



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**ÇİFT HEDEFLİ BİYOUYUMLU NANOPARTİKÜLLERİN
PANKREAS KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Ayşe Nur NURDOĞAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR**

Mayıs, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 14.05.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA
İstanbul Medeniyet Üniversitesi
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 39283 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Bu çalışmada MiaPaCa-2 kanser hücreleri üzerinde kurkumin ve eskuletinin hem ayrı ayrı hem de kombine halde çıplak ve nanoformüle halleri ile etkilerinin, ayrıca pankreatik adacık türevli progenitör hücrelerden (PID-PC) ve MiaPaCa-2 kanser hücrelerinden elde edilen membran proteinleri ve sitozolik proteinler ile kaplanarak oluşturulmuş kurkumin ve eskuletin içeren çift hedefli ve biyouyumlu nanoformülasyonların olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda ilk kez bu proteinler ile kaplanarak oluşturulan nanoformülasyonların hücre canlılığı, meydana gelen hücre ölüm tipi ve reaktif oksijen türlerine (ROS) olan etkileri araştırılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince her türlü desteğini hissettiğim, bilgisi ve ilgisiyle her zaman yanımda olan, tezin hipotezi, tez kapsamındaki deneylerin tasarlanması, çoğu deney uygulamasının yapılması, elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve istatistiklerinin yapılması aşamalarında büyük emek veren sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Karatuğ Kaçar'a sonsuz teşekkür ederim. Tez kapsamında kullanılan nanoformülasyonların kontrolünde emeği geçen Doç. Dr. Fatemeh Bahadori ve nanoformülasyonların hazırlanmasında emeği geçen Arş. Gör. Rabia Sak'a, salım deneylerinin yapılmasında emeği geçen Dr. Öğr. Üyesi Gamze Ergin Kızılcay'a teşekkür ederim. Ayrıca ROS ölçümü için İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bulunan ELISA reader cihazının kullanımını sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Elif Mertoğlu Kamalı ve Dr. Aslıhan Şengelen'e, hücre ölüm analizi için Koç Üniversitesi'nde bulunan ELISA reader cihazının kullanımını sağlayan Dr. Özgecan Kayalar'a teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 39283 numaralı yüksek lisans tez projesi ile destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi'ne, 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı desteği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan, bu yaşa gelmemi sağlayan sevgili annem Zinnet Nurdoğan, babam Abdulkadir Nurdoğan, kardeşlerim Adem Nurdoğan ve Mehmet Yasir Nurdoğan'a emekleri, sabırları ve destekleri için teşekkür ederim. Bana olan güvenlerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Gizem Aydınli ve Umut Akkiran'a zor zamanlarda dostluklarıyla yeniden ayağa kalkmamı sağladıkları için teşekkür ederim.

Mayıs 2024

Ayşe Nur NURDOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xv
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. KANSER.....	5
2.2. PANKREAS KANSERİ	6
2.3. PANKREAS KANSER HÜCRE SOYLARI.....	8
2.3.1. MiaPaCa-2 Hücre Soyu	8
2.4. ESKULETİN.....	9
2.4.1 ESKULETİNİN Kanserde Etkileri.....	9
2.5. KURKUMİN.....	11
2.5.1 Kurkuminin Kanserde Etkileri	11
2.6. NANOBİYOTEKNOLOJİ.....	13
2.7. HEDEFLİ TEDAVİ	15
2.8. MEMBRAN PROTEİNİ İLE KAPLI NANOPARTİKÜLLER VE KANSER TEDAVİSİNDE ETKİLERİ	16
2.9. HÜCRE ÖLÜMÜ TİPLERİ.....	17
2.9.1. Apoptoz	19
2.9.2. Nekroz	22
2.10. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ.....	24
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	26
3.1. HÜCRE SOYU	26
3.1.1. MiaPaCa-2 Hücre Soyunun Kültüre Edilmesi	26
3.1.2. Pankreatik Ada Türevli Progenitor Hücrelerin Kültüre Edilmesi	26
3.2. HÜCRELERDEN MEMBRAN VE SİTOZOLİK PROTEİNLERİN İZOLE EDİLMESİ	26

3.3. İZOLE EDİLEN MEMBRAN VE SİTOZOLİK PROTEİNLERİN MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ	27
3.4. PLGA NANOPARTİKÜLÜN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU	27
3.5. PLGA NANOPARTİKÜLLERİNE PID-PC VE MIAPACA-2 HÜCRELERİNDEN İZOLE EDİLEN MEMBRAN VE SİTOZOLİK PROTEİNLERİN YÜKLENMESİ	29
3.6. ESKULETİN VE KURKUMİNİN <i>IN VITRO</i> SALIMI	30
3.7. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	31
3.8. HÜCRE CANLILIK ANALİZİ	31
3.9. HÜCRE ÖLÜM TİPİNİN BELİRLENMESİ	32
3.10. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ ANALİZİ.....	33
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	33
4. BULGULAR.....	33
4.1. HÜCRE CANLILIK ANALİZ SONUÇLARI.....	34
4.1.1. Eskuletin, Kurkumin ve Eskuletin+Kurkumin Kombinasyonunun MiaPaCa-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi	34
4.1.2. PLGA ile Kaplı Eskuletin, PLGA ile Kaplı Kurkumin ve İkisinin Kombinasyonunun MiaPaCa-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi.....	36
4.1.3. PID-PC Hücrelerinden İzole Edilen Sitozolik ve Membran Proteinlerinin Ayrı Ayrı Uygulanmasının Miapaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi	41
4.1.4. Miapaca-2 Hücrelerinden İzole Edilen Sitozolik ve Membran Proteinlerinin Ayrı Ayrı Uygulanmasının Miapaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi	42
4.1.5. PID-PC Hücrelerinden İzole Edilen Membran ve Sitozolik Proteinler ile Ayrı Ayrı Kaplanarak Oluşturulan PLGA Kaplı Proteinlerin Miapaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi	44
4.1.6. Miapaca-2 Hücrelerinden İzole Edilen Membran ve Sitozolik Proteinler ile Ayrı Ayrı Kaplanarak Oluşturulan PLGA Kaplı Proteinlerin Miapaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi	46
4.1.7. PID-PC ve Miapaca-2 Hücrelerinden Elde Edilen Membran ve Sitozolik Proteinler ile Ayrı Ayrı Kaplanmış PLGA_ESC ve PLGA_CURC Nanopartiküllerinin Miapaca-2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Ortak Şemada Gösterimi.....	48
4.2. OLUŞTURULAN NANO FORMÜLASYONUN KARAKTERİZASYONU	50
4.2.1 Boş PLGA'nın Karakterizasyonu.....	50
4.2.2. PLGA_ESC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Karakterizasyonları.....	51
4.2.3. PLGA_CURC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Karakterizasyonları.....	55
4.3. PLGA_ESC VE PLGA_CURC'İN FARKLI PROTEİNLER İLE KOMBİNE EDİLEN FARKLI FORMLARININ SALIM DENEYİ SONUÇLARI	58

4.3.1. PLGA_ESC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Salım Sonuçları	58
4.3.2. PLGA_CURC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Salım Sonuçları.....	60
4.4. APOPTOZ VE NEKROZ ANALİZ SONUÇLARI	63
4.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLEİNİN ANALİZ SONUÇLARI.....	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ	99



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Eskuletinin moleküler yapısı (Zuo ve diğ., 2020).....	9
Şekil 2.2: Kurkuminin moleküler yapısı (Wahab ve diğ., 2020).....	11
Şekil 2.3: Morfolojik ayrıma göre hücre ölüm tipleri ve <i>in vivo</i> da bağlantılı oldukları pato-fizyolojik durumlar (Galluzi ve diğ., 2007).	19
Şekil 2.4: Apoptozun üç sinyal yolağı. a) Ekstrinsik ve intrinsik (mitokondriyal) yolak. b)Endoplazmik retikulum stresinin uyardığı yolak (Nirmala ve Lopus, 2020).....	20
Şekil 2.5: Perforin/granzim yolağı (Nirmala ve Lopus, 2020).....	22
Şekil 2.6: Nekrotik hücre ölümünün gösterimi (Nirmala ve Lopus, 2020).....	23
Şekil 4.1: MiaPaCa-2 hücre soyu üzerine eskuletinin etkisi. ***p<0,001, ****p<0,0001.....	34
Şekil 4.2: MiaPaCa-2 hücre soyu üzerine kurkuminin etkisi.	35
Şekil 4.3: MiaPaCa-2 hücre soyu üzerine eskuletin ve kurkumin kombinasyonunun etkisi. 1: 6.25 µg eskuletin+0.78 µg kurkumin; 2: 12.5 µg eskuletin+1.56 µg kurkumin; 3: 25 µg eskuletin+3.12 µg kurkumin; 4: 50 µg eskuletin+6.25 µg kurkumin; 5: 100 µg eskuletin+12.5 µg kurkumin. ****p<0,0001.	36
Şekil 4.4: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA ile kaplı eskuletinin hücre canlılığı üzerine etkisi. *p<0,05, ****p<0,0001.	37
Şekil 4.5: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA ile kaplı kurkuminin hücre canlılığı üzerine etkisi. **p<0,01, ****p<0,0001.	38
Şekil 4.6: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_ESC ve PLGA_CURC kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi. 1: 6.25 µg PLGA_ESC +0.78 µg PLGA_CURC; 2: 12.5 µg PLGA_ESC+1.56 µg PLGA_CURC; 3: 25 µg PLGA_ESC+3.12 µg PLGA_CURC; 4: 50 µg PLGA_ESC+6.25 µg PLGA_CURC; 5: 100 µg PLGA_ESC+12.5 µg PLGA_CURC. **p<0,01, ****p<0,0001.....	39
Şekil 4.7: Eskuletin (ESC), Kurkumin (CURC), Eskuletin+Kurkumin (ESC+CURC) kombinasyonu ile PLGA ile kaplı Eskuletin (PLGA_ESC), PLGA ile kaplı Kurkumin (PLGA_CURC) ve ikisinin kombinasyonunun (PLGA_ESC+CURC) MiaPaCa-2 hücre canlılığı üzerine etkisinin ortak şemada gösterimi. **p<0,01, ***p<0,001.....	40
Şekil 4.8: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine PID-PC membran proteinin etkisi.	41

Şekil 4.9: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine PID-PC sitozolik proteinin etkisi.	42
Şekil 4.10: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine MiaPaCa-2 membran proteinin etkisi.	43
Şekil 4.11: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine MiaPaCa-2 sitozolik proteinin etkisi.	44
Şekil 4.12: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_PID-PC_MP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi. *p<0,05.	45
Şekil 4.13: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_PID-PC_SP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.14: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_MiaPaCa-2_MP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.15: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_MiaPaCa-2_SP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.16: PLGA_ESC, PLGA_CURC ve kombinasyon nanopartiküllerinin ve bu formülasyonların PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ya da membran proteinler ile kaplanmasıyla oluşturulan nanopartiküllerin MiaPaCa-2 hücre canlılığı üzerine etkisinin ortak şemada gösterimi. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.....	49
Şekil 4.17: Boş PLGA'nın karakterizasyon için ölçüm grafiği.....	51
Şekil 4.18: PLGA_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği.....	52
Şekil 4.19: PLGA_PID-PC_MP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği	53
Şekil 4.20: PLGA_PID-PC_SP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği	53
Şekil 4.21: PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği.....	54
Şekil 4.22: PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği	54
Şekil 4.23: PLGA_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği	55
Şekil 4.24: PLGA_PID-PC_MP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği.....	56
Şekil 4.25: PLGA_PID-PC_SP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği.....	56
Şekil 4.26: PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği	57
Şekil 4.27: PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği	57
Şekil 4.28: PLGA_ESC Salım Grafiği	58
Şekil 4.29: PLGA_PID-PC_MP_ESC Salım Grafiği.....	59

Şekil 4.30: PLGA_PID-PC_SP_ESC Salım Grafiği	59
Şekil 4.31: PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC Salım Grafiği	60
Şekil 4.32: PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC Salım Grafiği.....	60
Şekil 4.33: PLGA_CURC'in Salım Grafiği	61
Şekil 4.34: PLGA_PID-PC_MP_CURC Salım Grafiği	61
Şekil 4.35: PLGA_PID-PC_SP_CURC Salım Grafiği	62
Şekil 4.36: PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC Salım Grafiği.....	62
Şekil 4.37: PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC Salım Grafiği.....	63
Şekil 4.38: Eskuletin (ESC), eskuletin+kurkumin (ESC+CURC), PLGA_ESC+CURC ve PLGA kaplı nanotaşıyıcıların PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ve membran proteinleri ile ayrı ayrı kaplanmasıyla oluşturulan nanoformülasyonların MiaPaCa-2 hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla meydana gelen apoptoz seviyesinin katlı artış grafiği. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.....	64
Şekil 4.39: Eskuletin (ESC), eskuletin+kurkumin (ESC+CURC), PLGA_ESC+CURC ve PLGA kaplı nanotaşıyıcıların PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ve membran proteinler ile ayrı ayrı kaplanmasıyla oluşturulan nanopformülasyonların MiaPaCa-2 hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla oluşturduğu nekroz katlı artış grafiği. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.....	66
Şekil 4.40: PLGA-Eskuletin (PLGA_ESC), PLGA-Kurkumin (PLGA_CURC) ve kombinasyon nanopartikülleri (PLGA_ESC+CURC) ile bu nanopartiküllerin PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ve membran proteinler ile ayrı ayrı kaplanmasıyla oluşturulan nanopartiküllerin MiaPaCa-2 hücrelerinde ROS oluşumuna etkisi. *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001.	68

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
mM	: Milimolar
µM	: Mikromolar
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
U	: Ünite
Mbar	: Milibar
Nm	: Nanometre
rpm	: Dönüm sayısı (devir/dakika)
°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
g	: gravite
mo/wt	: molekül ağırlığı
Ex	: Uyarılma
Em	: Emisyon

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

AE@NP	: PLGA-nanopartikülüne Alantolakton yüklenerek oluşturulmuş nanopartikül
AİF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
ALA	: Alantolakton
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
Bis-AAF-R110	: Bis-alanylalanyl-phenylalanyl-rhodamine 110
CDNG	: Kanser Hücre Zarıyla Kaplanmış DOX yüklü Nanojel
CH	: Sitozan
CMCN	: Hücre Membranı ile Kaplanmış Nanopartiküller
CPT	: Kamptotesin

CR	: Nanoçubuk
CS	: Nanoküre
CTX	: Cetuximab
CURC	: Kurkumin
DCF	: 2',7-dichlorofluorescein
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DOX	: Dokсорubisin
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMBA	: Dimetilbenz(a)antrasen
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DST	: Dasatinib
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
EF24	: Sentetik Kurkumin Analogu
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	: Epitel Mezenkimal Dönüşüm
EPR	: Artmış Geçirgenlik ve Tutunma Etkisi
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK	: Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz
ERL	: Erlotinib
ESC	: Eskuletin
FasR	: Fas reseptörü
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
FUC	: Fukoidan
GEM	: Gemsitabin
GF-AFC	: Glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂DCFDA	: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC50	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
IFS	: Ifosfamid
IPMN	: Intraduktal Papiller Müsinöz Neoplazmlar

KPC	: Katlanmamış Protein Cevabı
LE	: Yüklenme Etkinliği
LNC	: Lipid-çekirdekli Nanokapsül
MCN	: Müsinöz Kistik Neoplazm
Metf	: Metformin
MNP@DOX@CCCM	: Kanser Hücre Membranı ile Kaplı DOX yüklü Manyetik Demir Oksit Temelli Nanopartikül Sistemi
MP	: Membran Proteini
MSC	: Mezenkimal Kök Hücre
MTT	: 3-(4,5-Dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolum bromid
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B
NLRs	: Nükleotit Oligomerizasyon Domain (NOD)-benzeri Reseptörler
NP	: Nanopartikül
PanIN	: Pankreatik İntraepitel Neoplazmlar
PARP-1	: Poli[ADP-riboz]polimeraz 1
PDAC	: Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PDI	: Polidispersite İndeksi
PEG	: Polietilen Glikol
PH	: Progenitör Hücreler
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PID-PC	: Pankreatik Adacık Türevli Progenitör Hücreler
PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik)asit
Poli(NTC)	: Polikarbonat Yapı İskelesi
RLRs	: RIG-I-benzeri reseptörler
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SP	: Sitozolik Protein
SPION	: Süpermanyetik Demir Oksit Nanopartikülleri
TGFβ	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-β
TLRs	: Toll-benzeri Reseptörler
TNFR1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1
TOS	: α-tokoferol sukkinat
TRAILR	: TRAIL Reseptörü
uIONP	: Aşırı Küçük Demir Oksit Nanopartikülü
UPAR	: Urokinaz Plazminojen Aktivatör Reseptörü

ZnO NP

: Çinko Oksit Nanopartikülü



ÖZET

ÇİFT HEDEFLİ BİYOUYUMLU NANOPARTİKÜLLERİN PANKREAS KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Nur NURDOĞAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR

Hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılım göstermesi sonucu çeşitli organlarda kanserin farklı türleri meydana gelmektedir. Pankreas dokusunun hem endokrin hem de eksokrin kısımlarında farklı tip kanserler gözlenmektedir. Pankreas kanseri teşhisi konulan hastaların çok azı, teşhisten sonra en fazla 5 yıl kadar yaşayabilmektedir. Hastaların çok az bir kısmı cerrahi müdahale ile tedaviye açık olmakta ve çoğu hasta kemoterapi ya da radyoterapi yöntemlerine karşı direnç göstermektedir. Bu nedenle pankreas kanserinden kaynaklı ölümlerin sayısı da her geçen gün artmaktadır.

Bir kumarin bileşiği olan eskuletin birçok çalışmada anti-kanser ajan olarak kullanılmıştır. Benzer şekilde *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilen kurkumin bileşiğinin de anti-kanser etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Nanobiyoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde hedefe yönelik nanoyapılar oluşturulabilmekte ve bu sayede daha az yan etkiyle birlikte hedef dokuda kontrollü ilaç salınımı gerçekleştirilebilmektedir. Çeşitli çalışmalar nanopartiküller ile ilaç taşınımının ilacın çıplak olarak verildiği koşullara göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Diğer yandan, oluşturulan nanopartikülün immün cevabı tetiklememesi ve tümörün daha etkin bir şekilde hedeflenebilmesi için, nanopartiküller kök hücre ve kanser hücrelerini de içeren çeşitli hücre membranları ile kaplanabilmektedir. Bu

sayede oluşturulan nanopartikülün immün sistem tarafından eliminasyonu engellenerek kanda dolaşım süresi arttırılmaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada eskuletin ve kurkuminin MiaPaCa-2 pankreas kanser hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Eskuletin, kurkumin ve kombinasyonu hem çıplak olarak hem de PLGA ile kaplı olarak hücrelere uygulanmıştır. Ayrıca, pankreatik ada türevli progenitör hücreler (PID-PC) ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler eskuletin, kurkumin ve kombinasyonlarını içeren PLGA-nanoformülasyonlar ile kaplanarak çift hedefli ve biyouyumlu nanoformülasyonun pankreas kanseri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hücre canlılığı MTT ile analiz edilmiştir. Oluşturulan nanopartiküllerin boyut analizi ‘‘Dynamic Light Scattering (DLS)’’ yöntemi ile belirlenmiş, ayrıca eskuletin ve kurkumin yüklü nanopartiküllerin *in vitro* salım profilleri diyaliz membran yöntemiyle araştırılmıştır.

MiaPaCa-2 hücrelerinin canlılığı kontrol grubuna kıyasla, eskuletinin çıplak uygulanması sonucunda anlamlı derecede azalmış, kurkuminin çıplak olarak uygulanması sonucunda anlamlı bir farklılık gözlenmemiş, eskuletin ve kurkumin kombinasyonunun uygulanması sonucunda ise anlamlı olarak azalmıştır. PLGA-Eskuletin, PLGA-Kurkumin ve PLGA-Eskuletin-Kurkumin kombinasyonunun MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanması sonucu hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir. PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler MiaPaCa-2 hücrelerine çıplak olarak uygulandığında hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla bir farklılık gözlenmemiştir. PLGA ile kaplanmış PID-PC’lerden izole edilen membran proteinlerinin yüksek dozunda MiaPaCa-2 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine anlamlı bir artış gözlenmiştir. Diğer izole edilen proteinlerin PLGA ile kaplanması sonucu yapılan uygulamada herhangi bir değişiklik olmamıştır. İzole edilen proteinlerin PLGA-Eskuletin, PLGA-Kurkumin ve kombinasyonları ile oluşturulan nanoformülasyonların MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanması ile hücre canlılıkları kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştır.

Eskuletinin PLGA’dan salınımı ilk 6 saatte oldukça yavaş iken sonrasında artan bir ivme kazanarak 48 saat sonrasında ilacın tümü salınmıştır. PLGA-Eskuletinin izole edilen proteinler ile kaplanması ilk saatlerden itibaren salım hızını arttırmıştır. Kurkumin PLGA’dan ilk 6 saatte salınım göstermezken, sonrasında salım yavaş bir şekilde ilerlemiş ve 72 saat sonrasında ilacın yalnızca %30’u salınmıştır. PLGA-Kurkumin PID-PC’den ve MiaPaCa-2’den izole edilen membran proteinler ile kaplandığında ilk 6 saat sonrasında salım hızlanmışken, PID-PC’den izole edilen sitoplazmik proteinler ile kaplandığında salım açısından bir farklılık oluşmamıştır. MiaPaCa-2’den izole edilen sitoplazmik proteinler ile kaplandığında ise kurkumin salımı gerçekleşmemiştir.

PLGA-Eskuletin-Kurkumin kombinasyonunun MiaPaCa-2 hücrelerine uygulaması sonucu hesaplanan IC50 değeri baz alınarak bu konsantrasyonda hazırlanan maddeler, oluşturulan tüm gruplara uygulanmıştır. Hem çıplak, hem PLGA kaplı, hem de izole edilen farklı proteinler ile oluşturulan nanoformülasyonlarda sadece PID-PC sitoplazmik, MiaPaCa-2 sitoplazmik ve MiaPaCa-2 membran proteinleri ile kaplı kurkumin grupları hariç tüm gruplarda apoptotik hücre ölümü gözlenmiştir. Nekrotik hücre ölümü ise araştırılan tüm gruplarda tespit edilmiştir. Kurkuminin PLGA, PID-PC sitoplazmik, PID-PC membran ve MiaPaCa-2 sitoplazmik proteinleri ile kaplı grupları hariç tüm gruplarda ROS seviyesinde kontrol gruplarına göre azalma görülmüştür.

İlk kez tarafımızca formüle edilen çift hedefli ve biyouyumlu nanoformülasyonların MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanması sonucu hücre canlılığının azaldığı ve farklı tip hücre ölümleri ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu kapsamda, yapmış olduğumuz çalışma pankreas kanseri tedavisi açısından literatüre katkı sağlamaktadır. Apoptotik hücre ölümünü hedeflemek için farklı doz ve inkübasyon sürelerinin denenmesi gerekmektedir. Çalışma ileri aşamalarda *in vivo* deneyler ile desteklenerek pankreas kanseri tedavisi için önem arz edecek nitelik kazanacaktır.

Mayıs 2024, 119. sayfa.

Anahtar kelimeler: Pankreas kanseri, Nanobiyoteknoloji, Çift hedefli nanoformülasyon, Biyouyumlu nanoformülasyon, Eskuletin, Kurkumin



SUMMARY

THE EFFECT OF THE DUAL-TARGETING BIOMIMETIC NANOPARTICLES ON PANCREATIC CANCER

M.Sc. THESIS

Ayşe Nur NURDOĞAN

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR

The various types of cancer occur in different organs due to the uncontrolled growth and spread of cells. Different types of cancers are observed in both the endocrine and exocrine parts of pancreatic tissue. Only a small percentage of patients diagnosed with pancreatic cancer can survive for up to five years after diagnosis. Few patients are amenable to surgical intervention, with most showing resistance to chemotherapy or radiotherapy methods. Therefore, the number of deaths due to pancreatic cancer is increasing day by day.

Esculetin, a coumarin compound, has been used as an anti-cancer agent in many studies. Similarly, curcumin derived from the rhizomes of the *Curcuma longa* plant has been shown to have anti-cancer effects in various studies. Advances in nanobiotechnology allow the creation of targeted nanostructures, enabling controlled drug release in target tissues with fewer side effects. Several studies have shown that drug delivery with nanoparticles is more effective than administering the drug in its naked form. Furthermore, to prevent the nanoparticle from triggering an immune response and to target the tumor more effectively, nanoparticles can be coated with various cell membranes, including stem cells and cancer cells. In this way, the

elimination of the created nanoparticle by the immune system is prevented and the circulation time in the blood is increased.

In our study, the effects of esculetin and curcumin on MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells were investigated. Esculetin, curcumin, and their combination were applied to cells both in their naked form and encapsulated in PLGA. Additionally, membrane and cytosolic proteins isolated from pancreatic islet-derived progenitor cells (PID-PC) and MiaPaCa-2 cells were coated with PLGA-nanoformulations containing esculetin, curcumin, and their combinations, and the effect of the dual-target and biocompatible nanoformulation on pancreatic cancer was examined. Cell viability was analyzed using the MTT assay. The size analysis of the nanoparticles was determined by Dynamic Light Scattering (DLS), and the *in vitro* release profiles of esculetin and curcumin-loaded nanoparticles were investigated using the dialysis membrane method.

Compared to the control group, the viability of MiaPaCa-2 cells decreased significantly when esculetin was applied in its naked form, no significant difference was observed when curcumin was applied naked a significant decrease was observed when the combination of esculetin and curcumin was applied. Applying PLGA-Esculetin, PLGA-Curcumin, and PLGA-Esculetin-Curcumin combinations to MiaPaCa-2 cells resulted in a significant decrease in cell viability compared to the control group. When membranes and cytosolic proteins isolated from PID-PC and MiaPaCa-2 cells were applied naked to MiaPaCa-2 cells, no difference in cell viability compared to the control group was observed. A significant increase in cell viability of MiaPaCa-2 cells was observed at high doses of membrane proteins isolated from PID-PCs coated with PLGA. There was no change in the application as a result of coating the other isolated proteins with PLGA. When the nanoformulations created with PLGA-Esculetin, PLGA-Curcumin, and combinations of the isolated proteins were applied to MiaPaCa-2 cells, cell viability was significantly reduced.

While the release of esculetin from PLGA was quite slow in the first 6 hours, it gained increasing rate and entire drug was released after 48 hours. Coating PLGA-Esculetin with the isolated proteins increased the release rate from the first hours. While curcumin did not release from PLGA in the first 6 hours, the release proceeded slowly thereafter and only 30% of the drug was released after 72 hours. When PLGA-Curcumin was coated with membrane proteins isolated from PID-PC and MiaPaCa-2, the release was accelerated after the first 6 hours, while there was no difference in release when it was coated with cytoplasmic proteins isolated from PID-PC. When coated with cytoplasmic proteins isolated from MiaPaCa-2, curcumin release did not occur.

The substances obtained based on the IC₅₀ value calculated after the application of the PLGA-Esculetin-Kurkumin combination to MiaPaCa-2 cells were applied to all groups created. Apoptotic cell death was observed in all groups except for the PID-PC cytoplasmic, MiaPaCa-2 cytoplasmic, and MiaPaCa-2 membrane protein-coated curcumin groups, regardless of whether they were applied naked, PLGA-coated, or coated with different isolated proteins. Necrotic cell death was detected in all investigated groups. A decrease in ROS levels was observed in all groups except for curcumin groups coated with PLGA, PID-PC cytoplasmic, PID-PC membrane, and MiaPaCa-2 cytoplasmic proteins.

It has been demonstrated that the application of dual-targeted and biocompatible nanoformulations to MiaPaCa-2 cells resulted in decreased cell viability and various types of cell deaths. In this context, our study contributes to the literature on pancreatic cancer

treatment. Different doses and incubation periods need to be tested to target apoptotic cell death. The study holds significance for pancreatic cancer treatment, especially when supported by *in vivo* experiments.

May 2024, 119. pages.

Keywords: Pancreatic cancer, Nanobiotechnology, Dual-target nanoformulation,
Biocompatible nanoformulation, Esculetin, Curcumin



1. GİRİŞ

Yaşamı birçok yönüyle tehdit eden kanser hastalığını moleküler ve hücresel seviyede anlamak, kanserin başlamasında, ilerlemesinde ve yayılmasında meydana gelen karmaşık sistemleri açığa çıkarmak, bu hastalığın teşhis ve tedavisi açısından oldukça önem arz etmektedir (Ramos ve Bentires-Alj, 2015). Kanser oluşumu insanda ve hayvan modellerinde yapılan araştırmalar sonucunda anlaşıldığı gibi normal hücrelerde meydana gelebilen bir dizi genetik değişiklikler sonucunda hücrelerin aşamalı olarak kontrolsüz büyüme ve yayılım gösteren malign türe dönüşümüyle de karakterize edilmektedir. Meydana gelen genetik değişiklikler hücrenin fonksiyonunu, normal hücre büyümesini, hücre döngüsünü ve iç dengeyi bozarak spesifik organlarda kanserin birçok ayrı türünü ve alt türünü oluşturmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hassanpour ve Dehghani, 2017). Özellikle normal hücre bölünmesinde ve büyümesinde görevli olan proto-onkogenlerin genetik mutasyonlar sonucunda kanser oluşumunu destekleyici onkogenlere dönüşmesi ve tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin bozulması kanserin kontrol edilemeyen bölünmesini desteklemektedir. Ayrıca DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik faktörler de kanser oluşumu açısından önemlidir (Hassanpour ve Dehghani, 2017). Kanser ayırt edici özellikleri büyüme sinyallerini devam ettirme ve büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınma, sınırsız bölünebilme yeteneği, programlı hücre ölümü apoptozdan kaçınma, anjiyogenez, invazyon ve metastaz olarak sınıflandırılmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Pankreas kanseri kaynaklı ölümlerin sayısı ve insidansı diğer kanser türlerine kıyasla her geçen gün artarken 2030 yılında pankreas kanserinin dünya genelinde kanser kaynaklı ölümler arasında ikinci sıraya yerleşeceği öngörülmektedir (Rahib ve diğ., 2014). Pankreas kanseri teşhisi konan hastaların çok az bir kısmı teşhisten sonraki 5 yıl yaşayabilmektedir. Bu durumun temel sebepleri arasında cerrahi müdahale ile kurtarılabilecek hastaların sayısının azlığı ve pankreas kanserinin kemoterapi, radyoterapi gibi diğer tedavi metotlarına karşı direnç göstermesidir (McGuigan ve diğ., 2018). Pankreatik intraepitel neoplazmlar, intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar ya da müsinöz kistik neoplazmlardan oluşabilen pankreatik duktal adenokarsinomlar genel olarak KRAS, CDKN2A, TP53 ve SMAD genlerinde mutasyon içermektedir (Vincent ve diğ., 2011).

Pankreas kanseri hücre soyları arasında bulunan MiaPaCa-2 hücre soyu p53, p16 ve KRAS mutasyonlarını içermektedir ve pankreas kanseri çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Deer ve diğ., 2010; Sasaki ve diğ., 2020).

Birçok bitki ve esansiyal yağın temel bir bileşeni olan kumarin ve kumarin bileşikleri kanser, yanıklar, romatizmal hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla geçmişten günümüze kadar kullanılmaktadır (Egan ve diğ., 1990). Eskuletin (6,7-dihidroksikumarin) bir kumarin bileşiği olup çeşitli bitkilerden elde edilebilmektedir. Eskuletinin birçok kanser türünde büyümeyi engelleyici ve apoptozu destekleyici etkisi olduğu bilinmektedir (Cho ve diğ., 2015). Eskuletinin pankreas kanserinde, oral skuamöz hücreli karsinomda, akciğer kanserinde ve kolon kanseri hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak hücre büyümesini azaltıp hücre ölümünü desteklediği, lösemi hücrelerinde G1 fazında hücre döngüsünü durdurarak büyümeyi engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2002; Cho ve diğ., 2015; Kim ve diğ., 2015; Arora ve diğ., 2016; Zhu ve diğ., 2018; Karatug Kacar ve diğ., 2020).

Curcuma longa bitkisinin rizomlarında bulunan kurkumin antioksidan, kanser ve inflamasyon önleyici etki gösterebilen doğal bir bileşiktir. Kurkumin bu etkilerini apoptozu destekleyerek, büyümeyi inhibe ederek ve bunun yanı sıra çeşitli sinyal yollarını, onkogen ve miRNA ifadelerini düzenleyerek göstermektedir (Sun ve diğ., 2008). Yapılan çalışmalar sonucunda kurkuminin anti-kanser etkisi pankreas kanserini de içeren meme, kolon, prostat ve mide kanseri gibi birçok kanser türünde gösterilmiştir (Aggarwal ve diğ., 2003; Li ve diğ., 2004).

Nanoteknoloji ya da nanobilim, 1-100 nm arasında değişen ölçekteki malzeme ve yapıların tasarlanması, geliştirilmesi, sentezlenmesi, incelenmesi ve uygulanmasını temel alan bilim dalıdır (Gholami-Shabani ve diğ., 2014). Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, medikal anlamda teşhis ve tedavinin de gelişmesine katkı sağlamaktadır. Günümüzde nanobiyoteknoloji kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi insan yaşamını ciddi ölçüde tehdit eden hastalıkların teşhisinde, tedavisinde ve tedavi sürecinde ilaç taşıma stratejilerinde önemli bir yere sahiptir (Ingle ve diğ., 2020).

Nanobiyoteknolojide hedefe yönelik ilaç taşınmasını sağlayan terapötik tedavi yaklaşımları ve çeşitli nano-teşhis araçlarının geliştirilebilmesi için organik ve inorganik maddeler kullanılarak nanoyapılar oluşturulmaktadır (Liang ve diğ., 2014; Mitragotri ve Stayton, 2014;

Núñez ve diğ., 2018). Hastalıkların tedavisi için hedef odaklı nanomateryallerin kullanılması daha hızlı, etkin bir tedavinin yanı sıra kontrollü ilaç salınımı ve yan etkilerin azaltılması gibi avantajlara sahiptir (Gholami-Shabani ve diğ., 2017; Singh ve diğ., 2019). Hedefli ilaç taşınımı için geliştirilen nanotaşıyıcılar, lipofilik ilaçların çözünmesine yardımcı olmaktadır. İlaçların enzimatik olarak parçalanmasından ve değişken pH koşullarından korunmasını sağlamaktadır. İlacın yalnızca hedeflenen bölgeye yönlendirilmesi yoluyla sadece hedefli bölgeye salınımı sağlanmaktadır (Ingle ve diğ., 2020). Yapılan çalışmalarda, nanopartikül kullanılarak geliştirilen ilaç taşıma sistemlerinin aynı ilacın çıplak verildiği koşullara kıyasla tümör gelişimini daha fazla engellediği ve tümör hücresi tarafından ilacın alınmasını artırarak daha fazla sitotoksositeye sebep olduğunu gösterilmiştir (Rabiee ve diğ., 2018; Wang ve diğ., 2018; Chitphet ve diğ., 2020; Xue ve diğ., 2022).

Nanotaşıyıcılar toksisiteye sebep olmak ve immün cevabı tetiklemek gibi dezavantajları bulundurabildiğinden bu sorunlara çözüm üretmek amacıyla biyobenzer nanoteknolojilerin geliştirilmesi oldukça önemli görülmektedir. Tümörün etkin bir şekilde hedeflenebilmesi, oluşturulan nanotaşıyıcın kanda dolaşım süresinin artırılması ve immün sistem tarafından eliminasyonun engellenebilmesi amacıyla nanopartiküller, kırmızı ve beyaz kan hücreleri, kök hücre ve kanser hücrelerinin membranları ile kaplanabilmektedir. Bu şekilde oluşturulan biyoyumlu nanotaşıyıcılar doğal hücre membranında bulunan ve hedefli tedavi için fonksiyonel olabilecek proteinleri de barındırmaktadır (Song ve diğ., 2022).

Çok hücreli canlılarda büyümeyi ve gelişmeyi sağlamak için hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasında evrimsel olarak bağlantılı, sıkı bir şekilde kontrol edilen bir denge bulunmaktadır (Loftus ve diğ., 2022). Çok hücreli canlılar hücre bölünmesini düzenleyerek hücre çoğalmasını ve doku homeostazını sağlarken, programlanmış hücre ölümü embriyonik gelişimde uzuv ve dokuların oluşmasında, enfeksiyonların yayılmasını önlemede ve biyolojik sistemlerin düzenlenmesinde rol almaktadır (Ameisen, 2002). Bu iki önemli süreçte meydana gelebilecek fonksiyon bozuklukları kanser başta olmak üzere nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların oluşması ile ilişkilidir. Hücre ölümü ve hücre bölünmesi arasındaki dengesizlikler kanserin hücre ölümüne direnç gösterme, büyüme sinyallerini devam ettirme ve büyüme baskılayıcılardan kaçınma gibi özelliklerine katkı sağlayarak kanser hücrelerinin çoğalmasını sağlamaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011; Loftus ve diğ., 2022). Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz hücrenin büzülmesi, kromatin

yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve apoptotik cisimlerin oluşması ile karakterizedir. Apoptozda immün sistem uyarılmaz ve apoptoz kaspazların aktive olduğu çeşitli sinyal mekanizmaları ile düzenlenir (Johnson ve diğ., 2002). Ekstrem sıcaklık değişimleri, mekanik ya da kimyasal stresler, yüksek basınç gibi etkenler hücre de büyük ölçüde hasar oluşturarak sinyal mekanizmalarından bağımsız nekrotik hücre ölümüne sebep olmaktadır. Nekrotik hücre ölümü sonucunda hücreler zar sağlamlılığını yitirerek hücre içi içeriği ekstrasellüler alana yayarlar ve bunun sonucunda immün sistem aktive olur (Green ve Llampi, 2015). Yapılan çalışmalar sonucunda apoptozun engellenmesini takiben hücrede nekrotik hücre ölümün gerçekleştiği gösterilmiştir (Golstein ve Kroemer, 2005).

Normal hücrelerde mitokondri aracılı olan iç yolaklar ve çeşitli dış yolaklar indirgenmiş reaktif oksijen türleri üretilmektedir. (Beyersmann ve Hartwig, 2008; Starkov, 2008; Li ve diğ., 2013; Bhattacharyya ve diğ., 2014; Yang ve diğ., 2018). Bu türler, normal hücre fonksiyonlarının yanında kanser oluşumu ve ilerlemesi için bir avantaj ya da dezavantaj oluşturabilmektedir. Yapılan çalışmalarda orta ve düşük düzeyde ROS'un kanser ilerlemesini desteklediği, yüksek düzeyde ROS oluşumunun ise apoptoz ve nekroza sebep olduğu gösterilmiştir (Wiseman ve Halliwell, 1996; Sena ve Chandel, 2012; Gorrini ve diğ., 2013; Okon ve Zou, 2015; Perillo ve diğ., 2020). Diğer yandan yapılan bazı çalışmalarda, kanser hücresinde ROS artışının engellenmesinin sonucunda hücre içinde azalan ROS seviyesi ile birlikte hücre canlılığının da azaldığı ve hücre ölümünün gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2017). ROS'un bu iki taraflı etkisinden dolayı, bu türlerin hücre ölümüyle ilişkili olarak incelenmesi kanser tedavi yaklaşımları için önem arz etmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada PID-PC ve MiaPaCa-2 kanser hücrelerinden elde edilen membran ve sitozolik proteinler ile kaplanmış, kurkumin ve eskuletin içeren PLGA-nanoformülasyonlarının çift hedefli olarak pankreas kanseri üzerindeki olası etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda oluşturulan gruplara belirlenen dozlarda maddeler MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanmış ve 72 saat sonrasında hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Akabinde, hücre canlılığının azaldığı dozlarda hücre ölüm tipi araştırılmıştır. İlk kez sentezlenen bu çift hedefli biyouyumlu nanopartiküllerin pankreas kanser hücresi üzerine olan etkilerinin incelenmesi çalışmanın özgün değerini artırmakta olup, çalışmadan elde edilen veriler pankreas kanseri tedavisi açısından literatüre önemli katkılar sunacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser geçmişten bugüne insan yaşamını tehdit eden önemli bir hastalıktır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) verilerine göre, 2020 yılında dünya genelinde 19,3 milyon yeni kanser vakası görülürken, kanser dünya genelinde yaklaşık olarak 10 milyon insanın ölümüne neden olmuştur (Ferlay ve diğ., 2021).

