

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PLGA-KURKUMİN NANO-FORMÜLASYONUNUN KANSER
HÜCRELERİNDE NF- κ B'NİN P65 ALT BİRİMİ DÜZEYİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma BULUT

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ

ŞUBAT 2021

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PLGA-KURKUMİN NANO-FORMÜLASYONUNUN KANSER
HÜCRELERİNDE NF- κ B'NİN P65 ALT BİRİMİ DÜZEYİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Şeyma BULUT
(185309004)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA**

ŞUBAT 2021

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 185309004 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Şeyma BULUT, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "PLGA-KURKUMİN NANO-FORMÜLASYONUNUN KANSER HÜCRELERİNDE NF-κB'NİN P65 ALT BİRİMİ DÜZEYİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

İkinci Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA**
İstanbul Kültür Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Binnur TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Pelin KÖSEOĞLU YILMAZ.....
İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi : 15 Şubat 2021
Savunma Tarihi : 10 Şubat 2021



Sevgili Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince kıymetli bilgi, birikim, tecrübeleri ile bana yol gösteren ve destek olan, daima hoşgörü ile özverisini paylaşan, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirmem için her türlü imkanı sunan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ'ye;

Eğitim hayatım ve çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve emeklerini esirgemeyen, bilim yolunda ilerlemek için desteklerini sunan ve deneyimleri ile yol gösterici olan saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA ve Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU'na,

Tez çalışmalarım süresince laboratuvar olanaklarına erişim imkanı tanıyan Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Binnur TEMEL'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca sonsuz güven ve inanç ile desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, bu günlere gelmemde büyük emek veren, hayatımın her anında sevgilerini sürekli hatırlatan ve en zor günlerimde yanımda olan biricik aileme; başta sevgili annem olmak üzere sevgili babam, canım kardeşim Musa ve Mustafa'ya saygı ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi 8.2019/15 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Şubat 2021

Şeyma BULUT
(Moleküler Biyolog)

BEYAN

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

Şeyma BULUT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iv
BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BİLGİ	3
2.1 Kanser Gelişimi.....	3
2.1.1 Devam eden proliferatif sinyal iletimi	4
2.1.2 Büyüme engelleyici faktörlerden kurtulma.....	5
2.1.3 İmmun yıkımdan kaçış.....	6
2.1.4 Sınırsız bölünme yeteneği	7
2.1.5 İnvazyon ve metastaz	8
2.1.6 Anjiyogenez	9
2.1.7 Gen yapısında mutasyonlar	10
2.1.8 Enerji metabolizmasının yeniden programlanması.....	11
2.1.9 Hücre ölüm mekanizmalarından kaçınma.....	12
2.1.10 Tümörü destekleyen enflamasyon.....	12
2.2 Nanoteknoloji	13
2.2.1 Pasif Hedefleme	15
2.2.2 Aktif Hedefleme.....	16
2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	16
2.3.1 Lipozomlar	16
2.3.2 Miseller	17
2.4 Nano İlaç Taşıma Sistemleri	18
2.5 Polimerik Nano Taşıyıcılar	19
2.5.1 PLGA	20
2.6 Hedefli Kanser Tedavisi.....	21
2.7 Çoklu İlaç Direnci	22
2.8 Hücre Sinyal Mekanizmaları.....	23
2.9 Enflamasyon Mekanizmasında NF-kB Sinyal Yolağı.....	23
2.10 NF-kB Sinyal Yolağı Bileşenleri	27

2.11 NF-kB ve Kanser İlişkisi.....	28
2.12 Kurkumin	29
3. MATERYAL VE METOD.....	33
3.1 Malzemeler.....	33
3.2 Kullanılan Cihazlar	33
3.3 Deneysel Kısım	33
3.3.1 Hücre kültürü	33
3.3.2 Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi	34
3.3.3 Nano formülasyon sentezi.....	34
3.3.3.1 Tween 80 hazırlama	34
3.3.3.2 DSPE-PLGA sentezi	35
3.3.3.3 DSPE-PLGA-Kurkumin sentezi	35
3.3.3.4 Nano boyut dağılımı ölçümü.....	36
3.3.3.5 Hücre canlılığının belirlenmesi	36
3.3.4 Nano formülasyon oranının belirlenmesi.....	37
3.3.5 Paklitaksel uygulaması süresinin belirlenmesi.....	37
3.3.5.1 Total protein izolasyonu.....	38
3.3.5.2 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	38
3.3.5.3 Western blot	39
3.3.5.4 SDS-PAGE.....	39
3.3.5.5 Örneklerin membrana transfer edilmesi.....	40
3.3.5.6 İmmünoablottlama	40
3.3.5.7 Paklitaksel uygulama sürelerinin karşılaştırılması.....	40
3.3.6 Paklitaksel uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu.....	41
3.3.6.1 Nükleer ve sitoplazmik protein izolasyonu.....	42
3.3.6.2 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	43
3.3.7 Paklitaksel ve nano formülasyon uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu	43
3.3.7.1 Nükleer ve sitoplazmik protein izolasyonu.....	44
3.3.7.2 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi	44
3.3.7.3 Western blot analizi.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1 Nano Boyut Dağılımı Ölçümü	46
4.2 Hücre Canlılığı	50
4.1 Nano formülasyon oranının belirlenmesi.....	52
4.2 Paklitaksel uygulaması süresinin karşılaştırılması.....	53
4.2.1 Total protein miktar tayini	53
4.2.2 NF-kB alt birimlerinin western blot analizi ile karşılaştırılması.....	54
4.2.3 Paklitaksel uygulama süresinin karşılaştırılması	55
4.3 Paklitaksel uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu.....	56
4.3.1 Paklitaksel ve nano formülasyon uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu	57
4.3.2 Protein miktar tayini.....	58
4.3.3 Western Blot.....	59
4.3.4 Grupların karşılaştırılması.....	60
5. SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	74

KISALTMALAR

APS	: Amonyum Persulfat
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma 2
BSA	: Bovine Serum Albümin
ddH₂O	: İyonize Edilmiş Distile Su
dH₂O	: Distile Su
DMEM.	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSPE	: 1,2-distearol-sn- glisero-3-fosfoetanolamin
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPR	: Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
IL-6	: İnterlökin 6
KBB	: Kan Beyin Bariyer
kDa	: Kilodalton
LPS	: Lipopolisakkarit
MDR	: Çoklu İlaç Direnci, Multidrug Resistance
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
P-gp	: P-glikolipit
PARP	: Poli ADP Riboz Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDI	: Polidispersite
PEG	: Poli(etilen glikol)
PLGA	: Poli(laktik-ko-gliko asit)
PVDF	: Poliviniliden Diflorür
RHD	: Rel Homoloji Alanı
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-Page	: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBS	: Tris Baz Tamponu
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TLR	: Toll Benzeri Reseptör
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü alfa

SEMBOLLER

g	: Gram
nM	: Nanometre
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
ε	: Epsilon
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1 : Protein standartı olarak kullanılan BSA absorbansı.	53
Tablo 4.2 : Bradford tayini ile absorbans değerine bağlı olarak protein konsantrasyonu.....	54
Tablo 4.3 : Protein standartı olarak kullanılan BSA absorbansı.	56
Tablo 4.4 : Bradford tayini ile absorbans değerine bağlı olarak protein konsantrasyonu.....	57
Tablo 4.5 : Protein standartı olarak kullanılan BSA absorbansı.	58
Tablo 4.6 : Bradford tayini ile absorbans değerine bağlı olarak protein konsantrasyonu.....	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Kanserin 10 temel özelliği.....	4
Şekil 2.2	: Devam eden proliferatif sinyal iletimi.....	5
Şekil 2.3.	: Büyüme engelleyici faktörlerden kurtulma.....	6
Şekil 2.4.	: İmmun yıkımdan kaçış.	7
Şekil 2.5	: Sınırsız bölünme yeteneği.	8
Şekil 2.6.	: İnvazyon ve metastaz aktivasyonu.	9
Şekil 2.7	: Anjiyogenezin tetiklenmesi.	9
Şekil 2.8	: Genom instabilitesi ve mutasyon.	10
Şekil 2.9	: Enerji metabolizmasının yeniden programlanması.	11
Şekil 2.10	: Hücre ölüm mekanizmasından kaçınma.....	12
Şekil 2.11	: Tümörü destekleyen inflamasyon.	13
Şekil 2.12	: Nanoteknoloji uygulama alanı.....	14
Şekil 2.13	: Lipozomlar ile ilaç iletimi.	17
Şekil 2.14	: İlaç hidrofobikliğine bağlı olarak bir misel ile ilaç etkileşimleri.	18
Şekil 2.15	: Biyobozunur nanopartikül çeşitleri.	20
Şekil 2.16	: PLGA nanopartiküllerinin hidrolizi.	20
Şekil 2.17	: Enflamasyon gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan NF-kB hedef genleri.....	25
Şekil 2.18	: NF-kB sinyal mekanizmasının düzenlenmesi.	27
Şekil 2.19	: NF-kB, İκB ve IKK protein ailesi.	28
Şekil 2.20	: Kurkuminoitlerin kimyasal yapıları.	30
Şekil 2.21	: Klasik NF-kB sinyal mekanizmasının şematik gösterimi.	32
Şekil 3.1	: Partikül oluşturma yöntemi.	35
Şekil 3.2.	: Meme kanseri hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin, DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyon	36
Şekil 3.3	: Farklı oranlarda 72 saat süreyle uygulanan DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonu.	37
Şekil 3.4	: Meme kanseri hücrelerinde 1, 3, 6 ve 24 saat olarak uygulanan paklitaksel ilacı.	38
Şekil 3.5	: Bradford yöntemi.	39
Şekil 3.6.	: NF-kB alt birimlerinin Western Blot yöntemi ile karşılaştırılması.	41
Şekil 3.7	: Meme kanseri hücrelerinde Kontrol ve 24 saat olarak uygulanan paklitaksel ilacı.	42
Şekil 3.8	: Kontrol ve 24 saat süreyle paklitaksel uygulanan hücre grupları.	42
Şekil 3.9	: Sırasıyla kontrol; 24 saat paklitaksel ile birlikte 2:98 oranında nano formülasyon; 24 saat paklitaksel ile birlikte 1:9 oranında nano formülasyon uygulanan hücre grupları	44
Şekil 3.10	: Meme kanseri hücrelerinde 24 saat paklitaksel uygulamasından sonra yapılan nükleer ve sitoplazmik protein izolasyonu.....	44
Şekil 4.1	: PLGA-Kurkümin nano formülasyonuna ait sayıca (a), hacimce (b),	

	şiddetçe (c) dağılımı.....	47
Şekil 4.2	: PLGA-DSPE nano formülasyonuna ait sayıca (a), hacimce (b), şiddetçe (c) dağılımı.....	48
Şekil 4.3	: PLGA-DSPE-Kurkumin nano formülasyonuna ait sayıca (a), hacimce (b), şiddetçe (c) dağılımı.....	49
Şekil 4.4	: MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.....	50
Şekil 4.5	: MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.....	51
Şekil 4.6	: MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.....	51
Şekil 4.7	: MDA-MB-231 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.....	52
Şekil 4.8	: MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat olarak farklı oranlarda uygulanan DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.....	53
Şekil 4.9	: BSA standart proteini ile elde edilen standart eğri grafiği.....	54
Şekil 4.10	: MDA-MB-231 hücrelerinde 1, 3, 6 ve 24 saat olarak uygulanan paklitaksel bağlı olarak NF-kB alt birimlerine ait Western Blot yöntemi sonuçları.....	55
Şekil 4.11	: NF-kB ekspresyonu 24 saat paklitaksel uygulaması ile artış göstermiştir.....	56
Şekil 4.12	: BSA standart proteini ile elde edilen standart eğri grafiği.....	57
Şekil 4.13	: BSA standart proteini ile elde edilen standart eğri grafiği.....	58
Şekil 4.14	: Sırasıyla; Control 24 saat paklitaksel Control, 20 µl NP, 100 µl NP uygulanan hücre gruplarında sitoplazmik ve nükleer proteinlerine ait p65 primerinin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi.....	60
Şekil 4.15	: MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat paklitaksel ve 24 saat paklitaksel ile birlikte farklı oranda uygulanan nano formülasyona bağlı olarak NF-kB alt birimine ait Western Blot yöntemi sonuçları.....	61
Şekil 4.16	: Western blot analizine ait kantitatif sonuçlar.....	61

PLGA-KURKUMİN NANO-FORMÜLASYONUNUN KANSER HÜCRELERİNDE NF-KB'NİN P65 ALT BİRİMİ DÜZEYİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Kanser kemoterapi ajanlarının sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkilerine ek olarak bu ilaçların özellikle klinik kullanımdaki yüksek maliyeti göz önüne alındığında prooksidan polifenoller ile etkinliklerinin artırılması önem taşımaktadır.

Geleneksel sitotoksik kemoterapi, birçok kanser türü için hâlâ tercih edilen bir tedavi yöntemi olarak devam etmesine rağmen son yıllarda kanser tedavisinde çarpıcı bir değişim meydana gelmiştir. Kanser hücreleri için daha seçici etki gösterecek ve böylece normal hücreler üzerinde istenmeyen yan etkileri önleyerek daha az yan etkiye neden olacak yeni ilaçların tasarlanmasında büyük çaba gösterilmiştir.

Son yıllarda önemi giderek artan bir yaklaşım olan polimerik nanoparçacıkların ilaç taşıyıcılar olarak kullanılmasıyla daha az sistemik yan etki görülmekte ve tümör dokusunda daha yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşılmakta ve tedavi etkinliği belirgin ölçüde artırılmaktadır. Polimerik materyaller arasında en sık kullanılan polilaktik-ko- glikolik asit (PLGA), fizyolojik ortamda inert, biyoparçalanabilir, biyoyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, Food and Drug Administration) tarafından da onaylanmış bir biyomateryaldir.

Birçok çalışmada prooksidan etkisine sahip polifenollerin başında gelen kurkuminin insanlardaki farmokinetiğin, güvenliğinin ve etkinliği ortaya konulmuştur. Son zamanlarda kurkuminin antikanser aktivitesi gösterilmiş kanser tedavisindeki önleyici ve tedavi edici potansiyeli vurgulanmıştır. Ancak bu bileşiğin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan biyolojik aktivite testlerinde yüksek konsantrasyonda kullanımı sorunla karşılaşmaktadır.

Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB); enflamasyon, immün yanıt, proliferasyon ve apoptoziste sorumlu olan çok sayıda genin önemli bir regülatörü olan transkripsiyon faktörüdür.

NF-kB, tüm hücrelerde sitoplazma içerisinde inaktif halde bulunur. NF-kB, Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından 1986 yılında B lenfositlerin çekirdeklerinde immünglobulin kappa hafif zinciri geninde enhancer bölgesine bağlanan bir faktör olarak tanımlanmıştır. NF-kB protein kompleksi beş farklı alt proteinden (NF-kB1 (p50/p105), NF-kB2 (p52/p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel) oluşmaktadır. NF-kB immün sistemin normal çalışması için gereklidir. NF-kB'nin tümör hücrelerinin gelişiminde etkili olduğu ve NF-kB inhibisyonunun gerçekleşmesi halinde tümör hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirdiği belirtilmektedir.

NF-kB'nin aktivasyonu hücre içi büyüme faktörleri, oksidatif stres, mitojenler, pro-inflamatuar sitokinler, virüsler, gram negatif bakteri ürünleri, çevresel stres koşulları

gibi pek çok farklı etken ile gerçekleşmektedir. NF-kB hücre sitoplazmasında inhibitör protein olan IκB ile kompleks halde bulunur. IκB kinaz kompleksi (IKK) tarafından IκB proteinin fosforillenmesiyle bu protein inaktive olur ve NF-kB'den ayrılır. Böylelikle serbest kalan NF-kB nükleusa geçer. DNA'ya bağlanarak spesifik genlerin aktivasyonuna yol açar.

Kurkuminin anti-inflamatuar aktivitesi olduğu ve etkisini NF-kB aktivasyonunu baskılayarak sağladığı, ilk kez 1995 yılında Singh ve Aggarwal tarafından gösterilmiştir. Bu bulgunun yayımlanmasının ardından, diğer araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalar sonrasında NF-kB sinyal yolağındaki başka molekülleri de inhibe edebildiği gösterilmiştir. Kurkuminin NF-kB yolağına inhibisyonu aracılığı ile pankreatik, meme, kolorektal, oral, baş-boyun, glioblastoma, over, prostat ve T-hücreli lenfoma gibi birçok kanser hücresinde anti-kanser etkisi olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Birçok çalışma ile kurkuminin, kanser gelişimini önlemesi ile kanser tedavisinde güvenilirliği ve etkinliği kanıtlanmıştır. NF-kB yapısının ve mekanizmasını aydınlatılması, hücrel stresin azaltılmasında ve bununla birlikte yeni bakış açıları ile stresin negatif etkilerinin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynayacağı düşünülmektedir. Yapılan literatür incelemelerinde PLGA-Kurkumin nano formülasyonun kanser hücrelerinde Nf-kB'nin p65 alt birimi düzeyi üzerindeki etkisinin incelendiği bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu noktadan yola çıkarak çalışmamızda, günümüzde antikanser aktivitesi gösterilmiş, kanser tedavisindeki önleyici ve tedavi edici potansiyeli vurgulanan kurkumin nano formülasyonun NF-kB sinyal mekanizması için de aydınlatıcı olabileceği düşüncesiyle PLGA-kurkumin nano formülasyonunun kanser hücrelerinde Nf-kB'nin p65 alt birimi düzeyi üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

PLGA-Kurkumin nano formülasyonunun, p65 alt biriminin üzerindeki etkisi paklitaksel uygulanan MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde incelenmiştir. P65, PLGA-Kurkumin tarafından en çok baskılanan birim olmakla birlikte bu nano formülasyon ile birlikte kanser hücrelerindeki enflamasyonun engellenmesi nano formülasyonun güvenilirliğini arttırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: NF-kB, nano formülasyon, kurkumin, PLGA.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PLGA-CURCUMIN NANO-FORMULATION ON THE P65 SUB-UNIT LEVEL OF NF κB IN CANCER CELL LINES

SUMMARY

In addition to the toxic effects of cancer chemotherapy agents on healthy cells, it is important to increase the effectiveness of these drugs with pro-oxidant polyphenols, especially considering the high cost of these drugs in clinical use.

Although traditional cytotoxic chemotherapy remains the treatment of choice for many types of cancer, a dramatic change has occurred in cancer treatment in recent years. Great efforts have been made to design new drugs that will act more selectively for cancer cells and thus prevent unwanted side effects on normal cells and cause less side effects.

With the use of polymeric nanoparticles as drug carriers, which has become an increasingly important approach in recent years, less systemic side effects are seen, higher drug concentrations are achieved in tumor tissue and the treatment efficiency is significantly increased. Polylactic-co-glycolic acid (PLGA), which is the most commonly used polymeric material, is a biomaterial that is inert, biodegradable, biocompatible in physiological environment, and is widely used in new drug delivery systems and has been approved by the FDA due to its ability to break down into non-toxic products.

In many studies, the pharmacokinetics, safety and efficacy of curcumin, which is one of the leading polyphenols with prooxidant effect, have been revealed. Recently, anticancer activity of curcumin has been demonstrated and its preventive and therapeutic potential in cancer treatment has been emphasized. However, the use of this compound at high concentrations in biological activity tests is faced with problems due to its low solubility in water.

NF-κB (Nuclear Factor Kappa B); It is a transcription factor that is an important regulator of many genes responsible for inflammation, immune response, proliferation and apoptosis.

NF-κB is found inactive in the cytoplasm in all cells. NF-κB was identified by Ranjan Sen and David Baltimore in 1986 as a factor that binds to the enhancer region of the immunoglobulin kappa light chain gene in the nuclei of B lymphocytes. The NF-κB protein complex consists of five different sub-proteins (NF-κB1 (p50 / p105), NF-κB2 (p52 / p100), RelA (p65), RelB and c-Rel). NF-κB is necessary for the normal functioning of the immune system. It is stated that NF-κB is effective in the development of tumor cells and if NF-κB inhibition occurs, it makes the tumor cells sensitive to chemotherapy. The activation of NF-κB takes place with many different factors such as intracellular growth factors, oxidative stress, mitogens, pro-

inflammatory cytokines, viruses, gram-negative bacteria products, environmental stress conditions. NF- κ B is in a complex with the inhibitory protein I κ B in the cell cytoplasm. By phosphorylation of the I κ B protein by the I κ B kinase complex (IKK), this protein is inactivated and separated from NF- κ B. Thus, the released NF- κ B passes into the nucleus. It leads to the activation of specific genes by binding to DNA.

It was first demonstrated in 1995 by Singh and Aggarwal that curcumin has anti-inflammatory activity and provides its effect by suppressing NF- κ B activation. Following the publication of this finding, studies conducted by other researchers have shown that it can inhibit other molecules in the NF- κ B signaling pathway. It has been reported by many researchers that curcumin has an anti-cancer effect on many cancer cells such as pancreatic, breast, colorectal, oral, head-neck, glioblastoma, ovarian, prostate and T-cell lymphoma through inhibition of the NF- κ B pathway.

Many studies have proven the safety and effectiveness of curcumin in cancer treatment by preventing cancer development. It is thought that elucidating the structure and mechanism of NF- κ B will play an important role in reducing cellular stress and eliminating the negative effects of stress with new perspectives. In the literature reviews, there is no study investigating the effect of PLGA-curcumin nanoformulation on the p65 subunit level of Nf- κ B in cancer cells lines. Based on this point, our study aimed to examine the effect of PLGA-curcumin nanoformulation on the p65 subunit level of Nf- κ B in cancer cells, with the thought that curcumin nanoformulation, which has been shown to have anticancer activity and emphasized its preventive and therapeutic potential in cancer treatment, can also be illuminating for NF- κ B signaling mechanism. The effect of PLGA-Curcumin nano-formulation on the ratios of p65, was investigated on MDA-MB-231 breast cancer cells treated with paclitaxel. Although P65 is the unit most suppressed by PLGA-Curcumin, inhibition of inflammation in cancer cells with this nanoformulation increases the reliability of nanoformulations.

Keywords: NF- κ B, nano-formulation, curcumin, PLGA.

1. GİRİŞ

NF-kB, birçok sayıda genin düzenlenmesinden sorumlu olan bölgelerde ifade edilen bir ökaryotik transkripsiyon faktörüdür [1]. 1986 yılında Baltimore ve ark. tarafından keşfedilen NF-kB ailesi, çeşitli homodimerler ve heterodimerler oluşturan 5 farklı DNA bağlayıcı proteinden oluşmaktadır [2, 3]. NF-kB proteinleri, hücre profilyasyonu artırabilen, apoptozu inhibe edebilen, hücre göçünü teşvik edebilen, anjiyogenez ve metastazı uyarabilen, doğal ve edinilmiş immun yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan önemli faktörlerdir [4]. NF-kB aktivasyonu viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, DNA hasarı, oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklenmektedir [4]. Özellikle malign hücreler ve tümör mikroçevresi ile birçok kanser türünde NF-kB sinyal yolağı önemli rol oynamaktadır [5, 6].

p50 (NF-kB1), p52 (NF-kB2), p55 (Rel B), p65 (Rel A) ve c-Rel (Rel) alt birimlerinden oluşan NF-kB sinyal yolağı, bakteriyel lipopolisakkaritler (bacterial lipopolysaccharides, LPS) veya proenflamatuar sitokinler gibi uyarılar ile aktive edildiğinde, hücre çekirdeğine taşınır ve çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu başlatır [7]. Bu proenflamatuar moleküller aynı zamanda hücre proliferasyonuna ve tümör oluşumuna katılır [8]. NF-kB sinyal yolağı anti-apoptotik genleri regüle ederek kanser hücrelerinin sağkalımını sağladığı bilinmektedir. Kanser hücrelerinin sağkalımı veya apoptozu NF-kB transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna bağlı olabilmektedir. Birçok önemli enflamatuar hastalıklarda; meme, akciğer, karaciğer, pankreas, prostat kanseri gibi birçok kanser türünde rol alarak kanser hücrelerinin sağkalımını etkilemektedir [9].

NF-kB transkripsiyon faktörleri, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sinyal yollarından gelen uyarılara karşı yanıt oluşturabilmesinden dolayı son birkaç yıldır önemli ilgi odağı olmuştur [10]. NF-kB transkripsiyon faktörleri, inhibitör IκB protein ailesi tarafından hücrelerin sitoplazmasında pasif olarak tutulan dimerler olarak işlev görür [11-13]. En az 5 farklı IκB proteini tanımlanmıştır: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ ve bcl-3.

Hücre kültürü çalışmaları, transkripsiyon faktörü NF-kB'nin kurkumin tarafından inhibe edildiğini bildirmiştir [14-19]. Yapılan çalışmalar ile kurkumin NF-kB-DNA etkileşimini artırdığı ve NF-kB hedef genlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [19]. Ancak kurkuminin sudaki çözünürlüğünün sınırlı olması biyolojik çalışmalarda kullanımında engel oluşturmaktadır. Kurkuminin NF-kB sinyal yolağını inhibe ettiği bilinmekle birlikte p65 alt birimi üzerindeki etkisi, kurkuminin sudaki çözünürlüğünün oldukça sınırlı olması göz önüne alınarak, tam olarak bilinmemektedir. Kurkuminin düşük çözünürlüğü hücre kültürü dahil olmak üzere biyolojik sistemlerde yeteri kadar etki gösterememekte ve yüksek dozlarda kullanımı ile olası sonuçlar bilinmemektedir.

NF-kB yapısının ve kurkuminin etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması hücrel stresin azaltılması, dolayısıyla stresin olumsuz etkilerinin giderilmesinde ve kanserin tedavisinde yeni yaklaşımların ve etki mekanizmaların ortaya konmasında önemli bir yer tutacaktır.

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında, PLGA'nın hidrofob kapasitesi 1,2-distearol-3-fosfoetanolamin (DSPE) ile artırılmıştır. DSPE ile PLGA'nın hidrofob kapasitesi artırılarak kurkuminin daha önce uygulanan çalışmalarda çözünürlük oranına kıyasla daha fazla çözünürlük elde edilerek sulu hücre kültürü ortamında antioksidan ve pro-oksidan dozda kullanımı mümkün olmuştur. Çalışmamızda kurkumin çözünürlüğünü artırarak ve NF-kB sinyal mekanizması kurkumin tarafından suprese edilerek p 65 alt birimi üzerindeki etkisini incelenmesi amaçlanmıştır.

