



POLİTEKNİK DERGİSİ

JOURNAL of POLYTECHNIC

ISSN: 1302-0900 (PRINT), ISSN: 2147-9429 (ONLINE)

URL: <http://dergipark.gov.tr/politeknik>



İnsan kolon kanseri hücrelerine karşı inorganik nanopartikül-temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması: partikül büyüklüğünün antikanser aktivitesine etkisi

Using inorganic nanoparticle-based drug delivery systems against human colon cancer cells: effect of particle size on anticancer activity

Yazar(lar) (Author(s)): Cenk DAĞLIOĞLU

ORCID: 0000-0002-3857-2317

Bu makaleye şu şekilde atıfta bulunabilirsiniz (To cite to this article): Dağlıoğlu C., “İnsan kolon kanseri hücrelerine karşı inorganik nanopartikül-temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması: partikül büyüklüğünün antikanser aktivitesine etkisi”, *Politeknik Dergisi*, 23(1): 171-179, (2020).

Erişim linki (To link to this article): <http://dergipark.gov.tr/politeknik/archive>

DOI: 10.2339/politeknik.496351

İnsan Kolon Kanseri Hücrelerine Karşı İnorganik Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Kullanılması: Partikül Büyüklüğünün Antikanser Aktivitesine Etkisi

Araştırma Makalesi / Research Article

Cenk DAĞLIOĞLU*

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Urla/İzmir 35430, Türkiye
(Geliş/Received : 12.12.2018 ; Kabul/Accepted : 11.03.2019)

ÖZ

Günümüz nanopartikül teknolojisi, özellikle kanser nanotıp uygulamalarında kullanılmak üzere istenilen boyut, şekil ve malzemeye sahip nanopartikül-temelli ilaç taşıyıcı sistemlerinin sentezine olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla, partikül boyutlarının antikanser aktivite üzerindeki etkisini anlamak, kanser tedavisinde yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır. Bu nedenle, bu çalışmada, ilaç taşıyıcı sistemler olarak iki farklı büyüklükteki inorganik temelli nanopartiküller (~ 55 ve 314 nm) kullanıldı ve boyutlarının hücresel birikim, sitotoksisite ve apoptoz üzerindeki etkileri insan kolon kanseri Caco-2 ve HCT-116 hücrelerine karşı araştırıldı. Elde edilen sonuçlar, büyük nanopartiküllerle karşılaştırıldığında küçük nanopartiküllerin her iki kanser hücresinde de hızlı nanopartikül birikimini desteklediğini gösterdi. Küçük nanopartiküller, büyük nanopartiküllere göre 48 saat içinde daha düşük yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri ile kanser hücrelerinde daha yüksek sitotoksisite sergiledi. Öte yandan, her iki nanopartikül de 72 saate varan inkübasyon süreleri sonrası benzer IC₅₀ değerleri gösterdi. Ayrıca, küçük nanopartiküller 24 saatte apoptotik hücrelerin sayısını artırırken, büyük nanopartiküllerin 72 saatlik süre içerisinde apoptozu indüklediği belirlendi. Bu gözlemler, küçük boyutlu ilaç taşıma sistemlerinin, büyük boyutlu ilaç taşıma sistemleri ile karşılaştırıldığında, insan kolon kanseri hücrelerinde kemoterapötik ilaçların antikanser etkilerini artırmada daha verimli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İlaç taşıma sistemleri, partikül boyutu, kolon kanseri, Caco-2 hücreleri, HCT-116 hücreleri.

Using Inorganic Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems against Human Colon Cancer Cells: Effect of Particle Size on Anticancer Activity

ABSTRACT

Today's nanoparticle technology enables the synthesis of nanoparticle-based drug delivery systems with desired size, shape, and materials especially for the applications of cancer nanomedicine. Thereby, understanding impact of particle sizes on anticancer activity will contribute to development of new drug delivery systems in cancer therapy. For this reason, in this study, two different sized nanoparticles (with ~55 and 314 nm) were used as drug delivery systems and the effects of their size on the cellular uptake, cytotoxicity and apoptosis were investigated against the human colon carcinoma Caco-2 and HCT-116 cells. The results demonstrated that small nanoparticles promoted fast nanoparticle accumulation in both cancer cells in comparison to large particles. Small nanoparticles exhibited higher cytotoxicity in cancer cells with lower half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values than large nanoparticles in 48 h. On the other hand, both nanoparticles showed similar IC₅₀ values after 72 h prolonged exposure. Moreover, it was found that small nanoparticles increased the number of apoptotic cells in 24 h, whereas large nanoparticles induced apoptosis when exposure time increased to 72 h. These observations show that small sized drug delivery systems could be more efficient for improving the anticancer effects of chemotherapeutic drugs against human colon carcinoma as compared to large sized drug delivery systems.

Keywords: Drug delivery systems, particle size, colon cancer, Caco-2 cells, HCT-116 cells.

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Son zamanlarda ilaç taşıyıcı sistemler; tümör belgelerini hedefleyebilme, düşük çözünürlüğe sahip antikanser ilaçların biyoyararlanımlarını artırma, sistemik toksisiteyi engelleme ve çoklu ilaç dirençliliğini elimine etme

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author)
e-posta : cenkdaglioglu@iyte.edu.tr

gibi özellikleri sayesinde kanser araştırmalarında çok fazla çalışmada ön plana çıkmıştır [1-5]. Günümüze kadar geliştirilen çok sayıda ilaç taşıyıcı sistemleri arasında, manyetik özelliğe sahip inorganik-temelli nanopartiküller aynı anda hem diyagnostik hem de terapötik uygulamalarda kullanılabilirliği açısından umut vericidir. Bu partiküllerin, sentezlerinin kolaylığı ve

çeşitli hücre-spesifik hedefleme, görüntüleme ve terapötik fonksiyonların sisteme kolayca entegre edilebilmesinden dolayı akıllı nano ilaç taşıyıcılar olarak kullanılmaları mümkün hale gelmiştir [6-7]. Son zamanlarda taşıyıcı sistemlerin boyutlarının intratümör birikime ve antikanser aktiviteye etkisine odaklanan çok sayıda çalışma mevcuttur [8]. Çünkü tümörlü bölgelerde oluşan anormal biyo-bariyerlerin üstesinden gelmek için, sentezlenen nanopartikül boyutlarının karakterizasyonu, taşıyıcı sistemlerin antikanser etkinliğini anlama ve kapasitelerini geliştirme açısından çok büyük öneme sahiptir. Nanopartiküllerin boyutu hücre zarına bağlanma kabiliyetlerini belirlerken, ayrıca taşıyıcı sistemlerin yüzeyleri kanser hücreleri tarafından aşırı ifade edilen reseptörlere spesifik ligandlarla modifiye edilerek aktif olarak hücrelerle nanopartiküller arasındaki etkileşim oranları artırılabilir [9]. Bu sayede, nanopartiküller aracılığıyla kanser hücrelerinin içindeki ilaç konsantrasyonları artırılırken, antikanser ilaçların normal hücrelere karşı oluşturabileceği sistemik toksisite de minimize edilmektedir.

