



POLİTEKNİK DERGİSİ

*JOURNAL of POLYTECHNIC*

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

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



**Pasif tümör hedefli inorganik ilaç nanotaşıyıcıların akciğer sağlıklı ve kanser hücreleri üzerindeki uzun dönemli etkisi**

*Long term effect of passive tumor targeted inorganic drug nanocarriers on lung healthy and cancer cells*

*Yazar(lar) (Author(s)):* Cenk DAĞLIOĞLU<sup>1</sup>, Fatma Necmiye KACI<sup>2</sup>

*ORCID<sup>1</sup>:* 0000-0002-3857-2317

*ORCID<sup>2</sup>:* 0000-0003-3745-8173

**Bu makaleye şu şekilde atıfta bulunabilirsiniz (To cite to this article):** Dağlıoğlu C. ve Kaci F. N., “Pasif tümör hedefli inorganik ilaç nanotaşıyıcıların akciğer sağlıklı ve kanser hücreleri üzerindeki uzun dönemli etkisi”, *Politeknik Dergisi*, 23(3): 649-656, (2020).

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

**DOI:** 10.2339/politeknik.496354

# Pasif Tümör Hedefli İnorganik İlaç Nanotaşıyıcıların Akciğer Sağlıklı ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Uzun Dönemli Etkisi

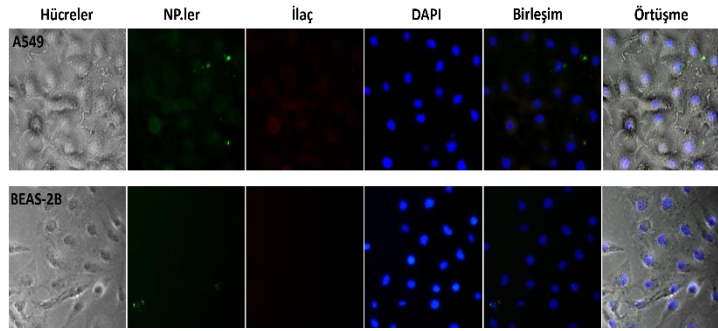
## Long Term Effect of Passive Tumor Targeted Inorganic Drug Nanocarriers on Lung Healthy and Cancer Cells

### Önemli noktalar (Highlights)

- ❖ İlaç nanotaşıyıcıların akciğer sağlıklı ve kanser hücreleri üzerindeki uzun dönem etkileri araştırıldı. / Long time exposure effect of drug nanocarriers was examined on lung healthy and cancer cells.
- ❖ Nanotaşıyıcılar kanser hücresi canlılığını kısa inkübasyon sürecinde etkin bir şekilde azalttı. / The nanocarriers showed efficient reduction of cancer cell viability in short exposure time.
- ❖ Uzun inkübasyon sürecinde, sağlıklı hücreler düşük düzeylerde ilaç-aracılı sitotoksosite sergiledi. / During prolonged exposure, the nanocarriers exhibited lower level drug-mediated cytotoxicity on healthy cells.

### Grafik Özet (Graphical Abstract)

A549 ve BEAS-2B hücrelerinin 48 saatlik nanotaşıyıcı inkübasyonları sonrası hücresel alım floresan mikroskobu görüntüleri. / Fluorescence microscopy images of A549 and BEAS-2B cells after 48 h nanocarriers incubations.



### Amaç (Aim)

Bu çalışmada, pasif hedefli ilaç nanotaşıyıcıların insan akciğer epitel BEAS-2B hücreleri ve insan akciğer kanser A549 hücreleri üzerindeki uzun dönem etkileri araştırıldı. / This study examined long time exposure effect of passively targeted drug nanocarriers on human lung epithelial BEAS-2B cells and human lung cancer A549 cells.

### Tasarım ve Yöntem (Design & Methodology)

Görüntüleme ve tedavi edici özellikleri bir arada barındıran ilaç nanotaşıyıcıları kullanıldı ve hücresel birikim, sitotoksosite ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırıldı. / Drug nanocarriers combining imaging and therapy were used and its cellular uptake, cytotoxicity and apoptotic effects were investigated.

### Özgünlük (Originality)

Aktif hedefli muadillerine göre, pasif hedefli nanotaşıyıcılar tümörlü dokularda daha yavaş ve düşük düzeyde ilaç birikimi sağladığından kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerde uzun süre bu nanotaşıyıcılara maruz kalmaktadır. / Tumor accumulation of passively targeted nanocarriers is generally more slowly and lower compared to their active counterparts. Thus in addition to cancer cells, healthy cells are also exposed to these nanocarriers at the same time.)

### Bulgular (Findings)

Pasif hedefli nanotaşıyıcılar kanser hücresi canlılığını etkin bir şekilde azaltırken, 24 saatlik inkübasyon sürecinde sağlıklı hücreler üzerinde kayda değer bir etki görülmedi. Ayrıca, nanotaşıyıcılar A549 hücrelerindeki apoptoz seviyelerini önemli ölçüde artırırken, BEAS-2B hücrelerinde 96 saat sonunda dahi apoptotik etki göstermedi. / Passively targeted nanocarriers showed efficient reduction of cancer cell viability. This did not affect internalization and viability of healthy cells in 24 h. Moreover, it was found that the nanocarriers considerable increased the percent of apoptotic cells in A549 cells whereas showed no apoptotic effect in BEAS-2B cells in 96h.

### Sonuç (Conclusion)

Bu sonuçlar, pasif hedefli inorganik ilaç nanotaşıyıcıların, sağlıklı hücreleri ihmal edilebilir düzeyde etkileyerek, antikanser ilaçların kemoterapötik etkilerini artırmada umut verici olduğunu göstermektedir. / These results show that passively targeted inorganic drug nanocarriers could be promising for enhancing the chemotherapeutic effects of anticancer drugs, while producing negligible effects on healthy cells.

### Etik Standartların Beyanı (Declaration of Ethical Standards)

Bu makalenin yazarları çalışmalarında kullandıkları materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve/veya yasal-özel bir izin gerektirmediğini beyan ederler. / The authors of this article declare that the materials and methods used in this study do not require ethical committee permission and/or legal-special permission.

