, sırasıyla, 288,1 ve 293,1 nm olduğu ve küresel şekilli oldukları tespit edilmiştir.



**Görsel 4.1.** *Vanadil Sülfat Kristalinin SEM Görüntüsü*



**Görsel 4.2.** *Boş KLN Formulasyonunun SEM Görüntüsü*

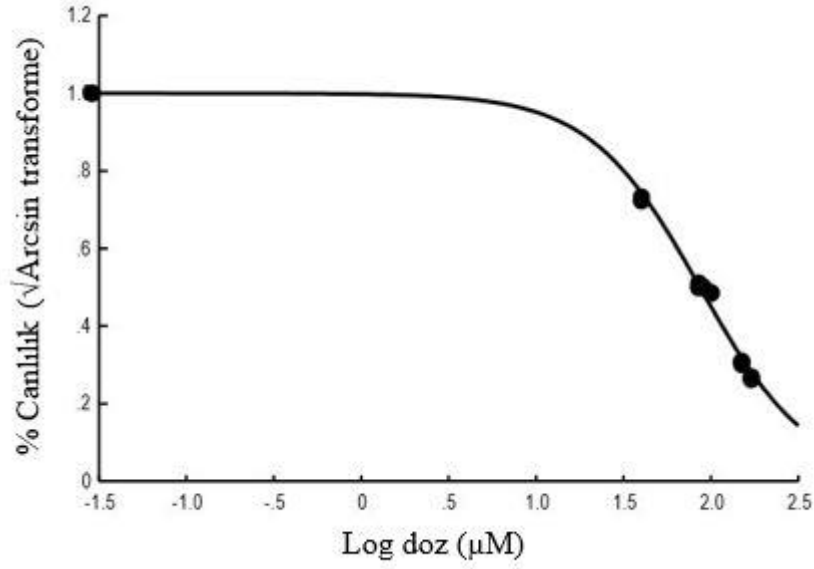


Görsel 4.3. Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun SEM Görüntüsü

## 4.2. MTT Kolorimetik Sitotoksosite Bulguları

### 4.2.1. Vanadil sülfatın MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları

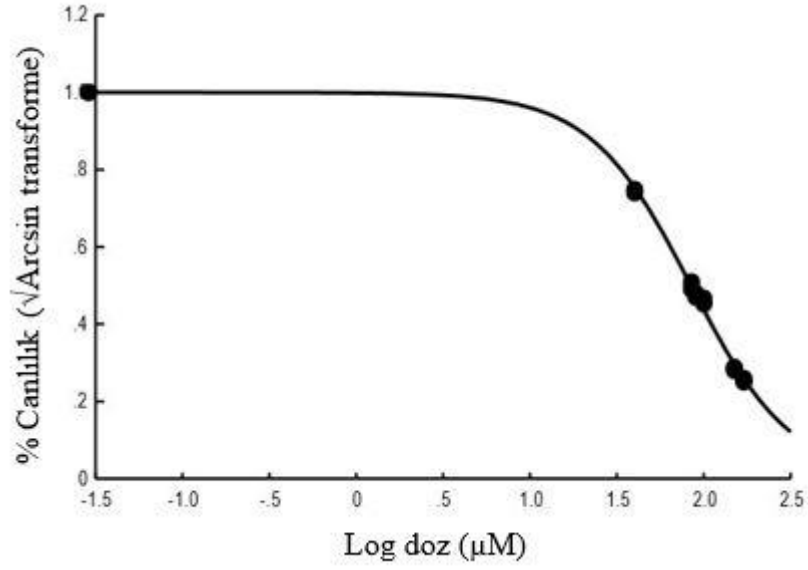
Vanadil sülfatın MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksitesini MTT yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemle MCF-7 hücrelerine uygulanan 40-170  $\mu\text{M}$  aralığındaki vanadil sülfat konsantrasyonları arttıkça, hücrelerin canlılık yüzdelerinde azalmanın 24 saat sonunda meydana geldiği bulunmuştur. 40-170  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarının uygulandığı MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdesi kontrol MCF-7 hücrelerindeki canlılık yüzdesiyle karşılaştırıldığında doza bağımlı olarak düşmüştür. Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon eğrisi TRAP Version 1-22 (EPA, ABD) programı kullanılarak oluşturulan grafikte, Şekil 4.1’de gösterilmiştir.  $\text{IC}_{50}$  konsantrasyonu yine aynı programda 85  $\mu\text{M}$  (% 95 güven aralığı = 82,29-91,01) olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.1.** Vanadil Sülfatın MCF-7 Hücrelerine 24 Saatlik Uygulanması Sonucundaki Antiproliferatif Etkisi. (EPA'nın geliştirdiği TRAP Version 1-22 programı ile elde edilen grafikte IC<sub>50</sub> değeri 85 μM olarak tespit edilmiştir.)

#### 4.2.2. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları

Vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksitesi MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Vanadil sülfat uygulamasında olduğu gibi burada 40-170 μM aralığındaki vanadil sülfat yüklü KLN konsantrasyonları MCF-7 hücrelerine uygulanmış ve uygulama yapılmayan MCF-7 hücreleri ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. MTT sonuçlarından 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin doza bağımlı olarak düştüğü tespit edilmiştir. Üç tekrarlı deneyden elde edilen canlılık yüzdelerinden TRAP Version 1-22 (EPA, ABD) programı kullanılarak IC<sub>50</sub> konsantrasyonu 85 μM (% 95 güven aralığı = 81,84-87,04) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2'de).



Şekil 4.2. Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun MCF-7 Hücrelerine 24 Saatlik Uygulanması Sonucundaki Antiproliferatif Etkisi (EPA'nın geliştirdiği TRAP Version 1-22 programı ile elde edilen grafikte IC<sub>50</sub> değeri 85 µM olarak tespit edilmiştir.)

#### 4.2.3. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik bulguları

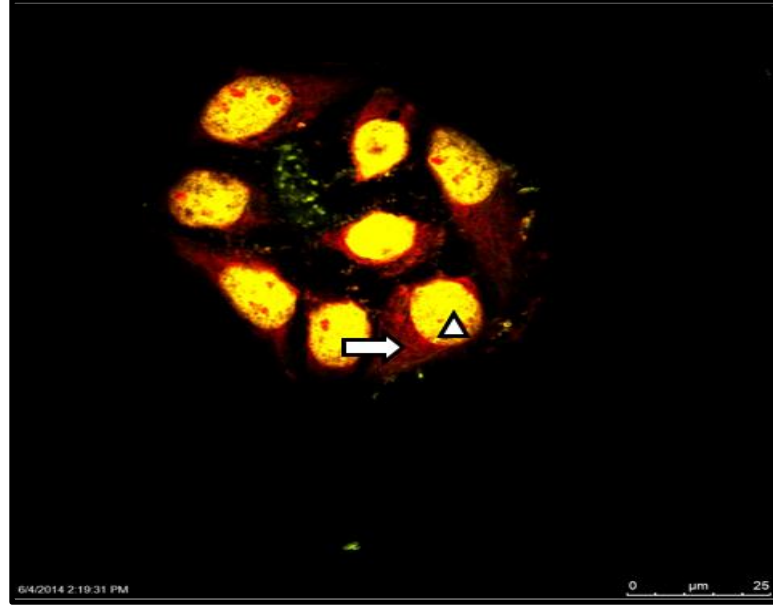
MCF-7 hücrelerine 24 saat süre ile uygulanan boş KLN formülasyonunun 40-170 µM konsantrasyon aralığında hücreler üzerinde anlamlı derecede sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Kontrol grubu MCF-7 hücreleri ile aynı % canlılık değerleri elde edildiği için IC<sub>50</sub> hesaplanmamıştır.

### 4.3. Konfokal Mikroskopik Bulgular

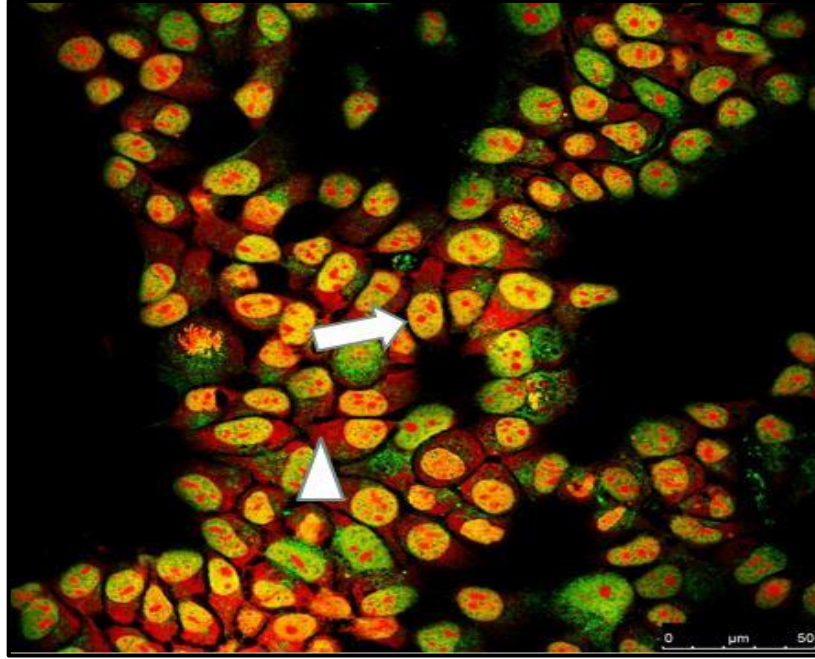
#### 4.3.1. Hücredeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları

##### 4.3.1.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskopik bulguları

MCF-7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısı akridin oranj ve falloidin ile ikili boyamadan sonra konfokal mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Kontrol MCF-7 hücrelerine ait konfokal mikroskop görüntüsü Görsel 4.4.A ve Görsel 4.4.B'de gösterilmektedir.



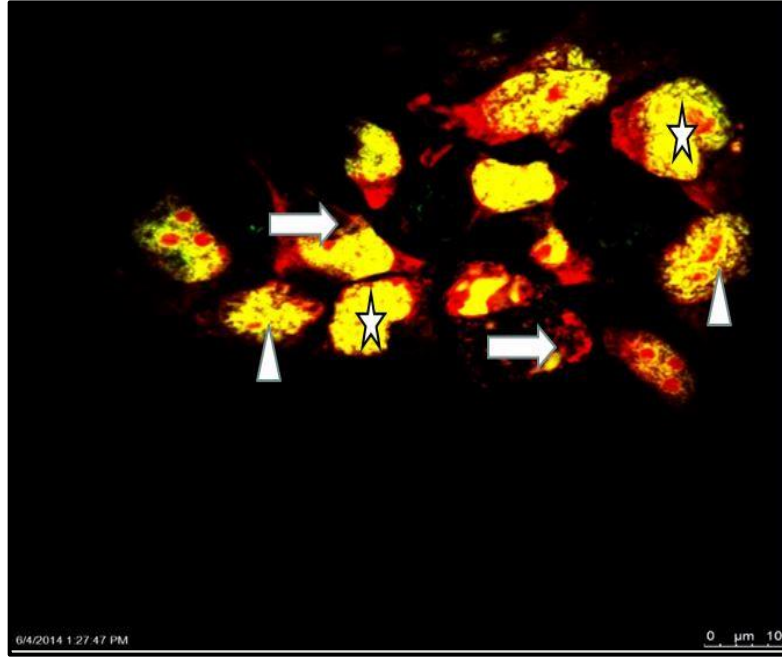
**Görsel 4.4. A.** Akridin Oranj ve Falloidin ile İkili Boyanmış Kontrol MCF-7 Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı; çekirdek yapısı, Ok; hücre iskeleti



**Görsel 4.4. B.** Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Kontrol MCF-7 Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı; Normal hücre iskeleti, Ok; Normal Çekirdek Yapısı

#### **4.3.1.2. Vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları**

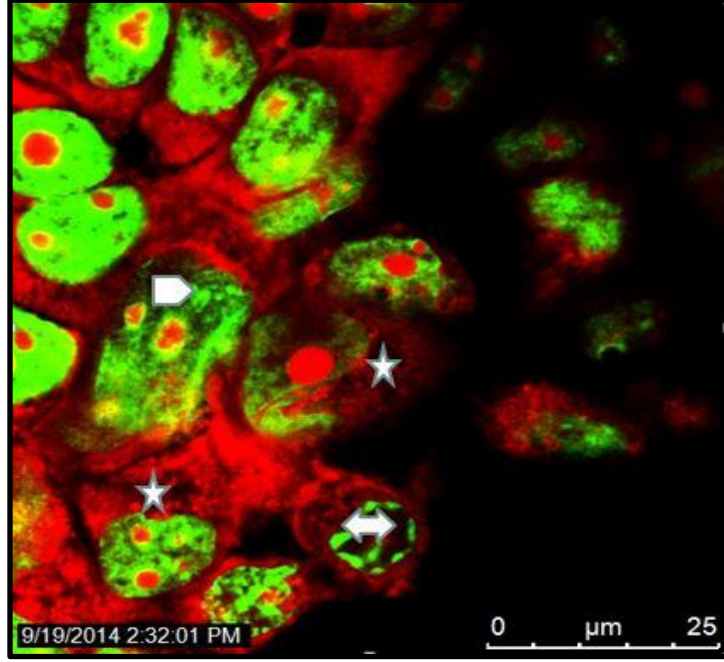
Vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinin morfolojik yapısında meydana getirdiği değişiklikler akridin oranj ve falloidin ile ikili boyamadan sonra konfokal mikroskopta incelenmiştir. Vanadil sülfat uygulanmış MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüleri Görsel 4.5 'de gösterilmektedir.



**Görsel 4.5.** Vanadil Sülfatın IC<sub>50</sub> Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Konfokal Mikroskopik Görüntüsü (40x). Ok-Hücre İskeletinde Parçalanma, Ok Başlı-Kromatin Kondenzasyonu, Yıldız-At Nalı Görünümlü Çekirdek Oluşumu

#### **4.3.1.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları**

Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin IC<sub>50</sub> konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı MCF-7 hücrelerinin morfolojik değişiklikleri akridin oranj ve falloidin ile ikili boyama gerçekleştirilerek konfokal mikroskopta değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye ait görüntüye Görsel 4.6'da yer verilmektedir.

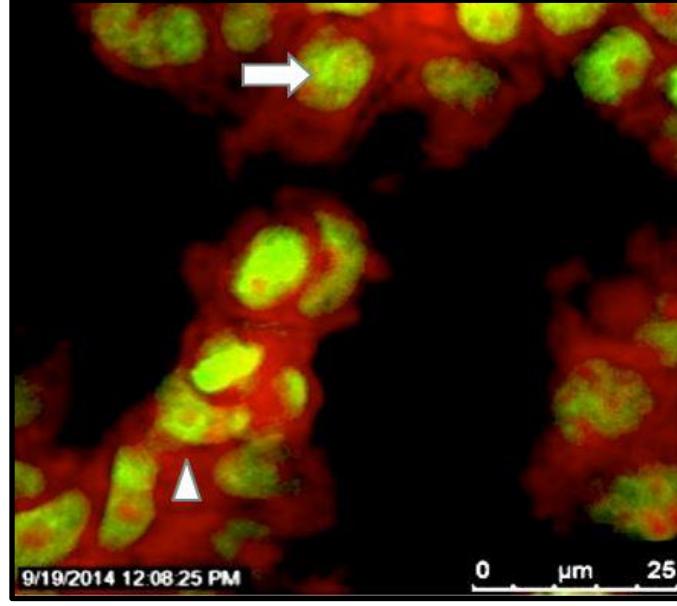


**Görsel 4.6.** Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun  $IC_{50}$  Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Konfokal Mikroskopik Görüntüsü (40x). Çift Başlı Ok-Yüzük Şeklinde Çekirdek Parçalanması, Ok Başlı-Kromatin Kondenzasyonu, Yıldız-Hücre İskeletinde Delik Oluşumu ve İskelet Parçalanması

#### **4.3.1.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi bulguları**

MCF-7 hücrelerinin boş KLN formülasyonunun farklı konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulamasından sonra  $IC_{50}$  değeri tespit edilememiştir. Bu boş formülasyonun MCF-7 hücrelerine anlamlı derecede sitotoksik etkisinin tespit edilememesi nedeniyle vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun MCF-7 hücrelerinin yarısını öldürdüğü konsantrasyon olan 85  $\mu$ M konsantrasyonu kadar boş KLN formülasyonu hücrelere 24 saat süre ile uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda yine akridin oranj ve falloidin ile ikili olarak boyanan MCF-7 hücrelerinin morfolojik yapısı konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir (Görsel 4.7.).