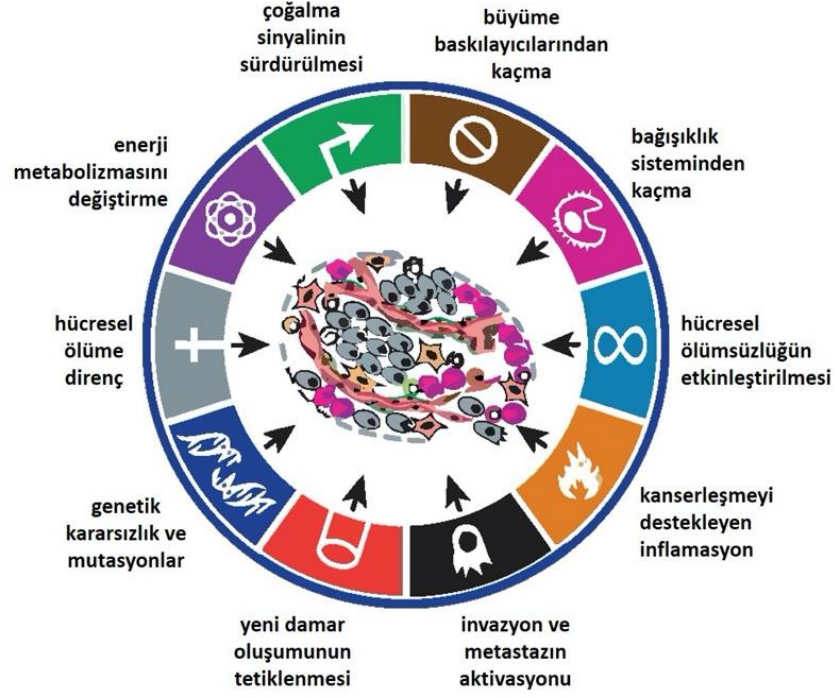
2. TEORİK BİLGİ

2.1 Kanser Gelişimi

Kanser gelişimi ve evreleri, bir dizi fonksiyonel ve genetik anormallikleri içeren karmaşık bir süreçtir. DNA metilasyonu ve histon asetilasyonundaki değişiklikler gibi epigenetik modifikasyonlar, genomik mutasyonlar, gen ekspresyonundaki ve hücre fonksiyonundaki değişiklikler kansere yol açabilmektedir. Malign süreç ve metastatik ilerlemeye neden olan moleküler mekanizmalara yönelik sorular birçok yeni teşhis ve tedavi stratejisinin geliştirilmesinin temelini oluşturmaktadır. Farklılaşma ve proliferasyon bakımından hücrelerin normal gelişiminde görülen bir bozulmayı içermesinden dolayı “gelişimsel bozukluk” olarak kabul edilebilmektedir [20]. Kanser hücreleri genellikle hayatta kalma, proliferasyon, farklılaşma, hücre ölümü ve hücre tipine özgü fonksiyonların ekspresyonu için gerekli olan biyomoleküllerin komplementlerini içermektedir. Hücre fonksiyonu için gerekli olan bu moleküllerin değiştirilmesi ile moleküller, işlevleri yerine getirememektedir. Kontrolsüz büyüme göstermeye başlayan hücre, tümör başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Sürecin genellikle en az iki genetik değişiklik gerektirdiği düşünülmektedir. Bunlar hücrenin fonksiyonel işlevsizliğini azaltma yeteneğini kaybetmesine neden olur ve daha sonrasında hücre ölümsüz hale gelir [21].

Kanser gelişimi ve ilerlemesi, tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybı ve/veya onkogen fonksiyonunun uyarılmasını içerebilir. Tümör baskılayıcı faktör veya onkogenlerde değişiklik oluşturan spesifik mekanizmalar, farklı tümör histolojisine bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte aynı histoloji içerisinde de değişiklik gösterebilmektedir [22].

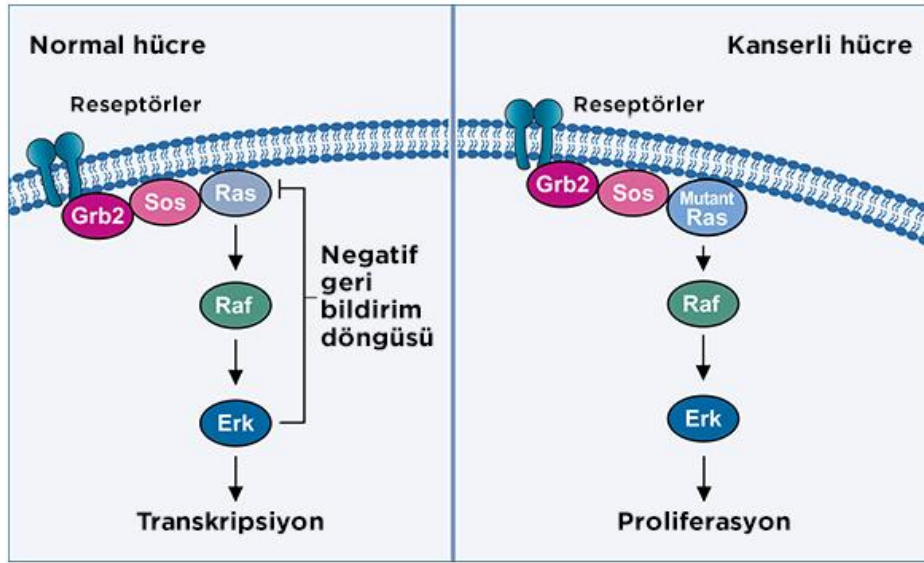
Hanahan ve Weinberg kanserin 10 temel özelliğini belirlemiştir (Şekil 2.1) [23]:



Şekil 2.1 : Kanserin 10 temel özelliği.

2.1.1 Devam eden proliferatif sinyal iletimi

Normal dokular hücre büyüme ve bölünme döngüsünü regüle eden sinyallerin üretimini ve salınmasını kontrol ederek hücre sayısının homeostazisinin sağlanması ve doku bütünlüğünün korunması gibi durumları takip etmektedirler. Kanser hücreleri ise bu sinyallerin serbest bırakılması ile kontrol dışı büyüme ve çoğalma gösterirler. Artan büyüme faktörü üretimi, hücre yüzeyindeki reseptör sayısını artırma, kanser hücresinin sinyalizasyonunu kolaylaştırmak için yapısal olarak reseptörlerin değiştirilmesi, sinyal yolundaki proteinlerin aktive edilmesi gibi yollar ile kanser hücreleri sinyal mekanizması olmadan proliferasyonlarını sürdürebilmektedir (Şekil 2.2) [24].

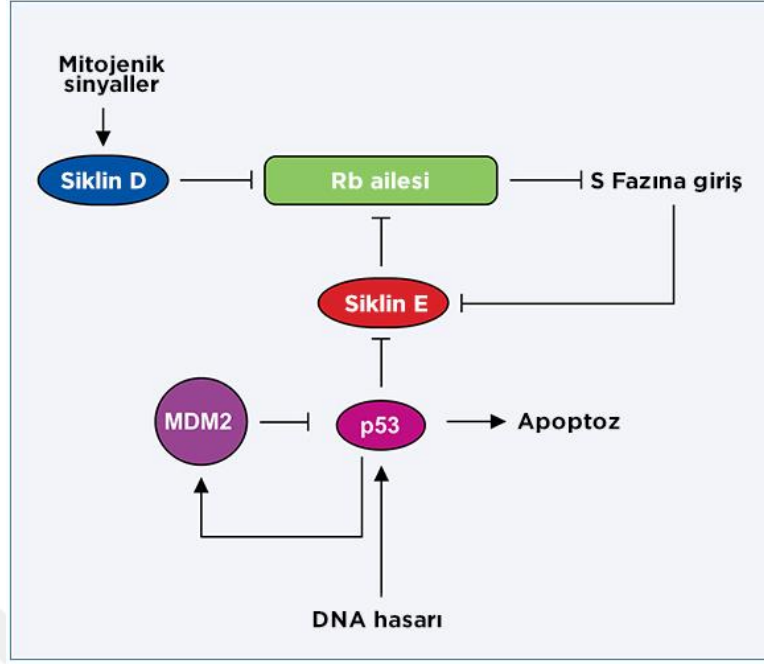


Şekil 2.2 : Devam eden proliferatif sinyal iletimi.

Tümör hücreleri onkogenik Ras sinyal iletim yolağındaki negatif geri bildirim döngülerini bozarak tümör hücrelerinde devam eden proliferatif sinyal iletimine yol açmaktadır [24].

2.1.2 Büyüme engelleyici faktörlerden kurtulma

Sağlıklı hücrelerin hücre proliferasyonu, pro- ve anti-proliferasyon sinyallerinin hücre döngüsü düzeyinde koordine edildiği bir süreçtir. Hücre proliferasyonunun uygun şekilde düzenlenmemesi kanser oluşumu tetiklenmektedir. B hücresi malignitesi, kromozom translokasyonları, siklinler veya siklin bağımlı kinazlar gibi hücre döngüsü proteinlerinin işlevini doğrudan etkileyebilen genetik değişiklikler tarafından yönlendirilmektedir. Ek olarak lenfomaların malignitelere dönüşmesinin önemli bir nedeni tümör baskılayıcı faktörlerin işlev göremeyerek hücre döngüsü kontrol noktalarından kaçınmasıdır (Şekil 2.3) [25].

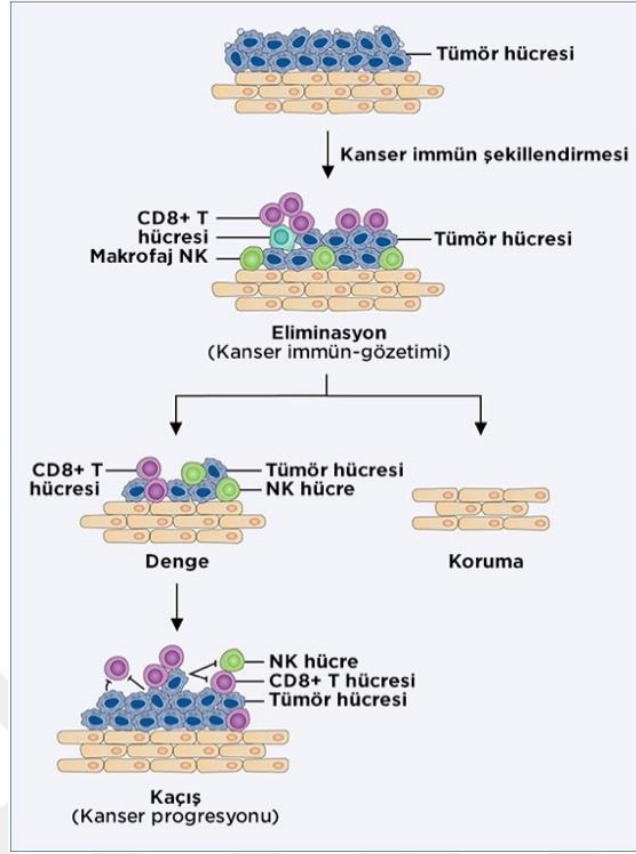


Şekil 2.3 : Büyüme engelleyici faktörlerden kurtulma.

Rb (Retinoblastoma). Tümör hücrelerinde inaktive edilen 2 yaygın tümör baskılayıcı olan Rb ve p53'ün inaktivasyonu, kontrolsüz büyüme ve proliferasyona yol açmaktadır [26].

2.1.3 İmmün yıkımdan kaçış

Kanser immunitésinin düzenlenmesi süreci temel olarak “3 E (Elimination; eliminasyon, Equilibrium; denge, Escape; kaçış) kanser immün düzenleyici” olarak adlandırılan 3 aşamalı (1) eliminasyon, (2) denge ve (3) kaçış basamaklarından oluştuğu öngörülmektedir [27]. Eliminasyon, kanser immunitésinin normal fonksiyonu anlamına gelmektedir; kanser hücreleri immün sistem tarafından başarılı bir şekilde tanınır ve ortadan kaldırılır. Bu sayede dokuların normal işlevlerini sürdürmesi sağlanır. İmmün sistem tarafından tamamen ortadan kaldırılamayan tümör hücreleri sayıca artış göstermeye devam ederek denge fazına geçer. Denge aşamasında 2 sonucun ortaya çıkabileceği varsayılmıştır: (1) Bağışıklık sistemi, tüm tümör hücrelerini ortadan kaldırabilir; (2) Bağışıklık sisteminin uzun bir süre boyunca tümörler ile sürekli etkileşimi sonucunda tümörlerin immün yanıtı karşı duyarlılığını kaybetmesine ve immün sistemden kaçış olarak adlandırılan tümör hücrelerinin birikimine sebep olabilir (Şekil 2.4) [28].

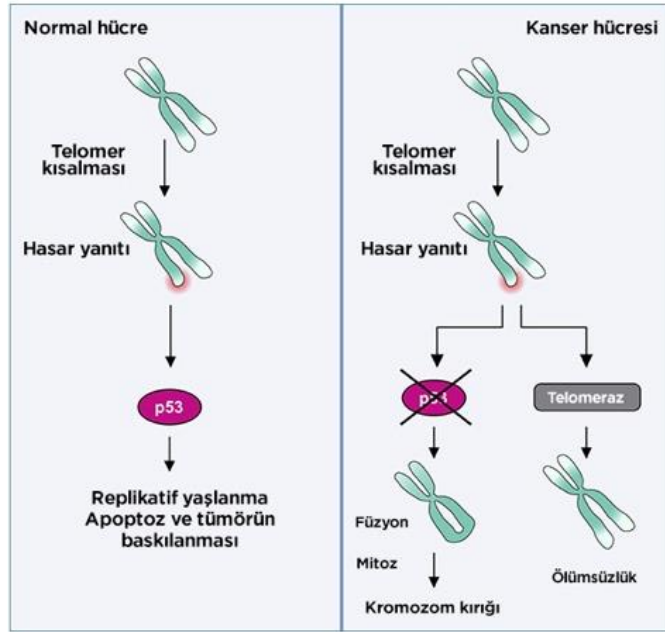


Şekil 2.4 : İmmün yıkımdan kaçış.

Kanser immün sistem düzenlenmesi 3 ana aşamadan oluşur: eliminasyon, denge ve kaçış. İmmün sistem yıkımından başarı ile kaçan tümör hücreleri kanser oluşumunu tetikler [28].

2.1.4 Sınırsız bölünme yeteneği

Kanser hücreleri, tümör oluşumunu sürdürmek için sınırsız replikasyon potansiyeline ihtiyaç duymaktadır. Sürekli bölünme yeteneği; sınırlı sayıda hücre büyümesi ve bölünmesi döngüsünden geçebilen normal hücre döngüsü ile zıtlık teşkil etmektedir. Kromozomların uçların koruyan telomerler, sınırsız proliferasyon yeteneğine etki etmektedir [29]. Kromozomların uç kısmarında bulunan telomerler her hücre bölünmesinde kısalarak genlerin korunmasını sağlar. Kanser hücreleri telomer kısalmasını engellemek için telomeraz enzimi ile aktivitesini artırarak sınırsız çoğalma yeteneğine sahip olurlar. Aynı zamanda p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin regülasyon bozukluğuna neden olmakta ve apoptoz direncinin artırılması, DNA hasar onarım aktivitesinin inhibisyonu gibi faaliyetlere neden olmaktadır (Şekil 2.5) [30-32].

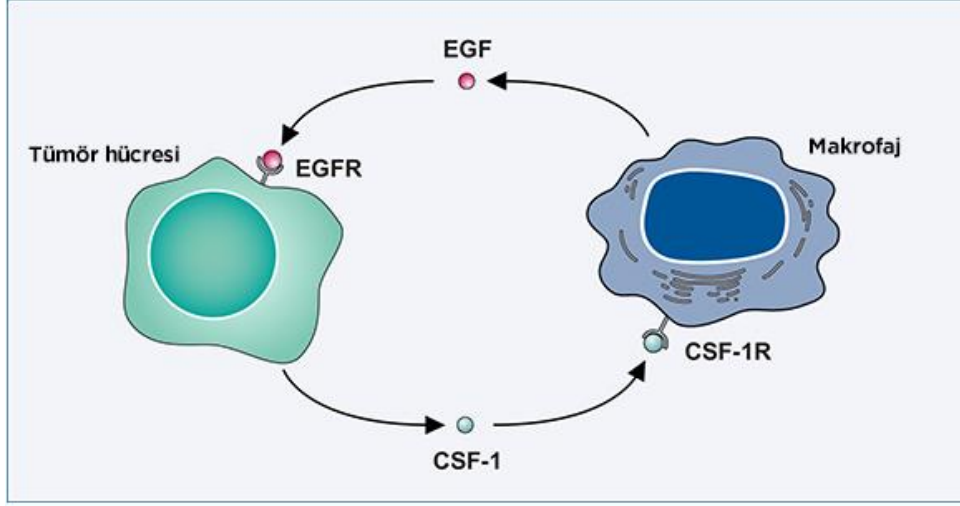


Şekil 2.5 : Sınırsız bölünme yeteneği.

Telomer boyunun kısalması normal hücrelerde replikatif yaşlanmayı aktive ederken tümör hücreleri telomer uzunluğunu koruyan telomerez enziminin aşırı ekspresyonu ile sınırsız bölünme yeteneği sınırlılığını ortadan kaldırmaktadır.

2.1.5 İnvazyon ve metastaz

Doku invazyonu ve metastaz, kanser hücrelerinin oluşum göstermeye başladıkları bölgeden farklı bir bölgeye göç etmesi konusunda 2 ana faktördür. Bu 2 faktör henüz detaylı olarak anlaşılmasına rağmen genel olarak ele alındığında hücrelerin, diğer hücreler ve ekstrasellüler matrikse tutunarak ortaya çıkan değişiklikler, doku invazyonu ve metastaza neden olmaktadır [33]. Tümör hücreleri yeni damar oluşumunu uyararak komşu hücreler ile olan iletişimini ortadan kaldırır ve primer tümör dokusundan ayrılır. Daha sonrasında tümör hücreleri ekstrasellüler matrikse geçer ve yakınında bulunan dokulara ulaşarak veya dolaşım sistemi ile uzak dokularda yerleşim gösterirler. Bu şekilde yaşamlarını sürdürür ve çoğalmalarını sağlarlar. Metastaz gelişimi direnç geliştirerek tedavinin başarısını olumsuz etkiler (Şekil 2.6) [31, 34].

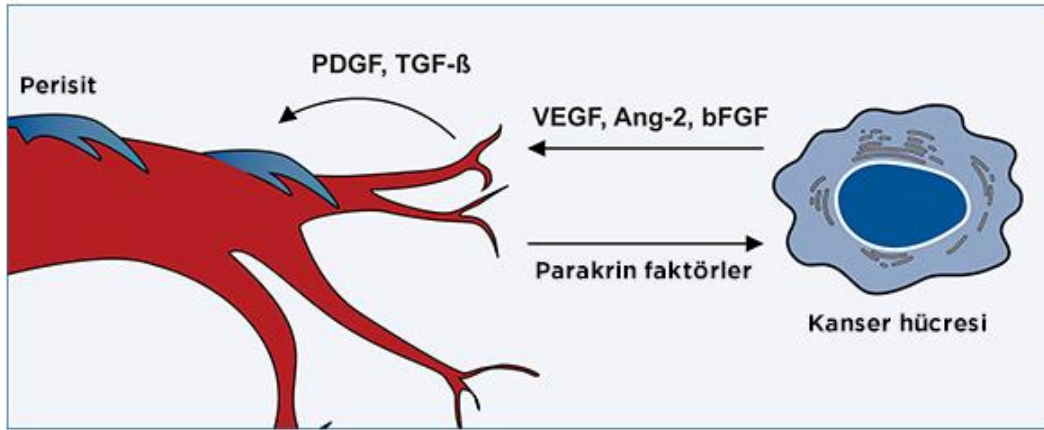


Şekil 2.6 : İnvazyon ve metastaz aktivasyonu.

Tümör hücresinin göçü CSF-1, EGF ve bunların karsinoma hücrelerinde farklı şekillerde eksprese edilen ilgili reseptörlerini ve tümör mikroçevresinde bulunan makrofajları içeren parakrin döngü yolu ile sürdürmektedir. [30, 31].

2.1.6 Anjiyogenez

Anjiyogenez; organizmada yara iyileşmesi, embriyogenez, menstrüel siklus gibi durumlarda faaliyet gösteren fizyolojik bir süreçtir. Başta tümörler olmak üzere romatoid artrit gibi kolajen doku hastalıkları, retinopatiler ve psöriasis vb. hastalıklarında görülen durum ise patojenik anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır [35]. Tümörlerin hızlı bölünmesi sonucunda oksijen ve besin ihtiyacının artması anjiyogenez oluşumunu tümör hücreleri tarafından uyarmaktadır (Şekil 2.7) [34].

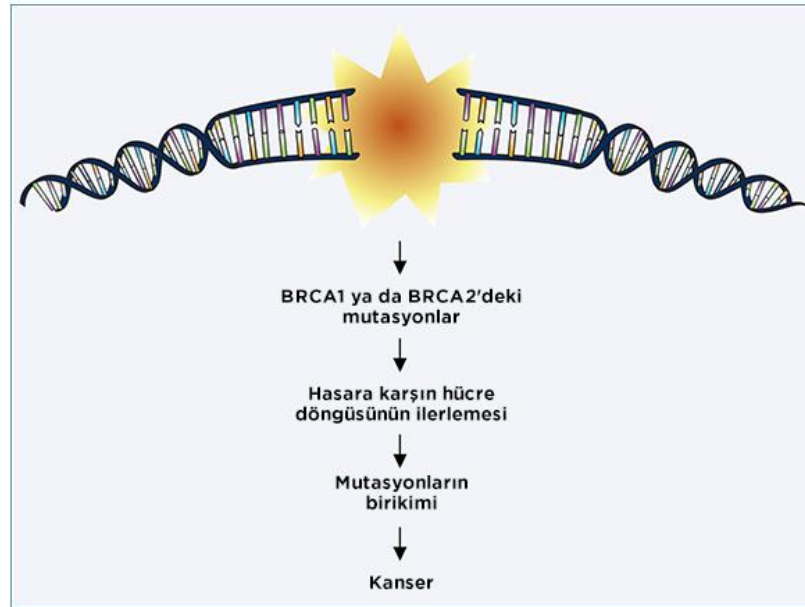


Şekil 2.7 : Anjiyogenezin tetiklenmesi.

Tümör anjiyogenezi, tümör mikroçevresinde bulunan çeşitli hücre tiplerinden gelen birçok sinyalin toplamı ile ortaya çıkan bir fonksiyondur. [36, 37].

2.1.7 Gen yapısında mutasyonlar

Kanser hücrelerinin genomlarında meydana gelen çok sayıda değişiklik pek çok onkogenik süreç için temel olarak işlev görmektedir. Mutasyon oranlarının artış göstermesi, tümör oluşumu tetikler ve mutasyonların birikmesi sonucunda kanser hücreleri bakımından avantaj sağlar. Mutajenik ajanlara karşı duyarlılığın artması, bir veya daha fazla hücrenin p53, BRCA1 proteini gibi genlerin aracılık ettiği DNA onarım mekanizmalarının işlev görememesi, bu faktörlerin kombinasyonu gibi durumlarda kanser hücreleri avantaj sağlamaktadır. DNA onarım mekanizmasının veya bakıcı genlerin değişikliğe uğrayarak hasar görmesi sonucunda; DNA hasarının saptanmaması ve onarım mekanizmasının aktive edilememesi, doğrudan hasar görmüş DNA'nın onarılamaması, mutajenik moleküllerin inaktive edilememesi veya engellenememesi gibi durumların ortaya çıkmasından sorumlu olabilmektedir. Bakıcı genlerin inaktive edilmesi veya baskılanması yolu ile tümör hücreleri mutasyon oranını ve sonrasında tümörigenezi artırmayı sağlayabilir. Kanser hücresi genom analizleri değişiklik gösteren mutasyonları ortaya çıkarmakta ve tümör progresyonu sırasında instabilitenin arttığını göstermektedir (Şekil 2.8) [38].

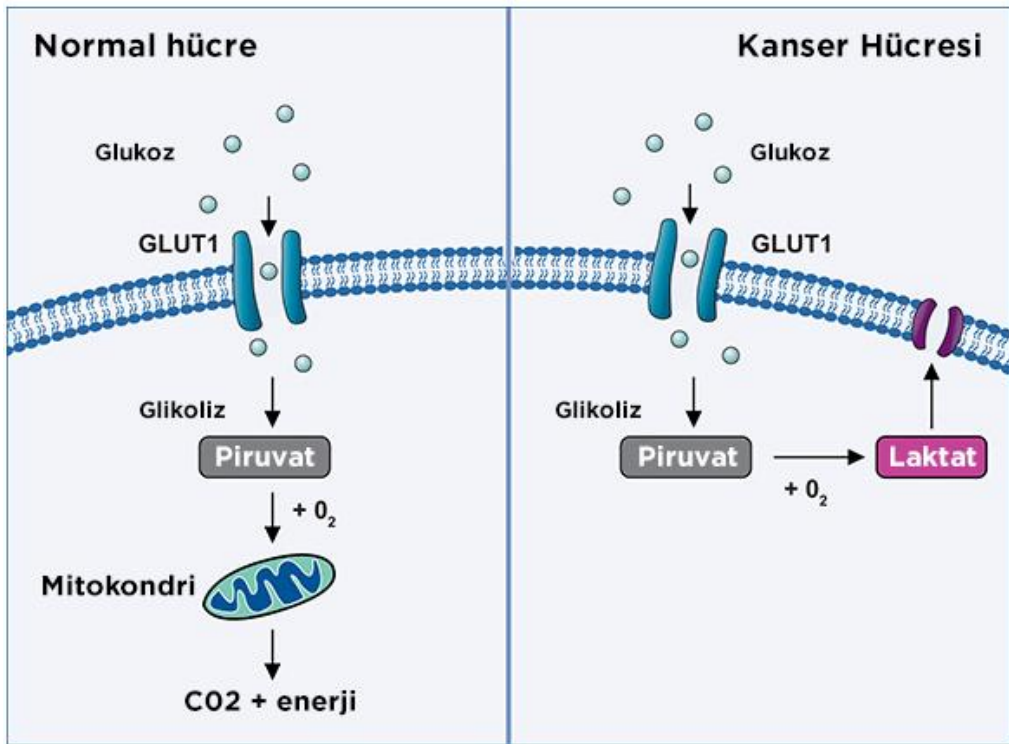


Şekil 2.8 : Genom instabilitesi ve mutasyon.

