



**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOTAŞIYICI SİSTEMLERE YÜKLENMİŞ
PAKLİTAKSEL'İN İNSAN SERVİKAL KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİ VE BAZI GENLERİN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

MANHAL TULIMAT

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

SIVAS – 2020



T.C.

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANOTAŞIYICI SİSTEMLERE YÜKLENMİŞ
PAKLİTAKSEL'İN İNSAN SERVİKAL KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİ VE BAZI GENLERİN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

MANHAL TULIMAT

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. YAVUZ SİLİĞ

SIVAS – 2020

"Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklenmiş Paklitaksel'in İnsan Servikal Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etki ve Bazı Genlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi" adlı **Doktora** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan _____

Üye _____

Üye _____

Üye _____

Üye _____

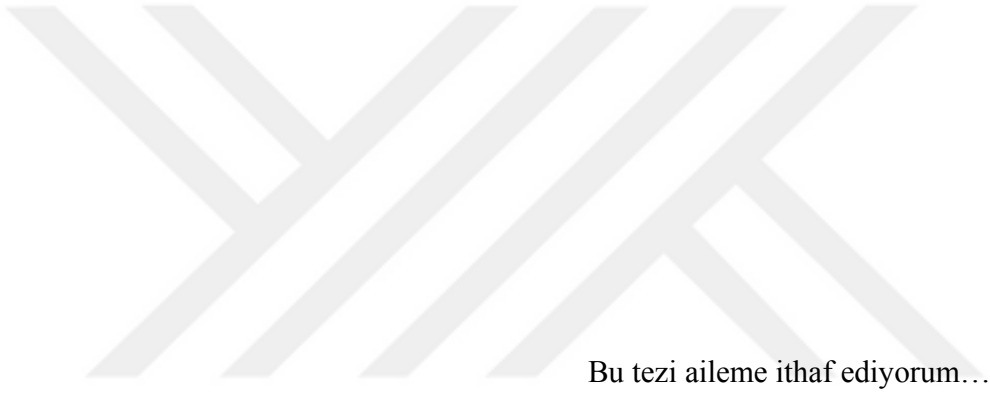
(Danışman)

ONAY

Bu tez çalışması, Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.



Bu tezi aileme ithaf ediyorum...

ÖZET

Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklenmiş Paklitaksel'in İnsan Servikal Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etki ve Bazı Genlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

Manhal TULIMAT

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ

2020, 165 sayfa

Servikal kanser, kadınlarda yaygın olarak görülen malign bir tümördür. Servikal kanser tedavisinde Paklitaksel (PTX) ilacı yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat PTX'in tüm vücut sistemi etkilediği için istenmeyen birçok yan etkisi vardır. Ayrıca yarı ömrü kısadır. Bu gibi dezavantajların üstesinden gelmek ve tedavi etkinliği artırmak amacıyla, bu çalışmada ilk olarak titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülleri sentezlendi. Daha sonra TiO₂ toksitesini azaltmak ve biyouyumlu hale getirmek için polietilen glikol (PEG) ile modifiye edildi. Son olarak sentezlenen nano taşıyıcı sisteme PTX ilacı ile modifiye edildi. Sentezlenen TiO₂-PEG-PTX ilacı ve TiO₂, TiO₂-PEG ve PTX ilaçları servikal kanser hücre hattına (HeLa) uygulayıp sitotoksik doz MTT yöntemiyle belirlendi.

HeLa hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX, ve PTX ilaçlarının farklı konsantrasyonları (0,5-50µg/ml) uygulandı ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu moleküller arasında en aktif 72 saat sonrası TiO₂ ve PTX olduğunu tespit edildi. TiO₂-PEG-PTX nanotaşıyıcı temelli ilacın IC₅₀ 7.81±1.11 olduğu saptandı. Daha sonra HeLa hücrelerine her bir molekülün 48 saat inkübasyon sonrası IC₅₀ dozlarını uygulandı ve hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı ve bu örneklerde *Tp53*, *MDM2*, *RAD51*, *BRCA2*, *ERCC1*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2* ve *MYC* genlerinin ekspresyon düzeylerini RT-PCR analiz yöntemiyle belirlendi.

