

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KURKUMİN YÜKLÜ PLGA - DSPE HİBRİT NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO*
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Fatmanur BABALI BALIBEY

(185314003)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

OCAK 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 183514003 numaralı Doktora Öğrencisi Fatmanur BABALI BALIBEY, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KURKUMİN YÜKLÜ PLGA-DSPE HİBRİT NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT.....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL.....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Fahri AKBAŞ.....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ.....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Eray Metin GÜLER.....
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Teslim Tarihi : 15 Ocak 2024
Savunma Tarihi : 15 Aralık 2023

ÖNSÖZ

Sonsuz desteği ve sabırlı bir eğitmen olduğu için tez danışmanım Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e ve tezin kurgulanmasında en büyük katkıları sağlayan Doç Dr. Fatemeh BAHADORİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hesaplamalı analizleri ile çalışmamıza değer katan saygıdeğer jüri üyemiz Prof. Dr. Adem TEKİN ve kıymetli asistanları Cem ORAN ve Feraye Hatice CANBAZ'a teşekkür ederim. En değerli hazine olan bilgisini paylaşan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Gamze ERĐİN KIZILÇAY ile uzun ve yorucu deneylerde beni yalnız bırakmayan Öğr. Gör. Ebru KANIMDAN'a teşekkür ederim. Ayrıca tezi hazırlamamda vermiş olduğu katkı ve destekten ötürü değerli jüri üyemiz Prof. Dr. Binnur TEMEL'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 20201206 numaralı proje ile destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız ekip arkadaşlarım Zeynep ÖZMAN, Ezgi DURMUŞ, Öznur YAŐAR ve yardımları için sevgili hocam Vildan Betül YENİĞÜN'e

Her ihtiyacım olduğunda moral ve destek veren kıymetli arkadaşlarım, akademik yoldaşlarım Zehra ŐEKER ve Hümeýra Őahin BEKTAY'a,

Yaptığım içi başından sonuna kadar büyük bir heyecanla takip eden ve destekleyen yirmi beş yaşından sonra sahip olduğum aileme,

İlk gençlik çağlarımdan beri beni inanarak destekleyen, onlara sahip olduğum için ne kadar şanslı olduğumu bildiğim sevgili annem Nimet BABALI ve kardeşlerim Zeynep, Ayşegül ve Yusuf'a teşekkür ederim.

Doğumundan itibaren bu yolda hep bir adım uzağımda olan gözümün nuru canım oğlum Asım BALİBEY ve her umutsuzluğumda beni tekrar ayağa kaldıran hayat yoldaşım Ahmet Bilal BALİBEY'e varlıkları için sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Ocak 2024

Fatmanur BABALI BALİBEY
(Eczacı)

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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

İMZA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	7
1.2 Tez Araştırmasının Amaçları	8
1.3 Literatür Araştırması	9
2 GENEL BİLGİLER	11
2.1 Kanserleşme ve Tümör Oluşumuna Genel Bakış.....	11
2.1.1 Hücre döngüsü bozulması.....	12
2.1.2 Kanser ve apoptotik sinyal yolları	13
2.1.3 Oksidatif stres ve kanser	15
2.1.4 Kanser direnç mekanizmaları	16
2.1.5 Kanserde hedefli tedaviler	17
2.2 Kolon ve Rektum (Kolorektal) Kanserleri	17
2.2.1 Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi, Etyolojisi ve Risk Faktörleri	17
2.2.2 Kolorektal kanser mekanizması / patofizyolojisi.....	19
2.2.3 Kolorektal kanserde teşhis ve tedavi	20
2.3 Kolorektal Kanser 5-Fluorourasil (5-FU) ile Tedavisi.....	21
2.3.1 Kemoterapi ajanı 5-FU'nun etki mekanizması.....	21
2.3.2 5-FU tedavisinin yan etkileri	22
2.3.3 5-FU ve ilaç direnci	22
2.4 Kanserde Bitkisel Tedavi	23
2.4.1 Anti kanser etken madde olarak kurkumin	24
2.5 Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler	31
2.5.1 Nanopartikül avantajları	33
2.5.2 Nanopartikül türleri.....	34
2.5.3 Polimer lipid hibrit nanopartiküller	37
2.5.4 Nano taşıyıcılarda kullanılan polimer ve lipitler	38
2.5.5 Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin hesaplamalı tasarımı	40
2.5.6 Nanopartikül enkapsülasyon etkinliğinin artırılması.....	40
3 GEREÇ VE YÖNTEM	42

3.1	Kullanılan cihazlar	42
3.2	Kullanılan kimyasallar	42
3.3	Hazırlanan çözeltiler.....	43
3.4	Yöntem	44
3.4.1	Kurkumin miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirilmesi	44
3.4.2	Nanopartikül hazırlanması ve karakterizasyonu.....	45
3.4.3	Hesaplamalı moleküler modelleme	54
3.4.4	<i>In Vitro</i> hücre kültürü çalışmaları	56
3.4.5	İstatiksel Analiz	66
4	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	67
4.1	Kurkumin Yüklü PLGA-DSPE Hibrit Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	67
4.1.1	Kurkumin yüklü ve boş hibrit nanopartikül ön çalışmaları	67
4.1.2	Optimize formülasyona ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli sonuçları 82	
4.1.3	Kurkumin'in NP içerisindeki çözünürlüğü.....	85
4.1.4	Kritik misel konsantrasyonu (KMK)	86
4.1.5	Formülasyona yüklenen kurkumin miktar tayini.....	87
4.1.6	Formülasyon enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme yüzdesi.....	90
4.1.7	Optimize formülasyonun stabilite sonuçları	91
4.1.8	Formülasyondan kurkumin salım sonuçları.....	97
4.1.9	Formülasyonun yapısal karakterizasyonu.....	98
4.2	Bilgisayar Destekli Modelleme Çalışmaları.....	108
4.2.1	Kuantum kimyası (QC) küme modelleri	109
4.2.2	Periyodik DFTB+ hesaplama sonuçları	113
4.3	Hücre Kültürü Çalışmaları	117
4.3.1	Hücre morfolojisi ve biyoluminesans görüntülenmesi	118
4.3.2	Hücre canlılığının belirlenmesi.....	119
4.3.3	Nano formülasyonların apoptoz üzerine etkisi	127
4.3.4	Western blot ile protein ekspresyonlarının hesaplanması.....	134
4.3.5	Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) kombine tedavi ile artışı.....	138
4.3.6	Nanopartiküllerin hücre içine giriş üzerine etkisi.....	141
5	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	145
	KAYNAKLAR	149
	ÖZGEÇMİŞ.....	161

KISALTMALAR

% EE	: Yüzde enkapsülasyon etkinliği
5-FU	: 5-Fluorourasil
AO/EB	: Akridin Oranj/Etidyum Bromide
Bax	: Bcl-2 ilişkili X protein
Bcl-2	: B-hücre lenfoma 2 protein
BSA	: Sığır serum albümini
CMC	: Kritik misel konsantrasyonu
CO₂	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz
EMT	: Epitelyal – Mezenkimal geçiş
FdUMP	: 5-florodeoksiüridin monofosfat
FdUTP	: Fluorodeoksiüridin trifosfat
FOLFİRİ	: Folik asit, fluorourasil ve irinotekan kombinasyon protokolü
FOLFOX	: Oksaplatin, fluorourasil ve irinotekan kombinasyon protokolü
IFN	: İnterferon
IGF	: İnsülin benzeri büyüme hormonu
IKKβ	: Nükleer faktör kappa-B kinaz
IVIS	: In vivo görüntüleme sistemi
TS	: Timidilat sentaz
DDS	: Drug delivery system (İlaç Taşıyıcı Sistem)
DFTB+	: Yoğunluk fonksiyonel tabanlı sıkı bağlama modeli
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DSPE	: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
ECL	: Hassas kemilüminesans görüntüleme
EDTA	: Etilendiamine tetraasetik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EPR	: Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkınma Etkisi
FBS	: Fetal bovin serumu
FDA	: Food and Drug Association (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FT-IR	: Fourier-Dönüşümlü Kızıl Ötesi
IC₅₀	: Canlı hücre sayısını yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
ICRA	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Örgütü
i.v.	: intravenöz (damar içi)
KASPAZ	: Sistein aspartil-spesifik proteazlar
LOD	: Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection)
LOQ	: Tayin sınırı (Limit of Quantification)
MEM	: Modifiye eagle besiyeri
MD	: Moleküler dinamik simülasyonları
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NDDS	: Nano-İlaç Taşıyıcı Sistem

NF-κB	: Nükleer faktör kappa-B
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PEG	: Poli etilen glikol
PdI	: Polydispersity index
PFA	: Paraformaldehit
PGA	: Poli glikolik asit
PLA	: Poli laktik asit
PLGA	: Poli (<i>laktik-ko-glikolik</i> asit)
QM	: Kuantum mekanik küme modelleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RSD	: Bağlı standart sapma
SD	: Standart Sapma
TEM	: Transmission Electron Microscopy
Z avg	: Average hydrodynamic diameter
β-ME	: β-merkaptoetanol

SEMBOLLER

C°	: Celcius
g	: Gram
h	: Saat
mg	: Mili grams
mL	: Mili liter
nm:	: Nanometre
rpm:	: (round per minute)
MW:	: Molekül ağırlığı
β	:Beta
μL:	: Mikrolitre
μM:	: Mikromolar
ζ:	: Zeta potansiyel
μg:	: Mikrogram
V:	: Volt
t:	: Zaman

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: KK'de onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde görülen bazı tekrarlayan somatik mutasyonlar [80].....	20
Tablo 3.1: Kullanılan hücre hatlarının genel özellikleri.	57
Tablo 4.1: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemine ısı uygulaması eklenerek hazırlanan CurPD2 ait boyut dağılımı sonuçları, Formülasyondaki lipid miktarının PDI ve partikül boyutu dağılımına etkisi.	74
Tablo 4.2: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan PD3 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.	77
Tablo 4.3: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD3 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.	77
Tablo 4.4: PD4 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.	80
Tablo 4.5: CurPD4 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.	80
Tablo 4.6: Optimize nano formülasyona ait hazırlanma koşulları.	84
Tablo 4.7: Taze hazırlanan PD4 ve CurPD4 formülasyonlarının zamana bağlı sayıca % boyut ve PDI değerleri.	91
Tablo 4.8: Şekil 4.27'de gösterilen yönelimler için hesaplanan CP-düzeltilmiş ve CP-düzeltilmemiş etkileşim enerjileri (kJ/mol).	112
Tablo 4.9: 5-FU ve serbest kurkumin'in IC50 değerleri.	122
Tablo 4.10: LoVo-Luc hücrelerinden ekstrakte edilen kontrol ve tedavi gruplarına ait protein konsantrasyonları.	135
Tablo 4.11: Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.	136

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kanserin ayırt edici karakteristik özellikleri [39, 40].....	11
Şekil 2.2: 2020 verilerine göre en yaygın görülen 10 kanser türünde vaka ve ölüm oranlarının dağılımı [46].	18
Şekil 2.3: Zerdeçal bitkisi a) Zerdeçal bitkisine ait rizom ve toz formu b) Kurkumin etken maddesinin kimyasal yapısı, keto ve enol formları c) Kurkuminoidler; demetoksikurkumin (DMC) ve Bisdemetoksikurkumin (BDMC) molekülleri [95].....	25
Şekil 2.4: Kurkumin bileşiğine ait genel farmakolojik ve terapötik etkinlikler.	26
Şekil 2.5: Kombine kurkumin ve kemoterapi ilaçlarının etki mekanizmaları [8].	28
Şekil 2.6: Sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki farka bağlı olarak NP'lerin kanser hücrelerine pasif veya aktif hedeflenmesi [124].	32
Şekil 2.7: İlaç taşımada sıklıkla kullanılan nanopartikül türleri [123].	35
Şekil 2.8: Polimerik misel yapısını oluşturan unimerler ve blok-ko-polimer misellerin kendiliğinden bir araya gelme modeli [125], [148].	39
Şekil 3.1: Mobil faz içerisinde kurkuminin maksimum absorpsiyon değeri.	45
Şekil 3.2: Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD4 nanopartikül hazırlanma basamakları (BioRender, https://biorender.com/ ile oluşturulmuştur.).	48
Şekil 3.3: Liyofilize edilmiş optimize formülasyona ait fotoğraf.....	52
Şekil 3.4: Salım deneylerinde kullanılan Amicon® Ultra-15 filter units santrifüj tüpü.	53
Şekil 3.5: MTT boyası ve renkli formazan ürününün yapıları [154].....	59
Şekil 3.6: AO/EB deneyindeki canlı, erken /geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin özellikleri.	62
Şekil 3.7: Anneksin V-FITC / PI analizinin çalışma prensibi [159].....	63
Şekil 4.1: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemi ile hazırlanan PLGA – kurkumin NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.	69
Şekil 4.2: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemi ile hazırlanan PLGA-DSPE-kurkumin hibrit NP'e (CurPD1) ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.	70
Şekil 4.3: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemine ısı uygulaması eklenerek hazırlanan boş PLGA-DSPE hibrit NP'e (PD2) ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.....	72
Şekil 4.4: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemine ısı uygulaması eklenerek hazırlanan PLGA-DSPE-kurkumin hibrit NP'e (CurPD2) ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.	73
Şekil 4.5: DSPE miktarındaki artışla birlikte hazırlanan formülasyonun boyut dağılımı ve PDI değerlerinin değişimi.	75
Şekil 4.6: Rotary evaporatör ile 125 mmHg vakum altında 50 °C'de ve 150 rpm'de kloroformun uçurulması ile elde edilen a) DSPE ve b) DSPE-kurkumin film tabakası.....	76

Şekil 4.7: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan boş PD3 hibrit NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.....	78
Şekil 4.8: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD3 NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.....	79
Şekil 4.9: Film oluşturma / NP ile rehidrate etme yöntemi ile hazırlanan boş PD4 NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.....	81
Şekil 4.10: Film oluşturma/ NP ile rehidrate etme yöntemi ile hazırlanan 5 mg kurkumin yüklü CurPD4 NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.....	82
Şekil 4.11: Optimize nano formülasyona (CurPD4) ait % boyut dağılımı sonuçları ve zeta potansiyeli sonucu.....	85
Şekil 4.12: Nano enkapsülasyon ile kurkumin sulu ortamda tamamen dağılırken serbest kurkumin çok az çözünür ve gözle görülebilen parçacıklar oluşturur.....	86
Şekil 4.13: PD4 NP'e ait kritik misel konsantrasyonu değerinin hesaplanması için kullanılan konsantrasyon-emisyon oranı diyagramı.....	87
Şekil 4.14: Serbest kurkumine ait ölçü eğrisi denklemi.....	88
Şekil 4.15: a) CurPD4 NP, b) Boş PD4 NP ve c) mobil faza ait HPLC kromatogram sonuçları.....	89
Tablo 4.7: Taze hazırlanan PD4 ve CurPD4 formülasyonlarının zamana bağlı sayıca % boyut ve PDI değerleri.....	91
Şekil 4.17: Optimize nano formülasyonun taze ve liyofilizasyon sonrası sulandırılmış haline ait görseller.....	94
Şekil 4.18: CurPD4 NP'lerin 4 °C ve 25 °C'de 60 gün saklama süresince a) fiziksel görünümü, b) PDI değeri ve sayıca % boyut dağılımı sonuçları.....	95
Şekil 4.19: Besi yeri içerisinde dilüe edilmiş CurPD4 NP'e ait 24, 48 ve 72 saatlik boyut dağılımı sonuçları.....	96
Şekil 4.20: CurPD4 NP ve Kurkumin yüklü PLGA NP'lere ait (a) % salım grafiği, (b) sıfırıncı derece, (c) birinci derece, (d) Hixson Crowell modeli ve (e) Korsmeyer-Peppas modeli salım profilleri.....	99
Şekil 4.21: Kurkumin (a), DSPE (b) ve PLGA polimerine (c) ait FT-IR spektrumu sonuçları.....	101
Şekil 4.22: Nano formülasyonlara ait FT-IR spektroskopisi sonuçları; a) BoşPD3, b) CurPD3, c) BoşPD4, d) CurPD4.....	102
Şekil 4.23: PLGA, kurkumin ve kurkumin yüklü NP'e ait FT-IR spektroskopisi.....	104
Şekil 4.24: (a) Kurkumin, (b) DSPE ve (c) PLGA'ya ait DSC termogramları.....	105
Şekil 4.25: (a)Boş PLGA DSPE NP (PD4), (b) Kurkumin yüklü PLGA NP ve (c) CurPD4 nano misellerine ait DSC termogramları.....	106
Şekil 4.26: CurPD4 ve PLGA-Kurkumin NP'lere ait TEM analizi sonuçları.....	108
Şekil 4.27 : Optimize edilmiş yapıların etkileşim enerjileri.....	111
Şekil 4.28: DFTB+ analizi, ilaç ve lipid moleküllerini içeren iki senaryonun optimize edilmiş hali.....	114
Şekil 4.29: İlaç, polimer ve DSPE moleküllerinin ilk ve optimize edilmiş hallerine ait yapılar.....	115

Şekil 4.30: Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarının morfolojileri a) LoVo-Luc b) CCD-1072Sk c) LoVo-Luc hücre hattının biyolüminesans ışınması.	119
Şekil 4.31: LoVo-Luc hücre hattında 5-FU'nun (0-700 μ M) MTT hücrel canlılık grafiği (*p<0.05; **p<0.01; ***).); ***p<0.001).....	120
Şekil 4.32: CCD-1072Sk hücre hattında 5-FU'nun (0-700 μ M) MTT hücrel canlılık grafiği (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).	121
Şekil 4.33: Serbest kurkuminin (0-100 μ g/mL) LoVo-Luc hücrelerindeki MTT hücrel canlılık grafiği (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).	123
Şekil 4.34: Serbest kurkuminin (0-100 μ g/mL) CCD-1072Sk hücrelerindeki MTT hücrel canlılık grafiği (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).	124
Şekil 4.35: CurPD4 NP'ün LoVo ve CCD-1072Sk hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik canlılığa etkisi.	124
Şekil 4.36: CurPD4 ve 5-FU (0-700 uM) kombine tedavi uygulamasının a)CCD-1072Sk ve b) LoVo-Luc hücrelerinde canlılık üzerine etkisi (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).	126
Şekil 4.37: CurPD4 ve CurPD3 nanopartiküller ve kurkumin yüklü olmayan hallerinin CCD1072Sk ve LoVo-Luc hücrelerindeki 24 saatlik toksisite sonuçlarının karşılaştırılması.	127
Şekil 4.38: Akridin oranj/etidyum bromür boyası ile boyanan ve BoşPD4, 5-FU, Kurkumin, Kurkumin + 5-FU ve CurPD4 +5 FU uygulanan LoVo hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.....	130
Şekil 4.39: LoVo hücre hattında 5-FU (500 uM), kurkumin, CurPD4, Kurkumin + 5 FU ve CurPD4 +5 FU uygulamasının neden olduğu canlılık ve apoptoz yüzdelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).	131
Şekil 4.40: LoVo-Luc hücre hattında 48 saat CurPD4 uygulaması sonrası hücre morfolojisini değerlendirmek için yapılan AO ve DAPI boyama sonuçları.	132
Şekil 4.41: LoVo-Luc hücrelerinde 48 saatte a) Kontrol, b) Serbest kurkumin, c) CurPD4, d) BoşPD4, e)5-FU, f) CurPD4 + 5-FU uygulamasının apoptotik etkisini gösteren Anneksin V-FITC/PI analizi sonuçları.	133
Şekil 4.42: LoVo-Luc hücre hattında 48 saat serbest kurkumin, CurPD4, BoşPD4, 5-FU ve CurPD4 + 5-FU uygulamasının canlılık, erken ve geç apoptoz yüzdelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.	134
Şekil 4.43: Bradford ölçümü için kullanılan BSA standart grafiği.	135
Şekil 4.44: p53 ve β -aktin protein ekspresyonlarına ait western blot bantları.....	136
Şekil 4.45: In vitro tekli ve kombine madde uygulamaları sonrası LoVo hücrelerinde gözlenen normalize edilmiş p53 protein ekspresyonu.	137
Şekil 4.46: Kolon kanseri hücrelerinde 24 saat uygulanan artan 5-FU konsantrasyonu (0-700 μ M) ile hücrel ROS oluşumu artmaktadır.....	139
Şekil 4.47: Kolon kanseri hücrelerinde 24 ve 48 saatlik ROS miktarı: PLGA DSPE hibrit nanopartikül içerisine enkapsüle edilen kurkumin miktarının artması ile hücre içi ROS düzeyleri artmaktadır.....	140

- Şekil 4.48:** Kurkumin yüklü nanopartikül (CurPD4) ve çeşitli dozlarda 5-Fluorourasil kombinasyon tedavisinin kanser hücreleri üzerindeki ROS oluşumuna etkisi..... 140
- Şekil 4.49:** a) Serbest kurkumin, b) CurPD4 ve c) PLGA-kurkumin NP uygulaması sonrası LoVo hücreleri tarafından kurkumin'in hücre içine alımı..... 143
- Şekil 5.1:** Kurkumin yüklü PLGA NP ve Kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit NP'ün kendiliğinden bir araya gelerek oluşumunun şematik gösterimi. 147



KURKUMİN YÜKLÜ PLGA - DSPE HİBRİT NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Poly (D, L Lactic-co-Glycolic acid) (PLGA) biyoyumlu, biyobozunur ve FDA onaylı bir biyopolimerdir. Bu polimer, emülsiyon- solvent evaporasyon yöntemi ile nano miseller hazırlanmasının kolay olması ayrıca, hidrofobik ilaçların taşınması için elverişli olması ile diğer biyoyumlu polimerlerden ayrılmaktadır. Kurkumin ise, *Curcuma longa* rizomlarından izole edilen, çok sayıda önemli biyolojik aktiviteye sahip bir doğal bileşiktir. Bu biyoaktivitelerin arasında ilk olarak kanser hücrelerinin kurkumin etkisiyle proliferasyonunun inhibe edilmesi ve apoptoza yönelmesi gelmektedir. Buna ek olarak kurkuminin kemoterapi ilaçlarının indüklediği direnç ile ilişkili genlerin aktivasyonunu ve proteinlerin ekspresyon seviyesini düşürdüğü bilinmektedir. Bu proteinlerin ekspresyon seviyesini düşürmek, kanser hücrelerinde ortaya çıkan kemoterapi direncinin gelişmesini engellemeyi ve kemoterapi ilacının daha etkili hale gelmesini sağlamaktadır.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan PLGA nano-misellerine 125 µg/mL kurkumin yüklemiş ve uygulandığı kanser hücrelerinde NF-κB seviyelerindeki değişim incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda kurkumin'in NF-κB seviyesini düşürmekte başarılı olduğu ancak PLGA nano-misellerinin bu proteinin tüm alt birimlerini etkin şekilde düşürmek için gerekli olan konsantrasyona ulaşamadığı fark edilmiştir. Bu sorun iki sebepten kaynaklanmış olabilir. Kurkumin NF-κB'nin tüm alt birimlerinin seviyesini düşüremeyen bir bileşiktir veya PLGA'nın taşıdığı kurkumin miktarı bu etkinliği elde etmek yetersiz kalmaktadır. Bu tez çalışması ile amacımız, PLGA'nın kurkumin taşımak için sahip olduğu hidrofobik kapasiteyi yine biyoyumlu ve FDA onaylı bir fosfolipit olan DSPE ile arttırmaktır. Bunun için "Emülsifikasyon- Solvent Evaporasyon" ve "Film Oluşturma-Rehidratasyon Yöntemi" olmak üzere iki farklı

yöntem ile PLGA-DSPE hibrit nano-miselleri hazırlandı, hesaplamalı moleküler modelleme yöntemleri ile polimer ve lipidin uyumu incelenmiş ve fizikokimyasal olarak karakterizasyonu tamamlandı. Ardından kurkumin taşımak için hidrofobik kapasitesi geliştirilen PLGA'nın bir kemoterapi ajanı olan 5 – Flourourasil (5-FU) kullanıldığında biyolojik etki açısından iyileşme davranışları *in vitro* olarak incelenmiştir. “Film Oluşturma–Rehidratasyon Yöntemi” yöntemi ile hazırlanan nanomiseller ile taşınan kurkumin miktarının 250 µg/mL'ye kadar yükseldiği başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Kurkumin yüklü nano-misellerin fizikokimyasal karakterizasyonu Dynamic Light Scattering (DLS) FT-IR, Differential Scanning Chalorimetry (DSC) ve HPLC ile gerçekleştirilmiştir. DLS yöntemi ile boyutu 120 nm (sayıca %) olarak tespit edilen nano-misellerde DSC ve FT-IR yöntemleri ile kurkumin'in başarılı bir şekilde nano-partikülün çekirdek kısmına yerleştiği ve DSPE'nin PLGA'nın tüm fonksiyonel grupları ile etkileştiği tespit edilmiştir. HPLC yöntemi ile oluşturulan hibrit nano-miselin içinde tuzağa düşürülen kurkumin miktarının yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE) %92,006 ve yükleme kapasitesi (%DL) %7,301 olarak ölçülmüştür. Kurkumin'in hibrit nano-miselden salım mekanizması incelenmiş ve Korsmeyer–Peppas modelinin en uygun model olduğu tespit edilmiştir. Buna göre kurkumin'in hibrit nano-misellerden salımının nano-taşıyıcının şişmesine bağlı olarak, difüzyon ile gerçekleştiği ortaya çıkmıştır. Elde edilen optimize formülasyonun stabilitesi yukarıda bahsedilen analiz yöntemleri ile, çeşitli ortam (oda sıcaklığı, liyoflizasyon sonrası ve besiyerinde) ve çeşitli sürelerde incelenmiş ve hazırlanan formülasyonun yüksek ölçekte üretim sırasında pazarlamaya uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bunlarla birlikte kurkumin yüklü DSPE-PLGA hibrit nano-miselleri için hesaplamalı moleküler modelleme çalışmaları (kuantum kimyasal küme modelleri ve periyodik DFTB+ hesaplamaları) gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak oluşturulan PLGA, DSPE ve kurkumin matriksinde kurkumin'in sadece DSPE veya PLGA ile değil, her ikisi ile etkileşimde olduğu, DSPE'nin PLGA zincirlerini bir arada tutmakta büyük etkisi olduğu ve üçlü sistemin birlikte oldukça kararlı bir sistem ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Bu sonuç stabilite çalışmaları ile uyumludur.

Son olarak 250 mg/mL kurkumin taşıyan optimize DSPE-PLGA hibrit nano-misellerinin *in vitro* biyolojik etkisi LoVo insan kolorektal kanser hücre hattı ve sağlıklı kolon hücre hattı CCD-1072Sk üzerinde incelenmiştir. Bunun için öncelikle 5-FU'nun IC₅₀ değeri 440.9 µM olarak hesaplanmış ve ilerleyen deneylerde 5-FU'nun

bu konsantrasyonu kurkumin yüklü optimize hibrit nano-miseller ile kombinasyon halinde kullanılmıştır. Optimize formülasyonun kanser hücreleri üzerindeki apoptoz etkisi akridin turuncusu (AO)/ etidyum bromür (EB) çift boyaması, DAPI boyama, floresan mikroskop incelemesi ve akış sitometrisi cihazında Annexin V-FITC ve PI boyama ile gerçekleştirilmiş ve optimize formülasyonun apoptoz üzerindeki etkisi serbest kurkumin'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunu takiben Western Blot yöntemi ile apoptotik protein artışı incelenmiştir. P53 proteininin, NP ile 5-FU kombinasyon uygulaması sonucu oluşan protein ekspresyon düzeylerinin yalnızca NP uygulamasına kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir. Bununla uyumlu olarak kemoterapi ve hibrit nano-taşıyıcının taşıdığı kurkumin'in kombine kullanımında hücre içi rekatif oksijen türleri (ROS) oranlarında anlamlı artış gözlenmiştir. Son olarak optimize DSPE-PLGA hibrit nano-misellerinin kurkumin'in hücre içine girişindeki etkisi incelenmiştir.

Sonuç olarak optimize DSPE-PLGA hibrit nano-miselinin PLGA'nın kurkumin taşıma kapasitesinin başarılı bir şekilde iki katına çıkardığı tespit edilmiş ve 5-FU ile kombine tedavide kemoterapinin etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir. *In vivo* çalışmalar ile hazırlanan optimize hibrit nano-formülasyonun etkinliğini incelemek araştırmanın bir sonraki basamağı olarak tasarlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nano ilaç taşıyıcı sistem, Polimerik misel, PLGA, Kurkumin, Kolon kanseri, Kemoterapi

PREPARATION, CHARACTERISATION AND IN VITRO EVALUATION OF CURCUMIN LOADED PLGA-DSPE HYBRID NANO PARTICLES

SUMMARY

It is a very common method to use polymer and lipid structured biological materials in the preparation of nano drug carrier systems. Poly (D, L Lactic-co-Glycolic acid) (PLGA) is a biocompatible, biodegradable, and FDA-approved biopolymer. It is very easy to produce nano-micelles from this polymer and is suitable for transporting hydrophobic drugs, distinguishing it from other biocompatible polymers. Apart from this, Curcumin is a natural compound isolated from the rhizomes of the *Curcuma longa* plant, also known as turmeric, and has many important bioactivities for humans. It has been reported that curcumin has cell cycle-inhibiting, proliferation-interfering, anti-inflammatory and apoptosis-inducing effects on cancer cells. Among these bioactivities, the inhibition of cancer cell proliferation and increase their tendency to apoptosis are first. In addition, Curcumin is known to reduce the level of proteins associated with chemotherapy resistance. Reducing the expression level of these proteins prevents the development of chemotherapy resistance in cancer cells and makes the chemotherapy drug more effective.

Our group had previously conducted many studies with PLGA nano-micelles, and in one of them, they loaded 125 $\mu\text{g/mL}$ Curcumin into the nano-micelle and examined the change in NF- κB levels in cancer cells it administered. As a result of this study, it was noticed that curcumin was successful in reducing the level of NF- κB , but the amount required to reduce all subunits of this protein was insufficient. This problem could be caused by two reasons. Curcumin is a compound that cannot reduce the level of all subunits of NF- κB or the amount of curcumin carried by PLGA is too small to achieve this effectiveness. Similarly, the reason why the *in vivo* activity of curcumin is not found to be high enough is due to the insufficient bioavailability of the molecule and consequently the molecule accumulates in the target area in too low amounts. In order to fully measure the relationship between curcumin-loaded nanocarriers and resistance, a high amount of curcumin must first be delivered to the target.

In this thesis, we tried to increase the hydrophobic capacity of PLGA to transport curcumin with DSPE, which is a biocompatible and FDA-approved phospholipid. For this purpose, PLGA-DSPE hybrid nano-micelles were prepared with two different methods, namely "Emulsification-Solvent Evaporation" and "Film Preparation-Rehydration Method" and their physicochemical characterization was completed. Afterward, PLGA, with enhanced hydrophobic capacity for carrying curcumin, was used with 5-FU, a chemotherapy agent, and the healing behaviors regarding biological effects were examined in-vitro. It has been successfully shown that the amount of curcumin carried by nano micelles prepared by the "Film Formation-Rehydration Method" method increases up to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Physicochemical characterization of curcumin-loaded nano-micelles was performed with Dynamic Light Scattering (DLS) FT-IR, Differential Scanning Calorimetry (DSC), and HPLC. It was determined that curcumin was successfully encapsulated in the core of the nano-particle and DSPE interacted with all functional groups of PLGA by DSC and FT-IR methods in nano-micelles whose size was determined as 120 nm (number%) by the DLS method. The percent encapsulation efficiency (%EE) of the amount of curcumin trapped in the hybrid nano-micelle formed by HPLC method was measured as 92.006% and the drug loading capacity (DL%) as 7.301%. The release mechanism of curcumin from the hybrid nano-micelle was investigated and the Korsmeyer–Peppas model was found to be the most suitable one. Accordingly, it was revealed that the release of curcumin from hybrid nano micelles occurs by diffusion due to swelling of the nanocarrier. The stability of the obtained optimized formulation was examined by the above-mentioned analysis methods, in various media (room temperature, after lyophilization, and in the medium) and at various times, and it was determined that the prepared formulation was suitable for marketing during high-scale production.

In addition, Computational Molecular Modeling for curcumin-loaded DSPE-PLGA hybrid nano micelles was performed with Quantum chemical cluster models, Periodic DFTB+ calculations, and Molecular dynamics (MD) simulations. As a result, it has been determined that curcumin interacts not only with each DSPE or PLGA individually but with both, DSPE has a great effect on keeping the PLGA chains together, and the triple system together creates a very stable system in the formed PLGA, DSPE and curcumin matrix. This result is compatible with stability studies.

Finally, the *in vitro* biological effect of optimized DSPE-PLGA hybrid nano micelles carrying 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ curcumin was investigated on transfected LoVo human colorectal

cancer cell line (LoVo-Luc) and Healthy colon cell line CCD-1072. For this, firstly, the IC_{50} value of 5-FU was calculated as 440.9 μ M, and in further experiments, this concentration of 5-FU was used together with optimized hybrid nano-micelles loaded with curcumin. The apoptosis effect of the optimized formulation on cancer cells was performed by Acridine orange (AO) / ethidium bromide (EB) double staining, DAPI staining, fluorescence microscopy, and Annexin V-FITC and PI staining on flow cytometry. The effect of the optimized formulation on apoptosis was statistically compared to free curcumin and was found significant. Following this, apoptotic protein increase and resistance-related beta catenin protein were examined by Western Blot method. It was concluded that the protein expression levels of the mentioned proteins resulting from the combination application of drug-loaded nanoparticles and 5-FU were significantly higher than the application of nanoparticles alone. In line with this, a significant increase in intracellular reactive oxygen species (ROS) rates were observed in the combined use of chemotherapy and curcumin carried by the hybrid nanocarrier. Finally, the effect of optimized DSPE-PLGA hybrid nano-micelles on the intracellular entry of curcumin was investigated.

As a result, It was determined that the optimized DSPE-PLGA hybrid nano-micelle successfully doubled the curcumin carrying capacity of PLGA and increased the efficacy of chemotherapy in combination treatment with 5-FU. Examining the effectiveness of the optimized hybrid nano-formulation prepared by *in vivo* studies was designed as the next step of the research.

Key Words: Nano drug delivery system, Polymeric micelle, PLGA, Curcumin, Colon cancer, Chemotherapy

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Kolorektal kanser (KK), kansere bağlı ölüm nedenleri arasında oldukça ön sıralarda yer almaktadır. Öyle ki ABD’de ikinci, dünya genelinde ise üçüncü sırada en yaygın rastlanır [1]. Kemoterapi, cerrahi tedavi ve radyoterapi ile kanserle mücadelede tercih edilen temel terapötik yaklaşımlardan biridir [2]. Ancak, kemik iliği, mide, bağırsak, karaciğer, böbrek vb. gibi sağlıklı dokulara zarar veren ciddi yan etkileri nedeniyle mutlak bir başarıya sahip değildir [3]. Ayrıca, hücrel toksisite ve ilaç direnci gibi çeşitli sınırlandırmaları da vardır . Buna rağmen KK hastalarının sağ kalımını arttırmaktan dolayı belirli kemoterapötikler sıklıkla tercih edilmektedir [4]. KK tedavisinde kullanılan temel ilaç olan 5-Fluorourasil (5-FU) yüksek etkinliğine rağmen doza bağlı toksisite göstermektedir ve ileri evre kemo-rezistant tümörlerde etkinliği sınırlıdır [5, 6]. Hedefe özgül olmaması ve düşük plazma yarı ömründen kaynaklı olarak yüksek doz 5-FU kullanımı kaçınılmaz olarak doza bağlı sistemik toksisite ve ilaç direncine neden olmaktadır [5].

Kanser araştırmalarından çıkarılan genel sonuçlardan biri, kanserin kombine tedavi stratejilerinin, özellikle ilaçların etki tarzları farklıysa, monoterapi rejimlerine göre güvenlik ve etkililikte dramatik iyileşme sağlayabileceğidir [7, 8]. Ancak istenilen etkinliğin sağlanabilmesi için hedef molekülün tümör bölgesine ulaşması ve yüksek biyoyararlanım göstermesi gerekir. Kombine tedavilerde en sık tercih edilen terapi ürünleri bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerdir [9]. Bitkisel doğal bileşiklerden olan kurkumin, zerdeçal olarak da bilinen *Curcuma longa* bitkisinin en önemli etken maddelerinden biridir. Bununla birlikte, kurkumin’in hidrofobik yapısı biyoyararlanımının zayıf olmasına neden olur ve klinik etkinliğini sınırlandırır [10]. Suda çözünürlüğünün düşük olmasının yanı sıra oral alımda kurkumin’in gastro intestinal sistem boyunca zayıf emilim göstermesi, karaciğerde yaygın ilk geçiş metabolizmasına uğraması ve vücuttan hızlı eliminasyonu serum konsantrasyonunu hızla düşürür [11, 12].

Nano ilaç taşıyıcı sistemler (NDDS), hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları taşıyabilecek şekilde tasarlanabilir ve kararlı yapıları sayesinde kanser tedavisinde büyük potansiyele sahiptir [13]. Ancak, ilacın tümör bölgesine ulaşana kadar stabil kalmasını ve hedef bölgeye en yüksek miktarda ulaşmasını sağlayacak rasyonel bir NDDS tasarımı yapılmalıdır. Araştırmalar bu konuda yoğunlaşsa da KK tedavisinde

kemoterapi ajanı ile kombine olarak kullanılacak henüz onaylanmış bir kurkumin yüklü nano taşıyıcı bulunmamaktadır. Mevcut NDDS tasarımları ya yeterli doza ulaşamamakta ya da hücrel toksisiteye neden olmaktadır [14-16]. KK tedavisinde gelinen umut vaat eden gelişmelere rağmen yan etki ve ilaç direnci noktasında yetersiz kalınması sağlığı tehdit eden önemli bir problemdir ve bu durumun NDDS ile giderilmeye çalışılması önemli bir araştırma konusudur.

1.2 Tez Araştırmasının Amaçları

Kemoterapinin etkinliğini artırmak, kemoterapötik ajana bağlı yan etkileri önlemek veya azaltmak için adjuvan terapi stratejilerinin geliştirilmesi gündemdeki araştırma konularından biridir [8]. Çok sayıda anti kanser ilacın, doğal bileşiklerle kombinasyon tedavisi, uygulanan ilacın dozunu azaltarak ilaca karşı direnci ve ilaç toksisitesini hafiflettiği için tercih edilmektedir. Bunun için doğal ürünlere ait ekstraktlar veya bunların etken maddeleri zengin bir kaynak oluşturmaktadır [7].

Nanoteknoloji günümüzde ilaç molekülleri ve diğer terapötik moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden kaynaklanan dezavantajları elimine etmek için kullanılmaktadır. NDDS, kurkumin gibi hidrofobik moleküllerin dağılımını ve hedeflendirilmesini sağlaması ve anti-kanser ilaçların yan etkilerini azaltması ile kanser tedavisinde konvansiyonel yollara alternatif olarak umut vaat etmektedirler. Kurkumin nano formülasyonu, serbest kurkuminin aksine sulu ortamda kolayca disperse olur ve *in vivo* ortamda belirgin bir terapötik etkinlik artışı gösterir [12, 17-19].

Bu doğrultuda kurkumin ve 5-FU'nun kombine kullanımının kolorektal kanser tedavisinde normalde kullanılan kemoterapi dozunu düşürerek daha yüksek anti-tümör etkinliği göstermesi amaçlanmakta. Bunun için vücut içinde dağılan ve tümör bölgesinde tutulan, hedef bölgede tutulumu arttıracak kurkumin yüklü nanopartikül (NP) tasarımı yapılmıştır. Bu sayede kullanılan kemoterapötik dozunun ve yan etkilerinin azalması, kombinasyon uygulaması ile sitotoksik ve apoptotik etkinin artması amaçlanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda PLGA nano-misellerine yüklenen 125 µg/mL kurkumin'in kemoterapi ajanı tarafından ekspresyonu arttırılan NF-κB'nin, P65 (RelA) alt birimini başarılı bir şekilde inhibe ettiği ancak bu proteinin diğer alt birimlerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir [16]. Bu gözlemin

sebebi iki kaynak olabilir. PLGA'nın taşıyabildiği 125 µg/mL kurkumin'in etkinliği NF-κB'nin tüm alt birimlerini baskılamaya yetmemiş olabilir veya bu proteinin diğer alt birimleri kemo-direnç ile ilintili değildir. Kurkumin yüklü nano misel ve kemo direnç ilişkisini kesin olarak ortaya koymak için yüksek doz kurkumin taşıyan formülasyonun hazırlanması önemlidir. Kurkumin aracılı aktive olan ve kemo direnç ile ilişkili çok sayıda yolak vardır ve bunların her birinin ileri *in vivo* çalışmalar ile aydınlatılması elzemdir. Bu çalışmanın amacı ise bu araştırmaların yapılmasını mümkün kılacak biyouyumlu, biyobozunur, kontrollü ve hedefe yönelik salım yapan stabil bir nano taşıyıcının ortaya konmasıdır. Bu amaç ile FDA onaylı bir fosfolipid olan 1,2-distearoilol-sn-gliserol-3-fosfoetanolin (DSPE) kullanılarak PLGA'nın kurkumin taşımaya yönelik hidrofobik kapasitesi artırılmıştır. Bunun için, iki farklı yöntemle PLGA-DSPE hibrit nano-miselleri hazırlanmıştır; bunlar emülsifikasyon-solvent evaporasyon ve film hazırlama-yeniden süspansiyon yöntemleridir.

1.3 Literatür Araştırması

Günümüzde KK tedavisinde hem ileri hem de erken evrede en yaygın tercih edilen ilaç 5-FU'dür. Anti metabolit bir ilaç olan 5-FU'nin mekanizması, ilk olarak Wisconsin Üniversitesi'nden Charles Heidelberger ve meslektaşları tarafından aydınlatıldı. Tümör dokularının nükleik asit biyosentezi için tercihen urasil kullandığını gözlemlədiler ve bir fluorourasil analogunun, deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitimidin monofosfata (timidilat) dönüşümünü bloke ederek tümör hücresi bölünmesini engelleyeceğini doğru bir şekilde öne sürdüler [20]. Bugün bilindiği üzere 5-FU, hücreyel yolaklarda değişiklik yaparak DNA hasarını teşvik eden, timidilat sentaz enzimini bloke ederek kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eden bir kemoterapötiktir [21].

Zerdeçal ekstraksiyonundan izole edilen kurkumin'in *in vitro* ve *in vivo* olarak farklı kanser türlerinde anti-kanser ve anti-inflamatuar özellikler sergilediği bilinmektedir [11, 22]. Uzak doğu ülkelerinde sıklıkla geleneksel kullanımı ile ilgili araştırmalar yapılmasının yanı sıra, yapılan klinik çalışmalar kurkumin tüketiminin yüksek olduğu ülkelerde kanser vakalarının daha düşük olduğunu bildirmiştir [23]. Ayrıca kurkumin'in yapılan çok sayıda çalışma sonucunda kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğini arttırdığı, hastanın hayatta kalma süresini iyileştirdiği [24], kemoterapi ajanının yan etkilerini azalttığı ve sağlıklı hücreleri kemoterapi kaynaklı toksisiteden

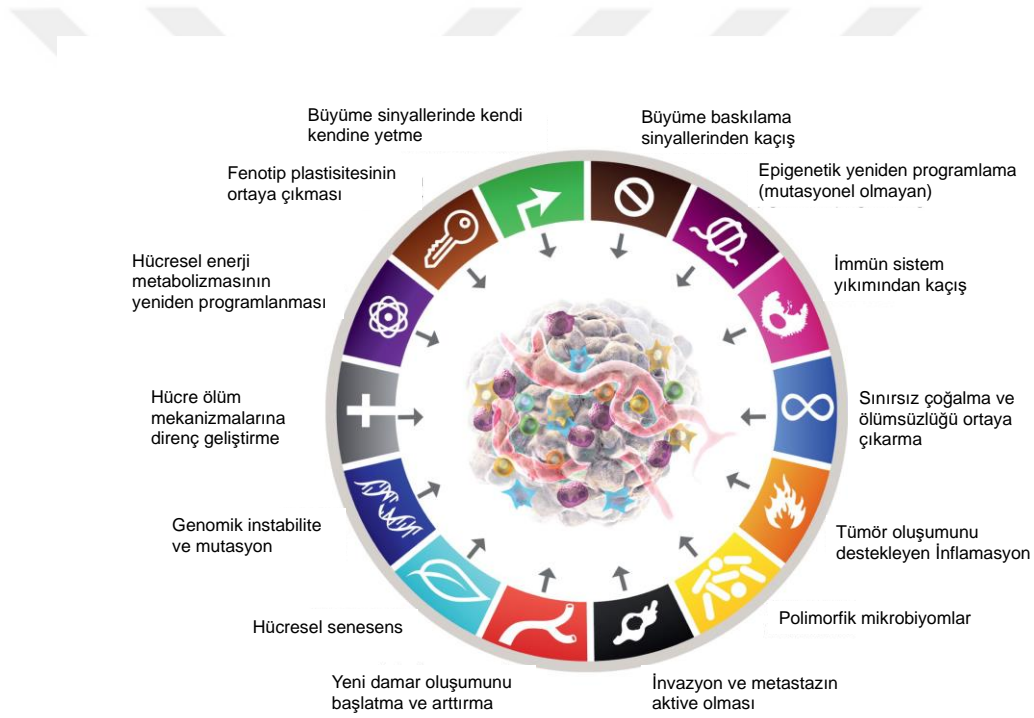
koruduğu vurgulanmaktadır [8]. Kurkumin'in bir kemoterapi ajanı ile kombine halde veya yüksek dozda tek başına tümör hacmini küçülttüğü ve tümörün metastatik özelliğini azalttığı gösterilmiştir [25]. Bu olumlu sonuçlar, araştırmacıları kolorektal kanser tedavisinde kurkumin'in etkinliğini değerlendirmeye yöneltmiştir. Faz I ve II klinik çalışmaları, kolon kanseri tedavi stratejilerinin bir parçası olarak kurkumin kullanımına ilişkin umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır [26]. Bununla birlikte, düşük biyoyararlanıma sahip bir bileşik olan kurkuminin klinik şartlarında tam verimlilikle uygulanması da mümkün değildir. Bunun üstesinden gelmek için lipozomlar ve nanopartiküller gibi, kurkumin'in biyoyararlanım ve etkinliğini arttıracak yenilikçi uygulama yaklaşımları geliştirilmektedir [26, 27]. Nano partiküler bir kurkumin taşıyıcı sistem olan "Theracurmin" ile yapılan çalışmalar, membran enkapsülasyonunun, kurkumin gibi hidrofobik bileşiklerin suda çözünürlüğünü artırarak biyoyararlanımı iyileştirebileceğini göstermiştir. Dahası, yapılan faz I çalışmaları, bu tedavi yaklaşımının toksik olmadığını ve pankreas kanseri olan hastalarda serbest kurkumine kıyasla daha yüksek biyodağılıma sahip olduğunu göstermiştir [28, 29].

Kurkumin kanserde genel olarak, hücrelerin apoptozu yeniden kazanmalarına yardımcı olur, ilaç-hedef etkileşimini farklı seviyelerde modüle eder, proteinleri aşırı eksprese edildiğinde tümör hücrelerinin hayatta kalma yollarını engeller ve farklı dirençli tümörlerin hassasiyet kazanması için alternatif bir yol ile çalışır [30]. Yapılan literatür taramaları sonucunda kurkumin ve 5-FU'in birlikte kullanıldığı çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya rastlanmıştır [7]. Kurkumin'in kolorektal kanser tedavisinde kemoterapinin etkinliğini arttırdığı ve ihtiyaç duyulan ilaç dozunu düşürerek yan etkileri azalttığı gösterilmiştir [31-35]. Ayrıca kurkumin'in çeşitli ilaç direnci geliştirmiş kanser türlerinde, ilaca duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir [34, 36]. Kurkumin NF-κB protein alt birimlerini zaman ve doz bağımlı olarak inhibe etmektedir. Ayrıca insan MDR kanser hücre hatlarında *mdr1* geni ve P-gp proteini aktivasyonunun arttığı ve kurkumin ile bu aktivasyonun inhibe edildiği bilinmektedir [37]. Bu ilaç direnci mekanizmasının kurkumin tarafından inhibe edilmesine, NF-κB nin doğrudan *mdr1* geninin promoter bölgesine bağlanması ve *mdr1b* gen transkripsiyonunun engellenmesi neden olmaktadır [38].

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kanserleşme ve Tümör Oluşumuna Genel Bakış

İnsan vücudu 100 trilyondan fazla hücreden meydana gelmekte ve her gün bu hücrelerin milyonlarcası kontrollü bir biçimde yok edilmektedir. Hücrelerin proliferasyonu, sağkalımı ve farklılaşması organizmanın kontrolünde regüle edilmektedir. Organizmanın normal hücrelerin kontrolünün bozulması ile vücudun belirli bir bölgesinde kanserleşme ortaya çıkmaktadır. Hücrelerin DNA eşleşmesindeki hatadan kaynaklı olarak kontrolsüz ve anormal çoğalması ve normalde apoptoza gitmesi gereken bu hasarlı hücrelerin çevre dokulara yayılması kanserin temel karakteristiğidir [1].



Şekil 2.1: Kanser ayırt edici karakteristik özellikleri [39, 40].

Tüm kanser hücrelerinde ortak olan bazı ayırıcı özellikler, kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden farklı kılmaktadır. Bunlar büyüme sinyallerinde kendi kendine yetme, büyümeyi engelleyen sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçınma, sürekli anjiyogenez yeteneği, sınırsız replikasyon potansiyeli ile doku invazyonu ve metastazdır [40]. Bunlara ek olarak immün yıkımdan kaçış, inflamasyon, hücre yaşlanması ve hücrel enerjinin serbest bırakılması da kanser hücrelerinin

özelliklerine dahil edilebilir [39, 41] (Şekil 2.1). Kanserde güncel tedavi cerrahi rezeksiyon, radyasyon, hormon tedavisi ve kemoterapidir. Kemoterapötik ajanlar, kanserli hücrelerin sınırsız büyümesini engellemek için sistemik olarak verilir [42]. Apoptoz, kontrollü hücre ölümünün ana mekanizmasıdır, bu nedenle apoptoz / hücre ölümünü tetikleyen ajanlar, kanser için terapötik olarak en umut verici adaylar olarak görülmektedir [43].

Kanser, görülme sıklığı ve gelişmiş ülkelerde dahi önlenemeyen yüksek mortaliteye sahip olması ile günümüzün en ciddi sağlık sorunlarından biridir. Kanser hastalığının tedavisinde önemli gelişmeler yaşanmış olsa dahi bu hastalık, bir sağlık sorunu olarak önemini devam ettirmektedir. Akciğer, mide, kolon (kolon ve rektum kanserleri), karaciğer ve meme kanserleri, önde gelen kanser ölüm nedenlerindedir [1, 44]. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (ICRA) verilerine göre 2020’de kanser kaynaklı ölümlerin 9.9 milyon olduğu ve 19.3 milyon yeni vaka görüldüğü bildirilmiştir [44].

Hücreyi kanserleşmeye götüren pek çok iç ve dış etmen vardır. Bu bağlamda kanser oluşumu multi faktöriyel olup, bakteri, virüs, radyasyon, çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları gibi dış sebepler veya kalıtsal sebepler gibi birçok faktör kanser oluşumunda suçlanmaktadır. Kanserleşmenin hücre gen yapısındaki değişiklikler ve replikasyonda oluşan hatalar ile şekillendiği düşünülmektedir. Ancak kanser gelişimi hücrelerin kötü huylu hale geldiği çok aşamalı bir süreçtir ve zaman içerisinde uğradığı birtakım değişiklikler ile meydana gelir. Bu durumu kanıtlar nitelikte kanser insidansının yaşla birlikte önemli ölçüde artması gösterilebilir. Bu da kanserlerin çoğunun yıllar içinde kademeli olarak biriken çok yolaklı hücresel anormallikler nedeniyle geliştiği anlamına gelir [45].

2.1.1 Hücre döngüsü bozulması

Hücrenin proliferasyonu yani bölünerek çoğalması olayı yaşamın devamlılığı için en temel mekanizmadır ancak kontrolden çıkması durumunda kanserleşme gözlenir. Bu durum anormal bir şekilde büyümeye ve bölünmeye başlayan tekil hücrelerden tümörlerin gelişmesi yani tümör klonalitesi olarak tanımlanır. Bu kontrol mekanizmalarının bozulması genellikle genetik mutasyonların birikiminden kaynaklanmaktadır. Karsinojenler sağlıklı hücrelerin DNA’larına zarar vererek onları öldürürken, DNA’sı hasar görmüş kanser hücrelerinin anormal büyümesine yol açar. DNA hasarına yol açacak bir karsinojenle muamele sonrası hücre i) hasarı onarabilir,

ii) kendisini apoptoza götürebilir veya iii) hasarlı DNA'nın replike olması sonucu kalıcı bir mutasyona uğrayabilir. Bu farkta iki önemli gen ailesi rol almaktadır. Bunlar i) proto-onkogenlerin mutasyonu ile oluşan ve normal hücrelerin kontrolden çıkarak kanser hücrelerine dönüşmesine neden olan onkogenler ve ii) hücre bölünmesini, DNA onarımını kontrol eden ve düzgün çalışmadığında kontrolden çıkarak kansere yol açabilen tümör baskılayıcı genlerdir [18]. Yani kanser oluşumunun nedeni DNA replikasyonunun ve/veya tamir mekanizmalarının düzgün çalışmaması sonucu hücrelerde meydana gelen anormal büyüme ve çoğalmadır. Devamlı proliferasyon, tümörün malign karaktere bürünmesine yol açan progresif fenotipik özellikler kazanmasını sağlar. Malign kanser hücresi ise klonal çoğalma ile önce çevre dokulara sonra da uzak dokulara yayılarak (metastaz) büyümeye başlar.

Hücre döngüsü süresi hücre tiplerine göre farklılık göstermekle birlikte dört aşamadan oluşmaktadır. Bunlar sırası ile hücrenin sentez için substratlarını arttırdığı G1 hazırlık evresi, DNA replikasyonunun olduğu S sentez evresi, replikasyonun durduğu G2 evresi ve bölünmenin gerçekleştiği M mitoz evresidir. Hücrenin G0 dinlenme evresinden G1 evresine geçmesine fizyolojik olduğu kadar patolojik uyaranlar da sebep olabilir. Moleküler olarak bu replikasyonun gerçekleşmesi siklin bağımlı kinazların (CDK) aktive olması ve son noktada retinablastom (Rb) proteininin fosforile olup hücreyi G1'den S fazına geçirmesi ile mümkündür [48]. CDK molekülleri hücre döngüsünü düzenlediğinden dolayı, kinaz aktivitesini düzenleyen genler hücre döngüsünü durdurucu sinyal iletimini sağlayabilirler. Döngünün kontrol noktalarında durdurulması sayesinde genetik materyalin onarımına izin verilir ve ikincil hataların oluşması önlenir. Bu kontroller proto-onkogenler veya tümör baskılayıcı genler (TBG) tarafından sağlanır ve bu genler arasındaki dengesizlik DNA anormalliklerine veya kanser önleyici proteinlerin sentezinde azalmaya sebep olmaktadır. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümü ve TBG'lerin inaktif olması kanserleşmeyi başlatır [46].

2.1.2 Kanser ve apoptotik sinyal yolları

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılır, embriyonik gelişimde kritik rol oynayan kontrollü bir süreçtir [47]. Hücre ölüm yolları arasında özellikle apoptoz, kanser araştırmaları içerisinde en çok çalışılan konulardandır. Nitekim kanserde hücre ölümü ile hücre bölünmesi arasındaki dengenin kaybolması ve normal şartlarda ölmesi gereken hücrelerin bu sinyali alamaması söz konusudur. Sağlıklı bir

hücrede normal gelişimsel sinyaller, stres sinyalleri ve hücre siklusunun bozulması ile apoptoz sinyali başlatılabilir. Apoptoz sürecinde karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Tümör oluşumu sırasında; apoptozdan kaçan tek bir kanserli hücre, sağlıklı hücrelerden daha yüksek bir oranda hücre bölünmesine maruz kalır ve kanser hücreleri, kan dolaşımından daha yüksek miktarda besin ve oksijen kaynağı tüketir [48]. Genomik bütünlük, hücre homeostazının çok önemli bir parçasıdır. DNA hasarını takiben normalde hücrenin apoptotik yola gitmesi mutasyona uğramış ve kanserleşme ihtimali olan hücrelerin çoğalmasını önler. Ancak hücre döngüsü ve apoptozda ikili rol oynayan proteinlerin susturulması hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının bozulmasına yol açar. Bu nedenle tümör hücreleri, sınırlı besin kaynağına rağmen bölünmeye devam eder ve ayrıca birçok tümör hücresi, besin miktarı yeterli olmamasına rağmen apoptozdan kaçır. Başlangıçta sağlıklı dokuya glikoz ve oksijen sağlamak için tasarlanmış damar sistemi, tümör kütlelerinin gereksinimlerini karşılayamaz [49].

Apoptoz iki ayrı sinyal yolu ile; mitokondri bağımlı (içsel) veya ölüm reseptörleri (dışsal) aracılığıyla başlatılabilmektedir. İçsel yolakta hücre hasarı ve strese karşı BCL-2 apoptotik protein ailesi mitokondriyal yolla kaspazlarla etkileşirken, dışsal yolakta hücre yüzeyi ölüm reseptörleri yoluyla kaspaz aktivasyonu başlatılır [47]. Hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini intraselüler anti-apoptotik BCL-2/ pro-apoptotik BAX oranı önemlidir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar kaspaz-8'i aktive ederek dışsal yolu başlatırken mitokondriden salınan sitokrom C kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3 ise birçok ligandı parçalayan bir proteazdır ve hücreyi ölüme götürür [50]. Morfolojik olarak apoptoz hücre zarında cepler oluşması, hücre büzülmesi, apoptotik cisimcikler oluşumu, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir.

Karsinogenezde apoptozun azalması veya apoptoz direnci önemli rol oynar. Bunu meydana getiren mekanizmalar özetle pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin bozulması, kaspaz aktivasyonunun azalması ve ölüm reseptör sinyalinin bozulmasıdır. Bcl-xL'nin aşırı ekspresyonunun, tümör hücrelerinde çoklu ilaca direnç fenotipi sağladığı ve apoptozu önlediği bildirilmiştir. Örneğin kolorektal kanserlerde Bax genindeki mutasyonlar yaygındır ve anti kanser tedavilere karşı dirence katkıda bulunabilir [47]. Tümör proteini 53 (veya TP53) olarak da adlandırılan p53 proteini, tümör baskılayıcı gen TP53 tarafından kodlanır ve en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden biridir. Sadece apoptoz indüksiyonunda yer almaz, aynı zamanda hücre

döngüsü düzenlemesi, gelişimi, farklılaşması, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal ayrışması ve hücre yaşlanmada da kilit bir oyuncudur [51]. Hücresel stres durumunda p53 proteini hücre döngüsünü durdurma veya apoptoza gitme kararını verir. Nitekim bozulmuş p53 aktivitesi kanserleşmeye yol açar. p53 tümör baskılayıcı genlerdeki kusurlar, insan kanserlerinin %50'sinden fazlasıyla ilişkilendirilmiştir [52].

Kanser hücrelerinin proliferasyonu, sağkalımı ve tedaviye direnç gelişimi noktasında yer alan bir transkripsiyon faktörü ailesi de Rel / NF-kappaB (NF-κB) protein kompleksidir. Ökaryotik hücrelerde beş farklı protein alt birimine (NF-κB1(p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), c-Rel, RelB ve RelA (p65)) sahip bu transkripsiyon faktörü programlanmış hücre ölümünün de temel düzenleyicilerindendir [53]. Bu düzenleyici rolü ile NF-κB dimerlerinin serbest kalarak çekirdeğe geçmesi nükleusta sitokinler, büyüme faktörleri, pro- ve anti-apoptotik proteinler ve hücre adezyon molekülleri gibi farklı genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesini sağlar [54]. NF-κB, hücre döngüsü düzenlemede görevli siklin D1 transkripsiyonunu aktive ederek ekspresyonunu artırır ve bu nedenle tümör büyümesi ile ilişkilidir. Nitekim NF-κB inhibisyonu siklin D1 ifadesinde azalma ile hücrenin S fazına geçmesini geciktirir. NF-κB aktivasyonunun ise bazı kanser hücrelerinde 5-FU gibi kemoterapötiklere karşı intrinsik direnç gelişimi ile sonuçlandığı gösteren çalışmalar mevcuttur [55]. Bununla birlikte, NF-κB aktivasyonunun inhibe edilmesi de kemoterapötiklere hassasiyeti artırır ve bu nedenle kemo direnci önlemede inhibitörlerinin sıklıkla araştırılması söz konusudur [24, 56].

2.1.3 Oksidatif stres ve kanser

Kanserleşme ve tümör oluşumu; DNA hasarı, kalıtsal genetik mutasyonlar, hormonlar ve bağışıklık sistemi ile ilişkili koşullar gibi iç faktörlerden kaynaklanabilir [45]. Bazı kanser türleri ise biyomoleküllerin (lipid, protein ve DNA) oksidatif hasarına neden olan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi sonucu gelişir [57]. Enflamasyon kanserlerin çoğunda önemli bir risk faktörü olarak bilinmektedir. Bu durum ilk olarak 1863'te kanser dokularında lökositlerin varlığını keşfeden Dr. Rudolph Virchow tarafından öne sürülmüştür. Kansere yol açan inflamasyona neden olan risk faktörlerinden bazıları sigara kullanımı, asbest, insan papilloma virüsü (HPV), Helicobacter pylori, Hepatit B & C virüsü, Epstein-Barr virüsü ve streptokok [58]. Serbest radikaller sadece hücrenin nükleer ve mitokondriyal bileşenlerine saldırmakla

kalmaz, aynı zamanda lipitler ve proteinler gibi diğer hücrel bileşenlere de saldırırlar ve oksidasyonuna neden olurlar [59]. Kronik inflamasyon nedeniyle, transdüksiyon basamakları ve transkripsiyon faktörleri (örn. NF- κ B) değiştirilerek yüksek seviyelerde ROS ve NO ara ürünleri üretilir [60]. TNF- α , AP-1, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin kronik inflamatuvar koşullar altında ekspresyonu farklı yollara aracılık eder ve tümör oluşumunu destekler [61].

Antioksidanlar hücreleri serbest radikaller olarak da bilinen kararsız moleküllerin neden olduğu hasara karşı korurlar. Nitekim ana kaynağı diyet ile alınan vitamin ve mineraller olan antioksidanlar sayesinde bağışıklık sistemine müdahale ederek kansere neden olan oksidan moleküllerin hasarı önlenbilir [59].

2.1.4 Kanser direnç mekanizmaları

Kanserin tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç kazandığını gösteren ilk ABC proteini (ATP-bağlayıcı kaset) 1976'da tanımlanan P-glikoprotein dir. İnsanlarda bu protein MDR1 geni tarafından kodlanır. Bununla birlikte, P-glikoprotein'in aşırı ekspresyonunun olmadığı durumlarda da çoklu ilaç direnci gözlenebilir. Direnç oluşumunun önemli bir sebebi de apoptoza veya diğer ölüm yollarına hücrelerin gidişinin inhibe edilmesidir. Kemoterapötikler stres yollarını ve PI3K (fosfotidil-3-fosfat kinaz) veya ERK1 (hücre dışı düzenlenmiş kinaz-1) gibi sağkalım yollarını modüle ederek pro- ve anti-apoptotik proteinleri düzenler.

WNT sinyali, embriyonik gelişim ve yetişkin doku homeostazında önemli roller oynayan, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal iletim yoludur. Wnt ligandlarının çeşitli reseptörlerine bağlanması, farklı aşağı akış sinyal yollarını aktive edebilir. WNT / β -katenin sinyali iletimi (kanonik Wnt yolu), en iyi çalışılmış WNT yoludur. CTNNB1 geni tarafından kodlanan β -katenin bu yolda merkezi bir rol oynar. Bu yolda β -katenin hem hücre-hücre yapışmasında hem de gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan çift işlevli bir proteindir. Hücre zarında, β -katenin, epitel hücre katmanlarının bakımı için temel olan yapışık bağlantıyı oluşturan bir protein kompleksinin parçasıdır. Düzensiz WNT sinyali insan kanserlerine neden olur. Artan sayıda çalışma, yüksek WNT sinyalinin kanser tedavisinde ilaç direncine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır.

2.1.5 Kanserde hedefli tedaviler

Kanserde, hastaları tedavi etmenin nihai amacı, tümörün büyümesini ve hastalığın yayılmasını kontrol etmektir. Kanserin patogenezi ve tedavisini anlamada önemli bir ilerleme kaydetmemize rağmen, kanseri tedavi etmek için mevcut geleneksel tedavi rejimi son kırk yıldan beri pek değişmemiş ve henüz tam bir tedavi keşfedilmemiştir. Son zamanlarda araştırmaların çoğu, küçük moleküllerin hedefli iletimi, yeni antikörlerin keşfi, viral terapi ve anti-anjiyogenez ilacı gibi hedefe yönelik tedavi ve uygulamaya odaklanmıştır. Bu teknikler, geleneksel kemoterapi ile ilişkili zayıf çözünürlük, zayıf geçirgenlik, hızlı eliminasyon gibi problemlerin üstesinden gelmektedir [62].

