TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBON NANOLİF TAŞIYICILARA YÜKLENMİŞ D VİTAMİNİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HAVVA DAŞTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BESLENME VE BİYOKİMYASI PROGRAMI

DANIŞMAN
Doç. Dr. ÖZLEM BİNGÖL ÖZAKPINAR

2022- İSTANBUL

BEYAN

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

Havva DAŞTAN

İmza

TEŞEKKÜR

Çalışmamda bana yol gösteren, destek ve emeklerini benden esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR'a, bilgi birikimi, hoşgörüsü ve yol göstericiliğiyle çalışmalarıma yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Elif ÇALIŞKAN SALİHİ'ye katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca derslerinden keyif aldığım, paylaştığı bilgi birikimi, sağladığı motivasyon ve kazandırdığı bakış açısı için hocam Sayın Prof. Dr. Derya ÖZSAVCI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvardaki çalışmalarımda tüm sorularımı sabırla cevaplayan ve teknik bilgisini her zaman benimle paylaşan hocam Sayın Dr. Öğr.Üyesi Turgut Şekerler'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam boyunca benden yardımını ve desteğini esirgemeyen birlikte çalışmaktan keyif aldığım sevgili arkadaşım Merve GÜRBOĞA'ya teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca destekleri ve sevgileriyle her zaman yanımda olan anneme, babama ve abime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN……**i**
TEŞEKKÜR……**ii**
İÇİNDEKİLER……**iii**
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ……**v**
ŞEKİL LİSTESİ……**vii**
RESİM LİSTESİ……**ix**
1.ÖZET……**1**
2.SUMMARY……**2**
3.GİRİŞ ve AMAÇ……**3**
4.GENEL BİLGİLER……**6**
4.1.KANSER ……6
4.1.1.Kolon Kanseri……7
4.2.KARBON NANOLİFLER……12
4.2.1.Karbon Nanolifler ve Biyomedikal Uygulamalar……13
4.2.1.1. Karbon Nanoliflerin Kanserde İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanımı ……14
4.3. AEROJELLER……16
4.4. D VİTAMİNİ……18
4.4.1. D vitamini Sentez ve Metabolizması ……18
4.4.2. VD'nin Kanserdeki Rolü……22
5. GEREÇ ve YÖNTEM ……**26**
5.1. GEREÇLER……26
5.1.1. Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri……26
5.1.2. Kimyasallar……27
5.2. YÖNTEM……27
5.2.1. CNF'lerin Hazırlanması ve VD adsorpsiyonu……27
5.2.2. VD Yüklü CNF'lerin Karakterizasyonu……28
5.2.3. Hücre Kültürü……29
5.2.3.1. VD Yüklü CNF'lerin Kolon Kanseri Hücrelerinde Antiproliferatif Aktivitesinin Belirlenmesi……29

5.2.3.2.VD Yüklü Karbon Nanoliflerin Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi…….……..….32
5.2.3.3. Apoptotik Mekanizmanın Araştırılması…….……33
6. BULGULAR……..**35**
6.1. ACNF'NİN KARAKTERİZASYONU ve VD ADSORPSİYONUNUN İNCELENMESİ……..35
6.1.1. ACNF üzerinde VD adsorpsiyonunun incelenmesi……38
6.2. CNF'NİN NIH/3T3 HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİ ……...40
6.3. MODİFİYE EDİLEN CNF'LERE YÜKLENMİŞ VD'NİN NIH/3T3 HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİ……...41
6.4. MODİFİYE EDİLEN CNF'LERE YÜKLENMİŞ VD'NİN HT-29 ve HCT-116 ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİSİ…….45
6.5. MODİFİYE EDİLEN CNF'LERE YÜKLENMİŞ VD'NİN HT-29 ve HCT-116 ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ÖLÇER CİHAZI İLE BELİRLENMESİ……..47
6.6. MODİFİYE EDİLEN CNF'LERE YÜKLENMİŞ VD'NİN HT-29 ve HCT-116 HÜCRELERİNDE KASPAZ AKTİVİTESİ ve MİTOKONDRİ MEMBRAN POLARİZASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN SONUÇLARI……49
6.6.1. Kaspaz Enzimlerinin Aktivasyonu……..…….……..49
6.6.2. Mitokondri Membran Potansiyeli…….…….…….51
6.6.3. Akridin oranj ve etidyum bromür boyama sonuçları……..……52
6.7. MODİFİYE EDİLEN CNF'LERE YÜKLENMİŞ VD'NİN HT-29 ve HCT-116 HÜCRE MİGRASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN SONUÇLARI…….52
7. TARTIŞMA ve SONUÇ…….…..**56**
8. KAYNAKLAR……..…**62**
9. ÖZGEÇMİŞ…….……**72**

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

$1,25(OH)_2D_3$: 1,25-dihydroxyvitamin D

$24,25(OH)_2D_3$: 24,25-hidroksivitamin D

$25(OH)\ D_3$: 25-hidroksivitamin D

7-DHC: 7-dehidrokolesterol

ACNF: Aktive edilmiş karbon nanolif

APC: Adenomatozis polipozis koli

AXIN2: Aksin 2

CDH1: Kaderin1

CNF: Karbon nanolif

CTNNB1: Katenin beta 1

CYP24A1: 24-hidroksilaz

CYP27B1: 1α-hidroksilaz enzimi

CYP2R1, CYP27A1 25-hidroksilaz

DBP: D Vitamin Bağlayıcı protein

DKK1: Dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü1

DNA: Deoksiribonükleik asit

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EMT: Epitelyal mezenkimal geçiş

GLOBOCAN: Küresel kanser gözlemevi

GRE: Geçirgenlik ve retansiyon

HAP: Hidroksiapatit

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IL-10: İnterlökin-10

IL-17: İnterlökin-17

IL-1β: İnterlökin -1β

IL-6: İnterlökin-6

IL-8: İnterlökin-8

miRNA: MikroRNA

MMP: Mitokondri membran potansiyeli

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

NF-κB: Nükleer Faktör Kb

NP: Nanopartiküller

PAN: Poliakrilonitril

PCL: Polikaprolakton

PEO: Polietilen oksit

PVA: Polivinil alkol

RDA: Tavsiye edilen günlük miktar

TGF-β: Transforming büyüme faktör beta

TNF-α: Tümör nekroz faktör

TNM: Tümor, nod ve metastaz

UVB: Ultraviyole B

VD: D vitamini

D2: Ergokalsiferol

D3: Kolekalsiferol

VDR: Vitamin D reseptörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kolon kanserine etki eden faktörler……..……..10

Şekil 2. Karbon nanolif ve aerojel örneklerinin XRD diyagramı……...36

Şekil 3. Karbon nanolif ve aerojel örneklerinin FTIR spektrumu……..37

Şekil 4. ACNF-VD (a, b) ve Aero1 (c, d) örneklerinin SEM görüntüleri……..38

Şekil 5. ACNF'nin zamana bağlı olarak VD adsorpsiyonu……39

Şekil 6. ACNF'nin sıcaklığa bağlı olarak VD adsorpsiyonu……..……39

Şekil 7. ACNF'nin pH'a bağlı olarak VD adsorpsiyonu……40

Şekil 8. CNF'nin doza bağlı olarak NIH/3T3 hücre proliferasyonuna etkisi……..……..41

Şekil 9. CNF ve modifiye edilmiş CNF örneklerinin normal hücre proliferasyonu üzerine etkisi……...……42

Şekil 10. ACNF ve modifiye edilmiş ACNF örneklerinin normal hücre proliferasyonu üzerine etkisi…….……..43

Şekil 11. Aerojel taşıyıcı sistemlerin NIH/3T3 hücre proliferasyonuna etkisi……..…….……44

Şekil 12. VD'nin doza bağlı olarak hücre proliferasyonuna etkisi……...45

Şekil 13. Aero1'in doza bağlı olarak HT-29 hücre proliferasyonuna etkisi…….46

Şekil 14. Aero1'in doza bağlı olarak HCT-116 hücre proliferasyonuna etkisi……47

Şekil 15. Aero0, Aero1 ve VD'nin HT-29 hücre proliferasyonuna etkisi……48

Şekil 16. Aero0, Aero1 ve VD'nin HCT-116 hücre proliferasyonuna etkisi…...……48

Şekil 17. Aerojellerin HT-29 hücrelerinde apoptotik mekanizmayı uyarması. A) Kaspaz-3 enzim aktivasyonu B) Kaspaz-9 enzim aktivasyonu C) Mitokondri membran depolarizasyonu. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre (Aero0: A0, Aero1: A1).……..……50

Şekil 18. Aerojellerin HCT-116 hücrelerinde apoptotik mekanizmayı uyarması. A) Kaspaz-3 enzim aktivasyonu B) Kaspaz-9 enzim aktivasyonu C) Mitokondri membran depolarizasyonu. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre (Aero0: A0, Aero1: A1).……..……..……..51

Şekil 19. Aerojellerin A) HT-29 ve B) HCT-116 hücre migrasyonu üzerine etkileri. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre (Aero0: A0, Aero1: A1)……...53

Şekil 20. Aero0, Aero1 ve VD'nin doza bağlı olarak HCT-116 hücre migrasyonuna etkisi……54

Şekil 21. Aero0, Aero1 ve VD'nin doza bağlı olarak HT-29 hücre migrasyonuna etkisi……....55

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Dukes sınıflandırması ……8

Resim 2. Nanotüp ve nanolif yapısı ……..……..……13

Resim 3. Aerojellerin kullanım alanları…….…….17

Resim 4. VD'nin derideki sentezi……...19

Resim 5. VD'nin vücuttaki sentez ve metabolizması…….….20

Resim 6. Aero1 kompozit jellerinin doza bağlı olarak kolon kanseri hücrelerindeki apoptotik etkilerinin akridin oranj boyaması ile saptanması……52

1. ÖZET

Karbon nanolif taşıyıcılara yüklenmiş D vitamininin kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin araştırılması

Öğrenci Adı: Havva DAŞTAN

Danışman Adı: Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

Programın Adı : Biyokimya (Ecz) Anabilim Dalı, Beslenme ve Biyokimyası

Amaç: İlacın hücrelere taşınması başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için önemlidir. Karbon nanomalzemeler, yüksek kimyasal dirence, verimli mekanik özelliklere sahip ve hafif oldukları için ilaç dağıtımı için iyi adaylardır. Mevcut literatür verileri, D vitamininin (VD) kanseri önlemedeki rolünü desteklemektedir ve VD'nin kanserin başlangıcında, ilerlemesinde, prognozunda ve tedavisinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Aerojeller, nanomalzemelerin ilaç yükleme kapasitesi için önemli avantajlar olan çok daha geniş yüzey alanları ve ultra gözenekli yapıları ile öne çıkmaktadırlar. Bu çalışmada, çevre dostu olması, sitotoksik etkilerinin olmaması ile yüksek biyouyumlu olması ve kolay üretilebilmesi nedeniyle aerojellerde taşıyıcı malzeme olarak karbon nanolifler (CNF) kullanılarak biyouyumlu ve maliyeti düşük VD taşıyıcılarının geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Aerojellerin antiproliferatif ve sitotoksik aktivitesini belirlemek için MTT yöntemi kullanılmıştır. VD yüklü aerojellerin kolon kanseri hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için yara açma deneyi yapılmıştır. Kolon kanseri hücrelerinde olası apoptotik mekanizmayı araştırmak için biyokimyasal ve morfolojik yöntemler kullanılmıştır.

Bulgular: Bu çalışmada, VD yüklü aktif karbon nanolifleri (ACNF) içeren kompozit aerojel ilaç taşıma sisteminin normal hücrelerde yüksek proliferasyon oranlarına sahip olduğu, bununla birlikte kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra üretilen taşıyıcı sistemin hücre migrasyonu üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: VD yüklü ACNF içeren kompozit aerojelin kolon kanseri üzerinde etkili olduğu ve umut vadeden yeni bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: D vitamini, ilaç taşıyıcı sistem, karbon nanolif, kolon kanseri, aerojel

2. SUMMARY

Investigation of the effect of Vitamin D loaded carbon nanofiber carriers on colon cancer cells

Student Name: Havva DAŞTAN

Name of Supervisor: Assoc. Prof. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

Program Name: Department of Biochemistry, Nutrition Biochemistry

Objective: Transport of the drug to the cells is important for the treatment of many diseases, especially cancer. Carbon nanomaterials are good candidates for drug delivery as they have high chemical resistance, efficient mechanical properties and weightless characters. Current literature data supports the role of vitamin D (VD) in cancer prevention and showed that VD has an important role in the onset, progression, prognosis and treatment of cancer. Aerogels stand out with much larger surface areas and ultra-porous structures which are important advantages for drug loading capacity of the nanomaterials. Developing biocompatible and inexpensive VD carriers was aimed in this study by using carbon nanofibers (CNF) in aerogels as carrier materials due to being environmentally friendly, highly biocompatible with the absence of cytotoxic effects and easy to handle production.

Material and methods: MTT method was used to determine the antiproliferative and cytotoxic activity of aerogels. In order to determine the effect of VD-loaded aerogels on the migration of colon cancer cells, wound dehiscence experiment was performed. Biochemical and morphological methods were used to investigate the possible apoptotic mechanism in colon cancer cells.

Results: It was determined in this study that the composite aerogel drug delivery system containing VD-loaded activated carbon nanofibers (ACNF) has high proliferation rates on normal cells, while had a cytotoxic and apoptotic effect on cancer cells. In addition to this, it was determined that the produced carrier system had an inhibitory effect on cell migration.

Conclusion: It is thought that the composite aerogel containing VD-loaded ACNF is effective on colon cancer and it is a promising new drug delivery system.

Keywords: Vitamin D, drug delivery system, carbon nanofiber, colon cancer, aerogel

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser yükü küresel olarak büyümeye devam etmekte ve birey, toplum ve sağlık sistemleri üzerinde fiziksel, duygusal ve finansal baskılar yaratmaktadır. Sağlık sistemlerinin güçlü olduğu ülkelerde, erken teşhis ve erişilebilir kaliteli tedavi sayesinde birçok kanser türünün hayatta kalma oranları artmaktadır. Klinikte önemli bir problem olan ve henüz kesin tedavisi olmayan kanser için yeni hedeflerin ve tedavi stratejilerinin oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde karşılaşılan en büyük problemlerden biri ilacın etki göstereceği doku veya hücreye taşınmasıdır. İdeal ilaç taşıma sistemi, ilacın biyoyararlanımını arttırmalı, kontrollü veya sürekli ilaç dağıtımı sağlamalı ve ilacı hastalıksız konakçı dokulardan kaçınırken etki yerine sağlam bir şekilde taşımalıdır. Ürün güvenli ve güvenilir, uygun maliyetli, stabil, hastalara kolay uygulanabilmeli ve ilaç teslimi çeşitli fizyolojik değişkenler altında tutulmalıdır (Jain, 2014). 1960'larda lipozomların keşfinden başlayarak ilaç taşıyıcı sistemlerin gelişimi birkaç yıldır yoğun bir şekilde devam etmektedir ve pek çok hastalığın tedavisinde çok umut vericidir.

Nanopartiküller (NP), 10^{-9}m üzerinde boyutları olan daha geniş yüzey alanı, stabilite, çeşitli kompozisyon, biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip nano ölçekli kolloidal taşıyıcılardır (Steichen ve ark., 2013). Nanomalzemeler arasında, karbon bazlı nanomalzemeler yüksek kimyasal direnç kabiliyeti, verimli mekanik özellikleri ve ağırlıksız karakterleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Ayrıca bu malzemeler, vücuttaki en yüksek dağılım kabiliyetine ve biyouyumluluğa sahiptir (Simon ve ark., 2019). Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar, karbon nanomalzemelerin anti-kanser ajanları olarak hareket edebileceğini ve kanser hücrelerini etoposid (Mahmood ve ark., 2009, 2010), deksametazon (Mahmood ve ark., 2010) ve paklitaksel (Arya ve ark., 2013) gibi sitotoksik ilaçlara duyarlı hale getirebildiğini göstermiştir.

D vitamini (VD), steroid yapıda 27 C'lu vitaminlerden biridir. İntra ve ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor regülasyonunda en etkili hormon olarak tanımlanmaktadır. Garland'ların 1980'lerin başlarında VD'yi olası antikanser aktivitesi ile ilişkilendiren ilk hipotezinden bu yana, çok sayıda klinik öncesi ve klinik çalışma yapılmış ve çok sayıda makalede karsinogenezde VD'nin çeşitli etki mekanizmaları

bildirilmiştir (Wu ve ark., 2015; Mondul ve ark., 2017). Özellikle meme, prostat ve kolon kanseri üzerinde çok önemli etkileri olduğu ortaya konmuştur. Klinik öncesi ve bazı klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, VD eksikliğinin kanser geliştirme riskini artırdığını ve eksikliğin önlenmesi ve VD takviyelerinin eklenmesinin kanser insidansını azaltmanın ve kanser prognozunu iyileştirmenin ekonomik ve güvenli bir yolu olabileceğini kuvvetle göstermektedir (Feldman ve ark., 2014; Moukayed ve Grant, 2017).

VD eksikliğinin sağlık için risk faktörü olarak kabul edilmesi, biyoyararlanımını veya aktivitesini azaltmadan gıdalara ve farmasötik formülasyonlara VD'nin dahil edilmesi için nanoteknolojiler kullanılarak üretilen yeni fonksiyonel gıdaların ve terapilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Kanser tedavisi için VD'nin yüklendiği çeşitli taşıma sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler çoğunlukla polimerler üzerinde yoğunlaşmış olup polimere bağlanan VD'nin büyük bir kısmı, hedef dokuya ulaşamadan yarı ömrünü tamamlamıştır. Bu nedenle uygulama sıklığının fazla olması, polimerin hazırlanmasındaki zorluklar ve ortaya çıkan yüksek maliyetler bu uygulamaların olumsuz yönlerini açığa çıkarmıştır.

Günümüzde, birbirinden farklı özelliğe sahip olan kolorektal kanserlerin her birini tedavi edebilecek özel bir tedavi tasarlanmamıştır. Hastalığın erken evrelerinde cerrahi önde gelen tedavi olmaya devam ederken, evre III kolorektal kanserli hastalarda kemoterapi kritik bir rol oynamaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, serum D vitamini (VD) seviyeleri ile insan kolorektal kanser insidansı arasında ters bir korelasyon olduğu belirtilirken (Javed ve ark., 2020), VD hem tek başına hem de kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde bir dizi klinik çalışmada kullanılmıştır (Woloszynska-Read ve ark., 2011). Ancak, konvansiyonel tedavide kullanılan kemoterapötik ajanların seçiciliklerinin olmayışı, yan etkilerinin yüksek oluşu ve bu ajanlara karşı kısa sürede direnç gelişimi kanserle savaşta aşılması gereken en önemli sorunlardır. Normal dokulara zarar vermeden tümör bölgesine özgü ve etkili bir ilaç nanotaşıyıcısı, dolaşımdaki ilaçların yarı ömürlerini arttırmakta ve hedef hücreye daha yüksek bir dozun verilmesine izin vermektedir (Ahmad ve ark., 2019).

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda karbon bazlı nanomalzemelere VD bağlanmasının etkinliği ve kanser hücreleri üzerindeki etkisine dair herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında, karbon nanoliflere VD bağlanması

çalışmaları yapılarak optimizasyonu sağlandıktan sonra kolon kanseri hücreleri HT-29 ve HCT-116 hücreleri üzerindeki olası antiproliferatif ve apoptotik mekanizmalar araştırılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen karbon bazlı ilaç taşıyıcı sistemin kolon kanseri tedavisi için yeni bir terapötik tedavi seçeneği olabileceğini ortaya koymaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz büyümesi sonucu meydana gelen bir hastalıktır (www.who.int/health-topics/cancer, Erişim tarihi: 15 Ağustos 2021). Dünyada yaşam süresinin artmasının önündeki önemli bir engel olan kanser, başlıca ölüm nedenleri arasındadır (Sung ve ark., 2021). GLOBOCAN 2020 değerlendirmelerine göre dünyada 2020 yılında 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser nedenli ölüm meydana gelmiştir. Kolorektal kanser, yeni vakaların %10'u, ölümlerin ise %9,4'ünü oluşturmaktadır (http://gco.iarc.fr/today/home- cancer fact sheets, Erişim tarihi: 15 Ağustos 2021).

Vücut, düzenli olarak büyüyen ve gerektiğinde kontrollü olarak bölünen trilyonlarca canlı hücreden oluşmaktadır. Normal vücut hücreleri yaşlandığında veya hasara uğradığında ölürler ve yerlerini yeni hücreler alır (https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer, Erişim tarihi: 16 Ağustos 2021). Anormal hücre, hücredeki genetik materyalde oluşan birçok değişimin normal vücut hücrelerinin neoplastik hücreye dönüşmesi sonucu oluşur. Çevresel veya genetik faktörler nedeniyle oluşan bazı DNA mutasyonları hücrede etki göstermezken, bazıları ise kanser hücrelerinin sağ kalma, proliferasyon, invazyon ve metastaz özelliklerini arttırmaktadır (Alexandrov ve Zhivagui, 2018).

Hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu meydana gelen kanserli ya da kötü huylu (malign) tümörler lenf düğümlerine ve diğer organlara metastaz yapabilmektedir. İyi huylu (bening) tümörler ise kanser ve metastaz yapmazlar (https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html, Erişim tarihi: 17 Ağustos 2021)

Akciğer, prostat, meme, kolorektal gibi kanserler solid tümör kanserleri olarak adlandırırken; lösemi, lenfoma ve multible myloma genellikle tümör oluşturmayan kan hücresi kanserleridir (https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html, Erişim tarihi: 17 Ağustos 2021).

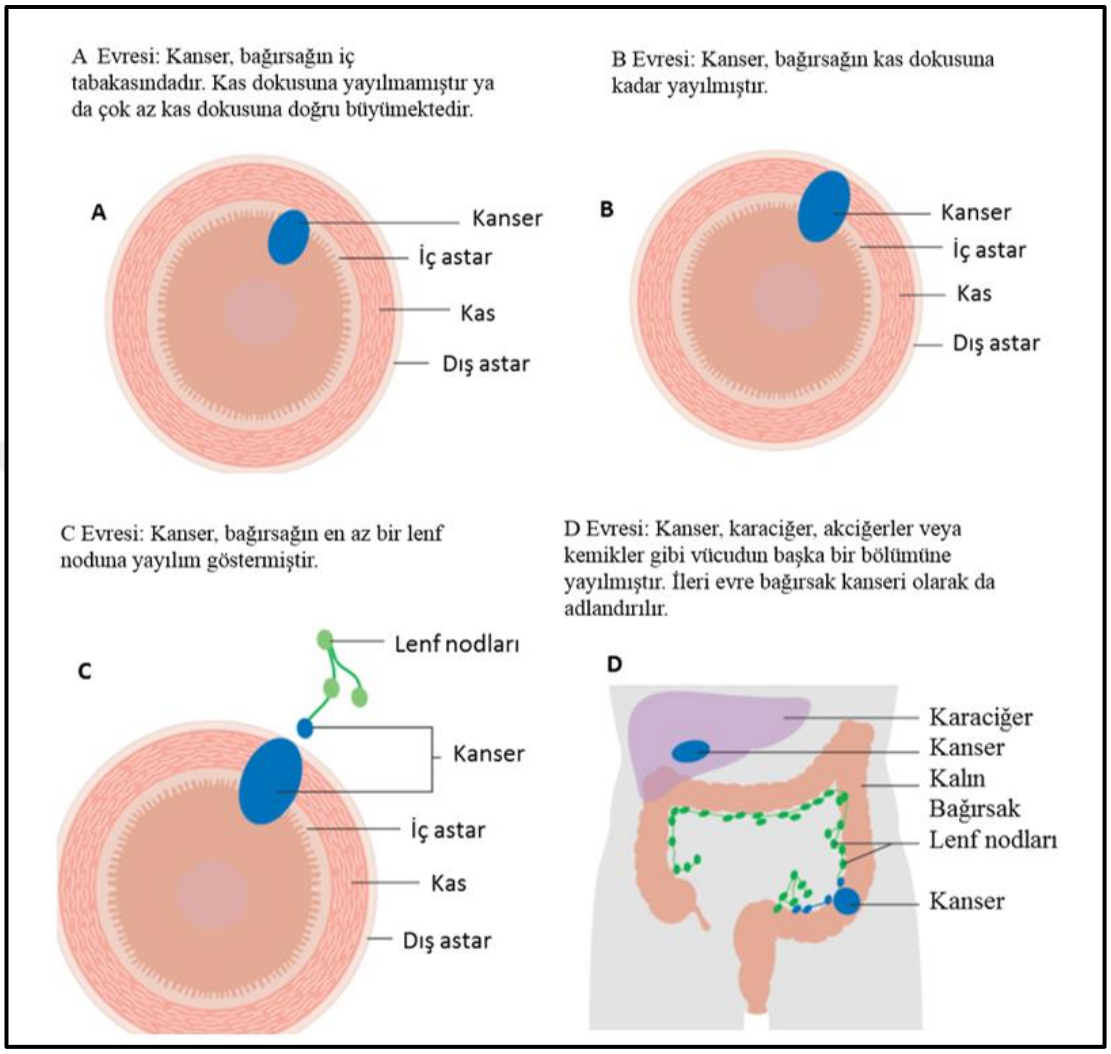
4.1.1. Kolon kanseri

Kolorektal kanser, kolon ya da rektumda görülmekte ve başladığı alana göre adlandırılmaktadır (https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html, Erişim tarihi: 17 Ağustos 2021). Başlangıçta kolon veya rektum içinde anormal büyümeler olan polipler gelişir ve bunlar çıkarılmazsa daha sonra kanserli hücreler haline gelebilmektedir (www.ccalliance.org/colorectal-cancer-information/what-is-colorectal-cancer, Erişim tarihi: 21 Ağustos 2021).