Vücudun koruma mekanizmaları arasında yer alan ve nanopartiküllerin temizlenmesinden sorumlu olan retikuloendotelial sistem (RES) üzerinde yapılan çalışmalarda, 10 ila 100 nm arasında değişen çaplardaki nanopartiküllerin bir yandan RES tarafından alınması önlenirken, diğer taraftan daha uzun kan dolaşım sürelerine sahip oldukları gösterilmiştir [10]. Fakat yapılan çalışmalar incelendiğinde, aynı boyutlardaki nanopartiküllerin antikanser aktiviteleri üzerinde belirgin örtüşmeler saptanamamıştır, çünkü her tümör tipinin sahip olduğu özgün patolojik özellikleri yanında aynı tümör içindeki farklı bölgelere karşıda farklı önemli davranışlar gözlemlenmiştir [11-13]. Bundan dolayı tek bir boyuta indirgenen nanopartikül tasarımları bütün kanser tiplerine karşı en etkili yaklaşım olmayabilir. Bu nedenle nanopartikül tasarımının ilgili tam lokasyona ve koşullara (primer veya metastatik tümör, tümör evresi ve agresiflik, konakçı organ, bölgesel vasküler özellikler ve hemodinami gibi) göre dizayn edilmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra nanopartikül boyutu taşıyıcı sistemlere ilaç yüklenmesi ve salınımı da etkilemektedir. Daha küçük partiküllerin yüzey alanı/hacim oranı daha büyük olduğundan ilaç salınım hızları daha yüksel olurken, büyük partiküller sahip oldukları büyük çekirdek yapıları sayesinde daha fazla ilaç yüklemesine olanak sağlarken daha yavaş bir ilaç salınım karakteri gösterirler [14-15].

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, ilaç taşıyıcı sistemleri olarak 100 nm'den küçük ve büyük olmak üzere iki farklı büyüklükteki nanopartiküllerin (~ 55 ve 314 nm) insan kolon kanseri Caco-2 ve HCT-116 hücrelerine karşı göstermiş oldukları antikanser aktiviteleri araştırıldı. Bunun için, yapısı daha önceki çalışmalarımızda geliştirilen ve fizikokimyasal olarak karakterize edilen bir antikanser ilaç taşıyıcı sistem olan $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ multifonksiyonel nanopartikül formülasyonları kullanıldı [16-18]. İlgili nanopartiküllerin, antikanser etkinlikleri, iki farklı insan

kolon kanseri hücrelerine karşı göstermiş oldukları (1) hücresel alım, (2) floresan görüntüleme, (3) sitotoksik ve (4) proapoptotik etkileri araştırılarak karşılaştırıldı.

2. MALZEME VE YÖNTEM (MATERIAL AND METHOD)

2.1. Malzeme (Materials)

3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) ve tripsin *Sigma-Aldrich Chemicals* 'dan, %10 fetal bovin serumu (FBS), streptomisin, penisilin, L-glutamik asit, RPMI-1640 besiyeri *Gibco Life technologies* 'den temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve denemeler boyunca ultra saf su kullanılmıştır.

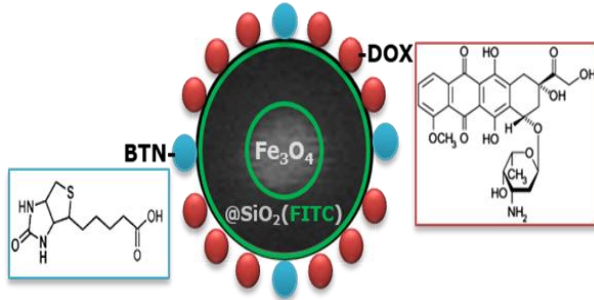
2.2. Hücre Kültürü (Cell Cultures)

Caco-2 ve HCT-116 (insan kolon karsinoma) hücre hatları İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Kanser hücreleri, 10% (v/v) fetal bovin serumu (FBS), 100 µg/mL streptomisin, 100 U/mL penisilin ve 2 mM L-glutamik asit içeren RPMI-1640 besiyeri içinde kültüre edildi. Kültür, steril koşullar altında 37 °C de, %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde gerçekleştirildi.

2.3. Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Sentezi ve Karakterizasyonu (Synthesis and Characterization of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems)

$Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartikül formülasyonuna sahip ilaç taşıyıcı sistemleri kaynakça 16 ve 17 de tarif edildiği gibi daha önceki çalışmalarımızda sentezlendi. Bunun için ilk olarak demir oksit (Fe_3O_4) çekirdek yapısı Fe^{+2}/Fe^{+3} tuzlarının ortak çöktürülmesi yöntemiyle sentezlendi. Bu aşamada farklı boyutlarda nanopartikül elde etmek için çekirdek yapı farklı konsantrasyonlarda (0.1 ve 0.6 mL) oleik asit ile kaplanarak stabilize edildi. Nanopartiküllerin biyoyumluluk kazanması ve ayrıca fizikokimyasal metodlarla yüzeylerinin fonksiyonelleştirilebilmesi için, demir oksit çekirdek, silika polimeri ile kaplandı. Bu amaç için sol-jel kimyasından yararlanıldı ve tetraetil ortosilikat (TEOS) ile demir oksit çekirdek kaplanarak $Fe_3O_4@SiO_2$ nanopartikül yapısı oluşturuldu. Daha sonra nanopartiküllerin hücre tarafından alındığının optik olarak izlenebilmesi için, $Fe_3O_4@SiO_2$ nanopartikül yapısına floresan özelliğine sahip floresin izotiyosiyanat (FITC) enkapsüle edildi. Enkapsülasyon sayesinde, nanopartiküllerin fotokimyasal stabilitesini artırması sağlandı. Bu işlemler sonrasında, in vivo ve in vitro koşullarda takip edilebilen, silika manyetik-floresan [$Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$] nanopartikülleri oluşturuldu. Daha sonra nanopartikül yüzeylerinin biyotin (BTN) ile esterifikasyonu sağlanarak, aktif tümör hedefleme özelliği kazandırıldı. Son adımda ise, model bir antikanser ilaç olarak doksorubisin (DOX), amin-fonksiyonel nanopartikül yüzeyine schiff-bazı kimyası ile bağlanarak $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$

formülasyonuna sahip ilaç taşıyıcı sistemlerinin sentezi gerçekleştirildi (Şekil 1). Nanopartiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonları, dinamik ışık saçılım spektrometresi (DLS), zeta-potansiyeli ölçümü, X-ışınları difraksiyon analizi (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve elektron mikroskobu teknikleri (SEM, STEM ve EDX) ile gerçekleştirildi [16-18].