Sonuç olarak TiO₂ nanopartikülünün tüm genlerin ekspresyonunu artırdığı tespit edildi. TiO₂-PEG-PTX'in *MDM2* ve *ERCC1* genlerinin ekspresyonunu azaltırken diğer tüm genlerin ekspresyonunu artırdığı belirlendi. PTX ise *Tp53*, *BRCA2*, *ATR*, *CDKN1A*,

PRKDC, VEGFB, PDGFB, CASP2 ve *MYC* genlerinin ekspresyonunu artırırken *MDM2, RAD51* ve *ERCC1* azalttığı saptandı.

Anahtar kelimeler: Servikal kanser, gen ekspresyonu, paklitaksel, nanopartikül, nanotaşıyıcılar, *Tp53, MDM2, RAD51, BRCA2, ERCC1, ATR, CDKN1A, PRKDC, VEGFB, PDGFB, CASP2, MYC*



ABSTRACT

THE CYTOTOXIC EFFECT OF PACLITAXEL LOADED NANOSYSTEM ON HUMAN CERVICAL CANCER AND DETERMINATION OF SOME GENE EXPRESSION PROFILES

Manhal TULIMAT

Doctorate Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Prof.Dr. Yavuz SİLİĞ

2020, 165 pages

Cervical cancer is a malignant tumor that is common in women. Paclitaxel (PTX) drug is widely used in the treatment of cervical cancer. However, PTX has many undesirable side effects that affects the whole body system. In addition, its half-life is short. In order to overcome such disadvantages and increase treatment efficacy, in this study first titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles was synthesized. Then it was modified with polyethylene glycol (PEG) to reduce TiO₂ toxicity and increase its biocompatibility. Finally, the synthesized nano carrier system was modified with PTX drug. The synthesized TiO₂-PEG-PTX drug and TiO₂, TiO₂-PEG and PTX drugs were applied to the cervical cancer cell line (HeLa) and cytotoxic dose was determined by MTT method.

Different concentrations (0.5-50 µg / ml) of TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX, and PTX drugs were applied to HeLa cells for 24, 48 and 72 hours and IC₅₀ values were calculated. Among these molecules, TiO₂ and PTX were found to be the most active after 72 hours. The TiO₂-PEG-PTX nanocarrier-based drug was found to be IC₅₀ 7.81 ± 1.11. Then IC₅₀ doses of each molecule were applied to HeLa cells for 48 hours then RNA was isolated from the cells. cDNA was synthesized from RNA samples and *Tp53*,

MDM2, RAD51, BRCA2, ERCC1, ATR, CDKN1A, PRKDC, VEGFB, PDGFB, CASP2 and *MYC* genes were determined by RT-PCR analysis method.

As a result, it was found that TiO₂ nanoparticle increased the expression of all genes. It was determined that TiO₂-PEG-PTX reduces the expression of *MDM2* and *ERCC1* genes while increasing the expression of all other genes. PTX increased expression of *Tp53, BRCA2, ATR, CDKN1A, PRKDC, VEGFB, PDGFB, CASP2* and *MYC* genes, while decreasing *MDM2, RAD51* and *ERCC1*.

Keywords: Cervical cancer, gene expression, paclitaxel, nanoparticle, nanocarriers, *Tp53, MDM2, RAD51, BRCA2, ERCC1, ATR, CDKN1A, PRKDC, VEGFB, PDGFB, CASP2, MYC*

TEŞEKKÜR

Doktora tezi hazırlamaya başladığım andan itibaren desteğini esirgemeyen ve bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ'e, destek, sabır ve anlayışından dolayı teşekkür ederim. Doktora eğitimim süresince bilgi birikimlerinden yararlandığım ve üzerimde çokça emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı' nın tüm öğretim üyelerine ve tüm çalışanlarına, aynı zamanda tez çalışmam için destek sağlayan Dr. Öđr. Üyesi Ayça TAŐ hocamıza teşekkür ederim. Ayrıca, Esmá ÖZMEN, Zuhâl TUNÇBİLEK e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1.Giriş	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.KANSER	4
2.1.1.Kansere neden olan etmenler.....	6
2.2.Servikal kanser	7
2.2.1.Servikal kanser evreleri	10
2.2.2.Servikal kanseri önleme ve kontrolü.....	11
2.3.HeLa hücreleri.....	12
2.4.Kemoterapi.....	14
2.5.Tübülin ve antitübülin ajanları.....	16
2.6.Nanopartiküller	20
2.6.1.TiO ₂ nanopartiküller	24
2.7.İnorganik fosfat	27
2.8.Glutatyon.....	28
2.9.Gen ekspresyon.....	28
2.10.Primeryerler	33
2.10.1.Hücre döngüsünün Primerleri.....	34
2.10.2.DNA tamirinin primerleri.....	40
2.10.3.Anjiyogenez primerleri	45
2.10.4.Apoptoz primerleri.....	47
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	52
3.1.Kullanılan Cihazlar.....	52
3.2.Kullanılan plastik malzemeler.....	53

