



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEM ARACILIĞIYLA İNDOMETASİNİN İNSAN GLİOBLASTOMA U87MG HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ferhat BOSTANCI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Murat PEKMEZ**

Ağustos, 2023

İSTANBUL

Bu alışma, 16.08.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Murat PEKMEZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Cenk KIĞ
İstanbul Üniversite
Fen Fakülte

Doç. Dr. Hüseyin ABDİK
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversite
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakülte

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 aboneli 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 38488 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim kıymetli zamanını ve bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Murat PEKMEZ'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans süresince aldığım dersler ile bilimsel bilgi birikimime katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün kıymetli öğretim üyelerine,

Yüksek lisans tez çalışmalarım için gerekli finansman desteğinde bulunan Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Gerek deneysel çalışma sırasında gerekse ayırdığı kıymetli zaman ve destekleri için Yunus AKSÜT'e ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak desteklerini her zaman gösteren aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2023

Ferhat BOSTANCI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1 GLİOMALAR.....	3
2.1.1 Gliomaların Sınıflandırılması.....	3
2.1.2 Glioblastoma.....	4
2.1.3 İnsan Glioblastoma U87MG Hücre Hattı.....	5
2.2 KARSİNOGENEZDE PROSTAGLANDİNLERİN ROLÜ	5
2.2.1 Non-Steroida Anti-İnflamatuar İlaçlar (NSAİ) ve Kanseri.....	7
2.2.1.1 İndometasin.....	9
2.3 KANSER TEDAVİSİNDE NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLER.....	10
2.3.1 Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler ve Kan-Beyin Bariyeri	12
2.3.2 Poli(laktik-ko-glikolik asit)(PLGA)	13
2.3.3 PLGA ile Taşınan İlaçların Kanseri Üzerindeki Etkisi	15
2.3.4 PLGA-İndometasin.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
3.1 PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN OLUŞTURULMASI	18
3.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ	18
3.3 HEMOSİTOMETRİK HÜCRE SAYIMI	19
3.4 SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ	19
3.4.1 Deney Gruplarının Oluşturulması	20
3.5 HÜCRELERİN DONDURULMASI	20
3.6 RNA İZOLASYONU.....	20
3.7 CDNA OLUŞTURULMASI.....	21

3.8 GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZİ.....	21
3.9 PROTEİN İZOLASYONU	22
3.10 SDS-PAGE ELEKTROFORETİK ANALİZİ	22
3.11 WESTERN BLOTLAMA.....	24
3.12 PLGA’NIN HÜCRE İÇİNE GİRİŞİNİN SAPTANMASI	25
3.13 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1 PARTİKÜL BOYUTU VE ZETA POTANSİYELİ ANALİZLERİ.....	27
4.2 FTIR ANALİZLERİ	28
4.3 IND-PLGA SALIM ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ.....	29
4.4 SİTOTOKSİSİTE ANALİZLER.....	31
4.5 GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ	33
4.6 HÜCRE ÖLÜM YOLAĞININ PROTEİN SEVİYESİNDE ANALİZİ.....	35
4.7 PLGA’NIN HÜCRE İÇERİSİNE GİRMESİ.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1:İndometasin yapısal formülü.	9
Şekil 2.2:PLGA yapısal formülü.....	14
Şekil 4.1: Sentezlenen nanopartiküller için DLS analizleri ile ortalama nanopartikül boyutları ve PDI değerleri.	27
Şekil 4.2: PLGA ve IND-PLGA nanopartiküllerinin Zeta Potansiyeli değerleri.....	28
Şekil 4.3: İndometasin, PLGA, IND-PLGA için FITR grafikleri.....	29
Şekil 4.4: İndometasin için oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi.	30
Şekil 4.5: IND ve IND-PLGA'nın zamana bağlı IND salımları.	31
Şekil 4.6: Farklı doz ve süredeki IND, PLGA ve IND-PLGA'nın MTT deneyi sonuçları.	31
Şekil 4.7: IND 4 saatlik ve normal etkisinin zamana ve doza bağlı etkisi.....	32
Şekil 4.8: Farklı dozlardaki PLGA, IND ve IND-PLGA'nın apoptoz üzerindeki etkisi.	34
Şekil 4.9: Hücre ölüm yolağı belirteç proteinlerinin western blotlama sonuçları.....	36
Şekil 4.10: PLGA'nın hücre içerisine girişi.	37

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: cDNA reaskiyonunun bileşenleri.	21
Tablo 3.2: cDNA reaksiyon koşulları.	21
Tablo 3.3: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu bileşenleri.	22
Tablo 3.4: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu koşulları.	22
Tablo 3.5: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.	23
Tablo 3.6: İmmünolojik analizler için hazırlanan çözeltiler.	24
Tablo 3.7: Kullanılan primer ve sekonder antikorlar.	25
Tablo 4.1: 4 saatlik IND-PLGA ve saf IND uygulamasının IC50 değeri.	33

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
g	: Gram
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mV	: Milivolt
ng	: Nanogram
pH	: Hidrojen Potansiyeli
ppm	: Milyonda Bir Miktar

Kisaltmalar	Açıklama
2HG	: 2-hidroksigluterata
AKT	: Protein Kinaz B
ATCC	: Amerika Tıp Kültür Koleksiyonu
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
COX	: Siklooksijenaz
CREB	: cAMP cevap elementine bağlanan protein
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DNA	: Deoksibonükleik Asit
DP1	: Prostaglandin D2 reseptör 1
DP2	: Prostaglandin D2 reseptör 2
E2F-1	: E2F transkripsiyon faktörü 1
EGFR	: Epirdermal büyüme faktörü reseptörü
EMA	: Avrupa İlaç Kurumu
EP2	: Prostaglandin E2 reseptör 2
EP3	: Prostaglandin E2 reseptör 3

EP4	: Prostaglandin E2 reseptör 4
ERKs	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FOXC2	: Forkhead Box Protein C2
FP	: Prostaglandin F reseptörü
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GBM	: Glioblastoma
ICAM-1	: Hücre içi adhezyon molekülü-1
IDH	: İzositrat Dehidrojenez enzimi
IP	: Prostatiklin reseptörü
MAPK	: Mitojenle Etkinleşen Protein kinaz
MDM2	: Mouse double minute 2 geni
mTOR	: Rapamisin'in mekanik hedefi
NADP+	: Nikotinamid Adenin Dinükleotitfosfatı
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa-B
Orai1	: Kalsiyum salınımı ile aktive olan kanal proteini 1
p14^{ARF}	: ARF tümör baskılayıcı protein
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Tuzlu fosfat tamponu
PKC-1	: Fosfoinositide bağlı protein kinaz 1
PEG	: Polietilen glikol
PGD2	: Prostaglandin D2
PGE2	: Prostaglandin E2
PGF2a	: Prostaglandin F2a
PGI2	: Prostaglandin I2
PI3K	: Fosfoinositid-3 kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PTEN	: Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu
PVDF	: Polivinilidinden diflorür
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon deney tamponu
Rod B	: Rhodamine B
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

STAT3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
U-87 MG	: Upsalla 87 İnsan Malign Glioma Hücre Hattı
TBST	: Tris tamponlu salin ve Polisorbat 20
TBXA2R	: Tramboksan A2 reseptörü
TP53	: Tümör Protein 53
TXA2	: Tramboksan A2



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEM ARACILIĞIYLA İNDOMETASİNİN İNSAN GLİOBLASTOMA U87MG HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ferhat BOSTANCI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat PEKMEZ

İndometasin kan-beyin bariyerinden geçebilen bu nedenle daha önce glioblastoma hücre hatlarında çalışılmış ümit vaat eden bir non-steroidal anti-inflamatuar ilaçtır. Prostaglandinlerin oluşmasını engelleyerek inflamasyonu azaltmaktadır. Fakat kanda %90 oranında kan proteinleriyle beraber bulunduğundan kandaki serbest indometasin miktarı azdır. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ise FDA tarafından onaylı normal koşullarda insanlarda ciddi bir yan etki oluşturmeyen nanopartiküllerdir. Daha önce birçok farklı ilacın farklı amaçlarla taşınmasını sağlamıştır. Bu çalışmada indometasin yüklü PLGA'nın U-87 MG insan glioblastoma üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada üretilen indometasin yüklü PLGA nanopartiküllerinin boyutu 160,6 nm olarak hesaplanmıştır. Ayrıca yapılan zeta potansiyeli testlerinde nanopartikülün zeta potansiyeli -23,9 mV olarak tespit edilmiştir. Nanopartikülün kimyasal yapısını tespit etmeye yönelik olan araştırmada ise üretilen nanopartikülün indometasin taşıdığı sonucuna varılmıştır. Spektral yöntemler kullanılarak üretilen nanopartikülün kütlece %9 oranında indometasin içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan salınım testlerinde 4 saat içerisinde yapısındaki indometasinin %72,5'lik miktarını ortama saldıgı gösterilmiştir.

Nanopartikülün özellikleri göz önünde bulundurularak hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)] ile tespit edilmiştir. Bunun için hücreler nanopartiküle 4 saat maruz bırakılmış ve medyası değiştirilerek 24, 48 ve 72 saatlik sonuçları

analiz edilmiştir. Nanopartikülle taşınan indometasinin etkisi saf indometasinin etkisiyle kıyaslanmıştır. Sonuç olarak indometasin yüklü nanopartiküllerin saf indometasine göre çok daha öldürücü olduğu belirlenmiştir. Sitotoksikite analizleri neticesinde uygun görülen 200µM ve 100µM indometasin içeren nanopartiküller ile saf haldeki 200µM ve 100µM indometasinin hücre ölüm yollarındaki etkisi araştırılmıştır. Bunun için Bax, Bcl2 ve Casp3 genlerinin RNA ve protein düzeyindeki değişimleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve western blotlama yöntemleriyle tespit edilmiştir. Bu yöntemlerin sonucunda indometasin yüklü nanopartikülün saf indometasine göre apoptoza yol açan genlerin ifadesini ciddi derece artırdığı saptanmıştır. Ayrıca apoptozu engelleyen genlerin ifadesinde azalma tespit edilmiştir.

Nanopartikülün hücre içerisine girişi nanopartikülün Rhodamine B ile işaretlenmesi ve floresan mikroskop altında gözlemlenmesi ile tespit edilmiştir. Hücrelerin yerlerini doğrulamak için hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 ile boyanmış ve floresan mikroskop altında gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak indometasin yüklü PLGA'nın saf indometasinden çok daha etkili olduğu ve üzerine daha fazla araştırma yapılmaya uygun bir aday tedavi sistemi olduğu belirtilmiştir.

Ağustos 2023, 67. sayfa.

Anahtar kelimeler: İndometasin, PLGA, Glioma, Kanser, Apoptoz.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF INDOMETACIN ON HUMAN GLIOBLASTOMA U87MG CELLS BY NANOPARTICULAR DELIVERY SYSTEM

Ferhat BOSTANCI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat PEKMEZ

Indomethacin is a promising non-steroidal anti-inflammatory drug that can cross the blood-brain barrier and has therefore been previously investigated in glioblastoma cell lines. It reduces inflammation by preventing the formation of prostaglandins. However, the amount of free indomethacin in the blood is low, as 90% of it is found with blood proteins in the blood. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is FDA-approved nanoparticles that do not cause serious side effects in humans under normal conditions. It has previously enabled many different drugs to be transported for different purposes. In this study, the effect of indomethacin loaded PLGA on U-87 MG human glioblastoma was investigated.

The size of indomethacin loaded PLGA nanoparticles produced in this study was calculated as 160.6 nm. In addition, the zeta potential of the nanoparticle was determined as -23.9 mV in the zeta potential tests. In the research to determine the chemical structure of the nanoparticle, it was concluded that the produced nanoparticle contained indomethacin. By using spectral methods, it was determined that the nanoparticle produced contains 9% mass of indomethacin. In addition, it was shown in the release tests that it released 72.5% of indomethacin in its structure within 4 hours.

Considering the properties of the nanoparticle, its cytotoxic effect on cells was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium)]. For this, the cells were exposed to the

nanoparticle for 4 hours and the media was changed and the results were analyzed at 24, 48 and 72 hours. The effect of nanoparticle contained indomethacin was compared with the effect of pure indomethacin. As a result, it was determined that indomethacin loaded nanoparticles were much more lethal than pure indomethacin. The effects of 200 μ M and 100 μ M indomethacin containing nanoparticles and 200 μ M and 100 μ M pure indomethacin on cell death pathways were investigated according to results of cytotoxicity analyses. For this purpose, changes in the RNA and protein levels of Bax, Bcl2 and Casp3 genes were determined by real-time polymerase chain reaction and western blotting methods. As a result of these methods, it was determined that the indomethacin loaded nanoparticle significantly increased the expression of genes that cause apoptosis compared to pure indomethacin. In addition, a decrease in the expression of genes that prevent apoptosis was detected.

The entry of the nanoparticle into the cell was determined by labeling the nanoparticle with Rhodamine B and observing it under a fluorescent microscope. To confirm the location of the cells, the nuclei of the cells were stained with Hoechst 33342 and observed under a fluorescent microscope.

As a result, it was stated that indomethacin loaded PLGA is much more effective than pure indomethacin and is a candidate treatment system suitable for further research.

August 2023, 67. pages.

Keywords: Indomethacin, PLGA, Glioma, Cancer, Apoptosis.

1. GİRİŞ

Kanser günümüzün hem dünya üzerinde hem de ülkemizde en önemli sağlık sorunlarından. T.C Sağlık Bakanlığı'nın 2022 yılında yayınladığı raporda Türkiye'de 2018 yılı içindeki yeni kanser vakasının 211 bin olduğu belirtilmektedir. Aynı raporda 2021 yılı içindeki yeni kanser vakalarının ise 218 bin olduğu tahmin edilmektedir (Türkyılmaz ve diğ., 2022). Dünya genelinde ise 2020 yılında 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanserle ilgili ölüm olduğu gösterilmiştir (Chhikara ve Parang, 2023).

Dünya genelinde beyin ve merkezi sinir sistemine bağlı kanser vakaları 2020 yılında 308 bin olduğu tahmin edilmektedir. Her ne kadar akciğer kanseri kadar yıllık vaka sayısına sahip olmasa da bu kanser türünün ölüm oranı ciddi anlamda yüksek olduğu belirtilmektedir. 2020 yılında beyin ve merkezi sinir sistemine bağlı ölümlerin 251 binden fazla olduğu tahmin edilmektedir (Ferlay ve diğ., 2021).

Beyin kanserinin tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri kan-beyin bariyerinin kemoterapik ilaçların geçişini engellemesidir. Kan beyin bariyeri büyük moleküllerin tamamını ve küçük moleküllerin %98lik bir kısmının beyine geçişini engellemektedir. Bu nedenle beyin ve merkezi sinir sistemine bağlı kanserlerin tedavisinde ciddi zorluklar oluşmaktadır (Pardridge, 2005). Kemoterapi hem kısa vadede (Altun ve Sonkaya, 2018) hem de uzun vadede (Alemany ve diğ., 2021; Schagen ve diğ., 2022) ciddi yan etkiler göstermektedir. Bu nedenle farklı ve geliştirilmiş tedavi yolları günümüzde de araştırılmaya devam etmektedir.

İndometasin non-steroidal anti-inflamatuar bir ilaçtır. Ağrı kesici ve ateş düşürücü etkisi olan indometasin özellikle eklemlerde gözlenen inflamasyonların tedavisinde kullanılır. Bunların yanı sıra kan-beyin bariyerinden geçebilen indometasin siklooksijenaz enzimini baskılayabilmesiyle prostaglandinlerin üretimini engellemektedir (Lucas, 2016). Böylelikle inflamasyona yol açan bir dizi olayı engellemektedir. Bunu yanında indometasinin bazı kanser türlerine karşı etkili olabileceği gösterilmiştir (Sarvepalli ve diğ., 2022; Hull ve diğ., 2003). Özellikle gliomalar üzerindeki çalışmalarda ümit vadettiği belirlenmiştir (Chang ve diğ., 2018; Chang ve diğ., 2020). İndometasinin tedavi olarak kullanılmasının yanında getirdiği yan etkiler nedeniyle muhtemel kanser tedavilerinin geliştirilmesi gerekliliği oluşmaktadır (Lucas, 2016).

Nanopartiküller ilgili madde ve ilaçların istenilen doku veya hücrelere taşınmasında kolaylaştırıcı ve yardımcı olduğu için ümit verici bir çalışma alanı olarak görülmektedir. Kanserin teşhisinde ve tedavisinde gösterdiği sonuçlar nedeniyle son yıllarda araştırmacıların rağbet gösterdiği bir teknoloji olmuştur (Baekte ve diğ., 2015). İlaç yüklü nanopartiküller taşıyıcı sistemlerin hedef oldaklı sonuç oluşturma ve kan-beyin bariyerini aşabilme gibi gelişmiş sonuçlar ortaya koyduğu gösterilmiştir (Upton ve diğ., 2022). İndometasinli yüklü taşıyıcı sistemlerin hem ilacın salınımını ve geçirgenliğini hem de kanser hücreleri üzerindeki ümit vadeden etkisi belirtilmiştir (Bernardi ve diğ., 2008; Sipos ve diğ., 2022).

Tezde elde edilen verilerin indometasin yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin insan U-87 MG glioblastoma hücre hattı üzerindeki etkileri üzerine bilgi vermesi ve gelecek çalışmalara öncülük etmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 GLİOMALAR

Gliomalar merkezi sinir sistemindeki glia ve diğer destekleyici hücrelerin kanserleşmesiyle oluşan hücrelerdir. Gliomalar merkezi sinir sistemindeki tümörlerin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadırlar. Bu hücreler histolojik olarak iyi huyludan en agresif merkezi sinir sistemi tümör türü olan glioblastomaya (GBM) kadar çeşitlilik gösterebilmektedirler. Gliomalar arasında en yaygın ve 5 senelik hayatta kalma oranı en düşük olan glioblastomadır. Bunun yanında beyin ve merkezi sinir sisteminde 100'den fazla farklı türde tümör tanımlanmıştır. Bu tanımlamalar ve sınıflandırmalar kanserin histolojisinin yanı sıra özellikle genetik ve epigenetik özellikleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır (Davis, 2018).

2.1.1 Gliomaların Sınıflandırılması

Gliomaların agresifliği ve histolojisine göre derecelendirilerek sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Davis, 2018).

