



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ABRAXANE'İN KANSER HÜCRELERİNİN  
HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Nurcan GÜRSES**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Radyobiyojoloji Programı**

**Danışman**

**Y. Doç. Dr. Mehmet Rifkı TOPÇUL**

**Haziran, 2013**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ABRAXANE'İN KANSER HÜCRELERİNİN  
HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Nurcan GÜRSES**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Radyobiyojoloji Programı**

**Danışman**

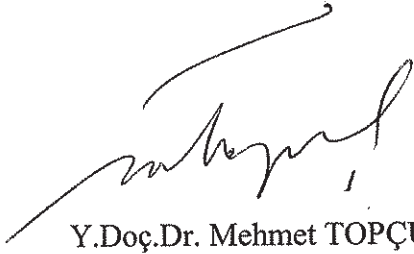
**Y. Doç. Dr. Mehmet Rifkı TOPÇUL**

**Haziran, 2013**

**İSTANBUL**

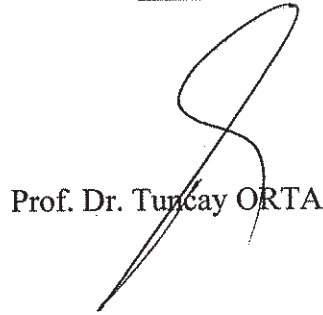
Bu çalışma 17/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Radyobiyojoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Y.Doç.Dr. Mehmet TOPÇUL

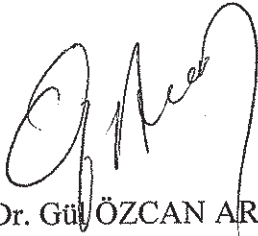
Danışman



Prof. Dr. Turçay ORTA



Prof. Dr. Kadriye AKGÜN DAR



Doç.Dr. Gül ÖZCAN ARICAN



Y. Doç.Dr Suna ÖZBAŞ TURAN

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin **26157** numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Kanser, uygarlığın gelişimine zıt yönde artan ve maalesef bir sınırlama olmadan büyük küçük herkesi etkileyen bir hastalıktır. Bilim hayatına adım attığım bu yüksek lisans çalışmasının bu hastalıktan muzdarip tüm insanlara yararlı olmasını ümit ediyorum.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren danışman hocam Sn. **Y. Doç. Dr. Mehmet TOPÇUL**'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Kullandığım ilaç yeni ve Türkiye'de henüz çok az kullanılan bir ilaç olduğundan dolayı temin etmek konusunda sıkıntı yaşamakta idim. İlaç temini konusunda benden yardımlarını esirgemeyen Sn. **Doç. Dr. Sezer SAĞLAM**'a teşekkürü borç bilirim.

Eğitim hayatım ve yaşamım boyunca sabır ve destekleri ile her zaman yanımda olan, bu günlere gelmemde çok emekleri olan değerli **aileme** sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

**Haziran, 2013**

**Nurcan GÜRSES**

| <b>İÇİNDEKİLER</b>  | <b>SAYFA NO</b> |
|---|-----------------|
| <b>ÖNSÖZ</b> .....  | <b>i</b>        |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....  | <b>ii</b>       |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....  | <b>v</b>        |
| <b>ÖZET</b> .....   | <b>viii</b>     |
| <b>SUMMARY</b> .....  | <b>ix</b>       |
| <b>1.GİRİŞ</b> .....  | <b>1</b>        |
| <b>2. GENEL KISIMLAR</b> .....  | <b>3</b>        |
| 2.1 SERVİKS .....   | 3               |
| 2.2 SERVİKS KANSERİ.....  | 4               |
| 2.3 HPV .....   | 4               |
| 2.4. KANSER.....  | 5               |
| 2.5. MİKROTÜBÜLLER.....   | 8               |
| 2.6.TUBULİN BAĞLAYICI AJANLARIN ANTİTÜMÖR ETKİLERİ.....                 | 9               |
| 2.7.TUBULİN BAĞLAYICI AJANLARIN ANTİVASKÜLER ETKİLERİ.....              | 10              |
| 2.8. ABRAXANE.....  | 11              |
| 2.9.APOPTOZ.....  | 14              |
| <b>3. MALZEME VE YÖNTEM</b> .....                                       | <b>16</b>       |
| 3.1 KULLANILAN HÜCRE SOYU .....   | 16              |
| 3.2 HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ .....                                       | 16              |
| 3.3 HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ.....   | 16              |
| 3.4 İLAÇ KONSANTRASYONLARI VE <sup>3</sup> H-TİMİDİN HAZIRLANMASI ..... | 17              |
| 3.4.1 İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....                       | 17              |
| 3.4.2 <sup>3</sup> H-Timidin Hazırlanması.....                          | 17              |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5 İLAÇ VE <sup>3</sup> H-TİMİDİN UYGULANMASI.....                        | 17        |
| 3.6 PREPARATLARIN HAZIRLANMASI VE FİKSASYON İŞLEMLERİ.....                 | 17        |
| 3.7 HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ.....                                      | 18        |
| 3.7.1 Mitotik İndeks.....  | 18        |
| 3.7.2 İşaretlenme İndeksi.....   | 19        |
| 3.7.2.1 Otoradyografi İşlemi.....  | 19        |
| 3.7.3 Apoptotik İndeks .....   | 19        |
| 3.7.4 İstatistik Değerlendirme.....  | 20        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>   | <b>21</b> |
| 4.1. MİTOZ.....  | 21        |
| 4.1.1 Optimum Doz Tayini.....  | 21        |
| 4.1.2. Optimum Doz Uygulaması (24-72 saat).....                            | 22        |
| 4.1.2. Morfolojik Değerlendirme.....                                       | 22        |
| 4.1.2.1. Işık Mikroskobu.....  | 22        |
| 4.1.2.2. Mitotik İndeks.....   | 23        |
| 4.2. <sup>3</sup> H TİMİDİN İŞARETLEME İLE DNA SENTEZİNİN SAPTANMASI ..... | 25        |
| 4.2.1. Morfolojik Değerlendirme.....                                       | 25        |
| 4.2.1.1. Işık Mikroskobunda İnceleme.....                                  | 25        |
| 4.2.1.2. İşaretlenme İndeksi .....   | 26        |
| 4.3. APOPTOZ.....  | 27        |
| 4.3.1. Morfolojik Değerlendirme.....                                       | 27        |
| 4.3.1.1. Işık Mikroskobu.....  | 27        |
| 4.3.1.2. Floresan Mikroskobu .....   | 27        |
| 4.3.1.3. Apoptotik İndeks.....   | 28        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>   | <b>30</b> |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>6. KAYNAKLAR .....</b> | <b>34</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>      | <b>39</b> |



## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 2.1:</b> Kadın genital sistemi.....  | 3  |
| <b>Şekil 2.2:</b> Kanserli hücrelerin özellikleri.....  | 6  |
| <b>Şekil 2.3:</b> Mikrotübül polimerizasyonu (Ahn, 2010).....   | 8  |
| <b>Şekil 2.4:</b> Antimitotik ilaçların bağlanma alanları (Ahn, 2010).....  | 10 |
| <b>Şekil 2.5:</b> Paklitaksel.....  | 12 |
| <b>Şekil 4.1:</b> Abraxane'ın üç farklı dozunun ( $D_1=10$ nM, $D_2=50$ nM, $D_3=100$ nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde mitoz bölünme yüzdeleri.....                   | 22 |
| <b>Şekil 4.2:</b> HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından 24 saat sonra oluşan tripolar metafaz görüntüsü (x100; Feulgen).....                                      | 23 |
| <b>Şekil 4.3:</b> HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından sonra mitoz bölünmenin ışık mikroskopunda görüntüsü (x100; Feulgen).....                                  | 24 |
| <b>Şekil 4.4:</b> Abraxane'ın $D_2$ dozunun ( $D_2=50$ nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda Mitotik İndeks değerleri (%) ( $\pm$ SD).....    | 24 |
| <b>Şekil 4.5:</b> HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından sonra DNA sentezinin ışık mikroskopunda görüntüsü (x100; Feulgen).....                                    | 25 |
| <b>Şekil 4.6:</b> HeLa hücre kültürlerinde Abraxane'ın $D_2=50$ nm dozunun 24, 48 ve 72. saatlik uygulama süresi sonunda meydana getirdiği İşaretlenme İndeksi değerleri..... | 26 |
| <b>Şekil 4.7:</b> HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından sonra apoptozun ışık mikroskopunda gösterimi (x100, Feulgen).....   | 27 |
| <b>Şekil 4.8:</b> HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından sonra apoptozun floresan mikroskopunda gösterimi (x100; DAPI).....  | 28 |
| <b>Şekil 4.9:</b> HeLa hücre kültürlerinde Abraxane'ın $D_2=50$ nM dozunun 24, 48 ve 72. saatlik uygulama süresi sonunda meydana getirdiği Apoptotik İndeks değerleri.....    | 29 |

## TABLO LİSTESİ

Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 4.1</b> : Abraxane'in üç farklı dozunun ( $D_1=10$ nM, $D_2=50$ nM, $D_3=100$ nM uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde mitoz bölünme yüzdeleri( $\pm$ SD).....          | 21 |
| <b>Tablo 4.2</b> : Abraxane'in $D_2$ dozunun ( $D_2=50$ nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda Mitotik İndeks değerleri (%) ( $\pm$ SD).....     | 24 |
| <b>Tablo 4.3</b> : Abraxane'in $D_2$ dozunun ( $D_2=50$ nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda İşaretlenme İndeksi değerleri (%)( $\pm$ SD)..... | 26 |
| <b>Tablo 4.4</b> : Abraxane'in $D_2$ dozunun ( $D_2=50$ nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda Apoptotik İndeks değerleri (%)( $\pm$ SD).....    | 28 |

## SEMBOL LİSTESİ

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>ABI-007</b>           | :Abraxane                                   |
| <b>AI</b>                | :Apoptotik İndeks                           |
| <b>Cr-EL</b>             | :Cromophor-EL (Polietoksillenmiş hint yağı) |
| <b>DAPI</b>              | :4'-6-diamino-2-fenilindol                  |
| <b>DEHP</b>              | :di(2-ethylhexyl)phthalate                  |
| <b>DNA</b>               | :Deoksiribonükleik asit                     |
| <b>EPR</b>               | :Artırılmış geçirgenlik ve tutma etkisi     |
| <b>FBS</b>               | :Fetal bovine serum                         |
| <b>FTS</b>               | :Fizyolojik tuzlu su                        |
| <b>HBV</b>               | :Hepatit B virus                            |
| <b>HCl</b>               | :Hidroklorik asit                           |
| <b>HPV</b>               | :İnsan papilloma virus                      |
| <b>IC50</b>              | :Yarı öldürücü doz                          |
| <b>LI</b>                | :İşaretlenme indeksi                        |
| <b>M-199</b>             | :Medium-199                                 |
| <b>MI</b>                | :Mitotik indeks                             |
| <b>mM</b>                | :Milimolar                                  |
| <b>nab-paklitaksel</b>   | :Nanopartikül albümin bağlı paklitaksel     |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b> | :Sodyum bikarbonat                          |
| <b>nm</b>                | :Nanometre                                  |
| <b>nM</b>                | :Nanomolar                                  |
| <b>pRb</b>               | :Retinoblastoma proteini                    |
| <b>PBS</b>               | :Fosfat tampon solüsyonu                    |
| <b>RNA</b>               | :Ribonükleik asit                           |

## ÖZET

### ABRAXANE'IN KANSER HÜCRELERİNİN HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Nanoteknoloji; maddeyi atomik ve moleküler seviyede kontrol etme bilimidir. Tıpta hastalık teşhis ve tedavilerinde nanoteknolojiden sıklıkla yararlanılmaktadır. Günümüzde tıptan mühendisliğe kadar birçok alanda uygulanan Nanoteknoloji, birçok bilimin bir araya getirilmesi ile oluşturulmuş disiplinler arası bir bilim dalıdır. Tedavisi mevcut teknolojilerle başarısız olan birçok hastalık için umut ışığı olmuştur. Nanoteknolojinin bu özelliğinin yanında günümüz ve geleceğin teknolojisi olması bizi bu alanda çalışmaya yönlendirmiş ve bu tez konusunu planlamamızı sağlamıştır.

Çağımızın en yaygın hastalığı olan kanser tedavisi zor bir hastalık grubudur. Kemoterapi sitotoksik ilaçlarla yapıldığı için özel bir uzmanlık konusudur ve etkili dozlarda fakat hastayı yan etkilerden koruyarak yapılması gerekmektedir. Kanser tedavisinde en önemli sorun olan sitotoksik ilaçların hastalarda oluşturduğu ağır yan etkilerin en aza indirilmesi ve ilacın etkinliğinin artırılması için kanser ilaçlarının geliştirilmesinde nanoteknolojiden yararlanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında nanoteknolojik bir ilaç olan Abraxane (Celgene, ABD)'in insan serviks kanseri hücre hattı (HeLa) hücreleri üzerine etkisi *in vitro* ortamda araştırılmıştır.

Nanoteknolojik olarak hazırlanmış, Paclitaxel'in albümin kaplı bir türevi olan Abraxane (Celgene, ABD) M-199 ile sulandırılarak  $D_1= 10$  nM,  $D_2= 50$  nM,  $D_3= 100$  nM dozları hazırlanmış ve hayvan doku kültürü ortamındaki insan serviks kanseri hücreleri (HeLa)'ne 24, 48 ve 72 saat sürelerince uygulanmıştır. İlaç uygulanmasından sonra hücre kinetiği parametrelerinden, Mitotik İndeks, Apoptoz İndeksi ve İşaretlenme İndeksi değerlendirilerek ilacın hücreler üzerinde meydana getirdiği değişimler analiz edilmiştir.