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve belirli bir bölgeden vücudun başka bölümlerine yayılım gösteren hücreler ile karakterize edilmiş hastalık olarak tanımlanmaktadır (Matthews ve diğ., 2022). Kanser köken aldığı doku, kanser türlerinin ayırt edici özelliklerini oluşturduğundan sınıflandırmada önem arz etmektedir. Epitel hücrelerden kaynaklanan kanser karsinoma olarak sınıflandırılırken, mezoderm hücrelerden köken alan kanser sarkoma, glandüler dokulardan kaynaklanan kanser ise adenokarsinom olarak sınıflandırılmaktadır (Pecorino, 2021). Anormal büyüme gösteren hücrelerin oluşturduğu hücre kütlesi (neoplazma), benign ya da malign tümöre dönüşebilir. Herhangi bir dokuda oluşabilen benign tümörler oluştukları dokuya göre lokal olarak etki gösterebilirler ancak vücudun başka bölgelerine yayılım göstermezler. Ancak malign tümörler invazyon ve metastatik özellik gösteren kanserlerdir (Franks ve Teich, 1997).

Normal hücrelerde hücre bölünmesi evrimsel olarak korunmuş kontrol noktaları ile sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Bu kontrol mekanizmaları hücre bölünmesi için uygun olan hücre büyüklüğünü, DNA replikasyonunun doğruluğunu, kromozomların bütünlüğünü ve mitoz evresindeki hassas dağılımlarını kontrol eder (Barnum ve O'Connell, 2014). DNA'da meydana gelen hasar hücre döngüsünün durmasına ve tamir mekanizmalarının başlatılmasına neden olur. DNA hasarı, genomun maruz kaldığı birçok genotoksik ajan sebebiyle oluşmaktadır. Bu ajanlar mutajenik kimyasallar, radyasyon, virüsler gibi eksojen kaynaklı olabildiği gibi ROS gibi endojen kaynaklı da olabilir (Lutfi ve diğ., 2021). DNA'da oluşan hasar c-myc gibi proto-onkogenlerin aktive olmasına ya da p53 gibi tümör supresörlerin fonksiyon kaybına sebep olabilir (Koeffler ve diğ., 1991). Hücre döngüsü kontrolünde yaşanan fonksiyon bozuklukları ve mutasyonlar tümör oluşumu açısından oldukça önemlidir. Hücre döngüsünde yer alan sinyal yollarında meydana gelen mutasyonlar, hücre ölümü ile

ilişkili gen *p53*'deki mutasyonlar ve hücre döngüsünden çıkışı kontrol eden kontrol mekanizmasındaki mutasyonlar kanserde sıklıkla görülmektedir (Matthews ve diğ., 2022). Tümör oluşumunda genetik faktörlerin yanı sıra epigenetik faktörlerde oldukça etkilidir. Memelilerin normal gelişimi ve gen ekspresyonu için gerekli olan ana mekanizmalardan epigenetik, DNA sekansındaki değişikliklerden bağımsız olarak gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişikliklerle ilgilidir. Bu değişikliklere örnek olarak DNA'nın metilasyonu, histon proteini modifikasyonları ve ayrıca kodlamayan RNA'ların ekspresyonu verilebilir. Epigenetik mekanizmalardaki meydana gelebilecek bozulmalar kanser oluşumu ve ilerlemesindeki ana sebepler olarak kabul edilmektedir (Sharma ve diğ., 2010).

Bir mutasyona uğramış hücre, tümör oluşumuna sebebiyet verebilir. Diğer yandan, tümörler farklı belirteçler, farklı hücre popülasyonları ve kanser kök hücrelerini de barındıran oldukça heterojen yapılardır. Bu heterojen yapı, tümör mikro-çevresini oluşturmaktadır ve bu mikro-çevre tümör büyümesini, ilerlemesini, metastazını ve hatta terapi direnci oluşmasına neden olmaktadır (Nassar ve Blanpain, 2016). Tümör mikro-çevresinde endotel hücreler, kanser ile ilişkili fibroblastlar, mezenkimal kök hücreler ve bazı immün sistem elemanları yer almaktadır. Bu hücreler birbirleriyle hücre-hücre ve hücre-matriks kontak etkileşimlerinin yanı sıra sitokinler, büyüme faktörleri ve çeşitli sinyal mekanizmaları aracılığıyla da iletişim kurmaktadır (Barbato ve diğ., 2019).

Kanserin ayırt edici özelliklerinin anlaşılması kanserin tespiti ve tedavisi için oldukça önemlidir. Hanahan ve Weinberg (2011), kanserin altı ayırt edici özelliğini; çoğalma sinyalini sürdürmek, sınırsız replikasyon yeteneği, yeni damar oluşumu (anjyogenez), büyüme baskılayıcılardan kaçmak, hücre ölümüne direnç göstermek, invazyon ve migrasyon yeteneği olarak belirtmişlerdir. Bunların yanı sıra, enerji metabolizmasını yeniden düzenlemek ve immün sistem elemanlarından kaçış da kanserin ayırt edici özelliği olarak tanımlanmıştır. Genom stabilitesinin bozulması ve mutasyonların yanı sıra, tümör destekleyici inflamasyonunda kanserin bu ayırt edici özelliklerinin oluşmasında katkısı olduğu ifade edilmiştir.

2.2. PANKREAS KANSERİ

Pankreas kanseri, dünya genelindeki en yıkıcı ve ölümcül kanser türlerinden biridir. Diyabet, inflamasyon, sigara ve alkol kullanımı pankreas kanseri riskini arttıran faktörler arasındadır.

Dünya genelinde kadınlara kıyasla erkeklerde daha fazla pankreas kanseri görülmektedir (McGuigan ve diğ., 2018). 2020 yılında kanser kaynaklı ölümler arasında yedinci sırada olan pankreas kanserinin, 2030 yılına gelindiğinde ikinci sıraya geleceği öngörülmektedir (Rahib ve diğ., 2014; Sung ve diğ., 2021).

Pankreas kanseri hastalarının yalnızca %15'i cerrahi müdahale ile tedaviye uygundur ve tedavi kemoterapi veya radyoterapi yaklaşımları ile desteklenmeye çalışılmaktadır (McGuigan ve diğ., 2018; Shi ve diğ., 2021; Wójcik ve diğ., 2021). Pankreas kanserinde sık tercih edilen kemoterapi tedavisi FOLFIRINOX olarak bilinen kemoterapi kombinasyonudur. Bu ilaç kombinasyonu 5-fluorourasil, folinik asit, irinotekan ve oxaliplatinden oluşmaktadır. Ayrıca gemsitabin ve gemsitabine ek olarak nab-paklitaksel kullanımı da hastalığı ilerlemiş hastalar için temel tedavi olarak kullanılmaktadır (Mizrahi ve diğ., 2020). Diğer yandan, birçok pankreas kanseri hastası, hastalık ileri evrelere gelene kadar semptom göstermemektedir. Bu sebeple geç teşhis yapılmakta, kötü prognoz ve hastalarda yüksek oranda görülen terapi direnci nedeniyle tedavi kısıtlanmakta ve ölüm oranı artmaktadır (Sun ve diğ., 2020). Pankreas kanserine ve ilerlemesine neden olan moleküler mekanizmaların anlaşılması, yeni biyo-belirteçlerin ve tedavi yaklaşımlarının keşfedilmesi hastalığın tedavisi için hayati önem taşımaktadır.

Çevresel faktörlerin yanı sıra, kalıtsal risk faktörleri de pankreas kanser oluşumunda önemli bir yere sahiptir. Özellikle bazı ailevi kanser sendromları, pankreas kanseri riskini arttırmaktadır. Tümör baskılayıcı gen *STK11*'deki mutasyondan kaynaklanan Peutz-Jeghers sendromu, *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonları ile karakterize olan kalıtsal meme ve yumurtalık kanser sendromu ve *CDKN2A* mutasyonları pankreas kanseri oluşumu için de risk faktörleri arasındadır (Benzel ve Fendrich, 2018).

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) tüm pankreatik tümörler içerisinde en sık görülen türdür ve dolayısıyla ekzokrin pankreasın malign hali ile ilişkilidir. Pankreatik intraepitel neoplazmlar (PanIN) olarak tanımlanan öncü lezyonlardan gelişen PDAC, genetik değişikliklerin kazanılmasıyla adım adım ilerler. PanIN pankreatik duktal adenokarsinomun bilinen üç lezyonlarından biridir. Azınlık olarak bazı pankreatik duktal adenokarsinomlar, intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar (IPMN) ya da müsinöz kistik neoplazmlardan (MCN) oluşabilmektedir (Mihaljevic ve diğ., 2010). Pankreas kanseri ile ilişkili dört ana gen bulunmaktadır. Bunlardan ilki büyüme faktörü reseptörleri ile ilişkili sinyal mekanizmasını

düzenleyen GTPaz molekülünü kodlayan *KRAS*'dır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar pankreas kanserinin büyük çoğunluğunda görülen mutasyonlardır. Ayrıca *KRAS* mutasyonları pankreas kanserinin birinci ve ikinci evresi ile ilişkilendirilmektedir (Wood ve Hruban, 2012). İkinci olarak hücre döngüsünde önemli düzenleyici rolü bulunan *CDKN2A* tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlarda pankreas kanserinde sıklıkla görülmektedir. Diğer tümör baskılayıcı genler olan *TP53* ve *SMAD*'da meydana gelen kritik mutasyonlar ise pankreas kanserinin üçüncü ve dördüncü evrelerinde gözlenmektedir (Kamisawa ve diğ., 2016).

2.3. PANKREAS KANSER HÜCRE SOYLARI

Pankreas kanseri hücre soyları farklı fenotip ve genotipleri içermektedir. Bu sebeple birçok açıdan birbirleri arasında çeşitlilik gösterirler. En çok referans alan pankreas kanseri hücre soyları arasında MiaPaCa-2, AsPC-1, PANC-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, HPAC, CFPAC-1, HPAF-II, Hs 766T ve SU.86.86 hücre soyları bulunmaktadır (Deer ve diğ., 2010). Bu hücre soyları tümör büyümesini ve metastazı da etkileyen hücre-hücre, hücre-ekstrasellüler matriks (ECM) etkileşimleri ve yüzeylerinde bulunan ECM reseptörleri; pankreas kanseri yayılımını destekleyen kanser hücre göçü ve invazyonu; anjiyogenez potansiyeli ve *in vivo* tümör oluşturma kapasitesi gibi özellikler açısından özgünlerdir (Albini ve diğ., 1987; Löhr ve diğ., 1996; Korc, 2003; Sipos ve diğ., 2003; Loukopoulos ve diğ., 2004). Bu özgünlük sebebiyle yapılan çalışmanın amacına uygun olarak çalışılacak pankreas kanseri hücre soyunun belirlenmesi gerekmektedir.

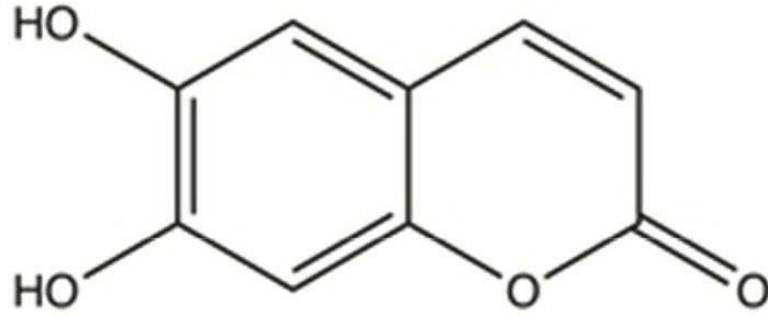
2.3.1. MiaPaCa-2 Hücre Soyu

MiaPaCa-2 hücre soyu pankreatik duktal adenokarsinoma sahip hastaya ait tümör dokusundan elde edilmiştir. Bu hücre hattı p53, p16 ve *KRAS* mutasyonlarını içermektedir (Deer ve diğ., 2010). 2D kültür ortamında yapışık halde bulunan MiaPaCa-2 hücreleri hem yuvarlak hem de iğ şeklinde morfolojiye sahipken, aynı zamanda yüzen yuvarlak şekilli hücreler de bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yuvarlak yapışkan MiaPaCa-2 hücrelerinin yüzen MiaPaCa-2 hücrelerini oluşturduğu ve bu hücrelerin yapışık hücrelere kıyasla daha düşük oranda integrin ve ABC taşıyıcısı eksprese ettiği anlaşılmıştır. Ayrıca, yüzen MiaPaCa-2 hücrelerinde epitel mezankimal dönüşüm (EMT) belirteçleri yapışkan hücrelere göre artmışken, yüzen hücreler daha az kanser kök hücre özelliği barındırmaktadır. Yapışma

özelliği gösteren MiaPaCa-2 hücreleri pankreas kanserinde kanser oluşumu, metastaz ve ilaç direnci çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Sasaki ve diğ., 2020).

2.4. ESKULETİN

Eskuletin (6,7-dihidroksikumarin), Asya ülkelerinde bitkisel tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan ve *Fraxinus rhynchophylla* Hance bitkisinin ana biyoaktif elemanı olarak bilinen kumarin bileşiğidir (Zhang ve diğ., 2022). Moleküler yapısına bakıldığında, 6. ve 7. karbon atomlarında iki hidroksil grubu bulundurmaktadır (Şekil 2.1). Eskuletinin yapısında bulunan bu hidroksil gruplar sayesinde eskuletin, oksidatif stres içeren hastalık koşullarında antioksidan olarak davranmaya elverişli hale gelmektedir. Ayrıca, bu gruplar serbest radikaller ile kolayca bağ kurabilir ve geçici metallerin şelasyonunu da sağlayabilirler (Garg ve diğ., 2022). Bu özellik sebebiyle antioksidan olarak etki gösteren eskuletinin anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkileri de bilinmektedir. Eskuletin, diyabetten kansere, Alzheimer hastalığından ateroskleroza birçok hastalığın tedavisi için aday ilaç olma potansiyeli taşımaktadır (Zhang ve diğ., 2022).



Şekil 2.1: Eskuletinin moleküler yapısı (Zuo ve diğ., 2020).

2.4.1 Eskuletinin Kanserde Etkileri

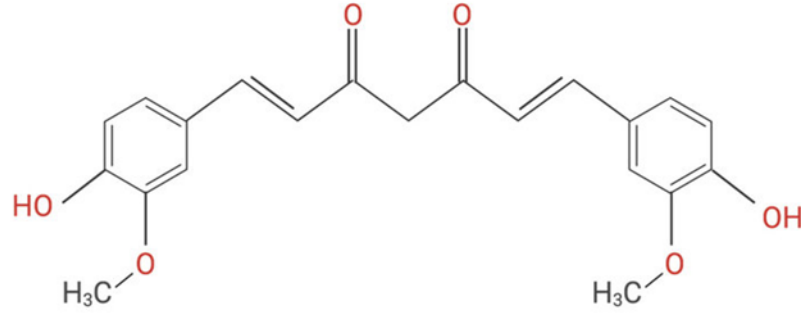
Eskuletinin temel özellikleri arasında antioksidan ve anti-inflamatuar özellikler bulunmaktadır. Eskuletin ayrıca anti-apoptotik ve apoptoz tetikleyici rolleri sebebiyle apoptotik hücre ölümünde çift yönlü düzenleyici etkiye de sahiptir (Zhang ve diğ., 2022). Eskuletinin bu etkileri yapılan birçok kanser çalışmasında araştırılmıştır. Bir çalışmada, 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) uygulaması ile hamster bukkal kese karsinogenez modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan bu modelde eskuletinin, ROS'un istenmeyen etkilerini azaltarak,

lipit peroksidasyonunu engelleyerek ve detoksifikasyon ajanlarını tümör baskılaması yönünde uyararak tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Selvasundaram ve diğ., 2018). Başka bir çalışma, eskuletinin C2C12 miyoblast hücre soyunda H_2O_2 kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkisini kanıtlamıştır (Han ve diğ., 2017). Eskuletin, HT-29 insan kolon kanseri hücre soyunda endoplazmik retikulum stresini uyararak, SMMC-7721 insan hepatosellüler karsinom hücre soyunda kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu ve Bax ekspresyonunu uyararak, Bcl-2 ifadesini azaltarak ve mitokondriden salınan sitokrom-c seviyesini artırarak apoptoz destekleyici etki göstermiştir (Kim ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2017). Eskuletin anti-kanser etkilerini, insan uterus adenokarsinoması olan HEC-1B ve Ishikawa hücre soylarında, HL-60 lösemi hücre soyunda, MGC-803, HGC-27 ve BGC-823 mide kanseri hücre soylarında, SMMC-722 karaciğer kanser soyunda ve yine karaciğer kanser soyu Hepa-16 hücrelerinin implante edildiği fare modellerinde, A549 ve LLC akciğer kanseri hücre soyunda ve bu hücreler ile oluşturulan fare modellerinde, 786-O ve SN12-PM6 böbrek kanseri hücre soylarında hücre çoğalmasını engelleyerek, apoptozu indükleyerek, hücre döngüsünü durdurarak veya invazyon/migrasyonu engelleyerek göstermiştir (Wang ve diğ., 2015; Wang ve diğ., 2017; Zhu ve diğ., 2018; Li ve diğ., 2019; Wang ve diğ., 2019; Duan ve diğ., 2020; Jiang ve diğ., 2021; Zhang ve diğ., 2022). Bunun yanı sıra eskuletin oksidatif DNA hasarı oluşturulmuş kolon kanseri sıçan modellerinde oksidatif stresi ve tümör oluşumunu azaltarak ilgili dokularda koruyucu bir etki göstermiştir (Kaneko ve diğ., 2007). Kim ve diğ., (2015), SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre soyunda çinko oksit nanopartikülünün (ZnO NP) neden olduğu nörotoksisiteye karşı eskuletinin koruyucu etkisini araştırmıştır. ZnO nanopartikülleri SH-SY5Y hücre soyunda apoptozu ve nekrozu indükleyerek hasara yol açarken, eskuletin uygulaması ROS oluşumunu, nekrozu ve PI3K/Akt yolağının aktivasyonunu baskılayarak apoptozun aktivasyonunu doza bağlı olarak engellemiştir.

Eskuletinin pankreas kanseri üzerindeki etkisini detaylı olarak inceleyen çalışmalar oldukça azdır. Farklı dozlarda etkisi incelenen eskuletinin PANC-1, MiaPaCa-2 ve AsPC-1 hücre soylarında zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı saptanmıştır (Arora ve diğ., 2016). Eskuletinin pankreatik beta hücre tümörü olan INS-1 hücre soyunda *in vitro* etkisini incelemek ve eskuletinin hücrelere hedefli olarak gitmesini sağlamak amacıyla yapılan çalışmada, eskuletinin hücre canlılığını azaltarak, hücre çoğalmasını engellediği ve nekrotik hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir (Karatug Kacar ve diğ., 2020).

2.5. KURKUMİN

Geçmiş zamanlardan bugüne gıda ürünü, kozmetik ve tıpta kullanılan zerdeçal, *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından elde edilmektedir. Yetiştigi toprak koşullarına ve kökenine göre zerdeçal %2 ile %9 arasında değişen kurkuminoidleri içermektedir. Kurkuminoidler başta kurkumin olmak üzere, demetoksikurkumin, bis-demetoksikurkumin, ve siklik kurkumin gibi türleri içeren gruba verilen genel addır (Priyadarsini, 2014). Aynı zamanda diferuloylmetan olarak da bilinen kurkumin, kurkuminoidlerin temel doğal bileşenidir ve zerdeçalın rizomlarında bulunan polifenolik bir renklendiricidir (Goel ve diğ., 2008; Hatcher ve diğ., 2008). Kurkuminin moleküler yapısı, α , β -doymamış β -diketon parçasını içeren yedi karbonlu bağlayıcı ile bağlanmış o-metoksi fenolik grupları barındıran iki aromatik halkadan oluşmaktadır (Şekil 2.2) (Wahab ve diğ., 2020).



Şekil 2.2: Kurkuminin moleküler yapısı (Wahab ve diğ., 2020).

2.5.1 Kurkuminin Kanserde Etkileri

Antioksidan, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-mutajenik ve anti-kanser özellikler göstermesinden dolayı kurkumin, özellikle Asya ülkelerinde geleneksel olarak kullanılan, tıbbi bir bitkidir (Hewlings ve Kalman, 2017). Kuttan ve diğ. (1985) yaptıkları çalışmada, kurkuminin anti-kanser aktivitesini *in vitro* ve *in vivo* modellerinde göstererek bu etkinin ilk kanıtlarını ortaya koymuşlardır. Sonrasında, kurkuminin bu etkileri pankreas kanserini de içeren miyeloid lösemi, meme kanseri ve rahim ağzı kanseri gibi farklı kanser türlerinde araştırılmıştır (Aggarwal ve diğ., 2006; Bimonte ve diğ., 2013; Kanai, 2014; Boroumand ve diğ., 2018; Ghasemi ve diğ., 2019; Kunihiro ve diğ., 2022). Kurkumin birçok molekülün gen

ekspresyonu ve sinyal mekanizmalarını düzenleyerek etkisini göstermektedir. Kanserde önemli görülen biyolojik olaylarda etki gösteren transkripsiyon faktörleri, sitokinler, enzimler, büyüme faktörleri, reseptörler ve p53 gibi apoptoz ile ilişkili proteinler ile de ilişkili bir bileşendir (Perrone ve diğ., 2015; Wahab ve diğ., 2020). Yapılan çalışmalarda kurkuminin, NF- κ B, TGF β , Wnt/ β -katenin, PI3K/Akt ve Hedgehog sinyal yolları aracılığıyla kanserde proliferasyon, invazyon ve metastazı engellediği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2015; Cao ve diğ., 2016; Ghasemi ve diğ., 2019; Li ve diğ., 2020; Kunihiro ve diğ., 2022). Li ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmada yüksek glikozun hücre proliferasyonuna neden olduğu BxPC-3 pankreas kanseri hücre soyunda kurkuminin bu etkiyi azalttığını ve EGF/ERK ve EGF/Akt sinyal yollarını inhibe ederek kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu engellediğini göstermişlerdir. Ayrıca, kurkuminin çeşitli kanser hücre soylarında hücre ölümünü, sinyal yolları ile ilişkili hücre içi transkripsiyon faktörlerini aşağı-regüle ederek ya da baskılayarak indüklediği gösterilmiştir (Kabir ve diğ., 2021).

Kanser hastaları ile yapılan klinik çalışmalar 8-12 gram oral dozlarda kurkuminin hastalar tarafından tolere edilebildiğini ve hastalarda düşük oranda yan etkiye sebep olduğunu göstermiştir (Lao ve diğ., 2006; Dhillon ve diğ., 2008). Ancak kurkuminin biyoelverişliliğinin ve kimyasal stabilitesinin az olması sebebiyle kan dolaşımındaki oranı oldukça azdır. Bu durum pankreas kanseri hedefli tedaviyi zorlaştırmaktadır (Schwarz ve diğ., 2020). Dolayısıyla son zamanlarda, pankreas kanserinde yapılan çalışmalar kurkuminin etkisini kanıtlamanın yanı sıra, biyoelverişliliği ve hedeflemeyi arttırmak için yeni bakış açıları da sunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, arginin-glisin peptidi ve insan serum albumin kullanılarak oluşturulan gemitabin-kurkumin nanopartikülünün (RGD-HSA-GEM/CUR) tümör hedefli etkinliğinin, SW1990 kanser hücrelerinde ve fare modellerinde çıplak haldeki gemitabin ve kurkumine kıyasla daha fazla olduğu gösterilmiştir (Ma ve diğ., 2022). Zhao ve diğ., (2015) 5-40 μ M arasında değişen kurkuminin doza bağımlı olarak PANC-1 pankreas kanseri hücre soyunda PI3K/Akt sinyal yolağını inhibe ederek hücre canlılığını ve çoğalmayı azalttığını, hücre döngüsünün durmasına ve apoptozun artmasına neden olduğunu göstermişlerdir. PANC-1 hücre soyunda yapılan başka bir çalışmada, 20 μ M kurkumin hipoksik ortam sebebiyle artan hücre popülasyonunu azaltmıştır. Ayrıca EMT ile ilişkili proteinleri düzenleyerek ve Hedgehog sinyal yolağını baskılayarak invazyon ve migrasyonu engellemiştir (Cao ve diğ., 2016). INS-1 hücrelerinde yapılan bir çalışmada kurkuminin diğer çalışmalarda görülen sitotoksik etkisinin yanı sıra bu çalışmada hücre koruyucu etkisinin

olduğunu gösterilmiştir. Çalışmada, hipoksi koşullarındaki INS-1 hücrelerine çeşitli dozlarda kurkumin yüklenen R3V6 peptit miselleri (R3V6-kurkumin) verildiğinde, R3V6-kurkuminin bu deney grubuna ait hücrelerde doza bağlı olarak ROS oluşumunu ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Han ve diğ., 2016). MiaPaCa-2 hücre soyunda yapılan çalışmalarda, kurkuminin NF- κ B'yi aşağı-regüle ederek hücre çoğalmasını engellediği ve apoptozu artırdığı gözlenmiştir (Bimonte ve diğ., 2013). Sentetik kurkumin analogu olan EF24'ün de MiaPaCa-2 hücre soyunda ve bu hücrelerle oluşturan ksenograft fare modellerinde, NF- κ B aktivasyonunu engelleyerek tümör oluşumunu inhibe ettiği ve apoptozu uyardığı gözlenmiştir (Bisht ve diğ., 2016).

2.6. NANOBIYOTEKNOLOJİ

Hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçların hedefli olarak ilgili dokuya gitmesi tedavinin etkinliği için oldukça önemlidir. Geleneksel yollar ile hastaya verilen ilaçların hedeflenmeyen dokularda birikme göstermesi, kanda stabilitelerinin az olması ve istenmeyen yan etkilerinin fazla olması sebebiyle günümüzde kontrollü ilaç taşınması ile ilgili çalışmalar oldukça dikkat çekmektedir (Wilczewska ve diğ., 2012).

Nano eki Yunanca'da "cüce" anlamına gelen nanos kelimesinde türetilmiştir ve günümüzde bir birimin milyarda birini (10^{-9}) tanımlamak için kullanılmaktadır (Joudeh ve Linke, 2022). Nanoteknoloji, biyoteknoloji, kimyasal ve fiziksel metodolojiyi birleştiren nanobiyoteknoloji, boyutları 1-100 nm arasında değişen nanometaryellerin sentezini, üretimini ve kullanımını temel alan multidisipliner bir alandır. Nanobiyoteknoloji biyomateryallerin sentezinde yukarıdan aşağıya inşa ve aşağıdan yukarıya inşa olmak üzere iki temel yaklaşımdan faydalanmaktadır. Yukarıdan aşağıya inşa yaklaşımında biyomateryal bir bütünün parçalarına indirgenmesiyle üretilirken, aşağıdan yukarıya inşa yaklaşımında materyal küçük birimlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulmaktadır (Klevenz, 2004). Boyutları 100 nm'den küçük olan nanomateryaller sınıflandırılırken boyut esas alınmaktadır. Örneğin, üç boyutu da nano ölçekte yer alan nanopartiküller sıfır-boyutlu (0-D) nanomateryaller olarak sınıflandırılırken, nanoçubuklar, nanotüpler, nanoteller gibi bir boyutu nano ölçeğin dışında olan materyaller tek-boyutlu (1-D) nanomateryaller olarak sınıflandırılmaktadır. Benzer bir mantıkta iki boyutu nano ölçeğin dışında olan materyallere iki-boyutlu (2-D) nanomateryaller (nanofilmler, nanotabakalar) ve hiçbir boyutu nano ölçekte olmayan materyallere üç-boyutlu (3-D) nanomateryaller ya da bulk nanomateryaller denilmektedir (Joudeh ve Linke, 2022).

Boyutları 10-100 nm arasında değişen nanopartiküller şekil, boyut, yüzey özellikleri ve yapı itibarıyla farklılıklar göstermektedir. Nanopartiküller yapısal özellikleri bakımından organik nanopartiküller, metalik (inorganik) nanopartiküller ve ikisinin karışımı olan yarı-iletken nanopartiküller olarak üç ana gruba ayrılmaktadır. Karbonhidratlar ve proteinler gibi doğal polimerler nanopartikülleri oluşturmak için kullanılabileceği gibi poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA), poli (glikolik asit), poli (laktik asit) gibi sentetik polimerler de kullanılabilmektedir. Ayrıca, polimerlerle kaplanarak oluşturulmuş nanopartiküller kontrollü ilaç salınımı, hedefli bölgeye yüksek oranda ulaşma gibi avantajlar barındırmaktadır (Khan ve diğ., 2015).

Nanobiyoteknolojideki çalışmalar nanopartiküllerin ilaç taşınması ve kontrollü salınımı için kullanılmasının umut vadeden bir yol olduğunu göstermektedir (Wilczewska ve diğ., 2012; Yang ve diğ., 2021; Liu ve diğ., 2022). Boyutlarının küçük olması sebebiyle nanotaşıyıcılar; özel fizyokimyasal ve biyolojik özellik göstermekte, dokulara ve hücrelere kolayca erişebilmekte ve ilaçların kan dolaşımındaki sürelerini artırmaktadır (Wilczewska ve diğ., 2012). Ayrıca, nanopartiküller artmış geçirgenlik ve tutunma (EPR) etkisine sahip olduklarından tümör dokusuna çıplak halde verilen ilaçlara kıyasla, hedefli dokuda daha az ilaç ile daha fazla etki göstermekte ve daha az istenmeyen yan etkiye sebep olmaktadır (Yang ve diğ., 2021). Yapılan bir çalışmada fare melanom modellerinde, daha önce anti-tümör etki gösterdiği bilinen kemoterapötik Doksorubisin (DOX) kanda kalış süresini daha da artıran polietilen glikol (PEG) ile kaplanmış PLGA-nanopartiküllerine (NP) yüklenerek fare modellerine uygulanmıştır. Doksorubisinin PLGA-nanopartiküllerine yüklenmiş hali DOX'a göre daha iyi sonuçlar göstermiştir (Chitphet ve diğ., 2020). Başka bir çalışmada, anti-neoplastik İfosamid (IFS), lipid-çekirdekli-nanokapsüle (LNC) yüklenerek MG63 kemik kanseri hücrelerine uygulanmıştır. IFS-LNC çıplak halde verilen IFS'ye göre hücre canlılığını daha fazla azaltmış, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ifadesini ve apoptozu daha fazla artırmıştır (Wang ve diğ., 2018). Pankreas kanseri tedavisi için kemoterapötik bir ilaç olan İrinotekanın aktif metaboliti SN38 (10 mg), kanser dokusuna hedefli olarak gitmesi için IGF-1 eklenmiş aşırı küçük demir oksit nanopartikülüne (uIONP) yüklenerek MiaPaCa-2 ve Panc02 hücrelerine uygulanmıştır (Xue ve diğ., 2022). Sonuçta çıplak halde verilen SN38'e göre, oluşturulan IGF1-uIONP/SN38 nanopartikülü MiaPaCa-2 ve Panc02 hücrelerinde hücre canlılığını daha fazla azaltmış ve SN38'in çıplak halde verilmesinin aksine normal HEK293 hücrelerine toksik etki oluşturmamıştır. Ayrıca, IGF1-uIONP/SN38 nanotaşıyıcısında apoptozu uyarmak

için gereken SN38 dozunun, çıplak halde verilen SN38 dozundan daha az olduğu gösterilmiştir (Xue ve diğ., 2022).

Nanotaşıyıcılar tek bir ilaç taşıyabildikleri gibi birden fazla ilacı aynı anda taşıyabilme yeteneğine de sahiptir. Bu sayede kanser tedavisi için birden fazla sinyal yolağı, ya da ilişkili protein hedeflenebilmektedir. Yapılan bir çalışmada tek başına verildiğinde ilaç direncine ve STAT3'ün aşırı eksprese olmasına sebep olan EGFR inhibitörü Erlotinib (ERL) ve STAT3 inhibitörü Alantolakton (ALA), PLGA-nanopartikülüne yüklenerek çift hedefli nanopartikül (AE@NP) elde edilmiştir. Pankreas kanseri hücre soyları PANC-1 ve Patu8988T'ye AE@NP uygulandığında hücre canlılığı, koloni oluşumu, migrasyonun azaldığı ve apoptozun arttığı gösterilmiştir (Bao ve diğ., 2021).

2.7. HEDEFLİ TEDAVİ

Nanotaşıyıcıların birçok kanser türünde etkinliği kanıtlanmış olsa da geleneksel nanotaşıyıcıların kullanımı anormal tümör mikroçevresi sayesinde kısıtlanmakta ve dolaşımdaki birçok bariyer sebebiyle nanotaşıyıcılar toksisite gösterebilmektedir. Bu sebeple, son zamanlarda hem hedefli olarak dokuya gidebilen hem de istenilen durumda ilaç salınımını gerçekleştirebilen, uyaranlara duyarlı ilaç taşıma sistemleri geliştirilmektedir. Nanopartiküllerin yüzeyi hedeflenme sağlayan ajanlarla birleştirilerek partikülün ve partiküle yerleştirilmiş ilaç molekülünün yalnızca hedefli dokuya gitmesi sağlanarak, hedefli olmayan dokularda birikme önlenmeye çalışılmaktadır (Kaushik ve diğ., 2022). Tang ve diğ. (2022) meme kanserinde etkinliği kanıtlanmış kamptotesini (CPT) pH duyarlı hidrazan bağları ile PLGA nanopartikülüne bağlamış, daha sonra diğer etkili ilaç metformini (Metf) partikülün içine yüklemiş, ayrıca partikül yüzeyine CGKRRK peptitleri ekleyerek tümöre yönelen çift ilaç yüklü pH duyarlı nanotaşıyıcı elde etmişlerdir. Oluşturulan nanopartikül CNP/CPT-Metf, CGKRRK peptidi içermeyen nanopartikül (NP/CPT-Metf) ve çıplak halde kamptotesin+metformin, meme kanseri hücre soyları MDA-MB-231, HCC1806 ve bu hücrelerle tümör oluşturulmuş tip 2 diyabetli fare modellerine uygulanmıştır. Elde edilen bulgular, CNP/CPT-Metf'in, CGKRRK peptidi içermeyen nanopartiküle kıyasla daha fazla oranda tümör hücrelerinde ve meme kanseri dokusunda biriktiğini, apoptozu indükleyerek hücre canlılığını ve tümör büyümesini (tümör ağırlığını) azalttığını göstermiştir. Başka bir çalışmada, araştırmacılar pH'a duyarlı asetal grubu içeren polikarbonat yapı iskelesini (poli (NTC)) PEG ve kamptotesin ile birleştirerek bir nanopartikül oluşturmuşlardır. Oluşturulan

bu nanopartikül A549 akciğer kanseri hücre soyu, PC3 prostat kanseri hücre soyu, MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre soylarında 0-100 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda uygulandığında çıplak uygulanan forma göre kanser hücre proliferasyonunu anlamlı derecede azaltmıştır. Oluşturulan bu nanopartikül aynı konsantrasyonlarda sağlıklı epitel ve fibroblast hücre soylarına (IMR-90 (insan akciğer fibroblastı), HS792 (insan fibroblastı), CHO-K1 (hamster yumurtalık hücreleri), NIH-3T3 (fare fibroblastı)) uygulandığında hücre çoğalmasını etkilememiştir (Arno ve diğ., 2023).

2.8. MEMBRAN PROTEİNİ İLE KAPLI NANOPARTİKÜLLER VE KANSER TEDAVİSİNDE ETKİLERİ

Geleneksel nanopartiküller ile tedavinin karşılaştığı sorunlara çözüm üretmek ve kanser hastalarında kişiye özgü tedaviyi sağlamak amacıyla oluşturulan çeşitli hücre membranları ile kaplanmış nanopartiküller (CMCNs) hem teşhis hem de tedavi için büyük potansiyel taşımaktadır (Chen ve diğ., 2021). Tümör-mikroçevresine gönderildiklerinde hücre membranı ile kaplı nanopartiküller, nanopartiküllerin korunmasını sağlamanın yanı sıra, immün sistemden kaçma, uzun süre kan dolaşımında kalma gibi normal hücrelerin özelliklerini sergilemektedir. Kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin membranları, ekzozomlar, kanser hücreleri ve kök hücre membranları nanopartiküllerin kaplanması için kullanılmakta ve oluşturulan nanopartikül birçok terapi ile birleştirilerek farklı kanser türlerinde tedavi amaçlı denenmektedir (Chen ve diğ., 2021). Rao ve diğ. (2016) kanser hücre membranı ile kaplı nanopartiküller tasarlamış ve bu nanopartikülün immün sistemden etkili bir şekilde kaçabildiği, diğer dokulara nazaran kanser dokusuna hedefli gidebildiği tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada, pH/redoks çift-duyarlı nanojellere DOX yüklenmiş ve nanopartikül 4T1 meme kanseri hücrelerinden elde edilen kanser hücre membranları ile kaplanarak *in vitro* ve *in vivo* etkinliği incelenmiştir (Xu ve diğ., 2021). Elde edilen sonuçlarda, nanopartikülü kanser hücre zarı ile kaplamanın stabiliteyi artırdığı ve oluşturulan nanopartikülün dokuya hedefli olarak gittikten sonra düşük pH ve yüksek glutatyondan dolayı tümör hücrelerinin içinde ilaç salınımını gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Xu ve diğ., 2021). Mezenkimal kök hücreler (MSC) ve progenitör hücreler (PH) düşük immünojenite göstermelerinin yanı sıra kötü huylu lezyonlara doğru yönelim göstermektedir (Yang ve diğ., 2018). Yang ve diğ. (2018) göbek kordonundan kaynaklanan mezenkimal kök hücre zarı ile kaplanmış PLGA nanopartikülünün, MHCC97H karaciğer karsinomu hücre soyu ve bu hücre soyu ile

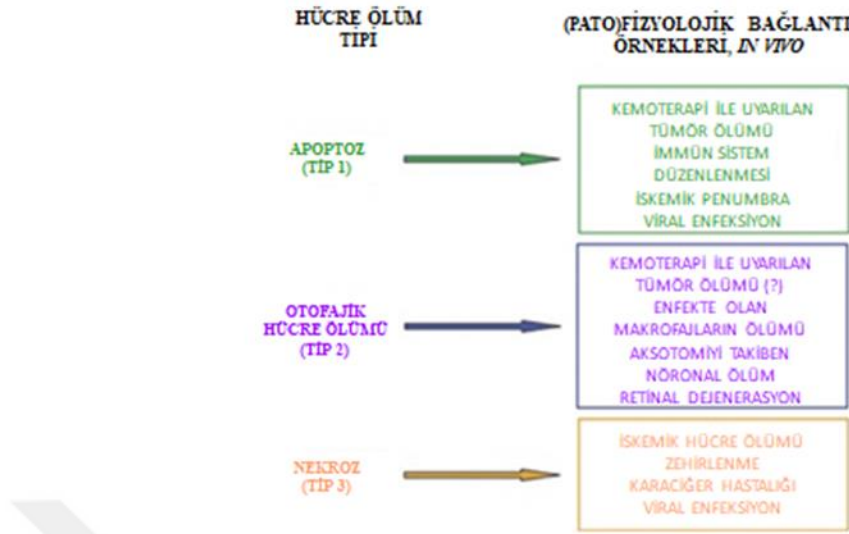
oluşturulan fare modelinde etkinliğini göstermişlerdir. DOX içeren PLGA nanopartikülü göbek kordonundan kaynaklanan MSC membranı ile kaplandıktan sonra hücrelere verildiğinde, tümör hücresi tarafından alınıp ilaç salınımı için asidik organellere yönlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, lipozom kaplı ve kaplanmamış kontrole göre MSC-kaplı nanopartikülün IC50 değerinin daha az olduğunu, tümör hücreleri tarafından alınımının arttığını, hücre canlılığını anlamlı olarak daha fazla azalttığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (Yang ve diğ., 2018). Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada, BxPC-3 hücrelerinden elde edilen membranlar ile kaplanmış DOX yüklü nanoçubuğun (CR) ve nanokürelerin (CS) etkinliği incelenmiştir. CS'lere göre daha iyi etkinlik gösteren CR'lerin hücre içinde endoplazmik retikulumda (ER) birikerek ER stresi oluşturduğu ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2019).