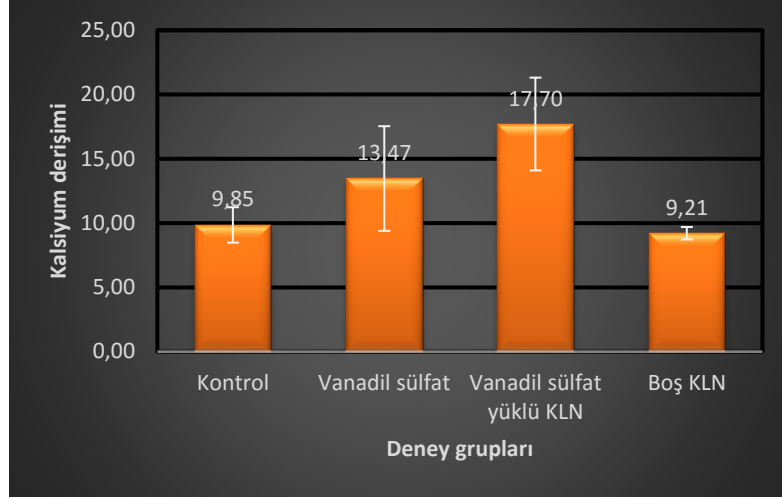




**Görsel 4.7.** Boş KLN Formülasyonunun 24 Saat Boyunca Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin ile Boyanmış Konfokal Mikroskopik Görüntüsü (40x). Ok başı-Normal Hücre İskeleti, Ok-Kontrol Grubundaki Çekirdek Yapısına Çok Yakın Çekirdek Yapısı

#### 4.3.2. Hücre içi bazal kalsiyum derişimindeki değişikliğin konfokal mikroskopik bulguları

Hücre içi kalsiyum derişimi, hücrelerin canlılık ve biyokimyasal faaliyetlerini gerçekleştirmeleri bakımından önemlidir. Bu derişimde meydana gelen değişiklikler hücre canlılığının sürdürülebilmesi için belirli aralıklarda tutulmalıdır. Değişimin artışı hücrenin ölümü daha doğrusu apoptotik hücre ölümü ile ilişkilendirilmektedir. Kalsiyum teşvikli kalsiyum salınımının vanadyum bileşikleri tarafından Jurkat T hücrelerinde teşvik edildiği literatürde yer almaktadır [41]. Bu çalışmada, vanadil sülfatın ve sentezlemiş olduğumuz vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun MCF-7 hücreleri üzerinde hücre içi bazal kalsiyum derişimini etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla vanadil sülfat KLN formülasyonunun ve vanadil sülfatın uygulandığı ve uygulanmadığı MCF-7 hücrelerinde konfokal mikroskopta bazal kalsiyum ölçümü gerçekleştirilmiştir. Hücre içi kalsiyum derişiminin değişiklikleri fluo-3 boyası ile boyanmış MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskoptan elde edilen eksitasyonlarından grafik olarak elde edilmiştir. Hücre içi bazal kalsiyum derişimindeki değişikliklerin tüm deney gruplarından elde edilen verilerinin karşılaştırmalı olarak yer aldığı grafik Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

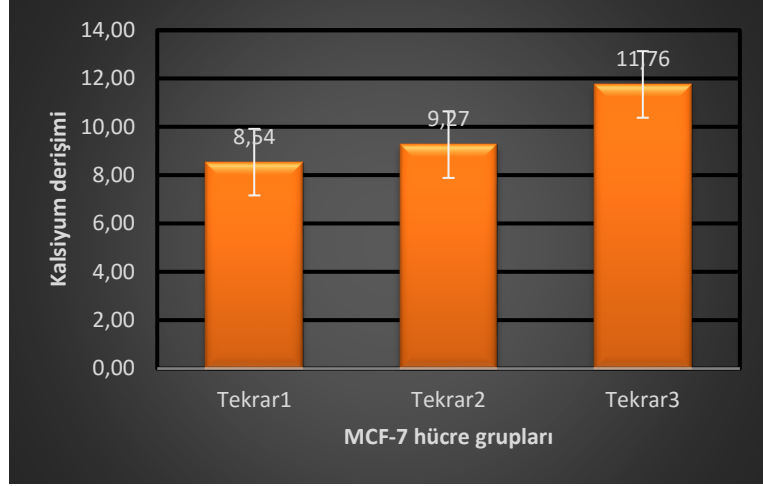


**Şekil 4.3.** Vanadil Sülfat, Vanadil Sülfat Yüklü KLN, Boş KLN Formulasyonlarının Uygulandığı MCF-7 Hücreleri ve Kontrol Grubu MCF-7 Hücrelerine Ait Bazal Kalsiyum Ölçüm Sonuçları

Konfokal mikroskop ölçümünden elde edilen bu değerlerin standart sapma hesaplamalarından, vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun 24 saat boyunca uygulandığı MCF-7 hücrelerinde yüksek standart sapma olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu durumun, lamellere ekilen hücre sayısının eşit olmasına rağmen, hücrelerin üst üste üreme özelliğinden dolayı, daha kalın bölgelerde Fluo-3 boyasının daha yüksek ışımaya vermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.3.2.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin hücre içi kalsiyum miktarının konfokal mikroskopik bulguları**

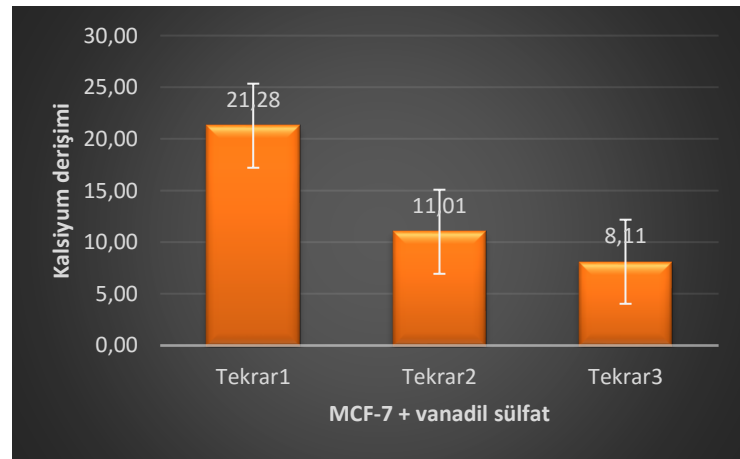
MCF-7 kontrol hücrelerinin bazal kalsiyumları diğer grupların bu hücre grubuyla karşılaştırılması açısından fluo-3 boyası ile boyanarak konfokal mikroskopta ölçülmüştür. Tüm deney gruplarında her MCF-7 hücre grubunun bazal kalsiyum değerlendirmesi üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen kalsiyum seviyesinin üç tekrarın ortalaması dikkate alındığında 9,85 civarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. MCF-7 Kontrol Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri

#### 4.3.2.2. Vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinde neden olduğu hücre içi kalsiyum derişimi değişikliğinin konfokal mikroskopik bulguları

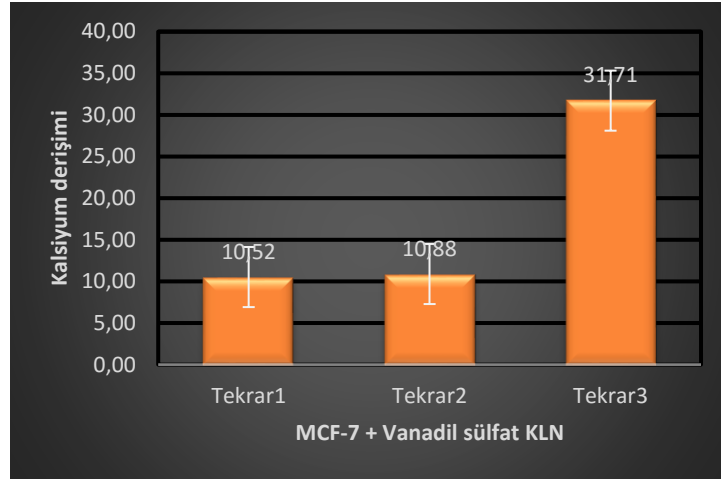
Vanadil sülfatın IC<sub>50</sub> konsantrasyonuna (85 µM) 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin hücre içi bazal kalsiyum derişimleri diğer hücre gruplarıyla eşzamanlı olarak gerçekleştirilmiş ve bu grupta da deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu üç MCF-7 hücre grubunun ortalama kalsiyum derişimi 13,47 civarında olduğu tespit edilmiş ve kontrol grubuna göre kalsiyum derişiminin artmış olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri

#### 4.3.2.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu hücre içi kalsiyum derişimi değişikliğinin konfokal mikroskopik bulguları

Vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun IC<sub>50</sub> konsantrasyonu (85 µM) ile 24 saat muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin bazal kalsiyum derişimleri kontrol hücreleriyle aynı günde olacak şekilde konfokal mikroskopta ölçülmüştür. Vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerindeki hücre içi kalsiyum derişiminin 17,70 civarında olduğu bulunmuştur. Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en yüksek kalsiyum derişiminin vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.6.).

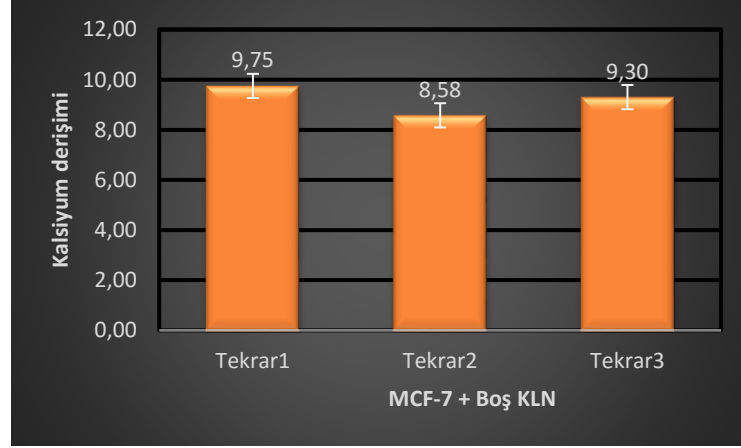


Şekil 4.6. Vanadil Sülfat KLN Formülasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri

#### 4.3.2.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu hücre içi kalsiyum derişimi değişikliğinin konfokal mikroskopik bulguları

Yeni sentezlenen boş KLN formülasyonunun IC<sub>50</sub> konsantrasyonu MCF-7 hücrelerinde diğer KLN formları ve vanadil sülfat uygulanma süresi içerisinde tespit edilemediğinden bu formülasyonun MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle karşılaştırma amacıyla vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun MCF-7 hücreleri üzerinde tespit edilen IC<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 85 µM olarak boş KLN formülasyonu ile hücreler 24 saat muamele edilmiş ve diğer hücre gruplarıyla eşzamanlı olarak hücre içi kalsiyum derişimleri ölçülmüştür. Bu grupta da üç deney tekrarı yapılmış ve sonuç olarak üç ölçümün

ortalaması alınmıştır. Hücre içi bazal kalsiyum derişimi boş KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücre grubunda yaklaşık 9,91 olarak bulunmuştur. Bu değer kontrol MCF-7 hücrelerinde ölçülen değere çok yakın olduğundan boş KLN formülasyonunun MCF-7 hücrelerinin hücre içi bazal kalsiyum derişiminde anlamlı bir değışikliğe neden olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.7.).

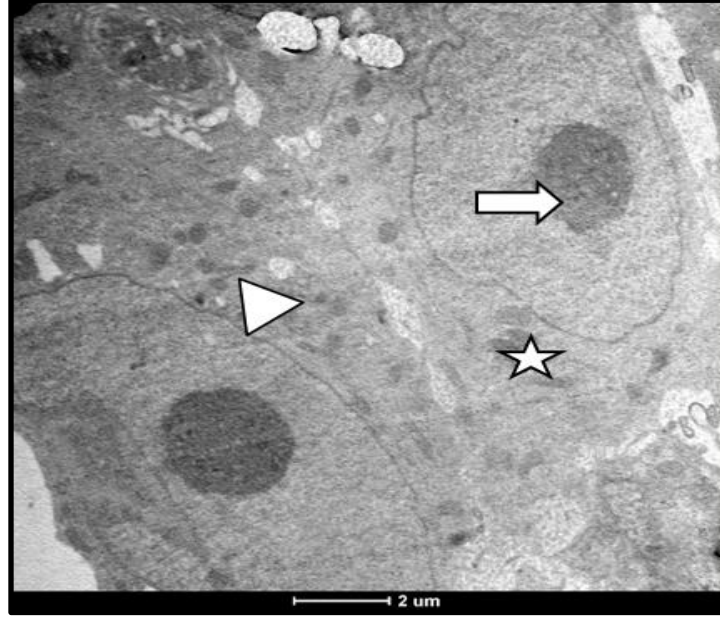


Şekil 4.7. Boş KLN Formülasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Bazal Kalsiyum Ölçümü Verileri

#### 4.4. Geçirimli Elektron Mikroskopik Bulgular

##### 4.4.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopik bulguları

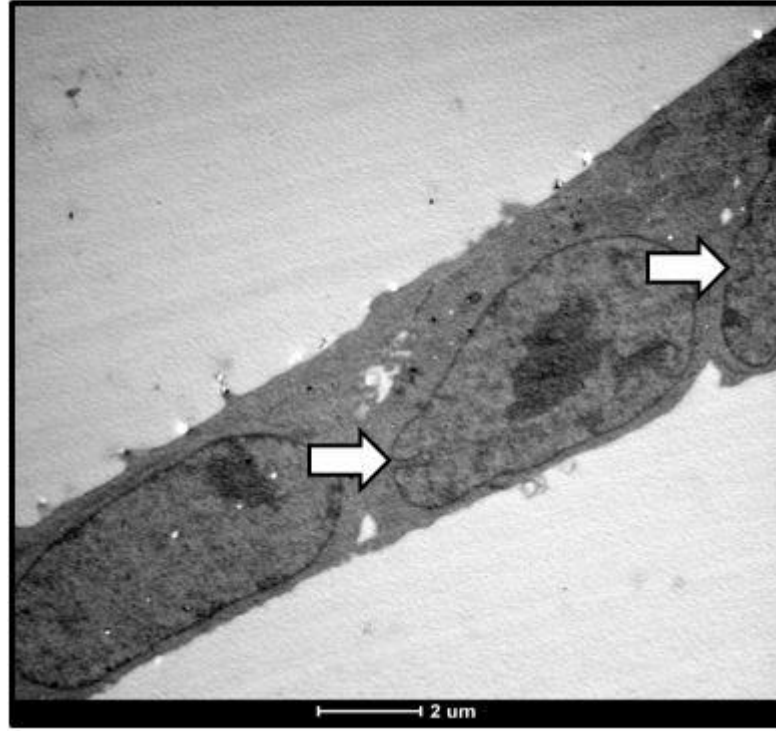
MCF-7 kontrol hücrelerinin ince yapısı vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonların uygulanmasından sonra meydana gelecek sitotoksik etki nedeniyle oluşan değışikliklerin karşılaştırılması açısından geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) görüntülenmiştir. Görsel 4.8’de kontrol MCF-7 hücrelerine ait TEM görüntüleri yer almaktadır.



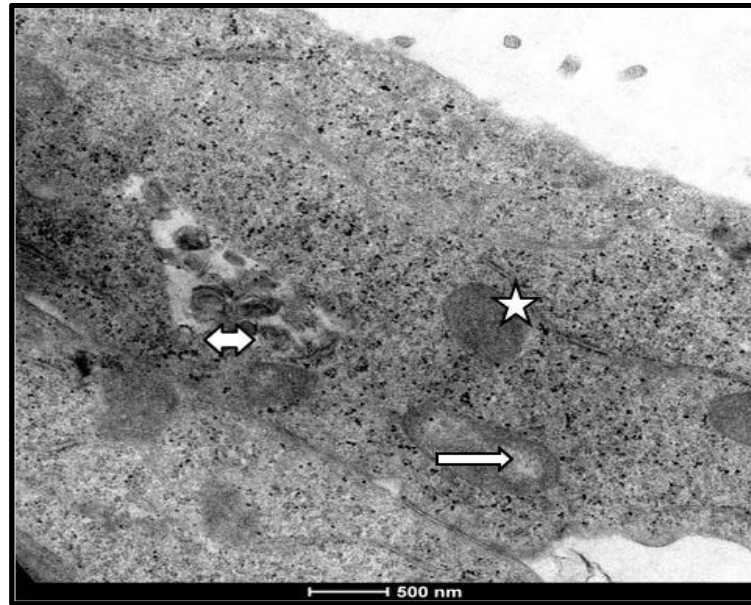
**Görsel 4.8.** Kontrol MCF-7 Hücrelerine Ait TEM Görüntüsü (6000x). Ok Başı-Normal Çekirdek Membranı, Ok-Normal Çekirdekçik Yapısı, Yıldız-Normal Hücre İskeleti ve Organeller

#### **4.4.2. Vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları**

Vanadil sülfatın 85  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin ince yapısal değişiklikleri TEM’de incelenmiştir. Bu incelemeye ait hücre membranında tomurcuklanma, hücre çekirdek membranında içe göçme, kromatin kondenzasyonu, mitokondrilerde meydana gelen krista kaybı, otofagozom oluşumu, vakuolizasyon ve mineralizasyon, lipid artışı, sekonder lizozom oluşumu şeklindeki ince yapısal değişiklik bulguları Görsel 4.9., Görsel 4.10, Görsel 4.11. ve Görsel 4.12’de gösterilmektedir. Ayrıca, bu MCF-7 hücrelerinde dağılmış mitokondri zarı, krista kaybı ve genişlemiş mitokondri kompartımanları tespit edilmiştir (Görsel 4.13. ve Görsel 4.14.).