DNA onarım mekanizmasında oluşan herhangi bir mutasyon genomik instabilitenin artması bakımından kanser hücrelerine avantaj sağlamaktadır. BRCA sinyal iletim mekanizmasından kaynaklanan mutasyon sonucunda kanser oluşumu tetiklemektedir [38].

2.1.8 Enerji metabolizmasının yeniden programlanması

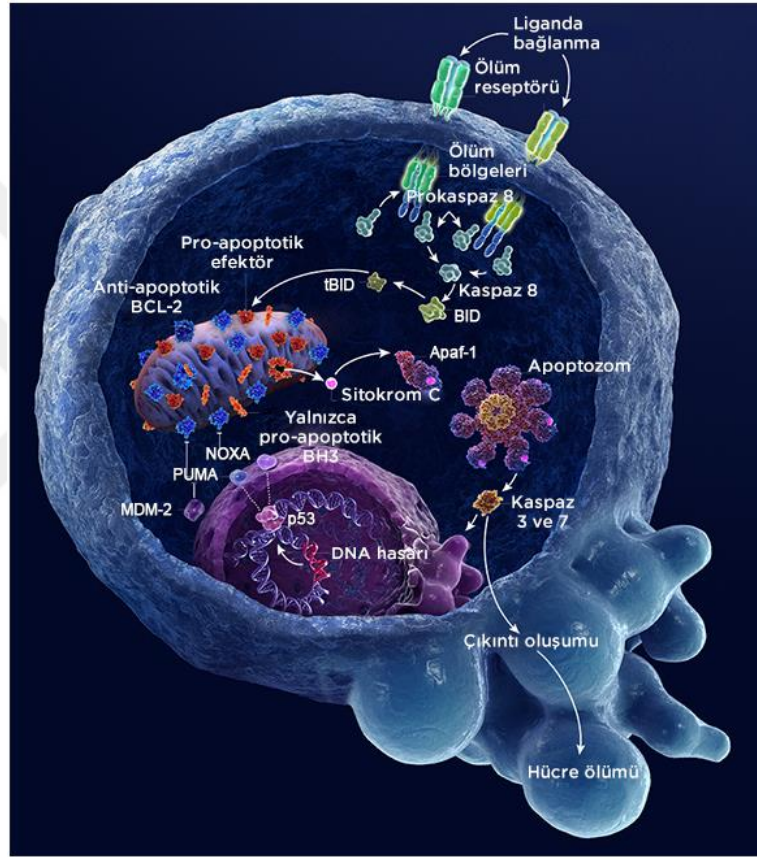
Normal fizyolojik koşullarda hücrenin enerji metabolizması verimli bir şekilde düzenlenmektedir. Dokuların ihtiyacı olan oksijen ve besinlerin ulaştırılması, atık ürünlerin toplanması kılcal damarlar yolu ile sağlanmaktadır. Tümörlü dokulardaki kanser hücrelerinin sürekli proliferatif sinyal iletimi, hücre sayısında da artışa neden olmaktadır. Artan hücre sayısı sonucunda hücreler birbirlerine yüksek basınç uygulayarak baskı yaparlar. Bu yüksek basınç, besin eksikliğine, hipoksik koşullara ve metabolik atık birikimine neden olan hipoperfüzyona yol açmaktadır. Hipoksik koşullara yanıt olarak hücreler, aerobik oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize geçerler. Bu metabolik yol, glikozun ATP gibi enerji taşıyıcılarına dönüştürülmesinde çok daha az etkili olmasından dolayı glikoz transferini sağlayan faktörler GLUT1'i regüle eder (Şekil 2.9) [39].



Şekil 2.9 : Enerji metabolizmasının yeniden programlanması. Kanser hücreleri, oksijen varlığından bağımsız olarak mevcut glikozu laktata dönüştürür (Warburg etkisi) ve bu sayede glikoz metabolitlerini, hücre proliferasyonunu hızlandıran yararlı anabolik süreçlere yöendirir [40].

2.1.9 Hücre ölüm mekanizmalarından kaçınma

Normal hücrelerin aksine tümörlü hücreler hücrel stres durumunda DNA hasarına yanıt olarak apoptozu başlatabilir. Bu durumu aksine apoptoz, doku homeostazının gelişiminde ve korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Apoptozun başlaması, düzenlenmesi ve işlevini etkileyen apoptotik sinyal mekanizmalarının araştırılması için önemli çalışmalar yapılmıştır. Kaspazlar, apoptozu etkileyen ana faktörlerdir (Şekil 2.10).



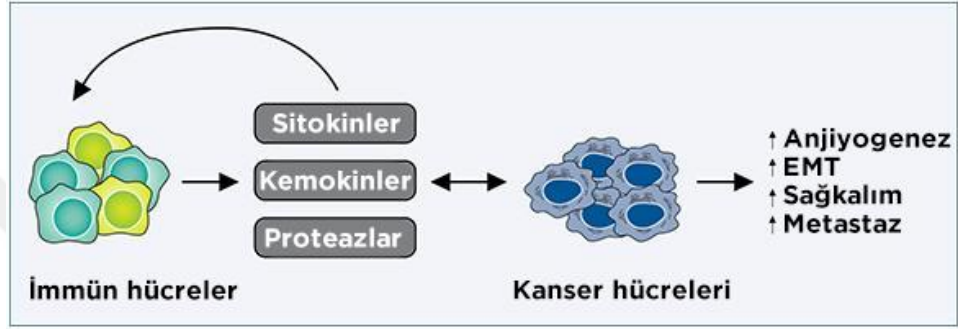
Şekil 2.10 : Hücre ölüm mekanizmasından kaçınma.

2.1.10 Tümörü destekleyen enflamasyon

Tümör ortamı kanser hücrelerine sahip olmakla birlikte aynı zamanda iltihaplanma ile ilişkili bağışıklık sistemi hücrelerine de sahiptir. Bu hücreler büyüme faktörleri ve enzim sayısını artırarak kanserli bölgenin anjiyogenez oluşturmasını desteklemeye yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte reaktif oksijen radikalleri (Reactive Oxygen Species, ROS) üreterek DNA'nın hasar görmesine ve kanserleşmeye neden olmaktadır.

Enflamasyon, ROS gibi faktörler yoluyla DNA hasarını indükleyerek ve tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açan epigenetik mekanizmaların aktivasyonu yoluyla tümörü destekleyen enflamasyona neden olabilir. Tümör başlangıcı sırasında bağışıklık ve enflamatuar hücreler, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını kolaylaştıran ve anjiyogenezi tetikleyen sitokinler ve kemokinler üretmektedir. Bu süreç tümör büyümesinde artışa neden olmaktadır.

Sitokinler ve kemokinler ayrıca tümör mikroçevresinde bağışıklık hücrelerinin daha fazla toplanmasına ve farklılaşmasına neden olmaktadır (Şekil 2.11) [41].



Şekil 2.11 : Tümörü destekleyen inflamasyon.

2.2 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji; mühendislik, biyoloji, fizik ve kimya uygulamaları üretilmiş çeşitli araçları ve geniş bir alanı kapsayan multidisipliner bir alan olarak tanımlanmaktadır [42]. Nanoteknoloji alanı güncel araştırmalar ve tüm teknik disiplinlerde temel olarak geliştirilen en popüler alanlardan biri olarak kabul edilmektedir. Basit olarak polimer bilimi ve teknolojisini içermekte ve bu alandaki araştırmalar çok çeşitli konuları kapsamaktadır [43].

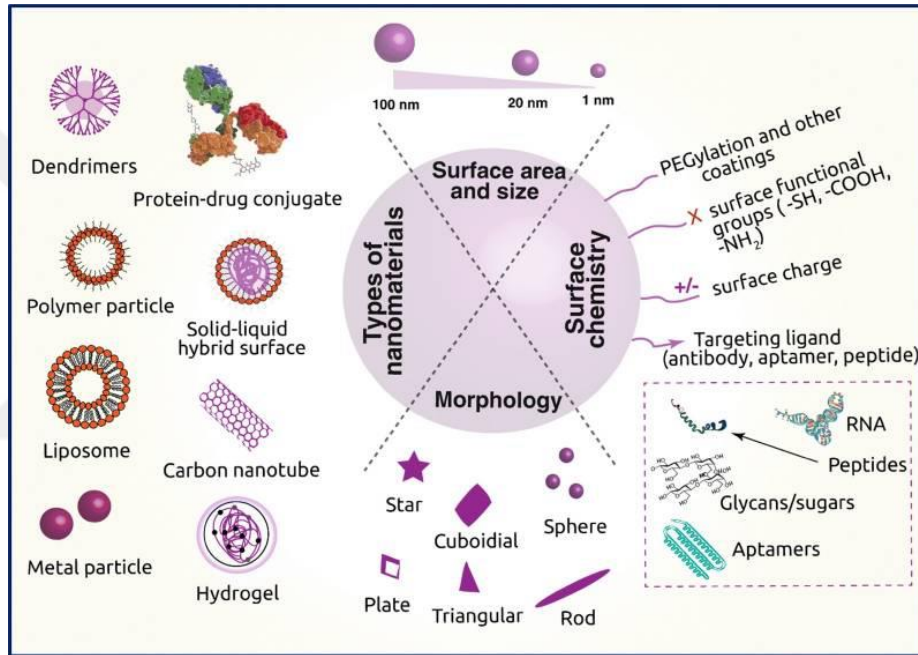
Nanoteknolojik araçların biçimsel tanımları genellikle uygulamanın kendi gereksinimlerine bağlı olarak değişebilmektedir ve en az 1-100 nm aralığında olması gerektiği şeklinde tanımlanmaktadır. Kanser ile ilgili nano teknolojilere;

- meme kanseri tedavisi için lipozom gibi enjekte edilebilir ilaç dağıtımını nanovektörleri,
- nöro-onkolojik müdahaleler kapsamında yapılan cerrahi uygulamaların görüntülenmesi için biyolojik olarak hedeflenmiş, nano boyutlu manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kontrast maddeleri;

- DNA ve proteinin yüksek verimde tespiti için yeni, nanoparçacık bazlı yöntemler

örnek olarak verilebilir.

Nanoteknoloji 1-100 nm boyutları arasındaki kendileri veya temel bileşenlerinden oluşan komponentlerin çalışmasını içermektedir [42]. Nano bazlı yöntemler, biyolojik bariyer arasında gelişmiş taşıma sağlaması ve ilacın daha etkili salınması için gelişmiş stratejiler sunmaktadır [44, 45]. Genellikle 1-100 nm aralığında organik, inorganik, lipid ve protein bileşikleri kullanılarak birçok çeşitten oluşan nanomalzemeler üretilmiştir (Şekil 2.12) [46].



Şekil 2.12 : Nanoteknoloji uygulama alanı.

Hedefli ilaç sistemi olarak nano taşıyıcılar, geleneksel ilaçların farmakolojik ve terapötik özelliklerini geliştirmek için tasarlanmıştır [47]. İlaç moleküllerinin nano taşıyıcı ile kaplanması, bir ilacı bozulmaya karşı koruyabilmektedir. Ayrıca hedefleme ve kontrollü salım olanakları sunmaktadır. Küçük boyutlarından dolayı nano taşıyıcılar kan-beyin bariyerini (KBB) geçebilmektedir. Geleneksel ilaç formu ile karşılaştırıldığında, nano taşıyıcı-ilaç konjugatları daha etkili ve seçicidir. Hedef bölgelerde ilaç salımı gerçekleştirerek normal dokulardaki toksisiteyi ve diğer yan etkileri azaltabilmektedir. Sonuç olarak, gerekli ilaç dozları daha düşüktür [48].

Antikanser ilaçlarının, ilacın hedef bölgeye ulaştırılmasında kısıtlılık göstermesi ve bundan dolayı tedavinin etkisiz kalmasına, hedef dışı etkilerin artmasına sebep olması gibi olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir [46]. Antikanser ilaçlarının etkinliği yalnızca doğru dozda ilaç uygulandığında doğru etki gösterebilmektedir. Bu nedenle tümör hücrelerini hedeflemek için kullanılan nanomalzemelerin, tümör hücrelerini tanıyarak bölgesel konsantrasyonunu arttırmaya yönelik olarak tasarlanması, olası toksisiteyi azaltması gerekmektedir [49].

Nanopartiküllerin geliştirilmesi, pasif ve aktif tümör hedefleme stratejileri ile geleneksel kemoterapinin olası yan etkilerinin azaltılması amaçlanmaktadır. Pasif hedefleme tipi olan “artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR:enhanced permeability and retention)”, çeşitli boyutlardaki nanopartiküllerin (genellikle 10-100 nm) sağlıklı ve tümörlü dokularda gereğinden fazla birikmesi sonucu oluşur. Nanopartiküllerin özelliklerinden yararlanılarak antikanser ajanların tümör hücrelerine taşınması mümkün hale gelmektedir [50].

2.2.1 Pasif Hedefleme

Pasif hedefleme, ilaç salım nanopartiküllerinin sağlıklı dokulara kıyasla, tümör dokularının seçici özelliklerine dayanarak ilacın hedef bölgeye ulaştırılabildiği sistem olarak tanımlanmaktadır. Tümör hücrelerinin sınırsız bölünmesinden dolayı kusurlu vasküler yapı ve hipervakülastöre neden olan geniş anjiyogenez meydana gelmektedir. Ayrıca tümörler yüksek seviyede geçirgenliğe sahiptir ve fonksiyonel lenf dolaşımından yoksundurlar. Tümör dokularının bu patofizyolojik durumlarının bir sonucu olarak, uygun şekilde tasarlanmış “ilaç taşıma sistemleri” anormal tipteki hücrelere kolayca nüfuz ederek orada tutulur. EPR etkisi olarak bilinen bu mekanizmadan yararlanılarak düşük moleküler ağırlıklı kemoterapötiklerin tümör bölgesine iletilmesi hedeflenebilmektedir [51]. Bu tip ilaç hedeflemesi, hedeflenen dokunun patofizyolojik spesifikliğine dayandığından “pasif hedefleme” olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte vektörün yükü, büyüklüğü ve yüzeyi gibi fizikokimyasal özellikleri EPR etkisine sahip pasif hedeflemede de önemli bir rol oynamaktadır.

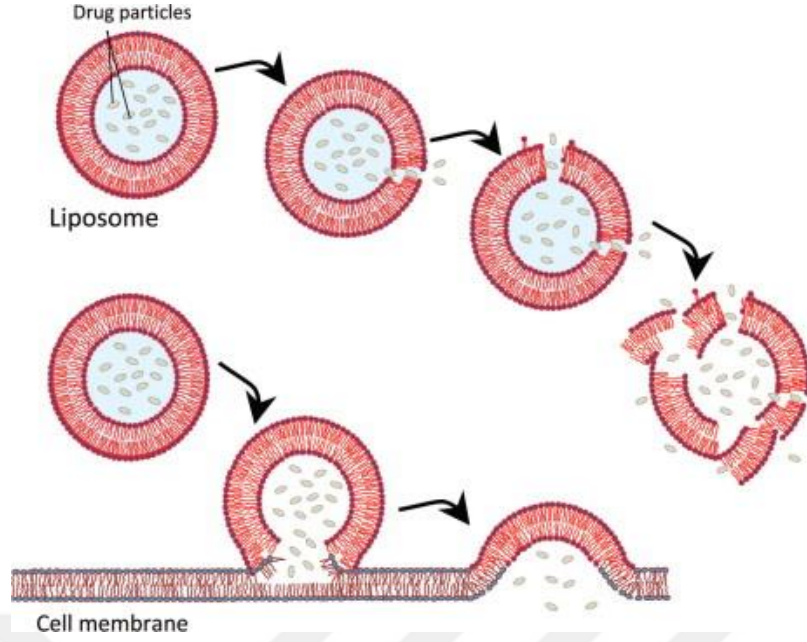
2.2.2 Aktif Hedefleme

Ligand aracılı hedefleme olarak da adlandırılan aktif hedefleme, hedeflenen hücreler tarafından spesifik tanıma ve alıkonma için nanopartikül yüzeyinde afiniteyi artıracak ligandlarının kullanılmasını içermektedir. Bu amaçla, ligandlar gereken organlarda, dokularda, hücrelerde ve subselüler alanlarda aşırı eksprese edilen yüzey moleküllerini veya reseptörleri bağlamak için seçilir. Bu özelliklerinden dolayı nanopartikül hedeflenmesi ve hücreler arasındaki etkileşimi arttırmayı, genel biyodağılımı değiştirmeden ilaçların daha efektif özellik göstermesini amaçlamaktadır [52].

2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler

2.3.1 Lipozomlar

Genellikle 80-300 nm boyut aralığında olan nano/mikro spesifik veya koloidal taşıyıcılardır. Fosfolipitler ve steroidler (örn. kolesterol), iki tabakalı veya bir yüzeyi aktif maddelerden oluşan küresel veziküllerdir ve bazı lipitler, sonikasyon gibi lipozomların hazırlandığı sulu ortam içerisine karıştırıldığında kendiliğinden meydana gelirler [48]. Lipozomların, ilaçların çözünürlüğünü arttırdığı ve kemoterapötik ajanların terapötik endeksi zararlı yan etkilerin azaltılması, in vitro ve in vivo antikanser aktivitesinin artması gibi farmakokinetik özelliklerini geliştirdiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [53]. İlaç kapsül içerisine alınarak lipozomlara dahil edilir (Şekil 2.13) [48, 53]. Bir ilacın lipozomlardan salınması; lipozom bileşimine, pH'a, osmotik basınca ve çevresine bağlıdır. Bunlara ek olarak, lipozom içerisinde kalma süresinin artması bu parçacıkların etkilerini azaltırken miktarını ise azaltır [53]. Lipozom ve hücre etkileşimi; absorpsiyon, füzyon, endositoz veya lipit transferi gibi yollar ile gerçekleştirilebilir. Lipozomal formda kullanılan birçok ilaç örneği bulunmaktadır: antikanser ilaçlar, nörotransmitterler (serotonin), antibiyotikler, anti-enflamatuar ve antiromatizmal ilaçlar [48].



Şekil 2.13 : Lipozomlar ile ilaç iletimi.

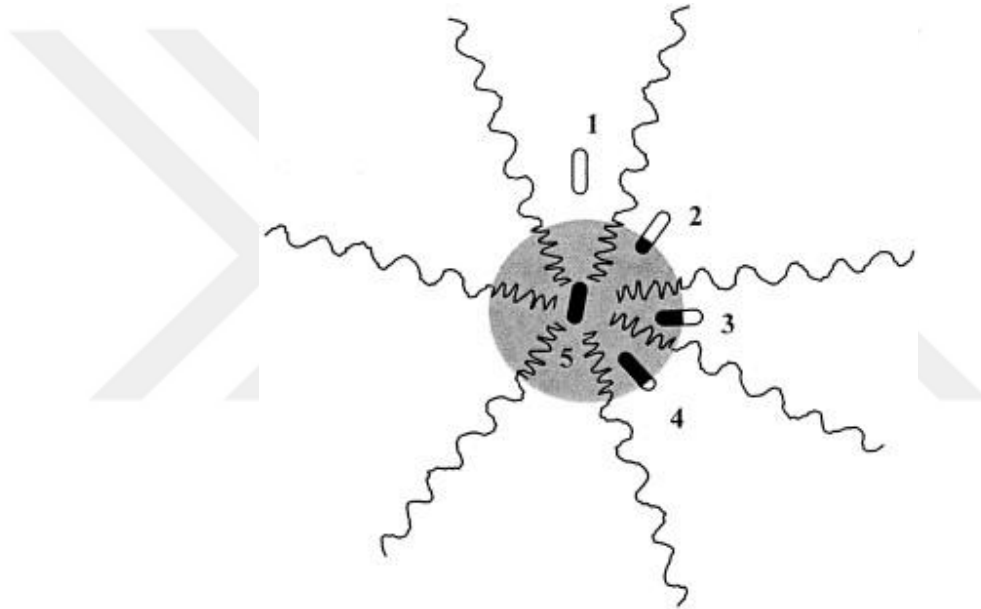
Lipozomlar, tabakalarına (tek, oligo veya çok tabakalı veziküller), boyutlarına (küçük, orta ve büyük), ve hazırlama yöntemine göre sınıflandırılabilir. Tek tabakalı veziküller bir çift lipid katmanı içerirler ve genellikle 50-250 nm çapa sahiptir. Tek tabakalı veziküller büyük ve sulu bir kapsül oluşturduğundan çoğunlukla suda çözünür ilaçların kapsül içerisine alınmasında kullanılırlar. Çok katmanlı veziküller iç içe konsantrik yerleşim gösteren birçok lipid katmanından oluşur ve çapları 1-5 μm arasındadır. Yüksek lipid içerişi sayesinde daha çok yağda çözünen ilaçların kapsül içerisine alınması sağlanır [54].

2.3.2 Miseller

İlaç taşıyıcıları olarak miseller, zayıf çözünen ilaçların çözündürmeleri, biyoyararlanımı arttırmaları, büyüklükleri, spesifik bir ligand ile dış yüzey ile hedeflendirilebilmesi, ticari olarak çok miktarda üretilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı birtakım avantajlar sunmaktadır. Misel formunda olan bir ilaç (çözünürlüğü düşük olan ilaç), biyolojik ortamın etkisi altında olası inaktivasyondan iyi bir şekilde korunur ve biyolojik olarak yan etkilere neden olmaz. Ayrıca misel, sulu çevreye maruz kalan dış tabakasının kan veya doku bileşenlerine karşı etkileşim kuramayacak bileşenlerden oluşacağı şekilde yapılandırılmıştır. Bu yapısal özellik sayesinde miseller belirli proteinler ve/veya fagositik hücreler tarafından tanınmadan uzun süre

organizmada kalmasını sağlar. Misellerin uzun ömürleri kademeli birikimlerini sağlayarak ilaç taşıyıcıları olarak önemli bir alan haline gelmiştir [55].

İyonik olmayan yüzey aktif maddelerden yapılan misellerin yapılarında anizotropik su dağılımına sahip olduğu bilinmektedir, bunun bir etkisi olarak su konsantrasyonları miselin çekirdeğine doğru azalmaktadır. Bu anizotropiden dolayı bu tür miseller yüksek oranda hidrat yüzeyden hidrofobik çekirdeğe kutuplaşma gösterir. Sonuç olarak, bir misel içinde belirli bir çözündürülmüş ilacın konumu kutupsallığına bağlı olmaktadır. Sulu sistemlerde polar olmayan moleküller absorbe edilmekte ve ara polariteye sahip olan maddeler belirli ara pozisyonlarda yüzey aktif madde molekülleri boyunca dağıtılmaktadır (Şekil 2.14) [55].



Şekil 2.14 : İlaç hidrofobikliğine bağlı olarak bir misel ile ilaç etkileşimleri. (İlaç molekülü üzerindeki siyah renk hidrofobik alanı, beyaz renk hidrofilik alanı gösterir). Tamamen suda çözünür hidrofilik ilaç sadece misel arasındaki bölgede absorbe edilebilir (1. Alan) Tamamen çözülmeyen hidrofobik molekül misel çekirdek bölgesine dahil edilebilir (5. Alan) Orta hidrofobik/hidrofillik alana sahip ilaç molekülleri misel partikülü içinde orta dereceli pozisyonlara sahip olacaktır (2-4. Alan) [55].

2.4 Nano İlaç Taşıma Sistemleri

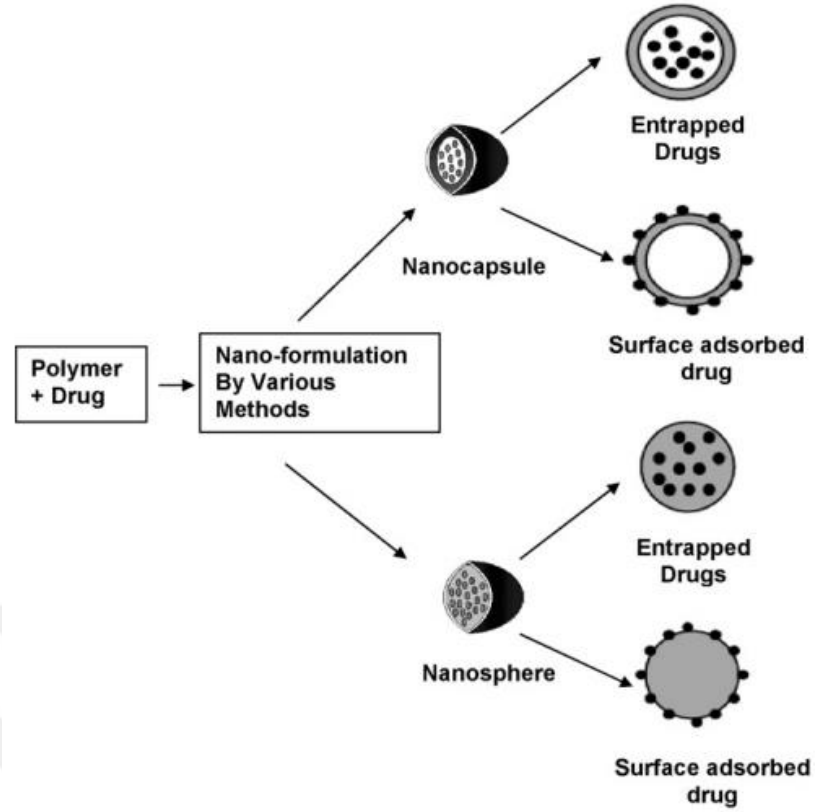
Kanser nanoteknolojisi yeni bir mutlidisipliner araştırma alanı olarak ortaya çıkmakta ve biyoloji, kimya, mühendislik, tıp disiplinlerini kapsayan; kanser tespiti, teşhisi ve tedavisinde önemli gelişmelere imkan sunmaktadır. Son araştırmalar; peptitler,

proteinler, nükleik asitler veya küçük moleküllü ligandlar gibi biyolojik moleküllere kovalent olarak bağlanmış fonksiyonel nanoparçacıklar geliştirmektedir.

Kanser terapötikleri için araştırılan çeşitli nanopartikül sistemleri bulunmaktadır. Her bir nanopartikül sistemi etkinliği ajanın tümöre iletimini artırmak için geliştirilmiştir. Örneğin nanopartiküllerin daha fazla dolaşıma katılmalarını sağlamak için hidrofilik yüzeyler kullanılarak pozitif yüklü yüzeyler sayesinde endositoz artırılabilir. Kanser terapötik uygulamaları için uygulama çeşidine bağlı olarak çeşitli nanopartikül tipleri geliştirilmiştir. Dendrimerler [56], lipozomlar [57], polimerik nanopartiküller [58], miseller [59], protein nanopartiküller [60], seramik nanopartiküller [61], viral nanopartiküller [62], metalik nanopartiküller [63] ve karbon nanotüpler [64] geliştirilen nanopartiküllere örnek olarak verilebilir [47].