2.9. HÜCRE ÖLÜMÜ TİPLERİ

Ökaryotlarda homeostazın korunabilmesi için hücre doğumu ve hücre ölümü arasında hassas bir denge bulunmaktadır. Hücre ölümü birbiriyle ilişkili birçok yolak aracılığıyla normal fizyolojide bu dengeyi sağlamak için programlı olarak gerçekleşebildiği gibi aynı zamanda travma veya inflamasyon gibi patolojik sebeplerden dolayı ani olarak da gerçekleşebilmektedir (Nirmala ve Lopus, 2020). İş görmeyen, hasarı tedavi edilemeyecek derecede olan ve potansiyel olarak zararlı kabul edilebilecek bu hücrelerin belirli ve genetik olarak kodlanmış mekanizmalarla ortadan kaldırılması programlanmış (düzenlenmiş) hücre ölümü olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda programlanmış hücre ölümünün çok hücreli ökaryotlara özgü olmadığı, aynı zamanda koloni olarak yaşayan bazı tek hücreli ökaryotlar ve bazı prokaryotlarda da görüldüğü anlaşılmıştır. Yüksek basınç, sıcaklık, fazla pH değişimleri, kesikler gibi fizyolojik, kimyasal veya mekanik olaylardan dolayı ani olarak gerçekleşen hücre ölümü, kaza sonucu gerçekleşen hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Bu tip hücre ölümüne kıyasla programlanmış hücre ölümü spesifik, düzenlenebilir moleküler mekanizmalara dayanmaktadır (Galluzzi ve diğ., 2018). Programlanmış hücre ölümünün kontrolden çıkması durumunda bazı dejeneratif hastalıklar meydana gelebilmektedir. Özellikle kanser tedavisi açısından tümör hücre ölümünü destekleyici tedaviler geliştirmek terapötik açıdan oldukça önemlidir. Bu anlamda, hücre ölüm mekanizmalarını detaylıca anlamak hücre ölümünün temel fizyolojideki yerini anlamaya yardımcı olmakla birlikte

kanseri de içeren birçok hastalığın tedavisi için yeni metotlar geliştirilmesine de katkı sağlamaktadır (Nirmala ve Lopus, 2020).

Hücre ölümü morfolojik görünüm (örneğin apoptoz, nekroz ya da otofajik), enzimolojik kriterler (örneğin kaspazlar ya da katepsinler gibi proteazların dahil olup olmadığı durumlar), fonksiyonel durum (örneğin programlı ya da kaza sonucu gerçekleşen hücre ölümleri) ya da immünolojik özellikler göz önünde bulundurularak sınıflandırılabilir. Hücre ölümünün morfolojik açıdan sınıflandırılmasına bakıldığında üç tip hücre ölümü tanımlanmıştır. Bunlar, apoptoz, otofajik hücre ölümü ve nekrozdur (Şekil 2.3) (Galluzzi ve diğ., 2007). Tip 1 hücre ölümü olarak bilinen apoptoz sitoplazmanın büzülmesi, kromatin yoğunlaşması (nükleer piknoz) ve nükleer fragmentasyon (karyoreksis) ile karakterizedir. Ayrıca apoptoz sonucunda apoptotik cisimler olarak isimlendirilen küçük veziküller oluşmaktadır. Bu veziküller içerisinde bozulmamış organeller veya nükleus parçaları bulunmaktadır. Apoptozun diğer belirgin özelliklerinden biri de hücre apoptoz ile öldüğünde etrafa yayılan apoptotik cisimlerin makrofajlar gibi fagositik hücreler için etrafa “beni-bul” sinyalleri yaymasıdır. Bu sayede apoptoz sonucunda ilgili bölgede inflamasyon veya diğer hücrelere sistemik bir zarar oluşmamaktadır (Medina ve Ravichandran, 2016). Tip 2 hücre ölümü olan otofajik hücre ölümünde sitoplazmanın çift membranlı vakuoller içerisine alınmasını takiben lizozomal enzimler ile parçalanma görülmektedir. Apoptoz ve otofaji arasında karmaşık bir ilişki bulunmakla birlikte otofajik hücre ölümünün mekanizması ve düzenlenmesi halen araştırılan bir konudur. Tip 3 hücre ölümü olan nekroz ise, apoptoz ve otofajik hücre ölümünden farklı olarak hücre hacmindeki aşırı artış sonucunda hücre zarının yırtılmasını ve parçalanmış organellerin dışarı salınımını içermektedir. Nekroz sonucunda bölgede tümör büyümesini destekleyebilecek inflamasyon oluşabilmektedir ve yapılan çalışmalarda apoptozun engellendiği durumlarda hücre ölüm tipinin nekroza değişebildiği gözlenmektedir (Golstein ve Kroemer, 2005).

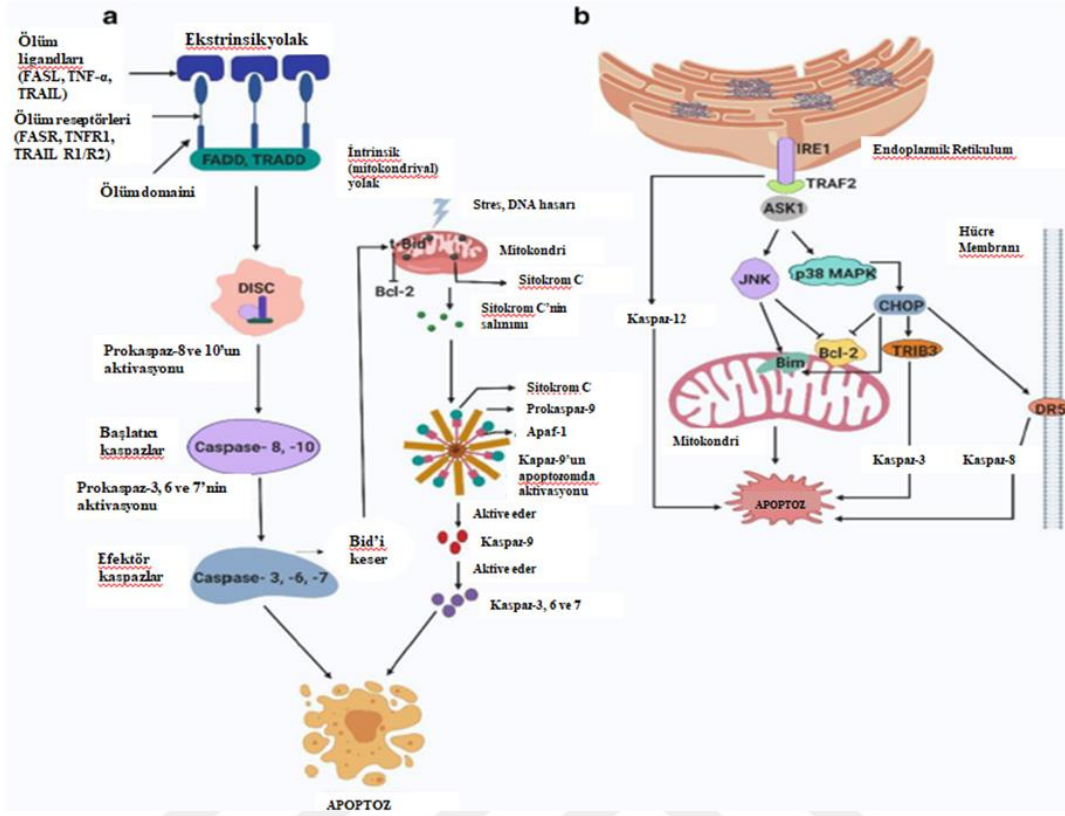


Şekil 2.3: Morfolojik ayrıma göre hücre ölüm tipleri ve *in vivo* da bağlantılı oldukları pato-fizyolojik durumlar (Galluzzi ve diğ., 2007).

2.9.1. Apoptoz

Yunanca yaprak dökülmesi anlamına gelen bir kelimeden türetilmiş olan apoptoz ifadesi ilk olarak Kerr ve diğ. (1972) tarafından belirli morfolojik özellikler içeren hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır. Apoptozda hücrede büzülmeyi takip eden hücre hacminin azalması (piknoz), kromatin yoğunlaşması, karyoreksis, genelde sağlam sitoplazmik organeller, plazma membranında tomurcuklanma ve fagositler tarafından sindirilen apoptotik cisimlerin oluşması gözlenmektedir (Kroemer ve diğ., 2009).

Apoptoz temel olarak üç yolak üzerinden gerçekleşmektedir. Bunlar, ölüm sinyal reseptörü aracılı ekstrasik yolak, mitokondriyal yolak olarak da bilinen intrinsik yolak ve ER stresinin uyardığı yolaktır (Şekil 2.4) (Nirmala ve Lopus, 2020). Bu yolaklarda hedef proteinlerini aspartik asit rezidülerinden kesen proteolitik aktiviteye sahip kaspaz isimli sistein proteazlar yer almaktadır (Elmore, 2007). Kaspazlar aktive olduklarında hücre ölümüne doğru geri döndürülemez bir eğilim oluşturmaktadır. Kaspazlar için başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2,8,9 ve 10), efektör kaspazlar (kaspaz-3, 6 ve 7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, 4 ve 5) olarak genel bir sınıflandırılma yapılmıştır (Cohen, 1997, Rai ve diğ., 2005). Bunların dışında apoptozun düzenlenmesi gibi çeşitli olaylarda görev alan kaspaz-11, kaspaz-12, kaspaz-13 ve kaspaz-14'de bulunmaktadır (Elmore, 2007).



Şekil 2.4: Apoptozun üç sinyal yolağı. a) Ekstrinsik ve intrinsik (mitokondriyal) yolak. b) Endoplazmik retikulum stresinin uyardığı yolak. (Nirmala ve Lopus, 2020).

Apoptozda ekstrinsik yolak incelendiğinde tümör nekroz faktör reseptörü 1 (TNFR1), TRAIL reseptörü (TRAILR) ya da Fas reseptörü (FasR) gibi ölüm reseptörlerine ilgili ligandların bağlanması sonucunda reseptörlerde meydana gelen yapısal değişikliğin sinyal kaskadını başlattığı gözlenmektedir. Ölüm reseptörlerinin sitoplazmik kısımlarında meydana gelen bu yapısal değişiklikler, farklı başlatıcı pro-kaspazlar için bağlanma bölgeleri sağlayan ölüm domainleri içeren adaptör proteinlerin birleşmesine ve aktivasyonuna sebep olmaktadır (Nirmala ve Lopus, 2020). Prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazlar bu adaptör proteinler ile birleşerek ölüm-indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluştururlar ve burada aktif hale gelirler (Locksley ve diğ., 2001). Aktifleşen başlatıcı kaspazlar, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazları aktif hale getirir ve bu şekilde hücre ölümüne aracılık etmiş olurlar.

Stres ve DNA hasarı gibi nedenlerden dolayı, intrinsik yolakta mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınması gözlenmektedir. Normal fizyolojide mitokondrinin iç zar boşluğunda bulunan sitokrom c apoptoz sinyali oluştuğunda mitokondriden sitoplazmaya salınarak apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile birleşerek apoptozom adı verilen bir yapı

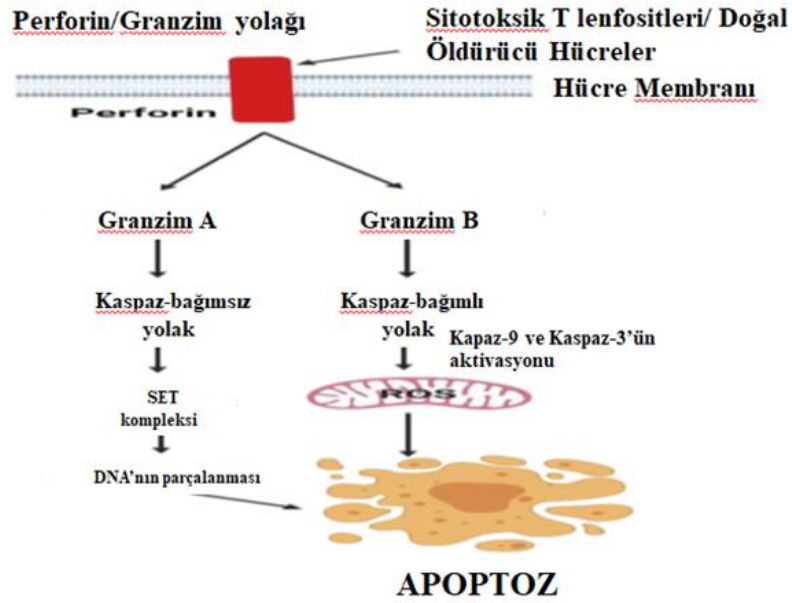
oluşturmaktadır (Green ve Llambi, 2015). Prokaspaz-9 apoptozom yapısı aracılığıyla aktive edilerek kaspaz-9'a dönüşür ve apoptotik hücre ölümüne neden olan efektör kaspazları aktive eder. Diğer yandan, mitokondriden yayılan apoptoz-indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G gibi proapoptotik proteinler nükleusta DNA fragmentasyonu ve kromatin yoğunlaşmasına sebep olmaktadır (Toné ve diğ., 2007). Ayrıca, intrinsik yolak pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinleri içeren Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından kontrol edilmektedir (Elmore, 2007). Bax ve Bak gibi apoptoz destekleyici olan proteinler apoptoz sinyaline cevaben mitokondri zarında porlar oluşturarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını sağlamaktadır. Başka bir apoptoz destekleyici protein olan Bim, anti-apoptotik olarak bilinen Bcl-2'nin inaktif olarak tutulmasından sorumludur (Elmore, 2007; Nirmala ve Lopus, 2020).

Hücrede meydana gelen enfeksiyon, hipoksi, açlık, çeşitli kimyasallar ve endoplazmik retikulumdaki fonksiyon bozuklukları hücrede hasarlı proteinlerin birikmesine ve ER stresi kaynaklı hücre ölümüne sebep olmaktadır (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo, 2016). ER'da biriken hasarlı proteinler katlanmamış protein cevabı (KPC) olarak isimlendirilen yolağı aktive eder ve bu yolak protein sentezini durdurarak hasarlı proteinler yerine doğru olarak katlanmış proteinlerin oluşmasına katkı sağlar. Eğer hasarlı proteinlerin yarattığı sorun çözülemezse hücre apoptoza gidebilmektedir. IRE1 proteini apoptozla sonuçlanan kaspaz-12 tarafından düzenlenen yolakta ve TRAF2-ASK1 kompleksinin yer aldığı JNK ve p38-MAPK sinyal yollarında önemli bir başlatıcı rol oynamaktadır. JNK yolağının TRAF2-ASK1 kompleksi ile aktivasyonu sonucunda anti-apoptotik protein Bcl-2 inaktive edilirken, pro-apoptotik protein Bim aktive edilmektedir. Diğer yandan, p38-MAPK yolağı bir dizi sinyal kaskadını destekleyerek apoptoza sebep olmaktadır (Nirmala ve Lopus, 2020).

Mitotik katastrof ve anoikis terimleriyle isimlendirilen iki hücresel olayın apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Mitoz sırasında yaşanabilen DNA hasarı ya da mitozla ilişkili proteinlerin fonksiyon bozukluğu sebebiyle mitozun tamamlanamaması ya da DNA sentezi tamamlanmadan hücrenin mitotik faza girmesi mitotik katastrofa neden olmaktadır. Ayrıca, radyasyon, kimyasal ya da fiziksel stres ve hücre döngüsü kontrol noktalarında hasar olması da mitotik katastrofa sebebiyet vermektedir (Vakıfahmetoglu ve diğ., 2008). Mitotik katastrof sonucu çoklu nükleasyon ile meydana gelen hücre ölümü ya da metafaz sırasında meydana gelen hücre ölümü görülmektedir. Mitotik katastrof apoptotik hücre ölümüne ya da nekroza sebep olabilmektedir (Kroemer ve diğ., 2009). Diğer yandan, bir hücrenin bağlantıda olduğu

komşu hücrelerden ya da etrafını saran ekstrasellüler matriksden ayrılması sonucunda anoikis meydana gelmektedir. Bu bir nevi yalnızlaşma sonucunda hücre savunma mekanizması olarak apoptozu başlatmaktadır (Gilmore, 2005).

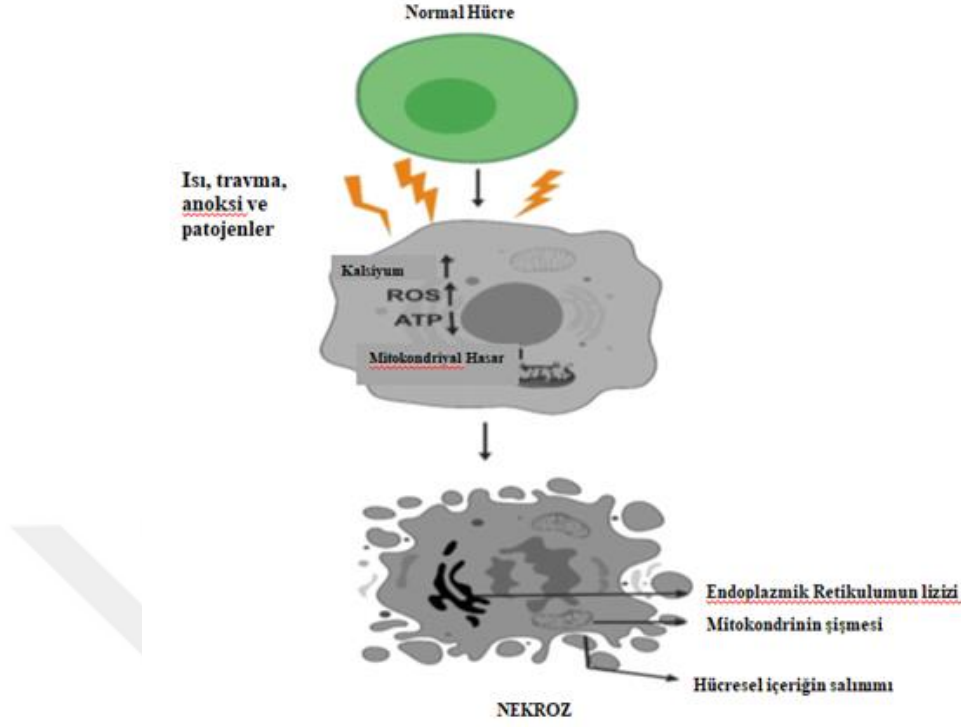
Hücre, enfeksiyon gibi durumlarda apoptoza benzer özellikler gösteren perforin/granzim yolağını da aktifleştirebilmektedir (Şekil 2.5) (Nirmala ve Lopus, 2020). Sitotoksik T lenfositleri ya da doğal öldürücü hücreler gibi immün sistem elemanları direkt olarak enfekte olan hücre ile temas ettiklerinde bu hücreleri sağlıklı hücrelere zarar vermeden elimine etmektedir. Bu tip hücre ölümünde, perforin ve bir serin proteazı olan granzim enzimleri immün hücrelerden salınır ve enfekte olan hücrede apoptozu başlatır. Granzim A DNA'nın parçalanmasını takiben apoptoza neden olan kaspaz-bağımsız yolağı yürütürken (Lieberman, 2010), Granzim B kaspaz-3 ve kaspaz-9'un katıldığı ve ROS seviyesinin artması sonucu hücre ölümünün gerçekleştiği kaspaz-bağımlı yolağı yürütmektedir (Martinvelet, 2015).



Şekil 2.5: Perforin/granzim yolağı (Nirmala ve Lopus, 2020).

2.9.2. Nekroz

Nekrotik hücre ölümü ya da nekroz, onkoz olarak isimlendirilen hücrenin hacminin artması olayı, organellerin şişerek büyümesi, plazma membranında parçalanma meydana gelmesini takiben hücre içinin dışarı yayılması ile karakterize olan inflamatuvar hücre ölüm tipidir (Şekil 2.6) (Kroemer ve diğ., 2009; Nirmala ve Lopus, 2020).



Şekil 2.6: Nekrotik hücre ölümünün gösterimi (Nirmala ve Lopus, 2020).

Nekrozun meydana gelmesinde enfeksiyon, yüksek oranda radyasyon ya da basınç, kimyasal ve mekanik stres, oksijensiz kalma gibi durumlar yer alabilmektedir. Programlanmış hücre ölümü olarak da tanımlanan apoptoza kıyaslandığında, nekroz programlanmamış ya da düzenlenmeyen hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Nirmala ve Lopus, 2020). Ancak, önceleri aniden kontrolsüz olarak meydana geldiği düşünülen nekrozun aslında birçok sinyal mekanizması ve katabolik olaylar ile düzenlenebileceği gösterilmiştir (Kroemer ve diğ., 2009). Nekroz sadece dokularda meydana gelen hücre ölümü olarak sınırlanmamalıdır. Çünkü *in vitro* koşullardaki hücrelerde de nekroz görülebilmektedir. Örneğin, Lieberthal ve diğ., (1998) primer hücre kültüründe ATP'nin tükenmesinin nekrozu indüklediğini göstermiştir. Benzer şekilde, yüksek konsantrasyonda tamoksifen ya da arsenik trioksit gibi bazı kimyasal ilaçların da hücre kültüründe nekrozu başlattıkları gösterilmiştir (Bursch ve diğ., 2008; Selveraj ve diğ., 2013).

Apoptoz ve nekroz arasındaki geçiş mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olsa da, hücre içinde ROS seviyesinin artması, ATP miktarının azalması ve kaspaz aktivasyonunun sonlandırılması nekroz ile sonuçlanmaktadır. Hücre içi ROS seviyesinin artması DNA'da hasar meydana getirmekte ve bu durum sonucunda DNA tamir enzimlerinden olan poli[ADP-

riboz] polimeraz-1 (PARP-1) aşırı aktive olarak ATP seviyesinin düşmesine ve sonuçta nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır (Nirmala ve Lopus, 2020). Hücre içinde Ca^{2+} miktarının artması sonucu meydana gelen mitokondri hasarı da ATP seviyesinde azalmayla birlikte nekroza sebebiyet vermektedir (Santulli ve diğ., 2015). Ayrıca kaspazların aktivasyonunun inhibe edilmesiyle apoptozun engellendiği durumlarda hücre ölüm tipinin apoptozdan nekroza değiştiği bilinmektedir (Golstein ve Kroemer, 2005).

Nekrozun başlatılmasında patojenlerin tanınması ve doğuştan immün savunmasının aktivasyonunda görev alan hücre yüzey reseptörlerinden RIG-I-benzeri reseptörler (RLRs), Toll-benzeri reseptörler (TLRs) ve nükleotit oligomerizasyon domain (NOD)-benzeri reseptörler (NLRs) görev almaktadır (Nirmala ve Lopus, 2020).

2.10. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Reaktif oksijen türleri (ROS) çeşitli hücre fonksiyonları sonucu yan ürün olarak oluşabilen hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen ($1O_2$), hipokloröz asit (HOCl), süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi kısmen indirgenmiş reaktif oksijen türlerini tanımlayan sınıfın genel adıdır (Yang ve diğ., 2018). Bu türler normal hücre fonksiyonlarının yanında kanser hücrelerinde de çeşitli sinyal yollarında yer alarak birçok biyolojik olaya dahil olabilmektedir (Chio ve Tuveson, 2017). Mitokondri hücre içinde endojen olarak üretilen ROS'un önemli bir kısmının kaynağı olarak bilinmektedir (Starkov, 2008; Li ve diğ., 2013). Bunun dışında hücre içinde geçiş metallerinin Fenton reaksiyonu aracılığıyla da enzimatik olmayan yollarla ya da sigara, hava kirliliği, radyasyon ve ilaçlar gibi dış faktörler aracılığıyla da üretilir (Beyersmann ve Hartwig, 2008; Bhattacharyya ve diğ., 2014).

Yapılan çalışmalar sonucunda hücre içinde üretilen ROS'un kanser hücrelerinde hem avantaj hem de dezavantaj oluşturabileceği anlaşılmıştır (Nakamura ve Takada, 2021). Düşük ve orta düzeyde üretilen ROS kanserin proliferasyonu, anjiyogenezi, invazyonu ve yayılımı için aktive edici olarak davranırken, yüksek düzeyde üretilen ROS hücre ölümünü uyararak kanser hücrelerine zarar verebilmektedir (Wiseman ve Halliwell, 1996; Sena ve Chandel, 2012; Gorrini ve diğ., 2013; Okon ve Zou, 2015). Kanser hücreleri hücre içinde artabilen ROS seviyesine karşı çeşitli antioksidan enzimlerin üretilmesine aracılık eden transkripsiyon faktörü NRF2'yi (nükleer eritroid 2-ilişkili faktör) overeksprese ederek kendini korumaktadır (Perillo ve diğ., 2020). Yüksek ROS seviyesi tümör mikroçevresinde bulunan tümör infiltrate

edici Treg hücrelerinin apoptozuna neden olarak kansere karşı geliştirilen immünoterapileri sınırlandırmaktadır. Bu sebeple son zamanlarda ROS artışından kaynaklı tümör büyümesini engellemek için ROS azaltıcı stratejiler de geliştirilmektedir (Deng ve diğ., 2020). Mitokondriyal ROS üretiminin hücre içinde aşırı artması intrinsik yolak aktivasyonunu uyararak hücre döngüsünü durdurmakta ve hücre apoptoza gidebilmektedir. Ayrıca artan ROS seviyesi transmembran ölüm reseptörlerini uyararak kanser hücre ölümüne aracılık eden ekstrinsik yolağı başlatabilmektedir (Simon ve diğ., 2000; Redza-Dutordoir ve Averill-Bates, 2016). Hücre içinde artan ROS programlı hücre ölümü tip 3 olarak bilinen nekrozu uyarabilmektedir (Perillo ve diğ., 2020).

Sonuç olarak, artan ROS seviyesi kanser hücreleri için ölümcül olabildiği gibi, son çalışmalar ROS artışının kanserin ilerlemesinde etkili olduğunu da göstermektedir. Bu iki taraflı durum, kanserde ROS'un etkisinin incelenmesinin kanser tedavilerinin etkinliği açısından büyük önem arz ettiğini düşündürmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE SOYU

Çalışmada pankreas kanseri hücre soyu MiaPaCa-2 (ATCC, CRL-1420) ve pankreatik adacık türevli progenitör hücreler (PID-PC) kullanılmıştır.

3.1.1. MiaPaCa-2 Hücre Soyunun Kültüre Edilmesi

MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücre soyu, %10 fetal bovin serum (Gibco, 10270106) ve %1 penisilin-streptomisin (10,000 U/mL) (Gibco, 15140122) içeren yüksek glikozlu DMEM medyumunu (Gibco, 41966029) kullanılarak kültüre edilmiştir. Hücrelerin medyum değişimi gün aşırı yapılmış olup, pasaj işlemi %0,25 tripsin-EDTA (1X) solüsyonu (Gibco, 25200056) ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin inkübasyonu %5 CO₂ içeren 37°C inkübatör ile sağlanmıştır.

3.1.2. Pankreatik Ada Türevli Progenitör Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Pankreatik adacık türevli öncül hücreler yetişkin erkek Wistar sıçanlarının pankreas dokusundan kendi laboratuvarımızda elde edilmiştir (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2018). PID-PC, %15 fetal bovin serum (Gibco, 10270106) ve %1 penisilin-streptomisin (10,000 U/mL) (Gibco, 15140122) eklenmiş 2 mM glutamin ve 5.5 mM glikozlu MEM medyumunu (Gibco, 31095029) kullanılarak kültüre edilmiştir. Gün aşırı medyum değişimi yapılmıştır. Pasaj işlemi %0,25 tripsin-EDTA (1X) solüsyonu (Gibco, 25200056) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde hücrelerin inkübasyonu sağlanmıştır.

3.2. HÜCRELERDEN MEMBRAN VE SİTOZOLİK PROTEİNLERİN İZOLE EDİLMESİ

MiaPaCa-2 ve PID-PC hücrelerinden membran ve sitozolik proteinler Mem-PER plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Scientific, 89842) kullanılarak izole edilmiştir. Hücreler %0,25 tripsin/EDTA (Gibco, 25200056) kullanılarak kaldırılmış ve hücre süspansiyonu 5 dakika 1500 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan pelet, kit içerisinde bulunan Cell Wash Buffer ile yıkanmıştır. Tüpler ilk yıkama sonrasında 5 dakika 1500 g'de ve ikinci yıkama sonrasında 4°C'de 5 dakika 16000 g'de santrifüj edilmiştir.

Yıkamalar sonrasında, hücre peletine kit içerisinde bulunan Permeabilization Buffer eklenerek 4°C’de çalkalayıcıda 10 dakika inkübasyon sağlanmıştır. Daha sonra süspansiyon 15 dakika 16000 g’de santrifüj edilmiştir. Sitozolik fraksiyonu içeren supernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Pelet, Cell Wash Buffer ile yıkandıktan sonra kit içerisindeki Solubilization Buffer ile çözündürülmüş ve 4°C’de çalkalayıcıda 45 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası, 10 dakika sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında tüpler 4°C 15 dakika 16000 g’de santrifüj edilmiş ve membran proteinlerini içeren supernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Elde edilen örnekler fosfataz-proteinaz inhibitörü eklenerek örnekler çalışılana kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.3. İZOLE EDİLEN MEMBRAN VE SİTOZOLİK PROTEİNLERİN MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ

MiaPaCa-2 ve PID-PC hücrelerinden elde edilen membran ve sitozolik protein örneklerindeki protein miktarları NanoDrop spektrofotometresi yöntemi ile BioSpec-nano (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japonya) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Cihaz kolu kontaminasyondan ve kalan solüsyondan arındırılmak için temizlendikten sonra her bir örnekten 1 µl cihazda okutularak numunelere ait protein miktarları kaydedilmiştir.

3.4. PLGA NANOPARTİKÜLÜN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Nanopartikül sentezinde kullanılacak olan Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (Sigma-Aldrich # 739960, (50:50), mol wt 54,000-69,000) altın standart olarak kabul edilen, FDA onaylı ve endüstriyel üretime uygun bir polimerdir. PLGA, polimer zincirinde bulunan ester bağlarının hidrolitik bozunması yoluyla meydana gelen sulu ortamda yüksek biyoyumluluğu ve biyobozunabilirliği nedeniyle seçilmiştir (Bahadori ve diğ., 2019). PLGA nanopartikülleri “water-in-oil (w/o) emulsion solvent evaporation” yöntemi ile hazırlanmıştır. 50 mg PLGA ve eskuletin / PLGA ve kurkumin birlikte 5 ml aseton ile oda sıcaklığında çözölmüştür. %0.05 (v/v)’lik Tween 80 kullanılarak hazırlanan suya bir şırınga yardımıyla hazırlanmış olan PLGA-aseton yavaş yavaş damlatılmıştır. Agregat oluşumunu engellemek veya istenilen partikül boyutunu yakalayabilmek için damlatma dakikada 30 damla olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 12 saat (veya daha uzun) beherde ve manyetik karıştırıcıda 680 rpm’de oda sıcaklığında asetonun uçurulması sağlanmıştır. Bu esnada, aseton içinde moleküler seviyede olan polimerik taşıyıcı, asetonun uçmasıyla sulu ortamda amfifilik karakterini

sergileyerek nano-partikül oluşmuştur (Yallapu ve diğ., 2010). Bu şekilde hazırlanmış olan PLGA nano-partiküllerinin boyut ölçümleri aşağıdaki şekilde gerçekleştirildikten sonra eskuletin ve kurkumin ile etkileşimi sağlanmıştır. Her basamakta oluşan nano-partiküllerin boyutu “Dynamic Light Scattering (DLS)” yöntemi ile belirlenmiştir. Nanotaşıyıcının taşıyamadığı ve dışarıya taşan eskuletin ve kurkumin agregat oluşturacağından DLS’de agregat görüldüğünde ilaç taşıma sisteminin kapasitesinin aşıldığı anlaşılmış ve maksimum kapasitenin bir önceki basamağındaki ilaç miktarı optimum miktar olarak belirlenmiştir (Yallapu ve diğ., 2010). Misellere eskuletin ve kurkumin yüklendikten sonra misellerin eskuletin ve kurkumini serbest bırakma süresi (Salım süresi) incelenmiştir. NP’lerinin Enkapsülasyon Etkinliği (EE %’si) ve Yüklene Etkinliği (LE’si), liyofilizasyondan sonra ölçülmüştür. NP’ler, partikül hazırlama ve boyut ölçümlerinden hemen sonra -80°C’de dondurulmuştur. Dondurarak kurutmadan sonra, (-80°C, 0.01mbar, Labconco, FreeZone, 4,5 l, -84°C (Kansas City, ABD)) eskuletin ve kurkumin yüklü PLGA nanopartikülleri hafif vorteksleme ile 200 µl kloroform içinde çözöldürölmüş, ardından 800 µl Tris-EDTA tamponu eklenmiştir. Yakalanan eskuletin ve kurkumin, organik çözücü içinde PLGA misellerinin patlamasını takiben sulu ortama yayılmıştır. Eskuletin ve kurkumini içeren sulu süpernatant, 20 dakika boyunca 18000 g’de 4°C’de santrifüj edilerek organik fazdan ayrılmış, eskuletin ve kurkumin miktarı ölçölmüştür. Her ölçüm üç kere tekrar edilmiştir. Kapsölleme verimliliği ve yüklemesi denklem 1 ve 2 kullanılarak hesaplanmıştır (Ceylan ve diğ., 2020):

Denklem 1

$EE\% = (PLGA \text{ ile birleştirilmiş eskuletin ve kurkumin}) / (\text{Eskuletin ve kurkuminin başlangıç miktarı}) \times 100$

Denklem 2

$LE = PLGA \text{ ile birleştirilmiş Eskuletin ve kurkumin (ng)} / PLGA\text{'nın ağırlığı (mg)}$

Konsantrasyon eğrisi çizilmiştir.

Daha sonra 1 ml PLGA’ya yüklenmiş eskuletin ve kurkumin 1 ml Tris-EDTA pH 7.4 ile 100 rpm’de ve 37°C’de döner bir çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (karşılaştırmalı Incu-shaker mini (Sayreville, NJ, ABD)). Önceden tanımlanmış periyotlarda, üç tekrar halinde numuneler alınmış ve 4°C’de 20 dakika boyunca 20000 g’de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlarda salınan

eskuletin ve kurkumin oranı, yukarıda belirtilen konsantrasyon eğrisi kullanılarak ölçülmüştür. PLGA ile eskuletin ve kurkumin arasındaki etkileşim “Differential Scanning Calorimetry (DSC)” ve FT-IR yöntemi ile araştırılmıştır. Böylelikle eskuletin ve kurkuminin başarılı bir şekilde nanotaşıyıcının içine yerleştiğinden emin olunmuştur (Ceylan ve diğ., 2020).

3.5. PLGA NANOPARTİKÜLLERİNE PID-PC VE MIAPACA-2 HÜCRELERİNDEN İZOLE EDİLEN MEMBRAN VE SİTOZOLİK PROTEİNLERİN YÜKLENMESİ

Eskuletin ve kurkuminin nano-taşıyıcının içine yerleştirildiği aşamalar izole edilen proteinler için de tekrarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan PLGA nano-partiküllerinin boyut ölçümleri gerçekleştirildikten sonra proteinler ile etkileşimi sağlanmıştır. Proteinlerin yüklenmesi için önceden hazırlanmış olan PLGA nanopartikülleri, proteinlerin tampon içindeki çeşitli konsantrasyonları ile vortex ve ultrasonik banyonun ardışık kullanımı ile ajite edilmiştir. Şiddetli ajitasyon ile nanomiseller açılarak proteinleri içine almıştır. 30 dakika oda sıcaklığında bekleme yapıldıktan sonra enkapsülasyon işlemi gerçekleşmiştir. Bu yöntem daha önce denenmiş ve proteinlerin yüklenmesinde çok etkili bulunmuştur (Ceylan ve diğ., 2020). Her nanotaşıyıcının her ilaç molekülü ya da protein için belirli bir taşıma kapasitesi vardır. Yukarıda bahsedilen proses proteinlerin artan miktarları ile tekrar edilmiştir.

NP'ler, partikül hazırlama ve boyut ölçümlerinden hemen sonra -80°C'de dondurulmuştur. Dondurarak kurutmadan sonra, (-80°C, 0.01mbar, Labconco, FreeZone, 4,5 l, -84°C (Kansas City, ABD)) protein yüklü PLGA nanopartikülleri hafif vorteksleme ile 200 µl kloroform içinde çözüldürülmüş, ardından 800 µl Tris-EDTA tamponu eklenmiştir. Yakalanan proteinlerin, organik çözücü içinde PLGA misellerinin patlamasını takiben sulu ortama yayılmıştır. Proteinleri içeren sulu süpernatant, 20 dakika boyunca 18000 g'de 4°C'de santrifüj edilerek organik fazdan ayrılmış ve protein miktarı Bradford yöntemi ile ölçülmüştür. Her ölçüm üç kere tekrar edilmiştir. Protein konsantrasyonları, önceden hazırlanmış bir konsantrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Kapsülleme verimliliği ve yüklemesi denklem 1 ve 2 kullanılarak hesaplanmıştır (Ceylan ve diğ., 2020):

Denklem 1

$$EE\% = (\text{PLGA ile birleştirilmiş proteinler}) / (\text{proteinlerin başlangıç miktarı}) \times 100$$

Denklem 2

LE= PLGA ile birleştirilmiş proteinler (ng) / PLGA'nın ağırlığı (mg)

Konsantrasyon eğrisi, Bradford yöntemi ile ölçülen protein miktarı sonuçları ile çizilmiştir. Daha sonra 1 ml PLGA'ya yüklenmiş proteinler 1 ml Tris-EDTA pH 7.4 ile 100 rpm'de ve 37°C'de döner bir çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (karşılaştırmalı Incu-shaker mini (Sayreville, NJ, ABD)). Önceden tanımlanmış periyotlarda, üç tekrar halinde numuneler alınmış ve 4°C'de 20 dakika boyunca 20000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlarda salınan protein oranı, yukarıda belirtilen konsantrasyon eğrisi kullanılarak ölçülmüştür. PLGA ile proteinler arasındaki etkileşim DSC ve FT-IR yöntemi ile araştırılmıştır. Böylelikle proteinlerin başarılı bir şekilde nanotaşıyıcının içine yerleştiğinden emin olunmuştur (Ceylan ve diğ., 2020).