**Görsel 4.9.** Vanadil Sülfatın  $IC_{50}$  Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü (6000x). Ok-Hücre Çekirdek Membranında Ondülasyon

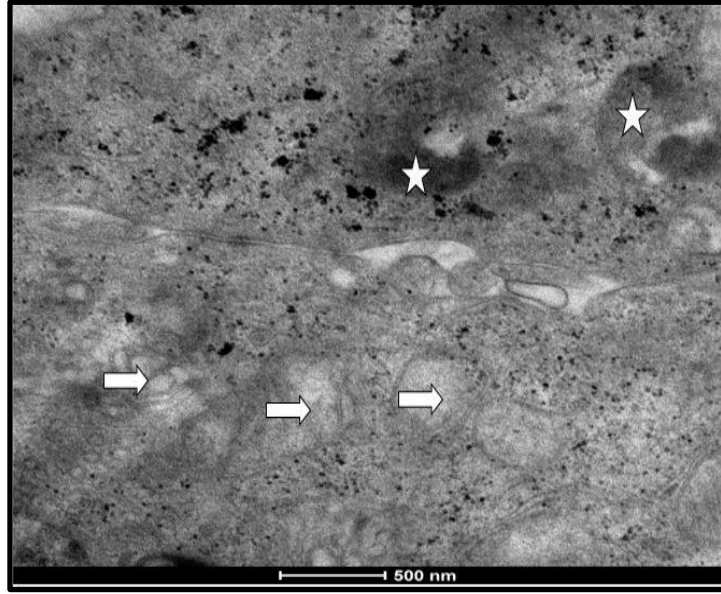


**Görsel 4.10.** Vanadil Sülfatın  $IC_{50}$  Konsantrasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü (8000x). Ok-Krista Kaybı, Çift Başlı Ok-Otofagozom Oluşumu, Yıldız-Hücre Çekirdek Membranında Ondülasyon, Ok Başlı-Kromatin Kondenzasyonu, Yıldız-Miyelinizasyon ve Vakuolizasyon





**Görsel 4.11.** Vanadil Sülfatın 24 Saatlik  $IC_{50}$  Konsantrasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü (7000x). Ok Başlı-Lipid Artışı, Romboit-Vakuolizasyon

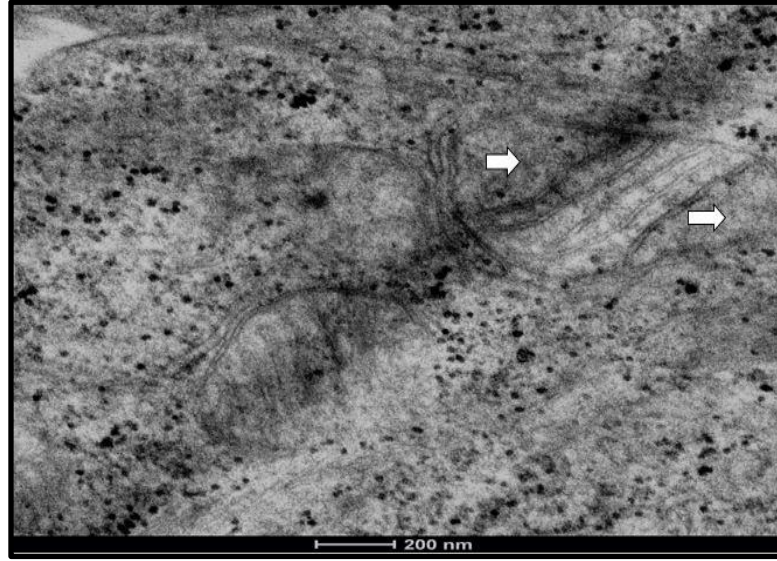


**Görsel 4.12.** Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinin İnce Yapısal Değişiklikleri (8000x). Ok-Zarlı Organellerde Bozulmalar, Yıldız-Sekonder Lizozom Oluşumu





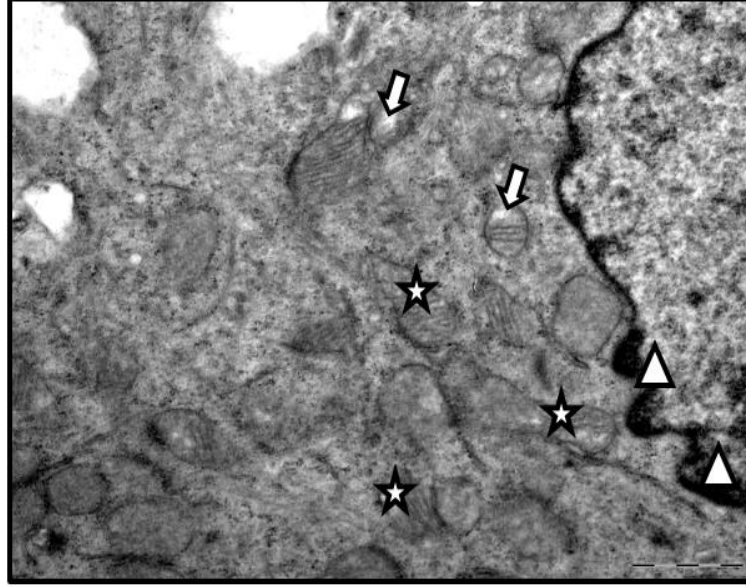
**Görsel 4.13.** *Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücresinde Tespit Edilen Genişlemiş Mitokondri Kompartmanı (10000x)*



**Görsel 4.14.** *Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücresinin Mitokondrisinde Meydana Gelen Krista Kaybı (10000x)*

#### **4.4.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimsiz elektron mikroskopik bulguları**

Vanadil sülfatın yeni sentezlenen KLN formunun uygulandığı MCF-7 hücre grubunda vanadil sülfatın uygulandığı hücre grubuna göre daha belirgin ince yapısal değişiklikler meydana gelmiştir. Bu değişiklikler Görsel 4.15’de gösterilmiştir.



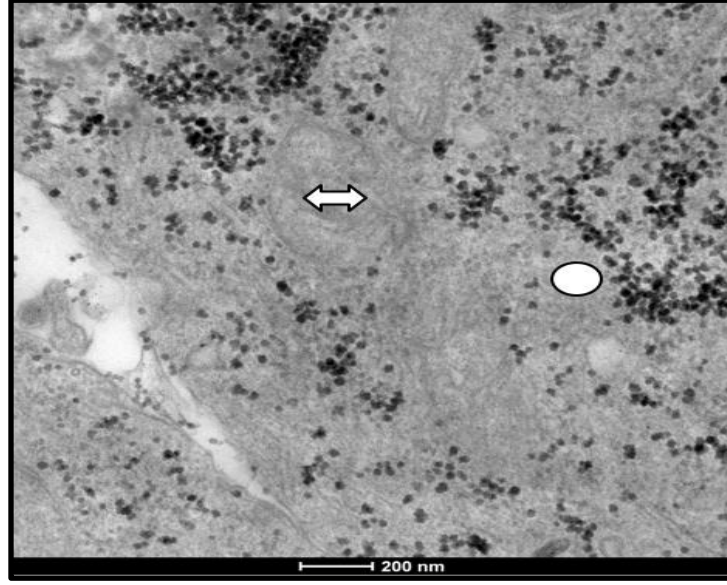
**Görsel 4.15.** Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinde Tespit Edilen İnce Yapısal Değişiklikler (8000x). Ok Başlı-Hücre Çekirdeğinde Büzüşme, Yıldız-Hasarlı, Şişmiş/Büzülmüş ve Polimorf Mitokondriler, Ok-İleri Derecede Krista Kaybı Olan mitokondriler

#### 4.4.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin elektron mikroskopik bulguları

Boş KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerinde belirgin ince yapısal değişiklik tespit edilmemiştir. Bu hücrelerin ince yapısı kontrol MCF-7 hücrelerinin ince yapısına nispeten daha yakın bulunmuştur (Görsel 4.16. ve Görsel 4.17.).



**Görsel 4.16.** Boş KLN Formülasyonunun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerindeki İnce Yapısal Değişiklikler (4000x). Ok-Normal Yapılı Hücre Çekirdek Membranı, Ok Başlı-Normal Hücre İskeleti



**Görsel 4.17.** *Boş KLN Formülasyonuna Maruz Bırakılan MCF-7 Hücresinin İnce Yapısı (8000x).  
Çift Başlı Ok-Mitokondri, Daire-Normal Hücre İskeleti*

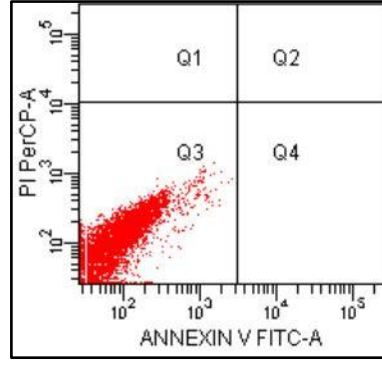
#### **4.5. Akış Sitometrisi Bulguları**

##### **4.5.1. Anneksin V-FITC ve PI boyamanın akış sitometrisindeki bulguları**

MCF-7 kontrol hücrelerinin ve vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonun uygulandığı MCF-7 hücrelerinin ölüm şekli ya da apoptotik profilleri akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI boyaları kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde, Q1; nekrotik veya ölü hücreleri yani anneksin V-FITC ile boyanmamış fakat PI ile boyanmış hücreleri, Q2; geç apoptotik hücreleri yani annexin V-FITC ve PI ile boyanmış hücreleri, Q3; canlı yani anneksin V-FITC ve PI ile boyanmamış hücreleri ve Q4; erken apoptotik yani anneksin V-FITC ile boyanmış PI ile boyanmamış hücrelerin olduğu alanlar olarak ele alınmıştır.

##### **4.5.1.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI boyama bulguları**

Kontrol MCF-7 hücrelerinin apoptotik profili akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI boyaları kullanılarak incelenmiş ve deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. MCF-7 kontrol hücrelerinin bulunduğu deney grubuna ait populasyonun tamamı canlı hücrelerin bulunduğu Q3 bölgesinde tespit edilmiştir. Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde apoptotik, nekrotik veya ölü hücre populasyonu saptanmamıştır (Şekil 4.8.).

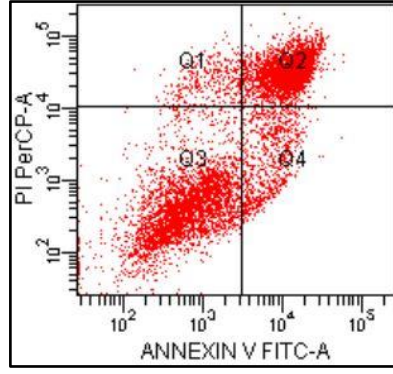


**Şekil 4.8.** MCF-7 Kontrol Hücrelerinin Apoptotik Profili. Q1: Geç Nekrotik, Nekrotik veya Ölü Hücreler (%0), Q2: Nekrotik, Erken Nekrotik veya Geç Apoptotik Hücreler (%0), Q3: Canlı Hücreler (%100) ve Q4: Apoptotik veya Erken Apoptotik Hücreler (%0)

#### 4.5.1.2. Vanadil sülfat uygulanan MCF-7 hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI bulguları

Vanadil sülfatın IC<sub>50</sub> konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin apoptotik profili incelendiğinde geç nekrotik, nekrotik veya ölü hücrelerin olduğu Q1 alanında bulunan MCF-7 populasyonu %4,3, nekrotik, erken nekrotik veya geç apoptotik hücrelerin bulunduğu Q2 alanındaki MCF-7 populasyonu %41,8, canlı hücrelerin bulunduğu Q3 alanındaki MCF-7 populasyonu %44,0 ve apoptotik veya erken apoptotik hücrelerin bulunduğu Q4 alanındaki MCF-7 populasyonu %9,9 olarak bulunmuştur. Bu bulgulara göre vanadil sülfatın IC<sub>50</sub> konsantrasyonu MCF-7 hücrelerinin canlılığını %44,0'a düşürmüş ve populasyonun %41,8'inde apoptotik hücre ölümünü tetiklemiştir. İncelenen MCF-7 hücresi populasyonunun %9,9'unun da vanadil sülfat tarafından tetiklenen erken apoptotik belirtiler taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 4.9.). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

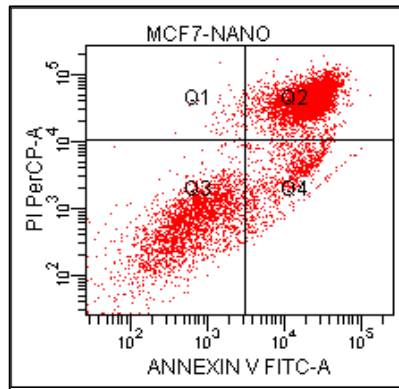




**Şekil 4.9.** Vanadil Sülfatın IC<sub>50</sub> Konsantrasyonunun 24 Saat Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Apoptotik Profili. Q1: Geç Nekrotik, Nekrotik veya Ölü Hücreler (%4.3), Q2: Nekrotik, Erken Nekrotik veya Geç Apoptotik Hücreler (%41.8), Q3: Canlı Hücreler (%44.0) ve Q4: Apoptotik veya Erken Apoptotik Hücreler (%9.9)

#### 4.5.1.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI bulguları

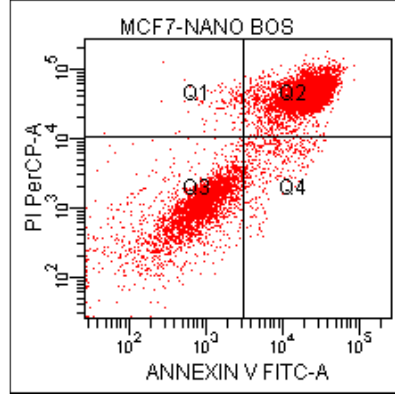
Anneksin V-FITC ve PI boyamasıyla akış sitometrisinde incelenen vanadil sülfat yüklü KLN formuna maruz bırakılmış MCF-7 hücre popülasyonunun canlılığı %28,1 olarak bulunmuştur. İncelenen hücre popülasyonunun %0,8'i nekrozla ölmüş hücreler olarak Q1 alanında tespit edilmiştir. Q2 alanında bulunan geç apoptotik hücre yüzdesinin 60,7 olduğu, Q4 alanındaki erken apoptotik evrede olan hücre popülasyonu yüzdesinin ise 10,3 olduğu saptanmıştır. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Yeni sentezlenen vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonu, kontrol grubu ve vanadil sülfat uygulanmış MCF-7 hücre grubuyla karşılaştırıldığında apoptozu belirgin bir yüzde farkı ile daha güçlü olarak tetiklemiştir (Şekil 4.10.).



**Şekil 4.10.** Yeni Sentezlenen Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonunun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Apoptotik Profili. Q1: Geç Nekrotik, Nekrotik veya Ölü Hücreler (%0,8), Q2: Nekrotik, Erken Nekrotik veya Geç Apoptotik Hücreler (%60,7), Q3: Canlı Hücreler (%28,1) ve Q4: Apoptotik veya Erken Apoptotik Hücreler (%10,3)

#### 4.5.1.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin anneksin V-FITC ve PI bulguları

MCF-7 hücreleri yeni sentezlenen boş KLN formülasyonuna 24 saat maruz bırakıldıktan sonra anneksin V-FITC ve PI boyamaları yapılmış ve apoptotik profilleri akış sitometrisinde incelenmiştir. Deney üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Boş KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücre popülasyonunun Q1 alanındaki yüzdesi 1,4, Q2 alanındaki yüzdesi 50,4, Q3 alanındaki yüzdesi 44,0 ve Q4 alanındaki yüzdesi de 4,2 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11.).

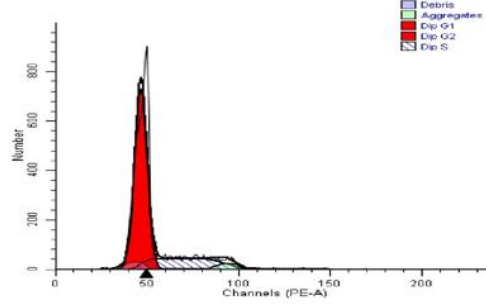


**Şekil 4.11.** Yeni Sentezlenen Boş KLN Formülasyonunun Uygulandığı MCF-7 Hücrelerinin Apoptotik Profili. Q1: Geç Nekrotik, Nekrotik veya Ölü Hücreler (%1,4), Q2: Nekrotik, Erken Nekrotik veya Geç Apoptotik Hücreler (%50,4), Q3: Canlı Hücreler (%44,0) ve Q4: Apoptotik veya Erken Apoptotik Hücreler (%4,2)

#### 4.5.2. Hücre döngüsü analizinin akış sitometrisindeki bulguları

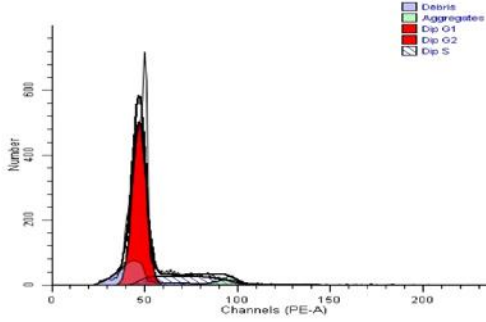
Kontrol, vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının (85 µM) 24 saat ile uygulandığı MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü analizi eşzamanlı olarak akış sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir. Bu hücre gruplarında hücre döngüsü analizi ile incelenen her hücre popülasyonundaki MCF-7 hücrelerinin yüzde olarak ne kadarının G0-G1 ne kadarının ise G2-M evrelerinde olduğu tespit edilmiştir. Her deney grubunda uygulamalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneylere ait veriler Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14. ve Şekil 4.15’de gösterilmiştir.