Hedef olmayan organları koruyarak ve kanser hücrelerini öldürerek küçük moleküllerin kanser dokularına/hücrelerine verilmesini iyileştirmek için önemli çabalar mevcuttur. Sağlıklı ve malign hücre arasındaki yapısal, fonksiyonel ve metabolik farklılıklar kanserde hedefli ilaç taşıyıcı sistem tasarlanmasında kullanılır. Taşıyıcı sistemlerin, retikulo endotelyal sistemden (RES) kaçınarak ve ilacın tümör dokularında lokalize olma şanslarını artırarak etkinliğinin artacağı düşünülür. Ayrıca uzun bir sürede meydana gelen ilaç salınımıyla, ilacın daha uzun süreli sistemik dolaşımında bulunduğu gösterilmiştir [63].

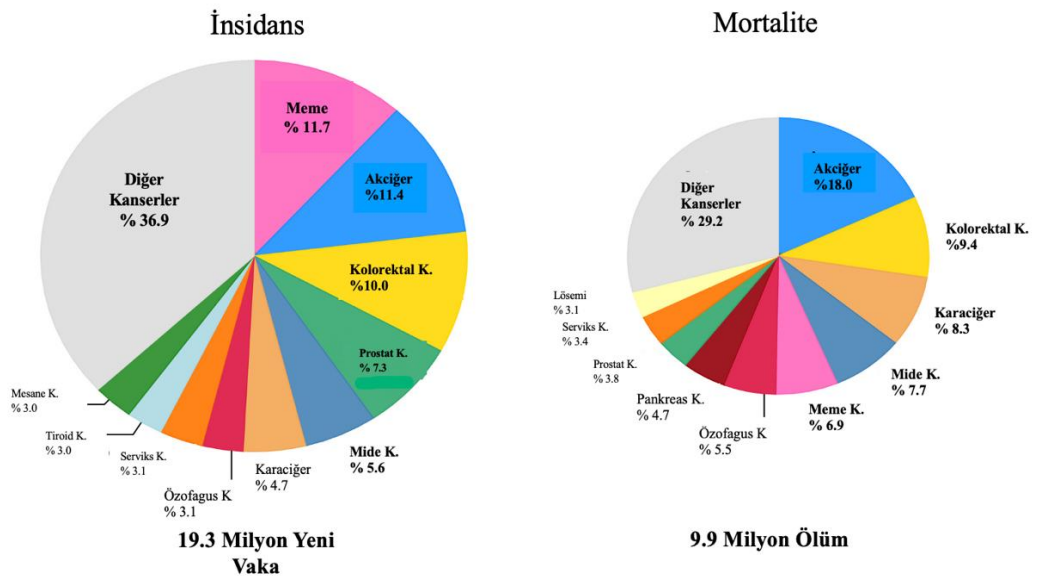
2.2 Kolon ve Rektum (Kolorektal) Kanseri

Kolorektal kanser (KK) terimi, kolon veya rektumda başlayan kanserleri ifade eder. Kolon ve rektum, gastro intestinal sistemin (GIS) kalın bağırsak olarak da adlandırılan alt kısmında bulunur. Kolon, temel görevi dışkıyı oluşturmak, depolamak ve vücuttan atılmasını sağlamak olan uzun kanal şeklindeki yapıdır. Rektum ise kolonun son kısmı ile anal kanal arasındaki kısımdır. Kolon kanserleri ile rektal kanserler pek çok ortak özelliğe sahip olduğu için birlikte değerlendirilmektedir. KK yüksek morbidite ve mortalite riskine sahip bir tür GIS kanseridir [64].

2.2.1 Kolorektal Kanseri Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

KK, dünyada ve Türkiye’de rastlanma sıklığı, morbidite ve mortalitesinin yüksekliğiyle büyük öneme sahip bir kanser türüdür. Şekil 2.2, dünya çapında en sık görülen ilk 10 kanser türü için tahmini vakalar ve ölümlerin oranlarını göstermektedir (Şekil 2.2). Buna göre tüm kanser türleri arasındaki toplam ölümlerin % 9.4’ü ve

görülen vakaların %10'u KK kaynaklıdır [46]. Dünya genelinde her iki cinsiyet için toplamda yılda 1.2 milyon yeni vaka ve yaklaşık 600 bin ölüm rakamları ile üçüncü sırada yer almaktadır [64]. Yine aynı rapora göre KK'in tanı konulduktan sonra 5 yıllık sağ kalım oranı dünya genelinde %64 olarak belirtilmiştir. Her yıl yaklaşık 150 bin ABD vatandaşına KK teşhisi konmakta ve hastaların yaklaşık üçte biri hayatını kaybetmektedir. Nitekim tüm kanser türleri arasında ABD'de ikinci sırada en yaygın ölüm nedenidir. 2030 yılına kadar, dünya genelinde KK yükünün %60 oranında artarak 2,2 milyondan fazla yeni vakaya ve 1,1 milyon ölüme ulaşacağı öngörülmektedir [1, 64, 65].



Şekil 2.2: 2020 verilerine göre en yaygın görülen 10 kanser türünde vaka ve ölüm oranlarının dağılımı [46].

Kolorektal kanser gelişiminin altında yatan etiyolojik faktörler ve patogenetik mekanizmalar son derece karmaşık ve heterojendir. KK oluşumuna sebep olan etmenler ve mekanizmalar, diyet ve yaşam tarzı faktörleri ile kalıtsal ve somatik mutasyonların birikimi ile ortaya çıkan sendromları içerir. Kanser türlerinin etiyolojisinde genetik faktörler genellikle öne çıksa da KK vakalarının yalnızca %10'luk kısmı genetik olarak aktarılır [66]. Yeni teşhis edilen KK vakalarının çoğu sporadik form olarak sınıflandırılır ve hastalığın oluşumu ve gelişimi uzun vadeli bir süreçtir [67]. KK'in erken evresinde, tümör genellikle mukus tabakasının içinde veya altında bulunur. Bu nedenle 5 yıllık sağkalım oranı %80'in üzerindedir. Bununla birlikte, lokal lenfatik metastaz ve uzak organ invazyonu, 5 yıllık sağkalım oranını %50'nin altına düşüren ileri KK'de rol oynar [68]. KK'de en önemli diyet ve yaşam

tarzı risk faktörleri arasında doymamış yağlar ve kırmızı et açısından zengin bir diyet, toplam enerji alımı, aşırı alkol tüketimi ve azaltılmış fiziksel aktivite olduğu görülmektedir [69].

KK insidansı yaşla birlikte artar ve Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'da daha yüksektir [70]. Teşhis konma olasılığı, mutasyon maruziyet süresine bağlı olarak 40 yaşından sonra giderek artarken vakalarının %90'ı 50 yaş ve üzerindeki kişilerde görülür [71]. Ancak son yıllarda KK gençlerde de, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, yağ ve protein ağırlıklı beslenme alışkanlıkları ve sigara içme gibi faktörler nedeniyle daha sık teşhis edilmektedir [72]. KK için genel risk faktörleri arasında ayrıca kalıtsal bağırsak polipozisi, kişide veya ailede KK öyküsü, inflamatuvar bağırsak hastalığı öyküsü (ülseratif kolit veya Crohn hastalığı vb.), Streptococcus bovis bakteriyemi öyküsü ve tip 2 diyabet varlığı gözlenmektedir [73].

2.2.2 Kolorektal kanser mekanizması / patofizyolojisi

Kişinin yaşamı boyunca bağırsak duvarının mukozal yüzeyindeki epitel hücrelerinde oluşan genetik değişiklikler belirli bir süre ve dozda maruziyet sonunda kanserleşmeye sebep olabilmektedir. KK, çok sayıda genetik mutasyonun normal hücre süreçlerini değiştirdiğinde ve hücrelere malign proliferatif, istilacı ve metastatik özellikler verdiği kolon veya rektumun epitel hücrelerinde ortaya çıkar. Menşei bir kök hücre veya kök hücre benzeri hücreden kanserleşme gözlenir ve bir polipten köken alır. Süreç anormal bir kript ile başlar, ardından neoplastik bir öncü lezyona (bir polip) dönüşür ve sonunda tahmini 10-15 yıllık bir süre içinde kolorektal kansere ilerler. Bu kanser kök hücreleri, tümör baskılayıcı genleri etkisiz hale getiren ve onkogenleri aktive eden genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyici birikiminin sonucudur. KK, iyi huylu polipler oluşturmak üzere kontrolsüz bir şekilde çoğalan kolon epitelinin hücre morfolojisindeki değişikliklerle başlar. Yavaş yavaş, atipik bir hiperplastik ileri adenoma dönüşür ve epitelyal yapı ve fonksiyon kaybına neden olarak invaziv bir tümör oluşturur [74]. KK'in öncü lezyonları olan tübüler ve villoz tip adenomlardan sporadik KK'lerin %95'i gelişmektedir ve malignant hale dönüşmeleri için uzun yıllar gerekmektedir [75].

Yaşam tarzı ve çevresel risk faktörlerinde aydınlatılması gereken kısımların aksine, KK'de kalıtsal yatkınlığın altında yatan spesifik gen kusurlarının belirlenmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir. Bu moleküler hatalar iki türde olabilir: onkogenlerin

yeni veya artan fonksiyonuna yol açan değişiklikler ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına yol açan değişikliklerdir [76] (Tablo 2.1).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesine, birincil tümör kütlelerinin oluşumuna ve vaskülarizasyona yol açar. İlerleyen evrelerinde kanser hücreleri, kan ve lenf yoluyla primer lokalizasyonları dışında ikincil tümörlerin oluşabileceği vücudun diğer bölgelerine yayılmaya (metastaz) başlar [77].

Tablo 2.1: KK'de onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde görülen bazı tekrarlayan somatik mutasyonlar [76].

Gen	Mutasyon Çeşidi	Görülme Sıklığı
Onkogenler		
KRAS	Nokta mutasyon (12. 13. 61. kodon)	%40
NRAS	Nokta mutasyon (12. 13. 61. kodon)	< %5
PIK3CA	Kinaz aktivitesini başlatan nokta mutasyon	%15-25
BRAF	Kinaz aktivitesini başlatan nokta mutasyon	% 5-10
EGFR	Gen amplifikasyonu	% 5-15
CDK8	Gen amplifikasyonu	% 10-15
CMYC	Gen amplifikasyonu	% 5-10
CCNE1	Gen amplifikasyonu	% 5
NEU(HER2)	Gen amplifikasyonu	< %5
MYB	Gen amplifikasyonu	< %5
Tümör Baskılayıcı Genler		
p53	Nokta mutasyon, allel kaybı	% 60-70
APC	Çerçeve kayması, nokta mutasyon, delesyon, allel kaybı	% 70-80
FBXW7	Anlamsız ve kayıp mutasyon, delesyon	% 20
PTEN	Anlamsız mutasyon, delesyon	% 10
SMAD4	Anlamsız mutasyon, delesyon, allel kaybı	% 10-15
SMAD2	Anlamsız mutasyon, delesyon, allel kaybı	% 5-10
SMAD3	Anlamsız mutasyon, delesyon	% 10-15
TGFβ11R	Çerçeve kayması, anlamsız mutasyon	% 5
TCF7L2	Çerçeve kayması, anlamsız mutasyon	% 10
ACVR2	Çerçeve kayması	% 5

2.2.3 Kolorektal kanserde teşhis ve tedavi

Kanser karmaşık bir hastalık sürecidir ve tek bir tedavisi yoktur. Tedavinin yönetimi, tümörün yeri ve evrelemesine ayrıca hastanın genel durumuna bağlıdır. Günümüzde cerrahi rezeksiyon, klinik olarak özellikle erken evrede KK için hala ana etkili tedavilerden biridir. Bununla birlikte, ilerlemiş KK'de cerrahi rezeksiyon, radyoterapi veya kemoterapiye yardımcı olmak için kullanılır [78, 79]. Bu tedavi yaklaşımları, tek başına veya diğer tedavi yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanabilir.

Cerrahi rezeksiyon en etkili tedavi yöntemi olsa da tam bir çıkarma olup olmayacağı sorgulanmıştır. Ayrıca bazı tümör kitlelerinin ulaşamayacak derinlikte bölgelere yerleştiği için çıkarılması zordur [80]. Radyoterapi sadece kanser hücrelerini

öldürmekle kalmaz, normal hücrelere de zarar verir [79]. Kemoterapinin en büyük dezavantajı ise kanser hücrelerine ulaşan ilaç miktarının tümörü küçültme veya yok etmede yetersiz olması ve sitotoksik bir ilaç olarak sağlıklı hücreleride etkilemesidir [77]. Bunun dışında, değiştirilmiş biyotransformasyon ve biyo-dağılım, kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişimi, toksisite ve ilaç klirensi ile ilgili sorunlar da söz konusudur [52, 77]. Kemoterapi, cerrahi tedavi ve radyoterapi ile kanserle mücadelede tercih edilen temel terapötik yaklaşımlardan biridir ancak kemik iliği, mide, bağırsak, karaciğer, böbrek vb. sağlıklı dokulara zarar veren ciddi yan etkileri nedeniyle sınırlı bir başarıya sahiptir. Bu yan etkilere rağmen KK hastalarının sağ kalımını arttırmaktan dolayı belirli kemoterapötikler klinisyenler tarafından sıklıkla tercih edilmektedir [81].

Mevcut kılavuzlarda ileri evre KK hastalarında 5-FU'e direnç gelişimi ve tedaviye cevabın azalmasından ötürü Oksaliplatin (Eloxatin), irinotekan (Camptosar) ve kapesitabin (Xeloda) gibi daha yeni kemoterapötiklerle veya Lökovorin vitamini ile kombinasyon protokolleri uygulanarak kemoterapi büyük ölçüde ilerletilmiştir. Bununla birlikte bevacizumab ve setuksimab gibi monoklonal antikorların ortaya çıkması da tedavi seçeneklerini arttırmaktadır [42]. Anjiyogenezi hedef alan bir anti-VEGF monoklonal antikor olan Bevacizumab, metastatik kolorektal kanserinde onaylanan ve bu tür kansere sahip tüm hastalara fayda sağladığı gösterilen ilk biyolojik ajandır. Daha sonra, diğer kemoterapi protokollerine bevacizumabın eklenmesinin sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. Daha sonra metastatik KK'li hastalarda kullanımı onaylanan diğer anti-VEGF ajanları arasında aflibercept ve ramucirumab yer almıştır.

2.3 Kolorektal Kanserin 5- Flourourasil (5-FU) ile Tedavisi

Kolon ve rektum kanserleri yüksek insidansı ve mortalitesi nedeniyle bilim insanları tarafından güncel tedavi yaklaşımları aranan bir kanser türüdür. Günümüzde KK tedavisinde 5-FU sıklıkla kullanılmakla birlikte yaygın görülen yan etkilerinden ve karşılaşılan ilaç direncinden dolayı yeni tedavi arayışları devam etmektedir. Çeşitli sistemik kombine kemoterapi protokolleri ile mevcut yanıt oranı %50'ye ulaşsa bile çoğu hasta 3 ila 12 ay içinde direnç geliştirir [82].

2.3.1 Kemoterapi ajanı 5-FU'nun etki mekanizması

Günümüzde kolorektal kanser tedavisinde hem ileri hem de erken evrede en yaygın tercih edilen antimetabolit ilaç, bir urasil analogu olan 5-Flourourasil (5-FU) dir [21].

Metastatik kolorektal kanser tedavisinin yanı sıra başka tür kanserlerde de tek başına veya başka kemoterapötikler ile kombinasyon halinde kullanılır [83, 84]. 5-FU, S fazında aktif bir kemoterapötik ajandır nitekim hücreler G0 veya G1 fazında iken hiçbir aktivite göstermez. Hücresel yollarda değişiklik yaparak DNA hasarını teşvik eder ve metaboliti olan 5-florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP) aracılığıyla timidilat sentaz enzimini bloke ederek kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder [85]. FdUMP, timidilat sentetaz ve 5,10-metilen tetrahidrofolat ile kovalent bir üçlü kompleks oluşturur. Kanserde 5-FU tedavisinin, FdUTP 'nin (Fluorodeoksiüridin trifosfat) DNA'ya yanlış bağlanması nedeniyle S fazı sırasında DNA hasarına, özellikle çift sarmallı kopmalara neden olduğu bilinmektedir.

5-FU, timidin fosforilazın (TP) etkisiyle 5-florouodeoksiüridin'e (5-FUdR) dönüştürülür. 5-FUdR daha sonra timidin kinaz (TK) tarafından 5-florodeoksiüridin monofosfata (5-FdUMP) dönüştürülür. 5-FdUMP, timidilat sentaza (TS) bağlanmak için deoksiüridin monofosfat (dUMP) ile rekabet ederek DNA sentezini inhibe eder. Orotat fosforibosiltransferaz (OPRT) ile 5-fluorouridin monofosfata (5-FUMP) metabolizmasını ve ardından 5-fluorouridindifosfat yoluyla 5-fluorouridin trifosfata (5-FUTP) dönüşümünü içeren bir yol aracılığıyla RNA sentezini, işlenmesini ve işlevini inhibe eder. Ardından 5-FU, dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) tarafından başlatılan sıralı enzimatik adımlarla katabolize edilir ve etkisiz hale getirilir [86].

2.3.2 5-FU tedavisinin yan etkileri

Anti-kanser ajanların genel yan etkilerinin yanı sıra, 5-FU kullanan hastalarda hepatotoksisite, gastrointestinal toksisite, mielosupresyon ve genotoksisite oldukça sık gözlenmektedir. Kemoterapötik ajan 5-FU alan hastaların üçte birinde gastrointestinal toksisite nedeniyle yaşamı tehdit eden ishale rastlanmıştır. Neticede 5-FU dozuna bağlı toksisiteyi azaltmak için yeni terapötik stratejilere ve kombine tedavi protokollerine ihtiyaç vardır.

2.3.3 5-FU ve ilaç direnci

Kanser yaşamı tehdit eden ve mevcut tedavilerin yetersiz kaldığı bir hastalıktır. Hedefli kanser tedavileri ile büyük ilerlemeler kat edilmiş olsa da halen pek çok önlenemeyen advers etki ve ilaç direnci oluşumu izlenmektedir [13]. Kolon kanserinin kemoterapötikler ile tedavisinde, etkinliğinin önündeki en önemli engel hastaların ilaca karşı geliştirdiği dirençtir. Nitekim 5-FU bazlı kemoterapi rejimleri, ilerlemiş KK

vakalarının yalnızca %10-16'sı için terapötik olarak etkilidir [79]. Kanser hücrelerinin belirli bir ilaca direnci kısmen apoptoza direncinden kaynaklanmaktadır. 5-FU'in antikanser etki mekanizması da apoptozu indüklemesidir [48].

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B), insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü (IGF-1R), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), siklooksijenaz-2 (COX-2), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT 3), kromozom 10'da silinen fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), timidilat sentaz (TS) overekspresyonu vb gibi bazı moleküller ve genler kanser hücrelerinin 5-FU'ya karşı kemo direnci ve duyarlılığı ile ilişkilidir [83]. Bu moleküllerin ve genlerin ifadesinin kanser hücrelerinde aktivasyonu, 5-FU'ya uzun süreli maruziyet ile artacak veya azalacaktır [35]. Neticede 5-FU dozuna bağlı toksisiteyi ve ilaç direncini azaltmak için yeni terapötik stratejilere ve kombine tedavi protokollerine ihtiyaç vardır [21, 87].

Epitelyal-mezenkimal geçişinde (EMT) KK'in 5-FU'ya direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. EMT, tümör hücrelerinin etrafında, yani lenf damarları ile kan damarları arasındaki bağlantının etrafında meydana gelir ve tümör hücrelerinin lenf damarlarına veya kan damarlarına veya uzak organlara yayılmasına katkıda bulunan parakrin yolu ile yeniden oluşturulur. EMT ilerlemesinin, WNT sinyal yolu tarafından indüklendiği bilinmektedir [88]. Literatürde *in vitro* kurkumin uygulamasının WNT proteinleri TCF-4 ve Axini aşağı regüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca tümör hücrelerinin epitelyal ilişkili genleri olan E-cadherin ve β -katenin de doza bağlı bir şekilde aşağı regüle edilmiştir. Bu veriler, kurkuminin WNT sinyal yolunu önemli ölçüde engelleyebileceğini ve EMT ilerlemesini tersine çevirebileceğini göstermektedir [89].

2.4 Kanserde Bitkisel Tedavi

Bitkisel kaynaklı doğal bileşikler pek çok terapötik kullanım alanının yanında kanser tedavisinde de önemli bir kaynak olarak görülmekte ve araştırılmaktadır. Nitekim 2010 yılına dek onay almış küçük moleküllü anti kanser ilaçların yalnızca %20,2'si sentetik kategorisinde sınıflandırılırken geri kalanlar doğal üründür veya doğal kaynaklı etken maddeler örnek alınarak geliştirilmiştir [9]. Kanser tedavisinde her evrede tedaviye destek olabilmeleri, toksik olmamaları, çok hedefli olmaları ve genellikle ilaçlarla sinerjik etki göstermeleri doğal terapötikleri çok önemli kılmaktadır. Çok sayıda anti kanser ilacın, tamamlayıcı tıp ürünü doğal bileşiklerle

kombinasyon kemoterapisi, uygulanan ilaç dozunu azaltarak ilaca karşı direnci ve ilaç toksisitesini hafiflettiği için tercih edilmektedir.

Herhangi bir kanser türü, 300 ila 500 arası genin modifikasyonu ile ilişkilidir ve kanser fenotipi hücre sinyal yollarının deregülasyonu ile karakterize edilir. Bu nedenle, tümörleşme ve kanser oluşumunun geriletilmesi, çok hedefli tedavilerin geliştirilmesini gerektirir [90]. Kanser araştırmalarından çıkarılan genel sonuçlardan biri, kanserin kombine tedavi stratejilerinin, özellikle ilaçların etki tarzları farklıysa, mono terapi rejimlerine göre güvenlik ve etkililikte dramatik iyileşme sağladığıdır [7]. İlaç ve beraberinde başka bir tür ilaç veya bitkisel etken madde kombinasyonu çoklu mekanizma ve yolları etkilediği için tedaviyi daha etkin kılmaktadır. Bununla birlikte, adjuvan tedavinin sinerjistik etkili olduğunu terapötik etkinin artması, daha düşük doz kemoterapi ile toksisiteyi azaltarak aynı etkiyi sağlaması, ilaç direnci gelişimini azaltması ve hedefe karşı seçici sinerjizm sağlanması gösterir. Bu durum yeni ilaç kombinasyonlarının araştırılması ve tedavi etkinliğini arttırmada adjuvan etkili bileşiklerin kullanılmasını sağlamaktadır.

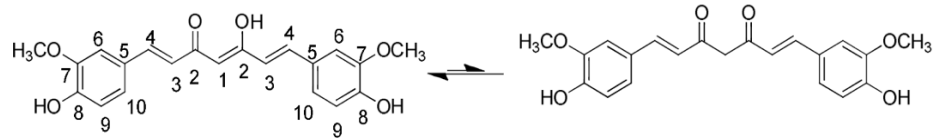
2.4.1 Anti kanser etken madde olarak kurkumin

Curcuma longa, *Zingiberaceae* familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Zerdeçal olarak da bilinen *C. longa* bitkisinin rizomu, kısa dalları olan dikdörtgen bir şekle sahiptir (Şekil 2.3a). Kurkuminin keto ve enol tautomerik konformasyonda denge halindedir. Keto formu asidik ve nötr koşullarda ana biyoaktif bileşendir ve tüm fazlarda stabildir ancak bazik durumlarda kurkumin enol formundadır (Şekil 2.3b) [91]. Kurkuminoidler, *Curcuma longa* L.'nin kurutulmuş rizomlarından elde edilen polifenollerdir. Bunlardan en temelde kurkumin olmakla birlikte, demetoksikurkumin (DMC) ve bisdemetoksikurkumin (BDMC) polifenolleri de belirli oranlarda bulunur (Şekil 2.3c) [11, 92]. Kurkumin bitkinin parlak sarı renginden sorumlu olan maddedir [98]. Kurkuminin moleküler ağırlığı 368.38, erime noktası 179-183 °C aralığında ve kimyasal formülü $C_{21}H_{20}O_6$ 'dır. Kimyasal yapısı iki metoksi grubu, iki fenolik hidroksil grubu ve üç çift konjuge bağ içerir. Kurkumin DMSO, etanol ve aseton gibi organik çözücülerde suda (yaklaşık 0.6 ug/mL) olduğundan daha fazla çözünür [90, 93]. Kurkumin Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (U.S. FDA) tarafından genel olarak güvenli kabul edilmiş (GRAS: Generally Recognised as Safe) maddeler listesine dahil edilmiştir. Ortalama günlük 60 ila 100 mg kurkumine eşdeğer, 2 ila 2.5 gram aralığında oral zerdeçal ekstresi alımının sonucunda herhangi bir toksisiteye

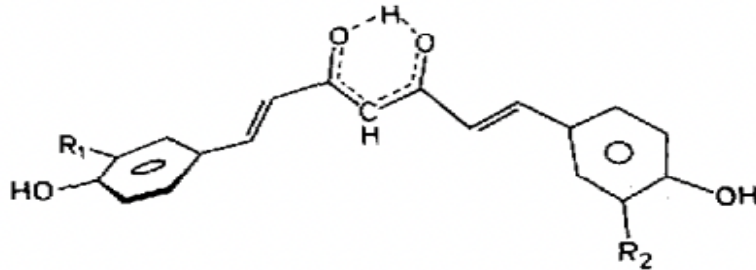
rastlanmadığı rapor edilmiştir [94]. Bunun yanında kanser hastalarında yapılan uzun süreli bir klinik çalışmada 8 gram/gün kurkumin dozunun ve sağlıklı gönüllüler ile yapılan başka bir klinik çalışmada günde 12 gram/gün oral kurkumin alımının son derece iyi tolere edildiği ve toksik olmadığı gösterilmiştir [101, 102].



a)



b)



c)

R1=R2=OCH₃, Kurkumin

R1=OCH₃ R2=H, Demetoksikurkumin

R1=R2=H, Bisdemetoksikurkumin

Şekil 2.3: Zerdeçal bitkisi a) Zerdeçal bitkisine ait rizom ve toz formu b) Kurkumin etken maddesinin kimyasal yapısı, keto ve enol formları c) Kurkuminoidler; demetoksikurkumin (DMC) ve Bisdemetoksikurkumin (BDMC) molekülleri [95].

Zerdeçal, MÖ 1900'den beri asya tıbbı ve ayurvedik tıpta yaralar, ağrılar, gastro intestinal sistem bozuklukları, nörolojik psikolojik hastalıklar ve karaciğer bozuklukları dahil olmak üzere çok çeşitli durumları tedavi etmek için antioksidan, anti inflamatuar ve antimikrobiyal etkileri ile kullanılmıştır (Şekil 2.4) [61].

Kurkuminin anti-kanser ajan olarak düşünülmesinin altında diyetle zerdeçal alımı ve gastro intestinal kanser insidansı arasında epidemiyolojik olarak negatif bir korelasyon bulunması vardır [90]. Bununla birlikte yapılan in vitro ve in vivo deneysel çalışmalar kurkuminin yüksek dozlarda bile toksik olmadığını göstermektedir [96]. Zerdeçal bitkisinde gösterilen biyolojik aktivitelerin çoğunluğu, çok sayıda farmakolojik etkinliğe sahip olduğu gösterilen kurkuminden kaynaklanmaktadır. Geleneksel kullanımının haricinde etken madde olarak kurkuminin kanser hücreleri üzerinde hücre döngüsünü durdurucu (Siklin D1 ve G1, S, G2/M kontrol noktaları ile), proliferasyona müdahale edici (EGFR ve AP-1), inflamasyonu giderici (NF-κB transkripsiyon faktörü) ve apoptozu başlatıcı (kaspaz aktivasyonu ve anti-apoptotik genlerin aşağı regülasyonu ile) etkinliği olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli organ ve dokularda kanserleşmeyi önleyen iyi bir kemopreventif ajandır [97]. Kurkuminin hemen hemen tüm tümör hücrelerini bir düzeyde inhibe ettiği kabul edilir [41].



Şekil 2.4: Kurkumin bileşiğine ait genel farmakolojik ve terapötik etkinlikler.

Kurkumin'in gösterdiği anti kanser ve sitotoksik etkinin temelinde apoptoz indüklenmesi yer alır. Kurkumin anti apoptotik Bcl-2 ailesine ait proteinlerin ekspresyonunu azaltırken, apoptotik p53, Bax, prokaspaz 3, 8 ve 9'un ekspresyonunu artırır. Hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ve Bcl-2 ve survivin gibi hayatta kalma faktörlerinin ekspresyonunu azaltır. Bununla birlikte NF-κB'nin çekirdeğe translokasyonunu engeller. Ayrıca siklin D1, cdk-1 ve cdc-25'in ekspresyonunu engeller ve bu sayede hücre döngüsünü durdurur. Kurkumin COX-2, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve hücreler arası adezyon molekülünün (ICAMs)

ekspresyonunu baskılar. Buna karşın metalloproteaz-2'nin doku inhibitörü (TIMP-2) ve E-kadherin gibi antimetastatik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir [98]. Buna göre kurkuminin tümörleşmenin farklı aşamalarında çok çeşitli modülasyonlar (transkripsiyon ve büyüme faktörleri, reseptörler, enzimler, genler vb.) yoluyla etkili olduğu anlaşılmaktadır.

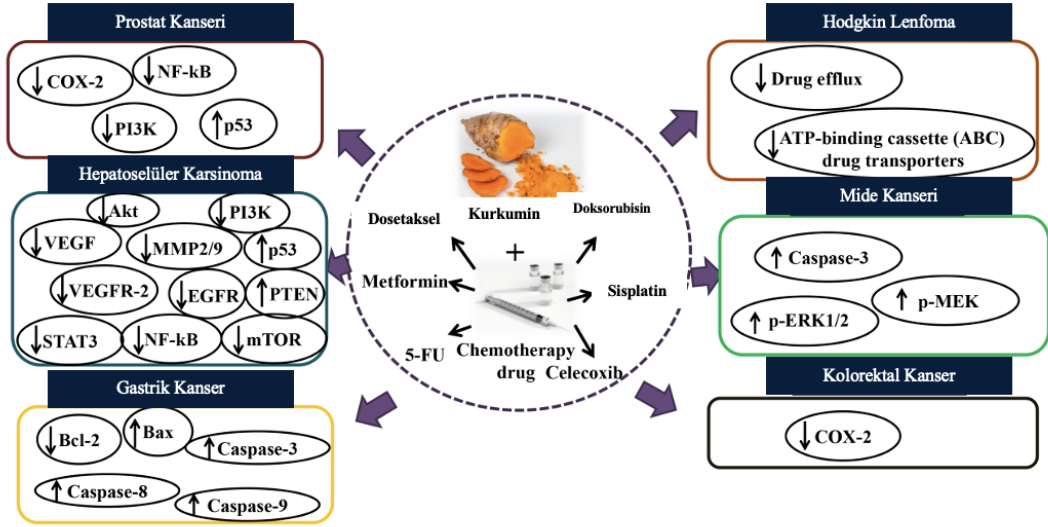
Kurkumin'in yapılan çok sayıda prelinik çalışma sonucunda kemoterapinin etkinliğini arttırdığı ve sağlıklı hücreleri kemoterapi kaynaklı toksisiteden koruduğu bildirilmiştir. İleri kolorektal kanser hastalarında günlük 36 ila 180 mg oral kurkumin alımının hastalığın stabil seyrini sağladığı gösterilmiştir [99]. Ayrıca artan dozlarda oral kurkumin (450 ila 3600 mg/gün) alan hastaların dört ay boyunca takip edildiği çalışmada hastalığın stabil kaldığı gösterilmiştir [100]. Kolorektal kanser tanısı almış 126 hasta ile yapılan daha yeni bir klinik çalışmada ise günlük 360 mg oral kurkumin uygulaması sonucu bir ayda kanser hücrelerinin apoptoza uğradığı gösterilmiştir [101].

2.4.1.1 Kurkumin kemoterapiye hassasiyeti artırıyor

Kapsamlı çalışmalar, kurkumin'in farklı mekanizmaları hedef alarak kanser hücrelerine karşı sitotoksositeye neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte kurkumin kombinasyon kemoterapisinin sinerjik etkinliği artırma olasılığı daha yüksektir. Bu da kemoterapötik ilaç konsantrasyonlarını azaltabilir ve böylece ilaçların yan etkilerini azaltır [102]. Doksorubisin, irinotekan, 5-florourasil, sisplatin ve paklitaksel gibi kemoterapötik ilaçlar kanser tedavisinde uygulanmaktadır. Şekilde çeşitli kemoterapi ajanları ile kombinasyon halinde uygulanan kurkumin'in hangi kanser türlerinde hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla etki gösterdiği özet olarak sunulmuştur (Şekil 2.5).

Kurkumin'in bir kemoterapi ajanı ile kombine halde veya yüksek dozda tek başına tümör hacmini küçülttüğü ve metastatik özelliğini azalttığı gösterilmiştir. Bu doğrultuda kurkumin ve 5-FU 'in kombine kullanımının kolorektal kanser tedavisinde normalde kullanılan kemoterapi dozunu düşürerek daha yüksek anti-tümör etkinliği göstermesi beklenmektedir [8, 35, 36]. Yapılan çalışmalarda 5-FU tedavisi uygulanan kolorektal kanserli hastalarda sıklıkla çoklu ilaç direnci gelişmektedir. Kurkumin ile ön tedavi uygulanan kolon kanseri hücrelerinde ise 5-FU'nun kemo hassasiyetinin arttığı gösterilmiştir [103]. Kurkumin ile 5-FU/oksalipatin kombinasyonu uygulanan mide kanseri (BGC-823) hücre hattında sinerjistik anti tümör aktivite göstermiş, Bcl-

2 ifadesini aşağı regüle ederek, Bax ve kaspaz-3, 8 ve 9 ifadelerini aktive ederek anti kanser etkiyi arttırmıştır [104].



Şekil 2.5: Kombine kurkumin ve kemoterapi ilaçlarının etki mekanizmaları [8].

In vitro çalışmalardan elde edilen veriler ile, kurkuminin (20 μ M) insan mide kanseri hücrelerinde NF- κ B sinyal yolunun baskılanmasıyla hücreleri 5-FU'ya duyarlı hale geldiği gösterilmiştir [56]. NF- κ B, hücrelerde inflamasyon, hücre proliferasyonu, apoptoz ve kemoterapötiklere karşı direncin baş kontrolörüdür. Kurkumin, NF- κ B'nin aktivitesini baskılama potansiyeline sahiptir, bu da tümör oluşumunda yer alan ve NF- κ B tarafından düzenlenen birçok genin (örneğin TNF, COX-2, siklin D1, c-myc ve interlökinler) aşağı regülasyonu ile sonuçlanır. Kurkumin'in yapısal NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek, tümör hücrelerinde apoptozu indükleyebildiği ve kemoterapiye karşı gelişen direncin düşüşünü sağladığı belirtilmiştir [16, 105]. Kurkumin aynı zamanda KK'de aşırı eksprese olan ve BCL-2 proteinini yukarı regüle ettiğinden ötürü apoptozu inhibe eden COX-2'nin inhibisyonunu sağlar [103, 106]. KK'de NF- κ B ve COX-2 proteinleri kanser hücrelerinin 5-FU'ya karşı kemo direnci ve duyarlılığı ile ilişkilidir [107, 108]. Dirençli insan kanser hücre hatlarında *mdr1* geni ve P-gp proteini aktivasyonunun arttığı ve Kurkumin ile bu aktivasyonun inhibe edildiği bilinmektedir [37]. Çünkü Kurkumin NF- κ B protein alt birimlerini zaman ve doz bağımlı olarak inhibe etmektedir. Bu ilaç direnci mekanizmasının kurkumin tarafından inhibe edilmesine, NF- κ B'nin doğrudan *mdr1* geninin promotor bölgesine bağlanması ve *mdr1b* gen transkripsiyonunun engellenmesi neden olmaktadır [100]. Mdr geni tarafından kodlanan P-gp ekspresyonu sıklıkla kanser hücrelerindeki,

kemoterapötik ilaçlara karşı çoklu ilaç direnci (MDR) ile ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada, kurkuminin çoklu ilaca dirençli L1210 / Adr hücrelerinde P-gp ifadesini aşağı regüle ettiği gösterilmiştir [109].

Klinik olarak onaylanmış ve metastatik prostat kanserinde sıklıkla kullanılan dosatakselin uzun süreli tedavide hastalarda ciddi toksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Banerjee ve ark. dosataksel ve kurkumin kombine tedavisinin, prostat kanseri (DU145 ve PC3) hücrelerinde proliferasyonu ve indüklenmiş apoptozu önemli ölçüde inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca kurkumin'in COX-2, p53, NF-kB, fosfo-Akt, PI3K ve reseptör tirozin kinazın (RTK) modülasyonu yoluyla PC-3 hücrelerinde dosataksel'in etkinliğini arttırdığını göstermiştir [110].

Klinik çalışmaların yer aldığı online kaynağa göre halihazırda, kansere karşı kurkumin ile ilgili 78, kolon kanserine karşı 9 girişimsel çalışma yürütülmektedir. Buna rağmen kanserde kurkumin nanopartiküllerinin kullanıldığı bir klinik çalışmaya rastlanmamıştır. Örneğin kurkuminin, hasta kaynaklı kolorektal karaciğer metastaz kültürlerinde FOLFOX bazlı kemoterapiyi (oksaliplatin + 5-FU) iyileştirdiği bulunmuştur. Faz I çalışması sonuçlarına göre, kolorektal karaciğer metastazı olan hastalarda günlük 2 g'a kadar kurkumin'in FOLFOX kemoterapisi ile kombinasyon halinde güvenli ve tolere edilebilir olduğunu göstermiştir [111].

2.4.1.2 Kurkumin biyoyararlanımı problemi

Kurkumin ve metabolitlerinin sağlık alanında uygulaması, düşük suda çözünürlüğü, zayıf absorpsiyonu, hızlı *in vivo* metabolizması, düşük kimyasal stabilitesi, hızlı sistemik eliminasyonu ve sınırlı kan-beyin bariyeri (BBB) geçirgenliği (normal gastrik pH:1,5-4 'da 0,4 µg/mL) nedeniyle sınırlıdır [96].

Kurkumin polar ve non-polar organik çözücülerde çözünen lipofilik bir maddedir ancak sulu çözeltilerde neredeyse hiç çözünmez olarak tanımlanır [12]. Fenolik gruplarının iyonizasyonu sayesinde alkali sulu çözeltilerde çözünse dahi hızla degradesi olarak stabilitesini kaybeder [117]. Bu nedenle fizyolojik pH'ta ve sulu çözeltilerinde düşük stabiliteye sahiptir. Öyle ki pH 7.4'teki fosfat tamponunda, kurkuminin yaklaşık %90'ının 30 dakika içinde bozulduğu gösterilmiştir [118].

Fizyolojik koşullarda stabilitesini kaybetmenin yanında kurkuminin ayrıca *in vivo* koşullarda hızla metabolize olduğu ve bu durumun uygulama yolu fark etmeksizin ilacın plazma konsantrasyonunu ciddi manada azalttığı bilinmektedir. Kurkumin'in GIS boyunca zayıf emilim göstermesi, karaciğerde yaygın ilk geçiş metabolizmasına

uğraması ve vücuttan hızlı eliminasyonu serum konsantrasyonunu hızla düşürür [11], [12]. Kurkumin absorpsiyon sonrası glukuronidasyon ve sülfatlanma sonucu plazmada genellikle major metabolitleri (%99 glukuronit konjugatı) olarak bulunur [104]. Çalışmalar yüksek kurkumin dozlarında bile, serum ve dokuda kurkumin ve *in vivo* metabolit seviyelerinin kısa bir süre sonra son derece düşük olduğunu göstermiştir [12]. Örneğin, sağlıklı gönüllülerde yapılan bir toksisite çalışmasında tek sefer oral kurkumin uygulanmasından (0.5 ila 8 gram aralığında) 1 saat sonra serumda kurkumin tespit edilmedi. Yüksek doz (12.000 mg) uygulanan gönüllülerde ise kanda son derece düşük kurkumin seviyeleri tespit edildi [103]. İlerlemiş kolorektal kanserli hastalarda yapılan çalışmada ise 29 güne kadar 2200 mg/gün oral zerdeçal ekstresi uygulandıktan sonra deneklerin plazmasında veya idrarında ne kurkumin ne de *in vivo* metabolitleri bulunamamış, ancak dışkıda düşük miktar saptanmıştır [107]. Benzer şekilde KK hastalarında 3600 mg kurkumin alımı sonrası sağlıklı ve malign dokudaki kurkumin konsantrasyonları sırası ile $12.7 \pm 5,7$ ve $7,7 \pm 1,8$ nmol/g olarak belirlendi ve bu dozlar protein düzeyleri üzerine etkisi ölçülerek farmakolojik olarak etkili bulundu [12]. Sonuç olarak klinik çalışmalarda gözlemlenen kurkumin etkinliğinin beklenenin altında olması biyoyararlanımı ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte kurkuminin *in vitro* emilimini değerlendirmek için bağırsak hücre modeli olarak Caco-2 tekli hücre tabakasını kullanan çalışmalar da düşük miktar kurkumin taşınması yani düşük biyoyararlanım sonucunu elde etmiştir [112].

Nano kurkumin, serbest kurkuminin aksine, sulu ortamda kolayca dağılır ve belirgin bir stabilite artışı gösterir. Bu sistemler genel olarak oral biyoyararlanımı iyileştirmek, hedef dokularda ilaç etkisini sürdürmek, *i.v.* uygulama için ilaçları çözmek ve terapötik ajanların enzimatik bozunmaya karşı stabilitesini geliştirmek için kullanılabilir [113]. Bununla birlikte, bitkisel etken maddelerin doğasında var olan sorunları ele almak için nano teknolojinin kullanımı, bu bileşikler yalnızca gıda takviyeleri olarak pazarlandığından ve daha az yatırım yapıldığından fazla ilgi görmemiştir. Kurkuminin önceki bölümlerde bahsi geçen anti kanser etkileri gösterebilmesi için vücut içinde dağılan ve tümör bölgesinde tutulan kurkumin miktarının yüksek olması gerekmektedir ancak biyoyararlanımının zayıf olması doğal bileşiğin klinik etkinliğini sınırlandırır [10]. Bu sorunları çözmek için birçok farklı formülasyon geliştirilmiştir [28, 29]. Genel olarak, bu yenilikçi mekanizmalar, kimyasal stabilitesini ve çözünürlüğünü ayrıca geçirgenliğini ve doku dağılımını artırarak kurkuminin biyoyararlanımını geliştirir [30, 31].

Günümüzde pek çok nano kurkumin formülasyonu bildirilmiştir ancak bunlardan yalnızca bazıları *in vivo* incelenmeye aday olarak gösterilebilmiş ve klinik çalışması yapılmıştır. Aşılması gereken zorluklara rağmen, kurkumin nano formülasyonları mükemmel biyolojik ve farmakolojik aktivite ve ilaca dönüşmesine yol açabilecek düşük yan etkiler gibi çok sayıda avantaja sahiptir. Bu durumda daha iyi biyoyararlanma sahip, etkinliği ve terapötik indeksi yüksek kurkumin nano ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması bilimsel gelişmeye önemli bir katkı sunacaktır.

2.5 Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler

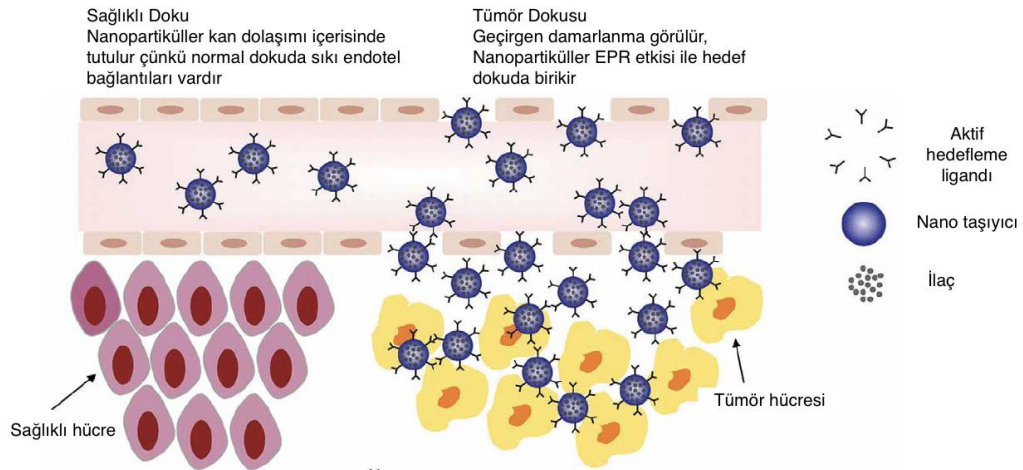
Kanser tedavisinde yenilikçi yöntemler bulmak dünya çapında büyük bir araştırma sorusudur. Kanser tedavisinde karşımıza çıkan yenilikçi yöntemlerin sayısındaki artış ile bazı kanser türlerinin tedavi imkânı büyük ölçüde iyileşmiştir. Kemoterapi tedavide ilk basamağı oluşturan, hızla büyüyen hücreleri sağlıklı veya kanserleşmiş olmasını ayırt etmeden öldürmeyi hedefleyen, geleneksel tedavi metodudur. Ancak bu durum pek çok yan etkiyi de beraberinde getirir [114]. Bu nedenle hedef tümör bölgesine sağlıklı hücelere kıyasla daha yüksek bir oranda ulaşan taşıyıcı sistemlerin tasarlanması kanser araştırmalarında öncelikli konu haline gelmiştir [115].

Nano partiküller hedef bölgeye aktif madde taşıma görevi ile oluşturulduğunda ve *in vivo* etkinliği için kullanıldığında nano ilaç taşıyıcı sistem (NDDS) veya nano taşıyıcı olarak adlandırılır. İdeal ilaç taşıyıcı sistem biyolojik olarak güvenli olmalı ve kapsüllenmiş aktif bileşiğin etki yerinde salınmasını kolaylaştırmalıdır. Bu sayede kapsüle edilmiş aktif maddenin potansiyel olumsuz etkilerini en aza indirmelidir. Salımı kontrol etme yetenekleri sayesinde bu tür dağıtım sistemlerinin, zayıf çözünürlük, zayıf geçirgenlik, hızlı eliminasyon ve hızlı metabolize olma gibi aktif bileşenle ilişkili bazı sorunları iyileştirmesi böylece gerekli ilaç dozunu azaltması ve etkinliği artırması beklenir [13]. Terapötik ve tanı amaçlı kullanılan ajanlar, bu tür nano taşıyıcılar içerisinde kapsüllenebilir, kovalent olarak bağlanabilir veya adsorbe edilerek taşınabilir.

Nanopartikül bazlı ilaç taşıma sistemleri hedefe yönelmesi açısından pasif ve aktif olarak ikiye ayrılır:

Pasif hedefleme, artırılmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisinin sonucudur (Şekil 2.6). NP'lerin kanser hücrelerini pasif olarak hedeflemesini sağlayan esas olarak, artan vasküler geçirgenlik ve zayıflamış lenfatik drenajdır [115]. Bir tümör büyüdükçe daha

fazla beslenme ve oksijen gereksinimi duyar. Sonuç olarak, tümör hücreleri, besinleri ve oksijeni taşımak için tümör bölgelerinin yakınındaki kan damarlarını büyütmek için (anjyogenez) sinyaller verir. Bu yeni gelişen kan damarları kontrolsüz büyür, endotel hücreleri normal dokuya nazaran daha geniş aralıktır ve genellikle sağlıklı dokulardaki kan damarlarından daha yüksek geçirgenliğe sahiptir. Bu aralık tümör çevresindeki enflamasyona bağlı olarak 200 nm ile 800 nm arasında değişim göstermektedir. Sağlıklı dokularda ise bu aralık 5-15 nm seviyesinde kalmaktadır. Bu sayede, yalnızca belirli boyuttaki ilaç taşıyan nanopartiküller endotel hücreleri arasındaki boşluklardan geçebilir, orada salım yapar ve ilacın sadece kanserli dokuda lokalize olmasına izin verir. EPR etkisi, NDDS'in boyutuna ve kan damarlarındaki boşluklara bağlıdır. Nitekim küçük partiküller de normal vaskülatürden (10 nm'den daha az) kolayca sızarak normal hücrelere zarar verebilir ve böbrekler tarafından kolayca filtrelenebilir. Ancak 200 nm'den büyük nano taşıyıcıların fagositler tarafından dolaşımdan temizlenmesi muhtemeldir. Sonuç olarak, boyutu ayarlanmış nano taşıyıcılar içerisindeki ilaçlar vücuda dağılmak yerine etkilenen bölgede pasif olarak birikebilir. Böyle bir durumda anti kanser ilaç daha düşük dozda daha yüksek aktivite gösterecektir. Bu durum nanopartiküllerin EPR etkisine (Şekil 2.6) dayanan pasif hedeflendirilmesi olarak bilinir [63, 116].



Şekil 2.6: Sağlıklı doku ve tümör dokusu arasındaki farka bağlı olarak NP'lerin kanser hücrelerine pasif veya aktif hedeflenmesi [124].

Aktif hedefleme, kimyasal konjugasyon veya yüzey modifikasyonu yoluyla hedef bölgeye doğrudan yönelen veya biriken ya da yalnızca hedef bölgede ilacı salan NDDS kullanır. Aktif hedefleme, NP yüzeyindeki ligandlar ve hücre yüzeyindeki reseptörler arasındaki etkileşimle sağlanır. Aktif hedeflendirme stratejileri de EPR etkisinden

faydalanır. Bu etki sağlıklı dokuların damar sisteminden farklı olarak patolojik damar sisteminin "sızdırması" olayına, yani makro moleküller ve nano partiküllerin patolojik dokuda (interstisyel tümör boşluğu gibi) birikmesine izin vermesine dayanmaktadır. Bununla birlikte, nano parçacıklar, reseptör aracılı alım için belirli hücreye özgü yüzeyel ligandlarla tümörlere aktif olarak hedeflenebilir. Spesifik "vektör" moleküllerin kullanımı, nano taşıyıcıların tümör hedeflemesini daha da geliştirir. Antikorlar, peptitler, lektinler, sakkaritler, hormonlar, transferrin ve bazı düşük molekül ağırlıklı bileşikler (örn. riboflavin, folat) tümörleri tanıyabilen vektör moleküller olarak kullanılmaktadır. Özellikle antikorlar ve fragmentleri, çeşitli dokulara hedefleme için kullanılır ve en yüksek potansiyel özgüllüğe sahiptir [117]. Kanser hücreleri üzerindeki hedefleme amaçlı kullanılan reseptörler arasında transferrin reseptörleri, folat reseptörleri, glikoprotein ve epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) bulunur. Kullanılan polimerin pH'a veya sıcaklığa duyarlı olması sayesinde seçici salım elde edilmesi de aktif hedefleme örneğidir. Bunun dışında nano taşıyıcıları tümör bölgelerine yönlendirmek için harici ısı, manyetik alan veya ultrason da kullanılmaktadır.

2.5.1 Nanopartikül avantajları

Nanoteknoloji günümüzde ilaç molekülleri ve diğer terapötik moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden kaynaklanan dezavantajları elimine etmek için kullanılmaktadır. Anti kanser ajanların nanopartiküller içerisinde kapsüle edilmesi;

- İlacın karakteri ile ilgili problemlerin (örn. düşük çözünürlüğün ve stabilitenin artırılması ve hedefli iletim sayesinde istenmeyen biyodağılımın önlenmesi böylece biyoyararlanımın artırılması) ve
- Doza bağlı problemlerin (örn. uygulanan ilaç dozunu azaltarak sağlıklı hücrelerdeki sitotoksitenin düşürülmesi) önüne geçilmesini sağlar [13].

NDDS, kurkumin gibi hidrofobik ilaçların dağılımını ve hedefe yönelmesini sağlaması ve anti-kanser ilaçların yan etkilerini azaltması ile kanser tedavisinde konvansiyonel yollara alternatif olarak umut vaat etmektedirler. Kurkumin nano formülasyonu, serbest kurkumin'in aksine sulu ortamda kolayca disperse olur ve nano-partikül formunda belirgin bir *in vivo* terapötik etkinlik artışı gösterir [12]. Nano sistemlere ilaç, görüntüleme ajanı, spesifik hücreye hedeflendirici molekül, manyetik malzemeler ve sıcaklığa ve pH'a duyarlı malzemeler ilave edilerek istenilen amaç doğrultusunda kullanılabilir.

Nanopartikülün boyut, şekil ve diğer fizikokimyasal özellikleri, bileşiğin yüklenmesi ve salınmasını optimize etmek ve belirli organları ve hücre popülasyonlarını hedeflemek için sentezi sırasında hassas bir şekilde ayarlanabilir. NP'lerin kabuk kısmının / yüzeyinin dolaşımdaki süresini uzatmak için hidrofilik olacak şekilde modifiye edilmesi bu ayarlamalardan biridir. Örneğin nanotaşıyıcının bağışıklık sistemi tarafından eliminasyonunu azaltmak için polietilen glikol (PEG) veya polioksietilen (POE) gibi hidrofilik bir polimerle kaplanması nanopartikülün opsonizasyonunu azaltan, böylece dolaşım süresini ve tümöre penetrasyonunu ve birikimini arttıran bir stratejidir [118-120]. Dahil edilen ilaç molekülü, oral uygulamadan sonra bağırsak metabolizmasından ve gastro intestinal bozulmadan korunur ve dolayısıyla ilacın stabilitesi sağlanır.

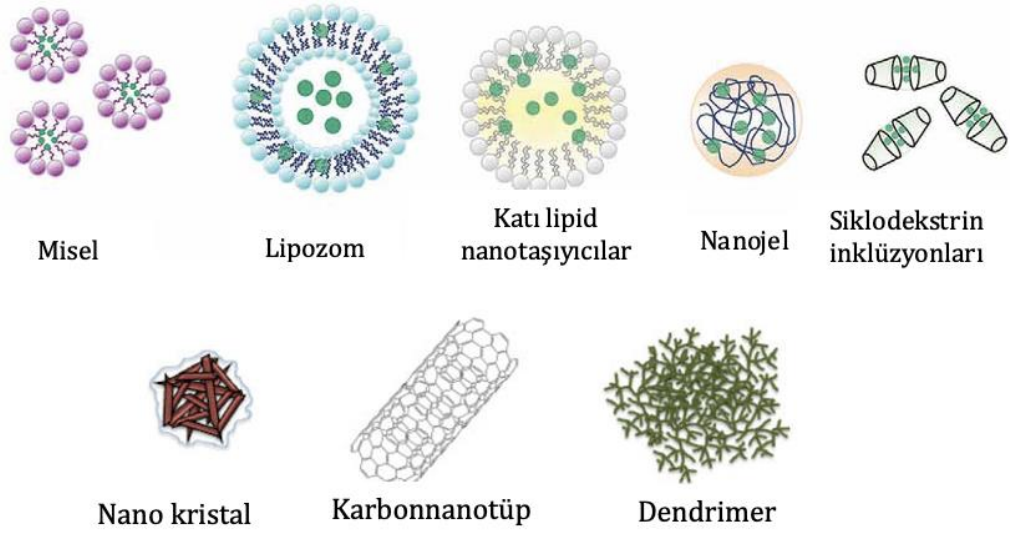
2.5.2 Nanopartikül türleri

Nano ölçekli materyaller, ilaç taşıyıcı sistem olarak görüntüleme, tıbbi implantlarda ve teşhis amaçlı çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır [120]. Tipik olarak *i.v.* uygulanan NP'ler iki kısımdan oluşur. Bunlar aktif maddenin yüklendiği ve korunduğu bir çekirdek ile spesifik hücre popülasyonlarının tanınmasını kolaylaştırmak için ligand moleküllerinin bağlanabildiği ve ilacın biyodağılım süresinin uzamasını sağlayan bir yüzey kaplamasından oluşur. Bunun dışında ilacın nano taşıyıcının yüzeyine kovalent bağ ile bağlandığı veya adsorbe edildiği yöntemler de mevcuttur [121].

İlaç taşıyıcı olarak kullanılacak nano-partiküllerin *in vivo* yüksek stabilite göstermesi, biyoyumlu ve biyobozunur olması, yüksek ilaç yükleme hacmine sahip olması ve hedef dokuya ulaşana kadar taşıdığı etken maddeyi salmaması beklenir. Bununla birlikte nano-partikül formülasyon bileşenlerinin olabildiğince düşük toksisite profiline sahip olması istenir ki bu da sitotoksisite sonuçlarının ve ilgili mekanizmaların daha doğru anlaşılmasını sağlar.

Farklı amaçlar için özelleşmiş ve fizikokimyasal özellikleri ayarlanmış çok farklı türde nano ilaç taşıyıcı sistemden söz etmek mümkündür. Kanser çalışmalarında teşhis ve tedavide sıklıkla kullanılan ve son zamanlarda yoğun şekilde çalışılan ilaç taşıyıcı sistemlerden lipozomlar, miseller ve polimerik nano parçacıklar en kapsamlı şekilde incelenenlerdir [117]. Daha özel gereksinimleri karşılayan dendrimerler, nanojeller, niosomlar, nanoemülsiyonlar, nanosüspansyonlar, siklodekstrin inklüzyonları, metal

nanopartiküller ve katı lipid nanopartiküller (SLN) gibi diğer birçok sistem de önerilmiş ve şu anda geliştirme aşamasındadır (Şekil 2.7) [122, 123].



Şekil 2.7: İlaç taşımada sıklıkla kullanılan nanopartikül türleri [123].

Polimer nano taşıyıcılara dahil olmanın yanında lipitler tek başına da ilaç taşıyıcı malzemeler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Lipid bazlı nano ilaç taşıyıcılar genellikle sentetik lipitlerden üretilen başarılı sistemlerdir. Lipozomlar, katı-lipit nanotaşıyıcılar, lipid nanomiseller ilk akla gelen örnekleridir.

Lipozomlar, kendiliğinden bir araya gelen fosfolipidlerin lipid çift tabakalar oluşturduğu kolloidal veziküler yapılardır. Farklı hidrofobisitelere sahip ilaçların yüklenebilmesi özelliği sayesinde en çok çalışılmış ilaç taşıyıcı sistem türüdür. Yüksek oranda hidrofobik ilaçlar lipid çift tabakada, güçlü hidrofilik ilaçlar sulu kısımda kapsüllenirken, ara oktanol-su dağılım katsayısına (logP) sahip ilaçlar çift tabaka ile sulu çekirdek arasındaki ara yüzde kümelenebilir [13]. Organik lipozomal formülasyonlarla ilgili ana sorun, tekdüze boyutta lipozomlar hazırlamanın yüksek maliyetli ve zor olmasıdır. Dolaşımda kalma sürelerinin uzatılması ve kontrollü ilaç salımı sağlanması amacıyla lipozomların poli(etilen glikol) (PEG) ile kaplanması kullanılan bir yöntemdir [124]. Son derece uzun araştırma geçmişine rağmen, lipozomlar henüz tıbbi alanda yeterince yaygın kullanılamamıştır. Ancak kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipozom ilaç dağıtım sistemleri, emülsiyonları ve katı lipid nanopartiküllerini içerir [123].

Katı lipid nanoparçacıkları, homojen bir şekilde lipid içerisinde eritilen ilaçlar içeren mikron altı partiküllerdir. İlk olarak lipozomlara ve emülsiyonlara göre, katı

çekirdekleri nedeniyle daha kararlı bir alternatif olarak tasarlanmışlardır. Kullanılan lipidler oda ve vücut sıcaklıklarında katı, bir tek fosfolipid tabakasıyla çevrilidir ve sürfaktan kullanımı ile daha da kararlı hale gelecektir. Genel olarak homojen bir lipid matris ve ilaç yüklenmiş kabuk veya çekirdek yapıdan oluşur.

Polimerik nanopartiküller monomerlerin *in situ* polimerizasyonu ile sentezlenebileceği gibi (örn. dendrimer) PLGA NP'lerde olduğu gibi önceden sentezlenmiş amfifilik polimerleri kullanan yöntemlerle de hazırlanabilmektedir. Boyutları genellikle 10 – 1000 nm çap aralığında değişebilen NP'ler biyo bozunur (örneğin albümin, kitosan ve aljinat) veya biyolojik olarak parçalanamayan polimerlerden oluşabilir [125]. Polimerik nanopartiküller farmasötiklerin parenteral, oral, pulmoner, nazal ve topikal uygulama yolları ile kontrollü olarak verilmesini mümkün kılar. Amfifilik blok kopolimerler, suda farklı çözünürlük davranışına sahip (hidrofilik ve hidrofobik) iki bloktan oluşur. Dar bir boyut aralığında (10-100 nm düzeyinde) çekirdek-kabuk misel yapıları ve morfolojileri oluşturmak üzere sulu ortamda kendiliğinden bir araya gelirler. Biyolojik olarak inert PEG polimeri, nanoparçacıkların yüzeyine kovalent bağ ile bağlanır. Böylece immünojenitenin azaldığı ve nanopartiküllerin RES tarafından fagositozunun sınırlanarak beyin, bağırsaklar ve böbrek gibi organlarda kandaki ilaç seviyelerinin artmasını sağladığı düşünülmektedir [126]. Polimerik nano-partiküller, kritik misel konsantrasyonu (CMC) değerlerinin üzerinde kendiliğinden oluşabilen ve düşük CMC değerleri sayesinde *in vivo* kararlılığı yüksek, endüstriyel üretimi mümkün sistemlerdir [123]. Nano tüpler, tüpler halinde düzenlenmiş kendi kendine birleşen atom tabakalarıdır. Kompozisyon olarak organik veya inorganik olabilirler, ayrıca tek veya çok katmanlı olarak üretilebilirler. En sık kullanılan versiyonu, C60 gibi çözünür fulleren türevlerinden üretilir. Geniş iç hacimlere sahip olması ve dış yüzeyinin kolaylıkla işlevselleştirilmesi avantaj sağlar. Farmasötik uygulamalar için potansiyel olarak ümit verici olsalar da toksisite sonuçları akut toksisitesi olduğu ve oksidatif hasara yol açabileceğini göstermektedir [14]. Nanotüplerin biyoyumluluğu ve toksisitesine ilişkin kapsamlı araştırmalar devam etmektedir.

Dendrimerler, monomerik veya oligomerik birimlerden oluşturulan polimer bazlı makromoleküllerdir, öyle ki, dallanma birimlerinin her bir katmanı çevresel grupların sayısını ikiye veya üçe katlar. Bir dendrimerin içindeki geniş boşluk alanı, ayarlanabilir dallanma derecesi, hazırlama kolaylığı ve boyut kontrolü, ilaç dağıtımı için büyük bir potansiyel sunar. Dendrimerler genellikle simetrik bir yapıya sahiptir

ve kimyasal işlevselleştirme yoluyla izole bir çekirdek alanı oluşturma veya uç kısımlarının hidrofilik gruplarla bağlanması ile suda çözünür olma potansiyeline sahiptir. Böylece suda çözünür dendrimerler, hidrofobik bir ilacın taşınması için uygun çekirdeğe sahip olarak tasarlanabilir. Ancak dendrimerlerin sitotoksisite profilleri, biyouyumluluk ve biyodağılımda daha fazla iyileştirilmesi gereklidir [126].

Kuantum noktaları, tipik olarak biyolojik sistemlerde görüntüleme için kullanılan parlak nanoparçacıklardır. Ana bileşenlerinin -çekirdek, kabuk ve kaplama- her biri fotokimyasal özellikleri değiştiren özelliklere sahiptir.

Nanokristaller, ince bir yüzey aktif madde kaplaması ile çevrelenmiş ilacın kristalli bir formunda birleştirilebilen molekül kümeleridir. Malzeme araştırmalarında, kimya mühendisliğinde ve biyolojik görüntüleme için kuantum noktaları olarak kapsamlı kullanımları vardır, ancak ilaç dağıtımı için nanotıpda daha az kullanılırlar.

Farklı tür nano taşıyıcıların dezavantajlarını ortadan kaldırmak için, birçok araştırmacı lipozomlar ve polimerik nanopartiküllerin özelliklerini birleştiren hibrit sistemlerinin geliştirilmesi üzerinde çalışmaktadır.

2.5.3 Polimer lipid hibrit nanopartiküller

Hibrit sistemlerde çekirdek, ilaçlar için rezervuar olarak kullanılan hidrofobik polimer zincirlerinden oluşur. Hidrofilik polimer kabuğu oluşturur ve nanoparçacık sirkülasyon yarı ömrünü artırmayı amaçlar. Lipitler, bu iki polimer zincirinin ara yüzüne yerleştirilir ve ilaçların çekirdeğin içinde hızlı ve anında salınmasına karşı bir bariyer görevi görür. Böyle bir hibrit dağıtım sistemi kullanılarak, lipit içermeyen polimerik taşıyıcılara kıyasla yükleme verimliliğinin arttığı ve salım hızının yavaşladığı görülmektedir. Bu tür hibrit NP'ler, lipidlerin yüksek biyouyumluluğunu polimer NP'lerin sağladığı yapısal bütünlük ile birleştirir ve bu nedenle daha iyi bir terapötik etki elde edebilirler [127, 128].