Şekil 1. $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartikül-temelli ilaç taşıyıcı sistemlerinin şematik gösterimi. Nanopartiküllerin çekirdek-kabuk yapısı (beyaz çekirdek-gri kabuk) taramalı-geçirimli elektron mikroskobu (STEM) aracılığıyla elde edildi. Gri silika kabuk içerisine FITC enkapsülasyonu sağlandı. Nanopartiküllerin yüzeyindeki kırmızı küreler antikanser ilaç doksorubisini (DOX), mavi küreler hedefleme ajanı biyotini (BTN) temsil etmektedir. (Schematic representation of nanoparticle-based drug delivery systems $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$. *The core-shell structure of the nanoparticle (white core-gray shell) was obtained from the scanning transmission electron microscopy (STEM). The FITC label (the contrast agent) encapsulated in the grey shell of the nanoparticles. Red circles represent the chemotherapeutic agent doxorubicin (DOX), whilst blue circles represent targeting agent biotin (BTN)

2.4. Hüresel Alım Deneyleri (Cellular Uptake Analysis)

Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartiküllerinin, Caco-2 ve HCT-116 kanser hücrelerini hedefleme potansiyelleri floresan mikroskopu kullanılarak araştırıldı.

Mikroskobik görüntüleme için, Caco-2 ve HCT-116 hücreleri 100.000 hücre/mL yoğunluğunda 6 kuyulu plakalarda 10 $\mu\text{g/mL}$ nanopartikül konsantrasyonunda 4 ve 12 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler; nanopartiküllere enkapsüle edilen FITC için yeşil kanalda, nanopartiküllere konjuge edilen ilaç için kırmızı kanalda, hücre çekirdek boyası DAPI için mavi kanalda ve hücre genel görüntüsü için aydınlık alanda floresan mikroskobu altında optik olarak izlendi. Nanopartiküllerin hüresel alımı, Olympus IX71 floresan mikroskobu kullanılarak görüntülendi. İlgili görüntülerin fotoğrafları CCD kamera kullanılarak çekildi ve ImageJ programı kullanılarak analiz edildi.

2.5. Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksik Etkileri (Cell Viability Analysis of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems)

Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartiküllerinin, Caco-2 ve HCT-116 kanser

hücreleri üzerinde gösterdikleri sitotoksiste, MTT yöntemi kullanılarak belirlendi.

Sitotoksiste çalışmaları için, Caco-2 ve HCT-116 hücreleri 10.000 hücre/mL yoğunluğunda 96 kuyulu plakalarda 0.1 / 1.0 / 10 / 50 / 100 / 200 $\mu\text{g/mL}$ nanopartikül konsantrasyonlarıyla 24 / 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Bu inkübasyonlardan sonra, hücreler 0.5 mg/mL MTT içeren ortamda 4 saat inkübe edildi ve ardından plakalar 1800 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucukda oluşan formazan kristalleri 150 μL DMSO içerisinde çözüldü ve 570 nm deki absorbansları mikropilaka okuyucu aracılığıyla okunarak "yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları" (IC_{50}) belirlendi. IC_{50} değerleri GraphPad Prism 7.0 yazılımı ile hesaplandı.

2.6. Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Pro-apoptotik Etkileri (Proapoptotic effects of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems)

Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartiküllerinin, Caco-2 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerinde gösterdikleri pro-apoptotik etkileri hücre çekirdek morfolojileri aracılığıyla, DAPI boyama yöntemiyle, Olympus IX71 floresan mikroskobu kullanılarak optik olarak analiz edildi.

Zamana bağımlı apoptoz çalışmaları için, Caco-2 ve HCT-116 hücreleri 100.000 hücre/mL yoğunluğunda 6 kuyulu plakalarda IC_{50} konsantrasyonlarındaki nanopartiküllerle 24 / 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası fosfat tamponlu çözelti (PBS) ile yıkanan hücreler 10 dakika boyunca % 4 paraformaldehit ile fikse edildi, ardından üç defa PBS ile yıkandı. Hücreler daha sonra 10 dakika boyunca % 0.1 Triton-X ile muamele edilerek hücre membranının geçirgenliği artırıldı ve akabinde tekrardan üç defa PBS ile yıkandı. Son olarak her bir kuyu 5 μL 1 mg/mL yoğunluğundaki DAPI çözeltisi ile boyandı. Boyama sonrası hücre çekirdekleri floresan mikroskobu altında optik olarak incelendi ve yoğunlaşmış veya parçalanmış çekirdekli hücreler apoptotik hücreler olarak kabul edildi. Görüntüler ImageJ programı aracılığıyla analiz edildi.

2.7. İstatistiksel Analiz (Statistical Analysis)

Tüm veriler, ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verildi. İstatistiksel analizler Student's *t* testi kullanılarak Microsoft Excel yazılımı aracılığıyla yapıldı. $P \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