Mitoz indeksinde dozlar arttıkça mitoz bölünmenin arttığı, ancak saatler arttıkça azaldığı saptanmıştır. Bu bulgu ilacın hücre bölünmesini mitoz fazında tuttuğunu ya da hücre bölünmesine ket vurduğunu göstermektedir. Ayrıca mitoz preparatlarında normal hücrelerde görülmeyen tripolar metafaz plaklarına rastlanmıştır.

İşaretlenme indeksinde kontrol grubunun 72. saatte sentez yüzdesi % 4.62 iken, 50 nM'lık doz uygulanan deney grubunda % 0.08 olarak saptanmış ve ilacın HeLa hücrelerinde DNA sentezini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür.

Apoptoz indeksinde apoptoz oranının saatler ilerledikçe arttığı ve 72. Saatte kontrol grubunda % 10.6 iken 50 nM'lık doz uygulanan deney grubunda % 30 olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen bulguların klinik araştırmada farklı tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

## **SUMMARY**

### **THE EFFECTS OF ABRAXANE ON CELL KINETIC PARAMETERS OF CANCER CELLS**

Nanotechnology is the science of controlling matter at the atomic and molecular level. Nanotechnology is often used in diagnosis and treatment of diseases in medicine.

Nanotechnology is an interdisciplinary branch of science formed through combination of a lot of science branch. For the treatment of many diseases that not achieved within the available technologies, it has been a beacon of hope. Besides this feature, because of it has been present and future technology, nanotechnology had led us to work in this area and led to planning the subject of this thesis.

The most widely diseases of our time, the cancer is a group of disorders that difficult to treat. Chemotherapy is a special expertise on the subject of cytotoxic drugs, it has to apply effective doses, but the patient must be protected from side effects. The most important problem with the treatment of cancer is severe adverse effects of cytotoxic drugs. Nanotechnology is used to develop the cancer drugs to minimize the adverse effects of cancer drug and increase the effectiveness of the drug.

In this thesis study, we used Abraxane (Celgene, USA) which is a derivate of Paclitaxel that albumin bound with nanotecnological methods.  $D_1= 10$  nM,  $D_2= 50$  nM,  $D_3= 100$  nM doses of Abraxane was prepared by diluting Abraxane with M-199 and applied on human cervical cancer cells (HeLa) in animal tissue culture media at 24, 48 and 72. hours. The parameters of the cell kinetic, mitotic index, apoptotic index and labelling index were analyzed by evaluating the changes caused by the drug on cells.

It was determined that mitosis increased with increasing doses and mitosis decreased with an increasing time in mitotic index. This showed that the drug may cause arrest cell division at the mitosis phase. Additionally, tripolar metaphase plates were seen in mitosis preparations.

In labelling index, 50 nM dose of Abraxane decreased DNA synthesis to 0.08 % while the percentage of DNA synthesis was 4.62 % in control groups at 72 h. The drug was caused a decrease in the DNA synthesis of the HeLa cells significantly.

In apoptotic index, 50 nM dose of Abraxane increased apoptosis to 30% while the percentage of apoptotic cells 10.6% in control groups at 72 h.

The findings of this study is to contribute to the development of clinical trials of different treatments.

## 1.GİRİŞ

Kanser, hücrelerde DNA hasarı sonucu kritik hücre düzenleyici genlerin mutasyona uğraması ile hücrelerin kontrolsüz ve anormal büyümesi ve çoğalmasdır. Kanserler kontrolsüz büyüme ve vücudun diğer dokularına yayılım göstermeleriyle karakterize edilmektedir. Kanser hücreleri çok sayıda modifikasyon geçirir ve en saldırgan olanlar diğer hücrelerin yerini alır. Bu nedenle kanser tedavisi zor bir hastalıktır. Hastalara tedavi amaçlı bir ilaç verildiğinde hayatta kalan az sayıda hücre ilaca karşı direnç geliştirmiş olanlardır. Bu hücre grubu kanserin yeniden ve eskisinden daha kötü bir biçimde başlaması için yeterli olur.

Kanser ölüm nedeni olarak kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen kanser türü jinekolojik kanserlerdir. Jinekolojik kanserler içinde ilk sırayı serviks kanseri almaktadır.

Rahimin 1/3 'lük alt kısmına serviks (rahim ağzı) denir. Serviks, uterus (rahim) ve vajinayı (doğum kanalı) birleştiren üreme sisteminin bir parçasıdır. Menstruasyon sırasında gerilerek endometrium tabakasının atılmasını, semenin uterusu aktarılmasını, doğum esnasında açılarak doğumun gerçekleşmesini, hamilelik esnasında ise bebeğin uterusu kalmasını sağlar.

İki kısımdan oluşur: İç kısım vajinaya yakın endoserviks ve dış kısım ektoservikstir. Çoğu servikal kanser bu iki tabakanın birleştiği alanda başlamaktadır.

Serviks kanserinde temel risk faktörü İnsan Papilloma Virüs (HPV)'dir. Sigara, HIV ile enfekte olma, doğum kontrol haplarının uzun süre kullanımı, çok doğum sayısı ve yaş riski artıran faktörlerdir.

Nano; metrenin milyarda birine karşılık gelen bir büyüklük birimidir. Atomik düzeylere inildikçe maddelerin makromoleküler özellikleri değişir. Nanoteknoloji; maddeleri atomik ve moleküler düzeyde inceleme, kontrol etme bilimidir. Nanobiyoteknoloji ise, canlı hücrelerin milyarlarca yıllık evrimi sırasında şekillenmiş nano-yapıları ve nano-makineleri, yani DNA, RNA, lipitler, proteinler, polisakkaritleri, bunların birbiri ile etkileşimlerini ve hareketlerini araştırır. Öte yandan Nanoteknoloji bu yapıları ve

etkileşimleri daha dayanıklı, daha hızlı hareket eden, istendiği zaman planlanmış hedefe varacak materyaller ve yapılar kullanarak taklit etme ile ilgilenen bir bilimdir.

Kemoterapi ilaçları sitotoksik etki gösteren ilaçlardır. Bu ilaçlar sağlıklı ve kanserli hücreleri ayırt etmeden tüm hücreleri öldürme eğilimindedir. Bu sebeple tümör tedavisinin yanı sıra istenmeyen etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkileri minimuma indirmek, ilacın etki düzeyini artırmak için kanser ilaçları geliştirilirken nanoteknolojiden faydalanılmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar çeşitli nanopartiküllerle kaplanarak hedef bölgeye gönderilir ve hedef bölgeye vardığında ilaç salınımı gerçekleştirilerek hem ilacın çeşitli enzimlerden etkilenecek etkinliğinin azalması önlenir, hem de tümör bölgesine ilacın tamamı ulaşarak maksimum derecede etki elde edilir. Böylece kanser tedavisindeki sınırlamalar ortadan kaldırılmış olur.

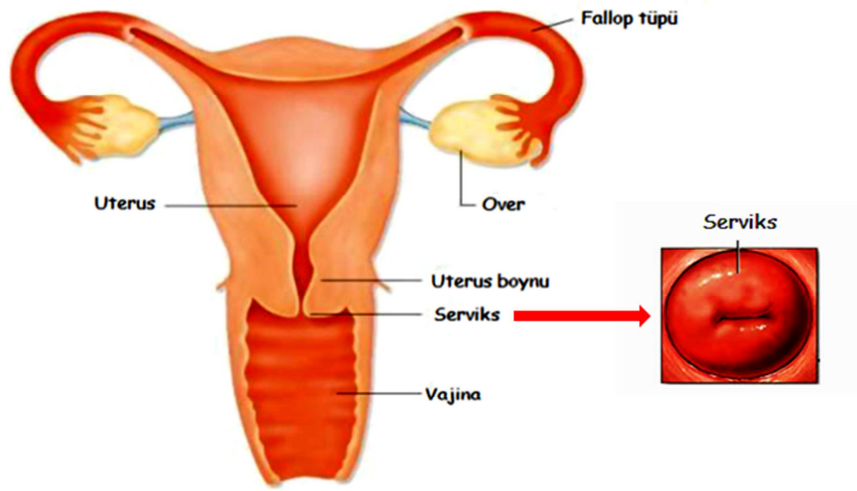
Hücre hareketi, hücre bölünmesi, hücre içi madde taşınması, hücresel yapının sağlanması gibi biyolojik işlevlerde rol alan mikrotübüller, antikanser ilaçların esas hedefi konumundadır.

Bu tez çalışmasında kullanmış olduğumuz Abraxane, meme, over, akciğer ve Kaposi sarkoma gibi kanserlerin tedavisinde kullanılan, nanoteknolojik yöntemle hazırlanmış bir kemoterapi ajanıdır. Porsuk ağacı (*Taxus brevifolia*) kabuğundan elde edilen ve mikrotübüller üzerine etki eden bir mitoz inhibitörü olan Paclitaxel'in albümin proteini ile bağlanması ile elde edilmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1 SERVİKS

Serviks, uterusun vajinaya açılan 1/3'lük dar, alt kısmını oluşturmaktadır (Şekil 2.1). Serviks kelimesi Latince boyun kelimesinden gelmektedir ve uzun, silindir şekilli bir geçittir. Menstruasyon sırasında gerilerek endometrium tabakasının atılmasını, semenin uterusu aktarılmasını, doğum esnasında açılarak doğumun gerçekleşmesini, hamilelik sırasında ise bebeğin uterusu kalmasını sağlamaktadır (Spencer, 2007).



Şekil 2.1: Kadın genital sistemi.

Serviks yüzeyi kolumnar epitel hücreleri ve squamoz epitel hücreleri olmak üzere iki farklı tipte hücre içermektedir. Serviks kanserlerinin büyük çoğunluğu squamoz hücre kökenli olmasına rağmen her iki hücre çeşidi de HPV ile enfekte olabilmekte ve serviks kanseri oluşabilmektedir (Spencer, 2007).

Serviks kanseri serviks hücreleri kontrolsüz bölünmeye başladığında ortaya çıkmaktadır (Spencer, 2007).



## 2.2 SERVİKS KANSERİ

Serviks kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanserler arasında meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Kadın genital kanserleri arasında tarama programı olması nedeniyle teorik olarak önlenebilir bir kanser olmasına rağmen özellikle gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde, genç yaştaki kadınlarda önemli bir mortalite sebebidir (Özer ve diğ., 2012) (Güner ve diğ., 2007).

İlk kez George Papanicolaou tarafından tıp dünyasına tanıtılan ve 1945'te Amerikan Kanser Derneği'nin tarama testi olarak önerdiği Pap smear'in kullanımı sonucu preinvaziv lezyonların erken tanısı ile serviks kanseri insidansında ve mortalite oranlarında önemli ölçüde düşme sağlanmıştır (Özer ve diğ., 2012).

## 2.3 HPV

Human Papilloma Virüs (HPV), yassı epitel hücre çekirdeğinde replikasyon gösteren, çift sarmallı DNA içeren, sferik protein bir kapside sahip, zarfsız bir virüstür. HPV konakçı hücre içinde sentezlediği onkojenik proteinler ile malign transformasyona yol açmaktadır. Özellikle E6 ve E7 proteinleri, p53 ve pRb tümör süpresör genleri ile kompleks yaparak, hücrenin ölümsüzleşmesine ve kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır. HPV ile servikal kanser arasında %99.9 oranında nedensel bir ilişki saptayan Harald zur Hausen, 2008 Nobel Tıp Ödülünü almıştır (Anonim-a) (Onan, 2009)

Papillomaviridae ailesinde yer alan HPV tipleri, çıplak, ikozahedral (küp biçiminde) simetrik, yaklaşık 55 nm çapında virüslerdir. Çift iplikli çembersel DNA'dan oluşan 8 kb büyüklüğündeki genom; virüsün replikasyonunda ve hücre transformasyonunda rol oynayan erken proteinler (E1, E2, E4, E5, E6, E7) ile kapsid yapısını oluşturan geç proteinleri (L1, L2) kodlar. HPV DNA'sının konak hücre kromozomuna integrasyonu, virüsün kalıcılığı ve karsinojenik etkileri için önem taşımaktadır (Avcı Alp, 2012).

Servikal kanser hücrelerinin çoğunda HPV integrasyonu genellikle E2 gen bölgesinde kırılmaya neden olmakta ve bu durum E6 ve E7 onkogenlerinin ekspresyonunda artışa yol açmaktadır. Özellikle HPV-16 ve HPV-18 gibi yüksek riskli tiplerin E6 ve E7 proteinleri, sırasıyla p53 ve retinoblastoma proteini (pRb) gibi tümör baskılayıcı

proteinler ile etkileşip onların fonksiyonlarını inhibe etmekte; böylece hücre çoğalmasının kontrolünü bozmakta ve hücrelerin ölümsüzleşmesine neden olmaktadır. E6 proteininin p53'e bağlanması hücrenin G1 fazında tutulmasına, apoptoz ve DNA tamirinin durdurulmasına yol açmaktadır. E7 proteini ise, pRb ve siklin-E gibi mitotik interaktif hücre proteinleri ile ilişkiye girerek, hücre DNA sentezi ve hücre çoğalmasının uyarılmasında rol oynamaktadır (Avcı Alp, 2012).