2.5 Polimerik Nano Taşıyıcılar

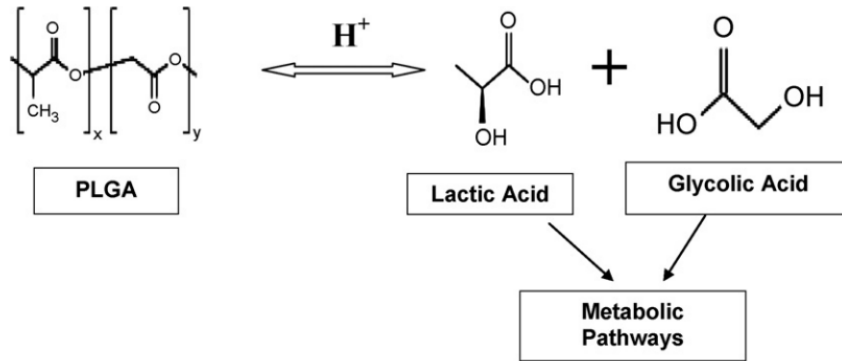
Polimerik nanopartiküller, uygulama ihtiyaçlarına ve kapsüllenecek ilaç türlerine göre çeşitli yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir [65]. Bu nanopartiküller, nanotıp alanında çeşitli etkili biyoaktif moleküllerin ve tıbbi ilaçların nanokapsülenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik olarak bozunabilir polimerik nanopartiküller, olumlu etkileri sayesinde ilaç dağıtım sistemlerinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu tür nanopartiküller doku ve hücreler ile, kontrollü/sürekli salım özelliği ve biyoyumluluk sağlamaktadır [66]. Biyolojik olarak bozunabilen nanopartiküllerin genel sentezi ve kapsüllenmesi Şekil 2.15'te özetlenmektedir.



Şekil 2.15 : Biyobozunur nanopartikül çeşitleri.
Yapılarına göre biyobozunur nanopartiküller nanokapsül ve nanosfer olarak sınıflandırılmaktadır. İlaç molekülleri içeride tutulur veya yüzeyde absorbe edilir [67].

2.5.1 PLGA

PLGA (poly-D,L-lactide-co-glycolide), biyolojik olarak parçalanabilir metabolit monomerleri, laktik asit ve glikolik asit üretmek için vücutta hidrolize uğramasından dolayı başarılı şekilde uygulanan biyolojik olarak parçalanabilir nanosistemlerden biridir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 : PLGA nanopartiküllerinin hidrolizi.
PLGA nanopartikülleri, asidik ortamda laktik ve glikolik aside biyolojik olarak hidroliz edilir.

PLGA nanopartikülleri, nanotıp, nano aşular, nanopartikül bazlı gen iletim sistemi, nano-antijen ve büyüme faktörü vb. protein ve peptitleri geliştirmek için kullanılmıştır [68-72]. PLGA'nın yüzey modifikasyonu, ilaç kapsülleme yöntemleri ve partikül büyüklüğü, formülasyon sırasında ilave edilen katkı maddeleri, ilacın moleküler ağırlığı, laktit-glikolid oranı, nanopartikül salımı ve verilen yanıtı üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir [73].

2.6 Hedefli Kanser Tedavisi

Kanser mekanizmasının anlaşılmasında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen kanser hâlâ dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Son yıllarda risk faktörlerini azaltma çabalarına rağmen kanser prevalansı artmaya devam etmektedir [74]. Mevcut bakım standartları değerlendirildiğinde kemoterapi, radyoterapi ve/veya cerrahi müdahaleler ile tedavi etkinliğinin artırılmaya çalışıldığı görülmektedir. Radyoterapi ve kemoterapinin sağlıklı doku hücreler de dahil olmak üzere doku üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu bilinmektedir [75]. Bununla beraber zayıf çözünürlük, stabilite ve metabolizmadan kaynaklı sorunlardan dolayı antikanser ilaçlarının zayıf farmakokinetik özellikler göstermesi, verimsizlik ve sınırlı biyo-dağılım gibi zorlukları ortaya çıkarmaktadır [46]. Bundan dolayı bahsedilen zorlukları giderebilecek ve sağlıklı dokulara önemli bir zarar vermeden tümör bölgelerinin seçici hedeflenmesini sağlayabilecek etkili formülasyonlar geliştirmek zorunlu hale gelmiştir [46].

Bir kanser terapötik tedavisinin etkinliği, sağlıklı dokuya zarar vermeden tümörleri azaltma veya yok etme kabiliyeti ile ölçülmektedir. Bu nedenle terapötik tedavilerin başarısında tümörlerin hedef alınması büyük öneme sahiptir. Özgüllük ve internalizasyonun artması, tedavinin etkinliğini artırabilir ve kanser hastalarının sıklıkla yaşadığı ciddi yan etkilerin olasılığını azaltabilir. Kanser terapötiklerinin nihai amacı, hastanın hayatta kalma süresini ve yaşam kalitesini arttırmaktır. Nanopartikül uygulamaları çoklu ilaç direncinden kaçma ve bir ajanın etkin bir şekilde verilmesini, spesifikliğini artırması sayesinde terapötik uygulamalarda büyük gelişmeler sunmaktadır [47].

İlaçların toksisitesini azaltmak ve çoklu ilaç dirençliliğini önüne geçmek açısından “tümör bölgelerini hedefleyebilen ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi” önemli bir

etkiye sahiptir [50]. Hedeflendirilmiş ilaç düşüncesi ilk kez 20. yüzyılın başlarında Paul Ehrlich tarafından “Magic Bullet” kavramı ile gelişmeye başladı [76]. Bu düşünce 1970’lerin başında monoklonal antikörlerin geliştirilmesi ile ilgi çekici hale geldi [76].

2.7 Çoklu İlaç Direnci

Antikanser ilaçları, çeşitli nedenlerden dolayı kanser hücrelerinin tedavisinde başarısız olabilirler. İlaçlar genellikle sistemik olarak verilir ve bu nedenle bireysel hastalara özgü olabilecek hedef dokulara emilim, metabolizma ve uygulamalardaki değişiklikler farklılık gösterebilmektedir [77].

Çoklu ilaç direnci (Multidrug resistance, MDR), birçoğu antikanser ajanlar olan yapısal olarak ilişiksiz sitotoksik çeşitli bileşiklere direnç gösteren karmaşık bir süreç olarak tanımlanmaktadır [78]. MDR, hücre içinde ilaç birikiminin azalması, ilaç ve hedef ilişkisinin azalması, detoksifikasyon işlevinin artması veya ilaç dağılımının değişiklik göstermesi şeklinde ortaya çıkabilmektedir. MDR ile ilişkili olarak 170 kDa’luk hücre membran proteini olarak tanımlanan P-glikoprotein (P-gp) hücre içi ilaç birikiminin azalttığı belirlenmiş ve 7. kromozom üzerinde bulunan MDR-1 geninin ekspresyonu ilişkili gösterilmiştir. P-gp ekspresyon seviyesi, çeşitli hücre tiplerinde ilaç direnç derecesi ile ilişkilidir. Hücre membranında taşıyıcı protein olarak tanımlanan 170 kDa’luk P-gp, 7. Kromozomdaki (7q21) MDR-1 geni tarafından kodlanmaktadır. ATP-bağımlı olarak çalışan P-gp, hücre içine giren ilacın dışarı çıkmasını sağlayarak hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltılmasını sağlamaktadır. Doksorubisin, daunorubisin, etoposid, taxol, vinkristin, vinblastine, paklitaksel gibi birçok hidrofobik kemoterapötik ilaca karşı direnç P-gp ile geliştirilebilmektedir.

MDR birçok kemoterapötik ajanın başarısızlığında önemli bir faktör olmakla birlikte kanser kemoterapisi için büyük bir zorluk oluşturmaktadır [79]. Kanser hücrelerinin apoptozunun engellenmesi ve ilaca dirençli tümörlerin artış göstermesinin bir sonucu olarak birçok kanser hücresinde MDR gelişmektedir. Direnç gelişimi, tümör hücrelerine verimsiz ilaç verilmesi ve P-gp tarafından ilacın tümör hücrelerinden çıkarılmasından kaynaklanmaktadır. Bu membran transport proteininin ilaca duyarlı hücre hatlarına kıyasla tümörlü hücrelerde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. Günümüzde kullanılan antikanser ilaçlarının yaklaşık %50’si P-gp substratlarıdır. MDR engelini aşılması için ilacı tümörlere eş zamanlı veren ve ilaçları hücre dışına taşıyan MDR proteinlerini inhibe eden nanopartiküller geliştirilmiştir. Direnç

mekanizmasının bloke edilmesi, tümörü sitotoksik ajanlara karşı oldukça hassas hale getirmektedir. Nanopartiküllerin endositoz yolu ile hücre içine alınması ve salımı ile ilacın hücre dışına çıkmasına sebep olan P-gp proteinini kısmen bloke ederek direnç engelinin aşılabileceği önerilmiştir [80-83]. MDR sorununa önerilen bir başka yaklaşım ise siRNA ile P-gp ekspresyonunun azaltılmasıdır [84-86].

2.8 Hücre Sinyal Mekanizmaları

Hücre sinyal mekanizması; embriyogenez, proliferasyon, büyüme, farklılaşma gibi temel hücresel aktiviteleri ve hücre içi/hücreler arası iletişimin koordinasyonu ile hücre hareketlerini koordine etmektedir [87]. Bu iletişim basamakları arasında meydana gelen bir aksaklık veya hatalar çeşitli hastalıklara ve kanser çeşitlerinin oluşmasına yol açmaktadır. Hücre sinyal mekanizmasının anlaşılması, hastalık nedenlerinin daha etkili bir şekilde takip ve tedavi edilebilmesi bakımından önem taşımaktadır [88].

2.9 Enflamasyon Mekanizmasında NF-kB Sinyal Yolağı

Ökaryotik organizmalar, gen ekspresyonunun sıkı bir şekilde düzenlenmesini sağlamak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar ile belirli bir hücre içi veya hücre dışı sinyale yanıt olarak sadece belirli genlerin ekspresyonuna izin verilmektedir. Genlerin seçici ekspresyonu, öncelikle hedef genlerin aktivasyonu veya inhibisyonu olarak düzenleyebilen gene özgü transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir. Hücre içerisinde inaktif durumda mevcut olan transkripsiyon faktör kompleksleri bulunmaktadır ve bu transkripsiyon faktörleri daha sonra belirli bir sinyale yanıt olarak aktive olurlar. Bu faktörlerin evrimsel olarak korunmuş örneklerinden biri ökaryotik NF-kB ve *Drosophila* Dorsal proteinlerini içeren Rel ailesine ait transkripsiyon faktörleri tarafından sağlanmaktadır [89].

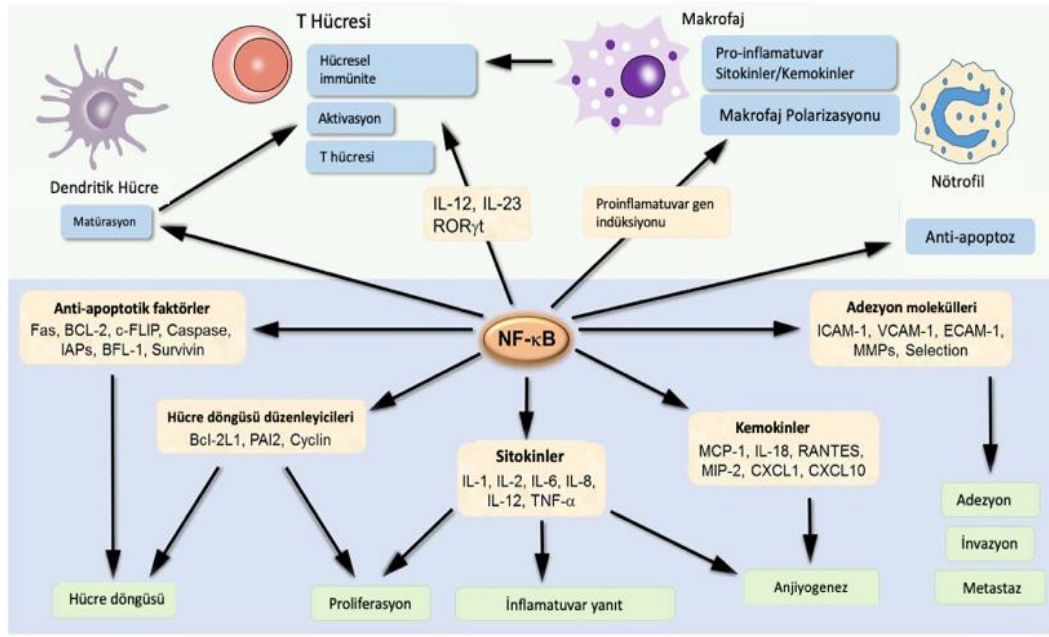
Mitojenler ve enflamatuar sitokinler dahil olmak üzere çok sayıda ajan tarafından indüklenen NF-kB'nin aktivasyonu I κ B'den ayrılmasına izin verir. Serbest kalan NF-kB'nin hücre içi transportuna izin vererek öncelikle bağışıklık ve enflamasyon yanıtlarında yer alan genlerin yanı sıra hücre proliferasyonunda rol oynayan bazı genlerin düzenlenmesini hedef alır [90].

Ökaryotik transkripsiyon faktörü NF-kB ilk olarak Sen ve Baltimore tarafından 1986 yılında tanımlanmıştır [91]. Baltimore ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar ile NF-kB'nin IκB ile etkileşime girerek düzenlendiğini göstermiştir. IκB proteini, NF-kB'nin DNA'ya bağlanmasının inhibisyonuna aracılık ettiği bilinmektedir.

NF-kB, birçok sayıda genin düzenlenmesinden sorumlu olan bölgelerde ifade edilen bir ökaryotik transkripsiyon faktörüdür [1]. NF-kB için 5 alt birim tanımlanmıştır: p50 (NF-kB1), p52 (NF-kB2), p55 (Rel B), p65 (Rel A) ve c-Rel (Rel) [7]. NF-kB, LPS veya proenflamatuar sitokinler gibi uyarılar ile aktive edildiğinde, hücre çekirdeğine taşınır ve çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu başlatır. Bu proenflamatuar moleküller kısmen hücre proliferasyonuna ve tümör oluşumuna katılır [8].

NF-kB transkripsiyon faktörleri, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sinyal yollarından gelen uyarılara karşı yanıt oluşturabildiğinden dolayı son birkaç yıldır önemli ilgi odağı olmuştur [10]. NF-kB transkripsiyon faktörleri, inhibitör IκB protein ailesi tarafından hücrelerin sitoplazmasında pasif olarak tutulan dimerler olarak işlev görür [11-13]. En az 5 farklı IκB proteini tanımlanmıştır: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ ve Bcl-3.

NF-kB ailesi, çeşitli fizyolojik durumlara bağlı olarak gen ekspresyonunun baskılanmasını indükleyebilen 5 transkripsiyon faktöründen oluşmaktadır. NF-kB'nin aktivasyonu ile enflamasyon arasındaki bağlantı çeşitli insan hastalıklarında ve hayvan modellerinde gösterilmiştir. Ayrıca NF-kB'nin enflamasyona aracılık etmesi yönündeki rolü, genetik yaklaşımlar kullanılarak ve kimyasal inhibitörler ile belirlenmiştir. Enfekte olmuş dokunun epitel hücreleri, mast hücreleri veya dendritik hücreleri gibi dokuda yerleşik hematopoietik hücreleri, enflamatuar yanıt olarak NF-kB sinyal mekanizması ile pro-enflamatuar yolları tetikleyerek enflamatuar yanıtı başlatır [92]. NF-kB'nin aktivasyonu, adezyon moleküllerinin ve kemokinlerin vasküler endotel hücreleri ve doku içinde regülasyonun artması ile sonuçlanır. Bu durum daha sonra sırası ile nötrofillerin, makrofajların ve diğer lökositlerin birikmesine ve aktivasyonuna yol açar. Ayrıca NF-kB, antimikrobiyal efektör moleküllerin üretimi ve lökositlerin enflamatuar bir ortamda devamlılığını sağlayabilmesi için de çok önemlidir. Aslında NF-kB doku epitel ve stromal hücreleri, vasküler endotel hücreleri ve hematopoietik hücrelerdeki transkripsiyonel programları düzenleyerek, enflamasyon durumlarında aracılık eden temel bir role sahiptir (Şekil 2.17) [93].



Şekil 2.17 : Enflamasyon gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan NF-κB hedef genleri.

NF-κB, birçok proenflamatuar sitokin ve kemokinleri kodlayan genlerin transkripsiyonundan sorumludur. Bu efektörlerin önemli bir hedefi de vasküler endoteldir. Vasküler endotel hücrelerdeki değişiklikler, dolaşımdaki lökositlerin adezyonunu ve migrasyonunu düzenler [94]. NF-κB, lökositlerin dolaşımdan enflamasyon bölgesine izin veren lökosit ve endotel hücrelerde bulunan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenler [95, 96].

PLGA nanopartiküllerinin hidrolizi: PLGA nanopartikülleri, asidik ortamda laktik ve glikolik aside biyolojik olarak hidroliz edilir Enflamasyon gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan NF-κB hedef genleri.

Gen hedefleme ve NF-κB inhibitörleri kullanılarak NF-κB'nin, enflamatuar süreçlerde rol oynadığını belirleyen birçok sayıda çalışma bildirilmiştir [92]. NF-κB sinyal mekanizmasının bir diğer rolünün lökositlerin hayatta kalmasında ve bu rolün özellikle enflamatuar içeren yanıtlar sırasında önemli olduğu daha önce yapılan çalışmalarda tartışılmıştır [92].

Nötrofiller, lokal enflamasyonda kilit rol oynarlar ve NF-κB, nispeten toksik durumlarda aktive edilmesi gereken bu hücrelerin hayatta kalması için önemlidir [97]. NF-κB, prostaglandinler ve reaktif oksijen türleri üreten enzimlerin üretimi için önemlidir (örneğin NF-κB hedef genleri olan iNOS ve Cox) ayrıca prostaglandinlerin

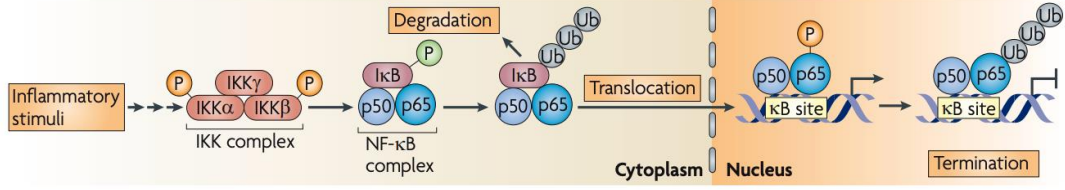
neden olduğu sinyalizasyonda rol oynayabilir [98, 99]. NF-kB, prostoglandinler gibi kısa ömürlü parakrin efektörleri olan lökotrienlere yanıtta rol oynamaktadır.

Matriks metaloproteinazlar (MMP) lokal enflamasyon ve aynı zamanda lökosit kemotaksisinin önemli araçlarıdır ve bunların ekspresyonu ayrıca NF-kB tarafından düzenlenir [100-102].

Patojen tanınmasından proinflamatuvar sitokin üretimine giden yol, NF-kB'ye özgüllük göstermektedir. NF-kB'ye bağlı TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler, NF-kB'yi aktive eden reseptörler olma eğilimindedirler. Dolayısıyla, NF-kB sitokin yanıtlarının değerlendirilmesi ve detaylandırılması için çok önemlidir. TNF- α hem lokal hem de sistemik enflamasyon için önemlidir [92].

NF-kB tarafından düzenlenen pro-enflamatuar transkripsiyonel programlar, enflamatuar yanıtı düzenler ve yürütür. Bu transkripsiyon programları uyarana ve yanıt aracılık eden hücre tipine bağlı olarak değişir. Bu nedenle LPS'ler yanıt olarak endotelial hücreler tarafından eksprese edilen NF-kB'ye bağımlı genler, pro-enflamatuar sitokin tümör nekroz faktörüne yanıt olarak indüklenenlerden farklı olabilir. Bu farklılıkların bazıları farklı hücre tiplerindeki farklı genlerle ilişkili epigenetik modifikasyonlarından kaynaklansa da önemli bir çeşitliliğin NF-kB mekanizmasından karmaşıklığından kaynaklandığı düşünülmektedir [93].

NF-kB sinyal mekanizmasında, uyarılmamış hücrelerde NF-kB proteinlerinin inhibitörü I κ B, sitoplazmada inaktif transkripsiyon faktörünü diziler (Şekil 2.18). NF-kB sinyal mekanizmasının aktivasyonundaki temel olay, I κ B proteinlerinin I κ B kinaz (IKK) kompleksi tarafından fosforilasyonudur. Bu da I κ B ubiquilasyonuna ve ardından degradasyonuna yol açar. Bu durum, daha sonra çekirdeğe taşınan ve hedef genlerin ekspresyonunu sağlayan sitoplazmik NF-kB kompleksinin salımı ile sonuçlanır. Bu nedenle IKK aktivasyonuna yol açan mekanizmalar, NF-kB sinyal mekanizmasının aktivasyonunda önemli düzenleyici durumlardır. NF-kB'nin; post-translasyonel modifikasyonları ile bu transkripsiyon faktörünün, hedef genlerin transkripsiyonunu hem aktive hem de inhibe edebilme yeteneği arasında karmaşık bir etkileşime sahip olduğu bilinmektedir [93].

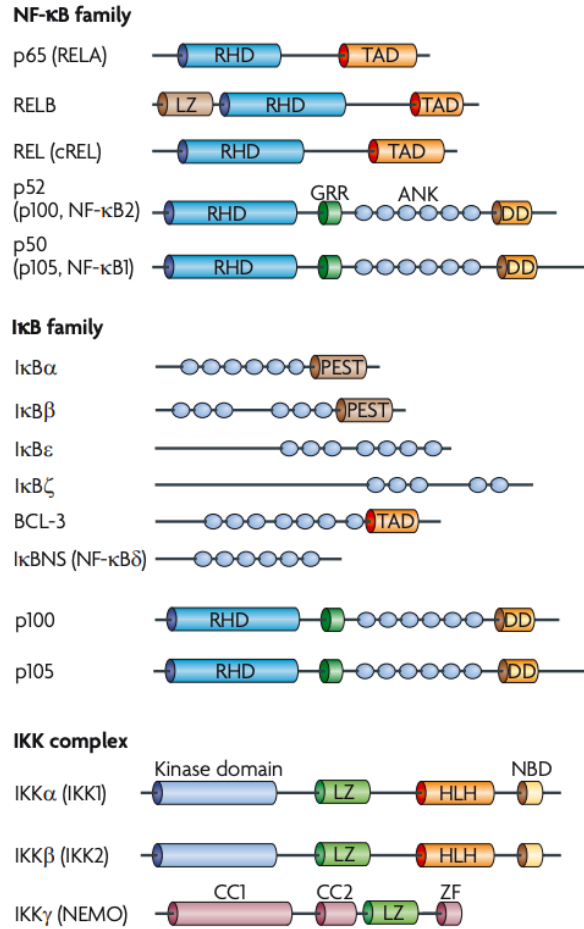


Şekil 2.18 : NF-κB sinyal mekanizmasının düzenlenmesi.

NF-κB sinyal mekanizmasının aktivasyonunda bir enflamatuvar uyarı, IKK (NF-κB inhibitörü kompleksinin (IκB)) B aktivasyonunu indükleyen sinyal iletim yollarını aktive eder. Bu IκB proteinlerinin fosforilasyonuna ve sonuç olarak proteazom tarafından bozunmasına neden olur. Serbest kalan NF-κB dimerleri çekirdeğe taşınır ve transkripsiyonlarına yol açan hedef genlerinin enhancer veya promotör bölgelerindeki κB bölgelerine bağlanır. Her bir adım bilinen düzenleyici mekanizmaları temsil eder. Bunlar arasında; NF-κB'nin transkripsiyonel aktivitesini etkileyen IKK hedef bölgeleri, transkripsiyonel programların şekillenmesinde rol alan IκB proteinleri, NF-κB tarafından seçici gen ekspresyonuna yol açan sinyal mekanizmaları ve kofaktörler, ve NF-κB mekanizmasının aktivitesinin sona ermesini kontrol eden mekanizmalar bulunmaktadır [93].

2.10 NF-κB Sinyal Yolağı Bileşenleri

NF-κB ailesi, tümü bir amino-terminal REL homoloji alanından oluşan (REL homology domain, RHD) ve 8 IκB aile üyeleri tarafından düzenlenen; p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2), p55 (Rel B), p65 (Rel A) ve c-Rel (Rel)'den oluşmaktadır (Şekil 2.19). NF-κB proteinlerinin dimerleri, transkripsiyonun aktivasyonu veya baskılanması düzenleyen mekanizmaları düzenleyen hedef genlerin promotör veya enhancer bölgelerindeki κB bölgelerine bağlanır [103].



Şekil 2.19 : NF-κB, IκB ve IKK protein ailesi.

ANK, ankyrin tekrarlı protein (ankyrin-repeat); BCL-3, B hücreli lenfoma 3 (B-cell lymphoma 3); CC, sarmal protein (coiled-coil); DD, ölüm alanı (death domain); GRR, glisin bakımından zengin bölge (glycine-rich region); HLH, sarmal-ilmek-sarmal proteini (helix-loop-helix); IKK, IκB kinaz (IκB kinase); LZ, lösin fermuarı (leucine-zipper); NBD, NF-κB modülatör bağlayıcı alan (NF-κB-essential-modulator-binding domain); PEST, proline-, glutamik asit, serin- ve treonin bakımından zengin bölge (proline-, glutamic acid-, serine-, threonine-rich); RHD, REL homoloji alanı (REL homology domain); TAD, transaktivasyon alanı (transactivation domain); ZF, çinko parmak (zinc-finger) [93].