Karsinogenesisdeki ilk aşama, neoplastik poliplerin spesifik türlerinin kolonik mukozada gelişimidir. Kolon kanseri, bening büyümelerden invaziv kansere kadar geniş spektrumlu neoplazm olarak kendini gösterir ve ağırlıklı olarak epitel kaynaklı tümörlerdir (adenomlar, adenokarsinomlar vs.) (https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer, Erişim tarihi: 16 Ağustos 2021). Herhangi bir polibin kansere dönüşümü adenom-karsinom dizisinden geçer. Geleneksel olarak non-neoplastik olarak kabul edilen polipler arasında hiperplastik, juvenil, hamartomatöz, inflamatuar ve lenfoid tipler bulunur. Ancak hamartomatöz ve juvenil nadiren kansere dönüşebilir (https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer, Erişim tarihi: 16 Ağustos 2021). Kanser öncüsü olanlar adenomatöz poliplerdir ve üç tipi bulunmaktadır: tübuler, villöz ve tübüler villoz adenomlar. Serrated ve flat adenomlar ise malign türdedir. Bir polibin kanser yapma ve kanser geliştirme riskini arttıran faktörler; 1 cm'den büyük polip bulunması, 3'ten fazla polip olması veya çıkarıldıktan sonra polipte displazi görülmesi durumlarıdır (https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html, Erişim tarihi: 17 Ağustos 2021).

Kolon kanseri, organlara yayılmak için lokal, lenfatik ya da hematojen invazyon gösterir. Yerinde karsinom ya da yüksek derecede displazi, muscular mukozaya yayılım olmadan mukozada sınırlandırılır. Lenfatik ve vasküler kanallar muskular mukozanın altında olduğu için bu kanserin metastaz yapması büyük ölçüde muhtemel değildir. İnvaziv kolon kanseri, genellikle Dukes sınıflandırmasına göre A'dan D'ye doğru sıralanır (Resim 1). A evresinde, submukozada yer alan kanser, B1 evresinde muscular propia, B2'de seroza'da gözlenir. C evresinde lenf nodlarına

metastaz yapmasıyla birlikte, D evresinde artık diğer organlara metastaz yapmış durumda bulunur (Cappell, 2008).



Resim 1. Dukes sınıflandırması (https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/bowel-cancer/stages-types-and-grades/dukes-staging, Erişim tarihi: 01 Haziran 2022'den değiştirilerek kullanımıştır)

Tümor, nod ve metastaz (TNM) sınıflandırması, tümörün başlıca mukozada bulunması (T), lenf nodlarına ulaşması (N) ve uzak bölgelere metastaz yapması (M) durumuna göre endosonografi değerlendirmelerinde kullanılır. Kolon kanseri TNM sınıflandırmasına göre dört aşamaya ayrılır. Dukes sınıflandırmasındaki A ve B1, 1.aşama; B2, 2. aşama; C evresi 3.aşama; D evresi 4. aşamaya denk gelmektedir (Cappell, 2008).

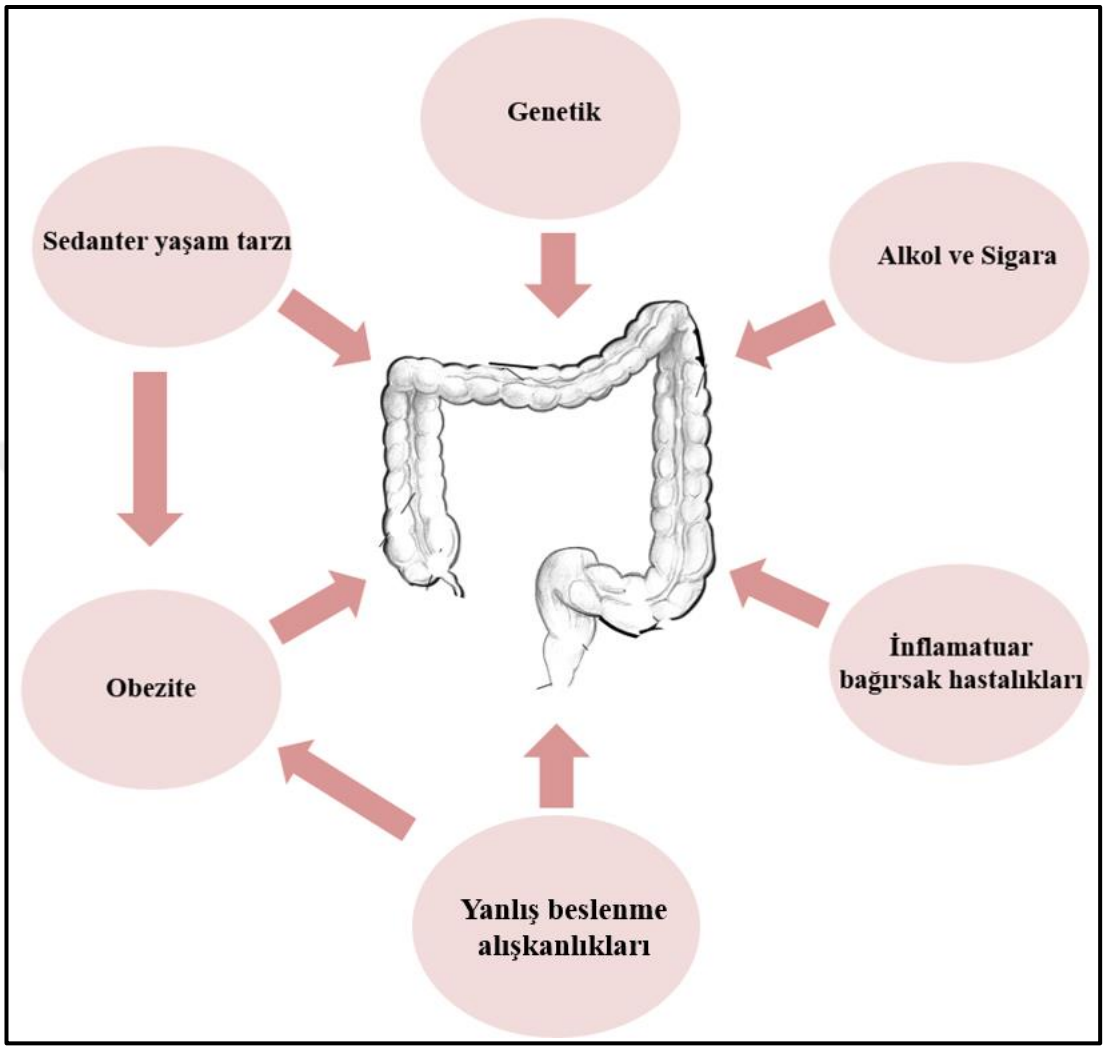
Tüm ırk ve etnik gruplardaki erkek ve kadınları etkileyen kolon kanseri, en sık 50 yaş ve üzeri kişilerde rastlanılmaktadır. Ancak son zamanlarda 50 yaşın altındaki bireylerde görülme sıklığı artmaktadır (https://www.ccalliance.org/colorectal-cancer-information/facts-and-statistics, Erişim tarihi: 22 Ağustos 2021).

Kolon kanseri riskinin artmasında genetik özellikler etkili bir faktör olmasıyla birlikte yaşam tarzı ve diyet alışkanlıkları da önemli unsurlar arasındadır (Şekil 1). Dünya Kanser Araştırma Fonu raporuna göre kolon kanseri oluşunda birçok etken gösterilmektedir. Sedanter yaşam, kırmızı et ve işlenmiş et ürünleri tüketimi, alkol ve sigara kullanımı, diyette süt ve süt ürünleri, tam tahıllı besinlerin az tüketimi ve obezite güçlü kanıtlar içeren faktörlerdir. Ancak bu rapora göre, hem demir içeren besinlerin tüketimi, düşük kalsiyum, C vitamini alımı, sebze ve meyvelerin günlük beslenmede yer almaması ve D vitamini seviyelerinin düşük olması da belirtilen sebepler arasında yer almaktadır (https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/cancer-types/colorectal-cancer/, Erişim tarihi: 10 Haziran 2022).

Obezite, çeşitli inflamasyon yolaklarını hormonlar aracılığıyla aktive etmektedir. Leptin, ghrelin, adiponektin ve insülin/ insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) bunlar arasındadır (Khalyfa ve ark., 2021). Beslenme alışkanlıkları obezite ve kolon sağlığında önemli bir faktör iken günümüzde işlenmiş et ürünleri ve hazır besinlerin sık tüketilmesiyle birlikte diyet posası alımında azalma, vitamin ve mineral yetersizlikleri, yüksek miktarda doymuş yağ ve trans yağ asidi alımı obeziteye neden olmanın yanı sıra kolorektal kanser patogenezinde de etkilidir. Polifenol içeriği zengin beslenme onkogen baskılanmasına katkı sağlarken posadan ve tam tahıllılardan zengin beslenmeyle oluşan kısa zincirli yağ asitleri karsinogenezis yolaklarında etki göstererek kanser oluşumuna engel olabilmektedir (Khalyfa ve ark., 2021).

Kırmızı et ve işlenmiş etlerin tüketilmesiyle birlikte alınan hem demir ve arjinin mutajenez ve inflamasyon potansiyeline sahiptir. Hem demir reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olarak kolonosit hücrelerinin apoptozunu inhibe etmekte ve karsinogenezise neden olmaktadır (Khalyfa ve ark., 2021). Kalsiyumun günlük <300 mg altında alınması da kanser için risk faktörü olarak belirtilmiştir. Özellikle D vitamini ile kombine tedavisinin kolorektal neoplazma karşı bağırsak sağlığını koruyucu etki gösterdiği vurgulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, kolondaki sekonder

yağ asitleri, iyonize yağ asitleri ve hem demir gibi karsinojenik etkenleri azalttığı gösterilmiştir (Keum ve Giovannucci, 2019).



Şekil 1. Kolon kanserine etki eden faktörler

Kolon kanseri ile ilgili belirti ve semptomlar arasında ishal, mide bulantısı, bağırsak alışkanlıklarındaki değişiklikler, dışkı miktarında azalma, şişkinlik, karın krampları, kilo kaybı ve iştahsızlık sayılmaktadır (Shrivastava ve ark., 2021).

Genetik ve epigenetik değişiklikler, kolon kanseri hücrelerinde tümör supressor genlerinin inaktivasyonu ve onkogen aktivasyonuna yol açar (Shirafkan ve ark., 2019). DNA mutasyonuna neden olan bu değişiklikler, çoğu zaman DNA onarım mekanizmasında fonksiyon kaybına ve apoptozisin bozulmasına neden olur (Chan ve

ark., 2020). Primer tümörün metastaza dönüşümünde en önemli faktör epitel mezenkimal geçiştir (EMT) (Shirafkan ve ark., 2019).

Kolorektal kanser, genetik değişiklikler açısından en iyi karakterize edilen katı neoplazidir. Metastatik kolorektal tümörlerin % 96'sı kadarının, WNT/ β-katenin sinyal yolunu anormal şekilde aktive eden genlerde mutasyonlar içerdiği gösterilmiştir (Carlberg ve Muñoz, 2022). APC (WNT sinyal yolunun APC düzenleyicisi), tümör baskılayıcı gendeki mutasyon, kolorektal kanser gelişiminde birincil adım olan kolorektal adenomların çoğunda birincil genetik değişikliktir. Daha düşük oranda ise AXIN2 (aksin 2) ve CTNNB1 (katenin beta 1) / β-katenin genleri de rol oynar. Ek olarak, KRAS ve BRAF'taki aktive edici mutasyon ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β yolundaki inaktive edici bir mutasyon, adenom hücrelerinin malignitesinde rol oynar (Javed ve ark., 2020).

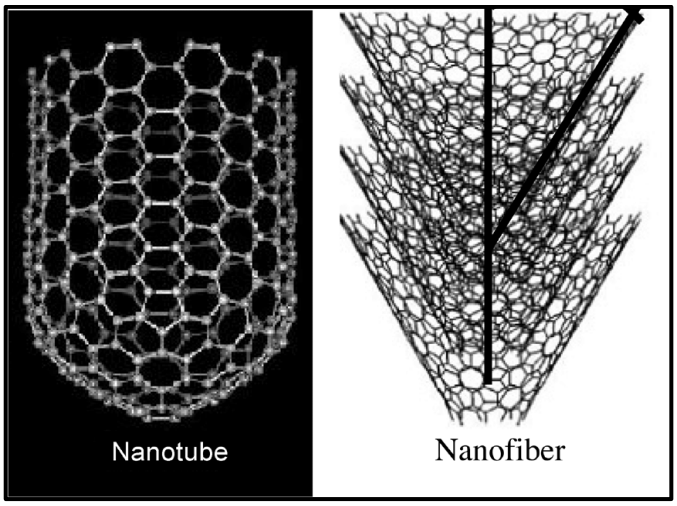
Son yıllarda, mikroRNAların (miRNAs) karsinogenezis ve birçok kanser gelişimindeki rolü kanıtlanmıştır (Shirafkan ve ark., 2019). Çok sayıda mikro RNA'nın kanser hücrelerinin büyüme, farklılaşma ve apoptozisinde önemi gösterilmiştir (Su ve ark., 2019). miRNA gen transkripsiyonunu stimüle ederek p53 seviyelerini etkileyebilmektedir. miRNA'ların ifadesi ve sentezinin kontrolü ile kanserde tedavi edici ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Badr ve ark., 2018). Kolon kanseri hastaların neredeyse %50'si p53 mutasyonuna sahiptir. Bu durum p53 mutasyonlarının önemini vurgulamaktadır (Chan ve ark., 2020).

İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı HT-29, 1964 yılında 44 yaşında Kafkas bir kadından Fogh ve Trempe tarafından izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda insan kolon kanserinden çeşitli hücre hatları elde edilmiştir (Martínez-Maqueda ve ark., 2015). Kültüre edilmiş hücreler çoğalması için uyarıldığında c-myc onkogen eksprese edilir ancak fazla ekspresyonu sonucunda karsinogenezde rol oynar. HT-29 kolon kanseri hücre hattı da c-myc onkogenin uygun olmayan ekspresyonu nedeniyle oluşur (Forgue-Lafitte ve ark., 1989). HT-29 dahil olmak üzere kolon kanseri hücre dizilerinde yüksek düzeyde c-myc mRNA kanıtlanmıştır. Yetişkin bir erkek kolon kanseri hastasının kolonundan izole edilen HCT-116 hücre hattı ise ras proto-onkogeninin 13. kodonunda bir mutasyon sonucu ortaya çıkan kolon kanseri hücre hattıdır https://www.atcc.org/products/ccl-247, Erişim tarihi: 09 Haziran 2022).

4.2. Karbon Nanolifler

İnert bir element olarak karbon, dokuların temel bir bileşeni olduğu için malzeme üretiminde daha avantajlı olmaktadır. Canlı organizmaların dokularının büyük bir kısmı karbon bileşiklerinden oluştuğu için dokular tarafından tolere edilebilmektedir. Son 25 yılda, tıbbın birçok alanında çeşitli karbon malzemeler üzerinde çalışılmıştır (Kumar ve ark., 2018). Karbon nanomalzemeler (nanotüp, nanolif vs.), oldukça faydalı bir nanomalzeme sınıfı olup biyosensör üretimi, biyogörüntüleme, ilaç dağıtımı, elektronik malzemeleri ve spor ekipmanlarını geliştirme amaçlarıyla kullanılmaktadır. Biyomedikal uygulamalarda ise karbon nanomalzemelerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Ayrıca kanser tedavisi ve doku mühendisliği dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda benzersiz özelliklerinden dolayı oldukça dikkat çekmektedirler (Loh ve ark., 2018; Abdo ve ark., 2021).

Karbon fiber sıklıkla bir makara üzerine sarılmış, polietilen oksit (PEO) veya polivinil alkol (PVA) gibi bir organik kaplama veya boyut ile bir arada tutulan ve korunan binlerce sürekli bireysel karbon filamentinin bir demetidir (Resim 2). Her bir karbon filamenti, 5-10 mikrometre çapında bir silindirdir ve neredeyse tamamen karbondan oluşur. En eski nesilleri 16-22 mikrometre çapa sahipken, sonraki liflerin çapları yaklaşık 5 mikrometredir. Karbon fiberlerin öncüleri poliakrilonitril (PAN), suni ipek ve zifttir. Nano ölçekte çaplara sahip karbon fiberler (karbon nanolifler), geleneksel biyomalzemelerin işlevlerini önemli ölçüde iyileştirir ve yeni kompozit materyallerin geliştirilmesini mümkün hale getirir (Kumar ve ark., 2018).



Resim 2. Nanotüp ve nanolif yapısı (Ngo ve ark., 2007)

Karbon nanolifler, çapı 10-500 nm aralığında, uzunlukları 10 μm'ye ulaşan ve çaplarına kıyasla uzunlukları oldukça fazla olan ipliksi yapılardır (Wang ve ark., 2019). Lif çapının nanometre boyutunda olması, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini geliştirirken, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ise kullanım alanlarını genişletmektedir(Sunar ve Hasçiçek, 2017). Karbon nanolifler, özellikle bazal grafit düzlemlere ve kenar düzlemlerine sahiptir. Yüzey modifikasyonları ve fonksiyonelleştirme açısından yüksek potansiyele sahip olmalarıyla biyomedikal, doku mühendisliği, nanocihazlar, sensörler, enerji ve çevre bilimi alanları ile nanomalzeme üretiminde önem kazanmaktadırlar (Wang ve ark., 2019). Ek olarak, karbon nanolifler çeşitli uygulamalarda düşük maliyeti ve ekonomik uygulanabilirliği, diğer nanomalzemelere kıyasla geniş spesifik yüzeye ve kolayca ölçeklendirilebilen kullanıma sahip olması, bu malzemeleri biyomedikal uygulamalar için umut verici bir alternatif haline getirir (Abdo ve ark., 2021). Karbon nanolifler ayrıca rejeneratif tıp ve kanser tedavisinde yeni uygulamalar için olanaklar sunmaktadır (Kumar ve ark., 2018).

4.2.1. Karbon nanolifler ve biyomedikal uygulamalar

Nano boyuttaki partiküler moleküller genellikle 1-100 nm boyutundadır. Hastalık bölgesine hedeflendirilmiş tedavide kulanılacak dozun azalmasını sağlaması ve vücuttaki herhangi bir sitotoksisiteyi neredeyse ortadan kaldırması nano boyuttaki partiküler yapıları geleneksel terapötiklerden daha avantajlı hale getirmektedir (Singer

ve ark., 2019). Ancak, esnek, biyouyumlu ve elektriksel olarak iletken olmaları nedeniyle, elektroaktif nörotransmitterleri belirleyen biyosensörlerde kullanılması (Loh ve ark., 2018), nöroloji alanındaki nöral doku rejenerasyon uygulamalarında nörokimyasal ve nöroelektrik aktivitenin izlenmesinde etkili olabileceğini ortaya çıkarmaktadır (Abdo ve ark., 2021).

Karbon nanoliflerin, sitotoksik bir etkisi görülmemekle birlikte hücre adezyonu ve proliferasyonunu geliştirmesi, mikrofibrillerin oluşumu nedeniyle kanın hızlı pıhtılaşması ve antibakteriyel özellikte olması pansuman malzemesi olarak kullanılmasını mümkün hale getirmektedir. Ayrıca, nanoliflerin üretim maliyetindeki azalma biyotıp ve biyomühendislik alanında nanoliflerin geleceğine dikkat çekmektedir (Yadav ve ark., 2020).

Kemik onarımı için karbon nanoliflerin kompozitlerinin, ketonik, karboksilik ve hidroksil grupları sağlamak için sürfaktanlar, asitler ve oksidanlarla yüzeylerinin işlevselliği geliştirilir. Potansiyel nanolifli yapı iskelelerine PCL (polikaprolakton)/ mineralize HAP (hidroksiapatit) dahil edilmesiyle tasarlanan kompozitler hem elastik modülü hem de yapışma özelliklerini gözle görülür şekilde iyileştirdiği ve önemli bir inflamatuar yanıt olmadan yumuşak fibröz doku büyümesini ortaya çıkardığı gösterilmiştir (Abdo ve ark., 2021). Ek olarak, karbon nanoliflerin kemik dokunun rejenerasyonunda umut verici uygulamalarını konu edinen birçok çalışma bulunmaktadır.

Yüksek en/boy oranları, esnek yüzey kimyası, yapısal ve morfolojik kontrol sağlamaları ve hedeflendirilebilme özellikleri ile biyoaktif bir dağıtım potansiyeli sergilerler (Shrivastava ve ark., 2021).

4.2.1.1.Karbon nanoliflerin kanserde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımı

Kanser hastalarına oral yoldan ilaç uygulaması, yaygın ve uyumun yüksek olduğu yol olmasına rağmen kolon kanserinde oral yolla uygulanan ilaçlarda bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Gastrointestinal sistemdeki enzimler, pH değişimleri ve mikroorganizmalar ilaçların yapısında ya da etkinliğinde değişimine neden olabilmektedir. Bu yüzden geliştirilen ilaçların özellikleri değişimlere dirençli olabilmelidir (Turanlı ve Acartürk, 2018). Kolona verilmesi hedeflenen nano-ilaç

formulasyonları bu durumda avantajlı olabilmektedir. Çünkü nanopartiküler, ilaçların etkinliğini geliştirme, hedeflenen dokuda birikme ve sistemik toksititeyi azaltan, tümör dokularına özgü olan geçirgenlik ve retansiyon (GRE) etkiyi arttıran, lokal tedaviye olanak sağlamaktadır (Ramalho ve ark., 2017; Naeem ve ark., 2020). Bununla birlikte, tümörün etrafındaki dokular, bozulmuş bir lenfatik drenaja sahip olduğundan, sızıntılı bir damar sistemi ile birlikte asidik bir mikro ortam sunar. Tüm bu değişiklikler, tümör tedavisinde uygun bir ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Bhaskaran ve Kumar, 2021). Nanopartiküller, tümor dokularındaki kan damarlarının geçirgenliğinin artmasından yararlanırken, tümör dokusundaki yüklü nanoparçacıkların konsantrasyonunu arttıran lenfatik drenaj azalmaktadır. GRE etkisi normal dokularda bulunmadığından böylelikle hedefe yönelik tedavi sağlanabilmektedir (Ramalho ve ark., 2017).

Yüksek yüzey alanı/hacim oranı, stabilite, biyouyumluluk, çeşitli kompozisyon ve biyobozunurluk gibi birçok fizikokimyasal özelliğe (Steichen ve ark., 2013); yüksek enkapsülasyon etkinliği, tekrarlanabilir etkin madde salımı, uygulama kolaylığı, düşük maliyet gibi cazip özelliklere sahip olan nanolifler, kanser tedavisinde lokal tedaviyi sağlayabilmektedir (Sunar ve Hasçiçek, 2017). Ayrıca, memeli hücre zarını endositoz veya başka bir mekanizma ile geçebilen nanolifler, çözünürlüğü düşük ilaçların da çözünürlüğünü artırırken, erişilemeyen hücrelere terapötik ilaçları daha güvenli ve verimli bir şekilde taşıyabilmektedir (Eatemadi ve ark., 2014; Turanlı ve Acartürk, 2018).

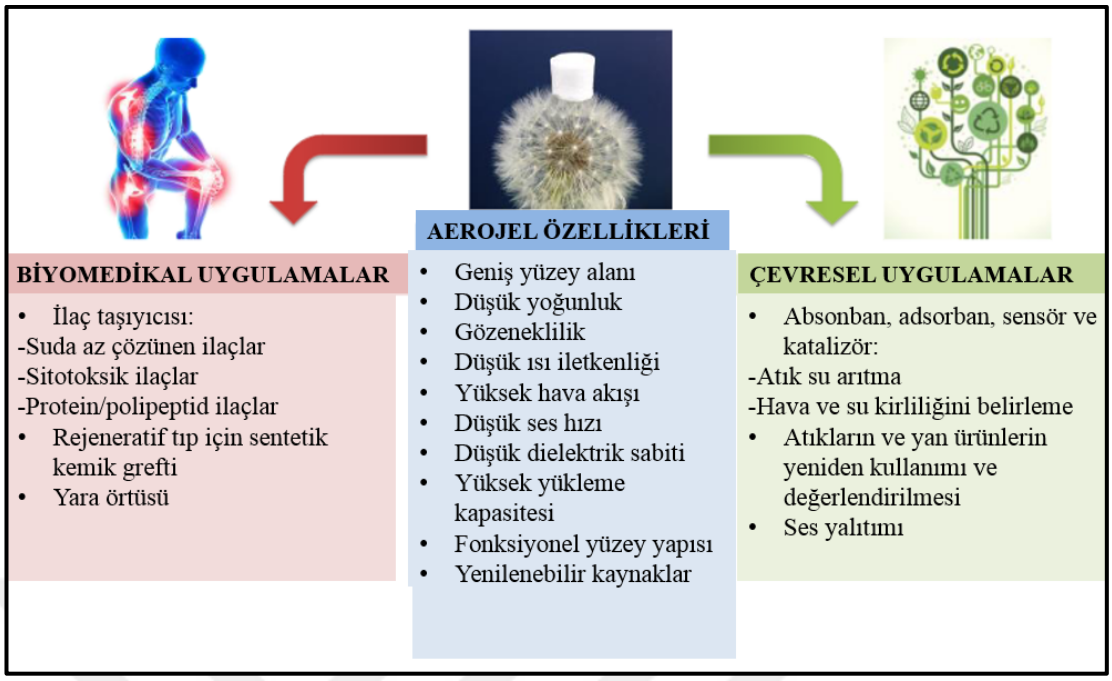
Kemoterapötik ilaçlardan sisplatin ve karboplatin karbon nanolif taşıyıcılara yükleyerek mesane, prostat ve sisplatine dirençli prostat kanseri hücreleri üzerine etkisini araştıran Ringel ve ark., bu taşıma sistemiyle ilaçların etkisinin 1,2-2,8 kat arttığını göstermiştir (Ringel ve ark., 2014). Bununla birlikte, karbon nanoliflere yüklenmiş doksorubisinin araştırıldığı bir çalışmada, ilacın hücresel alımında önemli ölçüde artış olduğu ve en küçük hacme sahip tümör hücrelerini de güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir. Karbon nanoliflerin tedavi etkinliğinin çok daha yüksek olması, gelecekteki kanser tedavisi için çok işlevli anti-kanser ajanları olarak umut verici bir uygulama olabileceğini doğrulamıştır (Dai ve ark., 2020).