3.3.Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	54
3.3.Kullanılan Besiyerleri	55
3.4.Kullanılan tampon ve çözeltiler	56
3.5.HeLa servikal Kanseri Hücre Hattı	57
3.6.Kullanılan Besiyeri	57
3.7.İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Canlandırılması ve Çoğaltılması	58
3.8.TiO ₂ nanopartiküllerinin ve PEG-TiO ₂ 'nin sentezi	58
3.9.PEG-TiO ₂ Nanotaşıyıcı sisteme PTX ilacın yüklenmesi	60
3.10.Hela kanser hücrelerinde TiO ₂ , TiO ₂ -PEG, TiO ₂ -PEG-PTX ve PTX'in antikanser aktivitesi	60
3.11.Hücrelerden RNA İzolasyonu	61
3.12.RNA'dan cDNA Sentezi	62
3.13.RT-PCR	64
3.14.İnorganik Fosfat Tayini	66
3.15.GSH Tayini	67
4.İstatistiksel Yöntem	68
5.BULGULAR	69
5.1.TiO ₂ -PEG ve TiO ₂ -PEG-PTX nanopartikülleri'nin sentezi ve Karakterizasyon Analizi	69
5.2.TiO ₂ -PEG, PTX ve TiO ₂ -PEG-PTX sitotoksik aktivitesi (yada sitotoksik aktivitesi)	70
5.3 İnorganik Fosfat (Pi) Tayini	73
5.4. GSH Tayini	74
5.5.RT-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi	76
5.5.1.Genlerin ekspresyon düzeyleri	76
6.TARTIŞMA	90
6.1.TP53	99
6.2.MDM2	100
6.3.RAD51	101
6.4.BRCA2	103
6.5.ERCC1	103
6.6.ATR	105
6.7.CDKN1A	106

6.8.PRKDC	107
6.9.VEGFB	108
6.10.PDGF	109
6.11.CASP-2	111
6.12.MYC	112
7.KAYNAKLAR	115
8.İZİNLER	145
9.ÖZGEÇMİŞ	147



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dünya çapında kanserden ölüm yüzdesi.....	4
Şekil 2. Kansere neden olan faktörlerin dağılım yüzdesi	6
Şekil 3. Serviks anatomisi.....	7
Şekil 4. Servikal kanserin oluşumu ve nüfus yoğunluğu şeması.....	8
Şekil 5. Kanser ilerlemesine göre servikal doku değişiklikleri.....	11
Şekil 6. Mikrotübüller polimerizasyonu ve depolimerizasyonu.....	17
Şekil 7. Tübüline kolşisin, vinka ve taksol bağlanma bölgeleri	19
Şekil 8. RT-PCR numune hazırlanması.....	29
Şekil 9. RT-PCR reaksiyon fazları	30
Şekil 10. Relativ floresan vs döngü sayısı	32
Şekil 11. Hücre döngüsü.....	35
Şekil 12. P53 yolunun şeması.....	36
Şekil 13. Hücre döngüsünün durdurulmasında P53'ün rolü	36
Şekil 14. MDM2-p53 yolu.....	38
Şekil 15. ERCC1 fonksiyonları	43
Şekil 16. Apoptoz yolları	48
Şekil 17. Kaspaz-2 aktivasyonunun iki bölmesi.....	49
Şekil 18. PEG-TiO ₂ ve PEG-TiO ₂ -PTX nanopartiküllerinin UV-Görünür bölge absorbsiyon grafiği	69
Şekil 19. HeLa hücre hattında 24 saat, 48 saat ve 72 saat 1-100 µg/ml doz aralıklarında, TiO ₂ , PEG-TiO ₂ , PEG-TiO ₂ -PTX ve PTX'in uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....	72
Şekil 20. HeLa hücre hattında TiO ₂ , PEG-TiO ₂ , PEG- TiO ₂ -PTX ve PTX'in morfolojik etkisi.....	73
Şekil 21. İnorganik fosfat standart eğresi	74
Şekil 22. HeLa hücre hattında 48 saat , TiO ₂ , PEG-TiO ₂ , PEG-TiO ₂ -PTX ve PTX IC ₅₀ doz uygulamasının hücre inorganik fosfat üzerine etkisi	74
Şekil 23. GSH standart eğrisi.....	75