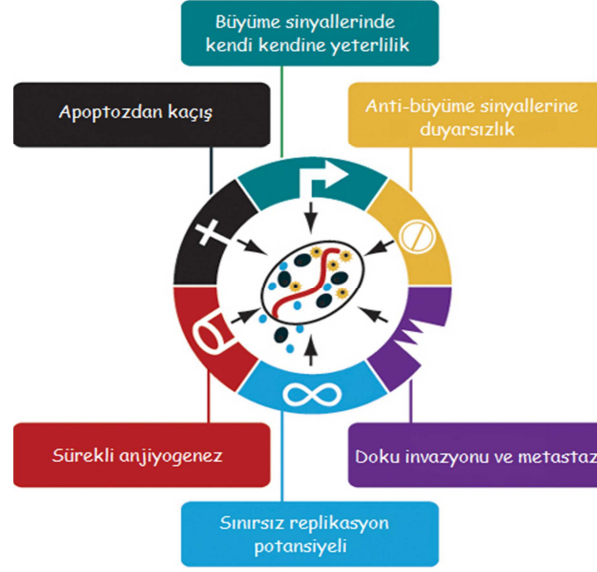
Virüs insanda primer olarak skuamöz epitel hücreleri ve mukozayı enfekte etmekte; deri ve mukozalarda bazal tabakalardan başlayarak çeşitli lezyonlar oluşturmaktadır. Düşük riskli HPV tipleri (özellikle HPV-6 ve HPV-11) genital siğiller ve rekürren larengeal papillomatoz gibi benign lezyonlara neden olurken, yüksek riskli HPV tipleri servikal, vajinal, vulvar, anal, penil ve orofarengeal karsinomayı da içine alan çeşitli kanserlerin gelişiminde doğrudan ya da dolaylı olarak rol oynayabilmektedir (Avcı Alp, 2012).

#### **2.4. KANSER**

Kanser hücre çoğalması ve hücre ölümüne yol açan dengenin bozulmasına yol açan gen anlatımlarındaki çoklu değişimlerin neden olduğu anormal bir büyümedir ve eğer tedavi edilmezse sonuçta dokuları istila edebilen ve metastaz yapabilen hücrelerin gelişimine neden olarak hastanın ölümüne neden olmaktadır.

Kanser, hücrelerde DNA hasarı sonucu kritik hücre düzenleyici genlerin mutasyona uğraması ile hücrelerin kontrolsüz ve anormal büyümesi ve çoğalmasıdır.

Kanser, hücrelerin sürekli olarak birikmesi ile karakterize edilen bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşmektedir. Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuçta hücreler devamlı birikmektedir. Bu dengesizlik, hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımadığı ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır (Lowitz ve diğ., 2012).



**Şekil 2.2:** Kanserli hücrelerin özellikleri.

Kanser hücrelerinin bazı benzersiz özellikleri şunlardır:

**1. Klonal orijin:** Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğmaktadır. Bazı kanserler birden fazla sayıda malign klonlardan doğmaktadır. Bu klonlar ya bir saha hasarı “field defect” sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücrelerinin karsinojene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtsal defektler sonucu oluşmaktadır.

**2. İmmortalite:** Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünebilmekte ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluşturmaktadırlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalırlar. Fakat, kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler, telomeraz enziminin etkisiyle yenilenmektedirler. Bu enzim normal olarak hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalmaktadır. Tamamıyla diferansiye olmuş bir hücre istirahat “senescent” durumuna girmekte ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölmektedir. Oysa, birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürmekte veya aktive edilmektedir. Sonuçta, telomerlerin uzunluğu sabit kalmakta ve hücre sınırsız sayıda çoğalmaktadır.

**3. Genetik instabilite:** Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA “mismatche”lerini tanımadaki defektlerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açmaktadır. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluşturmaktadır. Bu klonların ayrıca yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artmakta ve böylece metastaz yapmaktadır.

**4. Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı:** Kültür ortamında büyüyen normal hücreler, hücrelerin normalde yapıştığı substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde (“monolayer”) doldurduklarında (konfluent hale geldiklerinde) da bölünme özelliklerini kaybetmektedir. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını (nütrientleri) ihtiva etse bile bölünmemektedir. Kanser hücreleri ise, yarıkatı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye (büyümeye) devam edebilmekte, hatta hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyüme devam edebilmektedirler.

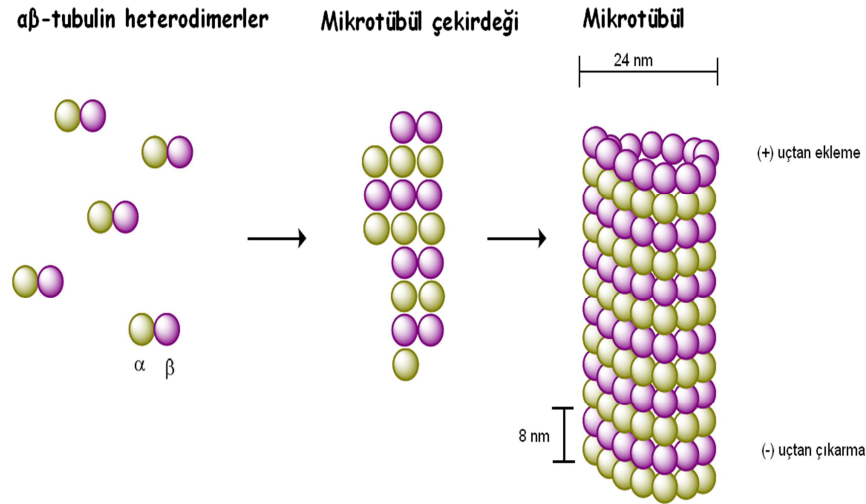
**5. Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve nutrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı:** Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini devamlı tüketiyor olmalarına rağmen büyüme devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler.

**6. Metastaz:** Benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücrel proteinlerin kaybı yada anormalliklerinden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metalloproteaz (kollejenazlar) gibi bazı enzimlerle bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşmektedir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır (Lowitz ve diğ., 2012).

## 2.5. MİKROTÜBÜLLER

Mikrotübüller hücre iskeletinin kritik öneme sahip bileşenleridir. Mikrotübüller doğrusal protofilamentlerin içinde bulunan  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimerlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.3). Bu mikrotübüller, (+) ucuna  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimerlerin eklenmesi veya (-) ucundan çıkarılmasıyla büyüyebilmekte ya da küçülebilmektedirler (Şekil 2.3). Mikrotübüller ve  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimerler arasındaki bu içsel dinamik denge mikrotübüllerin fonksiyonel çeşitliliğinde çok önemli bir rol oynamaktadır.

Mikrotübüller hücre bölünmesi, hücre şeklinin korunması, hücre sinyalizasyonu, hücre göçü ve hücre taşıma gibi çok çeşitli hücre süreçlere dahil olmaktadır (Jordan ve diğ., 2004).



Şekil 2.3: Mikrotübül polimerizasyonu (Ahn, 2010).

Mitotik iğ kanser kemoterapisi için önemli bir hedeftir. Antimitotik ajanlar mikrotübülleri stabilize ya da destabilize ederek mikrotübül fonksiyonunu baskılamaktadır. Tübülün inhibitörleri hücre siklusunda mitoz fazında hücre tutulmayı indüklemekte ve apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır (Ahn, 2010).

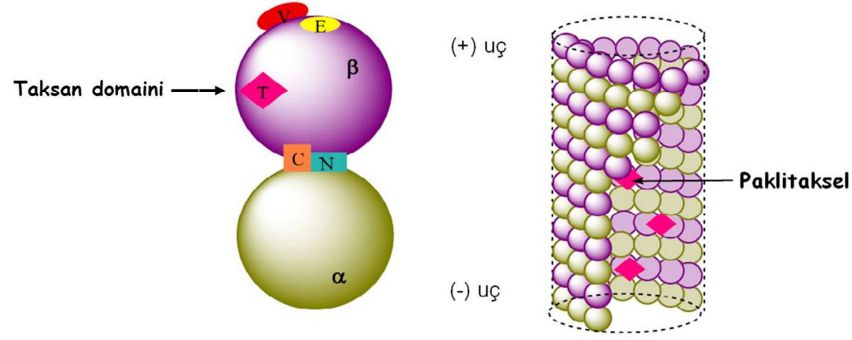
Mikrotübüller mitoz esnasında kromozomların uygun şekilde ayrılmasını sağlayan mitotik iği oluşturduğu için antimitotik ilaçlar "iğ zehirleri" olarak bilinmektedir. Antimitotik ajanlar ya  $\alpha\beta$ -tubulin heterodimerler ya da polimerize mikrotübüller ile

etkileşime girmekte ve böylece dinamik dengeyi engellemektedir. Antimitotik ilaçlarla polimerizasyona müdahale, mikrotübüllerin çözülmesini indükleyerek mikrotübüllere bağlı hücre fonksiyonları bozmaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelerden daha sık bölündükleri ve bu nedenle mitotik zehirlere karşı savunmasız evreden daha sık geçtikleri için bu ilaçlara karşı normal hücrelerle karşılaştırıldıklarında nispeten daha duyarlıdırlar (Ahn, 2010).

Tubulini hedefleyen ilaçlar genellikle iki temel kategoride sınıflandırılmaktadır: Mikrotübül stabilize edici ajanlar ve mikrotübül destabilize edici ajanlar. Mikrotübül kararsızlaştırıcı ilaçlar mikrotübül polimerizasyonunu inhibe etmekte ve vinka alkaloidleri, cryptophycins, halichondrins, estramustine, kolşisin, ve combretastatins gibi çeşitli bileşikler içerimektedir. Mikrotübül stabilize edici ajanlar mikrotübül depolimerizasyonunu bloke etmekte ve paklitaksel, docataksel, epotilonlar, diskodermolid, eleuterobinler, sarkodiktinler, laumalid, rhazinalam ve bazı steroidler ve poliizoprenil benzofenonları içermektedir. Mikrotübül stabilize edici ajanlardan olan Paklitaksel, ovaryum, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları ve Kaposi's sarkoma için klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak insan kemoterapisinde tubulin inhibitörleri periferel nörotoksisite, düşük biyoyararlılık, zayıf çözünürlük, karmaşık sentez prosedürleri ve çoklu ilaç direnci taşıyıcıları ile ilaç direnci ve tubulin mutasyonları gibi sınırlılıklara sahiptir. Bu sorunlarla savaşmak üzere yeni nesil antimitotik ajanları geliştirmek için aktif çaba harcanmaktadır (Ahn, 2010).

## **2.6.TUBULİN BAĞLAYICI AJANLARIN ANTİTÜMÖR ETKİLERİ**

Tubulin bağlayıcı ajanların antitümör etkileri birçok ardışık hücresel olaylara bağlıdır. İlk önce ilaç tubuline bağlanmaktadır. Bunu yaparken, ilaç mikrotübül ağını bozmakta ve hücreyi mitozda durdurmaktadır. Sonuçta, hücre siklusu durması apoptoz sinyalizasyon yollarını indüklemektedir. Üç temel bağlanma domaini tanımlanmıştır: vinka domaini, taksan domaini ve kolşisin domaini. Taksan domaini mikrotübül duvarının iç yüzünde  $\beta$  monomerin ortasındadır (Ahn, 2010).



**Şekil 2.4:** Antimitotik ilaçların bağlanma alanları (Ahn, 2010).

Taksanlar gibi stabilize ediciler mikrotubullerin yoğunluğunda bariz bir artış ile birlikte mikrotubul stabilizasyonuna neden olmaktadır. Ek olarak aneuploid ve poliploid hücrelerin oluşumu da rapor edilmiştir. Tübülün bağlayıcı ajanlar tarafından mikrotübül ağının bozulmasının iç-mikrotübül dinamiklerini inhibe ettiği, bunun sırasıyla kinetokor gerginliği ve kromozom ayrılması için sinyal bozulmasına neden olarak kromozomların yanlış eşleşmesine neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle iç oluşumuna müdahale, metafazdan anafaza geçişi inhibe ederek G<sub>2</sub>/M fazında hücre tutulmasıyla sonlanır. G<sub>2</sub>/M tutulması apoptoz ile sonuçlanır, ancak mikrotübül ağı bozulması ve apoptoz indüklenmesi arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan birçok *in vitro* çalışma tübülün inhibitörlerinin antimitotik etkilerinin muhtemelen mitokondriyal fonksiyon üzerinde daha direkt bir etkisi olduğunu göstermiştir (Ahn, 2010).

## 2.7.TUBULİN BAĞLAYICI AJANLARIN ANTİVASKÜLER ETKİLERİ

Tümör hücre büyümesini inhibe etme yeteneğine ek olarak, tübülün bağlayıcı ajanlar, antianjiyogenik ve damar bozucu özelliklerinin de dahil olduğu potansiyel tümör seçici antivasküler etkileri nedeniyle büyük ilgi yaratmıştır. Düşük molekül ağırlıklı ilaçlar, hızlı tümör seçici damar bozucu özellikleri ile damar bozucu ajanlar olarak sınıflandırılır ve mikrotübül destabilize ediciler damar bozucu ajanların en büyük ailesi olarak kabul edilir. Bu etkilerin hücresel ve moleküler mekanizmaları açıkça tanımlanmamış olmasına rağmen damar içi yapışık bağlantıların bozulması damar bozucu ajanların temel mekanizmalarından biri olarak kabul edilir. Tümör kan damarlarının hassas ve gelişmemiş doğası, bu ajanların tümörler üzerindeki seçici etkilerinin bir nedeni olduğunu öne sürmektedir. Damar bozucu ajanların düşük konsantrasyonları (toksik olmayan dozlar) terapötik anjiyogenik etkileri ile ilişkili olan

*in vitro* endotel hücre proliferasyonu, hücre göçü, hücre-hücre etkileşimi inhibisyonu göstermiştir (Ahn, 2010).