4.3. Aerojeller

İlk kez süperkritik CO_2 kurutma yoluyla sıvıyı silika jelden çıkaran Kistler, 3D yapısını koruyan gözenekli ağ yapısını 1931 yılında tanımlamıştır (Kistler,1931). Daha sonra jelatin, selüloz, yumurta albümini ve agardan hazırlamıştır. İlerleyen yıllarda teknolojik kısıtlamalar, aerojel araştırma ve gelişmelerini sınırlandırmıştır. Ancak bu dönemlerde ısı iletkenlik ve yalıtım özelliklerinden yararlanılarak yapı endüstrisinde kullanılmıştır (Budtova ve ark., 2020).

Önemli bir yapısal değişiklik olmaksızın gözenek sıvısının çıkarılmasını izleyen bir jelden elde edilen aerojeller, gevşek şekilde paketlenmiş, bağlanmış parçacıklar veya nano ölçekli liflerden oluşan katı, hafif ve uyumlu açık gözenekli ağlar olarak tanımlanır. Küçük boyutlarda geniş yüzey alanına sahip olması, düşük kütle yoğunluğu, gözenekli ve fonksiyonel yüzey yapısı sayesinde birçok alanda kullanılan ticari bir malzeme halini almıştır (Resim 3) (García-González ve ark., 2019).

Aerojellerin gelişimi 21.yüzyılda poliamin, poliüretan ve polimidin içeren sentetik polimere dayalıdır. Aynı zamanda polisakkarit ve proteine dayalı bio-aerojel olarak adlandırılan aerojeller üzerine çalışılmaktadır. Günümüzde polimer endüstrisinin çevreye verdiği zararı azaltmak ve sürdürülebilir kaynak kullanımını arttırmak amacıyla aerojellere olan ilgi artmıştır. Ek olarak, bio-kaynaklı polimerler biyouyumluluklarının yanı sıra biyolojik olarak bozunabilirler, ayrıca antiinflamuar ve antibakteriyel özellik göstermektedirler (Budtova ve ark., 2020). Birçok araştırmacı, organik, silika, karbon, metalik, hibrit gibi çeşitli aerojeller sentezlemişlerdir. Ancak bu çalışmalarda aerojeller, uygulama alanına uygun malzemeler (karbon, gümüş, altın, titanyum, kobalt, çinko, selüloz vb.) seçilerek üretilmiştir (Tayyab Noman ve ark., 2021).



Resim 3. Aerojellerin kullanım alanları (García-González ve ark., 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır)

Aerojeller ile doku mühendisliği, tıbbi cihaz, kan emilimi, kemik grefti, ilaç ve protein taşınımı ve biyosensör gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda çalışılmaktadır (Tayyab Noman ve ark., 2021). Taşıyıcı sistem olarak kullanılan aerojeller, besin ekstratlarının biyoyarlanımını arttırmakla birlikte raf ömrünü uzatmaktadır. Bununla birlikte suda çözünmezliğinin yanı sıra içerisindeki bileşenin ağız ve midede salınmasını ertelemekte ve bağırsakta serbest bırakmaktadır (Manzocco ve ark., 2021). İlaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılmasında da bu eşsiz özellikleri etkili olmaktadır. Genel bir kural olarak, ilaç-aerojel matriksi afinitesinde artış ve ilaç moleküller arası etkileşimlerinde azalma, amorf ilacın gözenek duvarlarında birikmesini kolaylaştırmaktadır. Daha ileri çalışmalar yapılması gerekmekle birlikte, aerojel yoğunluğunun ilaç adsorpsiyonunda önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (García-González ve ark., 2021). Yüksek biyouyumluluğa sahip aerojellerin içerisine birçok ilacın veya bileşenin eklenmesiyle yapılan hedeflendirmede, çok düşük dozlarda etkili sonuç alınabilmektedir.

4.4. D Vitamini

D vitamini (VD), bazı besinlerde doğal olarak bulunan yağda çözünen bir vitamindir. Ayrıca güneş ışığından gelen ultraviyole (UVB) ışınlara maruz kalan ciltte D vitamini endojen olarak üretilir (https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/#h2, Erişim tarihi: 20 Ağustos 2021). Prohormon olarak da ifade edilen VD, kalsiyum-fosfor homeostazının regülasyonu ve kemik metabolizmasında rol oynamaktadır. VD eksikliği, kemik yoğunluğunun azalması, kemik kırıklarının artmasıyla ilişkilidir. Büyüme çağındaki çocuklarda VD eksikliklerinde raşitizm ve rikets gözlenirken, yetişkinlerde osteomalaziye yol açmaktadır (El-Sharkawy ve Malki, 2020). Kemik sağlığı için önerilen günlük alım (RDA), yetişkin erkek ve kadınlarda (≤ 70 yaş) için 600 IU (15 µg) /gün iken ≥70 yaş için 800 IU (20 µg)/ gün' dür (Bostick, 2015).

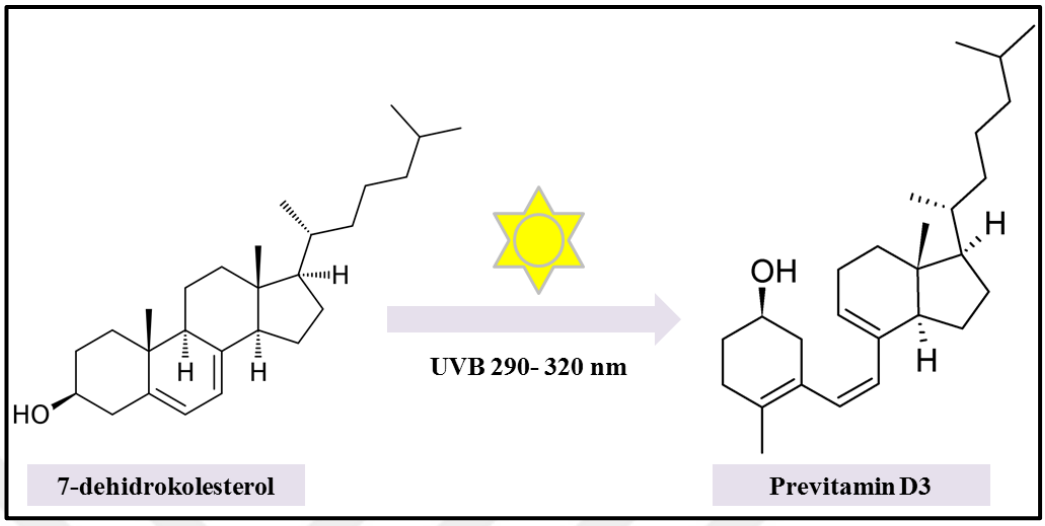
Klinik olarak, serum 25(OH) D_3 (kalsidiol) seviyeleri insan vücudundaki VD seviyesinin biyobelirteci olarak kullanılır (Zhang ve ark., 2021). Serum VD düzeyleri <30 nmol/L (12 ng/ml) bulunan bireylerde bazı hastalıklara (raşitizm, osteomalazi vb.) yol açabilecek bir eksiklik olduğu belirtilirken, 30-50 nmol/L (12-20 ng/ml) seviyeleri de yetersiz olarak kabul edilmektedir. Genel sağlık durumunun korunması ve devamlılığı için D vitamininin >50 nmol/L (20 ng/ml) serum düzeyleri yeterli bir seviye olarak kabul edilmektedir (https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/#h2, Erişim tarihi:20 Ağustos 2021). Kanser riskini azaltmada ise optimal VD seviyesinin 30-40 ng/ml aralığı olduğu sonucuna varılmıştır (Minisola ve ark., 2019).

VD eksikliği, otoimmün hastalıklar, diyabet, osteoartrit, peridontal hastalıklar ve daha birçok hastalığın yanı sıra en az 17 kanser çeşidinin patofizyolojisinde de önemli bir faktör olabilmektedir (Sun, 2011).

4.4.1. D vitamini sentez ve metabolizması

VD'nin, D2 (ergokalsiferol) ve D3 (kolekalsiferol) olmak üzere iki ana formu bulunmaktadır. Ergokalsiferol, ergosterolden UVB ışınları ile mantar, bitki ve mayalar tarafından sentezlenir. Kolekalsiferol (previtamin D3), UVB ışınlarının

(290-320 nm) etkisiyle epidermiste 7-dehidrokolesterolden (7-DHC) sentezlenen hayvansal kaynaklı formudur (Resim 4) (Jeon ve Shin, 2018).

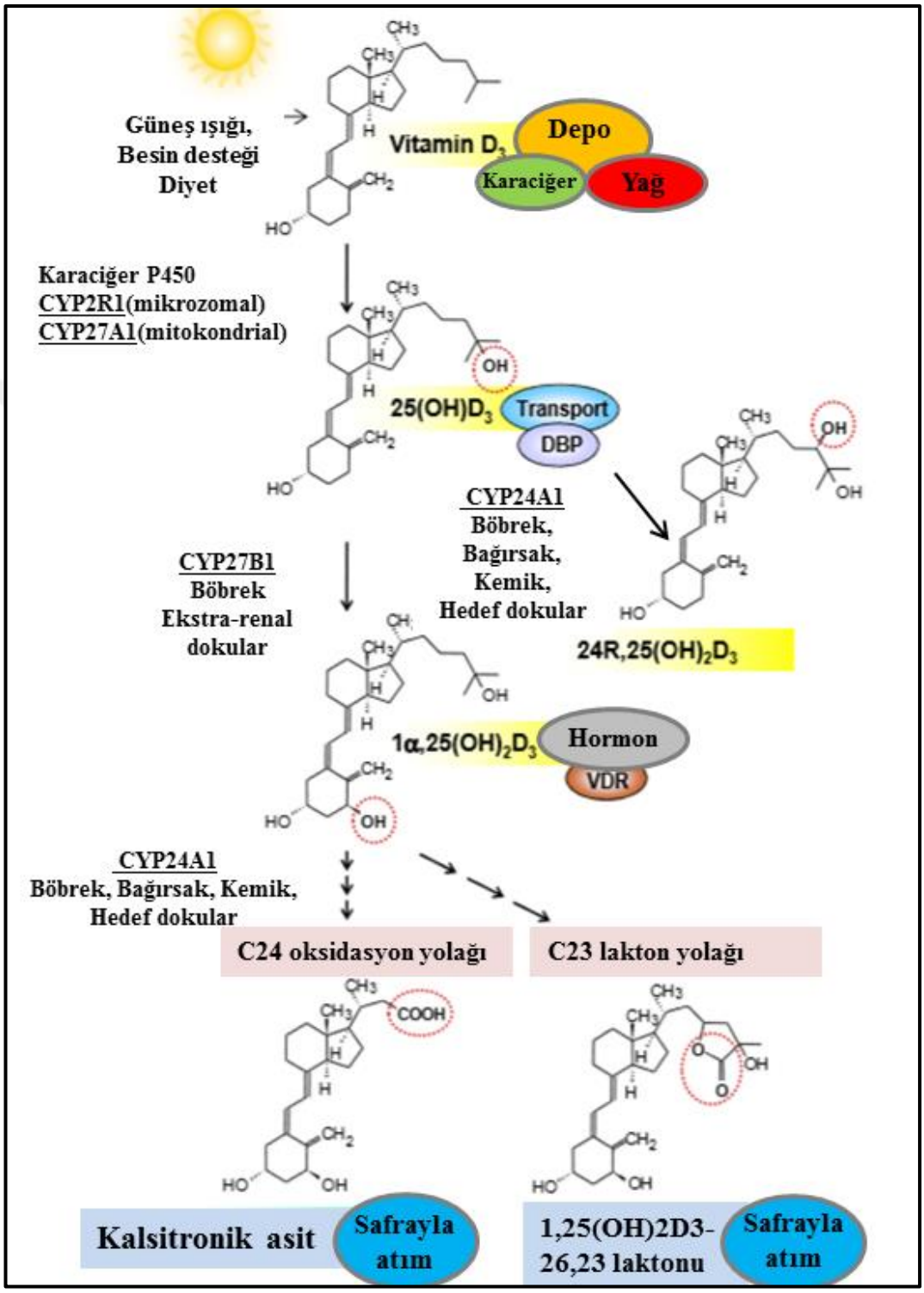


Resim 4. VD'nin derideki sentezi (Saponaro ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır)

Kolekalsiferolün derideki sentezi enzimatik bir süreç değildir. UVB ışınların 7-dehidrokolesterolün B halkasını kırmasıyla oluşan, ısıya duyarlı katalitik olmayan bir işlemdir. Deri pigmentasyon seviyesi ve derinin maruz kaldığı UVB ışınlarının yoğunluğu VD oluşma oranını etkilemektedir. Melanin, UVB ışınlarının 7-DHC'e ulaşmasını engellerken, giyim tarzı ve güneş koruyucu kullanma durumu da VD sentezini sınırlandırmaktadır. UVB ışınlarının yoğunluğu ise enlem ve mevsime göre çeşitlilik göstermektedir. VD, diyette yağlı balıklar, yumurta ve zenginleştirilmiş süt ürünleri ve diğer bazı besinlerden alınır (Bikle, 2014). Besinlerden elde edilen VD'nin sınırlılıkları dolayısıyla derideki sentez VD ihtiyacını karşılamada önemlidir.

Epidermiste sentezlenen previtamin D_3 ve diyetten alınan D_3 vitamini karaciğere taşınır. Karaciğerde 25-hidroksilaz (CYP2R1, CYP27A1) enzimiyle 25-hidroksikolekalsiferole (kalsidiol) dönüştürülür (Jeon ve Shin, 2018; El-Sharkawy ve Malki, 2020) ve %85'i yüksek afiniteyle VD bağlayıcı proteinler (DBP) yardımıyla taşınırken, %15'i düşük afinite ile ilişkili albümin ile (Saponaro ve ark., 2020) böbreklere gönderilir. Kalsidiol, en sık kullanılan diyetsel VD düzeylerinin göstergesidir ve yarılanma ömrü uzundur (Meeker ve ark., 2016). Böbreklerdeki 1α-hidroksilaz enzimi (CYP27B1), aktif formu olan 1α,25-hidroksikolekalsiferol (kalsitriol) formunu oluşturur (Resim 5) (Jeon ve Shin, 2018; El-Sharkawy ve Malki,

2020). Kalsitriol, yarılanma ömrü kısa olduğu için (4-20 saat) VD düzeylerini değerlendirmede sık kullanılmaz ancak bazı durumlarda serumda ek olarak



Resim 5. VD'nin vücuttaki sentez ve metabolizması (Jones ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır)

ölçülebilir. VD'nin aktif formu olan kalsitriol, paratroid hormonu, fibroblast benzeri büyüme faktörü-23 aktivasyonunun yanı sıra kalsiyum- fosfor düzeylerini regüle eder (Meeker ve ark., 2016).

VD'nin metabolizmasındaki 25-hidroksilasyon, 1α-hidroksilasyon ve 24-hidroksilasyon olmak üzere üç ana adımı, sitokrom P450 karışık fonksiyonlu oksidazlar (CYP'ler) tarafından gerçekleştirilir (CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1 ve CYP24A1 gibi) (Bikle, 2014). Kalsitriol, biyolojik olarak aktif form olarak CYP27B1 enzimini inhibe etmekte ve CYP24A1 enzimini indüklemektedir (Dou ve ark., 2016).

Aktif hormon 1α,25-hidroksikolekalsiferol (kalsitriol) böbrek, bağırsak, kemik ve diğer hedef dokulardaki VD reseptörlerine (VDR) bağlanarak hücre içerisine girer. Ligand bağlı VDR, retinoid X reseptörleriyle heterodimerleşir ve 24-hidroksilaz (CYP24A1)'in regülasyonu da dahil olmak üzere yaklaşık olarak 200-800 genin ekspresyonunu modüle eder. 24-hidroksilaz aktivitesinin ekspresyonu 25(OH) D_3-'den 24,25$(OH)_2D_3$ üretir ve bu kemik kırığı iyileşmesinde rol oynar. Ancak CYP24A1'in bir dizi hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonlarıyla 1α,25$(OH)_2D_3$'ü inaktive eder. Bu reaksiyonlar, kalsitronik asit ya da zayıf bir VDR antagonisti olan 1,25$(OH)_2D_3$-26,23 laktonu oluşturur (Jones ve ark., 2018). İnaktif kalsitronik asit ve 26,23-lakton safra veya üre ile atılır (Resim 5) (Saponaro ve ark., 2020). CYP24A1, kalsitriol üretiminde gerekli enzim olmanın yanı sıra kalsitriol için katabolik bir enzim olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde eksprese edilen CYP24A1'in daha malign ve metastatik tümörlerde ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Ayrıca kolorektal kanserde, artan CYP24A1 gen kopya sayısı gösterilirken, CYP24A1 promotör metilasyonunda hiçbir farklılık görülmemiştir (Christakos ve ark., 2016).

Kalsitriol, p450 sitokrom enzimi CYP27B1 enzimi ile hidroksilasyonu sonucu böbreklerde sentezlenir. CYP27B1 enzimi parakrin şekilde etki ettiği birçok kanser hücresi dahil olmak üzere (Feldman ve ark., 2014), epitel hücrelerinde (deri, akciğer, meme, bağırsak ve prostat), endokrin bezlerde (paratroid bezi, testis, yumurtalık, plasenta), immün sistem (makrofajlar, T ve B lenfosit) ve dendritik hücreler (osteoblast, kondrosit) gibi ekstra renal dokularda da bulunmaktadır (Bikle, 2014). Kalsitriol, proliferasyon, apoptozis, hücre farklılaşması, inflamasyon, invazyon, metastaz, anjiogenezisi içeren birçok metabolik yolağı ve miRNA ekspresyonunu

regüle etmektedir. Bu nedenle kanser gelişme ve büyümesini etkileme potansiyeline sahip olabileceği ve kanser kök hücrelerini etkileyebileceği gösterilmiştir (Feldman ve ark., 2014).

En aktif formu $1\alpha,25(OH)_2D_3$ (kalsitriol), nukleusda bulunan VDR reseptörleri aracılığıyla aktivite gösterir (Zhang ve ark., 2021). VDR sinyal aktivasyonu, kalsiyum metabolizması, apoptozis, immunite ve otofajiyi kapsayan birçok süreçte etkilidir (Sun, 2011). VD/VDR, immun sistem, bağırsak mikrobiyomunun şekillenmesinde ve bariyer fonksiyonunda önemli bir rol üstlenmektedir. VD/VDR arasındaki temel ilişki bağırsak mikrobiyotasının yanı sıra kronik inflamasyon ve inflamatuar bağırsak hastalıklarının gelişiminde etkili olmakla birlikte özellikle kolon kanserinde intestinal VDR düşüklüğü gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2021). Ayrıca VDR, birçok malign dokuda eksprese edilmiştir. Aktif VDR, hedef genlerin promoter bölgesinde bulunan VD yanıt elemanlarına bağlanır ve bu genlerin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Sun, 2011).

4.4.2. VD'nin kanserdeki rolü

Epidemiyolojik çalışmalarda, güneşten gelen UVB'ye daha fazla maruz kalan bölgelerde çeşitli kanserlerde daha düşük insidans ve ölüm oranları kaydedilmiştir (Krishnan ve ark., 2012). VD'nin kansere karşı koruyucu etkisine dair 40 yıl önce yapılan epidemiyolojik çalışmada ise, güneş ışığına maruz kalma oranının artması sonucu kolorektal kansere karşı koruyucu olabileceği öne sürülmüştür. Aynı zamanda in vitro deneylerde, kalsitriolün melanom hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu bulunmuş ve VD serum düzeylerinin düşük olması yüksek kanser insidansıyla ilişkilendirilmiştir (Carlberg ve Muñoz, 2022). Ek olarak, kanser hastalarında osteoporoz prevalansı, genel toplum içinde yaşayan nüfusa kıyasla daha yüksektir. Ayrıca, günlük VD takviyesi, genel popülasyonda kanser nedenli ölüm riskinde azalma ile ilişkilendirilmiştir (Wesselink ve ark., 2020).

Kalsitriol, hücre döngüsü durmasını ve hücre döngüsünün G0/G1 fazında hücre birikmesini indükleyerek birçok habis hücrenin çoğalmasını engeller (Krishnan ve ark., 2012). Bu nedenle, hücre sistemlerinin, p21 ve p27 dahil olmak üzere hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden genlerde VDR kontrolünün tanımlanması tesadüf

değildir (Campbell ve Trump, 2017). Kolon epitelyal VDR, yukarı regüle edilmiş p53 apoptoz modülatörünü ve epitelde apoptozu inhibe ederek, kolonun mukozal bariyerini koruyan ve inflasyonu azaltan önemli bir proapoptotik düzenleyicidir (Javed ve ark., 2020). Ek olarak, kalsitriol, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü II tarafından tetiklenen proliferatif sinyal yolaklarına müdahale eder (Barbáchano ve ark., 2017). TGF-β, epitelyal hücre proliferasyonunun güçlü bir inhibitörüdür ve birçok hücre sisteminde EMT'lerin ana indükleyicisidir. Kalsitriol, normal epitel hücrelerinde TGF-β tarafından EMT'nin indüklenmesini engeller, bu da E-kadherinin aşağı regülasyonunu önler. Bu etkinin ana mekanizması, sırayla büyük ölçüde Wnt/β-katenin, TGF-β ve EGF sinyal yollarının antagonizmasına dayanan epitelyal-mezenkimal geçişin inhibisyonudur (Fernández-Barral ve ark., 2020).

Birçok neoplastik hücrede kalsitriol, daha olgun ve daha az malign hücrelerin oluşumuyla sonuçlanan farklılaşmayı da indükler. Kalsitriolün kanser hücrelerinin farklılaşma mekanizmaları üzerine etkisi hücre tipine ve hücre içeriğine göre değişmektedir (Krishnan ve ark., 2012). Kalsitriol, kolon kanseri hücrelerinde birkaç mekanizmayla proliferasyonu engellenmesi ve farklılaşmanın düzenlenmesini sağlayan iki ana etkiye sahiptir. Bu mekanizmalar 1) transkripsiyonel olarak aktif TCF7L2/ β-katenin komplekslerinin oluşumunu engelleyen hücre çekirdeği içindeki β-katenin'e VDR bağlanmasının indüklenmesi, 2) plazma zarında yeni sentezlenen β-katenin proteininin çektiği CDH1 proteininin (cadherin 1, ayrıca E-cadherin olarak da adlandırılır) yukarı regülasyonu ile nükleer β-katenin içeriğinin azaltılması ve 3) DKK1 geninin uyarılması (Dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü1) içerir (Carlberg ve Muñoz, 2022). VDR, hücre çekirdeği içindeki β-katenin ile fiziksel olarak etkileşime girer ve bu nedenle β-katenin ve TCF arasındaki bağlanma ile rekabet eder ve buna müdahale eder. Bu, β-katenin/TCF hedef genlerinin ekspresyonunu engelleyen transkripsiyonel olarak aktif β-katenin/TCF komplekslerinin sayısında bir azalma ile sonuçlanır (Barbáchano ve ark., 2017).

Kalsitriol, tüm kanser hücrelerinde aynı etkiyi sağlamamasına rağmen çeşitli kanser hücrelerinde apoptozisi indüklemektedir (Krishnan ve ark., 2012). Kalsitriol, proapoptotik genlerin yukarı regülasyonu, hayatta kalma genlerinin (survivin ve

timidilat sentaz) aşağı regülasyonu ve parakrin bir şekilde, makrofajlar tarafından IL-1β sekresyonu ile etkileşim yoluyla çeşitli ajanlar tarafından apoptoz indüklenmesine karşı kolon karsinomu hücrelerini duyarlı hale getirir(Barbáchano ve ark., 2017). Ek olarak, kalsitriol, kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilen bir p53 homologu olan p73'ün ekspresyonunu arttırmakta (Krishnan ve ark., 2012), sinyalizasyonu ve antiproliferatif olayları aktive ederken apoptoza karşı hücreleri duyarlı hale getirmektedir (Campbell ve Trump, 2017).

E-kadherin ekspresyonunun azalması, çeşitli kanser türlerinin ilerlemesi sırasında sık görülür ve tümör hücreleri tarafından metastatik özelliklerin kazanılmasıyla ilişkilidir. Bu nedenle, E-kadherin invazyon baskılayıcı olarak kabul edilir. Kalsitriolün protein sentezi, de novo gerektiren bir transkripsiyonel mekanizma ile kolorektal kanser hücrelerinde E-kadherini arttırdığı gösterilmiştir (Barbáchano ve ark., 2017). Kolon kanseri tümörlerinde VDR ve E-kadherin RNA seviyeleri arasında doğrudan bir ilişki bulunmuştur (Barbáchano ve ark., 2017). HT-29 kolon kanseri hücre serisinde tümör metastazı ile ilişkili süreçleri inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca, E-kadherin ekspresyonunu arttırdığı ve N-kadherin ekspresyonunu inhibe ederek, tümör invazivliğinde önemli bir rol oynayan "kadherin geçişinin" durdurulmasındaki etkisi gösterilmiştir (Kallay ve Buburuzan, 2017).

HT-29 kolon kanseri hücre hattına 25(OH) D_3 ve 1,25$(OH)_2D_3$ uygulaması, doza ve zamana bağlı bir şekilde proliferasyonunu inhibe etmiştir (Kallay ve Buburuzan, 2017). D vitamini nanoemülsiyonunun ise doza ve zamana bağlı bir yaklaşımla HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde sitotoksisiteyi indüklediğini bulunmuştur (Razak ve ark., 2019).