#### 4.5.2.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları



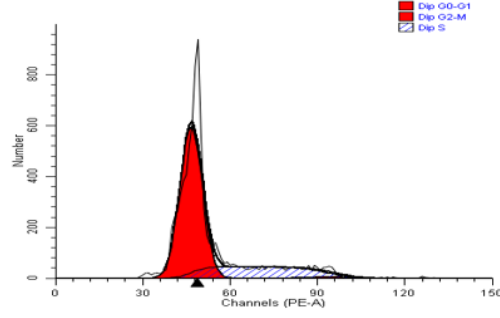
**Şekil 4.12.** Kontrol MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları. Bu Populasyonda G1 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %75,19, G2 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %0,0 ve S Fazında Bulunan Hücrelerin Yüzdesi %24,81 olarak Tespit Edilmiştir

#### 4.5.2.2. Vanadil sülfat uygulanan MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları



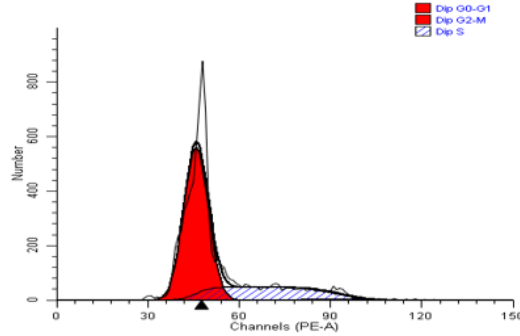
**Şekil 4.13.** Vanadil Sülfata 24 Saat Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları. Bu Populasyonda G1 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %78,49, G2 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %0,0 ve S Fazında Bulunan Hücrelerin Yüzdesi %21,51 Olarak Tespit Edilmiştir

#### 4.5.2.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları



**Şekil 4.14.** Vanadil Sülfat Yüklü KLN Formülasyonun 24 Saat Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları. Bu Populasyonda G1 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %72,55, G2 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %1,32 ve S Fazında Bulunan Hücrelerin Yüzdesi %26,13 Olarak Tespit Edilmiştir

#### 4.5.2.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları



**Şekil 4.15.** Boş KLN Formülasyonu ile 24 Saat İnkübe Edilen MCF-7 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Analizi Bulguları. Bu populasyonda G1 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %71,13, G2 Evresinde Bulunan MCF-7 Hücrelerinin Yüzdesi %1,04 ve S Fazında Bulunan Hücrelerin Yüzdesi %27,83 Olarak Tespit Edilmiştir



## 4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular

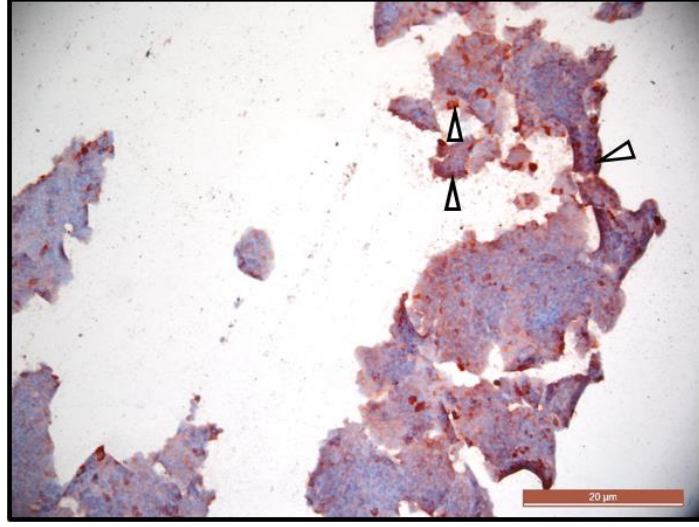
### 4.6.1. Siklinlerin immünohistokimyasal bulguları

Hücre döngüsünde anahtar role sahip siklinler MCF-7 kontrol hücrelerinde ve vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde işaretlenmiş ve immünohistokimyasal boyanmalar ışık mikroskopunda incelenmiştir. Her deney grubu üç kez tekrar edilmiştir. Siklinlerin immünohistokimyasal boyama değerlendirilmesi her preparatın üç ayrı alanının 40X büyütmede ışık mikroskopunda taranarak semikantitatif olarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde boyanan hücrelerin sayısına göre 0 (boyama yok), 1 (az boyama), 2 (orta boyama) ve 3 (çok boyama) olarak ele alınmıştır (Tablo 4.3). Deneyler sonucunda elde edilen boyanma görüntüleri Görsel 4.18-Görsel 4.25’de gösterilmiştir.

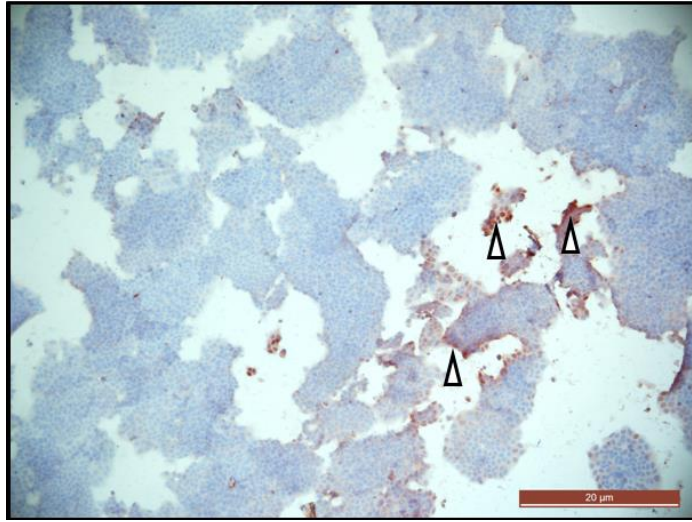
**Tablo 4.3.** Siklin B<sub>1</sub> ve Siklin D<sub>1</sub> Boyanmasının Semikantitatif Değerlendirme Tablosu

Siklin B <sub>1</sub>	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Ortalama
Kontrol	1	1	0	0.66
Vanadil sülfat	0	0	1	0.33
Vanadil sülfat yüklü	2	2	2	2
Boş KLN	1	1	1	1
Siklin D <sub>1</sub>	Grup 1	Grup 2	Grup 3	
Kontrol	1	0	1	0.66
Vanadil sülfat	1	2	2	1.66
Vanadil sülfat yüklü	2	1	1	1.33
Boş KLN	0	1	1	0.66

#### 4.6.1.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları

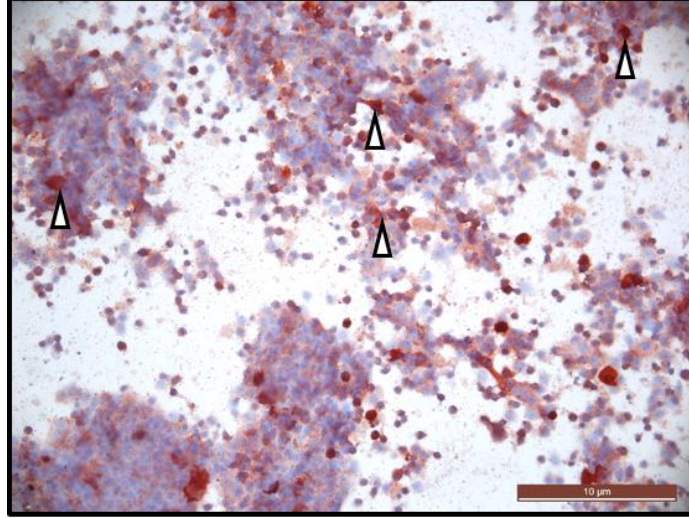


**Görsel 4.18.** Kontrol MCF-7 Hücrelerinde Siklin B<sub>1</sub> Boyanmasının Işık Mikroskobu Görüntüsü (20x). Ok Başlı-Siklin B<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

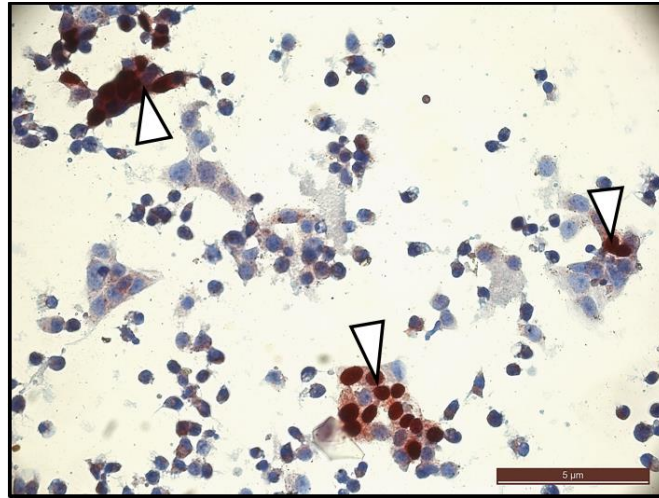


**Görsel 4.19.** Kontrol MCF-7 Hücrelerinde Siklin D<sub>1</sub> Boyanması (20x). Ok Başlı-Siklin D<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

**4.6.1.2. Vanadil sülfat uygulanan MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları**

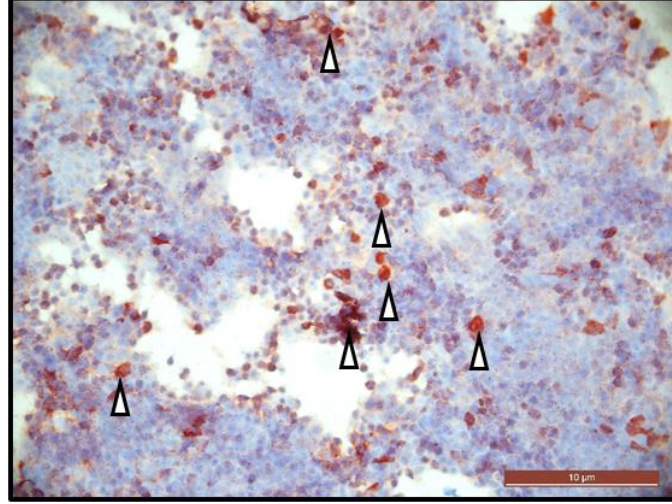


**Görsel 4.20.** Vanadil Sülfat Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin B<sub>1</sub> Boyanması (20x). Ok Başlı-Siklin B<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

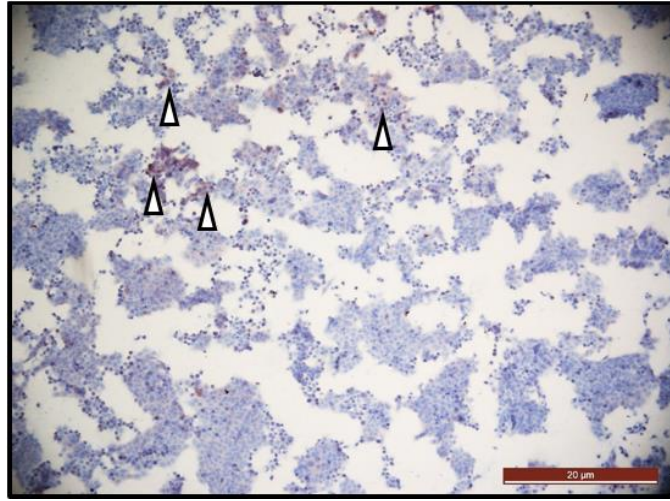


**Görsel 4.21.** Vanadil Sülfat Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin D<sub>1</sub> Boyanması (40x). Ok Başlı-Siklin D<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

**4.6.1.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları**



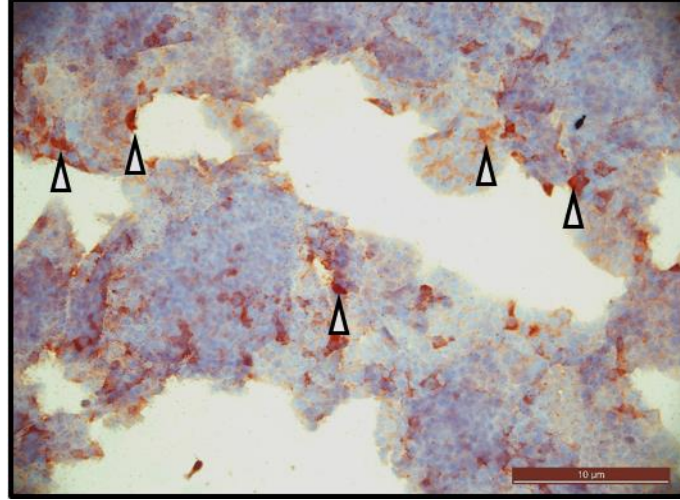
**Görsel 4.22.** Vanadil Sülfat Yüklü KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin B<sub>1</sub> Boyanması (20x). Ok Başlı-Siklin B<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler



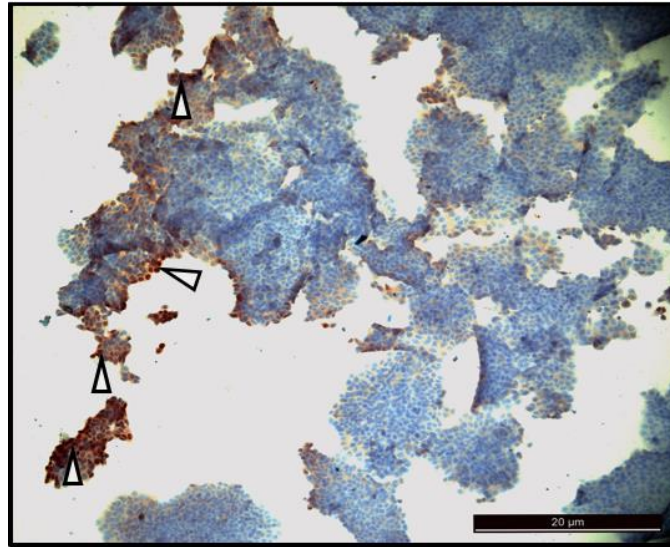
**Görsel 4.23.** Vanadil Sülfat Yüklü KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin D<sub>1</sub> Boyanması (10x). Ok Başlı-Siklin D<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler



**4.6.1.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal siklin bulguları**



**Görsel 4.24.** Boş KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin B<sub>1</sub> Boyanması (20x). Ok Başlı-Siklin B<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler



**Görsel 4.25.** Boş KLN Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Siklin D<sub>1</sub> Boyanması (20x). Ok Başlı-Siklin D<sub>1</sub> Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

**4.6.2. E-Kaderinlerin immünohistokimyasal ışık mikroskobu bulguları**

Vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN, boş KLN formlarının uygulandığı MCF-7 hücrelerinde ve kontrol MCF-7 hücrelerinde E-kaderinler immünohistokimyasal olarak işaretlenmiştir. MCF-7 hücrelerinin E-Kaderin immünohistokimyasal boyama değerlendirilmesi ışık mikroskobunda 40x büyütmede her bir preparatta 3 ayrı alan

taranarak semikantitatif yöntemle değerlendirilmiştir. Boyanan hücrelerin sayısına göre 0 (boyama yok), 1 (az boyama), 2 (orta boyama) ve 3 (çok boyama) olarak kabul edilmiştir. Değerlendirmeler aşağıda yer almaktadır (Tablo 4.4.).

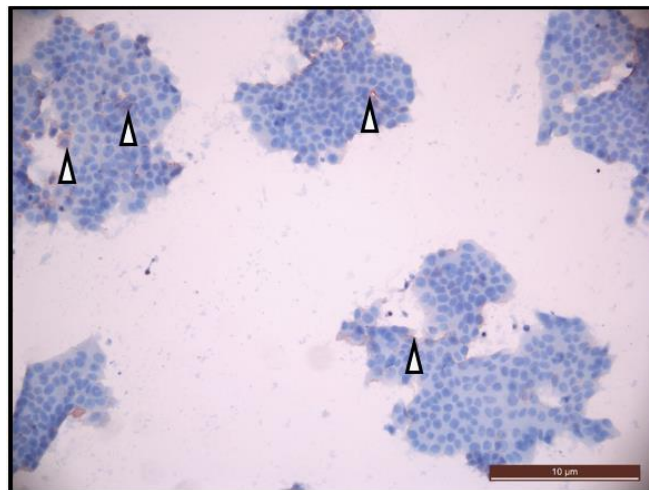
**Tablo 4.4.** Vanadil Sülfat, Vanadil Sülfat Yüklü KLN, Boş KLN Uygulanmış ve Kontrol MCF-7 Hücrelerinin E-Kaderin Boyanmasının Skorlama Tablosu

E-kaderin	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Ortalama
Kontrol	1	0	1	0.66
Vanadil sülfat	2	2	2	2
Vanadil sülfat yüklü	3	3	3	3
Boş KLN	1	1	1	1

E-kaderin işaretlemesini gösteren, kontrol MCF-7, vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN uygulanmış MCF-7 hücrelerine ait ışık mikroskobu görüntüleri aşağıda yer almaktadır (Görsel 4.26-Görsel 4.29.).