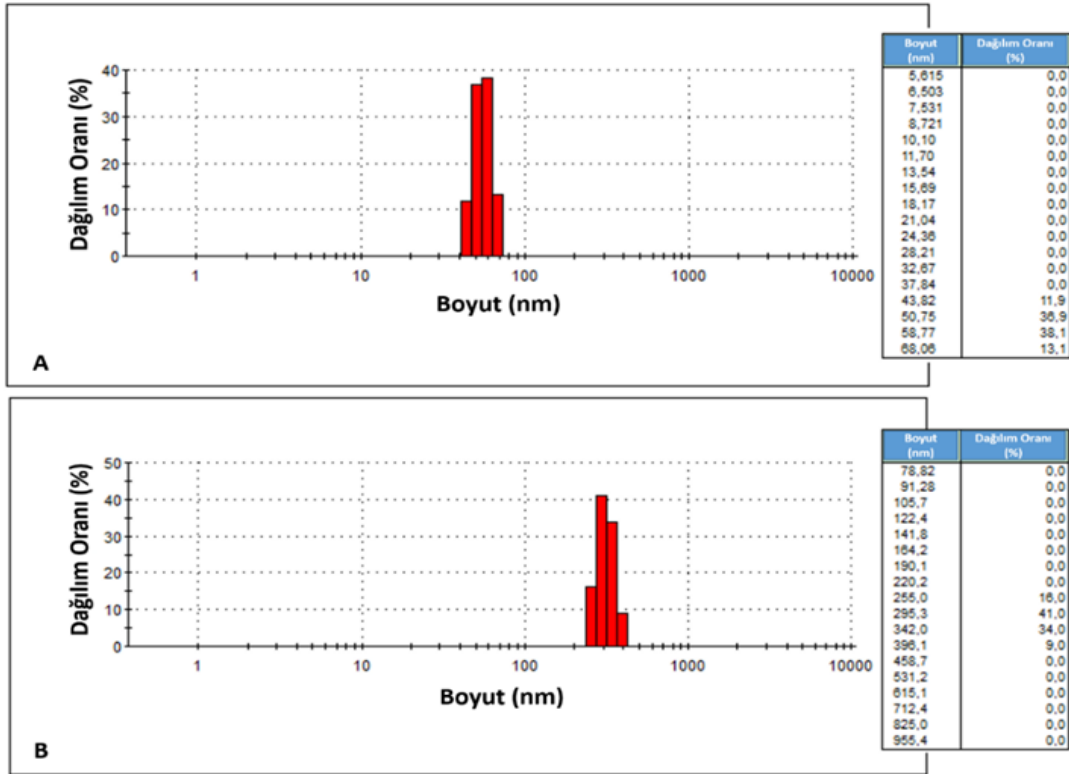
3.1. Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Sentezi ve Karakterizasyonu (Synthesis and Characterization of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems)

İlaç taşıyıcı sistemlerinin demir oksit (Fe_3O_4) çekirdek yapısı [$Fe^{+2} + 2Fe^{+3} + 8OH^- = Fe_3O_4 + 4H_2O$] kimyasal reaksiyon formülüne göre kaynakça 16 da gösterildiği

gibi sentezlendi. Bu aşamada inorganik çekirdek yapısı farklı konsantrasyonlarda (0.1 ve 0.6 mL) oleik asit ile kaplanarak sentez sırasında nanopartiküllerin büyüklüğü düzenlendi. Nanopartikül büyüklükleri, manyetit çekirdek üzerinde oleat iyonlarının artan konsantrasyonlarda kemisorbsiyonuna bağlı olarak, artan miktarda oleik asit ile düzenli olarak arttı. 0.1 mL oleik asit ile kaplanan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin hidrodinamik çapı yaklaşık 5 ± 1 nm iken 0.6 mL oleik asit ile kaplanan nanopartiküllerin çapı yaklaşık 19 ± 7 nm olarak belirlendi. Daha sonra silika polimeri ile kaplanan nanopartiküllere optik olarak izlenebilmesi için floresan özelliğine sahip FITC enkapsüle edildi ve $[Fe_3O_4@SiO_2(FITC)]$ nanopartikül yapısı oluşturuldu. Son olarak sırasıyla nanopartikül yüzeyine bir aktif hedefleme ajanı olarak biyotin (BTN) ve model bir antikanser ilaç olarak doksorubisin (DOX) konjuge edilerek $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX formülasyonuna sahip nanopartikül-temelli ilaç taşıyıcı sistemleri sentezlendi. Hızla bölünen kanser hücreleri, özellikle hızlı büyümelerini sürdürebilmek için belirli vitaminlere aşırı ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle vitamin alınmasına katılan reseptörler, kanserleşen hücre yüzeylerinde aşırı miktarda ifade edilmeye başlamaktadır [19]. Bu reseptör artışları sayesinde, vitamin-bağlantılı bu tür ilaç taşıma sistemleri daha yüksek afinitede tümör hücrelerini aktif olarak hedefleyebilmektedir. Hedefleme ajanı ve ilaç konjugasyonu adımları sonrası nanopartiküllerin hidrodinamik çapları sırasıyla yaklaşık 55 ± 7 ve 314 ± 39 nm olarak belirlendi (Şekil 2).

3.2. Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerinin Hüresel Alımı (Cellular Uptake Analysis of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems)