- İyi Huylu Gliomalar: Subependimom, subependimal dev hücre astrositom bu türün örneğidir. Çoğunlukla çocuklarda görülen bu tür genellikle ventriküllerde bulunsa da omuriliğe kadar uzanabilmektedir. Hızlı veya yavaş olarak gelişebilmektedir.
- I. Derece Gliomalar (düşük dereceli): Pilositik astrositoma bu türün örneğidir. Çoğunlukla çocuklarda ve gençlerde görülen bu tür genellikle beyinde bulunsa da optik sinir yollarında ve beyin kökünde de gelişebilmektedir. Yavaş çoğalan bu tür genellikle iyi huylu ve çoğunlukla kist halinde bulunurlar.
- II. Derece Gliomalar (düşük dereceli): Oligodendrogliomalar, astrositomlar ve oligoastrositomlar bu türün örnekleridir. Yavaş gelişme eğiliminde olan bu tür genellikle 20 ile 50 yaş arası erkeklerde görülür. Genellikle beyinde rastlanan bu türün beyin dışında gelişimine pek rastlanmamaktadır.
- III. Derece Gliomalar (yüksek dereceli): Anaplastik astrositomalar, anaplastik oligodendrogliomalar ve anaplastik oligoastrositomlar bu türün örnekleridir. II. derece gliomalardan daha agresif ve daha hızlı şekilde gelişebilen bu tür 30 ile 60 yaş arası erkeklerde daha yaygın olarak görülmektedir. Bulunduğu dokunun yakınındaki diğer dokulara sıçrama eğilimi göstermektedir.

- IV. Derece (yüksek dereceli): Glioblastoma bu türün örneğidir. Direk olarak (de novo) veya diğer düşük dereceli gliomalardan gelişebilen bu tür beyin içerisinde son derece yayılmacıdır. Ayrıca genellikle yaşlı erkeklerde daha çok görülmektedir.

2.1.2 Glioblastoma

Glioblastoma merkezi sinir sisteminde bulunan glia veya destek hücrelerinden oluşan en saldırgan kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yüksek dereceli ve IV. derece olarak sınıflandırılan kanser türü direkt olarak glia veya destek hücrelerinde oluşabildiği gibi düşük dereceli glioma kanserlerinden de gelişebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016 yılında yaptığı yeni merkezi sinir sistemi kanserleri sınıflandırmasında histolojik özelliklerin yanında genetik belirteçler de sınıflandırılmaya dahil edildi. Böylelikle ilgili kanserin daha iyi anlaşılması ve daha uygun tedavi yöntemlerinin uygulanması sağlanmaktadır (Davis, 2018; Bai ve diğ., 2020; Louis ve diğ., 2021).

Glioblastoma oluşum şekline göre ikiye ayrılır. Birincil veya de novo glioblastomalar herhangi bir saptanabilir öncül lezyon olmaksızın oluşan glioblastomalardır. İkincil glioblastomalar ise kademeli glioblastomalar olarak adlandırılır. Bu glioblastoma türü düşük dereceli gliomalardan veya anaplastik astrositomlardan gelişmektedir (Kleihues ve Ohgaki, 1999). Birincil ve ikinci glioblastomalar ifade ettikleri genler ve gen düzeyleri açısından birbirlerinden farklılık gösterirler. Epirdermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) düzeyindeki artış ve ilgili genin aşırı ifadesi daha çok birincil glioblastomalar ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca sürekli ifade edilen EGFR mutasyonlarında p27 proteinin düzeyinin azalmasına neden olmaktadır. Bu tür bir değişiklik ise temel olarak birincil glioblastomalarda görülmektedir. Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) geni ise yine genellikle birincil glioblastomada mutasyona uğramış durumdadır. Tümör Protein 53 (TP53) geninin mutasyonları ikincil glioblastomalarda birincil glioblastomalara göre çok daha fazla görülmektedir. Mouse double minute 2 (MDM2) geni ise genellikle birincil glioblastomalarda mutasyona uğramaktadır. ARF tümör baskılayıcı gen (p14^{ARF}) proteininin ifade kaybının promotor bölgesindeki metillenme ile sağlanması ise çoğunlukla ikincil glioblastomalar ile ilişkilendirilir. Bu ve bunun gibi birçok protein düzeyindeki farklılıklar birincil ve ikincil glioblastomaları birbirlerinden ayırt etmemizde yardımcı olmaktadır (Ohgaki ve Kleihues, 2007).

Glioblastoma için genetik belirteçlerden biri olan izositrat dehidrojenez (IDH) enzim ailesi Krebs döngüsünde görev almaktadır. Sitrata α -ketogluterata çeviren bu enzim ailesi aynı zamanda nikotinamid adenin dinükleotitfosfatı (NADP^+) indirgemektedir. İzositrat dehidrojenezin iki adet izoformu bulunmaktadır (IDH1 ve IDH2). Bu Genlerde meydana gelen somatik mutasyonlar sonucunda daha az NADP^+ indirgenmekte ve böylelikle ortamda daha fazla reaktif oksijen türleri bulunabilmektedir. Bu reaktif oksijen türlerinin kanser hücrelerini daha zayıf hale getirildiği düşünülmektedir (Bai ve diğ., 2020). Bunun yanında bazı mutant IDH genlerinin kodladığı enzimlerin α -ketogluteratı 2-hidroksigluterata (2HG) çevirebilmektedir. Oluşan bu ürün epigenetik süreçlere dahil olarak hücrenin farklılaşmasına ve onkogen oluşmasına katkıda bulunabildiği düşünülmektedir (Chen ve diğ., 2017). IDH genlerinin mutant versiyonuna sahip olan GBM hastalarının hastalıklarının daha iyi seyrettiği belirtilmektedir.

2.1.3 İnsan Glioblastoma U87MG Hücre Hattı

Uppsala 87 malignant glioma (U87MG) beyin kanseri çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir glioblastoma hücre hattıdır. Son yıllarda U87MG kökeni ile ilgili olarak yapılan araştırmalar bazı endişelere neden olmuştur. Bu araştırmalar sonucunda ATCC tarafından ticari olarak sağlanan U87MG hücre hattının orijinal U87MG hücrelerinden farklı olduğunu ama hala glioblastoma hücre hattının özelliklerini taşıdığı belirtilmektedir. Bunun yanında U87MG hücrelerinin seri pasajlanmasının bu hücre hattının tümörjenitesini değiştirildiği gösterilmiştir. Bu tür olumsuzluklara rağmen U87MG hücre hattı bilimsel çalışmalarda kullanılmakta ve glioblastoma özelliğini devam ettirdiği için tercih edilmektedir (Zeng ve diğ., 2018; Allen ve diğ., 2016).

2.2 KARSİNOGENEZDE PROSTAGLANDİNLERİN ROLÜ

Prostaglandinler hormon benzeri etkisi olan aktif lipid bileşikleridir. Bu bileşikler 20 karbonlu yağ asidi olan araşidonik asitinden oluşmaktadırlar. Araşidonik asit hücre zarındaki fosfolipitlerden fosfolipaz A2 enzimi tarafından sentezlenir. Daha sonra ise Arakidonik asit siklooksijenaz (COX) enzimleri tarafından öncül prostaglandin olan prostaglandin H₂(PGH₂) molekülüne çevrilir. Bir sonraki basamakta ise bu öncül prostaglandin 5 farklı prostanoid cinsine kendi reaksiyonlarına özgü enzimler yardımıyla çevrilirler. Bu prostanoidler is prostaglandin D₂(PGD₂), prostaglandin E₂(PGE₂), prostaglandin F_{2a}(PGF_{2a}), prostaglandin

I2(PGI2) ve tramboksan A2(TXA2) olarak adlandırılırlar (Wang ve Dubois, 2010; Wang ve diğ., 2007; Menter ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2022). Oluşan bu moleküller hücre dışına prostaglandin taşıyıcısı ile taşınırlar. Sonrasında ise G-proteini kenetli reseptörlere bağlanırlar. Bu reseptörler PGD2 reseptör 1(DP1), PGD2 reseptör 2(DP2), PGE2 reseptör 1(EP1), PGE2 reseptör 2(EP2), PGE2 reseptör 3(EP3), PGE2 reseptör 4(EP4), prostaglandin F reseptörü (FP), prostasiklin reseptörü (IP) ve TXA2 reseptörüdür (TBXA2R). Bu reseptöre hücre dışındaki ilgili prostanoidlerin bağlanması sonucunda G-proteini kendi alt birimlerine ayrılır ve hücre içi sinyal yollarını tetikleyerek farklı fizyolojik etkilere neden olur.

Siklooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu bazı kanser türlerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Gosh ve diğ., 2010; Khan ve diğ., 2011; Mantovani ve diğ., 2010). Bununla beraber siklooksijenazın inhibe edilmesinden kaynaklanan yan etkiler vücudun çeşitli yerlerinde tespit edilmektedir. Bu tür yan etkilerden kaçınmak için prostaglandinlerin üretimi ve aktivasyonundaki siklooksijenazdan sonra gerçekleşen reaksiyonları hedef alan çalışmalar bulunmaktadır (Sun ve Li, 2018).

PGE2 inflamasyon, tümörleşme ve bağışıklık sistemi yanıtı gibi vücut içi olaylarda yer alan bir prosnoidtir (Ricciotti ve FitzGerald, 2011; Kalinski, 2012). Bu molekülün hücre dışına çıkıp kendine uygun reseptörlere bağlanması sonucu meydana gelen sinyal iletimiyle alakalı olarak bazı hastalıklar ve kanserleşme ilişkilendirilmiştir (Narumiya ve diğ., 1999; Maingret ve diğ., 2017; Takeuchi ve Amagase, 2018).

EP1 reseptörünün ifadesinin bazı kanser türlerinde arttığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak farklı sinyal yollarının çalıştığı ve karaciğer, akciğer ve ağız kanserlerinin kötüleşmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Bu yollar sırasıyla protein kinaz C(PKC)/nükleer faktör kappa-B(NF- κ B) /forkhead box protein C2(FOXC2) doğrultusunda, fosfoinositid-3 kinaz(PI3K) ve mitojenle etkinleşen protein kinaz(MAPK) aktivasyonunun neden olduğu E2F transkripsiyon faktörü 1(E2F-1)/FOXC2 doğrultusunda ve hücre içi adhezyon molekülü-1(ICAM-1) üretiminin artırılması doğrultusundadır (Bai ve diğ., 2014; Pan ve diğ., 2016; Yang ve diğ., 2010)

EP2 reseptörü PGE2 prosnoid ile bağlanması sonucunda adenilil siklaz ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aktif hale gelmektedir. Böylelikle β -katenin, PI3K, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERKs) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3)

tetiklenmektedir. Bunun sonucunda inflamasyon, tümörleşme, başka dokuya sıçrama ve apoptoz gibi sonuçlar oluşmaktadır (Sung ve diğ., 2005; Chun ve Langenbach, 2011; Castellone ve diğ., 2005).

EP3 reseptörü ise bazı kanser türlerinde kanserleşmeye neden olan unsurlardan biri olarak tanımlanmıştır. PGE2'nin EP3 reseptörüne bağlanmasıyla bazı sinyal yolları tetiklenmekte ve bu da tümör gelişimine ve tümörün kötü huyluluk özelliklerinin artmasına neden olmaktadır (Ye ve diğ., 2020; Wang ve diğ., 2022).

EP4 reseptörü birçok kanser türünde fazlasıyla ifade edilmektedir (Chen ve diğ., 2006; Rundhaug ve diğ., 2011; Majumder ve diğ., 2018). Bunun sonucu olarak tümörün çoğalması, apoptozu ve farklı dokulara sıçraması gibi özellikleri artmaktadır. EP4'ün protein kinaz A(PKA)/PI3K/protein kinaz B(AKT) sinyal yolağını tetiklemesiyle hücre çoğalmasında artış gözlemlenmiştir (Xu ve diğ., 2018). Diğer taraftan EP4 reseptörünün inhibe edilmesiyle pankreas kanserinde hücre çoğalmasının baskılandığı gösterilmiştir (Takahashi ve diğ., 2019). Birçok kanser türünde siklik adenosin monofosfat(cAMP)/PKA/cAMP cevap elementine bağlanan protein (CREB) yolağının aktivasyonunu engeller. Bunun sonucu olarak ise hücre çoğalması azalırken hücrelerin apoptoza yönelmesi artar (Li ve diğ., 2017; Cherukuri ve diğ., 2007). EP4 reseptörleri PI3K/Kalsiyum salınımı ile aktive olan kanal proteini 1(Orai1) /ERKs yolağının aktivasyonunu sağlayarak hücre göçüne yardımcı olmaktadır(Osawa ve diğ., 2020).

Yukarıda bahsedildiği gibi prostaglandinler birçok kanser türünde kanserleşmede ve kanserin ilerlemesinde rol oynamaktadırlar. Bu sorunun önüne geçebilmek için araştırmacılar çeşitli çözüm yolları aramışlardır. Ümit vadeden çözüm yollarından biri de non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların kullanımı olmuştur.

2.2.1 Non-Steroid Anti-İnflamatuar İlaçlar (NSAII) ve Kanser

İnflamasyonun kanserleşmeyle olan ilişkisi daha önceki çalışmalarla ortaya konmuştur (Balkwill ve Mantovani, 2001). Tümör hücreleri inflammatuar hücrelere benzerlik göstermektedir. Sitokin, kemokin ve bunlara ait reseptörlerin tümör hücreleri tarafından üretilmesi buna örnek olarak gösterilebilir. Bunlar gibi inflamasyona yardımcı ürünlerin sürekli olarak üretilmesi dokuda deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına ve böylelikle daha fazla

mutasyona neden olabilir. Bu mutasyonların sonucunda ise tümörleşme, tümörün kötü huylu hale gelmesi, tümör bölgesinde damarlaşıma, kanserin farklı dokulara sıçraması gibi durumlar oluşabilir (Philip ve diğ., 2004).

Steroid olmayan anti inflamatuvar ilaçlar tümör üzerinde hücre göçünü kısıtlama, apoptozu ve ilaçlara olan duyarlılığı artırma gibi etkilere sahiptir. Bu ilaçların kanser hastaları üzerinde uzun süreli kullanımı ölüm vakalarının ve sonradan yeniden tekrarlama vakalarının azalmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Rayburn ve diğ., 2009).

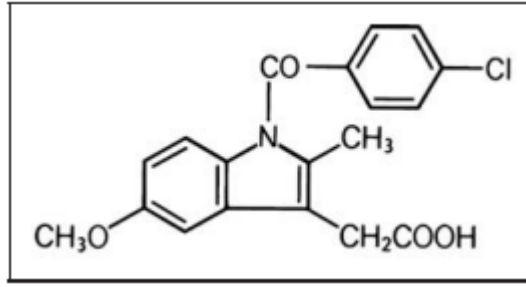
Steroid olmayan anti inflamatuvar ilaçlar inflamasyonu siklooksijenaz enzimini aktivitesini inhibe ederek yapar. Bu özelliği sayesinde prostaglandin üretimini sekteye uğratabilmektedir. Prostaglandin ifadesinin yüksek olduğu kanserlerde ise bu ilaçların etkili olabileceği gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2020). Ailesel adenomatöz polipozis olan hastaların sulindak ile tedavisinden sonra hastalığın tekrar etmesinde ve oluşan polip sayısında azalma olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Cruz-Correa ve diğ., 2002). Bunun yanında sulindak adenomaların gerilemesine yol açtığı raporlanmıştır (Matsushashi ve diğ., 1997). Selekoksib bir sıçan modelinde %90 oranında tümörün gerilemesine neden olduğu raporlanmıştır (Alshafie ve diğ., 2000). Farklı bir hayvan çalışmasında ise loksoprofenin tümör gelişmesini baskıladığı gösterilmiştir (Kanda ve diğ., 2003). Aspirinin kanser üzerindeki etkisi ise hücre kültürü çalışmalarında muhtemel etki mekanizmalarına değinerek belirtilmiştir (Hossain ve diğ., 2012).

Siklooksijenazın inhibe edilmesi bu ilaçların ortak noktası ve bazı kanser tedavisi veya önlenmesinde belirleyici faktör olsa da bu ilaçların hücre içi farklı yolak ve mekanizmaları etkileyerek kanser üzerinde tedavi edici veya önleyici etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Kolawole ve Kashfi, 2022). Kolorektal kanserdeki uzun süreli aspirin kullanımının NF- κ B nin nukleusa yönelimini artırdığı ve dolayısıyla tümör hücrelerinde apoptozun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Stark ve diğ., 2001). Sulindak NF- κ B yolağının aktivasyonunu artırarak kolon kanserindeki hücre bölünmesinin azaltmıştır (Yamamoto ve diğ., 1999). Selekoksib fosfoinositide bağlı protein kinaz 1 (PDK-1) aktivitesini baskılayarak kolon kanserinde apoptozu neden olduğu gösterilmiştir (Arico ve diğ., 2002). Naproksenin ve aspirinin PDK-1'in baskılanmasına neden olarak kanser hücrelerinde apoptozu neden olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2014; Chen ve diğ., 2020). İndometasin mide kanser hücre hattında apoptozu mitojenle aktifleşen protein kinazları inhibe ederek tetiklediği raporlanmıştır (Husain ve diğ., 2001). İndometasinin β -katenin ifadesini azalttığı ve böylelikle onkogen oluşumunu

geciktirdiği gösterilmiştir. (Heidel ve diğ., 2012). Aspirin kolorektal kanser hücrelerinde rapamisinin mekanik hedefini (mTOR) baskılayarak otofajiye neden olduğu raporlanmıştır (Din ve diğ., 2012).

2.2.1.1 İndometasin

İndometasin (IND) ağrı kesici, ateş düşürücü inflamasyon önleyici özellikleri olan non-steroid antiinflamtuvar bir ilaçtır. Tam olarak kimyasak adı 1-(p-klorobenzoil)25-metoksi-2-metilindol-3-asetik asittir. Aynı sınıftaki diğer ilaçlar gibi indometasin de prostaglandinlerin üretiminin azalmasına neden olarak anti-inflamatuvar etkisini göstermektedir. Bu etkiyi araşidonik asitin prostaglandine dönüşümünü sağlayan siklooksijenazı inhibe ederek yapmaktadır. Şekil 2.1’de indometasinin yapısal formülü gösterilmiştir.



Şekil 2.1:İndometasin yapısal formülü.

İndometasin tedavisinde indometasinin vücuda alımı ağız yoluyla ve emilimi sindirim sistemi boyunca gerçekleşir. Bu emilimi beraberinde tüketilen yiyecekler etkileyebilmektedir. Bunun yanında emilimin yaşa bağlı olarak değişmediği bilinmektedir (Helleberg, 1981).

İndometasin kanda %90 oranında kandaki proteinlere bağlı olarak bulunur (Emori ve diğ., 1976). İndometasin kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Fakat kanda bulunan serbest indometasin oranı düşük olduğu için beyne geçen indometasin miktarı da düşüktür (Bannwarth ve diğ., 1990).