# Pasif Tümör Hedefli İnorganik İlaç Nanotaşıyıcılarının Akciğer Sağlıklı ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Uzun Dönemli Etkisi

*Araştırma Makalesi / Research Article*

**Cenk DAĞLIOĞLU<sup>1\*</sup>, Fatma Necmiye KACI<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Urla/İzmir 35430, Türkiye

<sup>2</sup>Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Yakutiye/Erzurum 25050, Türkiye

(Geliş/Received : 31.12.2018 ; Kabul/Accepted : 08.07.2019)

## ÖZ

İlaç nanotaşıyıcıları, kontrollü ve sürekli ilaç salım özellikleri ile kanser tedavisinde büyük bir potansiyele sahiptir. Bu nanotaşıyıcılar pasif veya aktif hedefli olarak ilaç taşınımı sağlayabilmektedir, ancak aktif hedefli muadillerine göre, pasif hedefli nanotaşıyıcılar tümörlü dokularda daha yavaş ve düşük düzeyde ilaç birikimi sağladığından kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerde uzun süre bu nanotaşıyıcılara maruz kalmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, pasif hedefli ilaç nanotaşıyıcıların insan akciğer epitel BEAS-2B hücreleri ve insan akciğer kanser A549 hücreleri üzerindeki uzun dönem etkileri araştırıldı. Bunun için, görüntüleme ve tedavi edici özellikleri bir arada barından  $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX formülasyonuna sahip ilaç nanotaşıyıcıları kullanıldı ve hücresel birikim, sitotoksikite ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırıldı. Hücresel alım ve sitotoksikite deneyleri, pasif hedefli nanotaşıyıcıların kanser hücresi canlılığının etkin bir şekilde azalttığını gösterirken, 24 saatlik inkübasyon sürecinde sağlıklı hücreler üzerinde kayda değer bir etki görülmedi. Ancak 96 saatlik uzun inkübasyon sürecinde, sağlıklı BEAS-2B hücreleri makul seviyelerde nanotaşıyıcı alımı gerçekleştirenken, A549 kanser hücrelerine kıyasla düşük düzeylerde ilaç-aracılı sitotoksikite sergiledi. Ayrıca, nanotaşıyıcılar A549 hücrelerindeki apoptoz seviyelerini önemli ölçüde artırırken, BEAS-2B hücrelerinde 96 saat sonunda dahi apoptotik etki göstermedi. Bu sonuçlar, pasif hedefli inorganik ilaç nanotaşıyıcıların, sağlıklı hücreleri ihmal edilebilir düzeyde etkileyerek, antikanser ilaçların kemoterapötik etkilerini artırmada umut verici olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, pasif tümör hedefleme, ilaç nanotaşıyıcılar, BEAS-2B hücreleri, A549 hücreleri.

## Long Term Effect of Passive Tumor Targeted Inorganic Drug Nanocarriers on Lung Healthy and Cancer Cells

### ABSTRACT

Drug nanocarriers have shown great potential in cancer therapy, as they provide controlled- and sustained-release properties. Nanocarriers can deliver drugs with passive or active targeting, but tumor accumulation of passively targeted nanocarriers is generally more slowly and lower compared to their active counterparts. Thus in addition to cancer cells, healthy cells are also exposed to these nanocarriers at the same time. In the light of this issue, this study examined long time exposure effect of passively targeted drug nanocarriers on human lung epithelial BEAS-2B cells and human lung cancer A549 cells. For this reason,  $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX formulated drug nanocarriers combining imaging and therapy were used and its cellular uptake, cytotoxicity and apoptotic effects were investigated. Cellular uptake and cytotoxicity experiments demonstrated that passively targeted nanocarriers showed efficient reduction of cancer cell viability. This did not affect internalization and viability of healthy cells in 24 h. But after 96 h prolonged incubation time, non-tumoral BEAS-2B cells showed moderate level cellular uptake of nanocarriers and exhibited lower level drug-mediated cytotoxicity as compared to A549 cancer cells. Moreover, it was found that the nanocarriers considerable increased the percent of apoptotic cells in A549 cells, whereas showed no apoptotic effect in BEAS-2B cells in 96 h. These results show that passively targeted inorganic drug nanocarriers could be promising for enhancing the chemotherapeutic effects of anticancer drugs, while producing negligible effects on healthy cells.

**Keywords:** Cancer, passive tumor targeting, drug nanocarriers, BEAS-2B cells, A549 cells.

### 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

İnorganik nanotaşıyıcılar sahip oldukları daha uzun kan dolaşımı, daha iyi ilaç salınım kinetiği, gelişmiş antikanser etkinliği ve düşük yan etkileri gibi üstün özellikleri sayesinde, geleneksel kanser tedavilerine karşı

etkili bir ilaç taşıma yöntemi olarak ortaya çıkmaktadır [1-2]. Bu taşıyıcılar arasında manyetik özelliğe ( $Fe_3O_4$ ) sahip nanotaşıyıcılar, aynı anda hem diyagnostik hem de terapötik uygulamalarda kullanılabilmesi ve terapötik fonksiyonların taşıyıcılara kolayca entegre edilebilmesinden dolayı biyomedikal uygulamalarda ümit verici olmaktadır [3-4]. Ayrıca bu taşıyıcılar artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkileri sayesinde tümör

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

bölgelerinde yüksek miktarlarda birikebilirken aynı zamanda taşıdıkları antikanser ilaçların antitümoral etkinliklerini de kayda değer düzeylerde artırabilmektedir [5]. Artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR: enhanced permeability and retention) etkisi, bir pasif hedefleme formudur ve çeşitli boyutlardaki nanotaşıyıcıların (genellikle 10-100 nm) tümör dokularında, sağlıklı dokularda mümkün olmayan şekilde birikmesi sonucu oluşur [6]. Nanotaşıyıcılar bu benzersiz özellikleri sayesinde, antikanser ajanların tümör hücrelerine taşınımını mümkün kılmaktadır. Bu sayede, nanotaşıyıcılar aracılığıyla kanser hücrelerinin içindeki ilaç konsantrasyonları artırılırken, normal hücrelere karşı meydana gelebilecek olan toksik etki de minimize edilmektedir. Ancak, uzun süreli maruz kalma sürelerinde, nanotaşıyıcıların organizma üzerindeki etkileri hala dokularda potansiyel birikimleri gibi soru işaretleri barındırmaktadır [7]. Bu nedenle, uzun süreli ilaç nanotaşıyıcı uygulamaları öncesi sağlıklı hücreler üzerinde meydana gelebilecek muhtemel birikim ve toksik etkilerin belirlenmesine ihtiyaç vardır. Böylece bir yandan istenmeyen sistemik reaksiyonlar elimine edilebilirken, diğer taraftan kullanılması gereken en uygun ilaç nanotaşıyıcı konsantrasyonları da belirlenebilir. Bu bağlamda bu çalışmanın amacı ilaç nanotaşıyıcılara uzun süreli maruz kalan sağlıklı hücrelerin, aynı süreçteki kanserli hücrelerle birlikte, yanıtlarını değerlendirmektir. Bunun için, nano-formülasyonu daha önceki çalışmalarımızda geliştirilen ve fizikokimyasal olarak da karakterize edilen, bir pasif hedefleme formu olan artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi için sentezlenen  $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX multifonksiyonel nanotaşıyıcıları kullanıldı [8-9]. Pasif hedefli bu nanotaşıyıcıların insan akciğer epitel BEAS-2B hücreleri ve insan akciğer kanser A549 hücreleri üzerindeki uzun dönemli etkileri, 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, DMEM besiyeri *Gibco Life technologies* 'den temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve denemeler boyunca ultra saf su kullanılmıştır.