Şekil 24. HeLa hücre hattında 48 saat , TiO ₂ , PEG-TiO ₂ , PEG-TiO ₂ -PTX ve PTX IC ₅₀ doz uygulamasının hücre GSH üzerine etkisi.....	75
Şekil 25. <i>GAPDH</i> geninin erime eğrisi.....	76
Şekil 26. <i>TP53</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması ...	78
Şekil 27. <i>MDM2</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	78
Şekil 28. <i>RAD51</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	79
Şekil 29. <i>BRCA2</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	80
Şekil 30. <i>ERCC1</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	80
Şekil 31. <i>ATR</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	81
Şekil 32. <i>CDKN1A</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	82
Şekil 33. <i>PRKDC</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	82
Şekil 34. <i>VEGFB</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	83
Şekil 35. <i>PDGFB</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	84
Şekil 36. <i>CASP2</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması	85
Şekil 37. <i>MYC</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması ...	85
Şekil 38. <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>RAD51</i> , <i>BRCA2</i> , <i>ERCC1</i> , <i>ATR</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>PRKDC</i> , <i>VEGFB</i> , <i>PDGFB</i> , <i>CASP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin kat değişimi değerlerinin karşılaştırılması.....	86
Şekil 39. <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> , <i>RAD51</i> , <i>BRCA2</i> , <i>ERCC1</i> , <i>ATR</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>PRKDC</i> , <i>VEGFB</i> , <i>PDGFB</i> , <i>CASP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	114

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Genomik DNA eliminasyon karışımı.....	63
Tablo 2. Reverse transkriptaz karışımı.....	63
Tablo 3. Mastermiks karışımı.	64
Tablo 4. RT-PCR döngü koşulları.....	65
Tablo 5. RT-PCR yönteminde kullanılan primerler, firma ve katalog numaraları.	65
Tablo 6. İnorganik fosfat tayini için numune, standart ve kör karışımının hazırlanması.	66
Tablo 7. İnorganik fosfat tayini için numune, standart ve kör süpernatant hazırlanması.	67
Tablo 8. GSH tayini numune, standart ve kör için süpernatant hazırlanması.	67
Tablo 9. 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyondan sonra HeLa hücrelerinde TiO ₂ , TiO ₂ -PEG, PTX ve TiO ₂ -PEG-PTX nanopartikülleri arasındaki IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması.	70
Tablo 10. GAPDH geminin Ct değeri.....	76
Tablo 11. <i>Tp53, MDM2, RAD51, BRCA2, ERCC1, ATR, CDKN1A, PRKDC, VEGFB, PDGFB, CASP2 ve MYC</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde grupların sınıflandırılması.....	77
Tablo 13. Grup1'in kat regülasyonu ve P değeri.....	88
Tablo 14. Grup2'in kat regülasyonu ve P değeri.....	88
Tablo 15. Grup3'ün kat regülasyonu ve P değeri.....	89
Tablo 16. Grup4'ün kat regülasyonu ve P değeri.....	89

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

HPV	İnsan papilloma virüsü
NP	Nanopartikül
TiO₂	Titanyum diyoksit
PTX	Paklitaksel
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HeLa	Sevikal kanser hücre hattı
GTP	Guanozin trifosfat
GDP	Guanozin difosfat
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
CuO	Bakır Oksit
ZnO	Çinko Oksit
ROS	Reaktif oksijen türleri
Fe₃O₄	Demir III oksit
UV	Ultraviyole ışınları
PEG	Polietilenglikol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	Eş-zamanlı PCR
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CKI	CDK inhibitörleri
HR	Homolog rekominasyonu
NER	Nükleotid eksizyon onarım
PIKK	Fosfatidilinositol 3-kinaza bağlı kinaz
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
MTT	3-(4.5-dimetiltiyazol-2-il
PBS	Fosfat tamponlu tuz