PLGA nano partiküllerinin sınırlamalarını önlemek, böylece tedavi ve biyo görüntülemenin daha iyi olmasını sağlamak için organik veya inorganik malzemeler kullanılan yeni bütünleşmiş hibrit sistemler araştırılmaktadır. PLGA-lipid hibrit NP'ler, lipitlerin biyomimetik özelliklerini ve etkin dağıtım sağlayan polimerik çekirdeğin yapısal avantajını birleştiren sistemlerdir [129]. Ayrıca emülsifikasyon sürecinde fosfolipidlerin kullanılması ile üretilen PLGA-lipid NP'lerin kan akışındaki biyo dağılımı düzenleme ve akciğere hedeflendirmede proteinlerin pulmoner absorpsiyonunu artırma gibi başarıları vardır [130, 131]. Bununla birlikte fosfolipid

kaplı PLGA mikro partiküllerinin yalnızca PLGA ile hazırlananlara göre fagositik alımı azalttığı, böylece potansiyel olarak uzun etkili bir alveolar ilaç taşıyıcı sistemi sağladığı gösterilmiştir [132]. İç kısmında polimerik çekirdek ve bir lipid kabuğundan oluşan lipid-polimer hibrit NP'lerin pankreas kanseri [133], meme kanseri [134] ve metastatik prostat kanserinde [135, 136] umut verici bir ilaç verme platformu olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda, kontrollü boyut ve polidispersite indeksi ile geliştirilen PLGA-lipit NP'lerin, aşıların oral uygulamasında sürekli ve kontrollü salımda etkili olduğu da gösterilmiştir [137].

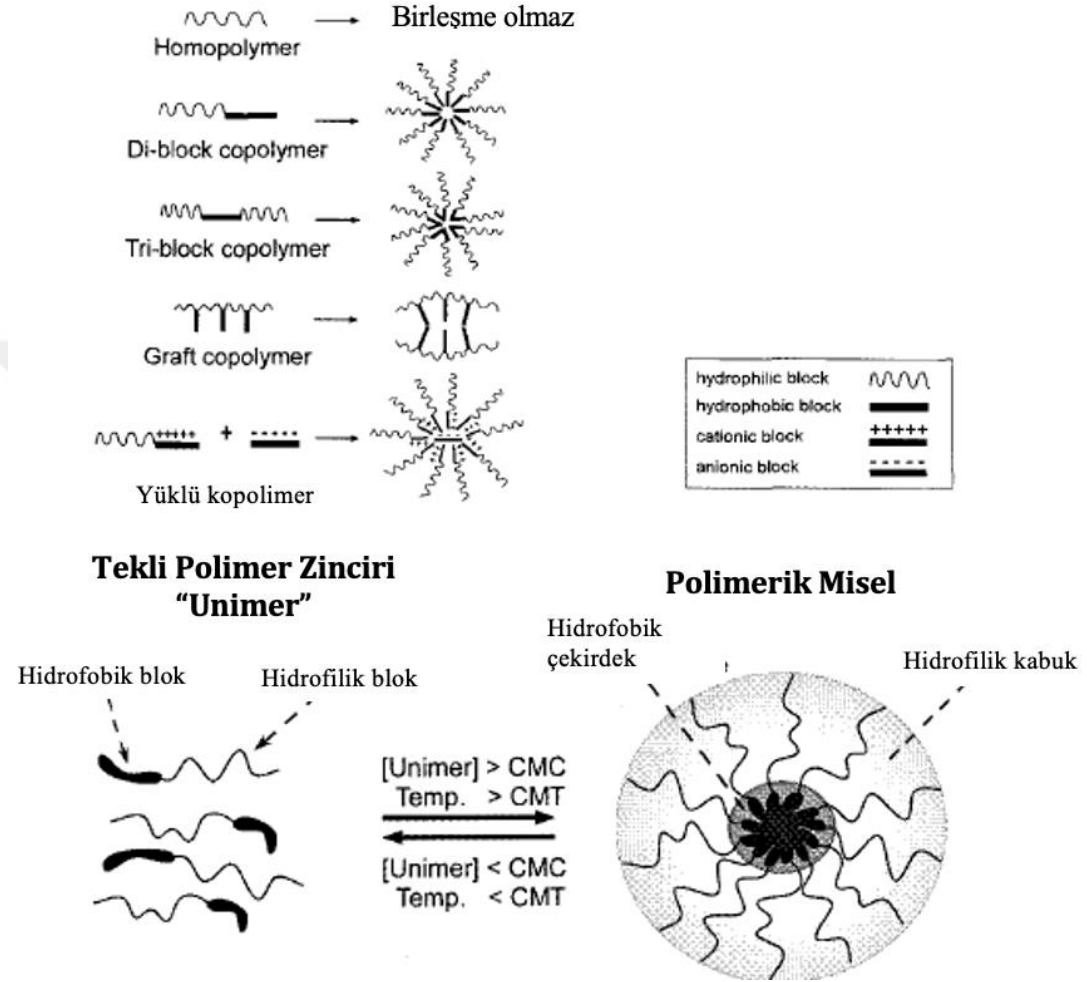
2.5.4 Nano taşıyıcılarda kullanılan polimer ve lipitler

Hedefe yönelik kanser tedavisi alanında tasarlanan formülasyonlar içerisinde yalnızca amfifilik malzemeden yapılmış ve kendiliğinden bir araya gelen (Self Assembly) sistemlerin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) gibi otoriteler tarafından güvenliği onaylanmıştır. Nano taşıyıcılar hem doğal hem de sentetik malzemelerden üretilebilir. Lipitler ve polimerler ilaç taşıyıcı sistemlerde başlıca kullanılan iki malzeme olmakla birlikte ikisinin birlikte kullanılması ile hazırlanan hibrit yapılar da son zamanlarda sıklıkla araştırılmaktadır.

Polimerik nanopartiküllerin çoğu biyolojik olarak parçalanabilir, biyo uyumlu ve kimyasal dönüşüm yoluyla yüzey modifikasyonuna uygun polimerler ile üretilir. Sıklıkla tercih edilen blok kopolimerler, birbirine kovalent bağlarla bağlanmış homo polimer alt birimlerinden oluşur. Blok kopolimerlerin önemli bir özelliği, seçici bir çözücü içinde nanopartiküller halinde kendiliğinden bir araya gelme yetenekleridir. Amfifilik di-blok (hidrofilik-hidrofobik) veya tri-blok (hidrofilik-hidrofobik-hidrofilik) kopolimerler, ilaç dağıtımı için kendiliğinden oluşan polimer miselleri hazırlamak için en yaygın şekilde kullanılır. Şekil 2.8'deki unimerlerinin koyu bölgeleri hidrofobik blokları temsil ederken, daha açık bölgeler hidrofilik blokları temsil etmektedir. İlaç taşıyıcılarda kullanılan unimerler, vücutta toksisiteye yol açabilecek polimer birikimini önlemek için, biyolojik olarak parçalanabilir veya böbrek klerensi ile elimine edilecek kadar küçük bir moleküler kütleyle (< 40 kDa) sahip olacak şekilde tasarlanır [138].

Nano ilaç taşıyıcı sistemlerde lipid moleküllerin kullanımı da son derece yaygındır. Palange ve ark. PLGA ile DSPE-PEG2000 kullanarak kurkumin taşıyan hibrit nano sistem hazırlamış ve PLGA çekirdek yapısının lipid tarafından sarıldığını göstermiştir. DSPE-PEG2000 misel, kemoterapötik uygulamalar için umut verici bir ilaç dağıtım

aracıdır. Hibrit sistemlerde stearik asit, lesitin, 1,2-dilauroilfosfatidilkolin (DLPC), 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-karboksi-(polietilen glikol)-2000 (DSPE-PEG2000), 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) veya 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-phos-phoethanolamine (DOPE) genellikle lipid kısmı oluşturur [132].



Şekil 2.8: Polimerik misel yapısını oluşturan unimerler ve blok-ko-polimer misellerin kendiliğinden bir araya gelme modeli [125], [148].

Çeşitli organik çözücüler içinde çözünerek katmanlı bir yapı oluştururken sulu çözeltiler içinde blok-ko-polimer yapısından kaynaklı olarak PLGA polimerleri kendi kendine bir araya gelerek yumak yapılı miseller oluşturur. Biyo bozunur özellikteki PLGA NP'ler, toksik olmayan ve vücuttan kolayca uzaklaştırılabilen poli (*laktik asit*) (PLA) ve poli(*glikolik asit*) (PGA) monomerlerine parçalanır. PLGA ile hazırlanan nanotaşıyıcıların sağlıklı hücreler üzerinde toksisitesinin olmadığı gösterilmiştir [139, 140]. Poli (*laktik-ko-glikolik asit*) (PLGA), FDA tarafından altın standart olarak kabul edilen ve hidroforik ilaç yükleme ve taşınması için sıklıkla kullanılan en başarılı nano taşıyıcı bileşenlerinden biridir [19]. Ayrıca, PLGA kopolimerinden yapılan klinik

ürünler, EligardVR ve ZoladexVR FDA tarafından ilaç taşıyıcı sistem olarak onaylanmıştır. Bunun bir sonucu olarak, PLGA, HNP'lerin geliştirilmesi için de sıklıkla tercih edilmektedir [128].

2.5.5 Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin hesaplamalı tasarımı

Nano partiküller (NP'ler), yüksek yüzey alanları ve sınırlı kuantum-mekanik etkileri nedeniyle genellikle farklı manyetik, termal, optik ve elektriksel özellikler sergiler. Nanopartikül araştırmaları birçok değişkenin göz önünde bulundurulması gereken ve karmaşık maliyetli deneylerle aydınlatılan çalışmalardır. Bu sebeple de bilgisayar simülasyonları için mükemmel bir çalışma adayıdır. Simülasyonlar hem ilaç hem de taşıyıcı adayı molekülleri tarayabilir ve tamamen yeni NP'lere yönelik tasarım öngörülerini sağlayabilir.

Teorik ve hesaplamalı modelleme, optimize edilmiş geometri, yüzey kimyası veya diğer özellikler için çözümler sağlamak üzere daha önce gözden geçirilen ilaç verme işlemlerinden herhangi biri için kullanılabilir.

2.5.6 Nanopartikül enkapsülasyon etkinliğinin artırılması

Kurkumin'in kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve mekanizmaları bilinmektedir ancak *in vivo* yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir [16, 141]. Herhangi bir hedefli ilaç dağıtım sisteminin (DDS) temel amacı, istenen bir terapötik ajanın (küçük moleküllü ilaçlar, DNA, RNA ya da peptid gibi makro moleküller) etkili bir şekilde yüklenmesi ve hedefine iletilmesidir. Bu durumda yüklenen ilacın yapısı ve miktarı, taşıyıcı malzemelere ve üretim yöntemlerine bağlı olarak büyük farklılıklar gösterir. Kurkumin'in de hedef tümör bölgesine iletilmesi, birikimi ve ilacı seçici olarak hedef bölgede salması ve dolayısıyla hedeflenen tedavinin genel etkinliği akılcı bir nano taşıyıcı tasarımı ile mümkündür.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır ki tek başına PLGA ile hazırlanan nano taşıyıcının kurkumin yükleme kapasitesi tümör hücrelerini küçültecek kadar yüksek konsantrasyonda değildir [16, 142]. Önceki çalışmalarımızda PLGA'nın kurkumin taşımaktaki bu yetersizliğini ortadan kaldırmak için nano-taşıyıcının yüzeyini hücre içine girişi kolaylaştıran polisakkaritler ile kaplandı. Bahsi geçen çalışmamızda levan adlı polisakkarit ile kaplanan PLGA nano misellerine kurkumin yüklendi ve Gemcitabine adlı kemoterapi ilacı tarafından yükselen NF-κB

oranının düşüşü incelendi. NF- κ B'nin 5 alt birimi olan P65, P50, P52, cRel ve RelB'nin tamamında Gemcitabine uygulaması ile yükseliş yaşanmış ve direncin gelişmekte olduğuna işaret etmişti. Ancak kurkumin uygulanması ile sadece P65 ve P52'nin düşüşü gözlemlendi. Dolayısıyla levan tarafından hücre içine giriş yükselmişse de nano taşıyıcının taşıdığı düşük miktardaki kurkuminin yeteri kadar etki gösteremediği düşünüldü.



3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan cihazlar

Ultrasonik banyo (Memmert, ENB29, Almanya), Rotary Evaporatör (Heidolph, Schwabach, Almanya) nanopartikül hazırlanması ve *in vitro* deneyler için çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır. HPLC Cihazı (Shimadzu LC 20A, LC Solution), Analitik kolon (Perkin Elmer, C18, (2,7 µm, 150 x 4,6 mm I.D.)) karakterizasyon deneylerinde kullanılmıştır. TA Instruments Discovery DSC 250 cihazı nitrojen atmosferi altında dakikada 10 °C ısıtma hızıyla (0-200 °C aralığında, üç döngü halinde) DSC termogramlarının çekilmesi için kullanıldı. Platinum-ATR aksesuarı (ZnSe kristali) ile ALPHA Bruker spektrometresi kullanılarak, 4000 ila 400 cm⁻¹ aralığında bir Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrumları tarandı. JEOL JEM-2100 cihazı (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, ABD) kullanılarak 80 kV hızlanma voltajında TEM görüntüleri kaydedildi. Hücre Kültürü Kabini (Seviye II) (Safe Fast Classic Faster Air), Karbondioksit İnkübatörü (ESCO – Panasonic), Soğutmalı Santrifüj (Hermle), Floresans Mikroskop (Leica DM 1000), Akış Sitometri cihazı (BD FACS Canto II MMP), Multiplaka Okuyucu (Thermo Varioskan), In Vivo Imaging System (IVIS) (Perkin Elmer), Western blot/ membrana aktarma sistemi (Biorad), Jel Görüntüleme Cihazı (Vilbert Laurmart Fusion Fx5), Transfer Sistemi (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System) hücre kültürü deneylerinde kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan kimyasallar

PLGA, *Poli(lakti-ko-glikolik) asit*” veya “*Poly (D,L-lactide-co-glycolide)*, lactide: glycolide (50:50), Ester bağlı, MA 30,000-60,000 (Sigma-Aldrich USA 802182); Kurkumin (Curcuma longa, Zerdeçal) (1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi- 3-methoksifenil) - 1,6- heptadien-3,5-dion, HPLC saflıkta; Tween 80, 8.22187.0500, Merck, Darmstadt, Germany; DSPE, 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, PE (18:0/18:0), 850715P, Avanti Phospholipids alındığı gibi kullanılmıştır.

Eagle's Minimum Essential Medium (E'MEM) Sigma-Aldrich; Cryopreservation Medyum ABM; 5-Fluorouracil, Sigma Aldrich, F6627-5G; Diklorofloroscein Diasetat (DCFH-DA), Sigma; Blastacidin-S HCl; Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, ThermoFisher; Coomassie Brilliant Blue G250 BioRad; RIPA Tamponu, Santa Cruz; Laemlli Sample Buffer, Biorad; Triton X-100; Protein Ladder, PageRuler, Thermo;

Akridin oranj (Sigma Aldrich, ABD); Etidyum bromür (Amresco, ABD); L-Glutamin, Sigma-Aldrich Fetal Sığır Serumu (FBS), Sigma Aldrich, F9665; ECL Solüsyonu, Pierce™ ECL Western Blotting Substrate; Penicilin/streptomisin 10.000 U/mL (100 mL) GIBCO; Nutrient Mixture F-12K (Ham's), with L-Glutamine; Tripsin/EDTA (%0.25) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD deneyin amacına uygun şekilde karıştırılarak veya seyreltilerek kullanılmıştır. Western blot deneylerinde kullanılmak üzere p53 Rabbit mAb, cell signalling technology; Anti-mouse sekonder antikor; Anti-rabbit sekonder antikor; NF-κB p65 Rabbit mAb, cell signalling ve Beta catenin Rabbit mAb, cell signalling süt tozu ile seyreltilerek kullanılmıştır.

3.3 Hazırlanan çözeltiler

Stok kurkumin çözeltisi (1 mL): 25 mg kurkumin (368.385 g/mol) 1 mL DMSO içerisinde çözülerek 25.000 µg/mL çözelti hazırlanır. Deneylerde kullanılmak üzere 500 µg/mL çözelti elde etmek için besiyeri ile 50 kat dilüe edildi. Her hafta taze olarak hazırlandı.

5-Flourourasil stok çözeltisi: 500 mg 5-FU (130.08 g/mL, toz) 10 mL DMSO ile çözülüp distile su ile 38,43 mL ye tamamlanarak 100 mM stok çözeltisi hazırlanır. (+4 °C'de en fazla üç ay muhafaza edilir)

DCFH-DA Solüsyonu: 10 mM H₂DCFDA stok solüsyonu hazırlamak için 27.6 mg madde 1 mL DMSO içerisinde çözülür. (-20 °C'de saklanır ve hazırlandıktan sonra 3 ay içinde kullanılmalıdır.) Deneyde kullanılmadan önce gün içerisinde 100 µM'a dilüe edilir.

SDS Poliakrilamid Jel:

•%10'luk ayırma jeli için; 1 mL (1,5 M, pH:8,8) Tris-HCl-%10 SDS + 1,66 mL %30 Ac/ Bis +2,62 mL dH₂O + 50 µL %10 APS + 3,5 µL TEMED kullanılır.

•%5'lik yükleme jeli için; 0,25 mL (1 M, pH:6,8) Tris-HCl-%10 SDS + 337,5 µL %30 Ac/ Bis + 1,87 mL dH₂O + 30 µL %10 APS + 3,5 µL TEMED kullanılır.

%10 APS Çözeltisi: 100 mg amonyum persülfat 1 mL distile su ile çözülerek elde edilir. Jel dökülmeden önce taze olarak hazırlanır.

1,5 M Tris-baz çözeltisi (pH 8,8): Tris-baz (C₄H₁₁NO₃) 90,8 gr, Distile su (dH₂O) 500 mL, Tris-baz 800 mL su içerisinde belirtilen miktarda çözülerek pH 8,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır. (+4 °C'de muhafaza edilir)

0,5 M Tris-baz çözeltisi (pH 6,8): Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$) 30,25 gr, Distile su (dH_2O) 500 mL, Tris-baz 800 mL su içerisinde belirtilen miktarda çözülerek pH 6,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır. (+4 °C'de muhafaza edilir)
%30 (v/v) Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (100 mL için): Akrilamid (C_3H_5NO) 29,2 gr, Bis-Akrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) 0,8 gr, Distile su (dH_2O) 100 mL (+4 °C'de muhafaza edilir.)

10X Yürütme Tamponu: Tricine base 71,7 gr, Tris base 72,6 gr, SDS 10 gr, sodyum bisülfat 2,5 gr 500 mL distile su ile çözülerek hazırlanır. (+4 °C'de muhafaza edilir.)

Kullanılmadan önce çözelti 1X olması için dH_2O ile dilüe edilir.

3.4 Yöntem

Çalışmamızın deneysel aşaması 3 bölümden oluşmaktadır. Bunlar; nanopartikül sentez ve karakterizasyon deneyleri, hesaplamalı moleküler modelleme çalışmaları ve *in vitro* hücre kültürü çalışmalarıdır.

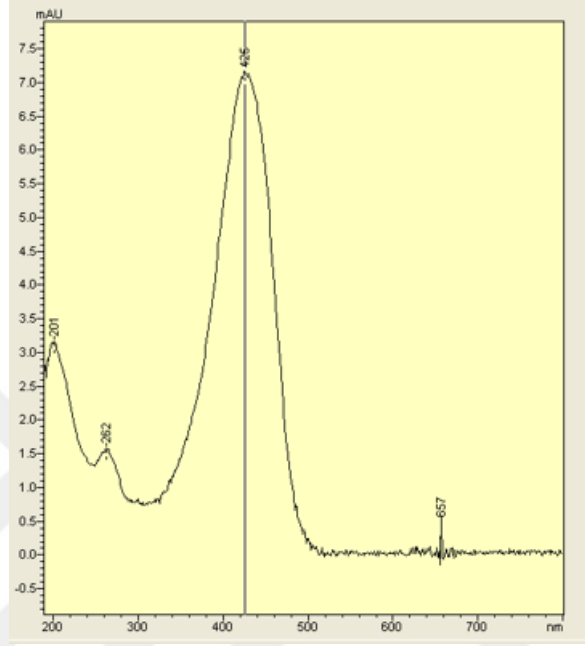
3.4.1 Kurkumin miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirilmesi

Nanopartikül içerisine yüklenen kurkumin miktarının tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile validasyonu tamamlanmış bir yöntem kullanıldı. Yöntemde formülasyondaki kurkumin madde miktarı C18 kolonda (150 x 4.6 mm; 2,7 μ m) 5 mM fosforik asit-asetonitril (60:40, h/h) mobil faz sisteminin izokratik uygulanması ile 40 °C'de 1 mL/dk akış hızında analiz edildi. HPLC sisteminde floresans dedektör için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 425 nm ve 520 nm; PDA dedektör için 425 nm olarak belirlendi (Şekil 3.1). Seçicilik, aralık ve doğrusalılık, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik (kesinlik), LOD (Gözlenebilme sınırı) ve LOQ (Tayin sınırı) validasyon parametreleri tekrar edildi.

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, kurkumin eklemeksizin (boş nanopartikül) hazırlanan formülasyon ve mobil faz aynı koşullarda HPLC'de analiz edildi. Böylece formülasyondan ve mobil fazdan kaynaklanabilecek bir girişim olup olmadığı incelendi.

Kurkumin standart çözeltisi kullanılarak ölçü eğrisi hazırlandı. Standart maddeden 10 mg tartıldı ve 10 mL'lik balon jodede metanol ile çözündürülüp hacmine tamamlandı (1 mg/mL). Stok kurkumin çözeltisinden uygun miktarda alınarak mobil faz ile seyreltilmesiyle 10 μ g/mL ve 100 μ g/mL konsantrasyonda olmak üzere ara stok çözeltileri hazırlandı. Ara stok çözeltilerden uygun miktarlarda alınarak mobil faz ile

seyreltilmesiyle 10 mL'lik balon jojelerde 0,25-10 µg/mL aralığında altı farklı konsantrasyonda ölçü eğrisi çözeltileri hazırlandı ve koşulları belirlenmiş olan HPLC sistemine 50 µL enjekte edildi. Ölçü eğrisi 6 kez tekrar edildi. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan değerleri ile 0,25-10 µg/mL aralığında ortalama ölçü eğrisi çizildi.



Şekil 3.1: Mobil faz içerisinde kurkuminin maksimum absorpsiyon değeri.

LOQ ve LOD değerleri kalibrasyon doğrusunun eğimi (m) ve y eksenini kestiği nokta üzerinden aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad (3.1)$$

$$LOD = \frac{3\sigma}{m} \quad (3.2)$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y keşişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.4.2 Nanopartikül hazırlanması ve karakterizasyonu

3.4.2.1 Kurkumin yüklü PLGA DSPE nano formülasyonu ön çalışmaları

Hibrit çekirdek-kabuk yapıları nanopartiküllerinin hazırlanmasında iki veya tek aşamalı yöntemler kullanılır. İki aşamalı yöntem, ilaç yüklü PLGA nanopartiküllerinin önceden oluşturulmuş lipid veziküller ile inkübe edilmesini, ardından gözenekli bir

membrandan ekstrüzyonunu içerir. Alternatif olarak, tek aşamalı yöntem, bir polimer-ilaç çözeltisi ile bir lipit çözeltisinin karıştırılmasını, ardından nanopresipitasyon ve/veya emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma uygulanmasını içerir. Bu yöntemle lipit ve polimer, hibrit nano yapılar oluşturmak üzere kendi kendine bir araya gelir, bu nedenle kendi kendine bir araya gelen (*self assembly*) sistemler olarak adlandırılır [125].

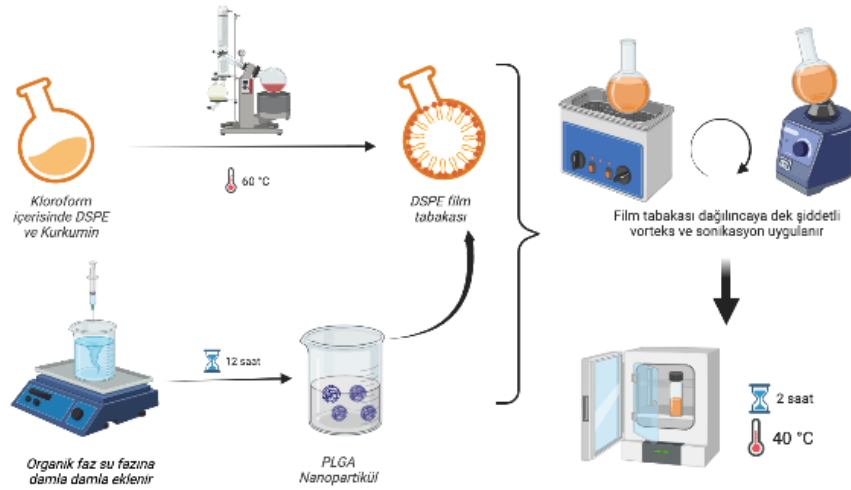
NP'lerin üretim teknikleri, şekil, boyut, boyut dağılımı ve stabilite gibi nihai özelliklerinde önemli rol oynamaktadır. PLGA içerikli NP sentezi için (tekli veya çift) solvent evaporasyon-emülsifikasyon, nano çöktürme, diyaliz ve sprey kurutma gibi çok çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Nanopartikül hazırlama yöntemlerinden en başarılı olanın PLGA-DSPE-kurkumin için uyarlanması amacı ile ön denemeler yapıldı. Buna göre literatürde bulunan solvent evaporasyon-emülsifikasyon yönteminden uyarlanarak dört farklı yeni yöntem geliştirildi [143].

Laboratuvarımızda uygulanan klasik kurkumin yüklü PLGA nanopartikül hazırlama yöntemine göre 50 mg PLGA 5 mL aseton ile çözülerek, 20 mL % 0,025 Tween 80 içeren su fazına damla damla eklenmektedir. Ardından emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemine göre manyetik karıştırıcıda (600 rpm) tüm gece bekleyerek organik fazın tamamının uzaklaşması sağlanır. PLGA amfifilik bir polimerdir ve sulu ortama damlatıldığında kendi kendine birleşen miseller oluşturur. Bu yöntemde kurkumin de organik faz içerisinde çözünür ancak yapılan çalışmalara göre 20 mL formülasyon içerisinde en fazla 2 mg kurkumin taşıyabilmektedir. Bu nedenle lipid yapıdaki DSPE kullanılarak formülasyonun hidrofobik kapasitesinin artırılması amaçlandı. Bu amaçla aşağıda açıklanan dört farklı yöntem geliştirildi;

- a. CurPD1: Klasik PLGA nanopartikül hazırlama yönteminden (emülsifikasyon-solvent evaporasyon) yola çıkılarak oluşturuldu [142]. Organik faz olarak 50 mg PLGA ile 5 mg kurkumin 5 mL asetonitril içerisinde ve 10 mg DSPE ise 0,8 mL metanol içerisinde ayrı ayrı çözüldürülüp karıştırıldı. Organik faz çözeltisine daha sonra 3 dakika şiddetli vorteks uygulandı ve % 0,025 tween 80 içeren 20 mL distile sulu faz üzerine 600 rpm'de manyetik karıştırıcı altında damla damla eklendi. Organik solvent, amfifilik bir polimer olan PLGA'nın sulu ortamda kendi kendine birleşen miseller oluşturması için gece boyunca oda ısısında uçuruldu. Düşük kurkumin yükleme kapasitesine sahip formülasyonun hazırlanmasında aynı işlemler DSPE hariç tutularak yalnız PLGA ve kurkumin kullanılarak tekrarlandı [144].

- b. CurPD2: Kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit nanopartiküllerinin hazırlanması için yağ/su emülsifikasyonu – solvent evaporasyonu metodu modifiye edilerek kullanıldı. Bir önceki klasik yöntemden farklı olarak birbiri ile daha iyi karışan sıvılar olduğu için asetonitril ve metanol kullanıldı ve lipidin camsı geçiş sıcaklığının üzerinde ısı uygulandı. Isı uygulanması sayesinde lipidin polimer ile kolayca birbirine geçmesi ve nanotaşıyıcının hidrofobik ilaç taşıma kapasitesinin artırılması amaçlanmıştır. Hazırlama yöntemi kısaca şöyledir: PLGA, DSPE ve Kurkumin (3.5:1.5) asetonitril: metanol organik fazı içerisinde ayrı ayrı çözdürüldü ve su banyosunda eş zamanlı 60 °C'ye kadar ısıtıldı. Tüm organik faz (50 mg PLGA, 10 mg DSPE ve 5 mg Kurkumin) karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoda 60 °C'de 30 dakika bekletildi ve üç dakika şiddetli vorteks uygulandı. Organik faz, %0,025 Tween 80 içeren ve 60 °C sıcaklıktaki distile su fazına (20 mL) 600 rpm'de manyetik karıştırıcı altında damla damla eklendi. Organik solvent, amfifilik bir polimer olan PLGA'nın sulu ortamda kendi kendine birleşen miseller oluşturması için 4 saat boyunca sabit sıcaklıkta uçuruldu. Bu sırada fosfolipid yapılı DSPE'nin sıcaklığın etkisiyle sıvı faza geçtiği ve hidrofobik kurkumin ile PLGA'nın hidrofobik kısımları arasında üçlü etkileşim meydana getirdiği düşünülmektedir.
- c. CurPD3: Kurkumin yüklü PLGA-DSPE Hibrit Nanopartiküllerinin bu yöntem ile hazırlanmasında daha öncekilerden farklı olarak ince tabaka film oluşturma yöntemi temel alındı. Bu metod ile hazırlanan nano taşıyıcılarda 10 mg DSPE ve 5 mg kurkumin 5 mL kloroform ile çözüldü, 500 mL lik balon içerisinde tamamen karıştırıldı. Daha sonra sıcaklığı 60 °C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 5 dakika ses dalgasına maruz bırakıldı. Evaporatörün sıcaklığı da 60 °C'ye ayarlandı ve düşük basınç altında evaporatör ile ince film tabakası oluşturuldu. Oluşan film 40 dakika boyunca çeker ocak altında bekletildi. Aynı yerde 50 mg PLGA 2,5 mL asetonitril içerisinde çözüldürüldü. Daha sonra 2,5 mL metanol ile karıştırılarak ince filmin bulunduğu balona ilave edildi, böylece ince film tabakasının organik faz ile dağılması sağlandı. Balona şiddetli vorteks ve sonikatör uygulanması ile film dağıtıldı. Elde edilen çözelti, %0,025 Tween 80 içeren ve 60 °C sıcaklıktaki distile su fazına (20 mL) damla damla eklendi ve 600 rpm de manyetik karıştırıcı altında gece boyunca organik fazın uzaklaşması beklendi.

- d. CurPD4: Bu metod ile nano taşıyıcı hazırlarken ilk aşamada bir önceki yöntemde (CurPD3) anlatıldığı gibi DSPE ve kurkuminin kloroform ile çözülüp balon içerisinde karışması, ardından 60 °C sıcaklık ve düşük basınç altında evaporatör ile ince film tabakası oluşturulması sağlandı. Hazırlanan film tabakası bir gün önceden hazırlanmış olan boş PLGA nanopartikül (3.5:1.5 asetonitril: metanol organik fazı kullanılarak solvent evaporasyonu yöntemi ile hazırlanmış) ile rehidrate edildi ve film çözülene dek şiddetli vorteks ve ultrasonikatör uygulaması yapıldı. Hazırlanan taze formülasyon iki saatlik süre ile 40 °C’deki etüvde bekletildikten sonra analiz işlemleri yapıldı. Formülasyonun hazırlama basamakları Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD4 nanopartikül hazırlanma basamakları (BioRender, <https://biorender.com/> ile oluşturulmuştur.).

Enkapsüle edilmeyen kurkumin, lipid ve emülgatörün uzaklaştırılması için 40 °C’deki etüvde iki saat bekletildikten sonra formülasyon 11.000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüj edildi (Hermle, Germany) ve 2 defa distile su ile yıkandı. Elde edilen pellet +4 °C’de saklandı ve kullanım öncesi eşit hacimdeki distile su ile rehidrate edildi. PLGA-DSPE hibrit nano ilaç taşıma sisteminin karakterizasyon ve optimizasyon sürecinde partikül boyutu dağılımı (d.nm), polidispersite indeksi (PDI), nanopartikül yüzey yükü (zeta potansiyeli, mV), kurkumin yükleme kapasitesi (%EE) ve in vitro salım kinetiği dikkate alındı.

3.4.2.2 Partikül boyutu dağılımı ve polidispersite indeksinin belirlenmesi

Nanoparçacıkların hidrodinamik çapını karakterize etmek için, süspansiyonların boyut dağılım profiline belirlemeye yönelik bir teknik olan Dinamik Işık Saçılımı (DLS) (Zetasizer, ZEN3600; Malvern Instrument, Inc.) kullanıldı. Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan misellerin çapları ve polidispersite indeksi 25 °C’de distile su içerisinde, 20 µL nanopartikül süspansiyonu 1,8 mL distile suda seyreltilerek belirlendi. Bu sayede partiküllerin ortalama boyut dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) belirlendi. Nanoparçacıklar sıvı ortam içerisinde rastgele hareket ettikçe aralarındaki mesafe ve saçılan ışığın yoğunluğu da değişir. Cihazın ölçüm prensibi büyük parçacıkların daha yavaş hareket ederken, küçük parçacıkların nispeten daha hızlı hareket etmesine dayanır. Belirli açılar ile saçılan ışık yoğunluğu parçacıkların boyutuyla ilişkilidir. Ölçümler için 173°’lik bir Zeta Sizer kırılma indisi (geri saçılma) kullanıldı. Her defasında hazırlanan formülasyonda üç tekrarlı ölçüm yapıldı. Her tekrarda cihaz tarafından 11 ölçümün ortalaması alındı ve her ölçüm arasında 1 saniye beklendi.

3.4.2.3 Nanopartikül yüzey yükü ölçümü

Zeta potansiyeli, dağılımdaki parçacık stabilitesini belirlemeye yardımcı olan parçacıkların yüküdür. Ön formülasyonlar ve optimize nano formülasyonda partiküllerin koloidal kararlılık ve yüzey yükü / zeta potansiyelinin ölçümü için Zetasizer Nano ZS cihazı kullanıldı. Zeta potansiyeli elektroforetik hareketlilik temelinde bir elektrik alanı altında tahmin edildi. Her örneğin 11 okumasının ortalamasından ayrı bir zeta potansiyel değeri hesaplandı. Ortalama zeta potansiyeli, üçlü ölçümün ortalama değeri olarak hesaplandı [145].

3.4.2.4 Kritik misel konsantrasyonunun (KMK) hesaplanması

Kendiliğinden bir araya gelen (self assembly) sistemlerde misel oluşturan bileşenlerin sulu ortam içerisindeki konsantrasyonu kritik bir hidrofobiklik düzeyinin altına düşerse birleşme meydana gelmez. Hazırlanan nano formülasyonlar *i.v.* uygulama sonrası yüksek oranda seyrelmeye maruz kaldığı için film oluşturma- rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan yeni hibrit nanopartikülün kritik misel konsantrasyonu hesaplanmalıdır.

PLGA-DSPE hibrit NP’e ait KMK hesaplanırken floresan prob olarak piren adlı hidrofobik molekül kullanıldı. Piren suda çözünmez ve uyarılmış halden temel hale

geçerken uzun süre ışık yayar. Deneyin temel prensibi ortamda misel varsa pirenin floresan ışımalarının kaybolmasına dayanır. İlk olarak konsantrasyonu 6×10^{-7} Molar olacak şekilde stok piren çözeltisi hazırlandı ve 20 farklı vial içerisine eşit hacimlerde eklendi. Ardından vialler çeker ocak altında tüm gece bekletilerek asetonun tamamının uçması ve piren filmi oluşması sağlandı. Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan PLGA-DSPE hibrit misel her biri 5 kat olmak üzere 20 defa dilüe edildi ve her bir dilüsyondan 0,5 mL alınarak kurutulmuş piren problemlerinin üzerine ilave edildi. Her bir numuneye 5'er dakika vorteks ve ultrasonikatör uygulandı ve oda sıcaklığında çalkalanarak iki saat bekletildi. Daha sonra her birinin kararlı hal floresan spektrumları 375 nm emisyonuna sabitlenerek eksitasyon spektrumu kaydedildi. Elde edilen floresan grafikte I_{ex} / I_{em} piklerinin yükseklikleri birbirine oranlanarak ve nanopartikülün logaritmik konsantrasyonuna göre hesaplama yapıldı [144, 145].

3.4.2.5 Kurkumin'in nano formülasyon içerisindeki çözünürlüğü

Kurkumin hidrofobik yapısı nedeniyle suda çok az çözünür ve bu durum canlı sistemlere uygulanmasındaki ana problemdir. Bu nedenle eşit miktar kurkuminin optimize edilmiş formülasyon içindeki ve distile sudaki çözünürlüğü fiziksel olarak karşılaştırıldı. Bunun için 20 mL formülasyonda 5 mg kurkumin taşıyabilen ve film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan optimize formülasyon örnek alınarak 20 mL %0,025 Tween 80 içeren distile su içerisine 5 mg kurkumin ilave edildi. Kuvvetli vorteks ve 5 dakika 60 °C sıcaklıkta ultrasonik dalga uygulaması ile çözülmeye çalışıldı ve fiziksel görünüm açısından değerlendirildi.

3.4.2.6 Nanopartikül enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması

Nano formülasyonlarda ilaç yükleme kapasitesi misel içerisine enkapsüle edilen ilacın dış sulu ortamdaki ilaçtan daha yüksek konsantrasyonda olduğunu göstermelidir. Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD4 NP içerisine gerçekten enkapsüle edilen kurkumin miktarını bulmak için %EE hesaplandı. Bunun için misel içerisine yüklenen kurkumin miktarı formülasyona eklenen toplam ilaç miktarına oranlandı. Yüklenen kurkumin miktarının tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanıldı. Formülasyon oda sıcaklığında bir gece inkübe edildikten sonra analiz edilmek üzere her bir formülasyondan 250 µL örnek alındı, balon joje içerisinde 3:1 (v/v) oranında asetonitril: metanol ile 10 mL'ye tamamlandı. Organik çözücü, formülasyondaki miselin dağılmasını ve enkapsüle olmuş ilacın

serbest kalmasını sağlamıştır. Nanopartiküllerin tamamen dağılıp içerisindeki ilacı salması için ultrasonik banyoda 60 sn bekletildi ve 30 saniye vorteks yapıldı. Ardından 0,45 µm naylon filtreden süzüldü ve her ölçümde 10 µL koşulları önceden belirlenmiş olan HPLC sistemine enjekte edildi. Her bir ölçüm üç kez tekrarlandı. Yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve yüzde ilaç yükleme kapasitesi (%İY) belirlenmesi için aşağıda sunulan denklemler (Denklem 3.1 ve Denklem 3.2) kullanılarak hesaplama yapıldı.

$$\%EE = (\text{Ölçülen kurkumin}) / (\text{Formülasyona eklenen kurkumin}) \times 100 \quad (3.3)$$

$$\%İY = (\text{Yüklenen kurkumin}) / (\text{Formülasyonun toplam ağırlığı}) \times 100 \quad (3.4)$$

3.4.2.7 Nanopartikül stabilite çalışmaları

Hazırlanan nanopartikülün stabilitesi herhangi bir ilaç taşıyıcı sisteminin önemli bir özelliğidir. Kurkumin, nötr veya bazik pH koşulları altında kolayca ve hızlı bir şekilde bozunur. Aynı zamanda yiyecekler, içecekler ve plazmadaki bazı metal iyonlarını kolaylıkla şelatlayabilir ve bu da düşük farmakolojik aktivite ve düşük stabilite ile sonuçlanabilir [158]. Fiziksel kararsızlık, ilaç sızıntısına ve veziküllerin agregasyonuna veya füzyonuna yol açacaktır.

Bu çalışmada film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonun fiziksel stabilitesi, nanopartiküllerin belirli zaman aralıklarında ortalama boyut dağılımı, zeta potansiyeli ve içeriğindeki kurkumin miktarının ölçülmesi ile değerlendirildi. Polidispersite indeksinin bozulduğu (PDI>0.3) ve partikül boyutunun büyüdüğü (d.nm>300 nm) zaman stabilitesinin kaybolduğu varsayıldı. Stabilite çalışmaları için 1. gün, 3.gün, 4.gün, 7.gün ve 15. günde analiz yapıldı. Her bir formülasyondan 250 µL alınarak mobil faz ile 10mL'ye tamamlandı. 30 saniye vorteks yapıldıktan sonra ve 0,45 µm PTFE filtreden süzüldü. Süzüntü 50 µL enjeksiyon hacminde koşulları önceden belirlenmiş olan HPLC sistemine enjekte edildi.

Hazırlanan kurkumin nano miselleri uzun süreli stabilite tayini için ayrı ayrı 4 °C ve 25 °C'de cam şişelerde (5 mL) 60 gün süreyle saklandı. Belirli zaman aralıklarında fiziksel görünüm, faz ayrımı, ilaç çökmesi ve partikül boyutunun ölçülmesi yönünden değerlendirildi.

Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonun liyofilizasyon sonrası stabilitesinin belirlenmesi için hazırlanan NP önce -80 °C 'de donduruldu (10 mL) ardından yüksek basınç ve düşük sıcaklıkta (800 Pa, -96 °C) liyofilize (FreeZone

25, LABCONCO Lyophilizer) edildi (Şekil 3.3). Liyofilize formülasyon 60 gün süre ile +4 °C'de tutuldu ve ardından eşit miktar distile su ile rehidrate edildi. Formülasyonun partikül boyutu dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) aynı koşullarda ölçüldü.



Şekil 3.3: Liyofilize edilmiş optimize formülasyona ait fotoğraf.

Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan PLGA-DSPE kurkumin nanopartikülün hücre kültürü deneyleri sırasındaki stabilitesini kontrol etmek için eşdeğer bir ortam tasarlandı. Bunun için 4500 µL hücre kültürü besi yerinin içerisine 500 µL formülasyon ilave edildi ve 37 °C'de muhafaza edildi. Karışımın partikül boyutu ve PDI değeri 48 saat sonra DLS kullanılarak ölçüldü.

3.4.2.8 Nanopartikül zamana bağlı salım kinetiğinin hesaplanması

Kurkuminin *in vitro* salım koşulları altındaki bütünlüğünü incelemek için salım deneylerinden önce Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak kurkumin pikleri analiz edildi [146]. Kurkumin standart solüsyonuna ait pikler, ayrı ayrı bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin ve kurkumin'in alıkonma sürelerini göstermektedir. Bu piklerin, nanopartikül içerisindeki kurkuminden örnek alınarak, salım deneyi süresince bozulmadan kaldığını göstermek için kurkumin standart solüsyonu ile aynı olup olmadığı incelendi.

Salım kinetiğinin hesaplanması için genellikle kullanılan diyaliz membran metodu (uygun gözenek boyutuna sahip diyaliz membranı kullanarak kurkuminin dış ortama zamana bağlı salımını ölçmek) formülasyondaki kurkuminin membrana afinite duyması ve salım ortamına çıkmaması nedeni ile sorun oluşturmaktadır [144]. Bu yüzden oda sıcaklığında stabilite çalışmaları devam ederken, süpernatantta kalan kurkumin miktarını ölçen dolaylı bir salım hesaplaması planlandı. Bu amaçla, formülasyonun yarısı stabilite çalışması için ayrıldı ve eş saat aralıklarında DLS ile boyut ölçümü yapıldı. Ayrılan diğer formülasyondan 1500 µL alındı ve Amicon® filtreli santrifüj tüp (Milipore, MWCO 30,000) kullanılarak diyaliz edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Salım deneylerinde kullanılan Amicon® Ultra-15 filter units santrifüj tüpü.

Tüpün alt kısmına 15 mL HPLC analizinde kullanılacak olan mobil faz ilave edildi. Salım deneyi boyunca 37 °C'de inkübe edilen tüp belirlenen saat aralıklarında (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72, 168 saat) 500 rpm'de santrifüj edildi. Yüzde yüz olarak kabul edilen sıfır noktasındaki kurkumin miktarlarının hesaplanması için formülasyondan bir numune saklandı. Her santrifüj sonrasında mobil faza geçen alt kısımdan HPLC cihazına enjekte edilmek üzere 50 uL örnek alındı. Salım deneylerinde film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan PLGA-DSPE-Kurkumin NP ve klasik yöntem ile hazırlanan PLGA-Kurkumin NP kullanıldı ve her birine eşit konsantrasyonda (250 µg/mL) kurkumin ilave edildi. Santrifüj sonrası bazal ortamdaki kurkumin miktarları, daha önce tarif edildiği gibi HPLC ölçüm yöntemiyle ölçüldü ve sıfır noktasındaki oranla bir yüzde elde edildi.

Optimize edilmiş PLGA-DSPE hibrit NP'den kurkuminin salınma davranışının kinetiği sıfır, birinci derece, Hixson-Crowell ve Korsmeyer-Peppas kinetik modelleri kullanılarak incelendi. Tüm modeller için R² değeri hesaplandı ve en yüksek olan matematiksel model belirlendi [147].

3.4.2.9 Yapısal karakterizasyonun belirlenmesi

Nano taşıyıcıların yapısal karakterizasyonu için Diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry, DSC), Fourier Dönüşümlü InfaRed (FT-IR) spektroskopisi ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanıldı [118, 148]. Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan optimize formülasyon oluşturulduktan sonra -80 °C de bir gece boyunca dondurulup ardından 48 saat boyunca yüksek basınç ve düşük sıcaklıkta (800 Pa, -96 °C) liyofilize edildi. DSC analizi ve FT-IR spektrumu çekilmesi için formülasyonların liyofilize halleri kullanıldı. TEM analizi öncesi taze formülasyon bakır grid üzerine kaplama yapıldı. DSC, sıcaklığa bağlı faz geçişlerini incelemek için uygulanan ve kurkuminin polimer içerisindeki durumunu ortaya koyan termodinamik bir tekniktir. Bu nedenle nanopartikül karakterizasyonunda formülasyon bileşenlerinin ve bunların nanopartikül içindeki hallerinin DSC termogramları incelendi. Kurkumin ve PLGA-DSPE nanopartikülleri arasındaki potansiyel etkileşimi tanımlamak için FT-IR spektrumları analiz edildi. Kurkuminin nano taşıyıcının içerisinde yerleşmesi durumu IR piklerinin yorumlanması ile anlaşıldı. TEM görüntüsü, hızlandırılmış bir elektron ışını numunenin ince bir filminden geçtiğinde ve farklı açılara dağıldığında oluşturulur. Optimize edilmiş nanopartikülün (CurPD4) ve Kurkumin- PLGA nanopartiküllerin morfolojisi, Geçirgen Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak incelendi. TEM numunelerinin hazırlanması için bir damla Kurkumin-PLGA NP ve CurPD4 NP (konsantrasyon: 1 mg/mL) 0,037 mm'lik bir bakır ızgara (ultra ince karbon tip) üzerine damlatıldı. Numuneler lekелendi ve ızgaralar, %2 (w/v) uranil asetat sulu solüsyonu ile negatif olarak kontrastlandı. Izzaralar daha sonra iki kez distile su ile yıkandı ve deney öncesi çeker ocakta hava ile kurutuldu [148].

3.4.3 Hesaplamalı moleküler modelleme

PLGA, DSPE ve ilaçlardan oluşan nanokompozitler çok karmaşık sistemler olduğundan, ilaç moleküllerinin PLGA ve DSPE ile nasıl etkileşime girdiğini ortaya çıkarmak için çok çeşitli hesaplama araçları kullanılmalıdır. Bu çalışmada

moleküllerin etkileşimi ile ilgili soruları cevaplamak için kuantum kimyası (QC) ve moleküler dinamik (MD) gibi hesaplama araçları kullanıldı. Nano formülasyon hazırlanması ile kurkuminin PLGA ve DSPE'den oluşan hibrit bir nano taşıyıcı aracılığıyla hedefe yönlendirilmesi amaçlandı. QC-MD yaklaşımlarının birlikte kullanılması ile de kurkuminin nanopartikülün bileşenleriyle nasıl etkileşime girdiği ve DSPE'nin rolü netleştirildi.

3.4.3.1 Kuantum kimyasal küme modelleri

Kuantum kimya küme hesaplamaları ilaç-ilaç, ilaç-DSPE, ilaç-PLGA ve poli-(glikolik asit) (PGA) ve poli-(laktik asit) (PLA) dahil olmak üzere farklı ikili sistemler için yapıldı. Kurkumin, enol ve keto tautomerik konformasyonlarının varlığında dengededir. Asidik ve nötr koşullar altında ana bileşen keto formudur, pH > 8 olduğu durumlarda ise kurkuminin enol formu mevcuttur [92]. Model hesaplamalarında kurkuminin her iki tautomerik formu da dikkate alındı.

Bu modelleme çalışmaları özellikle periyodik yapılarda için sınırlı bir başarıya sahiptir. Bu nedenle yalnızca 2-3 molekülden oluşan nispeten küçük sistemlerin analizinde kullanıldı.

TURBOMOLE program paketi [149], kuantum kimyasal küme modelleri kullanılarak hesaplamalar yapmak için kullanıldı. SVP temel setine sahip B97-D fonksiyoneli, geometri optimizasyonlarını gerçekleştirmek için kullanıldı. Küme modellerinde önemli sayıda atomu işlemek için "kimlik çözünürlüğü" (RI) yöntemi kullanıldı. Geometri optimizasyonlarının ardından, bağlanma enerjileri B97-D/SVP/TZVP teori seviyesi kullanılarak değerlendirildi.

Bağlanma enerjilerindeki temel küme süperpozisyon hatalarını (BSSE) ele almak için "karşı denge" (CP) yöntemi kullanıldı [150]. TURBOMOLE, A ve B monomerlerinden oluşan bir dimer için CP düzeltmesini Denklem 3.5'de gösterildiği şekilde gerçekleştirir.

$$E_{AB}^{CP} = E_{AB} - (E_{A(B)} - E_A) - (E_{B(A)} - E_B) \quad (3.5)$$

Bunula birlikte A, B ve C monomerlerinden oluşan bir trimer için Denklem 3.6'da gösterilen şekilde gerçekleştirir.

$$E_{ABC}^{CP} = E_{ABC} - (E_{AB(C)} - E_{AB}) - (E_{AC(B)} - E_{AC}) - (E_{BC(A)} - E_{BC}) \quad (3.6)$$

Burada parantezler, elektronlar veya nükleer yükler olmadan hayalet temel kümeleri göstermektedir [150].

3.4.3.2 Periyodik DFTB+ hesaplamaları

Kuantum kimyası küme modeli hesaplamaları yararlı olsa da, özellikle büyük ve karmaşık sistemlerle uğraşırken sonlu sistem boyutu gibi sınırlamaları vardır. Hesaplama açısından pahalı bir model kullanmaktan kaynaklanan sorunlardan kaçınmak için, Slater- Koster sıkı bağlama yaklaşımından yararlanan yoğunluk fonksiyonel teorisinin (DFT) basitleştirilmiş bir versiyonu olan DFTB+ (Yoğunluk Fonksiyonel-tabanlı Sıkı Bağlama), daha büyük sistemleri incelemek için yürütüldü. DFTB+, moleküller, katılar, yüzeyler ve nanoyapılar dahil olmak üzere çok çeşitli sistemlerin kuantum mekaniksel simülasyonlarını gerçekleştirmek için kullanılan hesaplamalı bir yazılım paketidir. Elektronik yapıyı hesaplamak için basitleştirilmiş bir sıkı bağlama yaklaşımının avantajını kullanan yöntem, geleneksel DFT yöntemlerinden önemli ölçüde daha hızlı hesaplamalara izin verir [151, 152].

3.4.4 *In Vitro* hücre kültürü çalışmaları

Kurkumin nano formülasyonu ve kombine halde 5-FU kullanımının transgenik LoVo kolon kanseri hücreleri ve sağlıklı hücrelerdeki sitotoksik, apoptotik ve tümör gelişimini inhibe edici etkinlikleri incelendi. Anti kanser etkinliği bilinen kurkuminin etkin doza ulaşabilmesi için enkapsülasyon etkinliği artırılmış yeni bir formülasyon tasarlandı ve hedef hücrede biriken kurkumin miktarının artırılması amaçlandı. Formülasyona kurkumin yükleme miktarındaki artış ile orantılı olarak kurkuminin *in vitro* anti kanser, apoptotik etkinliğinde artış ve 5-FU ile uygulamasında sinerjistik etki gözlemesi amaçlandı. Nano enkapsüle kurkumin'in serbest kurkumin ile karşılaştırıldığında suda çözünürlüğünün artması, hücre içine girişinin artması ve hedeflenen bölgede birikiminden dolayı *in vivo* etkinliğinin artması beklenmektedir. *In vitro* deneyler için iki farklı tür hücre hattı kullanılmıştır. Bunlardan LoVo, IV. derece Dukes C tipi kolorektal kanser hastası olan, 56 yaşındaki bir erkeğin kalın bağırsağından izole edilen bir hücre dizisidir. CCD-1072Sk ise normal yenidoğan sünnet derisinden izole edilmiştir. Hücre hatlarının genel özellikleri Tablo 3.1'de gösterildi.

3.4.4.1 Hücrelerin Hazırlanması

Bu proje ile lusiferaz geni transfekte edilmiş LoVo insan kolorektal kanser hücre hattında (LoVo-Luc) kurkumin yüklü hibrit nano misellerin hücre canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. İleride *in vivo* hayvan deneylerine gereksinim duyulacağı için *in vitro*

çalışmalara laboratuvarımızda mevcut olan transgenik LoVo hücre dizisi ile başlama kararı alındı.

Tablo 3.1: Kullanılan hücre hatlarının genel özellikleri.

Hücre Hattı	Organizma	Doku	Morfoloji	Hastalık	Klinik Özelliği	Onkogen
LoVo (CCL-229™)	İnsan	Kolon	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma, Dukes tipi C, derece IV	Erkek, Beyaz, 56 yaş, 1971	myc+;myb+; ras+; fos+; p53+; sis-; ablr-; src-
CCD-1072Sk (CRL-2088™)	İnsan	Deri	Fibroblast	Sağlıklı	Erkek, Yeni doğan	-

Sıvı nitrojen tankı içerisinde çıkarılan hücreler 37 °C su banyosunda çözündürüldü. Kriyo tüp içindeki sıvı eridikten sonra hızla besiyeri ile dilüe edilip steril santrifüj tüpünde toksik DMSO'yu uzaklaştırmak için çöktürüldü. Santrifüj işleminden sonra hücreler yeni besiyeri ile süspansiyon edildi ve hücre kültür şişesine aktarıldı. Hücreler % 60-70 doluluğa ulaşıncaya dek inkübe edildi ve 24 saat sonra besiyeri değiştirildi.

Hücrelerin pasajlanması için önce besiyeri uzaklaştırıldı ve 5 mL 1XDPBS ile yıkandı. Daha sonra 2 mL tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Hücreler yuvarlak bir şekil alıp yüzmeye başladığında laminar akışlı kabin içerisinde flasklara tripsin çözeltisinin iki katı kadar besiyeri eklendi, tripsin inaktive edildi ve tüm içerik 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler, oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelletinin üzerindeki supernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL taze besiyeri içinde yeniden süspansiyon edildi. Süspansiyondaki hücre sayısını belirlemek için 15 µL alınarak thoma lamına aktarıldı. Stok olarak saklanmak istenen 15 mL'lik santrifüj tüplerinin içerisindeki hücre pelletlerinin üzerine freezing medyum eklenip homojen şekilde karışması sağlandı. Karışım kriyo tüplerine konularak önce bir gece -80 °C'de bekletildi ve ertesi gün sıvı azot tankına (-196 °C) kaldırıldı.

Hücreler, büyüme ortamında doku kültürü şişelerinde % 95 hava, % 5 CO₂ atmosferinde 37 °C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde tutuldu. Transgenik LoVo-Luc kolorektal kanser hücre hattı F12K besiyeri içine % 10 FBS ve % 1 P/S eklenerek kültüre edildi. Sağlıklı kolon hücre hattı CCD-1072Sk, E'MEM besiyerinde %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 P/S eklenerek kültüre edildi. Besiyeri her üç günde bir

değiştirildi. Deneyle steril laminar hava akımlı kabinde gerçekleştirildi. Deneyle üçlü tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi, ortalamaları ve standart sapmaları alındı. Çalışmamızda hücreler MTT testi, ROS tayini, AO/EB deneyi, Annexin V-FITC/PI analizi, hücre içine giriş testi ve Western Blot Analizi için 6'lı, 12'li veya 96'lı plaklara ekilmeden önce, her kuyuya eşit sayıda canlı hücre gelmesi amacıyla thoma lamında, tripan mavisi kullanılarak sayıldı. Eşit hacimde (10 µL) hücre süspansiyonu ve tripan mavisi karıştırıldıktan sonra canlı hücre sayısı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı (Denklem 3.5).

1 mL' deki hücre sayısı =

$$0.1 \text{ mm}^3 \text{ 'te sayılan hücre} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4 \quad (3.7)$$

Hücre canlılığının MTT ile analizi ve ROS analizi için hücreler 96 kuyucuklu plakalara 7×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. DAPI, AO/EB boyama ve protein ekspresyonlarının ölçümü için hücreler 6 kuyucuklu plakalara 10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat inkübasyonun ardından kontrol ve tedavi grupları olarak belirlenip madde verildi. Her bir deney için ayrı ayrı belirlenen saatlerde inkübasyonun ardından besiyerleri aspire edildi. Hücreler 1xDPBS ile yıkayıp her bir kuyuya % 0,25 tripsin-EDTA eklenerek kaldırıldı. Tripsin etkisini inaktive etmek için önceden toplanan besiyerleri ile pipetaj yapılan hücreler steril endorf tüplere alındı. Hücreler +4 °C'de 1500 rpm'de 2 defa 5 dakika steril 1xDPBS ile santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kez daha gerçekleştirdikten sonra deney aşamalarına geçildi.

Biyoluminesans görüntüleme, *in vivo* hayvan modelinde tümörün gerçek zamanlı ve non-invazif görüntülenmesini sağlar. Luminesans ışımının ölçülmesi lusiferaz sentezleyen canlı hücreye/canlıya lusiferin verilmesi durumunda, lusiferinin oksilusiferine dönüşmesi ile luminesans foton salınması prensibine dayanır. Sonuçta biyoluminesans yoğunluğun miktarı, canlıda tümörün büyüklüğü hakkında yorum yapmamızı sağlar.

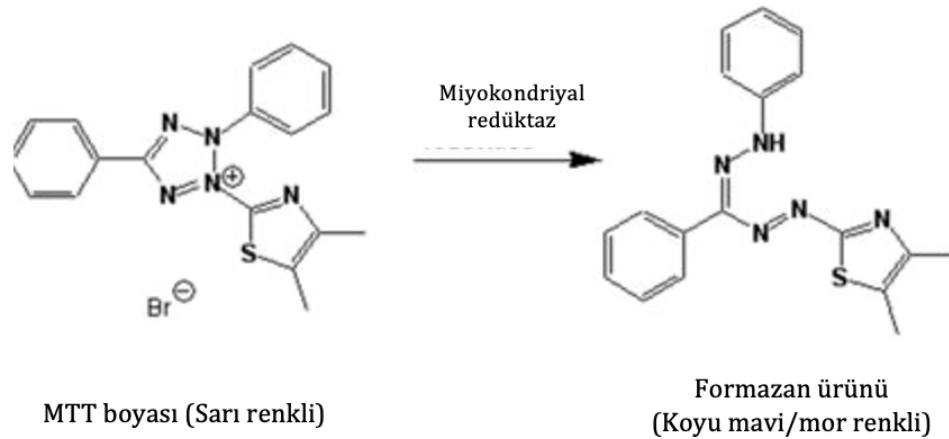
Hücrelerin biyoluminesans özelliğini kaybetmediğini göstermek için *in vitro* deneylere başlanmadan önce ve belirli aralıklarla 6 kuyucuklu plakalara 5×10^4 transfekte LoVo hücresi ekildi, yapışan hücreler 1xDPBS ile yıkandıktan sonra kuyu başına 1 µM D-lusiferin eklenip *in vivo* görüntüleme sistemi (IVIS) ile luminometrik olarak görüntü alınıp, ışım gösterildi. LoVo-Luc hücreleri için hazırlanan tamamlanmış besiyerine transfeksiyon özelliğini kaybeden hücrelerin elimine olup, transfekte hücrelerin çoğalması için 6 µg/mL blastasidin-S HCl (BSH) antibiyotigi

ilave edilmiştir. Böylece transfeksiyonun devam ettiğinin gösterilmesi amaçlandı [152].

3.4.4.2 Nano partiküllerin hücre canlılığına etkisi

Sağlıklı epitel hücreleri (CCD-1072Sk) ve kolon adenokarsinoma hücreleri (LoVo-Luc) üzerinde ayrı ayrı kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit nanopartikülün (CurPD4), ilaç yüklü olmayan PLGA-DSPE nanopartikülün (PD4), serbest kurkuminin 24, 48 ve 72 saatlik etkinliği incelendi. Daha sonra hücrelerde antineoplastik ajan 5-FU'in 24, 48 ve 72 saatlik IC₅₀ dozları belirlendi. Son olarak belirlenen dozlarda 5-FU ile kombine halde kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit nanopartikül (CurPD4) ve serbest kurkumin uygulanan hücrelerde 24, 48 ve 72 saatlik canlılık sonuçları karşılaştırıldı.

Test moleküllerinin kanser hücreleri ve sağlıklı hücrelerde doğrudan sitotoksik / antiproliferatif etkilere sahip olup olmadığını belirlemek için hücre bazlı in vitro analiz olan MTT testi [*3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide*] kullanıldı [153]. Tetrazolium boyası sarı renkli ve suda çözünürdür ancak canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile indirgenerek suda çözünmeyen mor renkli formazan kristalleri oluşturur. Deneyin temel prensibi MTT boyasının canlı hücre içerisine girmesiyle indirgenmesi sonucu mor renkli formazan tuzlarının meydana gelmesine dayanır. Aktif metabolizmaya sahip canlı hücrede süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesi artar, tetrazolyumu maksimum 570 nm'ye yakın bir absorbansa sahip mor renkli bir formazan ürününe dönüştürür (Şekil 3.5). MTT testinde formazan kristalleri DMSO ile çözülür ve oluşan renk yoğunluğu ile canlı hücre sayısı hakkında bir sonuç verir. Böylece kontrole göre yüzde hücre canlılığı belirlenir.



Şekil 3.5: MTT boyası ve renkli formazan ürününün yapıları [154].

LoVo-Luc kolon kanseri hücreleri ve CCD-1072Sk sağlıklı epitel hücreleri her kuyucukta 7×10^3 hücre olacak şekilde 96'lı plaklara 100 μ L besiyeri olacak şekilde ekildi ve plakaya yapışmaları için yirmi dört saat inkübe edildi.

5-FU ve kurkumin DMSO'da çözülerek stok çözeltileri hazırlandı ve ileri dilüsyonlar besiyeri ile yapıldı. Kurkumin çözeltisi her kullanımında taze hazırlandı. Plakaya yapışan hücreler üzerine inkübasyon süresinin ardından 5 μ L PBS ile çözülmüş MTT boyası (5 mg/mL) uygulandı. Daha sonra 37 °C'lik etüvde 4 saat inkübasyonun ardından besiyeri, ilaç ve MTT solüsyonu uzaklaştırıldı. Her bir kuyuya 150 μ L DMSO eklenerek 20 dakika boyunca tuz çözüldü ve spektrofotometre (Varioskan multiplate okuyucu) ile 570 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kontrol grubu olarak, yalnız besiyeri uygulanmış hücrelerin absorbansı %100 hücre canlılığı olarak kabul edildi. İlaç uygulanan grupların yüzde canlılıkları kontrole kıyasla hesaplandı. Tüm deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 5.0 Software kullanılarak saptandı.

3.4.4.3 Nano partiküllerin apoptoz üzerine etkisi

3.4.4.3.1 Akridin oranj (AO) / etidyum bromür (EB) çift boyama deneyi

Hücrelerde apoptozun varlığını ve kantitatif tayinini yapabilmek için morfolojik değişiklikleri değerlendiren akridin turuncusu/etidyum bromür (AO/EB) çift boyama metodu kullanılır [155]. Akridin turuncusu boyası vital bir boyadır ve hem canlı hem de ölü hücreleri boyar. Etidyum bromür boyası ise sadece membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyar. Nekrotik, canlı, erken ve geç apoptotik hücreler floresan mikroskopla görüntülenir [156]. AO/EB ile boyanmış hücrelerde, sitoplazma ve nükleolus parlak yeşil ve soluk kırmızı floresan verirken, asidik bölmeler parlak kırmızı floresan verir. Kırmızı floresanın yoğunluğu, asitlik derecesi ve/veya hücresel asidik bölmenin hacmi ile orantılıdır [157]. Apoptoz deneyinde hücrelerin görsel olarak canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik etiketlenmesini sağlamak üzere Şekil 3.6 kullanıldı.