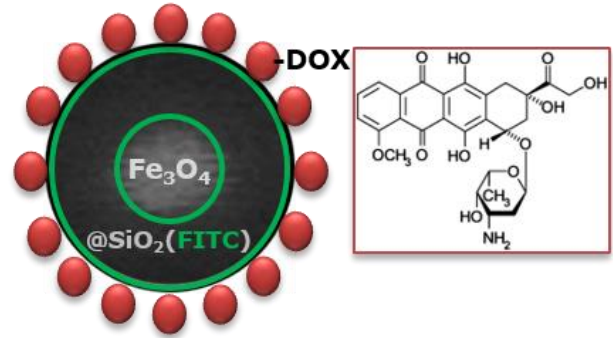
### 2.2. Hücre Kültürü (Cell Cultures)

İnsan akciğer epitel BEAS-2B ve insan akciğer kanser A549 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 DMEM besiyeri içinde kültüre edildi. Kültür,

steril koşullar altında 37 °C de, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde gerçekleştirildi.

### 2.3. Nanotaşıyıcıların Sentezi ve Karakterizasyonu (Synthesis and Characterization of Nanocarriers)

$Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX formülasyonuna sahip inorganik nanotaşıyıcılar kaynakça 8 ve 9 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. Nanotaşıyıcıların biyouyumluluk ve stabilite kazanması, 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  $Fe_3O_4@SiO_2$  yapısı oluşturuldu. Daha sonra nanotaşıyıcıların hücre tarafından alındığının optik olarak izlenebilmesi için,  $Fe_3O_4@SiO_2$  yapısına floresan özelliğine sahip floresan izotiyosyanat (FITC) enkapsüle edildi. Enkapsülasyon sayesinde, nanotaşıyıcıların fotokimyasal stabilitesini artırması sağlandı. Bu işlemler sonrasında, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda takip edilebilen, silika manyetik-floresan [ $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ ] nanotaşıyıcı yapısı oluşturuldu. Son adımda ise, model bir antikanser ilaç olarak doksorubisin (DOX), amin-fonksiyonel nanotaşıyıcı yüzeyine schiff-bazı kimyası ile bağlanarak  $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX formülasyonuna sahip pasif hedefli ilaç nanotaşıyıcıları sentezlendi (Şekil 1). Nanotaşıyıcıların fizikokimyasal karakterizasyonları, dinamik ışık saçılım spektrometresi (DLS), zeta-potensiyeli ölçümü, X-ışınları difraksiyon analizi (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve elektron mikroskobu teknikleri (SEM, STEM ve EDX) ile gerçekleştirildi.



**Şekil 1.**  $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX formülasyonuna sahip nanotaşıyıcıların şematik gösterimi. Nanotaşıyıcıların çekirdek-kabuk yapısı (beyaz çekirdek-gri kabuk) taramalı-geçirimli elektron mikroskobu (STEM) aracılığıyla elde edildi. Gri silika kabuk içerisine FITC enkapsülasyonu sağlandı. Nanotaşıyıcıların yüzeyindeki kırmızı küreler antikanser ilaç doksorubisini (DOX) temsil etmektedir. (Figure 1. Schematic representation of nanocarriers with  $Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX formulation. \*The core-shell structure of the

nanocarriers (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 nanocarriers. Red circles represent the chemotherapeutic agent doxorubicin (DOX.).

#### 2.4. Hüresel Alım Deneylemleri (Cellular Uptake Analysis)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanotaşıyıcılarının, akciğer epitel BEAS-2B ve akciğer kanser A549 hücrelerini hedefleme potansiyelleri floresan mikroskopu kullanılarak araştırıldı.

Mikroskopik görüntüleme için, BEAS-2B ve A549 hücreleri 100.000 hücre/mL yoğunluğunda 6 kuyulu plakalarda 10 µg/mL nanotaşıyıcı konsantrasyonunda 4 / 12 ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler; nanotaşıyıcılara enkapsüle edilen FITC için yeşil kanalda, nanotaşıyıcılara konjuge edilen ilaç için kırmızı kanalda, hücre çekirdek boyası DAPI için mavi kanalda ve hücre genel görüntüsü için aydınlık alanda floresan mikroskopu altında optik olarak izlendi. Nanotaşıyıcıların hüresel alımı, Olympus IX71 floresan mikroskopu kullanılarak görüntülendi. İlgili görüntülerin fotoğrafları CCD kamera kullanılarak çekildi ve ImageJ programı kullanılarak analiz edildi.

#### 2.5. İnorganik İlaç Nanotaşıyıcıların Sitotoksik Etkileri (Cell Viability Analysis of Inorganic Drug Nanocarriers)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanotaşıyıcılarının, akciğer epitel BEAS-2B ve akciğer kanser A549 hücreleri üzerinde gösterdikleri sitotoksiste, MTT yöntemi kullanılarak belirlendi.

Sitotoksiste çalışmaları için, BEAS-2B ve A549 hücreleri 10.000 hücre/mL yoğunluğunda 96 kuyulu plakalarda 0.1 /1.0 /10 / 50 / 100 / 200 µg/mL nanotaşıyıcı konsantrasyonlarıyla 24 / 48 / 72 ve 96 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 mikropılaka okuyucu aracılığıyla okunarak "yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları" (IC<sub>50</sub>) belirlendi. IC<sub>50</sub> değerleri GraphPad Prism 7.0 yazılımı ile hesaplandı.

