



Investigation of proapoptotic and anticancer effects mediated by intracellular ceramide changing dependent on ARN14974=BOC treatment in human non-small cell lung cancer

Gökhan KUŞ¹, Canan VEJSELOVA SEZER², Ömer Koray YAYLACI³, Emre ÇÖMLEKÇİ⁴,
Hatice Mehtap KUTLU^{2*}

ORCID: 0000-0002-2424-2720; 0000-0002-3792-5993; 0000-0002-1846-9646; 0000-0002-7597-0381; 0000-0002-8816-1487

¹Anadolu University, Faculty of Open Education, Department of Health Sciences, 26470, Eskisehir, Türkiye

²Eskisehir Technical University, Faculty of Science, Department of Biology, 26470, Eskisehir, Türkiye

³Anadolu University, Plant, Pharmaceutical and Scientific Research Applications and Research Center, 26470, Eskisehir, Türkiye

⁴Anadolu University, Rectorate, 26470, Eskisehir, Türkiye

Abstract

Sphingolipids are structural molecules of cellular membranes, that regulate biological processes such growth, proliferation, migration, metastasis by controlling signaling functions of cancer cells. Recent research in cancer therapy has sought to find mechanical details of tumor growth and roles of sphingolipids and their downstream targets in chemotherapy, radiotherapy and/or immunotherapy responses, by innovative molecular and pharmacological tools targeting sphingolipid signaling nodes in cancer cells.

Lung cancer is one of the most common cancers in our country and in the world. An important part of cancer-derived deaths is lung cancer-derived. New and effective treatment modalities for lung cancer are increasingly needed.

This research investigated the novel and effective treatment approach by inhibiting the formation of ceramidase-1-phosphate, which inhibits apoptosis, with synthesis of solid lipid nanoparticles of the ceramidase inhibitor-ARN14974=BOC, thereby increasing the intracellular level of cell and promoting cell viability and proliferation.

Results showed, cytotoxicity, antiproliferative effect, morphological and ultrastructural changes indicating apoptosis caused by ARN14974=BOC and its nanoparticle formulation on A549 cells. Apoptosis was induced by the agents via raising ROS, causing cell cycle arrest. The results underlined and proved that cell death is triggered more effectively by the nanoparticle formulation of ARN14974=BOC on human non-small cell lung cancer cells.

Keywords: lung cancer, cytotoxicity, ceramidase inhibition, apoptosis, cell culture.

----- * -----

ARN14974=BOC tedavisine bağlı intrasellüler seramid değişimi aracılı proapoptotik ve antikanser etkilerinin insan küçük hücreli dışı akciğer kanserinde araştırılması

Özet

Sfingolipidler hücre membran yapısında bulunan ve kanser hücresinde sinyalleşme işlevlerini kontrol ederek büyüme, proliferasyon, göç, metastaz gibi biyolojik fonksiyonları düzenlemekte olan moleküllerdir. Kanser tedavisinde son yıllardaki araştırmalar, kanser hücrelerindeki sfingolipid sinyalleşmesini hedef alan, yenilikçi moleküller ve farmakolojik araçlar kullanılarak tümör büyümesinin ve kemoterapi, radyoterapi ve/veya immünoterapiye yanıtta sfingolipidlerin ve alt hedeflerinin rolü hakkında mekanik ayrıntılar bulmayı amaçlamıştır.

* Corresponding author / Hatice Mehtap KUTLU: Tel.: +902223350580/4721; Fax: 902223350580; E-mail: hmkutlu@eskisehir.edu.tr

Akciğer kanseri ülkemizde ve dünyada en sık görülen kanser türlerindedir. Kanser kaynaklı ölümlerin önemli bir kısmı akciğer kanserine bağlıdır. Akciğer kanseri için yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine her gün daha çok ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, ARN14974=BOC seramidaz inhibitörünün katı lipit nanopartikül formunun sentezlenmesi ile seramidin hücre içi seviyesini artırarak hücrenin yaşamını ve proliferasyonunu sağlayan ve apoptozu inhibe eden seramidaz-1-fosfatın oluşumunu engelleyerek yeni ve etkili bir tedavi yaklaşımının küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı A549 hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma sonuçları ARN14974=BOC'un ve nanopartikül formunun A549 hücrelerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkileri tespit edilmiş ve bu hücrelerde apoptozu gösteren morfolojik ve ince yapısal değişiklikler saptanmıştır. Bu moleküllerin A549 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olarak apoptozu tetiklemiştir. Bu sonuçlar, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde hücre ölümünün sentezlenen ARN14974=BOC'un nanopartikül formu tarafından daha etkin bir biçimde gerçekleştirildiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: akciğer kanseri, sitotoksisite, seramidaz inhibisyonu, apoptoz, hücre kültürü

1. Giriş

Seramidler hücrelerin membranlarında bulunan büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi çok önemli metabolik süreçte görev almakta olan yapısal moleküllerdir. Seramid, tümör baskılayıcı lipit olarak işlev görmekte olup, çeşitli stres uyarımları varlığında hücre içi miktarı artarak apoptozise neden olmaktadır. Seramid üretimi ve sfingolipid metabolizması hataları, kanserli hücre sağ kalımı ve kanser tedavisinde önemli faktörlerdir. Bu hataları düzeltmek için seramid metabolizmasını hedeflemek, kanser tedavisinde direncin üstesinden gelmek için bir alternatif sunma potansiyeli taşımaktadır.

Seramidler ile yapılan çeşitli çalışmalar kanser araştırmalarına yeni boyutlar kazandırmaktadır. Son yıllarda sfingolipid metabolizmasında etkili olan ilaçların karsinojen ya da antikanser etkileri üzerine pek çok araştırma yapılmaktadır. Sfingozin kinaz-1 ve glukozilseramid sentaz seramid metabolizmasında rol alan kritik enzimlerdir. Seramidler apoptotik sfingozine seramidazlar ile dönüşmektedir ve bu sfingozinler; sfingozin kinaz-1'ler ile sfingozin-1-fosfata fosfatlanırlar. Sfingozin-1-fosfat, hücrenin yaşamını ve proliferasyonunu sağlar ayrıca apoptozu inhibe eder. Bu nedenle, sfingolipid metabolizmasında seramidaz aktivitesinin baskılanmasının kanser tedavisinde önemli bir rolünün olduğu vurgulanmıştır.

Akciğer kanseri, prostat kanserinden sonra en sık görülen kanser çeşitidir. Tüm kanser ölümlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan akciğer kanserleri dünya çapında önde gelen kanser insidansının ve mortalitenin en sık nedenidir [1]. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi akciğer kanseri nedeniyle ölmektedir. Ortalama süresi 8 ay olmak ile birlikte 5 yıllık sağ kalım oranı % 15'tir [2]. Akciğer kanserinde kemoterapiyi destekleyen yeni tedavi yaklaşımları önem taşımaktadır. Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde apoptotik mekanizmayı çalıştırmaya aracılık eden yollardan biri sfingolipid yolağıdır.

Sfingolipidler, kanser hücresi sinyal iletimindeki sinyal fonksiyonlarını kontrol etmekte, büyüme, proliferasyon, göç, istila ve/veya metastaz gibi çeşitli biyolojik olayları da düzenlemektedirler. Örneğin, sfingozin ve seramid üretimi, kemoterapi, radyasyon ve/veya oksidatif stres ile indüklenir ve bu sfingolipidler hücre ölümüne, yaşlanmasına ve/veya hücre döngüsü durdurulmasına aracılık ederler [3]. Sfingozin, sfingozin 1-fosfat ve seramid; hücre proliferasyonunu ve apoptozu kontrol etmeye katkıda bulunurlar. Seramid ve katabolit sfingozin sfingolipid metabolitleri olarak bilinir ve bunlar hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicileri olarak görev yaparlar, apoptozu teşvik ederler. Öte yandan, bir sfingozin kinaz ile sfingozinin fosforilasyonu ile oluşan sfingozin 1-fosfat hücre büyümesinin uyarılmasında, apoptozu inhibe etmede rol oynamaktadır [4].