Son yıllarda kanserin etiolojisi ile ilgili bilgiler giderek artmaktadır (Hanahan ve diğ., 2000).

Malign transformasyon ve tümörögenезin kalbi olan süreçlerin anlaşılması birçok yeni sınıf antitümör terapötiklerin geliştirilmesine yol açmıştır. Klasik kemoterapötik ajanlara (Doksorubisin, Sisplatin, Paklitaksel gibi) ek olarak bu moleküler olarak hedeflenmiş ajanlar (büyüme faktörü reseptörü inhibitörleri, proteozom inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri ve antianjiyogenik ajanlar gibi) bazı kanser işaretlerine (hallmark) daha seçici etki yetenekleri ile terapötik cephaneliği zenginleştirmişlerdir (Lammers ve diğ., 2008).

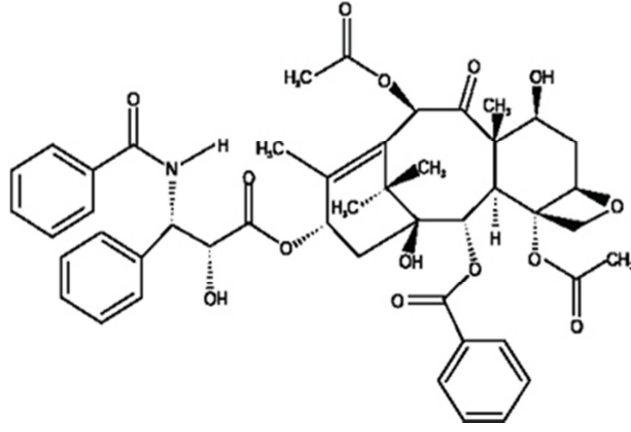
Bazı ikinci jenerasyon ajanların, klasik kemoterapötiklerle paylaştığı, önemli ancak gözardı edilen özellikleri intravenöz uygulamada olumsuz biyodağılımdır. Bu ajanlar genellikle sirküasyondan hızlıca temizlenir ve çok küçük bir kısmı tümör alanına ulaşır. Bazı durumlarda tümöre ulaşma yeterli değildir, ilaç tümörden çok hızlı temizlenebilir ve kuvvetli terapötik etki göstermesine yetecek kadar uzun süre mevcut olmayabilir. Ayrıca ilacın fizyokimyasal özellikleri ilacın hedef hücrelere girmesini zorlaştırabilir. Tümör hedeflenmiş nanoilaçlar onkolojide, bu limitlerin üstesinden gelerek ilaç performansını artırmak için geliştirilmektedir. En çarpıcı özellikleri bir ilacı tümör alanına hedefleme, böylece tümöral ilaç seviyelerini artırma (alan-spesifik dağılım) ve/veya bir ilacı bu ilacın toksik etkilerine özellikle duyarlı vücut bölgelerinden doğrudan uzak tutma (alan- kaçınma dağılım; normal dokularda düşük hasarı hedefleme) yetenekleridir (Lammers ve diğ., 2008).

## 2.8. ABRAXANE

Taksan sınıfı bileşiklerden olan paklitaksel son yılların en önemli kanser kemoterapötiklerindedir. Mikrotübüllerin stabil halde kalmasını sağlayan paklitaksel, ilk defa ABD'de yetişen *Taxus brevifolia Nutt.* (pasifik porsuk ağacı)'nın kabuğundan 1967 yılında elde edilmiş ve ABD Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından tanımlanmıştır. Preparatı **Taxol®** (Bristol-Myers Squibb Company, New York, NY) olarak



isimlendirilirken etken maddesine **Paclitaxel** adı verilmiştir (Şekil 2.5). Bu yıldan sonra üzerinde yapılan yoğun çalışmalar sonucunda Taksol, 1983 yılında faz I, 1985 yılında faz II çalışmalarına alınmıştır. Taksol, FDA tarafından 1992 yılı içinde ovaryum ve 1994 yılında meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır (Erdemoğlu ve diğ., 2000) (Park ve diğ., 2008).



Şekil 2.5: Paklitaksel.

Paklitaksel, antitümör etkilerini, hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotübül toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir (Erdemoğlu ve diğ., 2000).

Tübülün polimerizasyonunu teşvik eden mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlayarak hücre bölünmesi için gerekli dinamikleri bozmaktadır (Lin ve diğ., 2012).

Mikrotübül sisteminin dinamik dengesini bozmakta ve hücreleri, hücre siklusunun geç G<sub>2</sub> ve M fazında bloke etmekte, böylece hücre replikasyonunu inhibe ederek kanser hücrelerini öldürmektedir (Danhier ve diğ., 2009) (Park ve diğ., 2008). Ayrıca apoptoz tarafından takip edilen bcl-2 fosforilasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Danhier ve diğ., 2009).

Paklitaksel, primer epitelial over, kolon, baş, boyun, küçük hücreli olmayan akciğer ve metastatik meme kanserini içeren çeşitli kanserlerde kullanılan bir ilaçtır. Hidrofobikliği

ve sulu çözeltilerde zayıf çözünürlüğü (0.5 mg/L'den az) nedeniyle genellikle Cremophor EL (polietoksillenmiş hint yağı) dehidre etanol gibi katkı maddelerinin yüksek oranları ile formüle edilmekte olan Paklitaksel formülasyon sorunlarından muzdarip ilaçların bir örneğidir (Brannon-Peppas ve diğ., 2004) (Park ve diğ., 2008).

Cremophor EL, aşırı duyarlılık, nefrotoksisite, nörotoksisite, endotelial ve vasküler kaslarda vazodilasyon, nefes darlığı ve hipotansiyon gibi yan etkilere sebep olmaktadır (Danhier ve diğ., 2009). Buna ek olarak Paklitaksel Cremophor miselleri tarafından saklanmakta ve sistemik maruziyeti uzatarak ilaç toksisitesini artırmaktadır (Desai, 2008).

Birçok ilaç, hedef reseptöre afinite gösteren lipofilik grupların dahil edilmesi nedeniyle aynı probleme sahiptir. Bu zayıf çözünen ilaçların intravenöz enjeksiyonu, erimeyen ilaçların agregasyonu nedeniyle kan damarlarında embolizasyona neden olabilir ve çökme yerinde yüksek ilaç konsantrasyonları sonucunda lokal toksisite gösterebilir (Park ve diğ., 2008).

Pek çok araştırma, antikanser ilaçların doku ve hücre dağılım profillerinin ilaçların submikronik kollodial sistemler içine sıkışmaları ile kontrol edilebileceğini göstermiştir. Buna göre paklitakselin çözünürlüğü için lipozomlar, mikroküreler, nanopartiküller ve polimerik miselleri içeren birçok alternatif formülasyon araştırılmıştır. Bu yaklaşımın ardındaki mantık sistemik yan etkileri azaltırken antitümör etkinliği artırmaktır. Nanoparçacık ilaç taşıyıcı sistemler artık onlarca yıldır çalışılmaktadır ve onları cazip ilaç taşıyıcısı haline getiren birçok özellikleri iyi bilinmektedir. Ayrıca nanopartiküller tümörü çevreleyen damarlardan sızdırıcı endotel doku içinden kaçabilir ve artırılmış geçirgenlik ve tutma etkisi (EPR) yoluyla bazı solid tümörlerde birikebilir (Danhier ve diğ., 2009).

Paklitaksel ile kemoterapide Cremophor EL ile ilişkili toksisiteyi önlemek için, insanlarda lipofilik moleküllerin doğal bir taşıyıcısı olan albüminin eşsiz özelliklerini kullanan biyolojik etkileşimli nanometre boyutunda albümin bağlı paklitaksel partikülü Abraxane (Celgene, ABD) geliştirilmiştir ve 2005 yılında tekrarlayan metastatik meme kanseri için (Kratz, 2008) (Danhier ve diğ., 2009) ve 2012 yılında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri için FDA tarafından onaylanmıştır (Anonim-d).

Abraxane insan kanından elde edilmiş albümin içerir. Albümin:Paklitaksel oranı 9:1'dir. Ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık olarak 130 nm, hidrodinamik çapı 110 nm'dir (Anonim-b,) (Kratz, 2008) (Danhier ve diğ., 2009) (Costanzo ve diğ., 2009). Abraxane, insan serum albüminine bağlı amorf halde paklitaksel nanopartikülleri içerir. Albüminin plazma bileşenlerinin endotelial transitozuna aracılık ettiği bilinmektedir ve *in vitro* çalışmalar albümin varlığının endotelial hücrelerden paklitaksel taşınmasını artırdığını göstermiştir (Anonim-c).

Abraxane, 2005 yılında ilk pasif tümör hedefleyen polimerik nanoilaç olarak FDA onayını almıştır (Gradishar ve diğ., 2005).

Pasif hedefleme, nanotıp ilişkili ilacın, artmış damar geçirgenliğinden yararlanarak, tümör bölgesindeki intersitisiyel sıvı içine önemli ölçüde ekstravazasyonunu ifade eder. Buna ek olarak, solid tümörler fonksiyonel lenflerden yoksun olma eğilimindedirler ve ekstravaze nanomateryaller tümör alanında uzun sürelerde korunur. Artırılmış geçirgenlik ve saklama (EPR) olarak adlandırılan etki düşük moleküler ağırlıklı kemoterapötik ajanların tümörlere dağıtımını geliştirmek için şu anda kullanılan en önemli stratejidir (Lammers ve diğ., 2008).

## **2.9.APOPTOZ**

Apoptoz Yunanca "apo" ve "ptosis" kelimelerinden türemiş, düşmek, dökülmek anlamına gelen, sonbaharda yaprakların ağaçtan dökülmesini ifade eden bir kelimedir (Wong, 2011).

Apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir (Altunkaynak ve diğ., 2008).

Apoptoz çok hücreli bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin bir organizma olarak varolmasına ve yaşlanmasına dek bir çok gelişim

aşamasında organizmada homeostazinin sürmesini sağlayan önemli bir fizyolojik işlevdir. Apoptoz, homeostazinin korunmasında embriyonik dönemde ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumunda, dişi fetüste Wolf ya da erkek fetüste Müller kanallarının körelmesi sırasında ve merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde yer alarak; doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir işlev yürüterek, ayrıca DNA'sı ağır hasar gören ya da virüsle enfekte hücrelerin ölümünü sağlayarak temel bir rol oynar. Ayrıca büyüme faktörlerinin ortamdan çekildiği koşullarda (emzirme sonunda meme bezinin, doğum sonrası uterusun) organlarda gerçekleşen küçülmenin de temel mekanizması, ilgili organlardaki hücrelerin apoptozla ölümüdür (Solakoğlu, 2009).

Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü, hücre proliferasyonunu kontrol etmek için ya da DNA hasarı tamir edilmediğinde hasara cevap olarak ölüme giden hücreler tarafından yapılan temel bir kontrol mekanizmasıdır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptoz yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır Apoptoz aynı zamanda normal gelişimin bir parçası olarak hücre sayısı ve proliferasyonunu kontrol etmede önemlidir (Ghobrial ve diğ., 2005) (Akşit ve diğ., 2008).

Hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir. Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybından sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur (Altunkaynak ve diğ., 2008).

Tümör hücrelerinin en önemli özelliklerinden birisi normal hücrelere göre artan yaşam kabiliyetleridir. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz; fizyolojik büyüme kontrolü ve doku homeostazinin regülasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır. Hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki dengenin bozulduğu patolojik olaylardan birisi de kanser oluşumudur (Karabulut, 2009).

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1 KULLANILAN HÜCRE SOYU**

Bu araştırmada kullanılan HeLa hücre soyu, Avrupa hayvan hücre kültürü koleksiyonundan (CCL2) elde edilmiş olup, 1990 yılından bu yana, hücre ve doku kültürleri laboratuvarımızda yetiştirilmektedir. Bu hücreler, 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulagay), 100 IU/ml penisilin (Penicillin, Pfizer), % 10 Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco, A.B.D.) ve 2 mM glutamin içeren pH'sı % 4.4' lük NaHCO<sub>3</sub> ile 7.2' ye ayarlanmış, Medium-199 (M-199) (Gibco, A.B.D.) doku kültürü mediumunda yaşatılmaktadır.

#### **3.2 HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ**

HeLa hücrelerinin pasajı, hücrelerin yetişmiş oldukları kültür kaplarında tek tabaka haline geldiklerinde gerçekteştirilmiştir. Hücrelerin yetiştirildikleri kültür şişesi içinden kaldırılabilmesi için % 0.25'lik tripsin eriyiği (Multicell) kullanılmış ve süspansiyon edilerek santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu işlemde sonra 2 ml M-199 eklenerek tripsin inaktif hale getirilmiş ve 1500 g dönme hızında 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine kuyucuk başına ekilecek olan hücre sayısı hesaplanarak M-199 ile sulandırma yapılmış ve ekim işlemine geçilmiştir.

#### **3.3 HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ**

Hazırlanan hücre süspansiyonlarından; mitoz indeksi ve işaretleme indeksi analizi için 24 kuyucuklu kültür kaplarına her bir lamelli kuyucuk başına 150.000 hücre/ml ve apoptotik indeks analizi için 6 kuyucuklu kültür kaplarına 150.000 hücre/ml olacak şekilde ekimler gerçekteştirilmiştir. Ekim işleminden sonra, hücrelerin yüzeye tutunmaları için pH 7.2'de ve 37°C'de 20 dakika inkübasyon gerçekteştirilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunmalarından sonra her bir kuyucuğa, hücrelere spesifik doku kültürü mediumundan 2 ml ilave edilerek 24 saat inkübasyona devam edilmiştir.