FBS	Fetal sığır serumu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
TE	Tris edta tamponu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
TCA	Trikloroasetik asit
TiP	Titanyum fosfit
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
mL	Mililitre
M	Molarite
hPa	Hektopaskal
CO₂	Karbondioksit
µL	Mikrolitre
IC₅₀	İnhibitöri konsantrasyon
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1.Giriş

Kanser Yunanca'daki 'carcinosa' yani yengeç kelimesinden gelir ve ilk defa Hipokrat (M.Ö. 460-370) tarafından kullanılmıştır. Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve vücudun doğal hücre ölümü mekanizmasından kaçma kabiliyeti olan ve adım adım ilerleyen karmaşık bir hastalıktır (1). Kanser istatistikleri, kanserle ilişkili ölüm oranlarının oldukça arttığını göstermiştir ve bu oranların 2020 yılında % 50 oranında olabileceği tahmin edilmektedir. Erkeklerde kanser insidansı kadınlara göre daha fazladır. Kadınlarda en sık görülen kanser, meme kanseri iken erkeklerde sık görülen kanser ise akciğer kanseridir. Servikal kanser ise, yılda yaklaşık 500.000 kişiyi etkileyen, kadınlarda 4. en sık görülen kanser türüdür. Servikal kanserde maligniteyi etkileyen birçok faktör vardır bunlar: erken cinsel ilişki (yirmi yaşından önce), çoklu cinsel partner, genç yaşta gebelik, daha fazla doğum sayısı, viral enfeksiyonlar, kötü sosyo-ekonomik durum sayılabilir (2). Servikal kanseri, epitelde servikal intraepitelyal neoplazi adı verilen bir dizi değişikliklerle gelişir. Kanser hücrelerinin biyolojik ve genetik özellikleri geri dönüşümsüz olarak değişir ve bu oluşan anormal hücreler diğer anatomik bölgelere metastaz yapma potansiyeline sahiptir (3). Servikal kanserlerinin yaklaşık %90'ı, organize tarama ve insan papilloma virüsü (4) aşılama programlarından yoksun düşük ve orta gelirli ülkelerde görülür. Yüksek gelirli ülkelerde servikal kanseri insidansı ve mortalite, resmi tarama programlarının başlatılmasından bu yana son 30 yıldır yarıya inmiştir. Servikal kanser tedavisi, teşhis ve hastalığın derecesine bağlıdır. Ayrıca, radikal histerektomi veya kemoradyasyon veya her ikisinin bir kombinasyonunu içerebilir (5). HPV dünyada cinsel yolla bulaşan en önemli hastalıklardan birisidir. HPV, tipleri çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Bazı tipleri, oral, genital veya anal papillomları

(siğiller) estetik olarak rahatsız edici olabilir; bazıları hayatı tehdit edici kanserlere neden olabilir; diğersleri ise tamamen asemptomatik olabilir ve kendine özgüdür. Human papilloma virüsünün (HPV) 16 ve HPV 18 gibi yüksek riskli tipleri, virüsle enfekte olmuş kişilerin kansere yakalanma ihtimalinin artmasına neden olur (6). Kanser hücrelerinin geleneksel kemoterapötik ajanlarla seçici olarak tedavi edilmesi yan etkilerinden dolayı çok zordur. Bu ajanlar öncelikle çeşitli hücresel mekanizmalarla, hücre döngüsünün durdurulması, apoptozun indüklenmesi ve kanser hücrelerinin çoğalmasının önlenmesi ve metabolik yeniden programlamaya müdahale edilmesi gibi bazı özelliklere sahiptir (7). Aktif antikanser ilaçlarının cilt, dalak, karaciğer ve diğers birçok organlar ve kanserli olmayan hücreler üzerindeki etkisinden dolayı artan toksisite vakaları gözlenmiştir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için, kanser hücrelerini hedefleyen nanoparçacık temelli kemoterapötik ajanlar , özellikle kanser hücrelerini hedefleme kabiliyetleri ve düşük toksisite nedeniyle giderek daha fazla tercih edilmektedir (8). Nanopartiküller (NP'ler) kansere karşı mücadelede daha yeni bir yaklaşımdır. NP'ler, tümör hücrelerinin infiltre edilmesinde ve ortadan kaldırılmasında etkili olmaları nedeniyle popüler olmayı başarmıştır. NP'ler , arzu edilen terapötik bir ilacı içerecek şekilde kolayca modifiye edilir, vücutta genellikle çok az toksik etkiye sahiptir, oldukça stabildir ve ilgilenilen bölgeye iletilmesinde oldukça etkilidir (9). Titanyum diyoksit (TiO₂) NP'leri, çok sayıda tüketici ve sanayi ürünü olarak üretilen ve en yaygın kullanılan nanomalzemeler arasındadır. Dünyada TiO₂ NP'nin üretim miktarının yaklaşık 3,000 ton / yıl olduğu tahmin edilmektedir (10). Son yıllarda, TiO₂ NP'ler, yüksek kimyasal stabilite, yüksek foto-reaktivite, düşük toksisite ve iyi biyoyumluluk nedeniyle biyolojik uygulamadaki rollerinden dolayı yoğun ilgi