İndometasinin mide kanserinde apoptozu tetiklediği raporlanmıştır (Chiou ve diğ., 2014). Ayrıca renal kanser hücrelerinde apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (Ou, 2007). Gliomalar

üzerinde de indometasinin etkili olduğu belirtilmiştir (Pantovic ve diğ., 2017). Bunların yanında yemek borusu kanseri gibi farklı kanser türlerinde de etkisi gösterilmiştir (Qin ve diğ., 2015)

2.3 KANSER TEDAVİSİNDE NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLER

Son dönemlerdeki nanoteknoloji alanındaki gelişmeler nedeniyle nanopartiküllerin kanser tespitinde ve tedavisindeki etkisini araştırıldığı çalışmalar artmıştır (Baekte ve diğ., 2015). Kanser ve diğer hastalıkların teşhisinde kullanılan nanopartiküller ilgili hücrelerin tespitinde rol oynamaktadır. Fakat vücut içindeki emilim, dağılım ve atılım gibi farmakokinetik gereksinimler nedeniyle bu alanda hatırıli sayılır miktarda nanopartikül üretilmemiştir. Bu nedenle nanopartikül çalışmaları ilaçların ilgili tümör bölgesine daha hızlı ve rahat taşınmasının sağlamak ve diğer sağlıklı dokuda birikmesine engelleyerek yan etkileri azaltmak üzerine gelişmiştir (Kiessling ve diğ., 2014; Rizzo ve diğ., 2013).

Nanopartiküller hastalıkların ve tümörlü dokuların saptanmasında kontrast maddesi olarak kullanılmaktadır. Böylelikle farklı görüntüleme teknikleriyle hedeflenen dokunun görüntülenmesine ve tespit edilmesine katkı sağlarlar. Bu nanopartiküllere polimerler, lipozomlar, ultra-küçük süper paramanyetik demir oksit nanopartiküller ve altın nanopartiküller örnek verilebilir. Daha küçük boyuttaki maddelerin kullanımı ile kan havuzu ajanlarının kullanımına gerek kalmamakta ve bilgisayar tomografisi gibi görüntüleme teknolojileriyle kısa sürede ilgili görüntüler alınabilmektedir (Kiessling ve diğ., 2014).

Nanopartiküllerin teşhiste hızlı ve ilgili bölgeye bağlanarak kontrast artırma özelliği onu bu alanda daha cazip hale getirmektedir. Fakat nanopartikülün boyutu arttıkça kandaki yarı ömrü artmakta ve böylelikle elde edilen görüntüde kirliliğe neden olabilmektedir. Bunun temel sebeplerinden biri de 5 nm den büyük partiküllerin böbrekten dışarı atılarak vücuttan temizlenememesidir. Bu neden böbreklerin yardımıyla vücuttan temizlenecek kadar küçük boyutta olan partiküllerin kullanımının en uygunu olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında büyük boyutlu partiküller kandan dışarı çıkamayacak kadar büyük oldukları ve ömürleri kısa oldukları sürece kanda tespit edilmek istenen hedefler için daha uygundur. Nanopartiküllerin bu özelliklerinden ötürü görüntülenmek istenen hedefe en uygun strateji belirlenmelidir (Baekte ve diğ., 2015).

Nanopartiküllerin görüntülemeye yardımcı özellikleriyle tümörün damarlaşmasını tespit edebilmek mümkün olmuştur. Bu amaçla plansız çoğalan endotel hücreleri bu nanopartiküller

tarafında hedeflenmiş ve böylelikle kötü huylu hale gelen tümörlerin vücut içindeki yeri tespit edilebilmiştir (Palmowski ve diğ., 2008). Bu hedeflemelerde mikro kabarcıklar kullanılarak vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 2 saptanarak damarlaşmaya yönelen tümörler görüntülenebilmektedir (Pysz ve diğ., 2010).

Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküller taşıyıcı sistemler birçok farklı özellikte ve yeterlilikte olmak üzere günümüze kadar birçoğunun üretimi ve araştırılması yapılmıştır. Bu nanopartiküllerin teşhis için kullanılan nanopartiküllerden farklı özellikler taşıması gerekmektedir. Terapide kullanılan nanopartiküllerin ilaç taşıma kapasitesine sahip olması ve uzun süre dolaşım sisteminde bulunabilmesi gerekmektedir. Çünkü bunların temel amacı ilgili tümör veya hastalık bölgesinde olabildiğince uzun süre birikerek tümör veya hastalık üzerinde etki göstermektir. Bunlara örnek olarak FDA tarafından onaylı demir oksit nanopartiküllerin aneminin tedavisinde kullanılması gösterilebilir (Baetke ve diğ., 2015).

Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküllerin dikkate alınması gereken en önemli özellikleri partikülün boyutu, yükü, çekirdek, yüzey ve şekil özellikleridir. Bu özelliklerin yanında nanopartiküllerin canlı içinde gösterdiği toksisite, hedeflenen dokuya ulaşma kapasitesi, canlı içindeki dağılımı gibi unsurlar da önem göstermektedir. Bu özellikler ilaçların nanopartiküle yüklenmesi kapasitesi, nanopartikülden ilaç salınımı ve nanopartikülün dayanıklılığı açılarından önemlidir. Nanopartikülün boyutuna dair olarak yapılan araştırmalardan ilaç taşınımında kullanılması en uygun boyutun 10-100 nm aralığı olduğu kanaati oluşmuştur. Bu boyuttaki nanopartiküllerin doku içine nüfuzunun ve birikmesinin daha büyük boyuttaki nanopartiküllere göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu boyuttaki nanopartiküller dalaktaki temizlikten de kaçabildiği gösterilmiştir (Aslan ve diğ., 2013; Petros ve DeSimone, 2010). Uygulanan nanopartiküllerin boyut olarak çeşitlilik oluşturması bazı konularda problemler oluşturmaktadır. Tek boyutlu nanopartikül uygulamalarında daha uygun ilaç salınımı, hedeflenen dokuya ulaşabilme ve biyolojik yarı ömür gözlemlenmektedir (Grimm ve Scheinberg, 2011). Nanopartiküllerin bir diğer önemli özelliği ise yüzey alanlarının büyük olmasıdır. Böylelikle daha fazla ilacın bağlanması sağlayarak hedeflenen dokuda daha hızlı şekilde ilacın birikmesine olanak oluşturmaktadır. Nanopartikülün şekli ise nanopartikülün hangi dokuları daha iyi hedefleyebileceği açısından önemlidir. Örneğin polietilen glikol ile kaplı çubuk şeklindeki altın nanopartikülleri, polietilen glikol ile kaplı küre şeklindeki altın nanopartiküllerine göre tümör hücrelerini daha iyi hedefleyebilmektedir (Longmire ve diğ.,

2011). Artı yüklü nanopartiküllerin hücre içine fagositoz ile daha rahat girebildiği için hedeflenen doku dışında da birçok dokuya etki edebilmektedir. Bu nedenle nötr veya eksi yüklü olan nanopartiküller daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Baetke ve diğ., 2015).

2.3.1 Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler ve Kan-Beyin Bariyeri

Tek katmanlı endotel hücrelerinin perisit ve astrosit hücreleriyle desteklenmesiyle oluşan kan-beyin bariyeri 400 dalton büyüklüğün üzerindeki maddelerin beyine geçişini engellemektedir. Bunun yanında beyine giden oksijenin ve beyinden uzaklaştırılan karbondioksitin düzenlenmesi de bu hücreler sayesinde gerçekleşir. Bu endotel hücrelerin hücreler arasındaki boşluğu iyi kapatması nedeniyle beyne geçmesi gereken maddeler genellikle hücrenin içinden geçmeye zorlanmaktadır. Lipofilik maddeler pasif olarak bu hücreleri geçebilirken hidrofilik olan maddelerin geçmesi için bazı taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır (Pardridge, 2012; Abbot ve diğ., 2006). Kan beyin bariyerinin bu özellikleri kanser tedavisinde kullanılan ilaçların beyine geçişini engellemektedir. Bu nedenle genellikle lipofilik olan ilaçlar kan-beyin bariyerini geçip beyindeki kanser dokusuna ulaşabilmektedir.

Beyin tümörü kan-beyin bariyerine kadar yayılınca bu sağlam yapıyı bozmaya başlar. Böylelikle beyinde kan-tümör bariyeri oluşur. Bu bariyer kan-beyin bariyeri gibi birbirine sıkı sıkı kenetlenmiş hücrelerden çok, aralarındaki bağların daha gevşek olduğu hücrelerden oluşur. Bunun nedeniyle kandaki maddelerin beyin içine sızması kan-tümör bariyerinde daha kolaydır. Kandaki atık maddelerin ve suyun beyin içine kontrolsüzce sızması sonucunda beyin iç basıncı artabilmektedir. Bu kolay sızılabilen bariyerden dolayı, bazı ilaçların etki göstermeye başlaması veya etkisini artırması mümkündür. Bunun yanında bazı bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör dokusunda kan-tümör bariyerinin daha fazla geçirgen olması nedeniyle tümöre ulaşımının kolaylaştığı bilinmektedir (Arvanitis ve diğ., 2020; Ningaraj ve diğ., 2002).

Kan-beyin bariyerini aşıp beyindeki tümör dokusuna müdahale etmek için kullanılan yöntemlerden biri nanopartiküler taşıyıcı sistemler ile ilaçların taşınmasıdır. Nanopartiküller kan-beyin bariyerini geçerek ilacın ilgili bölgeye daha verimli bir şekilde ulaşmasının ve ilacın normalde sağlıklı dokuya verdiği zararın azalmasını sağlamaktadır (Rahman ve diğ., 2012). Bu alanda kullanılan nanopartiküller çeşitli yapılarda olabilmektedir. İnorganik nanopartiküller altın ve gümüş içermektedir. Organik nanopartiküller ise lipozom, misel veya polimer yapılarında olabilir.

Lipid yapılı nanopartiküller iki veya daha fazla katmana sahiptir. Ayrıca hidrofobik veya hidrofilik yapıdaki ilaçları taşıyabilme kapasiteleri vardır (Bhujbal ve diğ., 2014). Kan beyin bariyerini geçmek için lipozomun üzerinde kan-beyin bariyerindeki endotel hücreleri hedefleyebilecek makro moleküller, polimerler, peptitler ve antikorlar ile modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu maddelerin endotel hücrelerin yüzündeki reseptörleri tanımasıyla lipozomun içerdiği ilacın hücre içine nüfuzu gerçekleşir. Bu nüfuzun miktarının artırılması için ısı, pH veya ultrason gibi parametreler değiştirilebilir.

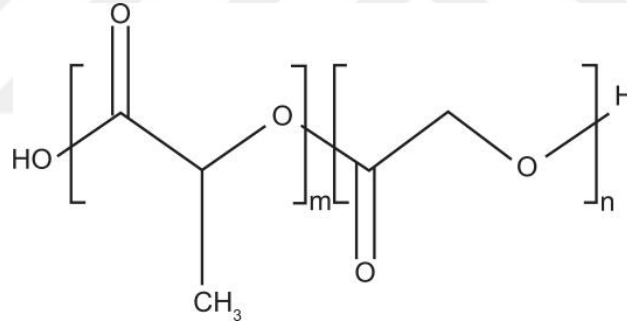
Metal yapılı nanopartiküller altın, gümüş, demir veya bakır temelli olabilmektedir. Farklı metal yapılı nanopartiküllerde yapılan çalışmalar çinko oksit yapılı nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini geçebildiğini ve küresel ve disk benzeri yapıya sahip gümüş nanopartiküllerinin geçişinin daha kolay olduğunu göstermiştir (Guo ve diğ., 2021). Altın yapılı nanopartiküllerin yüzeyinin modifiye edilerek bazı tümör belirteçlerinin hedeflenmesi mümkündür. Suda çözünmeyen ilaçların taşınmasının yanında DNA moleküllerini de taşıyabilmektedir. Bu nedenle gen terapisi için uygun bir taşıyıcı sistem olduğu düşünülmektedir (Upton ve diğ., 2022). Demir oksit nanopartiküllerini diğer nanopartiküllerden ayıran bazı özellikler bulunmaktadır. Hem ligand bazlı bağlanma hem de manyetik alan uygulamasıyla nanopartiküllerin belirli bir bölgeye yönlendirilebilmesi nedeniyle önemli bir nanopartiküler taşıyıcı sistem olarak görülmektedir (Bredlau ve diğ., 2017).

Polimer temelli nanopartiküller farklı monomerlerin polimerleşmesiyle oluşabilir. Bu nanopartiküllerin içine istenilen ilaçların doldurularak ilgili dokuya taşınması mümkündür. Nanopartikülün boyutu, şekli ve yükü kan-beyin bariyerini hedeflemek için ayarlanabilmektedir. Poli(laktik-ko-glikolik asit) gibi nanopartiküller kan-beyin bariyerini geçebilen sentetik nanopartiküllere örnek verilebilir. Son zamanlarda bu nanopartiküller arasında yapılan araştırmalar ilacın nanopartiküle daha verimli olarak yüklenmesi, ilgili dokunun hedeflenmesi ve ilaç salınımı ile ilgilidir. Bu alanlarda yapılan araştırmalar bu tür nanopartiküllerin hidrofobiklik, toksisite, yüksek maliyet ve saflık gibi karşılaştığı sorunları çözmeyi hedeflemektedir (Zhang ve diğ., 2021).

2.3.2 Poli(laktik-ko-glikolik asit)(PLGA)

Poli(laktik-ko-glikolik asit), laktik asitten ve glikolik asitten oluşmaktadır. Poli(laktik-ko-glikolik asit) bu kimyasalların siklik dimerlerinin rastgele halka açılımının kopolimerleşmesi

reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Bu reaksiyonu kalay (II) 2-etilheksanoat, kalay (II) alkoksitler veya alüminyum izopropoksit bileşikleri katalizleyebilir. Bu polimerleşme reaksiyonu sırasında bu iki bileşik birbirlerine ester bağı ile bağlanırlar. Böylece amorf alifatik polyester yapıda nanopartiküller oluşur. PLGA'nın farklı formları bulunmaktadır. Bu formlar nanopartikülün içerdiği laktik asit ve glikolik asidin birbirlerine göre oranlarıyla ilişkili olarak isimlendirilir. Örneğin PLGA 50:50 ile ifade edilen bir PLGA formu yarı yarıya laktik asit ve glikolik asit içermektedir. PLGA'nın vücutta bozunması sonucunda ortaya laktik asit ve glikolik asit çıkmaktadır. Bu ürünlerin hücre içerisinde krebs döngüsüne girerek tüketilmesi nedeniyle bu nanopartikülün normal vücut hücreleri üzerindeki etkisi minimum düzeydedir. Bu nanopartikül FDA ve Avrupa İlaç Kurumu (EMA) tarafından ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabilmesi konusunda onaylanmıştır. Nanopartikülün vücut içinde bozunma süresi içerdiği laktik asit ve glikolik asit oranına bağlıdır. Laktik asit daha hidrofobik olduğu için laktik asit oranı daha yüksek olan PLGA formlarının vücut içerisinde bozunması daha uzun zaman almaktadır. Böylelikle bu nanopartiküllerin ilaç sakınımı daha kontrollü ve uzun süreli olabilmektedir.



Şekil 2.2:PLGA yapısal formülü.

PLGA nanopartikülleri hücre içersine pinositoz veya klattrin destekli endositoz yöntemleriyle girebilirler. Giriş yaptıktan kısa bir süre sonra endo-lizozomdan kaçarak sitoplazmaya geçerler.

Nanopartiküllerin yüzey yüklerinin katyonik yük olması nanopartiküle hücreye girişte kolaylık sağlamaktadır. PLGA'nın yüzeyi eksi yüklüdür. Ama polietilen glikol (PEG) gibi moleküllerle yüzeyin kaplanıp yüzeysel yükün nötr veya artı yüklü olması sağlanabilmektedir.

Nanopartiküler taşıyıcı sistemler hazırlanırken ilacı nanopartikülün merkezine yerleştirilebilir veya yüzeyine bağlanabilir. Dispersiyon polimerizasyonu nanopartikül oluştururken kullanılan yaygın tekniklerden biridir. Bu teknik farklı metotlarla uygulanabilir. Bu metotlar temelde iki aşamadan oluşur. Bunlardan ilki ve metotlar arasında ortak olarak uygulanan bir emülsiyon

sistemi oluşturmaktır. Bunu takip eden aşama ise metotlar arasında farklılık göstererek ilgili metoda adını vermektedir (Dinarvand ve diğ., 2011).

Tek veya çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi özellikle suda çözünen ilaçların nanopartiküle bağlanması için kullanılan bir yöntemdir. Bu bağlanma efektif olarak çift emülsiyon (su-yag-su) yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. PLGA'ya insülin yerleştirmek için ise katı-yag-su çift emülsiyonu kullanılmaktadır (Lü ve diğ., 2009).

Emülsifikasyon çözücü difüzyonu metodunda ise organik çözücü-su emülsiyonu kullanılmaktadır. Böylelikle bu metotta %70 oranında kapsülleme verimine ulaşılabilmektedir (Sadat Tabatabaei Mirakabad ve diğ., 2014).

Emülsifikasyon tersine tuzla çöktürme yönteminde polimer ve ilaç solüsyonu aseton ve tuzla çöktürme ajanıyla beraber mekanik olarak karıştırılarak su ile seyreltilir. Bunun sonucunda ortaya çıkan nanopartikülün ısı uygulanmadan elde edildiği için ısıya duyarlı ilaçların nanopartiküle bağlanması konusunda avantajlı bir sistemdir (Jung ve diğ., 2000).

Nano çökeltme metodu ise tek adımda gerçekleşen genellikle hidrofobik materyallerin nanopartiküle eklenmesinde kullanılan bir metottur (Dinarvand ve diğ., 2011).

2.3.3 PLGA ile Taşınan İlaçların Kansere Üzerindeki Etkisi

Kanser tedavisinde günümüze kadar çeşitli metotlar uygulanmıştır. Bu amaçla ameliyat ile ilgili dokunun alınması, kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi gibi yöntemler uygulanmaktadır. Kemoterapi ilaçlarının kötü yönü bu ilaçların tümör dokusuna spesifik olmayıp diğer doku ve organları da etkilemesidir (Teicher, 2000). Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasında nanopartiküllerin ilgili dokuyu hedefleyebilmesi veya ilacın doku içerisine geçişini kolaylaştırdıklarından sağlıklı dokuya gelecek hasarın daha az olması gibi özellikleri önemli rol oynamaktadır (Mahapatro ve Singh, 2011).

PLGA nanopartikülleri birçok kanser ilacının taşınmasında kullanılan in vivo etkileri umut vaat eden bir ilaç taşıma sistemidir (Kumari ve diğ., 2010). Bu nanopartiküller suda az çözünen ve kararlı olmayan ilaçları biyolojik ortamdan koruyarak onların kanser tedavisin deki etkilerini artırmaktadırlar. Ayrıca kendi yüzeyleri de farklı maddelerle kaplanarak tümöre özgü hale gelebilirler.

Paklitaksel mikrotübüllerin ayrışmasını onlara bağlanarak engelleyen bir ilaçtır. Böylelikle mikrotübüllerin dinamik yapısını sekteye uğratarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Bu ilaç birincil yumurtalık kanseri, meme kanseri ve kolon kanserinde etkilidir. Bu ilacın dezavantajı ise sudaki çözünürlüğünün az olmasıdır. Bu noktada PLGA ile bu ilacın taşınması göz önüne alınmış ve paklitasel içeren PLGA taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Mu ve Feng, 2003).