Çeşitli uyarımlar morfolojik değişikliklerden önce meydana gelen seramidin birikimi eşliğinde sfingomyelin hidrolizini indükleyebilmektedir ve seramidin apoptoz sinyalleşmesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, seramidin pro-apoptotik fonksiyonu, apoptotik sinyal yolu boyunca çeşitli kontrol noktalarında düzenlenebilmektedir. Seramid, ayrıca apoptozun erken aşamalarında üretildiği gösterilen sfingozini üretmek üzere bir seramidaz ile metabolize edilebilir ve birçok hücre tipine ekzojen olarak eklendiğinde sfingozinin kendisi apoptozu indükleyebilmektedir. Sfingozin, Sfingozin-1-fosfat'ı (S-1P) oluşturmak üzere sfingozin kinaz ile fosforile edilebilir. S-1P, seramid aracılı apoptozu antagonize eden bir sinyal molekülüdür. Seramidaz, sfingozin kinaz ve S-1P fosfataz aktivitelerinin modülasyonu, seramid, sfingozin ve S-1P arasındaki intrasellüler oranı düzenleyerek apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilmektedir [5, 6].

Seramid ve sfingozinin hücre çoğalmasını düzenleyen önemli rolünden dolayı kanser tedavisinde önemli hedefler haline gelmiştir [7]. Buna ilaveten, asid seramidaz sfingolipid metabolizmasını düzenleyen en önemli enzimlerden biri olduğundan, yeni kanser terapi araştırmalarının birçoğu bu enzime odaklanmıştır. Örneğin, murin L929 fibrosarkoma hücrelerinde asid seramidazın aşırı ekspresyonu, muhtemelen seramid düzeylerini azaltarak tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümünü bastırmıştır [8-10].

Seramidazlar, seramidin sfingozine ve yağ asitlerine indirgenmesini katalize eder. Seramid sadece sfingolipid biyosentezinin ve parçalanmanın merkezi olmakla kalmayıp, aynı zamanda sfingolipid sinyalizasyonunda önemli bir

molekül olup, farklılaşmayı veya apoptozu teşvik eder. Asit seramidaz inhibisyonu bazı kanser türlerini kemo ve radyoterapiye duyarlı hale getirmektedir. Son yirmi yılda seramidin yapısal ve stereokimyasal modifikasyonlarına dayalı bir seri seramidaz inhibitörü geliştirilmiştir. Seramidazın ilk seramidi taklit eden inhibitörü, N-Oleoyl-tololamid (NOE)'dir ve seramidin endojen hücrese seviyelerini arttırıp farklı hücre hatlarında apoptozu indükler [11].

Sfingolipid metabolizması sfingolipidler, metabolik enzimler ve / veya reseptörler dahil olmak üzere çoklu sinyalleme düğümleri, yeni antikanser müdahale stratejilerinin geliştirilmesi için yeni terapötik hedefleri temsil etmektedir. Hücrese strese yanıt olarak seramidin sentezi ve / veya birikimi, apoptoz, nekrotoz, otofaji ve ER stresinin indüklenmesi de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla kanser hücresi ölümüne aracılık ettiği bilinmektedir. Bu seramid aracılı hücre ölüm yolları hücre ve / veya doku türüne, seramidin subseleler lokalizasyonu ve / veya seramidin aşığı akış hedeflerinin mevcudiyetine göre farklı şekilde düzenlenmektedir [3].

Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon ve kemoterapi sonucu ortaya çıkan apoptoz etkisine aracılık eden seramid, aynı zamanda kanser koruyucu etkileri ile bilinen ilaçların da (curcumin, resveratrol, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar gibi) etkisini düzenlemektedir. Bu ilaçların kanser hücrelerinde seramid düzeyini arttırarak hücrelerde apoptoza yol açtıkları belirtilmiştir [12].

ARN14974, asit seramidazı ($IC_{50}=79$ nM) inhibe eden bir benzoksazonon karboksamididir. ARN14974, hücrelerde 24 saate kadar asit seramidaz aktivitesini inhibe etme özelliğinden dolayı kalıcı etki göstermektedir. Tamponlar ve plazmada son derece stabil olan ARN14974 farelerde intravenöz veya intraperitoneal uygulandığında son derece iyi farmakokinetik etki göstermektedir. Farelerde beyin, karaciğer, kalp, akciğerler ve böbrek gibi çoklu organlarda asit seramidaz aktivitesinde belirgin bir azalmaya neden olmaktadır [13]. Benzoksazonon-3-karboksamid yapısı üzerinde ayrıntılı olarak gerçekleştirilen bir çalışmada, 3-karboksamit N-H parçasının bir asit seramidaz aktivitesinin inhibisyonu için zorunlu bir yapısal özellik olduğunu ortaya çıkarmıştır [13].

Kanser hücrelerinde sfingolipid yolağını hedefleyerek kanser hücrelerinde ölümü indüklemek kanser tedavisinde yeni ve güncel bir yaklaşımdır [14, 15, 16]. Bu kapsamda literatürde çeşitli çalışmalar olmakla beraber kullanılan bileşiklerin katı lipid nanopartikül formlarının kullanılması daha önce hiçbir çalışmada yapılmamıştır.

Bu çalışma ile akciğer kanser hücrelerinde bir seramidaz inhibitörü olan ARN14974=BOC ile çalışılmıştır. Akciğer kanseri hücrelerinde, hücre içi seramid birikiminin arttırılması sağlanarak hücrelerde apoptoz indüksiyonu sağlanmıştır. Bu bileşiğin A549 akciğer kanser hücrelerindeki etkin dozu MTT, SRB ve ATP canlılık testleriyle bulunmuş ve akım sitometrisiyle hücre ölüm kinetikleri saptanmıştır. Bunun ardından hücrese morfolojideki etkileri belirlemek için konfokal mikroskop ile hücre çekirdeği ve iskeletindeki değişiklikler, geçirimli elektron mikroskopi ile de organel bazındaki ince yapısal değişiklikler belirlenmiştir. Böylelikle ilaç geliştirme çalışmalarının temel çalışmaları olan *in vitro* çalışmalar ile ilaç etkinlik potansiyeli değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Materyal

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), Dimetil sülfoksit (DMSO), Fetal Bovine Serum (FBS), Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Osmium tetraoksit, Glutaraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranil asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science), 25 ve 75 cm²'lik flask, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar, Cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), Pastör pipetler, Enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), Steril falkon tüpler (15 ve 50 mL), Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Kryotüp, Yuvarlak lamel, Bakır grid deney aşamalarında kullanılmış olup tedarikçi firmalardan bu materyaller satın alınmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Katı lipid nanopartiküllerin sentezi

ARN14974=BOC yüklü katı nano partikülleri (KLN) hazırlamak için sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. KLN hazırlanmasında % 3 lipit, % 5 ARN14974=BOC ve % 1 oranında Tween 80 kullanılmıştır. Öncelikle lipidin 80°C'de erimesi sağlanarak, madde ve sonrasında da Tween 80 eklenerek ultraturaks ile 20.500 rpm'de yaklaşık 1 dakika karıştırılarak madde yüklü KLN formülasyonu elde edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar soğutulurak 0.22 µm'lik filtrelerden geçirip kullanıma hazır hale getirilmiştir.

2.2.2. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü

ARN14974=BOC yüklü katı lipid nano partikülleri zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem için hazırlanan katı lipid nanopartiküller NaCl ile iletkenliği 50µS'ye ayarlanıp distile suda seyreltilerek süspansiyon edilmiş ve cihazın kuvetine yerleştirilmiştir. Kuvetten yapılan ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

2.2.3. A549 hücrelerinin çoğaltılması

Akciğer kanser hücreleri A549, sıvı azot tankından çıkarılarak, hücre içeriği eritildikten sonra %10 serum (Fetal Bovine Serum/FBS) içeren RPMI-1640 besi yeri eklenen falkon tüp içerisine alınıp, 1200 rpm' da 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki süpernatant kısım döküldükten sonra, hücreler yeni besi yeri ortamında süspanse edilip kültür flaskalarına alınmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ve uygun nem standartlarını içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu şekilde çoğaltılan hücreler 8. pasajdan sonra deneylerde kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan hücrelerin flask tabanını %85 oranında kaplamış olmasına dikkat edilmiştir.