Altı kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir kuyuda ortalama $1,2 \times 10^6$ tane olmak üzere LoVo-Luc hücreleri ekildi ve 24 saat boyunca yapışmaları beklendi. Hücrelere IC₅₀ dozlarının altında 25 μ g/mL serbest kurkumin, CurPD4, BoşPD4, 500 μ M 5-FU, 25 μ g/mL kurkumin+500 μ M 5-FU ve CurPD4+500 μ M 5-FU uygulandı. Maddeler ile 48 saat inkübe edilen hücreler tripsin-EDTA kullanılarak ependorf tüplere alındı ve 1xDPBS ile 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 2 defa yıkandı. Ardından 25 μ L

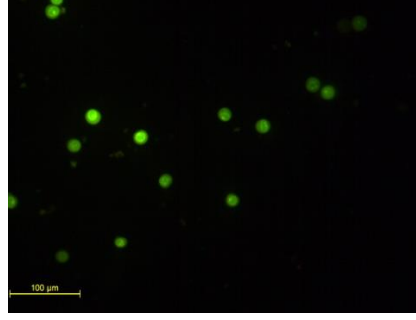
hücre süspansiyonunu ($0,5 \times 10^6$ hücre/mL) 10 µL 1x AO/EB boya solüsyonu ile inkübe edildi ve yavaşça karıştırıldı. Mikroskopik bir lam üzerine 10 µL hücre boya karışımı yerleştirildi, bir cam lamel ile kapatıldı ve floresan filtresinde 20X objektif kullanılarak floresan mikroskopunda (*Leica DM 1000*) hücreler incelendi. Her numune, mikroskopi ve kantifikasyondan hemen önce boyandı ve numuneler hemen değerlendirildi. Hücrelerin canlılık, apoptoz ve nekroz oranları seçilen alanlarda 100 adet hücre sayılıp not edilerek yarı kantitatif olarak belirlendi. Bu işlem üç kez tekrarlandı ve apoptoz yüzdeleri standart sapmalarıyla birlikte hesaplandı. Apoptoz oranı, apoptotik hücrelerin sayılan tüm hücrelere yüzdesi olarak hesaplandı ve her deney grubu için en az 100 çekirdek analiz edildi. Grup ortalamaları arasında kontrole göre karşılaştırmalar, çift yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ve ardından Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi. Farklılıklar $p < 0.05$ olduğunda sonuç anlamlı kabul edildi.

3.4.4.3.2 DAPI boyama ve apoptoz morfolojisinin analizi

Apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişiklikleri hem çekirdek hem de sitoplazmada hücre tipleri ve türleri arasında oldukça benzerdir. Apoptotik hücrede hücre şeklinin yuvarlanması, hücre hacminde azalma (piknoz) ve psödopodların geri çekilmesi ile kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma gözlenir. Kromatin, parçalanana kadar daha da yoğunlaşır ancak plazma membranı süreç boyunca bozulmaz.

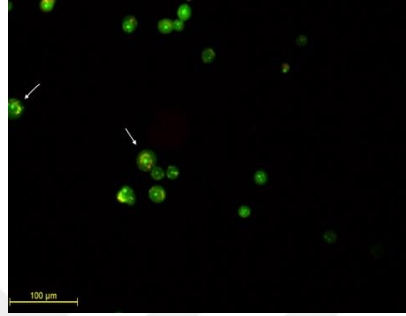
Çekirdekdeki bu morfolojik değişikliklerin gösterilmesi için LoVo-Luc hücrelerine CurPD4 nanopartikülleri uygulandı ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından hücreler, 4% paraformaldehit (PFA) ile fikse edildi. Hücreler önce 30 dakika 10 µl 1x AO boyası ile ardından 10 dakika 10 µg/mL konsantrasyonda DAPI ile inkübe edilerek çekirdekleri ve sitoplazması boyandı. Floresan mikroskopu altında gözlemlendi (Zeiss, Axio Observer Z1) ve görsel olarak analiz edildi.

Canlı hücreler



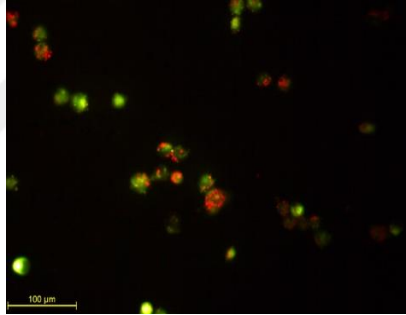
Homojen yeşil renkli çekirdek hücrenin merkezinde yerleşmiş.

Erken apoptotik hücreler



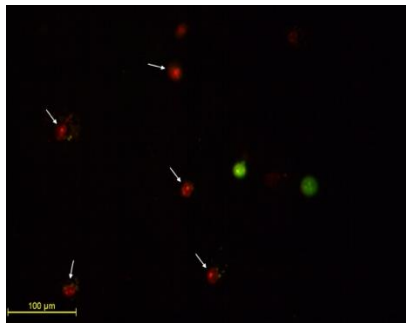
Kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması nedeniyle çekirdekte parlak sarımsı-yeşil noktalar görülür. Hücrelerin tek tarafında hilal şeklinde yer alır.

Geç apoptotik hücreler



DNA denatürasyonu nedeniyle hem AO hem EB içerir, kırmızımsı turuncu renk oluşur.

Nekrotik hücreler



Morfolojisi bozulmuş hücrelerin hacmi artar. Düzensiz turuncu-kırmızı flüoresans ve belirgin olmayan bir dış hat görülür.

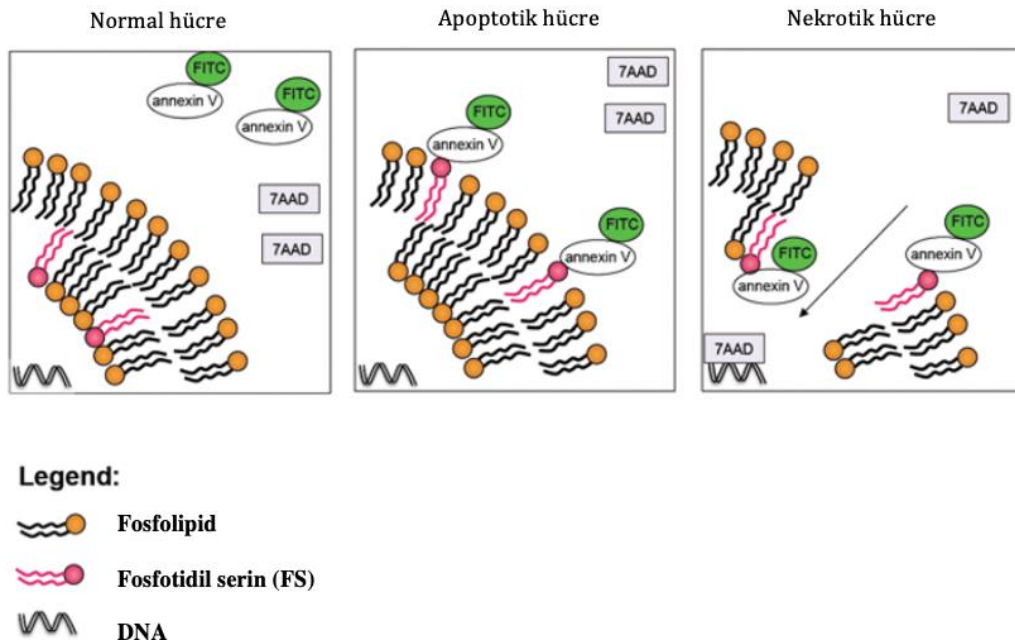
Şekil 3.6: AO/EB deneyindeki canlı, erken /geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin özellikleri.

3.4.4.3.3 Annexin V-FITC / PI ile akış sitometri analizi

Normal ve sağlıklı hücrede plazma zarında fosfatidilserin (FS) bulunmaz. Erken apoptozda, hücre zarının dış katmanlarında lokalize olan ve iç katmanlardan

"fırlatılmış" FS ekspresyonu vardır. Bu, işaretli hücreler makrofajlar tarafından erken tanınmayı sağlar ve proinflatuar sitokinlerin salınması olmadan fagositozla hücre ölümü ile sonuçlanır. Annexin V proteini, kalsiyum varlığında FS ile yüksek afinite ile bağlanır. Bu nedenle Annexin V konjugatı (Annexin V-floresan izotiyosiyanat (FITC)), akış sitometrisi yöntemi ile erken apoptozu tespit etmek için yaygın olarak kullanılır (Şekil 3.7). Geç apoptotik ve nekrotik hücrelerdeki DNA ya ise propidyum iyodür (PI) boyası bağlanır [158].

Akış sitometrisi cihazında apoptoz tayini için ticari olarak satın alınan Annexin V-FITC/PI apoptoz tayin kiti (EBioscience) kullanıldı ve kit talimatlarına göre deney planlandı. Daha önceki apoptoz tayin yöntemlerinde olduğu gibi (Bölüm 3.2.3.3) hücreler hazırlandı ve maddeler uygulandı. Ardından hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp 1xDPBS ile yıkandı, 195 µl 1x bağlanma tamponu ve 5 µl Annexin V-FITC boyası ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 200 µl 1x bağlanma tamponu ekleyip +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı. Pellete 190 µl 1x bağlanma tamponu ve 10 µl propidyum iyodür boyası eklenip vorteksledikten sonra akış sitometrisinde (Becton Dickinson, FACS Canto II) ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$:488/525 nm) analiz edildi.



Şekil 3.7: Annexin V-FITC / PI analizinin çalışma prensibi [159].

3.4.4.4 Western Blot ile protein ekspresyonlarının analizi

Westernblot (veya İmmün blotlama), karmaşık numunelerden hedef proteinler hakkında spesifik bilgiler elde etmek için antikor bazlı proplar kullanan, protein tespiti için yaygın olarak kullanılan rutin bir yöntemdir. Antikor-antijen etkileşiminin özgülüğü, bir protein karışımının ortasında bir hedef proteinin tanımlanmasını sağlar. Bu yöntem proteinlerin miktarı, moleküler ağırlığı ve translasyon sonrası modifikasyonları hakkında bilgi elde etmek için kullanılabilir. Temel olarak protein jel elektroforezi ile boyutlarına göre ayrılmış proteinlerin görüntülenmesi amacıyla membrana aktarılması olayına blotlama denilir.

Bu tekniği uygulamak için öncelikle KK hücreleri (LoVo-Luc) altı kuyucuklu hücre kültür plakalarında (8.8×10^6 hücre) 2 mL besiyeri ile ekildi ve hücrelerin yapışması için 24 saat inkübe edildi. Ardından hücreler kuyucuklarda 1800 μ L besiyeri içerisinde dilüe edilmiş 200 μ L formülasyon (CurPD4), 5-FU, kurkumin (25 mg/mL) veya kombinasyonları ile muamele edilerek 24 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Kontrol grubu olarak hiçbir muamele görmemiş ve 2000 μ L besiyeri ile inkübe edilmiş hücreler kullanıldı. Daha sonra 1xDPBS ile yıkayıp %0,25 Tripsin-EDTA kullanılarak fiziksel olarak kaldırılan hücreler +4 °C sıcaklık ve 1500 rpm'de santrifüj edildi.

Protein elektroforez ve ardından western blot analizinde kullanılmak üzere ilk olarak uygulama yapılmış ve inkübasyon süresi tamamlanmış hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı. Elde edilen pelletlere 150 μ L RIPA (radyoimmünopresipitasyon) lizis tamponu (PMSF, Na-ortovanadat ve proteaz inhibitör kokteyli eklenmiş) ilave edildi, vortekslendi ve 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi ve edilerek total hücre ekstraktı elde edildi. Ayrılan süpernatant protein miktarı ölçüldükten sonra jel elektroforezinde kullanılmaya dek -80 °C'de muhafaza edildi. Bradford metodu ile protein miktar tayini yapılması için BSA protein standartları kullanıldı [160]. 96'lı plaklarda her kuyuya 5 μ L total hücre lizatı veya BSA standartı ve üstüne 150 μ L Bradford ajanı (Thermo Scientific Pierce Coomassie Plus Assay Reagent) konuldu. 5 dakika karanlıkta inkübasyonun ardından spektrofotometrede absorbans (595 nm'de fotometrik) ölçümü yapıldı. BSA standart grafiği kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonu hesaplandı.

SDS-PAGE için %10'luk ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli olacak şekilde dikey elektroforez sisteminde SDS jeli döküldü. Proteinler (20 μ L'de 50 μ g) jeldeki kuyulara yüklenmesi için konsantrasyonları hesaplandı. Daha önce içerisine β -ME eklenmiş 4X

laemli tamponu ile karıştırıldı ve ısıtıcı blokta 96 °C'de 5 dakika denatüre edildi. SDS içeren yürütme tamponu içinde taraklar çıkarıldıktan sonra yürütme tankına yerleştirilen jeller, proteinler yürütme jelinden çıkana kadar 90 V'da daha sonra 120 V'da yaklaşık 2 saat yürütüldü. Daha sonra aktifleştirilmesi amacıyla metanol, dH₂O ve transfer tamponunda belirli süre bekletilen PVDF (poliviniliden florid) membran transfer süngerini ile jel arasına yerleştirilerek transfer sisteminde (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System) 25 Volt/ 30 dk'da geçişi sağlandı. Jeldeki proteinin tamamı membrana geçince, membran %5'lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak bloke edildi. Ardından 1X TBST (Tris- Buffered Saline-Tween) ile 5'er kez 5 dakika yıkandı ve %2,5'lik yağsız süt tozu ile hazırlanan belirli proteinlere karşı primer antikolar ile gece boyunca membran yüzeyine tamamen temas edecek şekilde +4 °C'de inkübe edildi. Primer antikor uzaklaştırıldıktan sonra tekrar 1X TBST ile yıkanan membran HRP konjuge Anti-rabbit veya Anti-mouse IgG sekonder antikor (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Yıkanan membran ECL solüsyonu (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, ABD) ile birkaç dakika bekletildi ve cihazın (Vilbert Laumart Fusion Fx5) otomatik ayarında görüntü alındı. Bantların kalınlığı NIH Image J yazılımı ile optik yoğunluk açısından analiz edildi.

3.4.4.5 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) tayini

Hücre içi ROS üretim seviyesi, 2,7-diklorofloresein diasetat (DCF-DA; Sigma, St Louis, MO, ABD) boyası kullanılarak ve Wan ve ark. yönteminden uyarlanarak tahmin edildi [161]. Hücreler, 96 kuyucuklu siyah tabanlı bir plakaya (10⁴ hücre/kuyucuk) ekildi ve 24 saat yapışmaları beklendi. Hücreler 24 ve 48 saatlik sürelerde kurkumin, 5-FU, CurPD4 ve bunların kombinasyonlarına maruz bırakıldı. Maruziyetin ardından hücreler, iki kez 1xDPBS ile yıkandı ve 37 °C'de 30 dakika boyunca H₂DCF-DA boyası (100 µL, 10 µM) ile inkübe edildi. Reaksiyon karışımı daha sonra 200 µL PBS ile değiştirildi ve floresan yoğunluğu, sırasıyla 485 ve 528 nm'lik uyarma ve emisyon dalga boylarında Varioskan multi plate okuyucu (*Thermo, Waltham, ABD*) ile ölçüldü. ROS oluşumunun kalitatif analizi, MTT hücre canlılığı sonuçları ile normalize edildi ve karşılaştırmalı olarak yapıldı [162].

3.4.4.6 Nanopartikül hücre içine giriş analizi

Nano enkapsüle kurkumin ve serbest kurkuminin hücre içerisine girişini karşılaştırmak formülasyonun etkinliğini göstermesi açısından önemlidir. Bu nedenle kurkuminin nano enkapsüle ve serbest halde LoVo-Luc kolorektal kanser hücreleri tarafından farklı zaman aralıklarında hücre içine alımı floresan mikroskop (Zeiss, Axio Observer Z1) ile incelenmiş ve kurkumin'in kendi oto-floresan özelliğinden yararlanılmıştır.

Nanopartikül hücre içerisine alım çalışmalarında kullanılmak üzere PLGA-kurkumin NP, CurPD4 NP ve %0.2 DMSO içinde çözülmüş (25 mg/mL) serbest kurkumin hazırlandı. LoVo-Luc hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi ve 24 saatlik inkübasyonun ardından toplam 2250 µL besi yeri ilave edildi. Hücrelere her biri 250 µL olacak şekilde tüm nano formülasyonlar ve eşit konsantrasyonda %0.2 DMSO içinde çözülmüş kurkumin ilave edildi. Hücreler 6, 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra PBS ile iki defa yıkandı ve PBS içerisinde bekletildi. Kurkumin emisyonunu gözlemlemek için canlı hücreler floresan mikroskop altında incelendi.

3.4.5 İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz yapmak için GraphPad Prism Yazılımı (sürüm 5.0) kullanıldı. Hata çubukları ortalamanın standart hatasını temsil eder. Veri setleri, two-way ANOVA ve/veya Student t- test kullanılarak karşılaştırıldı. Farklılıklar istatistiksel olarak (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$ olarak değerlendirildi.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kurkumin Yüklü PLGA-DSPE Hibrit Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Kurkumin yüklü PLGA - DSPE hibrit nano misellerin kanser ilaç direncini önlemede kemoterapi ajanı ile kombine olarak intravenöz (*i.v.*) uygulanması planlanmaktadır. Bu nedenle biyolojik dağılımında ve tümör penetrasyonunda nanopartiküllerin boyut aralığı kritik öneme sahiptir. Formülasyonu optimize ederken partikül boyutlarının monodispers ve kabul edilebilir aralıkta (100-200 nm) olması birincil şart olarak belirlenmiştir. Partikül boyutları nanopartiküllerin hücreye tutunması, fagositoz ve dokuda tutulumunda son derece önemlidir. Bu nedenle yoğunluk, hacim ve sayıca partiküllerin boyut dağılımı değerleri göz önüne alınmış ve formülasyon bileşenlerinin miktarında belirleyici olmuştur [128]. Ayrıca sifıra yakın PDI değeri, parçacıkların yüksek düzeyde tek dağılımlı (monodispers) olduğunu gösterir.

Tez çalışmasında elde etmek istediğimiz genel hedefimiz, yüksek miktarda kurkumin yüklü PLGA - DSPE hibrit nano miseller hazırlamak ve karakterize etmek, daha sonra bu nano partikülleri KK tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapi ilacı olan 5-FU ile kombinasyon halinde kolon kanseri hücrelerine (LoVo-Luc) uygulamaktır. Bu sayede yüksek doz ve hedefe yönelik uygulanan kurkumin'in kemoterapi ilacı ile kombinasyon tedavisindeki anti kanser etkinin artışı incelenmiştir. Kurkumin miktarındaki artış önceki çalışmalarımızda kullandığımız formülasyona göre en az iki kat daha fazla ilaç yüklenmesi ile ortaya konacaktır [16]. Nitekim bahsi geçen çalışmada direnç ile ilişkili *NF-κB* proteininin beş farklı alt biriminde anlamlı bir düşüş gözlenememiş ve bu durumun kurkumin dozuna bağlı olduğu düşünülmüştür. Böylece kurkumin miktarındaki artışla birlikte kolon kanserinde 5-FU direncinin azalmasının hücrelerdeki sitotoksik etki aracılığı ile incelenmesi amaçlanmıştır.

4.1.1 Kurkumin yüklü ve boş hibrit nanopartikül ön çalışmaları

Nano formülasyonların karakterizasyonu için ortalama partikül boyutu, partikül boyut dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli Dynamic Light Scattering (DLS) (Zetasizer Nano ZS, model ZEN 3600; Malvern Instrument, Inc, Londra, İngiltere) cihazı ile 25 °C'de dinamik ışık saçılım metodu kullanılarak ölçülmüştür. Karakterizasyon çalışmalarında yoğunluk, hacim ve sayıca partiküllerin boyut dağılımı değerleri ve monodispers olmaları göz önüne alınmış ve formülasyon bileşenlerinin miktarında belirleyici

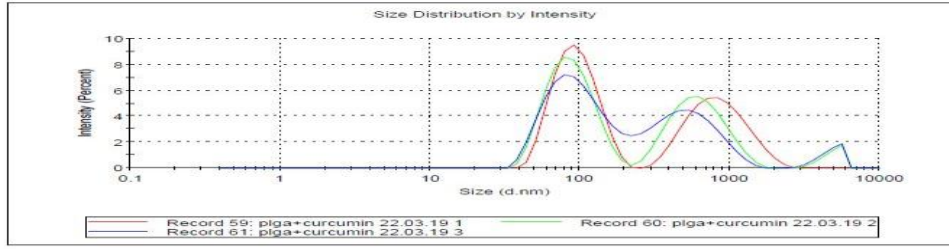
olmuştur. Sayıca dağılım, farklı boyuttaki parçacıkların ortamdaki sayısını; hacimce dağılım, farklı boyuttaki parçacıkların ortamdaki toplam hacmini; yoğunluğa göre dağılım ise, farklı boyutlardaki parçacıklar tarafından ne kadar ışık saçıldığını gösterir [163]. Buna göre en yüksek kurkumin taşıma miktarına ve kabul edilebilir polidispersite indeksine (PDI) sahip olan formülasyonlar optimize nanopartikül olarak kabul edilmiştir.

İlk olarak yöntem belirlemek amacıyla ön çalışmalara başlandı. PLGA nano partikülleri hazırlanırken hidrofobik moleküllerin enkapsülasyonunda en sık tercih edilen yöntem olan emülsifikasyon-solvent evaporasyon yöntemi kullanıldı [142]. Organik faz olarak PLGA kullanılarak solvent evaporasyon yöntemi ile 5 mg kurkumin yüklenmiş bir formülasyon hazırlandı ve PLGA nanopartiküllerinin tek başına bu miktarı taşıyamadığı gösterildi. Hazırlanan formülasyonun fiziksel görünümünde agregat oluşmuş ve bu durum Şekil 4.1’de gösterilen DLS grafikleri ile de teyit edilmiştir. Sayıca ortalama boyut dağılımı 51,18 nm (%100) olmakla birlikte PDI (0,646) kabul edilemez seviyede yüksek bulunmuştur. Hacimce ortalama boyut dağılım sonuçları da beklenenden çok daha küçük (69,5 nm, %68,9) ve büyük (5016 nm, %4.7) partiküllerin birlikte bulunduğunu göstermiştir. Buradan anlaşıldığı üzere tek başına PLGA polimeri kullanılarak klasik yöntem ile hazırlanan nanopartikül yüksek miktarda kurkumin taşımada başarılı olamamıştır (Şekil 4.1).

Kurkumin yükleme miktarını arttırabilmek için klasik hazırlama yöntemi ile devam edilmiş ancak hidrofobik kapasiteyi arttırmak için lipid yapılı DSPE eklenmiş ve birbiri ile daha iyi karışan sıvılar olduğu için asetonitril ve metanol kullanılmıştır. Buna göre PLGA asetonitril içerisinde, DSPE ve kurkumin ise metanol içerisinde ayrı ayrı çözündürülüp daha sonra bir araya getirilerek organik fazı oluşturmaktadır. Hazırlanan NP’lere (CurPDI) 5 mg kurkumin yüklenmiş ancak formülasyonda birkaç saat içerisinde agregat oluşumu ve PDI değerinde kabul edilemez artış gözlenmiştir. Buna karşın sayıca boyut dağılımı sonuçları önceki formülasyondan çok daha iyi bir partikül olduğunu göstermektedir. PDI (0,262) önceki formülasyona göre daha düşüktür. Sayıca boyut dağılımı monodispers ve istenilen boyut aralığında (165,7 nm, %100) bir partikül olduğunu gösterir, ancak hacim ve yoğunluğa göre boyut dağılımı sonuçlarından agregat oluştuğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.2).

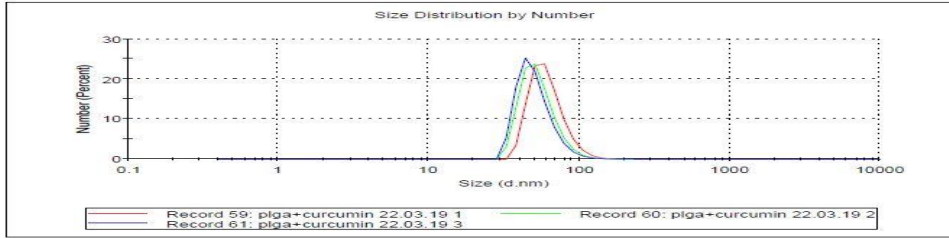
Results

Z-Average (d.nm): 135.5 **Peak 1:** 101.7 **% Intensity:** 55.6 **St Dev (d.nm):** 45.71
Pdl: 0.646 **Peak 2:** 542.0 **% Intensity:** 39.1 **St Dev (d.nm):** 257.1
Intercept: 0.949 **Peak 3:** 4693 **% Intensity:** 5.3 **St Dev (d.nm):** 790.5
Result quality **Good**



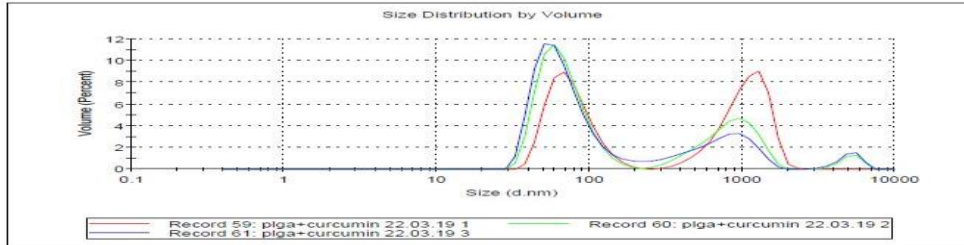
Results

Z-Average (d.nm): 135.5 **Peak 1:** 51.18 **% Number:** 100.0 **St Dev (d.nm):** 17.46
Pdl: 0.646 **Peak 2:** 0.000 **% Number:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Intercept: 0.949 **Peak 3:** 0.000 **% Number:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Result quality **Good**



Results

Z-Average (d.nm): 135.5 **Peak 1:** 69.65 **% Volume:** 68.9 **St Dev (d.nm):** 32.94
Pdl: 0.646 **Peak 2:** 762.5 **% Volume:** 26.4 **St Dev (d.nm):** 339.2
Intercept: 0.949 **Peak 3:** 5016 **% Volume:** 4.7 **St Dev (d.nm):** 873.6
Result quality **Good**



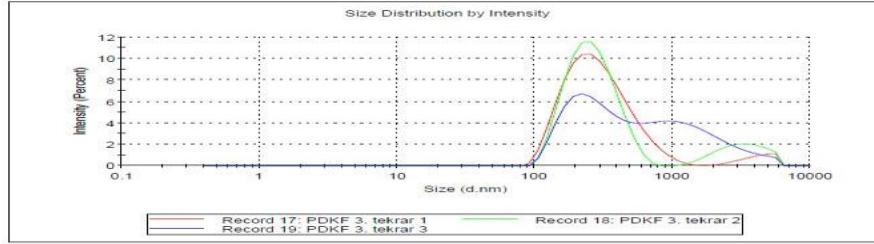
PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıcı % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
0,646	101,7 ± 45,71	51,18 ± 17,46	69,65 ± 32,94

Şekil 4.1: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemi ile hazırlanan PLGA – kurkumin NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

Results

Z-Average (d.nm): 265.8 **Peak 1:** 318.3 **% Intensity:** 94.7 **St Dev (d.n...)** 186.4
Pdi: 0.262 **Peak 2:** 4158 **% Intensity:** 5.3 **St Dev (d.n...)** 1046
Intercept: 0.965 **Peak 3:** 0.000 **% Intensity:** 0.0 **St Dev (d.n...)** 0.000

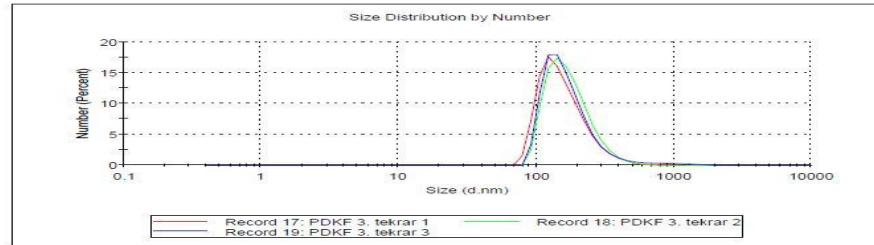
Result quality Good



Results

Z-Average (d.nm): 265.8 **Peak 1:** 165.7 **% Number:** 100.0 **St Dev (d....)** 82.49
Pdi: 0.262 **Peak 2:** 0.000 **% Number:** 0.0 **St Dev (d....)** 0.000
Intercept: 0.965 **Peak 3:** 0.000 **% Number:** 0.0 **St Dev (d....)** 0.000

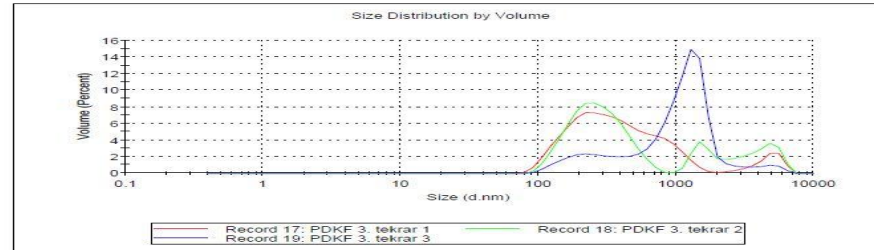
Result quality Good



Results

Z-Average (d.nm): 265.8 **Peak 1:** 428.7 **% Volume:** 90.6 **St Dev (d.nm):** 306.0
Pdi: 0.262 **Peak 2:** 4657 **% Volume:** 9.4 **St Dev (d.nm):** 1090
Intercept: 0.965 **Peak 3:** 0.000 **% Volume:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000

Result quality Good



PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıcı % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
0,262	318,3 ± 186,4	165,7 ± 82,49	428,7 ± 306,0

Şekil 4.2: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemi ile hazırlanan PLGA-DSPE-kurkumin hibrit NP'e (CurPD1) ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

Dipte çöken maddeler filtre kâğıdı kullanarak ayrılmış ve FT-IR spektroskopisi çekildiğinde DSPE ve kurkumin içerdiği anlaşılmıştır. Bu durumda nanopartikül içine bir miktar DSPE yerleştiği ancak yerleşemeyen DSPE'nin süspansiyon haldeki kurkumini de kendi ile çöktürdüğü düşünülmüştür.

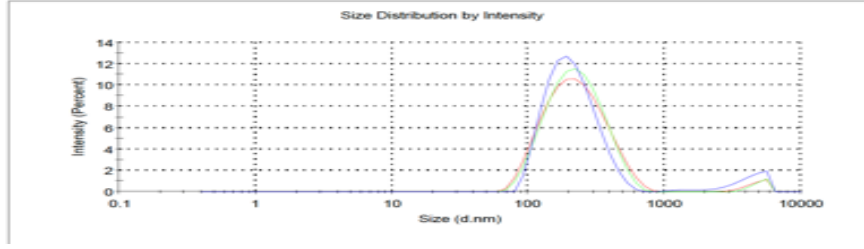
Bunu takiben tasarlanan nano ilaç taşıyıcı sistemde, laboratuvarımızda en sık kullanılan yöntemde optimizasyon yapılarak rasyonel bir tasarım uygulanmıştır. Kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit nanopartiküllerinin hazırlanması için önceki klasik yöntemden farklı olarak, DSPE'nin sulu ortamda hızla agregat oluşturmamasından dolayı, hazırlanma esnasında nanopartiküller oluşuncaya dek ortama lipidin camısı geçiş sıcaklığının üzerinde ısı uygulanmıştır. Bu sırada fosfolipid yapıdaki DSPE'nin sıcaklığın etkisiyle sıvı faza geçtiği ve hidrofobik kurkumin ile PLGA'nın hidrofobik kısımları arasında üçlü etkileşim meydana getirdiği düşünülmektedir. Isı uygulanması sayesinde lipidin uzun karbon zincirlerinin açıldığı, polimer ile kolayca birleştiği ve nano taşıyıcının hidrofobik ilaç taşıma kapasitesini arttırdığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda sulu faz ve organik fazın süreç boyunca sabit sıcaklıkta (60 °C) tutulmasının agregat oluşumunun önlenmesi için oldukça önemli olduğu anlaşılmıştır. Buradan yola çıkarak öncelikle ilaç yüklenmeden PLGA-DSPE hibrit nanopartikül (PD2) ısı uygulanarak ve sabit sıcaklıkta solvent buharlaştırılarak hazırlanmıştır. Sunulmuş olan DLS sonuçlarına göre (Şekil 4.3) PDI değeri kabul edilebilir aralığın yüksek sınırlarında (0,301) belirlenirken sayıca boyut dağılımı 136.2 nm civarındadır. Ancak yoğunluğa ve hacme göre boyut dağılım aralıkları (sırasıyla 217,1 ve 216,3) 200 nm üzerinde olduğu için partikül başarısız kabul edilmiştir.

Emülsifikasyon – solvent evaporasyon yöntemine ısı uygulaması eklenerek hazırlanan aynı NP'e daha sonra 5 mg kurkumin yüklenmiş (CurPD2) ve boyut dağılımı ölçülmüştür. Buna göre PDI değeri 0,393 ve sayıca boyut dağılımı $81,46 \pm 24,64$ nm olarak belirlenmiştir. Yoğunluğa göre ve hacimce boyut dağılımları 100 nm üzerinde ve partikül boyutu dağılımı polidispers bulunmuştur. Kurkumin yüklü NP'de boş haline kıyasla boyut dağılımının düştüğü ancak PDI değerinin değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.4). Bunun üzerine aynı yöntemde sonucu iyileştirebilmek adına lipid miktarını değiştirerek optimizasyon çalışması yapılmasına karar verilmiştir.

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.n.m): 211.4	Peak 1: 217.1	91.3	90.46
Pdl: 0.301	Peak 2: 4218	7.9	1099
Intercept: 0.945	Peak 3: 1377	0.8	248.8

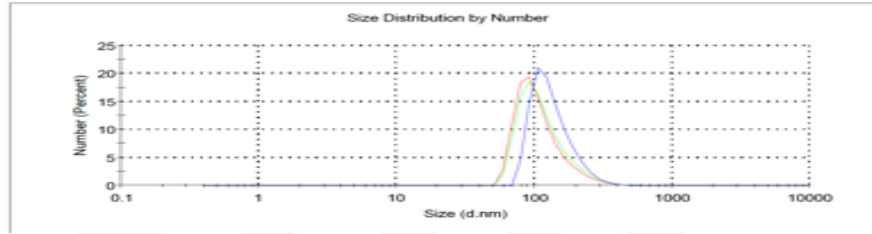
Result quality Good



Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.n.m): 211.4	Peak 1: 136.2	100.0	51.04
Pdl: 0.301	Peak 2: 1297	0.0	297.9
Intercept: 0.945	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

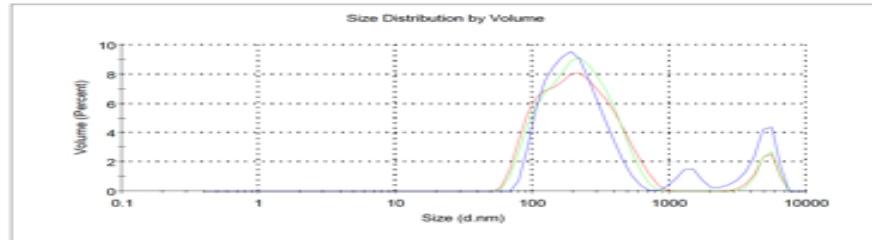
Result quality Good



Results

	Size (d.n.m):	% Volume:	St Dev (d.n.m):
Z-Average (d.n.m): 211.4	Peak 1: 216.3	78.6	104.3
Pdl: 0.301	Peak 2: 4792	15.6	1023
Intercept: 0.945	Peak 3: 1434	5.8	329.9

Result quality Good

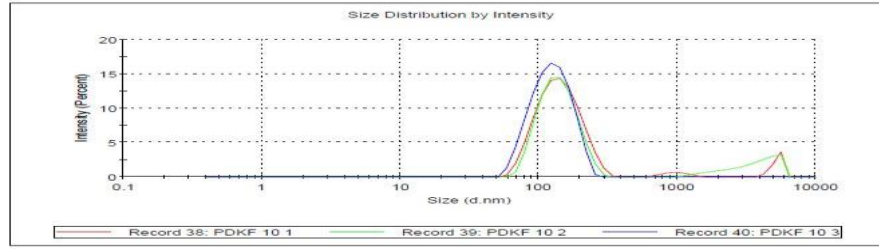


PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıca % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
0.301	217.1 ± 90.46	136.2 ± 51.04	216.3 ± 104.3

Şekil 4.3: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemine ısı uygulaması eklenerek hazırlanan boş PLGA-DSPE hibrit NP'e (PD2) ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

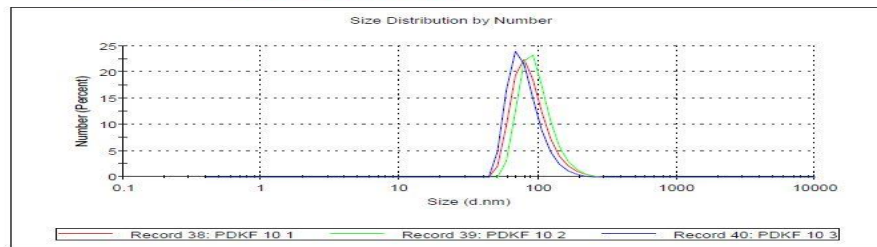
Results

Z-Average (d.nm): 280.1 **Peak 1:** 127.6 **% Intensity:** 100.0 **St Dev (d.n...)** 39.85
Pdl: 0.393 **Peak 2:** 0.000 0.0 0.000
Intercept: 0.965 **Peak 3:** 0.000 0.0 0.000
Result quality Refer to quality report



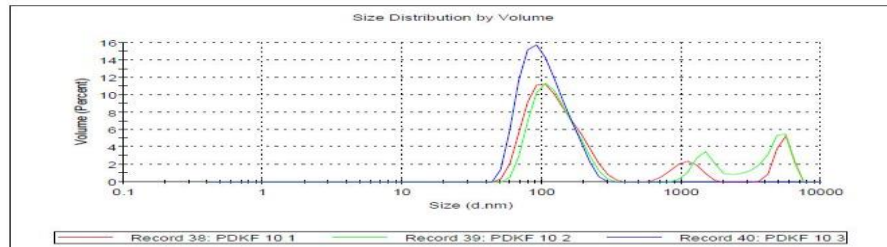
Results

Z-Average (d.nm): 280.1 **Peak 1:** 81.46 **% Number:** 100.0 **St Dev (d....)** 24.64
Pdl: 0.393 **Peak 2:** 0.000 0.0 0.000
Intercept: 0.965 **Peak 3:** 0.000 0.0 0.000
Result quality Refer to quality report



Results

Z-Average (d.nm): 280.1 **Peak 1:** 108.2 **% Volume:** 100.0 **St Dev (d.nm):** 40.64
Pdl: 0.393 **Peak 2:** 0.000 0.0 0.000
Intercept: 0.965 **Peak 3:** 0.000 0.0 0.000
Result quality Refer to quality report



PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıca % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
0,393	127,6 ± 39,85 nm	81,46 ± 24,64	108,2 ± 40,64

Şekil 4.4: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemine ısı uygulaması eklenerek hazırlanan PLGA-DSPE-kurkumin hibrit NP'e (CurPD2) ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

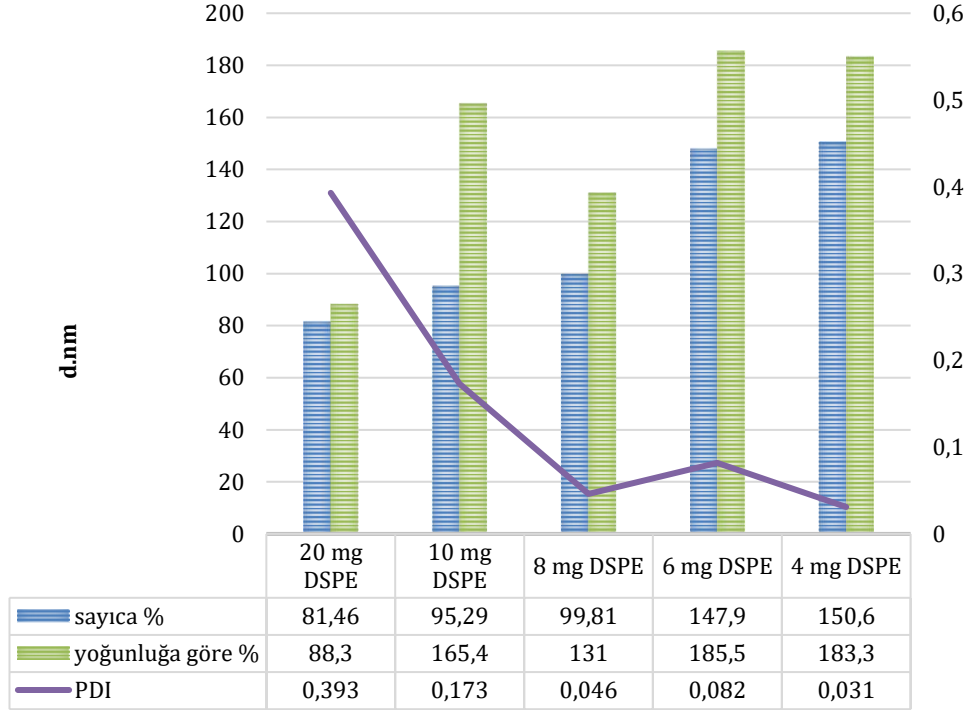
Hibrit NP'lerin sentezinde kullanılan lipid-polimer oranı optimize edilmelidir, çünkü fazla miktardaki lipidler polimerik çekirdeğe sahip olmayan miseller ve lipozomlar oluşturabilir [164]. Amfifilik lipidler, yağ-su (O/W) emülsiyonundaki yağ damlacıklarını stabilize ederek yüksek ilaç kapsülleme verimliliğine sahip kararlı bir katı çekirdek oluşturabilir. Literatürde benzer bir çalışmada Liu ve ark. emülsifiye edici bir lipid olan DLPC'nin (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine) miktarını PLGA çekirdeğini eşit şekilde kaplamak için optimize etmiştir. Çünkü optimum seviyenin üzerindeki lipidlerin daha düşük enkapsülasyon etkinliği ve yetersiz hücre içi dağıtımla sonuçlanacak olan lipid veziküllerinin oluşumuna yol açtığını göstermiştir. Bu nedenle çalışmamızda optimize DSPE ve kurkumin miktarının belirlenmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonlarda PLGA ve kurkumin miktarları sabit tutularak DSPE miktarında (0-10 mg aralığında) değişiklikler yapılmış, bu tekrarlı çalışmaların sonuçları Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1: Emülsifikasyon- solvent evaporasyon yöntemine ısı uygulaması eklenerek hazırlanan CurPD2 ait boyut dağılımı sonuçları, Formülasyondaki lipid miktarının PDI ve partikül boyutu dağılımına etkisi.

Kullanılan nano taşıyıcı	Sayıca boyut dağılımı	Hacme göre boyut dağılımı	Yoğunluğa göre boyut dağılımı	PDI
PLGA (50 mg)	56,56 ± 15,75	70,89 ± 23,69	88,30 ± 26,50	0,362
PLGA (50 mg) DSPE (20 mg)	81,46 ± 24,64	108,2 ± 40,64	127,6 ± 39,85	0,393
PLGA (50 mg) DSPE (10 mg)	95,29 ± 30,53	133,0 ± 54,90	150,7 ± 52,64	0,173
PLGA (50 mg) DSPE (8 mg)	99,81 ± 25,58	119,8 ± 35,37	130,7 ± 33,14	0,046
PLGA (50 mg) DSPE (6 mg)	147,9 ± 40,52	180,4 ± 52,07	183,1 ± 46,74	0,082
PLGA (50 mg) DSPE (4 mg)	150,6 ± 38,92	178,5 ± 47,62	180,5 ± 42,26	0,031

*Her formülasyon 20 mL'de 5 mg kurkumin eklenerek hazırlanmıştır.

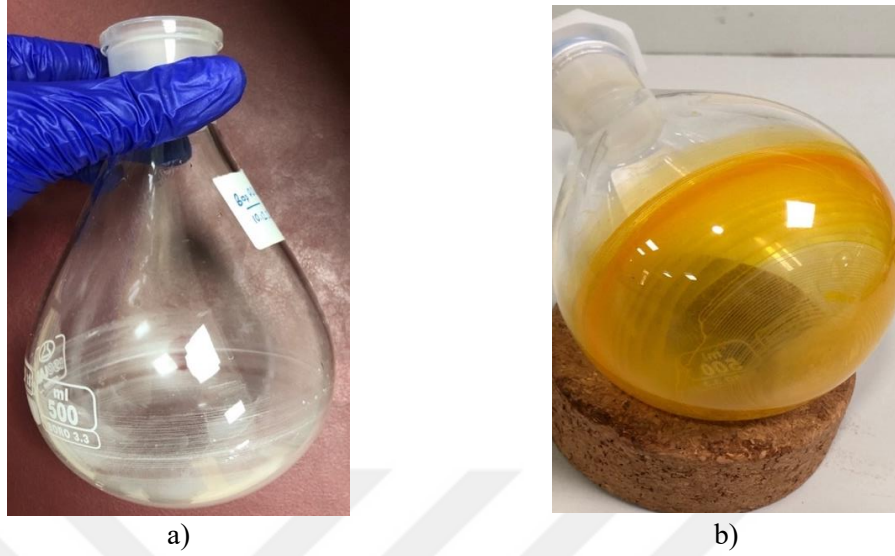
DSPE miktarındaki değişime bağlı olarak yapılan karakterizasyon çalışmasında 20, 10, 8, 6 ve 4 mg DSPE diğer parametreler eşit tutularak karşılaştırılmış ve 8 mg DSPE de yeterince düşük PDI değeri (0,046) ve düşük partikül boyutu dağılımı (sayıca % boyut dağılımı: $99,81 \pm 25,58$) elde edilmiştir (Şekil 4.5). Buna göre 50 mg PLGA için kullanılması gereken optimum DSPE miktarı 8 mg olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5: DSPE miktarındaki artışla birlikte hazırlanan formülasyonun boyut dağılımı ve PDI değerlerinin değişimi.

Nano taşıyıcı hazırlanmasında sıklıkla kullanılan bir diğer yol da film oluşturma - rehidratasyon metodudur [165]. Nano formülasyon hazırlamada daha sonra bahsi geçen metot ile solvent evaporasyon - rehidratasyon metodu birleştirilmiştir. Film oluşturma işlemi için DSPE ve kurkumin 500 mL'lik cam balon içerisinde 15 mL kloroform ile çözülmüş ve tam çözünme elde edilene kadar vorteks ve ultrasonik ses dalgası uygulanmıştır. Bu sayede lipid ve ilacın balonun çeperinde tek tabaka halinde dizildiği öngörülmektedir (Şekil 4.6). Daha sonra bu filmin 5 mL asetonitril: metanol (3:1) içerisinde çözülmüş 50 mg PLGA çözeltisi ile rehidrate edilip %0,025 Tween 80 içeren ve 60 °C sıcaklıktaki deiyonize sulu faza (20 mL) manyetik karıştırıcı altında damla damla eklenmesi ile CurPD3 hazırlanmıştır. Aynı yöntemde tek başına DSPE ile film oluşturup kurkumin kullanılmadığı durumda ilaç taşımayan PD3 hazırlanmıştır. Birbirinden farklı zamanlarda hazırlanmış nano formülasyonlara ait

boyut dağılımı sonuçları tablolarda (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3) ve DLS diyagramı sonuçları şekilde (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8) gösterildiği gibidir.



Şekil 4.6: Rotary evaporatör ile 125 mmHg vakum altında 50 °C'de ve 150 rpm'de kloroformun uçurulması ile elde edilen a) DSPE ve b) DSPE-kurkumin film tabakası.

Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD3 NP düşük PDI ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliği ile başarılıdır. Ayrıca sayıca ortalama boyut dağılımı BoşPD3 için 167,74 nm, CurPD3 için 175,3 nm bulunmuştur (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Ancak tekrarlı hazırlanan NP'lere ait partikül boyutları hacme ve yoğunluğa göre bakıldığında 200 nm'den daha büyük (yoğunluğa göre ortalama 243,06 nm ve hacme göre 248,36 nm) bulunmuştur. Bu durumda formülasyon, hücre içine giriş ve kanser bölgesinde birikim özellikleri açısından dezavantajlı olacağından formülasyonun ileri karakterizasyon çalışmaları ve in vitro deneyler için elenmesine karar verilmiştir.

Film hazırlama yöntemi ile hazırlanan diğer NP ise CurPD4 olarak adlandırılmıştır. Evaporatör ile daha önce anlatıldığı gibi oluşturulan DSPE- kurkumin filminin önceden hazırlanmış PLGA nanopartikül ile rehidrate edilmesi (şiddetli vorteks ve sonikatör uygulaması) ile CurPD4 NP hazırlanmıştır. Bu yöntemde kullanılan PLGA NP, 50 mg PLGA'nın asetonitril: metanol (3:1) içerisinde çözülüp %0.025 Tween 80 içeren deiyonize sulu faza (20 mL) manyetik karıştırıcı altında damla damla eklenmesi ve bir gece boyunca çözücü karışımının uçurulması ile oluşturulmuştur. Birbirinden farklı zamanlarda hazırlanmış nano formülasyonlara ait boyut dağılımı sonuçları tablolarda (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5) ve DLS diyagramı sonuçları şekilde (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10) gösterildiği gibidir.

Tablo 4.2: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan PD3 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.

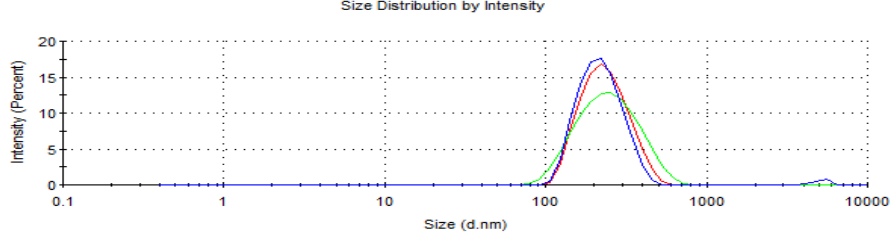
PD3	Yoğunluğa göre	Sayıca	Hacimce	PDI	% Dağılım
1	240,6	179,7	245,4	0,128	100%
2	224,9	155,7	225,1	0,092	100%
3	209,1	168,8	209,4	0,212	98%
4	224,7	166,5	226,3	0,119	100%
5	212,6	168	213	0,148	100%
Ortalama	222,38	167,74	223,84	0,1398	99%
S. Sapma	12,41	8,53	14,13	0,05	0,01

Tablo 4.3: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD3 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.

CurPD3	Yoğunluğa göre	Sayıca	Hacimce	PDI	% Dağılım
1	226,3	170,5	228,3	0,149	100%
2	216,9	165,9	217,6	0,176	98%
3	270,9	192,2	282,7	0,214	97%
4	236,3	156,6	239,7	0,152	100%
5	264,9	191,3	273,5	0,144	100%
Ortalama	243,06	175,3	248,36	0,167	0,99%
S. Sapma	23,79	15,83	28,44	0,03	0,01

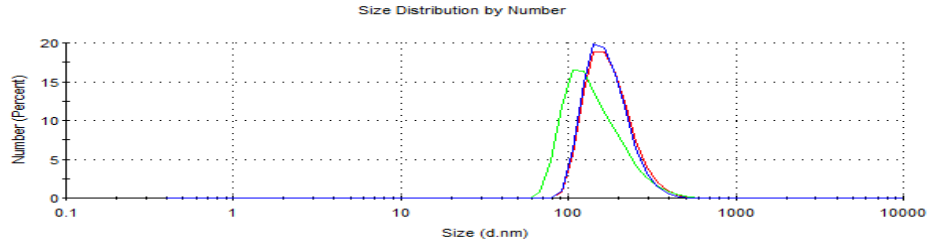
Z-Average (d.nm): 219.7
PdI: 0.128
Intercept: 0.951
Result quality : Good

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	240.6	100.0	79.11
Peak 2:	0.000	0.0	0.000
Peak 3:	0.000	0.0	0.000



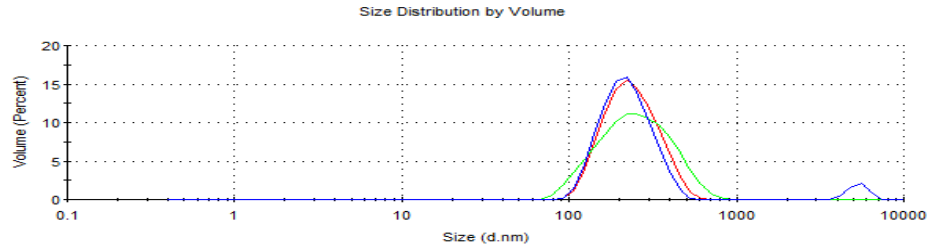
Z-Average (d.nm): 219.7
PdI: 0.128
Intercept: 0.951
Result quality : Good

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	179.7	100.0	59.61
Peak 2:	0.000	0.0	0.000
Peak 3:	0.000	0.0	0.000



Z-Average (d.nm): 219.7
PdI: 0.128
Intercept: 0.951
Result quality : Good

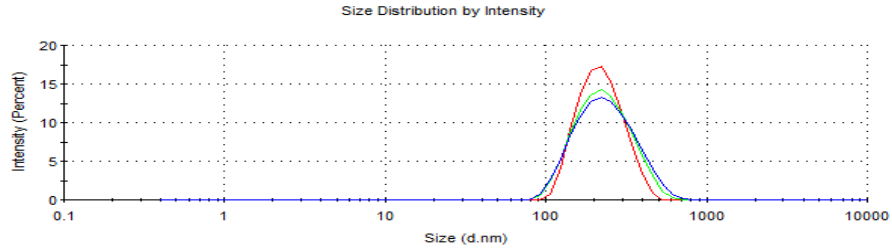
	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	245.4	100.0	88.65
Peak 2:	0.000	0.0	0.000
Peak 3:	0.000	0.0	0.000



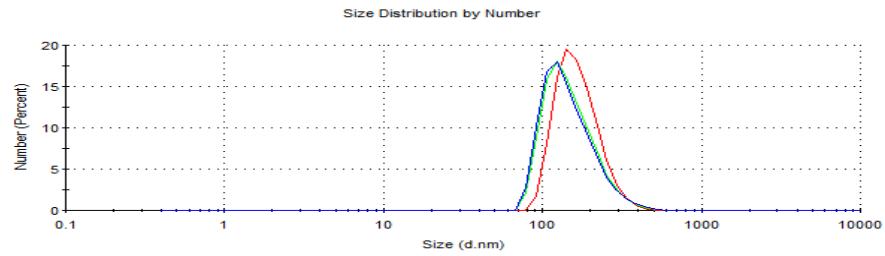
PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıca % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
0,128	240,6 ± 79,11 nm	179,7 ± 59,61 nm	245,4 ± 88,65 nm

Şekil 4.7: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan boş PD3 hibrit NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

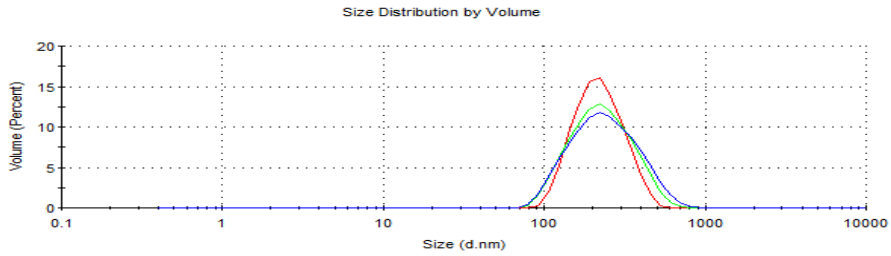
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 211.3	Peak 1: 226.3	100.0	71.14
PdI: 0.149	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.965	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 211.3	Peak 1: 170.5	100.0	55.22
PdI: 0.149	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.965	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 211.3	Peak 1: 228.3	100.0	79.19
PdI: 0.149	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.965	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıcı % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
PDI			
0,149	226,3 ± 71,14 nm	170,5 ± 55,22 nm	228,3 ± 79,19 nm

Şekil 4.8: Film oluşturma – PLGA ile rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan CurPD3 NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan nano formülasyona ait boyut dağılımı sonuçları optimize edilmiştir. Buna göre PLGA nanopartikül ile

rehidratasyon yapılan yöntemde (PD4) ortalama boyut dağılımı, organik çözücü ile çözülmüş PLGA ile rehidratasyon yaparak su fazına damlatılan yöntemde (PD3) göre daha düşük bulunmuştur. PD4 NP'ün sayıca ortalama boyut dağılımı 141,3 nm iken CurPD4 NP'ün 126,52 olarak hesaplanmıştır. Yoğunluğa ve hacme göre boyut dağılım sonuçlarının da hem ilaç yüklü hem de boş NP için (PD4 ve CurPD4) 200 nm altında olduğu anlaşılmıştır.

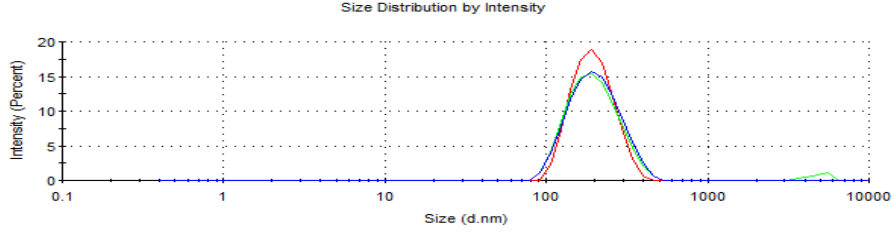
Tablo 4.4: PD4 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.

PD4	Yoğunluğa göre	Sayıca	Hacimce	PDI	% Dağılım
1	140,7	109,9	131,8	0,227	97%
2	199,7	154,8	198,1	0,166	100%
3	198,3	152,1	196,3	0,153	100%
4	201,8	151,1	199,6	0,08	100%
5	189,4	138,6	184,6	0,071	100%
Ortalama	185,98	141,3	182,08	0,1394	99%
S. Sapma	25,75	18,63	28,72	0,06	0,01

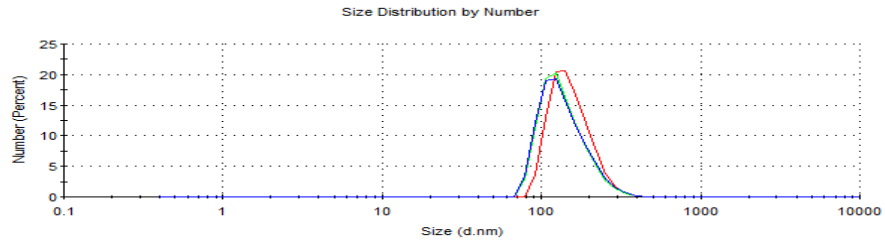
Tablo 4.5: CurPD4 NP'e ait tekrarlı hazırlanan formülasyon boyut dağılımı sonuçları.

CurPD4	Yoğunluğa göre	Sayıca	Hacimce	PDI	% Dağılım
1	171,8	100,3	154,4	0,182	100%
2	184,7	106,2	169,8	0,147	100%
3	196,5	156,6	195,0	0,076	100%
4	197,4	132,2	191,4	0,102	100%
5	192,7	137,3	187,7	0,235	100%
Ortalama	188,62	126,52	179,66	0,148	100%
S. Sapma	10,65	23,20	17,13	0,06	0,00

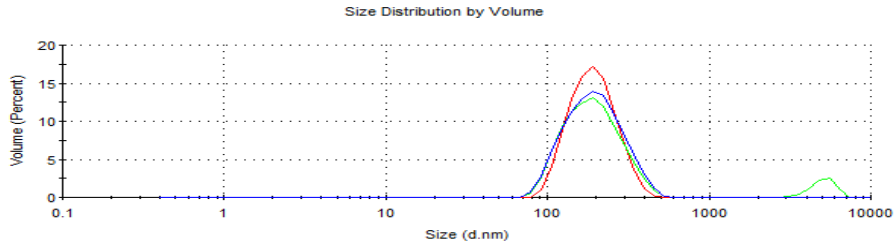
Z-Average (d.nm): 193.2 **Peak 1:** 199.7 **% Intensity:** 100.0 **St Dev (d.nm):** 57.70
Pdi: 0.166 **Peak 2:** 0.000 **% Intensity:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Intercept: 0.955 **Peak 3:** 0.000 **% Intensity:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Result quality : Refer to quality report



Z-Average (d.nm): 193.2 **Peak 1:** 154.8 **% Number:** 100.0 **St Dev (d.nm):** 46.35
Pdi: 0.166 **Peak 2:** 0.000 **% Number:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Intercept: 0.955 **Peak 3:** 0.000 **% Number:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Result quality : Refer to quality report



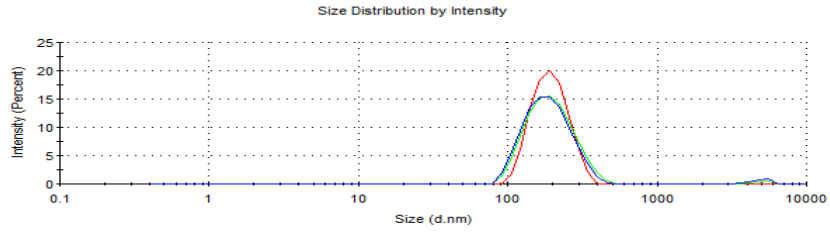
Z-Average (d.nm): 193.2 **Peak 1:** 198.1 **% Volume:** 100.0 **St Dev (d.nm):** 63.83
Pdi: 0.166 **Peak 2:** 0.000 **% Volume:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Intercept: 0.955 **Peak 3:** 0.000 **% Volume:** 0.0 **St Dev (d.nm):** 0.000
Result quality : Refer to quality report



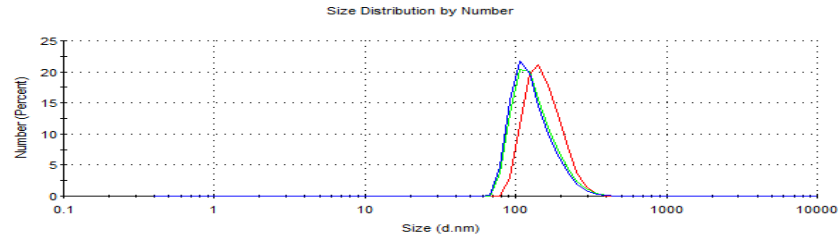
PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıca % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
0,166	199,7 ± 57,70 nm	154,8 ± 46,35 nm	198,1 ± 63,83 nm

Şekil 4.9: Film oluşturma / NP ile rehidrate etme yöntemi ile hazırlanan boş PD4 NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

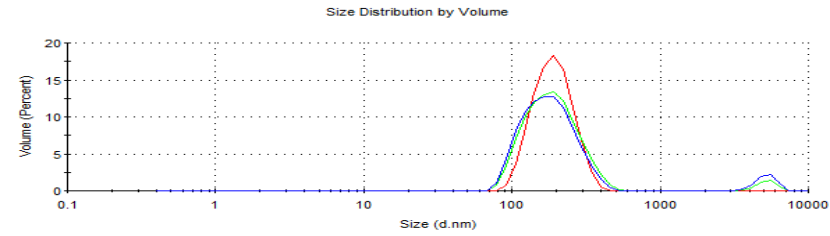
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 182.5	Peak 1: 196.5	100.0	52.57
Pdl: 0.076	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.927	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 182.5	Peak 1: 156.6	100.0	45.03
Pdl: 0.076	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.927	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 182.5	Peak 1: 195.0	100.0	58.34
Pdl: 0.076	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.927	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıcı % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
0,076	196,5 ± 52,57 nm	156,6 ± 45,03 nm	195,0 ± 58,34 nm

Şekil 4.10: Film oluşturma/ NP ile rehidrate etme yöntemi ile hazırlanan 5 mg kurkumin yüklü CurPD4 NP'e ait DLS diyagramları ve boyut dağılımı sonuçları.

4.1.2 Optimize formülasyona ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli sonuçları

Nanopartiküllerin boyutu, çapı ve yüzey kimyası kan damarlarında, akciğerlerde ve gastrointestinal sistemdeki biyo dağılımlarını etkilediği gibi immün sistemi aktive etme olasılıklarını da etkiler [166]. Küçük boyutlu (200 nm'nin altında) nano

partiküllerin kan dolaşımında daha uzun süre varlığını sürdürdüğü, ayrıca EPR etkisi yoluyla tümör bölgesinde birikim yaptığı iyi bilinmektedir. Buna karşın, optimum etkinlikteki ilaç dağıtım sistemi fagositik hücreler tarafından uzaklaştırılmayacak büyüklükte olursa en üst düzeyde verimlilik gösterebilir [63]. 100 nm'den küçük nanopartiküller kan damarlarını endotel hücreleri yoluyla terk ederken, mikropartiküller karaciğerdeki Kupffer hücreleri tarafından alınır veya kılcal yataklarda fiziksel olarak tutulur. Ayrıca, 200 nm'nin altındaki nanoparçacıklar, kltrin aracılı yoldan hücre içine alınabilirken, 500 nm'nin üzerindeki nanoparçacıklar ancak kaveola aracılı yoldan alınabilir [167]. Nanopartiküllerin tümör çevresinde birikimi kan dolaşım süresi ile doğru orantılıdır. Kan dolaşım süresinin ve tümör içerisinde birikiminin 100 ila 160 nm çap aralığında optimum olduğu ve çaptaki artışla birlikte arttığı bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada zenograft modele intravenöz uygulanan 100 nm misellerin 30 nm misellerden 10 ila 20 kat daha fazla tümörde birikebildiği gösterilmiştir. Ancak büyük boyutlu nanotaşıyıcılara göre küçük olanların daha fazla tümör penetrayonuna sahip olduğu bilinmektedir [168]. Bundan ötürü ilaç birikimini ve tümöre penetrasyonu dengeleyen optimal bir boyut elde edilmesi, yani uzun dolaşım süresine sahip olacak kadar büyük ama tümöre penetre olabilecek kadar küçük olması, nanopartikülün yüksek terapötik etkinliğini geliştirmek için kritik öneme sahiptir.