### 3.4 İLAÇ KONSANTRASYONLARI VE <sup>3</sup>H-TİMİDİN HAZIRLANMASI

#### 3.4.1 İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Uygulanan ilaç konsantrasyonları, daha önce yapılan *in vitro* ve klinik çalışmalar temel alınarak saptanmıştır. Deneyler, Abraxane'ın (Celgene, A.B.D.) değişik konsantrasyon ve zaman aralıklarındaki uygulamaları ile gerçekleştirilmiştir. 6 mM olacak şekilde izotonik serum fizyolojik ile sulandırılan Abraxane ana stok olarak kullanılmıştır. Abraxane'ın 6000 kat sulandırılması ile 1000 nM'lık doz hazırlanmıştır. Bu dozun 10 kat sulandırılması ile 100 nM'lık D<sub>3</sub>, D<sub>3</sub>'ün 2 kat sulandırılması ile 50 nM'lık D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>'nin 5 kat sulandırılması ile 10 nM'lık D<sub>1</sub> elde edilmiştir.

#### 3.4.2 <sup>3</sup>H-Timidin Hazırlanması

1 mCi/ml <sup>3</sup>H-timidin (TRA-120, Amersham, İngiltere) içeren şişeye 9 ml deiyonize su eklenerek 100 µCi/ml'lik stok solüsyon hazırlanmıştır. Tüm deneylerde bu stok solüsyon kullanılmıştır. Bu stok solüsyondan 1 µCi/ml olacak şekilde hücrelerin mediumlarına eklenerek, hücrelerin kısa süreli işaretlenmeleri sağlanmıştır.

### 3.5 İLAÇ VE <sup>3</sup>H-TİMİDİN UYGULANMASI

Deneyler 2 grup halinde uygulanmıştır. Deney grupları; Kontrol ve Abraxane olarak ayrılmıştır. Kontrolü oluşturan gruba ilaç uygulaması yapılmamıştır. Diğer gruba inkübasyon süresi sonunda ilaç belirlenen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik süreler boyunca uygulanmıştır.

Bu sürelerin bitiminde işaretleme indeksi parametresini araştırmak için ayrılan hücreler, 1 µCi/ml <sup>3</sup>H-timidin içeren mediumda 20 dakika tutularak işaretlenme sağlanmıştır.

### 3.6 PREPARATLARIN HAZIRLANMASI VE FİKSASYON İŞLEMLERİ

Deney gruplarındaki hücrelerin ilaç uygulama süreleri tamamlandığında, Carnoy fiksatifi [glasiyal asetik asit:% 96 etanol (1:3 v/v)] ile 10 dakika fikse edilmiş ve iki kez 5'er dakika % 70 etanol ile yıkanmıştır. Mitotik indeks işlemleri için ayrılan lameller kuyucuklardan çıkarılmıştır. Havada kurutulduktan sonra 0 numaralı oje ile lamlara yapıştırılmıştır. Hazırlanan bu preparatlar havada kurutulduktan sonra, preparatlar daha

sonraki hidroliz ve boyama işlemleri için kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır.

Apoptotik indeks tespiti için, Abraxane'ın uygulama süreleri sonunda hücreler % 0.25'lik tripsin ile yüzeyden kaldırılmış ve steril tüplere alınmıştır. 1500 g hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin fiksasyonu için pellet üzerine 1 ml metanol: FTS (1:1 v/v) konularak ve 1500 g hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra pellet üzerine 1 ml metanol eklenmiş ve pipetaj ile süspansiyon edilip 4 °C'de saklanmıştır.

Preparat hazırlanması için kullanılacak lamalar temizlenmek üzere etanol: HCl (1:1 v/v) ile 4°C'de 24 saat bekletilip daha sonra 24 saat akarsu altında bırakılmıştır. Distile suda tekrar durulanan lamalar preparat yapılmak üzere 4°C'de saklanmıştır. Hazırlanan lamalar ıslak iken hücreler 200 µl olacak şekilde ekilerek yayma preparat hazırlanmış ve kurumaya bırakılmıştır.

### **3.7 HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ**

#### **3.7.1 Mitotik İndeks**

Mitotik İndeks (MI) için, deney gruplarına göre hazırlanan preparatlar önce oda sıcaklığındaki 1 N HCl ile 1 dakika daha sonra 60 °C'deki 1 N HCl ile 10.5 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz işlemlerinden sonra preparatlara 1 saat süresince Feulgen metodu uygulanmıştır. Bu preparatlar daha sonra Feulgen metoduna spesifik taze hazırlanmış yıkama solüsyonu ile 2'şer dakikadan 3 kez yıkanmış ve havada kurutulmuştur. Ardından 2 dakika süre ile Giemsa Boyası (1 ml stok solüsyonu + 10 ml Tampon çözelti) ile boyanarak sayım için hazır duruma getirilmiştir. Bu preparatlardan MI değerlerini saptamak amacı ile, geç profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri sayılmıştır. Erken profaz evresi ile interfaz grubundaki hücreler morfolojik olarak benzerlik gösterdiğinden bu iki evre birlikte değerlendirilmiştir. Uygulanan her bir ilaç konsantrasyonu ve süre için üçer preparat değerlendirilmiş ve her preparattan ortalama 3000 hücre mitoz bölünme evrelerinde olanlar ve olmayan hücreler olarak sayılarak MI değerleri saptanmıştır.

### 3.7.2 İşaretlenme İndeksi

#### 3.7.2.1 Otoradyografi İşlemi

İşaretleme indeksinin tespiti için hazırlanmış olan preparatlar DNA'ya bağlanmamış olan radyoaktif maddenin uzaklaştırılması amacı ile, otoradyografi işleminden hemen önce, +4 °C'de % 2'lik perklorik asitte 30 dakika süre ile iki kez hidroliz edilmiştir. Hidroliz işleminden sonra 4 kez saf su ile yıkanan preparatlar otoradyografi işlemi için hazır duruma getirilmiştir. Bu preparatlar karanlık odada 40 °C'de eritilmiş K2 jel emülsiyon (Ilford, İngiltere) ile kaplanmıştır. Kuruyan otoradyogramlar ekspozisyon süresi için, siyah ve ışık almayan kutularda 3 gün +4 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra, yine karanlıkta D19b (Kodak, A.B.D.) ile 18 °C'de 6 dakika develope edilmiş ve Fiksaj B (Kodak, A.B.D.) ile 18 °C'de 10 dakika fikse edilmiştir (Bassler ve diğ., 1968).

Otoradyogramlar Giemsa boyası ile 16 °C'de 3 dakika süresince boyanmıştır. Her ilaç konsantrasyonu ve her uygulama süresi için ortalama 3000 hücre sayılarak, hücrelerin işaretlenme yüzdeleri hesaplanmıştır.

### 3.7.3 Apoptotik İndeks

3.5'te açıklandığı şekilde 4°C'de bekletilen hücreler 500 g hızda 5 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiş, supernatant uzaklaştırılmış ve tekrar 1 ml taze metanol ile süspansiyon edilmiştir. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan daha önce temizlenen lamalar üzerine, tüm lam yüzeyi kaplanacak şekilde 200 µl damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutmanın ardından örneklerin DAPI ile muameleleri gerçekleştirilmiştir. Preparatlara boyama kaplarında, ışık almayan bir ortamda 20 dakika boyunca oda sıcaklığında DAPI uygulanmıştır. Bu süre sonunda boyama kabından alınan preparatlar 20 dakika boyunca PBS'de bekletilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından preparatların üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskopta (Leitz, Wetzlar Ortholux) (λ<sub>ex</sub> 364 nm; λ<sub>em</sub> 454 nm) sayımları gerçekleştirilmiştir. Yapılan sayımlarda DAPI uygulanan hücreler, normal ve apoptotik nükleus olarak belirlenmiştir ve AI değerleri hesaplanmıştır. Her deney grubu için en az 30 alanda yaklaşık 100 hücre sayılmış ve her alan için apoptotik hücrelerin toplam hücrelere olan yüzde oranları hesaplanmıştır.



### **3.7.4 İstatistik Değerlendirme**

Tüm deney gruplarında uygulanan doz ve zamana göre saptanan çoğalma hızı, mitotik indeks ve apoptotik indeks değerleri kontrole ve birbirlerine göre değerlendirilmiştir. Bu amaçla tüm deney gruplarından saptanan değerlere tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Grupların kontrole göre anlamlılıkları DUNNETT’S testi ile grupların birbirleri ile olan anlamlılıkları ise t-testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde  $p < 0.05$  anlamlılık seviyesi temel alınmıştır (GraphPad Prism versiyon 4.00, GraphPad Software, San Diego California, USA).

## 4. BULGULAR

### 4.1. MİTOZ

HeLa hücre kültürlerinde 72 saat süresince uygulanan üç farklı Abraxane dozunun ( $D_1=10$  nM,  $D_2=50$  nM,  $D_3=100$  nM) antimitotik etkisi, mitotik indeks analizi ile değerlendirilmiştir.

#### 4.1.1 Optimum Doz Tayini

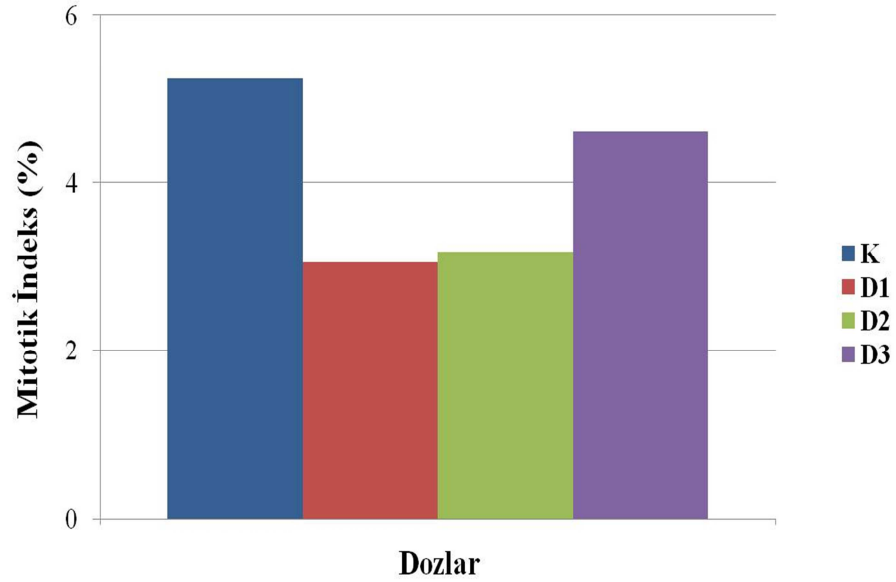
HeLa hücre kültürlerinde üç farklı Abraxane dozunun uygulanması ile, kontrol grubunun ortalama mitoz bölünme yüzdesi % 5.24 olarak belirlenirken, Abraxane uygulanan deney gruplarında sırasıyla  $D_1$  için, % 3.05  $D_2$  için % 3.18 ve  $D_3$  için % 4.61 olarak saptanmıştır (Tablo 4.1). Yapılan istatistiksel analizlerde kontrol grubu ile deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Ayrıca ilaç uygulanan tüm deney grupları arasında  $D_2$  ve  $D_3$  dışında anlamlı bir fark bulunduğu da belirlenmiştir ( $p<0.001$ )(Şekil 4.1).

MI sonuçlarına bağlı olarak, 24 saat zaman periyodunda çalışmanın amacına yönelik optimum Abraxane dozunun % 3.18 MI değeri ile  $D_2$  dozu olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.1:** Abraxane'in üç farklı dozunun ( $D_1=10$  nM,  $D_2=50$  nM,  $D_3=100$  nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde mitoz bölünme yüzdeleri.( $\pm$ SD)

| 24 saat Abraxane Uygulaması |                  |
|-----------------------------|------------------|
| Gruplar                     | MI (%)           |
| Kontrol                     | 5.24 $\pm$ 2.32* |
| $D_1$                       | 3.05 $\pm$ 1.854 |
| $D_2$                       | 3.18 $\pm$ 1.84  |
| $D_3$                       | 4.61 $\pm$ 1.87  |

$p<0.001$ : \*kontrole göre anlamlılık.



**Şekil 4.1:** Abraxane'in üç farklı dozunun ( $D_1=10$  nM,  $D_2=50$  nM,  $D_3=100$  nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde mitoz bölünme yüzdeleri.

#### 4.1.2. Optimum Doz Uygulaması (24-72 saat)

72 saat süresince hücrelere uygulanan üç farklı Abraxane dozu içerisinde çalışmamızın amacına uygun olan  $D_2$  dozunun mitoz bölünme yüzdesi 24-72 saatlik zaman periyodu içerisinde 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında belirlenmiştir.