Vinkristin sülfat kansere karşı etkili olmasına rağmen bazı kanser türlerindeki P-glikoprotein bu ilacın tümör hücrelerine girerek etki göstermesini engellemektedir. PLGA ile taşınan vinkristin sülfat ise tümör hücresine girerek burada etki gösterebilmektedir (Song ve diğ., 2009).

Sisplatin DNAYı birbirine farklı şekillerde bağlayarak mitotik hücre bölünmesini engelleyen bir ilaçtır. Bu ilaç sadece kanser hücrelerinde değil diğer hücrelerde de benzer etkiye neden olduğu için toksisitesi çok yüksektir. PEG ile kaplı PLGA nanopartikülüne yüklü sisplatin kanser hücrelerini daha rahat hedefleyebilmekte ve yan etkileri azalmaktadır (Dinarvand ve diğ., 2011).

Etoposid topoizomerez II'yi inhibe eder. Ayrıca hücre içindeki redoks reaksiyonlarının aktivasyonlarını sağlayarak DNAYA hasar veren bazı ürünlerin ortaya çıkmasına yardımcı olur. Böylelikle hücrenin ölümüne yol açar. Bu ilacın kanser üzerindeki etkisinin az olmasının nedeni ise ilacın biyolojik yarı ömrünün kısa olması ve kanser hücrelerinin bu ilaca uzun süre maruz kalamamasıdır. PLGA içine yerleştirilen formu ise çok daha uzun süre etki edebilmektedir (Acharya ve Sahoo, 2011).

9-Nitrokamptotesin topoizomerez I enzimi üzerinde etkili bir antikanser ilacıdır. Bu ilacın problemi ise pH'ya bağlı olarak çok hızlı şekilde hidroliz olarak etkisiz formlarına dönüşmesidir. PLGA ile taşındığında ise kendi aktif formunu koruyabilmektedir (Derakhshandeh ve diğ., 2007).

Bir antrasiklin antibiyotik olan doksorubisin birçok kanser türüne karşı son derece etkilidir. Fakat kardiyotoksisiteye veya kan zehirlenmesine neden olabildiğinden kullanımı kısıtlıdır. Fakat PLGA ile taşındığında bu yan etki azalmakta ve daha verimli şekilde etki edebilmektedir (Park ve diğ., 2009).

Kurkumin eski çağlardan beri farklı uygarlıklarda tıp alanında kullanılmaktadır. Bu ilacın en büyük sorunun suda çözünürlüğünün çok az olmasıdır. PLGA ile taşındığında tümöre ulaşması ve tümöre etki eden kurkumin miktarı artmaktadır (Shaikh ve diğ., 2009).

Rapamisin klinik öncesi çalışmalarda göğüs kanserine karşı ümit vaat eden sonuçlar göstermiştir. Ama klinik çalışmalarda suda az çözünmesi, sadece tümörleri hedefleyememesi ve doza bağlı toksisite gibi konular nedeniyle klinik öncesi çalışmalarda gösterdiği etkiyi gösterememiştir. Bu nedenle PLGA gibi nanopartiküler sistemlerle taşınan rapamisin daha fazla etkili olmuş ve yan etkilerinde azalmaya rastlanmıştır.

2.3.4 PLGA-İndometasin

İndometasinin suda az çözünmesi ve %90 oranında kandaki proteinlere bağlı olması nedeniyle nanopartiküler taşıyıcı sistemlerle taşınmasının tedavi için gereken indometasin miktarını azaltacağı ve hücre içine geçişi artıracığı bilinmektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda nanopartiküler taşıyıcı sistemlerle taşınan indometasinin beyindeki tümörler için ümit verici bir tedavi şekli olabileceği gösterilmiştir (Bernardi ve diğ., 2009).

PLGA içeren farklı bir nanopartikülün olan poli-l-laktik asit/polilaktik-ko-glikolit (PLLA-PLGA) nanopartikülün üzerine indometasin emdirilmesiyle oluşan ilaçlı nanopartikül taşıyıcı sistemin akciğer kanseri hücre hattında etkili olabileceği gösterilmiştir (Kang ve diğ., 2008).

Kanser dışında indometasin yüklü PLGA nanopartiküler taşıyıcı sistemin deriden geçişini ve hücrelere nüfuzunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Takeuchi ve diğ., 2017).

Farklı çalışma ve araştırma sahalarında uygulanan PLGA-indometasin nanopartiküler taşıyıcı sistemi birçok çalışma ve tedavi için umut vaat etmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN OLUŞTURULMASI

PLGA ve indometasin yüklü PLGA'nın sentezi için manyetik karıştırıcı üzerinde 25 mg PLGA (poli(laktik-ko glikolik asit) 50:50 (PolyScience) içeren 1 mL dimetil sülfoksit(DMSO) ve 6 mg indometasin oda sıcaklığında 1 saat boyunca 200 rpm de karıştırıldı. Böylelikle ortaya çıkan organik faz, PVA (Sigma-Aldrich) oranı %1 olan sulu çözeltiye dakikada 5 mL akış hızıyla eklenerek bir süspansiyon elde edildi. Bu süspansiyonun 6 dakika boyunca %30 şiddetinde sonikasyona maruz bırakılarak enkapsülasyon işlemi tamamlandı. Üretimi tamamlanan indometasin yüklü nanopartikülleri elde etmek için 14000 rpm de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen ürünün saflığını artırmak için 3 defa daha suda dağıtarak 14000 rpm de santrifüj edildi. Ürün dondurularak kurutuldu ve +4°C'de saklamaya bırakıldı. İndometasin içermeyen PLGA nanopartikülleri için ise işlem indometasinsiz olarak gerçekleştirildi.

Nanopartiküllerin çeşitli özellikleri farklı cihazlar tarafından tespit edildi. Fiziksel özelliklerinin tayini için DLS (Dinamik Işık Saçılımı, Malvern Nano ZS90), kimyasal özellikleri için FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, Agilent Cary 630), indometasin miktar ve salınım özellikleri için UV-VIS (Ultraviyole Görünür Spektroskopisi, PG Instrument) kullanıldı.

3.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ

U-87 MG hücre hattı İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında alınıp İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi laboratuvarlarında alt kültürlenmesi gerçekleştirildi. Hücrelerin alt kültürlenmesinde DMEM/High Glucose (Thermo Fisher Gibco 11965092) medyası kullanıldı. Kullanılan bu medyaya %10 oranında fetal sıgır serumu (FBS; fetal bovine serum) ve %1 oranında antibiyotik (streptomisin (100U/mL)-penisilin (100 µg/mL)-amfoterisin B (0,25µg/mL)) eklendi. Alt kültürlenme sırasında T75 hücre kültürü flasklarına (NEST T75 708001) yüzeyin yaklaşık %30'unu kaplayacak kadar bir önceki kültürden eklendi ve 13 mililitre(mL) hazırlanan medyadan eklenerek %95 nemlilik, %5 karbondioksit (CO₂) içeren 37°C sıcaklık sağlayan inkübatörde (NUVE) T75 hücre kültürü flaskının yüzeyinin %90-%100 oranında kaplayana kadar inkübe edildi.

Hücrelerin pasajlanması veya deneyler için farklı hücre kültürü kaplarına alınması sırasında öncelikle T75 hücre kültürü kabındaki medya uzaklaştırıldı. Daha sonra 5 mL tuzlu fosfat tamponu (PBS; Phosphate Buffered Saline) ile hücreler yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Hücre kabına 4mL %0,2'lik Tripsin ve %0.04'lük EDTA karışımı eklenerek hücrelerin yüzeyle bağlantısı kesilinceye kadar (yaklaşık 2 dakika) inkübatörün içerisine konuldu. Inkübatörden çıkarılan hücrelerin üzerine 4mL medya eklenerek tripsin karışımının hücreler üzerindeki etkisi dolaylı olarak engellendi. Solüsyon 15mL'lik falkon tüplere aktarıldı ve 1300rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hücrelerin pellet oluşturması sağlandı. Daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 1 mL medyada çözdürüldü. T75 hücre kabının %30 yüzeyini dolduracak kadar hücre yeni T75 hücre kabına aktarılarak inkübatöre kaldırıldı.

3.3 HEMOSİTOMETRİK HÜCRE SAYIMI

Bölüm 3.2'deki hücre pelleti 1 mL medyada çözdürüldükten sonra 5 µL solüsyon 5 µL tripan mavisini ile karıştırıldıktan sonra tripan mavisinin ölü hücreler içerisine girmesi beklendi (yaklaşık 1 dakika). Daha sonra 10µL'lik solüsyon Neubauer lamı üzerine konulup mikroskop altında ilgili bölgelerdeki canlı hücreler sayıldı. 1mL'deki canlı hücreler $N \times 10^4$ formülüyle hesaplandı. (N= ilgili alanda sayılan canlı hücre sayısı)

3.4 SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

İndometasin yüklü PLGA ve indometasinin U-87 MG insan hücre hattındaki toksik etkisi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)] yöntemi kullanılarak belirtildi. Bu yöntem için 96 kuyulu hücre kaplarına her bir kuyuya 10^4 hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin yüzeye tutunması ve morfoloji oluşturması için bir gün beklendi. Daha sonra 200 µM, 100µM, 50µM, 25µM, 10µM konsantrasyonlarında indometasin içeren indometasin yüklü PLGA solüsyonu ve 200µM, 100µM, 50µM, 25µM, 10µM dozlarında indometasin solüsyonu 4 saat boyunca uygulandı. Bu süre sonunda mevcut medya taze medya ile değiştirilip inkübatöre konuldu ve belirli aralıklarla ölçüm alındı. Her doz 4 tekrar olacak şekilde uygulandı. Bunun yanında saf indometasin için 4 saat sonra medya değiştirerek ve herhangi bir şekilde medya değiştirilmeden 1µM ve 2000µM arasında değişen dozlarla 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonuçları alındı. Ölçüm için medya ortamdan uzaklaştırıldı ve her kuyuya 30 µL MTT solüsyonu (PBS içerisinde 5 mg/mL) ilave edildi. 3 saat boyunca hücrelerin formazan kristalleri üretmesi

beklenildi. 3 saat sonunda 150 μ L DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı ve 590 nm dalga boyunda spektrometrede ölçüm alındı.

3.4.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

Bölüm 3.4'teki sonuçlar değerlendirildikten sonra 200 μ M indometasin içeren plga-indometasin (795 μ g/mL plga-indometasin solüsyonu), 100 μ M indometasin içeren plga-indometasin (397,5 μ g/mL plga-indometasin solüsyonu), 200 μ M indometasin ve 100 μ M indometasin içeren dozlar belirlendi. Kontrol için ise normal medya kullanıldı. Bu dozların Bölüm 3.2'de belirtilen şekilde hücre pelleti oluşturduktan ve Bölüm 3.3'te belirtildiği şekilde sayım işlemin yapıldıktan sonra ilgili miktarlarda hücre kaplarına ekilen U-87 MG insan hücre hattı hücreleri 4 saat boyunca ilgili doza maruz bırakıldıktan sonra taze medya uyguladı ve toplamda 48 saatin sonunda hücreler toplanarak gerekli incelemeler yapıldı.

3.5 HÜCRELERİN DONDURULMASI

Hücrelerin herhangi bir olumsuzluğa karşı stoklanıp yeniden kullanılabilmesi için hücreler -80°C'de donduruldu. Bu işlem için Bölüm 3.1.'de bahsedildiği gibi hücre pelleti oluşturuldu ve süpernatant uzaklaştırıldı. 900 μ L medya ve 100 μ L DMSO eklenerek pipetaj yapıldı ve dondurma tüpüne alındı. Daha sonra içerisinde 2-propanol bulunana ve hücrelerin dakika 1°C soğumasının sağlaya kabın içerisine alındı ve içerisine konarak -80 dolabına (Nuve™ DF490) alındı. 4 saat sonra bu kaptan alınan hücreler -80°C dolabın içerisinde uygun bir bölüme kaldırıldı.

3.6 RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu için 'Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit 12183018A' kiti kullanıldı ve kit ile gelen protokol takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonucunda elde edilen RNA'nın konsantrasyonu 'Shimadzu™ BioSpec-Nano' nanodrop cihazı kullanılarak tespit edildi. RNA'nın miktarını saf bir şekilde belirlemek için RNA'nın içinde bulunduğu nükleaz içermeyen su makineye tanıtıldı. Daha sonra elde edilen RNA solüsyonu makineye tanıtılarak RNA'nın konsantrasyonu öğrenildi. RNA'nın saflığını anlamak için 260nm/280nm ve 260nm/230nm oranları kontrol edildi.

3.7 CDNA OLUŞTURULMASI

Bölüm 3.5.'de elde edilen RNA kullanılarak cDNA oluşturuldu. Bunun için 'Nepenthe™ cDNA Synthesis Kit NP041011610' kiti kullanıldı ve kitte belirtilen bileşenler ve program takip edildi. Gerekli bileşenlerin miktarı ve program sırasıyla Tablo 3.1. ve Tablo 3.2. de belirtilmiştir. Reaksiyon 'SimpliAmp™ Thermal Cycler A24811' kullanılarak gerçekleştirildi

Tablo 3.1: cDNA reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşenler	Hacim/Miktar
Kalıp RNA	2 µg
Tampon Karışımı(2X)	10µL
Enzim Karışımı	2µL
dH ₂ O	Toplam 20 µL olana kadar tamamlandı.

Tablo 3.2: cDNA reaksiyon koşulları.

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dakika
47°C	60 dakika
85°C	10 dakika
4°C	Sonsuz

3.8 GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZİ

Bölüm 3.6.'da elde edilen cDNA kullanılarak apoptoz ile ilişkili BAX, BCL2 ve CASP3 genlerinin ifadesini tespit edebilmek için Sybr Green (Nepenthe™ 2X SYBR Green Real Time PCR Master Mix NP041010210) ve ilgili primerler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonun bileşenleri ve reaksiyonun koşulları Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.'te sırasıyla gösterilmiştir. Reaksiyon 'CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System' kullanılarak gerçekleşti

Tablo 3.3: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu bileşenleri.

Bileşenler	Hacim/Miktar
2X Master Karışım	10 µL
Birinci Primer	0.5µL
İkinci Primer	0.5µL
Kalıp DNA	100 ng
dH ₂ O	20 µL oluncaya kadar tamamlandı.

Tablo 3.4: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu koşulları.

Sıcaklık	Zaman
94°C	1 dakika
95°C	15 saniye
58°C (35 tekrar)	30 saniye
72°C	60 saniye
72°C	5 dakika

3.9 PROTEİN İZOLASYONU

48 saatin sonunda toplanan hücreler protein izolasyonuna kadar -80°C'lik dolapta saklandı. Protein izolasyonu için ise 4°C'lik Radyoimmünopresipitasyon deney tamponu (RIPA) toplanan hücrelerin miktarına göre 100 ile 150 µL arasında hücrelerin üzerine eklendi. Hücrenin tamamen parçalanıp proteinlerin ortaya çıkması için öncelikle hücreler 1 mL olan enjektörlerden geçirildi. Sonrasında ise ultrasonik su banyosuna ve buza konuldu. Daha sonrasında ise 4°C de 20 dakika ve 20000 rpm de santrifüj edildi. Supernatant farklı bir tüpe transfer edilerek bir sonraki işleme kadar -80°C'lik dolapta saklandı. Protein konsantrasyonu SMART™ BCA Protein Assay Kit'i (iNtRON Biotechnology) kullanılarak ve üretici tarafından sağlanan protokole bağlı kalınarak tespit edildi.

3.10 SDS-PAGE ELEKTROFORETİK ANALİZİ

Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)-poliakrilamid jel elektroforezi(PAGE) denatüre olmuş proteinlerin iki aşamalı bir jel üzerinde elektrik akımı etkisiyle yürümesini ifade etmektedir.

Ayrılma jeli tablodaki içerikle hazırlanıp mini jel elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) içerisindeki camları arasına %80 düzeyine kadar doldurarak eklendi. Polimerizasyon sırasında havadaki bağlantıyı kesmek için 2-propanol ile geri kalan kısmı dolduruldu. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra 2-propanol uzaklaştırıldı ve geri kalan kısma yükleme jeli dökülerek taraklar yerleştirildi. Jel katı hale geldikten sonra sistemin gösterdiği miktarda tampon çözeltisi sisteme eklendi ve taraklar çıkarıldı. 30 µg örnek proteini yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika boyunca kaynatıldı. İlk kuyuya Protein marker karışımı (Pierce® Blue Prestained Protein MW Marker Mix, Thermo Scientific 266121) eklendi. Diğer kuyulara kaynatılan örnekler eklendi ve 200 voltajda elektroforez gerçekleştirildi.

Tablo 3.5: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.

Çözeltiler	Bileşenler
Ayrılma Jeli (%10 Akrilamid)	Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8) 1 mL dH ₂ O 2.262 mL %30 Stok Akrilamid Solüsyonu 1.662 mL %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) 50 µL %10 Amonyum persülfat (APS) 25 µL TEMED 1.75 µL
Yükleme Jeli (%5 Akrilamid)	Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8) 250 µL dH ₂ O 1.875 mL %30 Stok Akrilamid Solüsyonu 337.5 µL %10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) 25 µL %10 Amonyum persülfat (APS) 12.5 µL TEMED 3.5 µL
Yürütme Tamponu (pH 8.3)	Trizma Baz (25 mM) 3.03 g Glisin (192 mM ,AppliChem A1067) 14.4 g SDS (%0.1) 1 g dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
Örnek Yükleme Tamponu	0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8) 5 mL SDS 1 g Gliserol (Sigma-Aldrich G5516) 10 mL β-Merkaptoetanol (AppliChem A1108) 0.25 mL Bromo-fenol mavisi (%0.5 (w/v) stok, Merck 108122) 5 mL dH ₂ O ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3.11 WESTERN BLOTLAMA

SDS-PAGE ile jel üzerinden birbirinde ayrılan proteinler elektroblot metodu ile [Wet/ Tank Blotting System (Bio-Rad)] polivinilidinden diflorür (PVDF) membranına aktarıldı. Bu aktarım için öncelikle jel boyutunda PVDF ve filtre kağıtları kesildi. Kesilen PVDF 30 saniye için metanol içerisinde bekletildi. Daha sonra 2 kat filtre kağıdı aralarında jel ve PVDF olmak şartıyla transfer tamponuna 20 dakika yerleştirilerek sistemin nemlenmesi sağlandı. Sandviç sistemine yerleştirilip tank içerisine tampon çözelti ile konulan bu katmanlar 90 dakika boyunca uygun voltaja maruz bırakıldı. Transfer sonrasında membran antikorların rastgele yapışmasını engellemek için yıkama tamponu olan TBST içerisinde hazırlanmış %5 oranında yağsız süt tozu (Fluka 70166) içerisinde bekletildi. Daha sonrasında aynı süt solüsyonu içerisinde primer antikor eklenerek membrane bu solüsyon içerisinde 1 gece +4°C’de bekletildi. Membranın yıkanması için 4 defa 15 dakika süreyle TBST ile çalkalandı. Daha sonra sekonder antikorlar ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilen membran TBST ile tekrardan 4 defa ve 15 dakika süreyle yıkandı. ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham RPN2133) tarafından sağlanan A ve B solüsyonlarıyla protokole uygun olarak muamele edilen membran iki şeffaf asetat kağıdı arasına yerleştirilerek membran görüntüleme cihazı (ChemiDoc MP, Bio-Rad) içinde görüntülendi. Aynı membrandan tekrardan görüntü alabilmek için “stripping” işlemi ile antikorlar membrandan uzaklaştırıldı. Böylece diğer antikorlar için yeniden blotlama imkanı oluştu. Ortaya çıkan sonuçlar ImageLab 5.2.1 programı ile analiz edildi.