Araştırmalarda, kalsitriolün inflamatuar ve immün yanıtlarda etkili olmasının yanı sıra, hücresel proliferasyonda yer alan genlerin ekspresyonunu düzenleyen inflamasyondan karsinojeneze giden süreçte önemli olduğu düşünülen transkripsiyon faktörü NFκB'nin aktivasyonunu ve sinyalleşmesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Krishnan ve ark., 2012). Ek olarak, Wnt/β-katenin yolu, karsinom hücrelerinde kalsitriol tarafından interlökin (IL)-1β sentezinin inhibisyonu ve komşu makrofajlar tarafından salgılanması yoluyla parakrin bir şekilde inhibe edilir (Barbáchano ve ark., 2017)

VD kanserlerde inflamatuar ortamı nasıl etkilediğine ilişkin çeşitli mekanizmalar araştırılmıştır; bunlar arasında nükleer faktör (NF)-κB ve siklooksijenaz yolakları gibi kolorektal kanserin ilerlemesinde yer alan çeşitli inflamatuar yolaklar ve birçok sitokinin (TNF-α, interlökin -1β, IL-6, IL-8, IL-17 ve TGF-β1) D vitamininden etkilendiğini gösterilmiştir (Javed ve ark., 2020). Ayrıca IL-6, pro-tümörijenik kapasiteye sahip bir proinflamatuar sitokin olarak, prostat ve kolorektal kanser ilerlemesinde önemli bir anahtar efektördür (Liu ve ark., 2018). Kolorektal kanser hastalarında bu sitokinlerin serum seviyeleri daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Javed ve ark., 2020). Günlük 800 IU vitamin D_3 alımı, farklı inflamasyon belirteçlerinin (örn., C-reaktif protein, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-1β, IL-10) serum düzeylerini azalttığı ve kolon kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kallay ve Buburuzan, 2017).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Cihazlar ve laboratuvar gereçleri

- CO_2 inkübatörü: SANYO MCO-19A1C (UV)
- Laminar akımlı kabin: ESCO Class II Biosafety Cabinet LP-4S1I 2009-43648
- Santrifüj: Hettich UNIVERSAL 320 ve 32R
- Işık mikroskobu: OLYMPUS CKX41
- Buzdolabı (+4 °C ve -20°C): UĞUR USD 372 DTK ve REGAL DD-143
- xCELLigence: Acea Biosciences 3X16
- Microplate reader: Epoch BioTek Instruments 254732
- Microplate reader: RAYTO RT-2100C
- Homojenizatör: IKA R104
- Ultrasonikatör: Bandelin UW 3100
- Manyetik karıştırıcı: ISOLAB Fuse T315 A1 250VAC
- Çalkalamalı su banyosu: GFL 2002- 108914151
- Distile su cihazı: GFL 2002-1008974151
- Buz makinesi: SPT IM-662C: 66 Ibs Automatic Stainless Steel Ice Maker
- Ultrasonik banyo: Wise Clean WUC-A03H
- Hassas terazi: Weightlab instruments WSA-224
- UV spektrofotometre: SHIMADZU UV- 1700
- Otoklav: BioTek NB1045
- Etüv: Heraeus Thermo Scientific 40918100
- Mikropipet: RAININ Pipet-Lite XLS 10 µl, 100 µl ve 1 ml
- Mikropipet: BIOHIT PROLİNE 20-200 µl
- Pipetör: CappAid

5.1.2. Kimyasallar

- D vitamini: $1,25(OH)_2D_3$, Zhejıang Garden Biochemical SDS202008032A
- Sodyum aljinat: Sıgma- Aldrıch W201502-1KG
- CNF: Sıgma- Aldrıch 719811-25G

5.2. Yöntem

5.2.1. CNF'lerin hazırlanması ve VD adsorpsiyonu

Karbon nanolifler (CNF), çözünebilen safsızlıklardan arıtmak amacıyla distile su ile manyetik karıştırıcı kullanılarak 24 saat yıkandıktan sonra etüvde kurutuldu.

CNF'lere, aktifleştirme işlemi yapılması için yıkanmış ve kurutulmuş 3 g CNF tartıldı. Üzerine 50 ml %85 H_3PO_4 (fosforik asit) ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Manyetik karıştırıcıdan alınan CNF-H_3PO_4 ağzı parafilmle kapatılarak 24 saat bekletildi ve süre sonunda 250°C'deki etüve alındı. Etüvde orta düzeyde ısıya maruz bırakılan CNF'ler etüvden alındıktan sonra üzerine 200 ml distile su (dH_2O) ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Manyetik karıştırıcıdan alınan CNF'ler, 50 ml'lik santrifüj tüplerine eşit bir şekilde dağıtıldı ve 30 dakika süresince 5000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifügasyon sonucunda süpernatant dökülerek pellete 50 ml distile su eklendi ve tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem süpernatantın pH'sı nötr pH değerine ulaşana kadar tekrarlandı. pH sabitlendikten sonra 85°C'deki etüvde kurutuldu. Bu örnekler aktif CNF (ACNF) olarak adlandırıldı.

Yapılan hücre kültürü deneylerinde CNF ve ACNF'lerin non- kanserojenik NIH/3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermesi nedeniyle glisin ile modifikasyon yapılmasına karar verildi. Hazırlanan ACNF ve CNF'lere glisin (GLC) bağlanması için 200 mg ve 100 mg GLC tartılıp toplam hacim 200 ml olacak şekilde distile su ilave edildi. VD ile muamele edilen numuneler 37°C'de çalkalamalı su banyosunda çalkalandı, yalnızca GLC modifikasyonu için 85°C'de etüv kullanıldı. Numuneler 24 saat sonunda bekletilen sıcaklıklarda kurumaya alındı.

Hazırlanmış olan CNF ve ACNF'ler ile CNF– GLC ve ACNF- GLC örneklerine VD yüklemesi için 200 mg ve 50 mg VD konsantrasyonları kullanıldı. 100

ml % 99,9 etanolde çözdürüldü ve toplam hacim 200 ml olacak şekilde, 100 ml distile suda hazırlanmış CNF/ACNF çözeltilerine eklendi. Hazırlanan cam deney şişeleri 37°C çalkalamalı su banyosunda 24 saat çalkalandı. Karıştırıcıdan alınan şişeler, 3 defa distile su ile yıkanıp filtreden geçirildi. Son olarak, filtre üzerindeki CNF-VD ve ACNF-VD örnekleri 37℃'deki etüvde 2,5 saat boyunca kurutuldu.

Aerojel üretimi için yukarıda hazırlanan ACNF (150 mg)- VD (50 mg) (ACNF- VD-2) örneklerinden 0,4 ve 2 mg/ml'lik dispersiyonlar hazırlandı. Bunun için 4 mg ACNF-VD-2 ve 20 mg ACNF-VD-2 tartılarak 10 ml distile suya eklendi. Hazırlanan ACNF-VD-2 dispersiyonları homojenizatör kullanılarak 30 dk boyunca disperse edildikten sonra 10 dakika sonikatöre maruz bırakıldı. Sodyum aljinat çözeltisi hazırlamak için 2 g sodyum aljinat tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. Bu çözeltiden 10'ar ml alınarak üzerine hazırlanmış olan ACNF-VD-2 dispersiyonu pipetle damla damla ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda 10 dk bekletildikten sonra 3 g $CaCI_2$ içeren 100 ml distile su çözeltisi üzerine damla damla eklendi. $CaCI_2$ içerisinde 24 saat bekletilen aerojeller, bu süre sonunda 3 defa distile su ile yıkandıktan sonra 24 saat boyunca havada kurumaya bırakıldı. Ertesi gün aerojeller 37°C'deki etüvde 12 saat kurutuldu.

5.2.2. VD yüklü CNF'lerin karakterizasyonu

CNF, modifiye edilmiş CNF ve üretilen aerojellerin yüzey alanlarını hesaplamak için metilen mavisi adsorpsiyonu yöntemi kullanıldı.

CNF, modifiye edilmiş CNF ve üretilen aerojellerin yüzey yapısı ve morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak incelendi. Hazırlanan numunelerin morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (Zeiss EVO MA 10) ile karakterize edildi. Örneklerin UV spektrumlarını kaydetmek için UV-Görünür spektrofotometre (Shimadzu 1700) kullanılarak VD adsorpsiyon çalışmaları yapıldı. Numunelerin FTIR spektrumlarını kaydetmek için Varian 800 FTIR (Fourier transform kızılötesi) spektrometresi kullanıldı. XRD analizi için Shimadzu XRD 6100 kullanıldı.

Seçilen ACNF örneklerinin VD adsorpsiyon kapasitesini hesaplamak için kesikli adsorpsiyon deneyleri yürütüldü. 500 mg/L VD başlangıç derişimi kullanılarak ACNF örnekleri üzerindeki VD adsorpsiyonu zamana ve farklı deney koşullarına bağlı olarak spektrofotometrik olarak izlendi. ACNF üzerindeki VD adsorpsiyonuna ortam sıcaklığının etkisini görmek amacıyla farklı sıcaklıklarda adsorpsiyon çalışmaları yürütüldü ve VD adsorpsiyonuna pH etkisi, farklı ortam pH'larında incelendi.

5.2.3. Hücre kültürü

CNF'lere yüklenmiş VD uygulamasının kolon kanseri hücre proliferasyonu üzerine etkisinin araştırılması için çalışmamızda HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücre hatları kullanıldı. HT-29 ve HCT-116 hücreleri, %5 CO_2 içeren ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyerinde kültüre edildi. Hücrelerin %80-90 konfluent hale gelmesinden sonra Tripsin-EDTA uygulaması ile kaldırılan hücreler, 25 cm^2'lik flasklara pasajlandı.

Çalışmamızda sağlıklı hücre olarak fare embriyonik fibroblast hücre dizisi olan NIH/3T3 hücreleri kullanıldı ve hücreler %5 CO_2 içeren ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM/F12 besi yerinde kültüre edildi.

5.2.3.1. Nanomalzemelerin antiproliferatif ve sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi

Hazırlanan nanomalzemelerin antiproliferatif ve sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi için 2 farklı yöntem kullanıldı: a) Kantitatif bir yöntem olan yöntem MTT yöntemi b) "Gerçek Zamanlı Hücre Ölçer" yöntemi.

MTT Yöntemi: MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid), hücre proliferasyonunu, hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi ölçmede kullanılan kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntem, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanmaktadır (Beekman ve ark., 1997). Tetrazolium tuzları (MTT, XTT, WST-1), genelde substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucu renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolium tuzudur ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz (SDH) enzimine

spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler bu ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Formazan tuzları, DMSO, izopropanol gibi organik solventlerde kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi spektrofotometrik olarak ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir.

MTT çözeltisinin hazırlanışı: Çalışmada kullanılacak yöntem için ticari olarak satın alınan "Vybrant Mtt Cell Proliferation Assay Kit" (Thermo Fischer, USA) kullanıldı. Paket içerisinde bulunan 5 mg MTT boyası, 1 mL steril fosfat tamponu (PBS) içinde çözüldükten sonra iyice vortekslenerek ve çözünmeyen kısımlar santrifüjlenerek üstteki sıvı steril bir ependorfa alındı. Işığa karşı hassas olan MTT çözeltisi kullanılıncaya kadar +4ºC'de karanlıkta saklandı.

96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması: NIH/3T3 hücre serisi, HT-29 ve HCT-116 kolon kanser hücre serileri öncelikle sayımı yapılarak kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları mikroskopta incelendi. Kuyucuklara ekilen hücreler, inkübatöre kaldırılarak 24 saat süresince inkübe edildi.

VD yüklü CNF'lerin eklenmesi: 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelere, çeşitli konsantrasyonlarda yüklü nanolifler eklenerek tekrar inkübatöre kaldırıldı.

Çalışmamızda aşağıdaki örnekler kullanıldı:

1. CNF (200 mg): PBS
2. CNF (200 mg) + Glisin (200 mg) (CNF- GLC)
3. CNF (200 mg) + VD (200 mg) (CNF-VD)
4. CNF (200 mg) + Glisin (200 mg) + VD (200 mg) (CNF-GLC-VD)
5. Aktif CNF (ACNF) (200 mg): %85 Fosforik asitle aktifleştirilen
6. ACNF (200 mg) + Glisin (200 mg) (ACNF- GLC)
7. ACNF (200 mg) + VD (200 mg) (ACNF- VD)

8. ACNF (200 mg) + Glisin (200 mg) + VD (200 mg) (ACNF- GLC- VD)
9. ACNF (150 mg)- VD (50 mg) (ACNF- VD-2)
10. Aerojel (sodyum aljinat) (200 mg) + ACNF (4 mg) (Aero0)
11. Aerojel (sodyum aljinat) (200 mg) + ACNF- VD-2 (4 mg) (Aero1)
12. Aerojel (sodyum aljinat) (200 mg) + ACNF- VD-2 (20 mg) (Aero2)
13. D vitamini 1 µM (VD1)
14. D vitamini 2 µM (VD2)

MTT deneyinin yapılışı: 48 saat sonunda inkübatörden çıkarılan kuyucuklardaki hücre besiyeri pipetle çekilip atıldı. Kuyucuklara 200 µl PBS eklenerek kuyucukların iyice temizlenmesi sağlandı. Daha sonra her bir kuyucuğa önce 100 µL hücre besiyeri eklendikten sonra 10µL MTT solüsyonu eklenerek 4 saat süre boyunca inkübatörde inkübe edildi. 4 saatlik sürenin sonunda kuyucuklara 100µl sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenerek MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 12 saat boyunca 37°C'de CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Kültür plağı mikroplaka okuyucusuna konularak absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda okutuldu. Hiçbir madde eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer % 100 kabul edildi. Sentez bileşikleri içeren kültürlerden elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edildi. Bu deneyler en az 3 tekrarlı olarak 3 farklı zamanda yapıldı.

Gerçek Zamanlı Hücre Ölçer Cihazı ile Antiproliferatif Etkinliğin Belirlenmesi: Bu sistemin temeli, hücreler üzerinde herhangi bir işaretleme yapmadan, sisteme özel tasarlanmış olan e-plakaların zemininde bulunan ve altın içeren mikro-elektrotlar sayesinde hücrelerden alınan elektriksel empedansın ölçümüne dayanmaktadır. Empedans ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumları hakkında kantitatif bilgi verir. Bu yöntem, "end-point" yöntemlerle elde edilmesi mümkün olmayan verilerin elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilecek hücre indeksi parametresinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu e-plaka kullanıldı. Öncelikle

e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklendikten sonra cihaza konularak "background" ölçümleri yapıldı. Daha sonra hücreler için 100 µl besiyerinde uygunluğu belirlenen sayıda hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapıldı. Bu işlemin ardında plakalar 30 dakika boyunca steril çalışma kabini içerisinde inkübe edildikten sonra xCELLigence DP (Roche) cihazındaki yerlerine yerleştirilerek 37°C ve %5 CO_2 ortam şartlarında inkübasyona bırakıldı. E-plakalara hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra xCELLigence DP cihazına her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verildi. Hücre ekiminden yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde e-plakalardaki besiyeri çeşitli konsantrasyonlardaki karbon nanolif konsantrasyonlarını içeren besiyeri ile değiştirilerek 120 saat süresince 15 dakika aralıklarla ölçüm alınmaya devam edildi. Konsantrasyona ve zamana bağımlı hücre indeksi değerlerine ait grafikler bilgisayar ekranına aktarılarak analizler gerçekleştirildi.

5.2.3.2.VD yüklü karbon nanoliflerin hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Kanser hücrelerinin migrasyonu üzerine VD yüklü karbon nanoliflerin etkisini belirlemek amacıyla yara açma deneyi yapıldı. Yapılan MTT analizleri sonucu normal hücreler üzerinde sitotoksik aktivite göstermeyen ACNF- VD-2 kompozitini içeren aerojel (Aero1) kullanılarak migrasyon deneyleri yapıldı.

Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi: Yara kapanma deneyi için hücreler 6 kuyucuklu plakalara (her kuyucukta $1x10^6$ hücre) ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından 24 saat %0 FBS'li medium ile tekrar inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri alınarak, düz bir çizgi halinde 100 µl steril pipet ucuyla birbirine paralel yaralar (çizgi) açıldı. 3 kez steril PBS ile yıkanıp kalkan hücreler ortamdan alındıktan sonra %1 FBS'li besiyeri içerisinde hazırlanan karbon nanolifler çeşitli konsantrasyonlarda eklendi. 0., 24. ve 72. saatlerde fotoğraflar çekildi ve yara kapanması kontrol edildi.

5.2.3.3.Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının araştırılması

Kolon kanseri hücrelerinde olası apoptotik mekanizmanın araştırılmasında biyokimyasal ve morfolojik yöntemler kullanıldı. Yapılan MTT analizleri sonucu normal hücreler üzerinde sitotoksik aktivite göstermeyen ACNF- VD-2 kompozitini içeren aerojel (Aero1) kullanılarak kaspaz enzim aktivasyon ölçüm deneyleri yapıldı.

Kaspaz enzim aktivasyonlarının ölçümü: Ticari olarak satın alınan kaspaz 3, 8 ve 9 kitleri ile aktivasyon ölçülüp hangi yolak veya yolakların etkili olduğu spektrofotometrik olarak belirlenmeye çalışıldı. Her 3 kaspaz proteini enzimatik olarak ölçüldü (Şenkardeş| ve ark., 2016)

Kaspaz-3 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz-3 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınacak olan kaspaz-3 deney kitinde (Millipore Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit) belirtilen yöntem ile ölçüldü. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi peptid substrat Acetyl Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilid'in (Ac-DEVD-pNA) kaspaz-3 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan p-nitroanilid (pNA) miktarının 405 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz 9 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınacak olan kaspaz-9 deney kitinde (Millipore Caspase-9 Colorimetric Activity Assay Kit) belirtilen yöntem ile ölçüldü. Peptid substrat Ac-LEHD-pNA kaspaz-9 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan pNA nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-9 aktivitesi hesaplandı.

Kaspaz -8 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz-8 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınacak olan kaspaz-8 deney kitinde (Millipore Caspase-8 Colorimetric Activity Assay Kit) belirtilen yöntem ile ölçüldü. Peptid substrat Ac-IETD-pNA kaspaz-8 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan pNA nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-8 aktivitesi hesaplandı.

Mitokondri Membran Potansiyelinin (MMP) Belirlenmesi: Apoptoz esnasında mitokondri membran potansiyeli kaybı, JC-1 mitokondri membran potansiyeli belirleme kiti (MitoPT™ JC-1 Assay Kit, ImmunoChemistry) kullanılarak belirlendi. Sağlıklı hücrelerde JC-1 boyası mitokondride agregatlar şeklinde toplanır

ve bu kırmızı floresan bir renk verir. Apoptotik hücrelerde ise mitokondri membran potansiyeli çökmüş olduğundan JC-1 boyası mitokondri içinde toplanamaz ve sitoplazmada monomerik formda kalarak yeşil floresan bir renk verir (Kulabaş ve ark., 2016).

Membran potansiyelinin belirlenmesi amacıyla hücreler $1x10^6$ hücre/ml olacak biçimde 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek karbon nanolifler eklenerek inkübasyona maruz bırakıldı. Hücreler daha sonra 800 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine 1 ml 1X JC-1 solüsyonu eklenerek süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 37°C' de, %5 CO_2 inkübatöründe 15 dakika inkübe edilerek sonrasında 800 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 2 ml assay buffer eklenerek tekrar santrifüjlendi. Bu işlem toplamda 2 kez tekrarlandı. Daha sonra hücreler uygun tamponda süspanse edilerek florospektrofotometre cihazında analiz edildi.

Akridin oranj ve etidyum bromür boyaları ile apoptozun saptanması: Akridin oranj ve etidyum bromür boyaları, canlı ve ölü hücreler ile nükleusta ve hücre membranındaki nekroz ve apoptoza bağlı değişiklikler hakkında bilgi vermektedirler. Akridin oranj, hem canlı hem ölü hücreleri boyarken, etidyum bromür sadece membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyar. Canlı hücreler morfolojik olarak üniform yeşil renkli boyanırlar. Apoptozun erken dönemindeki hücreler de yeşil-sarı renkte boyanmakta ancak nükleuslarında, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmantasyonu gösteren parlak yeşil-sarı renkli noktalanmalar içermektedirler. Geç apoptotik dönemdeki hücreler karakteristik parçalanmış nükleus görünümler ile turuncunun değişik tonları şeklinde gözlenir. Etidyum bromür nekrotik hücrelerin çekirdeklerinin kırmızı renkte görünmesine neden olur.

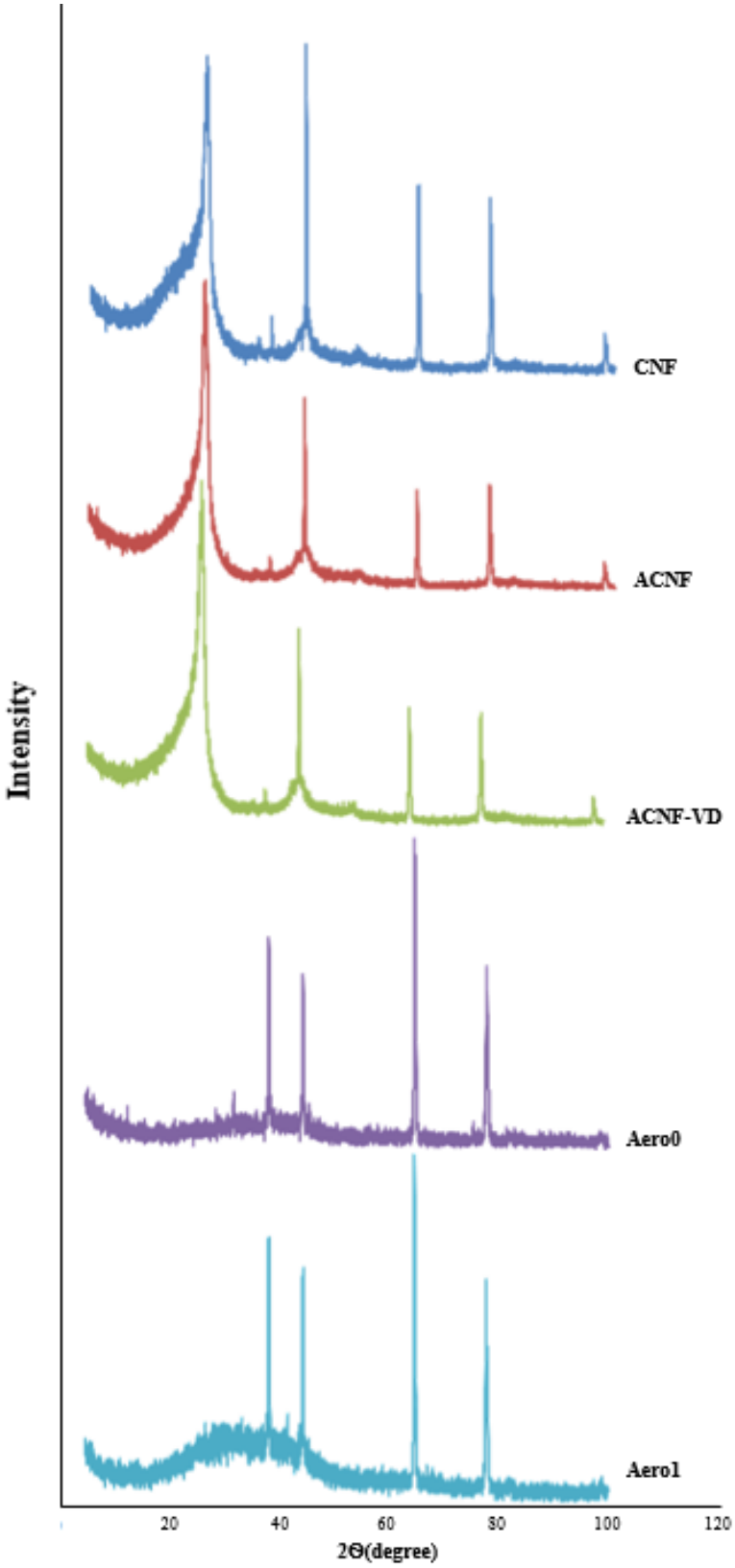
Deneyin yapılışı: 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler nanoliflerle inkübasyonun ardından bu işleme alındı. Kuyucuklarda bulunan hücre besiyeri çıkarıldıktan sonra, PBS ile hücreler iyice yıkandı ve ardından metanol ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyondan sonra hücreler akridin oranj (100 mg/ml) ve etidyum bromür (100 mg/ml) içeren boya solüsyonu ile 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Boyama işleminin ardından hücreler bir kez yıkandıktan sonra floresan mikroskop altında incelendi.