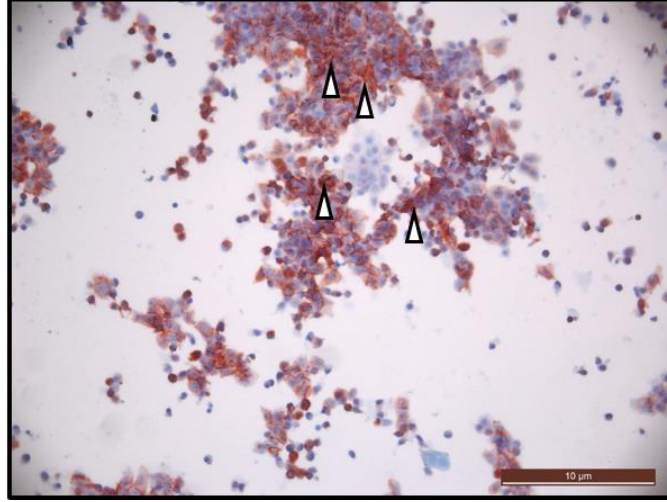
#### 4.6.2.1. MCF-7 kontrol hücrelerinin immünohistokimyasal E-kaderin işaretlemesi

##### *Bulguları*



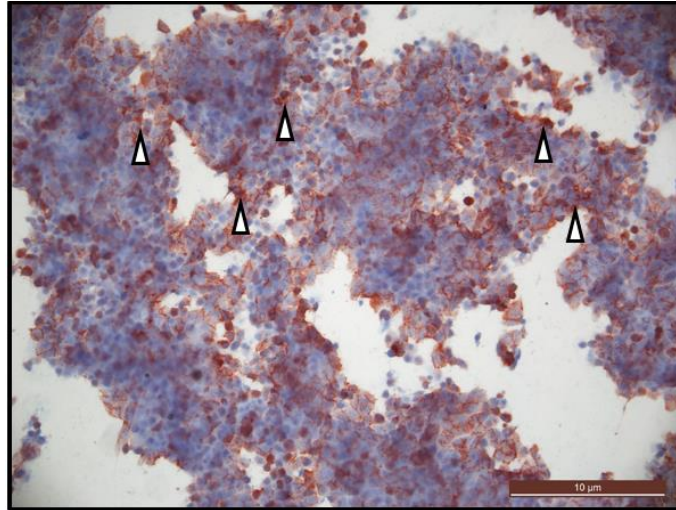
**Görsel 4.26.** Kontrol MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x). Ok Başlı-E-Kaderin Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

**4.6.2.2. Vanadil sülfat uygulanan MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal E-kaderin işaretlemesi bulguları**



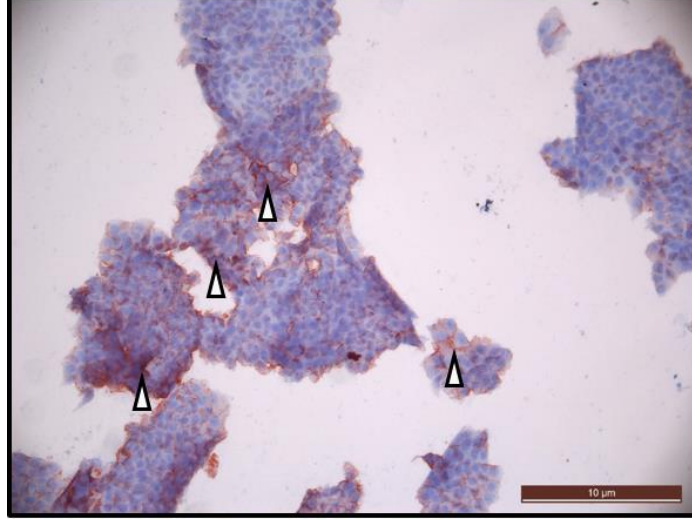
**Görsel 4.27.** Vanadil Sülfat Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x). Ok Başlı-E-Kaderin Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

**4.6.2.3. Vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal E-kaderin işaretlemesi bulguları**



**Görsel 4.28.** Vanadil Sülfat Yüklü KLN Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x). Ok Başlı-E-Kaderin Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler

**4.6.2.4. Boş katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin immünohistokimyasal E-kaderin işaretlemesi bulguları**



**Görsel 4.29.** Boş KLN Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde E-Kaderin Boyanması (20x). Ok Başlı-E-Kaderin Boyanmasının Yoğun Olduğu Hücreler



## 5. TARTIŞMA

Kanser, oluşumu ve gelişimi hızlı ve kompleks olması ve tedavisinin de çok zorlu ve pahalı bir süreç olması ve buna ilaveten yüksek mortaliteden dolayı, günümüzde en önemli toplum sağlığı problemleri arasında yerini ilk sıralarda koruyan bir hastalıktır [1]. Kanser tedavisine yönelik çalışmalar ve geliştirilen ilaçların sayısı son on yıl içerisinde ciddi bir artış göstermiştir. Bu ilaçlar arasında, metal kompleksler *in vitro* ve *in vivo* olarak test edilmiş, bazıları da klinik uygulama basamağına geçebilmiştir. Son yıllarda klinik kullanımına başlanan sisplatin, rutenyum, altın ve feroksifen gibi metal bazlı ilaçlar başta antikanser ve antiinvazif özellikler olmak üzere, kanser hücresinin canlılığını baskılamaya yönelik birçok biyokimyasal özelliğine sahiptir [6]. Bu ilaçların aşırı yan etkileri kullanımlarını sınırlamaktadır [20]. Geniş yelpazede etkili metal bazlı kanser hücresini öldürmeye yönelik biyokimyasal özellikte ilaç olarak geliştirme potansiyeli olan bir metal de vanadyum ve vanadyum bileşikleridir [6]. Vanadyum bileşiklerinin önemli grubunu teşkil eden vanadyum tuzlarının antikanser etkisi ilk kez 1965 yılında araştırılmış ve yayınlanmıştır [13]. Bir vanadyum tuzu olan vanadil sülfatın memelilerde kimyasal ile indüklenmiş karsinogenezde inhibisyona neden olduğunu bildiren ilk çalışma ise 1984 yılında yayınlanmıştır [17].

Vanadyum bileşikleriyle gerçekleştirilen birçok çalışmada vanadyum bileşiklerinin antikanser etkinliği fare karaciğer kanseri, fare meme bezi karsinomu, Morris hepatoma, rat leiomyosarcoma ve birçok insan kanser hücre hatları gibi farklı hücre hatlarında araştırılmıştır [17]. Şimdiye dek araştırılmış farklı vanadyum bileşikleri farklı hücre hatları üzerinde, doza, uygulanan bileşiğin türüne, zamana aynı zamanda da hücre türüne bağlı olarak birçok farklı biyokimyasal etkiler göstermiştir [17]. Farklı vanadyum bileşiklerinin ortak tek bir etkisi kaydedilmiştir: Malign hücrelerde apoptozu tetiklemek [17]. Son yıllarda kanser tedavisine yönelik araştırmalarda apoptozu indükleyen bileşiklerin kullanımına yönelim artmıştır. Bunun nedeni apoptoz indükleyen ilaçların, kanser tedavisine yeni bir yaklaşım potansiyeline sahip olduklarının düşünülmesidir [20].

Metal bazlı ilaçların kanser hücreleri üzerinde antikanser etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Ancak günümüzde kanser tedavisinde en önemli sorun, tümöre spesifik hedeflemenin yapılamamasıdır. Vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin kanserli hücrelerde daha çok biriktiğinin bilinmesi ve ideal kanser ilacında bulunması gereken özellikleri bir arada veya tek tek taşıma kapasitesinin olması, hedefli kanser tedavisi yönünden önemli ajanlar olduğu ve çeşitli uygulamalarla bu tip ilaçların geliştirilebileceği

umudunu vermektedir [13]. Vanadyumun araştırılmasına başlandıktan sonraki yıllarda vanadyum bileşiklerinin ters misel reaksiyonu ile nanokompozitleri, bunların da vanadil ester ve karboksilik asit reaksiyonu sonucu nanopartikülleri elde edilmiştir. Bu yöntemlerle VO<sub>2</sub> nanopartikülü elde edilmiştir. V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nanopartiküllerinin antikanser etkisini genel olarak hücre yüzeyi, morfolojisi ve içine girdiklerinde de hücre kimyasını bozarak gösterdikleri ispatlanmıştır [121].

Nanopartiküller, etken maddeleri istenilen bölgeye yönlendiren, kontrollü olarak salınımını sağlayabilen nanometre boyunda taşıyıcı sistemlerdir [66, 67]. Katı lipid nanopartiküller ise katı lipidden oluşan, oda sıcaklığında katı halde olan, hidrofobik çekirdek ve tek tabakalı fosfolipid yüzeyden oluşan, 50-1000 nm boyutundaki nano formülasyonlardır. Dezavantajları henüz bildirilmeyen bu formülasyonlar sulu çözeltilerde disperse olan, kararlı, kolloidal ilaç taşıyıcılarıdır. Katı lipid nanopartikül taşıyıcılar kolloidal olmaları, biyolojik olarak geçirimli olmaları, pahalı olmayan cihazlarla üretilebilmeleri, çok miktarda üretilebilmeleri, toksik olmamaları ve fazla miktarda etken madde yüklenebilmelerinden dolayı çok avantajlıdırlar [76, 77, 78]. Vanadyum bileşiklerinin antikanser etkisini gösterebilmeleri için, hücreler içerisine vanadil sülfatı daha çok miktarda ve daha kolay sokmak amacıyla bu çalışmada vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartikül formu sentezlenmiştir. Sentezlenen partiküllerin boyutları ve büyüklüğüne göre gösterdikleri dağılım, kolloid yapıyla ilaç taşıma sistemlerinde fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi açısından değerlendirilen parametrelerdir [118]. Sentezlenen partiküllerin partikül büyüklüğüne bağlı olarak fiziksel kararlılıkları ve etkinlikleri değişmektedir. Sentezlenen partiküllerdeki parçacık boyutu geniş bir aralıkta dağılım gösterdiğinde küçük partiküllerin etrafındaki enerji yükü büyük partiküllerdeki yükten daha yüksek olduğundan küçük partiküllerin birleşerek çökmesi meydana gelmektedir [118]. Bu açıdan, elde edilen ürünün parçacık boyutlarının birbirine yakın olması gerekmektedir. Çalışmamızda gerçekleştirilen polidispers indeks ve parçacık boyutu ölçümlerinden, sentezlediğimiz KLN ürünlerinin partikül boyutlarının birbirine yakın olduğu ve homojen dağılım gösterdiği bulunmuştur (Tablo 4.1.).

Kolloidal partiküller dispersiyon ortamındaki iyonları adsorbe ederek yüklü duruma geçerler. Bu yüklerin değerlendirilmesi ve partikül yüzeyindeki net yükün bilinmesi KLN formülasyonlarının raf ömrü ve muhtemel presipitasyon durumlarını değerlendirmek açısından gereklidir. Katı lipid nanopartiküllerin yüzeyindeki net yükün belirlenmesinde zeta potansiyel ölçümü gerçekleştirilmektedir [119, 120]. Partiküllerin

zeta potansiyeli değerleri -31 ile -60 mV aralığında orta, -61 ile -80 mV arasında iyi, -81 ile -100 mV arasında da mükemmel derecede kararlı olarak kabul edilmektedir [120]. Zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik ölçüm verilerinin (Tablo 4.2.) değerlendirilmesinden sentezlenen partiküllerin kararlılığının orta dereceye yakın olduğu ve saklama sırasında presipitasyon risklerinin nispeten düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Partiküllerin morfolojik incelemeleri sonucunda vanadil sülfatın kristal yapılı olup, sentezlenen KLN formülasyonlarıyla (288,1 ve 293,1 nm) karşılaştırıldığında, çok büyük boyutlarda (15,04 µm) olduğu gösterilmiştir. Vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının partikül şeklinin küresel ve nispeten pürüzsüz yüzeyli olduğu ve vanadil sülfat kristaliyle karşılaştırıldığında partikül boyutunun yaklaşık 50 kat daha küçük olduğu gösterilmiştir (Görsel 4.1-Görsel 4.3.).

Yapılan çalışmalarda, vanadyumun insan hücreleri üzerinde etkisinin kesin bilinmediği ifade edilmiştir [11, 41]. Bu bilgilerden yola çıkılarak bu tezde antikanser etkisi birçok yönden *in vitro* şartlarda incelenen vanadil sülfatın ve yeni sentezlenen vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun sitotoksik, antiproliferatif, antikanser etkilerinin olup olmadığı MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde araştırılmıştır. Vanadil sülfatın ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun 40-170 µM aralığında uygulandıklarında MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. MCF-7 hücrelerinin canlılığı 24 saatlik uygulama süresi sonunda konsantrasyona bağımlı olarak düşmüştür. Vanadil sülfatın ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun 24 saatlik IC<sub>50</sub> konsantrasyonunun 85 µM olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.2). Yeni sentezlenmiş olan boş KLN formülasyonunun MCF-7 hücrelerine 40-170 µM aralığında uygulanması sonucunda ise sitotoksik etki tespit edilemememiştir. Boş KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücre grubunda tespit edilen canlılık yüzdesi kontrol MCF-7 hücrelerinde bulunan hücre canlılığı ile neredeyse aynı bulunmuştur. Bu sonuçlara benzer olarak yapılmış olan bir çalışmada fare fibrosarkoma L929, rat feokromositoma PC12 ve insan karaciğer karsinoması HepG2 hücrelerinde vanadil sülfatın bu hücrelerin canlılığını doza ve zamana bağımlı olarak düşürdüğünü ifade etmişlerdir [17]. Yine aynı çalışmada vanadil sülfatın insan karaciğer karsinoma hücreleri üzerindeki etkisinin fare fibrosarkoma ve rat feokromositoma hücreleri üzerindeki etkisinden daha düşük seviyede olduğu bulunmuştur [17]. Buna benzer olarak araştırıcılar vanadil sülfatın MTT testi ile A549 insan akciğer adenokarsinoma hücreleri üzerinde belirledikleri IC<sub>50</sub> konsantrasyonu olan 15 µM'lık konsantrasyonun DU145 prostat kanser

hücrelerinin aynı uygulama süresinde tamamını öldürdüğünü ifade etmişlerdir [32, 62]. Başka bir çalışmada vanadyum tuzlarının sindirim kanalında emiliminin zor olması ve yan etki gösterebildikleri bilgisinden yola çıkarak alternatif bir vanadyum bileşiği sentezleme yoluna gitmişlerdir [19]. Bu bileşik vanadil sülfatın sulu çözeltisinden elde edilen vanadil alginatlardır. Vanadil alginatların insan hepatoma hücresi BEL-7402 hattında belirgin bir sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir [19].

Bu çalışmada da vanadil sülfatın olası yan etkilerini azaltmak ve biyoyararlılığını arttırmak amacıyla alternatif bir kanser tedavi ajanı olarak vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonları elde edilmiş ve MCF-7 hücre hattında antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Metal komplekslerin hidrofobik hücre membranını geçip antikanser etkinliklerini gerçekleştirebilmeleri kompleksin lipofilik özelliklerine bağlıdır [20]. Araştırmacılar lipofilik özelliklerini yükselttikleri vanadyum IV komplekslerinin lösemi hücrelerinde daha iyi derecede sitotoksikite tespit etmişlerdir. Ayrıca yeni sentezledikleri bu vanadyum komplekslerinin U937 lösemi hücreleri üzerine vanadil sülfatın antiproliferatif etkisini de arttırdığını bildirmişlerdir [20]. Bulgularımız bu araştırmalarla benzerdir; vanadil sülfatın katı lipid nanopartiküller içine yüklenmesiyle MCF-7 hücrelerine olan sitotoksik etkisi araştırılmış ve vanadil sülfat ile benzer olarak 24 saat içerisinde vanadil sülfat yüklü KLN formunun ilaç salınımını gerçekleştirdiği ve MCF-7 üremesini 85  $\mu$ M konsantrasyonda baskıladığı tespit edilmiştir. Tespit edilen bu konsantrasyonun daha önce farklı çalışmalarda farklı vanadyum bileşiklerinin farklı hücre hatları üzerindeki düşük dozlarda sitotoksikite göstermeleri sonucuyla uyumluluk göstermektedir [122].

Vanadyum bileşiklerinin antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini DNA'yı parçalayarak gösterdiği bilinmektedir [13, 17]. Bu bileşiklerin DNA kırıklarına yol açması hücreyi apoptoza götüreceğinin göstergesi olarak kabul etmektedir [17]. Bu çalışmada vanadil sülfatın ve yeni sentezlenen vanadil sülfat yüklü KLN formunun MCF-7 hücreleri üzerinde apoptozu indüklemeye özelliği de ele alınmıştır. Bu amaçla ilk olarak vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formulasyonunun uygulandığı MCF-7 hücreleri ve kontrol MCF-7 hücrelerinin morfolojisi konfokal mikroskopta incelenmiştir. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun IC<sub>50</sub> konsantrasyonunun uygulandığı MCF-7 hücre iskeletinde delik oluşumu, kromatin yoğunlaşması, hücrelerin ve çekirdeklerinin büzülmesi ve parçalanması, at nalı şeklinde çekirdek oluşumu, hücre membranı tomurcuklanması, hücre membranı ve hücre

iskeletinde parçalanmalar tespit edilen morfolojik değişikliklerdir (Görsel 4.5. ve Görsel 4.6.). Bu değişiklikler hücrelerde apoptozu işaret eden morfolojik değişiklikler olarak değerlendirilmiştir. Boş KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerinde ise hücre yapısının kontrol MCF-7 hücrelerine çok yakın olduğu ve önemli hücre hasarının meydana gelmemiş olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç ile uyumlu olarak araştırmacılar vanadil sülfat uyguladıkları A549 insan akciğer adenokarsinoması ve DU145 prostat adenokarsinoması hücrelerinde konfokal mikroskopik inceleme sonucunda parçalanmış çekirdekli, geç apoptotik hücre ölümü tespit etmişlerdir [62]. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak, insan kolon kanseri Caco-2 hücrelerinde okzodiasetatlı vanadil IV bileşiğinin hücre iskeletini bozduğu da bildirilmiştir [123].

Birçok hücre tipinde meydana gelen ve apoptozun indüklenmesiyle ilişkilendirilen bir diğer biyokimyasal değişiklik de hücre içi kalsiyum derişimindeki değişikliklerdendir. Hücre içi kalsiyumun aşırı yüksek seviyelerinin apoptozu indüklediği gösterilmiştir [124]. Buna ilaveten apoptozun indüklenmesi sırasında kalsiyum bağımlı endonükleazların devreye girmesi [125] ve hücre içi kalsiyum artması aktif T hücre hibridoması [126] ve timositlerin apoptotik ölümüyle ilişkilendirilmiştir [127]. Bu bilgilerle uyumlu olarak bizim çalışmamızda, vanadil sülfat uygulanmayan grupta kontrol grubuna ve boş KLN formülasyonunun uygulandığı gruba göre, kalsiyum miktarında artış saptanmıştır. Boş KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerinde kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerine yakın bazal kalsiyum tespit edilmiştir. Vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun uygulandığı MCF-7 hücre grubunda ise bazal kalsiyum en yüksek seviyede tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). Bu bulgular doğrultusunda, MCF-7 hücrelerinde konfokal mikroskopik değerlendirmeler sonucunda vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun en yüksek seviyede olmak üzere hücre içi kalsiyum derişimi arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 4.3.).