NP'lerin yüzey modifikasyonunu incelemek için birçok teknik geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Yüzey modifikasyonunun etkinliği, yüzey yükü, fonksiyonel grupların yoğunluğu veya yüzey hidrofilik özelliğindeki artış tahmin edilerek ölçülebilir. Teorik olarak, zeta potansiyelinin pozitif veya negatif değerleri süspansiyonların kararlılığını belirler [169]. PLGA NP'lerinin yüzey yükü doğal olarak negatiftir ve plazma zarı ile hücre içi ortamın da negatif yüklü olması parçacık endositozunu engelleyebilmektedir. Bu nedenle literatür, nötr ve pozitif yüzey yüküne sahip parçacıkların hücreler ve DNA ile gelişmiş etkileşim sergilediğini bildirmektedir. PLGA polimerlerindeki pozitif yüzey yükü çeşitli ligandlarla (poli(etilen glikol)/PEG, poli(etilen oksit)-poli(β -amino ester)/PEO-PbAE, polietilenimin/PEI) modifikasyonu sonucu elde edilebilir [170]. Ancak elektrostatik reaktivite nedeniyle, pozitif yüklü partiküller, kanda bulunan hücreler ve proteinlerle agregatlar oluşturma eğilimindedir ve akabinde agregasyon organlarda birikmektedir. He ve ark. yapmış olduğu deneyin sonucuna göre katyonik kitozan NP'lerinin akciğerde tutulduğu gözlenmiştir [171]. Ayrıca yaklaşık -15 mV zeta potansiyeline sahip 150 nm boyutunda NP'lerin biyolojik dağılımının, daha

negatif veya pozitif partiküllere kıyasla tümör bölgesinde daha yüksek birikim ve kanda daha uzun süre kalma eğilimi gösterdiği açıkça gösterilmiştir [170]. Spesifik olmayan yüzey etkileşimini azaltmak için, küçük boyuta sahip nispeten daha az negatif yüklü anyonik (neredeyse nötr) polimerik NP'ler, geniş bir biyolojik spektrum için kationik yüklü parçacıklardan daha akılcı olabilmektedir. Zhang ve ark. tarafından tek-aşamalı nano presipitasyon yöntemi ile kendi kendine birleştirme yoluyla lipid polimer hibrit nanopartikül sentezlenmiş ve hidrofobik PLGA çekirdeği, hidrofilik PEG kabuğu ve ara yüzde bir lipit (lesitin) tek tabakası olduğu karakterizasyon çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Sonuçta uygun boyut (70–80 nm) ve zeta potansiyeline sahip (-35 mV) nanopartiküller elde edildi [172].

Yapılan ön çalışmalar ve deneyler sonucunda en düşük boyut dağılımı ve polidispersite indeksine sahip ve stabilite yönünden başarılı formülasyon optimize nanopartikül olarak belirlenmiştir. Optimize nanopartikül aşağıda belirtilen (Tablo 4.6) hazırlanma koşulları ve özelliklere sahiptir.

Tablo 4.6: Optimize nano formülasyona ait hazırlanma koşulları.

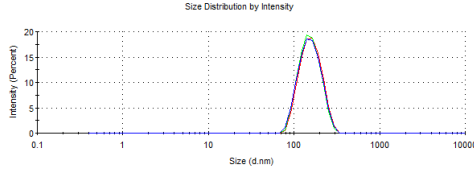
PLGA	DSPE	Kurkumin	Sıvı ortam	Solvent	Sürfaktan
50 mg	8 mg	5 mg	dH ₂ O	5 mL asetonitril:meta nol / 15 mL kloroform	% 0,025 T80

Optimize formülasyona ait hidrodinamik çap ve zeta potansiyelini belirlemek için DLS analizi yapıldı. Buna göre polidispersite indeksi 0,063 olmak üzere sırasıyla sayıca, hacimce ve yoğunluğa göre partikül boyutu dağılımları 161,5 nm, 119,8 nm ve 153,0 nm olarak belirlendi. Formülasyonun zeta potansiyeli yapılan ölçümler sonucu genellikle orta derecede negatif (-9,40 mV) olarak bulundu. Bu negatif değer, polimerin karbonil (-COOH) uç gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen değerler, NP'lerin süspansiyonunun orta üstü derecede kararlı olduğunu göstermektedir. Şekil 4.11'de gösterildiği gibi, partiküller dar bir boyut aralığındadır ve agregat oluşumu gözlenmemektedir.

Yoğunluğa göre % boyut dağılımı

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 149.8	Peak 1: 161.5	100.0	45.42
Pdi: 0.063	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.960	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

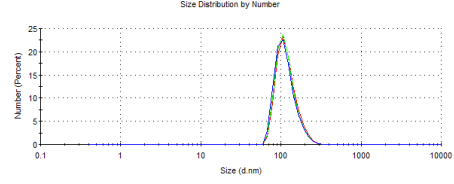
Result quality : Good



Sayıca %boyut dağılımı

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 149.8	Peak 1: 119.8	100.0	35.27
Pdi: 0.063	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.960	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

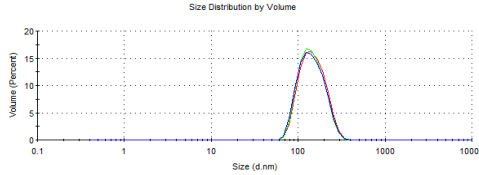
Result quality : Good



Hacimce % boyut dağılımı

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 149.8	Peak 1: 153.0	100.0	50.00
Pdi: 0.063	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.960	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

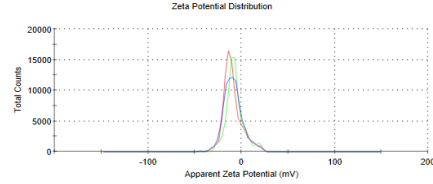
Result quality : Good



Zeta potansiyeli

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -9.40	Peak 1: -9.40	100.0	10.1
Zeta Deviation (mV): 10.1	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0770	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality See result quality report



Şekil 4.11: Optimize nano formülasyona (CurPD4) ait % boyut dağılımı sonuçları ve zeta potansiyeli sonucu.

4.1.3 Kurkumin'in NP içerisindeki çözünürlüğü

Kurkumin, zerdeçal bitkisinden elde edilen başlıca kurkuminoid olan polifenolik bir moleküldür. Molekül yedi karbonlu bir bağlayıcı zincir uç kısımlarında β -diketon parçası ve aromatik O-metoksi-fenolik grup taşır. Organik çözücülerde enolik formda ve suda ise keto formunda bulunan bir diketon tautomeridir [173]. Deneysel verilere göre DMSO'da 25 mg/mL, etanolde 10 mg/mL çözünürken asidik ve nötr pH'daki suda çözünmez olarak bildirilmiştir [174].

Tüm formülasyonlar 20 mL sulu faz içerisinde 5 mg kurkumin taşıyacak şekilde hazırlanmaktadır. Şekilde görüldüğü gibi, kurkumin nano formülasyonu kararlı ve homojen dağılmış bir sistem oluşturdu. Buna karşın %0,025 Tween 80 içeren deiyonize su ile karıştırılan ve ultrasonik banyoda bekletilen eşdeğer miktardaki kurkumin süspansiyonunda çok sayıda kurkumin kristali dibe çökmüş halde görülmektedir (Şekil 4.12). Kurkuminin nano formülasyon içerisindeki yüksek

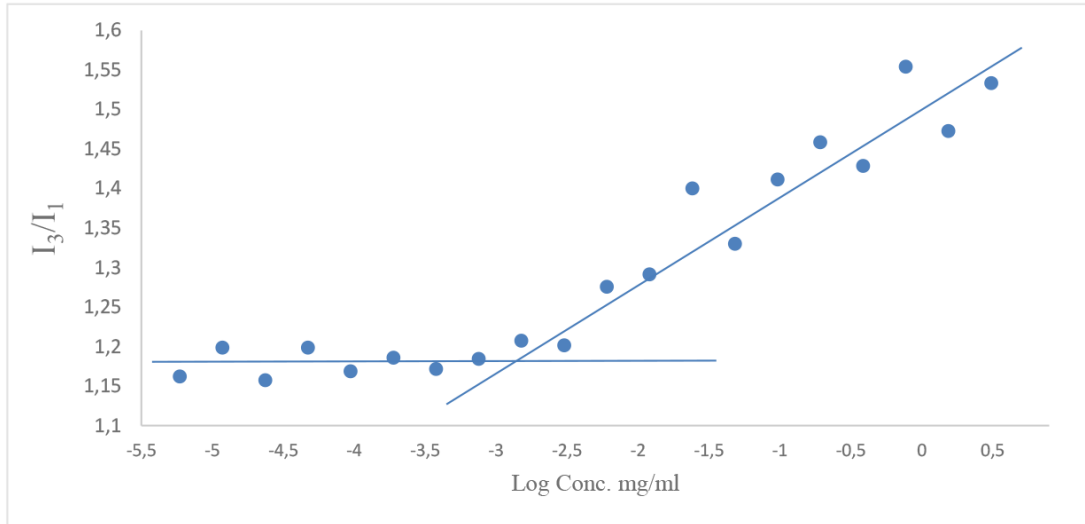
çözünürlüğü (250 µg/mL) ise, kurkuminin suda çözünürlüğünün nano enkapsülasyon ile önemli ölçüde iyileştirildiğini göstermektedir.



Şekil 4.12: Nano enkapsülasyon ile kurkumin sulu ortamda tamamen dağılırken serbest kurkumin çok az çözünür ve gözle görülebilen parçacıklar oluşturur.

4.1.4 Kritik misel konsantrasyonu (KMK)

Polimerler düşük konsantrasyonda tekli zincirler halinde bulunurken, kritik misel konsantrasyonuna (KMK) ulaştığı noktada misel oluşturur. Bunun sebebi polimerin hidrofobik zincirinin bir araya gelebilmesi ve hidrofilik kısmının sulu ortama tamamen entegre olmasıdır. Canlı sistemlerde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan polimerik miseller intra venöz uygulama sonrası kan dolaşımına doğrudan katılır ve dağılıma durumuna gelebilir. PLGA nano partiküllerinin DSPE ile hibrit hale getirilmesi ile yeni bir formülasyon ortaya konduğu için önemli miktarda seyreltmeden sonra bile çözeltilerdeki misellerin varlığını doğrulamak için KMK ölçülmüştür. CurPD4 için hesaplanan KMK değeri $7,57 \times 10^{-4}$ mg/mL olarak bulunmuş ve bu da örnek bir KMK değeri olarak değerlendirilmiştir. Polimerik misel çözeltisinin konsantrasyonunun logaritmik değeri (mg/mL) ile ışınım miktarındaki değişim grafiği Şekil 4.13'te sunulmuştur. Bu değer, formülasyonun *in vitro* veya *in vivo* olarak seyreltilmesi üzerine parçacıkların bir arada kalmasını sağlayarak ilacı istenmeyen salım olasılıklarından korur.



Şekil 4.13: PD4 NP'e ait kritik misel konsantrasyonu değerinin hesaplanması için kullanılan konsantrasyon-emisyon oranı diyagramı.

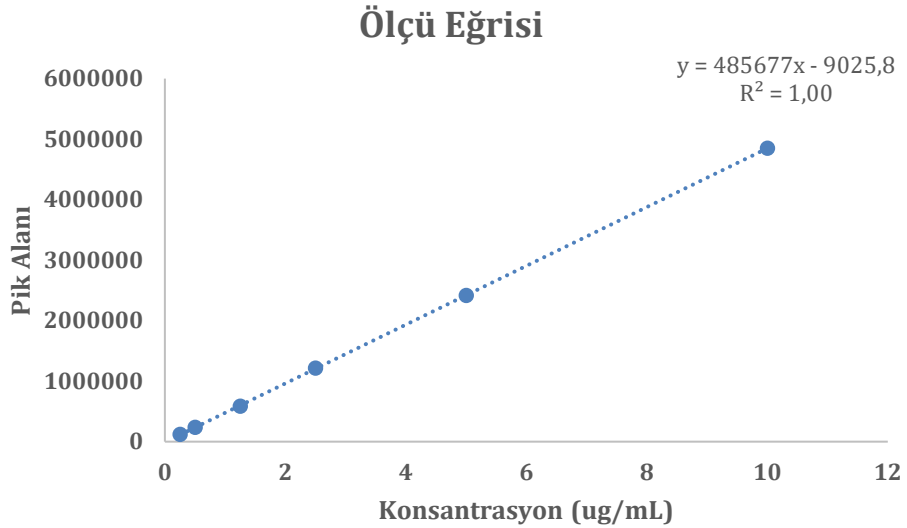
4.1.5 Formülasyona yüklenen kurkumin miktar tayini

Mevcut çalışmada PLGA-DSPE miseline dahil edilen ilaç miktarını incelemek ve salım sonuçlarını takip etmek için HPLC cihazı ile kurkumin ölçümüne yönelik analitik bir yöntem geliştirildi. NP'lerin sulu çözeltileri oda sıcaklığında bir gece inkübe edildikten sonra 3:1 (v/v) oranında asetonitril: metanol ile 40 kat dilüe edilerek dağıtıldı ve vorteksenerek içeriğindeki kurkumini tamamen salması sağlandı. Ardından filtreden süzülde ve her ölçüm üç tekrarlı olacak şekilde koşulları önceden belirlenmiş olan HPLC sistemine enjekte edildi. Kurkumin stok solüsyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak NP içerisindeki kurkumin miktarı analiz edilmiştir. Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, HPLC cihazında yapılan analizler sonucunda kurkumin pikinin retensiyon zamanında ortamdaki kirliliklerden kaynaklı herhangi bir girişim olmadığı saptanmıştır. Hazırlanan ölçü eğrisinin 0,25-10 µg/mL aralığında doğrusal olduğu saptanmıştır. Ölçü eğrisi için standart madde ile 6 farklı konsantrasyonda 6 tekrarlı yapılan analiz sonucunda $y = 485677x - 9025,8$ olarak ölçü eğrisi denklemi bulunmuştur (Şekil 4.14).

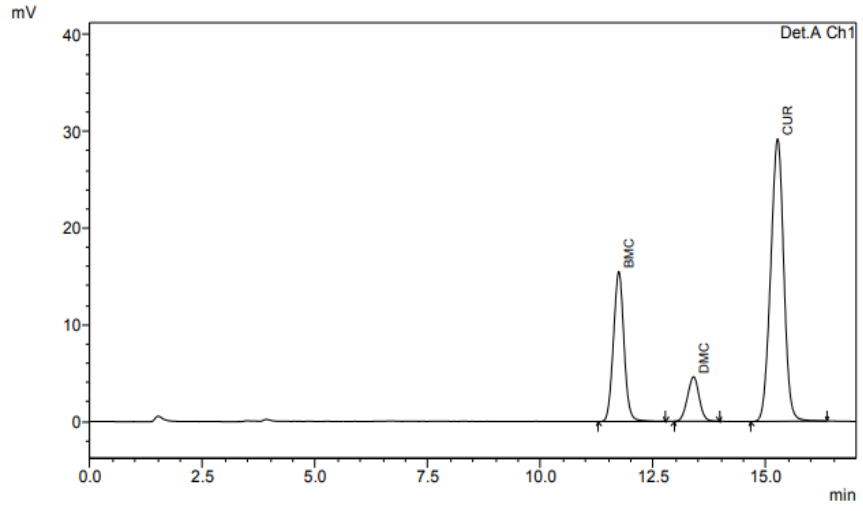
Kurkuminoidler doğal floresana sahip olduğundan, UV/VIS tespit yöntemine ek olarak, 10 kat daha hassas olduğu bildirilen PDA dedektör ile floresan (FL) tespit yöntemi de kullanıldı [175]. HPLC sisteminde floresans dedektör için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 425 nm ve 520 nm; PDA dedektör için 425 nm olarak belirlendi (Şekil 3.1).

Sisteme verilen ve NP içerisine yüklenen kurkumin üç analogdan yani kurkumin, DMC ve BDMC'den oluşmaktadır. Analiz süresinin 17 dakika olduğu sistemde belirlenen kromatografik koşullarda kurkuminin retensiyon zamanı 15,2. Dakika olarak belirlenmiştir. Mevcut olan standart madde kurkuminoid şeklinde olduğundan kromatogramda kurkuminin yanı sıra bisedemetoksikurkumin ve demetoksikurkumin de tespit edilmiştir. Bisedemetoksikurkumin (BMC) ve demetoksikurkuminin (DMC) saf standart maddeleri ile retensiyon zamanları sırasıyla 11,73. ve 13,39. dakika olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.15a). Kurkumin analogları 420 nm de tepe noktası oluşturmuş buna karşın boş PD4 NP HPLC analizinde aynı dakikalarda tepe noktası göstermemiştir. Buna göre oluşan tepe noktasının NP içerisindeki bileşenlerden kaynaklanmadığı kanıtlanmıştır (Şekil 4.15b).

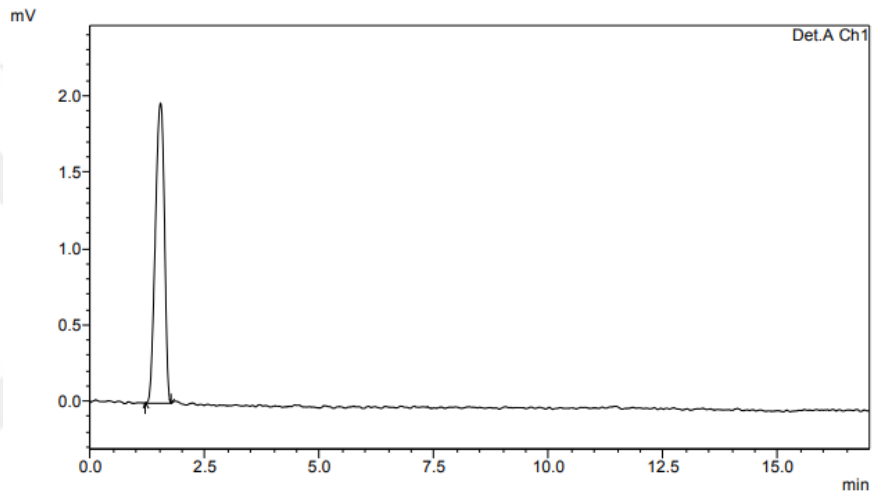
Yöntemin tekrarnabilirliği için yapılan çalışmalarda aynı gün içinde RSD (Bağıl standart sapma) değerleri %0,18-0,36 aralığında hesaplandı. Farklı günlerde üç konsantrasyonun yapılan analizlerinde elde edilen RSD değerleri %1,01-1,11 aralığında hesaplandı. Mobil faza ait HPLC kromatogramında ise herhangi bir pik gözlenmemiştir (Şekil 4.15c).



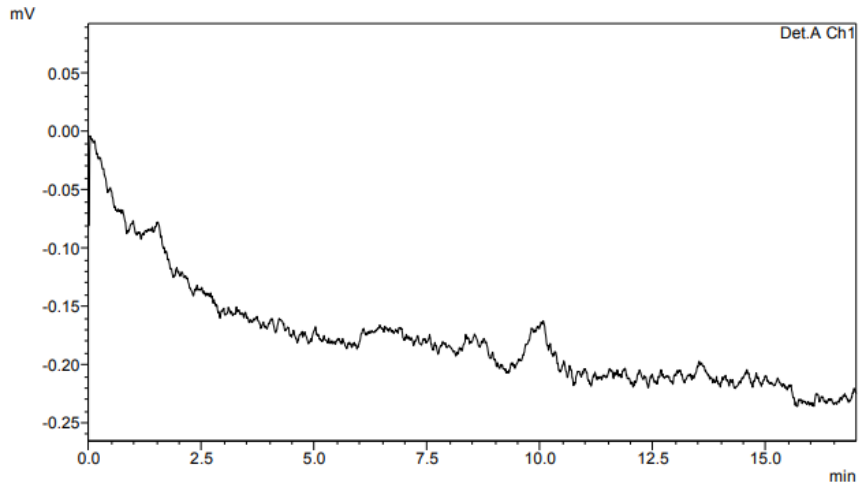
Şekil 4.14: Serbest kurkumine ait ölçü eğrisi denklemi.



a)



b)



c)

Şekil 4.15: a) CurPD4 NP, b) Boş PD4 NP ve c) mobil faza ait HPLC kromatogram sonuçları.

4.1.6 Formülasyon enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme yüzdesi

Nanopartikül içerisine ilaç yüklemek için iki temel yöntem mevcuttur. Bunlar ilacın nanopartikül sentezi esnasında eklendiği yöntem ve ilacın nanopartikül içerisine sentezden sonra absorbe edildiği yöntemdir [117]. Bu çalışmada DSPE ve kurkumin birlikte film oluşturulduğu için yüklenmesi amaçlanan ilacın sentez esnasında dahil edildiği ve akabinde nanopartiküllerin kendiliğinden bir araya geldiği düşünülmektedir.

Kapsülleme verimliliği birçok faktörden etkilenir. Örneğin organik fazdaki polimer konsantrasyonunun artırılması ile enkapsülasyon etkinliğinin arttığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, polimerin konsantrasyonu %20'den %32,5'e yükseldiğinde kapsülleme verimliliği %53,1'den %70,9'a yükselmiştir [176]. Polimerin organik solvent içerisinde çözünme düzeyi de polimerin solidifikasyon hızını belirlediği için enkapsülasyon etkinliği ile doğru orantılıdır. Bunlar dışında ilaç ve polimer arasındaki etkileşim de kapsülleme verimliliğini artırmaya katkıda bulunur. Eğer hidrofobik etkileşim, ilaç ve polimer arasında baskın bir güçse, PLGA gibi nispeten hidrofobik polimerler, kapsülleme verimliliğini artırmada avantajlıdır [177]. İlacın dış sulu fazdaki çözünürlüğü organik fazdakinden daha yüksekse, ilaç bu aşamada kolayca dış faza difüze olur. Örneğin, kinidin sülfatın kapsülleme etkinliği, çözünemediği alkalın dış sürekli fazda, kolaylıkla çözündüğü nötr sürekli faza göre 40 kat daha yüksek bulunmuştur [178].

Klippstein ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada yüklenen kurkumin miktarını artırmak için, ilaçla birlikte farklı yağ özlü malzemelerle (hint yağından elde edilen doymuş bir triaçilgliserol vb.) nano kapsül yapısı sentezlenmiş ve tümör oluşturulan zenograft fare modellerinde tümör hücreleri tarafından ilacın alımı gösterilmiştir [179]. Bu çalışmada kullandığımız kurkumin etken maddesinin de hidrofobik karakterde olması, dış sulu ortama difüze olmasını yavaşlatmaktadır. Bu çalışmada kapsülleme verimliliğinin formülasyonda lipid (DSPE) kullanımı ile artırılması amaçlanmıştır.

Optimize formülasyonun yüzde enkapsülasyon etkinliği (% EE) önceki bölümde verilen denklem (3.1) kullanılarak ve üç tekrarlı yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak % 92,006 olarak hesaplanmıştır. Optimize edilmiş formülasyonun yükleme kapasitesi (%DL) önceki bölümde verilen denklem (3.2) kullanılarak ve üç tekrarlı ölçümlerin ortalaması alınarak % 7,301 olarak tespit edilmiştir. Seçilen optimize edilmiş

formülasyon, %100 dağılımla düşük bir PDI'ye sahip olduğu ve yüksek yüzde enkapsülasyon etkinliği de gösterildiği için bu çalışmada hedeflendiği gibi yüksek miktar kurkumin taşıdığı kabul edilmiştir.

4.1.7 Optimize formülasyonun stabilite sonuçları

İlaç taşıyıcı sistemlerin stabil olması ilacın piyasada kullanımını açısından önemlidir. Fiziksel stabilitesi bozulmuş formülasyonda ilk olarak faz ayrımı ve agregat oluşumu gözlenir. Bu durum veziküllerin agregasyonu veya füzyonu nedeniyle olabilir. Ayrıca nanopartikülden dış ortama ilaç sızıntısı nedeniyle formülasyonun enkapsülasyon miktarında azalma gözlenebilmektedir [180]. Nitekim hidrofobik ilaçlar miselin çekirdeğinde tamamen çözündüğünde, misel solüsyonu berrak olmalıdır. Ancak ilaç misel çekirdeğinin dışında kaldığında bulanıklık görülür ve çökme meydana gelir [119]. Bu durum da formülasyonun boyut dağılımında ani ve büyük ölçekte değişim gözlenmesi ile sonuçlanabilir. Tablo 4.7'de gösterildiği gibi hem PD4 hem de CurPD4 nano partiküllerinde 15 günlük süre içerisinde boyut değişiminde anormal bir artış ya da azalış olmamıştır. İlaç yüklü olmayan formülasyonun boyutu zaman içerisinde neredeyse aynı iken kurkumin yüklü formülasyonda zamanla partikül boyutunda yavaş bir büyüme gözlenmiştir. Buna karşın partikül boyutu dağılımının monodispers olduğunu ve zamana bağlı olarak bu niteliğini koruduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.7: Taze hazırlanan PD4 ve CurPD4 formülasyonlarının zamana bağlı sayıca % boyut ve PDI değerleri.

		1.gün	3.gün	4.gün	7.gün	15.gün
Boş PD4	Boyut	121,8	123,5	118,5	96,23	111,2
	S. Sapma	37,34	33,31	37,90	28,99	32,04
	PDI	0,079	0,054	0,099	0,100	0,067
	Zeta P.	-16,0	-19,8	-11,8	-18,0	-18,8
CurP	Boyut	74,93	79,42	93,37	110,5	115,1
	S. Sapma	25,25	25,44	27,08	34,64	37,69
	PDI	0,137	0,109	0,079	0,084	0,102
	Zeta P.	-17,51	-13,3	-17,5	-20,4	-18,3

4.1.7.1 Santrifüj edilen formülasyonun stabilitesi

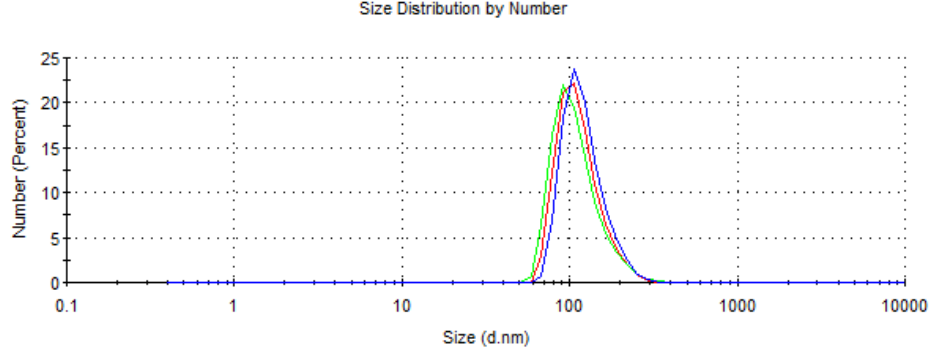
Hazırlanan PD4 NP ve CurPD4 NP'ler uzun süreli saklama amacıyla santrifüj edildi ve daha sonra eşit hacimde distile su ile rehidrate edildi. Yeniden sulandırılan formülasyon, 0,22 µm filtre ile süzöldükten sonra DLS cihazı ile partiköl boyutu ve PDI açısından kontrol edildi. Elde edilen sonuçlara göre santrifüj sonrası PD4 NP'de PDI değeri açısından olumsuz yönde bir değışim gözlenmezken CurPD4 NP'de PDI değeri yükselmiştir. Buna karşın formülasyonların boyut dağılımları hem PD4 NP hem de CurPD4 NP'de santrifüj öncesi boyut dağılımına yakın bulunmuştur. PDI değeri de taze hazırlanan optimize formülasyonun sonuçlarına yakındır (Şekil 4.16).

4.1.7.2 Liyofilizasyon sonrası formülasyonun stabilite sonuçları

Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin sulu ortamdaki zayıf stabilitesi, klinik kullanımına karşı bir engel oluşturmaktadır. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon), koloidal nano parçacıkların uzun vadeli stabilitesini geliştirmek için iyi bir teknik olarak kabul edilmiştir [181]. NP'lerin liyofilizasyonu, yalnızca numune saklama için yeterli koşulları sağlamak için bir araç olarak işlev görmez, aynı zamanda buharlaştırma işleminden sonra partiköllerde kalmış olabilecek artık solvent kalıntılarını en aza indirir. Liyofilize edilen PD4 ve CurPD4 formülasyonları aynı miktar deiyonize su ile sulandırıldığında formülasyonun önceki haline geldiği ve homojen bir çözelti oluşturduğu görölmektedir. Formülasyonların liyofilizasyon öncesi ve sonrasına ait resimleri şekilde (Şekil 4.17) yer almaktadır.

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 154.8	Peak 1: 116.1	100.0	36.31
Pdl: 0.151	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.967	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

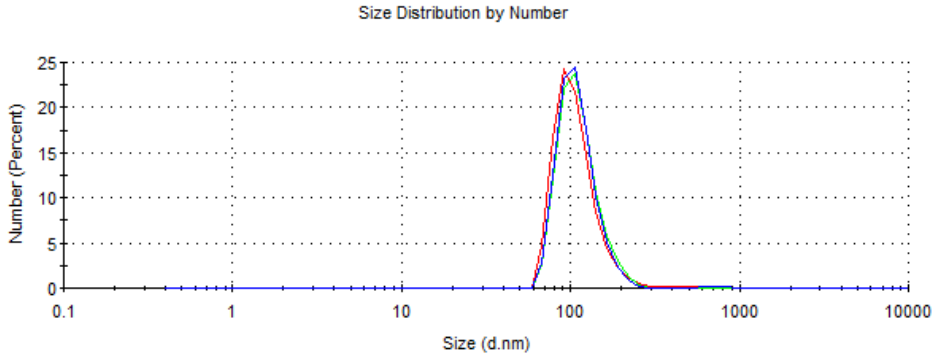
Result quality : **Good**



a)	PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıca % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
	0,151	165,4 ± 51,82	116,1 ± 36,31	155,2 ± 56,32

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 265.1	Peak 1: 111.3	100.0	48.30
Pdl: 0.542	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.894	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **Good**



b)	PDI	Yoğunluğa göre % boyut dağılımı	Sayıca % boyut dağılımı	Hacimce % boyut dağılımı
	0,542	156,2 ± 52,21	111,3 ± 48,30	143,5 ± 53,96

Şekil 4.16: Santrifüj sonrası sulandırılan a) PD4 ve b) CurPD4 NP'lere ait DLS diyagramı vesayıca % partikül boyutu dağılımı sonuçları.

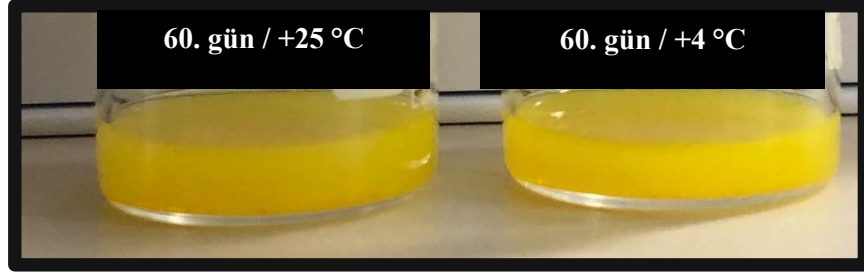


Şekil 4.17: Optimize nano formülasyonun taze ve liyofilizasyon sonrası sulandırılmış haline ait görseller.

4.1.7.3 Formülasyonun saklama koşullarındaki stabilitesi

Saklama koşullarındaki stabilitesi, herhangi bir ilaç taşıyıcı sisteminin başarısını gösteren önemli bir parametredir. Kurkumin nano formülasyonunun uzun süreli saklama koşullarındaki fiziksel stabilitesini değerlendirmek için taze formülasyonlar 60 gün boyunca +4 °C ve +25 °C'de ayrı ayrı saklanmış ve partikül boyutu dağılımı ve PDI ile stabilitesi değerlendirilmiştir. Formülasyonun fiziksel kararlılık sonuçları Şekil 4.18'de sunulmuştur.

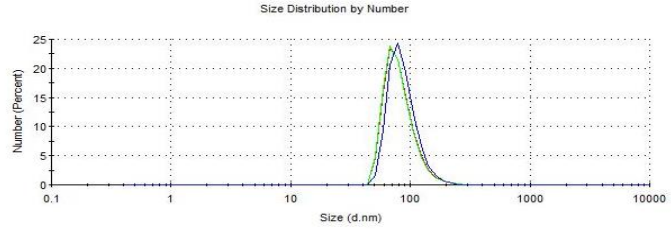
Ne oda sıcaklığında (25 °C) ne de +4 °C'de saklanan formülasyonların fiziksel görünümde ve renginde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.18a). Formülasyonlar 25 °C'de saklandığında, kurkumin nano parçacıklarının boyutunda ve PDI değerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Stabilite süresinin sonunda 25 °C'de saklanan CurPD4 NP'ün sayıca % boyut dağılımı $82,32 \pm 25,97$ (PDI: 0,104) nm iken $104,7 \pm 42,31$ (PDI: 0,157) olarak değişmiştir. Buna karşın +4 °C'de saklanan formülasyonda sayıca ortalama çap 30 günlük depolamanın ardından $119,7 \pm 40,26$ nm'ye (PDI: 0,256) çıkmıştır (Şekil 4.18b). Bu durum, kurkumin nano misellerinin 25 °C'de saklandığında daha kabul edilebilir fiziksel stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir.



ε

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 121.1	Peak 1: 82.32	100.0	25.97
Pdi: 0.104	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.961	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

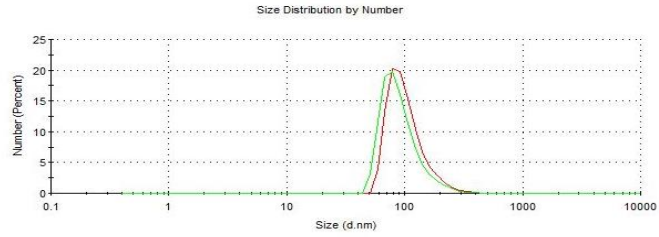
Result quality : Good



PDI: 0.104
82.32 ± 25.97

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 164.5	Peak 1: 104.7	100.0	42.31
Pdi: 0.157	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.963	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

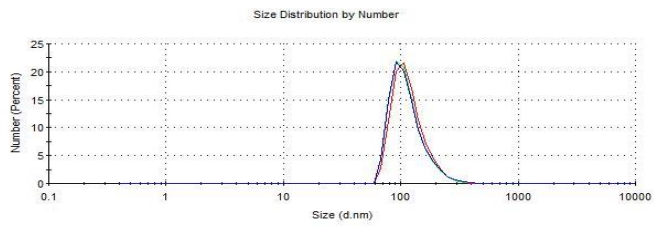
Result quality : Good



25 °C
PDI: 0.157
104.7 ± 42.31

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 180.3	Peak 1: 119.7	100.0	40.26
Pdi: 0.256	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.949	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good

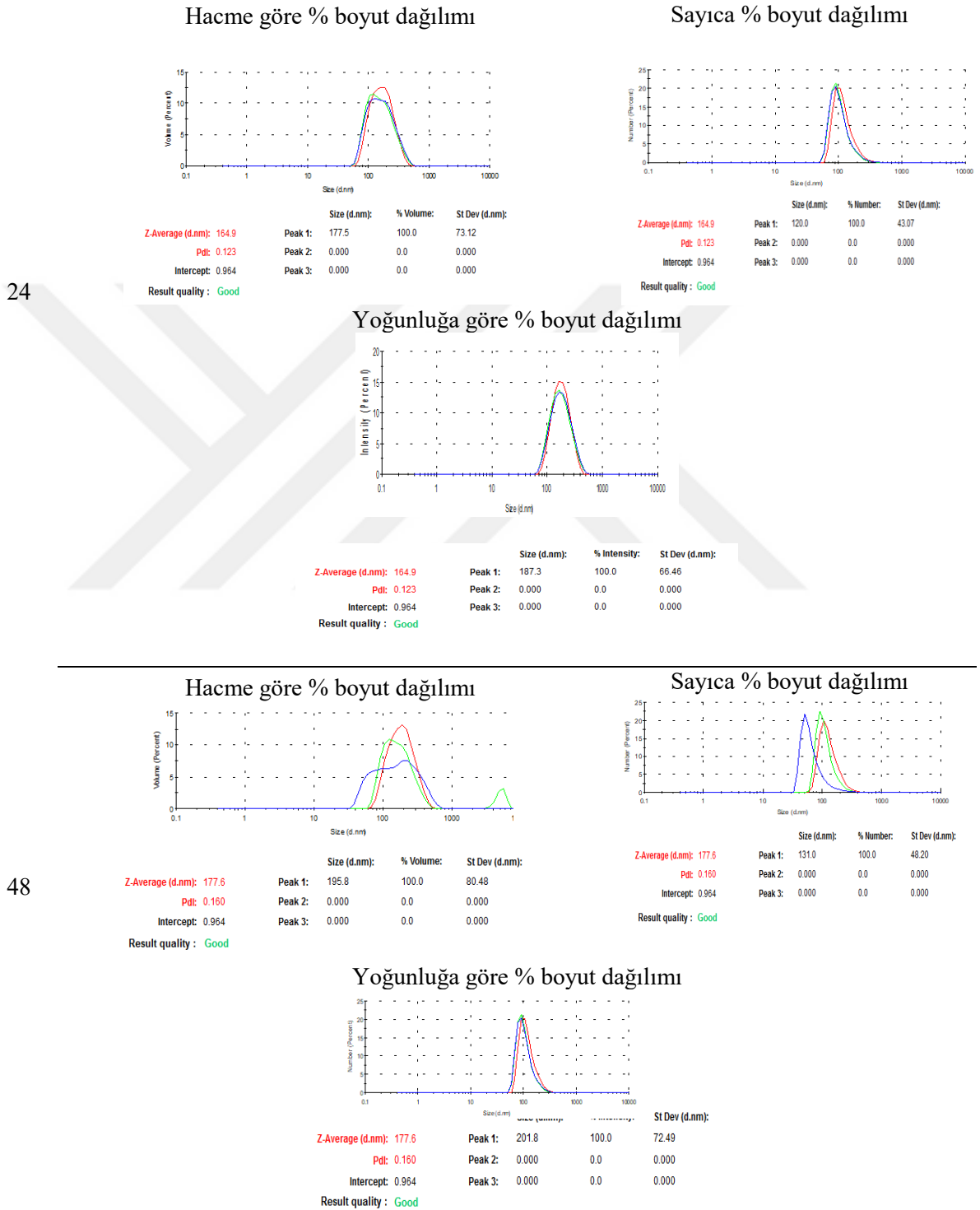


+4 °C
PDI: 0.256
119.7 ± 40.26

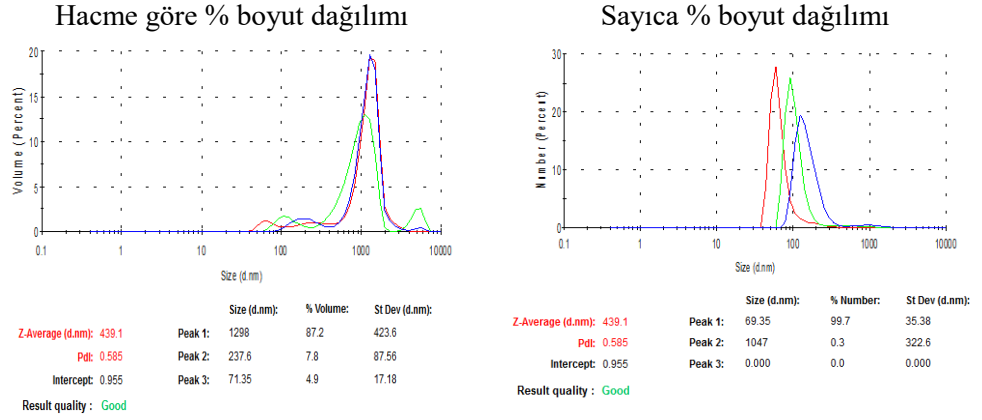
Şekil 4.18: CurPD4 NP'lerin 4 °C ve 25 °C'de 60 gün saklama süresince a) fiziksel görünümü, b) PDI değeri ve sayıca % boyut dağılımı sonuçları.

4.1.7.4 4.1.5.4 Besi yeri içerisinde formülasyonun stabilite sonuçları

Formülasyon, *in vitro* deneyler esnasındaki stabilitesini göstermek için, besi yeri içerisinde 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiş, ardından partikül boyut dağılımı ve PDI açısından kontrol edilmiştir (Şekil 4.19).

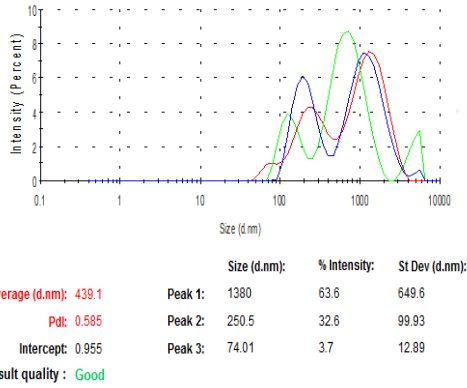


Şekil 4.19: Besi yeri içerisinde dilüe edilmiş CurPD4 NP'e ait 24, 48 ve 72 saatlik boyut dağılımı sonuçları.



72 saat

Yoğunluğa göre % boyut dağılımı



Şekil 4.19 (devam): Besi yeri içerisinde dilüe edilmiş CurPD4 NP'e ait 24, 48 ve 72 saatlik boyut dağılımı sonuçları.

Elde edilen sonuçlara göre formülasyon, hücre kültürü deneylerinin yapıldığı koşullarda 48 saat boyunca boyut dağılımı açısından stabildir. Buna karşın 72 saatte PDI değerinin kabul edilemeyecek kadar yükseldiği ve partikül boyutunun arttığı görülmüştür.

4.1.8 Formülasyondan kurkumin salım sonuçları

Nano ilaç taşıyıcı sistemlerden salım mekanizmasının anlaşılması önemlidir zira polimerin gözenek boyutu, şekli, ilaç ve taşıyıcı arası etkileşim, polimer bozunma hızı vb pek çok değişken tarafından belirlenir. Matematik modelleri, ilaç difüzyon katsayısını belirleyerek salım kinetiğinin anlaşılmasını sağlar. Ayrıca yüklenen maddenin hidrofobisite derecesi nano taşıyıcı içerisinde salınmasında belirleyici bir faktördür. Yüklenen malzemenin suda çözünürlüğü düşük olduğunda, NP'lerden çıkma ve sulu ortamla temas etme eğilimi düşüktür [177]. Aynı şekilde nano taşıyıcının ihtiva ettiği malzemelerin ilaca olan afinitesi de salımı etkiler.

PLGA polimer matriksinin erozyonu ile ilacı salması mümkündür. Bu nedenle pH ve sıcaklığın da PLGA bozulması üzerinde önemli bir etkisi olduğu göz ardı edilmemelidir. PLGA'nın hidrolizi asidik ve/veya alkalik pH'larda hızlanır, bu sayede partiküller fizyolojik koşullarda (pH 7.4) daha kararlıdır, ancak asidik PH'lara sahip tümör dokularında bozunma artar (pH 5.5) [41].

Salım deneyi için optimize edilmiş formülasyon koşulları ve hazırlanma yöntemi kullanılmıştır. Film oluşturma – rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan optimize formülasyon (CurPD4) klasik yöntem ile hazırlanan kurkumin yüklü PLGA NP ile karşılaştırılmıştır. Her üç kurkumin formu için de (kurkumin, DMC, BDMC) nano enkapsüle kurkumin ile standart kurkumin örneklerinin retansiyon zamanları aynı bulunmuştur. Ayrıca 24 saat boyunca *in vitro* salım koşulları altında HPLC sonuçlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum *in vitro* salım koşullarında kurkuminin yapısında bozulma olmadığını göstermektedir.

Kurkumin'in salım verileri matematiksel olarak farklı kinetik modellere uydurulmuştur. Bunlar ilaç salım mekanizmasını belirlemek için sıklıkla kullanılan sıfır dereceli, birinci derece, Hixson Crowell ve Korsmeyer-Peppas modelleridir (Şekil 4.20). Ortaya konan grafiklere göre her iki formülasyonun da Korsmeyer-Peppas (CurPD4 için $r^2=0.9338$ ve PLGA NP için $r^2=0.8331$) denklemlerine diğer denklemlerden (sıfır derece, birinci derece ve Hixson Crowell) daha iyi uyduğu görülmüştür [178]. Bu da salım mekanizmasının su emiliminin ve dolayısıyla polimerik nano-taşıyıcının şişmesi ile kontrol edildiğini göstermektedir. Yani difüzyon mekanizması (Fickian difüzyonu) salım mekanizmasında baskın olan mekanizmadır (Şekil 4.20e)

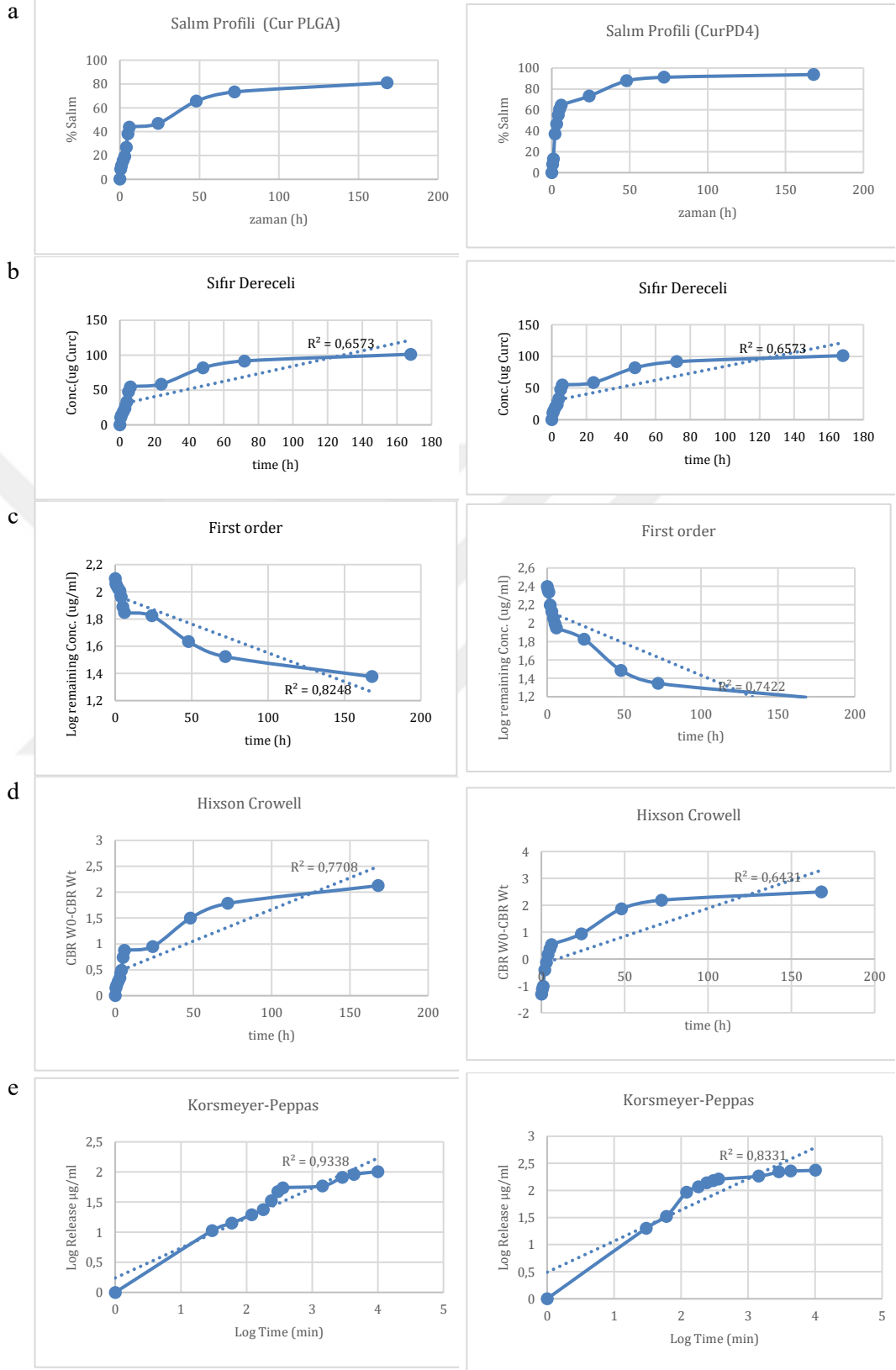
4.1.9 Formülasyonun yapısal karakterizasyonu

4.1.9.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi sonuçları

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile kurkumin molekülünün nanopartikül içerisine başarıyla dahil edilip edilmediğini doğrulamak amaçlanmıştır. Liyofilize edilmiş nanopartiküllerin yüklenen ilaç ve diğer formülasyon bileşenleri ile arasındaki etkileşim ölçülmüştür. Toz halde kurkumin, DSPE (fosfolipid) ve PLGA polimerine ait FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

Cur PLGA NP

CurPD4



Şekil 4.20: CurPD4 NP ve Kurkumin yüklü PLGA NP'lere ait (a) % salım grafiği, (b) sıfırcı derece, (c) birinci derece, (d) Hixson Crowell modeli ve (e) Korsmeyer-Peppas modeli salım profilleri.

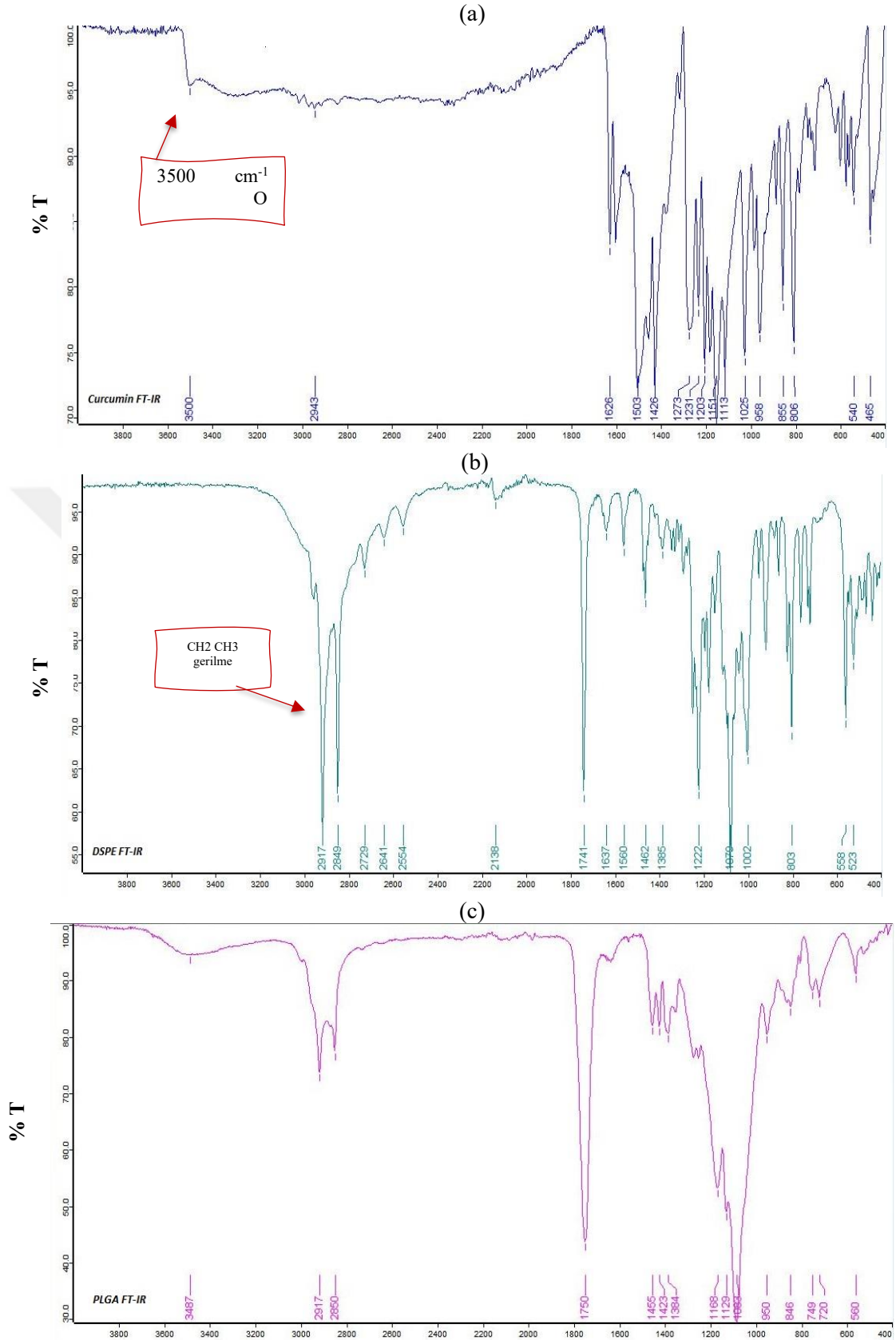
Kurkumin, 3524 cm^{-1} de (fenolik O-H germe titreşimi), 1626 cm^{-1} de (aromatik C=C gerilmesi), 1597 cm^{-1} de (benzen halkası germe titreşimleri), 1509 cm^{-1} de (C=O ve C=C titreşimleri), 1428 cm^{-1} de (olefinik C-H eğilme titreşimleri), 1278 cm^{-1} de (aromatik C-O esneme titreşimleri) ve 1024 cm^{-1} de (C-O-C esneme titreşimleri) kendi karakteristik piklerini göstermektedir [182]. Kullandığımız kurkumine ait FT-IR spektrumunda da fenolik hidroksil grubunun titreşimine bağlı 3500 cm^{-1} de geniş O-H bandı gözlenmiştir (Şekil 4.21a).

Fosfolipidler karakteristik piklerini 2900 ve 2850 cm^{-1} lerde (CH₂ gerilme titreşimleri), 1737 cm^{-1} de (simetrik C=O germe titreşimi), 1648 cm^{-1} 'de ve 1249 cm^{-1} 'de (PO₄ antisimetrik germe bantları) göstermektedir. NP hazırlamada kullandığımız fosfolipid, DSPE'ye ait FT-IR spektrumunda da 2917 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} de CH₂ gerilmelerine bağlı çift pik Şekil 4.21b 'de gösterilmiştir [183].

PLGA'ya ait FT-IR spektrumu ise 1750 cm^{-1} 'de C=O gerilimine bağlı absorpsiyon bandını tek bir uzun pik olarak gösterir. Alifatik poliesterlerde bulunan C-O grupları da 1165 cm^{-1} 'de ve 1083 cm^{-1} 'de görülür [184]. Ayrıca 2980 cm^{-1} 'de ve 2949 cm^{-1} 'de görülen simetrik ve asimetrik pikler CH₂ ve CH₃ gruplarının gerilmesiyle ilgilidir. PLGA polimerine ait CH₂ ve CH₃'ün asimetrik deformasyon bantları ise 1350 -1450 cm^{-1} aralığında görülür. Kullandığımız PLGA polimerinde 1750 cm^{-1} 'deki karbonil piki ve CH₂-CH₃ gerilmesine bağlı asimetrik pikler Şekil 4.21c'de gösterilmiştir.

Kurkumin'in nanoformülasyon içerisine enkapsüle edilmiş hali ve ilaç yüklü olmayan nanoformülasyonlara ait FT-IR spektrumları Şekil 4.22'de gösterilmektedir.

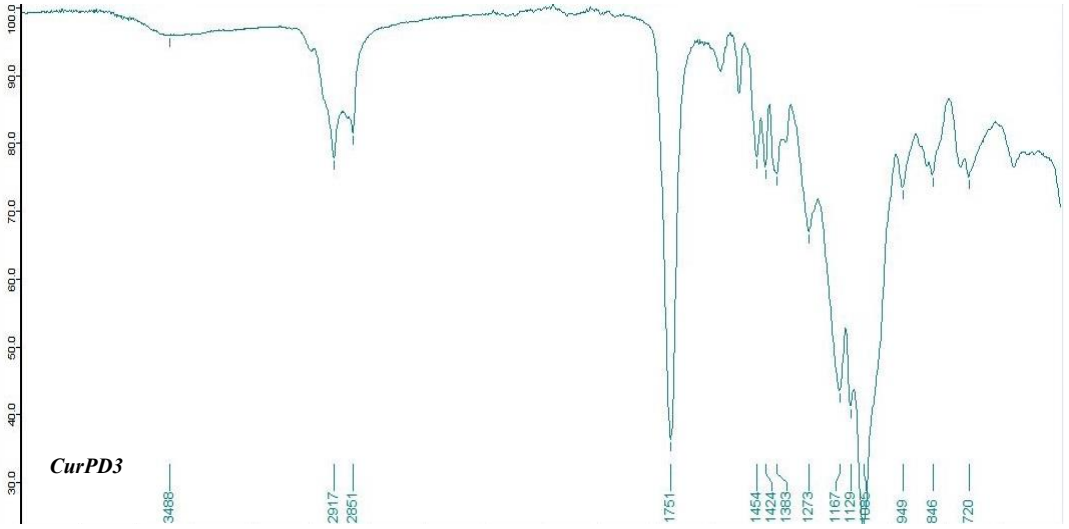
Kurkumin nanopartikül içerisine dahil edildiğinde, 2918 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} 'deki (CH₂ titreşim absorpsiyonu) pik konumu ve şekli fosfolipid ve polimere benzer şekilde görülmüştür. Paramera ve ark. göre nano enkapsüle kurkumin spektrumundaki 3508 cm^{-1} zirvesinin kaybolması, kurkuminin fenolik -OH'sinin fosfolipid ile büyük olasılıkla hidrojen bağı yoluyla etkileşimini gösterir [185]. Bu nedenle kurkumine özgü 3300 cm^{-1} de görülen geniş -OH pikinin kurkumin yüklü nano formülasyonda kaybolduğu Şekil 4.22b ve Şekil4.22d'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21: Kurkumin (a), DSPE (b) ve PLGA polimerine (c) ait FT-IR spektrumu sonuçları.



a)

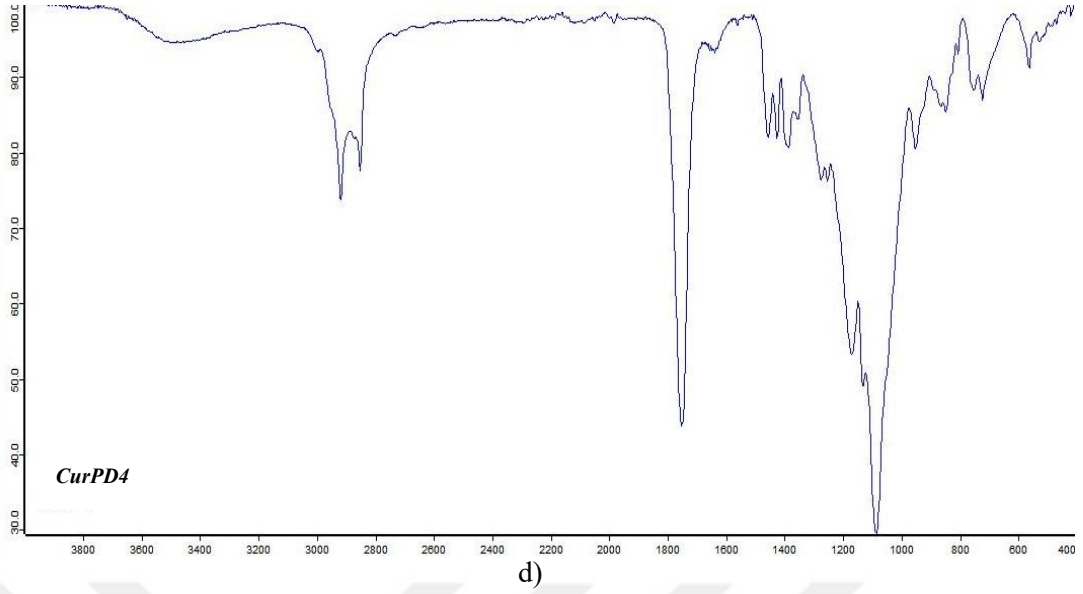


b)



c)

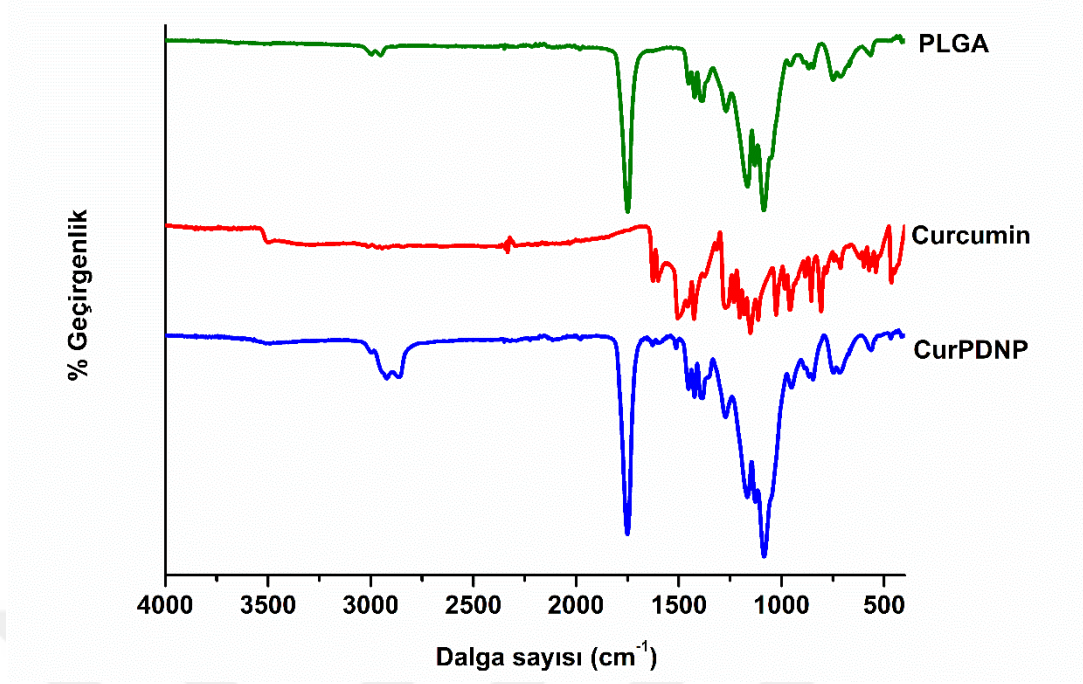
Şekil 4.22: Nano formülasyonlara ait FT-IR spektroskopi sonuçları; a) BoşPD3, b) CurPD3, c) BoşPD4, d) CurPD4.



Şekil 4.22 (devam): Nano formülasyonlara ait FT-IR spektroskopi sonuçları; a) BoşPD3, b) CurPD3, c) BoşPD4, d) CurPD4.

PLGA polimerine ait spektrumda 1750 cm^{-1} de görülen C=O bağından kaynaklı pikin nanoformülasyonda varlığını koruyacağı öngörülmüştür. Şekil 4.22a, Şekil 4.22c ve Şekil 4.22d'de görülebileceği gibi hem BoşPD4 ve BoşPD3 hem de CurPD4 nano partiküllerinde PLGA'nın C=O ve C-O ile ilgili 1745 cm^{-1} , 1165 cm^{-1} ve 1083 cm^{-1} bantları mevcuttur. PLGA'da ester grubuna ait C=O (karbonil) bağına ilişkin pik 1750 cm^{-1} de DSPE 'de aynı pik 1741 cm^{-1} de ortaya çıkmış, nitekim PLGA-DSPE ilgili pik'in 1751 cm^{-1} de görülmesi dış yüzeyde PLGA polimerinin hidrofilik kısımlarının bulunduğunu düşündürmüştür.

Nano formülasyon ile kurkumin'in karakteristik piklerinde kayma veya şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu durumda kurkumin moleküllerinin NP içine yerleştirildiği, dolayısıyla spektrumdaki "imzalarının gizlendiğini" belirtmiştir [203]. Buna karşın PLGA'ya ait piklerin şiddetinde artma veya aynı kalma durumu söz konusudur. Şekil 4.23'te karşılaştırmalı görseli paylaşılan FTIR spektrumlarına dayanarak, kurkumin'in PLGA DSPE hibrit nanopartiküle başarıyla yüklediği gösterilmiştir.