6. BULGULAR

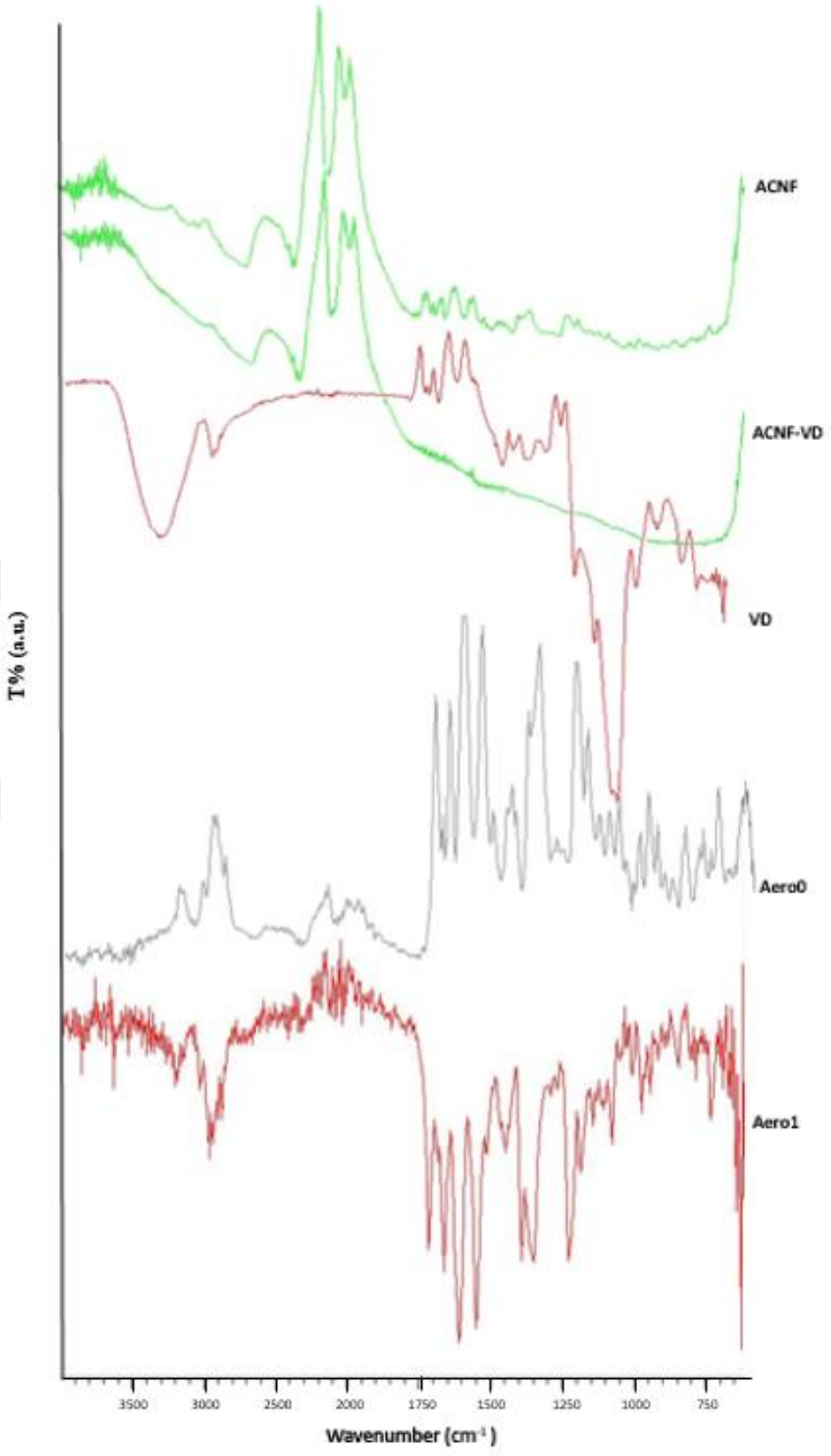
6.1. ACNF’nin Karakterizasyonu ve VD Adsorpsiyonunun İncelenmesi

Bu çalışmada VD taşıyıcı platform olarak aerojel yapıda ACNF-VD-2 kompozit ilaç taşıyıcı sistemi (Aero1) geliştirildi. HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi. Aerojel platformların yapısında kullanılan ACNF'nin yüzey alanı ve VD taşıma kapasitesi ise adsorpsiyon yöntemi kullanılarak test edildi. ACNF’nin yüzey alanı metilen mavisi yöntemi ile belirlendi ve bulunan sonuçlara göre yüzey alanı 33,58 m^2/g olarak hesaplandı. ACNF üzerinde VD adsorpsiyonu da aerojellerin üretim sıcaklığı olan 37°C’da incelenerek, elde edilen sonuçlara aşağıda yer verildi.

Karbon nanolif ve aerojel örneklerinin XRD analizi yapılmış olup, XRD diyagramı Şekil 2’de verilmiştir. Nanolif ve aerojel örneklerinin FTIR spektrumları Şekil 3’te verilmiştir.

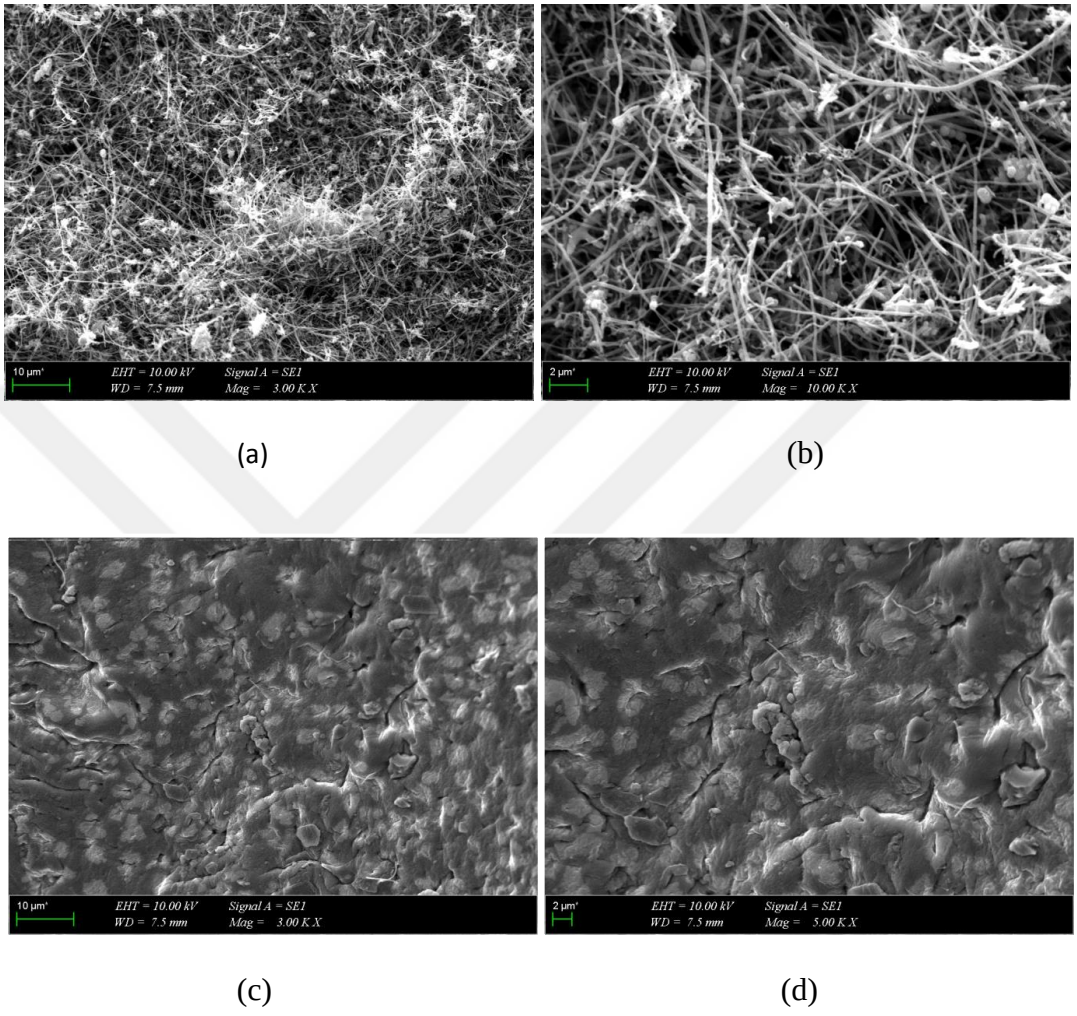


Şekil 2. Karbon nanolif ve aerojel örneklerinin XRD diyagramı



Şekil 3. Karbon nanolif ve aerojel örneklerinin FTIR spektrumu

Karbon nanolif ve aerojel örneklerinin yüzey morfolojisini ve yapısını analiz etmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır ve SEM görüntüleri Şekil 4'te verilmiştir.



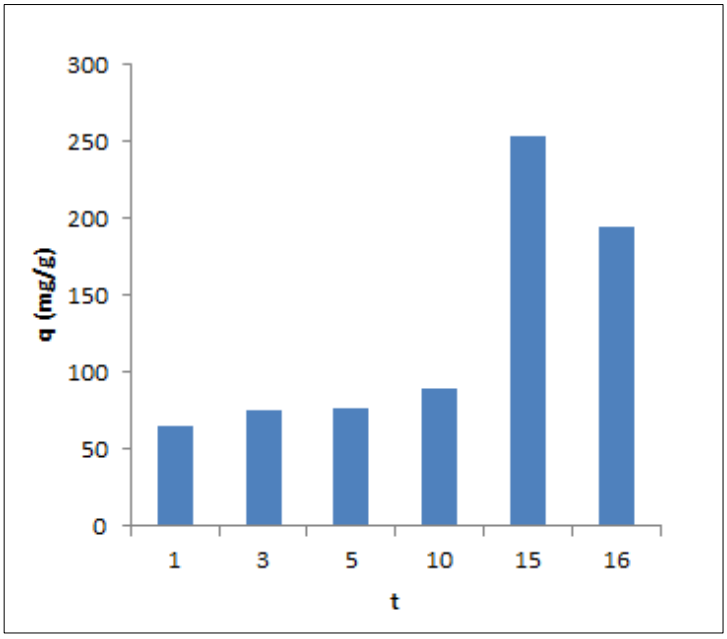
(a) (b)

(c) (d)

Şekil 4. ACNF-VD (a, b) ve Aero1 (c, d) örneklerinin SEM görüntüleri.

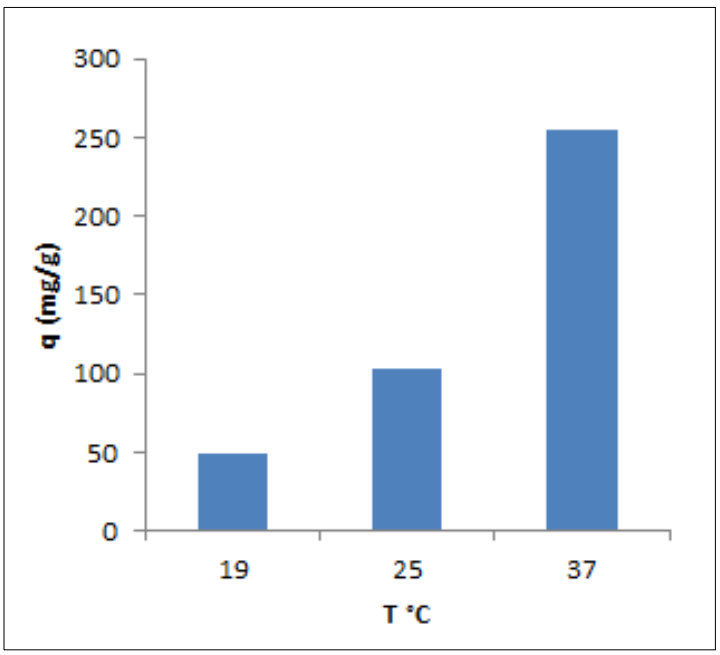
6.1.1. ACNF üzerinde VD adsorpsiyonunun incelenmesi

Seçilen ACNF örneklerinin VD adsorpsiyon kapasitesini hesaplamak için kesikli adsorpsiyon deneyleri yürütüldü. 500 mg/L VD başlangıç derişimi kullanılarak ACNF örnekleri üzerindeki VD adsorpsiyonu zamana ve farklı deney koşullarına bağlı olarak spektrofotometrik olarak izlendi. ACNF adsorpsiyonunda derişimin zamanla değişimi verileri izlenerek denge süresinin 15 dakika olduğu belirlendi (Şekil 5).



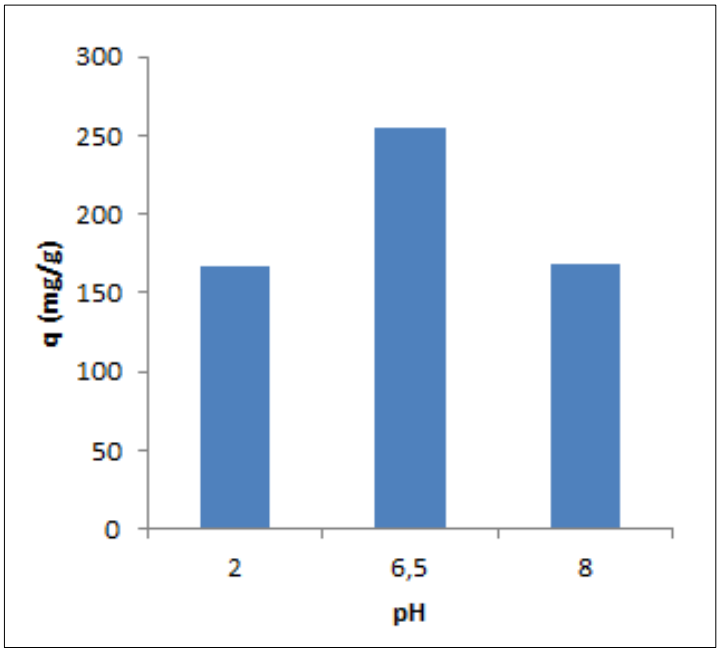
Şekil 5. ACNF'nin zamana bağlı olarak VD adsorpsiyonu

ACNF üzerindeki VD adsorpsiyonuna ortam sıcaklığının etkisini görmek amacıyla farklı sıcaklıklarda adsorpsiyon çalışmaları yürütüldü. Elde edilen sonuçlara göre VD adsorpsiyonunun sıcaklık artışı ile birlikte önemli ölçüde arttığı belirlendi. İlaç taşıyıcı sistemlerin üretimi için ACNF üzerine VD adsorpsiyonu en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin elde edildiği 37°C sıcaklıkta yürütüldü (Şekil 6).



Şekil 6. ACNF'nin sıcaklığa bağlı olarak VD adsorpsiyonu

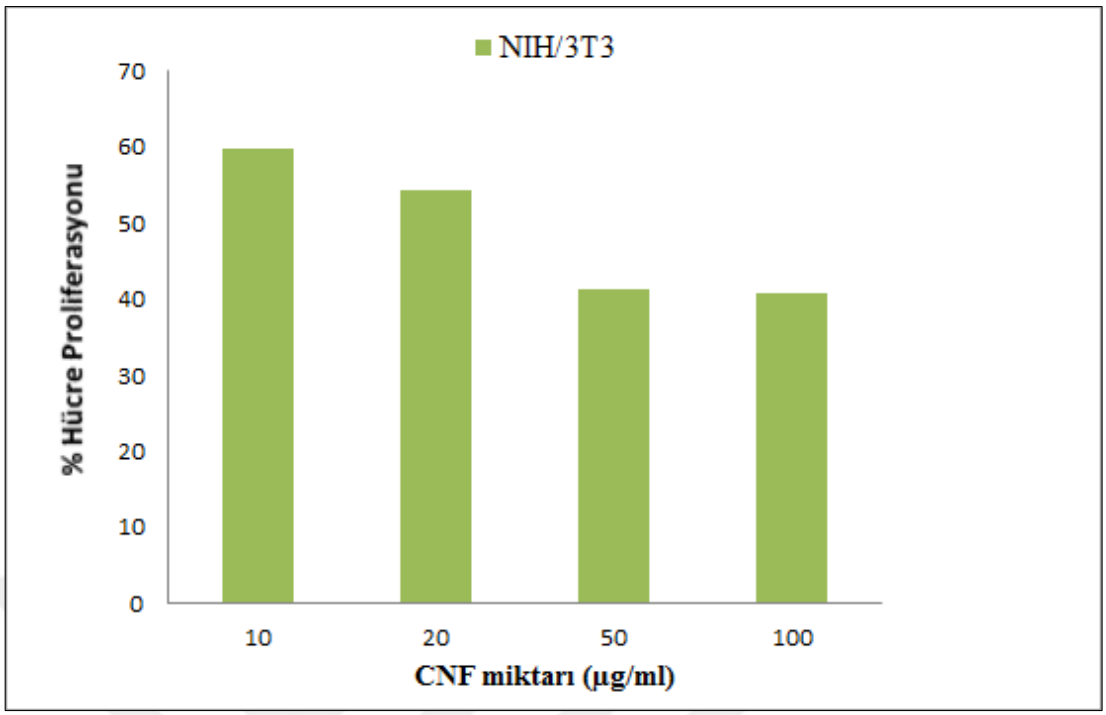
VD adsorpsiyonuna pH etkisi, farklı ortam pH'larında incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 7'de gösterildi. VD adsorpsiyonuna ortam pH'ının önemli etkisi olduğu görüldü ve en yüksek adsorpsiyon kapasitesi değeri VD çözeltisinin kendi pH'ı olan 6,5'ta elde edildi.



Şekil 7. ACNF'nin pH'a bağlı olarak VD adsorpsiyonu

6.2. CNF'nin NIH/3T3 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

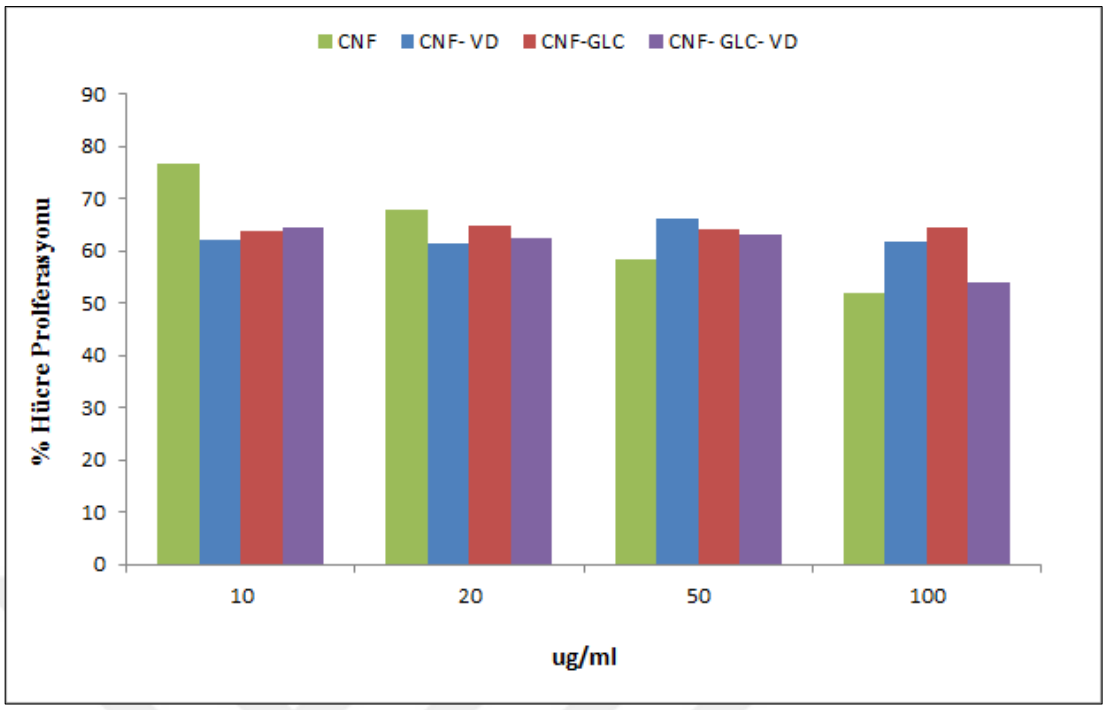
Tezimizde sentezlemeyi amaçladığımız ilaç taşıyıcı sistemin kanser hücreleri üzerindeki etkisini belirlemeden önce, non-kanserojenik hücre hattı olarak kullandığımız NIH/3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisini belirledik. CNF aktifleştirmeden ve D vitamini yüklemesi yapılmadan önce NIH/3T3 hücre büyümesi üzerine etkisi MTT yöntemi ile analiz edildi. PBS içerisinde hazırlanmış olan CNF'in doza bağlı sitotoksik aktivitesini gözlemlemek için 10 µg, 20 µg, 50 µg ve 100 µg dozları uygulandı. Yapılan analizler sonucunda, CNF'nin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu %40-60 oranında inhibe ettiği belirlendi (Şekil 8). Bu sonuçlara dayanarak, sitotoksik etkiyi azaltmak amacıyla CNF'lere çeşitli modifikasyonların uygulanması gerektiğine karar verildi.



Şekil 8. CNF'nin doza bağlı olarak NIH/3T3 hücre proliferasyonuna etkisi

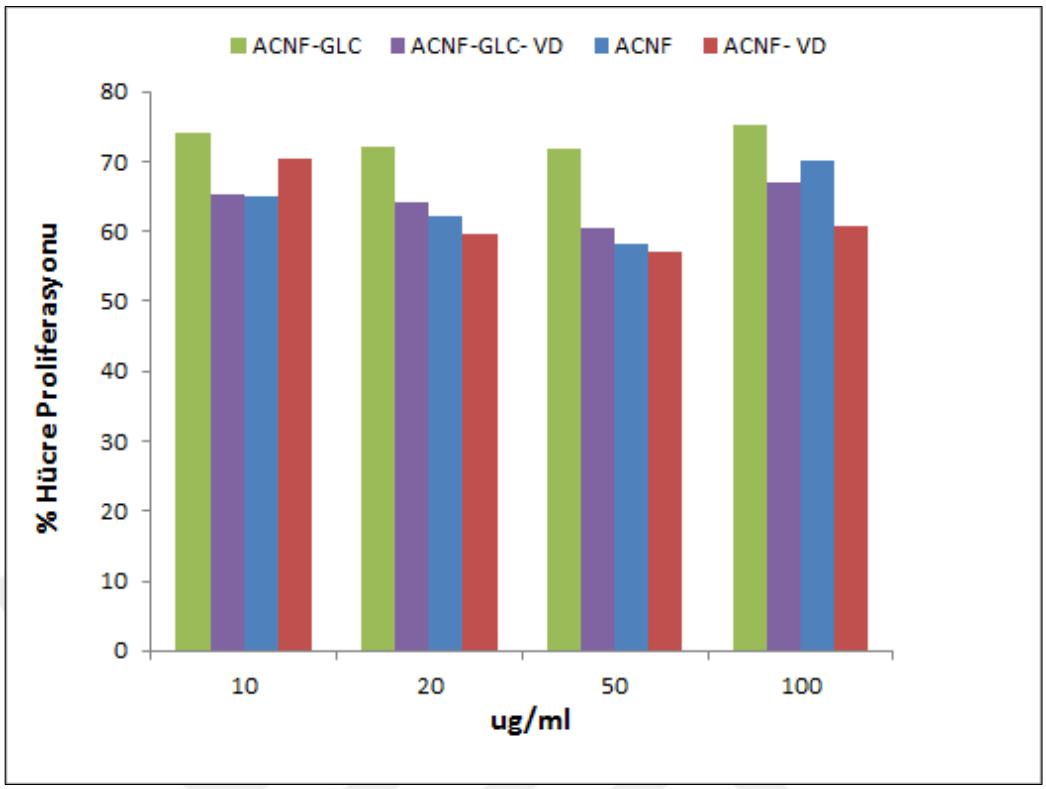
6.3. Modifiye Edilen CNF'lere Yüklenmiş VD'nin NIH/3T3 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Modifiye edilmiş CNF'lerin ve VD yüklü formlarının hücre büyümesi üzerine etkisi MTT yöntemi ile incelendi. PBS'te hazırlanan dispersiyonlar 10-100 µg doz aralığında uygulandı. CNF'ler (Şekil 9), ACNF'ler (Şekil 10) ve VD yüklü formlarının (Şekil 9 ve Şekil 10) kontrol grubuyla kıyaslandığı deneyde, sağlıklı hücrelere sitotoksik etkisi olduğu gözlendi. Sağlıklı hücrelere olan sitotoksik etkiyi azaltmak amacıyla CNF ve ACNF'lere GLC kullanılarak modifiye edildi. Modifiye edilen CNF, ACNF ve VD yüklü formlarının sitotoksik etkileri de Şekil 9 ve 10'da karşılaştırmalı olarak verildi.