3.6. ESKULETİN VE KURKUMİNİN *IN VITRO* SALIMI

Eskuletin ve kurkumin ilaç moleküllerinin PLGA nanopartiküllerinden *in vitro* salım profilleri diyaliz membran yöntemiyle belirlenmiştir. 1 mg/ml eskuletin yüklü PLGA ve 125 µg/ml kurkumin yüklü PLGA formülasyonlar ile salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada MiaPaCa-2 ve PID-PC'lerden elde edilen membran proteinlerin (MP) ve sitozolik proteinlerin (SP) eskuletin ve kurkumin yüklü PLGA nanotaşıyıcı sistemlere vortekleme ile yüklenmesi sağlanmıştır. Protein kaplanmış formülasyonların da salım profillerine bakılmıştır. Böylece protein ile kaplanmasının salım profiline olan etkisi de araştırılmıştır.

Deney öncesi diyaliz membranı distile su içerisinde 30 dk bekletilerek şişmesi sağlanmıştır. Formülasyonlardan 3 ml Spectra/Por 3 diyaliz membranına (Spectrum, MWCO 3.500, reorder no. 132720) yerleştirilmiştir ve membran daha sonra 37°C 300 ml %1 Tween 80 çözeltisi olan diyaliz ortamına %1 Tween 80 çözeltisi bırakılmıştır. 100 rpm karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Deneyin 0.5, 1, 2, 3, 4, 12, 24, 48 ve 72. saatlerinde diyaliz ortamından 1 ml numune alınmış ve hacmi tamamlamak için 1 ml %1 Tween 80 çözeltisi eklenmiştir. Deney öncesi ve sonrası diyaliz membranının içerisinden de örnekler alınmıştır. Diyaliz ortamından alınan salım örneklerinin konsantrasyonu HPLC yöntemiyle belirlenmiştir.

3.7. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Yapılan çalışma kapsamında deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur:

- 1- Çıplak eskuletin (6.25-100 µg), çıplak kurkumin (0.78-12.5 µg) ve ikisinin kombinasyonunun uygulandığı birinci grup;
- 2- PLGA ile kaplı eskuletin (6.25-100 µg), PLGA ile kaplı kurkumin (0.78-12.5 µg) ve ikisinin kombinasyonunun uygulandığı ikinci grup;
- 3- PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ve membran proteinlerinin (0.0125-0.8 µg) ayrı ayrı çıplak halde uygulandığı üçüncü grup;
- 4- PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler ile ayrı ayrı kaplanarak oluşturulan PLGA kaplı proteinlerin (0.0125-0.8 µg) uygulandığı dördüncü grup;
- 5- PLGA ile kaplı eskuletin (75 µg), PLGA ile kaplı kurkumin (9.375 µg) ve ikisinin kombinasyonlarının PID-PC hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler (0.8 µg) ile ayrı ayrı kaplanarak uygulandığı beşinci grup;
- 6- PLGA ile kaplı eskuletin (75 µg), kurkumin (9.375 µg) ve ikisinin kombinasyonlarının MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler (0.8 µg) ile ayrı ayrı kaplanarak uygulandığı altıncı grup.

3.8. HÜCRE CANLILIK ANALİZİ

Hücre canlılığı MTT analizi ile kolorimetrik olarak yapılmıştır. MTT analizi hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Canlı hücreler solunum yaptıklarında, mitokondrilerinde bulunan oksidoredüktaz enzimleri suda çözünebilir bir tetrazolum tuzu olan MTT'yi [3-(4,5-Dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolum bromid], çözünür olmayan mor renkli formazan kristallerine indirger (Mosmann, 1983). Sonrasında oluşan bu kristaller çözündürülür ve konsantrasyonlarının optik yoğunluğu ölçülür.

Hücre canlılık analizinde, MiaPaCa-2 hücreleri 10^4 yoğunluğunda olacak şekilde 96-kuyucuklu pleytlere ekilmiştir. Sonrasında bir gece boyunca pleytler %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelere deney gruplarına göre belirlenen dozlarda

ilgili maddeler uygulanmıştır. Eksojen olarak madde uygulanan hücreler 72 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin medyumunu toplanarak her kuyucuğa 100 µl MTT (0.5 mg/ml) solüsyonu (Sigma Aldrich, M5655) içeren medyum eklenmiştir. Hücreler 2 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde inkübe edilmiştir. Sonrasında, kuyucuklardaki MTT toplanarak oluşan formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 75 µl izopropanol (Sigma Aldrich, 19516) eklenmiştir. Spektrofotometrede 540 nm’de mikropłaka okuyucu (BioTek, Santa Clara, US) kullanılarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğu ölçülmüştür. Kontrol grubu %100 canlı kabul edilerek deney gruplarının % canlılık oranları hesaplanmış ve IC50 değerleri belirlenmiştir.

3.9. HÜCRE ÖLÜM TİPİNİN BELİRLENMESİ

Hücre canlılığı analizi sonucunda hücre ölümü görülen deney gruplarında hücre ölüm tipi belirlenmiştir. Hücre ölüm tipinin belirlenebilmesi için ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega) kiti kullanılmıştır. ApoTox-Glo Triplex Assay kiti tek bir analizde hücre canlılığı, sitotoksosite ve kaspaz aktivitesini ölçebilmektedir. İlk olarak hücre canlılığı ve sitotoksiteyi ölçmek için iki ayrı proteaz aktivitesi analiz edilmektedir. Canlı hücrelerdeki proteaz aktivitesi sayesinde hücreye geçebilen glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin (GF-AFC) fluorojenik substrat kesildiğinde canlı hücre sayısı ile doğru orantılı floresan bir ışımaya vermektedir. Diğer yandan hücre zarından geçemeyen bis-alanylalanyl-phenylalanyl-rhodamine 110 (bis-AAF-R110) substrat membran sağlamlığını kaybetmiş ölü hücrelerin proteaz aktivitesini ölçmek için kullanılmaktadır. Yaşayan ve ölü hücrelerin proteazları sırasıyla farklı ürünleri (AFC ve R110) oluşturduklarından, birbirlerinden farklı uyarım ve emisyon spektrumlarına sahiplerdir. Kullanılacak olan kit kaspaz-3/7 aktivitesini ölçmek için kaspaz aktivitesi, lusiferaz aktivitesi ve hücre lizizi için oluşturulmuş solüsyonda DEVD tetrapeptit sekansı içeren luminojen kaspaz-3/7 substratını içermektedir. Hücre lizizini takiben substratın aktif kaspaz ile kesilmesi durumunda lusiferaz ile üretilen luminesan sinyali kaspaz aktivitesi ile doğru orantılıdır (Prasad ve diğ., 2012).

İlk olarak protokole göre Viability/Cytotoxicity Reagent hazırlamak için, kit içerisinde bulunan 10 µl GF-AFC Substrate ve 10 µl bis-AAF-R110 Substrat yine kit içerisindeki 2.5 ml Assay Buffer’a eklenerek vortekslenmiştir. Caspase-Glo® 3/7 Reagent hazırlanması için, kit içerisindeki 10 ml Caspase-Glo® 3/7 Buffer, Caspase-Glo® 3/7 Substrate ile çözündürülmüştür. Hücreler 384 kuyucuklu pleyte MiaPaca-2 hücreleri 25x10² yoğunlukta

ekildikten ve ilgili maddeler deney gruplarına ve belirlenen dozlara göre uygulandıktan sonra 72 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 5 µl Viability/Cytotoxicity Reagent uygulanarak 30 saniye 1300-1500 rpm'de çalkalandıktan sonra 30 dakika 37°C'de inkübasyon sağlanmıştır. Ardından hücre canlılığı ve sitotoksosite sırasıyla 400Ex/505Em ve 485Ex/520Em dalga boylarında mikroparka okuyucu (Biotek Synergy H1) ile ölçülmüştür. Ölçüm sonrası her kuyucuğa 25 µl Caspase-Glo® 3/7 Reagent eklenerek 30 saniye çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrası oluşan lüminesan sinyali ölçülmüştür. Elde edilen veriler kontrol ile kıyaslanarak hücre canlılığı, sitotoksosite ve apoptoz katlı artışı hesaplanmıştır.

3.10. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ ANALİZİ

Hücre canlılığı analizi sonucunda hücre ölümü görülen deney gruplarında ROS, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) kullanılarak analiz edilmiştir. Floresan olmayan H₂DCFDA, hücre içi ROS oluşumunu takiben floresan 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)'e oksitlenen bir indikatördür. MiaPaCa-2 hücreleri 10⁴ yoğunluğunda 96-kuyucuklu plakaya ekildikten sonra hücreler bir gün inkübe edilmiştir. Hücrelere deney gruplarına göre maddeler verilerek 72 saat inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerden uygulanan maddenin bulunduğu medyum çekilerek taze medyum içine 10 µM DCFA (Sigma Aldrich, D6883) eklenmiştir. Deney başlangıcı 0. saat olarak kabul edilerek her 10 dakikada bir floresan ışımaya mikroparka okuyucu cihaz (BioTek, Santa Clara, US) ile ölçülerek toplamda bir saat boyunca ölçüm alınmıştır. Ölçümler sonucunda, ilk ölçülen değerler son ölçülen değerlerden çıkarılmıştır. Aradaki fark hesaplanarak kontrol grubu değerleri %100 kabul edilmiştir. Deney grubundaki değerler kontrol grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

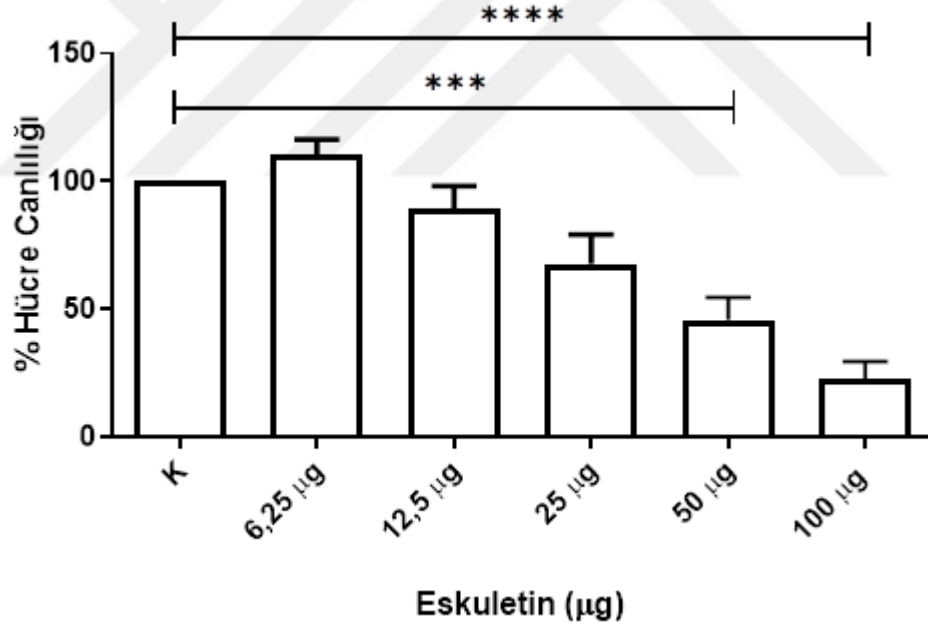
Her deney aşaması farklı günlerde en az üç tekrarlı çalışılmıştır. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak sonuçlar hesaplanmıştır ve $\pm$ S.E.M olarak ifade edilmiştir. ANOVA varyans analiz testi ve çoklu karşılaştırmalar için nonparametrik Tukey testi GraphPad Prism 9 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIK ANALİZ SONUÇLARI

4.1.1. Eskuletin, Kurkumin ve Eskuletin+Kurkumin Kombinasyonunun MiaPaCa-2 Hücre Soyuna Etkisi

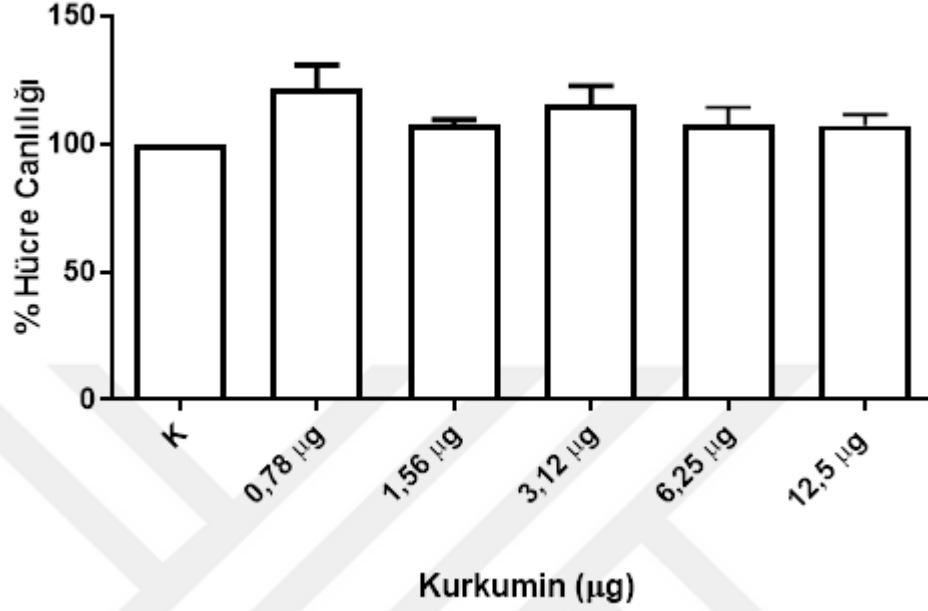
Eskuletin (ESC) (6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g), kurkumin (CURC) (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 μ g) ve eskuletin+kurkumin (ESC+CURC) kombinasyonu MiaPaCa-2 hücre soyu üzerine uygulanmış ve etkisi incelenmiştir. Maddeler eksojen olarak hücrelere uygulanmasını takiben 72 saat inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı analiz sonuçları aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.1: MiaPaCa-2 hücre soyu üzerine eskuletinin etkisi. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

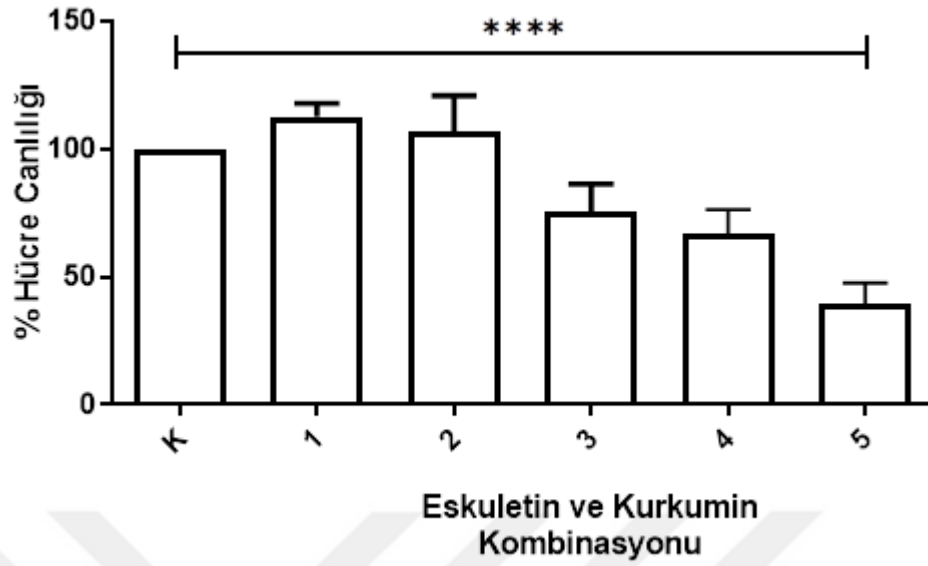
MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 6.25 μ g ESC uygulandığında $110,6 \pm 5,773$; 12.5 μ g ESC uygulandığında $89,10 \pm 9,103$; 25 μ g ESC uygulandığında $67,71 \pm 11,45$; 50 μ g ESC uygulandığında $45,82 \pm 8,794$; 100 μ g ESC uygulandığında $22,62 \pm 6,921$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 50 μ g (** $p < 0,001$) ve üzeri (**** $p < 0,0001$) ESC uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla

hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür. Bu analiz sonucu yapılan hesaplamalara göre IC50 değeri 45.226 μg olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2: MiaPaCa-2 hücre soyu üzerine kurkuminin etkisi.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.78 μg CURC uygulandığında $121,5 \pm 9,374$; 1.56 μg CURC uygulandığında $107,4 \pm 2,193$; 3.12 μg CURC uygulandığında $115,5 \pm 7,216$; 6.25 μg CURC uygulandığında $107,6 \pm 6,773$; 12.5 μg CURC uygulandığında $107,2 \pm 4,229$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre CURC uygulanması sonucunda hücre canlılığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık yoktur.

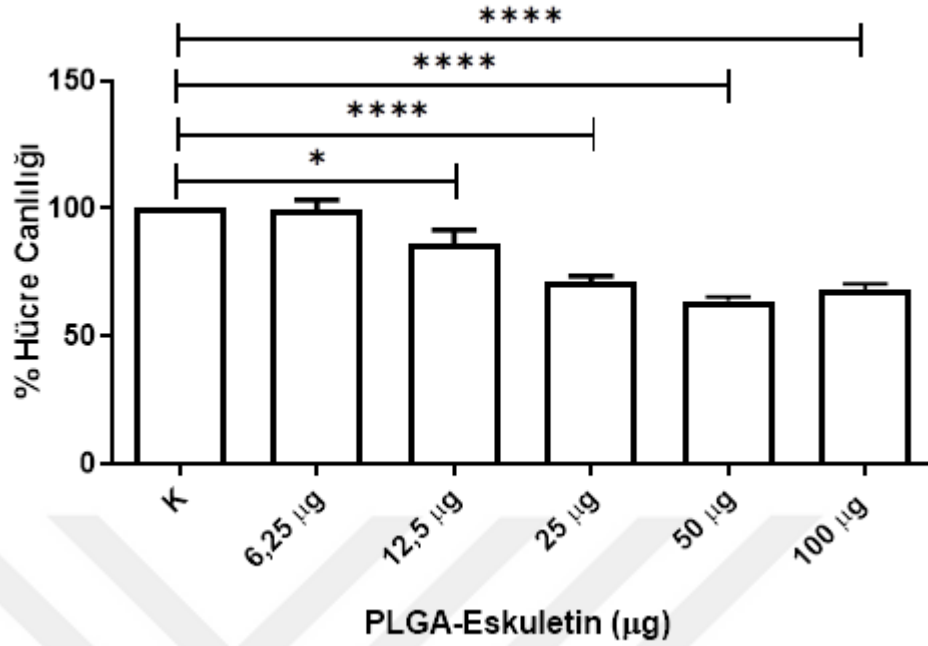


Şekil 4.3: MiaPaCa-2 hücre soyu üzerine eskuletin ve kurkumin kombinasyonunun etkisi. 1: 6.25 µg eskuletin+0.78 µg kurkumin; 2: 12.5 µg eskuletin+1.56 µg kurkumin; 3: 25 µg eskuletin+3.12 µg kurkumin; 4: 50 µg eskuletin+6.25 µg kurkumin; 5: 100 µg eskuletin+12.5 µg kurkumin.****p<0,0001.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 6.25 µg eskuletin+0.78 µg kurkumin uygulandığında $112,6 \pm 5,227$; 12.5 µg eskuletin+1.56 µg kurkumin uygulandığında $106,8 \pm 13,98$; 25 µg eskuletin+3.12 µg kurkumin uygulandığında $75,53 \pm 10,80$; 50 µg eskuletin+6.25 µg kurkumin uygulandığında $66,94 \pm 9,344$; 100 µg eskuletin+12.5 µg kurkumin uygulandığında $39,66 \pm 8$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MiaPaCa-2 hücrelerine 100 µg eskuletin+12.5 µg kurkumin eksojen olarak uygulandığında 72 saat sonrasında hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır (****p<0,0001). Bu analiz sonucu yapılan hesaplamalara göre IC50 değeri eskuletin için 81.04 µg ve kurkumin için 10.131 µg olarak hesaplanmıştır.

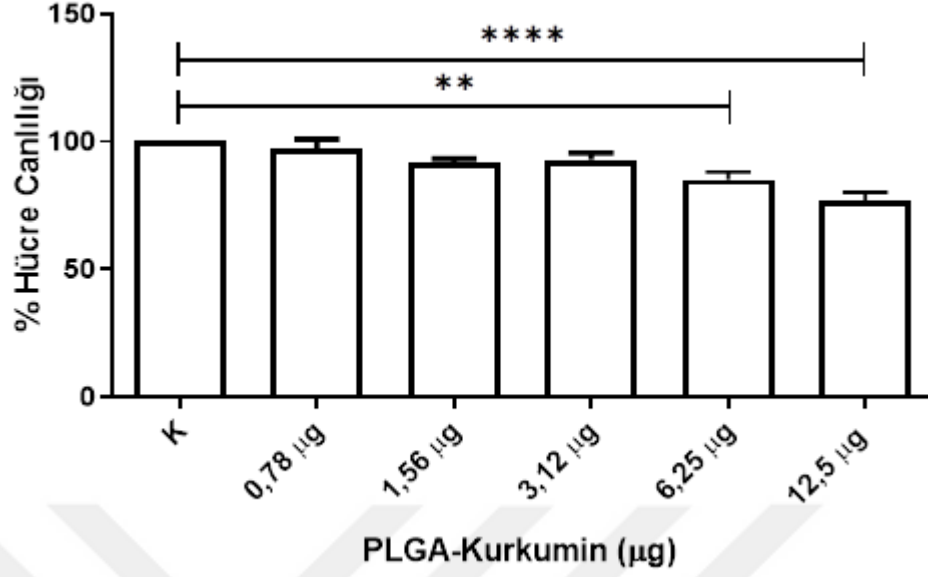
4.1.2. PLGA ile Kaplı Eskuletin, PLGA ile Kaplı Kurkumin ve İkisinin Kombinasyonunun MiaPaCa-2 Hücre Soyuna Üzerine Etkisi

İkinci grup olarak PLGA-Eskuletin (PLGA_ESC) (6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg), PLGA-Kurkumin (PLGA_CURC) (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 µg) ve ikisinin kombinasyonun (PLGA_ESC+CURC) MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Maddeler hücrelere uygulandıktan 72 saat sonra hücre canlılığı analiz edilerek sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



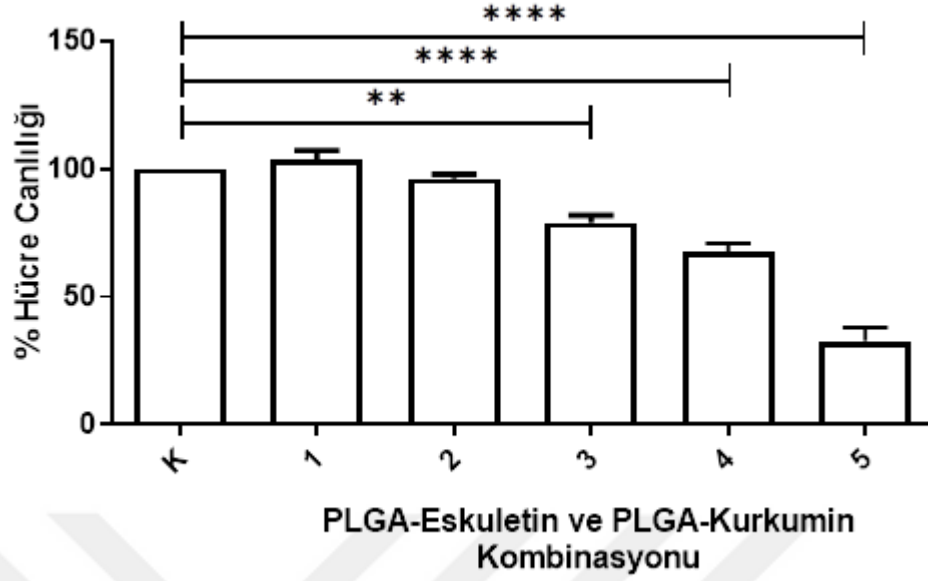
Şekil 4.4: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA ile kaplı eskuletinin hücre canlılığı üzerine etkisi. *p<0,05, ****p<0,0001.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 6.25 µg PLGA_ESC uygulandığında $99,58 \pm 3,738$; 12.5 µg PLGA_ESC uygulandığında $86,28 \pm 5,267$; 25 µg PLGA_ESC uygulandığında $71,13 \pm 2,473$; 50 µg PLGA_ESC uygulandığında $63,83 \pm 1,651$; 100 µg PLGA_ESC uygulandığında $68,03 \pm 2,532$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak hücre canlılığı 12.5 µg dozdan itibaren yükselen dozlarda kontrol grubuna göre azalmıştır (*p<0,05, ****p<0,0001).



Şekil 4.5: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA ile kaplı kurkuminin hücre canlılığı üzerine etkisi. **p<0,01, ****p<0,0001.

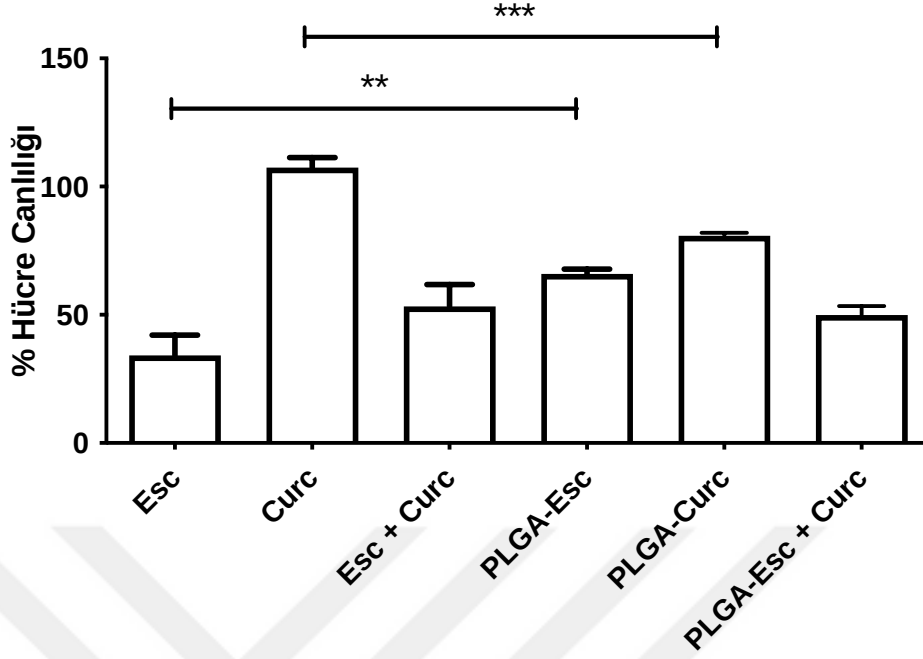
MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.78 µg PLGA_CURC uygulandığında $96,93 \pm 4,034$; 1.56 µg PLGA_CURC uygulandığında $91,64 \pm 1,649$; 3.12 µg PLGA_CURC uygulandığında $92,81 \pm 2,758$; 6.25 µg PLGA_CURC uygulandığında $85,01 \pm 3,003$; 12.5 µg PLGA_CURC uygulandığında $76,64 \pm 3,508$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna göre hücre canlılığı 6.25 µg dozdan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (**p<0,01, ****p<0,0001).



Şekil 4.6: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_ESC ve PLGA_CURC kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi. 1: 6.25 µg PLGA_ESC +0.78 µg PLGA_CURC; 2: 12.5 µg PLGA_ESC+1.56 µg PLGA_CURC; 3: 25 µg PLGA_ESC+3.12 µg PLGA_CURC; 4: 50 µg PLGA_ESC+6.25 µg PLGA_CURC; 5: 100 µg PLGA_ESC+12.5 µg PLGA_CURC. **p<0,01, ****p<0,0001.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 6.25 µg PLGA_ESC +0.78 µg PLGA_CURC uygulandığında $103,8 \pm 3,293$; 12.5 µg PLGA_ESC +1.56 µg PLGA_CURC uygulandığında $96,14 \pm 1,791$; 25 µg PLGA_ESC +3.12 µg PLGA_CURC uygulandığında $78,93 \pm 2,824$; 50 µg PLGA_ESC +6.25 µg PLGA_CURC uygulandığında $67,29 \pm 3,626$; 100 µg PLGA_ESC +12.5 µg PLGA_CURC uygulandığında $32,71 \pm 5,265$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MiaPaCa-2 hücrelerine 25 µg PLGA_ESC +3.12 µg PLGA_CURC (**p<0,01) ve üstü dozların (****p<0,0001) uygulanması hücre canlılığında anlamlı derecede azalmaya sebep olmaktadır. Bu analiz sonucu yapılan hesaplamalara göre IC50 değeri eskuletin için 75 µg ve kurkumin için 9.375 µg olarak hesaplanmıştır.

PLGA_ESC+CURC grubunun hücrelere uygulanması sonucu elde edilen IC50 değerlerinden yola çıkarak eskuletin için 75 µg, kurkumin için 9.375 µg verilmesi sonucu farklı kombinasyonlardaki madde uygulamalarının MiaPaCa-2 hücreleri üzerine olan etkileri ortak bir şemada Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

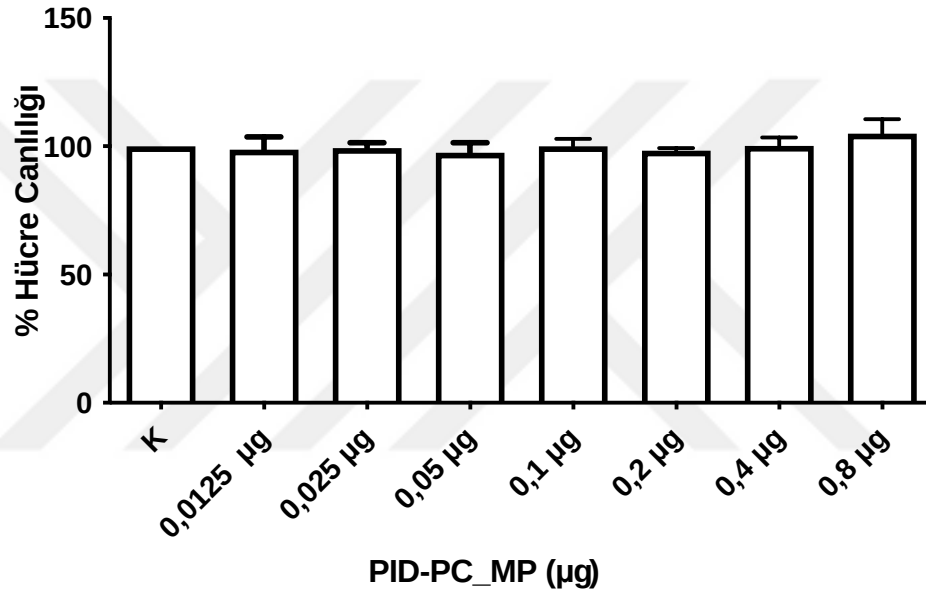


Şekil 4.7: Eskuletin (ESC), Kurkumin (CURC), Eskuletin+Kurkumin (ESC+CURC) kombinasyonu ile PLGA ile kaplı Eskuletin (PLGA_ESC), PLGA ile kaplı Kurkumin (PLGA_CURC) ve ikisinin kombinasyonunun (PLGA_ESC+CURC) MiaPaCa-2 hücre canlılığı üzerine etkisinin ortak şemada gösterimi. **p<0,01, ***p<0,001.

Şekil 4.7'ye göre MiaPaCa-2 hücrelerinde % hücre canlılığı 75 µg ESC uygulandığında 34.22 ± 7.808 ; 9.375 µg CURC uygulandığında 107.4 ± 3.864 ; 75 µg ESC ve 9.375 µg CURC kombine uygulandığında 53.30 ± 8.550 ; 75 µg PLGA_ESC uygulandığında 65.93 ± 1.939 ; 9.375 µg PLGA_CURC uygulandığında 80.83 ± 1.159 ; 75 µg PLGA_ESC ve 9.375 µg PLGA_CURC kombine uygulandığında 50.0 ± 3.421 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, MiaPaCa-2 hücrelerinde 75 µg PLGA_ESC uygulaması sonucunda hücre canlılığı, 75 µg eskuletinin çıplak olarak uygulandığı duruma kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır (**p<0,01). Diğer yandan, 9.375 µg PLGA_CURC uygulaması sonucunda hücre canlılığı, 9.375 µg kurkuminin çıplak olarak uygulanmasına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (***p<0,001). Eskuletin ve kurkuminin kombine uygulandığı gruplar arasında ise istatistiksel olarak hücre canlılığında birbirlerine kıyasla bir farklılık bulunmamaktadır.

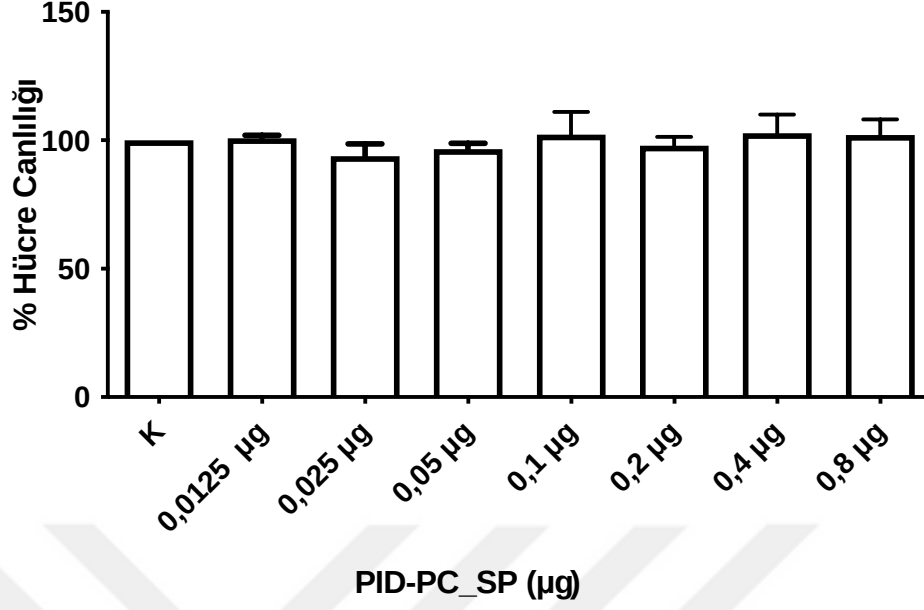
4.1.3. PID-PC Hücrelerinden İzole Edilen Sitozolik ve Membran Proteinlerinin Ayrı Ayrı Uygulanmasının Miapaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi

0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μg konsantrasyonlarda PID-PC'lerden izole edilen membran proteini (MP) ve sitozolik protein (SP) çıplak olarak MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanmış ve canlılık üzerine etkisi incelenmiştir. Maddeler uygulandıktan sonra hücreler 72 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılığı analiz edilerek sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9).



Şekil 4.8: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine PID-PC membran proteininin etkisi.

MiaPaCa-2 hücrelerinde % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.0125 μg PID-PC_MP uygulandığında $98,68 \pm 4,952$; 0.025 μg PID-PC_MP uygulandığında $99,32 \pm 2,108$; 0.05 μg PID-PC_MP uygulandığında $97,59 \pm 3,869$; 0.1 μg PID-PC_MP uygulandığında $100 \pm 2,978$; 0.2 μg PID-PC_MP uygulandığında $98,28 \pm 1,055$, 0.4 μg PID-PC_MP uygulandığında $100,2 \pm 3,230$, 0.8 μg PID-PC_MP uygulandığında $104,9 \pm 5,620$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak PID-PC_MP uygulaması sonucunda MiaPaCa-2 hücrelerinin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0,05$).

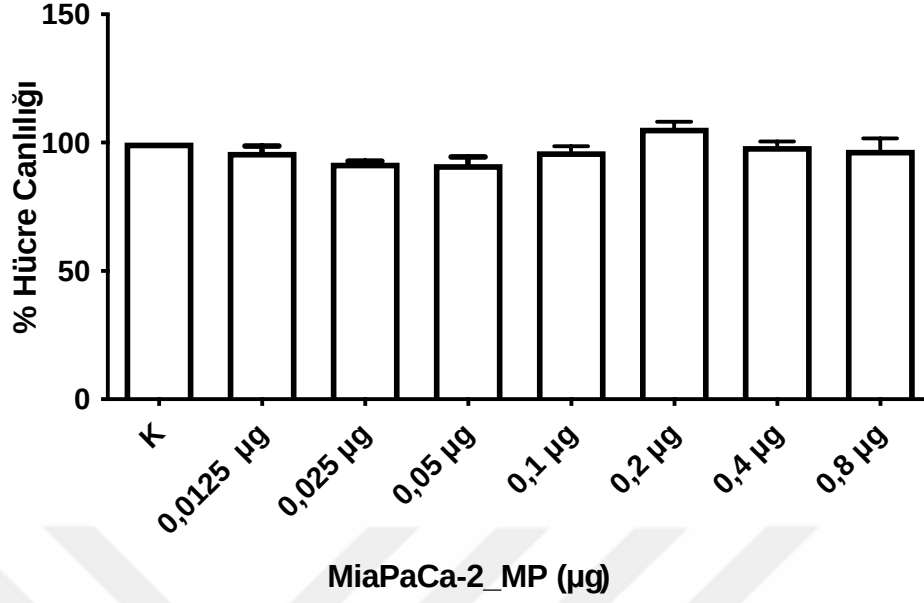


Şekil 4.9: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine PID-PC sitozolik proteinin etkisi.

MiaPaCa-2 hücrelerinde % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0,0125 µg PID-PC_SP uygulandığında $100,9 \pm 1,021$; 0,025 µg PID-PC_SP uygulandığında $93,83 \pm 4,774$; 0,05 µg PID-PC_SP uygulandığında $96,52 \pm 2,263$; 0,1 µg PID-PC_SP uygulandığında $102,2 \pm 8,896$; 0,2 µg PID-PC_SP uygulandığında $97,92 \pm 3,376$, 0,4 µg PID-PC_SP uygulandığında $102,9 \pm 7,212$, 0,8 µg PID-PC_SP uygulandığında $102,1 \pm 6,058$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak PID-PC_SP uygulaması sonucunda MiaPaCa-2 hücrelerinin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0,05$).

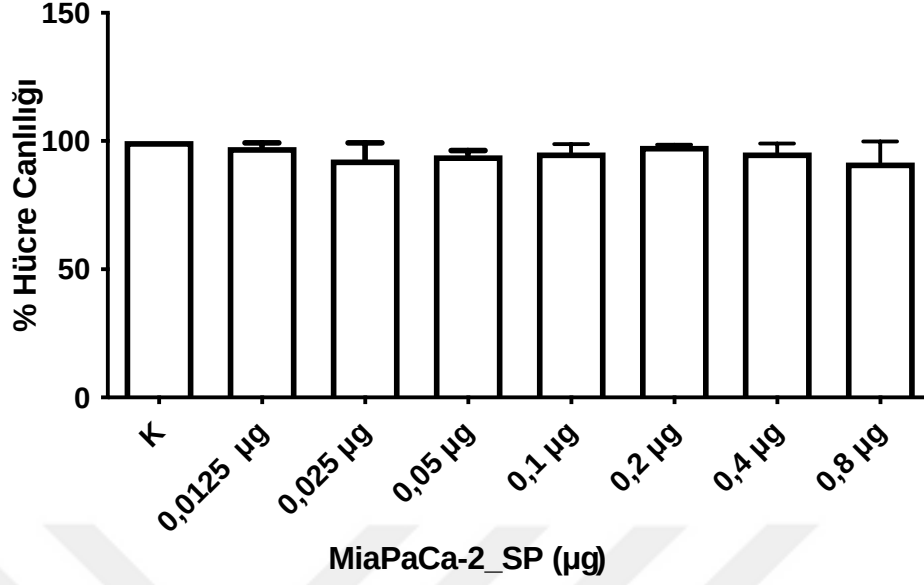
4.1.4. Miapaca-2 Hücrelerinden İzole Edilen Sitozolik ve Membran Proteinlerinin Ayrı Ayrı Uygulanmasının Miapaca-2 Hücre Soyuna Üzerine Etkisi

0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 µg konsantrasyonlarda MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran proteini (MP) ve sitozolik protein (SP) çıplak olarak MiaPaCa-2 hücre soyuna uygulanmış 72 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığı analiz edilerek sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



Şekil 4.10: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine MiaPaCa-2 membran proteininin etkisi.