2.2.4. MTT sitotoksosite testi

A549 hücreleri 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına, kuyu başına 5x10³ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakaya ekilen hücreler 37°C'de ve %5 karbon dioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Kullanılan ARN14974=BOC ve nanopartikül formülasyonu 3.13-200 µM konsantrasyon aralığında seri dilüsyon yapılarak 24, 48, 72 saat hücreler ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 20 µL MTT boyası (5mg/mL) ilave edilerek, 37°C'de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda plakada bulunan her kuyucuk içerisindeki sıvı kısım boşaltılarak 200 µL DMSO ilave edilip HTX-Synergy Bio-Tek, plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir. ARN14974=BOC ve katı lipid nano partikül formülasyonu ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol olarak kabul edilmiştir. Her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Uygulanan madde yüklü katı lipid nano partiküllerin A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ konsantrasyonu bu canlılık değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.5. Sulforhodamine B metodu (SRB)

A549 hücreleri, 2500-7500 arası değişen yoğunlukta, kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak üzere 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra ARN14974=BOC bileşiği ve katı lipid nanopartikül formu belirlenen doz aralığında, 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilmiştir. Hücreler %50 (w/v) soğuk TCA ile *in situ* fikse edilerek hücrelere kompleksler eklendiği andaki (Tz) hücre popülasyonunun ölçümü için %1 asetik asit içinde %0.4 (w/v) SRB ile boyanmıştır. Komplekslerin her birinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücreler ek olarak 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Muamele süresi sonunda hücrelere bağlanan SRB boyası tamponlanmamış 10 mM Tris kullanarak çıkarılmış ve optik yoğunluk (absorbans) 530 nm'de ELISA "microplate" okuyucusunda (HTX Biotek, USA) ölçülmüştür.

2.2.6. ATP canlılık metodu

Bu amaçla, A549 hücreleri 5x10³ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten sonra, ARN14974=BOC ve katı lipid nanopartikül formunun tedavisi, belirlenen doz aralığında 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Tedavi uygulanmış hücrelerdeki ve kontrol hücrelerindeki ATP içeriği aşağıda gösterilen lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (Relative Light Unit, RLU) olarak alınmıştır. Böylece tedavi uygulanmış ve kontrol hücrelerinden elde edilecek RLU değerlerine göre örneklerin % canlılığı hesaplanmıştır. Canlılık hesabı aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{Örnek RLU}) / (\text{Kontrol RLU})]$$

2.2.7. Konfokal mikroskopi yöntemi

A549 hücrelerinin hazırlık aşamasında ilk olarak 3x10⁵ hücre/kuyu yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilmiş ve ARN14974=BOC, ARN14974=BOC yüklü KLN formülasyonunun IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda besi yeri uzaklaştırılarak, hücreler fosfat tamponu (PBS)'de yıkanmış glutaraldehitte fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında tekrar PBS ile yıkanan hücreler akrinin oranj ve falloidin boyaları ile ikili boyama uygulaması gerçekleştirilerek hücrelerde oluşan morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopta (Leica TCS-SP5 II) Leica Confocal Software Version 2.00 yazılımı kullanılarak incelenip görüntülenmiştir.

2.2.8. Geçirimli elektron mikroskopi yöntemi

Geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) ince yapı değişikliklerini incelemek amacıyla 1x10⁶/mL yoğunluğundaki A549 hücreleri 12 ayrı flaska her grup için üçer tekrarlı olacak şekilde ekilerek, 24 saat süresince CO₂ etüv içerisinde inkübe edilmiştir. ARN14974=BOC, ARN14974=BOC yüklü KLN formunun IC₅₀ konsantrasyonları üçer flaska uygulanarak ve 24 saat etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda flaskalarda glutaraldehit ile fikse edilen A549 hücreleri doku takibine alınarak gece boyu +4 °C'de glutaraldehit içinde fikse edilmiştir. Bu süre sonunda tampon ile yıkamaya tabi tutulan hücreler osmiyum tetraoksit içerisinde ikincil fiksasyon uygulamasına tabi tutulmuştur. Daha sonra hücreler etil alkol serisinde (%50, %70, %90, %96 ve absöü etil alkol) dehidrate edilmiştir. Dehidrasyonu gerçekleştirilen hücreler propilen oksit ile şeffaflaştırılarak resine alıştırıldıktan sonra resin ile bloklanarak, 60°C'de etüv içerisinde 48 saat boyunca polimerizasyonu yapılmıştır. Hazır hale getirilen bloklar traşlanıp, 80-100 nm'lik ince kesitleri alınmıştır. Hazırlanan ince kesitler bakır gridlere alınıp, kurşun sitrat ve uranil asetatta boyanarak geçirimli elektron mikroskopunda 120 KV'de (Biotwin FEI, USA) görüntüleme yapılmıştır.

2.2.9. Akış sitometrisinde aneksin V boyama tekniği ile apoptoz tayini

A549 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat süresince, 37°C 'de, %5 CO_2 etüv içerisinde çoğaltılmıştır. 24 saatlik süre neticesinde A549 hücreleri ARN14974=BOC, ARN14974=BOC yüklü KLN formülasyonunun IC_{50} konsantrasyonları ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda hücreler flasktan kaldırılıp, 2 defa PBS ile santrifüjlenip yıkanmıştır. Hücreler yıkandıktan sonra 1 mL içerisindeki sayısı hesaplanmıştır. Akış sitometri tüpüne $100\mu\text{L}$ hücre örneği ve $100\mu\text{L}$ aneksin eklenip oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika bekletilerek hücre analiz cihazında (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) analiz edilmiştir.

2.2.10. Oksidatif stres seviyelerinin belirlenmesi

A549 hücreleri kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Flask içerisinde CO_2 etüvde inkübe edilen hücreler proje kapsamındaki maddeler ile tedavi edilmiş ve ardından PBS ile yıkanmıştır (~ 10 mL). Daha sonra 5 dakika süresince 37°C 'de inkübe edilmiştir. Her bir madde için 1×10^6 sayıdaki hücreler iki farklı 15 mL'lik tüplere ayrılmıştır. Böylece, en az iki tüp hazırlanmıştır. $670 \times \text{g}$ 'de hücreler 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar hücre pelletlerini bozmadan dikkatlice atılarak her tüp için 0.5 mL soğuk 1X yıkama tamponu ile hücreler yavaşça tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. $670 \times \text{g}$ 'de hücreleri 5 dakika santrifüjlenerek yine süpernatantları hücre pelletlerini bozmadan atılmıştır. Her tüpe 0.5 mL soğuk %100 metanol eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. 5 dakika buz üzerinde inkübe ederek hücreleri sabitlemiştir. $670 \times \text{g}$ 'de hücreler 5 dakika santrifüjlenerek ortamı ve /veya kimyasalları aspire edilmiş, ardından PBS ile yıkanmıştır (~ 10 mL). Süpernatantlar hücre pelletleri bozulmadan dikkatlice atılmıştır. Hücreler iki kez soğuk 1X yıkama tamponu (her biri 0.5 mL) ile yavaşça yıkanmıştır. Süpernatantlar hücre pelletleri bozulmadan dikkatlice atılmıştır. Her test örneğine $100 \mu\text{L}$ DNPH solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırılmıştır sonrasında 45 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Tüp başına $100 \mu\text{L}$ taze seyreltilmiş FITC konjuge anti-DNP antikoru eklenmiştir. Hücreler ve antikor çözeltisi nazikçe pipetlenip arada hafifçe karıştırarak karanlıkta bir saat boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Hazırlanan örnekler Muse™ Cell Analyzer (Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında oksidatif stres ölçme programında analiz edilmiştir.

2.2.11. Kaspaz 3/7 aktivitesi

Hücreler kaspaz 3/7 çalışma solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Daha sonra kaspaz 7-ADD solüsyonu ile muamele edilip Muse™ Cell Analyzer (Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında okutulmuştur.