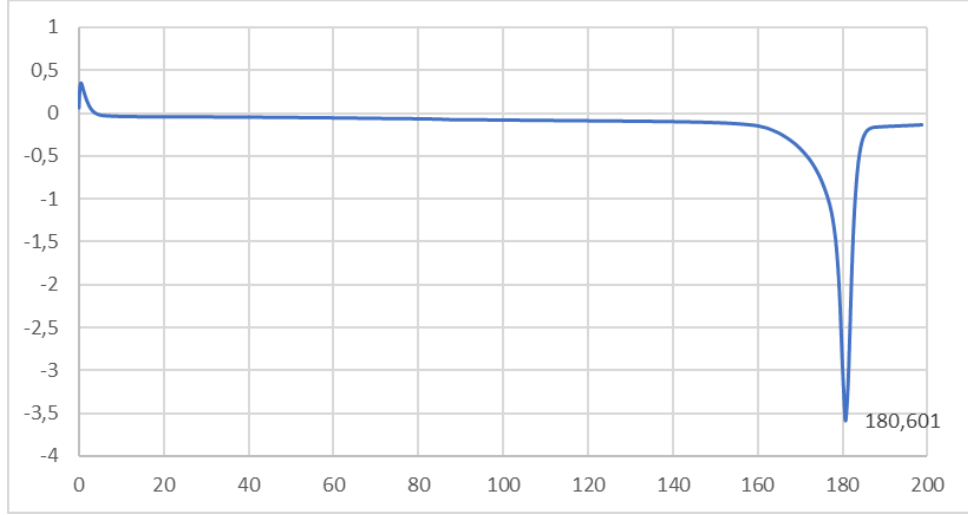


Şekil 4.23: PLGA, kurkumin ve kurkumin yüklü NP'e ait FT-IR spektroskopisi.

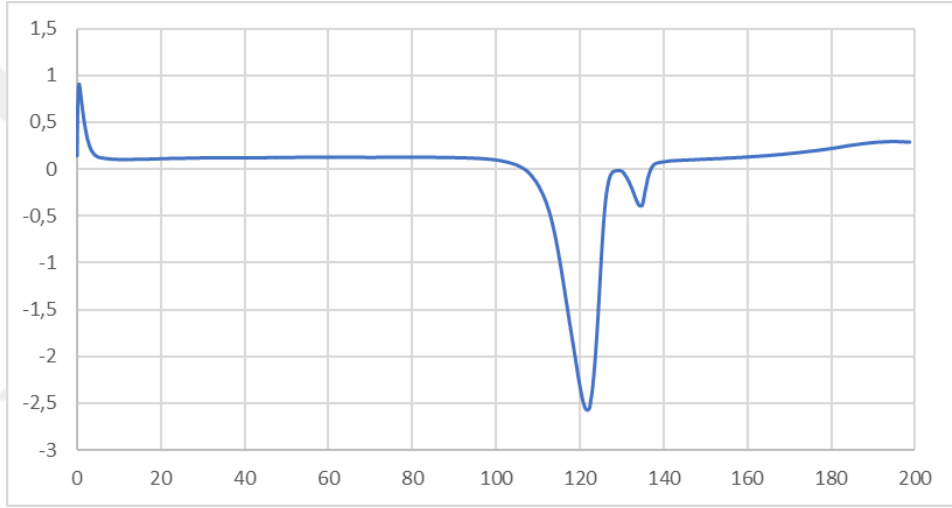
4.1.9.2 DSC analizi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry, DSC) kristal ve amorf yapıdaki numunelerin özelliklerini karakterize etmek için kullanılır. DSC yöntemi bu çalışmada ilaç molekülleri yüklenmiş olan ve olmayan polimer ve fosfolipid katmanlarının faz geçişlerini incelemek için kullanılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen sonuçlar (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25) kurkumin'in PLGA-DSPE misellerine dahil edildiğini göstermiştir.

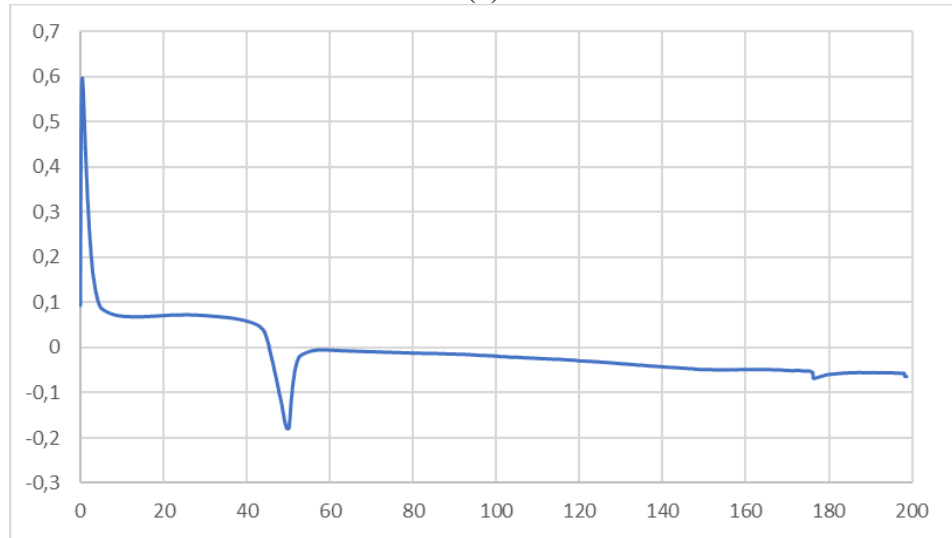
Kurkuminin erime noktası 180,6 °C'de ve entalpi değişimi (ΔH) 106,57 J/g dır (Şekil 4.24a). Yüksek sıcaklıktaki bu keskin erime noktası, kurkuminin kristal yapısındaki ikincil bağ kuvvetlerinin parçalanmasından kaynaklanmaktadır. DSPE ile ilişkili pik ise 59,87 °C'de, ΔH 72,041 J/g ile oluşmaktadır (Şekil 4.24b). Yapılan analiz sonucu PLGA polimerinin erime noktası 52,69 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.24c). Laktit/glikolit oranı ve molekül ağırlığı PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığını (genellikle 40 ila 60 °C aralığında) etkiler; bu sıcaklık, laktit içeriğinin ve moleküler ağırlığın azalmasıyla azalır [186]. Bu çalışmada kullanılan PLGA polimeri laktit:glikolit (50:50) dir.



(a)

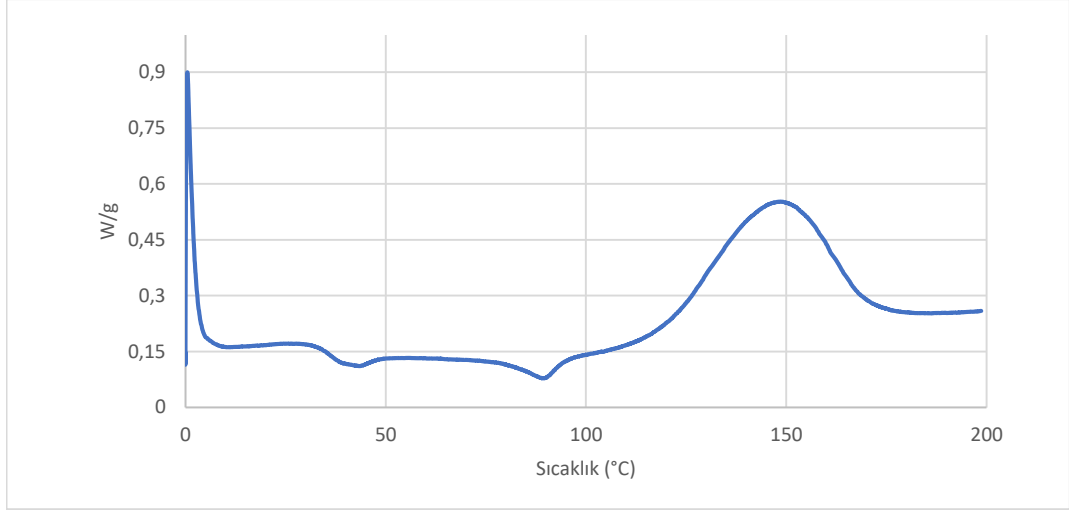


(b)

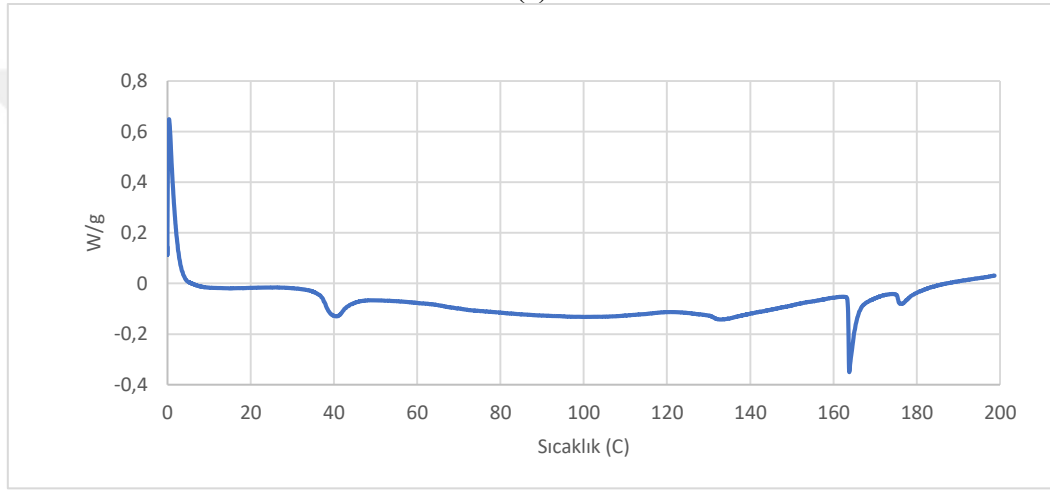


(c)

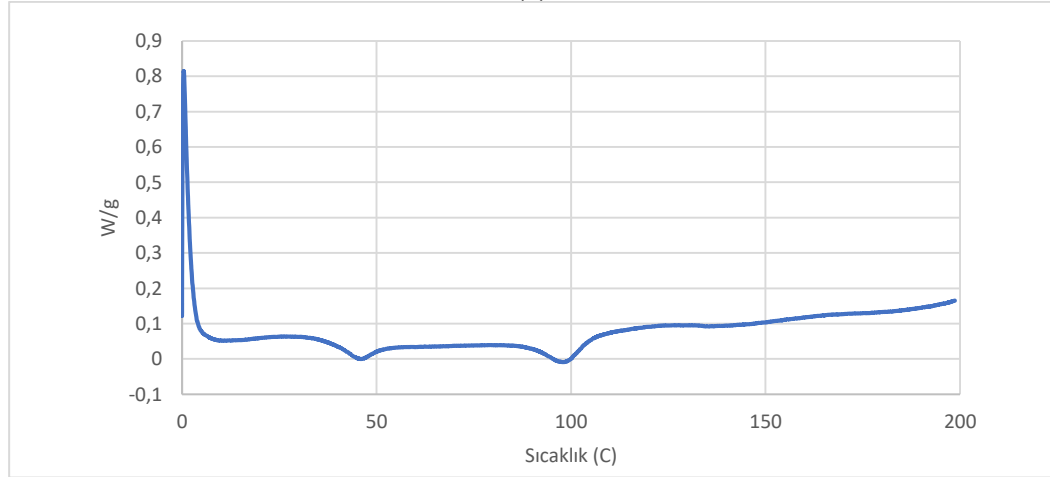
Şekil 4.24: (a) Kurkumin, (b) DSPE ve (c) PLGA'ya ait DSC termogramları.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.25: (a)Boş PLGA DSPE NP (PD4), (b) Kurkumin yüklü PLGA NP ve (c) CurPD4 nano misellerine ait DSC termogramları.

Şekil 4.25'te misel oluşumu sonrası liyofilize edilen Boş NP, Kurkumin yüklü PLGA NP ve Kurkumin yüklü hibrit NP'e ait DSC termogramları önemli sonuçlar ortaya koymuştur. Misel oluşumu sonrası liyofilize edilen DSPE-PLGA NP'lerde DSPE'ye

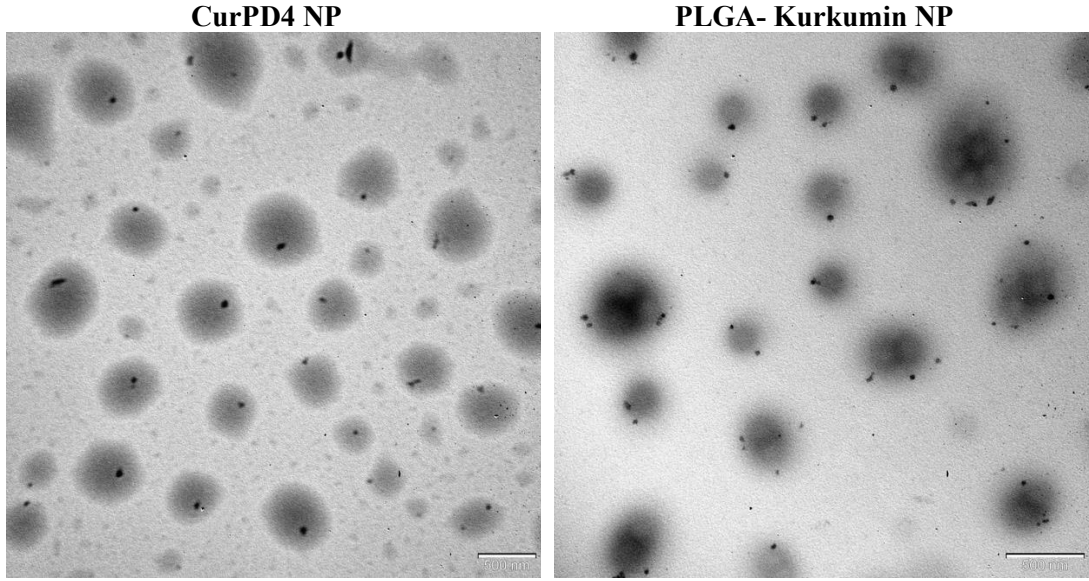
ait 59,87 °C'deki erime pikinin kaybolduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.25a). Bunun sebebi DSPE'nin amorf yapısı nedeniyle liyofilize halde erime sıcaklığı göstermemesi veya polimer tabakası ile çevrenmesinden dolayı pik oluşturmaması ile açıklanabilir. Aynı şekilde kurkumin yüklü hibrit nano partiküle ait termogramda da DSPE piki görülmemiştir (Şekil 4.25c).

PLGA ile oluşturulan nano misellerin hepsinde PLGA'nın Tg'si belirgin olarak görülmektedir ancak liyofilize edilmiş misellerdeki Tg değeri (PLGA Tg: 41,69 °C iken PLGA-DSPE NP'lerde Tg: 42,44 ve 45,59 °C'ye) üst alanlara kaymıştır (Şekil 4.25b).

Kurkumin yüklü veya boş PLGA DSPE hibrit NP'ün (CurPD4) DSC diyagramı, kurkumin ile karşılaştırıldığında, kurkumin'de gözlenebilen keskin pik (Tg: 180,6 °C ve ΔH 106,57 J/g) fark edilememiştir. Bu, kurkumin'in polimerin amorf yapısında dağıldığını, misel içerisine hapsoldüğünü ve artık kristalize bir forma sahip olmadığını göstermektedir. Buna karşın Kurkumin yüklü PLGA NP'e ait DSC termogramında 163,80 °C ve 176,46 °C'lerde iki adet keskin pik oluştuğu gözlenmiştir. Bu durumun yalnızca PLGA ile oluşan miselin hidrofobik ilacı tamamen enkapsüle edememesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

4.1.9.3 TEM analizi

Partikül boyutu ve morfolojisi tasarlanan nano taşıyıcının fonksiyonunu etkileyeceği için son derece önemlidir. Nano yapıların (birkaç nanometre veya daha düşük boyuttaki) karakterizasyonunda kullanılan tekniklerden biri de yüksek rezolüsyon ve büyütme ile nano partikülleri görüntülemeyi sağlayan TEM analizidir. Bu teknik, malzeme ile etkileşime giren ve böylece görüntü üretimi için bilgi elde eden bir elektron ışınının numune boyunca iletilmesini içerir [187]. Elektronlar karbon gibi hafif atomların bulunduğu bölgeye çarptığında saçılma zayıf olacaktır. Öte yandan, ağır atomlar daha yüksek saçılma ile sonuçlanacaktır. Bu nedenle saçılmayan elektronlar numuneden geçer ve kamera tarafından kaydedilir. Aydınlık alan yüksek iletim bölgesini, karanlık alan ise düşük iletim bölgesini temsil etmektedir.



Şekil 4.26: CurPD4 ve PLGA-Kurkumin NP'lere ait TEM analizi sonuçları.

Nano partiküllere ait küresel ve tek boyutlu şekil TEM görüntülerinde (Şekil 4.26) gözlemlenmiştir. Ayrıca partiküllerin agrege olmadığı aksine ayrık olduğu bildirilmiştir. Partikül boyutları genellikle aynı ortalama çap ile dağılmıştır. Bu durum daha önce taze formülasyonların DLS sonuçları ile de gösterilmiştir (Bölüm 4.1.2). Taze formülasyonların görüntüleme öncesi kurutma ve grid üzerine kaplanması esnasında gözlenen çökmeler koyu renkli noktalar olarak şekilde görülmüştür. CurPD4 NP ve Kurkumin yüklü PLGA NP karşılaştırıldığında, hibrit nanopartiküle ait boyut dağılımının daha tekdüze olduğu gözlenmiştir. Nitekim DLS sonuçlarında (Bölüm 4.1.2) PDI değerinin CurPD4 için daha düşük olması da bu sonucu desteklemektedir.

4.2 Bilgisayar Destekli Modelleme Çalışmaları

Nano ilaç taşıyıcı sistemlerde PLGA polimeri ilaç yüklenen matriks olarak sıklıkla tek başına kullanıldığı gibi yardımcı malzemeler ile etkinliğinin artırıldığı da bilinmektedir. Poli (*laktik-ko-glikolik asit*) (PLGA), uygun toksik profil, yüksek ilaç taşıma etkinliği ve sulu ortamda 200 nm'den daha küçük boyutlarda küresel partiküller üretme yeteneği gibi diğer amfifilik malzemelere göre üstün özellikleri ile bilinen en popüler polimerik malzemelerden biridir. Çalışmamızda amfifilik bir malzeme olan PLGA ile, lipid yapıdaki DSPE'nin kullanılması ile nano taşıyıcının hidrofobikliği artırılmış ve böylece hidrofobik ilaç yükleme kapasitesi artırılması amaçlanmıştır.

Bunun için laboratuvar çalışmalarının yanı sıra DSPE ve polimer matriksin nano taşıyıcıdaki rolleri bilgisayar simülasyonu düzeyinde de aydınlatılmıştır. Malzemenin karakteristiğine bakacak olursak hidrofobik ilaç moleküllerinin, polimerin laktik asit kısımlarının yanı sıra lipid yapı ile de etkileşime girip ayrı kümeleşmeler oluşturması söz konusudur. Bu nedenle ilaç-polimer matrisinin mi yoksa ilaç-lipid etkileşimlerinin mi daha öncelikli oluştuğunun anlaşılması gerekmektedir. Bu soruları cevaplamak için mevcut çalışmamızda kuantum kimyasal (QC) küme hesaplamaları ve DFTB+ adı verilen yoğunluk fonksiyonel tabanlı sıkı bağlama modeli hesaplama araçları kullanılmıştır.

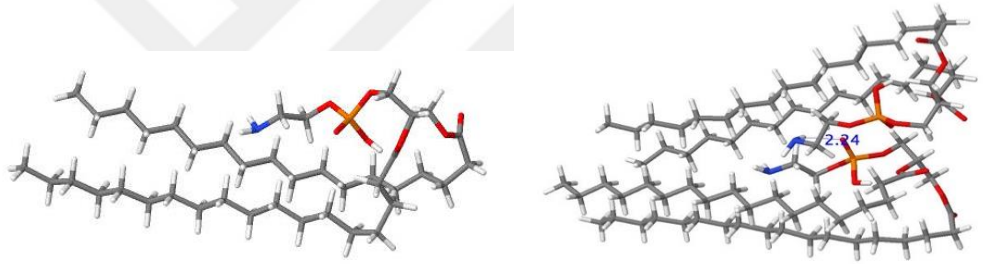
QC hesaplamaları yüksek doğrulukta sonuç verir ancak küçük sistemler için daha elverişlidir, öte yandan MD çok büyük sistemleri çok daha düşük doğrulukla simüle edebilir [150]. Her iki yaklaşımın da bazı sınırları olduğundan, daha gerçekçi sonuçlar elde etmek için birleştirilmiş bir yaklaşım (QC-MD) kullanılması planlanmıştır. QC-MD yaklaşımlarının birlikte kullanılması ile kurkuminin NP bileşenleriyle nasıl etkileşime girdiğinin ve DSPE'nin rolünün netleştirilmesi amaçlanmıştır. Projenin hesaplamalı kısmı için hedeflenen yaklaşım, iki yöntemin de avantajlı kısımlarından yararlanmak adına hem kuantum kimyasal hem de moleküler dinamik hesaplamalarını yapıp, sonuçları bir bütün olarak incelemektir. Bu sayede elimizdeki sistemle ilgili iki yöntemin de tek başına sağlayabileceğinden çok daha detaylı bir bilgi elde edilmiştir.

4.2.1 Kuantum kimyası (QC) küme modelleri

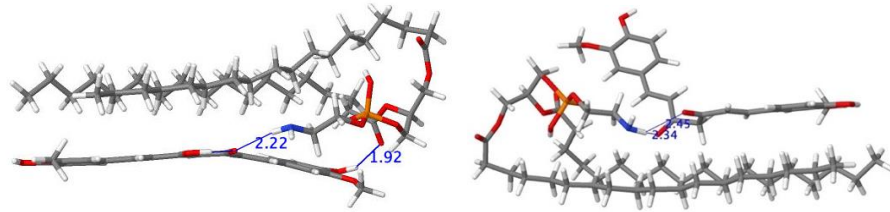
Kuantum kimyasal küme modellemelerinde sistem boyutu sınırlıdır. Bu nedenle üç molekülden daha karmaşık yapısal konfigürasyonları analiz etmek için geometri optimizasyonlarını gerçekleştirirken SVP temel setine sahip B97-D fonksiyoneli kullanılarak sistem boyutu adım adım artırılmıştır. Başlangıçta, çeşitli yönlere sahip çok sayıda küme modeli dikkate alınırken yalnızca minimum bağlanma enerjisine sahip olanlar sunulmuştur. Bağlanma enerjileri B97-D/SVP/TZVP teori seviyesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Önceki çalışmalar, B97-D/TZVP kullanılarak gerçekleştirilen etkileşim enerjisi hesaplamalarının, karşılaştırılabilir sistemler için MP2, SCS-MP2 ve B2PLYP-D ile uyumlu olduğunu göstermiştir [206].

Kuantum mekanik küme hesaplamaları ilaç-ilaç, ilaç-DSPE, ilaç-PLGA ve poli-(glikolik asit) (PGA) ve poli-(laktik asit) (PLA) gibi çeşitli ikili sistemler, farklı konfigürasyonlarda yerleştirilerek kuantum kimyası küme hesaplamalarına tabi tutulmuştur. Bunun için kurkuminin hem enol hem de keto formu kullanılmıştır. Bu

hesaplamalar ile hem en düşük enerjili geometrik yapılar (iki molekülün oluşturabileceği en kararlı üç boyutlu hali), hem de moleküllerin birbirleriyle olan etkileşim enerjileri elde edilmiştir. Bu ikili sistemlerdeki moleküller arası etkileşimlerin güçlerini hesaplamak için dispersiyon düzeltmesi de dikkate alınmıştır. Tüm sistemler vakum ortamında B97-D/SVP seviyesinde geometri optimizasyonlarına tabi tutulmuş ve daha sonra optimize edilmiş geometriler kullanılarak aynı seviyedeki etkileşim enerjileri hesaplanmıştır. Yalnızca PLGA-DSPE-ilaç senaryosu, üçlü-yapı etkileşiminin daha ayrıntılı bir resmini görmek için B97-D/TZVP düzeyinde etkileşim enerjileri hesaplamasına tabi tutulmuştur. Sonuç olarak ortaya çıkan etkileşim enerjileri ve BSSE-düzeltilmiş etkileşim enerjileri Tablo 4.8’de listelenmiştir. Şekil 4.27’de etkileşim enerjileri listelenmiş optimize edilmiş yapılar gösterilmektedir. Mavi çizgiler, güçlü hidrojen bağlarını ve Angstrom cinsinden uzunluklarını göstermektedir.

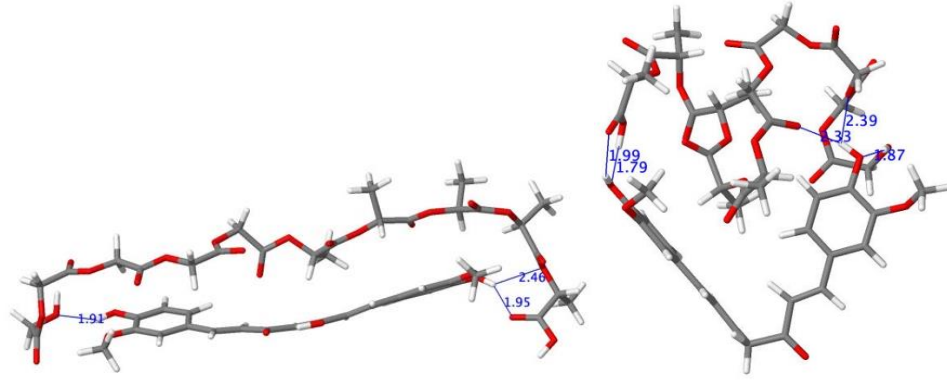


Sol: Optimize Edilmiş DSPE (enol), Sağ: Optimize Edilmiş DSPE Dimer

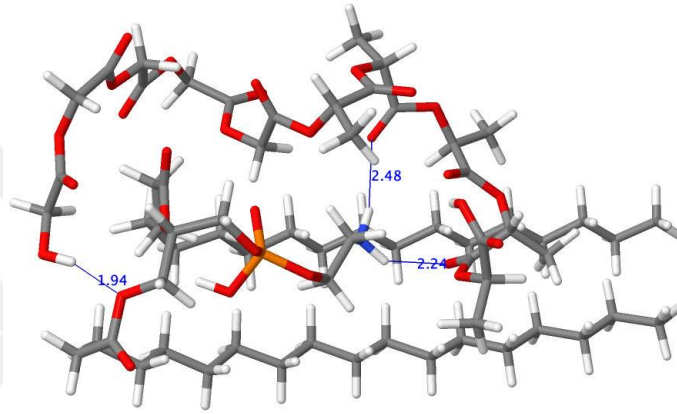


Sol: DSPE-Kurkumin (enol), Sağ: DSPE- Kurkumin (keto)

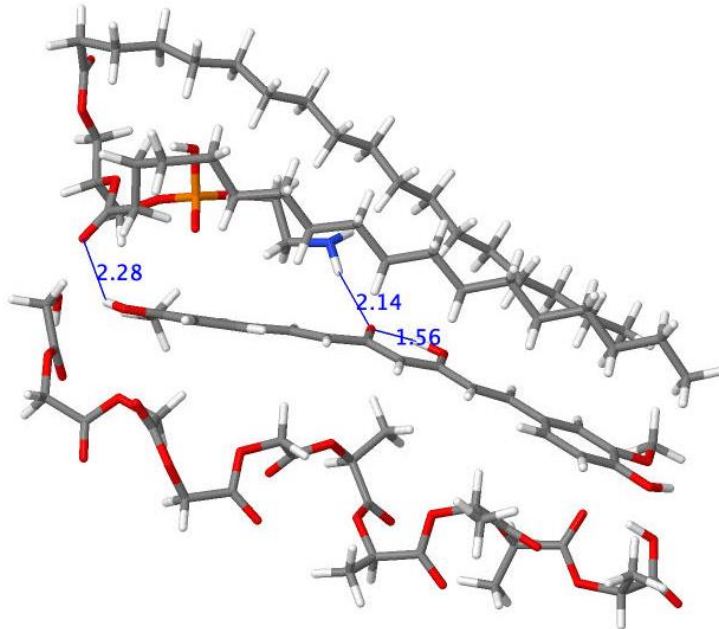
Şekil 4.27: Optimize edilmiş yapıların etkileşim enerjileri.



Sol: LA5GA5- Kurkumin (enol), Sağ: LA5GA5- Kurkumin (keto)



DSPE-LA5GA5



DSPE-LA5GA5- Kurkumin (enol)

Şekil 4.27 (devam): Optimize edilmiş yapıların etkileşim enerjileri.

Tablo 4.8 ve Şekil 4.27'den görüldüğü gibi, ilaç ve DSPE ile polimer ve DSPE arasında güçlü bir bağlanma etkileşimi vardır. Ayrıca kurkuminin enol formu, keto formuna kıyasla polimer ve DSPE ile daha güçlü bir etkileşime sahiptir. Trimer durumunda (DSPE-LA5GA5- Kurkumin (enol)), ilaç molekülü hem DSPE'ye hem de polimere güçlü bir şekilde bağlanmıştır. Verilen geometrik konfigürasyon için, DSPE ile ilaç arasındaki bağlanma etkileşimi (-118,416 kJ/mol), polimer ve ilaç arasındaki etkileşimden (-98,264 kJ/mol) biraz daha güçlü görünmüştür (Tablo 4.8). Şekil 4.27'de polimer-DSPE dimer, polimer ve DSPE arasında güçlü bir bağ olduğunu gösterirken, kurkumin molekülü trimer durumunda polimer ve DSPE arasına yerleşerek bir duvar gibi davrandığından, aralarındaki etkileşim enerjisi (-22,785 kJ/mol) düşmüştür. Ayrıca aynı nedenle üçlü-yapı etkileşiminin itici bir karaktere sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.8: Şekil 4.27'de gösterilen yönelimler için hesaplanan CP-düzeltilmiş ve CP-düzeltilmemiş etkileşim enerjileri [kJ/mol].

Sistem	CP düzeltilmiş	CP düzeltilmemiş
Kurkumin (enol)-DSPE	-133.63043	-208.36039
Kurkumin (keto)-DSPE	-120.73123	-188.81635
Kurkumin (enol)-LA5GA5	-157.00631	-254.7416
Kurkumin (keto)-LA5GA5	-148.58561	-220.88645
DSPE-DSPE	-154.12096	-243.90718
DSPE-LA5GA5	-155.69397	-264.43332
Kurkumin (enol)-DSPE-LA5GA5	-236.2868	-260.06331

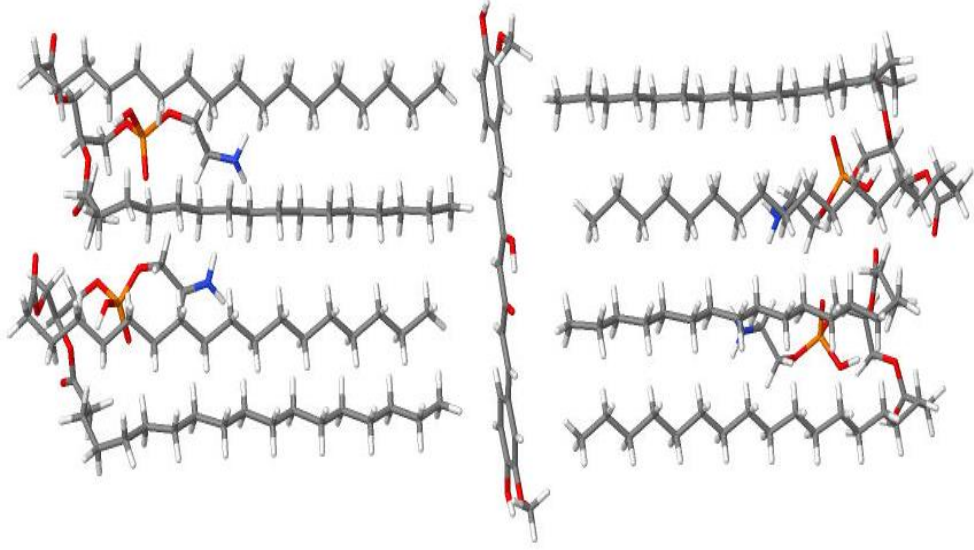
Kuantum kimyasal (QC) küme hesaplamalarından elde edilen sonuçlar, bu üç molekülün birbirleri arasında güçlü hidrojen bağları yapma eğiliminde olduğunu ve bu nedenle bir arada kaldıklarını gösteriyor.

4.2.2 Periyodik DFTB+ hesaplama sonuçları

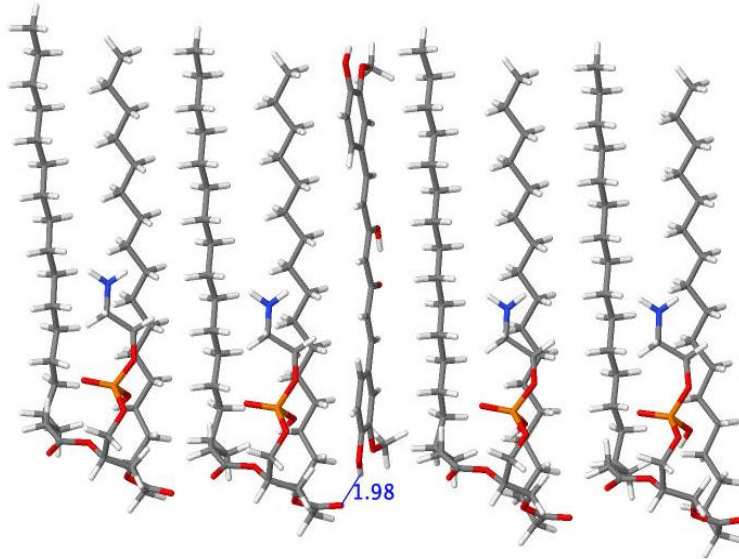
Kuantum kimyası küme modeli hesaplamaları yararlı olsa da, özellikle büyük ve karmaşık sistemlerle uğraşırken sonlu sistem boyutu gibi sınırlamaları vardır. Hesaplama açısından pahalı bir model kullanmaktan kaynaklanan sorunlardan kaçınmak ve daha büyük sistemleri incelemek için, Slater- Koster sıkı bağlama yaklaşımından yararlanan yoğunluk fonksiyonel teorisinin (DFT) basitleştirilmiş bir versiyonu olan DFTB+ (Yoğunluk Fonksiyonel-tabanlı Sıkı Bağlama) yürütülmüştür. DFTB+, moleküller, katılar, yüzeyler ve nano yapılar dahil olmak üzere çok çeşitli sistemlerin kuantum mekaniksel simülasyonlarını gerçekleştirmek için kullanılan hesaplamalı bir yazılım paketidir. Elektronik yapıyı hesaplamak için basitleştirilmiş bir sıkı bağlama yaklaşımının avantajını kullanan yöntem, geleneksel DFT yöntemlerinden önemli ölçüde daha hızlı hesaplamalara izin verir [151].

DFTB+'nin doğruluk ve hesaplama verimliliği arasında bir denge sağlaması, onu bu çalışmanın odak noktası olan büyük ve karmaşık sistemleri incelemek için uygun bir seçim haline getirmiştir. Bu nedenle, DFTB+ programında uygulandığı gibi daha büyük sistemler için yapı optimizasyonu ve tek nokta enerji hesaplamaları yapılmıştır. Hesaplamalar vakum ortamında ve dispersiyon düzeltmesinden yararlanılarak yapılmıştır.

Şekil 4.28, DFTB+ ile analiz edilen ilaç ve lipid moleküllerini içeren iki senaryonun optimize edilmiş yapılarını göstermektedir. Şekil 4.29 ise ilaç, polimer ve DSPE moleküllerine ait ilk ve optimize edilmiş yapıları göstermektedir.

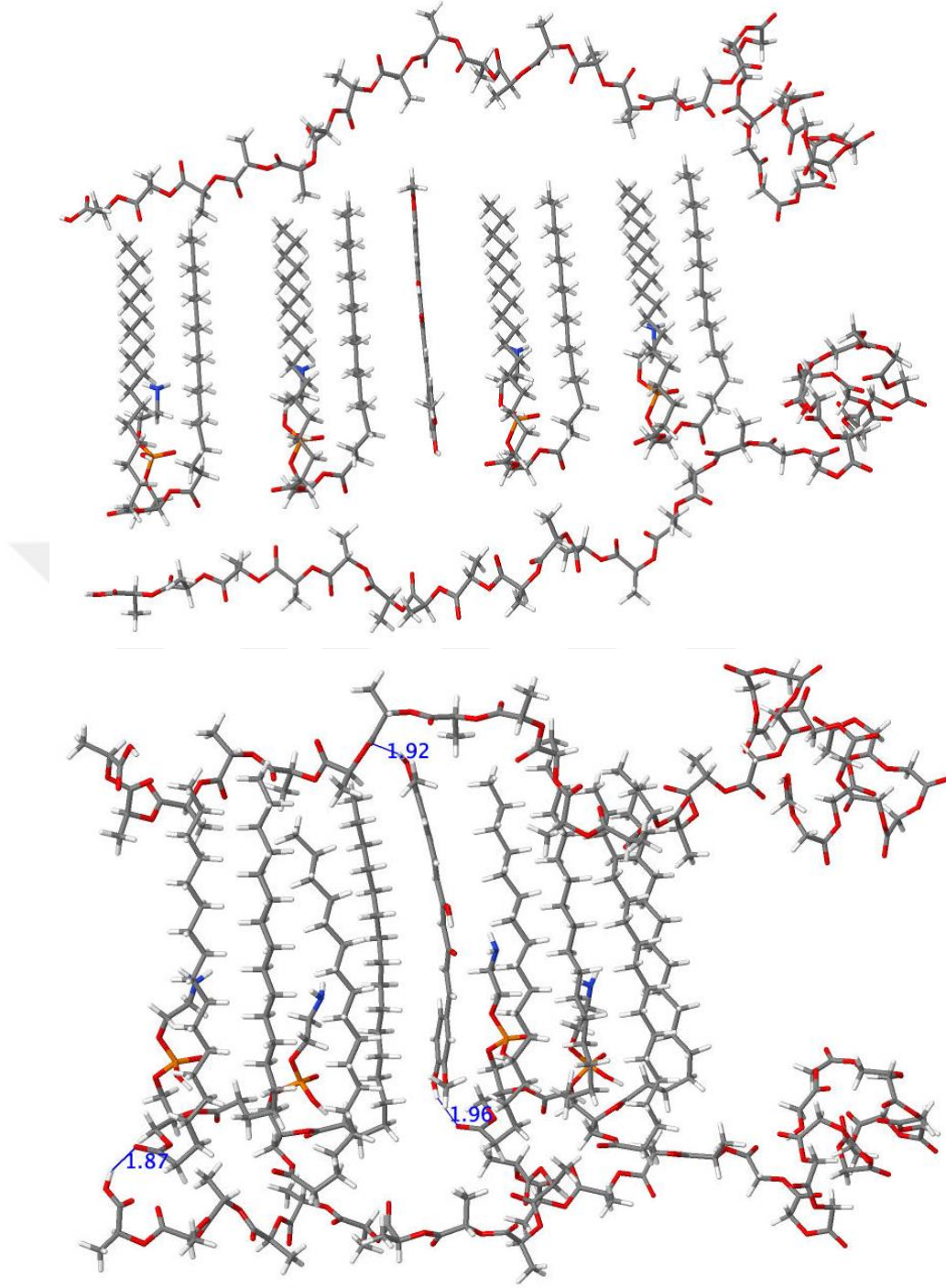


Senaryo 1: Kurkumin (enol)-DSPE (Toplam etkileşim enerjisi= -215.34 kJ/mol).



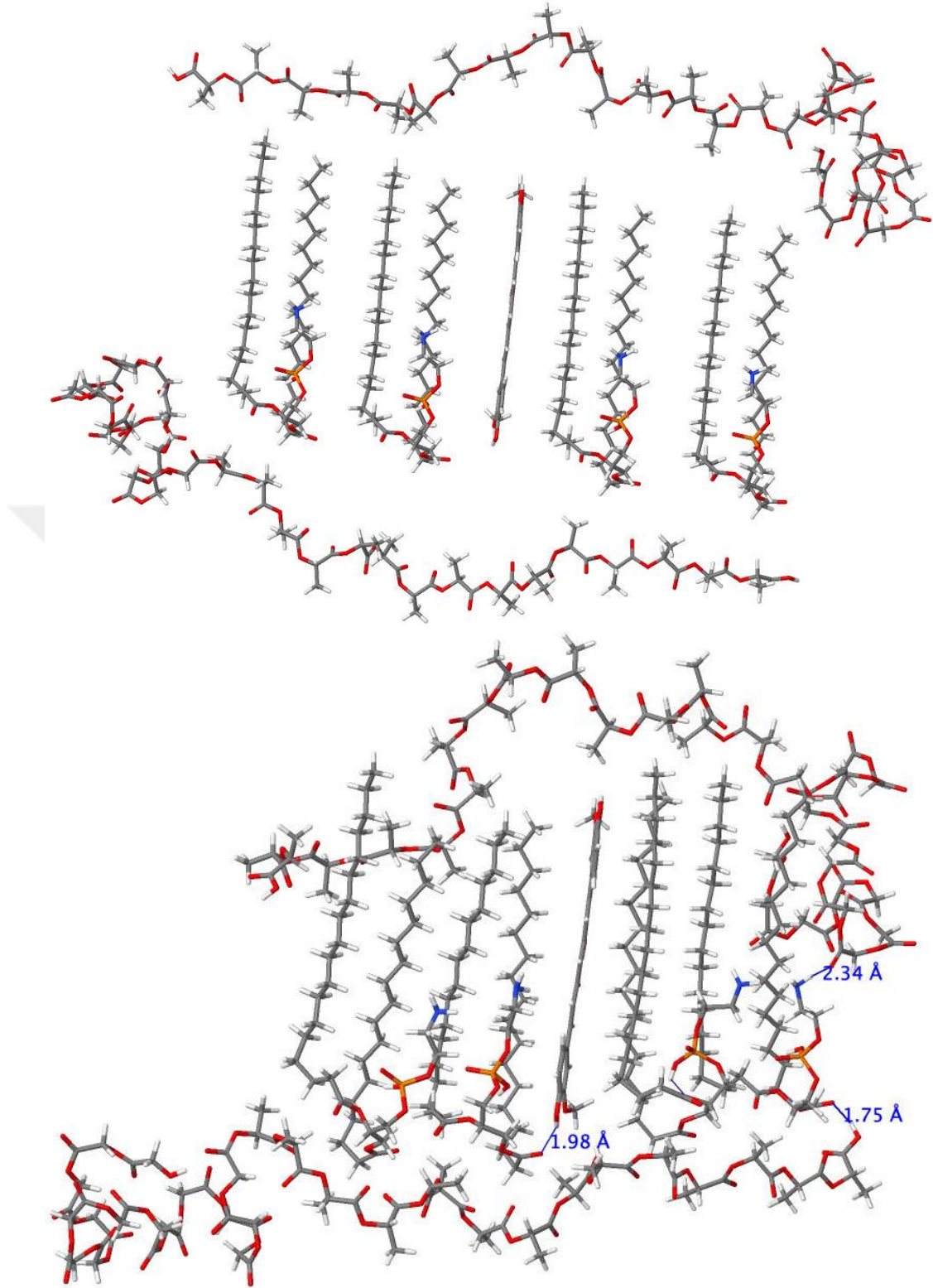
Senaryo 2: Kurkumin (enol)-DSPE (Toplam etkileşim enerjisi= -282,82 kJ/mol)

Şekil 4.28: DFTB+ analizi, ilaç ve lipid moleküllerini içeren iki senaryonun optimize edilmiş hali.



Kurkumin (enol)-DSPE-LA15GA15
Üst: İlk yapı, Alt: Optimize edilmiş yapı

Şekil 4.29: İlaç, polimer ve DSPE moleküllerinin ilk ve optimize edilmiş hallerine ait yapılar.



Kurkumin (enol)-DSPE-LA15GA15
Üst: İlk yapı, Alt: Optimize edilmiş yapı

Şekil 4.29 (devam): İlaç, polimer ve DSPE moleküllerinin ilk ve optimize edilmiş hallerine ait yapılar.

Şekil 4.29'da görüldüğü gibi ilaç ve DSPE moleküllerinden oluşan senaryolar, ilaç molekülünün DSPE moleküllerinin kollarına dik kalmaya kıyasla paralel kalmayı tercih ettiğini göstermiştir. Birinci senaryonun toplam etkileşim enerjisi -215,34 kJ/mol iken, ikinci senaryonun enerjisi -282,82 kJ/mol'dür. Ek olarak, ikinci durumda ilaç ve DSPE molekülleri arasında güçlü bir hidrojen bağı görülmüştür (Şekil 4.29). Bu nedenle, ikinci konfigürasyon, PLGA zincirleri de dahil edilerek daha ileri ve büyük sistemlerde kullanılmıştır.

Yukarıdaki DFTB+ sonuçları, Şekil 4.29'da görüldüğü gibi, ilaç molekülünün hem polimer hem de DSPE ile güçlü hidrojen bağları kurduğunu açıkça göstermiştir. İlaç molekülünün DSPE'nin kollarına yakın ve paralel durmayı tercih ettiği ve polimerin ilaç ve DSPE moleküllerinden oluşan çekirdeği sarma eğiliminde olduğu görülmüştür. Üstteki senaryoda (Şekil 4.29a), ilaç molekülü, komşu DSPE molekülleri ile en güçlü bağlanmaya sahiptir. İlaç ve DSPE molekülleri arasındaki bağlanma enerjileri sırasıyla -87,39 kJ/mol (sağa doğru dönen DSPE için) ve -59,45 kJ/mol (sağa doğru dönen DSPE için) olarak belirlenmiştir. Bunu -44,39 kJ/mol ile ilaç ve üst polimer arasındaki etkileşim izlemiştir. İkinci durumda (Şekil 4.29b) ise, ilaç molekülü yine komşu DSPE molekülleri ile en güçlü şekilde bağlanmıştır. Sağdaki ve soldaki DSPE molekülleri için bağlanma enerjisi sırasıyla -79,47 kJ/mol ve -92,40 kJ/mol'dür. İlaç ve polimer molekülleri arasındaki etkileşim, mesafeleri nedeniyle düşük kalmıştır. İlaç molekülü ile en yakın polimerin (alttaki) etkileşim enerjisi -14,82 kJ/mol'dür. Öte yandan, toplam etkileşim enerjileri ilk senaryo için -731,70 kJ/mol (Şekil 4.29a), sonraki senaryo için -876,28 kJ/mol (Şekil 4.29b) olarak bulunmuştur. Bu, hem polimerler ve DSPE molekülleri arasındaki hem de DSPE moleküllerinin kendi aralarındaki etkileşimlerin, her iki senaryonun toplam etkileşim enerjisinin önemli bölümünü doldurduğu anlamına gelmektedir.

Sonuç olarak, DFTB+ sonuçları, ilaç ile formülasyondaki diğer iki molekül arasında güçlü bağlanma etkileşimleri olduğunu ve büyük PLGA zincirlerinin bir arada kalmak için tüm sistemi desteklediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, kuantum kimyasal küme modellerinin sonuçlarıyla uyumludur.

4.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu tez çalışmasında emülsiyon-solvent evaporasyon (w/o/w) ve film oluşturma - rehidratasyon yöntemi birlikte kullanılarak 250 ug/mL kurkumin yüklü PLGA-DSPE

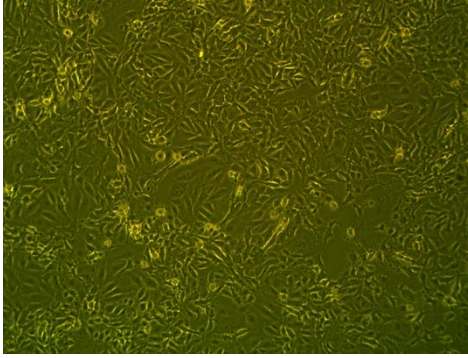
hibrit nanopartikül optimize edilmiş ve formülasyon (CurPD4) hazırlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları ile, FT-IR, DSC ve TEM analizi kullanılarak, PLGA-DSPE hibrit nano misellerine kurkuminin başarıyla yüklendiği ortaya konmuştur. CurPD4 nano partikülleri 120-160 nm boyut aralığında bulunmuştur. Nanopartikül kapsülleme etkinliği %92 ilaç yükleme etkinliği %7,3 olarak belirlenmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları tamamlanan kurkumin yüklü nanopartikül ve 5-flourourasil (5-FU) ile kombinasyon uygulamasının kolon kanseri hücreleri ve sağlıklı hücrelerdeki etkinliğini incelemek amacıyla kolon adenokarsinoma LoVo (CCL-229™) hücre hattı ve deri fibroblast CCD-1072Sk (CRL-2088™) hücre hattı kullanılmıştır. Çalışma kapsamında, kurkumin yüklü nanopartikül ve 5-flourourasil (5-FU) ile kombinasyon uygulamasının LoVo-Luc ve CCD-1072Sk hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatteki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT canlılık analizi, apoptotik etkinliğinin belirlenmesi için Anneksin V-FITC deneyi ve akridin oranj/etidiyum bromür deneyi gerçekleştirilmiştir. Üç tekrarlı yapılan deneylerde kontrole göre deney grupları karşılaştırılmış ve hücrelerin % canlılık ve % apoptoz oranları belirlenmiştir.

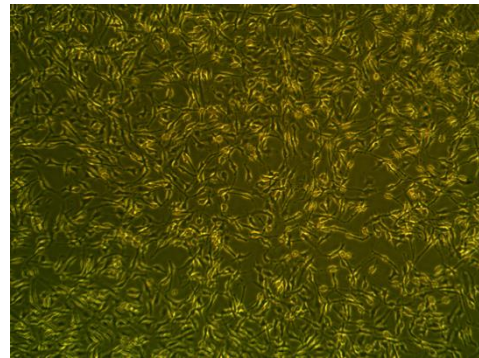
4.3.1 Hücre morfolojisi ve biyoluminesans görüntülenmesi

LoVo (kolon kanseri) ve CCD-1072Sk (sağlıklı fibroblast) hücre hatları deneyler için kullanılmadan önce en az iki defa pasajlanmış ve konflue olması beklenmiştir. Hiçbir madde ile maruziyet uygulanmamış hücrelere ait invert ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.30'da sunulmuştur (Şekil 4.30a ve Şekil 4.30b). Transgenik hücre hattı olan kolon kanseri hücreleri deneylere başlamadan önce transfeksiyonun mevcudiyeti açısından kontrol edilmiştir. Ayrıca hücrelerin daha sonra hayvan deneylerinde kullanılabilmesi için D-lusiferin uygulamasının ardından biyoluminesans ışımaya yaptığı gösterilmiştir (Şekil 4.30c).

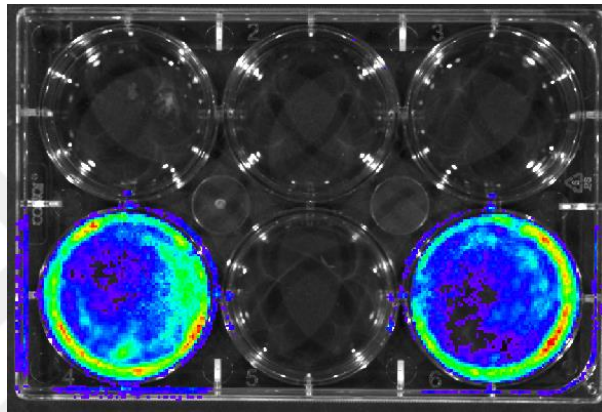
a) Lovo-Luc



b) CCD1072



c) D-lusiferin uygulanmış LoVo-Luc hücreleri



Şekil 4.30: Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarının morfolojileri a) LoVo-Luc b) CCD-1072Sk c) LoVo-Luc hücre hattının biyoluminesans ışınması.

4.3.2 Hücre canlılığının belirlenmesi

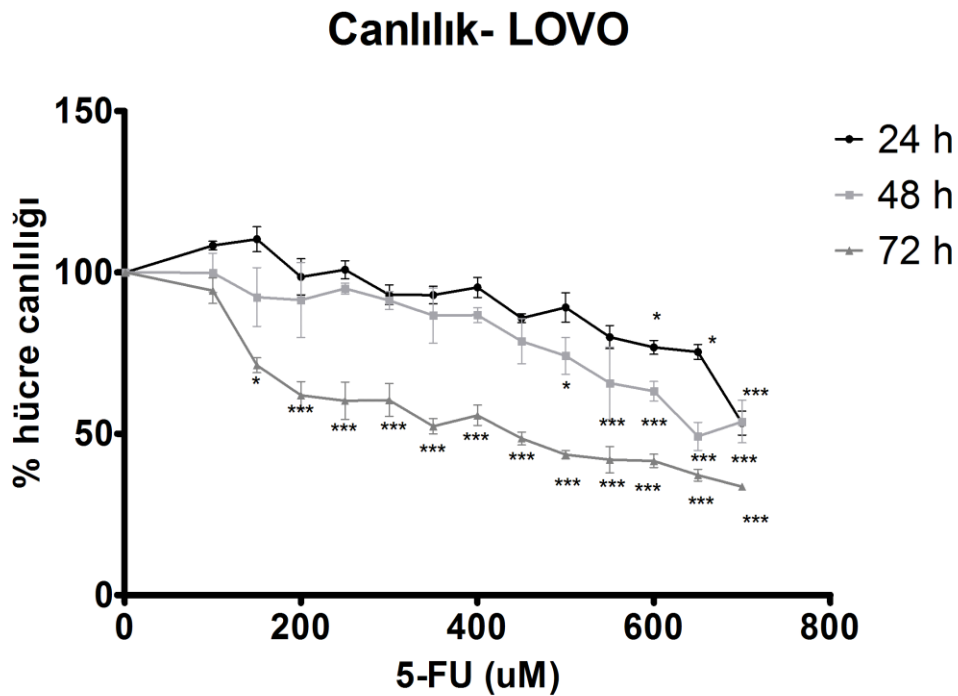
4.3.2.1 5-FU IC50 dozunun belirlenmesi

Kolon kanseri hücrelerinde 5-FU'in antikanser etkileri iyi bilinmektedir. Bir pirimidin analogu olan 5-FU hücrelerin içinde florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiüridin trifosfat (FdUTP) ve florouridin trifosfat (FUTP) gibi farklı sitotoksik metabolitlere dönüşür. Bu türevler DNA ve RNA'ya dahil olarak hücre ölümüne yol açar [21].

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde kolon kanseri hücre hatlarında 5-FU'nun yarı inhibitör konsantrasyonlarının (IC_{50}) HCT116 için $13,72 \mu M$ ve HT29 hücreleri için $106,8 \mu M$ olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada 5-FU'in endotel hücreler ve kardiyomiyosit hücrelerinde toksisitesi incelenmiş ve sağlıklı hücrelerdeki sitotoksik dozun çok daha düşük (HUVEC için $3,832 \mu M$ ve HCM için $4,866 \mu M$) olduğu belirtilmiştir [86].

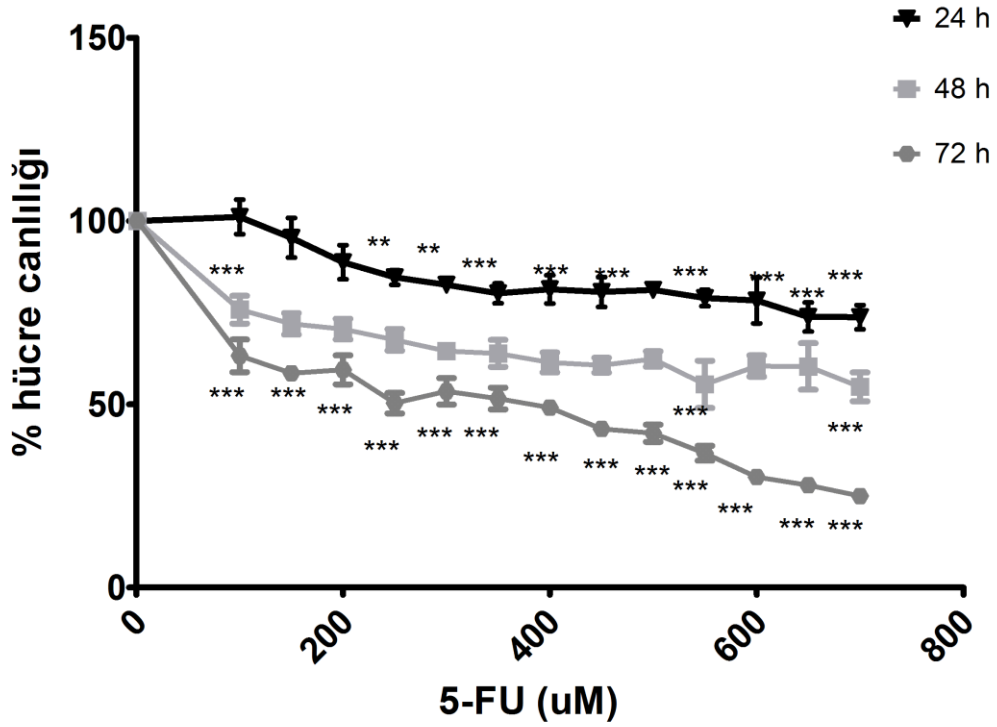
Kombinasyon tedavisinde hücelere uygulanacak 5-FU dozunun belirlenmesi için öncelikle 5-FU stok solüsyonu ($10^5 \mu\text{M}$) hazırlanmış ve besiyeri ile seyreltilerek hücelere 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 μM dozlarında 5-FU uygulanmıştır. Hücrelerin 24, 48 ve 72 saatlik % canlılık grafikleri LoVo-Luc hücre hattı için Şekil 4.31 ve CCD-1072Sk hücre hattı için Şekil 4.32’de sunulmuştur. Sitotoksik etkinin tüm hücelerde doza ve maruziyet zamanına bağlı olarak arttığı ve canlılığın azaldığı gözlenmiştir.

Hücelere 400 μM dozunda 5-FU uygulandığında CCD-1072Sk hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik canlılık oranı sırası ile %81,36, %61,41 ve %52,43; buna karşın LoVo-Luc hücrelerinde aynı dozda canlılık oranı sırası ile %102,05, %86,77 ve %55,73 olarak hesaplandı. Bu durumda kanser hücreleri ile sağlıklı hücreler arasında 5-FU ilacının seçiciliğinin olmadığını ve kemoterapi ajanının sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etkisinin yüksek olduğu bilgisi doğrulanmıştır [6]. Buna karşın kanser hücrelerinin ilaca karşı gösterdiği hassasiyet daha düşük olarak bulunmuştur. Maruziyet zamanları arasındaki farka bakıldığında 24 saat ve 48 saat ile 24 ve 72 saat arasında 400 μM dozunda anlamlı bir fark ($p < 0.001$, ***) bulunmuştur. Buna karşın aynı dozda 48 ve 72 saat arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, ns).



Şekil 4.31: LoVo-Luc hücre hattında 5-FU'nun (0-700 μM) MTT hücresel canlılık grafiği (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***)..; *** $p < 0.001$).

Canlılık- CCD1072Sk



Şekil 4.32: CCD-1072Sk hücre hattında 5-FU'nun (0-700 µM) MTT hücresel canlılık grafiği (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

MTT canlılık testi sonucunda elde edilen konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri kullanılarak uygulanan maddelerin her birine ait IC₅₀ değerleri tüm maruziyet zamanları için hesaplanmış ve Tablo 4.9'da sunulmuştur. Kemoterapötik bir ajan olan 5-FU'nun kanser hücrelerindeki IC₅₀ değerleri sağlıklı hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Nitekim 48 saat için LoVo-Luc hücrelerindeki IC₅₀ oranı 440,9 ± 0,0303 µM iken CCD-1072Sk hücrelerinde 140,3 ± 0,04434 µM olarak hesaplanmıştır.

4.3.2.2 Serbest kurkumin ve kurkumin nano formülasyonun hücre canlılığına etkisi

Kurkumin, p53 aracılı apoptoz vb. çok sayıda yolak ile kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti kanser etkileri indükler. p53 aracılı yolak, siklin bağımlı kinaz (Cdk) inaktivasyonu ile sonuçlanır ve bu da hücre döngüsünün G1-S fazında durmasına yol açar [188]. Yapılan bir çalışmada, kurkumin taşıyan PLGA nano partiküllerinin, MCF-7 meme kanseri hücre hattında G2/M evresinde hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir [189].

Kurkumin'in çeşitli farklı kanser türleri için terapötik potansiyele sahip olduğu yapılan çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir [190]. Zayıf suda çözünürlüğü, düşük

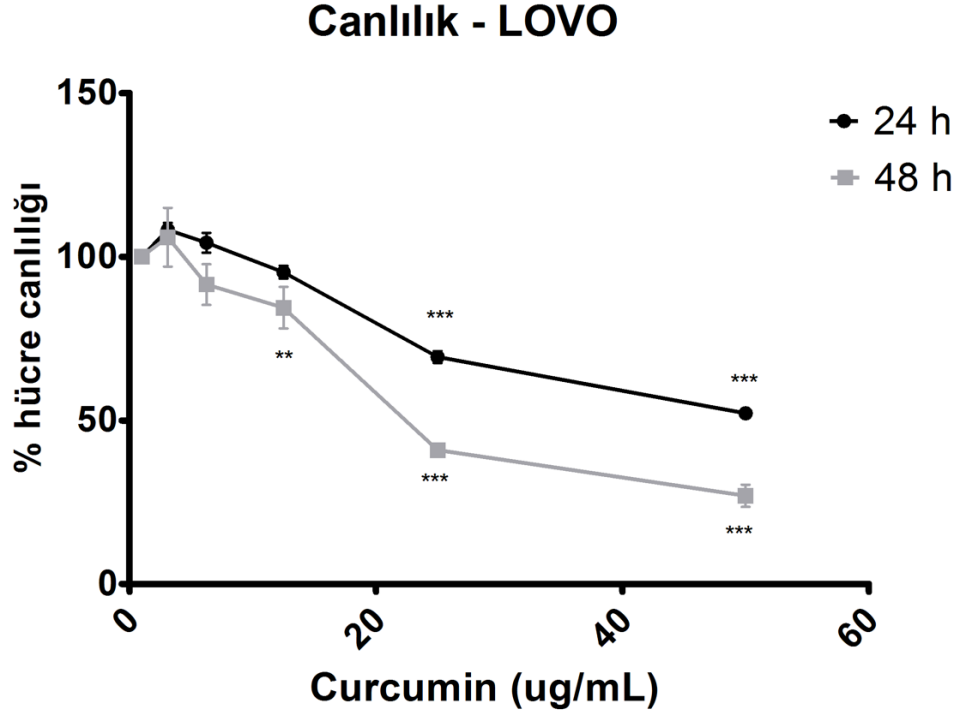
biyoyararlanımı ve hızlı metabolize olması nedeniyle, oral veya *i.v.* kurkumin uygulaması *in vivo* koşullar için sınırlıdır [191]. Bu sorunların üstesinden gelmek için, hidrofobik doğal ürünün farklı türde nano formülasyonları geliştirilmiştir. Shaikh ve ark. sunmuş olduğu bir çalışmada 264 nm boyutunda ve %76,9 kapsülleme verimliliğine sahip kurkumin yüklü PLGA nanopartikülleri ile oral biyoyararlanımın 9 kat arttığını öne sürmüştür [17]. Mirakabad ve ark. ise kurkumin yüklü PLGA-PEG nanopartiküllerinin MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde serbest kurkuminden daha yüksek, ayrıca doza ve zamana bağlı bir inhibitör etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur [148]. Bunlar gibi çeşitli çalışmalarla etkinliği kanıtlanan ve biyoyararlanım problemi ortaya konan kurkumin'in kanser hücrelerinin bulunduğu sulu ortamda çözünürlüğünü arttırmak için bu tez çalışmasında PLGA-DSPE nano miselleri hazırlanarak *in vitro* deneylerde kullanılmıştır.

Tablo 4.9 : 5-FU ve serbest kurkumin'in IC₅₀ değerleri.

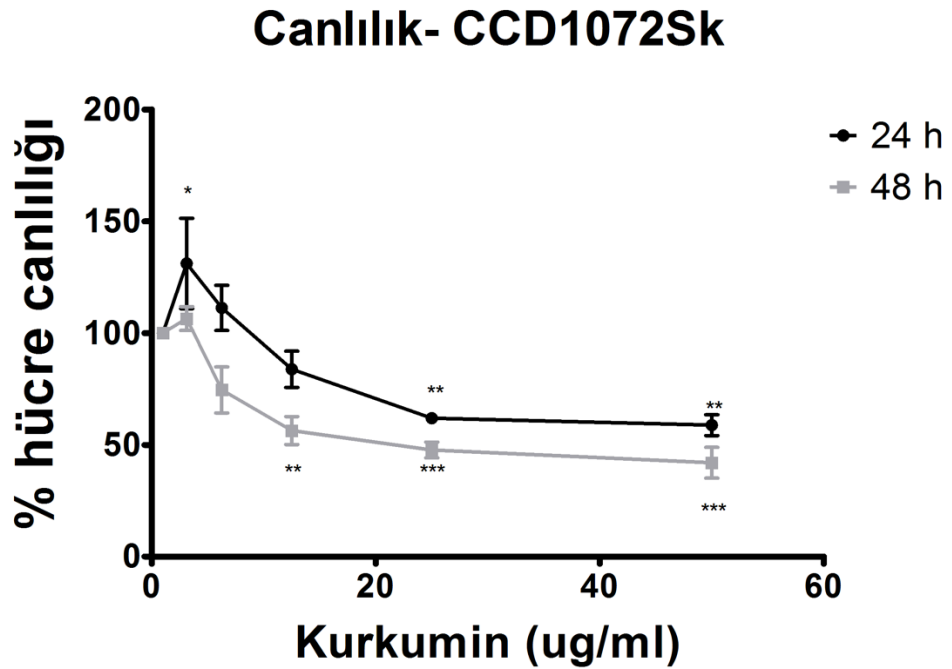
	Maruziyet Zamanı	IC ₅₀ (μM)	
		CCD-1072Sk	LoVo
5-FU	24 saat	239,0 ± 0,0407	495,5 ± 0,01935
	48 saat	140,3 ± 0,04434	440,9 ± 0,03031
	72 saat	101,4 ± 0,0754	208 ± 0,02384
		IC ₅₀ (μg/mL)	
Serbest Kurkumin	24 saat	24,15 ± 0,08945	21,79 ± 0,02275
	48 saat	14,55 ± 0,05208	12,96 ± 0,03631

LoVo kolorektal adenokarsinom hücrelerine 0-100 μg/mL konsantrasyon aralığında serbest kurkumin 24 ve 48 saatlik tedavi şeklinde uygulanmıştır. Hücre canlılığının, 6,25 μg/mL üzerindeki dozlarda konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Ancak düşük dozlarda kurkuminin (0-6,25 μg/mL) hücreleri proliferere ettiği gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre kurkumin uygulanan kanser hücrelerinde 25 μg/mL ve üzeri dozlarda hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı (p<0.005, **) düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.33). Bu nedenle hücrelere bundan sonra uygulanacak kurkumin dozu 25 μg/mL olarak belirlenmiştir. Sağlıklı hücrelerde ise kurkuminin düşük

dozlarda hücreleri proliferere ettiği ancak 25 µg/mL ve üzeri dozlarda anlamlı hücre ölümüne ($p < 0.005$, **) yol açtığı anlaşılmıştır (Şekil 4.34) Kurkuminin kanser hücrelerindeki IC₅₀ dozu sağlıklı hücrelerde kanser hücrelerine göre daha yüksektir (Tablo 4.9).