MiaPaCa-2 hücrelerinde % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.0125 µg MiaPaCa-2_MP uygulandığında $96,44 \pm 2,204$; 0.025 µg MiaPaCa-2_MP uygulandığında $92,15 \pm 0,683$; 0.05 µg MiaPaCa-2_MP uygulandığında $91,73 \pm 2,715$; 0.1 µg MiaPaCa-2_MP uygulandığında $96,69 \pm 1,844$; 0.2 µg MiaPaCa-2_MP uygulandığında $105,8 \pm 2,368$, 0.4 µg MiaPaCa-2_MP uygulandığında $98,69 \pm 1,773$, 0.8 µg MiaPaCa-2_MP uygulandığında $97,22 \pm 4,463$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak MiaPaCa-2_MP uygulaması sonucunda MiaPaCa-2 hücrelerinin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0,05$).

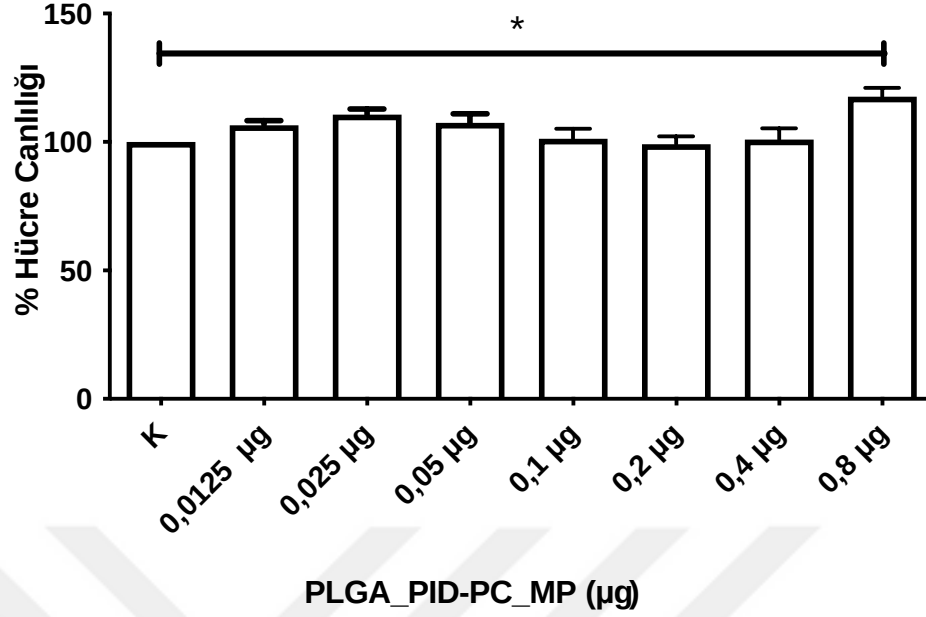


Şekil 4.11: MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine MiaPaCa-2 sitozolik proteinin etkisi.

MiaPaCa-2 hücrelerinde % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.0125 µg MiaPaCa-2_SP uygulandığında $97,74 \pm 1,619$; 0.025 µg MiaPaCa-2_SP uygulandığında $92,86 \pm 6,469$; 0.05 µg MiaPaCa-2_SP uygulandığında $94,46 \pm 1,860$; 0.1 µg MiaPaCa-2_SP uygulandığında $95,58 \pm 3,190$; 0.2 µg MiaPaCa-2_SP uygulandığında $98,24 \pm 0,296$, 0.4 µg MiaPaCa-2_SP uygulandığında $95,55 \pm 3,488$, 0.8 µg MiaPaCa-2_SP uygulandığında $91,63 \pm 8,209$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak MiaPaCa-2_SP uygulaması sonucunda MiaPaCa-2 hücrelerinin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p > 0,05$).

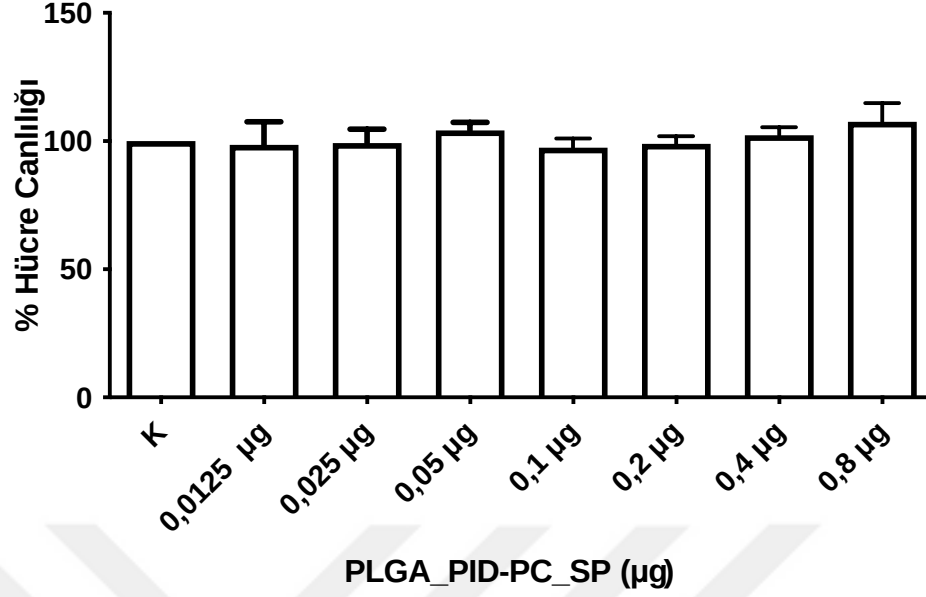
4.1.5. PID-PC Hücrelerinden İzole Edilen Membran ve Sitozolik Proteinler ile Ayır Ayır Kaplanarak Oluşturulan PLGA Kaplı Proteinlerin Miapaca-2 Hücre Soyu Üzerine Etkisi

0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 µg konsantrasyonlarda PID-PC hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler ile kaplanarak oluşturulan PLGA kaplı proteinlerin (PLGA_PID-PC_MP, PLGA_PID-PC_SP) MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Maddeler uygulandıktan sonra hücreler 72 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılığı analiz edilerek sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13).



Şekil 4.12: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_PID-PC_MP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi. * $p < 0,05$.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.0125 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulandığında $106,5 \pm 1,728$; 0.025 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulandığında $110,6 \pm 2,145$; 0.05 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulandığında $107,5 \pm 3,432$; 0.1 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulandığında $101,3 \pm 3,904$; 0.2 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulandığında $99,22 \pm 2,999$, 0.4 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulandığında $100,9 \pm 4,404$, 0.8 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulandığında $117,6 \pm 3,400$ olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre hücre canlılığı 0.8 µg protein içeren PLGA_PID-PC_MP uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (* $p < 0,05$).



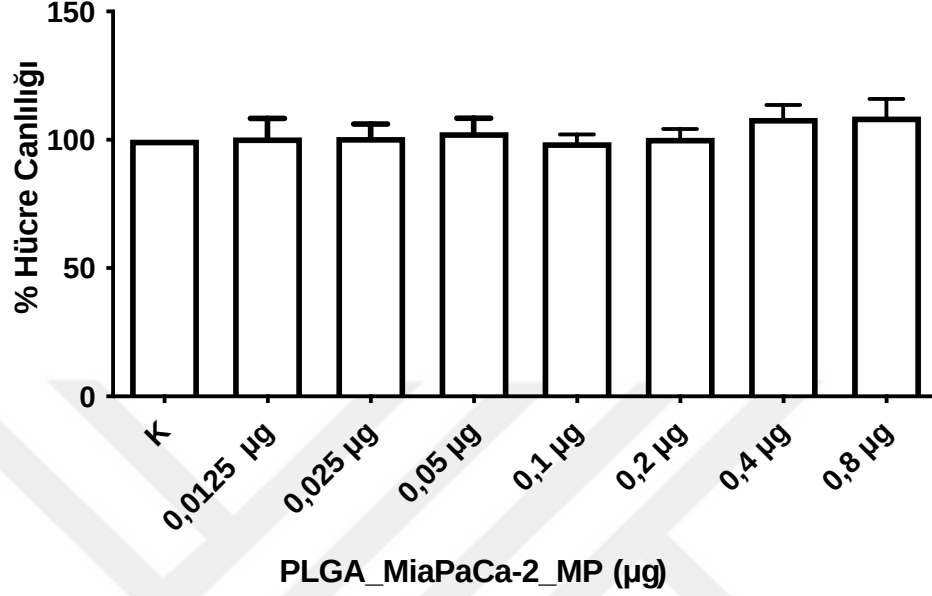
Şekil 4.13: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_PID-PC_SP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.0125 µg protein içeren PLGA_PID-PC_SP uygulandığında $98,56 \pm 9,002$; 0.025 µg protein içeren PLGA_PID-PC_SP uygulandığında $99,32 \pm 5,377$; 0.05 µg protein içeren PLGA_PID-PC_SP uygulandığında $104,1 \pm 3,218$; 0.1 µg protein içeren PLGA_PID-PC_SP uygulandığında $97,45 \pm 3,603$; 0.2 µg protein içeren PLGA_PID-PC_SP uygulandığında $98,97 \pm 3,015$, 0.4 µg protein içeren PLGA_PID-PC_SP uygulandığında $102,3 \pm 3,078$, 0.8 µg protein içeren PLGA_PID-PC_SP uygulandığında $107,6 \pm 7,237$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, PLGA_PID-PC_SP nanopartikülünün MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktur ($p > 0,05$).

4.1.6. Miapaca-2 Hücrelerinden İzole Edilen Membran ve Sitozolik Proteinler ile Ayrı Ayrı Kaplanarak Oluşturulan PLGA Kaplı Proteinlerin Miapaca-2 Hücre Soyuna Üzerine Etkisi

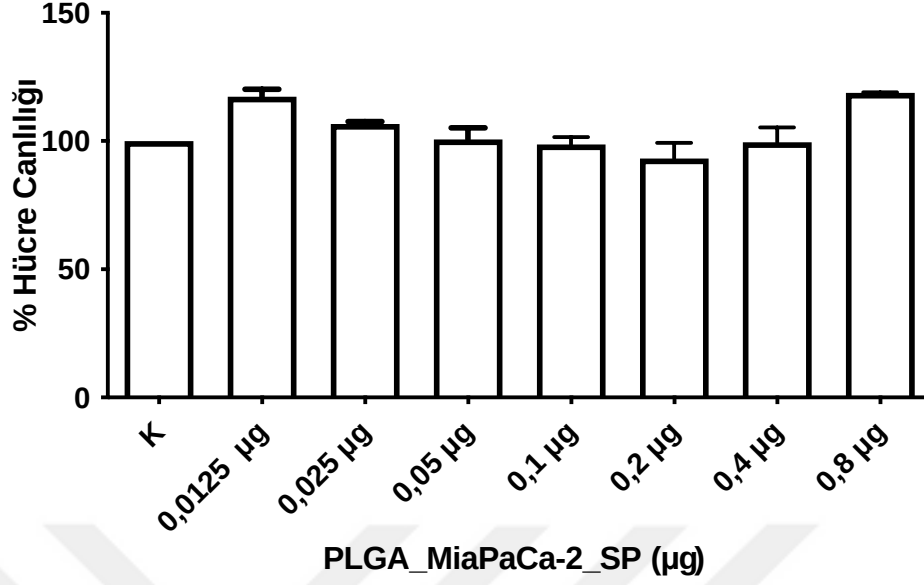
0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 µg konsantrasyonlarında MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler ile kaplanarak oluşturulan PLGA kaplı proteinlerin (PLGA_MiaPaCa-2_MP, PLGA_MiaPaCa-2_SP) MiaPaCa-2 hücre soyunun canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Maddelerin uygulanmasını takiben hücreler 72 saat inkübe edilmiş ve

hücre canlılığı analiz edilerek sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15).



Şekil 4.14: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_MiaPaCa-2_MP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0,0125 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_MP uygulandığında $101,0 \pm 7,380$; 0,025 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_MP uygulandığında $101,1 \pm 5,091$; 0,05 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_MP uygulandığında $102,9 \pm 5,558$; 0,1 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_MP uygulandığında $99,06 \pm 3,056$; 0,2 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_MP uygulandığında $100,8 \pm 3,358$, 0,4 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_MP uygulandığında $108,5 \pm 4,989$, 0,8 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_MP uygulandığında $109,1 \pm 6,862$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PLGA_MiaPaCa-2_MP nanopartikülünün MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık yoktur ($p > 0,05$).



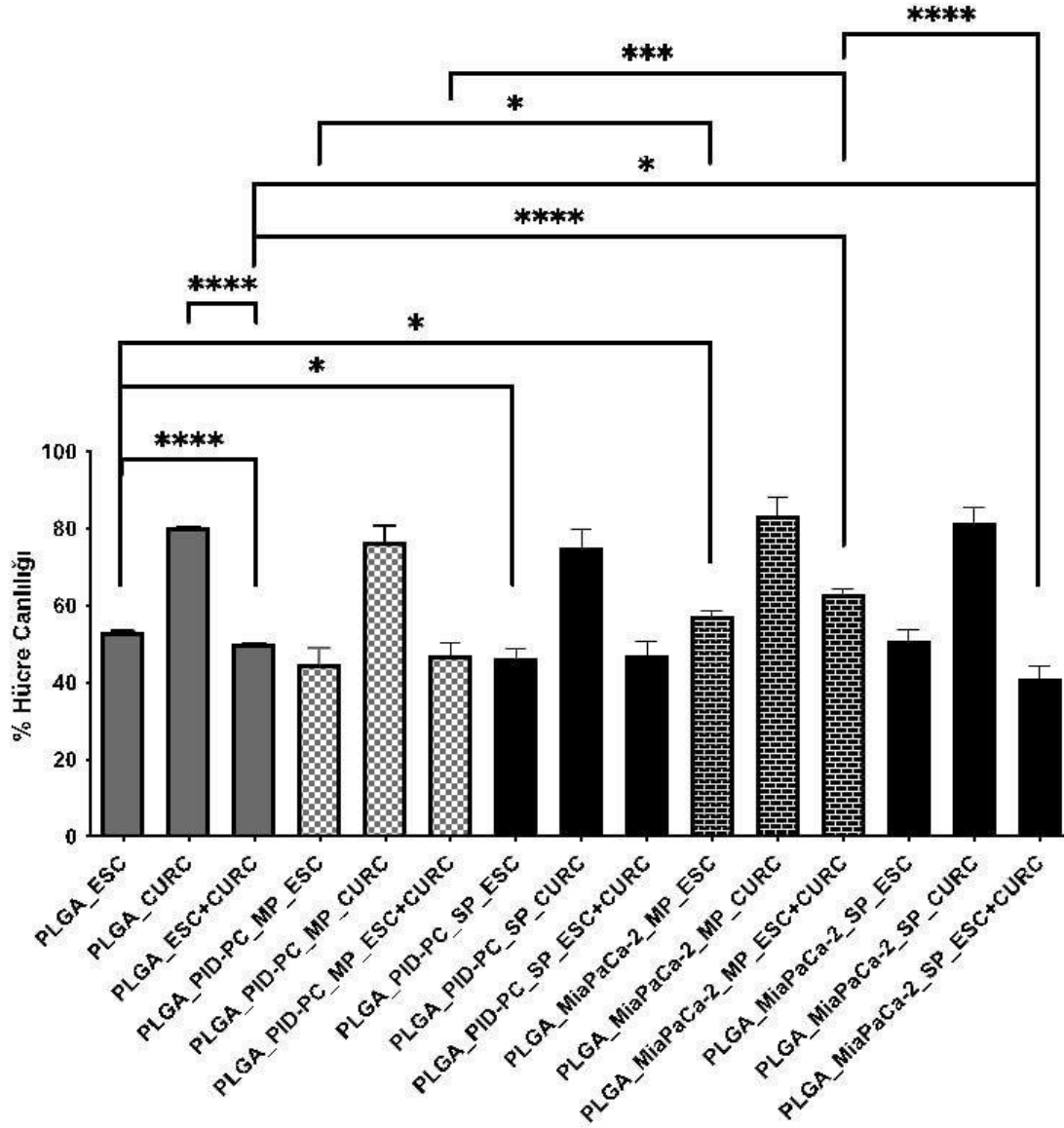
Şekil 4.15: MiaPaCa-2 hücre soyunda PLGA_MiaPaCa-2_SP nanopartikülünün hücre canlılığı üzerine etkisi.

MiaPaCa-2 hücre soyunda % hücre canlılığı kontrol grubunda 100 ± 0 ; 0.0125 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_SP uygulandığında $117,3 \pm 2,969$; 0.025 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_SP uygulandığında $106,7 \pm 0,7985$; 0.05 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_SP uygulandığında $100,7 \pm 4,473$; 0.1 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_SP uygulandığında $98,67 \pm 2,859$; 0.2 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_SP uygulandığında $93,24 \pm 6,101$, 0.4 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_SP uygulandığında $99,52 \pm 5,852$, 0.8 µg protein içeren PLGA_MiaPaCa-2_SP uygulandığında $118,8 \pm 0,2274$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PLGA_MiaPaCa-2_SP nanopartikülünün MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktur ($p > 0,05$).

4.1.7. PID-PC ve Miapaca-2 Hücrelerinden Elde Edilen Membran ve Sitozolik Proteinler ile Ayrı Ayrı Kaplanmış PLGA_ESC ve PLGA_CURC Nanopartiküllerinin Miapaca-2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Ortak Şemada Gösterimi

75 µg eskuletin içeren PLGA nanopartikülleri ve 9.375 µg kurkumin içeren PLGA nanopartikülleri PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik protein (0.8 µg) ve membran proteinleri (0.8 µg) ile kaplanmış ve oluşturulan nanoformülasyonlar MiaPaCa-2

hücrelerine tek başına ya da kombinasyon halinde uygulanmıştır. Bu uygulamaların sonuçları Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16: PLGA_ESC, PLGA_CURC ve kombinasyon nanopartiküllerinin ve bu formülasyonların PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ya da membran proteinler ile kaplanmasıyla oluşturulan nanopartiküllerin MiaPaCa-2 hücre canlılığı üzerine etkisinin ortak şemada gösterimi. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

MiaPaCa-2 hücrelerine 75 µg PLGA_ESC, 9.375 µg PLGA_CURC ve kombinasyonları uygulanmıştır. Ayrıca 0.8 µg PID-PC membran ya da sitoplazmik protein ya da MiaPaCa-2 membran ve sitozolik proteinleri ayrı ayrı PLGA kaplı nanoformüllere ilave edilmiştir. Buna göre, % hücre canlılığı, PLGA_ESC için 53,17 ± 0,0738; PLGA_CURC için 80,41 ± 0,1845; PLGA_ESC+CURC için 50,21 ± 0,0850; PLGA_PID-PC_MP_ESC için 44,87 ±

4,003; PLGA_PID-PC_MP_CURC için %76,65 $\pm$ 4,317; PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC için %47,21 $\pm$ 3,019; PLGA_PID-PC_SP_ESC için %46,42 $\pm$ 2,313; PLGA_PID-PC_SP_CURC için %75,17 $\pm$ 4,487; PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC için %47,07 $\pm$ 3,671; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC için %57,19 $\pm$ 1,58; PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC için %83,41 $\pm$ 4,883; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC için %63,09 $\pm$ 1,243; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC için %50,89 $\pm$ 2,938; PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC için %81,54 $\pm$ 4,112; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC için %41,11 $\pm$ 3,158 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, PLGA_ESC+CURC uygulaması sonucu PLGA_ESC ve PLGA_CURC uygulanmasına göre hücre canlılığı azalmıştır (****p<0,0001). PLGA_ESC uygulamasına kıyasla, PLGA_PID-PC_MP_ESC uygulaması anlamlı bir değişiklik oluşturmazken PLGA_PID-PC_SP_ESC uygulaması hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (*p<0,05). PLGA_ESC uygulanmasıyla kıyaslandığında, PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC uygulaması hücre canlılığını artırıcı etki gösterirken (*p<0,05) PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC uygulaması anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. PLGA_CURC uygulaması sonucu, protein kaplı olan PLGA_CURC gruplarında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. PLGA_ESC+CURC grubuna göre, PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC ve PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC grupları anlamlı bir fark oluşturmamıştır. PLGA_ESC+CURC grubuna kıyasla PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC grubunda hücre canlılığı artmıştır (****p<0,0001). PLGA_ESC+CURC grubuna kıyasla PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC grubunda ise hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azalmıştır (*p<0,05).

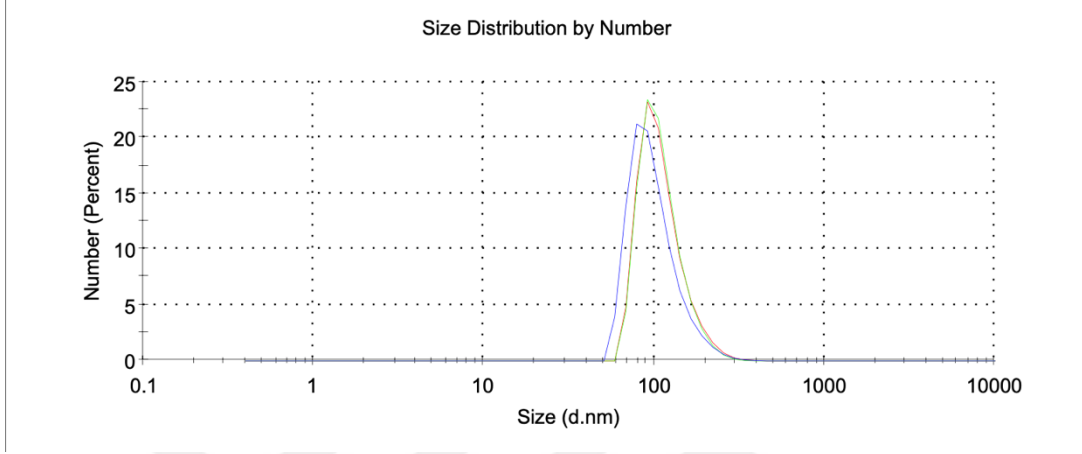
4.2. OLUŞTURULAN NANO FORMÜLASYONUN KARAKTERİZASYONU

Oluşturulan nanoformülasyonların karakterizasyonu DLS yöntemi ile yapılmıştır.

4.2.1 Boş PLGA'nın Karakterizasyonu

Şekil 4.17'de boş PLGA'nın karakterizasyonu için ölçüm grafiği verilmiştir.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 149.1	Peak 1: 101.1	100.0	36.10
Pdl: 0.109	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.908	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



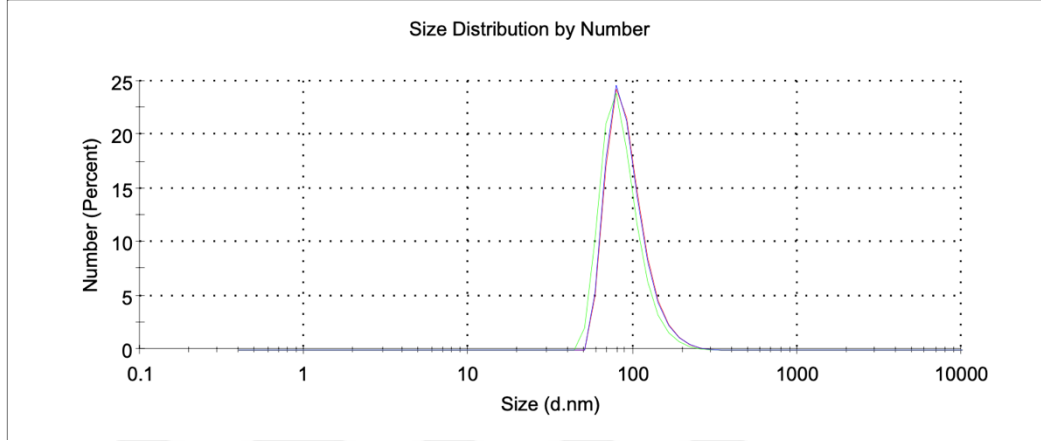
Şekil 4.17: Boş PLGA'nın karakterizasyon için ölçüm grafiği

Boş PLGA karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 101.1 ± 36.10 nm olarak ölçülmüştür.

4.2.2. PLGA_ESC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Karakterizasyonları

PLGA_ESC ve farklı proteinler ile kombine edilen farklı formların karakterizasyonları sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

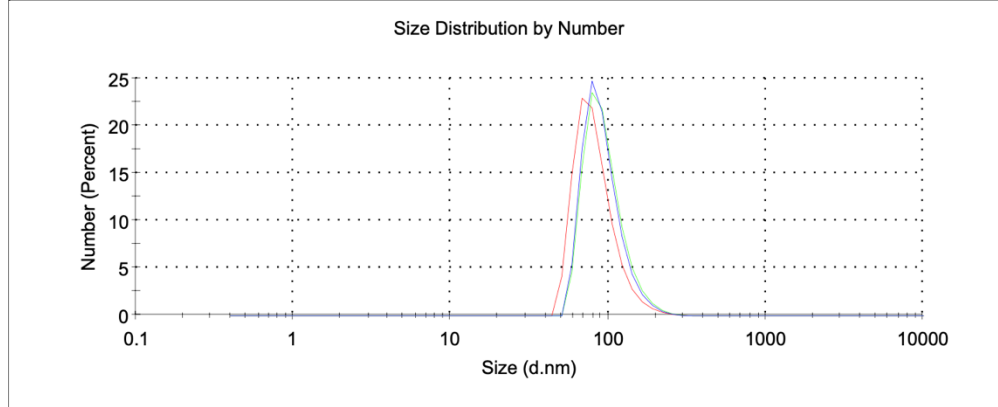
	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 129.7	Peak 1: 93.17	100.0	28.47
Pdl: 0.123	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.903	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.18: PLGA_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği

PLGA_ESC'nin karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 93.17 ± 28.47 nm olarak ölçülmüştür.

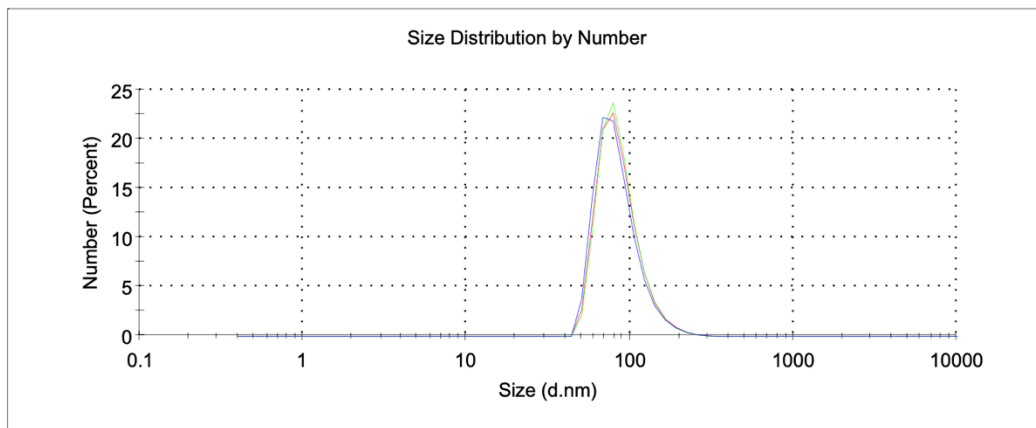
	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 127.9	Peak 1: 92.96	100.0	27.89
Pdl: 0.135	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.886	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.19: PLGA_PID-PC_MP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği

PLGA_PID-PC_MP_ESC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 92.96 ± 27.89 nm olarak ölçülmüştür.

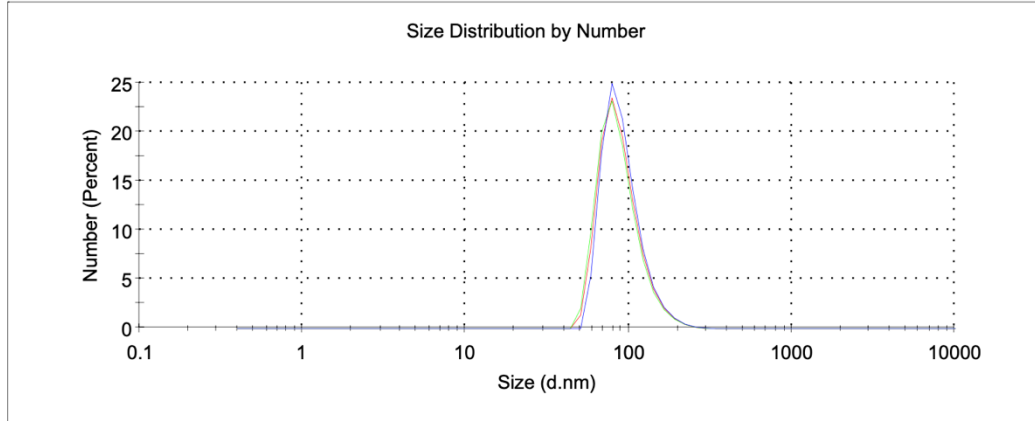
	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 128.6	Peak 1: 85.16	100.0	28.37
Pdl: 0.111	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.838	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.20: PLGA_PID-PC_SP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği

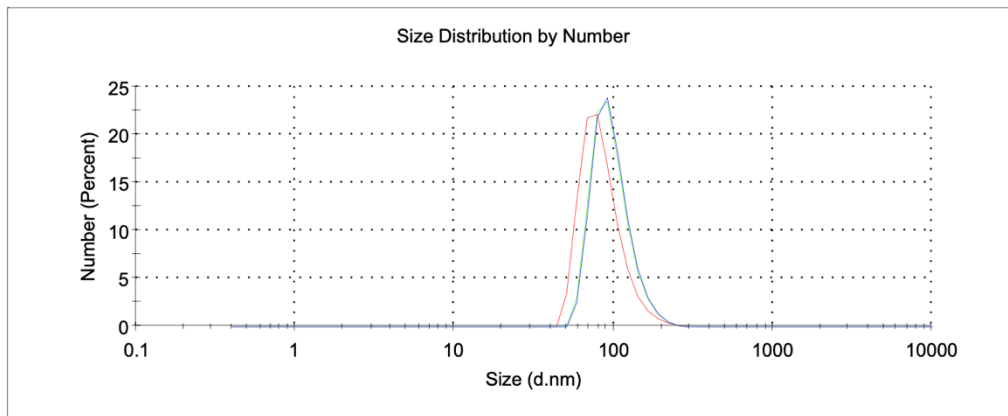
PLGA_PID-PC_SP_ESC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 85.16 ± 28.37 nm olarak ölçülmüştür.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 127.2	Peak 1: 92.57	100.0	27.88
Pdl: 0.103	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.911	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.21: PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği
PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 92.57 ± 27.88 nm olarak ölçülmüştür.

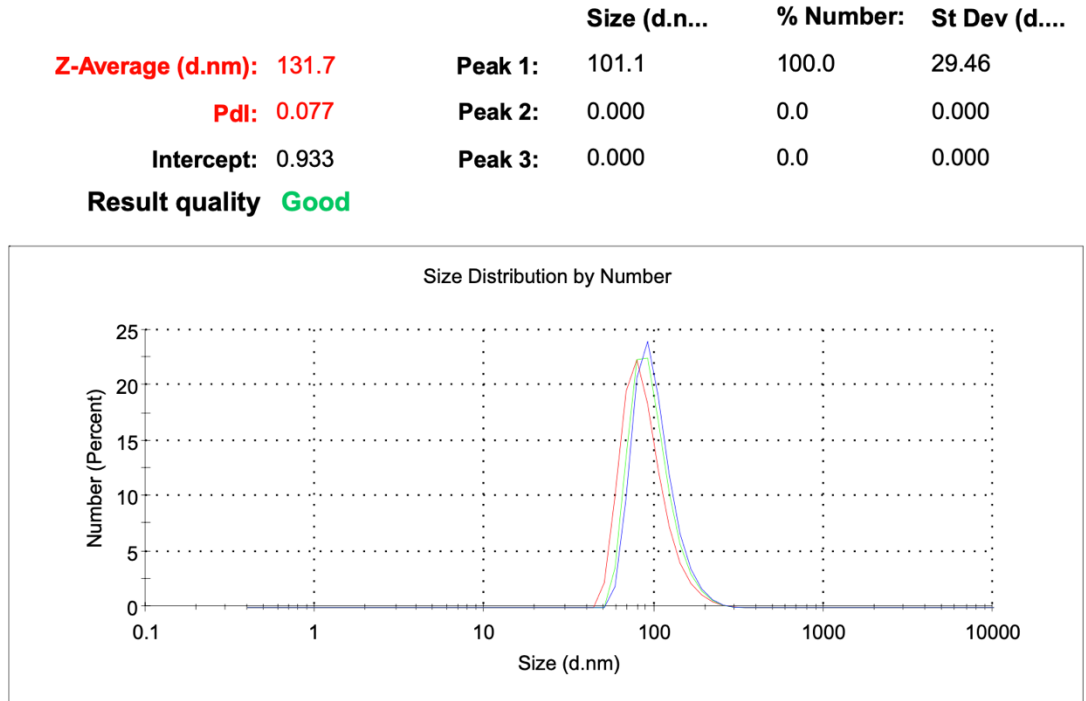
	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 127.3	Peak 1: 98.62	100.0	27.86
Pdl: 0.059	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.22: PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği
PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 98.62 ± 27.86 nm olarak ölçülmüştür.

4.2.3. PLGA_CURC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Karakterizasyonları

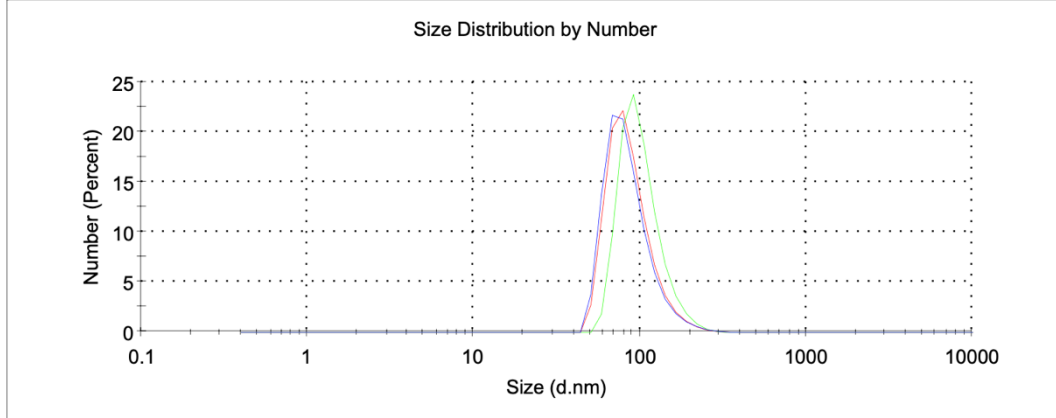
PLGA_CURC ve PLGA_CURC'nin PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler ile kaplanması sonucu oluşturulan nanoformülasyonların karakterizasyonu sonucu elde edilen grafikler Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.23: PLGA_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği

PLGA_CURC'nin karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 101.1 ± 29.46 nm olarak ölçülmüştür.

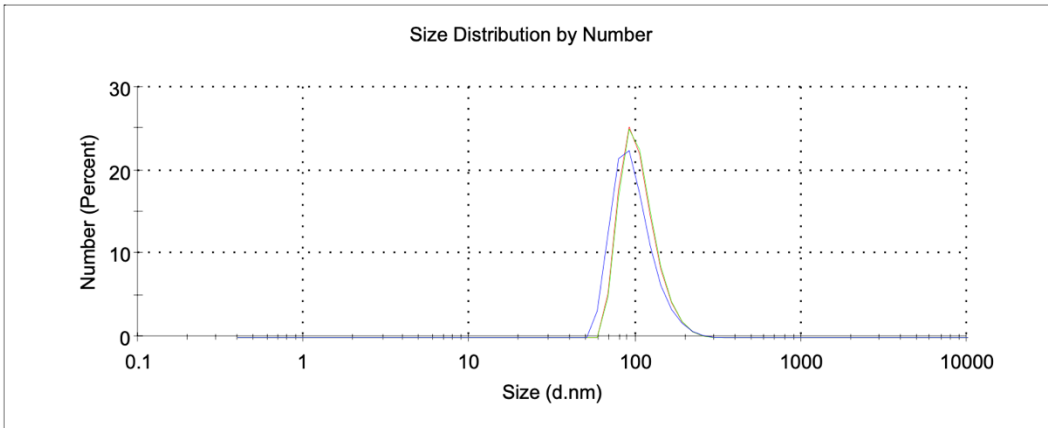
	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 136.7	Peak 1: 86.55	100.0	30.85
Pdl: 0.131	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.881	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.24: PLGA_PID-PC_MP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği

PLGA_PID-PC_MP_CURC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 86.55 ± 30.85 nm olarak ölçülmüştür.