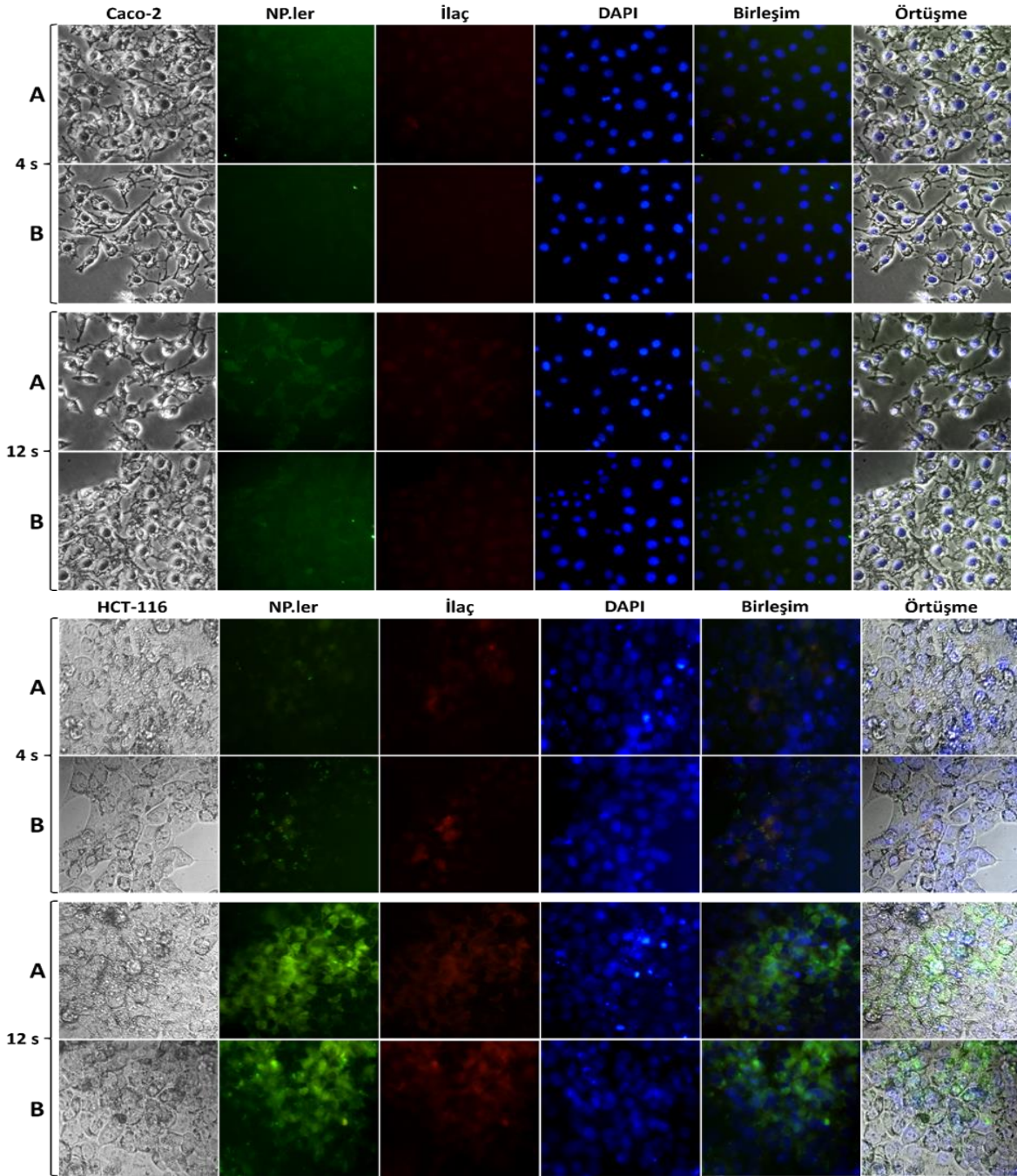
Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX nanopartiküllerinin Caco-2 ve HCT-116 kanser hücrelerini hedefleme potansiyellerinin araştırılması için aydınlık alan ve floresan mikroskop görüntüleri çekildi (Şekil 3). Nanopartiküllerin hüresel lokalizasyonları, floresan görüntülerine karşılık gelen aydınlık alan görüntülerinin karşılaştırılmasıyla elde edildi. Hüresel alımı takip etmek için hücre çekirdeği ayrıca DAPI ile boyandı. Her iki boyuttaki nanopartikülün zamana bağımlı olarak artan oranlarda kanser hücrelerini hedefleyebildiği, fakat küçük nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerindeki hücre içi floresan yoğunluklarının, büyük nanopartiküllerle karşılaştırıldığında, daha yüksek olduğu belirlendi. 4 saatlik inkübasyon sonrası küçük partiküllerin Caco-2 hücre içi yoğunlukları büyük partiküllere oranla daha yüksekken, 12 saatlik inkübasyon sonrası büyük partiküllerin hücre içi birikim yoğunluklarının küçük partiküllerin seviyesine ulaştığı belirlendi. HCT-116 kanser hücrelerinde ise, her iki boyuttaki nanopartikül de zamana bağımlı olarak benzer hücre içi yoğunluklara ulaşırken, 12 saatin sonunda, Caco-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında, daha fazla hücre içi partikül birikim verimi elde edildi. Bu sonuçlar, $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX formülasyonuna sahip ilaç taşıyıcı sistemlerinin Caco-2 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerine başarılı bir şekilde nüfuz



Şekil 2. (A) 0.1 mL oleik asit stabilize ve (B) 0.6 mL oleik asit stabilize $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX nanopartiküllerinin boyut-dağılım grafikleri. (Size distribution of (A) 0.1 mL and (B) 0.6 mL oleic acid stabilized $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX nanoparticles)

edebildiğini, fakat Caco-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında, HCT-116 hücrelerine karşı her iki boyuttaki nanopartikülün de yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar, ilaç

taşıyıcı sistemlerinin tümör tipine göre tasarlanması gerekliliğini vurgulamaktadır.



Şekil 3. Caco-2 ve HCT-116 hücrelerinin (A) küçük ve (B) büyük boyuttaki nanopartiküller ile 4 ve 12 saatlik inkübasyonları sonrası hücresel alım floresan mikroskobu görüntüleri. Sütunlar için sırasıyla: (1) Caco-2 ve HCT-116 hücrelerinin aydınlık alan görüntüleri; (2) hücre içindeki nanopartiküllerin yeşil floresan görüntüleri; (3) hücre içine taşınan doksorubisinin kırmızı floresan görüntüleri; (4) DAPI ile boyanan hücre çekirdeklerinin mavi floresan görüntüleri; (5) nanopartikül, ilaç ve DAPI floresan görüntülerinin üst üste birleştirilmesi; (6) aydınlık alan, nanopartikül, ilaç ve DAPI görüntülerinin üst üste örtüşürülmesi. (Fluorescence microscopy images of Caco-2 and HCT-116 cells after incubation with (A) small and (B) large nanoparticles for 4 and 12 h. The nanoparticles were observed as green fluorescence, DOX was observed as red fluorescence and DAPI was observed as blue fluorescence. For columns: (1) bright-field images; (2) fluorescence images of nanoparticles; (3) fluorescence images of DOX; (4) the stained nuclei of cells with DAPI; (5) the merger of nanoparticles, DOX and DAPI; and (6) overlay of bright-field images and fluorescence images)

3.3. Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksik Etkileri (Cell Viability Analysis of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems)

Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX nanopartiküllerinin Caco-2 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerinde nasıl bir sitotoksik etki gösterdiğini incelemek için, zamana bağımlı MTT hücre proliferasyonu analizi yapıldı. Bunun için, kanser hücrelerine 24 / 48 ve 72 saat boyunca artan konsantrasyonlarda (0.1-200 $\mu g/mL$) nanopartiküller uygulandı. $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX nanopartikülleri, Caco-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında, HCT-116 hücrelerine karşı ilk 48 saatlik süreçte daha düşük IC_{50} değeri ile daha güçlü bir sitotoksik etki sergiledi. Öte yandan, nanopartiküller 72 saatlik inkübasyon sonrası her iki hücrede de benzer IC_{50} değerleri ile yakın sitotoksik etki gösterdi. Küçük partiküller, büyük