Kalsiyumun hem hücre ölümünü önleme hemde hücre ölümünü tetikleme mekanizmalarında gerekli olduğu bilinmektedir. Hücre içi kalsiyum derişimlerinin düzenlenmesinde mitokondrilerin anahtar rol oynadığı kaynaklarda belirtilmiştir. Mitokondride kalsiyum derişiminin uygun miktarlarda arttırılmasının enerji metabolizmasını destekleyerek hücreleri aktive ettiği ve canlı tuttuğu gösterilmiştir. Bu artışın aşırı seviyeleri ise hücrenin ölümüne yol açmaktadır [128]. Kalsiyumun aşırı derecede artmış olmasının mitokondri bütünlüğünü bozduğu dolayısıyla da mitokondriden sitoplazmaya apoptojenik proteinlerin serbestleşmesine yol açtığı

kaynaklarda yer almaktadır. Diğer yandan hücrelerin canlılığını sürdürebilmesi için hücre içi kalsiyum homeostazını sürdürmesi gerektiği ve kültür hücrelerinde kalsiyum kaybının hücre ölümü ile yakından bağlantılı olduğu belirtilmiştir [128]. Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonlarının MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde hücre içi kalsiyum derişimini arttırdığı saptanmıştır (Şekil 4.3.). Vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonun 24 saatlik uygulanması sonucunda MCF-7 hücrelerinde hücre içi kalsiyum derişimini, diğer gruplara göre belirgin olarak daha çok arttırdığı saptanmıştır. MCF-7 hücrelerine uygulanan vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonlarının hücre ince yapısında ve morfolojik yapısında meydana getirdiği başta mitokondri hasarı ve çekirdek parçalanması olmak üzere değişiklikler ile anneksin V-FITC ve PI incelemesi sonuçlarıyla beraber incelendiğinde hücre içi kalsiyum derişimindeki artışın MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır. Daha önce yapılmış bir çalışmada vanadyum bileşiklerinden vanadatların hücrelerde Ca-ATPaz aktivasyonunu inhibe ederek, hücre içi kalsiyum brikimine neden olduğu bulunmuştur [129]. Bizim çalışmamızda, vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formlarının uygulandığı MCF-7 hücrelerinde saptanan kalsiyum artışının ve artan kalsiyumun apoptozu indüklemeye mekanizmasının açıklanabilmesi için ileri araştırmalar gerekmektedir. Apoptozun gerçekleşmesinde kesin ön şart olmamakla birlikte hücre içi kalsiyum önemli bir apoptoz mediyatörüdür. Kalsiyum iyonunun hücre içi seviyesinin artmasıyla prokaspaz-12 aktifleşerek sitoplazmadaki kaspaz-9 ile etkileşir ve apoptotoz tetiklenmiş ve böylece hücre geri dönüşümsüz olan bir ölüm sürecine girmiş olur [91]. Vanadyum bileşiklerinin Jurkat T lenfositleri ve rat bazofilik lösemi hücrelerinde kalsiyum sinyalleşmesini indüklemeye ve kalsiyum teşvikli kalsiyum kanallarının aktivasyonunu sağladığı bulunmuştur [41]. Bu çalışmada, MCF-7 hücrelerinde vanadil sülfatın ve sentezlemiş olduğumuz vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun hücre içi kalsiyum derişimine olan etkisi araştırılmış ve konfokal mikroskopta bu maddelerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinin bazal kalsiyum derişimi ölçülmüştür. Kalsiyum miktarı, vanadil sülfat uygulanan MCF-7 hücrelerinde kontrol hücreleri ve boş KLN formülasyonunun uygulandığı hücrelere göre artmıştır. Boş KLN formülasyonun uygulandığı MCF-7 hücrelerinde bu artış kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı seviyede değildir. Kalsiyum seviyesindeki en büyük artış vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonun uygulandığı MCF-7 hücre grubunda kaydedilmiştir (Şekil 4.6.). Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN

formlarıyla inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde tespit edilen hücre içi kalsiyum derişimi artışının bu hücrelerde apoptotik hücre ölümünün indüklenmesiyle ilişkilendirilmiştir. MCF-7 hücrelerinde vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun tetiklediği kalsiyum aracılı bu apoptotik etkinin moleküler mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için daha ayrıntılı ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Vanadyum ve vanadyum bileşikleri hücrede lizozom, mitokondri gibi organellerin yapısını, aktin ve tubulin gibi hücre iskelet proteinlerini de değiştirerek, bazı hücre içi sinyal yolaklarını, siklin ve kaspazları etkileyerek hücre döngüsünü durdurmak ve en sonunda da hücreyi apoptoza sürükleyerek antikanser etkiye sebep olmaktadır. Ayrıca bu bileşikler çekirdekte genotoksik etki meydana getirerek hücre DNA'sına hasar vermektedir [130, 131]. Araştırmacılar H35-19 rat hepatoma hücrelerinde  $VOSO_4$ ,  $Na_3VO_4$  ve  $NaVO_3$  vanadyum tuzlarının hücre ince yapısına etkisini araştırmış ve hücrelerin çekirdek membranında içe çökme, trabeküler yapılı çekidekçikler, Golgi aygıtında sisterna kesikleri gibi değişiklikler tespit etmişlerdir [35]. Buna benzer olarak, bizim çalışmamızda da bu çalışmada vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun 24 saat uygulanması sonucunda, MCF-7 hücrelerinin ince yapısında meydana getirdiği değişiklikler araştırılmış ve büzüşme, mitokondrilerde krista kaybı, şişme ve hücrede sekonder lizozom, otofagozom, vakuol ve lipid artışı, çekirdek membranında çökme, at nalı çekirdek oluşumu, kromatin kondenzasyonu, hücre membranında tomurcuklanma gibi apoptotik değişiklikler tespit edilmiştir. MCF-7 hücre grubu kontrol grubu, ve birbirileri ile karşılaştırıldığında vanadil sülfat uygulanmış grup, kontrol grubuna göre belirgin apoptotik ince yapısal değişiklikler saptanırken en bariz apoptotik belirteç ince yapısal değişikliklerin ise vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun uygulandığı grupta görülmüştür. Boş KLN formulasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerinin ince yapısında normale yakın hücre membranı, çekirdek yapısı ve hücre iskeletinin olduğu tespit edilmiştir (Görsel 4.16.). Bu sonuçlara benzer olarak vandyum bileşiklerinin besinle alındığında piliçlerin mitokondrilerinde krista kaybına neden olduğu araştırmacılar tarafından yayınlanmıştır [132].

Çalışmamızda, vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN formulasyonlarının MCF-7 hücrelerinde apoptozu indükleme etkisini karşılaştırmak için akış sitometrisinde apoptoz profilleri incelenmiştir. Kontrol MCF-7 hücre popülasyonunda apoptotik veya nekrotik hücelere rastlanmamıştır (Şekil 4.8.). Vanadil sülfatın  $IC_{50}$  konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin apoptotik

profili incelendiğinde ise hücre popülasyonunun %4,3'ünün nekrozla öldüğü, %41,8'inin geç apoptotik dönemde, %9,9'unun ise erken apoptotik dönemde olduğu bulunmuştur. 24 saat inkübasyondan sonra vanadil sülfatın MCF-7 hücrelerinde toplamda %51,7'lik bir değer ile apoptozu tetiklediği bulunmuştur (Şekil 4.9.). Vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun uygulandığı MCF-7 hücrelerinde ise, toplam apoptotik hücre yüzdesinin %71 olduğu tespit edilmiştir. Katı lipid nanoformulasyonun, vanadil sülfat ile karşılaştırıldığında, MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklemeye oranının %20 daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10.).

Hücreler hücre döngüsü sürecinde çok iyi düzenlenen kontrol noktalarından geçerek farklı evreler arasında ilerlemektedirler. İlaç geliştirme araştırmalarında bu döngüdeki kontrol noktalarını hedef alarak hücre döngüsünü durdurmaya ve apoptozu tetiklemeye yönelik ajanların bulunmasına yönelik çalışmalar gündemdedir [132]. Apoptoz sırasında endonükleazlar aktive olarak, DNA molekülünün interkromozomal alanlarında etki göstererek ileri derecede DNA kırıklarına yol açmaktadır. Hasarlı DNA'ya sahip apoptotik hücrelerin DNA miktarı azalır ve DNA'ya özel florokrom boyalarla boyandıklarında, akış sitometrisinde G<sub>1</sub> evresi hücrelerinden daha düşük bir DNA içeriğine sahip hücreler olarak tespit edilirler [131]. Tez çalışmamızın bu aşamasındaki bir diğer amacımız, olan vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun hücre döngüsünü durdurduğu evreyi tespit etmeye yöneliktir. Bu amaca uygun olarak yapılan, DNA analizinden elde edilen veriler, hem vanadil sülfatın, hem de vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun hücre siklusunu G<sub>1</sub> evresinde durdurduğunu göstermiştir. Hücre döngüsü analiz sonuçlarımızda, G<sub>1</sub> evresinde bulunan MCF-7 hücrelerinin yüzdesinin vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN için sırasıyla %78,49, %72,55 ve %71,13, G<sub>2</sub> evresinde bulunan MCF-7 hücrelerinin yüzdesi %1,04 ve S fazında bulunan hücrelerin yüzdesi %27,83 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12-Şekil 4.15.).

Vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin, hücre proliferasyonundan sorumlu proteinlerin sentezini değiştirerek hepatositlerin proliferasyonunu etkilediği bilgisi kaynaklarda belirtilmiştir [132]. Bu durum vanadyumun protein sentezini baskılama özelliğinden kaynaklanmaktadır. Bu proteinler genellikle siklin grubu proteinlerdir. Hücre döngüsünün farklı evrelerinde farklı siklinler görev almaktadır. Bunlardan siklin D ve E G<sub>1</sub> evresinde, siklin A S evresinde ve mitozda, siklin B ise mitoz evresinde rol oynadığı kaynaklarda belirtilmektedir [132]. Daha önce yapılmış bir çalışmada, sodyum



ortovanadatın karaciğer karsinoma hücreleri HepG2, Sk-Hep-1 ve Hep3B’de hücre döngüsünü G<sub>2</sub>/M evresinde doza bağlı olarak durdurduğu bulunmuştur. G<sub>2</sub>/M evresindeki bu inhibisyonun hücre döngüsünde düzenleyici proteinlerden olan Siklin B<sub>1</sub> ekspresyonunun sodyum ortovanadat tarafından arttırılmasından kaynaklandığı bulunmuştur [17]. Bir başka çalışmada, krizin ve silibininli okzovandyum bileşiklerinin 100 µM’lık konsantrasyonunun 24 saat inkübasyon sonucunda hücre döngüsünü yine G<sub>2</sub>/M safhasında durdurduğu bulunmuştur [132]. Araştırmacılar vanadat, VO(acac)<sub>2</sub> ve VO(ma)<sub>2</sub> bileşiklerinin karaciğer kanseri HepG2 ve L02 lösemi hücrelerinde yaptıkları çalışmada bu bileşiklerinin hücre döngüsünü HepG2 hücrelerinde G<sub>1</sub>/S geçiş evresinde, L02 hücrelerinde ise G<sub>2</sub>/M geçiş evresinde durdurduğunu ifade etmişlerdir [133]. Bu çalışmada tespit edilen G<sub>1</sub> safhasında hücre döngüsü inhibisyonunun sebebini araştırmaya yönelik olarak vanadil sülfat, vanadil sülfat yüklü KLN ve boş KLN uygulanan MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsünün önemli kontrol noktası proteinleri olan siklin B<sub>1</sub> ve siklin D<sub>1</sub> proteinleri işaretlenmiştir. Bu işaretleme sonuçlarımız doğrultusunda, gerçekleştirilen karşılaştırmalı semikantitatif değerlendirme sonucunda, kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında, G<sub>2</sub>-M geçiş safhasını düzenleyen siklin B<sub>1</sub> proteininin ekspresyonu vanadil sülfat uygulanan grupta nispeten azalmış, vanadil sülfat yüklü KLN uygulanan grupta ise az miktarda artmıştır. G<sub>1</sub> safhasında sentezlenen Siklin D<sub>1</sub> proteini ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında vanadil sülfat yüklü katı lipid nanopartikülün uygulandığı MCF-7 hücrelerinde daha fazla boyanma gösterirken en yoğun boyanmanın saptandığı MCF-7 hücre grubu vanadil sülfatın IC<sub>50</sub> konsantrasyonunun uygulandığı hücreler olmuştur (Görsel 4.21.). Bu boyanma sonuçları da gerçekleştirdiğimiz hücre döngüsü analizinin sonuçlarıyla birbirini desteklemektedir. Bu analizler sonucunda vanadil sülfat yüklü KLN formunun ve vanadil sülfatın hücre döngüsünü G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> geçiş evresinde durdurmuş olduğu tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinin döngüsünde tespit edilen G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> geçiş evresindeki durma bu hücelere uygulanan vanadyum bileşiklerinin siklin D<sub>1</sub> proteininin sentezini etkilemesiyle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, vanadyum bileşiklerinin siklin proteinlerinin aktivitesini etkileme mekanizması henüz tam olarak literatürde yer almamaktadır [131]. Buna benzer olarak, vanadyum bileşiklerinin çekirdekte heterokromatin bölgesinde birikerek hücre döngüsünü geç S ve G<sub>2</sub> fazlarında geri dönüşümlü olarak durdurduğu araştırmacılar tarafından bulunmuştur [11].

Son yıllarda vanadyum ve vanadyum bileşiklerinin antikanser etkilerini araştırmaya yönelik çalışmalar artmıştır. Vanadyum bileşiklerinin bu çok yönlü antikanser özellikler

arasında malign hücrelerde antiproliferatif etki gösterme, nekroz veya apoptoz yoluyla sitotoksik veya sitostatik etki gösterme, hücrelerde ilaç direnci geliştirmemek veya az geliştirme özelliğinin düşük veya hiç bulunmamasının yanı sıra en önemli özelliklerinden birisi olarak ise malign hücrelerdeki invazyon ve metastaz özelliklerini azaltması veya inhibe etmesi gösterilmektedir. Bu antikanser etki ve özellikler birçok farklı yönden ve farklı hücre hatları üzerinde araştırılmıştır [13]. Vanadyum (IV) bileşiklerinin osteosarkom hücrelerinde bir saatlik uygulama sonucunda doza bağımlı olarak hücre adezyonunu ve yayılmasını inhibe ettiği araştırmacılar tarafından bulunmuştur [34]. Yine aynı çalışmada vanadil komplekslerinin uygulandığı hücrelerde adezyonun %40 oranında inhibe edilmiş, yayılmanın ise %55 inhibe edilmiş olduğu bildirilmiştir [34].

Agresif ve ileri safhada olan birçok kanser türünde E-kaderin ekspresyonunun tamamen kaybolduğu ve bu kaybolmaya sebep olan mekanizmanın veya hücrel değişikliğin tam olarak ne olduğu henüz açıklanamamıştır [134]. Meme kanserinde genel olarak E-kaderinlerin kısmi veya tamamen kaybı sözkonusudur. Bu hücrelerdeki E-kaderin kaybı hücrelerin farklılaşma özelliklerinin kaybolması, invazyon özelliği kazanması, tümör derecesinin artması, metastatik özellik kazanması ile doğrudan ilişkilendirilmektedir [115]. E-kaderinlerin bazı meme kanseri türlerinde kısmen, neredeyse %80'lik kısmında ise tamamen kaybının söz konusu olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. E-kaderinlerin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasındaki etkisini araştıran *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur [32]. E-kaderinlerin eksprese edilmediği meme kanseri hücrelerinde, E-kaderinlerin ekspresyonunun arttırılmasının, bu hücrelerin çoğalmasını hem hücre kültüründe hem de *in vivo* tümörlerde, ileri derecede inhibe ettiği gösterilmiştir [32]. Buna benzer olarak, bu çalışmada, vanadil sülfat ve yeni sentezlenmiş olan vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde 24 saatte etkili olan  $IC_{50}$  (85  $\mu$ M) konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda E-kaderinlerin immünohistokimyasal işaretleme gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun uygulandığı hücrelerde E-kaderinlerin arttığı tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerine uygulanan boş KLN formülasyonunun ise bu hücrelerde E-kaderin ekspresyonunu kontrol grubuna göre çok etkilemediği dolayısıyla da kontrol MCF-7 hücrelerinde tespit edilen E-kaderin boyanma oranına yakın olan bir boyanma tespit edilmiştir. Vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formlarının MCF-7 hücrelerindeki E-kaderinlere etkisi karşılaştırıldığında E-kaderinleri en çok indükleyen formülasyonun vanadil sülfat olduğu, yeni sentezlenen

vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun ise nispeten daha az bir artışa neden olduğu ortaya çıkmıştır. MCF-7 hücrelerinde meydana gelen bu E-kaderin artışının hücre proliferasyonunu durdurduğu sonucuna varılmış olmakla birlikte bu hücrelere uygulanan vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun bu etkiyi doğrudan E-kaderin molekülü ile mi yoksa buna bağlı olan  $\beta$  katenin gibi moleküller aracılığıyla mı gerçekleştirdiğinin mekanizmasının aydınlatılması için ileri araştırmalar gerekmektedir. E-kaderin aracılı hücre proliferasyonunun baskılanmasının üzerinde araştırıldığı SW480 kolorektal tümör hücrelerinde baskılama mekanizmasının  $\beta$  katenin/TCF bağımlı genlerin inhibisyonu yoluyla gerçekleştiği bulunmuştur [135]. Bu konuda yapılan diğer bir çalışmada ise E-kaderinin hücre proliferasyonunu baskılama özelliğinin hücre döngüsünü durdurma şeklinde gerçekleştirdiği açıklanmıştır. Yine aynı çalışmada bu döngü baskılamasının hücre döngüsü kontrolü yapan siklin bağımlı kinazların, p21 gibi inhibitörler aracılığıyla inaktive edilmesiyle meydana geldiği fakat E-kaderinin p21 ekspresyonunu nasıl arttırdığının henüz açıklanamadığı ifade edilmiştir [110].