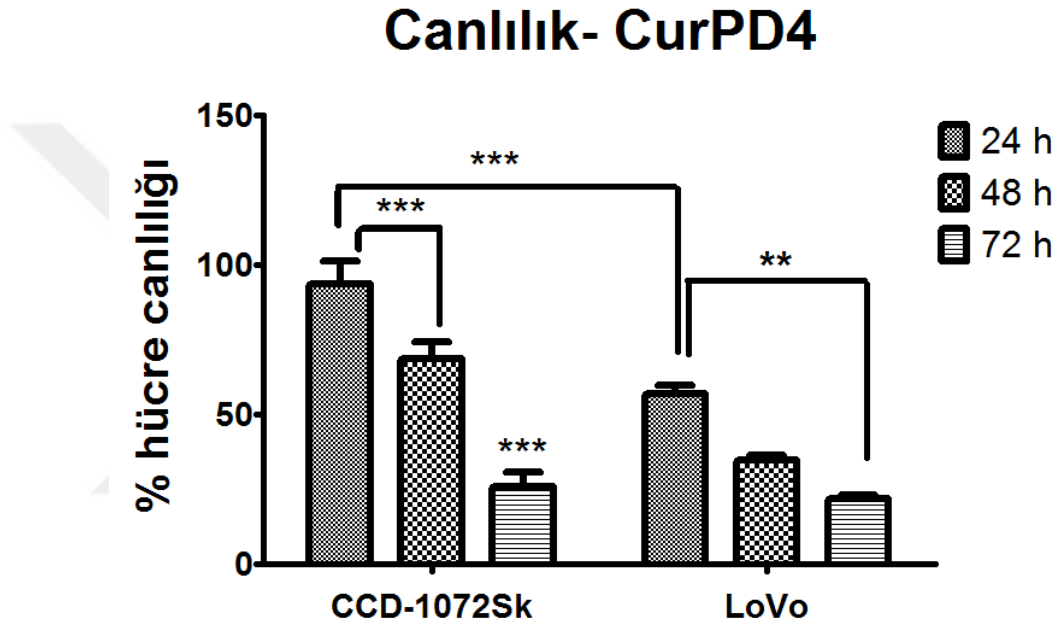


Şekil 4.33: Serbest kurkuminin (0-100 µg/mL) LoVo-Luc hücrelerindeki MTT hücresel canlılık grafiği (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



Şekil 4.34: Serbest kurkuminin (0-100 µg/mL) CCD-1072Sk hücrelerindeki MTT hücresel canlılık grafiği (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Kurkumin yüklü hibrit nanopartikül uygulanan LoVo-Luc hücreleri üzerindeki ortalama canlılık oranları 24 saat için %60, 48 saat için %40 ve 72 saat için %25 olarak hesaplanmıştır. Sağlıklı hücre ve kanser hücreleri kendi aralarında karşılaştırıldığında 24 saatte LoVo hücrelerini CCD1072 hücrelerine kıyasla daha çok öldürdüğü görülmüştür (***p<0.001). Hücrelerde 48 ve 72 saatte görülen hücre ölümünde 24 saate göre anlamlı bir fark bulunmuştur (***p<0.001) (Şekil 4.35).



Şekil 4.35: CurPD4 NP'ün LoVo ve CCD-1072Sk hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik canlılığa etkisi.

4.3.2.3 Kombine tedavi uygulamasının hücre canlılığına etkisi

Kolorektal kanserde 5-FU temelli tedavi yaklaşımı uzun yıllardır tek başına veya başka ilaçlar ile kombine protokoller olarak tercih edilmektedir. Her ne kadar lekövirin, oksaliptatin ve irinotekan ile kombinasyonları sayesinde tedavide iyileşme sağlansa da KRK'lerin yaklaşık yarısı 5-FU bazlı kemoterapiye dirençlidir [192]. Tedaviye ilk yanıtı olumlu olan hastalarda dahi hastalığın nüksetmesi ihtimalinden dolayı, kemoterapi sonrası hastalığın rekürrensini durduran hedefe yönelik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır [193].

Kurkumin p53 yolağı ile 5-FU ise sitotoksik metabolitlerin aracılık ettiği yollarla kanser hücresi ölümüne yol açar. Bunun dışında Kurkumin, kolon kanserinde COX-2 mRNA / protein ekspresyonlarını inhibe edebilir ve bu da 5-FU'nun anti kanser

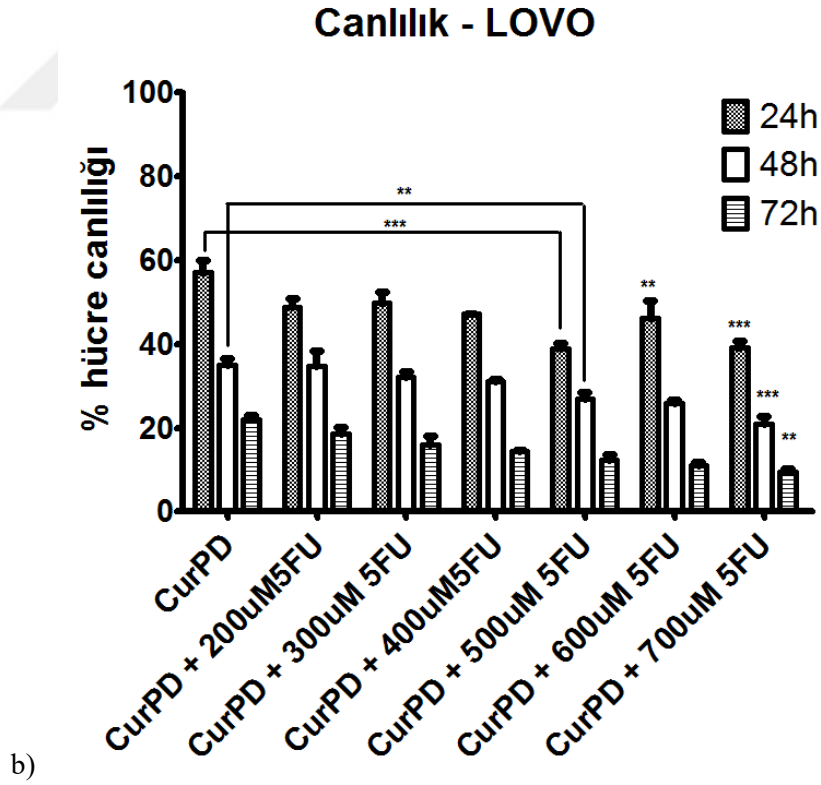
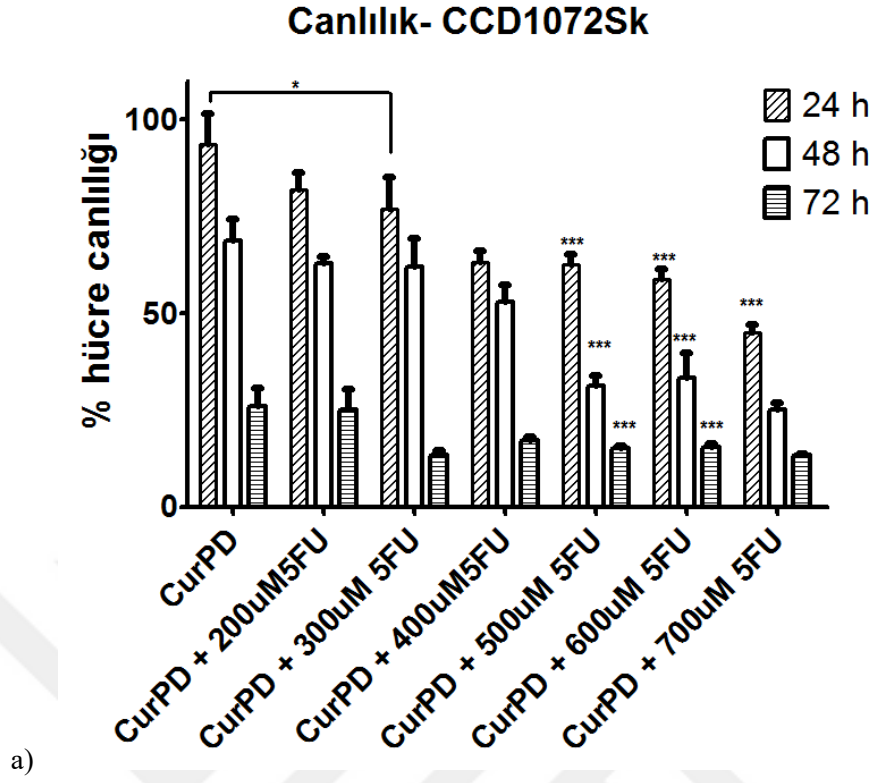
etkinliğini iyileştirmeye yardımcı olur. Daha önce yapılan ve HT-29 kolon kanser hücreleri kullanılan birkaç çalışmada kurkumin ve 5-FU'nun birlikte kullanımında anti kanser etkinliğin artması [194], kurkumin aracılığıyla COX-2'nin mRNA ve protein düzeyinde inhibisyonu yoluyla açıklanmıştır [103, 195]. Mukerjee ve Vishwanatha, tasarladıkları kurkumin yüklü PLGA partiküllerini kullanarak, kurkumin'in prostat tümörlerinde adjuvan tedavi olarak yüksek potansiyele sahip olduğunu öne sürmüşlerdir [196].

Literatür ile uyumlu olarak yapılan çalışmanın sonuçlarına göre kombine tedavideki (CurPD4 + 5-FU) sitotoksik yanıtın tekli tedavilere göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre hem sağlıklı hücrede (Şekil 4.36a) hem de kanser hücresinde (Şekil 4.36b) istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p < 0.001$, ***). Sağlıklı hücreler ve kanser hücreleri kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm saatlerde kurkumin yüklü nano miselin LoVo hücrelerinde daha yüksek hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. LoVo hücrelerinde yalnızca CurPD NP ile kombinasyon uygulaması (500 μ M 5-FU ve üzeri dozlarda) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir ($p < 0.001$). Benzer şekilde sağlıklı hücrelerde de 5-FU ile kombinasyon tedavisinin tek başına nano misel uygulanmasından daha yüksek hücre ölümü sağladığı anlaşılmıştır.

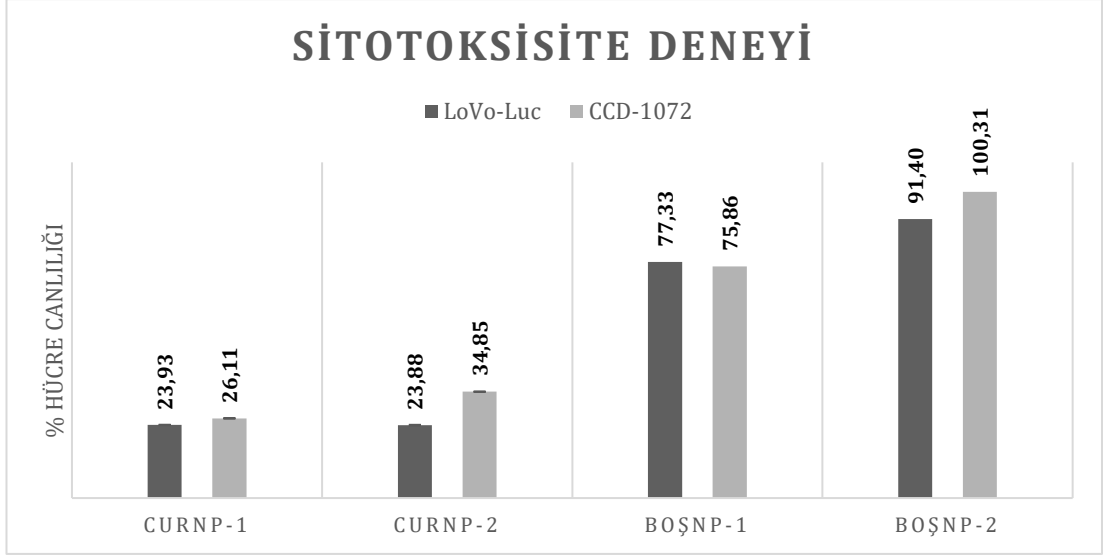
4.3.2.4 Formülasyonun toksik etkisi

Projede kullanılacak olan PLGA FDA onaylıdır. DSPE ise FDA onaylı DOXIL formülasyonunun bir bileşenidir. DOXIL, doxorubicin HCl'un lipozomal formülasyonudur ve yapısında PEG konjuge DSPE kullanılmıştır. Bu yüzden bu proje kapsamında hazırlanacak DSPE-PLGA hibrit nano ilaç taşıma sistemi etkin miktarda kurkumin taşıdığı takdirde, düzenleyici merciler tarafından tanınan bileşenler ile endüstriyel üretime uygun partiküller üretilmiş olacaktır.

Sentezi ve karakterizasyonu tamamlanan ilaç yüklenmemiş nano formülasyonun toksisite ve aktivite çalışmaları *in vitro* hücre kültüründe (LoVo-Luc kolon kanser hücre hattında ve CCD-1072 sağlıklı kolon epitel hücrelerinde) karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Buna göre film oluşturma - rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan PD4 nano misellerinin kolon kanseri hücrelerinde toksik olmadığı, sağlıklı hücrelerde ise %91.40 canlılıkla sonuçlandığı gözlenmiştir. Buna göre içeriğindeki malzemelerin toksik olmadığı, etkinliğin ise ilaç taşınması ile sağlandığı doğrulanmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.36: CurPD4 ve 5-FU (0-700 uM) kombine tedavi uygulamasının a) CCD-1072Sk ve b) LoVo-Luc hücrelerinde canlılık üzerine etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



Şekil 4.37: CurPD4 ve CurPD3 nanopartiküller ve kurkumin yüklü olmayan hallerinin CCD1072Sk ve LoVo-Luc hücrelerindeki 24 saatlik toksisite sonuçlarının karşılaştırılması.

4.3.3 Nano formülasyonların apoptoz üzerine etkisi

Anormal hücre proliferasyonunu kontrol etmekten sorumlu mekanizmalar, apoptoz, nekroz veya otofaji ile tetiklenebilen hücre ölüm programlarıdır. Kanser hücrelerinin bu hücre ölümü mekanizmalarına direnebilmeleri ayırt edici özelliklerindedir. Kurkuminin, hücre döngüsünün durmasını indükleyen çoklu sinyal yollarını hedeflediği ve kurkuminin neden olduğu temel hücre ölümü mekanizmasının apoptoz olduğu gösterilmiştir [197]. Kurkumin nano partikülleri ile yapılan çalışmalar, *in vitro* ve *in vivo* sulu ortam koşullarında serbest kurkumine göre PLGA nanopartiküllerin kanser hücrelerini inhibe etmede çok daha iyi etki gösterdiğini ve apoptozu arttırdığını kanıtlamıştır [198, 199].

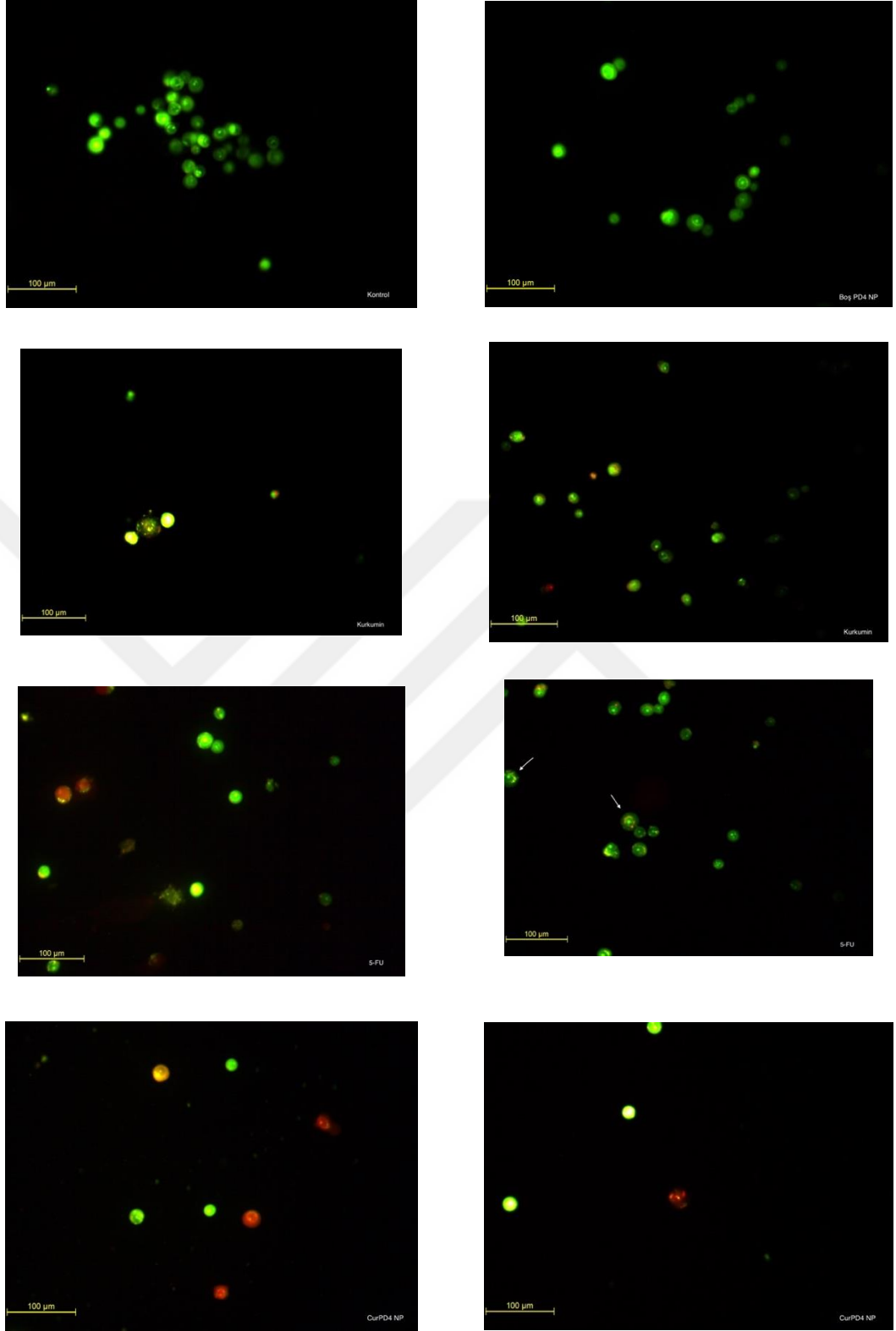
Genel olarak, apoptozda üç ana tip biyokimyasal değişiklik gözlemlenebilir: Bunlar 1) kaspazların aktivasyonu, 2) DNA ve protein parçalanması ve 3) zar değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınmadır. Kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonu, birçok hayati hücrel proteini yok eder, nükleer yapıyı ve hücre iskeletini parçalar. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da bozan DNAazı aktive ederler. Bunun ardından DNA'nın 50 ila 300 kilobazlık büyük parçalara karakteristik bir şekilde parçalanması gerçekleşir. Daha sonra, DNA endonükleazlar tarafından 180 ila 200 baz çiftinin katları halinde oligonükleozomlara bölünür. Apoptozun sonraki aşamasında görülen morfolojik özelliklerden bazıları, zarda blebler oluşması, sitoplazmik organellerin ultrastrüktürel modifikasyonu ve zar

bütünlüğünün kaybını içerir. Genellikle fagositik hücreler, apoptotik cisimler oluşmadan önce apoptotik hücreleri yok eder.

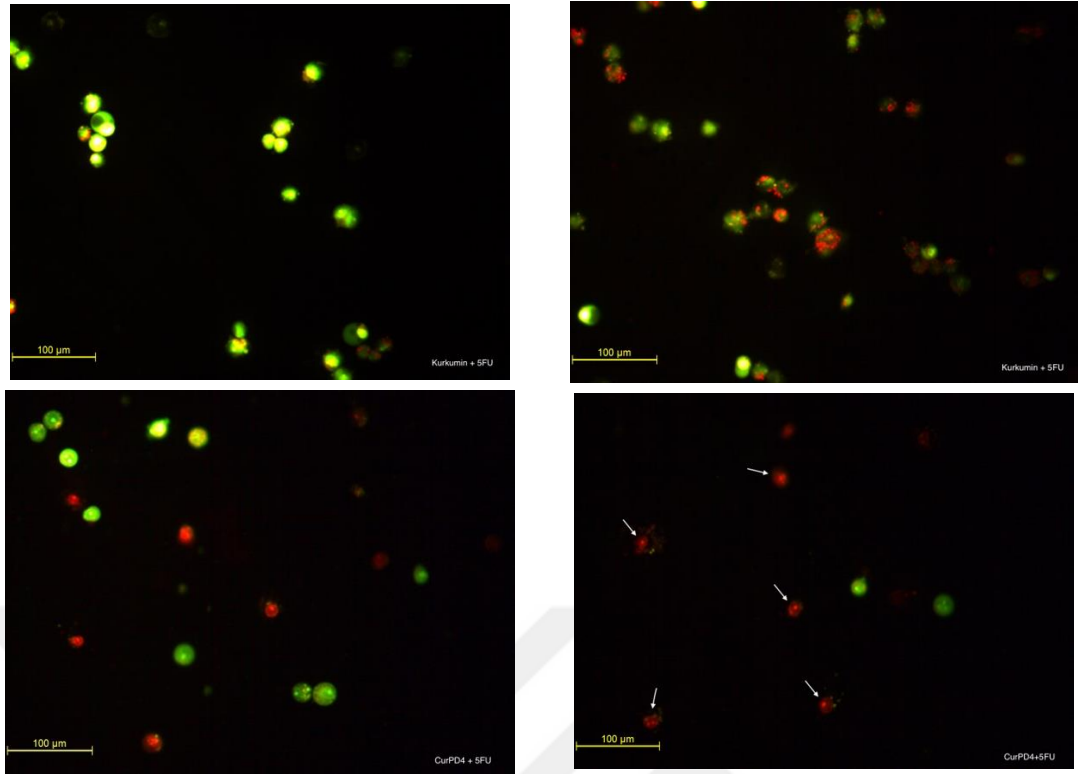
4.3.3.1 Akridin turuncusu (AO) / etidyum bromür (EB) çift boyaması

Akridin oranj boyası hem canlı hem de ölü hücreleri boyarken etidyum bromür boyası ise sadece membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyar. Deney sonucunda bu nedenle canlı hücreler homojen yeşil görünmüştür. Erken apoptotik hücreler yeşil boyanmış ancak kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanmanın bir sonucu olarak çekirdeklerde parlak yeşil noktalar bulundurmıştır[157]. Geç apoptotik hücreler ayrıca etidyum bromür içerecek ve bu nedenle turuncuya boyanacaktır, ancak nekrotik hücrelerin aksine, geç apoptotik hücreler yoğunlaşmış ve sıklıkla parçalanmış çekirdeklere sahiptir. Nekrotik hücreler kırmızı renkte boyanır ancak yoğunlaşmış kromatin içermeyen canlı hücrelere benzeyen bir nükleer morfolojiye sahiptir [200]. Şekilde LoVo hücresi üzerinde uygulanan 5-FU, kurkumin, CurPD4 ve kombine tedavilerinin apoptoz üzerine etkisi floresan mikroskop görüntüleri ile ortaya kondu. Muamele edilmiş hücreler, kontrollere kıyasla apoptoz özelliklerini, yani nükleer parçalanma ve sitoplazmik kesecik oluşumu sergilemiştir (Şekil 4.38).

Her bir deney grubunda 100 hücre sayılarak hücreler canlı, apoptotik veya nekrotik olarak belirlenmiştir. Her bağımsız deney için normal (tekdüze yeşil), apoptotik (yoğun kromatin yoğunlaşması içeren yeşil/sarı veya turuncu) ve nekrotik hücrelerin (tekdüze turuncu/kırmızı) yüzdesi ölçülmüş, 3 tekrarın ortalama \pm standart hatası hesaplanmıştır. Böylece yarı kantitatif bir değerlendirme yapılmış ve sonuçları Şekil 4.39'da sunulmuştur. Kontrol grubunda görülen yeşil renkle boyanmış yuvarlak çekirdekler canlı hücreleri göstermektedir. Kurkumin + 5 FU uygulanmış hücrelerde gözlenen yeşilimsi sarı çekirdekler ise erken apoptoz varlığına işaret eder. Yoğun şekilde turuncu/kırmızı gözlenen çekirdekler CurPD4 ve 5-FU uygulanmış hücrelerde görülmüştür ve bunlar geç apoptotik hücrelerdir. Tamamen kırmızı renkli hücreler ise CurPD4 +5 FU uygulamasına ait görselde bulunmuştur ve ölü hücreleri gösterir. Nekrotik hücrelerde belirgin olmayan bir dış hat görülmüş ve parçalanmaya yakın hücrenin hacmi artmıştır [200]. Boş nanopartikül uygulanmış, tedavi edilmemiş hücrelerde, parlak yeşil olarak sunulan, hücrenin merkezinde eşit olarak dağılmış dairesel normal çekirdekler ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.38: Akridin oranj/etidyum bromür boyası ile boyanan ve BoşPD4, 5-FU, Kurkumin, Kurkumin + 5-FU ve CurPD4 +5 FU uygulanan LoVo hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.

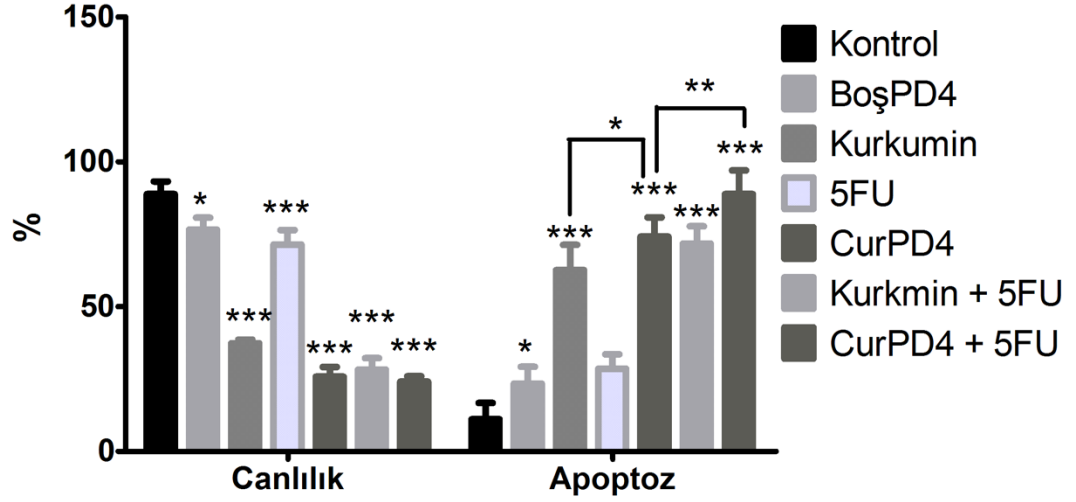


Şekil 4.38 (devam): Akridin oranj/etidyum bromür boyası ile boyanan ve BoşPD4, 5-FU, Kurkumin, Kurkumin + 5-FU ve CurPD4 +5 FU uygulanan LoVo hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.

Kurkumin, 5-FU ve nanopartikül kombinasyonları ile muamele edilen hücreler, kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma, apoptotik cisimciklerin varlığı ve vakuollerin oluşumu gibi karakteristik apoptoz özellikleri göstermiştir. Görsel üzerinde oklar ile işaretli kısımlar apoptotik hücre morfolojisine ait özelliklere dikkat çekmektedir (Şekil 4.38). Görsel anlatım dışında yarı kantitatif analiz sonuçları da değerlendirildiğinde kombinasyon gruplarında apoptoz oranının artmış olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.39).

AO/EB çift boyaması sonuçlarına göre CurPD4 +5 FU kombine tedavisinde rastlanan canlılık oranı (%24.13) kurkumin, 5-FU ve kurkumin yüklü NP'ün tek tek uygulanmasına göre (sırası ile %37.38, %71.42 ve %25.84) daha yüksektir. Ancak CurPD4 ve CurPD4 + 5FU uygulanan hücrelerdeki yüzde canlılık değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p > 0.05$) yüzde apoptoz değerleri arasındaki fark ($p < 0.01$) anlamlı bulunmuştur. Buna ek olarak serbest kurkumin (%62.61) ile CurPD4 NP (%74.15) uygulanan hücrelerde yüzde apoptoz oranı ($p < 0.05$) nanopartikül uygulamasında daha yüksektir (Şekil 4.39) Elde edilen sonuçlar daha önce yapılan MTT hücre canlılığı testinde elde edilen sonuçları destekler niteliktedir ve hücre ölüm şeklinin apoptoz olduğunu kanıtlamıştır.

Apoptoz - LoVo

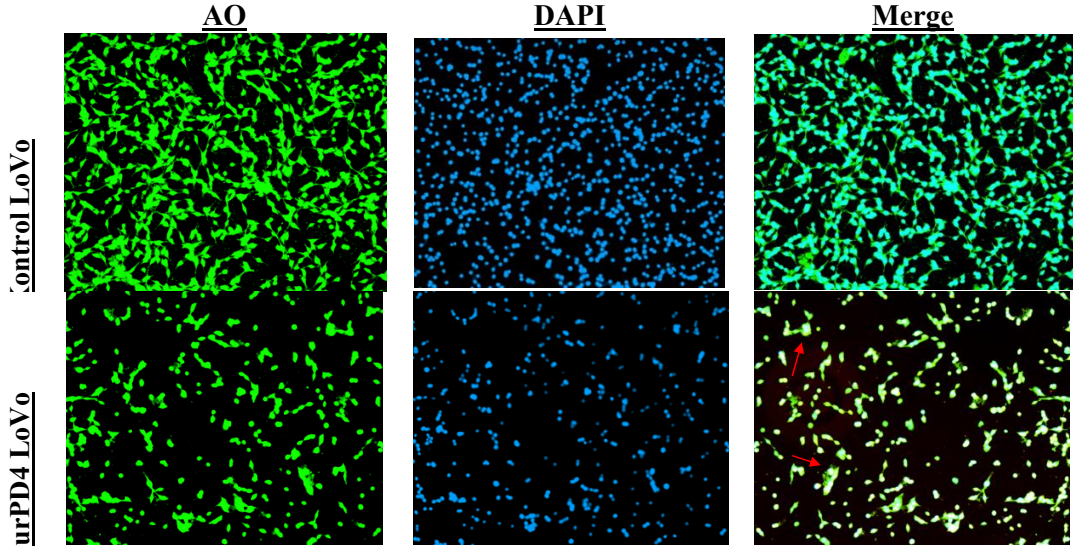


Şekil 4.39: LoVo hücre hattında 5-FU (500 uM), kurkumin, CurPD4, Kurkumin + 5 FU ve CurPD4 +5 FU uygulamasının neden olduğu canlılık ve apoptoz yüzdelерinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

4.3.3.2 DAPI boyama ve floresan mikroskop

DAPI boyası, hücrelerin çekirdek DNA'sına bağlanır, bu nedenle bir mikroskop aracılığıyla hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi amacıyla kullanılmıştır. Kolon kanser hücreleri kültür kapları içerisinde konflue olana kadar beklenmiş ve ardından tedavi (CurPD4) uygulanmıştır. Kontrol grubu ve tedavi grubu 48 saat inkübasyonun ardından %4 PFA ile fikse edilmiştir. Daha sonra hücreler 1 X AO ve DAPI ile boyandı ve inkübasyon süresinin ardından 1XPBS ile yıkanmıştır. Hücreler floresan filtreli bir mikroskop aracılığıyla (Zeiss, Axio Observer Z1) görüntülenmiş ve morfolojik olarak incelenmiştir.

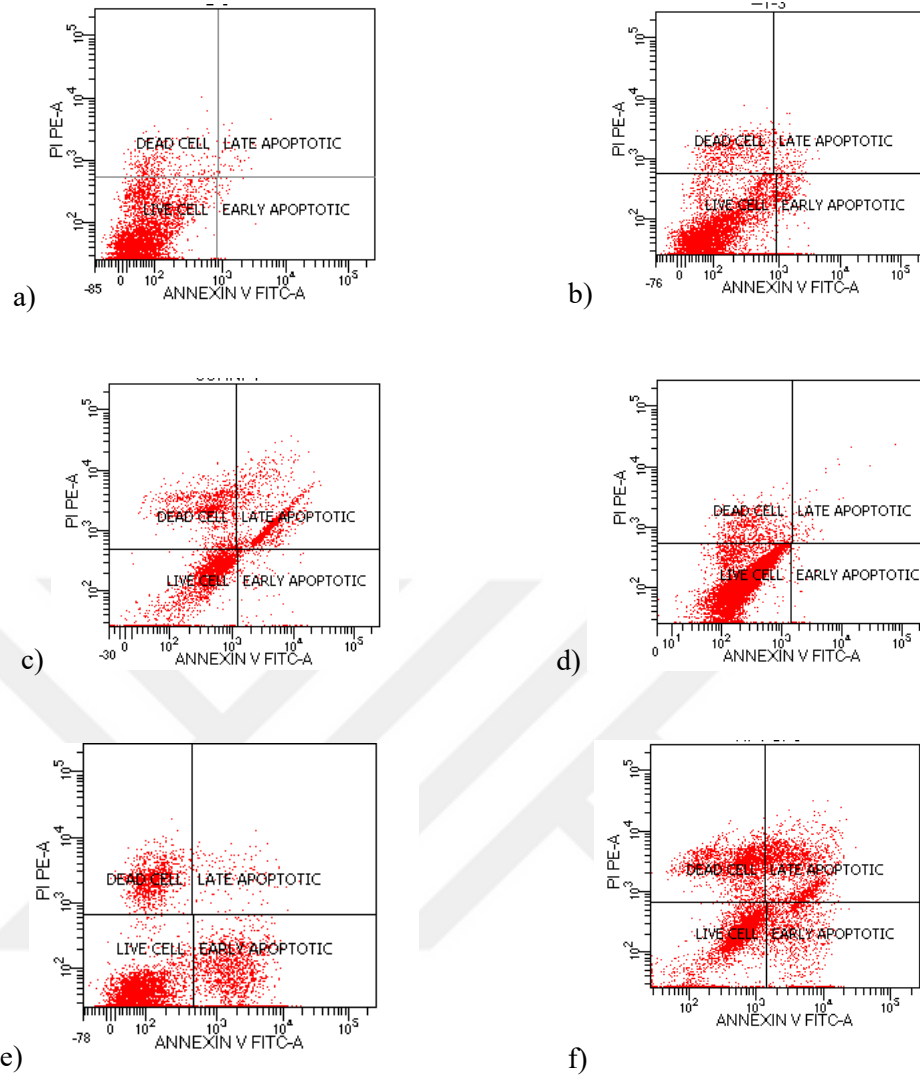
Nanopartikül uygulanan hücreler kontrole göre morfolojik değişiklikler göstermiştir. Hücre şekli bozulmuş ve boyut olarak daha küçük bir hale gelmiştir. Hücrelerin çekirdekleri yuvarlak, büyük ve homojen mavi renk ile boyanmıştır. Şekilde çizilen oklar, nükleer büzülme ve kromatin yoğunlaşmasının belirtilerini göstermektedir (Şekil 4.40).



Şekil 4.40: LoVo-Luc hücre hattında 48 saat CurPD4 uygulaması sonrası hücre morfolojisini değerlendirmek için yapılan AO ve DAPI boyama sonuçları.

4.3.3.3 Annexin V-FITC ve PI boyama

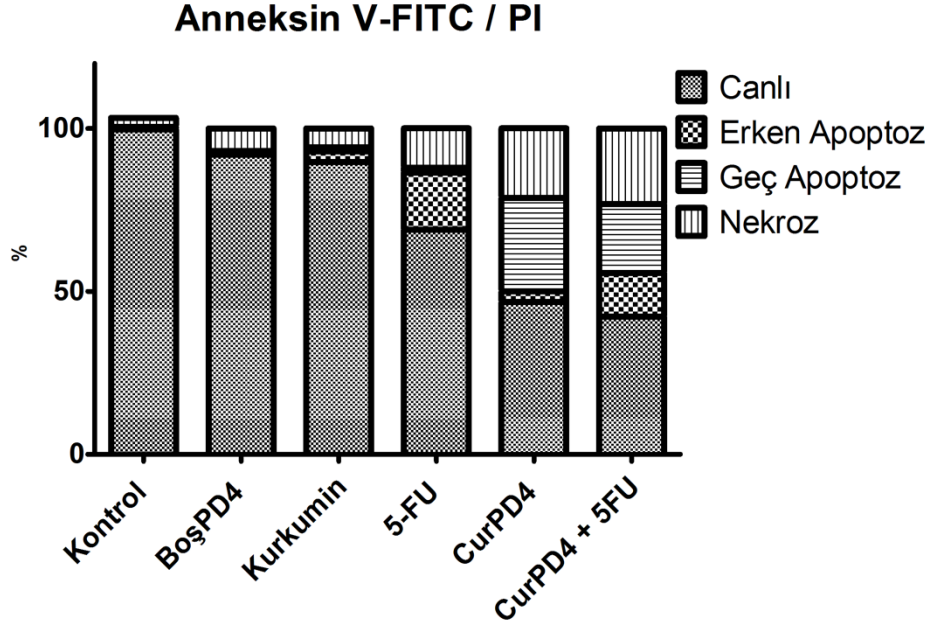
Apoptotik etkinin analizinde kullanılan yöntemlerden biri de Annexin V-FITC/PI akış sitometri yöntemidir. Bu nedenle kurkumin ve 5-FU tedavisinin, kurkumin yüklü nanopartikülün ve bunların eşzamanlı kombinasyonunun LoVo hücre hattının hücre ölümü üzerindeki etkilerini incelemek için 48 saatlik tedaviden sonra hücreler FITC bağlı Annexin-V ve PI boyası ile işaretlenmiş ve akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Akış sitometrisinde hücreler FITC-/PI- ise canlı, FITC+/PI- ise erken apoptotik, FITC+/PI+ ise geç apoptotik ve FITC-/PI+ ise nekrotik olarak kabul edilir. Deneyde ticari olarak satın alınan Annexin V-FITC/PI kiti (*EBioscience*) kullanılmıştır. Hücreler tripsin ile kaldırılmış ve epenporf tüpler içerisinde kit protokolüne uygun şekilde boyanmıştır. Numuneler akış sitometrisi cihazında (Becton Dickinson, FACS Canto II) ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$:488/525 nm) analiz edilmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.41 ve Şekil 4.42’de sunulmuştur.



Şekil 4.41: LoVo-Luc hücrelerinde 48 saatte a) Kontrol, b) Serbest kurkumin, c) CurPD4, d) BoşPD4, e) 5-FU, f) CurPD4 + 5-FU uygulamasının apoptotik etkisini gösteren Anneksin V-FITC/PI analizi sonuçları.

Annexin V-FITC/PI boyama ve akış sitometrisi, apoptotik hücrelerin yüzdesinin, CurPD4, 5-FU ve kombinasyon tedavileri ile 48 saatlik inkübasyondan sonra, kontrol grubu hücelere kıyasla önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Şekil 4.41). Kontrol grubunda önemli bir apoptoz oranına rastlanmamış ve canlı hücrelerin tüm hücelere oranı % 96.5 olarak saptanmıştır. Ayrıca nanopartikül toksisitesi ile ilgili sunulan MTT sonuçlarını destekleyecek nitelikte BoşPD4 NP'ün canlılık ve apoptoz oranları arasında kontrole göre fark bulunamamıştır ($p > 0.05$, ns). Bu da formülasyonun tek başına apoptozu indüklediğini ve hücre ölümüne yol açmadığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre CurPD4 NP + 5-FU kombinasyonu diğer gruplara göre daha yüksek bir apoptoz oranını (%34.6) indüklemiştir. Ayrıca kurkumin yüklü

nanopartikül (CurPD4, % 32.0) ile karşılaştırıldığında serbest kurkumin (% 4.5) ve 5-FU'in (%19.1) daha az apoptotik hücre oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.42).



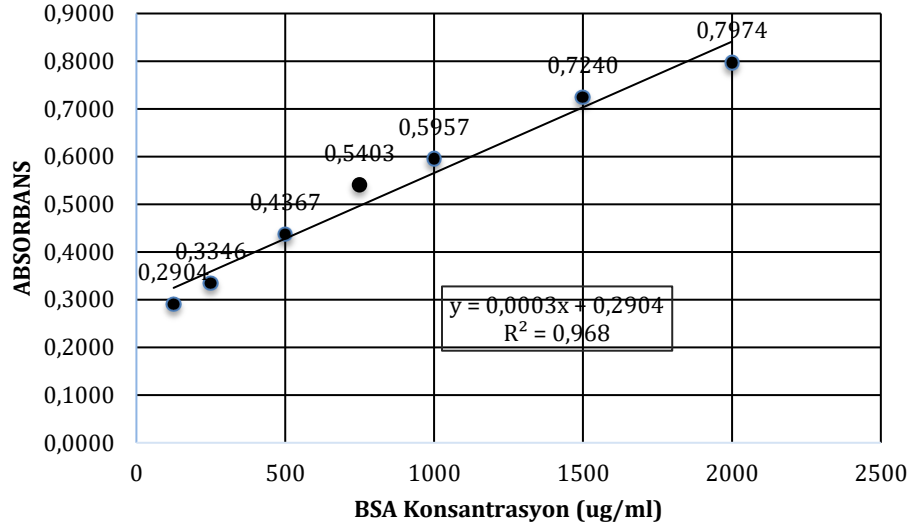
Şekil 4.42: LoVo-Luc hücre hattında 48 saat serbest kurkumin, CurPD4, BoşPD4, 5-FU ve CurPD4 + 5-FU uygulamasının canlılık, erken ve geç apoptoz yüzdelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

4.3.4 Western blot ile protein ekspresyonlarının hesaplanması

Western blot total protein karışımı içerisinde belirli bir proteinin miktarını kantitatif tayin edebilmeyi sağlayan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu çalışmada western blot analizi pro-apoptotik p53 proteininin ekspresyonunu belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

İlk olarak 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilen LoVo hücrelerine 250 ug/mL serbest kurkumin, CurPD4, BoşPD4, 500 uM 5FU, 250 µg/mL Kurkumin + 500 uM 5FU ve CurPD4+ 500 uM 5FU uygulanmış ve 48 saat boyunca 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ atmosferinde nemlendirilmiş ortamda inkübe edilmiştir. Bradford (Commasie blue G250) metodu ile proteinlerin miktar tayini yapılmıştır. Bunun için 595 nm’de 0-2000 µg/mL BSA standart solüsyonlarının absorbansı ölçülmüş ve absorbansa karşılık gelen protein konsantrasyonlarının grafiği çizilmiştir. Şekil 4.43’te sunulduğu gibi grafiğe ait R² değeri 0,968 olarak belirlenmiştir.

BSA STD



Şekil 4.43: Bradford ölçümü için kullanılan BSA standart grafiği.

Standart eğri grafiği kullanılarak hesaplanan kontrol ve tedavi gruplarına ait ekstrakte edilen protein konsantrasyonları tablo 4.10'da sunulmuştur. Böylece jeldeki her bir kuyucuğa kaç µL protein karışımı yükleneceği belirlenmiştir.

Tablo 4.10: LoVo-Luc hücrelerinden ekstrakte edilen kontrol ve tedavi gruplarına ait protein konsantrasyonları.

	Protein (ug/mL)	Std.sapma
Kurkumin 25 ug/mL	0,8177	± 0,0025
Kontrol	0,7815	±0,0073
5FU 500 uM	0,8190	±0,0108
Kurkumin + 5-FU	0,8174	±0,0179
BoşPD4	0,9083	±0,0370
CurPD4	0,8741	±0,0025
CurPD4 + 5-FU	0,8404	±0,0318

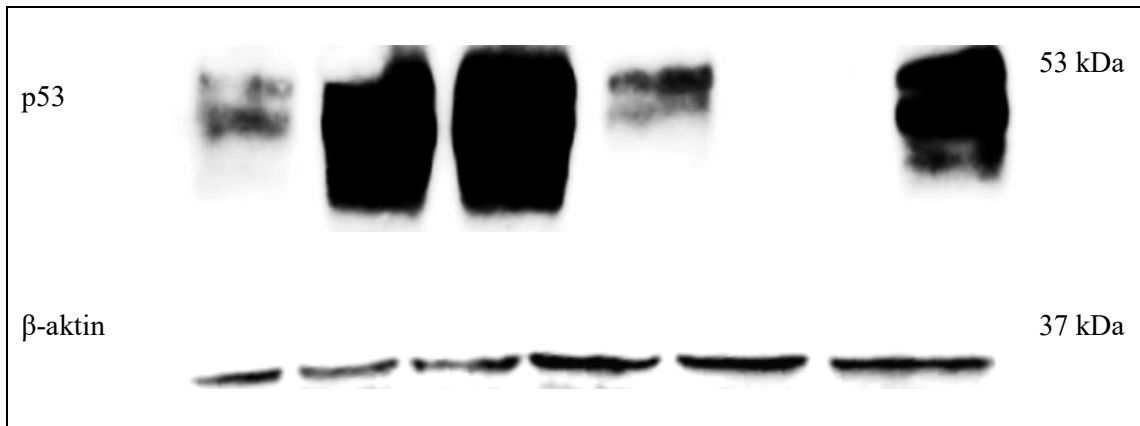
Bradford absorbans ölçümüne göre konsantrasyonları hesaplanan proteinler, SDS-PAGE jel elektroforezi için önceden hazırlanan jelin yükleme jeli kısmına her biri eşit miktarda olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez tankına yerleştirilen jeller 1X yürütme tamponu varlığında yürütülmüş, böylece proteinlerin boyutlarına göre ayrılması sağlanmıştır. Jel PVDF membrana aktarıldıktan sonra farklı zamanlarda tabloda (Tablo 4.11) belirtilen primer antikorlar ile gece boyunca muamele edilmiş,

ardından uygun sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda tutulmuştur. Housekeeping protein olarak β -aktin anti mouse primer antikorunu kullanılmıştır.

Tablo 4.11: Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

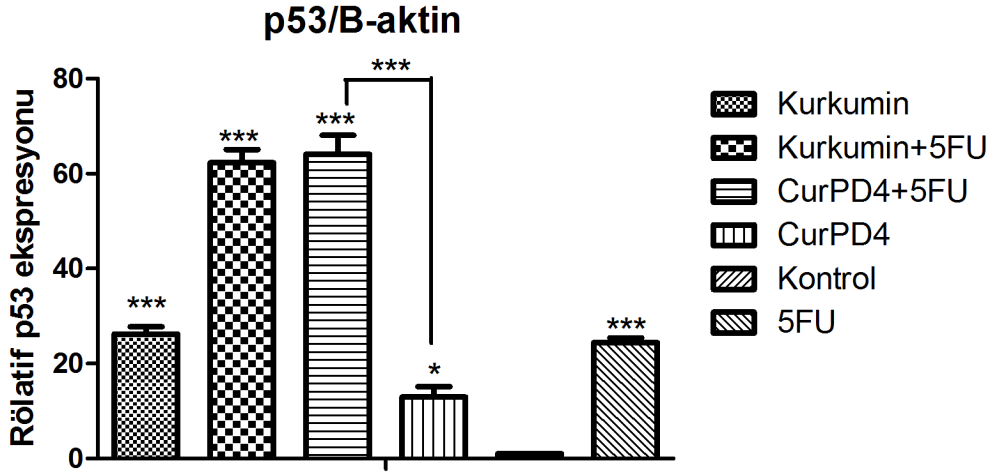
Primer Antikor	Dilüsyon Oranı	Sekonder Antikor	Dilüsyon Oranı
p53	1:500	Goat anti mouse IG-g HRP	1:1000
β -aktin	1:1000	Goat anti mouse IG-g HRP	1:1000

Membranlar antikorun kemi lüminesans sinyal oluşturmasını sağlayan ECL stok solüsyonları karışımında karanlıkta 5 dakika bekletilmiş ve bant görüntüleri (Vilbert Laumart Fusion Fx5) alınmıştır (Şekil 4.44). Housekeeping protein ve hedef proteinlerin bant yoğunluğunu ölçmek ve karşılaştırmak için Image J (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) görüntüleme analizi programı kullanılmıştır. Kontrole göre madde verilen grupların normalizasyonu ve anlamlılık hesaplamaları GraphPad prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı ile yapılmıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.44: p53 ve β -aktin protein ekspresyonlarına ait western blot bantları.

Western blot bantlarının analizi sonucundan p53 protein ekspresyonunun kontrole göre tüm deney gruplarında arttığı gösterilmiştir. Ayrıca NP ile 5-FU kombinasyon uygulaması sonucu protein ekspresyonu yalnızca NP uygulamasına göre anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.45: In vitro tekli ve kombine madde uygulamaları sonrası LoVo hücrelerinde gözlenen normalize edilmiş p53 protein ekspresyonu.

Yabancıl tip p53 kanserde saptanamayacak seviyede düşük, genellikle inaktif ve protein kompleks halindedir. Ancak hücre genotoksik strese maruz kaldığında çeşitli post translasyonel modifikasyonlar ile protein kompleksinden ayrılır ve hızlıca aktive olur [201]. Kanserde başarılı tedavi yöntemlerinin artmasına rağmen, ilaç direnci gelişimi kanser tedavisinde hala önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Çoklu ilaç direnci (MDR), tedavide başarısızlığa yol açarak kanserin ilerlemesine ve kötü prognoza sebep olur. Tümör ilaç direncinin mekanizmaları, ATP bağlama kaseti (ABC) taşıyıcılarının (örn. efflux) aşırı ekspresyonu, hatalı apoptotik mekanizmalar, interstisyel sıvı basıncı ve asidik/ hipoksik tümör mikro çevresi gibi hücrel ve fizyolojik faktörleri içerir. Apoptotik yoldaki hata, genellikle BCL-2 ve NF- κ B'nin düzenlenmesi ile ortaya çıkar ve kanser hücrelerinin apoptozdan kaçma ve hayatta kalma oranını arttırarak kanserde ilaç direnci oluşumuna vesile olur. BCL-2 kanserde aşırı eksprese olan anti-apoptotik bir proteindir ve ilaç direncinde etkili olması nedeniyle hedef protein olarak araştırılmaktadır. Öyle ki BCL-2 siRNA ve kemoterapötik ilacın birlikte yüklü olduğu PLGA NP tasarımları kanser ilaç direncini geriletmede başarılı olmuştur [202]. Ayrıca kurkumin gibi NF- κ B inhibitörleri NP içerisine yüklenerek kombinasyon tedavilerinde sıklıkla kullanılmıştır. Dirençli overyum kanseri tümörlerinde kurkumin ve paklitaksel yüklü polimerik misellerin ilaç direncini sinerjistik olarak tersine çevirerek anti tümör aktivite gösterdiği belirtilmiştir [203]. Anti-apoptotik proteinlerin inhibisyonu yanında, pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu yoluyla da ilaç direncine karşı tedavi arayışları sürdürülmektedir. Yapılan

çalışmalar önemli bir tümör baskılayıcı olan vahşi tip p53 proteini ekspresyonunun seramid ile geri kazanılmasının ilaca dirençli tümör modelleri ve ksenograftlarında terapötik etkinliği arttırdığını göstermektedir.

4.3.5 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) kombine tedavi ile artışı

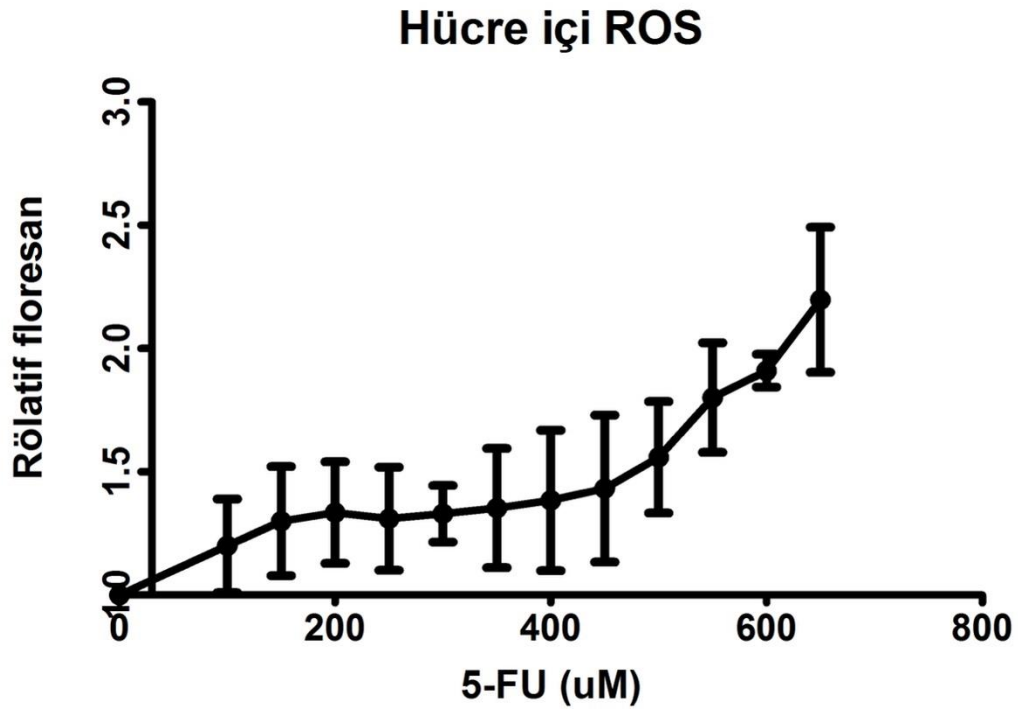
Reaktif oksijen türleri (ROS) canlı hücreler üzerinde kanıtlanmış hasarlara neden olur. Buna rağmen her hücrede belirli miktarda ROS üretimi vardır ancak kanser hücrelerinde özel olarak yüksek ROS düzeyi görülür. Bununla birlikte kemoterapi ilaçlarının pek çoğu, hücrelerdeki ROS düzeyini arttırarak hücrel DNA hasarını ve kanser hücrelerinin apoptoza yönelmesini sağlamaktadır. Yani oksidatif dengesizlik hem kanser hücrelerini öldürmede kullanılır hem de önemli hücrel protein ve lipid yapılarını hedef alarak mutasyona uğrama riskini arttırır [204].

Antioksidan moleküller (dışarıdan alınan) ve antioksidan enzimler (endojen) hücrel ROS düzeyini azaltıcı yönde işlev gösterirler. Ancak genellikle eksojen antioksidan olarak bilinen fitokimyasal bileşikler yüksek dozlara çıkıldığında ve ortamda serbest demir / bakır varlığında pro-oksidan özellik göstermektedirler. Hücrelerdeki antioksidan mekanizmalar ve üretilen serbest radikaller arasında oksidanlar yönüne doğru bir dengesizlik olması durumunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmış olduğu gözlenir. Aşırı ROS kolayca H₂O₂'ye dönüştürülür, bu da hücreler arası zarlara kolayca yayılır ve demir katalizli fenton reaksiyonu yoluyla yüksek oranda reaktif ve toksik hidroksil radikaller üretir. Hidroksil radikalleri hücreler ve diğer biyomoleküller üzerinde, sonuç olarak da organizmada olumsuz etkilere yol açmaktadır [205].

Kurkumin, DNA ve membran hasarından sorumlu olan hidroksil radikalleri dahil olmak üzere ROS oluşumunu engelleyen fenolik bir antioksidan maddedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterir. Bu seçici anti proliferatif aktivitenin sebebi olarak ROS aracılı pro-oksidan etki ortaya konmaktadır [204]. 2',7'-diklorofloresin (DCF) ve türevleri, hücre bazlı deneylerde ROS oluşumunun floresan göstergesi olarak sıklıkla kullanılır. Buna karşın, hücre içi mikroskobik analiz için DCF problemlerinin kullanımında fotostabilite ve probun dışarı atılması gibi çok sayıda zorluk söz konusudur. Floresan problemler ile ROS saptanması için mikroskopi, plaka spektroskopisi veya akış sitometrisi kullanılabilir, buna karşın mikro plaka ile yapılan analizler verim, maliyet, optimizasyon ve analiz süresi açısından avantajlıdır [206].

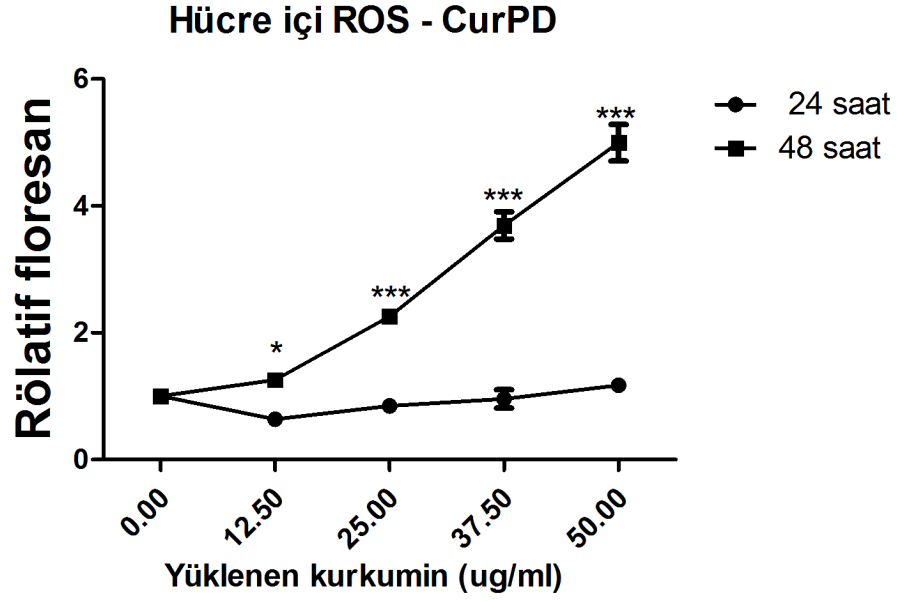
Bu çalışmada kolorektal kanser hücre hattında ortaya çıkan hücre içi ROS düzeyleri değerlendirilmiştir. ROS düzeylerini karşılaştırabilmek için indirgenmiş floresan

özelliik gösteren hücre geçirgen bir prob ($H_2DCFH-DA$ dikloro floreskein diasetat) kullanıldı [162]. Hücreler üzerine değişen konsantrasyonda 5-FU ve kurkumin yüklü nanopartikül uygulandı. Daha sonra 24 ve/veya 48 saat inkübasyonun ardından floresan ölçüm alındı. $H_2DCF-DA$, ROS oluşumu ile yüksek oranda yeşil floresan diklorofloreseine (DCF) indirgenmektedir. Bu nedenle yüzde $H_2DCFHDA$ inhibisyonu sonuçları MTT hücre sağ kalımı sonuçlarıyla oranlanıp hücre başına relatif floresan olacak şekilde hesaplanmış ve Şekil 4.48, Şekil 4.49’da sunulmuştur.



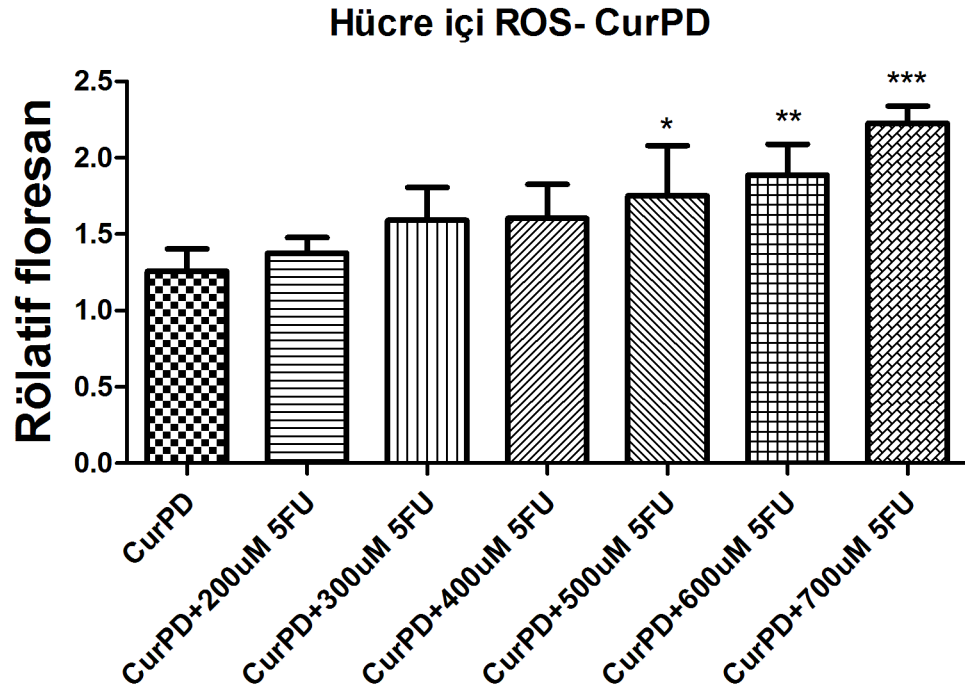
Şekil 4.46: Kolon kanseri hücrelerinde 24 saat uygulanan artan 5-FU konsantrasyonu (0-700 μM) ile hücrel ROS oluşumu artmaktadır.

Rölatif floresan kanser hücrelerinde 5-FU maruziyetinden sonra istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış (0-700 μM , $p < 0.001$) ve ROS üretimini konsantrasyona bağlı bir şekilde indüklenmiştir (Şekil 4.48).



Şekil 4.47: Kolon kanseri hücrelerinde 24 ve 48 saatlik ROS miktarı: PLGA DSPE hibrit nanopartikül içerisine enkapsüle edilen kurkumin miktarının artması ile hücre içi ROS düzeyleri artmaktadır.

Farklı dozlarda kurkumin uygulanan kolon kanser hücrelerinde doza bağlı ROS üretiminde artış gözlenmektedir. Maruziyet süreleri karşılaştırıldığında 48 saatteki ROS oluşumu 24 saate göre belirgin şekilde yükselmiştir (Şekil 4.49).



Şekil 4.48: Kurkumin yüklü nanopartikül (CurPD4) ve çeşitli dozlarda 5-Fluorourasil kombinasyon tedavisinin kanser hücreleri üzerindeki ROS oluşumuna etkisi.

Kolon kanseri hücre hattına 24 saat boyunca kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit nanopartikül ve farklı dozlarda 5-FU uygulamasının ardından kontrole göre ROS üretiminde artış gözlenmiştir. Buna göre 500 uM 5-FU ve üzeri dozlarda, CurPD4 NP'e oranla anlamlı şekilde rölatif floresan artışı gözlenmiştir (Şekil 4.50).

4.3.6 Nanopartiküllerin hücre içine giriş üzerine etkisi

Küçük moleküllerin hücrelere girmesinin ana yollarından biri pasif difüzyondur. Lipofilik bir ilaç olan kurkumin de kolayca hücre membranından difüze olabilir ancak *in vivo* sulu ortam koşullarında biyoyararlanımı son derece düşüktür. Ancak kurkumin'in hücrel toksisitesi ve hücre içi yolaklara etki edebilmesi, hücrel alımı ile ilişkilidir. Bu nedenle nanopartiküller kullanılarak, hedef bölgede ilaç salımı ve/veya temas edilen hücrelere doğrudan ilaç transferi yoluyla hedef hücrede ilaç birikimi sağlanması amaçlanmaktadır [207].

Farklı nano formülasyonların karşılaştırıldığı hücre içine alım çalışmasının sonucuna göre en yüksek hücre içi ilaç seviyesinin lipozom ve polimerik nanopartiküller ile sağlandığı ancak bu nano taşıyıcıların klatrin aracılı endositoz ile hücre içerisine alınmadığı öne sürülmektedir. Ancak bu sonuçlar değerlendirilirken kullanılan tüm nano taşıyıcıların 200 nm üzerinde bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğu göz ardı edilmemelidir. Sonuç olarak yeni tasarlanan PLGA-DSPE hibrit nano taşıyıcı sistemin hücre içine alım ve hücre içi kurkumin birikiminin gösterilmesi önemlidir.