Tablo 3.6: İmmünolojik analizler için hazırlanan çözeltiler.

Solüsyonlar	İçerikleri
Stripping Tamponu	%10’luk SDS çözeltisi 20 mL 0.6 M Tris-HCl (pH:6.8) tamponu 10 mL β -merkaptoetanol 0.8 mL ve Ultra saf su 70 mL
Yıkama Tamponu	Trizma-Baz (20 mM, pH: 7.5) 2.42 g NaCl (150 mM) (Merck 106400) 8.77 g Tween-20 (%0.1) 1 mL ve dH ₂ O ile 1L’ye tamamlandı.
%5’lik Yağsız Süt Solüsyonu	Yağsız süt tozu (Sigma 70166) 5 g Son hacim 1X yıkama solüsyonu ile 100 mL’ye tamamlandı.
Transfer Tamponu	Trizma-Baz (25mM, Sigma T1503) 3.03 g Glisin (192 mM, AppliChem A1067) 14.4 g Metanol 200 mL dH ₂ O ile 1L’ye tamamlandı

Tablo 3.7: Kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Antikor	Sağlayıcı Firma	Kod	Konak Hayvan	Dilüsyon
Anti-Caspase-3 pro ve kesilmiş form	Proteintech	19677-1-AP	Tavşan	1:1000
Anti-Bax	Proteintech	50599-2-Ig	Tavşan	1:1000
Anti-Bcl-2	Proteintech	12789-1-AP	Tavşan	1:1000
Anti- β -aktin	Novus	NB600-501	Fare	1:5000
Anti-Tavşan IgG	Boster	BA1050	Keçi	1:5000
Anti-Fare IgG	Boster	BA1050	Keçi	1:5000

3.12 PLGA'NIN HÜCRE İÇİNE GİRİŞİNİN SAPTANMASI

PLGA nanopartikülleri floresan Rhodamine B (Rod B) ile işaretlenmiş ve bu nanopartiküllerin hücre içerisine girdiği görüldü. PLGA'nın Rod B ile işaretlenmesi için 5000 ppm içeren Rod B solüsyonu ile 24 saat inkübe edildi. Sonrasında solüsyon 3 defa metil hidroksit ile yıkandıktan sonra 9000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Distile suda bulunan çökelti dondurarak kurutma yöntemiyle sudan arındırılarak vakum kurutucularında sakalandı.

PLGA'nın hücre içine girişini gözlemlemek için 5×10^3 hücre 96 kuyulu hücre kaplarına ekilerek yüzeye tutunması ve morfoloji oluşturması için 1 gün inkübe edildi. Rod B işaretli PLGA nanopartikülleri distile suda konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde çözdürüldü. Hücreler üzerinde kullanımdan önce medya ile 250 μ g/mL konsantrasyonuna seyreltilti. Daha sonra hücreler 37°C'de 1 saat süreyle işaretli PLGA solüsyonuna maruz bırakıldı. 1 saat sonunda hücreler PBS ile yıkandı ve hücre çekirdeğini boyayan Hoechst 33 342 boyası ile boyandı. Fazla boyadan kurtulmak için PBS ile yıkanan hücreler floresan mikroskop (Olympus IX71, Olympus DP72 camera) altında görüntülendi.

3.13 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

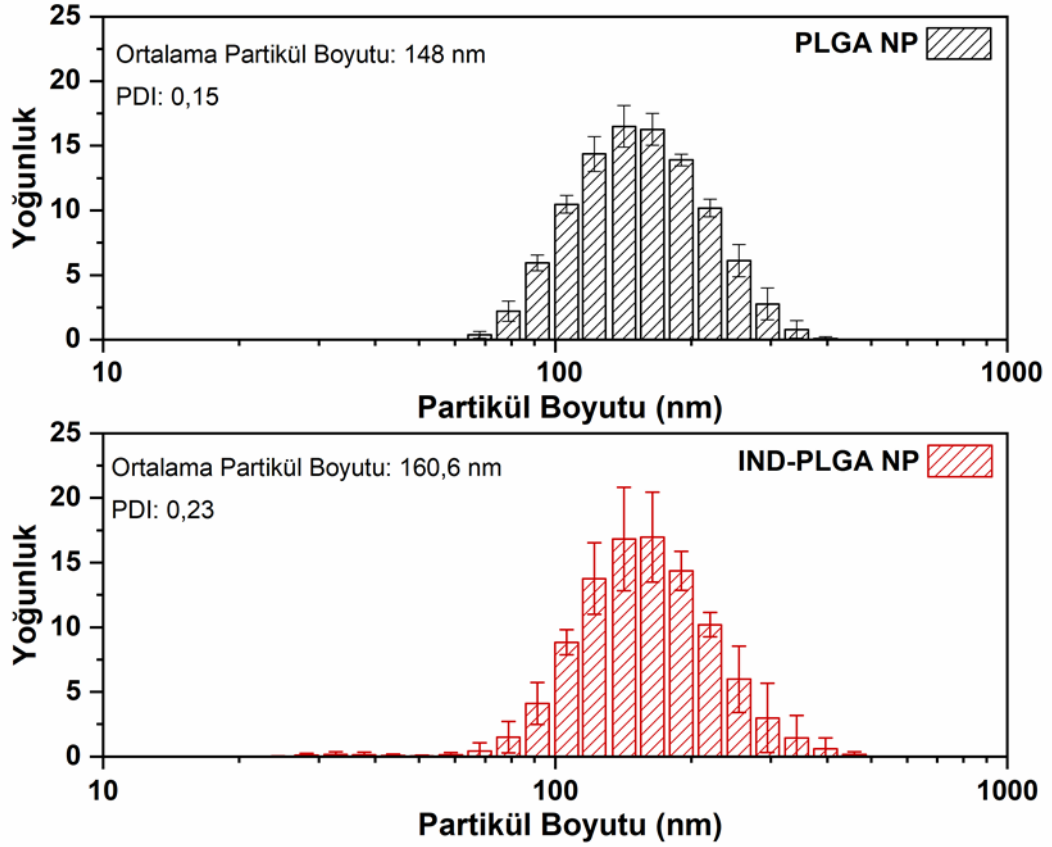
RT-PCR ve western blotlama tekniklerinden elde edilen veriler RNA ve protein verileri kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. GraphPad Prism v9.5 yazılımı kullanılarak deney sonuçlarının kontrole göre anlamlı sonuç oluşturma durumu t testi kullanılarak saptandı. $p < 0,1$ anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

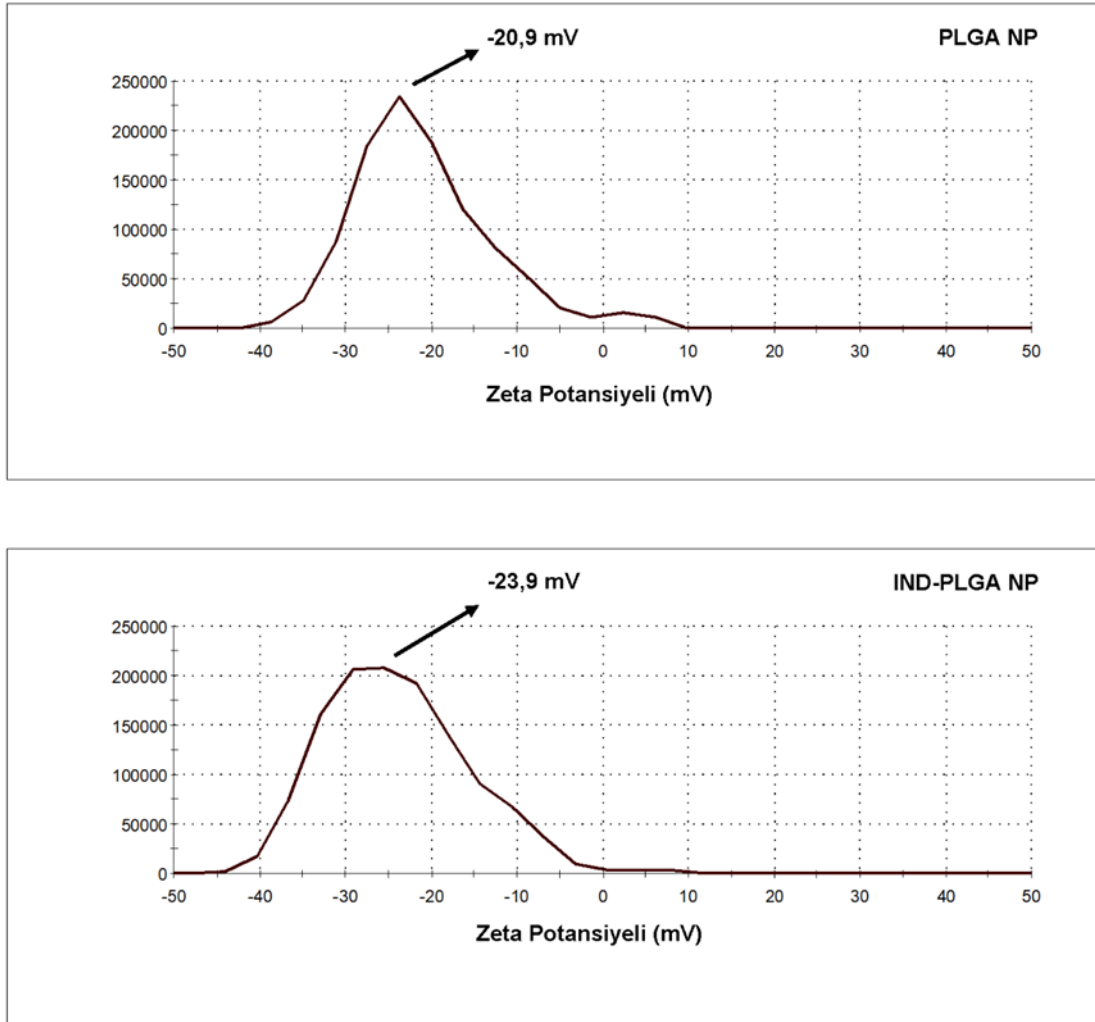
4.1 PARTİKÜL BOYUTU VE ZETA POTANSİYELİ ANALİZLERİ

Nanopartiküllerin fiziksel özelliklerinin saptanması için DLS analizi gerçekleştirildi. IND-PLGA ve PLGA nanopartikülleri 25°C deki suda 0,25 mg/mL konsantrasyonunda ve 90° saçılım ile test edilmiştir. Şekil 4.1’de nanopartikül sonuçları gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre ortalama PLGA ve IND-PLGA nanopartiküllerin boyutları 148 nm ve 160,6 nm olarak belirlenmiştir. Heterojenlik indisi (PDI) de DLS analizleri sonucunda tespit edilen nanopartiküller IND-PLGA için 0.23 ve PLGA için ise 0.15’dir



Şekil 4.1: Sentezlenen nanopartiküller için DLS analizleri ile ortalama nanopartikül boyutları ve PDI değerleri.

Şekil 4.2’de sentezlenen nanopartiküllerin Zeta potansiyeli analiz sonuçları gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre IND-PLGA için Zeta potansiyeli -20,9 mV olarak PLGA için ise -23.9 mV olarak belirlenmiştir.

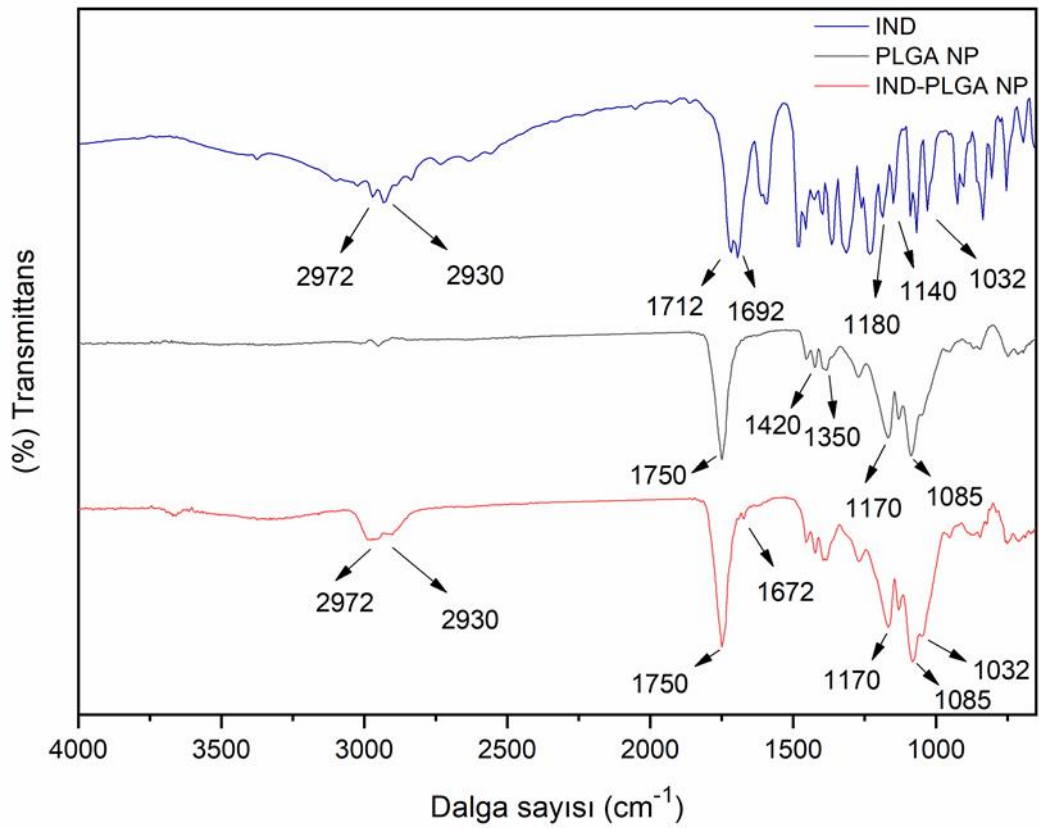


Şekil 4.2: PLGA ve IND-PLGA nanopartiküllerinin Zeta Potansiyeli değerleri.

4.2 FTIR ANALİZLERİ

Sentezlenen nanopartiküllerin kimyasal yapılarını tespit etmek için yapılan FTIR analizlerinde 1712 cm^{-1} ve 1692 cm^{-1} gerçekleşen titreşimler IND yapıda bulunan C=O titreşimlerine atfedilmiştir bunun yanında 1180 cm^{-1} ve 1140 cm^{-1} yapıda bulunan aromatik halka titreşimlerine, 1032 cm^{-1} titreşimleri ise yeniden IND yapısında bulunan O-H titreşimlerine atfedilmiştir. PLGA nanopartikülü için yapılan analizde ise 1750 cm^{-1} ’de bulunan titreşimler

yapıda bulunan ester bağlarının C=O titreşimlerine atfedilmiştir. 1420 cm^{-1} ve 1350 cm^{-1} 'de bulunan titreşimler ise $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ bükülme titreşimlerine atfedilmiştir. Bunların dışında 1170 cm^{-1} ve 1085 cm^{-1} 'de bulunan pikler ise C-O titreşimleriyle ilişkilendirilmiştir. İndometasin içeren PLGA nanopartiküllerinde ise 2972 cm^{-1} ve 2930 cm^{-1} 'deki C-H gerilim titreşimlerinin sadece saf IND de değil aynı zamanda IND-PLGA yapısında da bulunduğu görülmektedir. Ayrıca 1750 cm^{-1} 'de PLGA'nın yapısında bulunan pikin de IND-PLGA sonuçlarında görülebileceği gösterilmiştir. Şekil 4.3'teki sonuçlar bu şekilde ele alındığında indometasinin enkapsülasyon işleminin başarıyla gerçekleştiği gösterilmektedir.

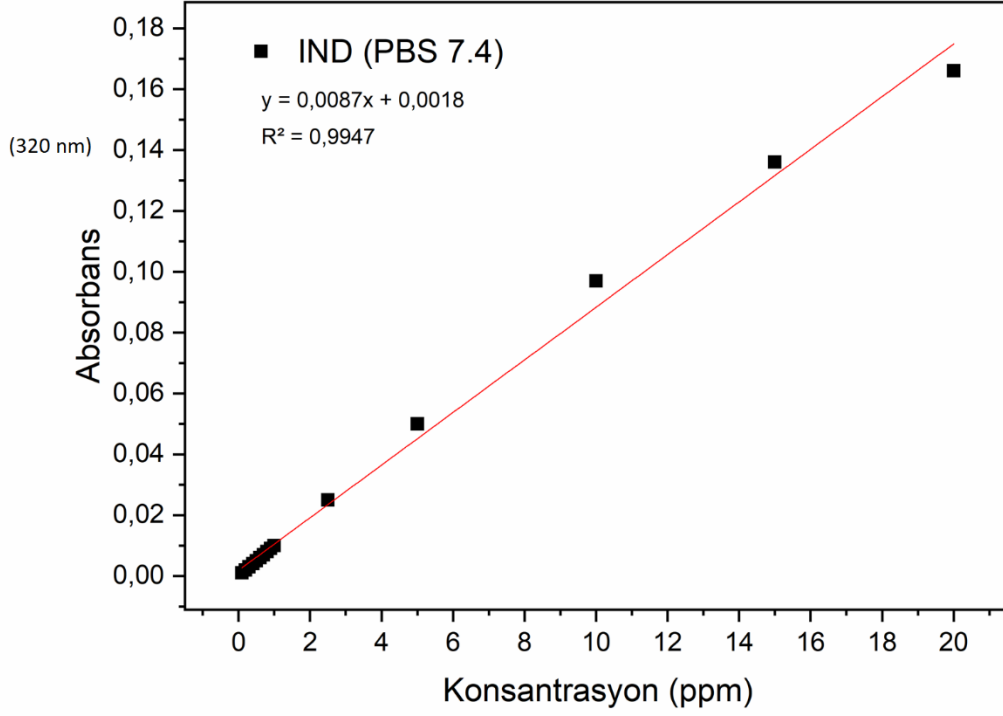


Şekil 4.3: İndometasin, PLGA, IND-PLGA için FITR grafikleri.