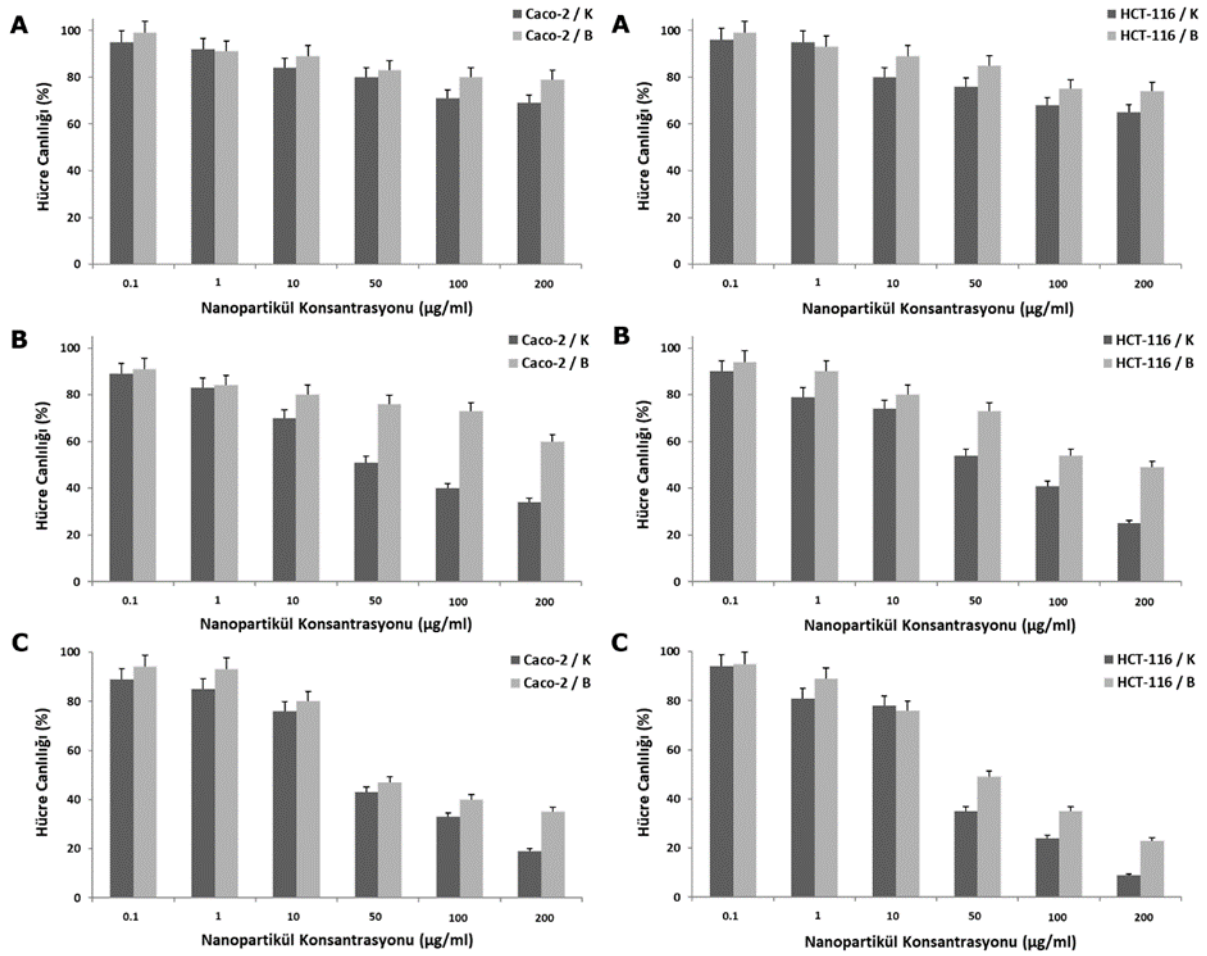
sonuçlarını desteklerken ilgili nanopartikül formülasyonlarının HCT-116 kanser türüne karşı daha yüksek sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4). Büyük partiküller daha uzun inkübasyon süreleri sonrası küçük partiküllerin gösterdiği sitotoksik değerlere ulaşmaktadır. Bunun nedeni olarak, küçük partiküllerin hücresel alım verimliliklerinin daha yüksek olduğundan bahsedebileceğimiz gibi, küçük partiküllerin yüzey alanı/hacim oranı büyük partiküllere göre daha büyük olduğundan ilaç salınım hızları daha yüksel olmaktadır, fakat büyük partiküller sahip oldukları büyük çekirdek yapıları sayesinde daha fazla ilaç yüklemesine olanak sağlarken daha yavaş bir ilaç salınım karakteri gösterdiklerinden sitotoksik etkileri ancak zamana bağımlı olarak artış göstermektedir [14-15]. Benzer bir şekilde daha önce yaptığımız çalışmalarda da, ilaç taşıma sistemleri olarak tasarladığımız nanopartiküller,

Çizelge 1. Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX nanopartikül formülasyonlarının Caco-2 ve HCT-116 hücrelerindeki 24 / 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri. Değerler üç bağımsız denemenin ortalama \pm SS'sını temsil etmektedir. (The IC_{50} values of different sized $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -BTN/DOX nanoparticles in Caco-2 and HCT-116 cells when incubated for 24 /48 and 72 h. Values represent the mean \pm SD of three independent experiments)

Hücreler	Nanopartiküller ($\mu g/mL$)	24 saat	48 saat	72 saat
Caco-2	Küçük NP'ler	325.3 \pm 34.5	103.6 \pm 9.3	81.9 \pm 9.9
	Büyük NP'ler	531.2 \pm 48.8	274.7 \pm 20.7	98.7 \pm 5.3
HCT-116	Küçük NP'ler	271.4 \pm 22.3	95.3 \pm 13.9	68.8 \pm 4.6
	Büyük NP'ler	380.7 \pm 35.7	167.2 \pm 12.4	92.5 \pm 6.8

partiküller ile karşılaştırıldığında, her iki kolon kanseri türüne karşı ilk 48 saatlik süreçte daha sitotoksik etki gösterirken, 72 saate varan inkübasyonlar sonrası her iki partikülde benzer IC_{50} değerleri sergiledi (Çizelge 1). Bu sonuçlar, ilaç taşıyıcı sistemlerin hücresel alım

biyokimyasal profilleri birbirlerinden farklı olan çeşitli kanser hücrelerine karşı değişen oranlarda sitotoksik etki sergilemiştir [16-18,20-21].