#### 2.6. İnorganik İlaç Nanotaşıyıcıların Pro-apoptotik Etkileri (Proapoptotic effects of Inorganic Drug Nanocarriers)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanotaşıyıcılarının, akciğer epitel BEAS-2B ve akciğer kanser A549 kanser hücreleri üzerinde gösterdikleri pro-apoptotik etkileri hücre çekirdek morfolojileri aracılığıyla, DAPI boyama yöntemiyle, Olympus IX71 floresan mikroskopu kullanılarak optik olarak analiz edildi.

Zamana bağımlı apoptoz çalışmaları için, BEAS-2B ve A549 hücreleri 100.000 hücre/mL yoğunluğunda 6

kuyulu plakalarda IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarındaki nanotaşıyıcılarla 48 / 72 ve 96 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 mikroskopu 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 ± standart sapma (SS) olarak verildi. İstatistiksel analizler Student's *t* testi kullanılarak Microsoft Excel yazılımı aracılığıyla yapıldı. P ≤0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

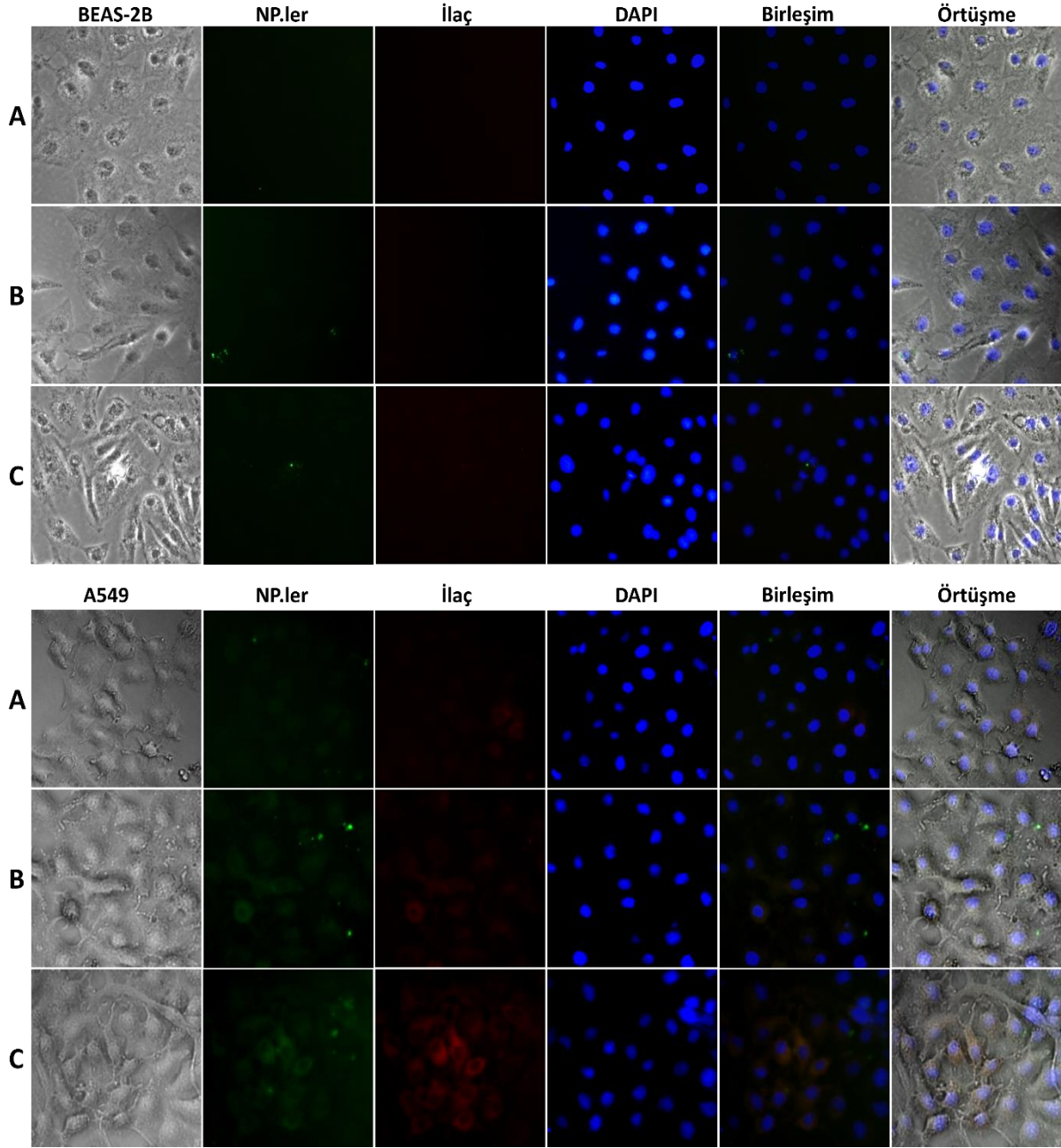
#### 3.1. İnorganik İlaç Nanotaşıyıcıların Hüresel Alımı (Cellular Uptake Analysis of Inorganic Drug Nanocarriers)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanotaşıyıcılarının BEAS-2B ve A549 hücrelerini hedefleme potansiyellerinin araştırılması için aydınlık alan ve floresan mikroskop görüntüleri çekildi. Nanotaşıyıcıların hüresel lokalizasyonları, floresan görüntülerine karşılık gelen aydınlık alan görüntülerinin karşılaştırılmasıyla elde edildi. Hüresel alımı takip etmek için hücre çekirdeği ayrıca DAPI ile boyandı. Nanotaşıyıcılar zamana bağımlı olarak artan oranlarda A549 kanser hücrelerini hedefleyebilirken, aynı şekilde hücre içi kırmızı floresan yoğunluklarından anlaşıldığı üzere artan oranlarda ilaç yüklemesi de gerçekleştirdi. Sağlıklı akciğer epitel BEAS-2B hücrelerinde ise zamana bağımlı olarak 24 saatlik inkübasyon sonrasında, kanser hücreleri ile karşılaştırıldığında, ihmal edilebilecek düzeylerde nanotaşıyıcı alımı gerçekleşti (Şekil 2). Bu sonuçlar, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX inorganik nanotaşıyıcıların A549 akciğer kanseri hücrelerine başarılı bir şekilde nüfuz edebildiğini, ancak sağlıklı akciğer epitel BEAS-2B hücrelerine karşı 24 saatlik uzun inkübasyon sürecinde dahi hüresel alım yönünde bir etki göstermediği doğrulamaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, daha önce raporladığımız ve aktif olarak hedeflendirilen inorganik nanotaşıyıcıların sağlıklı hücreler yerine kanser hücrelerini daha yüksek afinitede hedeflendirdiğini gösterdiğimiz çalışmamızı da desteklemektedir [10]. Jung ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise hedefleme ajanı olarak biyotinin kullanıldığı nanotaşıyıcılar ile A549 kanser hücrelerinin yarım saatlik süre içerisinde aktif olarak hedeflendirilebildiği gösterilmiştir. Fakat aktif hedefli bu nanotaşıyıcıların sağlıklı hücreler üzerinde