görmüştür. TiO₂ NP'lerinin umut verici biyolojik uygulamaları arasında kanser tedavisi, ilaç dağıtımı, hücre görüntüleme ve biyosensör bulunmaktadır (11). Ancak, son araştırmalar TiO₂ NP'lere maruz kalan sıçanların iltihaplanma, akciğer hasarı ve akciğer tümörleri geliştirdiğini ortaya koymuştur. Polietilen glikol (12) toksik ve immünojenik değildir, uygun farmakokinetiğe ve doku dağılımına sahiptir. NP'lerin yüzeyini PEG ile değiştirmek biyoyumluluklarını artırır. PEG ile kaplama nanomalzemelerin *in-vivo* dolaşım süresini artırır, böylelikle retikuloendotel sistemi yoluyla klirensi azaltır (13). Paklitaksel (PTX), meme kanseri, servikal kanseri, yumurtalık kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve diğer kanserlerin klinik tedavisi için kullanılan bir taksan anti-tümör ilacı sınıfına aittir. PTX, suda zayıf çözünürlüğe ve oral biyoyararlanıma sahiptir. Genellikle intravenöz infüzyon yoluyla uygulanır (14). PTX, mikrotübülün dinamiklerini seçici olarak bozan, böylece hücre ölümüne yol açan mitotik tutuklanmaya neden olan bir mikrotübül stabilize edici ilaçtır (15).

Bu çalışmada; nanotaşıyıcı sistemlere yüklenmiş paklitaksel'in insan servikal kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ve bazı genlerin ekspresyon profillerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.KANSER

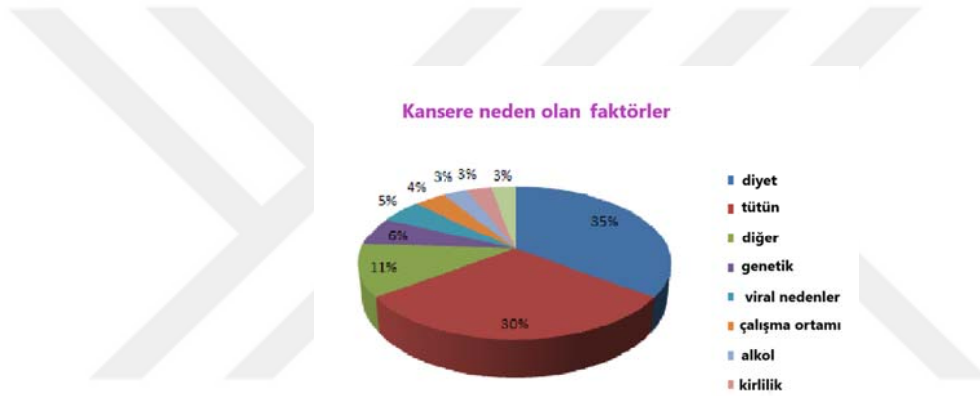
Kanser, dünya çapında görülen malign yaygın bir hastalıktır. Kanser, hücresel işlev bozukluğu ile karakterize olan geniş bir hastalık grubunu tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Sağlıklı hücreler ne zaman ne yapılacağını bilmek” için programlanmıştır. Kanserli hücreler ise bu programlamaya sahip değildir ve bu nedenle anormal büyür ve kontrolden çıkar. Normal dokularda yeni hücre büyümesi ve eski hücre ölümünün oranı dengede tutulur. Kanser durumunda, bu denge bozulur. Bu bozulma, kontrolsüz hücre büyümesi veya bir hücrenin apoptoz adı verilen bir işlemle hücrenin intihar etme kabiliyetinin kaybından kaynaklanabilir. Kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Tüm dünya genelinde , kanser prevalansı giderek artmaktadır (16). Kanser istatistikleri 2020’e göre, 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.6 milyon ölüm, kanserden meydana gelmiştir. 2020’de Asya’da kanser ölümlerinin% 57’sinden fazlası kaydedilmiştir. Avrupa, Amerika (kanser ölümünün% 15’i), Afrika (kanser ölümünün% 7’si) ve okyanusya’dan% 20 daha fazla kanserden ölüm olduğu bildirilmiştir (şekil 1)(17).