4.3 IND-PLGA SALIM ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

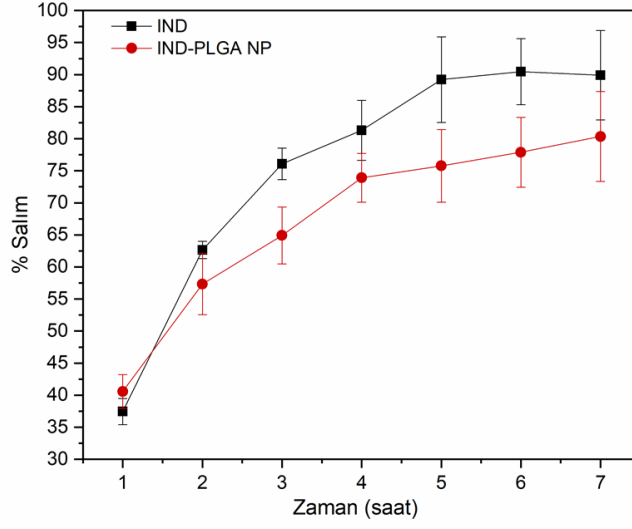
Sentezlenme sırasında saklanan süzüntü analiz edildiğinde IND-PLGA nanopartikülünün kütlece %9 indometasin içerdiği tespit edilmiştir. Salınım çalışmaları için PBS içerisindeki saf indometasinin kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ve bu eğri standart kabul edilerek salınım

araştırılmıştır. Bu kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında ve salınım deneyinin geri kalanında miktar tayini T80+ UV/VIS model Spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4'te kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 4.4: İndometasin için oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi.

Saf İND ve İND-PLGA'dan indometasin salınımı 7 saat boyunca incelenmiş ve saf İND için 4 saat içerisinde salınımın %80 kadarının gerçekleştiği saptanmıştır. 7 saatin sonunda ise %90 kadar salınım gerçekleşmiş bulunmaktadır. İND-PLGA için ise 4 saat sonunda nanopartikülün yapısında bulunan %72,5 indometasin yapıdan ayrılmıştır. 7 saatin sonunda ise bu miktar %80'e çıkmaktadır. Bu veriye ait analizi Şekil 4.5'te görebilirsiniz.

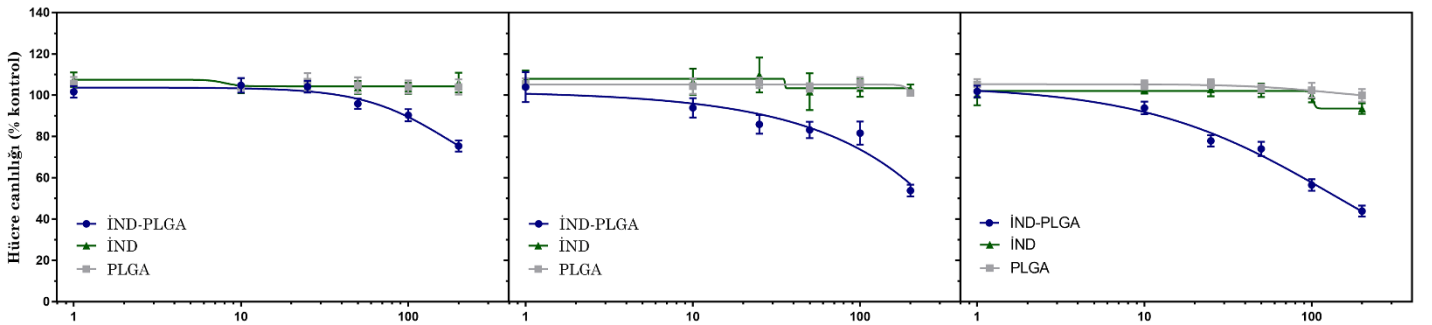


Şekil 4.5: IND ve IND-PLGA'nın zamana bağlı IND salımları.

4.4 SİTOTOKSİSİTE ANALİZLER

Indometasinin, PLGA'nın ve indometasin yüklü PLGA'nın U-87 MG insan glioblastoma hücreleri üzerindeki 4 saatlik maruz kalma etkisinin 24, 48 ve 72 saatlik MTT deneyi sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında indometasinin ve PLGA'nın ciddi bir toksik etkisi gözlemlenmezken IND-PLGA nanopartikülleri önemli oranda öldürücülük göstermiştir. Sonuçların birbiri açısından anlamlı olabilmesi için saf indometasin ve IND-PLGA eşit miktarda indometasin konsantrasyonu içermektedir. Bunun sonucunda 48 saatlik sonuçlarda IND-PLGA uygulanan kanser hücrelerin canlılığı %55'e düşmekteyken PLGA veya saf IND anlamlı bir toksisite gösterememektedirler. Bundan sonraki deneylerde %55 canlılığa neden olan IND-PLGA (200µM indometasin) konsantrasyonu ve %80 canlılığa neden olan IND-PLGA (100µM indometasin) baz alınarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

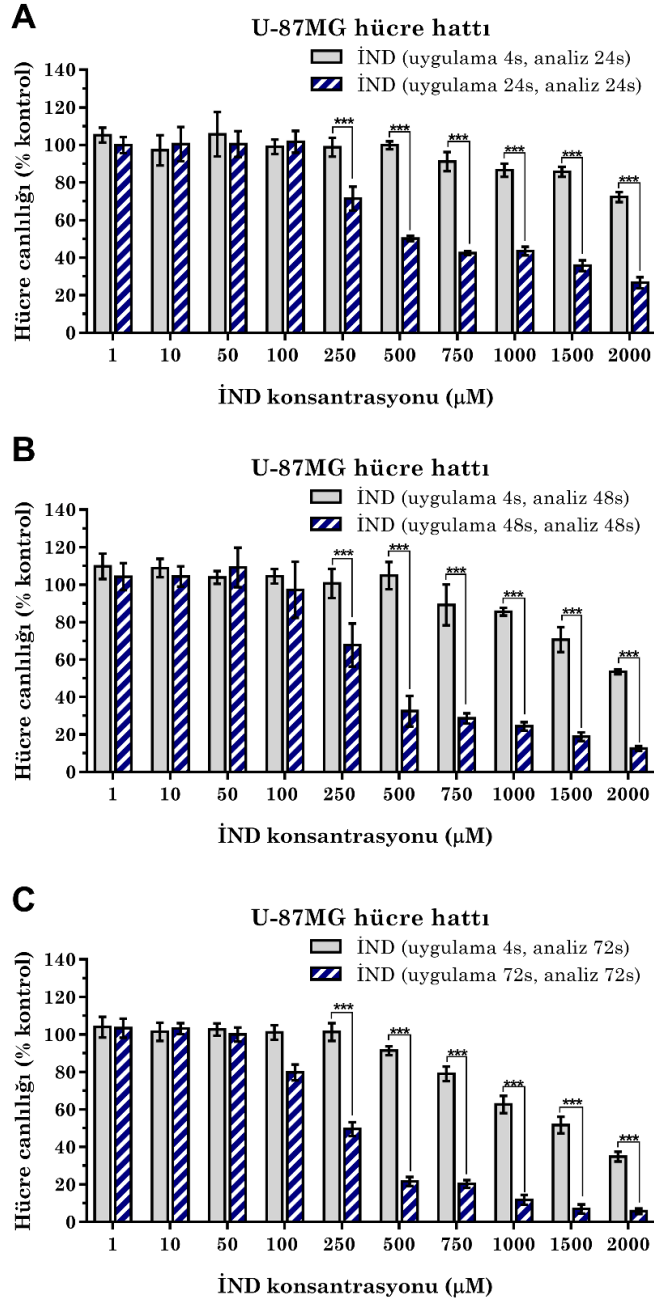
U-87MG Hücre Hattı



Şekil 4.6: Farklı doz ve süredeki IND, PLGA ve IND-PLGA'nın MTT deneyi sonuçları.

Şekil 4.6'da sol taraftaki grafikte 24 saatlik sonuçlar gösterilmiştir. Ortadaki grafikte 48 saatlik sonuçlar gösterilmiştir. Sağdaki grafikte 72 saatlik sonuçlar gösterilmiştir.

Bunun haricinde saf İND 4 saatlik etkisinin normal etkisine göre durumunu kıyaslamak için 1 μ M ve 2000 μ M arasında değişen dozlarda farklı zaman aralıklarıyla toksisitesi ölçülmüştür. Bunun sonucunda saf İND 4 saatlik etkisinin normal etkisine göre anlamlı derecede azaldığı t testi kullanılarak gösterilmiştir. Şekil 4.6'dan bunun sonuçları gözlemlenebilir.



Şekil 4.7: İND 4 saatlik ve normal etkisinin zamana ve doza bağlı etkisi.

Şekil 4.7’de (A) grafiği 4 saatlik ve normal uygulamanın 24 saatlik etkisini göstermektedir. (B) grafiği 4 saatlik ve normal uygulamanın 48 saatlik etkisini göstermektedir. (C) grafiği 4 saatlik ve normal uygulamanın 72 saatlik etkisini göstermektedir. (*) aynı dozdaki iki farklı uygulamayı kıyaslamak için kullanıldı.

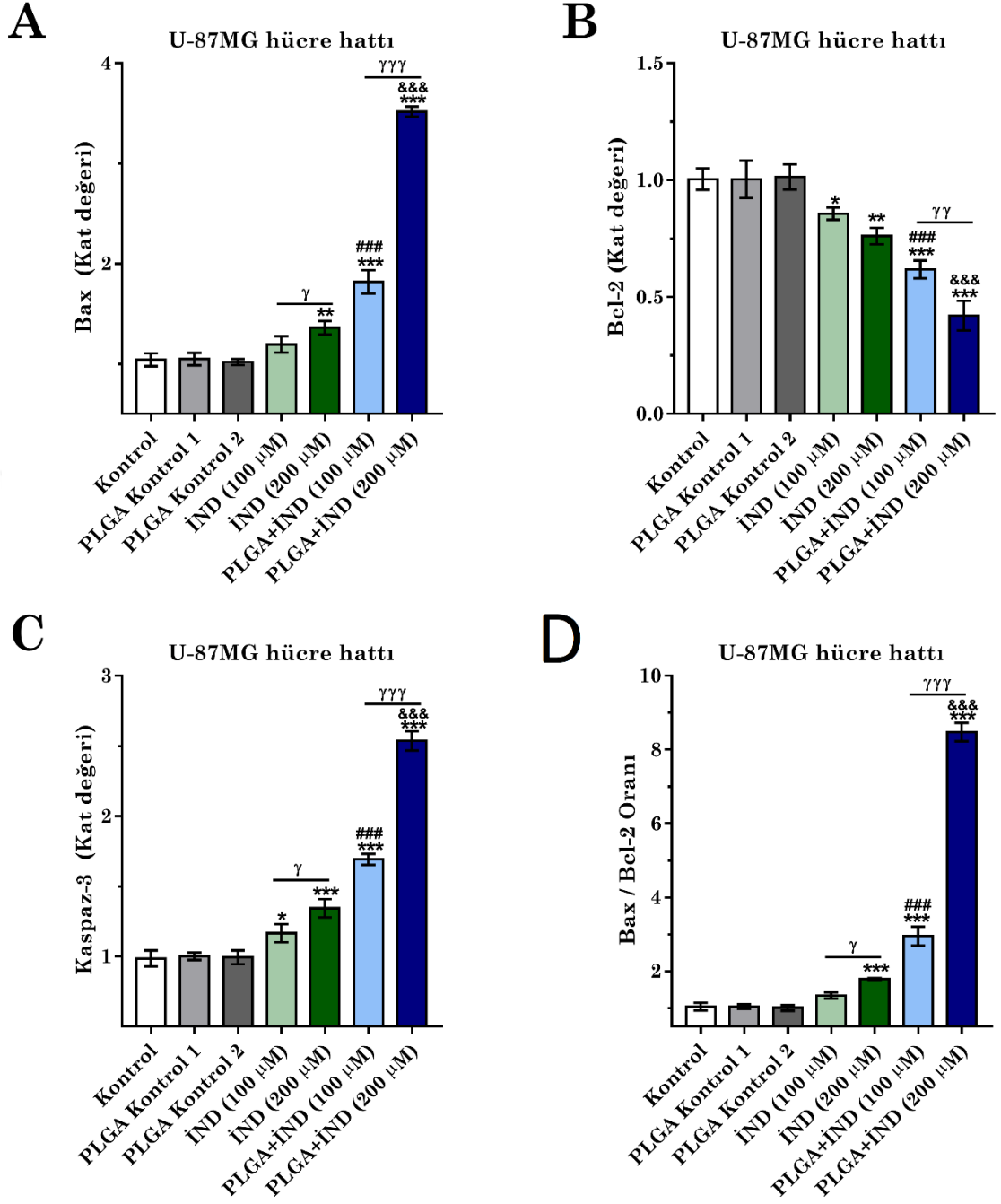
4 saatlik uygulamada sadece 72 saat sonunda IC₅₀ dozu elde edilebilmiştir. Tablo 4.1’de bu konuda veri bulunmaktadır.

Tablo 4.1: 4 saatlik IND-PLGA ve saf IND uygulamasının IC₅₀ değeri.

		IC ₅₀ değeri (µM)			Sensitive indeksi
Analiz zamanı		İND/PLGA NP	İND	PLGA NP iskeleti	
		(NP içinde İND)	(Serbest İND)		
U-87MG hücre hattı	24 saat	-	-	-	-
	48 saat	-	-	-	-
	72 saat	146.26 ± 3.44	1641.30 ± 3.38	-	11.22

4.5 GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ

IND-PLGA’nın hücre ölümüne neden olduğunu gördükten sonra bu ölüm mekanizmasının ne şekilde tetiklendiğini keşfetmek için apoptoz belirteçlerinin gen ifadesi düzeyinde değişikliğine bakılmıştır. Bu amaçla BAX, BCL2 ve CASP3 genlerinin RNA düzeyinde ifadeleri RT-PCR metoduyla incelenmiştir. Bu araştırmanın sonucunda apoptoz başlatıcı genleri ifadesinde artış ve apoptoz önleyici genlerin ifadesinde düşüş gözlemlenmiştir. GAPDH geni ise kontrol olarak kullanılmıştır. Farklı gen ifade düzeylerinin kontrol ile ve kendi aralarındaki farklılıkları t testi kullanılarak anlamlı şekilde ifade edilmiştir. İstatistiksel olarak bu farklılıklar Şekil 4.7’de belirtilmiştir.



Şekil 4.8: Farklı dozlardaki PLGA, IND ve IND-PLGA'nın apoptoz üzerindeki etkisi.

Şekil 4.8'de (A) ile belirtilen k grafikte BAX geninin RNA düzeyindeki ifadesindeki değişiklik gösterilmiştir. (B) kısmında ise BCL2 geninin RNA düzeyindeki ifadesindeki değişiklik gösterilmiştir. (C) kısmında ise CASP3 geninin ifadesindeki doza bağlı değişiklik gösterilmiştir. (D) kısmında ise BAX/BCL2 oranının doza ve ilacın uygulanma şekline bağlı

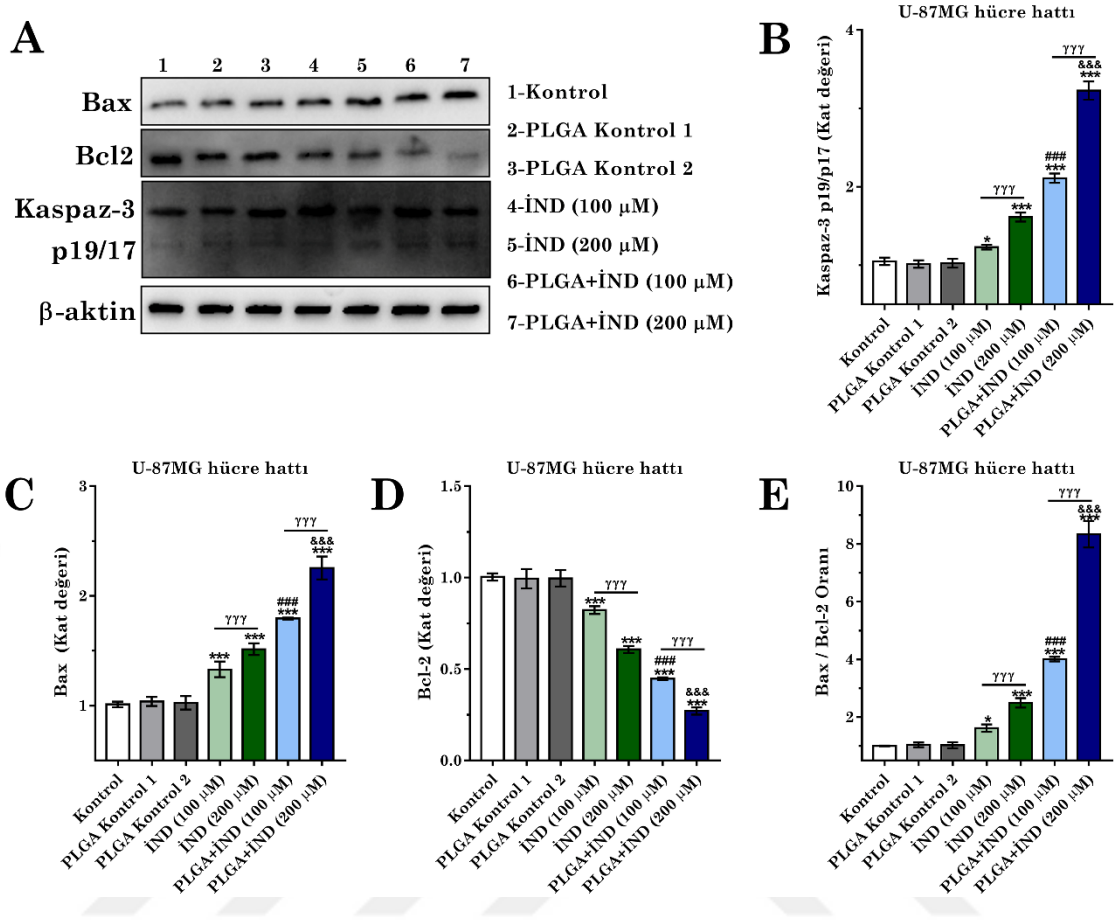
oralar etkisindeki değişim gösterilmiştir. Grafiklerdeki damga gösterimi * kontrole göre, # İND100 ve PLGA + İND 100 göre, & İND200 ve PLGA + İND 200 göre, † iki grup arasında kıyaslamak için kullanılmıştır.

4.6 HÜCRE ÖLÜM YOLAĞININ PROTEİN SEVİYESİNDE ANALİZİ

İND, PLGA ve İND-PLGA'nın apoptoz üzerindeki etkisini protein seviyesinde de test etmek için western blotlama deneyi yapılmıştır. 200µM ve 100µM indometasin içeren İND-PLGA, saf 200µM ve 100µM indometasin, boş PLGA ve kontrol sonuçları elde edilerek ilgili sonuçlar kontrole göre normalize edilmiştir.

Bu deney sonucunda 200µM ve 100µM indometasin içeren İND-PLGA'nın hücreler üzerinde apoptoza başlatıcı genlerin (Bax) ifadelerinde artışa neden olduğu bulunmuştur. 200µM indometasin içeren PLGA'nın 100µM içeren PLGA'ya göre çok daha fazla Bax proteini ifade ettiği saptanmıştır. Ayrıca saf indometasin ile indometasin içeren PLGA arasında Bax geninin ifadesinde ciddi farklılık olduğu gösterilmiştir.