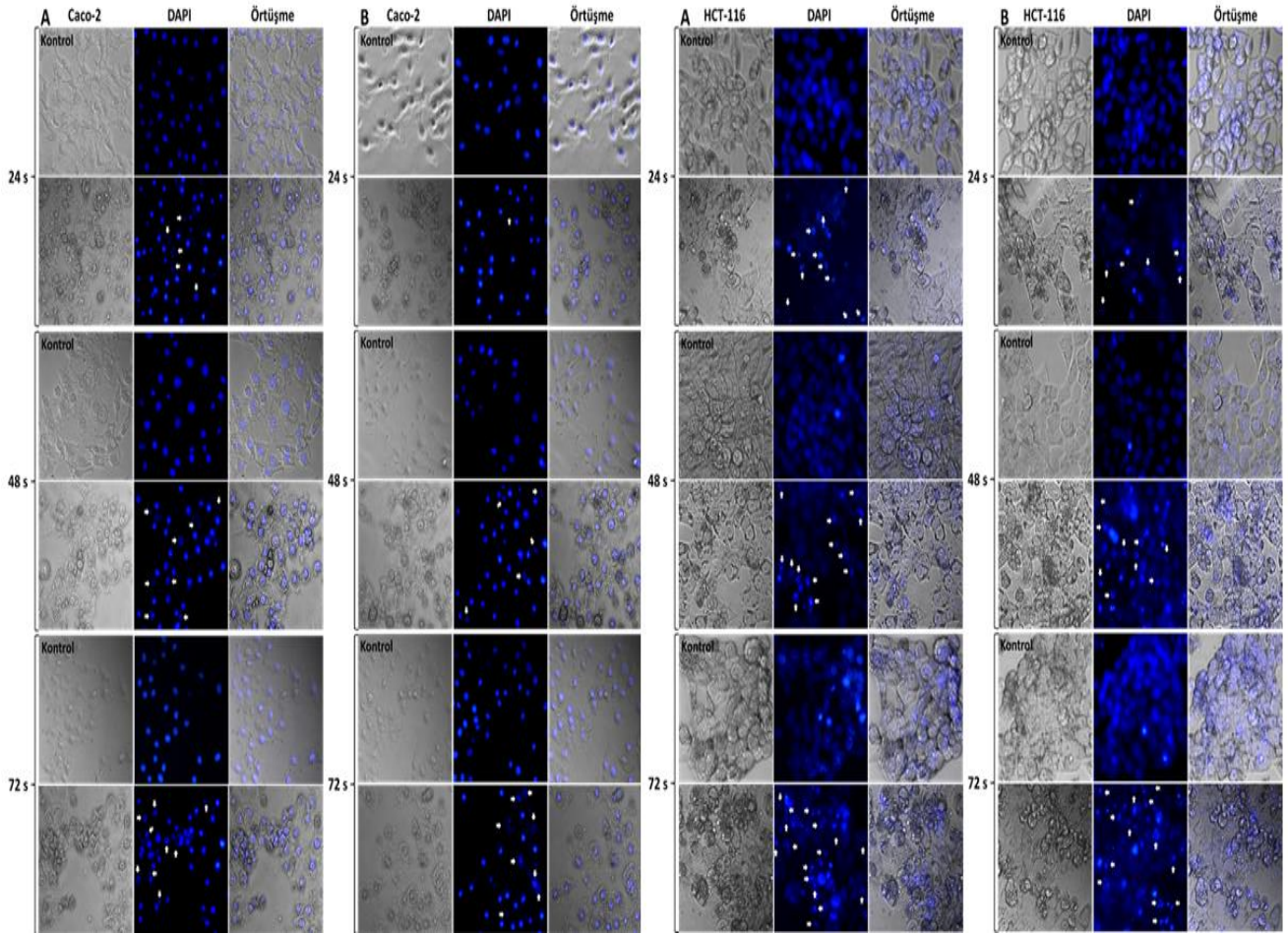


Şekil 4. Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartikül formülasyonlarının Caco-2 ve HCT-116 hücreleri üzerinde gösterdiği (A) 24, (B) 48 ve (C) 72 saatlik antikanser aktiviteleri. K: küçük nanopartiküller B: büyük nanopartiküller. Her bir kolon üç bağımsız denemenin ortalama \pm SS'sını temsil etmektedir. (Anticancer activities of different sized $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanoparticles against Caco-2 and HCT-116 cells after (A) 24, (B) 48 and (C) 72 of growth. K: small and B: large nanoparticles. Each column represents the mean \pm SD of three independent experiments)

3.4. Nanopartikül-Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Pro-apoptotik Etkileri (Proapoptotic effects of Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems)

Farklı boyutlardaki $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartiküllerinin Caco-2 ve HCT-116 kanser hücreleri üzerinde gösterdiği 24 / 48 ve 72 saatlik apoptotik etkileri, floresan mikroskopu altında yoğunlaşmış veya parçalanmış çekirdekli hücreler incelenerek araştırıldı. Şekil 5. de görüldüğü üzere $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartikülleri, Caco-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında, HCT-116 hücrelerine karşı daha yüksek düzeyde apoptoz indüksiyonu gerçekleştirdi. Büyük partiküller Caco-2 hücrelerine karşı ancak 72

saatlik süreç sonunda kayda değer bir apoptotik etki gösterirken, HCT-116 hücrelerinde küçük partiküllerle benzer oranlarda bir apoptotik etki sergiledi. Bu sonuçlar göstermektedir ki, $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)-BTN/DOX$ nanopartikülleri HCT-116 kanser hücrelerine daha hızlı bir şekilde kemoterapötik ajan yüklemesi sağlamakta ve bu sayede DOX-aracılı apoptoz oranlarını Caco-2 kanser hücrelerine oranla aynı zaman dilimi içerisinde daha yukarı seviyelere taşımaktadırlar. Bununla birlikte, nanopartikül boyutları HCT-116 kolon kanser türüne karşı apoptotik aktiviteyi etkilemezken, Caco-2 kanser türünde ise hücre alım düzeyleri daha yüksek olan küçük nanopartiküllerin daha yüksek oranlarda apoptotik etki sergilediği görülmüştür.



Şekil 5. Caco-2 ve HCT-116 hücrelerinin (A) küçük ve (B) büyük boyuttaki nanopartiküller ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonrası apoptotik çekirdeklerinin floresan mikroskobu görüntüleri. İlk satırlar nanopartikül uygulanmayan kontrol hücreleri ve çekirdeklerini göstermektedir. Oklarla gösterilen apoptotik hücreler nükleer parçalanma ve daha parlak mavi floresans göstermektedir. Sütunlar için sırasıyla: (1) Caco-2 ve HCT-116 hücrelerinin aydınlık alan görüntüleri; (2) DAPI ile boyanan hücre çekirdeklerinin mavi floresan görüntüleri; (3) aydınlık alan ve DAPI görüntülerinin üst üste örtüştürülmesi. (Apoptosis analysis of Caco-2 and HCT-116 cells treated with small (K) and large (B) nanoparticles for 24, 48 and 72 h, by fluorescence microscopy. Untreated cells served as control cells. Morphological changes of cell nuclei stained with DAPI were observed under fluorescence microscopy and arrows indicated apoptotic cells present nuclear fragmentation and brighter blue fluorescence. For columns: (1) bright-field images; (2) the stained nuclei of cells with DAPI; (3) overlay of bright-field images and fluorescence images of DAPI)