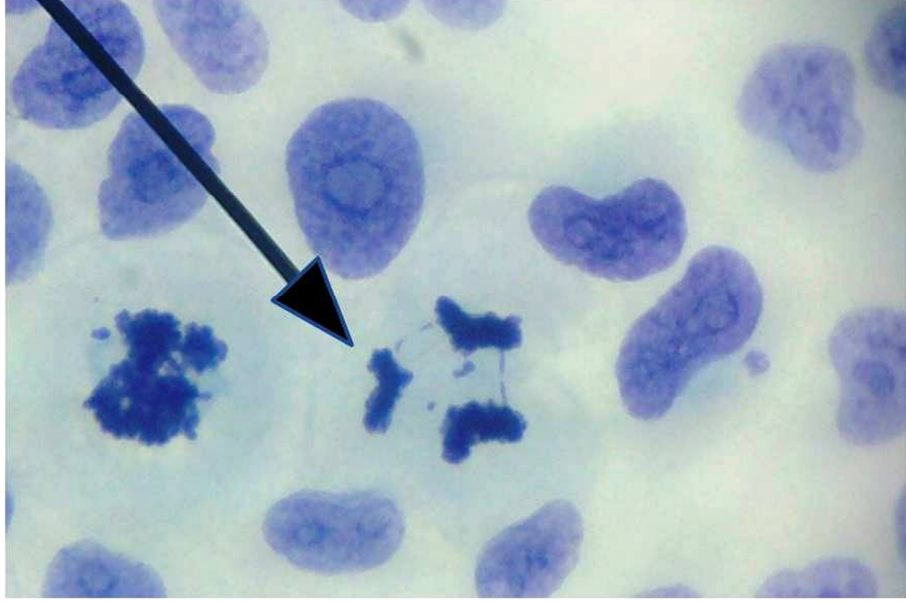
$D_2$  dozunun HeLa hücre kültürlerine uygulanmasının ardından, belirlenen 24, 48 ve 72 saat deney sürelerinin bitiminde her bir zaman periyodu için, kontrol ve deney grubu olmak üzere mitoz bölünme geçiren hücreler sayılmıştır (Tablo 4.1). Mitoz yüzdelerinin hesaplanmasının ardından bu değerlere ait grafikler oluşturulmuştur. Yapılan istatistiksel analizlerde, 24-72 saat arası ilaç uygulamasında kontrol grupları ile deney grupları arasında anlamlı bir farkın olduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

#### 4.1.2. Morfolojik Değerlendirme

##### 4.1.2.1. Işık Mikroskopu

Abraxane'in uygulama süreleri boyunca HeLa hücrelerinde meydana gelen mitoz bölünmenin geç profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri Feulgen metodu ve Giemsa boyama uygulanarak ışık mikroskopunda x100'lük objektif ile sayılmıştır. Abraxane'in

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi normal hücrelerde görülmeyen tripolar metafazlara yol açtığı saptanmıştır.

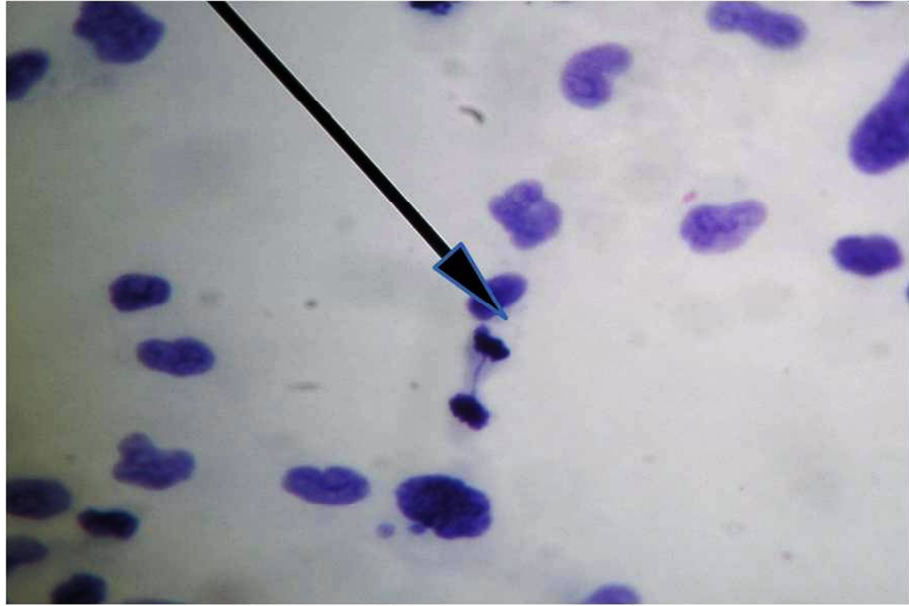


**Şekil 4.2:** HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından 24 saat sonra oluşan tripolar metafaz görüntüsü (x100; Feulgen).

#### **4.1.2.2. Mitotik İndeks**

Abraxane’in 3 farklı dozunun ( $D_1=10\text{nM}$ ,  $D_2=50\text{nM}$ ,  $D_3=100\text{nM}$ ) 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmasının ardından hazırlanan preparatlardan, Giemsa boyama ve Feulgen metodu uygulanarak, her deney grubu için en az 30 alanda, ortalama 3000 hücre, geç profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerindeki hücreler ve normal hücreler olmak üzere sayılarak MI değerleri saptanmıştır.

Tüm deney gruplarında  $D_2= 50 \text{ nM}$  için MI değerleri, 24. saatte kontrol için % 5.24,  $D_2$  için % 3.18, 48. saatte kontrol için % 4.79,  $D_2$  için % 2.53, 72. saatte kontrol için % 3.36 ve  $D_2$  için % 1.89 olarak tespit edilmiştir. (Tablo 4.2).

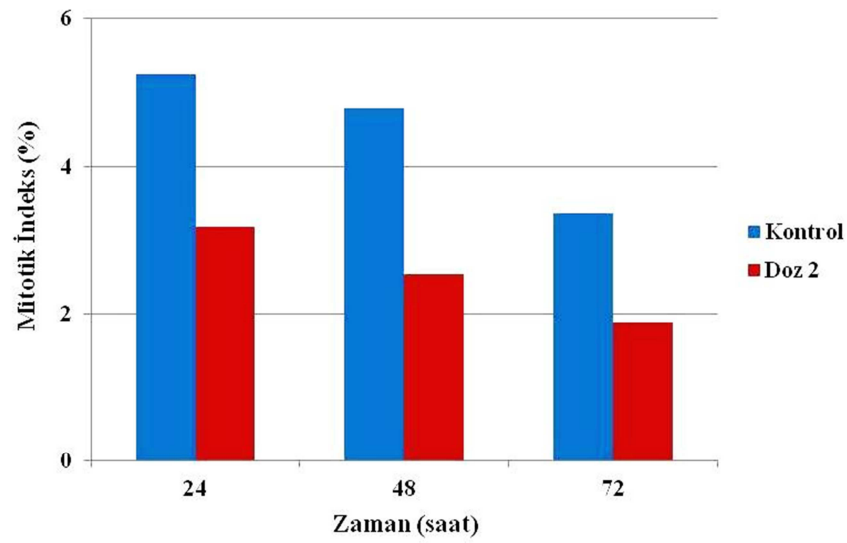


**Şekil 4.3:** HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından 24 saat sonra mitoz bölünmenin ışık mikroskopunda görüntüsü (x100; Feulgen).

**Tablo 4.2:** Abraxane'in D<sub>2</sub> dozunun (D<sub>2</sub>=50 nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda Mitotik İndeks değerleri (%) (±SD).

|                | 24 saat    | 48 saat   | 72 saat   |
|----------------|------------|-----------|-----------|
| Kontrol        | 5.24±1.82* | 4.79±1.63 | 3.36±1.52 |
| D <sub>2</sub> | 3.18±1.84  | 2.53±0.84 | 1.89±1.42 |

p<0.001: \*kontrolle göre anlamlılık.



**Şekil.4.4:** Abraxane'in D<sub>2</sub> dozunun (D<sub>2</sub>=50 nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda Mitotik İndeks değerleri (%) (±SD).

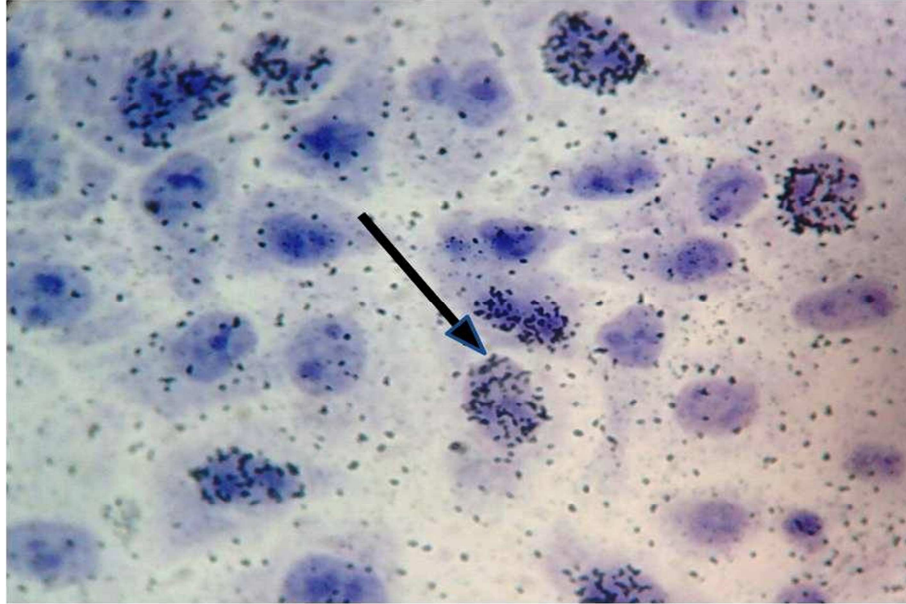
Deney grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın bulunduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Hücrelere uygulanan  $D_2$  dozunun 24-72 saatlik zaman periyodu içinde saptanan MI değerleri Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Yapılan istatistiksel analizlerde ilaç uygulanan deney gruplarında saptanan MI değerlerinin kontrol grubu değerleri ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

## 4.2. $^3H$ TIMİDİN İŞARETLEME İLE DNA SENTEZİNİN SAPTANMASI

### 4.2.1. Morfolojik Değerlendirme

#### 4.2.1.1. Işık Mikroskopunda İnceleme

Abraxane'in HeLa hücrelerinde DNA sentezi üzerinde yaptığı etki ışık mikroskopunda  $^3H$  timidin ile işaretlenmiş hücrelerde oluşan grainler Giemsa boyama uygulanarak x100'lük objektifte sayılarak saptanmıştır (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5:** HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından 48 saat sonra DNA sentezinin ışık mikroskopunda görüntüsü (x100; Feulgen)

#### 4.2.1.2. İşaretlenme İndeksi

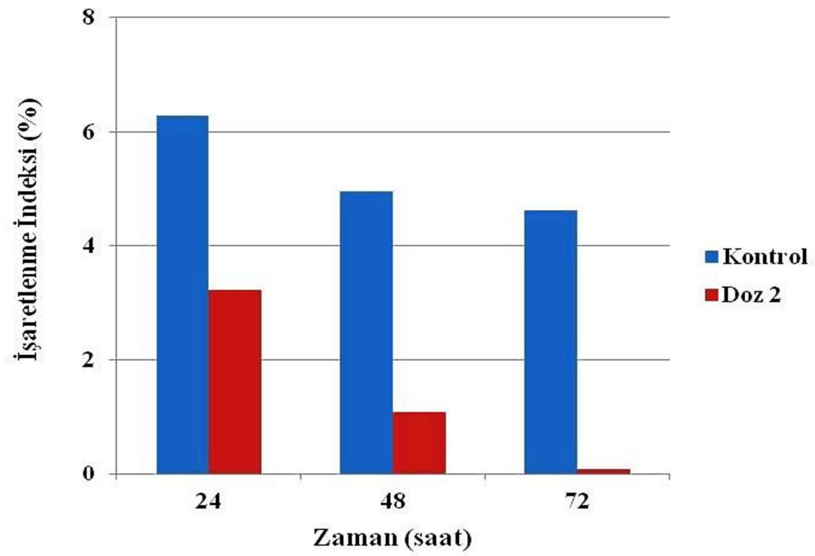
Abraxane'in  $D_2$  değeri, 72 saat boyunca uygulanmasının ardından hazırlanan preparatlardan Giemsa boyama ile ışık mikroskopunda x100'lük objektif büyütmesinde en az 30 alanda ortalama 3000 hücre, grain'li ve grain'siz hücre olarak sayılarak işaretlenme indeksi değerleri belirlenmiştir.

Tüm deney gruplarında  $D_2=50$  nM için LI değerleri 24. saat kontrol için % 6.28,  $D_2$  için % 3.21, 48. saatte kontrol için % 4.96,  $D_2$  için % 1.08, 72. saatte kontrol için % 4.62 ve  $D_2$  için % 0.08 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel açıdan kontrole göre tüm deney gruplarında anlamlı bir farkın bulunduğu tespit edilmiştir ( $p<0.001$ ). Ayrıca, tüm deney grupları arasında da anlamlı bir farkın bulunduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

**Tablo 4 .3:** Abraxane'in  $D_2$  dozunun ( $D_2=50$  nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda İşaretlenme İndeksi değerleri (%) ( $\pm$ SD).

|         | 24 saat          | 48 saat         | 72 saat         |
|---------|------------------|-----------------|-----------------|
| Kontrol | 6.28 $\pm$ 0.22* | 4.96 $\pm$ 0.31 | 4.62 $\pm$ 0.16 |
| $D_2$   | 3.21 $\pm$ 0.17  | 1.08 $\pm$ 0.11 | 0.08 $\pm$ 0.01 |

$p<0.001$ : \*kontrole göre anlamlılık.