200µM ve 100µM indometasin içeren İND-PLGA'nın hücreler üzerinde apoptoz önleyici genlerin (Bcl2) ifadelerin azalışa neden olduğu gösterilmiştir. 200µM indometasin içeren PLGA'nın 100µM içeren PLGA'ya göre çok daha az Bcl2 proteini ifade ettiği saptanmıştır. Ayrıca saf indometasin ile indometasin içeren PLGA arasında Bcl2 geninin ifadesinde ciddi farklılık olduğu gösterilmiştir. Artış ve azalışların anlamlı olarak kontrolle ve birbirleriyle ilişkileri t testi kullanılarak saptanmıştır. Şekil 4.8'de bu anlatım düzeylerindeki farklılıkları göstermektedir.

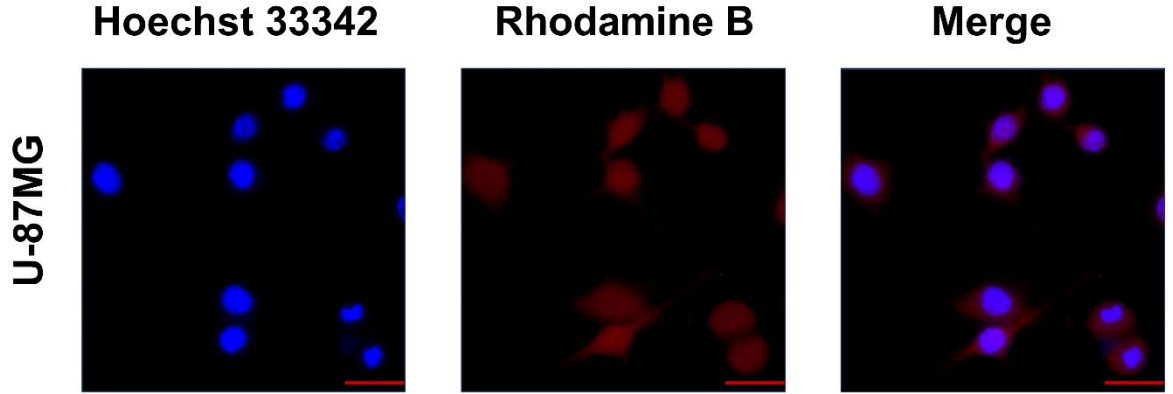


Şekil 4.9: Hücre ölüm yolağı belirteç proteinlerinin western blotlama sonuçları.

Şekil 4.9’da (A) Farklı ölüm yolağı proteinlerinin western blotlama sonuçlarını göstermektedir. (B) Kaspaz-3 proteinin ifadesini ve p19/17 oluşumunu göstermektedir. (C) Bax proteininin ifadesinin uygulanan dozlara ve maddeye göre değişimini göstermektedir. (D) Bcl-2 proteininin ifadesinin uygulanan dozlara ve maddeye göre değişimini göstermektedir. (E) Bax proteininin ifadesinin / bcl-2 proteinin ifadeine olan oranın göstermektedir. * kontrole göre, # İND100 ve PLGA + İND 100 göre, & İND200 ve PLGA + İND 200 göre, √ iki grup arasını kıyaslamak için kullanılmıştır.

4.7 PLGA’NIN HÜCRE İÇERİSİNE GİRMESİ

PLGA’nın hücre içerisine girişini gözlemlemek için Plga nanopartikülleri Rod B ile işaretlendi ve 1 saat boyunca hücreye nüfuz etmesi sağlandı. Ayrıca hücre çekirdeğini boyayan farklı bir boya ise işaretlenmiş PLGA’nın hücre içerisine girmesi teyit edilmiştir. Bu işaretin ve boyanın görüntüsü floresan mikroskop ile alınmıştır. İlgili görüntüyü Şekil 4.9’da görülebilmektedir.



Şekil 4.10: PLGA’nın hücre içerisine girişi.

Şekil 4.10’da sol taraftaki fotoğrafta hücre çekirdeği Hoechst 33342 ile boyanmış hücreler görülmektedir. Ortada ise sadece Rod B ile işaretlenmiş hücreler görülmektedir. Sağ tarafta ise soldaki ve ortadaki resmin birbiri üzerine geçirilmiş halidir. Böylelikle PLGA’nın hücre içerisine girebildiği bulunabilmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nanopartiküller biyoteknolojinin birçok alanında kullanılabildiği gibi ilaç taşınımında da kullanılmaktadırlar. Özellikle taşınacak ilacın vücuttaki normal dokuya zarar verebilecek durumda olması veya ilacın normal şartlarda hedeflenen dokuya ulaşamayacak olması bu konuda nanopartikülleri çok uygun taşıyıcı sistemler yapmaktadır.

İndometasin kan içerisinde düşük çözünürlülüğe sahip antiinflamatuvar bir ilaçtır. Bu ilacın yüksek dozlarda kullanımı bazı rahatsızlıklara neden olabildiği bilinmektedir. Bu nedenle PLGA gibi FDA onaylı bir nanopartikülle iletilmesinin ümit vaat edici olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada ise indometasin yüklü PLGA'nın glioblastoma hücreleri üzerinde saf indometasine göre bir farklılık oluşturup oluşturmadı araştırıldı.

4 saat içerisinde %72,5 indometasini ortama saldığı için saf indometasinle arasındaki farkı görebilmek adına kanser hücreleri IND-PLGA ve saf IND sadece 4 saat maruz bırakıldı. Bunun sonucunda ise IND-PLGA'nın kanser hücrelerindeki öldürücülük açısından saf indometasinden çok daha iyi olduğu sonucuna varıldı. Deney sırasında IND-PLGA'nın medya içerisinde %1 DMSO miktarını geçmeden çözündürülmesi mümkün olmadığından 48 saatteki IC50 dozu yerine indometasin miktarları eşitlenerek uygulanacak doz belirlendi. Böylelikle 200µM ve 100µM indometasin içeren IND-PLGA konsantrasyonu deneyin geri kalanında kullanılmıştır. Ayrıca Uzun süreli yapılan IND sitotoksitesite deneyinde ise IND normal uygulanmasının yanında 4 saatlik uygulanmasının çok daha az etkiye sahip olduğu görülmüştür.

IND-PLGA'nın hücre ölüm yollarından hangisini kullandığını bulmak için apoptoz belirteçlerine bakıldı. Hem RNA düzeyinde RT-PCR metodu ile hem de protein düzeyinde apoptoza yol açan genlerin ifadesinin daha çok olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle BAX/BCL2 oranının çok yüksek olması sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkması ve kaspazları aktif hale getirecek bir dizi olayın başlatıldığına işaret etmektedir.

Floresanla işaretlenmiş PLGA'nın hücre içerisine kadar girebilmesi kanser hücresinde oluşan etkilerin dışsal veya farklı bir nedenden ötürü değil PLGA ile hücre içerisine taşınan indometasin tarafından yapıldığını göstermektedir. Bu hücre içerisine geçiş genellikle endositoz yoluyla olmakta ve oluşan endozomdan kaçarak sitoplazma içerisine bünyesindeki ilacın salınımını gerçekleştirebilmektedir.

Literatürde PLGA ile taşınan ilaçlar farklı kanser türlerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan bu araştırmalardan birinde kuersetin ilacının PLGA ile taşınımı sonrasında meme kanseri üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Suda çözünürlüğü çok az olan kuersetinin PLGA ile taşınımı sonrasında ilgili kanser dokusunun hedeflene bildiği ve kuersetin salınımının uzun sürelerle yayıldığı için uzun süreli etki göstermesinin sağlandığı saptanmıştır (Çetiner, 2023). İlacın PLGA'dan salınımı ve buna bağlı olarak gösterdiği kısa süreli ve uzun süreli etki hedeflenen kanserin türüne ve yüklenen ilacın özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Kuersetin ile yüklenen PLGA'nın meme kanseri üzerindeki etkisi indometasin yüklenen PLGA'nın glioblastoma üzerindeki etkisinden çok daha fazladır. Bunun nedenleri farklı ilaçların farklı kanser türlerinde gösterdiği etki ile ilişkilendirilebilir. Fakat iki ilacın da PLGA ile taşınmasında ilaçların kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin artmış olduğu saptanmaktadır.

Bitkilerde bulunan bir flavonoid olan baicalein literatürde anti-kanser özellik gösterdiği belirtilmiştir. Bu flavonoidin PLGA ile taşınarak glioblastoma üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmada baicalein yüklü PLGA nanopartiküllerinin bir gün sonunda stabiliteğini %77 oranında koruyabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca U-87 MG insan hücre hattında yapılan çalışmalarda 24 saat içerisinde ciddi oranda öldürücülük gösterdiği saptanmıştır (Kayaş, 2020). Bu verilere göre indometasin yüklü PLGA nanopartiküllerine göre daha etkili olabileceği görülmektedir.

PLGA ile taşınan siRNA'nın glioblastoma üzerindeki etkisi literatürde belirtilmiştir. Yapılan çalışmadan PLGA içerisine integrin $\alpha 10$ proteininin ifadesini susturacak siRNA eklenerek U-87 hücre hattı üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Ama yapılan sitotoksik testlerde hücre üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Ancak glioblastoma hücrelerinde integrin $\alpha 10$ proteininin ifadesini bastırdığı gözlemlenmiştir. Bu proteinin ifadesinin azalmasının hücre göçüne olan etkisini çizik deneyi ile gösterilmiştir (Çevik, 2022). İndometasin yüklü PLGA'nın hücre göçü üzerinde bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda bu özellik incelenmelidir.

Literatürde dosetaksel ve kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro ve in vivo olarak beyin tümörü etkinliği değerlendirilmiştir. Dosetaksel ve kurkumin birlikte kullanıldığında anti-kanser özellik göstermektedir. Ayrıca kurkumin kullanımı dosetakselin yan etkilerini azalttığı için normal dokulara verilen zararı en aza indirmektedir. Oluşturulan PLGA polisorbata 80 ile kaplanarak hücre içerisine geçişi kolaylaştırılmıştır. Ancak boş polisorbata 80

kaplı PLGA'nın normal hücrelerde toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında dosetaksel ve kurkumin yüklü ve polisorbata 80 kaplı PLGA'nın bozunmasının uzun zaman aldığı gösterilmiştir. U-87 MG hücre hattında yapılan sitotoksikite deneylerinde $0,07\mu\text{M}$ dosetaksel ile $25\mu\text{M}$ kurkuminin 72 saat sonundaki etkisinin serbest dosetakselden daha fazla olduğu ve kurkuminin dosetakselin etkisini artırdığı gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarında ise polisorbata 80 kaplı PLGA'nın doku içine daha çok girdiği ve kan-beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir (Seko, 2020). İndometasin yüklü nanopartiküller ile kıyaslandığında daha uzun salınım zamanına sahip olması bir avantaj gibi görünmektedir. Fakat polisorbata 80 kaplı nanopartiküllerin normal hücreler üzerinde toksisiteye sahip olması uzun süreli salınımda yan etkilere yol açabileceği endişesi uyandırmaktadır.

İrinotekan topoisomera-1 enzimi yarışmalı analogudur. Glioblastomada anti-kanser özellik göstermektedir. Metformin ise hücre enerji yollarının düzenlenmesinde rol almaktadır. İrinotekan ve metformin içeren PLGA'ların beyin ve beyin kanseri üzerinde etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada irinotekan ve metformin içeren PLGA'ların 24 saat içerisinde %90'dan fazla salınım yaptığı saptanmıştır. Sıçandan alınana normal beyin dokusu ve U-87 MG hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda $10\mu\text{m}$ irinotekan ve $0,5\text{ mM}$ metformin içeren PLGA'nın normal hücrelerde çok bir etkiye sahip olmamasına rağmen kanser hücreleri üzerinde ciddi bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Yüksek dozlarda irinotekan ve metformin içeren PLGA nanopartiküllerinin U-87 MG hücre hattı enjekte edilen sıçan beyinlerinde tümör dokusunu küçülttüğü gözlemlenmiştir (Taghizadehghalehjoughi, 2015). İndometasin yüklü PLGA'lar ile kıyaslandığında salınımı benzerlik göstermesine rağmen zararsız dozda kanser hücreleri üzerinde göstermiş olduğu etkinin daha az olduğu görülmektedir.

İndometasinin reaktif oksijen türlerinin hücre içerisinde artmasına neden olduğu bilinmektedir. İndometasin yüklü PLGA nanopartiküllerinin reaktif oksijen türlerinin düzeyine etkisinin yanında hücre göçüne etkisinin ve apoptoza tam olarak hangi yolağın neden olduğu, prostaglandinlerin inhibe edilmesinin bu süreç ile ilgili olup olmadığı veya bu sürecin prostaglandinlerden tamamen bağımsız olarak gelişip gelişmediği gibi sorular daha sonraki araştırmalarda üzerinde durulması gerekli konular olarak önümüze çıkmaktadır.

Sonuç olarak indometasinin PLGA nanopartiküler taşıyıcı sistemle glioblastoma hücre hattına taşınması saf indometasine göre çok daha öldürücü etki oluşturmaktadır. Bu öldürücülük apoptozun tetiklenmesiyle oluşmaktadır. İlgili mekanizmaların daha fazla aydınlatılması ve

diğer özelliklerin karakterize edilmesi için üzerinde daha fazla araştırma ve geliştirme yapılması gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.



KAYNAKLAR

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., and Hansson, E., 2006, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53.
- Acharya, S., and Sahoo, S. K., 2011, PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect, *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 170–183.
- Aleman, M., Velasco, R., Simó, M., And Bruna, J., 2021, Late effects of cancer treatment: consequences for long-term brain cancer survivors, *Neuro-Oncology Practice*, 8(1), 18–30
- Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S., & Westermarck, B., 2016. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news, *Science translational medicine*, 8(354), 354re3.
- Alshafie, G. A., Abou-Issa, H. M., Seibert, K., and Harris, R. E., 2000, Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model, *Oncology reports*, 7(6), 1377–1381.
- Altun, I., and Sonkaya, A., 2018, The Most Common Side Effects Experienced by Patients Were Receiving First Cycle of Chemotherapy, *Iranian journal of public health*, 47(8), 1218–1219.
- Arico, S., Pattingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P., and Ogier-Denis, E., 2002, Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line, *The Journal of biological chemistry*, 277(31), 27613–27621.
- Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B., and Jain, R. K., 2020, The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases, *Nature reviews. Cancer*, 20(1), 26–41.
- Aslan, B., Ozpolat, B., Sood, A. K., and Lopez-Berestein, G., 2013, Nanotechnology in cancer therapy, *Journal of drug targeting*, 21(10), 904–913.
- Baetke, S. C., Lammers, T., And Kiessling, F., 2015, Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer, *The British journal of radiology*, 88(1054), 20150207.
- Bai, J., Varghese, J., and Jain, R., 2020, Adult Glioma WHO Classification Update, Genomics, and Imaging: What the Radiologists Need to Know, *Topics in magnetic resonance imaging: TMRI*, 29(2), 71–82.
- Bai, X., Wang, J., Guo, Y., Pan, J., Yang, Q., Zhang, M., Li, H., Zhang, L., Ma, J., Shi, F., Shu, W., Wang, Y., & Leng, J., 2014, Prostaglandin E2 stimulates β 1-integrin expression in hepatocellular carcinoma through the EP1 receptor/PKC/NF- κ B pathway, *Scientific reports*, 4, 6538.
- Balkwill, F., and Mantovani, A., 2001, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet (London, England)*, 357(9255), 539–545.

- Bannwarth, B., Netter, P., Lapticque, F., Péré, P., Thomas, P., and Gaucher, A., 1990, Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of indomethacin in humans. Relationship to analgesic activity, *European journal of clinical pharmacology*, 38(4), 343–346.
- Bernardi, A., Braganhol, E., Jäger, E., Figueiró, F., Edelweiss, M. I., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., and Battastini, A. M., 2009, Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model, *Cancer letters*, 281(1), 53–63.
- Bernardi, A., Frozza, R. L., Jäger, E., Figueiró, F., Bavaresco, L., Salbego, C., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., And Battastini, A. M., 2008, Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. *European journal of pharmacology*, 586(1-3), 24–34.
- Bhujbal, S. V., de Vos, P., and Niclou, S. P., 2014, Drug and cell encapsulation: alternative delivery options for the treatment of malignant brain tumors, *Advanced drug delivery reviews*, 67-68, 142–153.
- Bredlau, A. L., Dixit, S., Chen, C., and Broome, A. M., 2017, Nanotechnology Applications for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma, *Current neuropharmacology*, 15(1), 104–115.
- Castellone, M. D., Teramoto, H., Williams, B. O., Druey, K. M., and Gutkind, J. S., 2005, Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis, *Science (New York, N.Y.)*, 310(5753), 1504–1510.
- Chang, C. Y., Li, J. R., Wu, C. C., Wang, J. D., Liao, S. L., Chen, W. Y., Wang, W. Y., and Chen, C. J., 2020, Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to Indomethacin-Induced Glioma Apoptosis, *International journal of molecular sciences*, 21(2), 557.
- Chang, C. Y., Li, J. R., Wu, C. C., Wang, J. D., Yang, C. P., Chen, W. Y., Wang, W. Y., and Chen, C. J., 2018, Indomethacin induced glioma apoptosis involving ceramide signals, *Experimental cell research*, 365(1), 66–77.
- Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., And Colman, H., 2017, Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance, *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 14(2), 284–297.
- Chen, Z., Wang, C., Dong, H., Wang, X., Gao, F., Zhang, S., and Zhang, X., 2020, Aspirin has a better effect on PIK3CA mutant colorectal cancer cells by PI3K/Akt/Raptor pathway, *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 26(1), 14.
- Chell, S. D., Witherden, I. R., Dobson, R. R., Moorghen, M., Herman, A. A., Qualtrough, D., Williams, A. C., and Paraskeva, C., 2006, Increased EP4 receptor expression in colorectal cancer progression promotes cell growth and anchorage independence, *Cancer research*, 66(6), 3106–3113.
- Cherukuri, D. P., Chen, X. B., Goulet, A. C., Young, R. N., Han, Y., Heimark, R. L., Regan, J. W., Meuillet, E., and Nelson, M. A., 2007, The EP4 receptor antagonist, L-161,982, blocks prostaglandin E2-induced signal transduction and cell proliferation in HCA-7 colon cancer cells, *Experimental cell research*, 313(14), 2969–2979.