4. GENEL DEĞERLENDİRME (CONCLUSION)

Bu çalışmada, iki farklı büyüklükteki nanopartikül-temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin, insan kolon kanseri Caco-2 ve HCT-116 hücrelerine karşı göstermiş oldukları antikanser aktiviteleri araştırıldı. Bunun için nanopartikül boyutlarının kolon kanseri hücrelerine karşı göstermiş oldukları hücresel birikim, sitotoksosite ve apoptoz üzerindeki etkileri karşılaştırıldı. Hücresel alım deneyleri ile her iki boyuttaki nanopartikülün zamana bağımlı olarak artan oranlarda kanser hücrelerini hedefleyebildiği, fakat küçük nanopartiküllerin Caco-2 kanser hücreleri tarafından alım kapasitelerinin büyük nanopartiküllere oranla daha yüksek olduğu belirlendi. Öte yandan, her iki hücre türünde de ilk 48 saat içinde küçük nanopartiküller, büyük nanopartiküllere göre daha düşük yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50})

değerleri ile daha yüksek sitotoksosite sergilerken, 72 saate varan inkübasyon süreleri sonrası iki farklı boyuttaki nanopartikülde benzer IC_{50} değerlerine ulaştı. Pro-apoptotik çalışmalarda, nanopartikül boyutları HCT-116 kolon kanser türüne karşı apoptotik aktiviteyi kayda değer bir oranda etkilemezken, Caco-2 kanser türünde ise hücresel alım düzeyleri ile paralel doğrultuda küçük nanopartiküller daha yüksek oranlarda apoptotik aktivite sergiledi. Bu sonuçlar göstermektedir ki, nanopartikül boyutları HCT-116 kolon kanseri türüne karşı antikanser aktiviteyi çok fazla etkilemezken, Caco-2 kanser türünde ise, nanopartikül boyutlarına göre hücresel alım seviyeleri değişmekte ve bu durum hücre içi ilaç konsantrasyonlarını etkilediği için paralelinde antikanser aktivitede etkilenmektedir. Sonuç olarak bu gözlemler, küçük boyutlu ilaç taşıma sistemlerinin, büyük boyutlu

ilaç taşıma sistemleri ile karşılaştırıldığında, insan kolon kanseri hücrelerinde kemoterapötik ilaçların antikanser etkilerini artırmada daha verimli olduğunu göstermektedir.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Laboratuvarından çalışma fırsatı sağladığı için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Sayın Hocam Doç. Dr. Alper Arslanoğlu'na en içten dileklerle teşekkür ederim.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Müller R. H, Jacobs C. and Kayser O., “Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future”, *Adv Drug Deliv Rev.*, 47: 3–19, (2001)
- [2] Jaracz S., Chen J., Kuznetsova L. V. and Ojima I., “Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates”, *Bioorg. Med. Chem.*, 13: 5043–5054, (2005)
- [3] Müller R. H. and Peters K., “Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique”, *Int J Pharm.*, 160: 229–237, (1998)
- [4] Rizzo L. Y., Theek B., Storm G., Kiessling F. and Lammers T., “Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24: 1159–1166, (2013)
- [5] Shapira A., Livney Y. D., Broxterman H. J. and Assaraf Y. G., “Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance”, *Drug Resist Updat.*, 14: 150–163, (2011)
- [6] Sun C., Lee J. S. and Zhang M., “Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery”, *Adv Drug Deliv Rev.*, 60: 1252–1265, (2008)
- [7] Park J. H., von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S. N. and Sailor M. J., “Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magneto-fluorescent imaging and drug delivery”, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 47: 7284–7288, (2008)
- [8] Sykes E. A., Chen J., Zheng G. and Chan W. C., “Investigating the Impact of Nanoparticle Size on Active and Passive Tumor Targeting Efficiency”, *ACS Nano.*, 8: 5696–706, (2014)
- [9] Danhier F., Feron O. and Préat V., “To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery”, *J. Control. Release*, 148: 135–146, (2010)
- [10] Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L. V. and Muller R. N., “Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications”, *Chem. Rev.*, 108: 2064–2110, (2008)
- [11] Uchiyama K., Nagayasu A., Yamagiwa Y., Nishida T., Harashima H. and Kiwada H., “Effects of the size and fluidity of liposomes on their accumulation in tumors: A presumption of their interaction with tumors”, *Int. J. Pharm.*, 121: 195–203, (1995)
- [12] Nagayasu A., Shimooka T., Kinouchi Y., Uchiyama K., Takeichi Y. and Kiwada H., “Effects of fluidity and vesicle size on antitumor activity and myelosuppressive activity of liposomes loaded with daunorubicin”, *Biol Pharm Bull.*, 17: 935–939, (1994)
- [13] Nagayasu A., Uchiyama K. and Kiwada H., “The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs”, *Adv Drug Deliv Rev.*, 40: 75–87, (1999)
- [14] Gao J. H., Gu H. W. and Xu B., “Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications”, *Acc. Chem. Res.*, 42: 1097–1107, (2009)
- [15] Lee J. E., Lee N., Kim H., Kim J., Choi S. H., Kim J. H., Kim T., Song I. C., Park S. P., Moon W. K. and Hyeon T., “Uniform mesoporous dye-doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery”, *J. Am. Chem. Soc.*, 132: 552–557, (2010)
- [16] Daglioglu C. and Okutucu B., “Synthesis and characterization of AICAR and DOX conjugated multifunctional nanoparticles as a platform for synergistic inhibition of cancer cell growth”, *Bioconjug. Chem.*, 27: 1098–1111, (2016)
- [17] Daglioglu C., “Enhancing tumor cell response to multidrug resistance with pH-sensitive quercetin and doxorubicin conjugated multifunctional nanoparticles”, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 156: 175–185, (2017)
- [18] Daglioglu C., “Environmentally responsive dual-targeting nanoparticles: improving drug accumulation in cancer cells as a way of preventing anticancer drug efflux”, *J. Pharma. Sci.*, 107: 934–941, (2018)
- [19] Russell-Jones G., McTavish K., McEwan J., Rice J. and Nowotnik D., “Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumors”, *J. Inorg. Biochem.*, 98: 1625–1633, (2004)
- [20] Daglioglu C. and Okutucu B., “Therapeutic effects of AICAR and DOX conjugated multifunctional nanoparticles in sensitization and elimination of cancer cells via survivin targeting”, *Pharm. Res.*, 34: 175–84, (2017)
- [21] Daglioglu C., “İlaç Taşıma Sistemleri olarak Nanopartiküller kullanılarak Pasif ve Aktif Tümör Hedeflemelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi”, *Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 6: 01-07, (2018)