2.11 NF-κB ve Kanser İlişkisi

NF-κB transkripsiyon faktörleri ailesinin keşfi ve karakterizasyonu, immünoloji ve kanser biyolojisi çalışmalarından oluşan iki ana araştırma alanından kaynaklanmıştır. NF-κB ve kanser biyolojisi alanındaki rolünün giderek daha iyi bir şekilde anlaşılmasına rağmen tarihsel olarak NF-κB hakkındaki mevcut bilgilerin çoğu bağışıklık yanıtının düzenlenmesi ve işlevini anlamaya yönelik çabalardan mevcuttur. NF-κB'nin farklı immünoloji alanlarında oynadığı kritik role uygun olarak, Toll benzeri reseptör (Toll-like receptor, TLR) ve antijen reseptörü (antigen receptor, AgR)

sinyallemesi, lenfoid organogenez ve hematopoezde NF-kB'nin rolünü kapsayan çok sayıda çalışma bildirilmiştir [92, 104-108].

Genel olarak ele alındığında memeli bağışıklık yanıtları, doğal ve edinilmiş olarak ayrılabilir. İmmün yanıt, konağın yabancı patojenlerin varlığını tanınması ile başlar, ardından hücresel, doku ve organizma seviyelerinde patojenin yok edilmesini sağlar. Bu nedenle, immün yanıt; hücre dışı ortamdaki değişikliklerin, hücre düzeyinde gen ekspresyonunu değiştirdiği bireysel sinyal transdüksiyon olaylarına ayrılabilir. Çok sayıda örnekte NF-kB bu transkripsiyonel değişikliklere aracılık eden transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır. İmmün yanıtın erken evrelerinde karakteristik gen ürünleri, tanınmayı sağlayan sitokinleri ve diğer ürünleri içerir. NF-kB'nin aktivasyonu ve düzenlenmesi de bu faktörlerin ortak bir hedefidir. Böylece birçok durumda doğal ve adaptif immün yanıtları etkileyen değişikliklerde rol oynar [92].

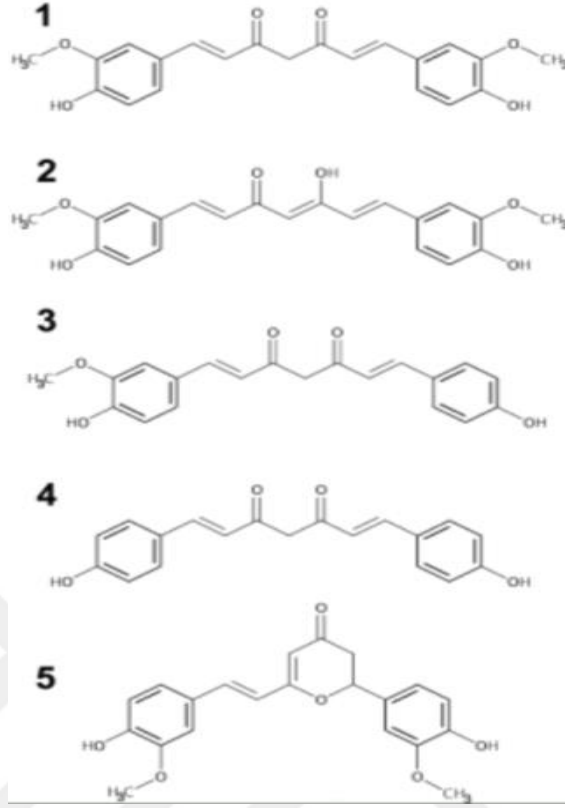
NF-kB transkripsiyon faktörleri, bağışıklık fonksiyonu ve gelişiminde yer alan çeşitli sinyal yolları ile aktive edilebilir. Bu faktörleri aktive eden doğal immün sistem tepkilerini etkileyen sinyal yolları, *Drosophila* Toll'un insan homologu [109], TNF α ve IL-1 sitokinleri, çeşitli bakteriyel ve viral ürünler içermektedir [11-13]. Bu faktörleri aktive eden edinilmiş bağışıklık sistem yanıtlarına dahil olan sinyal yolları; B ve T hücreleri üzerindeki antijen reseptörlerini, T hücreleri üzerindeki CD28 ve B hücreleri üzerindeki CD40 gibi lenfosit reseptör yollarında anahtar rol oynayan moleküllerini içermektedir. Bu sinyal yolları NF-kB dimerlerinin çekirdeğe translokasyonuna yol açan I κ B'lerin fosforilasyonuna neden olur [10].

İmmün sistemde NF-kB ailesi üyelerinin işlevleri lenfoid organlardan gen ve protein ekspresyonu analizleri ile tanımlanmıştır. P50, Rel ve RelA, lenfositler dahil olmak üzere tüm hematopoitik kökenli hücrelerde yüksek oranda eksprese edilirken p52 ve RelB'nin ekspresyon paterninin daha sınırlı olduğu görülmektedir [110].

2.12 Kurkumin

Sarımsı bir pigment olan kurkumin zerdeçal ve diğer kurkumin türlerinin köksapında bulunan bir polifenoldür. Kurkumin genellikle Zingiberaceae familyasının ilgili bileşikler olan demethoxycurcumin, bis demethoxycurcumin ve cyclo-curcumin ile birlikte bulunur (Şekil 2.20) [111]. Bu dört bileşik Kurkuminoidler olarak adlandırılmaktadır. Köklerdeki kurkuminoid içeriği dikkat çeken türler *Curcuma*

zedoaria (>100 µg/g), *Curcuma longa* (1-2 µg/g) ve *Curcuma aromatica*'dır (0,1 µg/g) [112, 113].



Şekil 2.20 : Kurkuminoidlerin kimyasal yapıları.

(1) Kurkumin keto-formu, (2) Kurkumin enolik formu, (3) dimetoksicurcumin, (4) bis-dimetoksikurkumin ve (5) siklo-kurkumin [112].

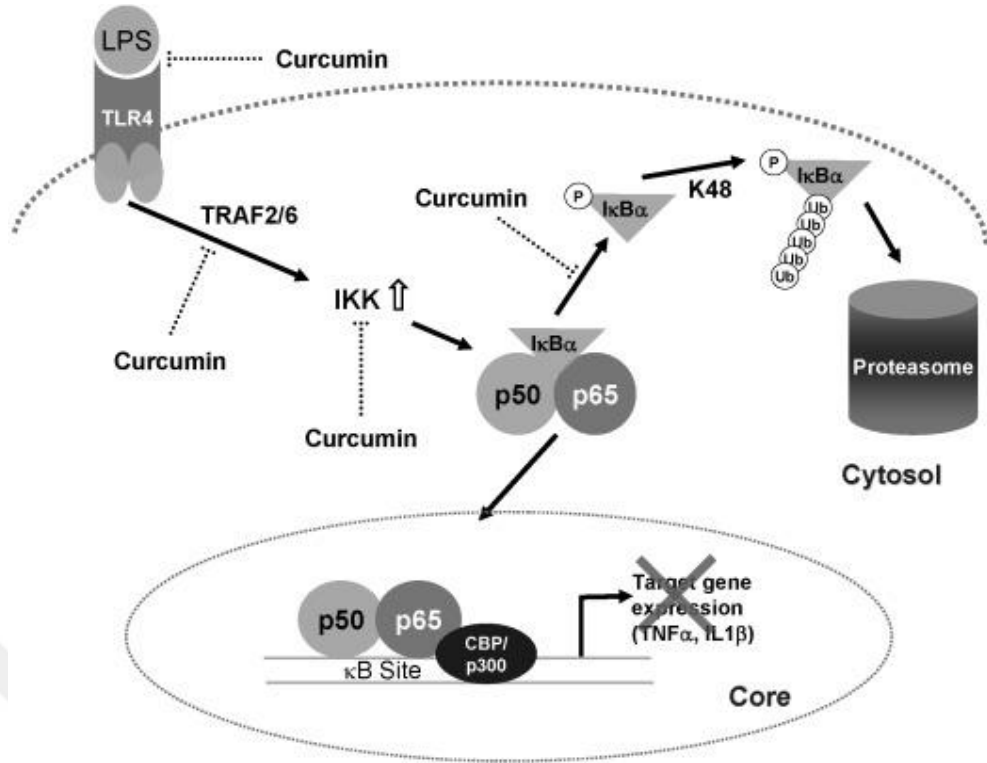
Kimyasal olarak bilinen kurkumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] veya diferuloylmethane, çözeltinin pH'ına bağlı olarak keto-enol totomerizm özellik sergiler; pH<7'de keto-form esas iken pH>7'de ise enol formu meydana gelir [111].

Kurkuminin üç farklı pKa değerine sahip olduğu bildirilmektedir; ilk (pKa 7,7-7,5) ve ikinci (pKa 8,5-10,4) değerler iki fenolik hidroksi grubundan ve üçüncü değer (pKa 9,5-10,7) enolik proton grubundandır. pH:1-6 arasında kimyasal olarak kararlıdır ancak bu pH aralığında suda pratik olarak çözünmez [112].

Curcuma longa'da ham ekstrakt kurkuminoid, zerdeçalın ağırlık olarak %1-6'sını oluşturur; %60-70'i kurkumin, %20-27'si biftoksikürümin ve %10-15'i bis-demethoxykurkumini oluştururken ticari olarak temin edilebilen kurkuminoidlerde yaklaşık %77 kurkumin içeriği bulunmaktadır [113, 114].

Zerdeçal geleneksel olarak hem Hint hem de Çin tıbbında; boya, baharat ve anti-enflamatuar ilaç olarak kullanılmaktadır. Antioksidan, anti-enflamasyon, anti-kanser, antidiyabetik, hepatoprotektif, antialerjik, anti-dermatofit ve nöroprotektif etkiler gibi hastalıklara olumlu etkiler sağladığı kurkumin zerdeçalın en önemli bileşimini oluşturmaktadır. Moleküler bir bakış açısı olarak kurkumin; Janus kinaz/sinyal yolağı (JAK-STAT), NF-kB, protein kinaz B (AKT/PKB), dönüştürücü büyüme faktörü b (TGF-b) ve rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) aracılığıyla farmakolojik etki göstermektedir [115-120]. Transkripsiyon faktörü Nrf2 ve NF-kB özellikle; transkripsiyon faktörü NF-kB'nin inhibisyonu ve anti-enflamasyonuna aracılık eder, Nrf2 sinyal yolağının indüksiyonu antioksidan savunma mekanizmaları ve faz II enzimlerinin üretimini sağlar [113]. Kurkuminin antikanserojen etkileri p53 düzeylerindeki artış ile ve dolayısıyla pro-apoptotik Bax ve sitokrom C ile ilişkilidir. Proliferasyonun baskılanması ve bir hücre döngüsünün durdurulması; NF-kB inhibitör a (IkBa), B-hücreli lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2), yaygın büyük B hücreli lenfoma (B-cell lymphoma-extra large, Bcl-x1), siklin D1 ve interlökin 6 (IL6) inhibisyonu gibi p53 yolağından bağımsız olarak kurkumin ile modüle edilebilir. Ayrıca kurkumin tarafından poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) artış göstermesi ile apoptoz başlatılabilir [113].

Hücre kültürü çalışmaları, transkripsiyon faktörü NF-kB'nin kurkumin tarafından inhibe edildiğini bildirmiştir [14-19]. Yapılan çalışmalar ile kurkuminin NF-kB-DNA etkileşimini artırdığı ve NF-kB hedef genlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [19]. Klasik NF-kB sinyal mekanizması Şekil 2.21'de gösterilmiştir.



Şekil 2.21 : Klasik NF-κB sinyal mekanizmasının şematik gösterimi.

Klasik NF-κB sinyal yolu, LPS gibi çeşitli uyarılar ile etkinleştirilebilir. İlk olarak TRAF 2 ve TRAF 6 adaptör proteinlerinin aktive edilmesi ile IKK aktive edilir. IKK; IKKα ve IKKβ olmak üzere iki katalitik alt birimden ve düzenleyici alt birim olan IKKγ/NEMO'dan oluşur. IKK'nın aktive edilmesi ile, sitoplazmada p50/p65 heterodimerini bağlayan IκBα proteini fosforile edilir. p50/p65 NF-κB dimeri serbest bırakılırken fosforillenmiş IκBα proteini K48 üzerinde poliubikitine edilir ve parçalanma için işaretlenir. Daha sonra p50/p65 heterodimer çekirdeğe taşınır, çekirdekte CBP/p300 kofaktör ile birlikte DNA üzerindeki κB bölgesine bağlanır ve TNF α ve IL1β gibi hedef genlerin ekspresyonunu indükler. NF-κB sinyal mekanizması kurkumin tarafından çeşitli noktalarda (noktalı çizgiler) modüle edilebilir ve hedef genlerin ekspresyonunun baskılanmasına neden olur [113, 121].

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Malzemeler

2-Merkaptoetanol (MERCK), Akrlamid/Bis-Akrlamid (Sigma,Aldrich), Amonyum persülfat (APS, Applichem), Asetik asit (Sigma, Aldrich), Aseton (MERCK), Bovin serum albumin (BSA, Cell Signaling Technology), Coomassie Blue belirteci (Applichem), Dimetilsulfoksit (DMSO, Merck), DMEM Medyumu (Gibco), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, Applichem), Fetal Bovin Serum (FBS, Gibco), Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, Aldrich), Hidroklorik asit (HCL, MERCK), Laemli tamponu (Sigma), Metanol (Sigma-Aldrich), Penisilin/Streptomisin (Gibco), Protein Ladder (Thermo), PVDF membran (Thermo), Saf etanol (Sigma-Aldrich), Sodyum dodesil sülfat (SDS, Applichem), Sodyum klorür (NaCl, MERCK), TEMED (Applichem), Tripsin-EDTA (Gibco), Tris-HCL (Calbiochem), Tween 20 (MERCK), Tween 80 (MERCK), Yağsız süt tozu (Santa Cruz Biotechnology), poli(D, L-laktik-ko-glikolid (PLGA, MA: 24,000-38,000, Aldrich) alındığı gibi kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Cihazlar

Nanopartiküllerin nano boyut dağılımı ölçümleri dinamik ışık saçılım (DLS) spektrometresi cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SDS-Page jel elektroforezi, 1x Tris-glisin SDS (pH: 8.3) yürütme tamponu ve bir poliakrilamid jeli kullanılarak 100 V'ta gerçekleştirilmiştir. Yükleme örnekleri yükleme tamponu ile karıştırılarak birkaç saniye vortekslenmiştir. Proteinler denatüre edilmesi için 5 dakika 95°C'de ısıtılmıştır. Jel görüntüleri Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme sistemi kullanılarak kaydedilmiştir.

3.3 Deneysel Kısım

3.3.1 Hücre kültürü

American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilen MDA-MB-231 hücre hattı, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin antibiyotikleri ilave edilen DMEM besiyeri kullanılarak %5 karbondioksit (CO₂) ve 37 °C'de bulunan

etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan besiyeri 0.22 µM por çapına sahip hücre kültürü uygulamaları ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiş; 50 ml'lik falkon tüplerde +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Hücre sayısının yeterli yoğunluğa ulaşması için hücreler 25 ve 75 cm²'lik hücre kültürü petrilerinde büyütülmüştür.

Gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda hücre ekimi için petri kabı içerisindeki hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşması ile hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. 75 cm²'lik hücre kültürü petrisi 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkayıp 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (% 0,25) ile CO₂ içeren etüvde 3 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenerek tripsin aktivitesinin durdurulması sağlanmış ve hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılarak pellet üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir. Pipetaj işlemi ile homojen bir hale gelen hücre süspansiyondan hücre sayımı için Neubauer hemositometre kuyusuna 10 µl eklenmiştir. Hemositometre ile hücre sayısı sayılmış ve 1 ml'de bulunan hücre miktarı hesaplanmıştır. Deney planına göre gereken hücre yoğunluğu belirlenmiş ve petri kaplarına yapışması için ekilmiştir.

3.3.2 Hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi

Erken pasaj sayısına sahip hücreler yedeklemek amacıyla dondurulmuştur. Hücre dondurmak için kültür petrieleri tripsin-EDTA ile muamele edilerek hücrelerin kalkması sağlandıktan sonra 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve 1800 µl hücre medyası, 200 µl DMSO içerisinde 1x10⁶ olacak şekilde hazırlanarak kriyotüp içerisine alınmıştır. Kriyotüpler ilk olarak -80 °C buzdolabı; daha sonra uzun süre saklamak için -196 °C sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir.

İhtiyaç durumu ile hücreler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra 37 °C besiyerinde 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek çoğalmaları sağlanmıştır.

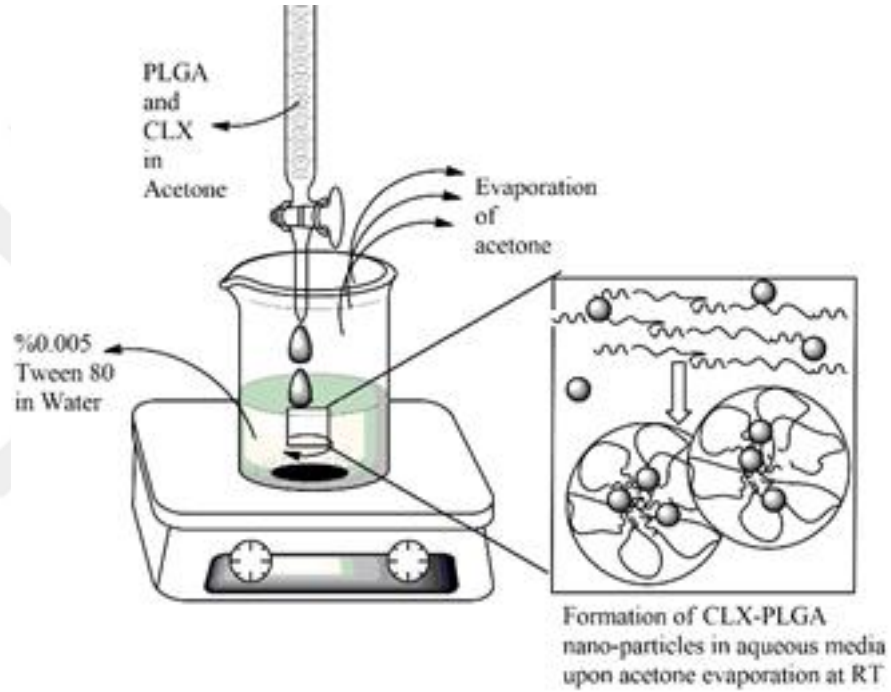
3.3.3 Nano formülasyon sentezi

3.3.3.1 Tween 80 hazırlama

19 ml distile su içerisine 1 ml Tween 80 eklenerek seyreltme yapılır. 19 ml distile su içerisine hazırlanan örnekten alınan 1 ml eklenir. Partikül oluşturmak için 2 kez seyreltilen Tween 80 çözeltisi kullanılmıştır.

3.3.3.2 DSPE-PLGA sentezi

10 mg PLGA, 2,5 ml asetonitril içerisinde çözülür. 2 mg DSPE 1 ml metanol içerisinde çözülür ve çözeltiler sıcak su banyosuna alınır. PLGA ve DSPE karıştırılarak sıcak su banyosunda bekletilir. Hazırlanan Tween 80 çözeltisinden 1 ml alınarak bu karışıma eklenir. 60 dereceye ayarlı manyetik karıştırıcıda enjektör yardımı ile damla damla eklenerek agregat oluşumu engellenir ve 600 rpm hızında aseton uçana kadar bekletilir (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 : Partikül oluşturma yöntemi.

3.3.3.3 DSPE-PLGA-Kurkumin sentezi

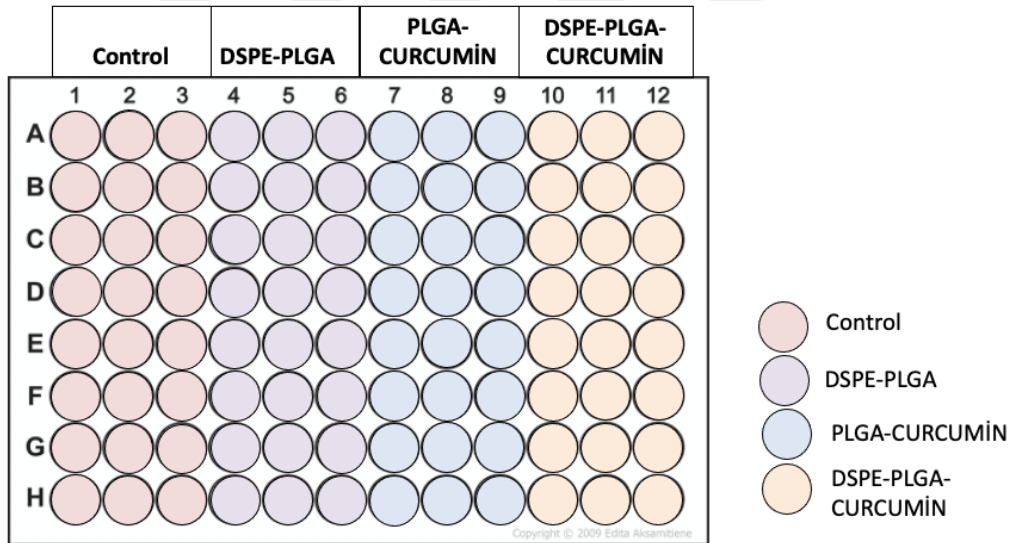
4,5 mg kurkumin 2,5 ml asetonitril içerisinde çözülür. 2 mg DSPE, 1 ml metanol içerisinde; 10 mg PLGA 2,5 ml asetonitril içerisinde çözülür. Çözeltiler sıcak su banyosuna alınır. 60° 30 dk bekletilir. İlk olarak PLGA-DSPE'ye eklenir ve daha sonra kurkumin çözeltisi eklenir. Hazırlanan Tween 80 çözeltisinden 1 ml alınarak bu karışıma eklenir. 60°C ayarlı manyetik karıştırıcıda enjektör yardımı ile damla damla eklenerek agregat oluşumu engellenir ve 600 rpm hızında aseton uçana kadar bekletilir (Şekil 3.1).

3.3.3.4 Nano boyut dağılımı ölçümü

Hazırlanan örneklerin nano boyut dağılımının ölçülmesi için örnekler cam küvetlere belirli bir miktar eklenir. Küvetler tek tek DLS cihazına alınır. Ölçüm yöntemine bağlı olarak gerekli protokol doğrultusunda, her bir küvet için 5 okuma ve 3 dakika okuma yapılır.

3.3.3.5 Hücre canlılığının belirlenmesi

PLGA-Kurkumin nano formülasyonunun zamana bağlı olarak etkisinin değerlendirilmesi için Sulforodamin B boyama yöntemi uygulanmıştır. Hücrelerin 3 adet 96 kuyucuklu hücre petrisine 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen hücelere ertesi gün sonra Şekil 3.2’de belirtilen sıra 900 µl hücre besiyeri, 100 µl nano formülasyon oranı olacak şekilde DSPE, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin uygulanmıştır. 96 kuyucuklu hücre petrilerin her biri 24, 48 ve 72 saat sonunda Sulforodamin B boyama yöntemi ile hücre canlılığı analiz edilmiştir.



Şekil 3.2 : Meme kanseri hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin, DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonu.

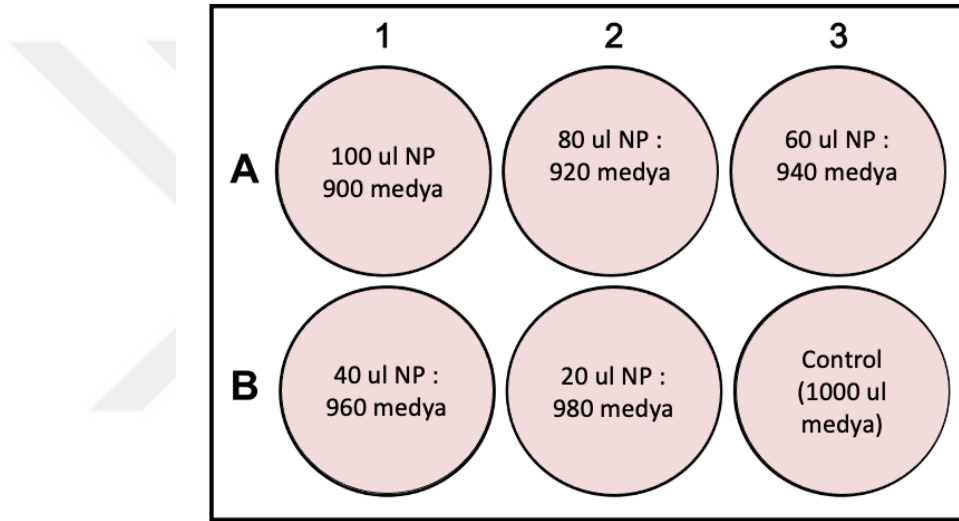
Sulforodamin B boyama aşamaları için ilk olarak medya uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl cold-TCA (trikloro asetik asit) eklenir ve 30 dk +4° de bekletilir. dH₂O ile plate yıkanır ve kabin içerisinde tamamen kuruması için bekletilir. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl Sulforodamin B boyası eklenir ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilir. %1 Asetik asit ile plate, 5 defa yıkanır ve kuruması için

bekletilir. 200 µl tris base eklenerek 96 kuyucuklu hücre petrisi Bio Rad Elisa Reader’da 515 nm dalga boyundaki absorbanlarına bağlı olarak ölçümü yapılır.

3.3.4 Nano formülasyon oranının belirlenmesi

72 saatte hücrelerin %16’sını öldürmeyi başarabilen DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonun farklı oranlarda uygulanarak hücre canlılığına etkisini değerlendirmek için 6 kuyucuklu hücre petrisine 80×10^5 yoğunluğunda MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ekilmiş ve bir gece boyunca yapışması beklenmiştir.

Hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra Şekil 3.3’ de görülen oranlarda DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonu uygulanmıştır.



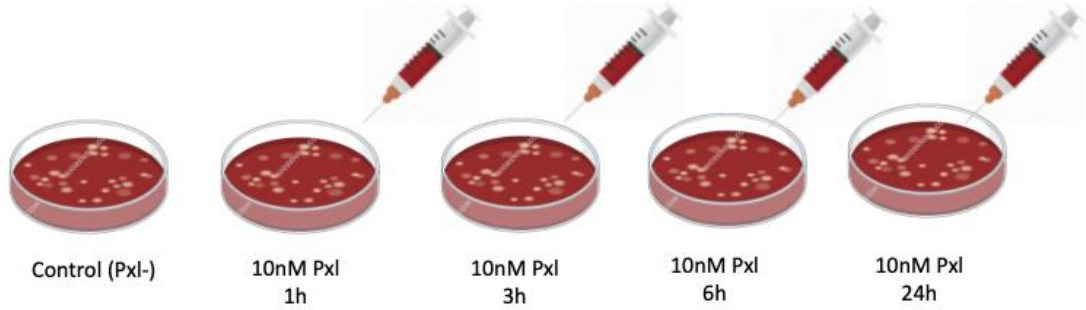
Şekil 3.3 : Farklı oranlarda 72 saat süreyle uygulanan DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonu.