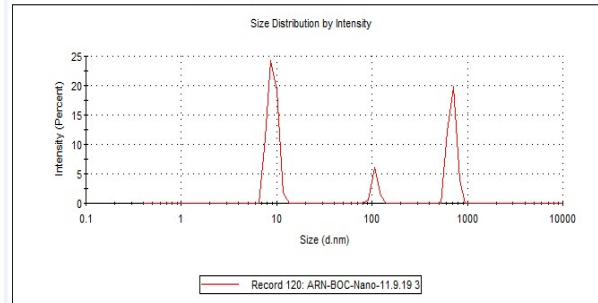
2.2.12. İstatistiksel analiz

Sitotoksite test sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilerek belirlenmiştir. Tüm testler α 0.05 anlamlılık düzeyinde sınanmıştır. İstatistiksel analizler GraphPad 6.0 bilgisayar paket programı ile değerlendirilmiştir.

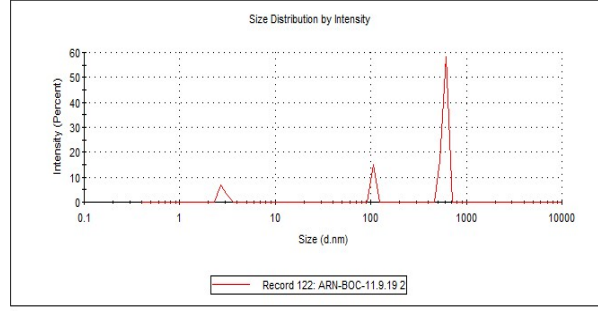
3. Bulgular

3.1. KLN sentez ve karakterizasyon bulguları

Projede sentezlenmiş olan ARN14974=BOC yüklü katı lipid nano-partiküllerinin (KLN) sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir ve ARN14974=BOC KLN formu oluşturulmuştur. Sentez aşamasında projede belirtildiği üzere sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen KLN formunun partikül boyutu, polidispers indeks özellikleri ölçülerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ölçüm sonuçları Figür 3.1 ve Figür 3.2'de verilmiştir.



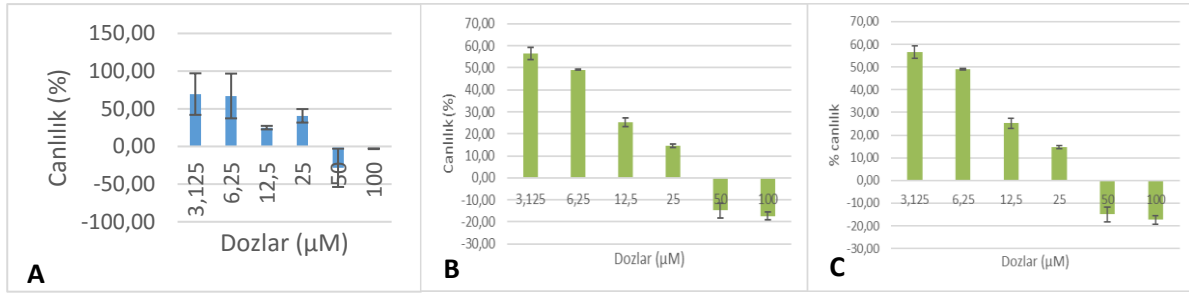
Figür 3.1. ARN14974=BOC KLN formu partikül boyutu, ve polidispers indeks ölçümleri. Yapılan ölçümler ile, ARN14974=BOC nanoformülasyonunun partikül boyutu 310.7 nm ve polidispers indeksi 0.562 olarak tespit edilmiştir



Figür 3.2. ARN14974=BOC partikül boyutu, ve polidispers indeks ölçümleri. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, ARN14974=BOC partikül boyutu 1483 nm olarak belirlenirken polidispers indeksi ise 0.925 olarak tespit edilmiştir

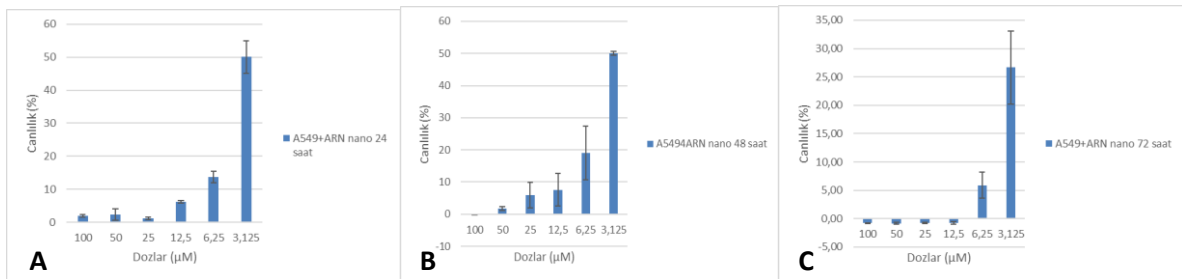
Sentez edilen nanopartiküllerin boyutunun ARN14974=BOC molekülünün partikülleri ile karşılaştırıldığında yaklaşık 4.7 kat bir küçülme gösterdikleri tespit edilmiştir. Karakterizasyon sonucunda ise nanopartikül boyutunun ve polidispers indeksinin uygun ve nanopartikül sentezinin gerçekleştirilmiş olduğunu gösterdiği saptanmıştır.

3.2. MTT bulguları



Figür 3.3. ARN14974=BOC 24 (A), 48 (B) ve (C) 72 saat uygulanmış A549 hücreleri MTT test sonuçları.

Gerçekleştirilen MTT testi sonucunda ARN14974=BOC maddesinin A549 hücreleri üzerinde düşük dozlarda sitotoksisiteyi 24 saatlik uygulama sonucunda gösterdiği ve etkili bir sitotoksik ajan olabileceği tespit edilmiştir. Deney sonucunda 24 saat sürede tespit edilen IC_{50} değeri $35.1 \mu M$ olarak saptanmıştır. 48 saat uygulandığında bu maddenin A549 hücreleri üzerinde $46 \mu M$, 72 saat uygulandığında ise $43 \mu M$ dozunda IC_{50} değeri verdiği bulunmuştur.

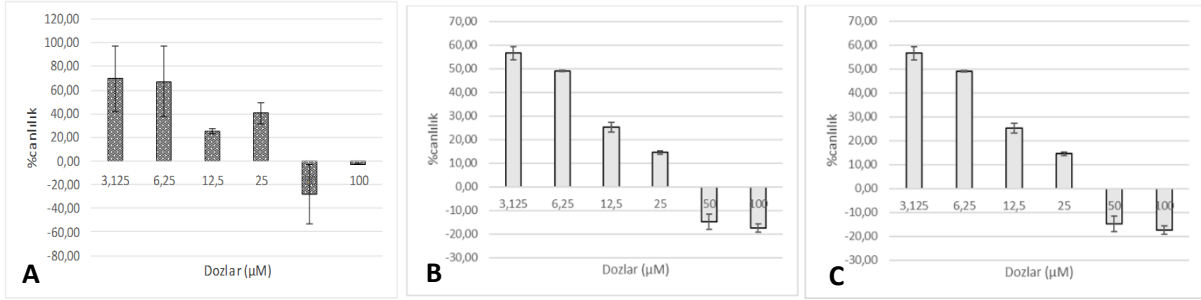


Figür 3.4. ARN14974=BOC nanopartikül formunun 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin MTT sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

Proje kapsamında sentezlenip karakterize edilmiş olan ARN nanopartikül formülasyonu ile A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen MTT testi sonucunda nu nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerinde oldukça çok düşük dozlarda sitotoksisiteyi gösterdiği ve etkili bir ARN14974=BOC ile karşılaştırıldığında daha etkili bir sitotoksik ajan olabileceği sonucu çıkarılabilmektedir. Deney sonucunda 24 saat sürede tespit edilen IC_{50} değeri $3.13 \mu M$ iken, 48 saat sonunda bu nanopartiküllerin yine yaklaşık aynı konsantrasyonda A549 hücreleri üzerinde ($3.125 \mu M$) IC_{50} değeri vermiş olduğu bulunmuştur. 72 saat süre ile nanopartikül uygulandığında ise elde edilen canlılık değerleri kör kuyu absorbanslarından daha düşük seviyeye düştüğünden canlılıklar çok düşük eksi (-) değerlerde tespit edilmiş olup IC_{50} değeri