gösterebileceği potansiyel etkileri araştırmaya dâhil edilmemiştir [11]. Bu sonuçlar pasif hedefli nanotaşıyıcıların tümör mikroçevresine verimli bir şekilde lokalize olabildiği gösterirken, aktif hedefleme aracılığı ile tümör hücrelerinin nanotaşıyıcıları alımı hızlandırılabilir.

### 3.2. İnorganik İlaç Nanotaşıyıcıların Sitotoksik Etkileri (Cell Viability Analysis of Inorganic Drug Nanocarriers)

$Fe_3O_4@SiO_2(FITC)$ -DOX nanotaşıyıcılarının BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerinde nasıl bir sitotoksik etki gösterdiğini incelemek için, zamana bağımlı MTT hücre

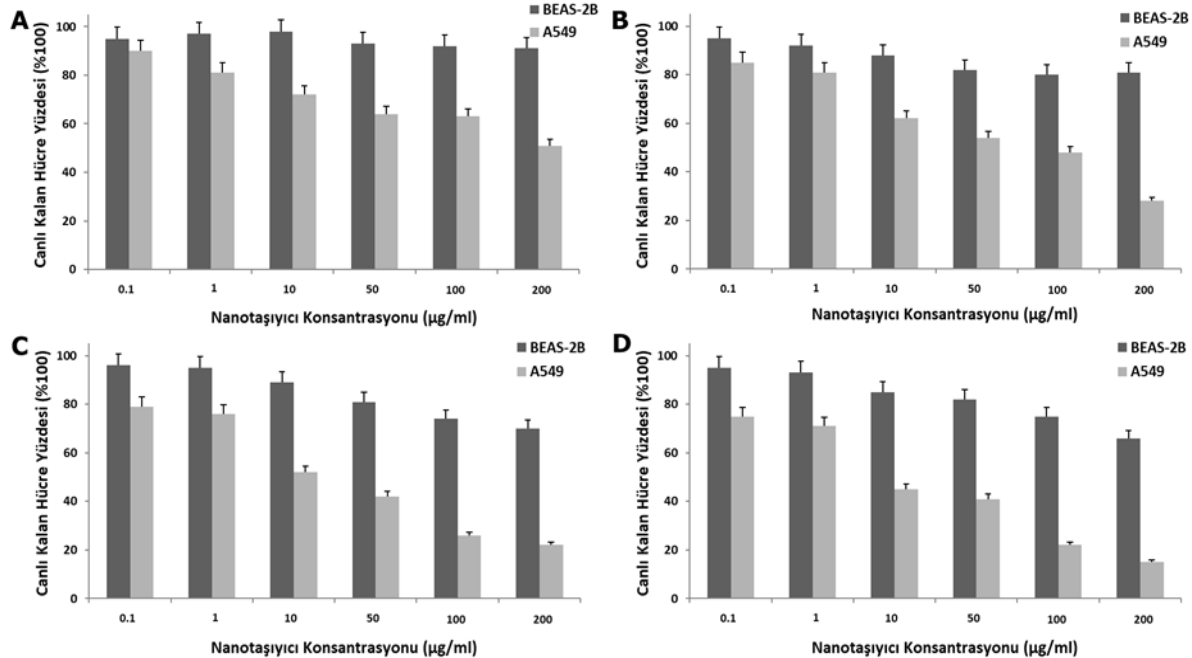


**Şekil 2.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin (A) 4, (B) 12 ve (C) 24 saatlik inkübasyonları sonrası hüresel alım floresan mikroskobu görüntüleri. Sütunlar için sırasıyla: (1) BEAS-2B ve A549 hücrelerinin aydınlık alan görüntüleri; (2) hücre içindeki nanotaşıyıcıların yeşil floresan görüntüleri; (3) hücre içine taşınan doksorubisinin kırmızı floresan görüntüleri; (4) DAPI ile boyanan hücre çekirdeklerinin mavi floresan görüntüleri; (5) nanotaşıyıcı, ilaç ve DAPI floresan görüntülerinin üst üste birleştirilmesi; (6) aydınlık alan, nanotaşıyıcı, ilaç ve DAPI görüntülerinin üst üste örtüştürülmesi. (**Figure 2.** Fluorescence microscopy images of BEAS-2B and A549 cells after (A) 4, (B) 12 and (C) 24 h nanocarriers incubations. The nanocarriers 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 nanocarriers; (3) fluorescence images of DOX; (4) the stained nuclei of cells with DAPI; (5) the merger of nanocarriers, DOX and DAPI; and (6) overlay of bright-field images and fluorescence images.)

proliferasyonu analizi yapıldı. Bunun için, hücrelere 24 / 48 / 72 ve 96 saat boyunca artan konsantrasyonlarda (0.1-200 µg/mL) inorganik nanotaşıyıcılar uygulandı. Sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırıldığında, A549 kanser hücreleri ilk 24 saatlik süreçte yaklaşık sekiz kat daha düşük IC<sub>50</sub> değerleri ile çok güçlü bir sitotoksik etkiye maruz kaldı. Öte yandan, 96 saatlik inkübasyon sonrası dahi her iki hücrenin sergilediği IC<sub>50</sub> değerleri benzer aralıklarda sitotoksik etkiler göstermeye devam etti. Daha da önemlisi, BEAS-2B hücrelerinin 72 saatten sonra yakın IC<sub>50</sub> değerleri göstermesi, ilgili inorganik taşıyıcıların sitotoksik etkilerinin zamana bağımlı olarak sınırlı kaldığını göstermektedir (Tablo 1). Bu sonuçlar, nanotaşıyıcıların hücre alım sonuçlarını desteklerken ilgili nanotaşıyıcı formülasyonlarının, sağlıklı akciğer hücreleriyle karşılaştırıldığında, akciğer kanser hücrelerine karşı çok daha yüksek bir sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 3). Benzer bir şekilde daha önce yaptığımız çalışmalarda da, rasyonel olarak dizayn edilen inorganik ilaç nanotaşıyıcılarının, antikanser ajanların terapötik etkilerini tümör türevli çeşitli kanser hücre hatlarına karşı yüksek değerlere taşıdığı gösterilmiştir [12-15]. Bu sonuçlarla paralel bir şekilde Nair ve arkadaşları tasarladıkları pasif hedefli nanotaşıyıcıların 1 mM'lık yüksek konsantrasyonlarda (karsinoma hücrelerini etkileyen dozların çok üstü bir konsantrasyonda) dahi sağlıklı mezenkimal kök hücreler (MSCs) üzerinde kabul edilebilir düzeylerde etki gösterdiğini belirlemişlerdir [16].