72 saat sonunda 6 kuyucuklu hücre petrisi Sulforodamin B boyama yöntemi ile Bio Rad Elisa Reader’da 515 nm dalga boyundaki absorbanlarına bağlı olarak ölçümü yapılmıştır.

3.3.5 Paklitaksel uygulaması süresinin belirlenmesi

MDR; tedavi için önemli bir sorundur. Hücrelerde NF-kB sinyal mekanizmasında ekspresyonu artırması beklenen paklitaksel uygulaması için MDA-MB-231 hücreleri 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 60 mm çaplı petrilere ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamı (DMEM besiyerinde %10 sıgır fetüsü serumu ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotik) eklenmiştir.

Hücrelerin hücre kültürü petrilere yapışması sağlandıktan sonra kontrol grubu hariç diğer petrilere; uygulanması gereken paklitaksel oranı 10 nM olacak şekilde petrilere 1, 3, 6 ve 24 saat olacak şekilde uygulanmıştır (Şekil 3.4)



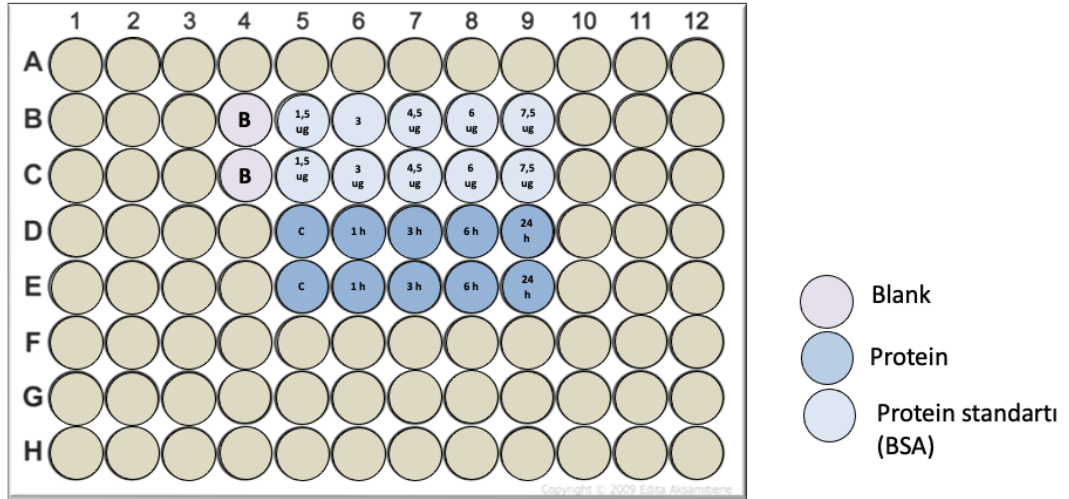
Şekil 3.4 : Meme kanseri hücrelerinde 1, 3, 6 ve 24 saat olarak uygulanan paklitaksel ilacı.

3.3.5.1 Total protein izolasyonu

Hücre petrilere Kontrol, 1 saat, 3 saat, 6 saat ve 24 saat olacak şekilde paklitaksel uygulamasına maruz bırakılmıştır. Belirtilen süre sonunda besiyeri uzaklaştırılarak hücreler soğuk 1x PBS ile bir kez yıkanmış ve tekrar 1x PBS eklenmiştir. Kazıyıcı yardımı ile hücreler kaldırılarak 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınmış ve tüpler 13.200 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılmış ve soğuk 1x PBS uygulaması, kazıma işlemi tekrar edilerek hücrelerin toplanması sağlanmıştır. Son santrifüj sonrasında pellet üzerine lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler, 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilerek +4 °C 16.000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir ependorf tüpüne alınarak -80 °C'de saklanmıştır.

3.3.5.2 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Elde edilen proteinlerin toplam protein miktarının tespit edilmesi için yöntem olarak Bradford metodu, protein standartı olarak Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5 µg/µl olan BSA kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. 1,5 µg/µl, 3 µg/µl, 4,5 µg/µl, 6 µg/µl, 7,5 µg/µl BSA'nın üzerine Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 µg/µl alınarak aynı dalga boyundaki absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin protein konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 3.5)



Şekil 3.5 : Bradford yöntemi.

3.3.5.3 Western blot

Spesifik bir proteinin analiz edilmesinde yaygın olarak kullanılan Western Blot yöntemi sayesinde örnek içerisindeki proteinin varlığı, büyüklüğü ve konsantrasyonu hakkında bilgi sahibi olmaya imkan vermektedir.

Temel olarak Western blot yöntemi, izole edilen protein örneklerinin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yolu ile proteinlerin yük ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve proteinlerin jelden membrana transfer edilerek blotlama ve antikor hibridizasyonu ile muamele edilerek membran okuyucuda görüntülenmesi esasına dayanmaktadır.

Bradford yöntemi ile elde edilen proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi sayesinde Western jel kuyucuklarının her birine eşit miktarda protein yüklenmesini sağlamaktadır.

Her örnekten uygun miktarda protein yüklenebilmesi için gerekli hacim ilgili denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Yüklenecek örnek hacmi } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Yüklenecek protein miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Örnek konsantrasyonu } \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}\right)} \quad (3.1)$$

3.3.5.4 SDS-PAGE

Konsantrasyonları belirlenen protein örneklerine SDS, gliserol, 2-merkaptoetanol, bromofenol mavisi ve pH 6,8 tris-hidroklorik asit (HCl) bulunan 4x-laemli solüsyonu eklenmiştir. SDS deterjanı, proteinlere bağlanarak proteinlerin negatif yükle

yüklenmesini sağlar. SDS'in protein örneklerini denatüre etmesi için örnekler 95 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Belirlenen proteinin kDa'na göre %10, %12 veya %15'lik akrilamid jel konsantrasyonuna sahip jellere yüklenerek SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmışlardır.

3.3.5.5 Örneklerin membrana transfer edilmesi

SDS-PAGE yürütülen proteinlerin jelden poliviniliden diflorür (PVDF) membrana transferi gerçekleştirilir. Transfer işlemi sonrasında PVDF membranlar %5 yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilerek bloklama yapılmıştır. Süt tozu içerisinden alınan membranlar 1X TBS-Tween ile 5'er dakika boyunca 3 defa yıkama yapılır ve hedef proteine özgü 1:1000 oranında % 5 yağsız süt ile dilüe edilen birincil antikor ile +4 °C'de bir gece inkübe edilir.

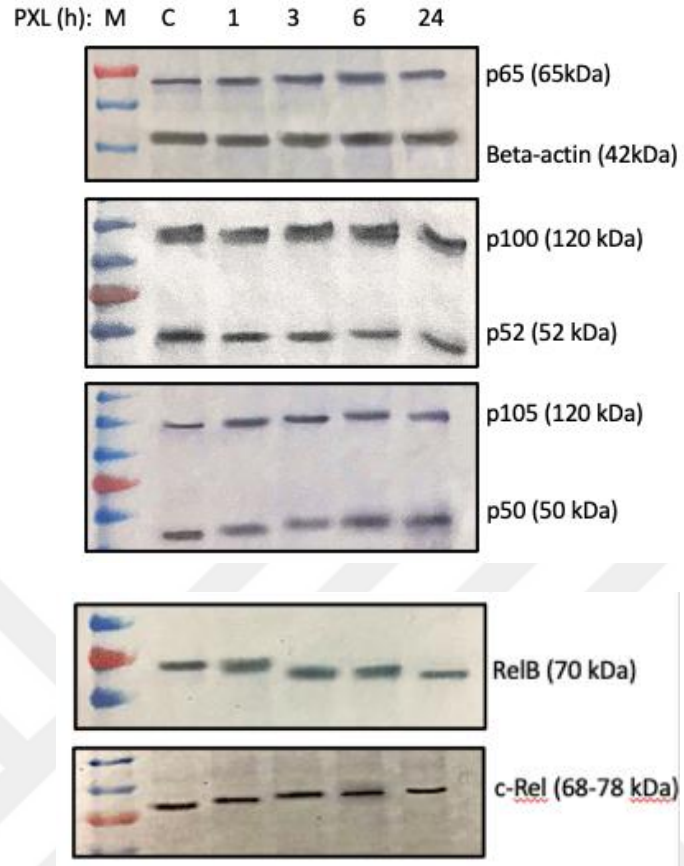
3.3.5.6 İmmünoblotlama

Ertesi gün PVDF membranlar 1X TBS-Tween ile 5'er dakika boyunca 3 defa yıkanarak hedef proteine özgü kullanılan birincil antikora göre 1:5000 oranında %5 yağsız süt tozu ile dilüe edilen anti-tavşan/anti-fare ikincil antikorları ile +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.

İkincil antikor uygulaması sonunda membranlar ile 5'er dakika boyunca 3 defa 1 X TBS-T çözeltisi ile yıkanmıştır. Kemilüminesans çözeltisi ile 2 dakika boyunca karanlıkta muamele edilen membranlar Chemidoc cihazında görüntüsü kaydedilerek bant görünümü kaydedilmiştir.

3.3.5.7 Paklitaksel uygulama sürelerinin karşılaştırılması

Farklı sürelerde uygulanan paklitakselin NF-kB sinyal yolağı alt birimlerine etkisi Western Blot yöntemi ile p65, p100/p52, p105/p50, RelB, c-Rel primer antikorları ile muamele edilmiş ve Western Blot yöntemi ile elde edilen sonuçlar Image J programında analiz edilerek T-Testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.6)

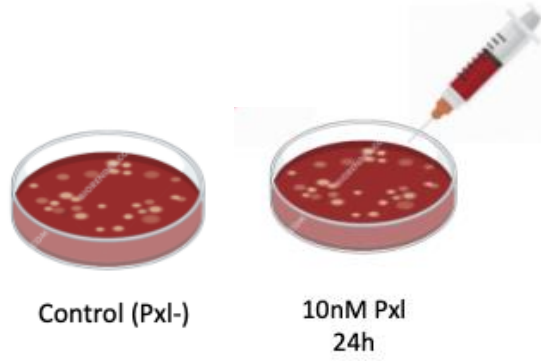


Şekil 3.6 : NF-kB alt birimlerinin Western Blot yöntemi ile karşılaştırılması.

3.3.6 Paklitaksel uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu

24 saat sonunda artış gösteren NF-kB ekspresyonunun Nükleer Sitoplazmik protein izolasyonunun gerçekleştirilmesi için petrilere 1×10^6 yoğunlukta hücre ekilmiş ve bir gece yığılması beklenmiştir.

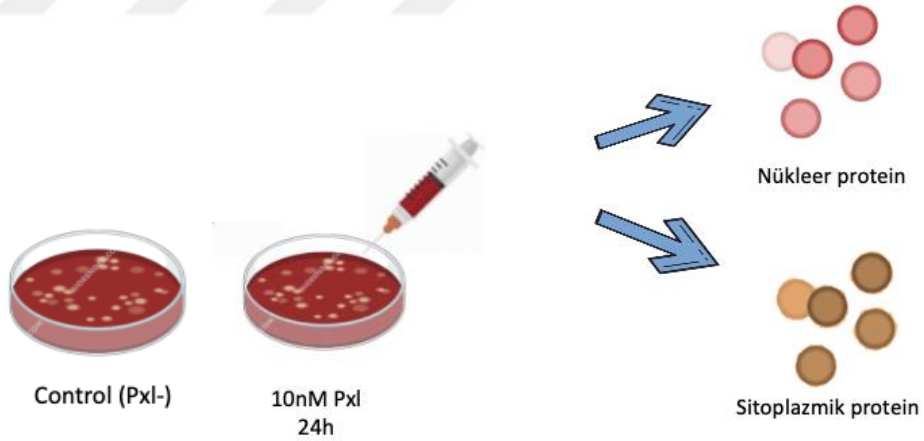
Hücrelerin hücre kültürü petrilere yapışması sağlandıktan sonra kontrol grubu petri haricindeki diğer hücre petrisine 10 nm paklitaksel uygulanmıştır (Şekil 3.7)



Şekil 3.7 : Meme kanseri hücrelerinde Kontrol ve 24 saat olarak uygulanan paklitaksel ilacı.

3.3.6.1 Nükleer ve sitoplazmik protein izolasyonu

Paklitaksel uygulamasının 24 saat süre sonunda petri tabakaları nükleer sitoplazmik protein izolasyonu için NE-PER™ kiti kullanılarak nükleer ve sitoplazmik ekstrat elde edilmiştir (Şekil 3.8)



Şekil 3.8 : Kontrol ve 24 saat süreyle paklitaksel uygulanan hücre grupları.

Nükleer ve sitoplazmik izolasyon için NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kiti kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinden nükleer-sitoplazmik ekstrat elde etmek için petripler soğuk PBS ile kazıyıcı yardımı ile kaldırılmıştır. Hücre süspansiyonları 13.2000 rpm'de +4 °C'de çöktürülmüş, petrideki tüm hücreler toplanana kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Pellet üzerine 50 µl CER1 (sitoplazmik ekstraksiyon reaktifi 1) solüsyonu eklenmiş, 15 saniye vortex işlemi uygulanarak 10 dakika buzda inkübasyonu yapılmıştır.

İnkübasyon sonunda 2,25 µl CER2 (sitoplazmik reaksiyon reaktifi 2) solüsyonu eklenmiş, 5 saniye vortex işlemi uygulanarak 16.000 g'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Oluşan fazlardan supernatant sitoplazmik protein elde edilerek yeni bir ependorfa aktarılmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Pellet üzerine 25 µl NER (nükleer ekstraksiyon reaktifi) solüsyonu eklenmiş, 15 saniye vortex işlemi uygulanarak buzda 40 dakika boyunca 10 dakikalık aralıklar ile 15 saniye vortex işlemi uygulanmıştır. Süre sonunda 16.000 g'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanarak supernatant ile nükleer protein elde edilmiştir. Supernatant yeni bir ependorfa aktarılarak -80 °C'de muhafaza edilmiştir .

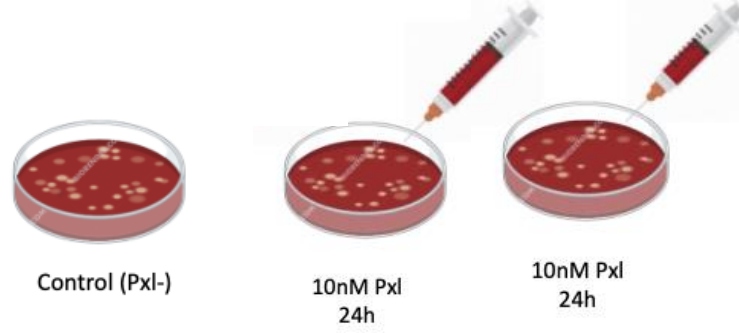
3.3.6.2 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein miktarının tespit edilmesi Bradford Metodu ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.7 Paklitaksel ve nano formülasyon uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu

Paklitaksel ile NF-kB ekspresyonu artmış hücre petriplerini DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonu ile baskılamak için 1×10^6 yoğunlukta hücre ekilmiştir.

Hücrelerin hücre kültürü petriplerine yapışması sağlandıktan sonra kontrol petrisi haricindeki diğer petrilere 10 nm paklitaksel uygulanmıştır (Şekil 3.9)



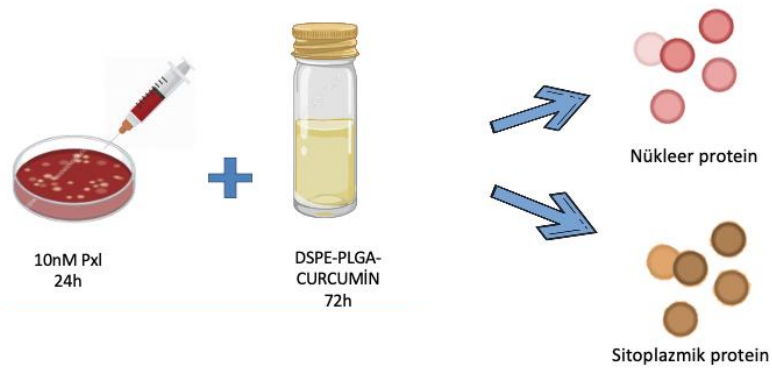
Şekil 3.9 : Sırasıyla kontrol; 24 saat paklitaksel ile birlikte 2:98 oranında nano formülasyon; 24 saat paklitaksel ile birlikte 1:9 oranında nano formülasyon uygulanan hücre grupları

24 saat paklitaksel uygulaması sonunda nano formülasyon hücre canlılığı ile belirlenen sürede uygulanmıştır: 72 saat.

(980:20 medya/nano formülasyon) (900:100 medya/np)

3.3.7.1 Nükleer ve sitoplazmik protein izolasyonu

Paklitaksel uygulamasının 24 saat süre sonunda nano formülasyon uygulanan petriyer Nükleer sitoplazmik protein eldesi için NE-PER™ kiti kullanılarak nükleer ve sitoplazmik ekstrat elde edilmiştir (Şekil 3.10)



Şekil 3.10 : Meme kanseri hücrelerinde 24 saat paklitaksel uygulamasından sonra yapılan nükleer ve sitoplazmik protein izolasyonu

3.3.7.2 Protein konsantrasyonunun belirlenmesi

Elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein miktarının tespit edilmesi Bradford Metodu ile gerçekleştirilmiştir

3.3.7.3 Western blot analizi

72 saat uygulanan kurkuminin, paklitaksel ile muamele edilmiş kanser hücrelerinde NF-kB sinyal yolağı alt birimlerine etkisi western blot yöntemi ile p65 primer antikoru ile muamele edilmiş ve elde edilen sonuçlar Image J programında analiz edilerek T-Testi ile değerlendirilmiştir.

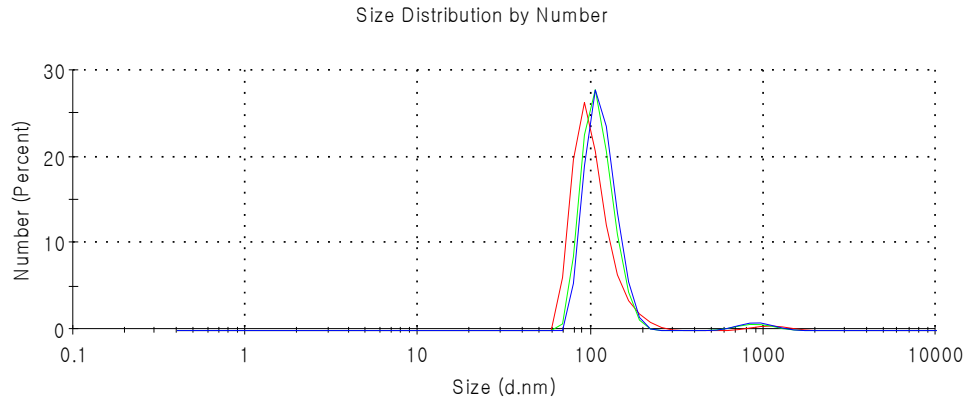


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

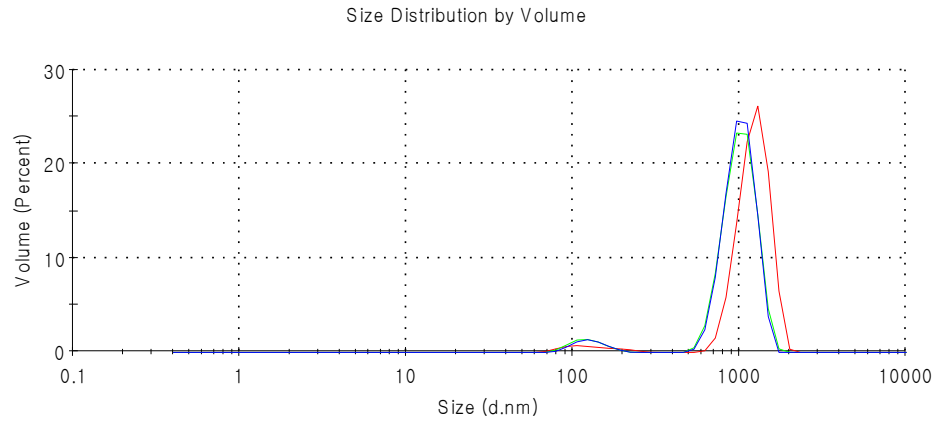
4.1 Nano Boyut Dağılımı Ölçümü

Belirtilen prosedüre uygun olarak hazırlanan nano formülasyonlar, hücre canlılığına olan etkisinin analiz edilmesi için nano boyut dağılımı analizi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nano formülasyonlarının boyutu DLS cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre PDI değeri nanopartikül boyut eşitliğini ifade etmekte ve bu değer hücre kültürü uygulaması için de standart olduğunu ifade etmektedir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

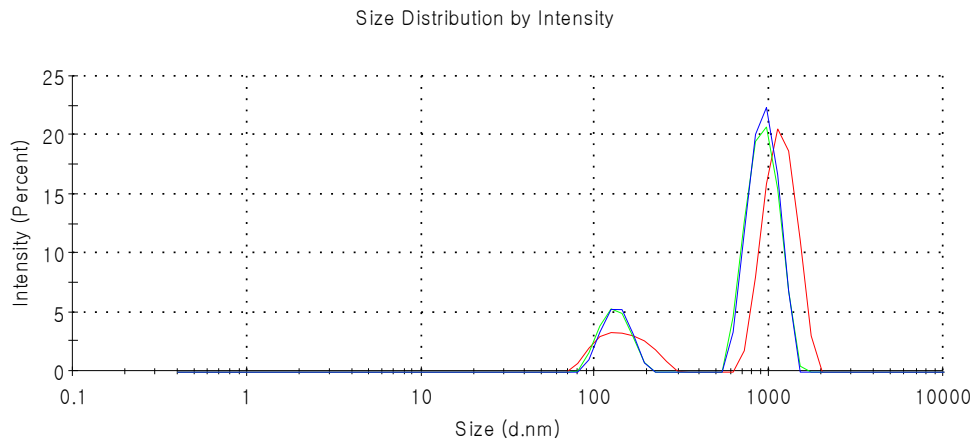
a)



b)

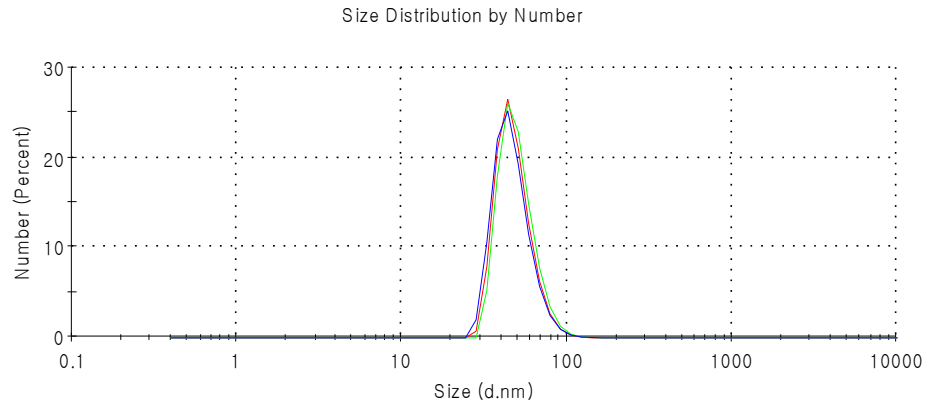


c)

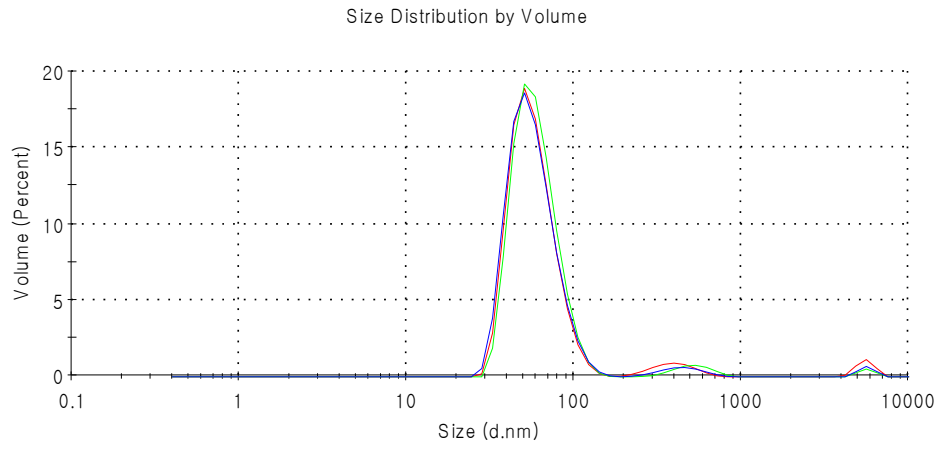


Şekil 4.1 : PLGA-Kurkümün nano formülasyonuna ait sayıca (a), hacimce (b), şiddetçe (c) dağılımı.