Şekil 9. CNF ve modifiye edilmiş CNF örneklerinin normal hücre proliferasyonu üzerine etkisi

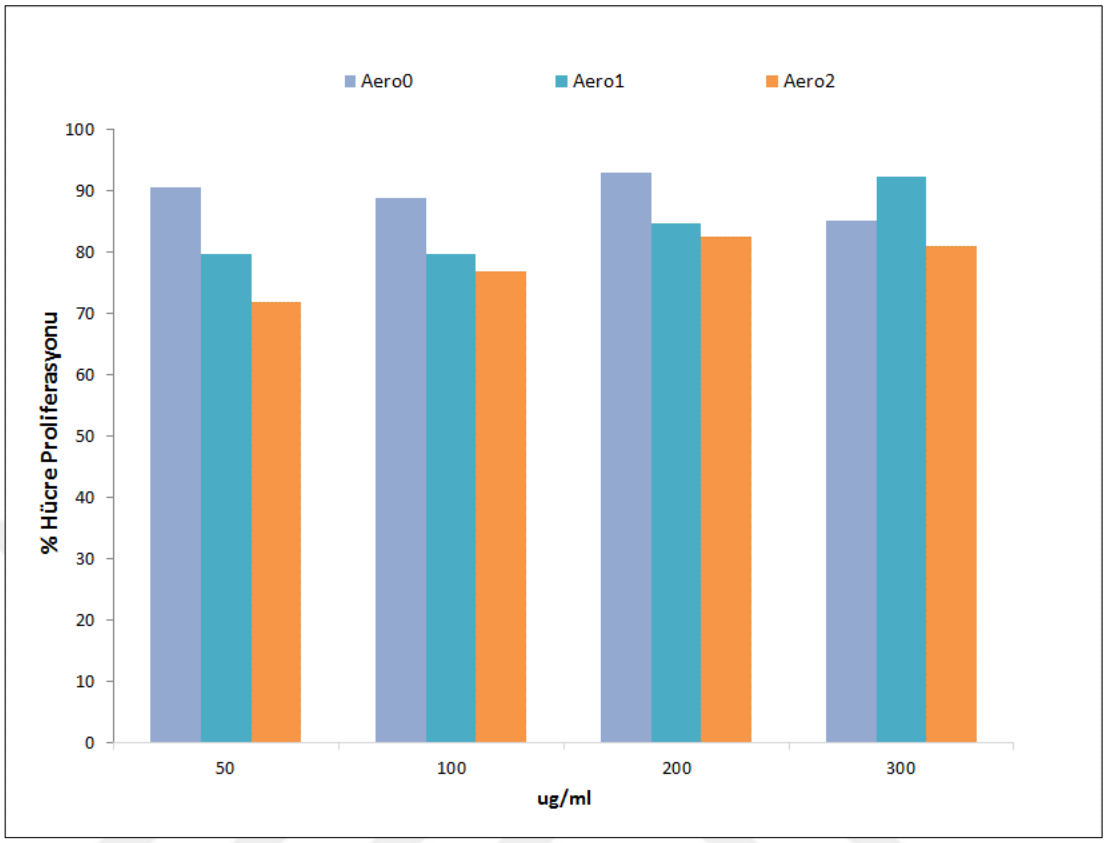
CNF'in tek başına GLC ile modifiye edilmiş örneklerinde ve/veya VD yüklü formlarının farklı dozlarında hücre sitotoksititesinin %35-45 oranında devam ettiği gözlendi (Şekil 9). ACNF örneklerinde ise GLC modifikasyonundan sonra hücre sitotoksitesinin %10 azaldığı ve VD yüklü formlarında ise sitotoksitenin %30-40 arasında devam ettiği belirlendi (Şekil 10)



Şekil 10. ACNF ve modifiye edilmiş ACNF örneklerinin normal hücre proliferasyonu üzerine etkisi

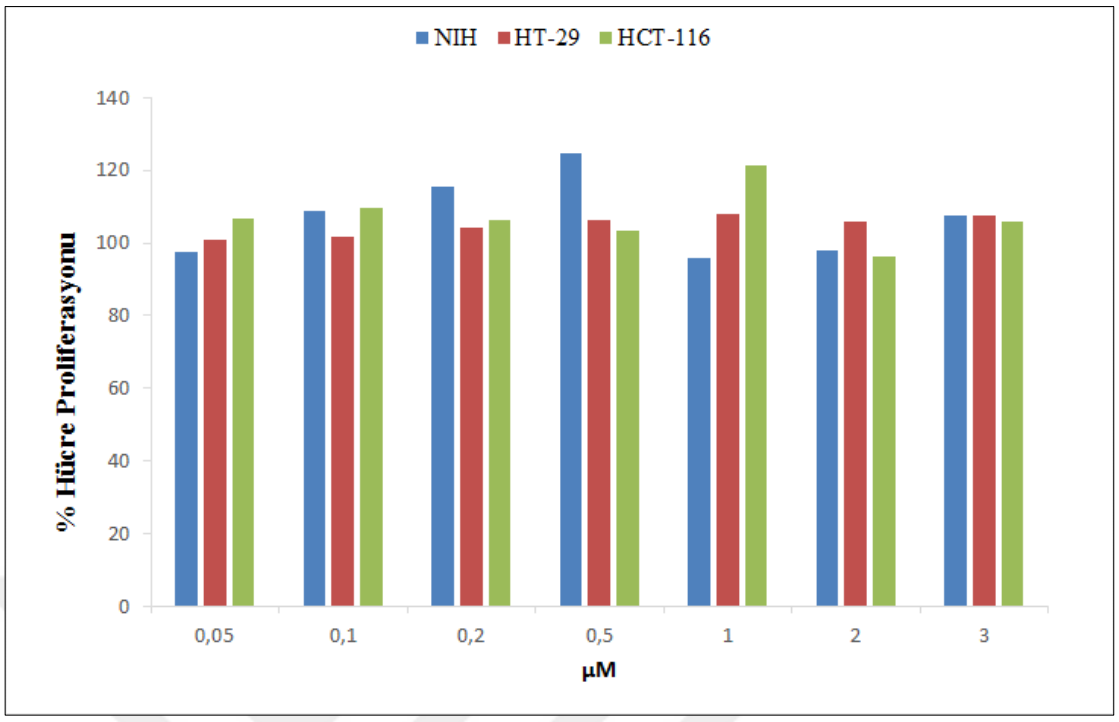
Yukarıdaki veriler değerlendirildiğinde hem CNF hem de ACNF'nin VD yüklü formlarının sitotoksik etkilerinin daha fazla olduğu belirlendiğinden, VD miktarının azaltılmasına; toksisitesi aktivasyon ile bir miktar azaltılmış olan ACNF'nin toksisitesini daha da azaltabilmek amacıyla sodyum aljinat kullanılarak ACNF içeren kompozit aerojel yapısındaki ilaç taşıyıcı sistemlerin üretilmesine karar verildi.

Üretilen aerojel taşıyıcı sistemin biyouyumluluğunu belirlemek için NIH/3T3 hücreleri üzerindeki sistotoksik etkileri 50-300 µg/ml konsantrasyonlarında çalışıldı. Hazırlanan VD yüklü aerojel taşıyıcı sistemler olan Aero1 ve Aero2 kıyaslandığında, Aero2'ye göre normal hücre proliferasyonunu daha kararlı bir biçimde arttırdığı tespit edildi. Diğer taraftan Aero0 ve Aero2'nin ise özellikle 300 µg/ml konsantrasyonunda hücre proliferasyonunda inhibisyona neden olduğu belirlendi (Şekil 11). Normal hücreler üzerinde sitotoksitesi olmayan ilaç taşıyıcı sistem oluşturulmasının amaçlandığı bu tez çalışmasında üretilen Aero1'in, kolon kanseri hücre serileri olan HT-29 ve HCT-116 üzerindeki etkilerinin belirleneceği deney ve analizlerde kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.



Şekil 11. Aerojel taşıyıcı sistemlerin NIH/3T3 hücre proliferasyonuna etkisi

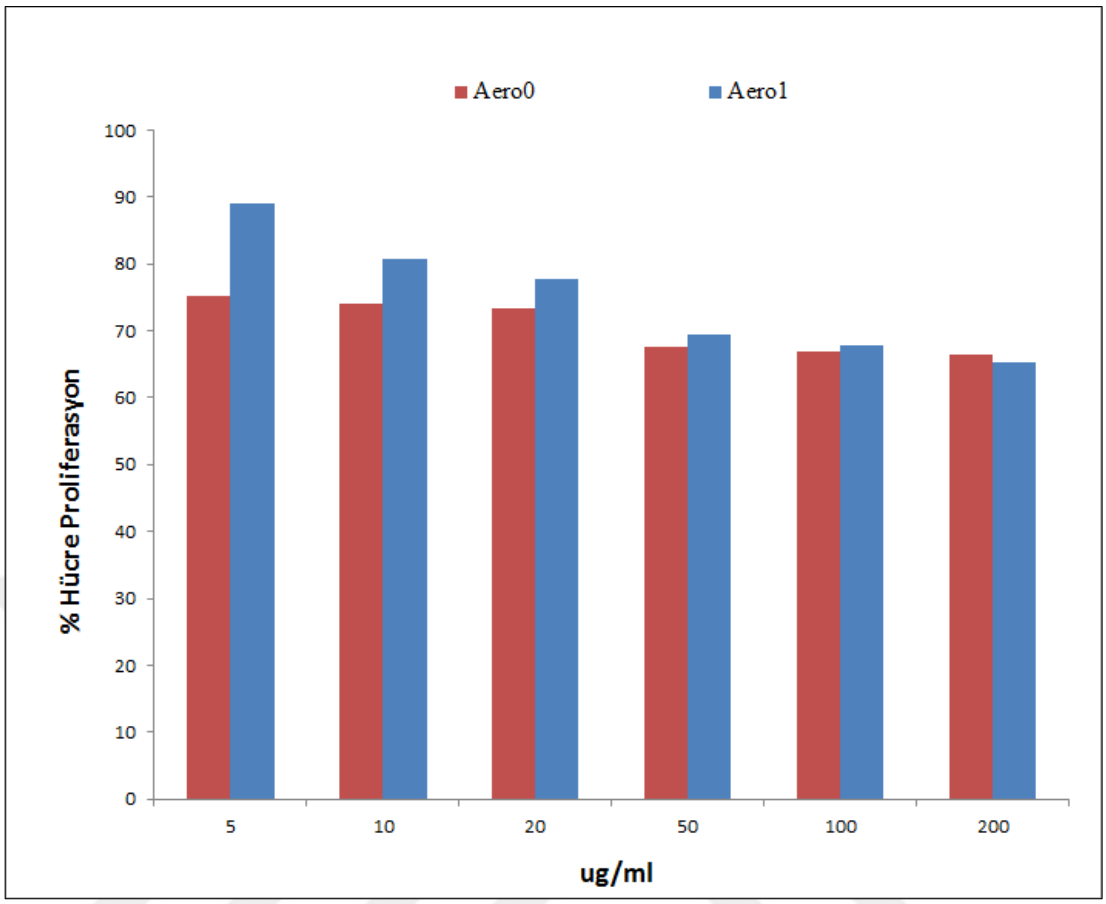
Üretilen Aero1 taşıyıcı sistemin normal hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin ACNF ve/veya VD kaynaklı olup olmadığını belirlemek için taşıyıcı sistemin karakterizasyon işlemleri yapıldı. Aero1'in yapısında bulunan VD miktarı, kesikli adsorpsiyon yöntemi ile 254,29 mg/g olarak hesaplandı. Bu miktara eş değer VD'nin 0,05-3 µM doz aralığında hem normal hücre serisi NIH/3T3 hem de kolon kanseri hücre serileri olan HT-29 ve HCT-116 üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini belirlemek için MTT yöntemi kullanıldı (Şekil 12). Yapılan analizler sonucunda bu doz aralıklarında normal ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlendi.



Şekil 12. VD'nin doza bağlı olarak hücre proliferasyonuna etkisi

6.4. Modifiye Edilen CNF'lere Yüklenmiş VD'nin HT-29 ve HCT-116 Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

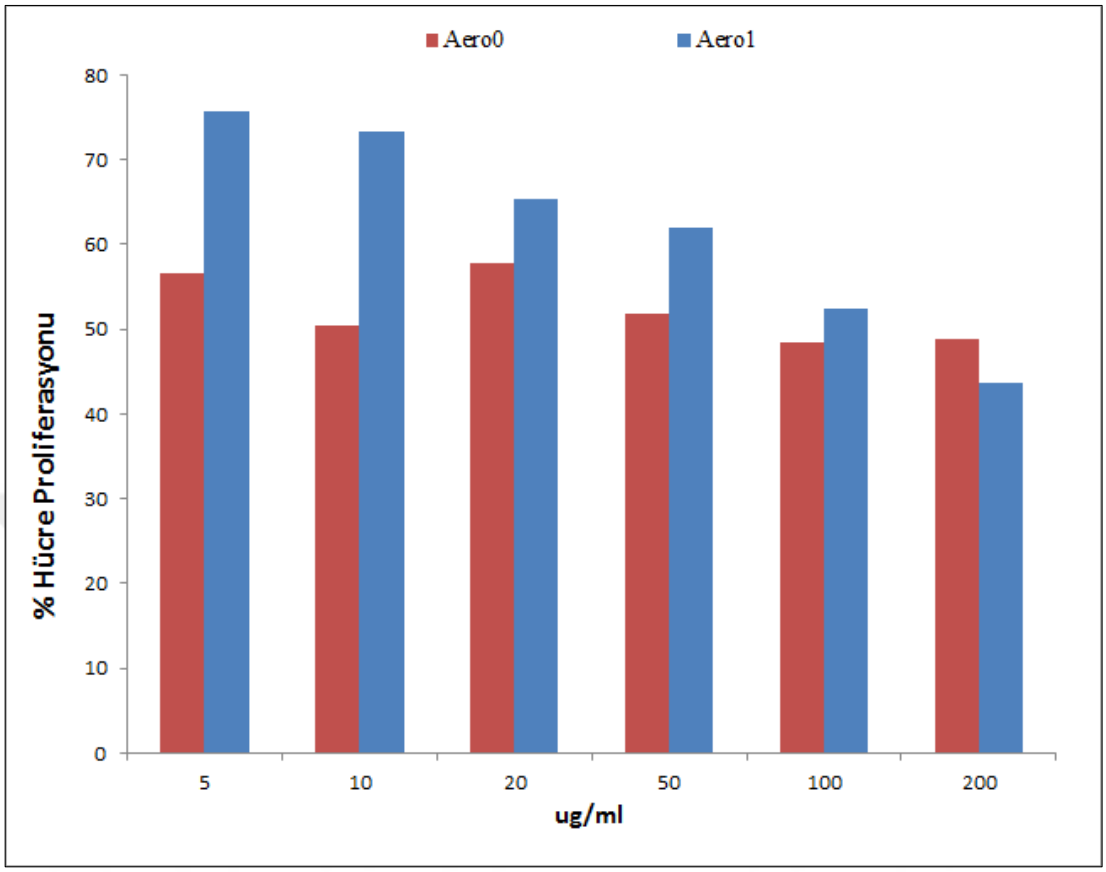
Normal hücreler üzerinde sitotoksitesi olmayan ve VD içeren ilaç taşıyıcı sistem üretilmesinin amaçlandığı bu tez çalışmasında elde edilen Aero1'in, kolon kanseri hücre serileri olan HT-29 ve HCT-116 üzerindeki etkileri MTT analiziyle incelendiğinde, deneydeki değişen dozlardaki aerojeller HT-29 (Şekil 13) ve HCT-116 (Şekil 14) kolon kanseri hücre serilerine uygulandığında kontrol grubuna kıyasla etkili bir inhibisyon gösterdi. 48 saatlik MTT deneyi sonrası yapılan analizlerde, Aero1'in IC_{50} konsantrasyonu HCT-116 hücrelerinde 141,2 µg/ml, HT-29 hücrelerinde ise 592 µg/ml olarak belirlendi.



Şekil 13. Aero1'in doza bağlı olarak HT-29 hücre proliferasyonuna etkisi

Diğer taraftan Şekil 13 ve Şekil 14'te de görüleceği üzere, Aero0'ın uygulanan doz aralıklarında hücre proliferasyon değerleri doğrusal bir artış veya azalış göstermediğinden hücre hatları üzerindeki IC_{50} konsantrasyonları belirlenememiştir. Bu da Aero1'in doza bağlı olarak içerdiği ACNF ve VD konsantrasyonunun artmasının Aero0'a kıyasla daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, deneysel işlem sırasında Aero1'in dispersiyon dağılımının daha iyi olduğu gözlenmiş olup hücreler üzerindeki antiproliferatif etkisinin doğrusallığı üzerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

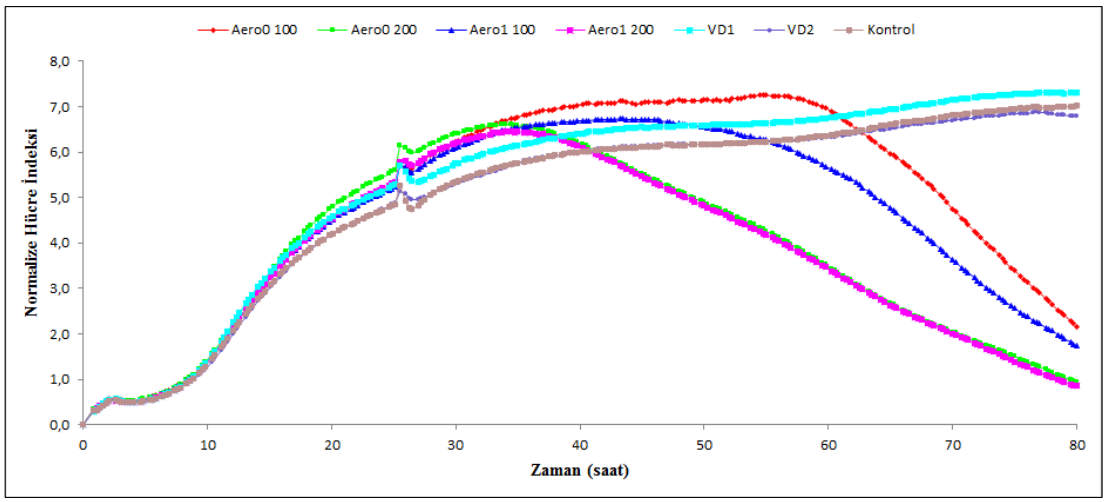
MTT analizlerinde her iki kanser hücre hattında antiproliferatif etkinin Aero1'in 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarında görülmesi nedeniyle gerçek zamanlı hücre ölçer analizi ile antiproliferatif aktivitenin belirlenmesi, apoptotik etki mekanizmalarının ve hücre göçünün belirlenmesi deneyleri için bu dozlar kullanılmıştır.



Şekil 14. Aero1'in doza bağlı olarak HCT-116 hücre proliferasyonuna etkisi

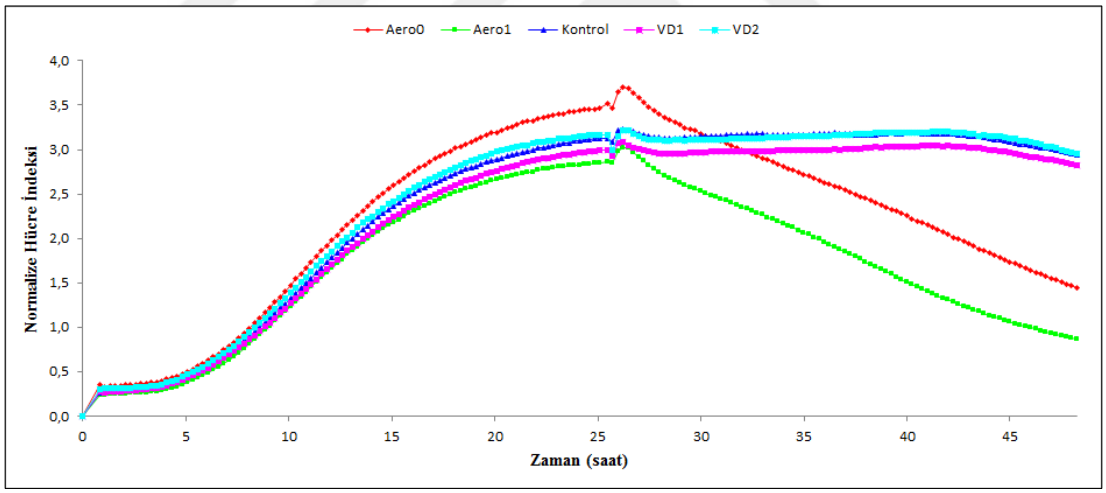
6.5. Modifiye Edilen CNF'lere Yüklenmiş VD'nin HT-29 ve HCT-116 Üzerindeki Antiproliferatif Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Ölçer Cihazı ile Belirlenmesi

Aero0, VD ve Aero1'in antiproliferatif etkinliğini göstermek için gerçek zamanlı hücre ölçer cihazı ile de analiz yapıldı. 120 saat süresince inkübasyona bırakılan hücrelerden elde edilen grafik Şekil 15 ve 16'da sunulmuştur. Grafikler incelendiğinde, HCT-116 hücrelerinde antiproliferatif etkinliğin yaklaşık 30. Saatte başladığı ve 48. saatin sonlarına doğru en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. HT-29 hücrelerinde ise bu etkinin yaklaşık 45. saatte başladığı ve 80. saatin sonlarına doğru en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir.



Şekil 15. Aero0, Aero1 ve VD'nin HT-29 hücre proliferasyonuna etkisi

HT-29 hücrelerinde Aero1'in doza bağlı olarak Aero0'a göre daha yüksek antiproliferatif etkinlik gösterdiği; VD'nin ise tek başına 1 µM ve 2 µM dozlarında etkinlik göstermediği belirlendi.



Şekil 16. Aero0, Aero1 ve VD'nin HCT-116 hücre proliferasyonuna etkisi

Benzer şekilde, HCT-116 hücrelerinde Aero1'in doza bağlı olarak Aero0'a göre daha yüksek antiproliferatif etkinlik gösterdiği; VD'nin ise tek başına 1 µM ve 2 µM dozlarında etkinlik göstermediği belirlendi.

6.6. Modifiye Edilen CNF'lere Yüklenmiş VD'nin HT-29 ve HCT-116 Hücrelerinde Kaspaz Aktivitesi ve Mitokondri Membran Polarizasyonu Üzerine Etkilerinin Sonuçları

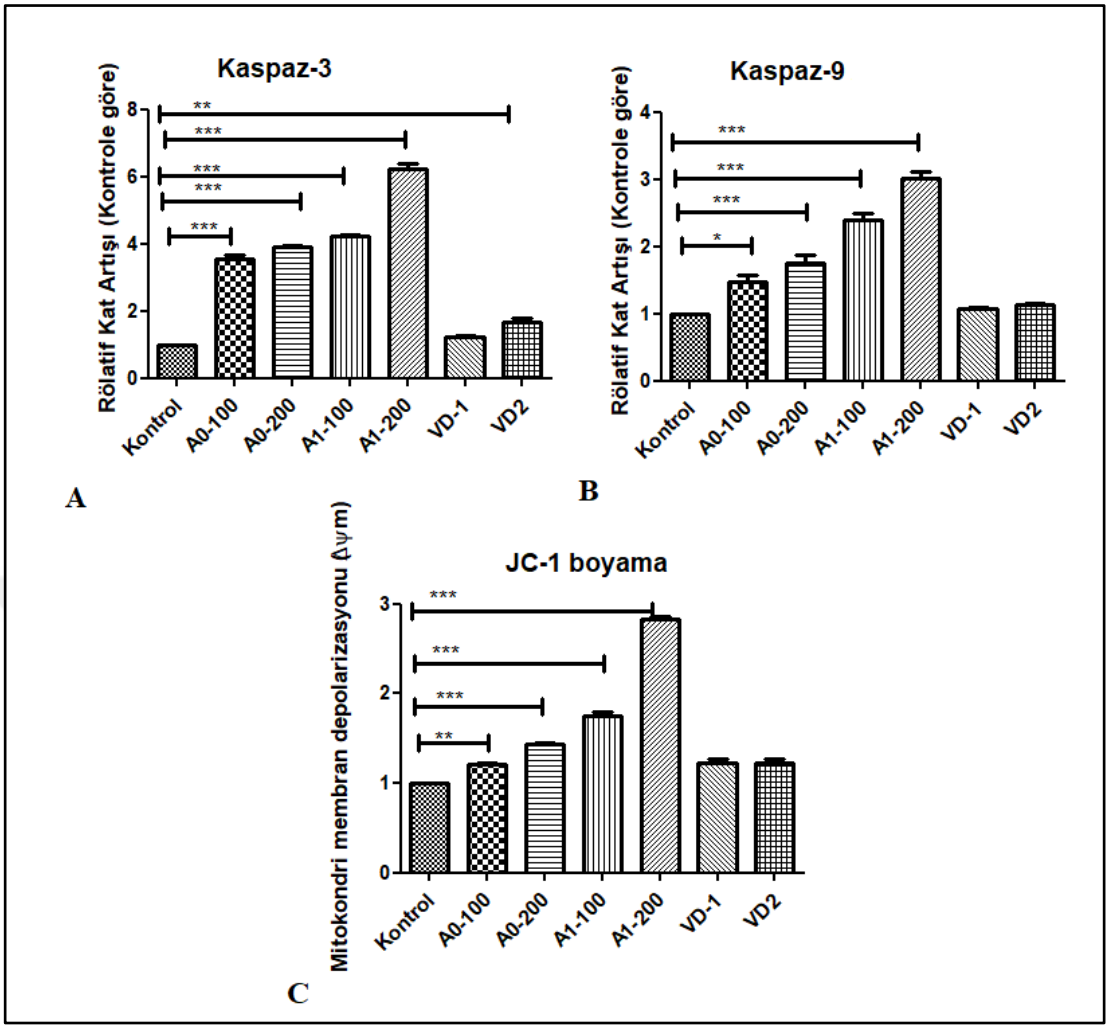
Modifiye edilerek üretilmiş aerojellerin antiproliferatif etkinlikleri hem MTT yöntemiyle hem de gerçek zamanlı hücre ölçer cihazı kullanılarak gösterilmesinden sonra bu etkilerini hangi biyokimyasal mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiklerini belirlemek için hücre ölüm mekanizmalarından biri olan apoptoz üzerinde çalışılmıştır. Apoptotik etkilerin belirlenmesinde hem biyokimyasal hem de morfolojik yöntemler kullanılmıştır.

6.6.1. Kaspaz enzimlerinin aktivasyonu

Apoptotik hücre ölümünde kaspazlar olarak bilinen sistein proteaz ailesi tarafından yürütülen iki süreç vardır: Kaspaz-8 tarafından başlatılan ekstrinsik (mitokondriyal) yolak ve kaspaz-9 tarafından tetiklenen intrinsik yolakların aktivasyonu ile hücre ölümü tetiklenmektedir. Ekstrinsik ya da intrinsik apoptotik süreçler sonunda en yaygın ölçülen kaspaz aktivitesi kaspaz-3'tür (Ozsavci ve ark., 2011).

Çalışmamızda Kaspaz-3, 8 ve 9 enzimlerinin aktivasyonu ticari olarak satın alınan kitlerle gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucu, modifiye üretilen aerojellerin HT-29 hücrelerinde apoptozu indükledikleri tespit edilmiştir (Şekil 17). Aero0 ve Aero1 kompozitlerinin yanısıra VD'nin de doza bağlı olarak Kaspaz-3 enzim aktivasyonunu istatistiksel anlamlı olarak arttırmıştır ($p<0,001$, $p<0,001$ ve $p<0,01$, sırasıyla). Benzer şekilde Kaspaz-9 enzim aktivasyonunun da kompozit jellerin dozuna bağlı olarak arttığı ($p<0,001$); VD'nin ise kontrole kıyasla bir artışa neden olmasına rağmen istatistiksel olarak bir anlama ulaşmadığı belirlendi ($p>0,05$).