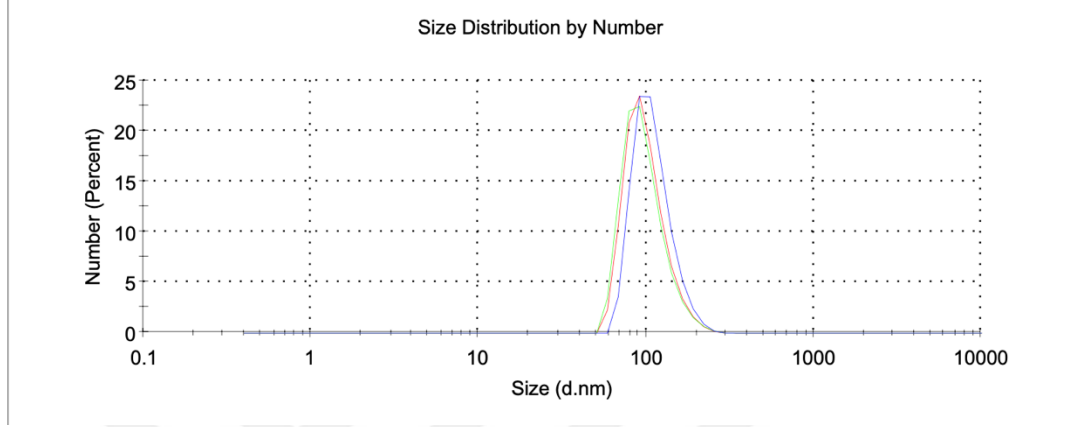
	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 133.8	Peak 1: 99.34	100.0	30.45
Pdl: 0.066	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.935	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.25: PLGA_PID-PC_SP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği

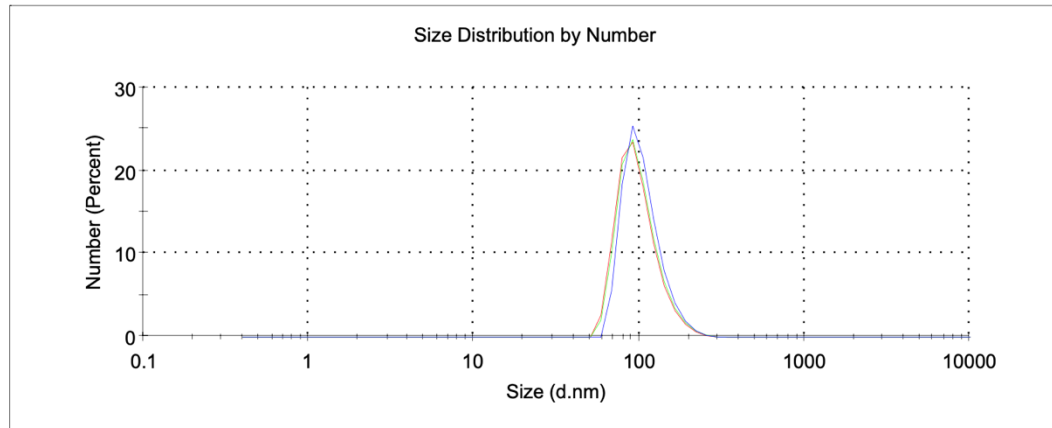
PLGA_PID-PC_SP_CURC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 99.34 ± 30.45 nm olarak ölçülmüştür.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 135.5	Peak 1: 110.2	100.0	29.79
Pdl: 0.053	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.935	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



Şekil 4.26: PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği
PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 110.2 ± 29.79 nm olarak ölçülmüştür.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 132.6	Peak 1: 105.5	100.0	29.05
Pdl: 0.068	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.930	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

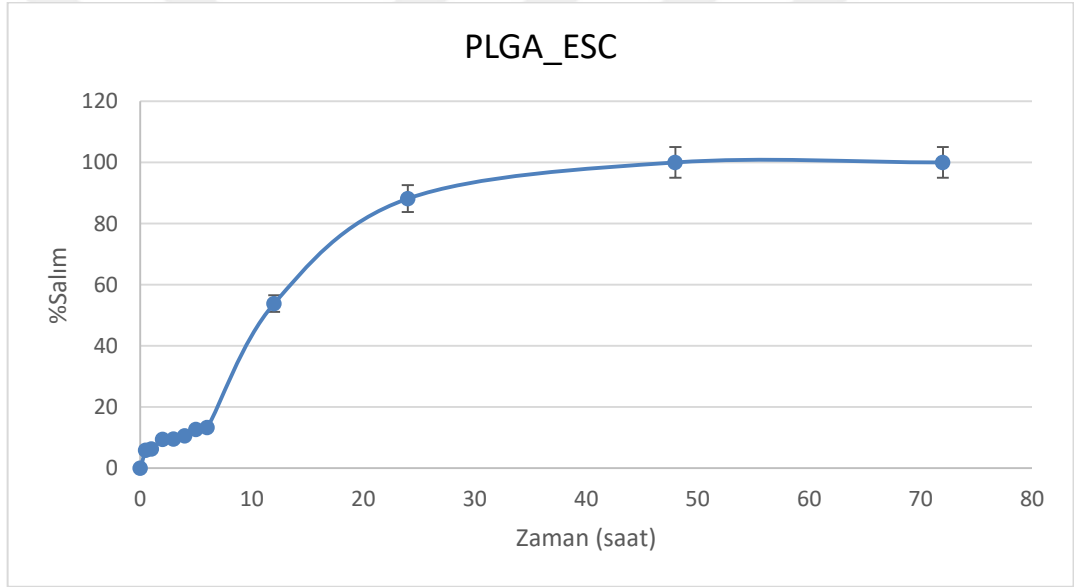


Şekil 4.27: PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC'in karakterizasyon için ölçüm grafiği
PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC'in karakterizasyon ölçüm grafiğine göre, formülasyonun boyutu 105.5 ± 29.05 nm olarak ölçülmüştür.

4.3. PLGA_ESC VE PLGA_CURC'İN FARKLI PROTEİNLER İLE KOMBİNE EDİLEN FARKLI FORMLARININ SALIM DENEYİ SONUÇLARI

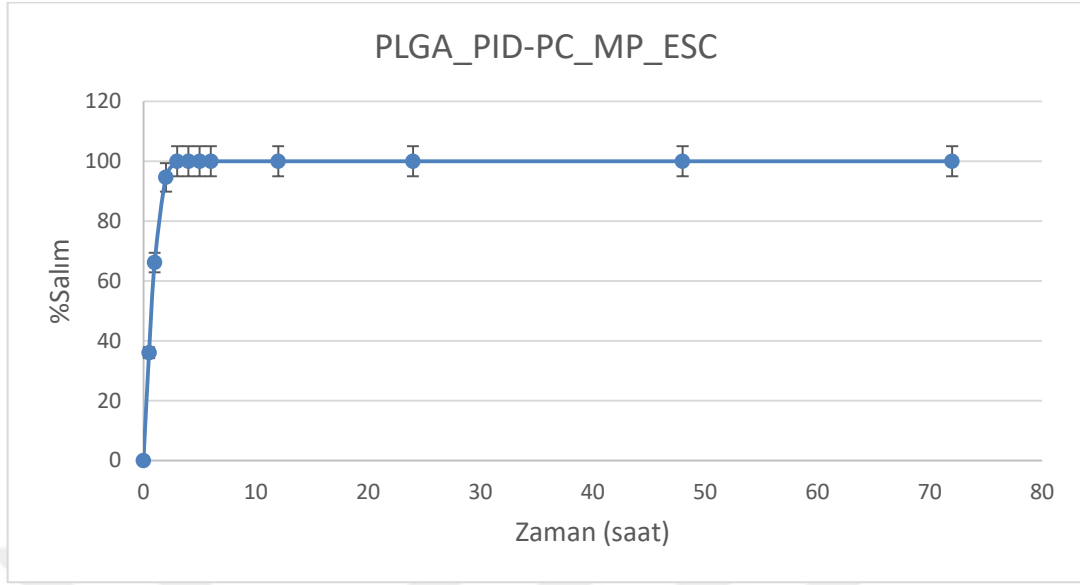
4.3.1. PLGA_ESC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Salım Sonuçları

Eskuletin salımı homojen bir davranış göstermektedir. Eskuletinin PLGA'dan salım davranışı daha önce yapmış olduğumuz yayında rapor edilen davranışa oldukça benzerdir (Karatug Kacar ve diğ., 2020). İlk 6 saatte oldukça yavaş bir salım gözlenmektedir. 6. saatten sonra yavaşça artan bir salım ivmesi ile eskuletin salınarak 48. saate gelindiğinde tüm ilaç molekülleri salınmaktadır (Şekil 4.28).

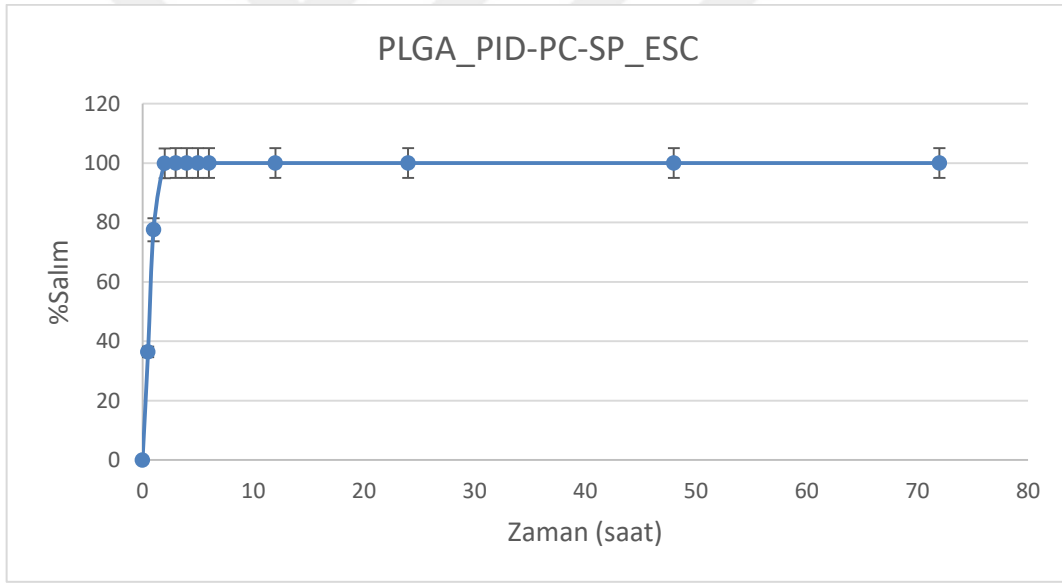


Şekil 4.28: PLGA_ESC Salım Grafiği

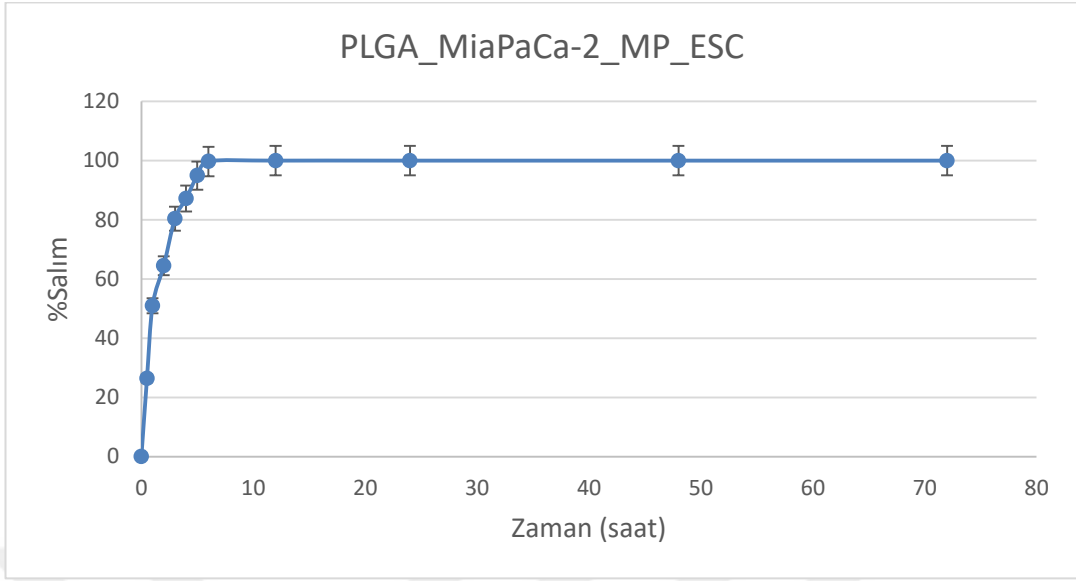
PLGA_ESC'nin PID-PC_MP, PID-PC_SP, MiaPaCa-2_MP ve MiaPaCa-2_SP'ler ile etkileşmesi oldukça etkin ve baskın bir şekilde salım hızını arttırmaktadır (Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32).



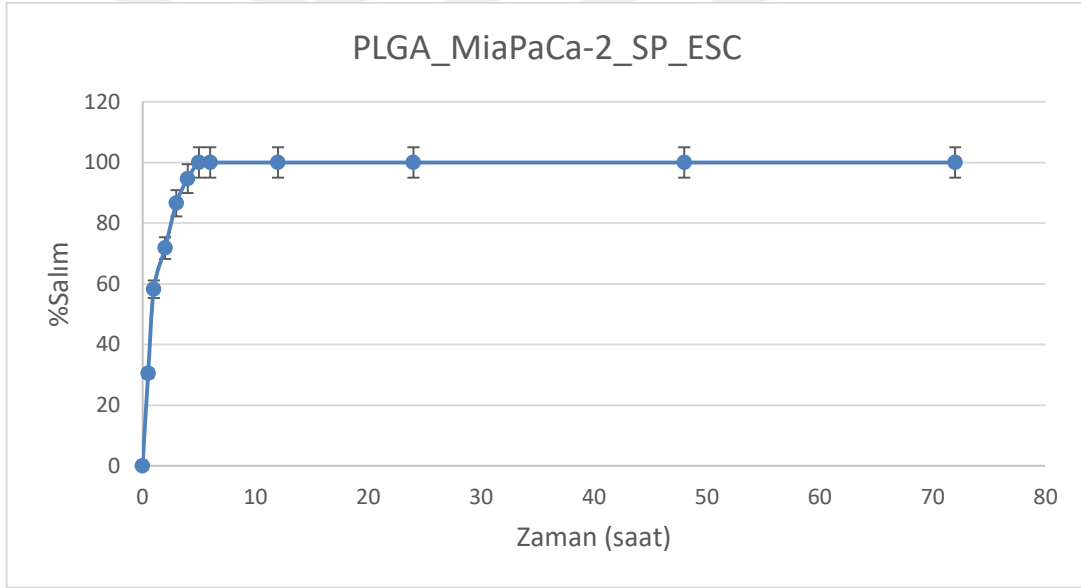
Şekil 4.29: PLGA_PID-PC_MP_ESC Salım Grafiği



Şekil 4.30: PLGA_PID-PC_SP_ESC Salım Grafiği



Şekil 4.31: PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC Salım Grafiği

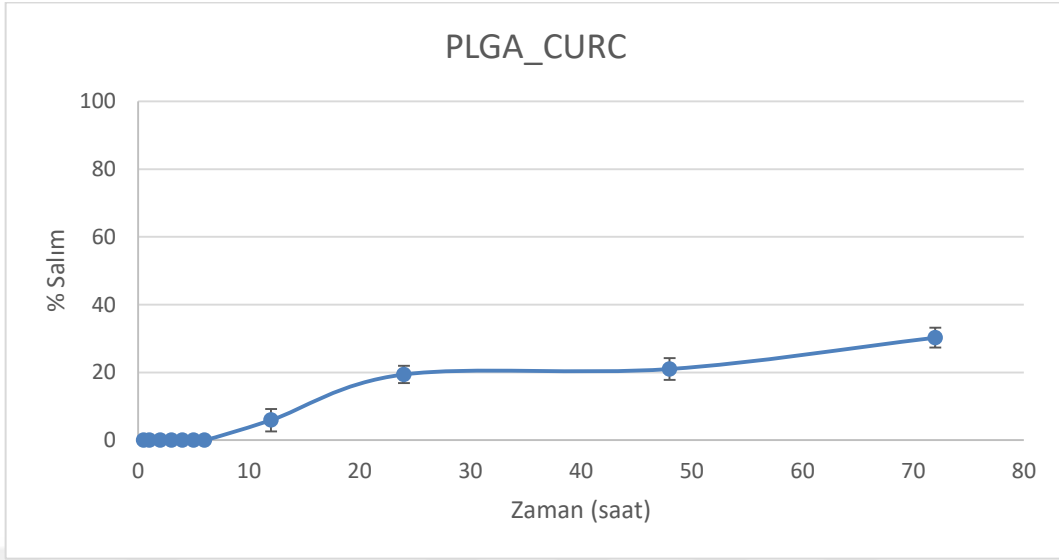


Şekil 4.32: PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC Salım Grafiği

Tüm formülasyonlarda Eskuletin ilk 6 saatte %100 salıma ulaşmış durumdadır.

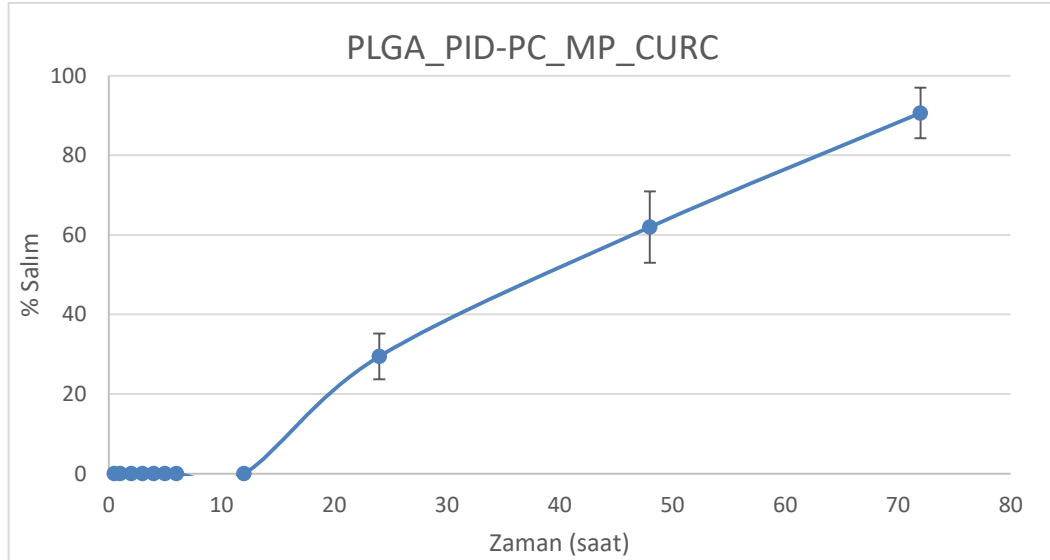
4.3.2. PLGA_CURC ve Farklı Proteinler ile Kombine Edilen Farklı Formların Salım Sonuçları

Kurkumin PLGA'dan oldukça yavaş bir şekilde salınım gerçekleştirmektedir. İlk 6 saatte hiçbir salım gözlenmezken, 12. saatten itibaren çok yavaş bir salım başlamakta ve 72 saatin sonunda bile PLGA'ya yüklenen kurkuminin sadece %30'u salınmaktadır (Şekil 4.33).



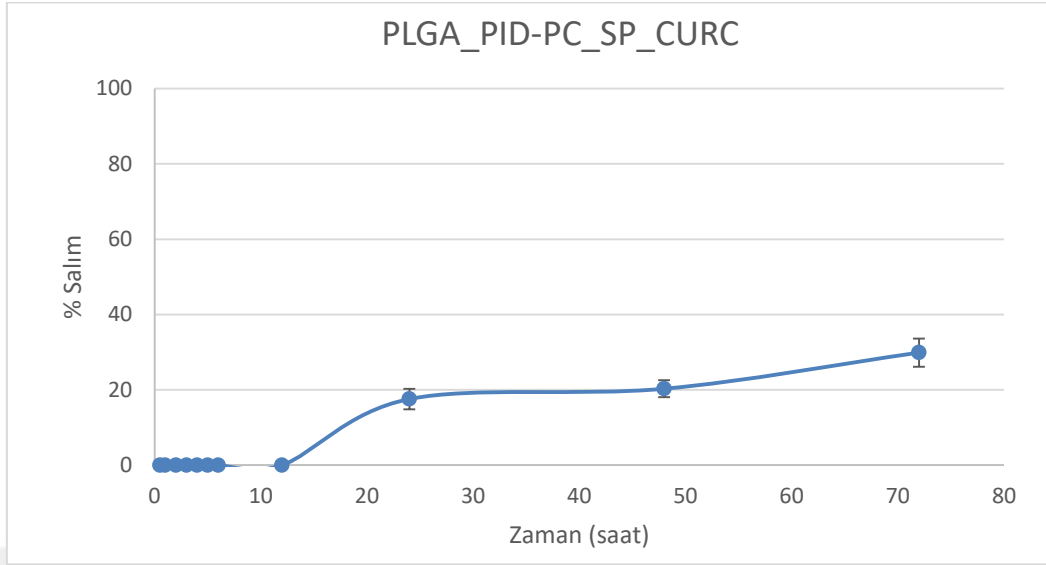
Şekil 4.33: PLGA_CURC'in Salım Grafiği

PLGA_CURC çeşitli protein fraksiyonları ile kaplandığında bu yavaş salım davranışı tamamen değişiklik göstermektedir. PLGA-Kurkumin PID-PC_MP ile kaplandığında salımın hızlandığı gözlenmektedir. İlk 12 saatte hiçbir salım gözlenmez iken, 12. saatten sonra salım davranışı aniden hızlanma göstermekte ve 72. saatin sonunda yüklenen kurkuminin yaklaşık %90'ı salınmaktadır (Şekil 4.34).



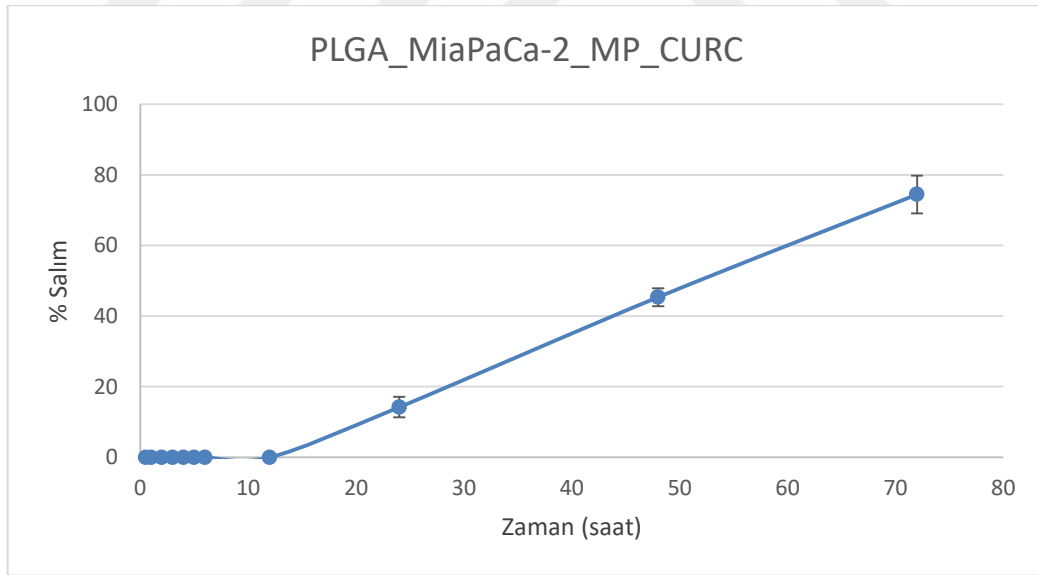
4.34: PLGA_PID-PC_MP_CURC Salım Grafiği

PLGA_CURC PID-PC_SP ile kaplandığında salım oldukça yavaştır ve tek başına PLGA_CURC'e kıyasla neredeyse hiçbir fark görülmemektedir (Şekil 4.35).



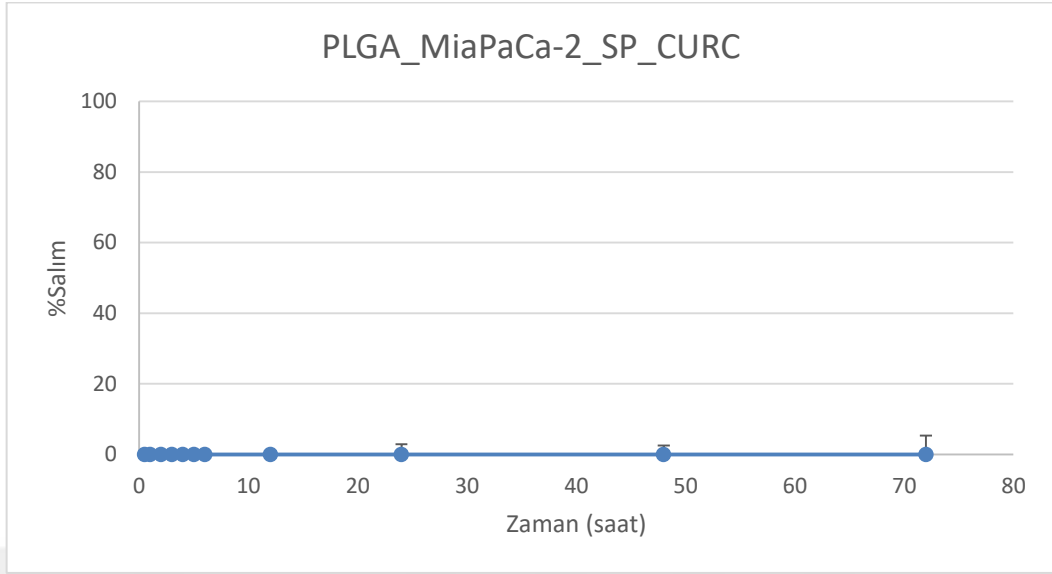
Şekil 4.35: PLGA_PID-PC_SP_CURC Salım Grafiği

PLGA_CURC MiaPaCa-2_MP ile kaplandığında da PLGA-Kurkumin PID-PC_MP ile kaplandığındakine benzer şekilde 12. saatten sonra kurkumin salımı daha da hızlanmış durumdadır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36: PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC Salım Grafiği

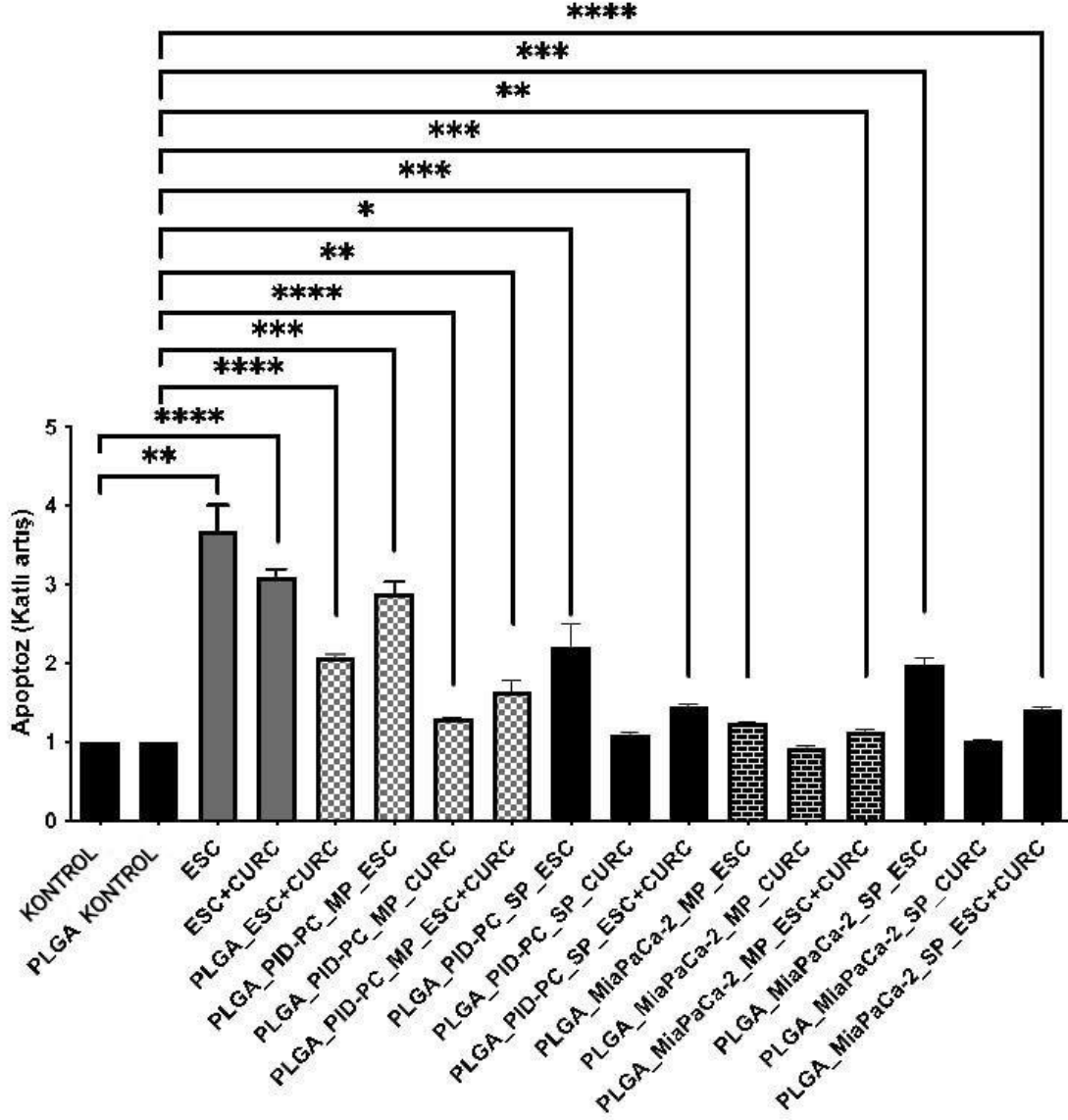
PLGA_CURC MiaPaCa-2_SP ile kaplandığında hiçbir şekilde kurkumin salımı gerçekleşmemiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37: PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC Salım Grafiği

4.4. APOPTOZ VE NEKROZ ANALİZ SONUÇLARI

Hücre canlılığı analizi sonucunda hücre ölümü gözlenen deney gruplarında apoptoz ve nekroz seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 4.38 ve Şekil 4.39’da gösterilmiştir.

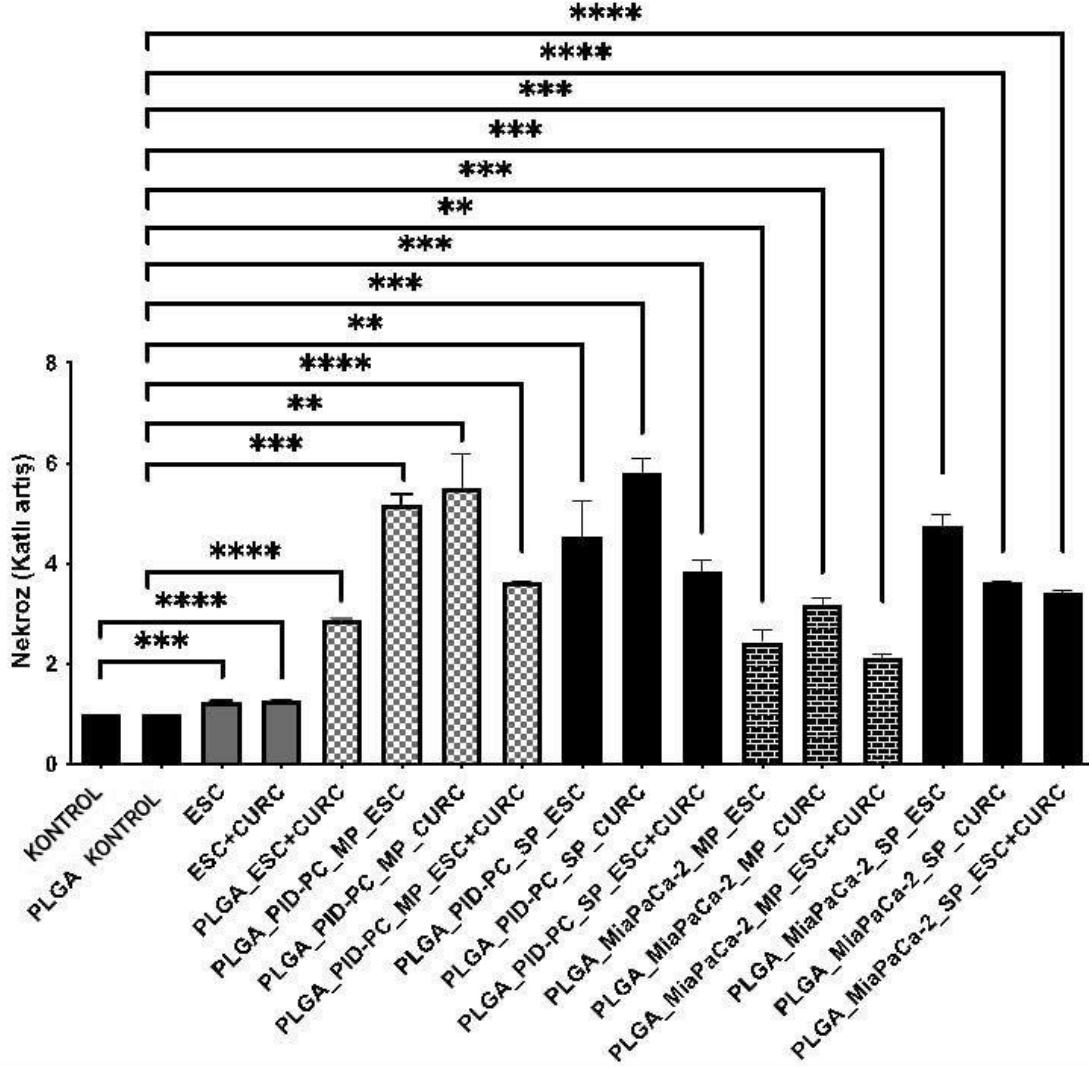


Şekil 4.38: Eskuletin (ESC), eskuletin+kurkumin (ESC+CURC), PLGA_ESC+CURC ve PLGA kaplı nanotaşıyıcıların PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ve membran proteinleri ile ayrı ayrı kaplanmasıyla oluşturulan nanoformülasyonların MiaPaCa-2 hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla meydana gelen apoptoz seviyesinin katlı artış grafiği. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

MiaPaCa-2 hücrelerine 75 μg ESC tek başına ve 9.375 μg CURC ile birlikte çıplak olarak ve sonrasında bu kombinasyon PLGA kaplı olarak uygulanmıştır. PLGA kaplı eskuletin ve kurkumin PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen 0.8 μg membran ve sitoplazmik proteinler ile ayrı ayrı kaplanarak MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre MiaPaCa-2 hücrelerinde apoptoz katlı artışı kontroller için $1,000 \pm 0$; ESC için $3,683 \pm 0,323$; ESC+CURC için $3,101 \pm 0,096$; PLGA_ESC+CURC için $2,081 \pm 0,024$; PLGA_PID-PC_MP_ESC için $2,889 \pm 0,146$; PLGA_PID-PC_MP_CURC için $1,292 \pm 0,018$;

PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC için $1,645 \pm 0,139$; PLGA_PID-PC_SP_ESC için $2,207 \pm 0,292$; PLGA_PID-PC_SP_CURC için $1,082 \pm 0,036$; PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC için $1,451 \pm 0,035$; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC için $1,239 \pm 0,013$; PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC için $0,926 \pm 0,026$; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC için $1,137 \pm 0,024$; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC için $1,985 \pm 0,084$; PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC için $1,009 \pm 0,017$; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC için $1,417 \pm 0,017$ olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubu ile kıyaslandığında çıplak ESC, çıplak ESC+CURC ve PLGA_ESC+CURC grupları anlamlı derecede apoptotik hücre ölümünün artışına sebep olmuştur (**p<0,01, ****p<0,0001, ****p<0,0001). İzole edilen membran ve sitoplazmik proteinler ile kaplanan gruplardan PLGA_PID-PC_SP_CURC, PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC ve PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC grupları hariç diğer protein kaplı gruplarda (PLGA_PID-PC_MP_ESC (***p<0,001), PLGA_PID-PC_MP_CURC (****p<0,0001), PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC (**p<0,01), PLGA_PID-PC_SP_ESC (*p<0,05), PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC (***p<0,001), PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC (***p<0,001), PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC (**p<0,01), PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC (***p<0,001), PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC (****p<0,0001)) kontrol gruplarına göre apoptotik hücre ölümü artmıştır.



Şekil 4.39: Eskuletin (ESC), eskuletin+kurkumin (ESC+CURC), PLGA_ESC+CURC ve PLGA kaplı nanotaşıyıcıların PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ve membran proteinler ile ayrı ayrı kaplanmasıyla oluşturulan nanoparmulasyonların MiaPaCa-2 hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla oluşturduğu nekroz katlı artış grafiğı. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

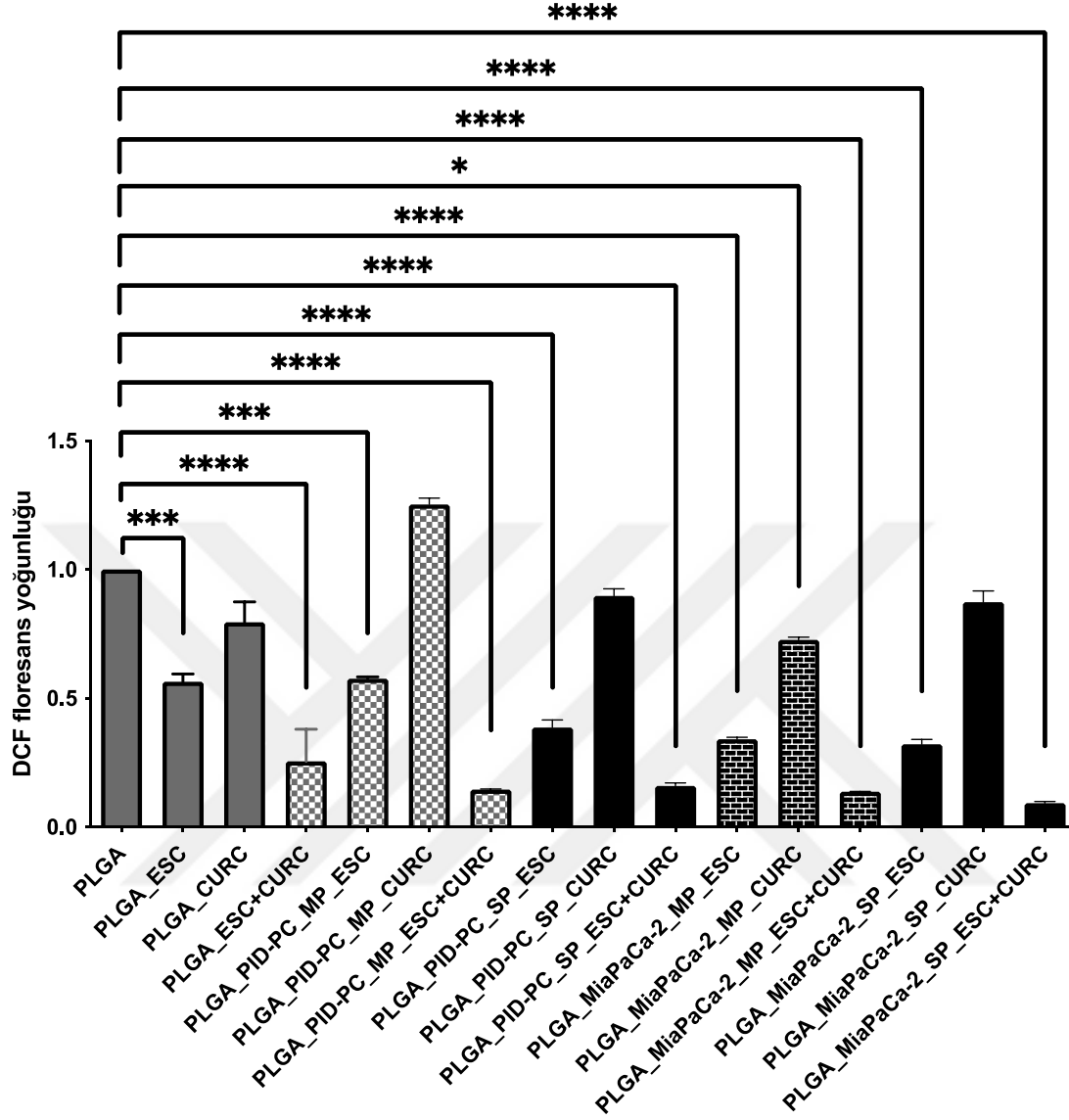
MiaPaCa-2 hücrelerine, 75 µg ESC tek başına ve 9.375 µg CURC ile birlikte çıplak olarak ve ESC+CURC kombinasyonu PLGA kaplı olarak uygulanmıştır. Sonrasında PLGA kaplı eskuletin ve kurkumin PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen 0.8 µg membran ve sitoplazmik proteinler ile ayrı ayrı kaplanarak oluşturulan gruplar da MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanmıştır. Tüm bu uygulanan deney gruplarında nekroz seviyesi araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre nekroz katlı artışı kontroller için 1,000±0; ESC için 1,244±0,012; ESC+CURC kombinasyonu için 1,275±0,005; PLGA_ESC+CURC için 2,880±0,028; PLGA_PID-PC_MP_ESC için 5,161±0,219; PLGA_PID-PC_MP_CURC için 5,494±0,693; PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC için 3,639±0,002; PLGA_PID-PC_SP_ESC için

4,523±0,715; PLGA_PID-PC_SP_CURC için 5,816±0,279; PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC için 3,827±0,236; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC için 2,435±0,231; PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC için 3,187±0,124; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC için 2,104±0,099; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC için 4,744±0,235; PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC için 3,632±0,016; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC için 3,409±0,053 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grupları ile kıyaslandığında çıplak ESC, çıplak ESC+CURC ve PLGA_ESC+CURC gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede nekrotik hücre ölümü artmıştır (**p<0,001, ***p<0,0001, ****p<0,0001). İzole edilen proteinler ile oluşturulan tüm gruplarda (PLGA_PID-PC_MP_ESC (**p<0,001), PLGA_PID-PC_MP_CURC (**p<0,01), PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC (***p<0,0001), PLGA_PID-PC_SP_ESC (**p<0,01), PLGA_PID-PC_SP_CURC (***p<0,001), PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC (***p<0,001), PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC (**p<0,01), PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC (***p<0,001), PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC (***p<0,001), PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC (***p<0,001), PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC (***p<0,0001), PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC (***p<0,0001)) kontrol gruplarına göre nekrotik hücre ölümü artmıştır.