### 3.3. İnorganik İlaç Nanotaşıyıcıların Pro-apoptotik Etkileri (Proapoptotic effects of Inorganic Drug Nanocarriers)

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanotaşıyıcılarının, BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerinde gösterdiği 48 / 72 ve 96 saatlik apoptotik etkileri, floresan mikroskobu altında yoğunlaşmış veya parçalanmış çekirdekli hücreler incelenerek araştırıldı. Şekil 4. de görüldüğü üzere inorganik nanotaşıyıcılar, A549 kanser hücrelerine karşı zamana bağımlı olarak yükselen düzeylerde apoptoz induksiyonu gerçekleştirdi. Sağlıklı BEAS-2B hücrelerinde ise nanotaşıyıcılar 96 saatlik süreç sonunda dahi kayda değer bir apoptotik etki gösteremedi. Bu sonuçlar göstermektedir ki, inorganik nanotaşıyıcılar, A549 kanser hücrelerine zamana bağımlı olarak artan oranlarda kemoterapötik ajan yüklemesi sağlamakta ve bu sayede DOX-aracılı apoptoz oranlarını daha yukarı seviyelere taşımaktadır. BEAS-2B hücrelerinin aynı zaman dilimi içerisinde hücre alım düzeyleri kanser hücrelerine göre çok düşük seviyelerde kaldığı için, nanotaşıyıcıların yeterli bir apoptotik etki sergileyemediği görülmüştür. Park ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise BEAS-2B epital hücreleri üzerinde ticari olarak satın alınan titanyum dioksit nanotaşıyıcılarının etkileri araştırılmış ve ilgili partiküller ilaç içermedikleri halde artan konsantrasyonlarda uygulanmaları sonrası DAPI boyalı hücre çekirdeklerinde artan oranlarda yoğunlaşmalarına sebep olmuştur [17], yine benzer sonuçlar Kim ve arkadaşları tarafından raporlanan gümüş nanotaşıyıcılar



**Şekil 3.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanotaşıyıcılarının BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerinde gösterdiği (A) 24, (B) 48, (C) 72 ve (D) 96 saatlik sitotoksikite sonuçları. Her bir kolon üç bağımsız denemenin ortalama ±SS'sını temsil etmektedir. (Figure 3. Cytotoxic effects of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanocarriers against BEAS-2B and A549 cells after (A) 24, (B) 48, (C) 72 and (D) 96 h of growth. Each column represents the mean ± SD of three independent experiments.)

**Tablo 1.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nano taşıyıcılarının BEAS-2B ve A549 hücrelerindeki 24 / 48 / 72 ve 96 saatlik IC<sub>50</sub> değerleri. Değerler µg/mL cinsindedir ve üç bağımsız denemenin ortalama ±SS'sını temsil etmektedir.

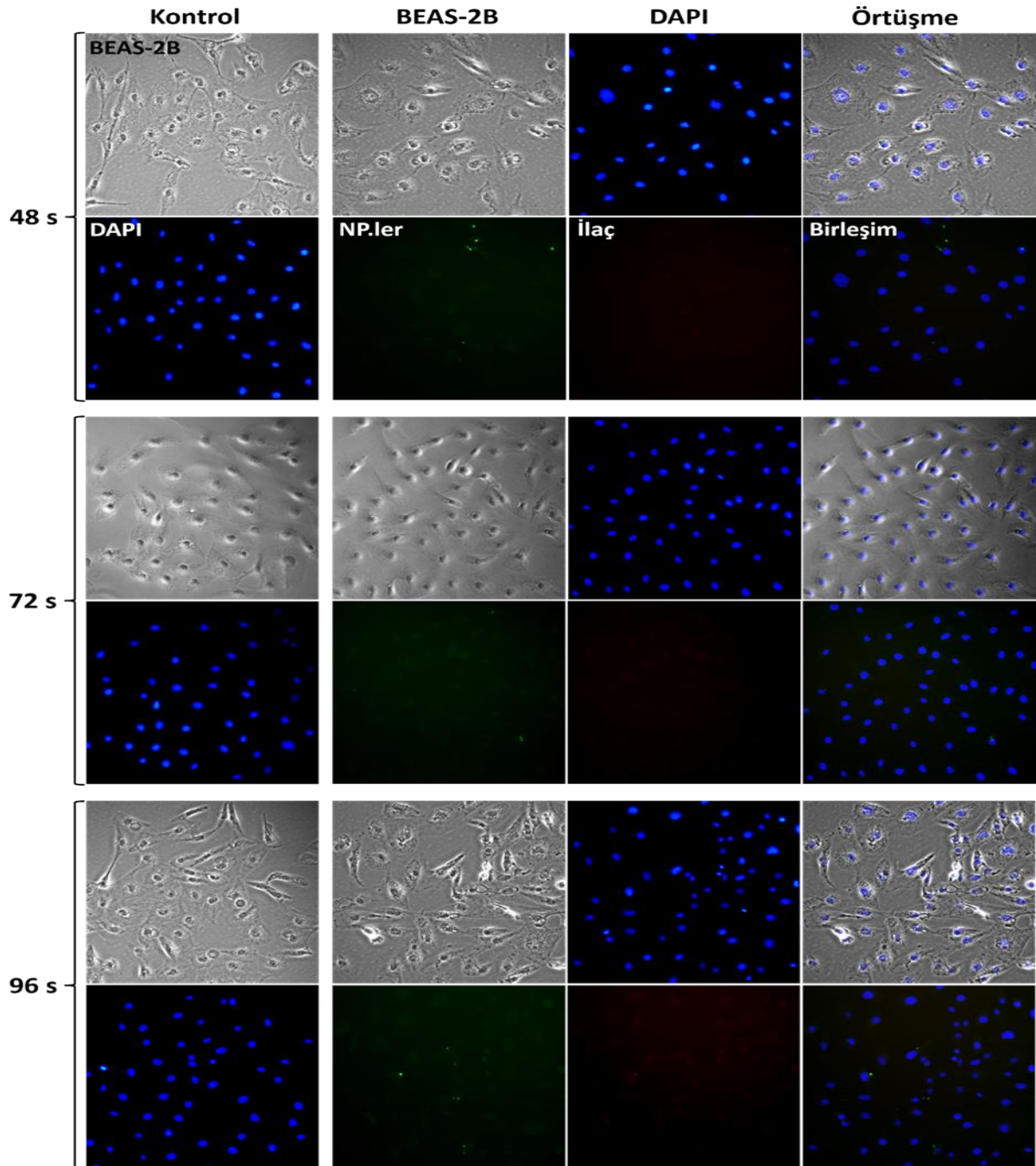
(Table 1. The IC<sub>50</sub> values of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX nanocarriers in BEAS-2B and A549 cells when incubated for 24 / 48 / 72 and 96