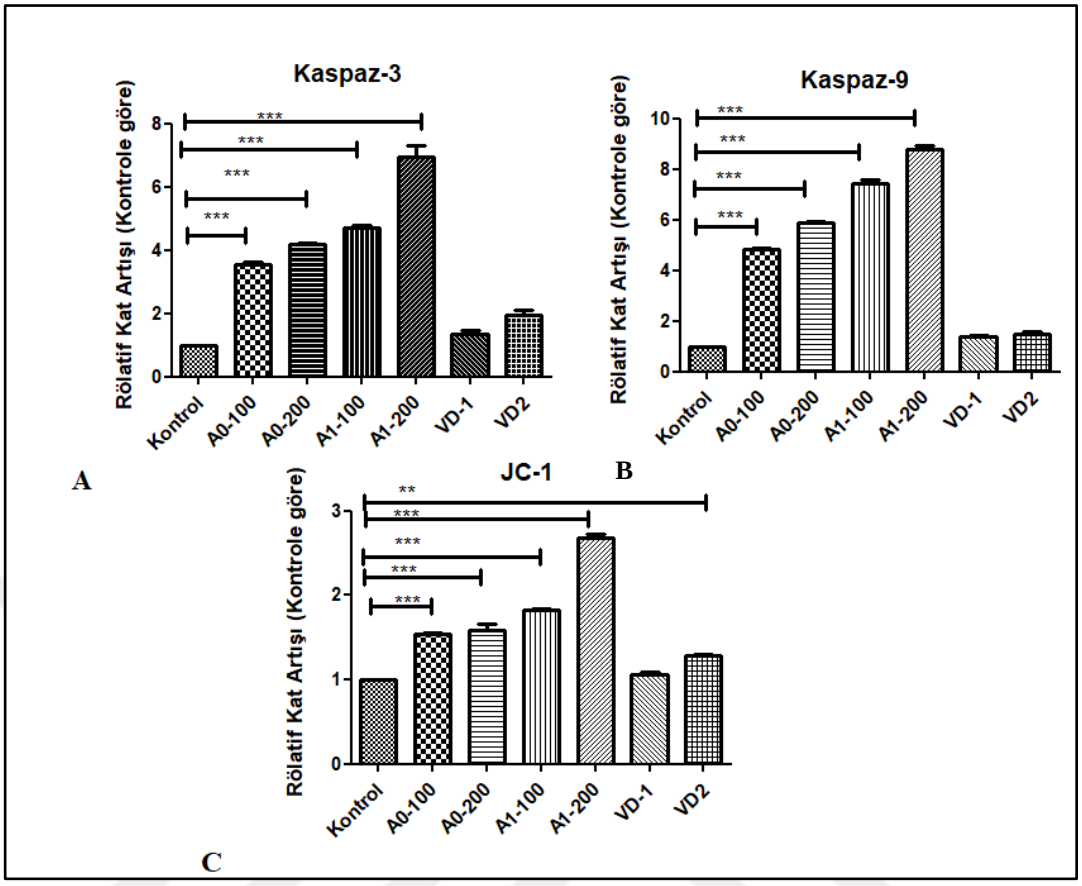
HCT-116 hücrelerinde de HT-29 hücrelerinde olduğu gibi modifiye olarak üretilen Aero0 ve Aero1 kompozit jellerin Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesini kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı olarak arttırdığı tespit edildi ($p<0,001$). Bu artışın doza bağlı olarak gerçekleştiği ve en büyük artışın Aero1-200 dozunda gerçekleştiği gözlendi (Şekil 18). VD'nin her iki dozunda enzim aktivasyonlarında artış görülmesine ragmen, bu artışın istatistiksel anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$).



Şekil 17. Aerojellerin HT-29 hücrelerinde apoptotik mekanizmayı uyarması. A) Kaspaz-3 enzim aktivasyonu B) Kaspaz-9 enzim aktivasyonu C) Mitokondri membran depolarizasyonu. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre (Aero0: A0, Aero1: A1).

Diğer taraftan kompozit jellerin ve VD'nin her iki hücre serisinde, Kaspaz-8 aktivitesi üzerinde herhangi bir artışa neden olmadığı belirlendi.

Kompozit jellerin kaspaz enzim aktivasyonları üzerindeki artışa neden olmasından dolayı her iki kolon kanseri hücre serisinde apoptotik mekanizmanın iç yolağının tetiklendiği ortaya konulmuştur.



Şekil 18. Aerojellerin HCT-116 hücrelerinde apoptotik mekanizmayı uyarması. A) Kaspaz-3 enzim aktivasyonu B) Kaspaz-9 enzim aktivasyonu C) Mitokondri membran depolarizasyonu. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre (Aero0: A0, Aero1: A1).

6.6.2. Mitokondri membran potansiyeli

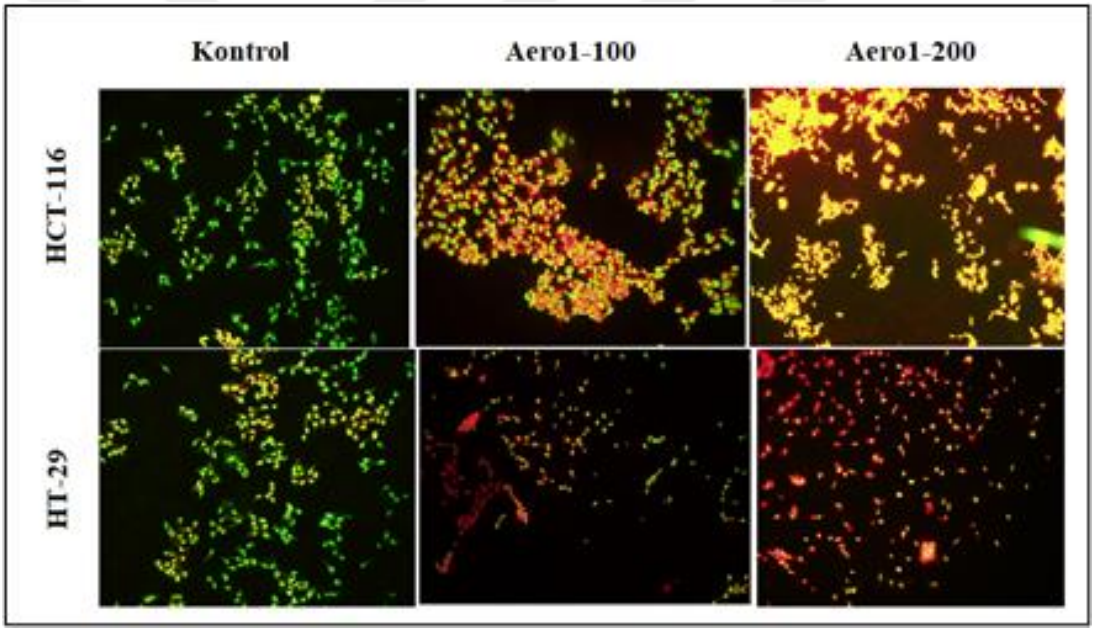
Apoptoz esnasında mitokondri membran potansiyeli kaybı, JC-1 mitokondri membran potansiyeli belirleme kiti (MitoPT™ JC-1 Assay Kit, ImmunoChemistry) kullanılarak belirlendi. Sağlıklı hücrelerde JC-1 boyası mitokondride agregatlar şeklinde toplanır ve bu kırmızı floresan bir renk verir. Apoptotik hücrelerde ise mitokondri membran potansiyeli çökmüş olduğundan JC-1 boyası mitokondri içinde toplanamaz ve sitoplazmada monomerik formda kalarak yeşil floresan bir renk verir.

Kaspaz-9 aktivasyonu ile başlayan ve mitokondri membran potansiyelinin azalması ile sonuçlanan iç yolağın kompozit jeller tarafından tetiklendiği JC-1 boyaması ile ortaya konulmuştur. Her iki hücre serisinde aerojellerin dozuna bağlı

olarak mitokondri membran potansiyelinin azaldığı ve depolarizasyonun arttığı belirlendi (Şekil 17 ve Şekil 18). Bu artış istatistiksel olarak da oldukça anlamlıydı ($p<0,001$).

6.6.3. Akridin oranj ve etidyum bromür boyama sonuçları

Kompozit jellerin kolon kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediği biyokimyasal yöntemlerle tespit edildikten sonra, morfolojik olarak da akridin oranj boyaması yapılarak görüntülendi. Her iki hücre serisinde de kontrol grubunda hücrelerin yeşile boyandığı, deney grubunda ise hücrelerin apoptoza uğradığı görülmektedir. Bu etkinin HCT-116 hücrelerinde çok daha belirgin olduğu gözlemlendi.



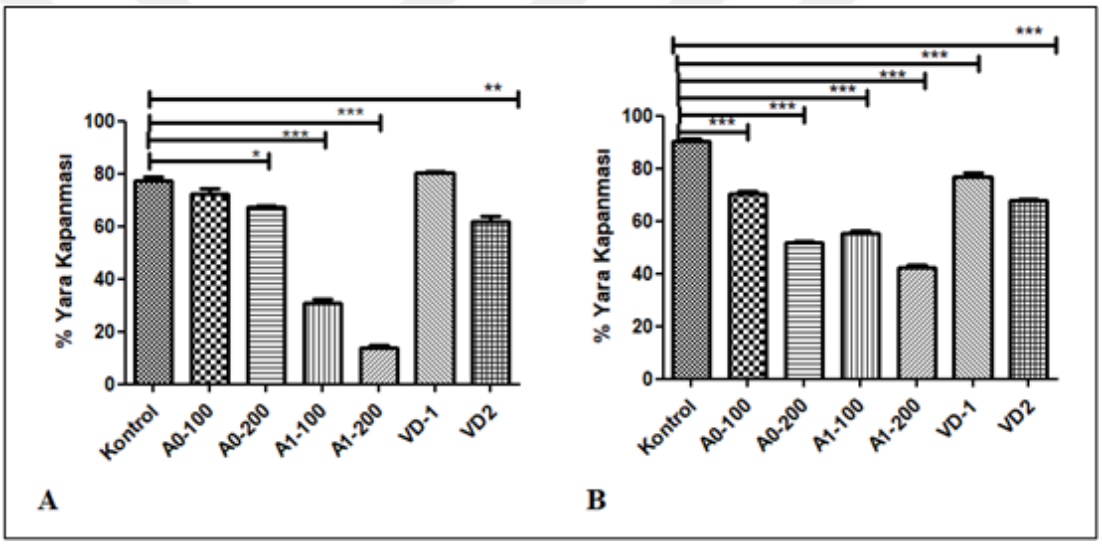
Resim 6. Aero1 kompozit jellerinin doza bağlı olarak kolon kanseri hücrelerindeki apoptotik etkilerinin akridin oranj boyaması ile saptanması

6.7. Modifiye Edilen CNF'lere Yüklenmiş VD'nin HT-29 ve HCT-116 Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisinin Sonuçları

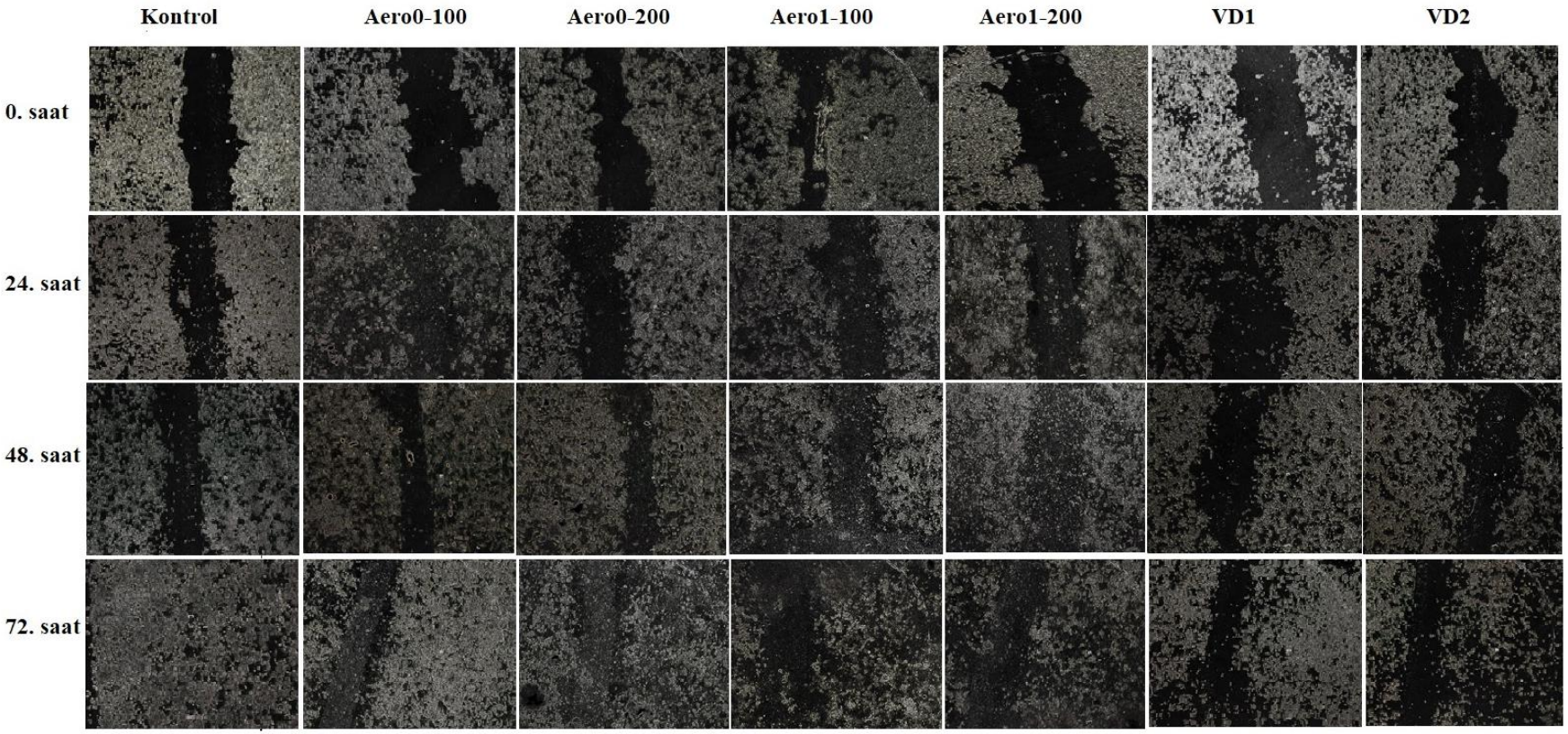
Üretilen kompozit jellerin hücre migrasyonuna etkilerini incelemek için yapmış olduğumuz yara iyileşme deneyleri sonucunda HCT-116 hücrelerinde Aero0, Aero1 ve VD'nin doza bağlı olarak inhibisyon yaptığını belirledik (Şekil 20). Bununla

birlikte, yapmış olduğumuz istatistik analizler sonucunda Aero1-100 ve Aero1-200 taşıyıcı modelin hücre migrasyonunu kontrole göre istatiksel anlamlı olarak inhibe ettiğini belirledik ($p<0,001$). Yapılan gözlemlerde özellikle bu iki kompozit jelin hücre morfolojisi üzerinde de belirgin bir değişiklik meydana getirdiği, hücreler arası bağlantıları kopardığı ve küçüldükleri tespit edildi.

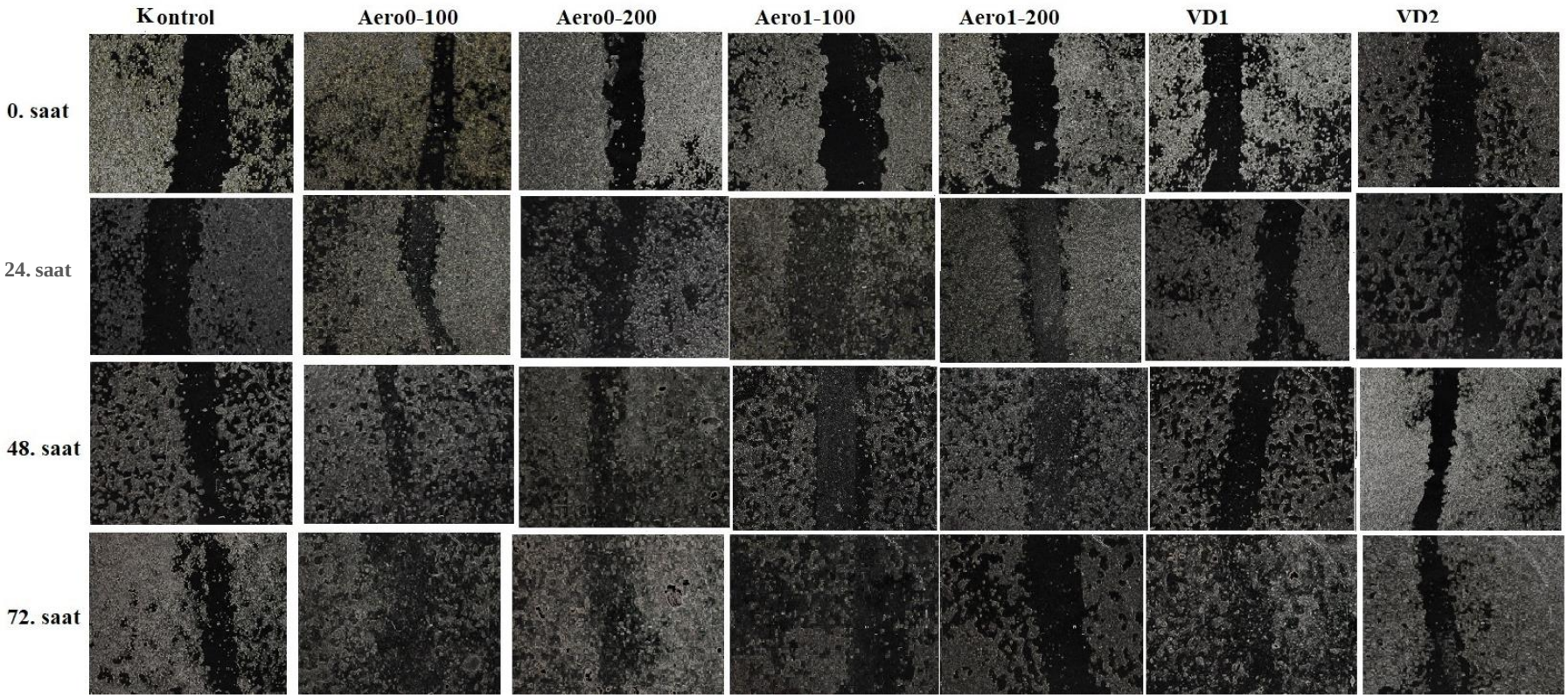
Aerojellerin HT-29 hücre migrasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde özellikle Aero1 jelinin doza bağlı olarak hücre migrasyonunu belirgin biçimde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 21). Özellikle Aero1-200 aerojelinin bu etkisinin çok belirgin olduğu ve hücrelerin migrasyon hızının kontrole kıyasla %14'lere indiği görülmektedir.



Şekil 19. Aerojellerin A) HT-29 ve B) HCT-116 hücre migrasyonu üzerine etkileri. *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$ kontrole göre (Aero0: A0, Aero1: A1).



Şekil 20. Aero0, Aero1 ve VD'nin doza bağlı olarak HCT-116 hücre migrasyonuna etkisi



Şekil 21. Aero0, Aero1 ve VD'nin doza bağlı olarak HT-29 hücre migrasyonuna etkisi

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Şimdiye kadar yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, VD'nin kanseri önleme ve tedavisindeki rolünü desteklemektedir (Feldman ve ark., 2014; Moukayed ve Grant, 2017). Bu nedenle, VD eksikliğinin önlenmesinin kanser insidansının azaltılması ve prognozunu iyileştirmenin ekonomik ve güvenli bir yolu olabileceği kuvvetle düşünülmektedir.

D3 vitamininin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D3 ($1{,}25(OH)_2D_3$), daha çok kemik, kalsiyum ve fosfat homeostazı üzerindeki etkileri ile bilinmektedir. Bu klasik etkilerin yanı sıra $1{,}25(OH)_2D_3$, vitamin D reseptörünü (VDR) eksprese eden çeşitli dokular ve ayrıca vitamin D3'ün hidroksilasyonlarını aktive etmekten sorumlu enzimler üzerinde de kemik metabolizması üzerindeki etkilerinden bağımsız olarak rol oynamaktadır. Bu nedenle çoğu doku, D3 vitaminini, aktif formu olan $1{,}25(OH)_2D_3$'e dönüştürme yeteneğine sahiptir ve bu da 1,25(OH)'nin VDR'ye bağlanarak hedef genleri olumlu veya olumsuz yönde etkilemektedir (Leyssens ve ark., 2014). $1{,}25(OH)_2D_3$'ün klasik olmayan etkileri ayrıca normal ve kanser hücreleri üzerindeki proliferatif ve antiproliferatif etkileri (Colston ve ark., 1981; Jensen ve ark., 2001) ve immünomodülatör etkinliklerini de içermektedir. Ancak bu klasik olmayan etkileri elde etmek için nanomolar aralıkta $1{,}25(OH)_2D_3$ dozları gerekirken, fizyolojik $1{,}25(OH)_2D_3$ serum konsantrasyonları pikomolar aralıktadır. $1{,}25(OH)_2D_3$'ün suprafizyolojik dozları hiperkalsemi ile sonuçlandığından, $1{,}25(OH)_2D_3$'ün faydalı etkilerini korurken veya arttırırken kalsemik yan etkileri en aza indirmek için $1{,}25(OH)_2D_3$ analogları geliştirilmiştir (Leyssens ve ark., 2014). Diğer taraftan, bazı analogların hayvan kanser modellerinde güçlü ilaçlar olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, şu anda klinikte kanser tedavisi için hiçbir VD analoğu kullanılmamaktadır. VD analoglarının kanser hücrelerinde, VD formlarına göre etkinlik, metabolizma ve VDR ile etkileşimindeki farklılıklar nedeniyle istenilen sonuçları göstermediği düşünülmektedir. Bu nedenle, VD'nin kanser tedavisinde etkin rol oynayabilmesi için ilaç taşıyıcı sistemler gibi farklı stratejiler yoluyla hedef hücrelere ulaştırılması büyük önem arz etmektedir.

Düşük kalsemik VD etkisine sahip, hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemi en çok arzu edilen gibi görünmektedir. Bununla birlikte, şimdiye kadar VD veya VD türevleri

için taşıyıcı sistemlerin işlevselleştirmesiyle ilgili ileri bir teknoloji sunulmamıştır. Bu çalışmada, taşıyıcı malzeme olarak karbon nanolifler (CNF) kullanılarak hedeflenen, düşük maliyetli ve biyouyumlu VD taşıyıcı sistemlerin ilk kez geliştirilmesi, optimize edilmesi ve antikanserojenik, apoptotik, hücre göçü önleyici aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Nanomalzemeler arasında, karbon bazlı malzemeler yüksek kimyasal direnç kabiliyeti, verimli mekanik özellikleri ve karakteristik özellikleriyle vücutta yüksek dağılım kabiliyetine ve biyouyumluluğa sahiptir (Simon ve ark., 2019). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, karbon nanomalzemelerin anti-kanser ajanı olarak kullanımı ve sitotoksik ilaçlara karşı kanser hücrelerini daha duyarlı hale getirebileceği gösterilmiştir. Mahmood ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, deksametazon ve etoposid gibi antikanserojenik ilaç yüklü farklı yapıdaki nanomateryallerin HeLa hücrelerini ilaca karşı daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. Diğer taraftan bu etkinliğinin tek duvarlı karbon nanotüpler tarafından sağlandığı ve kemoterapötik ajanların etkinliğinin %100-300 arasında arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda sağlıklı hücre hatlarının proliferasyonuna etkisi, düşük ve yüksek konsantrasyonlarda incelendiğinde, karbon nanomalzemelerin biyouyumluluğunu ortaya çıkaran sonuçlar elde edilmiştir (Mahmood ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada, kemoterapotik ilaçlardan karboplatin, karbon nanotüplere yüklenerek mesane kanseri hücre hattına uygulanmıştır. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan karbon nanotüplerin tek başına kanser hücreleri üzerinde önemli bir etkisi olmamasına rağmen karboplatin yüklemesinden sonra kanser hücre büyümesini anlamlı derecede inhibe ettiği gösterilmiştir (Hampel ve ark., 2008).

Karbon nanotüplerin fonksiyonelliğine olan etkisini kıyaslamak adına yapılan bir araştırmada, tek duvarlı nanotüpler ve çok duvarlı nanotüplerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması karşılaştırılmıştır. Sisplatin yüklenen her iki yapıdaki karbon nanotüpün, yüksek bir inflamatuar yanıt indüklemeden, kemoterapötik ilacın birikimini ve tümör hücreleri içindeki yavaş salınımını iyileştirmek için umut verici nano taşıyıcılar olduğu gösterilmiştir. Makrofajlar üzerinde zayıf sitotoksik ve proinflamatuar sitokin üretimi olmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte çok duvarlı nanotüplerin, tek duvarlılara kıyasla daha fazla miktarda sisplatin yüklemesi

yapılmasına olanak sağladığı gösterilmiştir (Muzi ve ark., 2015). Çalışmanın sonucunda nanomalzemelerdeki yüzey alanının artışı, yüksek dağılım ve daha verimli mekanik özellikler sağlarken biyoaktif özelliklerinde ve yüzeylerinin fonksiyonelleştirilme oranlarının da arttığı görülmüştür.

CNF'ler son yıllarda geliştirilmiş, üstün özellikler sergileyen ve birçok alanda kullanıma uygun nanomalzemeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Tek tabakalı ve çok tabakalı karbon nanotüplerle kıyaslandığında akciğer fibroblast hücreleri (Kisin ve ark., 2011) ve fare keratinositleri (Grabinski ve ark., 2007) üzerinde CNF'lerin daha düşük toksiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Henüz kanser tedavisine yönelik kullanımlarına dair kısıtlı araştırmalar mevcuttur (Magrez ve ark., 2006).

Araştırmamızda, CNF'leri seçmemizin nedenlerinden biri, yüzey alanı/hacim oranının fazla olmasının getirdiği çeşitli kompozisyon ve fizikokimyasal özelliklere sahip nano ölçekli kolloidal taşıyıcılar olmalarıdır. Çalışmamızda öncelikle CNF'lerin, NIH/3T3 hücrelerinin büyümesine olan sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle incelenmiş ve yapılan analizlerde proliferasyon yüzdesi < %70 bulunan nanomalzemelerin modifikasyon çalışmaları yürütülmüştür. Asit aktivasyonu ile üretilen modifiye nanolifler (ACNF) ile de deneyler tekrarlanmış ve ACNF'lerin sitotoksik etkisi başlangıçtaki CNF'lerden daha düşük bulunmuştur.