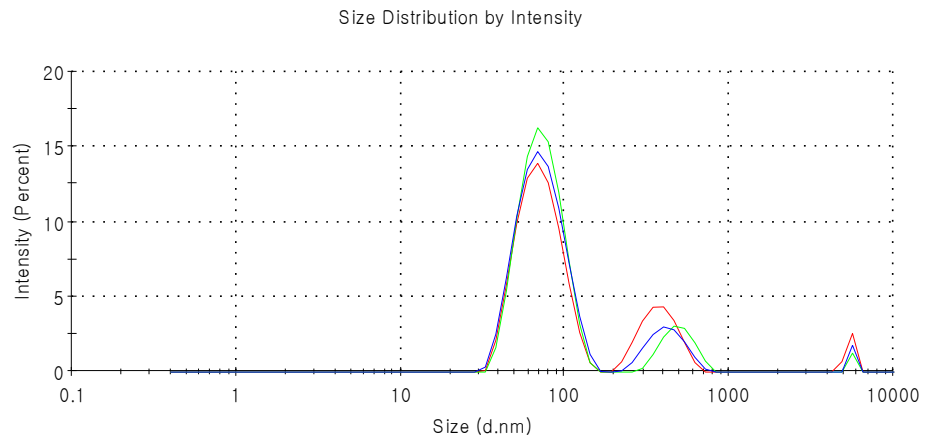
a)



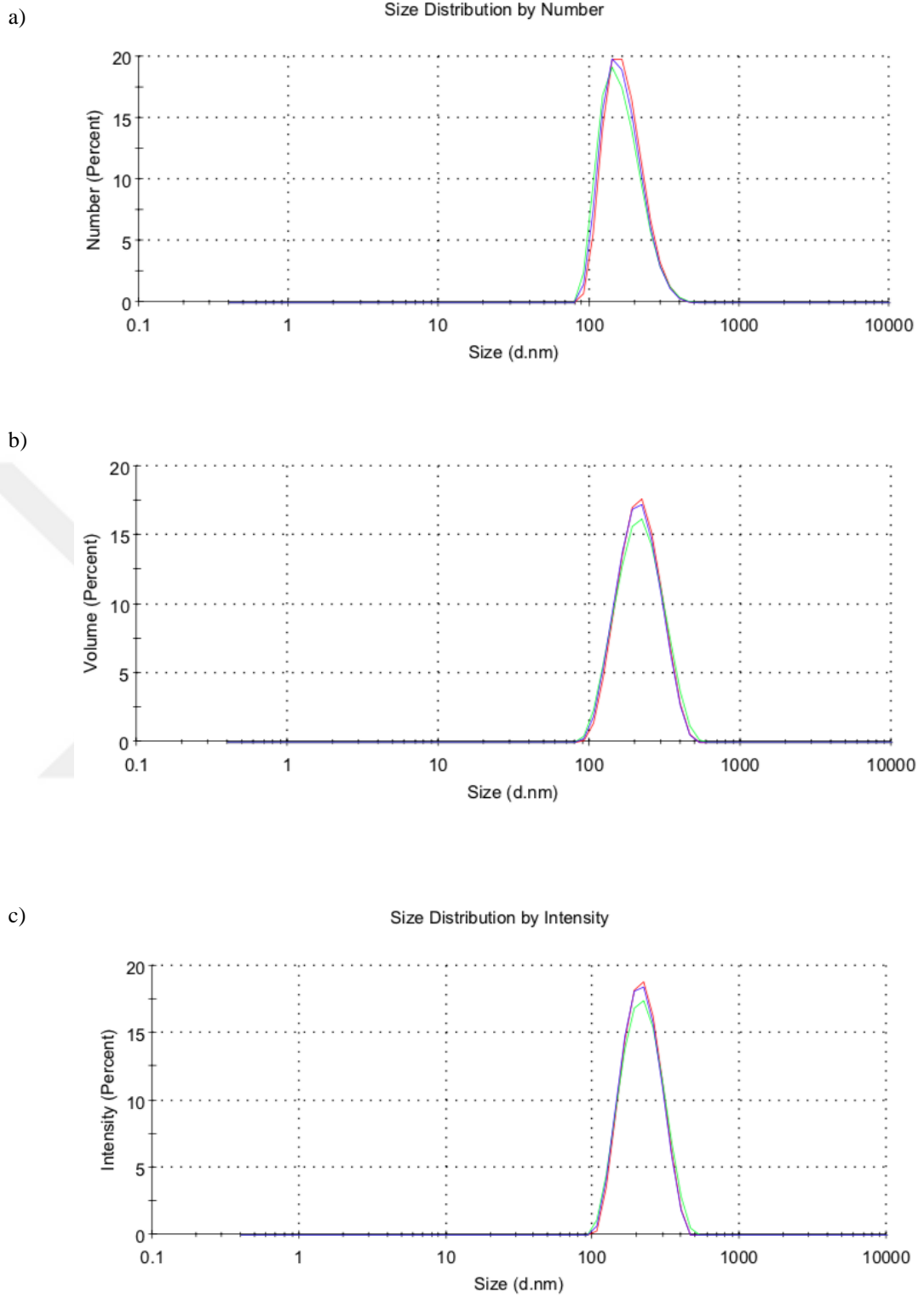
b)



c)



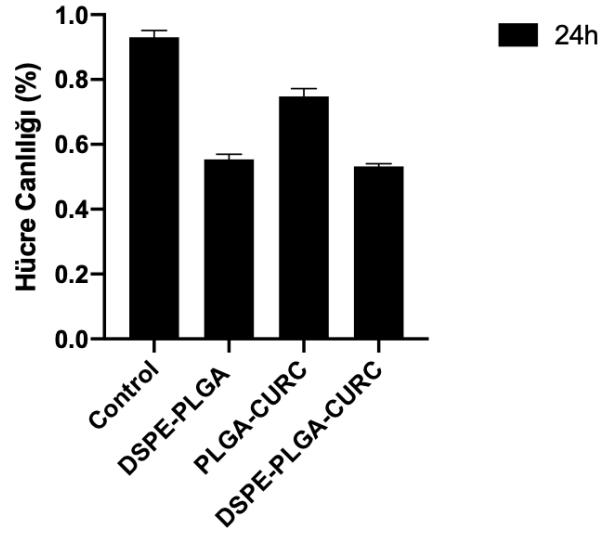
Şekil 4.2 : PLGA-DSPE nano formülasyonuna ait sayıca (a), hacimce (b), şiddetçe (c) dağılımı.



Şekil 4.3 : PLGA-DSPE-Kurkumin nano formülasyonuna ait sayıca (a), hacimce (b), şiddetçe (c) dağılımı.

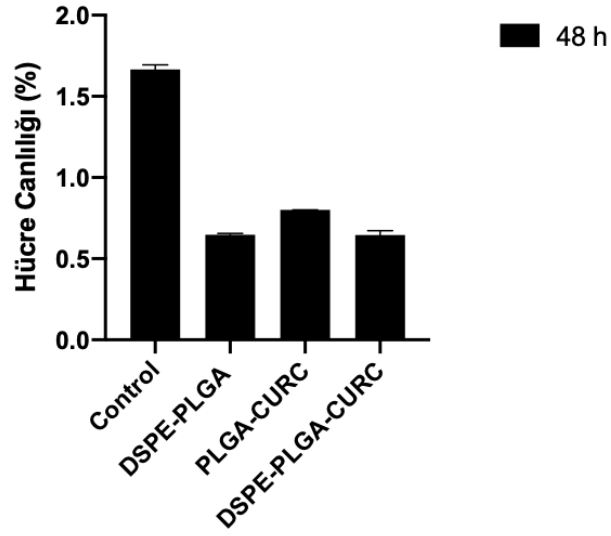
4.2 Hücre Canlılığı

MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat süre sonunda DSPE-PLGA uygulanan hücrelerin %53,72'si; PLGA-Kurkumin uygulanan hücrelerin %71,51'i; DSPE-PLGA-Kurkumin uygulanan hücrelerin ise %59,04'ü yaşayabilmiştir (Şekil 4.4).



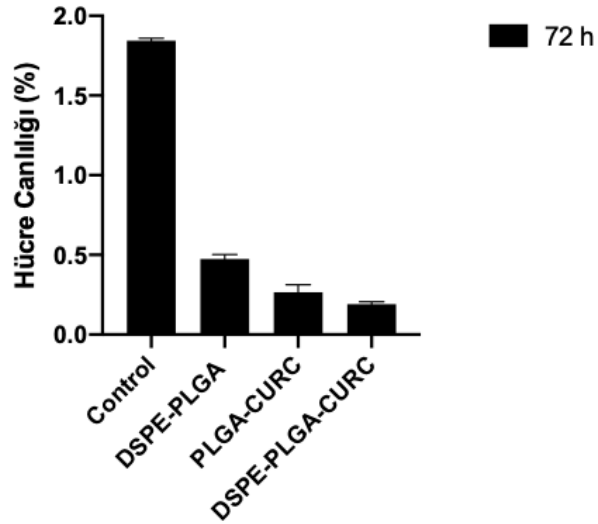
Şekil 4.4 : MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.

MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat süre sonunda DSPE-PLGA uygulanan hücrelerin %50,12'si; PLGA-Kurkumin uygulanan hücrelerin %75,09'ü; DSPE-PLGA-Kurkumin uygulanan hücrelerin ise %61,26'sı yaşayabilmiştir (Şekil 4.5).

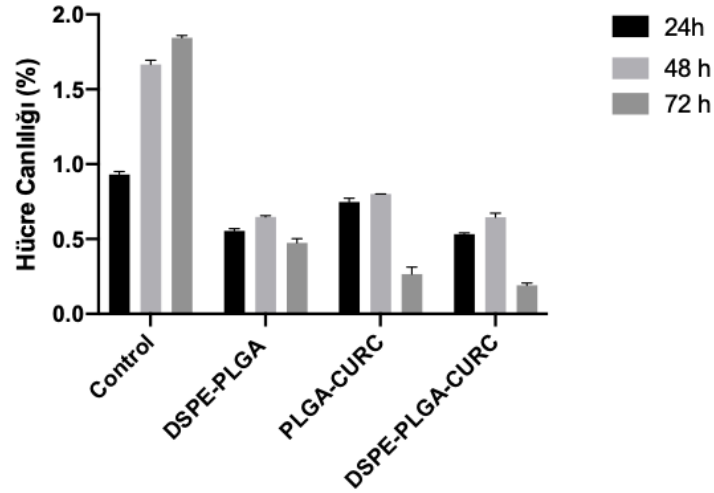


Şekil 4.5 : MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.

MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat süre sonunda DSPE-PLGA uygulanan hücrelerin %35,38'i; PLGA-Kurkumin uygulanan hücrelerin %24,34'ü; DSPE-PLGA-Kurkumin uygulanan hücrelerin ise %16,3'ü yaşayabilmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



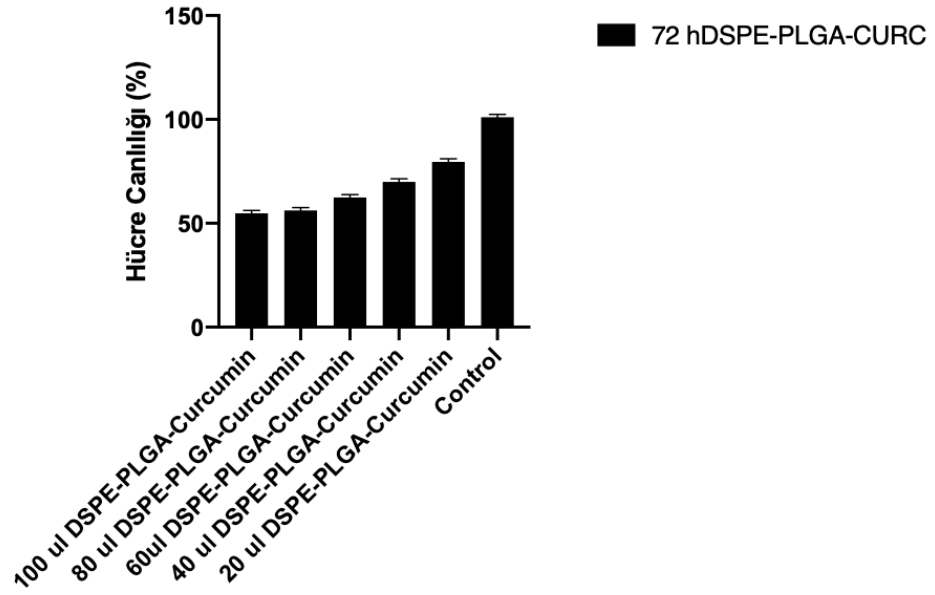
Şekil 4.6 : MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.



Şekil 4.7 : MDA-MB-231 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA, PLGA-Kurkumin ve DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.

4.1 Nano formülasyon oranının belirlenmesi

72 saat olarak uygulanan DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonu hücreleri başarıyla öldürebilmiştir. Yeteri kadar protein elde edilebilecek nano formülasyon oranının belirlenmesi için 6 kuyucuklu hücre petrisine 72 saat süre için farklı oranlarda DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyonu uygulanmıştır. Hücre canlılığını analizine göre; 100 µl uygulanan nano formülasyon ile hücrelerin %53,79'u; 80 µl uygulanan nano formülasyon ile hücrelerin %55,17'si; 60 µl uygulanan nano formülasyon ile hücrelerin 61,4'ü; 40 µl uygulanan nano formülasyon ile hücrelerin 68,97'si; 20 µl uygulanan nano formülasyon ile hücrelerin 78,62'si yaşayabilmiştir. Karşılaştırılma yapılabilmesi için paklitaksel uygulaması sonrasında iki farklı hücre petrisine 20 µl ve 100 µl olacak şekilde uygulama yapılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 : MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat olarak farklı oranlarda uygulanan DSPE-PLGA-Kurkumin nano formülasyona ait Sulforodamin B yöntem sonuçları.

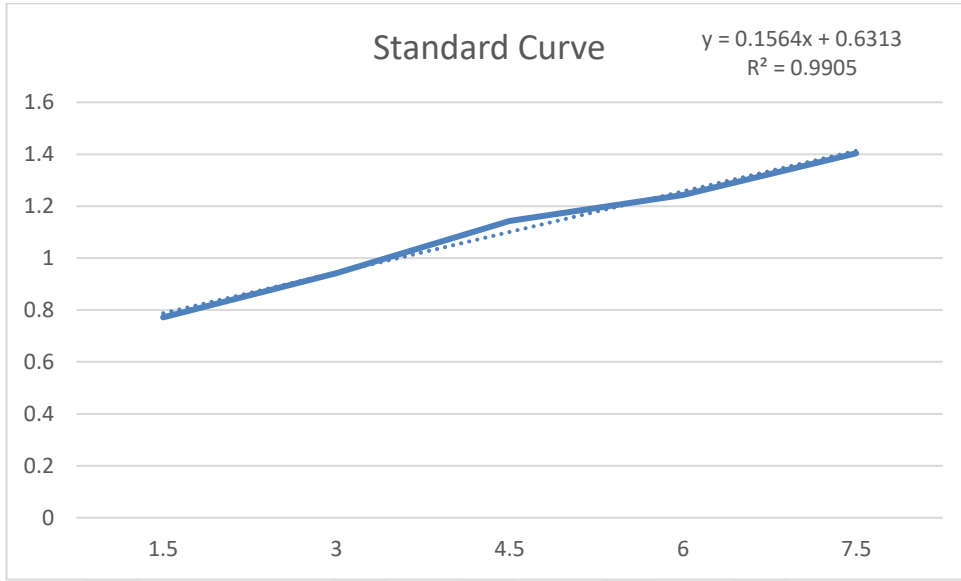
4.2 Paklitaksel uygulaması süresinin karşılaştırılması

4.2.1 Total protein miktar tayini

Kontrol, 1, 3 6 ve 24 saat olarak uygulanan paklitaksel uygulaması sonunda protein izolasyonunda protein standartı ile miktar tayini gerçekleştirilerek western blot analizi gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.9, Tablo 4.2).

Tablo 4.1 : Protein standartı olarak kullanılan BSA absorbansı.

BSA (μg)	Abs (nm)
1,5 μg	0,74
3 μg	0,87
4,5 μg	0,99
6 μg	1,14
7,5 μg	1,35



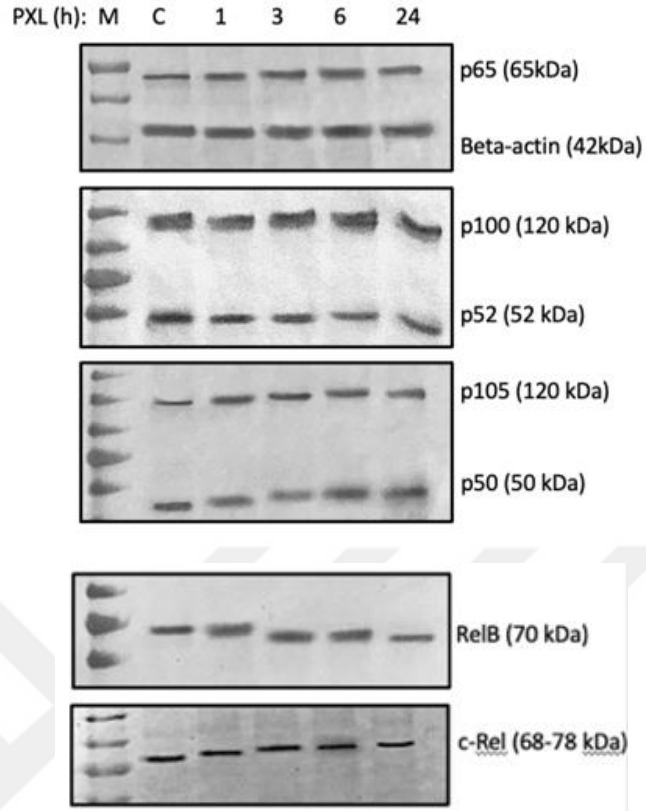
Şekil 4.9 : BSA standart proteini ile elde edilen standart eğri grafiği.

Tablo 4.2 : Bradford tayini ile absorbans değerine bağlı olarak protein konsantrasyonu.

Örnek	Abs	Kons
Kontrol	0,9	5,09
1h	0,83	4,36
3h	0,85	4,55
6h	0,82	4,21
24 h	0,82	4,18

4.2.2 NF-kB alt birimlerinin western blot analizi ile karşılaştırılması

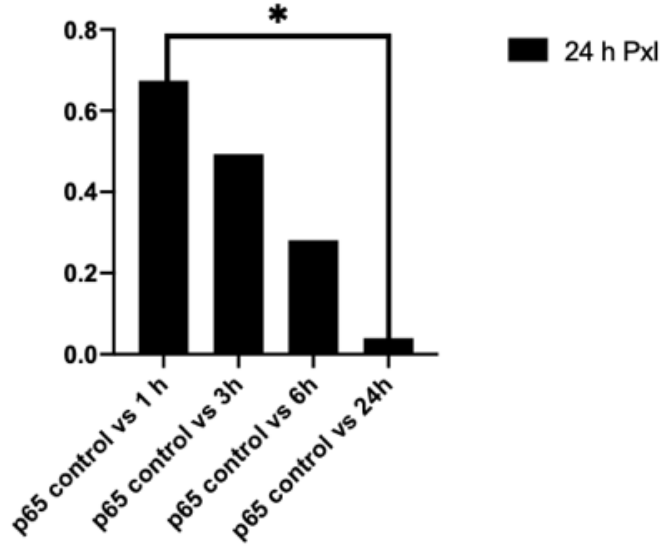
Westen blot yöntemi ile NF-kB sinyal yolağı için p65, p100-p52, p105-p50, RelB ve C-Rel alt birimlerine bakılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 : MDA-MB-231 hücrelerinde 1, 3, 6 ve 24 saat olarak uygulanan paklitaksele bağlı olarak NF-kB alt birimlerine ait Western Blot yöntemi sonuçları.

4.2.3 Paklitaksel uygulama süresinin karşılaştırılması

Yapılan analizler ile paklitaksel uygulamasının 24 saat uygulanması gerektiğine karar verilmiştir (Şekil 4.11).



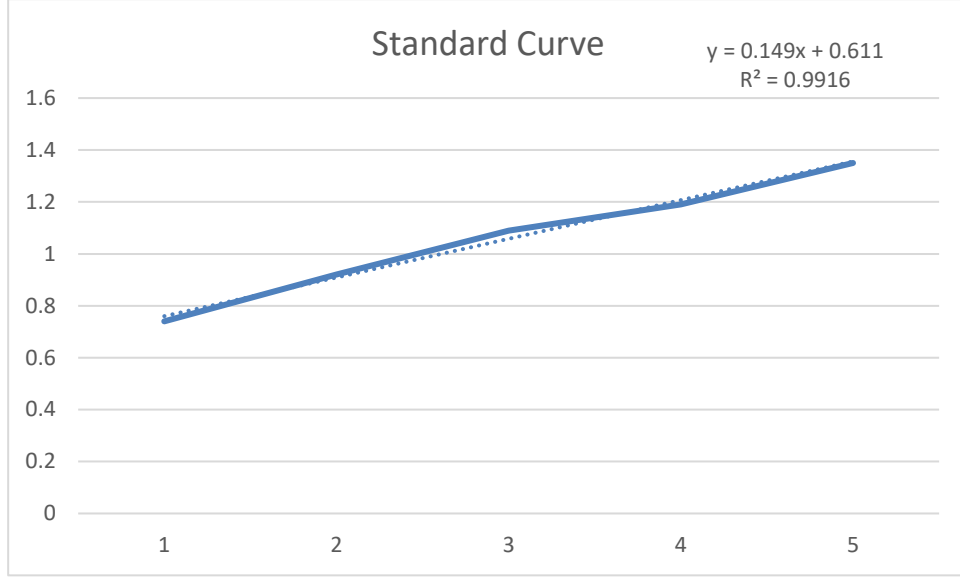
Şekil 4.11 : NF-kB ekspresyonu 24 saat paklitaksel uygulaması ile artış göstermiştir.

4.3 Paklitaksel uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu

Tablo 4.3, control ve 24 saat paklitaksel uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein miktarını göstermektedir. NF-kB alt birimlerinin analiz edilmesi için gerekli protein miktarı belirlendi ve western blot yöntemi için hazırlandı (Tablo 4.3 ve Şekil 4.12, Tablo 4.4).

Tablo 4.3 : Protein standartı olarak kullanılan BSA absorbansı.

BSA (μg)	Abs (nm)
1,5 μg	0,74
3 μg	0,92
4,5 μg	1,09
6 μg	1,19
7,5 μg	1,35



Şekil 4.12 : BSA standart proteini ile elde edilen standart eğri grafiği.

Tablo 4.4 : Bradford tayini ile absorbans değerine bağlı olarak protein konsantrasyonu.

Örnek	Abs	Kons
Kontrol-sitoplazmik	0,97	5,82
Kontrol-nükleer	0,67	2,60
24 h pxl-sitoplazmik	0,50	0,76
24 h pxl-nükleer	0,58	1,67

4.3.1 Paklitaksel ve nano formülasyon uygulaması ile sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonu

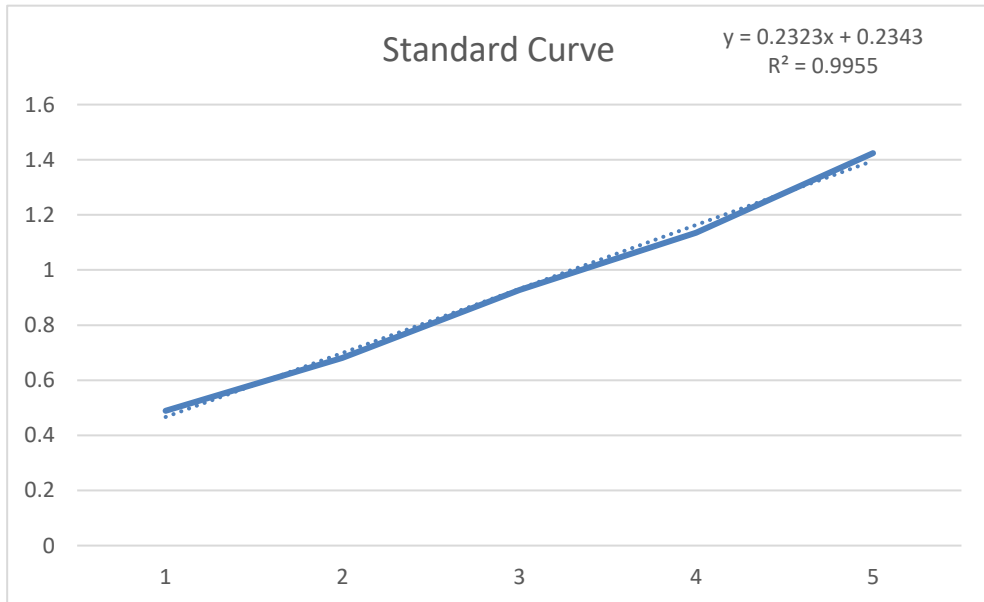
Kontrol ve 24 saat paklitaksel ile nano formülasyon uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein miktarını göstermektedir. NF-kB alt birimlerinin analiz edilmesi için gerekli protein miktarı belirlendi ve western blot yöntemi için hazırlandı.

4.3.2 Protein miktar tayini

Kontrol, 24 saat paklitaksel; kontrol 24 saat paklitaksel ile farklı oranlarda nano formülasyon uygulaması olarak uygulanan deney planı sonunda protein izolasyonu ve protein standartı ile miktar tayini gerçekleştirilerek western blot analizi gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.5, Şekil 4.13, Tablo 4.6).

Tablo 4.5 : Protein standartı olarak kullanılan BSA absorbansı.

BSA (μg)	Abs (nm)
1,5 μg	0,48
3 μg	0,68
4,5 μg	0,92
6 μg	1,13
7,5 μg	1,42



Şekil 4.13 : BSA standart proteini ile elde edilen standart eğri grafiği.

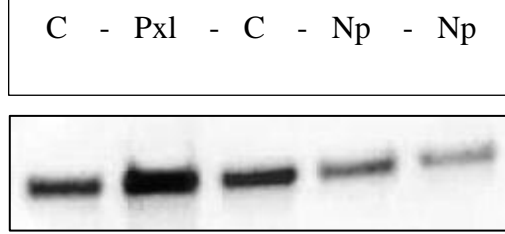
Tablo 4.6 : Bradford tayini ile absorbans değerine bağlı olarak protein konsantrasyonu.

Örnek	Abs	Kons
Kontrol-sitoplazmik	1,35	4,94
Kontrol-Nükleer	0,99	2,05
Mix 1-sitoplazmik	1,27	4,36
Mix 1-nükleer	0,90	1,31
Mix 2-sitoplazmik	1,28	4,44
Mix 2-nükleer	0,91	1,44

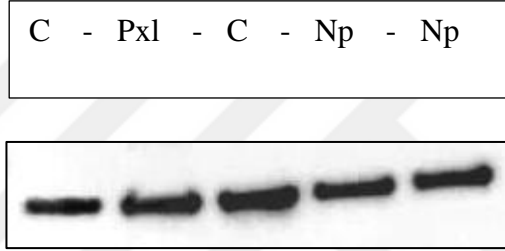
4.3.3 Western Blot

24 saat paklitaksel uygulanan hücre grubu ile 24 saat paklitaksel sonrasında nano formülasyon hücre grupları farklı zamanlarda nükleer sitoplazmik izolasyonları gerçekleştirildiğinden her iki grup kendi kontrolü ile kıyaslanmıştır. Elde edilen örnekler karşılaştırılması için Control, 24h paklitaksel; Control, 24 saat paklitaksel ve 20 ul nano formülasyon, 24 saat paklitaksel ve 100 µl nano formülasyonu sırası ile western blot yönteminde p65 primerine ait nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu analiz edilmiştir (Şekil 4.14)

a) Sitoplazmik protein



b) Nükleer protein

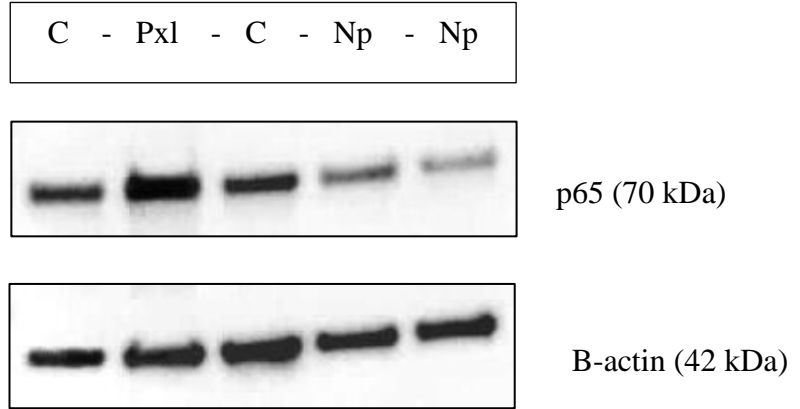


Şekil 4.14 : Sırasıyla; Control 24 saat paklitaksel Control, 20 µl NP, 100 µl NP uygulanan hücre gruplarında sitoplazmik ve nükleer proteinlerine ait p65 primerinin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi.