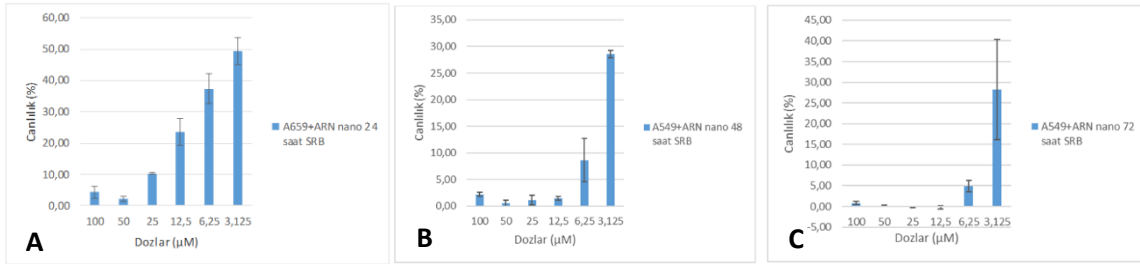
belirlenememiştir. Buradan nanopartikül formunun doza ve zamana bağlı olarak A549 hücrelerinde sitotoksisteye yol açmış olduğu saptanmıştır.

3.3. SRB test bulguları



Figür 3.5. ARN14974=BOC 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin SRB sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

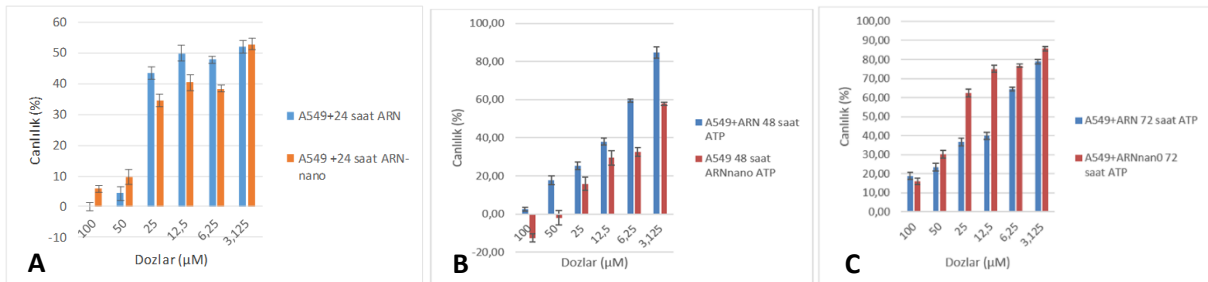
A549 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre ile farklı dozlarda ARN14974=BOC uygulaması ile gerçekleştirilen SRB test sonuçlarında tespit edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 34.2 µM, 47.8 µM ve 43.1 µM'dır. Bu sonuçlar MTT test sonuçlarıyla uyumluluk göstermekle birlikte ARN14974=BOC'un en düşük dozda IC_{50} değeri verdiği uygulama süresinin 24 saat olduğunu ifade etmektedir. Bu durum MTT sonucu elde edilen ARN14974=BOC'un A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik ajan olma potansiyelini SRB testi sonuçları da vurgulamaktadır.



Figür 3.6. ARN14974=BOC nanopartikül formunun 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin SRB sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

A549 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanan ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonunun uygulaması ile gerçekleştirilen SRB testi sonuçlarından elde edilen absorbans değerlerinde IC_{50} değeri sadece 14 saat için 2.95 µM olarak tespit edilmiştir. Diğer uygulama süreleri sonunda canlılık değerleri absorbans olarak eksi (-) değerlere düşmüş olduğundan canlılık değerleri eksi olarak bulunup grafikte gösterilmiştir. Bu nedenle IC_{50} değerleri 48 ve 72 saatlik uygulama süreleri için hesaplanamamıştır. Bu durum ARN nanopartikül formunun A549 hücreleri üzerinde ki ileri derecede sitotoksik olduğunu ifade etmekle birlikte doza bağlı hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir.

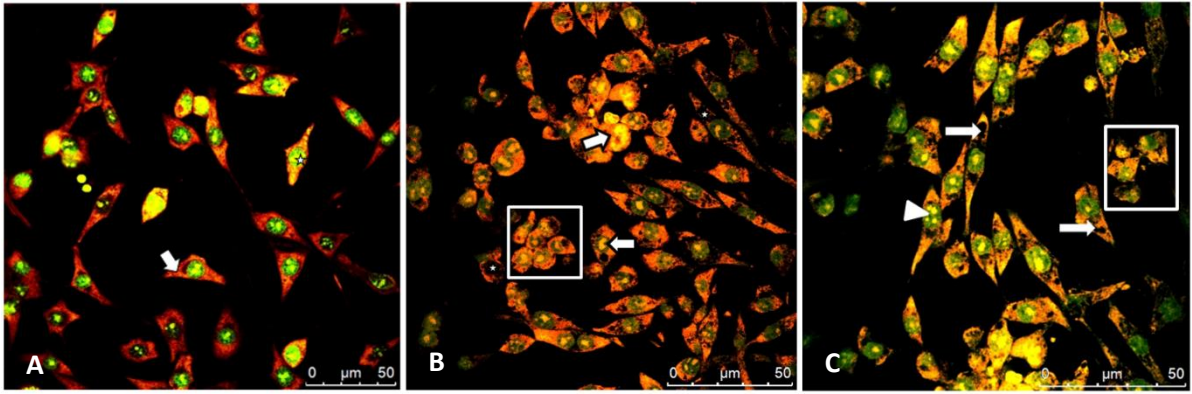
3.4. ATP test bulguları



Figür 3.7. ARN14974=BOC 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin ATP testi sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

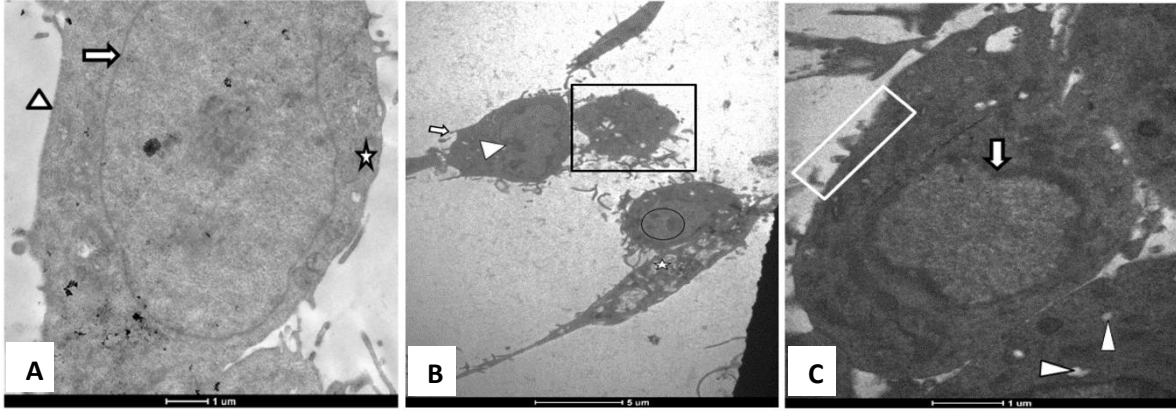
A549 akciğer kanseri hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre ile ARN ve nanopartikül formülasyonunun farklı dozları uygulanmış ve bunun sonucunda ATP testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen canlılık değerlerinden hesaplanan IC_{50} konsantrasyonları ARN için 24, 48 ve 72 saat uygulama süresince sırasıyla 12.5 μ M, 9.01 μ M ve 9.94 μ M olarak tespit edilirken bu değerler ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu için sırasıyla 3.77 μ M, 4.10 μ M ve 34.72 μ M olarak bulunmuştur. Bu değerler ARN'nin A549 hücreleri üzerine her uygulama süresinde sitotoksik etki gösterdiğini ifade etmektedir. Bunun yanı sıra A549 hücrelerine uygulanan nanopartikül formunun ARN'ye göre hücreleri daha düşük konsantrasyonlarda öldürebildiği ve yüksek sitotoksik kapasiteye sahip olduğu sonuçlardan görülmüştür. Ayrıca ARN nanopartikül formunun hücreleri doza bağlı olarak A549 akciğer kanseri hücrelerini öldürdüğü sonucu elde edilmiştir.