Hücreler	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
BEAS-2B	1538.0 ± 78.9	652,9 ± 34.1	327.3 ± 26.9	306.1 ± 25.8
A549	189.1 ± 15.3	98.8 ± 11.3	58.3 ± 12.4	41.2 ± 5.6

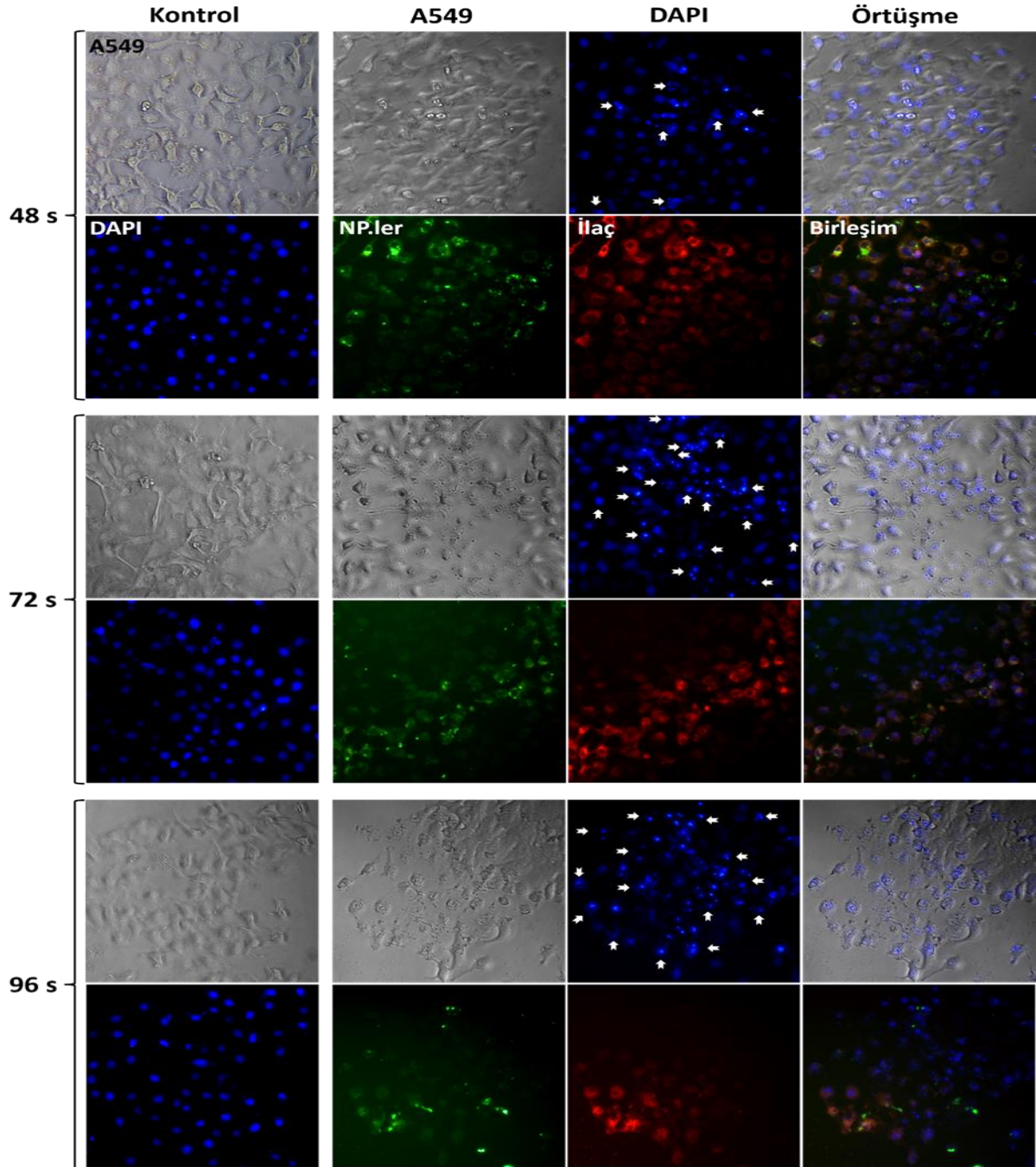
h. Values represent the mean ± SD of three independent experiments in µg/mL.)

ile yaptıkları çalışmada da elde edilmiştir [18]. Bu sonuçlar göstermektedir ki silika kaplı demir nano taşıyıcıları sağlıklı BEAS-2B hücreleri üzerinde,

titanyum ve gümüş nano taşıyıcıları ile karşılaştırıldığında, kabul edilebilir düzeylerde toksisite göstermektedir.