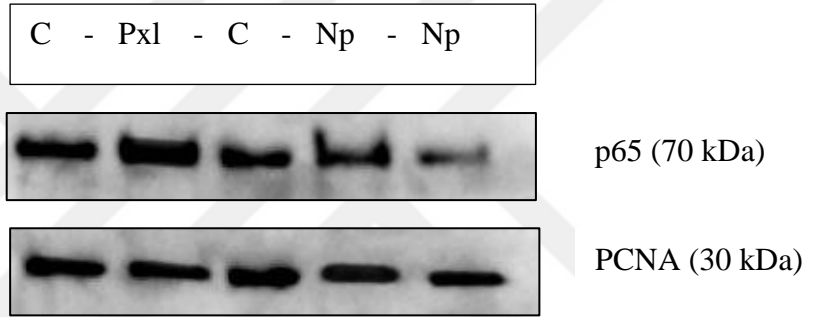
4.3.4 Grupların karşılaştırılması

MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat süre ile paklitaksel ve 72 saat kurkumin uygulandığında sitozolik fraksiyonlarda p65'in miktarının azaldığı gösterilmiştir. Bu veriler kurkuminin p65'in sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonunu inhibe ettiğini ve dolayısıyla NF-kB sinyal yolağını inaktive ettiğini göstermektedir (Şekil 4.15, Şekil 4.16).

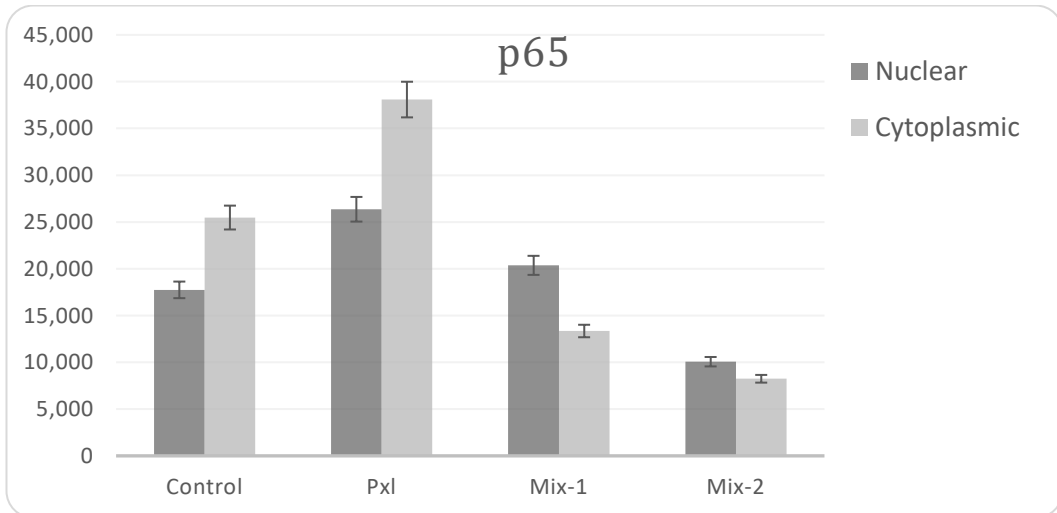
A.Sitoplazmik protein



B.Nükleer protein



Şekil 4.15 : MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saat paklitaksel ve 24 saat paklitaksel ile birlikte farklı oranda uygulanan nano formülasyona bağlı olarak NF-kB alt birimine ait Western Blot yöntemi sonuçları.



Şekil 4.16 : Western blot analizine ait kantitatif sonuçları.

Elde edilen sonuçlara göre sadece paklitaksel uygulamasına kıyasla nano formülasyon uyguladığımız grubun protein ekspresyonda azalma gözlemlenmiştir. Nano formülasyonumuz NF-kB sinyal yolağının alt birimi olan p53'ü başarıyla baskılayabildiğini göstermiştir.



5. SONUÇ

Kanser mekanizmasının anlaşılmasında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen kanser hâlâ dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden olmaya devam etmektedir. Günümüzde kanser tedavi yöntemleri için de önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Geleneksel sitotoksik kemoterapilerin tedavi yöntemi olarak tercih edilmesine rağmen son yıllarda bazı değişiklikler gözlemlenmiştir. Kanser hücreleri için daha seçici etkileyecek ve böylece normal hücrelerin etkilenmesini engelleyecek, yan etkiye sahip olmayan yeni ilaç tasarımı çalışmaları artış göstermektedir.

Tasarlanan nano partiküller arasında PLGA en sık kullanılan polimerik materyaldir. PLGA; fizyolojik ortamda inert, biyoparçalanabilir, biyoyumlu ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde FDA tarafından onaylanmış bir biyomateryaldir.

NF-kB sinyal yolağı sitoplazmada inaktif halde bulunmaktadır. P50, p65 alt birimleri ve inhibitör alt birim olarak p65'e bağlanan $\text{I}\kappa\text{B}$ ile üç alt birimden oluşmaktadır. $\text{I}\kappa\text{B}$ 'nin serbest bırakılması ile NF-kB dimerleri spesifik DNA dizilerine bağlanacağı çekirdeğe yerleşir. NkB sinyal mekanizması çoğunlukla tüm kanser tipinde görülmekle birlikte karmaşık bir süreçtir. NF-kB sinyal yolağının hücrelerde enflamasyon, hücre profileferasyonu, apoptoz gibi birçok önemli süreçte önemli rol oynadığı bilinmektedir. Kurkumin, NF-kB aktivitesini baskılayabilme özelliğine sahiptir.

Günümüzde anti kanser aktivitesi gösterilmiş, kanser tedavisindeki önleyici ve tedavi edici potansiyeli vurgulanan kurkumin nano formülasyonun NF-kB sinyal mekanizması için de aydınlatıcı olabileceği düşüncesiyle; PLGA- Kurkumin nano formülasyonun kanser hücrelerinde NF-kB alt birimleri düzeyi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Bu çalışma ile; nano ilaç taşıma sistemleri ile birlikte kurkuminin kanser hücreleri üzerindeki etkisinin artış gösterdiği, NF-kB alt birimleri kemoterapötik ajan

Paklitaksel tarafından artırılken; nano-kurkumin kullanılarak p65'in başarılı bir şekilde inhibe edildiğini göstermiştir.

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında yapılan bu araştırmalar doğrultusunda Kurkumin nano formülasyonunun sitotoksisite etkisi MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerinde in-vitro ortamda araştırılıp nano formülasyon ile etkin bir antikanser ajanı olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] **Ghosh, S., May, M. J. ve Kopp, E. B.** (1998). NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16(1), 225-260.
- [2] **Sen, R. ve Baltimore, D.** (2006). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences (Reprinted from Cell, vol 46, pg 705-716, 1986). *Journal of immunology*, 177(11), 7485-7496.
- [3] **Zhang, Q., Lenardo, M. J. ve Baltimore, D.** (2017). 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 168(1-2), 37-57.
- [4] **Karin, M. ve Greten, F. R.** (2005). NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews immunology*, 5(10), 749-759.
- [5] **Staudt, L. M.** (2010). Oncogenic activation of NF- κ B. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6), a000109.
- [6] **Ben-Neriah, Y. ve Karin, M.** (2011). Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature immunology*, 12(8), 715-723.
- [7] **Hayden, M. ve Ghosh, S.** (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 8, 837-848.
- [8] **Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A., ve ark.** (1999). Curcumin blocks cytokine-mediated NF- κ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- κ B kinase activity. *The Journal of Immunology*, 163(6), 3474-3483.
- [9] **Verzella, D., Pescatore, A., Capece, D., Vecchiotti, D., Ursini, M. V., Franzoso, G., ve ark.** (2020). Life, death, and autophagy in cancer: NF- κ B turns up everywhere. *Cell Death & Disease*, 11(3), 1-14.
- [10] **Sha, W. C.** (1998). Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor. *The Journal of experimental medicine*, 187(2), 143-146.
- [11] **Baeuerle, P. A. ve Baltimore, D.** (1996). NF- κ B: ten years after. *Cell*, 87(1), 13-20.
- [12] **Baldwin Jr, A. S.** (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, 14(1), 649-681.
- [13] **Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D. ve Miyamoto, S.** (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & development*, 9(22), 2723-2735.
- [14] **Singh, S. ve Aggarwal, B. B.** (1995). Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24995-25000.

- [15] **Plummer, S. M., Holloway, K. A., Manson, M. M., Munks, R. J., Kaptein, A., Farrow, S., ve ark.** (1999). Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF- κ B activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*, 18(44), 6013.
- [16] **Bharti, A. C., Donato, N., Singh, S. ve Aggarwal, B. B.** (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood*, 101(3), 1053-1062.
- [17] **Shishodia, S., Amin, H. M., Lai, R. ve Aggarwal, B. B.** (2005). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- κ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochemical pharmacology*, 70(5), 700-713.
- [18] **Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y., Sandur, S. K., Shishodia, S. ve Aggarwal, B. B.** (2006). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and Akt activation. *Molecular pharmacology*, 69(1), 195-206.
- [19] **Mackenzie, G. G., Queisser, N., Wolfson, M. L., Fraga, C. G., Adamo, A. M. ve Oteiza, P. I.** (2008). Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF- κ B and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. *Int J Cancer*, 123, 56-65.
- [20] **Dean, M.** (1998). Cancer as a complex developmental disorder—nineteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer research*, 58(24), 5633-5636.
- [21] **Mocellin, S.** (2007). *Microarray technology and cancer gene profiling*. Springer Science & Business Media.
- [22] **Solomon, E., Borrow, J. ve Goddard, A. D.** (1991). Chromosome aberrations and cancer. *Science*, 254(5035), 1153-1160.
- [23] **Hanahan, D. ve Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- [24] **Bardeesy, N. ve Sharpless, N. E.** (2006). RAS unplugged: negative feedback and oncogene-induced senescence. *Cancer cell*, 10(6), 451-453.
- [25] **Ringshausen, I., Peschel, C. ve Decker, T.** (2006). Cell cycle inhibition in malignant lymphoma: disease control by attacking the cellular proliferation machinery. *Current drug targets*, 7(10), 1349-1359.
- [26] **Sherr, C. J.** (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2), 235-246.
- [27] **Teng, M. W., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. ve Smyth, M. J.** (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of leukocyte biology*, 84(4), 988-993.
- [28] **Prendergast, G.** (2008). Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene*, 27(28), 3889.
- [29] **Blasco, M. A.** (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611.

- [30] **Nguyen, D. X., Bos, P. D. ve Massagué, J.** (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 274.
- [31] **Joyce, J. A. ve Pollard, J. W.** (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews cancer*, 9(4), 239.
- [32] **Artandi, S. E. ve DePinho, R. A.** (2009). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9-18.
- [33] **Poste, G. ve Fidler, I. J.** (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283(5743), 139.
- [34] **Meyer, T. ve Hart, I.** (1998). Mechanisms of tumour metastasis. *European journal of cancer*, 34(2), 214-221.
- [35] **Folkman, J. ve Klagsbrun, M.** (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235(4787), 442-447.
- [36] **Hicklin, D. J. ve Ellis, L. M.** (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology*, 23(5), 1011-1027.
- [37] **Bergers, G. ve Benjamin, L. E.** (2003). Angiogenesis: tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401.
- [38] **Venkitaraman, A. R.** (2001). Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *Journal of cell science*, 114(20), 3591-3598.
- [39] **Broertjes, J.** (2015). The Ten Hallmarks of Cancer in Cutaneous Malignant Melanoma.
- [40] **Marie, S. K. N. ve Shinjo, S. M. O.** (2011). Metabolism and brain cancer. *Clinics*, 66, 33-43.
- [41] **Grivennikov, S. I. ve Karin, M.** (2010). Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current opinion in genetics & development*, 20(1), 65-71.
- [42] **Ferrari, M.** (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews cancer*, 5(3), 161.
- [43] **Paul, D. R. ve Robeson, L. M.** (2008). Polymer nanotechnology: nanocomposites. *Polymer*, 49(15), 3187-3204.
- [44] **Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. ve Langer, R.** (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), 751.
- [45] **Rotello, V. M.** (2009). Sniffing out cancer using “chemical nose” sensors. Taylor & Francis; s.
- [46] **Navya, P., Kaphle, A., Srinivas, S., Bhargava, S. K., Rotello, V. M. ve Daima, H. K.** (2019). Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano convergence*, 6(1), 23.
- [47] **Brannon-Peppas, L. ve Blanchette, J. O.** (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 56(11), 1649-1659.

- [48] **Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H. ve Car, H.** (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports*, 64(5), 1020-1037.
- [49] **Du, W. ve Elemento, O.** (2015). Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies. *Oncogene*, 34(25), 3215.
- [50] **Dağlıoğlu, C.** İlaç Taşıma Sistemleri olarak Nanopartiküller kullanılarak Pasif ve Aktif Tümör Hedeflemelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi. *Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 6(1), 1-7.
- [51] **Matsumura, Y. ve Maeda, H.** (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 46(12 Part 1), 6387-6392.
- [52] **Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. ve Farokhzad, O. C.** (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*, 66, 2-25.
- [53] **Santos Giuberti, C. d., de Oliveira Reis, E. C., Ribeiro Rocha, T. G., Leite, E. A., Lacerda, R. G., Ramaldes, G. A., ve ark.** (2011). Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. *Journal of liposome research*, 21(1), 60-69.
- [54] **Immordino, M. L., Dosio, F. ve Cattell, L.** (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*, 1(3), 297.
- [55] **Torchilin, V. P.** (2002). PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Advanced drug delivery reviews*, 54(2), 235-252.
- [56] **Kukowska-Latallo, J. F., Candido, K. A., Cao, Z., Nigavekar, S. S., Majoros, I. J., Thomas, T. P., ve ark.** (2005). Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer research*, 65(12), 5317-5324.
- [57] **Belloq, N. C., Pun, S. H., Jensen, G. S. ve Davis, M. E.** (2003). Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjugate chemistry*, 14(6), 1122-1132.
- [58] **Betancourt, T., Brown, B. ve Brannon-Peppas, L.** (2007). Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation.
- [59] **Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E. ve Gao, J.** (2007). Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceutical research*, 24(6), 1029-1046.
- [60] **Veronese, F. M. ve Pasut, G.** (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug discovery today*, 10(21), 1451-1458.
- [61] **Montet, X., Montet-Abou, K., Reynolds, F., Weissleder, R. ve Josephson, L.** (2006). Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells. *Neoplasia*, 8(3), 214-222.

- [62] **Flenniken, M. L., Liepold, L. O., Crowley, B. E., Willits, D. A., Young, M. J. ve Douglas, T.** (2005). Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture. *Chemical Communications*, (4), 447-449.
- [63] **Lowery, A. R., Gobin, A. M., Day, E. S., Halas, N. J. ve West, J. L.** (2006). Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells. *International journal of nanomedicine*, 1(2), 149.
- [64] **Kam, N. W. S., O'Connell, M., Wisdom, J. A. ve Dai, H.** (2005). Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), 11600-11605.
- [65] **Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J. ve Veiga, F.** (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.
- [66] **Panyam, J. ve Labhasetwar, V.** (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*, 55(3), 329-347.
- [67] **Kumari, A., Yadav, S. K. ve Yadav, S. C.** (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- [68] **Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. ve Rudzinski, W. E.** (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*, 70(1-2), 1-20.
- [69] **Bittner, B., Ronneberger, B., Zange, R., Volland, C., Anderson, J. ve Kissel, T.** (1998). Bovine serum albumin loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres: the influence of polymer purity on particle characteristics. *Journal of microencapsulation*, 15(4), 495-514.
- [70] **Carrasquillo, K. G., Stanley, A. M., Aponte-Carro, J. C., De Jesús, P., Costantino, H. R., Bosques, C. J., ve ark.** (2001). Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly (lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein. *Journal of Controlled Release*, 76(3), 199-208.
- [71] **Johansen, P., Men, Y., Audran, R., Corradin, G., Merkle, H. P. ve Gander, B.** (1998). Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives. *Pharmaceutical research*, 15(7), 1103-1110.
- [72] **RaviKumar, M., Mohapatra, S., Kong, X., Jena, P., Bakowsky, U. ve Lehrd, C.-M.** (2004). Cationic poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as efficient in vivo gene transfection agents. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 4(8), 990-994.
- [73] **Mittal, G., Sahana, D., Bhardwaj, V. ve Kumar, M. R.** (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 119(1), 77-85.

- [74] **You, W. ve Henneberg, M.** (2018). Cancer incidence increasing globally: the role of relaxed natural selection. *Evolutionary applications*, 11(2), 140-152.
- [75] **Naidu, M. U. R., Ramana, G. V., Rani, P. U., Mohan, I. K., Suman, A. ve Roy, P.** (2004). Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis—complicating the treatment of cancer. *Neoplasia (New York, NY)*, 6(5), 423.
- [76] **Muro, S.** (2012). Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 125-137.
- [77] **Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. ve Gottesman, M. M.** (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 5(3), 219.
- [78] **Ling, V.** (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 40(1), S3-S8.
- [79] **Mohapatra, S., Ranjan, S., Dasgupta, N., Kumar, R. ve Thomas, S.** (2018). *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*. Elsevier.
- [80] **Hu, C.-M. J. ve Zhang, L.** (2009). Therapeutic nanoparticles to combat cancer drug resistance. *Current drug metabolism*, 10(8), 836-841.
- [81] **Dong, X. ve Mumper, R. J.** (2010). Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. *Nanomedicine*, 5(4), 597-615.
- [82] **Sadava, D., Coleman, A. ve Kane, S. E.** (2002). Liposomal daunorubicin overcomes drug resistance in human breast, ovarian and lung carcinoma cells. *Journal of liposome research*, 12(4), 301-309.
- [83] **Mayer, L. D. ve Shabbits, J. A.** (2001). The role for liposomal drug delivery in molecular and pharmacological strategies to overcome multidrug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 20(1-2), 87-93.
- [84] **Meng, H., Liang, M., Xia, T., Li, Z., Ji, Z., Zink, J. I., ve ark.** (2010). Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver doxorubicin and P-glycoprotein siRNA to overcome drug resistance in a cancer cell line. *ACS nano*, 4(8), 4539-4550.
- [85] **Sun, T.-M., Du, J.-Z., Yao, Y.-D., Mao, C.-Q., Dou, S., Huang, S.-Y., ve ark.** (2011). Simultaneous delivery of siRNA and paclitaxel via a “two-in-one” micelleplex promotes synergistic tumor suppression. *ACS nano*, 5(2), 1483-1494.
- [86] **Logashenko, E., Vladimirova, A., Repkova, M., Venyaminova, A., Chernolovskaya, E. ve Vlassov, V.** (2004). Silencing of MDR 1 gene in cancer cells by siRNA. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 23(6-7), 861-866.
- [87] **Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M. ve Roberts, K.** (2008). *Molecular cell biology*. New York: Garland Science.
- [88] **Doğan, A. L. ve Güç, D.** (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Acta Medica*, 35(1), 34-42.

- [89] **Beg, A. A. ve Baldwin, A.** (1993). The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & development*, 7(11), 2064-2070.
- [90] **Grilli, M., Chiu, J. J.-S. ve Lenardo, M. J.** (1993). IMF-κB and rel: Participants in a multiform transcriptional regulatory system. *International review of cytology* Cilt 143, ss. 1-62): Elsevier.
- [91] **Baeuerle, P. A. ve Baltimore, D.** (1988). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-κB transcription factor. *Cell*, 53(2), 211-217.
- [92] **Hayden, M., West, A. ve Ghosh, S.** (2006). NF-κB and the immune response. *Oncogene*, 25(51), 6758.
- [93] **Ghosh, S. ve Hayden, M. S.** (2008). New regulators of NF-κB in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 8(11), 837.
- [94] **Liao, F., Andalibi, A., deBeer, F. C., Fogelman, A. M. ve Lulis, A. J.** (1993). Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *The Journal of clinical investigation*, 91(6), 2572-2579.
- [95] **Eck, S. L., Perkins, N. D., Carr, D. P. ve Nabel, G. J.** (1993). Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa B in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), 6530-6536.
- [96] **Alcamo, E., Mizgerd, J. P., Horwitz, B. H., Bronson, R., Beg, A. A., Scott, M., ve ark.** (2001). Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-κB in leukocyte recruitment. *The Journal of Immunology*, 167(3), 1592-1600.
- [97] **Ward, C., Chilvers, E. R., Lawson, M. F., Pryde, J. G., Fujihara, S., Farrow, S. N., ve ark.** (1999). NF-κB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4309-4318.
- [98] **Poligone, B. ve Baldwin, A. S.** (2001). Positive and Negative Regulation of NF-κB by COX-2 ROLES OF DIFFERENT PROSTAGLANDINS. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38658-38664.
- [99] **Catley, M. C., Chivers, J. E., Cambridge, L. M., Holden, N., Slater, D. M., Staples, K. J., ve ark.** (2003). IL-1β-dependent activation of NF-κB mediates PGE2 release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS letters*, 547(1-3), 75-79.
- [100] **Vincenti, M. P., Coon, C. I. ve Brinckerhoff, C. E.** (1998). Nuclear factor κB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1β-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 41(11), 1987-1994.
- [101] **Vincenti, M. P. ve Brinckerhoff, C. E.** (2002). Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis research & therapy*, 4(3), 1-8.
- [102] **Lai, W.-C., Zhou, M., Shankavaram, U., Peng, G. ve Wahl, L. M.** (2003). Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix

metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Immunology*, 170(12), 6244-6249.

- [103] **Hoffmann, A., Natoli, G. ve Ghosh, G.** (2006). Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene*, 25(51), 6706.
- [104] **Mebius, R. E.** (2003). Organogenesis of lymphoid tissues. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 292.
- [105] **Bonizzi, G. ve Karin, M.** (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*, 25(6), 280-288.
- [106] **Lin, X. ve Wang, D.** (2004) editör^editörler. The roles of CARMA1, Bcl10, and MALT1 in antigen receptor signaling. *Seminars in immunology*; 2004: Elsevier; Published.
- [107] **Siebenlist, U., Brown, K. ve Claudio, E.** (2005). Control of lymphocyte development by nuclear factor- κ B. *Nature Reviews Immunology*, 5(6), 435.
- [108] **Akira, S., Uematsu, S. ve Takeuchi, O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- [109] **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. ve Janeway Jr, C. A.** (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394.
- [110] **Carrasco, D., Weih, F. ve Bravo, R.** (1994). Developmental expression of the mouse c-rel proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development*, 120(10), 2991-3004.
- [111] **Dei Cas, M. ve Ghidoni, R.** (2019). Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential. *Nutrients*, 11(9), 2147.
- [112] **Priyadarsini, K. I.** (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091-20112.
- [113] **Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I. M., Chin, D., Wagner, A. E. ve Rimbach, G.** (2012). Curcumin—from molecule to biological function. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(22), 5308-5332.
- [114] **Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F. ve Walters, M. A.** (2017). The essential medicinal chemistry of curcumin: miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 60(5), 1620-1637.
- [115] **Salehi, B., Stojanović-Radić, Z., Matejić, J., Sharifi-Rad, M., Kumar, N. V. A., Martins, N., ve ark.** (2018). The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. *European journal of medicinal chemistry*.
- [116] **Rajasingh, J., Raikwar, H. P., Muthian, G., Johnson, C. ve Bright, J. J.** (2006). Curcumin induces growth-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active JAK–STAT pathway in T cell leukemia. *Biochemical and biophysical research communications*, 340(2), 359-368.
- [117] **Marquardt, J. U., Gomez-Quiroz, L., Camacho, L. O. A., Pinna, F., Lee, Y.-H., Kitade, M., ve ark.** (2015). Curcumin effectively inhibits oncogenic NF- κ B signaling and restrains stemness features in liver cancer. *Journal of hepatology*, 63(3), 661-669.

- [118] **Thacker, P. C. ve Karunagaran, D.** (2015). Curcumin and emodin down-regulate TGF- β signaling pathway in human cervical cancer cells. *PLoS One*, 10(3), e0120045.
- [119] **Li, R., Wang, Y., Liu, Y., Chen, Q., Fu, W., Wang, H., ve ark.** (2013). Curcumin inhibits transforming growth factor- β 1-induced EMT via PPAR γ pathway, not Smad pathway in renal tubular epithelial cells. *PloS one*, 8(3), e58848.
- [120] **Lin, J., Huo, X. ve Liu, X.** (2017). "mTOR Signaling Pathway": A Potential Target of Curcumin in the Treatment of Spinal Cord Injury. *BioMed research international*, 2017.
- [121] **Ghoneim, A. I., Abdel-Naim, A. B., Khalifa, A. E. ve El-Denshary, E. S.** (2002). Protective effects of curcumin against ischaemia/reperfusion insult in rat forebrain. *Pharmacological research*, 46(3), 273-279.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Şeyma BULUT
Doğum Tarihi ve Yeri : 07/07/1997 Bingöl
E-posta : seybulut@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Demirođlu Bilim Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Bulut Ş., Obakan Yerlikaya P., Babalı Balibey F., Hacıosmanoğlu E., Bahadori F.
"The Effects of PLGA-Curcumin Nano-formulation on the Levels of Nf Kappa B Sub-Units in Cancer Cell Lines", *International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry* , Ankara, Turkey, December 16-18, 2020.