3.5. Konfokal mikroskopi bulguları



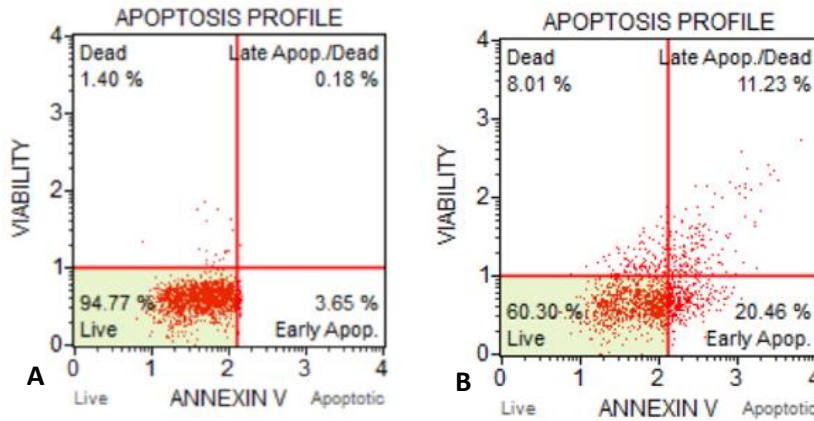
Figür 3.8. Kontrol (A), ARN14974=BOC (B) ve ARN14974=BOC nanopartiküllerinin (C) uygulamasından sonra A549 hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüsü. (A); Yıldız: Hücre çekirdeği, Ok: Hücre iskeleti. (B); Yıldız: Hücre iskeletinde delik, Ok: Kromatin yoğunlaşması, Kare: büzüşmüş ve yuvarlaklaşmış hücreler. (C); Ok: Hücre iskeletinde parçalanma, Ok başı: Kromatin kondenzasyonu ve çekirdek parçalanması, Kare: Parçalanmış ve yuvarlaklaşmış hücreler

A549 kontrol hücrelerine gerçekleştirilen ikili boyama sonucunda elde edilen konfokal mikroskopik görüntülerde hücre morfolojisinin değişmemiş olduğu, çekirdeğin, hücre membranının ve iskeletinin bütün olarak durduğu saptanmıştır. A549 kontrol hücrelerine ait konfokal mikroskop görüntüsü Figür 3.8.A'da yer almaktadır. ARN14974=BOC uygulanan A549 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntülerinde hücre iskeletinde deliklerin olduğu, kromatin yoğunlaşmasının ve çekirdek parçalanmasının meydana geldiği görülmektedir (Figür 3.8. B). Ayrıca hücre bütünüünün büzüştüğü ve yuvarlaklaşmaların meydana geldiği saptanmış ve bu değişikliklerin apoptotik hücre ölümüne işaret edebileceği düşünülmüştür. ARN14974=BOC'un proje kapsamında sentezlenen nanopartikül formülasyonunun uygulandığı A549 hücrelerinde konfokal mikroskopta hücre iskeletinde büyük deliklerin olduğu, ileri derecede kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanmasının gerçekleştiği saptanmıştır (Figür 3.8. C). Buna ilaveten hücre yapısının meydana gelen büzüşmeden dolayı yuvarlaklaştığı tespit edilmiştir. Bu morfolojik değişikliklerin ARN uygulanan A549 hücrelerinde meydana gelen değişikliklerden daha yoğun ve belirgin olarak meydana gelmiş olması sentezlenen nanopartikül formülasyonunun A549 hücre morfolojisi üzerinde etkin sitotoksik aktivite gösterdiğinin belirtisi olarak yorumlanmıştır.

3.6. *İnce yapısal değişiklik bulguları*

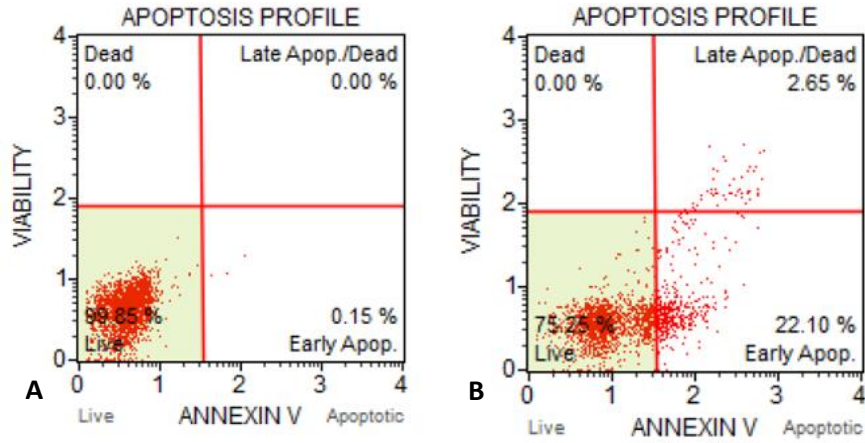
Figür 3.9. Kontrol (A), ARN14974=BOC uygulanmış (B) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonunun uygulandığı (C) A549 hücrelerinin TEM görüntüsü. (A); Yıldız: Mitokondri, Ok başı: Hücre membranı, Ok: Çekirdek membranı. (B); Yuvarlak: Kromatin kondenzasyonu, Kare: Hücre büzüşmesi ve mitokondri kaybı, Yıldız: Krista kaybı, Ok başı: çekirdek parçalanması ve kromatin kondenzasyonu, Ok: Membran tomurcuklanması.(C); Diktörtgen: Membran tomurcuklanması, Ok: Kromatin yoğunlaşması ve çekirdek boğumlanması, Ok başı: Mitokondri bozulmaları ve krista kaybı

ARN14974=BOC uygulanan A549 hücrelerinin ince yapısında mitokondri kristalarında ve zarlı organellerde kayıplar olduğu tespit edilmiştir. Hücre çekirdeğinin kromatin yoğunlaşması sonucunda at nalına benzer bükülme gösterdiği bulunmuştur. Hücre şeklinin yuvarlaklaşması ve membran tomurcuklanmalarının gerçekleştiği TEM görüntülerinde net olarak görülmektedir (Figür 3.9). ARN14974=BOC'un nanopartikül formülasyonunun 24 saat uygulandığı A549 hücrelerinde yoğun krista kaybı, ileri seviyede kromatin yoğunlaşması ve çekirdek boğumlanması meydana geldiği tespit edilmiştir (Figür 3.9). Bu ince yapısal değişiklikler de kontrol grubuna göre bakıldığında (Figür 3.9) ARN14974=BOC'un ve daha yoğun olarak da nanopartikül formülasyonunun A549 hücrelerinin ince yapısı üzerinde sitotoksitesine işaret etmektedir ve konfokal mikroskop bulgularıyla uyumluluk göstererek apoptotik belirteçler olarak değerlendirilebilecek sonuçlar teşkil etmektedirler.

3.7. *Aneksin V analizi bulguları*

Figür 3.10 Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinin apoptotik profili

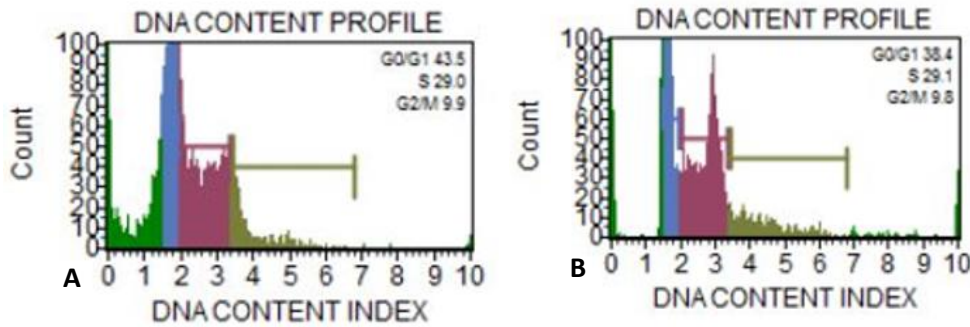
ARN14974=BOC'un 24 saat uygulandığı A549 hücrelerinin apoptotik profilindeki apoptotik hücre yüzdesinin 31.69'a çıktığı canlı hücre yüzdesinin ise 60.30'a düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum ARN14974=BOC maddesinin A549 akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermektedir.