Karbon nanomalzemelerden nanotüp ve nanolif yapılarının birlikte çalışıldığı başka bir çalışmada, dosetaksel ve miyomisin C adlı kemoterapötik ajanlar nanoyapılara yüklenerek prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Erdmann ve ark., 2017). Dosetaksel ve miyomisin C, tek başına prostat kanser hücrelerinin canlılığını sırasıyla %94 ve %68'e düşürürken, nanoliflerle kombine bir tedavi %30'dan daha az canlı hücre kalmasını sağlamıştır. Kombine tedavilerde görülen sonuçların elde edilebilmesi için kemoterapotiklerin 7-17 kat daha yüksek konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulduğu vurgulanmıştır. Buna karşılık, karbon nanomalzemelerle kombine halde bu konsantrasyonların azaltılabileceği gösterilmiştir. Karbon nanotüpler de benzer sonuçlara sahip olmasına rağmen nanolifler kadar etkili bir sonuç elde edilmemiştir (Erdmann ve ark., 2017).

CNF ve gümüş nanopartiküllerin kullanıldığı başka bir çalışmada, CNF'lerin oksidatif strese karşı savunma mekanizmalarında, hücrelerin büyüme ve farklılaşması, adezyonu, göçü ve proliferasyonunu düzenleyerek dokuların korunması ve onarılmasında fonksiyonel olan sekiz genin (FN1, MMP1, CAT, CDH1, COL4A1, FBN, GPX1 ve TGFB1) ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Salesa ve ark., 2021). Bu sonuçlar, CNF nanomalzemelerinin doku mühendisliği ve yara iyileşmesi gibi biyomedikal uygulamalardaki benzersiz büyük potansiyelini göstermektedir.

CNF'lerin antikanser ajanı olarak tek başına veya kemoterapötik ilaç yüklenmiş olarak etkilerinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Ancak bu kemoterapötik ilaçların kanser hücreleri proliferasyonuna etkili sonucu olmasına rağmen beraberinde birçok yan etkiye sahip oldukları da görülmüştür. Günümüz kanser tedavilerindeki asıl sorun kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların kanserli dokuyla birlikte insan vücudundaki sağlıklı hücrelere de sitotoksik etkisinin bulunmasıdır. Bizim çalışmamızda da CNF'lerin tek başına uygulandığında doza bağlı olarak NIH/3T3 fare fibroblast hücre proliferasyonunu % 40-60 oranında inhibe ettiğini belirledik. Asit ve Glisin ile yaptığımız modifikasyonlara ve bu modifikasyonlar sonucu oluşan ACNF'lere VD yüklememize rağmen bu sitotoksik aktivitenin devam ettiğini gözlemledik. Literatür incelendiğinde CNF'lerin mekanik, termal, ıslanabilirlik, hücre yapışması ve çoğalma özellikleri açısından geliştirilmiş fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip sitotoksik olmayan kompozitler üretmek amacıyla aljinat gibi biyopolimerlerle birleştirildiği tespit edilmiştir (Llorens-Gámez ve Serrano-Aroca, 2018; Rivera-Briso ve ark., 2020). Ayrıca aerojel yapısının geniş yüzey alanı ve gözenekli yapısı ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımını sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada ibuprofen yüklü ipek fibroin aerojellerin geniş zaman aralığındaki etkinliğiyle hedef dokuya taşınmasında etkili olabileceği belirtilmiştir (Marin ve ark., 2014). Aynı zamanda aljinat-aerojellerin geliştirildiği başka bir çalışmada ise ilaç taşınımı ve salınımında da etkili olduğu gözlenmiştir (Veronovski ve ark., 2013).

Bu nedenle biz de VD yüklediğimiz ACNF taşıyıcı sistemini sodyum aljinat ile birleştirerek oluşturduğumuz aerojellerin normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirledik. ACNF-VD'nin farklı dozlarını içeren ve sodyum aljinatla kompozit

oluşturan Aero1 adlı taşıyıcı sistemin Aero2'ye göre normal hücre proliferasyonunu daha kararlı bir biçimde arttırdığı tespit edildi. Aero1'in içerdiği VD miktarı kesikli adsorpsiyon yöntemiyle belirlendi ve bu dozun karşılık geldiği VD konsantrasyonunu da içeren 0,05-3 μM konsantrasyon aralığında yapılan sitotoksite çalışmasında VD'nin tek başına hem normal hem de HCT-116 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde toksik etkisi olmadığı saptandı. Varghese ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada, VD_3'ün HCT-116 hücreleri için sitotoksik IC_{50} konsantrasyonunu 15 μM olarak belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise nanoemülsiyon şeklinde verilen VD'nin doza ve zamana bağlı olarak HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği; 24 saat sonunda HCT-116 hücreleri için IC_{50} konsantrasyonunun 40,6 μM, HT-29 içinse 50,1 μM olduğu belirlenmiştir (Razak ve ark., 2019).

Yukarıda da belirtildiği gibi VD, anti-kanser etkisini özellikle fizyolojik konsantrasyonun çok üstündeki dozlarda gösterdiğinden dolayı hiperkalseminin etkili olduğu yan etkilere yol açmaktadır (Almouazen ve ark., 2013). Tüm bu nedenler VD için ilaç taşıyıcı sistemlerin önemini ortaya koymaktadır. Ramalho ve ark.'nın yaptığı çalışmada, poly-laktik-co- glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllere yüklenmiş VD'nin akciğer kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi gösterilirken, morfolojik özelliklerinde de değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir (Ramalho ve ark., 2015). Ek olarak, Sabzichi ve ark. (2017)'nın lipit nanopartiküllere yüklenmiş VD'nin meme kanser hücrelerinde serbest VD'ye kıyasla apoptozu uyarmada iki kat etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, taşıyıcı sistem olarak kullanılacak bu nanopartikül yapıların yüksek maliyeti ve yarı ömrünün kısa olması taşıyıcı sistem geliştirilmesinde sınırlayıcı faktörler arasında yer almaktadır.

Bu tez çalışması ile üretilen Aero1 ilaç taşıyıcı sisteminin, her iki kolon kanseri hücresinde apoptotik mekanizmanın iç sinyal yolağını tetikleyerek hücre ölümüne neden olduğu belirlendi. Kaspaz-9 ve kaspaz-3 enzim aktivitesinin artması ve mitokondri membran polarizasyonunun azalması iç yolağın tetiklendiğini gösteren en önemli bulgulardır. Varghese ve ark.'nın çalışmasında da VD'nin HCT-116 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesini arttırarak apoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımızı destekleyen bir başka çalışmada da, nanopartiküllere yüklenmiş VD'nin HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzim aktivitelerini arttırarak

apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Razak ve ark., 2019). VD'nin kolon kanseri hücrelerinde bulunan VD reseptörüne (VDR) bağlanması sonucu, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) düzeylerinde meydana gelen artış, kalmodulin (CAM) ve bağımlı kinaz II (CAMKII) proteinlerini ve ardından Bcl-2 ile ilişkili X (BAX) proteinini aktive ederek mitokondriyal hasarı tetiklemektedir. MMP'de meydana gelen azalma sonucu membran depolarize olur ve sitokrom C enzimi daha sonra mitokondriyal zardan sitozole sızar ve kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu tetiklemektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında VD taşıyıcı platform olarak geliştirdiğimiz aerojel yapıdaki ACNF-VD kompozit ilaç taşıyıcı sisteminin, HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir. Üretilen platformların sağlıklı hücreler üzerinde artan dozlarda bile yüksek biyouyumluluk oranı sergiledikleri görülmüştür. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçların, kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi için faydalı olacağı ve ayrıca üretilecek diğer ilaç taşıyıcı sistemler için bilgi sağlayıcı olacağı düşünülmektedir.

Hedefe yönelik, biyouyumluluğu yüksek ve ekonomik olarak ucuz VD taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve optimizasyonu başta kanser olmak üzere, VD eksikliğinin neden olduğu kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, karaciğer hastalıkları, renal, solunumsal ve nörolojik bozuklukların önlenmesini de sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

Abdo GG, Zagho MM, al Moustafa AE, Khalil A, Elzatahry AA. A comprehensive review summarizing the recent biomedical applications of functionalized carbon nanofibers. Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials. 2021; 1893–1908.

Ahmad A, Khan F, Mishra RK, Khan R. Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. Journal of Medicinal Chemistry. 2019; 10475–10496.

Alexandroy LB, Zhivagui M. Mutational signatures and the etiology of human cancers. Encyclopedia of Cancer. 2018; 499–510.

Almouazen E, Bourgeois S, Jordheim LP, Fessi H, Briançon S. Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation. Pharmaceutical research, 2013; 30(4): 1137–1146.

Arya N, Arora A, Vasu KS, Sood AK, Katti DS. Combination of single walled carbon nanotubes/graphene oxide with paclitaxel: a reactive oxygen species mediated synergism for treatment of lung cancer. Nanoscale. 2013;5(7): 2818–2829.

Badr EAE, Ali Assar MF, Gohar SF, Badr MH, Hathout RM, El-kousy SM. The clinical impact of miRNA34a and P53 gene expression in colon cancer," Biochemistry and Biophysics Reports. 2018; 16: 88–95.

Barbáchano A, Larriba MJ, Ferrer-Mayorga G, González-Sancho JM, Muñoz A. Vitamin D and Colon Cancer," Vitamin D: Fourth Edition. 2017; 837–862.

Beekman AC, Barentsen ARW, Woerdenbag HJ, Uden WV, Pras N, Konings AWT, El-Feraly FS, Galal AM, Wikström H. Stereochemistry-dependent cytotoxicity of some artemisinin derivatives. Journal of natural products. 1997; 60(4): 325–330.

Bhaskaran NA, Kumar L. Treating colon cancers with a non-conventional yet strategic approach. An overview of various nanoparticulate systems. Journal of Controlled Release. 2021; 16–39.

Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. Chemistry and Biology. 2014; 319–329.

Bostick RM. Effects of supplemental vitamin D and calcium on normal colon tissue and circulating biomarkers of risk for colorectal neoplasms. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2015; 86–95.

Budtova T, Aguilera DA, Beluns S, Berglund L, Chartier C, Espinosa E, Gaidukovs S, Klimek-Kopyra A, Kmita A, Lachowicz D, Liebner F, Platnieks O, Rodríguez A, Katherine L, Navarro T, Zou F, Buwalda SJ. Polymers Biorefinery Approach for Aerogels. 2020.

Campbell MJ, Trump DL. Vitamin D Receptor Signaling and Cancer. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2017; 1009–1038.

Cappell MS. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. Gastroenterology Clinics of North America. 2008; 1–24.

Carlberg C, Muñoz A. An update on vitamin D signaling and cancer. Seminars in Cancer Biology. 2022; 217–230.

Chan ZCK, Leong KH, Kareem HS, Norazit A, Noor SM, Ariffin A. Activation of death receptor, DR5 and mitochondria-mediated apoptosis by a 3,4,5-trimethoxybenzyloxy derivative in wild-type and p53 mutant colorectal cancer cell lines," Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2020; 393(3); 405–417.

Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. Physiol Rev. 2016; 96: 365–408.

Colston K, Colston MJ, Feldman D. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. Endocrinology. 1981; 108:1083-1086.

Dai J, Luo Y, Nie D, Jin J, Yang S, Li G, Yang Y, Zhang W. pH/photothermal dual-responsive drug delivery and synergistic chemo-photothermal therapy by novel porous carbon nanofibers. Chemical Engineering Journal. 2020; 397.

Dou R, Ng K, Giovannucci EL, Manson JE, Qian ZR, Ogino S. Vitamin D and colorectal cancer: Molecular, epidemiological and clinical evidence. British Journal of Nutrition. 2016; 115(9): 1643–1660.

Eatemadi A, Daraee H, Karimkhanloo H, Kouhi M, Zarghami N, Akbarzadeh A, Abasi M, Hanifehpour Y, Joo SW. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. Nanoscale research letters. 2014; 9(1); 1–13.

El-Sharkawy A, Malki A. Vitamin D signaling in inflammation and cancer: Molecular mechanisms and therapeutic implications. Molecules. 2020.

Erdmann K, Ringel J, Hampel S, Wirth MP, Fuessel S. Carbon nanomaterials sensitize prostate cancer cells to docetaxel and mitomycin C via induction of apoptosis and inhibition of proliferation. Beilstein journal of nanotechnology. 2017; 8(1): 1307–1317.

Feldman D, Krishnan Av, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ, The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nature Reviews Cancer. 2014; 342–357.

Fernández-Barral A, Bustamante-Madrid P, Ferrer-Mayorga G, Barbáchano A, Larriba MJ, Muñoz A. Vitamin D effects on cell differentiation and stemness in cancer. Cancers 2020; 1–19.

Forgue-Lafitte ME, Coudray AM, Brã©ant B, Mester J. Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT29: Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c-myc Oncogene1. 1989.

García-González CA, Budtova T, Durães L, Gaudio P, del Gurikov P, Koebel M, Liebner F, Neagu M, Smirnova I. Opinion An Opinion Paper on Aerogels for Biomedical and Environmental Applications. Molecules. 2019; 24: 1815.

García-González CA, Sosnik A, Kalmár J, de Marco I, Erkey C, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Aerogels in drug delivery: From design to application. Journal of Controlled Release. 2021; 332: 40–63.

Grabinski C, Hussain S, Lafdi K, Braydich-Stolle L, Schlager J. Effect of particle dimension on biocompatibility of carbon nanomaterials. Carbon. 2007; 45(14): 2828-2835.

Hampel S, Kunze D, Haase D, Krämer K, Rauschenbach M, Ritschel M, Leonhardt A, Thomas J, Oswald S, Hoffmann V, Büchner B. Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: A nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth. Nanomedicine. 2008; 3(2): 175–182.

Jain KK. Current status and future prospects of drug delivery systems. Methods in Molecular Biology. 2014; 1141: 1–56.

Javed M, Althwanay A, Ahsan F, Oliveri F, Goud HK, Mehkari Z, Mohammed L, Rutkofsky I. H. Role of Vitamin D in Colorectal Cancer: A Holistic Approach and Review of the Clinical Utility. Cureus. 2020; 19(9): 10734.

Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. Mol. Endocrinol. 2001; 15: 1370-1380.

Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. Experimental and Molecular Medicine. 2018; 50: 20.

Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. The Activating Enzymes of Vitamin D Metabolism (25- and 1α-Hydroxylases). Vitamin D, Volume 1: Biochemistry, Physiology and Diagnostics, Chapter 5, Fourth Edition. Canada: Queen's University; 2018, p: 57–79.

Kallay E, Buburuzan L. Vitamin D Inflammation and Cancer. Vitamin D: Fourth Edition. 2017; 891–911.

Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2019; 16(12): 713–732.

Khalyfa AA, Punatar S, Aslam R, Yarbrough A, Org AY. Exploring the Inflammatory Pathogenesis of Colorectal Cancer. Diseases. 2021; 9: 79.

Kisin ER, Murray AR, Sargent L, Lowry D, Chirila M, Siegrist KJ, Schwegler-Berry D, Leonard S, Castranova V, Fadeel B, Kagan VE, Shvedova AA. Genotoxicity of carbon nanofibers: are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos?. Toxicol Appl Pharmacol. 2011; 252 (1): 1-10.

Kistler SS. Coherent Expanded Aerogels and Jellies. Nature. 1931; 127(3211):741.

Krishnan Av, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention and Treatment. Rheumatic Disease Clinics of North America. 2012; 161–178.

Kulabaş N, Tatar E, Bingöl Özakpınar Ö, Özsavcı D. Pannecouque C, de Clercq E, Küçükgüzel İ. Synthesis and antiproliferative evaluation of novel 2-(4H-1,2,4-triazole-3-ylthio) acetamide derivatives as inducers of apoptosis in cancer cells. European journal of medicinal chemistry. 2016;121: 58–70.

Kumar N, Gangwar AK, Sangeeta Devi K. Carbon Fibers in Biomedical Applications. Recent Developments in the Field of Carbon Fibers. IntechOpen. 2018.

Leyssens C, Verlinden L , Verstuyf A. The future of vitamin D analogs. Front. Physiol. 2014; 5:122.

Liu W, Zhang L, Xu HJ, Li Y, Hu CM, Yang JY, Sun MY. The anti-inflammatory effects of vitamin D in tumorigenesis. International Journal of Molecular Sciences. 2018; 19(9): 2736.

Llorens-Gámez M, Serrano-Aroca Á. Low-Cost Advanced Hydrogels of Calcium Alginate/Carbon Nanofibers with Enhanced Water Diffusion and Compression Properties. Polymers. 2018; 10: 405.

Loh KP, Ho, D, Chiu GNC, Leong DT, Pastorin G, Chow EKH. Clinical Applications of Carbon Nanomaterials in Diagnostics and Therapy. Advanced Materials. 2018;30 (47).

Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forró L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. Nano Lett. 2006; 6(6): 1121-5.

Mahmood M, Casciano DA, Mocan T, Iancu C, Xu Y, Mocan L, Iancu DT, Dervishi E, Li Z, Abdalmuhsen M, Biris AR, Ali N, Howard P, Biris AS. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. Journal of Applied Toxicology. 2010; 30(1): 74–83.

Mahmood M, Karmakar A, Fejleh A, Mocan T, Iancu C, Mocan L, Iancu DT, Xu Y, Dervishi E, Li Z, Biris AR, Agarwal R, Ali N, Galanzha EI, Biris AS, Zharov VP. Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of carbon nanotubes and anti-tumor drug. Nanomedicine (London, England). 2009; 4(8): 883–893.

Manzocco L, Mikkonen KS, García-González CA. Aerogels as porous structures for food applications: Smart ingredients and novel packaging materials. Food Structure. 2021; 28: 100188.

Marin MA, Mallepally RR, McHugh MA. Silk fibroin aerogels for drug delivery applications. The Journal of Supercritical Fluids. 2014; 91: 84-89.

Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I. HT29 Cell Line, The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. 2015; 113–124.

Meeker S, Seamons A, Maggio-Price L, Paik J. Protective links between Vitamin D, inflammatory bowel disease and colon cancer. World Journal of Gastroenterology. 2016; 933–948.

Minisola S, Ferrone F, Danese V, Cecchetti V, Pepe J, Cipriani C, Colangelo L. Controversies surrounding vitamin D: Focus on supplementation and cancer. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019.

Mondul AM, Weinstein SJ, Layne TM, Albanes D. Vitamin D and Cancer Risk and Mortality: State of the Science, Gaps, and Challenges. Epidemiologic reviews. 2017; 39(1): 28–48.

Moukayed M, Grant WB. The roles of UVB and vitamin D in reducing risk of cancer incidence and mortality: A review of the epidemiology, clinical trials, and mechanisms. Reviews in endocrine & metabolic disorders. 2017; 18(2): 167–182.

Muzi L, Ménard-Moyon C, Russier J, Li J, Chin CF, Ang WH, Pastorin G, Risuleo G, Bianco A. Diameter-dependent release of a cisplatin pro-drug from small and large functionalized carbon nanotubes. Nanoscale. 2015; 7(12): 5383–5394.

Naeem M, Awan UA, Subhan F, Cao J, Hlaing SP, Lee J, Im E, Jung Y, Yoo JW. Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. Archives of Pharmacal Research. 2020; 153–169.

Ngo Q, Yamada T, Suzuki M, Ominami Y, Cassell AM, Li J, Meyyappan M, Yang CY. Structural and electrical characterization of carbon nanofibers for interconnect via applications. IEEE Transactions on Nanotechnology. 2007; 6(6): 688–695.

Ozsavci D, Ersahin M, Sener A, Bingol-Ozakpinar O, Toklu HZ, Sener G, Yegen B. The Novel Function of Nesfatin-1 as an Anti-inflammatory and Antiapoptotic Peptide in Subarachnoid Hemorrhage-induced Oxidative Brain Damage in Rats. Neurosurgery. 2011; 68 (6): 1699-1708.

Ramalho MJ, Coelho MAN, Pereira MC. Nanoparticles for Delivery of Vitamin D: Challenges and Opportunities: A Critical Evaluation of Vitamin D- Clinical Overview. 2017.

Ramalho MJ, Loureiro JA, Gomes B, Frasco MF, Coelho MAN, Pereira MC. PLGA nanoparticles as a platform for vitamin D-based cancer therapy. Beilstein Journal of Nanotechnology. 2015; 6: 1306-1318.

Razak S, Afsar T, Almajwal A, Alam I, Jahan S. Growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells induced by Vitamin D-Nanoemulsion (NVD): Involvement of Wnt/β-catenin and other signal transduction pathways. Cell and Bioscience. 2019; 9(1).

Ringel J, Erdmann K, Hampel S, Kraemer K, Maier D, Arlt M, Kunze D, Wirth MP, Fuessel S. Carbon nanofibers and carbon nanotubes sensitize prostate and bladder cancer cells to platinum-based chemotherapeutics. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2014; 10(3): 463–477.

Rivera-Briso AL, Aachmann FL, Moreno-Manzano V, Serrano-Aroca Á. Graphene oxide nanosheets versus carbon nanofibers: Enhancement of physical and biological properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films for biomedical applications. Int. J. Biol. Macromol. 2020; 143: 1000-1008.

Sabzichi M, Mohammadian J, Mohammadi M, Jahanfar F, MovassaghPour A, Hamishehkar H, Ostad-Rahimi A. Vitamin D-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC): A New Strategy for Enhancing Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. Nutrition and Cancer. 2017; 69: 840–848.

Salesa B, Assis M, Andrés J, Serrano-Aroca Á. Carbon Nanofibers versus Silver Nanoparticles: Time-Dependent Cytotoxicity, Proliferation, and Gene Expression. Biomedicines. 2021 Sep 3; 9(9): 1155.

Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An update on vitamin d metabolism. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 1–19.

Shirafkan N, Shomali N, Kazemi T, Shanehbandi D, Ghasabi M, Baghbani E, Ganji M, Khaze V, Mansoori B, Baradaran B. microRNA-193a-5p inhibits migration of human HT-29 colon cancer cells via suppression of metastasis pathway. Journal of Cellular Biochemistry. 2019; 120(5): 8775–8783.

Shrivastava P, Sharma R, Gautam L, Vyas S, P. Vyas S. Nanoparticles and colon cancer. Nano Drug Delivery Strategies for the Treatment of Cancers. 2021; 191–223.

Simon J, Flahaut E, Golzio M. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. Materials. 2019; 12(4): 624.

Singer A, Barakat Z, Mohapatra S, Mohapatra SS. Nanoscale Drug-Delivery Systems. Nanocarriers for Drug Delivery. 2019; 395–419.

Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2013; 48(3): 416.

Su C, Huang DP, Liu JW, Liu WY, Cao YO. miR-27a-3p regulates proliferation and apoptosis of colon cancer cells by potentially targeting BTG1. Oncology Letters. 2019; 18(3): 2825–2834.

Sun J. Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Macroautophagy in Inflammation and Infection, Discovery Medicine. 2011; 11(59): 325-335.

Sunar BS, Hasçiçek C. Elektroeğrilmiş nanoliflerin ılaç taşiyici sistem olarak ve doku mühendisliğinde kullanımı. Marmara Pharmaceutical Journal. 2017; 21(3): 425–435.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021; 71(3): 209–249.

Şenkardeş S, B. Özakpınar Ö, Özsavcı D, Şener A, Çevik Ö, Güniz Küçükgüzel. Synthesis of Diflunisal Thiazolidinones as Anticancer Agents. Anti-cancer agents in medicinal chemistry. 2016; 16(10): 1266–1274.

Tayyab Noman M, Amor N, Ali A, Petrik S, Coufal R, Adach, K, Fijalkowski M. gels Aerogels for Biomedical, Energy and Sensing Applications. 2021; 7: 64.

Turanlı Y, Acartürk F. Nanofibers and Applications as Colon Specific Drug Delivery System. Journal of Literature Pharmacy Sciences. 2018; 7(1): 11–23.

Varghese JE, Shanmugam V, Rengarajan RL, Meyyazhagan A, Arumugam VA, Al-Misned FA, El-Serehy HA. Role of vitamin D3 on apoptosis and inflammatory-associated gene in colorectal cancer: An in vitro approach. Journal of King Saud University – Science. 2020; 32 (6): 2786-2789.

Veronovski A, Knez Z, Novak Z. Preparation of multi-membrane alginate aerogels used for drug delivery. The Journal of Supercritical Fluids. 2013; 79: 209-218.

Wang Z, Wu S, Wang J, Yu A, Wei G. Carbon nanofiber-based functional nanomaterials for sensor applications. Nanomaterials. 2019; 9(7): 1045.

Wesselink E, Bours MJL, de Wilt, JHW, Aquarius M, Breukink SO, Hansson B, Keulen ETP, Kok DE, van den Ouweland J, van Roekel EH, Snellen M, Winkels R, Witkamp R.F, van Zutphen M, Weijenberg MP, Kampman E, van Duijnhoven FJB. Chemotherapy and vitamin D supplement use are determinants of serum 25-hydroxyvitamin D levels during the first six months after colorectal cancer diagnosis. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2020; 199.

Woloszynska-Read A, Johnson CS, Trump DL. Vitamin D and cancer: Clinical aspects. Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism. 2011; 25(4): 605–615.

Wu X, Zhou T, Cao N, Ni J, Wang X. Role of Vitamin D Metabolism and Activity on Carcinogenesis. Oncology Research. 2015; 22(3): 129.

Yadav D, Amini F, Ehrmann A. Recent advances in carbon nanofibers and their applications – A review. European Polymer Journal. 2020.

Zhang Y, Xia Y, Sun J. A simple and sensitive method to detect vitamin D receptor expression in various disease models using stool samples. Genes and Diseases. 2021; 8(6): 939–945.

ÖZGEÇMİŞ