Şekil 1. Dünya çapında kanserden ölüm yüzdesi

Bu nedenle kanser tüm insan toplumlarının sağlığını etkileyen ciddi bir sorundur. Kanser, çevresel faktörler tarafından uyarılan ve klinik olarak kötü prognozlu hücrelerin kontrolsüz büyümesine neden olan multijenik ve multisellüler bir hastalıktır. Tıbbi olarak kanser iki tiptedir: iyi huylu ve malign tümörlerdir (18). İyi huylu tümör, kontrolsüz hücre çoğalmasının gerçekleşmediği kanserli olmayan bir tümördür. Bu tür bir tümör vücuda zararsızdır. İyi huylu tümör hücreleri daha hızlı çoğaldığında ve hücre kütlelerinde artışa yol açtığında malign tümörlere dönüştürülür. Malign tümörde, tümör hücreleri kan yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılır. Bu işleme metastaz denir ve yakın dokuya zarar verdiğinde anjiyogenez olarak adlandırılır (19, 20). Yapılan çalışmalarda 200'den fazla kanser türünün olduğu bildirilmiştir (21). Tüm türler arasında, 2018'de küresel olarak % 18.4'lük ölüm oranı ile akciğer kanseri, % 9.2 ile kolorektal kanser, % 8.2 ile mide kanseri, % 8.2 ile karaciğer kanseri, % 56.6 ile göğüs kanseri, % 5.3 ile yemek borusu kanseri, % 4.5 ile pankreas, % 3.8 ile prostat, % 3.3 ile serviks uteri, % 3.2 ile lösemi ve % 29.3 ile diğer kanser türleridir (cilt, orofarinks, testis, anüs, vajina vb.) (22). Kanser, doku seviyesinde çeşitli bir hastalıktır ve bu çeşitlilik tedavinin etkinliği (23), ve ardından spesifik teşhisi için büyük bir zorluktur (24). Erkeklerde en fazla görülen kanser türleri: prostat, akciğer ve bronş, kolon, rektum ve idrar kesesidir. Kadınlarda ise, meme, akciğer ve bronş, kolon ve rektum, uterus korpusu ve tiroiddir. Bu veriler prostat ve meme kanserinin sırasıyla erkek ve kadınlarda kanserin büyük bir bölümünü oluşturduğunu göstermektedir (25). Kanser oluşumundan sorumlu tütün, obezite, enfeksiyon, diyet, kirlilik, genetik, alkol ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi çeşitli faktörler vardır (26, 27). Kanser, genlerdeki art arda bir mutasyon dizisi ile oluşur, böylece bu mutasyonlar hücre fonksiyonlarını değiştirir. Kimyasal bileşikler ve gen

mutasyonları ve kanser hücrelerinin oluşmasında belirgin bir rolüne sahiptir. (28). İlginç bir şekilde, kanserojen özelliklere sahip çevresel ve kimyasal maddeler, hücrelerin sitoplazmasını ve çekirdeğini doğrudan veya dolaylı olarak etkiler ve genetik bozukluklara ve mutasyonlarına yol açar (29, 30). Virüsler, bakteriler ve radyasyon ışınları, tüm kanserlerin yaklaşık% 7'sine neden olan diğer kanserojen faktörlerdir (şekil 2) (31).