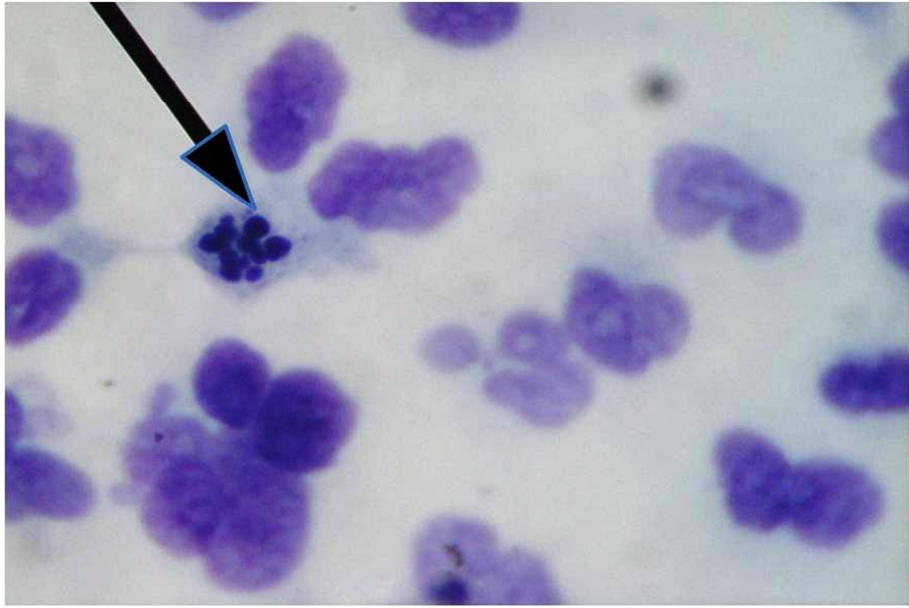
**Şekil 4. 6:** HeLa hücre kültürlerinde Abraxane'in  $D_2=50$  nm dozunun 24, 48 ve 72. saatlik uygulama süresi sonunda meydana getirdiği İşaretlenme İndeksi değerleri.

### 4.3.APOPTOZ

#### 4.3.1.Morfolojik Değerlendirme

##### 4.3.1.1.Işık Mikroskobu

Abraxane'ın HeLa hücreslerinde meydana getirdiği apoptoz sırasında oluşan kese şeklinde çıkıntılarının oluşumu, nuklear kondensasyon ve apoptotik cisimler, Giemsa boyama ve Feulgen metodu uygulanarak ışık mikroskobunda x100'lük objektifle saptanmıştır (şekil 4.7).

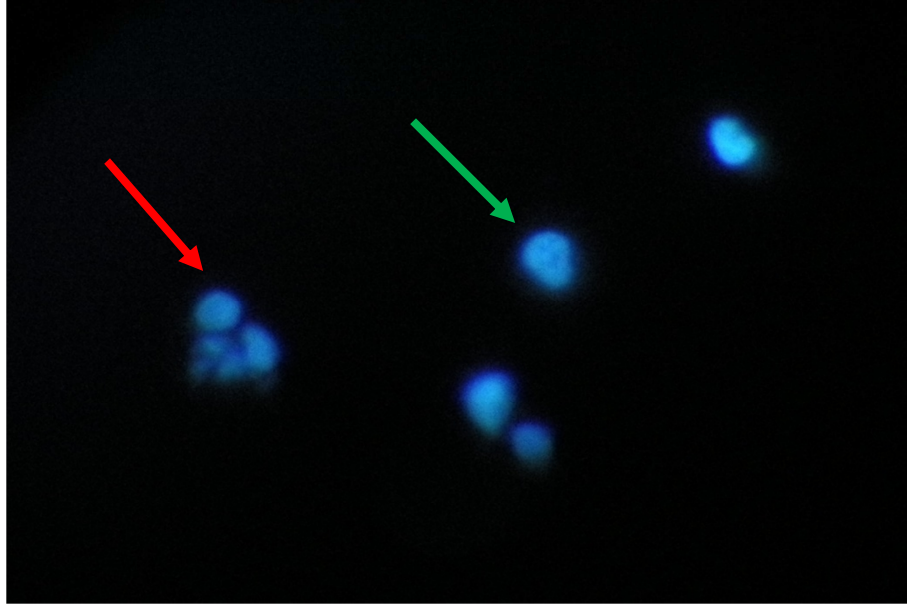


**şekil 4.7:** HeLa hücres kültürlerinde Abraxane uygulanmasından 24 saat sonra apoptozun ışık mikroskobunda gösterimi (x100, Feulgen).

##### 4.3.1.2.Floresan Mikroskobu

Abraxane'ın HeLa hücreslerinde meydana getirdiği apoptoz sırasında oluşan nuklear kondensasyon ve apoptotik cisimler, DAPI boyası uygulanarak floresan mikroskopta x100'lük objektif ile saptanmıştır (şekil 4.8).





**Şekil 4.8:** HeLa hücre kültürlerinde Abraxane uygulanmasından 72 saat sonra apoptozun floresan mikroskobunda gösterimi (x100; DAPI). ( —→ apoptotik hücre, —→ normal hücre)

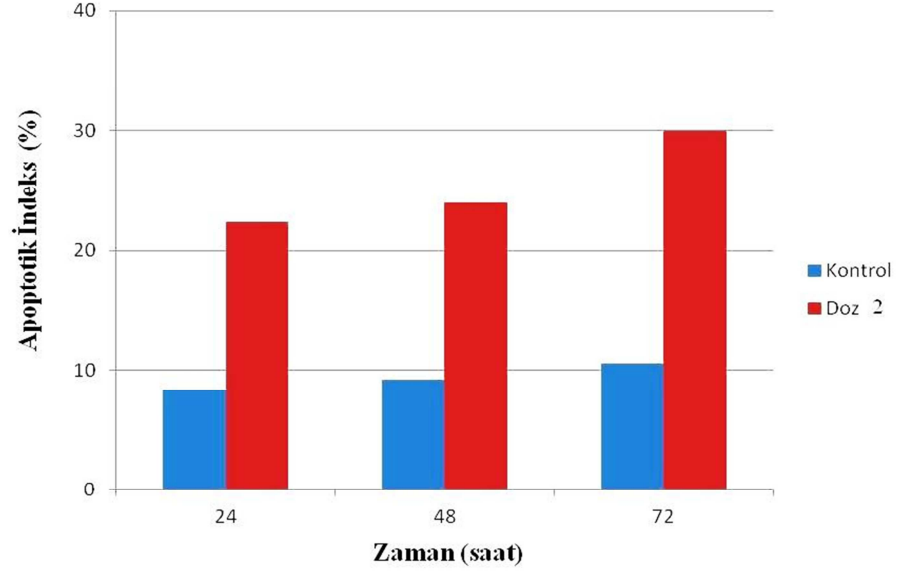
#### 4.3.1.3. Apoptotik İndeks

Abraxane'in optimum dozunun ( $D_2=50$  nm) 72 saat boyunca uygulanmasının ardından hazırlanan preparatlardan, DAPI ile floresan mikroskopta, her deney grubu için en az 30 alanda ortalama 5 hücre, apoptotik ve normal hücre olarak sayılarak AI değerleri saptanmıştır. Tüm deney gruplarında,  $D_2=50$  nm için AI değerleri, 24. saatte kontrol için % 8.38,  $D_2$  için % 22.37, 48. saatte kontrol için % 9.27,  $D_2$  için % 24.02, 72. saatte kontrol için % 10.6 ve  $D_2$  için % 30 olarak tespit edilmiştir. (Tablo 4.4). AI sonuçlarına bağlı olarak, 72 saatlik zaman periyodunda çalışmanın amacına yönelik optimum Abraxane dozunun % 30 AI değeri ile  $D_2$  değeri olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.4:** Abraxane'in  $D_2$  dozunun ( $D_2=50$  nM) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24-72 saat zaman periyodunda Apoptotik İndeks değerleri (%) ( $\pm$ SD).

|         | 24 saat          | 48 saat          | 72 saat         |
|---------|------------------|------------------|-----------------|
| Kontrol | 8.38 $\pm$ 0.63* | 9.27 $\pm$ 0.72  | 10.6 $\pm$ 0.84 |
| $D_2$   | 22.37 $\pm$ 1.81 | 24.02 $\pm$ 1.53 | 30.0 $\pm$ 1.34 |

$p < 0.001$ : \*kontrolle göre anlamlılık.



**Şekil 4.9:** HeLa hücre kültürlerinde Abraxane'ın  $D_2=50$  nM dozunun 24, 48 ve 72. saatlik uygulama süresi sonunda meydana getirdiği Apoptotik İndeks değerleri.

Yapılan istatistiksel analizlerde, tüm deney gruplarında saptanan AI değerlerinin kontrol grubu değerleri ile arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ( $p<0.001$ ).

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerdir. Bu yöntemlerin bazı sınırlamaları olduğu için hastalığı tamamen tedavi etmek güçtür. Son yıllarda bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve aynı zamanda tedavi etkinliğini arttırmak için yeni yöntemler geliştirilmektedir. Bu bağlamda nanoteknoloji umut verici bir yaklaşımdır ve bu nedenle kanser nanoteknolojisi dikkat çekici bir alan haline gelmiştir. Geleneksel kanser ilaçlarının yan etkilerini azaltan ve tedavi etkinliğini arttıran yeni nano ilaçlar, tek başlarına veya diğer tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılabilir (Topçul M, Çetin İ, 2013).

Bu tez çalışmasında, nanoteknolojik bir ilaç olan Abraxane'ın, serviks kanseri kökenli HeLa hücre soyu üzerine antiproliferatif etkileri hücre kinetiği parametrelerinden mitotik indeks, işaretlenme indeksi ve apoptotik indeks sonuçları değerlendirilerek araştırılmıştır.

Paklitaksel ve Abraxane'ın H295R ve SW-13 hücre hattında *in vitro* koşullarda inhibisyon gösterdiği rapor edilmiştir (Demeure ve diğ., 2008).

Abraxane'ın *in vitro* insan osteosarkoma OS-732 hücre hattı üzerine antitümöral aktiviteye sahip olduğu ve hücrelerin hücre siklusunda G<sub>2</sub>/M fazında tutulduğu gözlenmiştir (Yang ve diğ., 2010).

Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Abraxane'ın, dünya genelinde kanser ile ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer alan gastrik kanser üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada; insan gastrik kanser hücre hatları AGS, NCI-N87 ve SNU16 kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Abraxane'ın, Oxaliplatin ve Epirubicin'den daha düşük dozlarda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2013).

Desai ve arkadaşları (2006), beş hayvan modeli üzerinde Abraxane'ı etkililik ve toksisite azalmasında aktivite artışını göstermiştir. İnsan meme kanseri hücre hattı

implante edilmiş atimik farelerde radyoaktif olarak işaretlenmiş Abraxane ve Paklitaksel'in plazma farmakokinetiklerini tanımlamışlardır. tümör hücrelerinde Abraxane konsantrasyonu standart Paklitaksel'den % 33 daha yüksek bulunmuştur (Desai ve diğ., 2006).

Osteosarkoma için doz yoğunluğu optimize etme veya kemoterapi protokolünü değiştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmasına karşın uzun süreli sağ kalım son 15 yılda belirgin bir şekilde gelişme gösterememiştir. OS-732 insan osteosarkoması taşıyan çıplak farelere tümör büyüme inhibisyonunu değerlendirmek amacıyla değişik dozlarda Adriamycin, Paclitaxel ve Abraxane uygulanmıştır. Bunun sonucunda Abraxane (% 98.8 oranında tümör inhibisyonu) Adriamycin (% 46.1 oranında tümör inhibisyonu) ve Paclitaxel'den (% 40.8 oranında tümör inhibisyonu) anlamlı ölçüde daha yüksek bir tümör inhibisyon oranı göstermiştir. Bu oranlar Abraxane'ın *in vivo*'da osteosarkoma ksenograftlarında antitümör etkiye sahip olduğunu kanıtlamaktadır (Yang ve diğ., 2012).

Bulgularımızda elde edilen verilere göre; Mitotik indekste dozlar arttıkça mitoz bölünmenin arttığı, ancak saatler arttıkça azaldığı saptanmıştır. Bu bulgu ilacın hücre bölünmesini mitoz fazında tuttuğunu ya da hücre bölünmesine ket vurduğunu göstermektedir. HeLa hücreleri üzerine 50nM konsantrasyonda uygulanan Abraxane'ın, özellikle 72. saatte Mitotik İndekste düşüşe sebep olması, bize ilacın hücreyi ya ölüme götürdüğü yada hücrenin bölünmesine ket vurduğunu göstermektedir.

Standart Paclitaxel ile karşılaştırıldığında; Abraxane'ın prelinik çalışmalardaki üstünlüğünü ve düşük toksisitesini doğrulamak için yapılan bir Faz III çalışmada metastatik meme kanserli hastalar kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları Abraxane'ın standart Paclitaxel'den anlamlı olarak daha yüksek yanıt oranlarına ve tümör ilerlemesi için daha uzun bir zamana sahip olduğunu göstermiştir (Gradishar ve diğ., 2005).

Paklitaksel ile apoptozun derecesini tespit etmek için insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 kullanılarak bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Paklitakselin doza

bağımlı olarak apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir. Maksimum DNA zincir kırığı ilaçla muameleden 16 saat sonra ve maksimum apoptotik görünümlü hücreler ise 24 saat sonra oluşmuştur. Geriye kalan Paklitaksel'e maruz kalmış, ancak apoptotik olmayan hücreler ise G<sub>2</sub>'de tutuklu kalmıştır (Saunders ve diğ., 1997).

Yaptığımız çalışmada; optimum doz olarak belirlenen 50nM dozunun uygulanması ile apoptotik hücrelerin oranınının 24. saatte % 8.38'den % 22.37'ye yükseldiği ve zamana bağlı olarak da apoptotik hücrelerin oranlarının arttığı gözlemlenmiştir. Saunders ve arkadaşlarının meme kanseri hücreleri yapmış olduğu çalışma ile bizim çalışmamız birbirlerini desteklemektedir.