**Şekil 4.** BEAS-2B ve A549 hücrelerinin nanotaşıyıcılar ile 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonları sonrası apoptotik çekirdeklerinin floresan mikroskobu görüntüleri. İlk sütun nanotaşıyıcı uygulanmayan kontrol hücrelerinin aydınlık alan görüntüleri ve DAPI boyalı çekirdeklerinin mavi floresan görüntülerini göstermektedir. Oklarla gösterilen apoptotik hücreler nükleer parçalanma ve daha parlak mavi floresans göstermektedir. Sonraki sütunlar (1) nanotaşıyıcı uygulanan hücrelerin aydınlık alan görüntüleri; (2) DAPI ile boyanan hücre çekirdeklerinin mavi floresan görüntüleri; (3) aydınlık alan ve DAPI görüntülerinin üst üste örtüştürülmesi; (4) hücre içindeki nanotaşıyıcıların yeşil floresan görüntüleri; (5) hücre içine taşınan doksorubisinin kırmızı floresan görüntüleri ve (6) nanotaşıyıcı, ilaç ve DAPI floresan görüntülerinin üst üste birleştirilmesidir. (**Figure 4.** Apoptosis analysis of BEAS-2B and A549 cells treated with nanocarriers for 48, 72 and 96 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. The first column: bright-field images and DAPI stained nuclei of the control cells. The other 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) fluorescence images of nanocarriers; (5) fluorescence images of DOX; and (6) the merger of nanocarriers, DOX and DAPI.)

#### 4. GENEL DEĞERLENDİRME (CONCLUSION)

Bu çalışmada, pasif hedefli Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>(FITC)-DOX ilaç nanotaşıyıcılarının insan akciğer epitel BEAS-2B hücreleri ve insan akciğer kanser A549 hücreleri üzerinde göstermiş olduğu uzun dönem etkileri araştırıldı. Bunun için nanotaşıyıcıların sağlıklı ve kanser hücrelerine karşı farklı inkübasyon süreçlerinde göstermiş olduğu hücresel birikim, sitotoksosite ve apoptotik etkileri karşılaştırıldı. Hücresel alım deneyleri ile nanotaşıyıcıların zamana bağımlı olarak artan oranlarda A549 kanser hücrelerini hedefleyebildiği, fakat sağlıklı BEAS-2B hücrelerinde artan inkübasyon süreçlerinde dahi hücresel alım kapasitelerinin çok düşük düzeylerde kaldığı belirlendi. Öte yandan, sitotoksosite deneyleri, pasif hedefli nanotaşıyıcıların A549 kanser hücrelerinin canlılığının etkin bir şekilde azalttığını gösterirken, 96 saatlik artan inkübasyon sürelerinde sağlıklı BEAS-2B hücreleri düşük düzeylerde ilaç-aracılı sitotoksosite sergiledi. Pro-apoptotik çalışmalarda, nanotaşıyıcılar A549 hücrelerindeki apoptoz seviyelerini önemli ölçüde artırırken, BEAS-2B hücrelerinde 96 saat sonunda dahi bir apoptotik etki gösteremedi. Bu sonuçlar, pasif hedefli inorganik ilaç nanotaşıyıcıların, sağlıklı hücreleri etkilemeden, antikanser ilaçların kemoterapötik etkilerini artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir, fakat nanotaşıyıcıların uzun süreli kan dolaşımında kalması halinde, sağlıklı hücrelerin de belirli düzeylerde etkilenebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

#### TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Laboratuvarından çalışma fırsatı sağladığı için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Sayın Hocamız Doç. Dr. Alper Arslanoğlu'na en içten dileklerimizle teşekkür ederiz. Laboratuvarından çalışma fırsatı sağladığı için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Sayın Hocamız Doç. Dr. Alper Arslanoğlu'na en içten dileklerimizle teşekkür ederiz. Bu çalışma İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (2020IYTE0050).

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Wright J., "Nanotechnology: Deliver on a promise", *Nature*, 509: 58–59, (2014)
- [2] Kumari P., Ghosh B. and Biswas S., "Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery", *J Drug Target.*, 24: 179–191, (2016)
- [3] Sun C., Lee J. S. and Zhang M., "Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery", *Adv Drug Deliv Rev.*, 60: 1252–1265, (2008)
- [4] 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)
- [5] Kumar A., Chen F., Mozhi A., Zhang X., Zhao Y., Xue X., Hao Y., Zhang X., Wang P. C. and Liang X. J., "Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation", *Nanoscale*, 5: 8307–8325, (2013).
- [6] Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y. and Hori K., "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review", *J. Control. Release*, 65: 271–284, (2000)
- [7] Vajjayanthimala V., Cheng P. Y., Yeh S. H., Liu K. K., Hsiao C. H., Chao J. I. and Chang H. C., "The long-term stability and biocompatibility of fluorescent nanodiamond as an in vivo contrast agent", *Biomaterials*, 33: 7794–7802, (2012)
- [8] 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)
- [9] Daglioglu C., "İlaç taşıma sistemleri olarak nanopartiküller kullanılarak pasif ve aktif tümör hedeflemelerinin karşılaştırmalı incelenmesi", *Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 6: 01–07, (2018)
- [10] 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)
- [11] Jung D., Maiti S., Lee J. H. and Kim J. S., "Rational design of biotin–disulfide–coumarin conjugates: a cancer targeted thiol probe and bioimaging" *Chem. Commun.*, 50: 3044–3047, (2014)
- [12] 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)
- [13] 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: 175–184, (2017)
- [14] Daglioglu C., "İnsan kolon kanseri hücrelerine karşı inorganik nanopartikül-temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması: partikül büyüklüğünün antikanser aktivitesine etkisi" *Politeknik Dergisi*, DOI: 10.2339/politeknik.496351 (2019)
- [15] Daglioglu, C. and Kaci F. N., "Cascade therapy with doxorubicin and survivin-targeted tailored nanoparticles: an effective alternative for sensitization of cancer cells to chemotherapy" *Int J Pharm.* 561: 74–81, (2019)
- [16] Nair P. R., Alvey C., Jin X., Irianto J., Ivanovska I. and Discher D. E., "Filomicelles deliver a chemo-differentiation combination of paclitaxel and retinoic acid that durably represses carcinomas in liver to prolong survival" *Bioconjug Chem.*, 29(4): 914–927, (2018)
- [17] Park E. J., Yi J., Chung K. H., Ryu D. Y., Choi J. and Park K., "Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells" *Toxicol Lett.* 180(3): 222–229, (2008)
- [18] Kim H. R., Shin D. Y., Park Y. J., Park C. W., Oh S. M. and Chung K. H., "Silver nanoparticles induce p53-mediated apoptosis in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells" *J Toxicol Sci.* 39(3): 401–412, (2014)