4.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

75 µg ESC ve 9.375 µg CURC PLGA ile kaplanarak tek başına ve kombinasyon halinde MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra PLGA kaplı bu formülasyonlar 0.8 µg PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitoplazmik protein ile ayrı ayrı kaplanarak MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanmıştır. Uygulama sonrasında hücrelerde ROS oluşumu analiz edilmiştir. Elde edilen sonuç Şekil 4.40'da gösterilmiştir.



Şekil 4.40: PLGA-Eskuletin (PLGA_ESC), PLGA-Kurkumin (PLGA_CURC) ve kombinasyon nanopartikülleri (PLGA_ESC+CURC) ile bu nanopartiküllerin PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen sitozolik ve membran proteinler ile ayrı ayrı kaplanmasıyla oluşturulan nanopartiküllerin MiaPaCa-2 hücrelerinde ROS oluşumuna etkisi. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Elde edilen bulgulara göre MiaPaCa-2 hücrelerinde DCF floresan yoğunluğu PLGA için $1,000 \pm 0$; PLGA_ESC için $0,564 \pm 0,030$; PLGA_CURC için $0,796 \pm 0,078$; PLGA_ESC+CURC için $0,255 \pm 0,124$; PLGA_PID-PC_MP_ESC için $0,576 \pm 0,007$; PLGA_PID-PC_MP_CURC için $1,253 \pm 0,025$; PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC için $0,145 \pm 0,002$; PLGA_PID-PC_SP_ESC için $0,386 \pm 0,029$; PLGA_PID-PC_SP_CURC için $0,897 \pm 0,027$; PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC için $0,159 \pm 0,012$; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC için $0,341 \pm 0,008$; PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC için $0,726 \pm 0,011$; PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC için $0,137 \pm 0,001$; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC için

0,321±0,020; PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC için 0,873±0,043; PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC için 0,092±0,006 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, ROS oluşumu PLGA_ESC ve PLGA_ESC+CURC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken (***p<0,001, ****p<0,0001), PLGA_CURC grubunda bir değişiklik gözlenmemiştir. İzole edilen proteinler ile oluşturulan PLGA_PID-PC_MP_ESC (***p<0,001), PLGA_PID-PC_MP_ESC+CURC (****p<0,0001), PLGA_PID-PC_SP_ESC (****p<0,0001), PLGA_PID-PC_SP_ESC+CURC (****p<0,0001), PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC (****p<0,0001), PLGA_MiaPaCa-2_MP_CURC (*p<0,05), PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC (****p<0,0001), PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC (****p<0,0001) ve PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC (****p<0,0001) gruplarında kontrol grubuna göre ROS oluşumu anlamlı derecede azalmıştır. PLGA_PID-PC_MP_CURC, PLGA_PID-PC_SP_CURC ve PLGA_MiaPaCa-2_SP_CURC gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla ROS seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sağlıklı bir bireyde, hücre ve dokuların doğru yapı ve fonksiyonlarını sağlayan karmaşık moleküler yolların denetlenmesinde, hücre bölünmesinde ve hücre ölümünde görev alan birtakım genlerin mutasyona uğraması sonucunda ilgili doku ya da organda kanser meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar hücre büyümesinin kontrolden çıkmasına, dokuların bütünlüğünün bozulmasına ve kanser hücrelerinin yayılmasına neden olmaktadır (Kontomanolis ve diğ., 2021). Kanser, dünya çapında önde gelen halk sağlığı sorunlarından biridir ve bu sebeple kanser hastalığı için geliştirilen tedavilerin önemi her geçen gün artmaktadır (Siegel ve diğ., 2022). Pankreasın endokrin ve ekzokrin kısımlarından köken alan kanserler, pankreas tümör ve kanserlerini oluşturmaktadır. Ekzokrin pankreastan türeyen PDAC pankreas kanserinin en yaygın ve en agresif türüdür (Torphy ve diğ., 2020). Hastalığın semptomlarının geç ortaya çıkması, hastaların büyük çoğunluğuna geç evrelerde teşhis konulmasına sebep olmaktadır. Pankreas kanseri hastalarının 5 yıllık sağ kalım oranı %5'den azdır ve tedavi edilen hastalarda hastalığın tekrarlaması sıklıkla görülmektedir (Ansari ve diğ., 2018). Pankreas kanseri teşhis ve tedavisindeki gelişmelere rağmen, dünya genelinde pankreas kanseri görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır ve son 30 yıla bakıldığında bu artış neredeyse iki kattan fazladır (Pourshams ve diğ., 2019).

Çeşitli bitki kaynaklarında bulunan kumarinlerin bir türevi olan eskuletin birçok yararlı farmakolojik ve biyokimyasal aktiviteye sahiptir. Yapılan çalışmalarda eskuletinin birçok kanserde hücre ölümünü tetikleyerek hastalığın ilerlemesini engellediği gösterilmiştir (Riveiro ve diğ., 2010). Park ve diğ. (2008) insan lösemi kanseri hücre soylarında yaptıkları çalışmada 0–100 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda eskuletin uygulamasının hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığını ve eskuletinin ERK ve JNK yollarını, kaspaz aktivitesini ve Bcl-2 ailesi proteinlerini düzenleyerek apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, 12.5-150 µM aralığındaki eskuletin insan mide kanseri hücrelerinin çoğalmasını doza ve zamana bağlı olarak azaltmış, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesini artırarak apoptozu desteklemiştir (Pan ve diğ., 2015). Zhang ve diğ. (2019) eskuletinin doza bağlı olarak larinks kanseri hücrelerinin çoğalmasını, migrasyon ve invazyonunu azalttığını, apoptozu uyardığını ve G1 fazında hücre bölünmesini durdurduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, larinks kanseri hücreleri ile oluşturulan ksenograft fare modellerinde eskuletinin doza bağlı olarak

tümör büyümesini ve tümör ağırlığını azalttığı da gösterilmiştir. Eskuletinin hücre canlılığını azaltıcı etkisi PANC-1, MiaPaCa-2 ve AsPC-1 pankreas kanseri hücre soylarında da gösterilmiştir. Arora ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada, bu üç hücre soyunda eskuletinin ($IC_{50}=100 \mu M$) hücre büyümesini doza ve zamana bağlı olarak azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmaya ek olarak, daha önce eskuletinin pankreatik beta hücre tümöründe etkisini incelemek amacıyla INS-1 hücrelerini ile yapılan çalışmada 25 ve 50 μg eskuletin uygulamasının 72 saat sonrasında hücre canlılığını azalttığı ve hücrelerde nekrotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Karatug Kacar ve diğ., 2020). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 μg eskuletin MiaPaCa-2 hücrelerine eksojen olarak uygulanmıştır ve 72 saat sonrasında hücre canlılığında önemli ölçüde azalma görülmüştür. IC_{50} değeri 45.226 μg olarak hesaplanmıştır.

Kurkumin, *Curcuma Longa* bitkisinin kök sapından elde edilen polifenolik fitokimyasal bir bileşendir (Nabavi ve diğ., 2014). Yapılan çalışmalar sonucunda, kurkuminin kanserin ayırt edici özelliklerinden olan kontrolsüz hücre çoğalması ve büyümesi, anjiyogenez, metastaz gibi özellikleri düzenlediği, kanser hücrelerinde apoptozu uyararak ve tümör mikroçevresini engelleyerek kanseri inhibe edici etki gösterdiği görülmüştür (Block ve diğ., 2015). Kurkuminin anti-kanser etkisini kanser gelişimi için önemli olan sinyal mekanizmalarında görevli p53, Ras, mTOR, PI3K, AKT, Wnt- β katenin gibi proteinleri hedefleyerek gösterdiği anlaşılmıştır (Kasi ve diğ., 2016). Akciğer kanseri hücre soyları H1975 ve PC9 kullanılarak yapılan bir çalışmada, 40 μM kurkumin akciğer kanser hücrelerinin canlılığını ve koloni sayılarını azaltmış ve apoptoz belirteçlerinden Bax seviyesini artırarak ve anti-apoptotik Bcl-2 seviyesini düşürerek apoptozu desteklemiştir (Wu ve diğ., 2023). Yapılan bir çalışmada 50-100 μM arasında değişen konsantrasyonlardaki kurkuminin doza bağlı olarak mide kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Cai ve diğ., 2009). Başka bir çalışmada 15-60 μM aralığındaki kurkuminin doza bağlı olarak mide kanseri hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2014). Kurkumin pankreas kanseri tedavisi için de önemli bir bileşendir. Kurkuminin pankreas kanserinde tümör büyümesini ve çoğalmasını azalttığı, anjiyogenezi engellediği, tümör invazyon ve metastazını durdurduğu, apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Huang ve diğ., 2022). Pankreas kanserinde kurkuminin etkisi ilk olarak Li ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Kurkumin pankreas kanseri hücre soylarında doza ve zamana bağlı olarak tümör büyümesini engellemiş, NF- κB seviyesini aşağı-regüle etmiş ve

apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada, belirli dozlarda kurkumin (0, 20, 40, 60 μ M) PANC-1 ve SW1990 pankreas kanseri hücre soylarına uygulandığında hücre canlılığı doza bağlı olarak azalmıştır. Kurkuminin Beclin-1 ve HIF-1 α seviyesini azaltarak bu etkiyi gösterdiği saptanmıştır (Guo ve diğ., 2022). Kurkuminin pankreas kanserinde etkili olan epitel-mezenkimal dönüşüme etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 10, 20 ve 30 μ mol/ml kurkuminin PANC-1 hücrelerine uygulanması sonucunda hücre çoğalmasının, invazyon ve migrasyonun azaldığı, apoptozun uyarıldığı ve kurkuminin Hedgehog sinyal yolağını inhibe ederek epitel-mezenkimal dönüşümü etkisizleştirdiği gösterilmiştir (Sun ve diğ., 2013). Bimonte ve diğ. (2013) yapmış oldukları çalışmada, 50 μ M kurkuminin MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücre soyunda hücre proliferasyonunu durduğunu ve apoptozu artırdığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, MiaPaCa-2 hücreleri kullanılarak oluşturulmuş fare modellerinde, kurkumin tümör büyümesini, tümör hacmini ve anjiyogenezi azaltmıştır. Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, MiaPaCa-2 hücrelerine 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 μ g kurkuminin eksojen olarak uygulanması ile 72 saat sonrasında hücre canlılığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, MiaPaCa-2 hücrelerine kurkumin çıplak olarak uygulandığında, uygulanan bu dozların hücre ölümünü ve ilişkili yolakları destekleyici etkisinin olmadığını düşündürmüştür.

Yapılan klinik çalışmalarda kurkuminin zayıf biyoelverişlilik göstermesi sonucunda kurkuminin hedefli doku ve hücrelere etkin taşınımı için yeni metodlar geliştirilmesi gerektiği anlaşılmıştır (Bisht ve diğ., 2007). Yapılan çalışmada eskuletin ve kurkumin kombinasyonunun pankreas kanseri üzerine etkisi ilk kez tarafımızca araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, eskuletin (6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 μ g) ve kurkumin (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 μ g) MiaPaCa-2 hücrelerine birlikte verildiklerinde 100 μ g eskuletin+12.5 μ g kurkumin 72 saat sonrasında hücre canlılığını kontrole göre önemli ölçüde azaltmıştır. Analiz sonucunda IC50 değeri eskuletin için 81.04 μ g ve kurkumin için 10.131 μ g olarak hesaplanmıştır. Aynı dozda eskuletinin tek başına uygulandığında eskuletin ve kurkuminin birlikte uygulandığı duruma kıyasla daha fazla hücre canlılığını azaltıcı etki göstermesinin sebebi, bu ikili birleşimin kombine halde uygulanmasının birbirini üzerinde etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür.

Pankreas kanseri hastalarının geç evrelerde teşhis edilmesi pankreas kanserinde kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerini sınırlamaktadır. Pankreas kanseri birçok kanser ilişkili hücre grubunun yer aldığı, bozulmuş sinyal yollarını içeren karmaşık tümör mikro-çevresi nedeniyle bu tedavi metotlarına karşı direnç göstermektedir (Swayden ve diğ., 2018). Hastalığın tedavisi için geliştirilen ilaçların dolaşımını ve dağıtımını engelleyen pankreas kanserindeki yüksek desmoplastik stroma tedaviyi zorlaştıran diğer bir engeldir (Tarannum ve Vivero-Escoto, 2022). Nanotıp bilimi, lipozomal, polimerik, miseller, ya da metalik gibi çeşitli materyallerden oluşan nanopartikülleri kullanarak kanser dahil olmak üzere birçok hastalığın teşhis ve tedavisini geliştirmeyi amaçlamaktadır (Peer ve diğ., 2007; Gharpure ve diğ., 2015; Spencer ve diğ., 2015). Nanotaşıyıcılar ile geliştirilen ilaç taşıma sistemleri kullanılan ilacın plazmada kalım ömrünü uzatmakta, ilacın farmakolojik özelliklerini geliştirmekte ve istenmeyen yan etkileri sınırlandırarak daha etkili, hedefe özgü ilaç taşınımı sağlamaktadır (Rosenblum ve diğ., 2018). İlaç taşınımı için seçilecek sistem de oldukça önemlidir. Diğer sistemlere kıyasla hedeflenen tümör bölgesinde birikimi sağlayan daha stabil yapılar oluşturması sebebiyle polimerik miseller son zamanlarda yapılan kanser tedavisi çalışmalarında tercih edilmektedir (Wu ve diğ., 2010). Biyouyumlu ve biyobozunur PLGA ile oluşturulan nanopartiküller ilaç, peptit, protein gibi çeşitli maddeler için taşıyıcı olarak birçok çalışmada kullanılmaktadır (Sah ve diğ., 2013). Eskuletinin biyolojik sağlamlılığını ve anti-hiperglisemik etkisini geliştirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, eskuletin karmaşık misellere yüklenerek EC-M nanotaşıyıcısı oluşturulmuştur (Li ve diğ., 2023). Oluşturulan bu nanotaşıyıcı çıplak eskuletime göre daha fazla biyolojik mevcudiyet ve yarı ömür sergilemiştir. Bu taşıyıcı hiperglisemik fare modellerinde çıplak eskuletime kıyasla kan glikozunu da daha fazla düşürmüştür. Karatug Kacar ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada, PLGA nano-miselleriyle oluşturulan eskuletin nanotaşıyıcısı, INS-1 hücrelerinde hücre canlılığını azaltmış, nekrotik hücre ölümüne sebep olmuştur. Kurkuminin PLGA ile enkapsüle edilmesiyle oluşturulan nanotaşıyıcılar tümör bölgesine ilaç taşınımı için iyi bir sistem oluşturmaktadır. Ayrıca, oluşturulan nanopartiküllerin hedefli tedavi açısından geliştirilmesi de kurkuminin anti-kanser etkisini artırmaktadır (Feltrin ve diğ., 2022). Sivakumar ve diğ. (2014), oluşturdukları kurkumin-PLGA nanopartikülünün yüzeyini süpermanyetik demir oksit nanopartikülleri (SPION) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) ile düzenleyerek PANC-1 ve MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücre soylarına uygulamıştır. Sonuçta oluşturulan bu nanopartikül kurkuminin anti-kanser etkisini artırmıştır.

Başka bir çalışmada, PLGA ile enkapsüle edilen kurkumin nanopartikülü PEG ve sitozan ile modifiye edilerek yine PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanmıştır. Kurkumin-PLGA nanopartikülü serbest kurkumine kıyasla hücreler tarafından daha fazla alınmış ve daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Kurkumin-PLGA nanopartikülü anti-apoptotik protein seviyelerini düşürerek, proapoptotik protein Bax ve aktif kaspaz-3 seviyelerini artırarak apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur (Arya ve diğ., 2018).

Çalışmamızda, eskuletin (6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg) ve kurkumin (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 µg) PLGA ile kaplanarak nanoformülasyon oluşturulmuş (PLGA_ESC, PLGA_CURC) ve bu formülasyonların tek başına ve kombine etkisi MiaPaCa-2 hücrelerinde araştırılmıştır. PLGA_ESC'nin belirtilen dozlarda MiaPaCa-2 hücrelerine uygulanması ile 72 saat sonrasında hücre canlılığı kontrole kıyasla doza bağlı olarak anlamlı ölçüde azalmıştır. Aynı dozlarda çıplak olarak uygulanan kurkumin hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etki göstermezken, 6.25 ve 12.5 µg PLGA_CURC MiaPaCa-2 hücrelerinde hücre canlılığını kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Ayrıca 25 µg PLGA_ESC +3.12 µg PLGA_CURC ve üstü dozların uygulanması doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. IC50 değeri eskuletin için 75 µg ve kurkumin için 9.375 µg olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu IC50 değerleri çıplak uygulanan eskuletin ve kurkumin kombinasyonu sonucunda hesaplanan IC50 değerlerinden ve de ayrı uygulanan PLGA_ESC ve PLGA_CURC için hesaplanan IC50 değerinden azdır. Sonuçta oluşturulan bu nanotaşıyıcıların kombine uygulaması, çıplak uygulamayla veya PLGA ile kaplı olarak tek başına uygulama ile kıyaslandığında, MiaPaCa-2 hücrelerinde daha fazla sitotoksik etkiye sebep olmuştur.

Klasik olarak tasarlanan nanopartiküllerin kanser hastalığının teşhis ve tedavisi için kullanımı istenmeyen yan etkilerin azaltmaları ve kullanılan ilaçların farmakolojik etkilerini artırmaları sebebiyle avantajlı olarak kabul edilsede, son zamanlarda farklı hedefli nanopartiküllerin tasarlanması oldukça dikkat çekmektedir. Farklı tasarlanan hedefli nanopartiküller, klasik olarak tasarlanan nanopartiküllerin sahip olduğu dezavantajları azaltmaktadır. Çeşitli ligandların ya da küçük moleküllerin bağlanması ile tasarlanan bu hedefli nanopartiküller kanser terapisinde spesifikliğini artırmakta ve sitotoksik etki gösteren ilaçların daha etkin taşınımını ve salınımını sağlamaktadır (Cisterna ve diğ., 2016). Graf ve diğ. (2012) tasarladıkları sisplatin yüklü PLGA-PEG nanopartikülünü, kanser hücrelerinde yüksek olarak

eksprese edildiği bilinen integrin reseptörünü hedef alan siklik pantapeptit c(RGDfK) ile birleştirerek hedefli bir nanopartikül tasarlamışlardır. Oluşturdukları bu nanopartikül, meme ve prostat kanseri hücre soylarında, çıplak olarak uygulanan sisplatine kıyasla hücre büyümesini daha iyi inhibe etmiştir. Ayrıca bu nanopartikül insan meme kanseri ksenograft fare modellerinde çıplak olarak uygulanan sisplatinle benzer oranda tümör büyümesini azaltmış olsada, oluşturulan nanopartikül sisteminin biyodağılımı daha iyi sonuç vermiştir. Kanserde hipoksi koşulları, düşük pH ve diğer spesifik özelliklere hedefli gönderilen nanopartiküller, pankreas kanseri tedavisi için de kullanılmaktadır (Liu ve diğ., 2022). Yapılan bir çalışmada ilaç içeren mezofor silika nanopartikülü ile kanser spesifik urokinaz plazminojen aktivatör reseptörü (UPAR) ve asidik tümör mikroçevresi hedefli hale getirilmiştir (Gurka ve diğ., 2016). Oluşturulan bu nanopartikül pankreas kanseri hücre soylarına bağlanarak, içerdiği ilacın pankreas kanserine kontrollü salınımını sağlamış ve tümör büyümesini azaltmıştır. Başka bir çalışmada, epidermal büyüme faktörü reseptörünü hedeflediği bilinen Cetuximab (CTX)-kamptotesin yüklenmiş PLGA nanopartikülüne konjuge edilerek CTX-rezistan pankreas kanseri hücrelerine uygulandığında, oluşturulan bu nanopartikül ilacın taşınımını artırmış ve istenmeyen yan etkileri azaltarak tümör büyümesini engellemiştir (McDaid ve diğ., 2019).

Nanopartiküllerin yüzeyini modifiye ederek biyoyararlılığı ve hedefleme kapasitesini artırma yaklaşımı avantajlı olsada, oluşturulan bu nanopartiküllerin immün sistem tarafından tanınması ve immün cevap oluşumu bu avantajı sınırlandırıcı etki göstermektedir (Song ve diğ., 2022). Dolayısıyla araştırmacılar, kırmızı kan hücresi zarı, kanser hücresi zarı, kök hücre zarı gibi çeşitli hücre membranları ile nanopartikülleri kaplayarak hücre membranı ile kamufle edilmiş biyoyumlu nanopartiküller (CMCNs) üretmektedir (Fang ve diğ., 2017; Song ve diğ., 2022). Tasarlanan bu nanopartiküller, doğal olarak hücre zarında bulunan proteinler gibi birçok fonksiyonel bileşeni barındırdığından hedefli olarak istenen bölgeye gidebilmekte, immün sistem cevabından kaçabilmekte ve daha fazla dolaşımda kalabilmektedir (Song ve diğ., 2022). Nanopartiküllerin kanser hücre membranı ile kaplanması bu nanopartiküllerin dolaşımdaki sürelerini artırmanın yanı sıra homolog hedefleme kapasitesini de artırmaktadır (Dash ve diğ., 2020). Zhu ve diğ. (2016) tarafından geliştirilen kanser hücre membranı ile kaplı DOX yüklü manyetik demir oksit-temelli nanopartikül sistemi (MNP@DOX@CCCM), iyi bir şekilde seçici hedefleme yeteneği ve tümör tedavi yeteneği göstermiştir. Başka bir çalışmada, tümöre özgü immün cevap oluşturma

amacıyla melanoma hücre membranları kullanılarak biyobenzer kanser hedefli nano aşı geliştirilmiştir (Fang ve diğ., 2014). Wu ve diğ. (2023) yaptıkları çalışmada, karaciğer kanserinde etkili olduğu kanıtlanan Lenvatinib ilacını pH-duyarlı polimer ve kanser hücre membranı ile kaplayarak nano ilaç oluşturmuşlardır. Oluşturdukları bu biyoyumlu nano ilaç yüksek stabilite ve yüksek ilaç yükleme kapasitesi göstermesinin yanı sıra, *in vivo* çalışmalarda tümör bölgesinde birikerek tümörü etkin bir şekilde yok ettiği gösterilmiştir.

Kök hücre ailesinin önemli bir üyesi olan mezenkimal kök hücreler, uyumlu bağışıklık göstermeleri, tümör hücrelerine doğru eğilimleri olması gibi sebeplerden dolayı dikkat çekicidir (Leibacher ve Henschler, 2016; Zhen ve diğ., 2019). Tümör mikro-çevresinde aşırı eksprese olan çeşitli adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve kemokinler MSC'lerin tümör bölgesine doğru hareket etmelerini sağlamaktadır (Xu ve diğ., 2020). Bu sebeplerden dolayı mezenkimal kök hücre membranlarının ilaç taşınımı için oluşturulan nanopartiküllerde kullanımı hedefli tedavi açısından umut vadetmektedir. Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin membranları ile kaplanarak oluşturulan DOX yüklü-PLGA nanopartikülünün karaciğer kanseri hücrelerinde ve fare modellerinde etkisini inceleyen bir çalışmada, oluşturulan bu nanopartikülün tümör hücresi tarafından ilaç alınımını artırdığı, hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltarak hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2018).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, PID-PC ve MiaPaCa-2 kanser hücrelerinden elde edilen membran ve sitozolik proteinler eskuletin ve kurkumin içeren PLGA-nanopartiküllerinin kaplanmasında kullanılarak oluşturulan nanoformülasyonların MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde etkisi incelenmiştir. Oluşturulan bu biyoyumlu çift hedefli nanopartiküller ilk kez tarafımızca sentezlenmiştir ve ilk kez pankreas kanseri üzerine etkisi araştırılmıştır. MiaPaCa-2 hücrelerine PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden izole edilen membran ve sitozolik proteinler çıplak olarak ya da PLGA ile kaplı olarak uygulandığında hücre canlılığında kontrol grubuna göre farklılık gözlenmemiştir.

PLGA_ESC uygulanması ile kıyaslandığında, PLGA_PID-PC_SP_ESC uygulaması hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltırken, PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC uygulaması hücre canlılığını artırıcı etki göstermiştir. PLGA_CURC'nin proteinler ile kaplanması sonucu PLGA_CURC grubuna göre bir farklılık gözlenmemiştir. PLGA_ESC+CURC grubuna göre PLGA_MiaPaCa-2_MP_ESC+CURC hücre canlılığını

arttırırken, PLGA_MiaPaCa-2_SP_ESC+CURC nanoformülasyonu hücre canlılığını azaltmıştır. PLGA_ESC+CURC nanoformülasyonuna kıyasla, kanser hücresinin kendi sitozolik proteinleri ile kaplamanın sadece PLGA ile kaplamaktan daha etkin olduğu görülmektedir. Ayrıca PLGA_ESC'e kıyasla bu formülasyonu PID-PC hücrelerinden izole edilen sitozolik proteinler ile kaplamanın hücre canlılığını daha fazla azalttığı gösterilmiştir.

Hücre ölümü ve hücre bölünmesi arasındaki denge insan sağlığı için önem arz eden hayati bir konudur. Bu sebeple çeşitli moleküler mekanizmalar bu iki olayı düzenleyerek normal fonksiyonların devam etmesine katkı sağlamaktadır (Strasser ve Vaux, 2020). Hücrede tamir edilemeyen DNA hasarı oluşması ya da başka hasarlar sonucunda, hücre örneğin tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53'ü aktive ederek apoptozu uyarmakta ve kendini öldürmektedir (Nakano ve Vousden, 2001; Yu ve diğ. 2001; Jeffers ve diğ., 2003; Villunger ve diğ., 2003). Apoptoz ve nekroz spesifik mekanizmaları aktive eden ve birbirinden morfolojik olarak ayırt edilebilen ana hücre ölüm tipleridir. Her ne kadar hücre ölüm türlerinin moleküler mekanizmaları birbirlerinden farklı olsa da bu mekanizmalar tamamen bağımsız değildir. Aksine farklı hücre ölüm tiplerini kontrol eden sinyal yolları birbirleriyle bağlantılıdır ve hücrede oluşan strese karşı cevap oluşturmada birlikte çalışmaktadır (Chen ve diğ., 2018). Apoptoz ve nekrozdaki aşağı akış sinyal mekanizmalarının birbirleriyle ilişkide olması sebebiyle apoptoz ve nekroz aynı anda ya da ilişkili olarak gerçekleşebilir (Zhang ve diğ., 2015). Apoptozun inhibe edilmesi durumunda nekrotik hücre ölümü meydana gelebilirken, oksidatif stres sonucu meydana gelen nekroz apoptoz ile ilişkili olduğu bilinen kaspaz-8/Bid yolağının aktivasyonunu içermektedir (Leist ve Jäättelä, 2001; Wang ve diğ. 2003).

Pankreas kanserinde epidermal büyüme faktörü, insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (ILGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve bunların reseptörlerinin aşırı eksprese olması ve pankreas kanserinin ekstrasellüler matriks proteinlerini içermesi sebebiyle hücre ölümüne karşı direnç oluşmaktadır (Ozawa ve diğ., 2001; Vaquero ve diğ., 2003). Bu bağlamda pankreas kanserini tedavi etmek amacıyla apoptoz gibi hücre ölümü yollarını uyarıcı çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (Gukovskaya ve Pandol, 2004).

INS-1 hücrelerinde, 25 ve 50 µg eskuletinin PLGA ile kaplanması sonucu oluşturulan nanoformülasyonun çıplak eskuletine kıyasla 72 saat sonrasında nekroza sebep olduğu

gösterilmiştir (Karatug Kacar ve diğ., 2020). Atwan ve Al-Ogaidi (2023), kurkumini lesitin/sitozan nanopartikülü ile birleştirilmiş ve özafagus kanseri hücrelerine uygulamıştır. Sonuçta oluşturulan bu kurkumin nanoformülasyonu çıplak kurkumine kıyasla daha düşük dozda daha fazla apoptotik hücre ölümüne sebep olmuştur. Kurkumin ile yapılan başka bir çalışmada, hedefli ve pH duyarlı olarak 5-fluorourasil ile birlikte tasarlanan kurkumin nanopartikülü çıplak kurkumine kıyasla daha fazla apoptoza sebep olmuştur (Li ve diğ., 2024).

Saren ve diğ. (2024) tirozin kinaz inhibitörü olan Dasatinib (DST) ile yaptıkları çalışmada, PLGA-DST nanopartikülünü sitozan (CH) ve fukoidan (FUC) ile kaplayarak üçlü negatif meme kanseri hücre soyuna uygulamışlar ve sonuçta oluşturdukları bu nanopartikülün çıplak DST'ye göre daha fazla apoptoza sebep olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada kırmızı kan hücresi membranı ve yumurtalık kanser hücre membranı ile kaplanarak oluşturulan hibrit nanopartikülün yüksek oranda apoptoza sebep olduğu ve tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2023). Benzer şekilde Scully ve diğ. (2023), fare meme kanseri hücrelerinden izole ettikleri membran ile oluşturdukları ABT-737 içeren nanopartikülün çıplak ABT-737 ve PEG-PLGA-ABT-737'ye kıyasla daha fazla oranda apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamıza ait sonuçlarda, kontrol grubu ile kıyaslandığında hücrelere çıplak eskuletin ve çıplak eskuletin+kurkumin kombinasyonu uygulanması ile bu formülasyonların PLGA ile kaplanması sonucu oluşturulan nanoformülasyonların kombine uygulanması sonucunda apoptotik hücre ölümü anlamlı olarak artmıştır. Bu gruplarda nekrotik hücre ölümünde de artış gözlenmiştir. PLGA kaplı formülasyonlara PID-PC MP ve SP ile MiaPaCa-2 MP ve SP ilavesi ile oluşturulan nanoformülasyonlarda, kurkuminin PLGA_PID-PC_SP, PLGA_MiaPaCa-2_MP ve PLGA_MiaPaCa-2_SP ile kaplanan grupları hariç diğer tüm gruplarda kontrol gruplarına kıyasla apoptoz artmıştır. Nekrotik hücre ölümü ise kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda gözlenmektedir.

ROS normal hücrelerde çeşitli biyolojik olaylarda rol alan ikincil mesajcılardır (D'Autréaux ve Toledano, 2007). Özellikle düşük ve orta seviyede öldürücü dozda olmayan ROS kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını, anjiyogenezi ve metastazı desteklerken (Giles, 2006; Wu ve Hua, 2007; Ushio-Fukai ve Nakamura, 2008; Clerkin ve diğ., 2008), artan ROS miktarı kanser hücrelerinde hücre ölümüne neden olabilmektedir (Renschler, 2004; Ozben, 2007).

ROS'un bu etkileri çeşitli kanser tedavi araştırmalarında gösterilmiştir (Wang ve Yi, 2008). Huang ve diğ. (2023) yaptıkları çalışmada makrosiklik alkaloid olan Askomilaktam C'nin akciğer kanseri ve melanoma hücrelerinde ROS artışını uyararak hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada, tetrahidrobenzothiofen türevleri, pankreas kanseri hücre soyu MiaPaCa-2 hücrelerinde hücre içi ROS artışını uyararak hücre büyümesini durdurmuş ve EGFR2 tirozin kinaz sinyal yolağını inhibe ederek apoptozu uyarmıştır (Rahman ve diğ., 2023). Cheng ve diğ. (2020) 0.1g kurkumin ile oluşturdukları jelatin karışımlı nanoformülasyonun pankreatik duktal adenokarsinom hücrelerinde ROS üretimini artırarak ve endoplazmik retikulum stresini uyararak apoptoza sebep olduğunu göstermişlerdir. Gempitabin (GEM) ve α -tokoferol sukkinat (TOS) kombinasyonunu içeren nanopartikül MiaPaCa-2 hücrelerinde ROS üretimini uyararak hücre göçünü engellemiş ve apoptoza sebep olmuştur (Behera ve diğ., 2024). Ayrıca, Liu ve diğ. (2023), BxPC-3 pankreas kanseri hücre soyu membranını kullanarak oluşturdukları nanopartikülün pankreas kanseri hücrelerinde ROS oluşumunu artırarak hücre ölümüne sebep olduğunu göstermişlerdir. Hücre içinde artan ROS miktarının nekrotik hücre ölümüne sebep olabileceği de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Perillo ve diğ., 2020). Tümör nekrozis faktörün (TNF) uyarmasıyla aktive olan Nox1 NADPH oksidaz'ın fare fibroblast hücrelerinde ROS artışını sağlayarak nekrotik hücre ölümüne neden olduğunu görülmüştür (Kim ve diğ., 2007). INS-1 hücrelerine 350, 400 ve 450 μ M dozlarında 4-metilkatekol uygulamasının bu hücrelerde nekrotik hücre ölümünü takiben ROS seviyesini artırdığı gösterilmiştir (Karatug Kacar ve Bolkent, 2018). Bu çalışmalara ilave olarak, son zamanlarda kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla daha fazla oranda ROS içerdiği ve artan bu ROS miktarının kanser oluşumuna katkı yaptığı gösterildiğinden birçok ROS azaltıcı terapi yöntemi de geliştirilmiştir. Meme kanseri modelinde ROS tutucu nanopartikülün etkisinin araştırıldığı çalışmada, bu nanopartikülün tümör mikroçevresindeki ROS'u elimine ederek tümör infiltrate edici T lenfosit miktarını artırdığı ve sonuçta anti-kanser etkiye sebep olduğu gösterilmiştir (Deng ve diğ., 2020). Kamihara ve diğ. (2016) deferasiroks (DFX) kullanarak yaptıkları çalışmada, DFX'in çoklu miyeloma hücrelerinde hücre içi ROS seviyesini azaltarak apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir. PANC-1 pankreas kanseri hücrelerine eskuletin uygulamasının ROS seviyesini ve NF- κ B aktivitesini azaltarak apoptoza neden olduğu belirtilmiştir (Arora ve diğ., 2016). Bhat ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada, meme kanserinde overeksprese olan SNTA1 ve Rac1 proteinlerinin etkileşimini sitokalsin D ve

latrunkulin A ilaçları ile inhibe ettiklerinde, meme kanseri hücrelerinde apoptozun artışı takiben ROS oluşumunun azaldığını göstermişlerdir. Yaptığımız tez çalışmasında, kurkuminin PLGA, PLGA PID-PC MP, SP ve PLGA MiaPaCa-2 SP ile kaplanması sonucu oluşturulan nanoformülasyonlarda ROS oluşumunda farklılık gözlenmezken, diğer tüm gruplarda kontrol grubuna göre ROS oluşumu azalmıştır.

Çalışmamızda, eskuletin ve kurkumin hem ayrı ayrı hem de kombinasyonunun hem çıplak halde hem de PLGA ile nanoformüle edilerek, ayrıca ilk kez tarafımızca formüle edilen PID-PC ve MiaPaCa-2 hücrelerinden elde edilen proteinler ile oluşturulmuş çift hedefli ve biyoyumlu oluşturulan nanoformülasyonların pankreas kanser hücre soyuna uygulanması neticesinde hücre canlılığı, apoptotik, nekrotik hücre ölümü ve ROS seviyeleri analiz edilmiştir. Sonuç olarak pankreas kanseri hücreleri üzerine çıplak eskuletin hücre canlılığını azaltırken çıplak kurkuminin herhangi bir etkisi olmamıştır. PLGA kaplı eskuletin ve kurkumin ile oluşturulan nanoformülasyonun daha etkili olduğu görülmektedir. Protein ile kaplı PLGA formülasyonlarında ise kurkuminin olduğu gruplar hariç diğer gruplarda hücre canlılığındaki değişiklikler dikkat çekicidir. Uygulama sonucu hücrelerde hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümü meydana gelmiştir. Nekrotik hücre ölümü daha fazla katlı artış göstermiştir. Kurkuminin olduğu gruplar hariç diğer gruplarda ROS seviyeleri de anlamlı derecede azalmıştır. Bu gruplardaki apoptotik ve nekrotik hücre ölüm oranları dikkate alındığında ROS seviyesinin azalması ile hücre ölümü arasında bir ilişkinin olabileceği düşünülebilir. Çalışma, pankreas kanserinin hedefli tedavisi açısından literatüre önemli katkı sağlayacaktır. Apoptotik hücre ölümünü hedeflemek için farklı doz ve inkübasyon sürelerinin denenmesi ve akabinde çalışmanın *in vivo* deneyler ile de desteklenmesi pankreas kanseri tedavisi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, B. B., Kumar, A., Bharti, A. C., 2003, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*, 23(1/A), 363-398.
- Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y., Sandur, S. K., Shishodia, S., Aggarwal, B. B., 2006, Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and Akt activation. *Molecular pharmacology*, 69(1), 195-206.
- Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M., McEwan, R. N., 1987, A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer research*, 47(12), 3239-3245.
- Ameisen, J. C., 2002, On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death & Differentiation*, 9(4), 367-393.
- Ansari, D., Friess, H., Bauden, M., Samnegård, J., Andersson, R., 2018, Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment. *Oncotarget*, 9(5), 6644–6651.
- Arno, M. C., Simpson, J. D., Blackman, L. D., Brannigan, R. P., Thurecht, K. J., Dove, A. P., 2023, Enhanced drug delivery to cancer cells through a pH-sensitive polycarbonate platform. *Biomaterials Science*.
- Arora, R., Sawney, S., Saini, V., Steffi, C., Tiwari, M., & Saluja, D. (2016). Esculetin induces antiproliferative and apoptotic response in pancreatic cancer cells by directly binding to KEAP1. *Molecular cancer*, 15, 1-15.
- Arya, G., Das, M., Sahoo, S. K., 2018, Evaluation of curcumin loaded chitosan/PEG blended PLGA nanoparticles for effective treatment of pancreatic cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 555–566.
- Atwan, Q. S., & Al-Ogaidi, I. (2024). Enhancing the therapeutic potential of curcumin: a novel nanoformulation for targeted anticancer therapy to colorectal cancer with reduced miR20a and miR21 expression. *Biomedical Materials*, 19(2), 025020.
- Bahadori, F., Eskandari, Z., Ebrahimi, N., Bostan, M. S., Eroğlu, M. S., 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.
- Bao, S., Zheng, H., Ye, J., Huang, H., Zhou, B., Yao, Q., Lin, G., Zhang, H., Kou, L., Chen, R., 2021, Dual targeting EGFR and STAT3 with Erlotinib and Alantolactone co-loaded PLGA nanoparticles for pancreatic cancer treatment. *Frontiers in pharmacology*, 12, 625084.