Günümüzde vanadyum bileşiklerinden farmasötik kullanım amacıyla anti-neoplastik ajan üretme ve bunların klinikte kullanımına yönelik araştırmaların sayısı artmıştır. Bu alanda çok farklı vanadyum bileşikleri çok geniş yelpazadaki kanser hücre hatları ve *in vivo* modeller üzerinde denenmiş ve bu bileşiklerin farklı biyokimyasal özelliklerinden kaynaklanan etkileri, faydalı ve zararlı yönleri ile ortaya konulmuştur [20]. Son zamanlarda metal bazlı, hücre döngüsünü baskılayan, düşük konsantrasyonlarda etkili ve apoptozu indükleyen antikanser özellikli ajanların keşfedilmesine yönelik araştırmaların sayısı da gitgide artmaktadır [20, 136]. Ayrıca, metal bazlı bileşiklerden nanopartikül üretimi ve kanser tedavisindeki kullanımlarının araştırılması konusu da günümüzde yaygın araştırma konularındandır [137].

Bizim çalışmamızda, bir metal kompleksi olan vanadil sülfat ve yeni sentezlenmiş olan vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonlarının MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde etkin bir antikanser potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Bu antikanser özelliğın DNA kırıkları oluşturma, mitokondrilerde krista kaybına neden olma, siklin B<sub>1</sub> ve D<sub>1</sub> ekspresyonunu değiştirmek suretiyle hücre döngüsünü durdurma ve hücre içi kalsiyum derişimini arttırarak MCF-7 hücrelerini apoptozu sürüklemek şeklinde meydana geldiği bulunmuştur. Buna ilaveten vanadil sülfat ve vanadil sülfat yüklü KLN formülasyonunun MCF-7 hücrelerinde E-kaderinleri modüle ederek hücre canlılığını baskılama etkisi ve metastazı önleme olasılığının varlığı tespit edilmiştir. Tüm bu

özelliklerin vanadil sülfata nazaran yeni sentezlenmiş olan vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunda gösterilmiş olması, bu ajanın yeni bir antikanser terapötik oluşturma olasılığını ifade etmektedir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, yeni vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun ileride farklı hücre hatları ve dokularda diğer antikanser özelliklerinin de ayrıntılı şekilde araştırılmasından sonra antikanser etkinliğinin artırılması ve belli doku veya hücrelere hedeflenerek kanser tedavisinde yeni hedefli tedavi terapötüğü teşkil etme potansiyelinin olduğu ortaya konulmuştur. Vanadil sülfatın da bugüne dek geliştirilmiş ve klinik uygulamalarda yerini almış diğer metal bazlı antikanser terapötikler gibi yerini alacağı ve geniş çapta etkili uygulama alanı bulacağı bulgularımıza dayanılarak birçok vanadyum bileşiğinin antikanser etkisinin daha bu araştırma alanına dahil edilip kullanılacağı tahmin edilmektedir.

Araştırmanın tüm sonuçlarından yola çıkılarak, hücre içerisine daha kolay girmesi, kontrollü ilaç salınımı yapması ve biyoyararlılığı yüksek olmasından dolayı vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun, kısa süre içerisinde MCF-7 hücrelerini, vanadil sülfata göre, daha etkin olarak, apoptozu indükleme yoluyla öldürdüğü görülmektedir. Dolayısıyla da, vanadil sülfat yüklü KLN formulasyonunun da kanser tedavisi için ileride hedefli bazı kemoterapötiklerin sentezlenmesi için umut verici bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2015). Cancer statistics. *Ca. Cancer J. Clin.*, 65, 5–29.
- [2] Mobasheri, A. and Barrett-Jolley, R. (2014). Aquaporin water channels in the mammary gland: From physiology to pathophysiology and neoplasia. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 19, 91–102.
- [3] Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.*, 5 (2), 227–41.
- [4] Rillema, J.A. (1994). Development of the mammary gland and lactation. *Trends Endocrinol. Metab.*, 5 (4), 149–54.
- [5] Harris, H.R., Bergkvist, L. and Wolk, A. (2016). Adherence to the world cancer research fund/American Institute for Cancer Research recommendations and breast cancer risk. *Int. J. Cancer.*, 138, 2657–2664.
- [6] Petanidis, S., Kioseoglou, E., Hadzopoulou-Cladaras, M., Salifoglou, A. (2013). Novel ternary vanadium-betaine-peroxido species suppresses H-ras and matrix metalloproteinase-2 expression by increasing reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*, 335, 387–396.
- [7] Gruzewska K., Michno A., Pawelczyk T., Bielarczyk H. (2014). Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology. *J. Physiol. Pharmacol.*, 65 (5), 603-611.
- [8] Bishayee, A., Waghray, A., Patel, M.A., Chatterjee, M. (2010). Mini-review, Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The in vivo evidence. *Cancer Letters*, 294, 1–12.
- [9] Gonzalez-Villalva, A., Pinon-Zarate, G., De la Pena Diaz, A., Flores-García, M., Bizarro-Nevares, P., Rendón-Huerta, E.P., Colín-Barenque, L., Fortoul, T.I. (2011). The effect of vanadium on platelet function. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 32, 447-456.
- [10] Ozturk, N., Olgar, Y. and Ozdemir, S. (2013). Trace elements in diabetic cardiomyopathy: an electrophysiological overview. *World J. Diabetes.*, 4, 92-100.
- [11] Ekert, P.G., Vau, D.I. and Patel, M.A. (1997). Apoptosis and the immune system. *Br. Med. Bulletin*, 53, 591-603.
- [12] Urban, J., Antonowicz-Juchniewicz, J. and Andrzejak. R. (2001). Wanad-zagrozenia i nadzieje. *Medycyna Praktyczna*, 52, 125-133.
- [13] Evangelou, A.M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Rev. Oncol/Hematol.*, 42, 249–265.
- [14] Kostova, M. (2009). Titanium and vanadium complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 9, 827–842.
- [15] Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D. (2012). Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim. Pol.*, 59, 195-200.

- [16] Liem, D.A., Gho, C.C., Gho, B.C., Kazim, S., Manintveld, O.C., Verdouw, P.D., Duncker, D.J. (2004). The tyrosine phosphatase inhibitor bis(maltolato)-oxovanadium attenuates myocardial reperfusion injury by opening ATP-sensitive potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 309, 1256-1262.
- [17] Abakumova, O.Y., Podobed, O.V., Belayeva, N.F., Tochilkin, A.I. (2012). Anticancer activity of oxovanadium compounds. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 6 (2), 166–172.
- [18] Hanauske, U., Hanauske, A.R., Marshal, M.H., V.A., Muggia, D.D., Von, H. (1987). Biphasic effects of vanadium salts on *in vitro* tumor colony growth. *Int. J. Cell. Cloning*, 5, 170–178.
- [19] Liu, S., Liu, G. and Yi, Y. (2015). Novel vanadyl complexes of alginate saccharides: Synthesis, characterization, and biological activities. *Carbohydrate Polymers*, 121, 86–91.
- [20] Yamaguchi, T., Watanabe, S., Matsumura, Y., Tokuoka, Y., Yokoyama, A. (2012). Oxovanadium complexes with quinoline and pyridinone ligands: Syntheses of the complexes and effect of alkyl chains on their apoptosis-inducing activity in leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 3058–3064.
- [21] Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1257-1272.
- [22] Demir, D., Öner, F. and Kocagöz, T. (2002). Optimizing bacterial transformation in the pDNA-cationic lipid-surfactant complex systems by adjusting CaCl<sub>2</sub> concentration and incubation temperature, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 27, 7-11.
- [23] Venkateswarlu, V. and Manjunath, K. (2004). Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J. Control. Release*, 95, 627-638.
- [24] Trotta, M., Debernardi, F. and Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 257, 153-160.
- [25] Bummer, P.M. (2004). Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery- solid lipid nanoparticles. *Critic. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 21, 1-19.
- [26] Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M. E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R. (1997). Sterilization and freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharmaceutics*, 148, 47-53.
- [27] Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni P., Buralassi, S., Saettone, M.F. (2002). Solid lipid nanoparticles as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharm.*, 238, 241-245.
- [28] Capella, L.S., Alcantara, J.S., Maura-Neto, V., Lopes, A.G., Capella, M.A. (2000). Vanadate is toxic to adherent-growing multidrug-resistant cells. *Tumor Biol.*, 21, 54–62.
- [29] Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2011). Moleküler hücre biyolojisi. Altıncı baskıdan çeviri, Çeviri editörleri Geçkil, H., Özmen, M., Yeşilada, Ö. *Palme Yayıncılık*, 123-139.

- [30] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Çeviri editörleri: Buyru, N., Dalay, N., Özgüç, M., Öztürk, M., Sakızlı, M. (2008). Hücrenin moleküler biyolojisi. 4. baskı, *TÜBA*, 82-146.
- [31] Fraser, S.P., Diss, J.K.J. Chioni, A-M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., Djamgoz, M.B. (2005). Voltage gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Res.*, 11, 5381-5389.
- [32] Berx, G. and Van Roy, F. (2001). Commentary: The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res.*, 3 (5), 289-293.
- [33] Simstein, S., Burow, M., Parker, P., Weldon, C., Beckman, M. (2003). Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: Insights from the MCF-7 cell model system. Mini review. *Experimental Biol. Medicine*, 228, 995-1003.
- [34] Molinuevo, M.S., Cortizo, A.M., Etcheverry, S.B. (2008). Vanadium (IV) complexes inhibit adhesion, migration and colony formation of UMR106 osteosarcoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 61, 767-773.
- [35] Kordowiak, A.M., Klein, A., Goc, A., D'brooe, W. (2007). Comparison of the effect of  $\text{VOSO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and  $\text{NaVO}_3$  on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line. *Pol. J. Pathol.*, 58 (1), 51–57.
- [36] Bracke, M.E., Vyncke, B.M., Bruyneel, E.A, Vermeulen, S.J., De Bruyne, G.K., Van Larebecke, N.A., Vleminckx, K., Van Roy, F.M., Mareel. M.M. (1993). Insulin-like growth factor I activates the invasion supressor function of E-cadherin in MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro. *British J. Cancer*, 68, 282-289.
- [37] Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M.D., Zimonjic, B.D., Donaher, J.L., Popescu, N.C., Hahn, W.C., Weinberg, R.A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes and Development*, 15, 50-65.
- [38] <https://www.lgcstandardsatcc.org/Products/All/HTB22.aspx?slp=1#characteristics> (Erişim tarihi:1.3.2016)
- [39] Schwab, M. and Chatterjee, M. (2011). Vanadium. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, *Encyclopedia of Cancer*, 3883-3885.
- [40] Nriagu, J.P. (1998). Vanadium in the environment, Part 2: Health effects, *John Wiley and Sons, Inc.*, New York, ABD.
- [41] Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tewari, A., Chatterjee, M. (2004). Vanadium – an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.*, 150, 135–143.
- [42] Ehring, G.R., Kerschbaum, H.H., Christopher, M., Fanger, C.E., Rauer, H. Cahalan, M.D. (2000). Vanadate induces calcium signaling,  $\text{Ca}^{2+}$  vanadate induces calcium signaling,  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation, and gene expression in T

- lymphocytes and RBL-2H3 mast cells via thiol oxidation. *J. Immunol.*, 164, 679-687.
- [43] Crans, D.C. (2000). Chemistry and insulin-like properties of vanadium (IV) and vanadium (V) compounds. *J. Inorganic Biochem.*, 80, 123-131.
- [44] D’Cruz, O., Ghosh, P. and Uckun, F.M. (2000). Vanadium (IV) metallocene complexes having sperm motility inhibiting activity. *United States Patent*; 6, 051,603.
- [45] Rodriguez-Mercado, J.J., Mateos-Nava, R.A. and Altamirano-Lozano, M.A. (2011). DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 25, 1996-2002.
- [46] Greenwood, N.N. and Earnshaw, A. (1984). Chemistry of the elements. *Oxford: Pergamon Press*, İngiltere, 1157.
- [47] Bauer, G., Güther, V., Hess, H., Otto, A., Roid, O., Roller, H., Sattelberger, S. (2005). Vanadium and vanadium compounds, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim.
- [48] Crans, D.C., Trujillo, A.M., Pharazyn, P.S., Cohen, M.D. (2011). How environment affects drug activity: Localization, compartmentalization and reactions of a vanadium insulin-enhancing compound, dipicolinatooxovanadium(V), *Coord. Chem. Rev.*, 255, 2178.
- [49] Bryant, B.E. and Conard, F.W. (1957). Vanadium (IV) Oxy(acetylacetonate), *Inorg. Synth.*, 5, 113–116.
- [50] Krivovichev, S.V., Vergasova, L.P., Britvin, S.N., Filatov, S.K., Kahlenberg, V., Ananiev, V.V. (2007). Pauflerite,  $\text{-VO(SO}_4\text{)}$ , A new mineral species from the tolbachik volcano, Kamchatka Peninsula, Russia. *The Canadian Mineralogist*, 45 (4), 921–927.
- [51] Hawthorne, F.C., Schindler, M., Grice, J.D., Haynes, P. (2001). Orthominasragrite,  $\text{V}_4\text{O(SO}_4\text{)(H}_2\text{O)}_5$ , A new mineral species from Temple Mountain, Emery County, Utah, U.S.A. *The Canadian Mineralogist*, 39 (5), 1325–1331.
- [52] Schindler, M., Hawthorne, F.C., Huminicki, D.M.C., Haynes, P., Grice, J.D., Evans, H.T. (2003). Bobjonesite,  $\text{V}^{4+}\text{O(SO}_4\text{)(H}_2\text{O)}_3$ , a new mineral species from Temple Mountain, Emery County, Utah, U.S.A. *The Canadian Mineralogist*. 41 (1), 83–90.
- [53] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/233706?lang=en&region=TR> (Erişim tarihi: 02.20.2012).
- [54] Rehder, D. (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorganic Chemistry Commun.*, 6, 604–617.
- [55] Cohen, N., Halberstam, M., Shlimovich, P., Chang, C.J., Shamon, H. Rossetti, L. (1995). Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 95, 2501-2509.
- [56] Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., Rossum, G.D., Turco, S. (1996). Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 45, 1130-1135.



- [57] Desoize, B. (2004). Metals and metal compounds in cancer treatment. *Anticancer Research*, 24, 1529-1544.
- [58] Monteiro, H.P., Winterbour, C.C. and Stern, A. (1991). Tetravalent vanadium releases ferritin ion which stimulates vanadium-dependent lipid peroxidation. *Free Rad. Res. Commun.*, 1, 125–9.
- [59] Harding, M.M. and Moksdi, G. (2000). Antitumor metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr. Med. Chem.*, 7, 1289–93.
- [60] Kieler, J., Gromek, A. and Nissen, N.I. (1965). Studies on the antineoplastic effect of vanadium salts. *Acta Chir. Scand.*, 343 (Suppl), 154–64.
- [61] Ray, R.S., Rana, B., Swami, B., Venu, V., Chatterjee, M. (2006). Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cell line. *Chem. Biol. Interact.*, 163, 239–247.
- [62] Holko, P., Ligeza, J., Kisielewska, J., Kordowiak, A.M., Klein, A. (2008). The effect of vanadyl sulphate (VOSO<sub>4</sub>) on autocrine growth on human epithelial cancer cell lines. *Pl. J. Pathol.*, 59 (1), 3-8.
- [63] Wozniack, K. and Blasiak, J. (2004). Vanadyl sulfate can differentially damage DNA in human lymphocytes and HeLa cells. *Arch. Toxicol.*, 78, 7-15.
- [64] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 16 (65), 55-63.
- [65] Fotakis, G. and Timbrell, J.A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171–177.
- [66] Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60, 1650–1662.
- [67] Buyukozturk, F., Benneyan J.C. and Carrier R.L. (2010). Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J. Control. Release.*, 142, 22–30.
- [68] Lim, S-J. and Kim, C-K. (2002). Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharmaceut.*, 243,135-146.
- [69] Müller, R.H., Mader, K. and Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm-Biopharm.*, 5,161-177.
- [70] Wissing, S.A., Kayser, O. and Müller, R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 56, 1257-1272.
- [71] Demirel, M. ve Yazan, Y. (2000). Katı lipid nanopartiküller (SLN). *J. Pharmaceut. Sci.*, 25, 167-179.
- [72] Hou, D-Z., Xie, C-S., Huang K-J., Zhu C-H. (2003). The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24, 1781-1785.