Aktif ilacın tümör içi konsantrasyonunu arttırmak için tasarlanmış olan Abraxane'ın etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek için tasarlanmış çok merkezli bir Faz II çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalar kullanılmıştır. 43 hastanın dahil edildiği bu çalışmada genel yanıt oranı % 16 iken hastalık kontrol oranı % 49 olarak belirlenmiştir. Progresyon için medyan süre 6 ay ve medyan sağ kalım 11 aydır. 1 yıl içerisinde ilerleme olmama olasılığı % 13 iken, 1 yıl hayatta kalma olasılığı % 45'tir. Premedikasyonun olmamasına rağmen hiç bir aşırı duyarlılık reaksiyonu bildirilmemiştir (Green, 2006).

Sparreboom ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada Cremophorsuz albümin bağlı Taxol (Abraxane) ve Cremophor-Ethanollü Taxol'ün prelinik ve klinik farmakokinetik özellikleri karşılaştırılmıştır. Sıçanlarda Abraxane için kararlı durumda dağılım hacminin anlamlı olarak Taxol'den daha fazla olduğu bulunmuştur. Fekal atılım her iki formülasyon için de temel eliminasyon yöntemidir. Prelinik veriler ile uyumlu olarak, Abraxane'ın temizlenme ve dağılım hacminin insanlarda anlamlı derecede Taxol'den daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sparreboom ve diğ., 2005).

Abraxane, kliniğe başarılı bir şekilde girmiş olmasına karşın tümör dokuları ve normal dokularda radyasyonu modüle edici (düzenleyici) etkileri çok fazla bilinmemektedir. Bu

amaçla Wiedenmann ve arkadaşları (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada singeneik over ve meme karsinomu taşıyan fareler Abraxane, radyasyon ve her ikisi birlikte maruz bırakılmıştır. Abraxane tek ajan olarak her iki tümör tipi için antitümör etkinlik göstermiş ve radyosensitizör gibi davranmıştır. Radyasyondan önce verildiğinde ise supra-additif etkiler meydana getirmiştir. Abraxane hem tek bir ajan olarak hem de radyasyon ile birlikte güçlü bir antitümör etki sergilemektedir. Radyasyonla birlikte uygulandığında radyasyon tedavi dozunu % 50 azaltmıştır. Tümör histolojisinde apoptotik ve nekrotik hücre ölümü ve mitotik tutulma karakterize edilmiştir. Ayrıca Abraxane'in normal dokularda radyo duyarlılığı artırmadığı da gözlenmiştir (Wiedenmann ve diğ., 2007).

Çalışmamızda artan zaman ve deney grubundan elde edilen bulgulara göre, işaretlenme indeksi değerleri incelendiğinde; özellikle 72 saat süresince 50nM konsantrasyonda Abraxane ile muamele edilen HeLa hücrelerinin sentez fazındaki yüzdesini önemli ölçüde azalmış, neredeyse hücrelerin tamamı sentez fazına girememişlerdir.

Fader ve arkadaşları yaptıkları klinik çalışmalarda; Abraxane'in kadınlarda over, endometrium ve serviks kanserinin tedavisinde iyi tolere edilen bir ilaç olduğunu göstermişlerdir (Fader ve diğ., 2009).

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, yukarıda tartışılan çalışmalar ile uyumlu olarak Abraxane'in serviks kanseri hücreleri üzerinde anlamlı bir antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak; yukarıda anlatılan araştırmacıların bulgularıyla uyum gösteren ve hücre kinetiği parametrelerini incelediğimiz çalışmamızda, 50nM konsantrasyonda Abraxane'in HeLa hücreleri üzerine uygulanması ile, tümör hücrelerinin apoptoz indeksinde artışa, mitoz indeksi ve işaretlenme indeksinde ise azalışa sebep olduğu saptanmıştır. Yukarıda bahsedilen prelinik ve klinik çalışmalar göz önüne alındığında, Abraxane'in çeşitli kanser türleri üzerinde nanoteknolojik olmayan türevi ile de karşılaştırıldığında etkin bir tedavi sağlayacağı açıkça görülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

AHN, S., 2010, Novel Antimitotic Compounds with Potent *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Effects: the Use of Pharmacokinetics, Metabolism, Efficacy, and Toxicity Studies, Doktora tezi, The Ohio State University.

AKŞİT, H., BİLDİK, A., 2008, Apoptozis, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (2008) 19(1): 55-63.

ALTUNKAYNAK, B.Z., ÖZBEK, E., 2008, Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, Tıp Araştırmaları Dergisi: 2008 : 6 (2) : 93 -104.

Anonim-a:[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2008/#](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/#) (Ziyaret tarihi: 15.02.2013)

Anonim-b:[http://www.faq.s.org/sec-filings/100701/Abraxis-BioScience-Inc\\_8K/dex102.htm#b](http://www.faq.s.org/sec-filings/100701/Abraxis-BioScience-Inc_8K/dex102.htm#b) (Ziyaret tarihi: 20.01.2013)

Anonim-c:[www.has-sante.fr/portail/jcms/c.../abraxane](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c.../abraxane) (Ziyaret tarihi:10.02.2013)

Anonim-d:<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm323668.htm> (Ziyaret Tarihi 16.05.2013)

AVCI ALP, G., 2012, İnsan Papillomavirusunun Genomik Yapısı ve Proteinleri, Mikrobiyoloji Bülteni 2012; 46(3): 507-515.

BASSLEER R., LIÈBECQ-HUTTER S., BAECKELAND E., 1968 Contribution of Histoautoradiography to the Study of Nucleic Acids and Proteins in Cells. Autoradiography. *Acta histochem* Supp VIII: 53-72.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O., 2004, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2004, 56 (11), 1649–1659.

COSTANZO, F.D., GASPERONİ, S., ROTELLA,V., COSTANZO, F.D., 2009, Targeted delivery of albumin bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer, *OncoTargets and Therapy*, 2009:2 179–188.

DANHIÈRE, F. LECOUTURIÈRE, N. VROMAN, B. JÉRÔME, C. MARCHAND-BRYNAERT,J. FERON, O. PRÉAT, V., 2009, Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation, *Journal of Controlled Release* 133 (2009) 11–17.

DEMEURE, M. J., STEPHAN, E., GONZALES, P., HAN, H., DELGIORNO, K., GRANT, C. S., GATELY, S., TRENT J. M., VON HOFF, D. D., 2008, Pre-clinical evidence for nab-paclitaxel efficacy in the treatment of adrenocortical cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 2008 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 22070.

DESAI, N., TRIEU, V., YAO, Z. et al., 2006, Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ab1-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin cancer res.* 12: 1317–1324.

DESAI, N., 2008, Nab Technology A Drug Delivery Platform Utilising Endothelial gp60 Receptor-based Transport and Tumour-derived SPARC for Targeting, Drug Delivery Report Winter 2007/2008, Technology Overviews Syf 37-41ISSN 1750-2322.

ERDEMOĞLU, N., ŞENER B., 2000, Taksan Sınıfı Bileşiklerin Antitümör Etkileri, *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 29 (1) 77-90,

FADER A.N., ROSE P.G., 2009, Abraxane for the treatment of gynecologic cancer patients with severe hypersensitivity reactions to paclitaxel, *International Journal of Gynecol Cancer.* 19(7):1281-3.

GHOBRIAL, I. M., WITZIG, T.E., ADJEI, A.A., 2005, Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, *CA A Cancer Journal for Clinicians.* 55: 178–194.

GRADISHAR, W.J, TJULANDINS, DAVIDSONN, SHAWH, DESAI, N, BHARP, HAWKINSM, O'SHAUGHNESSY, J., 2005, Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer, *J of Clin Oncol.*, 23 (31): 7794-7803.

GREEN, M.R., MANIKHAS, G.M., ORLOV, S., AFANASYEV, B., MAKHSON, A.M., BHAR, P., HAWKINS, M.J., 2006, Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 17: 1263–1268.

GÜNER, H., TAŞKIRAN, Ç., 2007, Serviks Kanseri Epidemiyolojisi ve Human Papillomavirüs, *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi.* Cilt: 4 Sayı: 1;11-19.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, Vol. 100, 57–70.

JORDAN, M. A., WILSON, L., (2004), Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nat Rev Cancer* 4 (4): 253-65.

KARABULUT, A., 2009, Bazı 2-sübstitüe benzimidazol Türevi Bileşiklerin Sentezi ve Anjiyojenez Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Mersin Üniversitesi, Mersin.

KRATZ, F., 2008, Albumin as drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Controlled Release.* 132, 171–183.

LAMMERS, T., HENNINK, W.E., STORM, G., 2008, Tumour-targeted Nanomedicines: Principles and Practice, *British Journal of Cancer.* 99, 392 – 397.



LIN, L.Y., KARWA, A., KOSTELC, J.G., LEE, N.S., DORSHOW, R.B., WOOLEY, K.L., 2012, Paclitaxel-Loaded SCK Nanoparticles: An Investigation of Loading Capacity and Cell Killing Abilities *In Vitro*, *Molecular Pharmaceutics*. 9 (8); 2248–2255

LOWITZ, B.B., CASCIATO, B.B., 2012, Principles and Definitions, In Casciato, D.A. Territo, M.C.(ed) *Manual of Clinical Oncology*, Chapter 1, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business Philadelphia, USA, ISBN 987-1-4511-1560-4; 2-18.

ONAN, M.A., 2009, Hpv Virolojisi, Epidemiyoloji Ve Genital Kanser İlişkisi, *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Özel Dergisi*. 2(1):1-8

ÖZER, H., TUNCER, E., ÇİFTÇİ, A., KESER, H., AKER, H., ELAGÖZ, Ş., BOZTOSUN, A., 2012, Epitel Hücre Anormalliği Saptanan Servikal Smear Olgularında Sitolojik Tanı Dağılımı Ve Sito-Histopatolojik Korelasyon, *Cumhuriyet Tıp Dergisi*. 34: 319-324.

PARK, J. H., LEE, S., KIM, J., PARK, K., KIM, K., KWON, I.C., 2008, Polymeric nanomedicine for cancer therapy, *Progress in Polymer Science*. 33 113–137.

SAUNDERS, D.E., DWAYNE-LAWRENCE, W., CHRISTENSEN, C., WAPPLER, N.L., RUAN, H., DEPPE, G., 1997, Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast-cancer cells. *Int. J. Cancer*, 70: 214–220

SOLAKOĞLU, Z., 2009, Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni, *Klinik Gelişim*, 22 (3):20-25.

SPARREBOOM, A., SCRIPTURE, C.D., TREIU, V., et al., 2005, Comparative Preclinical and Clinical Pharmacokinetics of a Cremophor-Free, Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (ABI-007) and Paclitaxel Formulated in Cremophor (Taxol). *Clin Cancer Res*, 11:4136-4143.

SPENCER, J.V., 2007, *Deadly Disease and Epidemics - Cervical Cancer*, Chelsea House An imprint of Infobase Publishing, New York, ABD, ISBN-13: 978-0-7910-8941-5.

TOPÇUL, M., ÇETİN, İ., 2013, Nanotechnology in the field of clinical oncology, *Marmara Medical Journal*, 26:1-4.

WIEDENMANN, N., VALDECANAS, D., HUNTER, N., et al. 2007, 130-nm albumin-bound paclitaxel enhances tumorradiocurability and therapeutic gain. 13: 1868-1874.

WONG, R.S.Y., 2011, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 30:87.

YANG, Y., NIU, X., ZHANG, Q., HAO, L., DING, Y., XU, H., YUAN, R., 2010, *In vitro* inhibiting effect of albumin-bound paclitaxel on human osteosarcoma cell os-732, Shandong Medical Journal, 2010-42.

YANG Y, NIU X, ZHANG Q, HALO L, DING Y, XU H., 2012, The efficacy of Abraxane on osteosarcoma xenografts in nude mice and expression of secreted protein, acidic and rich in cysteine., , Am. J. Med. Sci. 344 (3): 199-205. Am. J. Med. Sci. 344 (3): 199-205.

ZHANG, C., AWASTHI, N, SCHWARTZ, MA, HINZ, S, SCHWARZ, RE., 2013, Superior Antitumor Activity of Nanoparticle Albumin- Bound Paclitaxel in Experimental Gastric Cancer. Plos One. 8 (2): 1-10.



## ÖZGEÇMİŞ

Nurcan GÜRSES 1988 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Rıfat Ilgaz İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Bahçeşehir Atatürk Lisesi (Y.D.A)'ni bitirdikten sonra 2006-2010 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde eğitimine devam etti. Üniversite öğrenimi sırasında Büyükçekmece Devlet Hastanesi Biyokimya-Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji (ELISA-İmmünoloji) ve Parazitoloji laboratuvarlarında staj yaptı. 2010-2012 yılları arasında Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Biyolog olarak görev yaptı. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Radyobiyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2012-2013 yılları arasında İstanbul Üniversitesi'nde Pedagojik Formasyon eğitimi almıştır. Yüksek lisans eğitimi esnasında Genetik ve Doku Kültürü derslerinde öğrenci asistan olarak görev almıştır. Bilimsel çalışmaları devam etmektedir.

Bu tez çalışması 19.06.2013 tarihinde Asian Pasific Journal of Cancer Prevention dergisinde yayınlanmak üzere kabul edilmiştir.

GURSES, N, TOPCUL, M, 2013, The effects of Abraxane on cell kinetic parameters of HeLa cells, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Vol 14 Issue 7/8 (in press).