- Chhikara, B.S. and Parang, K., 2023, Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451-451.
- Chiou, S. K., Hoa, N., Hodges, A., Ge, L., and Jadus, M. R., 2014, Indomethacin promotes apoptosis in gastric cancer cells through concomitant degradation of Survivin and Aurora B kinase proteins, *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 19(9), 1378–1388.
- Chun, K. S. and Langenbach, R., 2011, The prostaglandin E2 receptor, EP2, regulates survivin expression via an EGFR/STAT3 pathway in UVB-exposed mouse skin, *Molecular carcinogenesis*, 50(6), 439–448.
- Cruz-Correa, M., Hyland, L. M., Romans, K. E., Booker, S. V., and Giardiello, F. M., 2002, Long-term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: a prospective cohort study, *Gastroenterology*, 122(3), 641–645.
- Çetiner, K., 2023, *Kuersetin yüklü folat-plga nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi, karakterizasyonu ve meme kanser hücrelerinde in vitro değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Lokman Hekim Üniversitesi.
- Çevik, B., N., 2022, *Glioblastoma hücrelerinde integrin $\alpha 10$ 'un plga nanopartiküllerine yüklenmiş siRNA ile baskılanması*, Yüksek Lisans Tezi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi
- Davis M. E., 2018, Epidemiology and Overview of Gliomas, *Seminars in oncology nursing*, 34(5), 420–429.
- Derakhshandeh, K., Erfan, M., and Dadashzadeh, S., 2007, Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 66(1), 34–41.
- Din, F. V., Valanciute, A., Houde, V. P., Zibrova, D., Green, K. A., Sakamoto, K., Alessi, D. R., and Dunlop, M. G., 2012, Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells, *Gastroenterology*, 142(7), 1504–15.e3.
- Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., and Atyabi, F., 2011, Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents, *International journal of nanomedicine*, 6, 877–895.
- Emori, H. W., Champion, G. D., Bluestone, R., and Paulus, H. E., 1973, Simultaneous pharmacokinetics of indomethacin in serum and synovial fluid, *Annals of the rheumatic diseases*, 32(5), 433–435.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., and Bray, F., 2021, Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778-789.

- Ghosh, N., Chaki, R., Mandal, V., and Mandal, S. C., 2010, COX-2 as a target for cancer chemotherapy, *Pharmacological reports: PR*, 62(2), 233–244.
- Grimm, J., and Scheinberg, D. A., 2011, Will nanotechnology influence targeted cancer therapy? *Seminars in radiation oncology*, 21(2), 80–87.
- Guo, Z., Zhang, P., Chakraborty, S., Chetwynd, A. J., Abdolahpur Monikh, F., Stark, C., Ali-Boucetta, H., Wilson, S., Lynch, I., and Valsami-Jones, E., 2021, Biotransformation modulates the penetration of metallic nanomaterials across an artificial blood-brain barrier model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(28), e2105245118.
- Haddadi, A., Elamanchili, P., Lavasanifar, A., Das, S., Shapiro, J., and Samuel, J., 2008, Delivery of rapamycin by PLGA nanoparticles enhances its suppressive activity on dendritic cells, *Journal of biomedical materials research. Part A*, 84(4), 885–898. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31373>
- Heidel, F. H., Bullinger, L., Feng, Z., Wang, Z., Neff, T. A., Stein, L., Kalaitzidis, D., Lane, S. W., and Armstrong, S. A., 2012, Genetic and pharmacologic inhibition of β -catenin targets imatinib-resistant leukemia stem cells in CML, *Cell stem cell*, 10(4), 412–424.
- Helleberg L., 1981, Clinical Pharmacokinetics of indomethacin, *Clinical pharmacokinetics*, 6(4), 245–258.
- Hossain, M. A., Kim, D. H., Jang, J. Y., Kang, Y. J., Yoon, J. H., Moon, J. O., Chung, H. Y., Kim, G. Y., Choi, Y. H., Copple, B. L., and Kim, N. D., 2012, Aspirin enhances doxorubicin-induced apoptosis and reduces tumor growth in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo, *International journal of oncology*, 40(5), 1636–1642.
- Hull, M. A., Gardner, S. H., and Hawcroft, G., 2003, Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. *Cancer treatment reviews*, 29(4), 309–320.
- Husain, S. S., Szabo, I. L., Pai, R., Soreghan, B., Jones, M. K., and Tarnawski, A. S., 2001, MAPK (ERK2) kinase--a key target for NSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth, *Life sciences*, 69(25-26), 3045–3054.
- Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X., and Kissel, T., 2000, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 50(1), 147–160.
- Kalinski P., 2012, Regulation of immune responses by prostaglandin E2, *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 188(1), 21–28.
- Kanda, A., Ebihara, S., Takahashi, H., and Sasaki, H., 2003, Loxoprofen sodium suppresses mouse tumor growth by inhibiting vascular endothelial growth factor, *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 42(1), 62–70.

- Kang, Y., Wu, J., Yin, G., Huang, Z., Yao, Y., Liao, X., Chen, A., Pu, X., and Liao, L., 2008, Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of indomethacin-loaded PLLA/PLGA microparticles using supercritical CO₂ technique, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 70(1), 85–97.
- Khan, Z., Khan, N., Tiwari, R. P., Sah, N. K., Prasad, G. B., and Bisen, P. S., 2011, Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics, *Current drug targets*, 12(7), 1082–1093.
- Kayaş, C., 2020, *Beyin kanseri ve nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkili olabilecek yeni ajanlar: ¹³¹I-baicalein ve ¹³¹I-baicalein-plga*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi.
- Kiessling, F., Mertens, M. E., Grimm, J., and Lammers, T., 2014, Nanoparticles for imaging: top or flop? *Radiology*, 273(1), 10–28.
- Kim, M. S., Kim, J. E., Lim, D. Y., Huang, Z., Chen, H., Langfald, A., Lubet, R. A., Grubbs, C. J., Dong, Z., and Bode, A. M., 2014, Naproxen induces cell-cycle arrest and apoptosis in human urinary bladder cancer cell lines and chemically induced cancers by targeting PI3K, *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 7(2), 236–245.
- Kleihues, P. and Ohgaki, H., 1999, Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis, *Neuro-oncology*, 1(1), 44–51.
- Kolawole, O. R., and Kashfi, K., 2022, NSAIDs and Cancer Resolution: New Paradigms beyond Cyclooxygenase, *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1432.
- Kumari, A., Yadav, S. K., and Yadav, S. C., 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 1–18.
- Li, X., Yang, B., Han, G., and Li, W., 2017, The EP4 antagonist, L-161,982, induces apoptosis, cell cycle arrest, and inhibits prostaglandin E₂-induced proliferation in oral squamous carcinoma Tca8113 cells, *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 46(10), 991–997.
- Longmire, M. R., Ogawa, M., Choyke, P. L., and Kobayashi, H., 2011, Biologically optimized nanosized molecules and particles: more than just size, *Bioconjugate chemistry*, 22(6), 993–1000.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., and Ellison, D. W., 2021, The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251.
- Lucas S., 2016, The Pharmacology of Indomethacin, *Headache*, 56(2), 436–446.
- Lü, J. M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P. H., Yao, Q., and Chen, C., 2009, Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology, *Expert review of molecular diagnostics*, 9(4), 325–341.

- Mahapatro, A., and Singh, D. K., 2011, Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines, *Journal of nanobiotechnology*, 9, 55.
- Maingret, V., Barthet, G., Deforges, S., Jiang, N., Mulle, C., and Amédée, T., 2017, PGE2-EP3 signaling pathway impairs hippocampal presynaptic long-term plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease, *Neurobiology of aging*, 50, 13–24.
- Majumder, M., Nandi, P., Omar, A., Ugwuagbo, K. C., and Lala, P. K., 2018, EP4 as a Therapeutic Target for Aggressive Human Breast Cancer, *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1019.
- Mantovani, G., Macciò, A., Madeddu, C., Serpe, R., Antoni, G., Massa, E., Dessì, M., and Panzone, F., 2010, Phase II nonrandomized study of the efficacy and safety of COX-2 inhibitor celecoxib on patients with cancer cachexia, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 88(1), 85–92.
- Matsushashi, N., Nakajima, A., Fukushima, Y., Yazaki, Y., and Oka, T., 1997., Effects of sulindac on sporadic colorectal adenomatous polyps, *Gut*, 40(3), 344–349.
- Menter, D. G., Schilsky, R. L., and DuBois, R. N., 2010, Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(5), 1384–1390.
- Mu, L., and Feng, S. S., 2003, A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS, *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 86(1), 33–48.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F., 1999, Prostanoid receptors: structures, properties, and functions, *Physiological reviews*, 79(4), 1193–1226.
- Ningaraj, N. S., Rao, M., Hashizume, K., Asotra, K., and Black, K. L., 2002, Regulation of blood-brain tumor barrier permeability by calcium-activated potassium channels, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 301(3), 838–851.
- Ohgaki, H., And Kleihues, P., 2007, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma, *The American journal of pathology*, 170(5), 1445–1453.
- Osawa, K., Umemura, M., Nakakaji, R., Tanaka, R., Islam, R. M., Nagasako, A., Fujita, T., Yokoyama, U., Koizumi, T., Mitsudo, K., & Ishikawa, Y., 2020, Prostaglandin E2 receptor EP4 regulates cell migration through Orai1, *Cancer science*, 111(1), 160–174.
- Ou, Y. C., Yang, C. R., Cheng, C. L., Raung, S. L., Hung, Y. Y., and Chen, C. J., 2007, Indomethacin induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells by activating mitogen-activated protein kinases and AKT, *European journal of pharmacology*, 563(1-3), 49–60.
- Palmowski, M., Huppert, J., Ladewig, G., Hauff, P., Reinhardt, M., Mueller, M. M., Woenne, E. C., Jenne, J. W., Maurer, M., Kauffmann, G. W., Semmler, W., and Kiessling, F., 2008, Molecular profiling of angiogenesis with targeted ultrasound imaging: early assessment of antiangiogenic therapy effects, *Molecular cancer therapeutics*, 7(1), 101–109.

- Pan, J., Yang, Q., Shao, J., Zhang, L., Ma, J., Wang, Y., Jiang, B. H., Leng, J., and Bai, X., 2016, Cyclooxygenase-2 induced β 1-integrin expression in NSCLC and promoted cell invasion via the EP1/MAPK/E2F-1/FoxC2 signal pathway, *Scientific reports*, 6, 33823.
- Pantovic, A., Bosnjak, M., Arsikin, K., Kosic, M., Mandic, M., Ristic, B., Totic, J., Grujicic, D., Isakovic, A., Micic, N., Trajkovic, V., and Harhaji-Trajkovic, L., 2017, In vitro antiglioma action of indomethacin is mediated via AMP-activated protein kinase/mTOR complex 1 signalling pathway, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 83, 84–96.
- Pardridge W. M., 2005, The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development, *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(1), 3–14.
- Pardridge W. M., 2012, Drug transport across the blood-brain barrier, *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(11), 1959–1972.
- Park, H., Yang, J., Lee, J., Haam, S., Choi, I. H., and Yoo, K. H., 2009, Multifunctional nanoparticles for combined doxorubicin and photothermal treatments. *ACS nano*, 3(10), 2919–2926.
- Pysz, M. A., Foygel, K., Rosenberg, J., Gambhir, S. S., Schneider, M., and Willmann, J. K., 2010, Antiangiogenic cancer therapy: monitoring with molecular US and a clinically translatable contrast agent (BR55), *Radiology*, 256(2), 519–527.
- Rahman, M., Hoh, B., Kohler, N., Dunbar, E. M., and Murad, G. J., 2012, The future of glioma treatment: stem cells, nanotechnology and personalized medicine, *Future oncology (London, England)*, 8(9), 1149–1156.
- Rayburn, E. R., Ezell, S. J., and Zhang, R., 2009, Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy, *Molecular and cellular pharmacology*, 1(1), 29–43.
- Petros, R. A., and DeSimone, J. M., 2010, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(8), 615–627.
- Philip, M., Rowley, D. A., and Schreiber, H., 2004, Inflammation as a tumor promoter in cancer induction, *Seminars in cancer biology*, 14(6), 433–439.
- Ricciotti, E., and FitzGerald, G. A., 2011, Prostaglandins and inflammation, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 986–1000.
- Rizzo, L. Y., Theek, B., Storm, G., Kiessling, F., and Lammers, T., 2013, Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications, *Current opinion in biotechnology*, 24(6), 1159–1166.
- Rundhaug, J. E., Simper, M. S., Surh, I., and Fischer, S. M., 2011, The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer, *Cancer metastasis reviews*, 30(3-4), 465–480.

- Sadat Tabatabaei Mirakabad, F., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Milani, M., Zarghami, N., Zeighamian, V., Rahimzadeh, A., Alimohammadi, S., Hanifehpour, Y., and Joo, S. W., 2014, PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems, *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 15(2), 517–535.
- Sarvepalli, S., Parvathaneni, V., Chauhan, G., Shukla, S. K., and Gupta, V., 2022, Inhaled Indomethacin-Loaded Liposomes as Potential Therapeutics against Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Pharmaceutical research*, 39(11), 2801–2815.
- Schagen, S.B., Tsvetkov, A.S., Compter, A., Compter A., and Wefel, J.S., 2022, Cognitive adverse effects of chemotherapy and immunotherapy: are interventions within reach? *Nat Rev Neurol*, 18, 173–185.
- Seko, I., 2020, *Polisorbat 80 kaplı, kurkumin ve dosetaksel yüklü plga nanopartiküller sistemlerinin geliştirilmesi ve beyin tümörü etkinliklerinin değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi.
- Shaikh, J., Ankola, D. D., Beniwal, V., Singh, D., and Kumar, M. N., 2009, Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), 223–230.
- Sipos, B., Csóka, I., Ambrus, R., Schelz, Z., Zupkó, I., Balogh, G. T., And Katona, G., 2022, Spray-dried indomethacin-loaded polymeric micelles for the improvement of intestinal drug release and permeability. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 174, 106200.
- Song, X. R., Cai, Z., Zheng, Y., He, G., Cui, F. Y., Gong, D. Q., Hou, S. X., Xiong, S. J., Lei, X. J., and Wei, Y. Q., 2009, Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles, *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), 300–305.
- Stark, L. A., Din, F. V., Zwacka, R. M., and Dunlop, M. G., 2001, Aspirin-induced activation of the NF-kappaB signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(7), 1273–1275.
- Sun, X., and Li, Q., 2018, Prostaglandin EP2 receptor: Novel therapeutic target for human cancers (Review), *International journal of molecular medicine*, 42(3), 1203–1214.
- Sung, Y. M., He, G., and Fischer, S. M., 2005, Lack of expression of the EP2 but not EP3 receptor for prostaglandin E2 results in suppression of skin tumor development, *Cancer research*, 65(20), 9304–9311.
- Taghizadehghalehjoughi, A., 2015, *Metformin hcl/irinotekan yüklü plga nanopartiküllerinin glioblastoma multiforme üzerindeki etkilerinin in vivo ve in vitro olarak değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi.

- Takahashi, T., Ichikawa, H., Morimoto, Y., Tsuneyama, K., and Hijikata, T., 2019, Inhibition of EP2/EP4 prostanoid receptor-mediated signaling suppresses IGF-1-induced proliferation of pancreatic cancer BxPC-3 cells via upregulating γ -glutamyl cyclotransferase expression, *Biochemical and biophysical research communications*, 516(2), 388–396.
- Takeuchi, I., Suzuki, T., and Makino, K., 2017. Skin permeability and transdermal delivery route of 50-nm indomethacin-loaded PLGA nanoparticles, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 159, 312–317.
- Takeuchi, K., and Amagase, K., 2018, Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract, *Current pharmaceutical design*, 24(18), 2002–2011.
- Teicher B. A., 2000, Molecular targets and cancer therapeutics: discovery, development and clinical validation, *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 3(2), 67–73.
- Türkyılmaz, M., Oruç-Hamavioğlu, E.İ., Dündar, S., Kavak-Ergün, A., Sevinç, E.A., Tütüncü, S., 2022, *Türkiye Kanser İstatistikleri 2018*, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı, Ankara.
- Upton, D. H., Ung, C., George, S. M., Tsoli, M., Kavallaris, M., and Ziegler, D. S., 2022, Challenges and opportunities to penetrate the blood-brain barrier for brain cancer therapy. *Theranostics*, 12(10), 4734–4752.
- Yamamoto, Y., Yin, M. J., Lin, K. M., and Gaynor, R. B., 1999, Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway, *The Journal of biological chemistry*, 274(38), 27307–27314.
- Yang, S. F., Chen, M. K., Hsieh, Y. S., Chung, T. T., Hsieh, Y. H., Lin, C. W., Su, J. L., Tsai, M. H., and Tang, C. H., 2010, Prostaglandin E2/EP1 signaling pathway enhances intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and cell motility in oral cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 285(39), 29808–29816.
- Ye, Y., Peng, L., Vattai, A., Deuster, E., Kuhn, C., Dannecker, C., Mahner, S., Jeschke, U., von Schönfeldt, V., & Heidegger, H. H., 2020, Prostaglandin E2 receptor 3 (EP3) signaling promotes migration of cervical cancer via urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(9), 2189–2203.
- Zeng, Y., Wang, X., Wang, J., Yi, R., Long, H., Zhou, M., Luo, Q., Zhai, Z., Song, Y., and Qi, S., 2018, The Tumorigenicity of Glioblastoma Cell Line U87MG Decreased During Serial In Vitro Passage, *Cellular and molecular neurobiology*, 38(6), 1245–1252.
- Zhang, W., Mehta, A., Tong, Z., Esser, L., and Voelcker, N. H., 2021, Development of Polymeric Nanoparticles for Blood-Brain Barrier Transfer-Strategies and Challenges, *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 8(10), 2003937.
- Wang, D., and Dubois, R. N., 2010, Eicosanoids and cancer, *Nature reviews. Cancer*, 10(3), 181–193.

- Wang, M. T., Honn, K. V., and Nie, D., 2007, Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression, *Cancer metastasis reviews*, 26(3-4), 525–534.
- Wang, Q., Morris, R. J., Bode, A. M., and Zhang, T., 2022, Prostaglandin Pathways: Opportunities for Cancer Prevention and Therapy, *Cancer research*, 82(6), 949–965.
- Xu, S., Zhou, W., Ge, J., and Zhang, Z., 2018, Prostaglandin E2 receptor EP4 is involved in the cell growth and invasion of prostate cancer via the cAMP-PKA/PI3K-Akt signaling pathway, *Molecular medicine reports*, 17(3), 4702–4712.
- Qin, S., Xu, C., Li, S., Yang, C., Sun, X., Wang, X., Tang, S. C., and Ren, H., 2015, Indomethacin induces apoptosis in the EC109 esophageal cancer cell line by releasing second mitochondria-derived activator of caspase and activating caspase-3, *Molecular medicine reports*, 11(6), 4694–4700.



ÖZGEÇMİŞ

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

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İnönü Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	12.06.2018

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler	
Ferhat BOSTANCI, Elif KANSIZ, Pınar OBAKAN-YERLİKAYA, Elif-Damla ARISAN, Ajda COKER-GURKAN. (2022). "Atiprimod Triggers Endoplasmic Reticulum Stress in Autocrine Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) Overexpressing MDA-MB-231 Cells", (Poster sunumu), International Cell Death Society meeting "Future of Cell Death in Basic Science and Translational Medicine". July 2-4, 2022, Koç University, İstanbul, Turkey.	