- [73] Numanoğlu, U. ve Tarımcı, N. (2006). Katı lipid nanopartiküllerin özellikleri, farmsötik ve kozmetik alandaki uygulamaları. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35 (3), 211-235.
- [74] Mei, Z., Chen, H., Weng, T., Yang Y., Yang X. (2003). Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *Eur. J. Pharm.*, 56, 189-196.
- [75] Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, SA. (2003). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, suppl. 1, 131-S155.
- [76] Charcosset, C., El-Harati, A. and Fessi, H. (2005), Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J. Control. Release*, 108, 112– 120.
- [77] Kheradmandnia, S., Farahani, E.V., Nosrati, M., Atyabi, F. (2010), Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6, 753–759.
- [78] Irache, J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agueros, M., Espuelas, S. (2011), Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology*, 180, 47– 71.
- [79] Gökçe, E.H., Sandri, G., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferrari, F., Güneri, T., Caramella, C. (2008). Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *Int. J. Pharm.*, 364, 76–86.
- [80] Schwarz, C. and Mehnert, W. (1997), Freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN), *Int. J. Pharm.*, 157,171-179.
- [81] Schwarz, C. and Mehnert, W. (1999). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. Drug incorporation and physicochemical characterization. *J. Microencapsulation*, 2, 205-213.
- [82] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-57.
- [83] Krammer, P.H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., Debatin, M.K. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 6, 279-89.
- [84] Gerschenson, L.E. and Rotello, R.J. (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J.*, 6, 2450-55.
- [85] Allen, P.D., Bustin, S.A. and Newland, A.C. (1993). The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Reviews*, 7, 63-73.
- [86] Cohen, J.J. (1993). Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol. Today*, 14,126-30.
- [87] Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull.*, 53, 451-65.
- [88] Lambert, B. and Wiele, C.V. (2005). Treatment of hepatocellular carcinoma by means of radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 32, 980–989.
- [89] Szyszkoa, T., Al-Nahhasa, A., Canelob, R., Habib, N., Jiaob, L., Wasanc, H., Pagoua, M., Taitd, P. (2007). Assessment of response to treatment of unresectable

- liver tumours with 90Y microspheres: Value of FDG PET versus computed tomography. *Nucl. Med. Commun.*, 28, 15–20.
- [90] Park, B.C., Huh, M.H. and Seo, J.H. (1995). Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 22, 286-94.
- [91] Yüksel, B., Handemir Kılıç, S., Taşdemir, N., Batioğlu, S. (2008). Apoptosis ve kaspaz sistemi. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi* (Erişim: <http://http://dergi.ztb.gov.tr>).
- [92] Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M., Lenardo, M.J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signalling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)*, 98, 13884-8.
- [93] Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.*, 37, 719-727.
- [94] Zhang, Z., Leonard, S.S., Huang, C., Vallyathan, V., Castranova, V., Shi, X. (2003). Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G2/M phase arrest. *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (10), 1333-1342.
- [95] Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death, *Annual Rev. Immunol.*, 16, 395-419.
- [96] Gourdie, R.G. (1993). Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in Cell Biology*, 38.
- [97] Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., Takata, K. (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 45 (1), 49–53.
- [98] Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E. (2008). Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6, 93-104.
- [99] Berridge, M.J. (2001). The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Found. Symp.*, 239, 52–64.
- [100] Robison, T.W., Zhou, H. and Forman, H. (1995). Modulation of ADP stimulated inositol phosphate metabolism in rat alveolar macrophages by oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, 318, 215–220.
- [101] Ermak, G. and Davies, K.J. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.*, 38, 713–721.
- [102] Donaldson, K., Stone, V., Borm, P.J.A., Jimenez, L.A., Gilmour, P.S., Roel, P.F.S., Knaapen, M., Rahman, İ., Faux, S.P., David, M., Macnee, W. (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (11), 1369–1382.
- [103] Reimer, L. (1984). Transmission electron microscopy. Physics of image formation and microanalysis. *Springer Series in optical sciences, Springer Verlag Berlin Heidelberg GmbH*, (Erişim:<https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=CUfsCAAQBAJ> &oi=fnd&pg=PA1&dq=transmission+electron+microscopy&ots=DBIHpLMOdK&sig=adKobwgOmuNr8-gSVUD3gmBANK&redir\_esc=y#v=onepage&q&f=false, (Erişim tarihi: 06.03.2016).

- [104] Pesce, M. and Felici, M.D. (1994). Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anatomy and Embryology*, 189, 435-440.
- [105] Unwin, P.N.T. and Zampighi, G. (1980). Structure of junctions between communicating cells. *Nature*, 283, 545-549.
- [106] Glauert, A.M. and Lewis, P.R. (1998). Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. *Princeton University Press, New Jersey*, ISBN: 0-691-00749-2 (Cloth) , ISBN: 0-691-00900-7 (pbk).
- [107] Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., MacDonald-Bravo, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature*, 326, 515-517.
- [108] Celis, J.E. and Celis, A. (1985). Cell Biology, cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase (nonhistone protein/proliferating cell nuclear antigen antibody/Immunofluorescence/vertebrates/cell proliferation pathway), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 3262-3266.
- [109] Garcia, R.L., Coltrera, M.D. and Gown, A.M. (1989). Rapid communication, Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues, comparison with flow cytometric analysis. *American J. Pathol.*, 134 (4), 733-739.
- [110] Wijnhoven, B.P.L., Dinjens, W.N.M. and Pignatelli, M. (2000). E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.*, 87, 992-1005.
- [111] Canel, M., Serrels, A., Frame, M.C., Brunton, V.G. (2013). E-Cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell. Sci.*, 126, 393-401.
- [112] Onder, T.T, Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Research*, 68, 3645-3654.
- [113] Aken, E.V., Wever, O.D., Correia da Rocha, A.S. and Mareel, M. (2001). Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch.*, 439, 725-751.
- [114] Perl, A-K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, K. and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenomato carcinoma. *Nature*, 1998, 381-392.
- [115] Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Mirano, S., Takeichi, M., and Mori, T. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Research*, 53, 1696-1701.
- [116] Hayat, M.A. (1974). Principles and techniques of scanning electron microscopy. *Biological Applications*, 1, ISBN: 0-442-25677-9, ABD.
- [117] Tepikin, A.V. (2001). Calcium Signalling, A Practical approach, Second Edition, *Oxford University Press, İngiltere*, 17-21.

- [118] Ray, R.S., Ghosh, B., Rana, A., Chatterjee M. (2006). Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: Chemopreventive activity of vanadium *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Cancer*, 120, 13–23.
- [119] Van, M.W. and Libert, C. (2000). Bilirubin release induced by tumor necrosis factor in combination with galactosamine is toxic to mice. *Cytokine*, 23 (3), 94-100.
- [120] Anukarahanonta, T., Shinozuka, H., Farber, E. (1973). Inhibition of protein synthesis in rat liver by D-galactosamine, *Res. Commun. Chem. Pathol. and Pharmacol.*, 5 (2), 481-91.
- [121] Ivankovic, S., Music, S., Gotic, M., Ljubescic, N. (2006). Cytotoxicity of nanosize V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> particles to selected fibroblast and tumor cells. *Toxicology in Vitro*, 20, 286–294.
- [122] Barrio, D.A., Etcheverry, S.B. (2010). Potential use of vanadium compounds in therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 3632-3642.
- [123] Virgilio, A.L.D., Rivadeneira, J., Muglia, C.I., Reigosa, A., Butenko, M. Nataliya, Cavaco, I., Etcheverry, S.B. (2011). Cyto and genotoxicity of a vanadyl(IV) complex with oxodiacetate in human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells: potential use in cancer therapy. *Biomaterials*, 24, 1153–1168.
- [124] Tadakuma, T., Kizaki, H., Odaka, C., Kubota, R., Ishimura, Y., Yagita, H., Okumura, K., (1990). CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes are susceptible to DNA fragmentation induced by phorbol ester, calcium ionophore and anti-CD3 antibody. *Eur. J. Immunol.*, 20, 779-784.
- [125] Riberio, J.M. Carson, D.A. (1993). Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease from human spleen: Purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry*, 32, 9129-3136.
- [126] Mercep, M., Noguchi, P.D. and Ashwell, J.D. (1989). The cell cycle block and lysis of an activated T cell hybridoma are distinct processes with different Ca<sup>2+</sup> requirements and sensitivity to cyclosporine. *A. J. Immunol.*, 142, 4085-4092.
- [127] McConkey, D.J. Hartzell, P., Amador-Perez, F.J., Orenius S., Jondal, M. (1989). Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.*, 143, 1801-1806.
- [128] Down, D.R. (1995). Calcium regulation of apoptosis. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, 30, 225-280.
- [129] Varecka, L., Peterajova, E. and Sevcik, J. Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel and the activation of Ca<sup>2+</sup> influx in vanadate-treated red blood cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, 16 (4), 339-357.
- [130] Pessoa, J.C., Etcheverry, S., Gambino, D. (2015). Review: Vanadium compounds in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 301–302.
- [131] Liu, X., Cui, H., Peng, X., Fang, J., Cui, W., Wu, B. (2011). The effect of dietary vanadium on cell cycle and apoptosis of liver in broilers. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 143, 1508–1515.
- [132] León, I.E., Cadavid-Vargas, J.F., Tiscornia, I., Porro, V., Castelli, S., Katkar, P., Desideri, A., Bollati-Fogolin, M., Etcheverry, S.B. (2015). Oxidovanadium(IV)

- complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 20, 1175–1191.
- [133] Wang, Q., Liu, T.T., Fu, Y., Wang, K., Yang, X.G. (2010). Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15 (7), 1087-1097.
- [134] Umbas, R., Schalken, J.A., Aalders, T.W., Carter, B.S., Karthaus, H.F., Schaafsma, H.E., Debruyne, F.M., Isaacs, W.B. (1992). Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res.*, 52 (18), 5104-5109.
- [135] Gottardi, C.J., Wong, E., Gumbiner, B.M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell. Biol.*, 153 (5), 1049-1060.
- [136] Debreli Coskun, M., Ari, F., Yilmaztepe Oral, A., Sarimahmut, M., Kutlu H.M., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. (2013). Promising anti-growth effects of palladium (II) saccharinate complex of terpyridine by inducing apoptosis on transformed fibroblasts *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem.*, 21 (5), 4698-4705.
- [137] Kioseoglou, E., Petanidis, S., Gabriel, C., Salifoglou, A. (2015). Review. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coordination Chemistry Reviews*, 301–302, 87-105.

- Veyselova, C., Birbir, M., Berber, D. (2013). Minimal bactericidal concentration for a quaternary ammonium compound used in soak liquors. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (SLTC Journal)*, 97 (4), 166-171.
- Veyselova, C., Birbir, M., Berber, D. (2012). Quaternary ammonium compound as bactericide in hide brine curing and presoaking processes. *Journal of the American Leather Chemists Association (JALCA)*, 107, 336-339.

Posterler :

- 2016, (Poster), Veyselova D., Kutlu H.M., Analysing the cytotoxic effects of ceranib-2 on hepatocellular carcinoma cells. 1. International Cell Death Research Congress, PP-55, ISBN-13:978-605-63544-4-1, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- 2016, (Poster), Çömlekçi, E., Veyselova D., Kutlu H.M., Investigation of carmofur induced ultrastructural changes on human lung adenocarcinoma cells'', 1.International Cell Death Research Congress, PP-66, ISBN-13:978-605-63544-4-1, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- 2015, (Poster), D. Veyselova, H. Kutlu, Evaluation of the Potential Cytotoxic Effects of Vanadyl Sulphate on Human Breast Cancer Cells, Poster no: 2581, 2015 Society of Toxicology Annual Meeting Late-Breaking Abstracts book, 61, 54. SOT Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, ABD.
- 2015, (Poster), H. Kutlu, D. Veyselova, A Transmission Electron Microscopic Analysis of the Effects of Vanadyl Sulphate on the Ultrastructure of MCF-7 Cells, Poster no: 2593, 2015 Society of Toxicology Annual Meeting Late-Breaking Abstracts book, 54. SOT Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, ABD.
- 2015, (Poster), B. Yurdakok Dikmen, D. Veyselova, H. Kutlu, A. Filazi, F. Erkoç, Do Synthetic Pyrethroids Have Subcellular Effects Other Than Sodium Channel Blockade? A Mechanistic Study Using RTG Cells, Final abstract ID: 2475, 2015 Society of Toxicology Annual Meeting Late-Breaking Abstracts book 6-7, 54. SOT Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, ABD.
- 2015, (Poster), Kutlu H.M., Veyselova D., Kuş G., Determination of cell death mechanism on human lung adenocarcinoma cells exposed to ceranib-2. 12<sup>th</sup> Croatian Biological Congress with International Participation, Hırvatistan.
- 2015, (Poster), Veyselova D., Kutlu H.M., Kuş G., Investigation of ceranib-2 induced cytotoxicity on human lung adenocarcinoma cells. 12<sup>th</sup> Croatian Biological Congress with International Participation, Hırvatistan.
- 2014, (Poster), Veyselova D, Kutlu H.M., Cytotoxicity on human breast cancer cells caused by a vanadium salt, American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, ABD.

- 2014, (Poster), Kutlu H.M, Vejselova D, The effects of vanadyl sulphate on rat glioma cells ultrastructure, American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, ABD.
- 2014, (Poster), Kutlu H. M., Vejselova D., Antiproliferative and Apoptotic Effects of Vanadyl Sulphate on H-Ras Transformed 5rp7 Cells, Microscopy and Microanalysis, Hartford, Connecticut, ABD.
- 2014, (Poster), Vejselova, D., Kutlu H. M., Cengiz M., Morphological Changes on H-Ras 5RP7 Cells Caused by Vanadyl Sulphate, Microscopy and Microanalysis, Hartford, Connecticut, ABD.
- 2013, (Poster), Kutlu, M., Veyselova, C., Terzi, E., C6 Glioma Hücrelerinin Konfokal Mikroskopisi, 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası katılımlı), Mersin.
- 2013, (Poster), Vejselova, D., Kutlu, M., Diop, E. and Cengiz, M., Ellagic Acid Effects on Ultrastructural Changes on C6 Glioma Cell Line, II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir.
- 2013, (Poster), Kutlu, M., Vejselova, D., Diop, E. and Cengiz, M., Ellagic Acid Effects on C6 Glioma Cell Line, II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir.
- 2013, (Poster), Kutlu, M., Vejselova, D., Cengiz, M., Effects of Vanadyl Sulphate ( $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) on the Morphology of C6 Glioma Cells, American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, ABD.
- 2013, (Poster), Cengiz, M., Kutlu, M., Vejselova, D., Cytotoxic Effects of Vanadyl Sulphate on 5RP7 Cell Line, American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, ABD.
- 2013, (Poster), Vejselova, D., Kutlu, M., Cengiz, M., Inhibitory Effects of  $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  on C6 Glioma Cell Line, American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, ABD.
- 2012, Poster, Veyselova, C., Biyoloji Lisans Öğrencilerinin Biyokimya Laboratuvar Eğitimi Hakkındaki Görüşleri, Biyokimya Laboratuvar Eğitimine Çok Disiplinli Yaklaşım Çalıştayı, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.
- 2012, Poster, Veyselova, C., Biyokimya Laboratuvar Eğitiminin Hücre Kültürü Çalışmalarındaki Önemi, Biyokimya Laboratuvar Eğitimine Çok Disiplinli Yaklaşım Çalıştayı, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.



- 2012, Poster, Vejselova, D., Cengiz, M., Kutlu, M., İn vitro ortamda salisilik asitin A549 hücreleri üzerine toksisitesinin değerlendirilmesi, ASCB Annual Meeting-2012, San Fransisko, Kaliforniya, ABD.
- 2012, (Poster), Cengiz, M., Vejselova, D., A549 hücreleri üzerine salisilik asidin anti-tümör etkisi, ASCB Annual Meeting-2012, San Fransisko, Kaliforniya, ABD.

#### Sunumlar:

- 2016, (Sözlü Sunum), Vejselova, D., Kutlu H.M., Ceranib-2 induced cytotoxicity in HepG2 cells, International Healthcare, Applied Science and Engineering Conference, Martin Conference Center at Harvard Medical School, Boston, ABD.
- 2015, (Sözlü Sunum), Vejselova, D., Kutlu H.M., Vanadil sülfat ve nano formlarının kanser hücrelerindeki etkilerinin ince yapı düzeyinde araştırılması, 22. Elektron Mikroskopi Kongresi, LOF6 Sabancı Üniversitesi, İstanbul.
- 2015, (Sözlü Sunum), Kutlu H.M., Vejselova, D., Ceranib-2'ye maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin 3 boyutlu elektron tomografik incelenmesi, 22. Elektron Mikroskopi Kongresi, LOF5 Sabancı Üniversitesi, İstanbul.
- 2013, (Sözlü Sunum), Vejselova D., Kutlu M., Vanadyumun C6 glioma hücreleri üzerindeki biyokimyasal etkileri, XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir.

#### Katılan Bilimsel Etkinlikler:

- 2016, International Healthcare, Applied Science and Engineering Meeting, Martin Conference Center at Harvard Medical School, Boston, ABD.
- 2016, 1. Uluslararası Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye.
- 2015, 54<sup>th</sup> SOT Annual Meeting 2015 and ToxExpo, San Diego, ABD.
- 2015, 22. Elektron Mikroskopi Kongresi, 2-4 Eylül 2015, İstanbul, Türkiye.
- 2015, 12<sup>th</sup> Croatian Biological Congress with International Participation, Sveti Martin na Muri, Hırvatistan.
- 2014, Taramalı elektron mikroskopu (SEM) sertifikalı eğitim programı, ODTÜ Sürekli Eğitim Merkezi ve ODTÜ Merkez Laboratuvarı, Ankara.
- 2014, Uluslararası Otofaji Sempozyumu, Sabancı Üniversitesi, Minerva Han, Karaköy, İstanbul.
- 2014, ASCB Annual Meeting 2014, Philadelphia, Pennsylvania, ABD.

- 2014, Microscopy and Microanalysis, Hartford, Connecticut, ABD.
- 2013, II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, Çeşme, İzmir.
- 2013, XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Kaya Otel and Convention Center, İzmir.
- 2013, Biyokimya Laboratuvar Çalışmalarında Deney Geliştirilmesi, Alternatif Testler ve Model Organizmaların Kullanımı Eğitim Kursu, XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Kaya Otel and Convention Center, İzmir.
- 2013, ASCB Annual Meeting 2013, New Orleans, Louisiana, ABD.
- 2012, Biyokimya Laboratuvar Eğitimine Çok Disiplinli Yaklaşım Çalıştayı, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara.
- 2012, ASCB Annual Meeting-2012, San Fransisko, Kaliforniya, ABD.
- 2010, Prokaryotik ve Ökaryotik Hücrelere Gen Aktarımı Kursu, Anemon Hotel, Eskişehir.
- 2010, XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Anemon Hotel, Eskişehir.
- 2007, 3.Geleneksel Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Sergisi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- 2006, Biyoloji Eğitimi Sergisi, Gazi Eğitim Fakültesi, Ankara.
- 2006, 7. Ulusal Fen Bilimleri ve Matematik Eğitimi Kongresi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- 2005, Gıda Güvenirliği, Gıda Güvenirliğinin Biyolojik Çeşitliliğimiz Açısından Araştırılması ve Biyogüvenlik Yasa Tasarısına Önerilerin Saptanması Sempozyumu, ATO, Ankara.