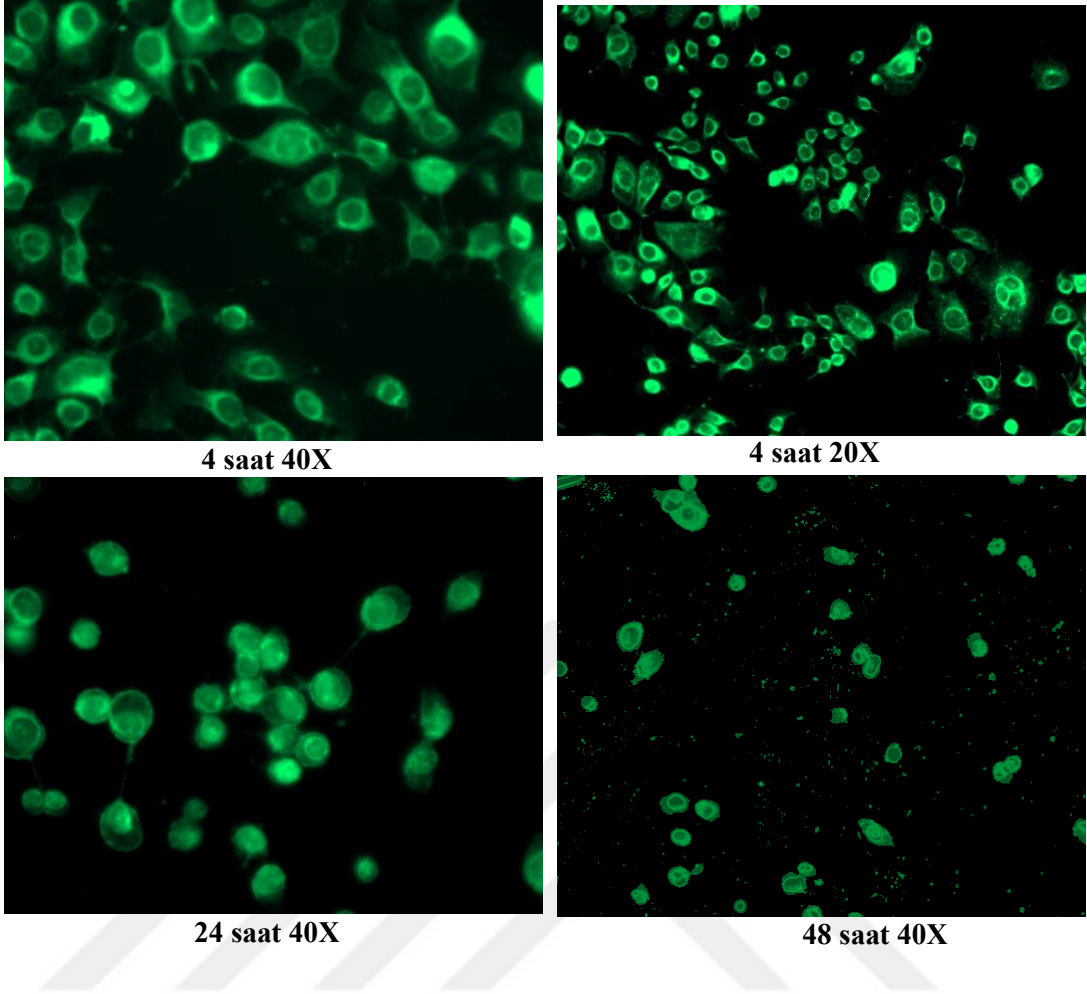
Kurkumin yüklü PLGA nano partiküllerinin, meme kanseri ve ovaryum kanseri hücre hatları tarafından hücre içine alımı serbest kurkumine kıyasla sırasıyla 6 ve 2 kat arttırdığı gösterilmiştir [199]. Bunun için hücre içine alımı karşılaştırmak amacıyla serbest kurkumin, PLGA-kurkumin NP ve CurPD4 uygulanan hücrelerde inkübasyon sürelerinin ardından oluşan floresan emisyonun yoğunluğu karşılaştırıldı. PLGA-kurkumin NP'lerini HeLa servikal kanser hücrelerinde uygulayan bir çalışmada Nair ve ark. suda veya DMSO'da çözülen kurkumine kıyasla NP içerisindeki kurkumin'in hücrel alımının daha yüksek olduğunu göstermiştir [198]. Bu bulgular *in vivo* kurkumin iletimi için nanopartikül stratejisinin etkili olduğunu ve organik çözücü kullanımına kıyasla kurkumin'in düşük biyoyararlanımını daha fazla arttırdığını göstermektedir.

Kurkumin hücrel alım profillerini incelemek için kullanılabilen belirli dalga boylarında doğal bir floresan ışımaya sahiptir [208]. Bu oto floresan özellikten yararlanılarak kurkumin ve nano enkapsüle kurkuminin hücre içine girişleri görsel

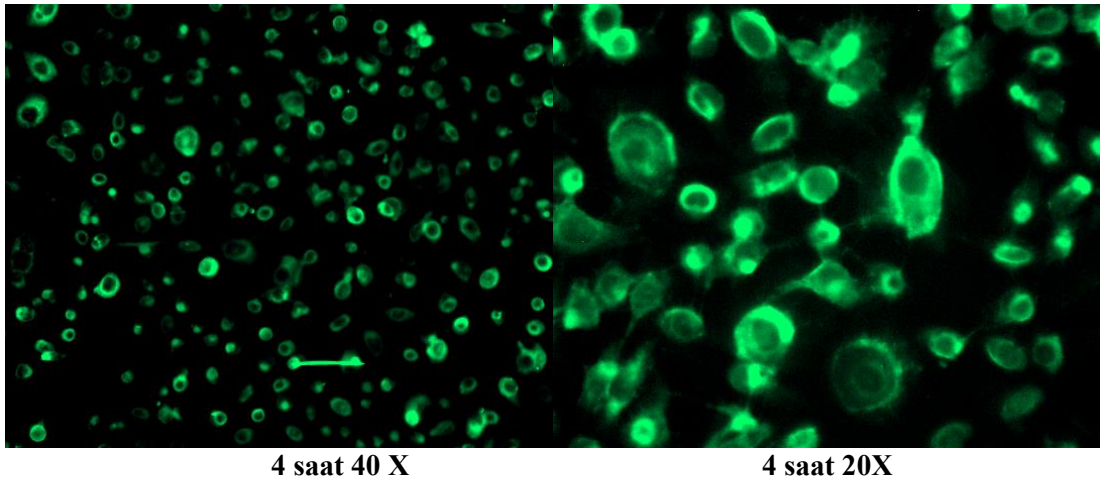
olarak değerlendirildi ve kalitatif olarak karşılaştırıldı. Hücreler %80 konfluansa ulaştığında madde uygulaması yapıldı ve inkübasyona bırakılmıştır. Serbest kurkumin 250 µg/mL olacak şekilde %1 DMSO ile çözülüp besi yeri ile seyreltilirken, CurPD4 içerisine 250 µg/mL kurkumin yüklenmiştir. Buna karşın PLGA-kurkumin nanopartikülün maksimum kurkumin taşıma kapasitesi 125 µg/mL dir. Farklı zaman aralıklarında (4, 24 ve 48 saat) inkübe edilen hücreler dPBS ile iki defa yıkandı ve floresan mikroskop (Zeiss, Axio Observer Z1) kullanılarak floresan ışınları incelendi. Kurkumin ve nano enkapsüle kurkuminin LoVo hücrelerindeki kademeli alım mekanizması ve lokalizasyonu hakkında toplanan sonuçlar Şekil 4.51'de sunulmuştur.

DMSO içerisinde çözüldürülen serbest kurkumin lipofilik bir ilaç olduğundan pasif difüzyon yoluyla hücre membranından geçerek hücre içerisine iletilmektedir. Buna karşın nanotaşıyıcılarda kapsüllenmiş ilaçların, klattrin aracılı endositoz yoluyla hücrelere alındığı bildirilmiştir [208]. Endositoz yolu, pasif difüzyon yoluna göre daha düşük ve daha yavaş ilacı hücrelere verme gücüne sahiptir [207]. Bu nedenle serbest kurkumin uygulamasının ardından floresan ışığın 4 saat sonra hücre zarında yoğunlaştığı ve 24 saat sonra hücrelerin iç bölümlerine ve hücre zarı çevresine yerleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.51). Floresan yoğunluğun 24 saatte özellikle hücre membranı çevresinde lokalize halde doyunluğa ulaştığı ve 48 saat sonunda ışımının azaldığı gözlenmiştir [209, 210]. Sonuç olarak kurkumin'in daha yüksek hücresel alıma sahip olduğu ancak floresan ışımının daha hızlı kaybolduğu gözlemlendi. Bunun aksine Ucisik ve Kupcu [210] tarafından da bildirilen sonuçları destekleyecek nitelikte nanopartikül ile muamele edilen gruplarda floresan yoğunluğun zamanla yükseldiği ve 48 saatte hiç solma olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum nano taşıyıcının benzer şekilde lipid iç kısmına dahil edilen kurkuminin kademeli salımı ile açıklanmıştır [211].

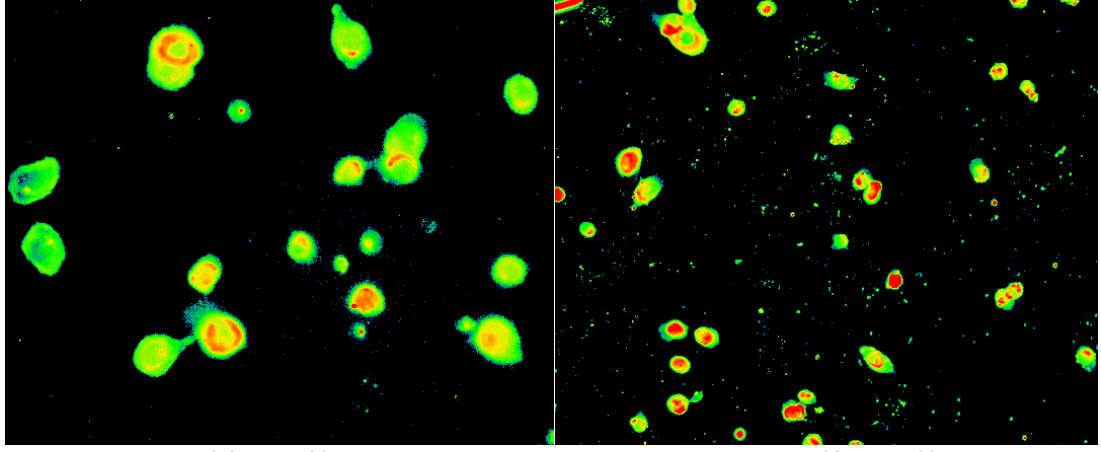
a) Kurkumin 250 ug/mL



b) CurPD4 NP



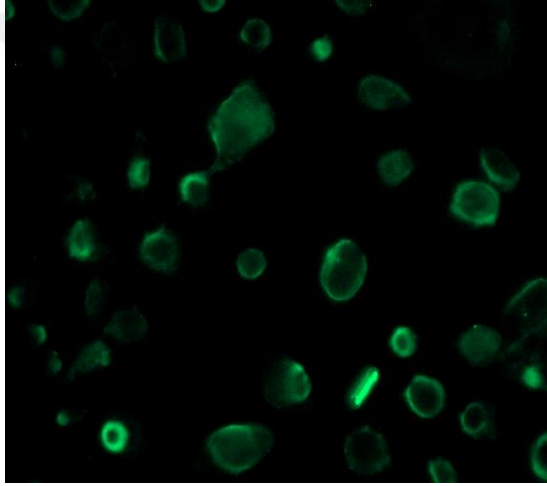
Şekil 4.49: a) Serbest kurkumin, b) CurPD4 ve c) PLGA-kurkumin NP uygulaması sonrası LoVo hücreleri tarafından kurkumin'in hücre içine alımı.



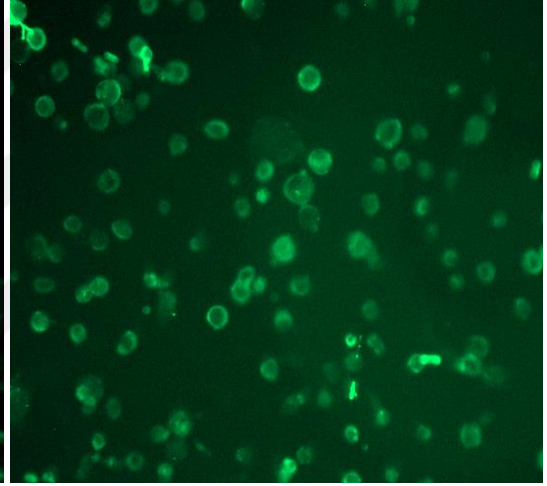
24 saat 40X

48 saat 40X

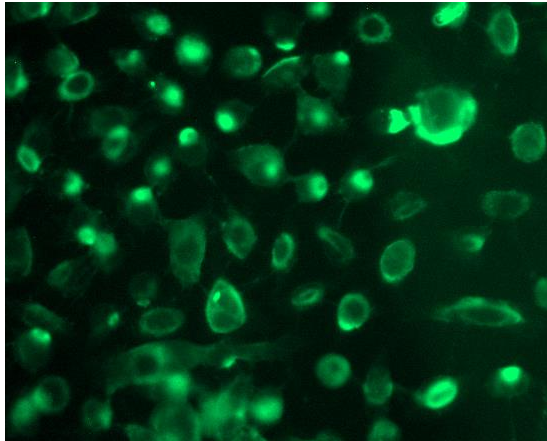
c) CurPLGA NP



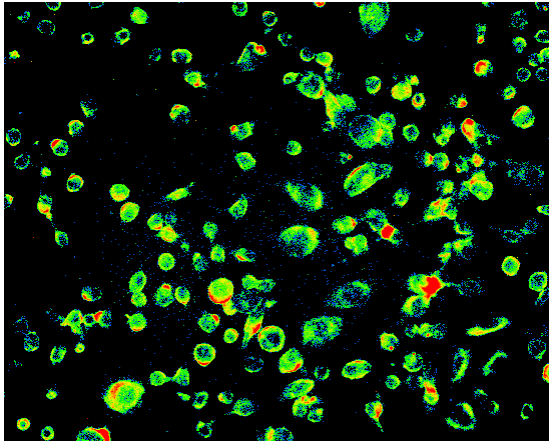
4 saat 40 X



4 saat 20X



24 saat 40X



48 saat 40X

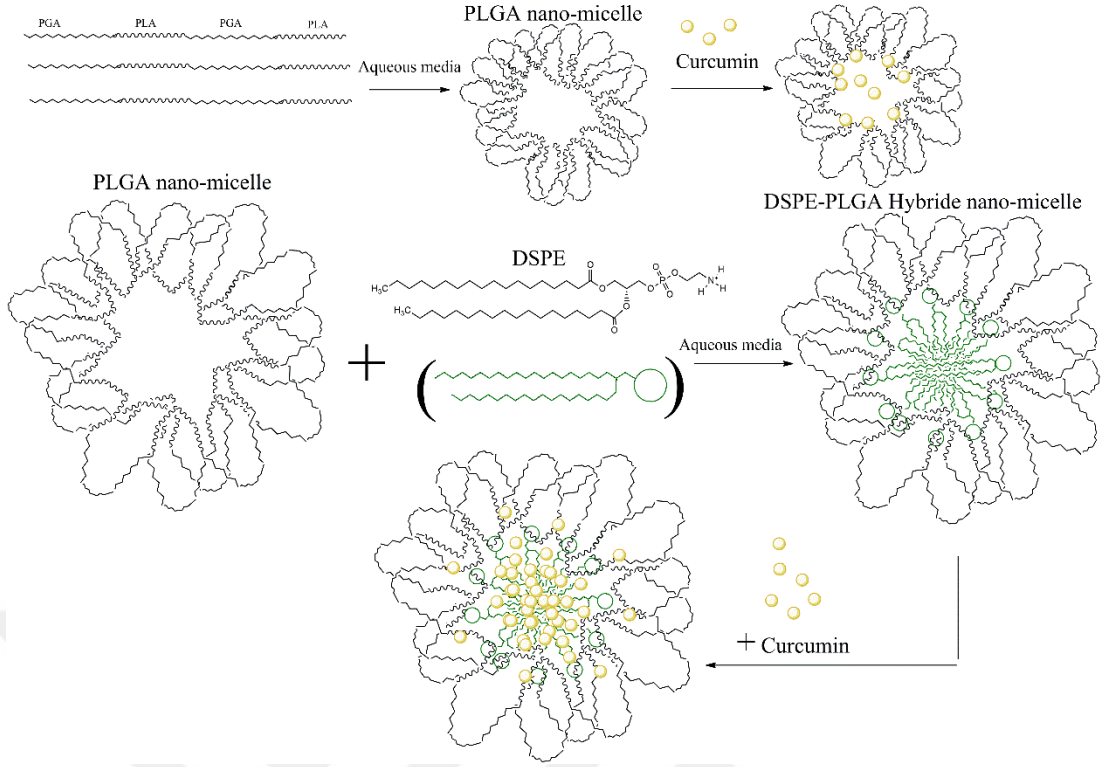
Şekil 4.49 (devam): a) Serbest kurkumin, b) CurPD4 ve c) PLGA-kurkumin NP uygulaması sonrası LoVo hücreleri tarafından kurkumin'in hücre içine alımı.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma halen kemoterapi yan etkileri ve direnç gelişimi gibi nedenler ile tam bir başarı sağlanamayan kolon kanserine yönelik yenilikçi tedavi yaklaşımlarının bir örneğidir. Anti kanser etken madde kurkuminin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin getirdiği sınırlamaların üstesinden gelmek için özgün bir hedefe yönelik nano ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiş ve başarıyla hazırlanmıştır. Bunun için FDA onaylı PLGA polimeri ve nano taşıyıcının hidrofobitesini arttıracak lipid yapılı DSPE (1,2-Distearoil-sn-glisero-3-fosfotidiletanolamin) molekülü kullanılarak kurkumin yükleme kapasitesinin artacağı hibrit bir nano-partikül formülasyonu elde edilmiştir [125, 212]. PLGA polimeri ve lipid yapılı DSPE'den oluşan hibrit nano misel, hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemleri arasında hem lipid hem de polimerik nano parçacıkların özelliklerini birlikte karşılamasından ötürü yarar sağlar. Bu nedenle yapılan çalışma ile hedefe yönelik kanser tedavisinde üstün özelliklere sahip ancak fiziksel kısıtlılıkları nedeniyle hedefe yeterli dozda ulaşamayan ve maksimum verimlilik gösteremeyen kurkumin molekülünün kolon kanseri tümör bölgesinde biyolojik etkinliğini gözlemleyebilmek için mevcutta sıklıkla kullanılan polimerik miselin ilaç yükleme kapasitesi arttırılmıştır.

Tez çalışmasının ilk kısmında yüksek miktar kurkumin taşıyan ve hedef bölgeye ulaştıran, 300 nm'den küçük, monodispers ve stabil polimer-lipid hibrit nano ilaç taşıyıcı sistemin hazırlanması ve karakterizasyonu için en uygun yöntem belirlenmiştir. Formülasyon bileşenlerinin seçiminde hesaplamalı moleküler modelleme çalışmaları ve literatür araştırması belirleyici olmuştur. Buna göre kurkumin ile PLGA ve DSPE arasında güçlü bağlanma enerjileri olduğu ve PLGA zincir moleküllerinin bir arada kalmayı tercih ettiği gösterilmiştir. İstenilen partikül boyutu (<300nm), negatif yüzey yükü ve % 92 oranında enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu karakterizasyon çalışmaları ile belirlendikten sonra, formülasyonun lipid film oluşturma - önceden hazırlanmış PLGA nanopartikül ile rehidrate etme tekniği kullanılarak hazırlanmasına karar verilmiştir. Nitekim elde edilen karşılaştırmalı sonuçlara göre PLGA tek başına, DSPE ile birleştirilmeden 5mg kurkumin taşıyamamış, agregat oluşumu ve polidispers partikül boyutu ile karşılaşmıştır. Buna karşın hibrit nano partikül içerisine yüklenen 5 mg kurkumin parçacık boyutunda ve PDI'da belirgin bir değişikliğe yol açmamıştır. Elde edilen yapısal karakterizasyon sonuçlarına göre (DLS, FT-IR ve DSC analizleri) kurkumin yüklü hibrit

nanopartikülün amfifilik bir polimer olan PLGA'nın (*Poli (laktik-ko-glikolik asit)*) hidrofobik kısımlarından meydana gelen çekirdek içerisinde etken maddeyi taşıdığı gösterilmiştir. Lipid yapıdaki DSPE'nin de sulu ortamda miselin çekirdeği ve çevresinde birikim gösterdiği ve hidrofobik ilacın tutulma yüzeyini arttırdığı tahmin edilmiştir. Yeni hazırlanan polimer - lipid miselin kritik misel konsantrasyonu (7.57×10^{-4} mg/mL) in vitro veya in vivo olarak seyreltilmesi durumunda parçacıkların bir arada kalmasını sağlayabilecek örnek bir değer olarak bulunmuştur. Stabilité çalışmaları ile hibrit nano misellerin enkapsülasyon oranınının 7 gün içinde belirgin olarak düştüğü ancak liyofilize edilen formülasyonda rehidratasyon sonrası madde miktarının değişmediği belirlenmiştir ($p > 0,05$, ns). Bu nedenle yeni hazırlanan PLGA-DSPE misellerinin istenen raf ömrünü sağlamada en uygun yöntemin liyofilizasyon ve rehidratasyon olduğu sonucuna varılmıştır. Kurkumin ile nano taşıyıcı arasında kuvvetli bir birleşme olduğunu gösteren bir diğer durum da kurkumin yüklenmesi ile -19,7 mV olan yüzey yükünün -9,40 mV'a, parçacık boyutunun ise 154,8 nm'den 119,8 nm'ye düşmüş olmasıdır. Ayrıca polimerin hidrofobik kısmı ile etkileşen lipid zincir yapıdaki DSPE iç kısma yerleşmekte ve nanopartikülden ilaç salımını etkilemektedir. Film oluşturma- rehidratasyon yöntemi ile hazırlanan hibrit nano miselin salım kinetiği PLGA nano misel ile aynı bulunmuştur. Elde edilen grafiklere göre her ikisi de Korsmeyer–Peppas modeline en çok uymakta yani polimerik nano miselin su alarak şişmesi ilaç salımını kontrol etmektedir. Nitekim hazırlanan formülasyon bu özelliği ile de hedefli kanser tedavisinde kullanılmaya uygundur. Hibrit nano partiküle ait tahmini yapı Şekil 5.1'de şematik olarak gösterilmiştir. En dış katmanda PLGA polimerinin hidrofilik kısımları çekirdek dışına çıkmıştır ve nanopartikülün stabilizasyonuna hizmet etmektedir. Buna karşın solvent evaporasyon yöntemi ile yalnızca PLGA ile oluşturulan nano miseller daha gevşek bir yapıdadır ve daha hızlı ilaç salımı yapmaktadır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Kurkumin yüklü PLGA NP ve Kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit NP'ün kendiliğinden bir araya gelerek oluşumunun şematik gösterimi.

Tezin ikinci kısmında hazırlanan ve karakterizasyonu tamamlanan nano formülasyonun *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile kolon kanseri hücrelerindeki sitotoksik, apoptotik ve 5-FU ile kombinasyon halindeki sinerjistik etkinliği incelenmiştir. Sentezlenen PLGA-DSPE nano misel ile daha önceki formülasyonda taşınan kurkumin miktarı iki kat (250 ug/mL) arttırılmıştır. Böylece vücutta dağılan ve tümör bölgesinde tutulan kurkumin miktarının yüksek olması sağlanmıştır [10]. Kurkumin yüklü nano misel uygulanan kolon kanseri hücrelerinde canlılığın başarılı şekilde düşürüldüğü ve sağlıklı hücrelere kıyasla hedef hücrelerin daha yüksek hassasiyete sahip olduğu gösterilmiştir.

Uygulanan nano malzemelerin ve hazırlama yaklaşımının özellikleri, sonuçta ortaya çıkan nano partiküllerin fizikokimyasal özelliklerini sadece boyutları, stabilitesi, ilaç kapsülleme ve salımları değil, aynı zamanda bir ilaç taşıyıcısı olarak biyolojik performansları açısından yönetir. Bu nedenle, dikkatli nano parçacık tasarımı, güvenli ve etkili ilaç dağıtımının istenen hedeflerine ulaşmanın anahtarıdır. Hazırlanan hibrit sistem kurkumin'in kanser tümör bölgesinde yüksek dozda birikmesini sağlamış böylece *intravenöz* uygulama yoluyla kanser hücrelerinin kemorezistansını azaltma potansiyeli göstermiştir. Yapılan *in vitro* deneyler neticesinde kurkumin yüklü nano

partikül ile kemoterapi ajanı 5-FU kombinasyon halinde kullanıldığında apoptoz oluşumunun ve ROS üretiminin tekli tedavi gruplarına göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Kurkumin, kanser hücrelerinde kemoterapi ajanları tarafından arttırılan nükleer Faktör kappa B (Nf-kB) seviyelerinin inhibe edilmesi de dahil olmak üzere çok yönlü biyoaktivitelere sahip doğal bir moleküldür. Bizim çalışmamızda ise hücre kültürü deneyleri ile 5-FU kullanımı sonucu oluşan p53 ekspresyonlarındaki artışın kurkumin yüklü nano misel ile nasıl baskılandığı başarılı şekilde gösterilmiştir. Her ne kadar *in vitro* sonuçlar hibrit nano formülasyonun başarısı hakkında fikir oluşmasını sağlasa da biyolojik sistemdeki davranışını öngörebilmek için *in vivo* hayvan deneyleri ile çalışmanın desteklenmesi planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Fedewa, S. A., Butterly, L. F., Anderson, J. C., ve ark. (2020). Colorectal cancer statistics, 2020.
- [2] Cardoso, R., Guo, F., Heisser, T., Hackl, M., Ihle, P., De Schutter, H., ve ark. (2021). Colorectal cancer incidence, mortality, and stage distribution in European countries in the colorectal cancer screening era: an international population-based study. *Lancet Oncol*, 22(7), 1002-1013.
- [3] Liu, Z., Huang, P., Law, S., Tian, H., Leung, W. ve Xu, C. (2018). Preventive Effect of Curcumin Against Chemotherapy-Induced Side-Effects. 9(1374).
- [4] Markowitz, S. D. ve Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361(25), 2449-2460.
- [5] Klotz, H. P., Weder, W. ve Largiadèr, F. (1994). Local and systemic toxicity of intra-hepatic-arterial 5-FU and high-dose or low-dose leucovorin for liver metastases of colorectal cancer. *Surgical Oncology*, 3(1), 11-16.
- [6] Suetsugu, T., Mori, R., Futamura, M., Fukada, M., Tanaka, H., Yasufuku, I., ve ark. (2021). Mechanism of acquired 5FU resistance and strategy for overcoming 5FU resistance focusing on 5FU metabolism in colon cancer cell lines. *Oncol Rep*, 45(4).
- [7] Tan, B. L. ve Norhaizan, M. E. (2019). Curcumin Combination Chemotherapy: The Implication and Efficacy in Cancer. *Molecules*, 24(14).
- [8] Howells, L. M., Sale, S., Sriramareddy, S. N., Irving, G. R., Jones, D. J., Ottley, C. J., ve ark. (2011). Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 129(2), 476-486.
- [9] Newman, D. J. ve Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75(3), 311-335.
- [10] Shen, L., Liu, C.-C., An, C.-Y. ve Ji, H.-F. (2016). How does curcumin work with poor bioavailability? Clues from experimental and theoretical studies. *Scientific Reports*, 6(1), 20872.
- [11] Dei Cas, M. ve Ghidoni, R. (2019). Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential. *Nutrients*, 11(9).
- [12] Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A. ve Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*, 4(6), 807-818.
- [13] Bahrami, B., Hojjat-Farsangi, M., Mohammadi, H., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Yousefi, M. ve Jadidi-Niaragh, F. (2017). Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunology Letters*, 190, 64-83.
- [14] Khaliullin, T., Fatkhutdinova, L. M., Zalyalov, R., Kisin, E., Murray, A. ve Shvedova, A. (2015). In vitro toxic effects of different types of carbon nanotubes. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 98, 012021.
- [15] Bahadori, F., Kocyigit, A., Onyuksel, H., Dag, A. ve Topcu, G. (2017). Cytotoxic, Apoptotic and Genotoxic Effects of Lipid-Based and Polymeric Nano Micelles, an In Vitro Evaluation. *Toxics*, 6(1).
- [16] Eskandari, Z., Bahadori, F., Yenigun, V. B., Demiray, M., Eroglu, M. S., Kocyigit, A. ve Oner, E. T. (2021). Levan enhanced the NF-kappaB suppression activity of an oral nano PLGA-curcumin formulation in breast cancer treatment. *Int J Biol Macromol*, 189, 223-231.
- [17] Shaikh, J., Ankola, D. D., Beniwal, V., Singh, D. ve Kumar, M. N. (2009). Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), 223-230.
- [18] Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maitra, A. ve Maitra, A. (2007). Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 5(1), 3.

- [19] **Pillai, O. ve Panchagnula, R.** (2001). Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 5(4), 447-451.
- [20] **Hartmann, K. U. ve Heidelberger, C.** (1961). Studies on fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidylate synthetase. *J Biol Chem*, 236, 3006-3013.
- [21] **Longley, D. B., Harkin, D. P. ve Johnston, P. G.** (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews Cancer*, 3(5), 330-338.
- [22] **Yang, C. L., Liu, Y. Y., Ma, Y. G., Xue, Y. X., Liu, D. G., Ren, Y., ve ark.** (2012). Curcumin blocks small cell lung cancer cells migration, invasion, angiogenesis, cell cycle and neoplasia through Janus kinase-STAT3 signalling pathway. *PLoS One*, 7(5), e37960.
- [23] **Mansouri, K., Rasoulpoor, S., Daneshkhah, A., Abolfathi, S., Salari, N., Mohammadi, M., ve ark.** (2020). Clinical effects of curcumin in enhancing cancer therapy: A systematic review. *BMC Cancer*, 20(1), 791.
- [24] **Lev-Ari, S., Vexler, A., Starr, A., Ashkenazy-Voghera, M., Greif, J., Aderka, D. ve Ben-Yosef, R.** (2007). Curcumin augments gemcitabine cytotoxic effect on pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Invest*, 25(6), 411-418.
- [25] **Bimonte, S., Barbieri, A., Palma, G., Luciano, A., Rea, D. ve Arra, C.** (2013). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *BioMed research international*, 2013, 810423.
- [26] **Sasaki, H., Sunagawa, Y., Takahashi, K., Imaizumi, A., Fukuda, H., Hashimoto, T., ve ark.** (2011). Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 34(5), 660-665.
- [27] **Li, L., Braiteh, F. S. ve Kurzrock, R.** (2005). Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer*, 104(6), 1322-1331.
- [28] **Kanai, M., Imaizumi, A., Otsuka, Y., Sasaki, H., Hashiguchi, M., Tsujiko, K., ve ark.** (2012). Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 69(1), 65-70.
- [29] **Kanai, M., Otsuka, Y., Otsuka, K., Sato, M., Nishimura, T., Mori, Y., ve ark.** (2013). A phase I study investigating the safety and pharmacokinetics of highly bioavailable curcumin (Theracurmin) in cancer patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 71(6), 1521-1530.
- [30] **Saha, S., Adhikary, A., Bhattacharyya, P., Das, T. ve Sa, G.** (2012). Death by design: where curcumin sensitizes drug-resistant tumours. *Anticancer Res*, 32(7), 2567-2584.
- [31] **Ferguson, J. E. ve Orlando, R. A.** (2015). Curcumin reduces cytotoxicity of 5-Fluorouracil treatment in human breast cancer cells. *J Med Food*, 18(4), 497-502.
- [32] **Irving, G. R., Iwuji, C. O., Morgan, B., Berry, D. P., Steward, W. P., Thomas, A., ve ark.** (2015). Combining curcumin (C3-complex, Sabinsa) with standard care FOLFOX chemotherapy in patients with inoperable colorectal cancer (CUFOX): study protocol for a randomised control trial. *Trials*, 16, 110.
- [33] **Ni, W., Li, Z., Liu, Z., Ji, Y., Wu, L., Sun, S., ve ark.** (2019). Dual-Targeting Nanoparticles: Codelivery of Curcumin and 5-Fluorouracil for Synergistic Treatment of Hepatocarcinoma. *J Pharm Sci*, 108(3), 1284-1295.
- [34] **Shakibaei, M., Kraehe, P., Popper, B., Shayan, P., Goel, A. ve Buhrmann, C.** (2015). Curcumin potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil in a 3D alginate tumor microenvironment of colorectal cancer. *BMC Cancer*, 15, 250.
- [35] **Wei, Y., Yang, P., Cao, S. ve Zhao, L.** (2018). The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Archives of pharmacal research*, 41(1), 1-13.
- [36] **Tian, F., Fan, T., Zhang, Y., Jiang, Y. ve Zhang, X.** (2012). Curcumin potentiates the antitumor effects of 5-FU in treatment of esophageal squamous carcinoma cells through downregulating the activation of NF-kappaB signaling pathway in vitro and in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44(10), 847-855.

- [37] **Anuchapreeda, S., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S., Tima, S., Chanarat, P. ve Limtrakul, P.** (2006). Inhibitory effect of curcumin on MDR1 gene expression in patient leukemic cells. *Archives of pharmacal research*, 29(10), 866-873.
- [38] **Choi, B. H., Kim, C. G., Lim, Y., Shin, S. Y. ve Lee, Y. H.** (2008). Curcumin down-regulates the multidrug-resistance *mdr1b* gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF kappa B pathway. *Cancer Lett*, 259(1), 111-118.
- [39] **Hanahan, D.** (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12(1), 31-46.
- [40] **Hanahan, D. ve Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- [41] **Feltrin, F. D. S., Agner, T., Sayer, C. ve Lona, L. M. F.** (2022). Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: A promising strategy for cancer therapies. *Adv Colloid Interface Sci*, 300, 102582.
- [42] **Gustavsson, B., Carlsson, G., Machover, D., Petrelli, N., Roth, A., Schmoll, H. J., ve ark.** (2015). A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 14(1), 1-10.
- [43] **DeVita, V. T., Jr. ve Chu, E.** (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 68(21), 8643-8653.
- [44] **Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F.** (2020). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *n/a(n/a)*.
- [45] **Knudson, A. G.** (2002). Cancer genetics. *Am J Med Genet*, 111(1), 96-102.
- [46] **Leal-Esteban, L. C. ve Fajas, L.** (2020). Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866(5), 165715.
- [47] **Wong, R. S.** (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30(1), 87.
- [48] **Ferreira, C. G., Epping, M., Kruyt, F. A. ve Giaccone, G.** (2002). Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 8(7), 2024-2034.
- [49] Karna, P. ve Yang, L., Year editör^editörler. Apoptotic Signaling Pathway and Resistance to Apoptosis in Breast Cancer Stem Cells 2009 Published.
- [50] **Lijuan, W., Xiaoying, J., Zipei, C. ve Wenlu, L.** (2016). Evodiamine induces extrinsic and intrinsic apoptosis of ovarian cancer cells via the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathways. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 36(3), 353-359.
- [51] **Vucic, D. ve Fairbrother, W. J.** (2007). The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(20), 5995-6000.
- [52] **Bush, J. A. ve Li, G.** (2002). Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *Int J Cancer*, 98(3), 323-330.
- [53] **Sen, R. ve Baltimore, D.** (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5), 705-716.
- [54] **Luo, J. L., Kamata, H. ve Karin, M.** (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*, 115(10), 2625-2632.
- [55] **Rajitha, B., Belalcazar, A., Nagaraju, G. P., Shaib, W. L., Snyder, J. P., Shoji, M., ve ark.** (2016). Inhibition of NF-kappaB translocation by curcumin analogs induces G0/G1 arrest and downregulates thymidylate synthase in colorectal cancer. *Cancer Lett*, 373(2), 227-233.
- [56] **Kang, Y., Hu, W., Bai, E., Zheng, H., Liu, Z., Wu, J., ve ark.** (2016). Curcumin sensitizes human gastric cancer cells to 5-fluorouracil through inhibition of the NFkappaB survival-signaling pathway. *Onco Targets Ther*, 9, 7373-7384.
- [57] **Mihanfar, A., Yousefi, B., Ghazizadeh Darband, S., Sadighparvar, S., Kaviani, M. ve Majidinia, M.** (2021). Melatonin increases 5-fluorouracil-mediated apoptosis of colorectal cancer cells through enhancing oxidative stress and downregulating survivin and XIAP. *Bioimpacts*, 11(4), 253-261.

- [58] **Shacter, E. ve Weitzman, S. A.** (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)*, 16(2), 217-226, 229; discussion 230-212.
- [59] **Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C. ve Bohr, V. A.** (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30(1), 2-10.
- [60] **Lonkar, P. ve Dedon, P. C.** (2011). Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer*, 128(9), 1999-2009.
- [61] **Grivennikov, S. I., Greten, F. R. ve Karin, M.** (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- [62] **Hariharan, S., Bala, I. ve Kumar, M. N. V. R.** (2004). PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art. 21(5), 36.
- [63] **Fang, J., Nakamura, H. ve Maeda, H.** (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 136-151.
- [64] **Brenner, H., Kloor, M. ve Pox, C. P.** (2014). Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*, 383(9927), 1490-1502.
- [65] **Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F.** (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691.
- [66] **Potter, J. D.** (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, 91(11), 916-932.
- [67] **Marmol, I., Sanchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. ve Rodriguez Yoldi, M. J.** (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1).
- [68] **Jiang, H. H., Zhang, Z. Y., Wang, X. Y., Tang, X., Liu, H. L., Wang, A. L., ve ark.** (2019). Prognostic significance of lymphovascular invasion in colorectal cancer and its association with genomic alterations. *World J Gastroenterol*, 25(20), 2489-2502.
- [69] **Slattery, M. L.** (2000). Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis*, 11(3), 142-146.
- [70] **Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A. ve Ward, E.** (2009). Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*, 59(6), 366-378.
- [71] Ries LAG, M. D., Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. National Cancer Institute; 2008.
- [72] **Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enriquez, M., Uriarte-Ruiz, K., ve ark.** (2017). Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11).
- [73] **Kelsen, D.** (2022). Upper Gastrointestinal Tract Cancers. İçinde J. Loscalzo, A. Fauci, D. Kasper, S. Hauser, D. Longo, J.L. Jameson, (Ed.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 21e. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- [74] **Angarita, F. A., Feinberg, A. E., Feinberg, S. M., Riddell, R. H. ve McCart, J. A.** (2018). Management of complex polyps of the colon and rectum. *Int J Colorectal Dis*, 33(2), 115-129.
- [75] **Janout, V. ve Kollárová, H.** (2001). Epidemiology of colorectal cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 145(1), 5-10.
- [76] **Fearon, E. R.** (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*, 6, 479-507.
- [77] **Lorscheider, M., Gaudin, A., Nakhlé, J., Veiman, K. L., Richard, J. ve Chassaing, C.** (2021). Challenges and opportunities in the delivery of cancer therapeutics: update on recent progress. *Ther Deliv*, 12(1), 55-76.

- [78] **Bao, X., Zeng, J., Huang, H., Ma, C., Wang, L., Wang, F., ve ark.** (2020). Cancer-targeted PEDF-DNA therapy for metastatic colorectal cancer. *Int J Pharm*, 576, 118999.
- [79] **Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., ve ark.** (2015). Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15065.
- [80] **Parissis, H. ve Young, V.** (2010). Treatment of pancoast tumors from the surgeons prospective: re-appraisal of the anterior-manubrial sternal approach. *J Cardiothorac Surg*, 5, 102.
- [81] **Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. ve Wallace, M. B.** (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467-1480.
- [82] **Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y. ve Cho, C. H.** (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*, 22(30), 6876-6889.
- [83] **De Angelis, P. M., Svendsrud, D. H., Kravik, K. L. ve Stokke, T.** (2006). Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Mol Cancer*, 5, 20.
- [84] **Mehta, A. ve Patel, B. M.** (2019). Therapeutic opportunities in colon cancer: Focus on phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci*, 230, 150-161.
- [85] **Peters, G. J., van Triest, B., Backus, H. H., Kuiper, C. M., van der Wilt, C. L. ve Pinedo, H. M.** (2000). Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur J Cancer*, 36(7), 916-924.
- [86] **Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., ve ark.** (2015). Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One*, 10(2), e0115686.
- [87] **Blondy, S., David, V., Verdier, M., Mathonnet, M., Perraud, A. ve Christou, N.** (2020). 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Sci*, 111(9), 3142-3154.
- [88] **Gören, A. C., Çıkrıkçı, S., Çergel, M. ve Bilsel, G.** (2009). Rapid quantitation of curcumin in turmeric via NMR and LC–tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 113(4), 1239-1242.
- [89] **Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C. ve Ramirez-Tortosa, M.** (2016). Curcumin and Health. *Molecules*, 21(3), 264.
- [90] **Hossain, D. M., Bhattacharyya, S., Das, T. ve Sa, G.** (2012). Curcumin: the multi-targeted therapy for cancer regression. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4, 335-355.
- [91] **Ansari, V.** (2015). Curcuma Longa: Boon For Health Care System with its Biomedical Application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 4168-4173.
- [92] **Kurien, B. T., Singh, A., Matsumoto, H. ve Scofield, R. H.** (2007). Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment. *Assay Drug Dev Technol*, 5(4), 567-576.
- [93] **Chainani-Wu, N.** (2003). Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med*, 9(1), 161-168.
- [94] **Lao, C. D., Ruffin, M. T. t., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., ve ark.** (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*, 6, 10.
- [95] **Dhillon, N., Aggarwal, B. B., Newman, R. A., Wolff, R. A., Kunnumakkara, A. B., Abbruzzese, J. L., ve ark.** (2008). Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(14), 4491-4499.
- [96] **Kuttan, G., Kumar, K. B., Guruvayoorappan, C. ve Kuttan, R.** (2007). Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol*, 595, 173-184.

- [97] Sharma, R. A., McLelland, H. R., Hill, K. A., Ireson, C. R., Euden, S. A., Manson, M. M., ve ark. (2001). Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 7(7), 1894-1900.
- [98] Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., Hewitt, H. R., ve ark. (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res*, 10(20), 6847-6854.
- [99] He, Z. Y., Shi, C. B., Wen, H., Li, F. L., Wang, B. L. ve Wang, J. (2011). Upregulation of p53 expression in patients with colorectal cancer by administration of curcumin. *Cancer Invest*, 29(3), 208-213.
- [100] Du, B., Jiang, L., Xia, Q. ve Zhong, L. (2006). Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*, 52(1), 23-28.
- [101] Zhou, X., Wang, W., Li, P., Zheng, Z., Tu, Y., Zhang, Y. ve You, T. (2016). Curcumin Enhances the Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Inducing Gastric Cancer Cell Apoptosis Both In Vitro and In Vivo. *Oncol Res*, 23(1-2), 29-34.
- [102] Batra, H., Pawar, S. ve Bahl, D. (2019). Curcumin in combination with anti-cancer drugs: A nanomedicine review. *Pharmacol Res*, 139, 91-105.
- [103] Kanai, M., Yoshimura, K., Asada, M., Imaizumi, A., Suzuki, C., Matsumoto, S., ve ark. (2011). A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68(1), 157-164.
- [104] Tsujii, M., Kawano, S. ve DuBois, R. N. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 3336-3340.
- [105] Chang, P. Y., Peng, S. F., Lee, C. Y., Lu, C. C., Tsai, S. C., Shieh, T. M., ve ark. (2013). Curcumin-loaded nanoparticles induce apoptotic cell death through regulation of the function of MDR1 and reactive oxygen species in cisplatin-resistant CAR human oral cancer cells. *Int J Oncol*, 43(4), 1141-1150.
- [106] Banerjee, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., Lillard, J. W., Jr. ve Singh, R. (2017). Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. *Front Biosci (Elite Ed)*, 9(2), 235-245.
- [107] Peters, G. J., Backus, H. H. J., Freemantle, S., van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., van der Wilt, C. L., ve ark. (2002). Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1587(2), 194-205.
- [108] Srivastava, S., Mohammad, S., Pant, A. B., Mishra, P. R., Pandey, G., Gupta, S. ve Farooqui, S. (2018). Co-delivery of 5-Fluorouracil and Curcumin Nanohybrid Formulations for Improved Chemotherapy Against Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of maxillofacial and oral surgery*, 17(4), 597-610.
- [109] James, M. I., Iwuji, C., Irving, G., Karmokar, A., Higgins, J. A., Griffin-Teal, N., ve ark. (2015). Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in ex vivo models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy. *Cancer Lett*, 364(2), 135-141.
- [110] Tønnesen, H. H. ve Karlsen, J. (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*, 180(5), 402-404.
- [111] Wang, Y. J., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. S., Hsieh, C. Y. ve Lin, J. K. (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal*, 15(12), 1867-1876.
- [112] Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. ve Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, 8(1), 59-73.
- [113] Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L. ve Sakariah, K. K. (2002). Improved HPLC Method for the Determination of Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(13), 3668-3672.

- [114] Shi, Y., van der Meel, R., Chen, X. ve Lammers, T. (2020). The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy. *Theranostics*, 10(17), 7921-7924.
- [115] Lee, W. H., Loo, C. Y., Young, P. M., Traini, D., Mason, R. S. ve Rohanizadeh, R. (2014). Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv*, 11(8), 1183-1201.
- [116] Torchilin, V. (2006). *Nanoparticulates As Drug Carriers*. Imperial College Press 1-725 s.
- [117] Abouzeid, A. H., Patel, N. R. ve Torchilin, V. P. (2014). Polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE)/vitamin E micelles for co-delivery of paclitaxel and curcumin to overcome multi-drug resistance in ovarian cancer. *Int J Pharm*, 464(1-2), 178-184.
- [118] Yang, Q., Jones, S. W., Parker, C. L., Zamboni, W. C., Bear, J. E. ve Lai, S. K. (2014). Evading immune cell uptake and clearance requires PEG grafting at densities substantially exceeding the minimum for brush conformation. *Mol Pharm*, 11(4), 1250-1258.
- [119] Demetzos, C. ve Pippa, N. (2014). Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review. *Drug Deliv*, 21(4), 250-257.
- [120] Faraji, A. H. ve Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem*, 17(8), 2950-2962.
- [121] Tardi, P. G., Boman, N. L. ve Cullis, P. R. (1996). Liposomal doxorubicin. *Journal of drug targeting*, 4(3), 129-140.
- [122] Müller, R. H., Mäder, K. ve Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, 50(1), 161-177.
- [123] 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 : official journal of the Controlled Release Society*, 70(1-2), 1-20.
- [124] Bangham, A. D. (1995). Surrogate cells or Trojan horses. The discovery of liposomes. *Bioessays*, 17(12), 1081-1088.
- [125] Zhang, L., Chan, J. M., Gu, F. X., Rhee, J. W., Wang, A. Z., Radovic-Moreno, A. F., ve ark. (2008). Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. *ACS Nano*, 2(8), 1696-1702.
- [126] Cheow, W. S. ve Hadinoto, K. (2011). Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 85(2), 214-220.
- [127] Scopel, R., Falcão, M. A., Cappellari, A. R., Morrone, F. B., Guterres, S. S., Cassel, E., ve ark. (2020). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a targeted drug delivery system for melanoma treatment. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-12.
- [128] Pandita, D., Kumar, S. ve Lather, V. (2015). Hybrid poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: design and delivery perspectives. *Drug Discov Today*, 20(1), 95-104.
- [129] Zeng, X. M., Martin, G. P. ve Marriott, C. (1995). The controlled delivery of drugs to the lung. *International Journal of Pharmaceutics*, 124(2), 149-164.
- [130] Garti, N. (1999). What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1), 125-146.
- [131] Evora, C., Soriano, I., Rogers, R. A., Shakesheff, K. N., Hanes, J. ve Langer, R. (1998). Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 51(2-3), 143-152.
- [132] Krishnamurthy, S., Vaiyapuri, R., Zhang, L. ve Chan, J. M. (2015). Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Biomater Sci*, 3(7), 923-936.

- [133] **Palange, A. L., Di Mascolo, D., Carallo, C., Gnasso, A. ve Decuzzi, P.** (2014). Lipid-polymer nanoparticles encapsulating curcumin for modulating the vascular deposition of breast cancer cells. *Nanomedicine*, 10(5), 991-1002.
- [134] **Bolat, Z. B., Islek, Z., Sahin, F. ve Ucisik, M. H.** (2023). Delivery of curcumin within emulsome nanoparticles enhances the anti-cancer activity in androgen-dependent prostate cancer cell. *Mol Biol Rep*, 50(3), 2531-2543.
- [135] **Wang, Q., Alshaker, H., Bohler, T., Srivats, S., Chao, Y., Cooper, C. ve Pchejetski, D.** (2017). Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. *Sci Rep*, 7(1), 5901.
- [136] **Ma, T., Wang, L., Yang, T., Ma, G. ve Wang, S.** (2014). Homogeneous PLGA-lipid nanoparticle as a promising oral vaccine delivery system for ovalbumin. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 129-136.
- [137] **Croy, S. R. ve Kwon, G. S.** (2006). Polymeric micelles for drug delivery. *Curr Pharm Des*, 12(36), 4669-4684.
- [138] **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.
- [139] **Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A. ve Préat, V.** (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), 505-522.
- [140] **Yallapu, M. M., Jaggi, M. ve Chauhan, S. C.** (2012). Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today*, 17(1-2), 71-80.
- [141] **Eskandari, Z., Bahadori, F., Altikatoglu, M., Yenigun, V. B., Kocyigit, A. ve Onyuksel, H.** (2019). NF- κ B Inhibition Activity of Curcumin-Loaded Sterically Stabilized Micelles and Its Up-Regulator Effect on Enhancement of Cytotoxicity of a New Nano-Pirarubicin Formulation in the Treatment of Breast Cancer. *Records of Natural Products*, 13(5), 390-404.
- [142] **Bahadori, F., Eskandari, Z., Ebrahimi, N., Bostan, M. S., Eroğlu, M. S. ve Oner, E. T.** (2019). Development and optimization of a novel PLGA-Levan based drug delivery system for curcumin, using a quality-by-design approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 138, 105037.
- [143] **Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K. ve Nagai, T.** (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*, 25(4), 471-476.
- [144] **Bahadori, F., Dag, A., Durmaz, H., Cakir, N., Onyuksel, H., Tunca, U., ve ark.** (2014). Synthesis and Characterization of Biodegradable Amphiphilic Star and Y-Shaped Block Copolymers as Potential Carriers for Vinorelbine. *Polymers*, 6(1), 214-242.
- [145] **Wang, F., Bronich, T. K., Kabanov, A. V., Rauh, R. D. ve Roovers, J.** (2005). Synthesis and Evaluation of a Star Amphiphilic Block Copolymer from Poly(ϵ -caprolactone) and Poly(ethylene glycol) as a Potential Drug Delivery Carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 16(2), 397-405.
- [146] **Vatansever, O., Bahadori, F., Bulut, S. ve Eroglu, M. S.** (2023). Coating with cationic inulin enhances the drug release profile and in vitro anticancer activity of lecithin-based nano drug delivery systems. *Int J Biol Macromol*, 237, 123955.
- [147] **Tabatabaei Mirakabad, F. S., Akbarzadeh, A., Milani, M., Zarghami, N., Taheri-Anganeh, M., Zeighamian, V., ve ark.** (2016). A Comparison between the cytotoxic effects of pure curcumin and curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 423-430.
- [148] **Narvekar, M., Xue, H. Y. ve Wong, H. L.** (2012). A novel hybrid delivery system: polymer-oil nanostructured carrier for controlled delivery of highly lipophilic drug all-trans-retinoic acid (ATRA). *Int J Pharm*, 436(1-2), 721-731.

- [149] Turbamole. 2019. Turbomole Program Package for ab initio Electronic Structure Calculations.
- [150] **Boys, S. F. ve Bernardi, F.** (2006). The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Molecular Physics*, 19(4), 553-566.
- [151] **Hourahine, B., Aradi, B., Blum, V., Bonafe, F., Buccheri, A., Camacho, C., ve ark.** (2020). DFTB+, a software package for efficient approximate density functional theory based atomistic simulations. *J Chem Phys*, 152(12), 124101.
- [152] **Li, Y., Hao, L., Liu, F., Yin, L., Yan, S., Zhao, H., ve ark.** (2019). Cell penetrating peptide-modified nanoparticles for tumor targeted imaging and synergistic effect of sonodynamic/HIFU therapy. *International Journal of Nanomedicine, Volume 14*, 5875-5894.
- [153] **Kumar, P., Nagarajan, A. ve Uchil, P. D.** (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(6).
- [154] **Karumuri, B.** (2013) *Metabolic Assay Based Validation of Cell Viability to Inflammatory Stimuli and Anti-Cancer Drugs in Normal and Tumor Brain Glia*
- [155] **McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., ve ark.** (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. 46, 153-187.
- [156] **Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E. ve Green, D. R.** (2006). Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH Protoc*, 2006(3).
- [157] **Liu, K., Liu, P. C., Liu, R. ve Wu, X.** (2015). Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Med Sci Monit Basic Res*, 21, 15-20.
- [158] **Zimmermann, M. ve Meyer, N.** (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol*, 740, 57-63.
- [159] **Riss, T. L., O'Brien, M. A., Moravec, R. A., Kupcho, K. ve Niles, A. L.** (2004). Apoptosis Marker Assays for HTS. İçinde S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, et al., (Ed.), *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD):
- [160] **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- [161] **Wan, C. P., Myung, E. ve Lau, B. H. S.** (1993). An automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. *Journal of Immunological Methods*, 159(1), 131-138.
- [162] **Ng, N. ve Ooi, L.** (2021). A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. *Bio-protocol*, 11(1), e3877.
- [163] **Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L. A. ve Wood, G. C.** (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(4), 474-491.
- [164] **Liu, Y., Pan, J. ve Feng, S. S.** (2010). Nanoparticles of lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for controlled release of paclitaxel: effects of surfactants on particles size, characteristics and in vitro performance. *Int J Pharm*, 395(1-2), 243-250.
- [165] **Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V. ve Cosco, D.** (2021). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front Pharmacol*, 12, 601626.
- [166] **Di Marzio, L., Ventura, C., Cosco, D., Paolino, D., Di Stefano, A., Stancanelli, R., ve ark.** (2015). Nanotherapeutics for anti-inflammatory delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32.

- [167] Wang, J., Mao, W., Lock, L. L., Tang, J., Sui, M., Sun, W., ve ark. (2015). The Role of Micelle Size in Tumor Accumulation, Penetration, and Treatment. *ACS Nano*, 9(7), 7195-7206.
- [168] Stevanović, M., Radulovic, A., Jordović, B. ve Uskoković, D. (2008). Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4, 349-358.
- [169] Sadat, S. M. A., Jahan, S. T. ve Haddadi, A. (2016). Effects of Size and Surface Charge of Polymeric Nanoparticles on in Vitro and in Vivo Applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 07(02), 91-108.
- [170] Ishiwata, H., Suzuki, N., Ando, S., Kikuchi, H. ve Kitagawa, T. (2000). Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 69(1), 139-148.
- [171] PubChem. **PubChem Compound Summary for CID 969516, Curcumin.** (2023). National Center for Biotechnology Information; September 18, 2023, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin>.
- [172] Chemspider. **CSID:839564.** (2023). ChemSpider 16:08, Nov 2, 2023, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.839564.html>
- [173] Zhang, J., Jinnai, S., Ikeda, R., Wada, M., Hayashida, S. ve Nakashima, K. (2009). A simple HPLC-fluorescence method for quantitation of curcuminoids and its application to turmeric products. *Anal Sci*, 25(3), 385-388.
- [174] Mehta, R. C., Thanoo, B. C. ve Deluca, P. P. (1996). Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(d,l-lactide-co-glycolide). *Journal of Controlled Release*, 41(3), 249-257.
- [175] Yeo, Y. ve Park, K. (2004). Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of pharmacal research*, 27(1), 1-12.
- [176] Bodmeier, R. ve McGinity, J. W. (1988). Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics*, 43(1), 179-186.
- [177] Klippstein, R., Wang, J. T., El-Gogary, R. I., Bai, J., Mustafa, F., Rubio, N., ve ark. (2015). Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Colon Cancer Therapy In Vivo. *Small*, 11(36), 4704-4722.
- [178] Zhou, W., Liu, W., Zou, L., Liu, W., Liu, C., Liang, R. ve Chen, J. (2014). Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 117, 330-337.
- [179] Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. ve Fessi, H. (2007). Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations. *Advanced drug delivery reviews*, 58, 1688-1713.
- [180] Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. ve Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: effect of entrapped air. *J Pharm Sci*, 72(10), 1189-1191.
- [181] Yallapu, M. M., Jaggi, M. ve Chauhan, S. C. (2010). beta-Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 79(1), 113-125.
- [182] Marques, D. R., Santos, L. A. d., Schopf, L. F. ve Fraga, J. C. S. d. (2013). Analysis of Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)/Poly(Isoprene) Polymeric Blend for Application as Biomaterial. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, 23(5), 579-584.
- [183] Paramera, E., Konteles, S. ve Karathanos, V. (2011). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem*, 125, 892-902.
- [184] Passerini, N. ve Craig, D. Q. (2001). An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 73(1), 111-115.
- [185] Mammadov, R., Tekinay, A. B., Dana, A. ve Guler, M. O. (2012). Microscopic characterization of peptide nanostructures. *Micron*, 43(2-3), 69-84.

- [186] **Karataş, D., Tekin, A. ve Çelik, M. S.** (2013). Adsorption of quaternary amine surfactants and their penetration into the intracrystalline cavities of sepiolite. *New Journal of Chemistry*, 37(12), 3936-3948.
- [187] **Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B. ve Stark, G. R.** (1998). The p53 network. *The Journal of biological chemistry*, 273(1), 1-4.
- [188] **Karthikeyan, A., Senthil, N. ve Min, T.** (2020). Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *Front Pharmacol*, 11, 487.
- [189] **Hatamipour, M., Sahebkar, A., Alavizadeh, S. H., Dorri, M. ve Jaafari, M. R.** (2019). Novel nanomicelle formulation to enhance bioavailability and stability of curcuminoids. *Iran J Basic Med Sci*, 22(3), 282-289.
- [190] **Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., ve ark.** (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)*, 355(9209), 1041-1047.
- [191] **Sinicrope, F. A., Foster, N. R., Thibodeau, S. N., Marsoni, S., Monges, G., Labianca, R., ve ark.** (2011). DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst*, 103(11), 863-875.
- [192] **Patel, B. B., Sengupta, R., Qazi, S., Vachhani, H., Yu, Y., Rishi, A. K. ve Majumdar, A. P.** (2008). Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int J Cancer*, 122(2), 267-273.
- [193] **Srimuangwong, K., Tocharus, C., Yoysungnoen Chintana, P., Suksamrarn, A. ve Tocharus, J.** (2012). Hexahydrocurcumin enhances inhibitory effect of 5-fluorouracil on HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, 18(19), 2383-2389.
- [194] **Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H. ve Atyabi, F.** (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine*, 6, 877-895.
- [195] **Barenholz, Y.** (2012). Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 160(2), 117-134.
- [196] **Basnet, P. ve Skalko-Basnet, N.** (2011). Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*, 16(6), 4567-4598.
- [197] **Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M. ve Chauhan, S. C.** (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *J Colloid Interface Sci*, 351(1), 19-29.
- [198] **Manygoats, K. R., Yazzie, M. ve Stearns, D. M.** (2002). Ultrastructural damage in chromium picolinate-treated cells: a TEM study. Transmission electron microscopy. *J Biol Inorg Chem*, 7(7-8), 791-798.
- [199] **Raimundo, L., Espadinha, M., Soares, J., Loureiro, J. B., Alves, M. G., Santos, M. M. M. ve Saraiva, L.** (2018). Improving anticancer activity towards colon cancer cells with a new p53-activating agent. *Br J Pharmacol*, 175(20), 3947-3962.
- [200] **Choi, K. Y., Correa, S., Min, J., Li, J., Roy, S., Laccetti, K. H., ve ark.** (2019). Binary Targeting of siRNA to Hematologic Cancer Cells In Vivo using Layer-by-Layer Nanoparticles. *Adv Funct Mater*, 29(20).
- [201] **Zhao, M. D., Li, J. Q., Chen, F. Y., Dong, W., Wen, L. J., Fei, W. D., ve ark.** (2019). Co-Delivery of Curcumin and Paclitaxel by "Core-Shell" Targeting Amphiphilic Copolymer to Reverse Resistance in the Treatment of Ovarian Cancer. *Int J Nanomedicine*, 14, 9453-9467.
- [202] **Khiste, S. K., Liu, Z., Roy, K. R., Uddin, M. B., Hosain, S. B., Gu, X., ve ark.** (2020). Ceramide-Rubusoside Nanomicelles, a Potential Therapeutic Approach to Target Cancers Carrying p53 Missense Mutations. *Mol Cancer Ther*, 19(2), 564-574.
- [203] **Cho, Y. H., Ro, E. J., Yoon, J. S., Mizutani, T., Kang, D. W., Park, J. C., ve ark.** (2020). 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/beta-catenin pathway activation. *Nat Commun*, 11(1), 5321.

- [204] **Cao, Z., Zhu, H., Zhang, L., Zhao, X., Zweier, J. L. ve Li, Y.** (2006). Antioxidants and phase 2 enzymes in cardiomyocytes: Chemical inducibility and chemoprotection against oxidant and simulated ischemia-reperfusion injury. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(8), 1353-1364.
- [205] **Sun, X., Li, F., Wang, Y. ve Liang, W.** (2010). Cellular uptake and elimination of lipophilic drug delivered by nanocarriers. *Pharmazie*, 65(10), 737-742.
- [206] **Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T. ve Goksungur, Y.** (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydr Polym*, 99, 454-461.
- [207] **Kunwar, A., Barik, A., Mishra, B., Rathinasamy, K., Pandey, R. ve Priyadarsini, K. I.** (2008). Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780(4), 673-679.
- [208] **Mohanty, C., Acharya, S., Mohanty, A. K., Dilnawaz, F. ve Sahoo, S. K.** (2010). Curcumin-encapsulated MePEG/PCL diblock copolymeric micelles: a novel controlled delivery vehicle for cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)*, 5(3), 433-449.
- [209] **Un, K., Sakai-Kato, K., Oshima, Y., Kawanishi, T. ve Okuda, H.** (2012). Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes. *Biomaterials*, 33(32), 8131-8141.
- [210] **Ucisik, M. H., Kupcu, S., Schuster, B. ve Sleytr, U. B.** (2013). Characterization of CurcuEmulsomes: nanoformulation for enhanced solubility and delivery of curcumin. *J Nanobiotechnology*, 11, 37.
- [211] **Bolat, Z. B., Islek, Z., Demir, B. N., Yilmaz, E. N., Sahin, F. ve Ucisik, M. H.** (2020). Curcumin- and Piperine-Loaded Emulsomes as Combinational Treatment Approach Enhance the Anticancer Activity of Curcumin on HCT116 Colorectal Cancer Model. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 50.
- [212] **Nair, K. L., Thulasidasan, A. K., Deepa, G., Anto, R. J. ve Kumar, G. S.** (2012). Purely aqueous PLGA nanoparticulate formulations of curcumin exhibit enhanced anticancer activity with dependence on the combination of the carrier. *Int J Pharm*, 425(1-2), 44-52.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Fatmanur BABALI BALIBEY

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- (2021- Halen) Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Babalı Balıbey F., Bahadori F., Ergin Kızılcay G., Koçyiğit A., Oran C., Tekin A.** (2023) Preparation And Characterisation of High Amount Curcumin Encapsulated PLGA DSPE Hybrid Nano Drug Delivery System. *3rd International Aegean Health Areas Symposium 2023 (IAHAS'23)*, İstanbul, Turkey, ss.53-55
- **Balıbey, F. B., Bahadori, F., Ergin Kızılcay, G., Tekin, A., Kanımdan, E., & Kocyiğit, A.** (2023). Optimization of PLGA-DSPE Hybrid Nano-Micelles with Enhanced Hydrophobic Capacity for Curcumin Delivery. *Pharmaceutical development and technology*, 1–25. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/10837450.2023.2264964>

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Bulut, Ş., Obakan, P., Babalı Balıbey, F., Haciosmanoğlu, E., Bahadori, F.,** (2020). PLGA-Kurkumin Nano-formülasyonunun Kanser Hücrelerinde NF-kB Alt Birimleri Düzeyi Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi . International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry, (pp.203). Ankara, Turkey
- **Bilgin, M. G., Güneş Bayır, A., Özkan, B., Özman, Z., Babalı Balıbey, F., Turgay, F., Karakaş, İ.** (2022). Evaluation of Some Physico-chemical and Antioxidant Characteristics of Commercial Honey Samples Originated from Different Regions of Turkey. *Acta Scientific Nutritional Health*, vol.6, no.1, 39-47.
- **Özman, Z., Babalı Balıbey, F., Durmuş, E., Koçyiğit, A.,** (2022). Investigation of the cytotoxic effects of heather and manuka honey on gastric cancer cells, Uluslararası Biyokimya Kongresi 2022 // 33. Ulusal Biyokimya Kongresi (pp.137). İzmir, Turkey
- **Güler E., Koçyiğit A., Babalı Balıbey F., Özman Z., Başarıcı M. T.,** (2023) In vitro Investigation of the Effects of Hylotelephium and Typha Plant Extracts on Anti-Inflammatory and Wound Healing