- Barbato, L., Bocchetti, M., Di Biase, A., Regad, T., 2019, Cancer stem cells and targeting strategies. *Cells*, 8(8), 926.
- Barnum, K. J., O'Connell, M. J., 2014, Cell cycle regulation by checkpoints. *Cell cycle control: mechanisms and protocols*, 29-40.
- Behera, C., Sandha, K. K., Banjare, N., Shukla, M. K., Ali, S. M., Singh, M., & Gupta, P. N. (2024). Biodegradable nanocarrier of gemcitabine and tocopherol succinate synergistically ameliorates anti-proliferative response in MIA PaCa-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 649, 123599.
- Benzel, J., Fendrich, V., 2018, Familial pancreatic cancer. *Oncology research and treatment*, 41(10), 611-618.
- Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of toxicology*, 82, 493-512.
- Bhat, S. S., Parray, A. A., Mushtaq, U., Fazili, K. M., & Khanday, F. A. (2016). Actin depolymerization mediated loss of SNTA1 phosphorylation and Rac1 activity has implications on ROS production, cell migration and apoptosis. *Apoptosis*, 21, 737-748.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, 94(2), 329-354.
- Bimonte, S., Barbieri, A., Palma, G., Luciano, A., Rea, D., Arra, C., 2013, Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *BioMed research international*, 2013.
- Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maitra, A., Maitra, A., 2007, Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 5.
- Bisht, S., Schlesinger, M., Rupp, A., Schubert, R., Nolting, J., Wenzel, J., Holdenrieder, S., Brossart, P., Bendas, G., Feldmann, G., 2016, A liposomal formulation of the synthetic curcumin analog EF24 (Lipo-EF24) inhibits pancreatic cancer progression: towards future combination therapies. *Journal of nanobiotechnology*, 14, 1-15.
- Block, K. I., Gyllenhaal, C., Lowe, L., Amedei, A., Ruhul Amin, A. R. M., Amin, A., Aquilano, K., Arbiser, J., Arreola, A., Arzumanyan, A., Salman Ashraf, S., Azmi, A. S., Benencia, F., Bhakta, D., Bilslund, A., Bishayee, A., Blain, S. W., Block, P. B., Boosani, C. S., ... Zollo, M., 2015, Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S276–S304.
- Boroumand, N., Samarghandian, S., Hashemy, S. I., 2018, Immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant effects of curcumin. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 7(4), 211-219.
- Bursch, W., Karwan, A., Mayer, M., Dornetshuber, J., Fröhwein, U., Schulte-Hermann, R., Fazi, B., Di, F. S., Piredda, L., Piacentini, M., Petrovski, G., Fésüs, L., Gerner, C., 2008,

- Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology*, 254(3), 147-157.
- Cai, X. Z., Wang, J., Li, X. D., Wang, G. L., Liu, F. N., Cheng, M. S., & Li, F. (2009). Curcumin suppresses proliferation and invasion in human gastric cancer cells by down-regulation of PAK1 activity and cyclin D1 expression. *Cancer biology & therapy*, 8(14), 1360–1368.
- Cao, L., Xiao, X., Lei, J., Duan, W., Ma, Q., Li, W., 2016, Curcumin inhibits hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition in pancreatic cancer cells via suppression of the hedgehog signaling pathway. *Oncology Reports*, 35(6), 3728-3734.
- Ceylan, Z., Meral, R., Kose, S., Sengor, G., Akinay, Y., Durmus, M., Ucar, Y., 2020, Characterized nano-size curcumin and rosemary oil for the limitation microbial spoilage of rainbow trout fillets. *LWT*, 134, 109965.
- Chen, T., Wang, Y., Zhu, L., Wu, J., Lin, J., Huang, W., & Yan, D. (2023). Hybrid Membrane Camouflaged Chemodrug-Gene Nanoparticles for Enhanced Combination Therapy of Ovarian Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*.
- Chen, X., Liu, B., Tong, R., Zhan, L., Yin, X., Luo, X., Huang, Y., Zhang, J., He, W., Wang, Y., 2021, Orchestration of biomimetic membrane coating and nanotherapeutics in personalized anticancer therapy. *Biomaterials Science*, 9(3), 590-625.
- Cheng, T., Zhang, Z., Shen, H., Jian, Z., Li, J., Chen, Y., ... & Dai, X. (2020). Topically applied curcumin/gelatin-blended nanofibrous mat inhibits pancreatic adenocarcinoma by increasing ROS production and endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis. *Journal of nanobiotechnology*, 18, 1-12.
- Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2017). ROS in cancer: the burning question. *Trends in molecular medicine*, 23(5), 411-429.
- Chitphet, K., Geary, S. M., Chan, C. H., Simons, A. L., Weiner, G. J., Salem, A. K., 2020, Combining Doxorubicin-loaded PEGylated poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles with checkpoint inhibition safely enhances therapeutic efficacy in a melanoma model. *ACS biomaterials science & engineering*, 6(5), 2659-2667.
- Cho, J. H., Shin, J. C., Cho, J. J., Choi, Y. H., Shim, J. H., Chae, J. I., 2015, Esculetin (6, 7-dihydroxycoumarin): a potential cancer chemopreventive agent through suppression of Sp1 in oral squamous cancer cells. *International journal of oncology*, 46(1), 265-271.
- Cisterna, B. A., Kamaly, N., Choi, W. Il, Tavakkoli, A., Farokhzad, O. C., Vilos, C., 2016, Targeted nanoparticles for colorectal cancer. *Nanomedicine (London, England)*, 11(18), 2443–2456.
- Clerkin, J. S., Naughton, R., Quiney, C., & Cotter, T. G. (2008). Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer letters*, 266(1), 30-36.
- Cohen, G. M., 1997, Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326(1), 1-16.

- Dash, P., Piras, A. M., Dash, M., 2020, Cell membrane coated nanocarriers - an efficient biomimetic platform for targeted therapy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 327, 546–570.
- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 813-824.
- Deer, E. L., González-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., Firpo, M. A., Mulvihill, S. J. 2010. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39(4), 425-435.
- Deng, H., Yang, W., Zhou, Z., Tian, R., Lin, L., Ma, Y., ... & Chen, X. (2020). Targeted scavenging of extracellular ROS relieves suppressive immunogenic cell death. *Nature Communications*, 11(1), 4951.
- Dhillon, N., Aggarwal, B. B., Newman, R. A., Wolff, R. A., Kunnumakkara, A. B., Abbruzzese, J. L., S. Ng, C., Badmaev, V., Kurzrock, R., 2008, Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical cancer research*, 14(14), 4491-4499.
- Duan, J., Shi, J., Ma, X., Xuan, Y., Li, P., Wang, H., Yang, F., Huijie, G., Wang, L., Pang, Y., Pang, S., Yan, Y., 2020, Esculetin inhibits proliferation, migration, and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 110031.
- Egan, D., O'kenedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., Thornes, R. D., 1990, The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews*, 22(5), 503-529.
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Fang, R. H., Hu, C. M. J., Luk, B. T., Gao, W., Copp, J. A., Tai, Y., O'Connor, D. E., Zhang, L., 2014, Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery. *Nano Letters*, 14(4), 2181–2188.
- Fang, R. H., Jiang, Y., Fang, J. C., Zhang, L., 2017, Cell membrane-derived nanomaterials for biomedical applications. *Biomaterials*, 128, 69–83.
- Feltrin, F. da S., Agner, T., Sayer, C., Lona, L. M. F., 2022, Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: A promising strategy for cancer therapies. *Advances in Colloid and Interface Science*, 300.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2021, Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789.
- Franks, L. M., Teich, N. M., 1997, Introduction to the cellular and molecular biology of cancer, 3rd ed., Oxford University Press, USA.

- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2007, Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*, 14(7), 1237.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Turk, B., 2018, Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Garg, S. S., Gupta, J., Sahu, D., Liu, C. J., 2022, Pharmacological and Therapeutic Applications of Esculetin. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12643.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Onay-Ucar, E., Sancar-Bas, S., Karatug-Kacar, A., Arda, E. S., Bolkent, S., 2018, Involvement of dying beta cell originated messenger molecules in differentiation of pancreatic mesenchymal stem cells under glucotoxic and glucolipotoxic conditions. *Journal of cellular physiology*, 233(5), 4235-4244.
- Gharpure, K. M., Wu, S. Y., Li, C., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K., 2015, Nanotechnology: Future of Oncotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21(14), 3121–3130.
- Ghasemi, F., Shafiee, M., Banikazemi, Z., Pourhanifeh, M. H., Khanbabaei, H., Shamshirian, A., Amiri Moghadam, S., ArefNezhad, R., Sahebkar, A., Avan, A., Mirzaei, H., 2019, Curcumin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathology-Research and Practice*, 215(10), 152556.
- Gholami-Shabani, M., Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Amini, A., Gholami-Shabani, Z., Imani, A., Razzaghi-Abyaneh, M., 2014, Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172, 4084-4098.
- Gholami-Shabani, M., Gholami-Shabani, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Jamzivar, F., Razzaghi-Abyaneh, M., 2017, Green nanotechnology: biomimetic synthesis of metal nanoparticles using plants and their application in agriculture and forestry. *Nanotechnology*, In: Prasad, R., Kumar, M., Kumar, V. (ed.), Springer, Singapore, 133-175.
- Giles, G. I., 2006, The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Current pharmaceutical design*, 12(34), 4427-4443.
- Gilmore A. P., 2005, Anoikis. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1473–1477.
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, B. B., 2008, Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*, 75(4), 787-809.
- Golstein, P., Kroemer, G., 2005, Redundant cell death mechanisms as relics and backups. *Cell Death & Differentiation*, 12(2), 1490-1496.
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews Drug discovery*, 12(12), 931-947.

- Graf, N., Bielenberg, D. R., Kolishetti, N., Muus, C., Banyard, J., Farokhzad, O. C., Lippard, S. J., 2012, $\alpha V\beta 3$ Integrin-targeted PLGA-PEG nanoparticles for enhanced anti-tumor efficacy of a Pt(IV) prodrug. *ACS Nano*, 6(5), 4530.
- Green, D. R., Llambi, F., 2015, Cell death signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 7(12), a006080.
- Guo, W., Ding, Y., Pu, C., Wang, Z., Deng, W., Jin, X., 2022, Curcumin inhibits pancreatic cancer cell proliferation by regulating Beclin1 expression and inhibiting the hypoxia-inducible factor-1 α mediated glycolytic pathway. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(6), 3254–3262.
- Gurka, M. K., Pender, D., Chuong, P., Fouts, B. L., Sobelov, A., McNally, M. W., Mezera, M., Woo, S. Y., McNally, L. R., 2016, Identification of pancreatic tumors in vivo with ligand-targeted, pH responsive mesoporous silica nanoparticles by multispectral optoacoustic tomography. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 231, 60–67.
- Han, J., Oh, J., Ihm, S. H., Lee, M., 2016, Peptide micelle-mediated curcumin delivery for protection of islet β -cells under hypoxia. *Journal of Drug Targeting*, 24(7), 618-623.
- Han, M. H., Park, C., Lee, D. S., Hong, S. H., Choi, I. W., Kim, G. Y., Choi, S. H., Shim, J., Chae, J., Yoo, Y. H., Choi, Y. H., 2017, Cytoprotective effects of esculetin against oxidative stress are associated with the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression via the activation of the ERK pathway. *International journal of molecular medicine*, 39(2), 380-386.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2000, The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hassanpour, S. H., Dehghani, M., 2017, Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of cancer research and practice*, 4(4), 127-129.
- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M., Torti, S. V., 2008, Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and molecular life sciences*, 65, 1631-1652.
- Hewlings, S. J., Kalman, D. S., 2017, Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, 6(10), 92.
- Huang, Q., Zhang, Y., Zheng, Y., Yang, H., Yang, Y., Mo, Y., Li, L., Zhang, H., 2022, Molecular Mechanism of Curcumin and Its Analogs as Multifunctional Compounds against Pancreatic Cancer. *Nutrition and Cancer*, 74(9), 3096–3108.
- Huang, Y., Yan, H., Zhang, B., Zhu, G., Yu, J., Xiao, X., ... & Yuan, J. (2023). Ascomylactam C Induces an Immunogenic Cell Death Signature via Mitochondria-Associated ER Stress in Lung Cancer and Melanoma. *Marine Drugs*, 21(12), 600.

- Ingle, A. P., Golińska, P., Yadav, A., Razzaghi-Abyaneh, M., Patel, M., Patel, R., Rai, M., 2020, Nanotechnology: a new era in the revolution of drug delivery, diagnosis, and treatment of diseases, Nanobiotechnology in diagnosis, drug delivery, and treatment, In: Rai, M., Razzaghi-Abyaneh, M., Ingle, A. P. (ed.), Chapter 1, Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd., USA, ISBN:9781119671732, 1-24.
- Iurlaro, R., Muñoz-Pinedo, C., 2016, Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. The FEBS journal, 283(14), 2640-2652.
- Jiang, R., Su, G., Chen, X., Chen, S., Li, Q., Xie, B., Zhao, Y., 2021, Esculetin inhibits endometrial cancer proliferation and promotes apoptosis via hnRNPA1 to downregulate BCLXL and XIAP. Cancer Letters, 521, 308-321.
- Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Molecular Biology of the Cell, In: Alberts, B. (ed.), Garland Science, New York, USA, 2002; ISBN 978-0-8153-3218-3.
- Joudeh, N., Linke, D., 2022, Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. Journal of Nanobiotechnology, 20(1), 262.
- Kabir, M. T., Rahman, M. H., Akter, R., Behl, T., Kaushik, D., Mittal, V., Pandey, P., Akhtar, M. F., Saleem, A., Albadrani, G. M., Kamel, M., Khalifa, S. A. M., El-Seedi, H. R., Abdel-Daim, M. M., 2021, Potential role of curcumin and its nanoformulations to treat various types of cancers. Biomolecules, 11(3), 392.
- Kamihara, Y., Takada, K., Sato, T., Kawano, Y., Murase, K., Arihara, Y., ... & Kato, J. (2016). The iron chelator deferasirox induces apoptosis by targeting oncogenic Pyk2/ β -catenin signaling in human multiple myeloma. Oncotarget, 7(39), 64330.
- Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., Takaori, K., 2016, Pancreatic cancer. The Lancet, 388(10039), 73-85.
- Kanai, M., 2014, Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. World journal of gastroenterology: WJG, 20(28), 9384.
- Kaneko, T., Tahara, S., Takabayashi, F., 2007, Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1, 2-dimethylhydrazine in rat colons. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30(11), 2052-2057.
- Karatug Kacar, A., & Bolkent, S. (2018). Necrotic cell death occur via JNK pathway with the activity of transcription factor c-Jun by 4-MC in INS-1 cell line. Journal of cellular biochemistry, 119(2), 2048-2060.
- Karatug Kacar, A., Bahadori, F., Kepekci Tekkeli, S. E., Topcu, G., Bolkent, S., 2020, Investigation of cell death mechanism and activity of esculetin-loaded PLGA nanoparticles on insulinoma cells in vitro. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 72(4), 592-606.

- Kasi, P. D., Tamilselvam, R., Skalicka-Woźniak, K., Nabavi, S. F., Daglia, M., Bishayee, A., Pazoki-Toroudi, H., Nabavi, S. M., 2016, Molecular targets of curcumin for cancer therapy: an updated review. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13017–13028.
- Kaushik, N., Borkar, S. B., Nandanwar, S. K., Panda, P. K., Choi, E. H., Kaushik, N. K., 2022, Nanocarrier cancer therapeutics with functional stimuli-responsive mechanisms. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 1-23.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Khan, I., Khan, M., Umar, M. N., Oh, D. H., 2015, Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. *IET nanobiotechnology*, 9(6), 396-400.
- Kim, A. D., Han, X., Piao, M. J., Hewage, S. R. K. M., Hyun, C. L., Cho, S. J., Hyun, J. W., 2015, Esculetin induces death of human colon cancer cells via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptosis pathway. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(2), 982-989.
- Kim, A. D., Madduma Hewage, S. R. K., Piao, M. J., Kang, K. A., Cho, S. J., Hyun, J. W., 2015, Esculetin induces apoptosis in human colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Biochemistry and Function*, 33(7), 487-494.
- Kim, J. H., Jeong, M. S., Kim, D. Y., Her, S., Wie, M. B., 2015, Zinc oxide nanoparticles induce lipoxxygenase-mediated apoptosis and necrosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochemistry international*, 90, 204-214.
- Kim, S. M., Hur, D. Y., Hong, S. W., & Kim, J. H. (2017). EBV-encoded EBNA1 regulates cell viability by modulating miR34a-NOX2-ROS signaling in gastric cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 494(3-4), 550-555.
- Kim, Y. S., Morgan, M. J., Choksi, S., & Liu, Z. G. (2007). TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Molecular cell*, 26(5), 675-687.
- Klevenz, H., 2004, Nanobiotechnology: from molecules to systems. *Engineering in life sciences*, 4(3), 211-218.
- Koeffler, H. P., McCormick, F., Denny, C., 1991, Molecular mechanisms of cancer. *Western Journal of Medicine*, 155(5), 505.
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Kalagasidou, S., Pagkalos, A., Alatzidou, D., Kantari, P., Ntounis, T., Fasoulakis, Z., 2021, Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. *JBUON*, 26(5), 1723–1734.
- Korc, M., 2003, Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Molecular cancer*, 2(1), 1-8.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., ... & Melino, G., 2009, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, 16(1), 3-11.
- Kunihiro, A. G., Brickey, J. A., Frye, J. B., Cheng, J. N., Luis, P. B., Schneider, C., Funk, J. L., 2022, Curcumin inhibition of TGF β signaling in bone metastatic breast cancer cells and the possible role of oxidative metabolites. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 99, 108842.
- Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., George, M. C., 1985, Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer letters*, 29(2), 197-202.
- Lao, C. D., Ruffin, M. T., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., Brenner, D. E., 2006, Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), 1-4.
- Leibacher, J., Henschler, R., 2016, Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1).
- Li, H., Wang, Q., Wang, Y., Xu, Z., Han, Z., 2019, Esculetin inhibits the proliferation of human lung cancer cells by targeting epithelial-to-mesenchymal transition of the cells. *Cellular and Molecular Biology*, 65(7), 95-98.
- Li, J., Li, S., Wang, X., Wang, H., 2017, Esculetin induces apoptosis of SMMC-7721 cells through IGF-1/PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(7), 787-794.
- Li, L., Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Abbruzzese, J., Kurzrock, R., 2004, Nuclear factor- κ B and I κ B kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 101(10), 2351-2362.
- Li, M., Liu, Y., Liu, Y., Lin, J., Ding, L., Wu, S., & Gong, J. (2024). Fabrication of targeted and pH responsive lysozyme-hyaluronan nanoparticles for 5-fluorouracil and curcumin co-delivery in colorectal cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127836.
- Li, W., Sun, L., Lei, J., Wu, Z., Ma, Q., Wang, Z., 2020, Curcumin inhibits pancreatic cancer cell invasion and EMT by interfering with tumor stromal crosstalk under hypoxic conditions via the IL 6/ERK/NF κ B axis. *Oncology reports*, 44(1), 382-392.
- Li, W., Wang, Z., Xiao, X., Han, L., Wu, Z., Ma, Q., Cao, L., 2019, Curcumin attenuates hyperglycemia-driven EGF-induced invasive and migratory abilities of pancreatic cancer via suppression of the ERK and AKT pathways. *Oncology Reports*, 41(1), 650-658.

- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*, 6(1), 1-19.
- Li, X., Xia, X., Zhang, J., Adu-Frimpong, M., Shen, X., Yin, W., He, Q., Rong, W., Shi, F., Cao, X., Ji, H., Torenizyazov, E., Wang, Q., Yu, J., Xu, X., 2023, Preparation, Physical Characterization, Pharmacokinetics and Anti-Hyperglycemic Activity of Esculetin-Loaded Mixed Micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(1), 148–157.
- Liang, R., Wei, M., Evans, D. G., Duan, X., 2014, Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics. *Chemical communications*, 50(91), 14071-14081.
- Lieberman, J., 2010, Granzyme A activates another way to die. *Immunological reviews*, 235(1), 93-104.
- Lieberthal, W., Menza, S. A., Levine, J. S., 1998, Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 274(2), F315-F327.
- Liu, L., Kshirsagar, P. G., Gautam, S. K., Gulati, M., Wafa, E. I., Christiansen, J. C., White, B.M., Mallapragada, S.K., Wannemuehler, M.J., Kumar, S., Solheim, J.C., Batra, S.K., Salem, A.K., Narasimhan, B., Jain, M., 2022, Nanocarriers for pancreatic cancer imaging, treatments, and immunotherapies. *Theranostics*, 12(3), 1030.
- Liu, X., Chu, Z., Chen, B., Ma, Y., Xu, L., Qian, H., & Yu, Y. (2023). Cancer cell membrane-coated upconversion nanoparticles/ZnMn₂O₄-xS core-shell nanoparticles for targeted photodynamic and chemodynamic therapy of pancreatic cancer. *Materials Today Bio*, 22, 100765.
- Liu, X., Sun, K., Song, A., Zhang, X., Zhang, X., He, X., 2014, Curcumin inhibits proliferation of gastric cancer cells by impairing ATP-sensitive potassium channel opening. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(1).
- Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J., 2001, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
- Loftus, L. V., Amend, S. R., Pienta, K. J., 2022, Interplay between cell death and cell proliferation reveals new strategies for cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4723.
- Loukopoulos, P., Kanetaka, K., Takamura, M., Shibata, T., Sakamoto, M., Hirohashi, S., 2004, Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas*, 29(3), 193-203.
- Löhr, M., Trautmann, B., Göttler, M., Peters, S., Zauner, I., Maier, A., Klöppel, G., Liebe, S., Kreuser, E. D., 1996, Expression and function of receptors for extracellular matrix proteins in human ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Pancreas*, 12(3), 248-259.

- Lutfi, N., Galindo-Campos, M. A., Yélamos, J., 2021, Impact of DNA Damage Response—Targeted Therapies on the Immune Response to Tumours. *Cancers*, 13(23), 6008.
- Ma, T., Jiang, J. L., Qi, W. X., Chen, J. Y., Xu, H. P., 2022, A Novel Delivery System of RGD-HSA Loaded GEM/CUR Nanoparticles for the Treatment of Pancreatic Cancer Therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 2395-2406.
- Martinvalet, D., 2015, ROS signaling during granzyme B-mediated apoptosis. *Molecular & cellular oncology*, 2(3), e992639.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., de Bruin, R. A., 2022, Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.
- McDaid, W. J., Greene, M. K., Johnston, M. C., Pollheimer, E., Smyth, P., McLaughlin, K., Van Schaeybroeck, S., Straubinger, R. M., Longley, D. B., Scott, C. J., 2019, Repurposing of Cetuximab in antibody-directed chemotherapy-loaded nanoparticles in EGFR therapy-resistant pancreatic tumours. *Nanoscale*, 11(42), 20261–20273.
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., McCain, R. S., 2018, Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World journal of gastroenterology*, 24(43), 4846.
- Medina, C. B., Ravichandran, K. S., 2016, Do not let death do us part: ‘find-me’ signals in communication between dying cells and the phagocytes. *Cell Death & Differentiation*, 23(6), 979-989.
- Mihaljevic, A. L., Michalski, C. W., Friess, H., Kleeff, J. (2010). Molecular mechanism of pancreatic cancer—understanding proliferation, invasion, and metastasis. *Langenbeck's archives of surgery*, 395, 295-308.
- Mitragotri, S., Stayton, P., 2014, Organic nanoparticles for drug delivery and imaging. *Mrs Bulletin*, 39(3), 219-223.
- Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., Shroff, R. T., 2020, Pancreatic cancer. *The Lancet*, 395(10242), 2008-2020.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nabavi, S. F., Daglia, M., Moghaddam, A. H., Habtemariam, S., Nabavi, S. M., 2014, Curcumin and Liver Disease: from Chemistry to Medicine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 62–77.
- Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer science*, 112(10), 3945-3952.
- Nassar, D., Blanpain, C., 2016, Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11, 47-76.

- Nirmala, J. G., Lopus, M., 2020, Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell biology and toxicology*, 36, 145-164.
- Núñez, C., Estévez, S. V., del Pilar Chantada, M., 2018, Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23, 331-345.
- Okon, I. S., & Zou, M. H. (2015). Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacological research*, 100, 170-174.
- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(9), 2181-2196.
- Pan, H., Wang, B. H., Lv, W., Jiang, Y., He, L., 2015, Esculetin induces apoptosis in human gastric cancer cells through a cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition pore associated with ROS. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 51–60.
- Park, C., Jin, C. Y., Kim, G. Y., Choi, I. W., Kwon, T. K., Choi, B. T., Lee, S. J., Lee, W. H., Choi, Y. H., 2008, Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells through activation of JNK and ERK. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227(2), 219–228.
- Pecorino, L., 2021, *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*, 5th ed., Oxford University Press, Bell & Bain Ltd., Glasgow, ISBN 9780198833024.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., Langer, R., 2007, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751–760.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., ... & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. *Experimental & molecular medicine*, 52(2), 192-203.
- Perrone, D., Ardito, F., Giannatempo, G., Dioguardi, M., Troiano, G., Lo Russo, L., De Lillo, A., Laino, L., Lo Muzio, L., 2015, Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Experimental and therapeutic medicine*, 10(5), 1615-1623.
- Pourshams, A., Sepanlou, S. G., Ikuta, K. S., Bisignano, C., Safiri, S., Roshandel, G., Sharif, M., Khatibian, M., Fitzmaurice, C., Nixon, M. R., Abbasi, N., Afarideh, M., Ahmadian, E., Akinyemiju, T., Alahdab, F., Alam, T., Alipour, V., Allen, C. A., Anber, N. H., ... Naghavi, M., 2019, The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 4(12), 934–947.
- Prasad, B. R., Mullins, G., Nikolskaya, N., Connolly, D., Smith, T. J., Gérard, V. A., Byrne, S. J., Davies, G., Gun'ko, Y. K., Rochev, Y., 2012, Effects of long-term exposure of gelatinated and non-gelatinated cadmium telluride quantum dots on differentiated PC12 cells. *Journal of nanobiotechnology*, 10(1), 1-14.

- Priyadarsini, K. I., 2014, The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091-20112.
- Rabiee, N., Deljoo, S., Rabiee, M., 2018, Curcumin-hybrid nanoparticles in drug delivery system. *Asian J. Nanosci. Mater*, 2, 66-91.
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., Matrisian, L. M., 2014, Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research*, 74(11), 2913-2921.
- Rahman, A., Jain, R. S. K., Meghana, P., Nippu, B. N., Manjunatha, K. S., Rajaput, P. S., ... & Satyanarayan, N. D. (2023). Tetrahydrobenzothiophene derivatives ameliorate Mia PaCa-2 cell progression and induces apoptosis via inhibiting EGFR2 tyrosine kinase signal. *Bioorganic Chemistry*, 143, 106968.
- Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V. K., 2005, Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The international journal of lower extremity wounds*, 4(3), 138-144.
- Ramos, P., Bentires-Alj, M., 2015, Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*, 34(28), 3617-3626.
- Rao, L., Bu, L. L., Cai, B., Xu, J. H., Li, A., Zhang, W. F., Sun, Z., Guo, S., Liu, W., Wang, T., X. Z., 2016, Cancer cell membrane-coated upconversion nanoprobe for highly specific tumor imaging. *Advanced Materials*, 28(18), 3460-3466.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
- Renschler, M. F. (2004). The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *European Journal of Cancer*, 40(13), 1934-1940.
- Riveiro, M., De Kimpe, N., Moglioni, A., Vazquez, R., Monczor, F., Shayo, C., Davio, C., 2010, Coumarins: Old Compounds with Novel Promising Therapeutic Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 17(13), 1325–1338.
- Rosenblum, D., Joshi, N., Tao, W., Karp, J. M., Peer, D., 2018, Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nature Communications*, 9(1), 1–12.
- Sah, H., Thoma, L. A., Desu, H. R., Sah, E., Wood, G. C., 2013, Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 747–765.
- Santulli, G., Xie, W., Reiken, S. R., Marks, A. R., 2015, Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11389-11394.
- Saren, B. N., Mahajan, S., Aalhat, M., Kumar, R., Chatterjee, E., Maji, I., ... & Singh, P. K. (2024). Fucoidan-mediated targeted delivery of dasatinib-loaded nanoparticles amplifies

apoptosis and endows cytotoxic potential in triple-negative breast cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 233, 113631.

- Sasaki, N., Gomi, F., Hasegawa, F., Hirano, K., Fujiwara, M., Toyoda, M., Ishiwata, T., 2020, Characterization of the metastatic potential of the floating cell component of MIA PaCa-2, a human pancreatic cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(4), 881-888.
- Schwarz, K., Dobiasch, S., Nguyen, L., Schilling, D., Combs, S. E., 2020, Modification of radiosensitivity by Curcumin in human pancreatic cancer cell lines. *Scientific Reports*, 10(1), 3815.
- Scully, M. A., Wilkins, D. E., Dang, M. N., Hoover, E. C., Aboeleneen, S. B., & Day, E. S. (2023). Cancer Cell Membrane Wrapped Nanoparticles for the Delivery of a Bcl-2 Inhibitor to Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 20(8), 3895-3913.
- Selvaraj, V., Armistead, M. Y., Cohenford, M., Murray, E., 2013, Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line. *Chemosphere*, 90(3), 1201-1209.
- Selvasundaram, R., Manoharan, S., Buddhan, R., Neelakandan, M., Murali Naidu, R., 2018, Chemopreventive potential of esculetin in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Molecular and cellular biochemistry*, 448, 145-153.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158-167.
- Sharma, S., Kelly, T. K., Jones, P. A., 2010, Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Shi, X., Li, Q., Zhang, C., Pei, H., Wang, G., Zhou, H., Fan, L., Yang, K., Jiang, B., Wang, F., Zhu, R., 2021, Semiconducting polymer nano-radiopharmaceutical for combined radio-photothermal therapy of pancreatic tumor. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-12.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., Jemal, A., 2022, Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33.
- Simon, H. U., Haj-Yehia, A., & Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5, 415-418.
- Singh, A. P., Biswas, A., Shukla, A., Maiti, P., 2019, Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. *Signal transduction and targeted therapy*, 4(1), 33.

- Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M., Klöppel, G., 2003, A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Archiv*, 442, 444-452.
- Sivakumar, B., Aswathy, R. G., Nagaoka, Y., Iwai, S., Hasumura, T., Venugopal, K., Kato, K., Yoshida, Y., Maekawa, T., Sakthikumar, D. N., 2014, Augmented cellular uptake and antiproliferation against pancreatic cancer cells induced by targeted curcumin and SPION encapsulated PLGA nanoformulation. *Materials Express*, 4(3), 183–195.
- Song, W., Jia, P., Zhang, T., Dou, K., Liu, L., Ren, Y., Liu, F., Xue, J., Hasanin, M. S., Qi, H. Zhou, Q., 2022, Cell membrane-camouflaged inorganic nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1-29.
- Spencer, D. S., Puranik, A. S., Peppas, N. A., 2015, Intelligent nanoparticles for advanced drug delivery in cancer treatment. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 7, 84–92.
- Starkov, A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 37-52.
- Sun, C., Wang, P., Dong, W., Liu, H., Sun, J., Zhao, L., 2020, LncRNA PVT1 promotes exosome secretion through YKT6, RAB7, and VAMP3 in pancreatic cancer. *Aging (Albany NY)*, 12(11), 10427.
- Sun, M., Estrov, Z., Ji, Y., Coombes, K. R., Harris, D. H., Kurzrock, R., 2008, Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 7(3), 464-473.
- Sun, X. D., Liu, X. E., Huang, D. S., 2013, Curcumin reverses the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by inhibiting the Hedgehog signaling pathway. *Oncology Reports*, 29(6), 2401–2407.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Swayden, M., Iovanna, J., Soubeyran, P., 2018, Pancreatic cancer chemo-resistance is driven by tumor phenotype rather than tumor genotype. *Heliyon*, 4(12), e01055.
- Tang, S., Wen, P., Li, K., Deng, J., Yang, B., 2022, Tumor targetable and pH-sensitive polymer nanoparticles for simultaneously improve the Type 2 Diabetes Mellitus and malignant breast cancer. *Bioengineered*, 13(4), 9757-9768.
- Tarannum, M., Vivero-Escoto, J. L., 2022, Nanoparticle-based therapeutic strategies targeting major clinical challenges in pancreatic cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 187.
- Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y., Earnshaw, W. C., 2007, Three distinct stages of apoptotic nuclear

condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Experimental cell research*, 313(16), 3635-3644.

Torphy, R. J., Fujiwara, Y., Schulick, R. D., 2020, Pancreatic cancer treatment: better, but a long way to go. *Surgery Today*, 50(10), 1117–1125.

Ushio-Fukai, M., & Nakamura, Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer letters*, 266(1), 37-52.

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Tamm, C., Heidari, N., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2008, DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death & Differentiation*, 15(3), 555-566.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., Goggins, M., 2011, Pancreatic cancer. *The lancet*, 378(9791), 607-620.

Wahab, N. A., H. Lajis, N., Abas, F., Othman, I., Naidu, R., 2020, Mechanism of anti-cancer activity of curcumin on androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer. *Nutrients*, 12(3), 679.

Wang, C. J., Hsieh, Y. J., Chu, C. Y., Lin, Y. L., Tseng, T. H., 2002, Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer letters*, 183(2), 163-168.

Wang, G., Lu, M., Yao, Y., Wang, J., Li, J., 2017, Esculetin exerts antitumor effect on human gastric cancer cells through IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 814, 207-215.

Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer biology & therapy*, 7(12), 1875-1884.

Wang, J., Lu, M. L., Dai, H. L., Zhang, S. P., Wang, H. X., Wei, N., 2014, Esculetin, a coumarin derivative, exerts in vitro and in vivo antiproliferative activity against hepatocellular carcinoma by initiating a mitochondrial-dependent apoptosis pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48, 245-253.

Wang, S. Q., Zhang, Q., Sun, C., Liu, G. Y., 2018, Ifosfamide-loaded lipid-core-nanocapsules to increase the anticancer efficacy in MG63 osteosarcoma cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(6), 1140-1145.

Wang, X., Yang, C., Zhang, Q., Wang, C., Zhou, X., Zhang, X., Liu, S., 2019, In vitro anticancer effects of esculetin against human leukemia cell lines involves apoptotic cell death, autophagy, G0/G1 cell cycle arrest and modulation of Raf/MEK/ERK signalling pathway. *J. BUON*, 24(4), 1686-1691.

Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., Car, H., 2012, Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports*, 64(5), 1020-1037.

- Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(Pt 1), 17.
- Wójcik, B., Sawosz, E., Szczepaniak, J., Strojny, B., Sosnowska, M., Daniluk, K., Zielińska-Górska, M., Bałaban, J., Chwalibog, A., Wierzbicki, M., 2021, Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12100.
- Wood, L. D., Hruban, R. H., 2012, Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(6), 492.
- Wu, X. J., & Hua, X. (2007). Targeting ROS: selective killing of cancer cells by a cruciferous vegetable derived pro-oxidant compound. *Cancer biology & therapy*, 6(5), 646-647.
- Wu, X. L., Kim, J. H., Koo, H., Bae, S. M., Shin, H., Kim, M. S., Lee, B. H., Park, R. W., Kim, I. S., Choi, K., Kwon, I. C., Kim, K., Lee, D. S., 2010, Tumor-targeting peptide conjugated pH-responsive micelles as a potential drug carrier for cancer therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 21(2), 208–213.
- Wu, X., Chen, H., Liu, N., Liu, S., Lin, G., 2023, Curcumin suppresses lung cancer progression via circRUNX1 mediated miR-760/RAB3D axis. *Thoracic Cancer*, 14(5).
- Wu, Y., Zhu, R., Zhou, M., Liu, J., Dong, K., Zhao, S., Cao, J., Wang, W., Sun, C., Wu, S., Wang, F., Shi, Y., Sun, Y., 2023, Homologous cancer cell membrane-camouflaged nanoparticles target drug delivery and enhance the chemotherapy efficacy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 558, 216106.
- Xu, C. H., Ye, P. J., Zhou, Y. C., He, D. X., Wei, H., Yu, C. Y., 2020, Cell membrane-camouflaged nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 105, 1–14.
- Xu, W., Wang, J., Li, Q., Wu, C., Wu, L., Li, K., Li, Q., Han, Q., Zhu, J., Bai, Y., Deng, J., Lyu, J., Wang, Z., 2021, Cancer cell membrane-coated nanogels as a redox/pH dual-responsive drug carrier for tumor-targeted therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(38), 8031-8037.
- Xue, T., Xu, P., Padelford, J., Xue, X., Wu, A. Y., Li, Y., Wang, L., 2022, Actively targeted delivery of SN38 by ultrafine iron oxide nanoparticle for treating pancreatic cancer. *Investigational New Drugs*, 40(3), 546-555.
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., Chauhan, S. C., 2010, Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of colloid and interface science*, 351(1), 19-29.
- Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37, 1-10.

- Yang, M., Li, J., Gu, P., Fan, X., 2021, The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. *Bioactive materials*, 6(7), 1973-1987.
- Yang, N., Ding, Y., Zhang, Y., Wang, B., Zhao, X., Cheng, K., Huang, Y., Taleb, M., Zhao, J., Dong, W., Zhang, L., Nie, G., 2018, Surface functionalization of polymeric nanoparticles with umbilical cord-derived mesenchymal stem cell membrane for tumor-targeted therapy. *ACS applied materials & interfaces*, 10(27), 22963-22973.
- Zhang, G., Xu, Y., Zhou, H. fang., 2019, Esculetin Inhibits Proliferation, Invasion, and Migration of Laryngeal Cancer In Vitro and In Vivo by Inhibiting Janus Kinas (JAK)-Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) Activation. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 7853–7863.
- Zhang, L., Xie, Q., Li, X., 2022, Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 36(1), 279-298.
- Zhang, W., Yu, M., Xi, Z., Nie, D., Dai, Z., Wang, J., Qian, K., Weng, H., Gan, Y., Xu, L., 2019, Cancer cell membrane-camouflaged nanorods with endoplasmic reticulum targeting for improved antitumor therapy. *ACS applied materials & interfaces*, 11(50), 46614-46625.
- Zhao, Z., Li, C., Xi, H., Gao, Y., Xu, D., 2015, Curcumin induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the induction of forkhead box O1 and inhibition of the PI3K/Akt pathway. *Molecular medicine reports*, 12(4), 5415-5422.
- Zhen, X., Cheng, P., Pu, K., 2019, Recent Advances in Cell Membrane-Camouflaged Nanoparticles for Cancer Phototherapy. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 15(1).
- Zhu, J. Y., Zheng, D. W., Zhang, M. K., Yu, W. Y., Qiu, W. X., Hu, J. J., Feng, J., Zhang, X. Z., 2016, Preferential Cancer Cell Self-Recognition and Tumor Self-Targeting by Coating Nanoparticles with Homotypic Cancer Cell Membranes. *Nano Letters*, 16(9), 5895–5901.
- Zhu, X., Gu, J., Qian, H., 2018, Esculetin attenuates the growth of lung cancer by downregulating Wnt targeted genes and suppressing NF- κ B. *Archivos de bronconeumologia*, 54(3), 128-133.
- Zuo, J., Zhang, W., Jian, H., Bou-Chacra, N., Löbenberg, R., 2020, Esculetin as bioactive marker: towards a rational scientific approach for the treatment of hyperuricemia using Traditional Chinese Medicine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ayşe Nur Nurdoğan
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Medeniyet Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	2021

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	
Nurdoğan A.N., Sak R., Kızılcay G.E., Bahadori F., Karatug Kacar A.* (corr.), “Dual-targeted and biocompatible nanoparticles loaded with esculetin and curcumin cause the death of pancreatic cancer cells”, Oral Presentation, 17th International Nanoscience and Nanotechnology Conference, Izmir Institute of Technology (IZTECH), İzmir/Turkey, on August 27-29, 2023.	