Figür 3.11. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinin apoptotik profili

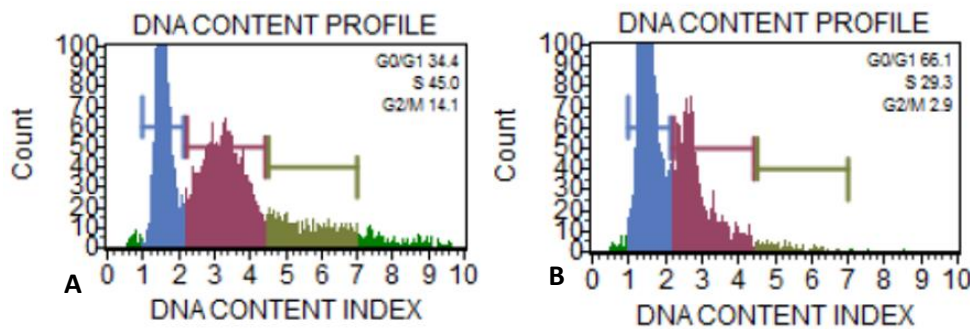
ARN14974=BOC'un nanopartikül formülasyonunun 24 saat uygulandığı A549 hücrelerinin apoptotik profilindeki hücrelerin % 75.25'inin canlı olup apoptotik hücre yüzdesinin 24.75 olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular ARN14974=BOC maddesinden sentezlenmiş olan nanopartikül formülasyonunun A549 akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini açıkça ifade etmiştir.

3.8. Hücre döngüsü analiz bulguları



Figür 3.12. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinde hücre döngüsü analizi

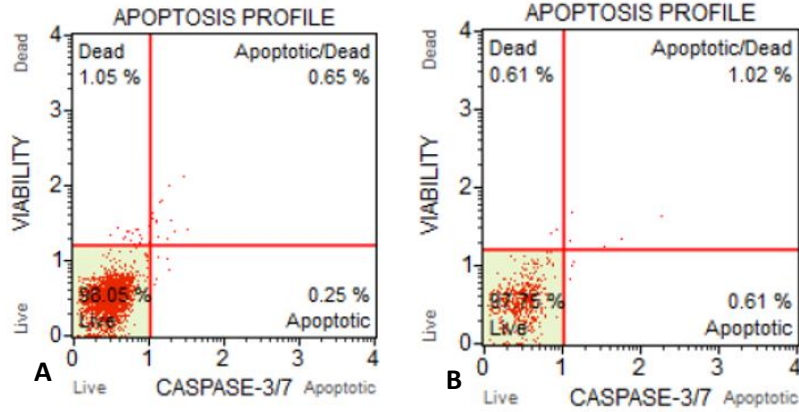
Yapılan hücre döngüsü analiz sonuçları Figür 3.12 ve Figür 3.13'de yer almaktadır. Deney sonuçlarından anlaşılacağı üzere ARN14974=BOC uygulanan A549 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda G0/G1 evresinde bulunan hücrelerin yüzdesi (38.4) kontrol grubuna göre (%43.5) hafif olarak azalmıştır.



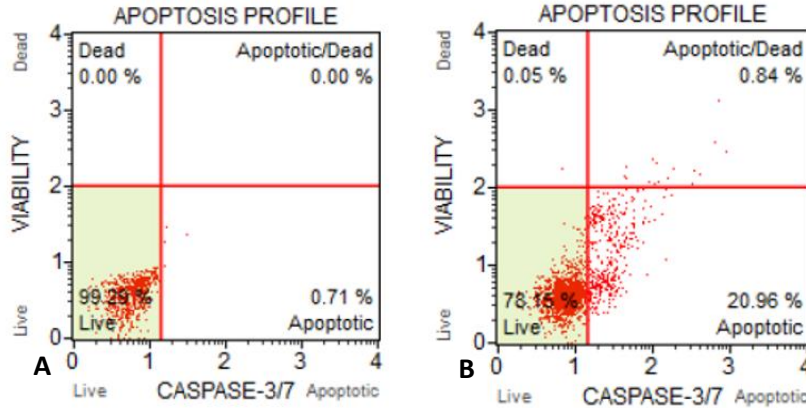
Figür 3.13. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinde hücre döngüsü analizi

Nanopartikül uygulanan A549 hücrelerinde S ve G2/M evrelerindeki populasyon kontrol grubuna kıyasla azalmıştır.

3.9. Kaspaz 3/7 analiz bulguları



Figür 3.14. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinin kaspaz 3/7 analizi bulguları

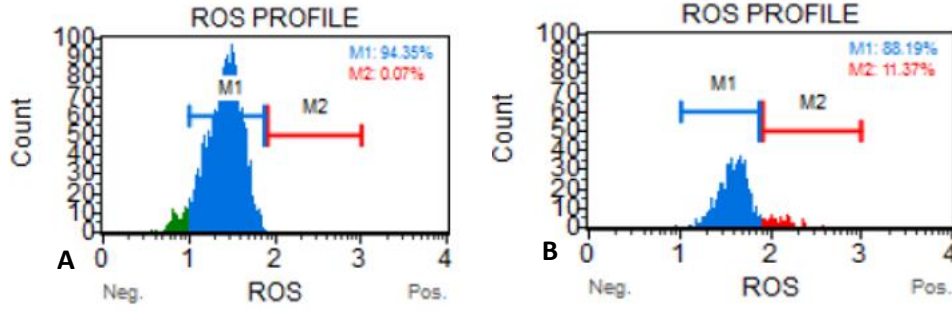


Figür 3.15. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinin kaspaz 3/7 analizi bulguları

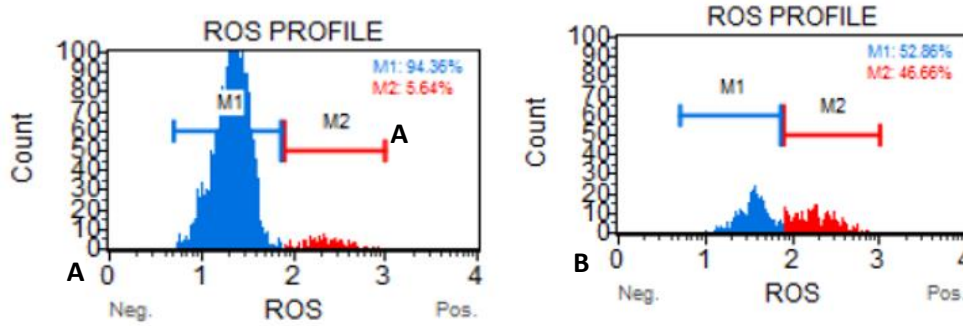
Deney sonuçlarından görülebildiği üzere ARN14974=BOC maddesi A549 hücreleri üzerinde kaspaz 3/7 aktivasyonuna neden olmamıştır. Bu grupta elde edilen total apoptotik hücreler %1.63 (Figür 3.15), kontrol grubunda ise (Figür 3.30) %0,90'dır. Nanopartikül formülasyonunun uygulandığı A549 hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla kaspaz 3/7 aktivasyonu gerçekleşmiş ve total apoptotik hücreler % 21.80 olarak tespit edilmiştir (Figür 3.15). Bu grubun kontrol hücrelerinin total apoptotik hücre yüzdesi ise 0.71'dir (Figür 3.15).

3.10. Oksidatif stres seviyesi analiz bulguları

A



Figür 3.16. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinin oksidatif stres seviyesi bulguları



Figür 3.17. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinin oksidatif stres seviyesi bulguları

Flow sitometrik olarak gerçekleştirilen ölçümlerde A549 kontrol hücrelerinde ((Ros (-)=%94.35), Ros (+)= %0.07) ve (Ros (-)=%94), Ros (+)= %5.64) reaktif oksijen türleri üretmemiş populasyon yüzdesi yüksek iken ARN uygulanmış A549 hücrelerinde ((Ros (-)=%88.19), Ros (+)= %11.37)) bu seviye kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu seviyedeki en büyük artışın ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulamasından sonra gerçekleştiği tespit edilmiştir ((Ros (-)=%52.86), Ros (+)= %46.66)) (Figür 3.16 ve Figür 3.17).

4. Sonuçlar ve tartışma

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri dünyada en sık görülen ve mortalitesi yüksek kanserlerden biridir. Gerçekleştirilen istatistiksel çalışmalarda yer alan verilere göre akciğer kanseri hem erkek hem de kadınlarda dünyada en yüksek mortalite gösteren kanser türüdür. Tüm akciğer kanseri vakaları için ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinde de erken teşhis ve tedavi yaklaşımları, hastaların yaşam süresini ve kalitesini yükseltmekte ve ölüm oranlarını düşürmektedir. Aktif olarak kullanılmakta olan tedavi yaklaşımları ve ilaçlar tam tedaviyi sağlayamamakla birlikte yüksek yan etkilere sahiptirler ve tedavi süreci bu nedenlerle çok sancılı bir şekilde dönüşmektedir. Bu nedenle akciğer kanserinin tedavisi için yeni tedavi yaklaşımları ve ilaç potansiyeli olan maddelere ve yan etkisi az olan yeni terapötik ajanlara ihtiyaç vardır. Tüm bu bilgiler kapsamında bu çalışmada bir seramidaz inhibitörü olan ARN14974=BOC'un ve bundan sentezlenen katı lipid nanopartikül formülasyonunun küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik/sitostatik, antiproliferatif ve proapoptotik potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir.

A549 hücreleri üzerinde sitotoksik, sitostatik ve antiproliferatif etkiler ARN ve ARN nanopartikül formülasyonlarının uygulamaları ile MTT, SRB ve ATP canlılık tesleri ile belirlenmiştir. Nanopartikül formülasyonunun sitotoksik etkisinin daha çok olduğu gösterilmiştir. Bu bulgularımız seramidaz inhibitörü kullanılarak kanser hücrelerinde sitotoksik etkinin oluştuğunu raporlayan çalışmalarla uyumludur [13, 14]. Hücrelerin ölüm şeklinin yapısal değişiklikler bazında belirlemek için konfokal mikroskopi ile morfolojik değişiklikler ve geçirimli elektron mikroskopunda ince yapısal değişiklikler analiz edilmiştir. Flow sitometrik analizler ile hücrelerde gerçekleşen ölüm yolları ve bu yollarda etkili olan proteinlerin aktivasyon ve ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Deneyler sonucunda ARN14974=BOC'un A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 35.1 µM olarak hesaplanmıştır. Hücrelerde ARN14974=BOC'un meydana getirdiği morfolojik değişiklikler ise konfokal mikroskopi yöntemi ile saptanmıştır. Bunun için A549 hücreleri ARN14974=BOC'un IC₅₀ değerine yine 24 saat süre ile maruz bırakılarak falloidin ve akrinin oranı ile boyandıktan sonra morfolojik yapıları konfokal mikroskopunda görüntülenmiştir. Hem ince yapısal değişiklikler hem de morfolojik

değişiklikler seramidaz inhibitörü ARN14974=BOC ve nanopartikül formülasyonunun A549 hücrelerinde tetiklediği ölüm şeklinin apoptoz olduğunu göstermiştir. Literatürde hücre içinde seramid birikime neden olan seramidaz inhibiyonu nedenli ölümün apoptoz olduğu vurgulanmış [3] olup çalışma sonuçlarımızı desteklemiştir. Hücre döngüsünü durdurma, proapoptotik etki, reaktif oksijen türlerinin üretimi gibi biyolojik süreçlerin çalışmamız sonucunda A549 hücrelerinde ARN14974=BOC uygulanmasından sonra aktive olduğu ve bu aktivasyonun yeni sentezlenmiş olan ARN14974=BOC katı lipid nanopartikülde daha belirgin olduğu ve düşük dozda gerçekleştiği literatür bilgisine [1] uyumlu olarak ve bu alandaki diğer çalışmaların verileri ile tutarlı olduğu [1, 3, 13, 14] bulunmuştur.

Sonuç olarak ARN14974=BOC'un ve nanopartikül formunun A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkileri saptanmıştır. ARN14974=BOC ve KLN formülasyonunun bu hücrelerde morfolojik ve ince yapısal değişikliklere neden olmuş ve bu değişiklikler apoptoz indikatörü olarak yorumlanmışlardır. Hem ARN14974=BOC hem de KLN formülasyonunun A549 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olarak apoptozu tetiklediği bulunmuştur. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde hücre ölümünün sentezlenen ARN14974=BOC'un nanopartikül formu tarafından daha etkin bir biçimde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Bu nedenle ARN14974=BOC KLN formülasyonunun kanser tedavisinde kullanılmak üzere ilaç potansiyeli taşıdığı ortaya konulmuş olup daha ileri farmakokinetik ve farmasötik çalışmalardan sonra ilaç geliştirilmesinde kullanımı önerilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kapsamında 1901S014 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2002). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74-108.
- [2] Müsellim B. (2007). Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi. *Akciğer Kanserine Güncel Yaklaşım Sempozyum Dizisi 2007*, 58, 113-118.
- [3] Oğretmen B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer*, 201818(1), 33-50.
- [4] Pathwardhan G. A., & Liu, Y. Y. (2011). Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *Prog Lipid Res*, 50(1), 104-114.
- [5] Cu villier O. (2002). Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1585(2-3), 153-162.
- [6] Reynolds, D., Shi, B. J., McLean, C., Katsis, F., Kemp, B., & Dalton, S. (2003). Recruitment of Thr 319-phosphorylated Ndd1p to the FHA domain of Fkh2p requires Clb kinase activity: a mechanism for CLB cluster gene activation. *Genes Dev.*, 17(14), 1789-802.
- [7] Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest*, 110(1), 3-8.
- [8] Strelow, L., Janigro, D., & Nelson, J. A. (2002). Persistent SIV infection of a blood-brain barrier model. *J Neurovirol.*, 8(4), 270-80.
- [9] Rombaut, R., Dejonckheere, V., & Dewettinck, K. (2006). Microfiltration of butter serum upon casein micelle destabilization. *J Dairy Sci*, 89(6), 1915-25.
- [10] Schmelz, E. M., Crall, K. J., Larocque, R., Dillehay, D. L., & Merrill, A. H. (1994). Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *J Nutr*, 124(5), 702-12.
- [11] Saied, E. M., & Arenz, C. (2016). Inhibitors of ceramidases. *Chem Phys Lipids.*, 197, 60-8.
- [12] Oskouian, B., & Saba, J. D. (2010). Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 688, 185-205.
- [13] Pizzirani, D., Bach, A., Realini, N., Armirotti, A., Mengatto, L., Bauer, I., Giroto, S., Pagliuca, C., De Vivo, M., Summa, M., Ribeiro, A., & Piomelli, D. (2015). Benzoxazolone carboxamides: potent and systemically active inhibitors of intracellular acid ceramidase. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54(2), 485-9.
- [14] Vejselova, D., Kutlu, H. M., Kus, G., Kabadere, S., & Uyar, R. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of ceranib-2 offering potential for a new antineoplastic agent in the treatment of cancer cells. *Turk J Biol.*, 38, 916-921.
- [15] Vejselova, D., Kutlu, H. M., & Kus, G. (2016). Examining impacts of ceranib-2 on the proliferation, morphology and ultrastructure of human breast cancer cells. *Cytotechnology*, 68, 2721-2728.
- [16] Albayrak, M. & Kutlu, H. M. (2021). Investigation of apoptotic activities of NOE on human ovarian cancer cells . *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14 (1), 132-137.