Şekil 2. Kansere neden olan faktörlerin dağılım yüzdesi

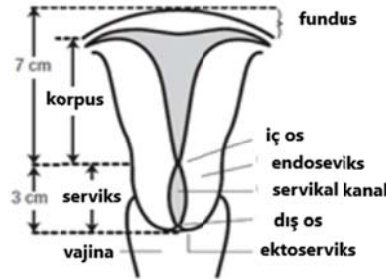
2.1.1.Kansere neden olan etmenler

Genel olarak, kanser hücreli ilişkileri bozmakta ve hayati genlerin işlevsizliğine neden olmaktadır. Bu bozukluk hücre döngüsünde etkilidir ve anormal proliferasyona neden olur (32, 33). Proto-onkojenler normal şartlar altında hücre bölünmesi ve büyümesinden sorumludur, ancak genetik mutasyon sırasında hücre varlığı için en tehlikeli olan onkojenler haline gelebilmektedir (34). Ek olarak, tümör baskılayıcı genlerin bulunmaması kontrolsüz hücre bölünmesini tetikler (35). Ayrıca 30'dan fazla DNA tamir genleri bulunmaktadır. Bu genlerin ürünü olan proteinler hatalı baz eklenmelerin çıkartılıp doğrusunun eklenmesinde görev alır (36). Onkojen oluşumuna ve genetik

bozukluklara yol açan genetik değişiklikler; kromozomal translokasyon (kronik kan kanserinde Bcr ve onkogen Abl), nokta mutasyonu (kolon kanserinde Ras geni), silme (meme kanserinde Erb-B geni), amplifikasyon (N- nöroblastomdaki myc) ve ekleme aktivasyonudur (akut kan kanserinde C-myc) (37-39). P53 genindeki mutasyon, p53 ile ilgili moleküler işlemlerin bozulmasında belirgin bir role sahip olan olağandışı bir proteinin oluşumuna yol açar. Bu moleküler ve biyolojik olayların anormalliği, kanser hücrelerinin oluşumuna yol açar; bu nedenle, p53 geninin kanser ile karmaşık bir ilişkisi olduğu ve p53 anormalliklerinin kanser vakalarının % 60'ında meydana geldiği bildirilmiştir. Normal şartlar altında, p53 hücre bölünmesi, hücre ölümü, yaşlanma, anjiyogenez, farklılaşma ve DNA metabolizmasında önemli bir rol oynar (40, 41)

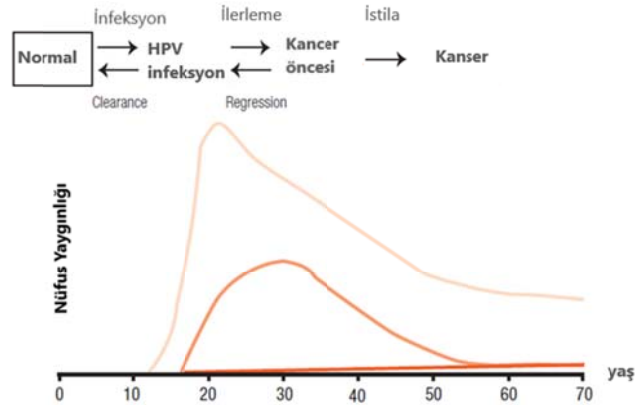
2.2.Servikal kanser

Serviks uterusun alt üçte biridir. Gebelik dışı doğurganlık çağındaki bir kadında, yaklaşık 3 cm uzunluğunda ve 2.5 cm çapındadır. Serviksin alt kısmı (ektoserviks) vajina içinde bulunur ve spekulum ile görülebilir; servikal üst üçte ikisi (endoserviks) vajinanın üzerinde yer alır ve görünmez. Çoğu servikal kanseri, endoserviks ve ektoserviksin birleştii bölgede ortaya çıkar (şekil 3) (42, 43).



Şekil 3. Serviks anatomisi

Servikal kanserin yaygın olarak Human Papillomavirüs (HPV) enfeksiyonlarından kaynaklandığı bilinmektedir. Servikal pre-kanser, serviksin dönüşüm bölgesinin epitel hücrelerinde meydana gelen belirgin bir değişikliktir; hücreler kalıcı veya uzun süreli HPV enfeksiyonu varlığında anormal bir şekilde gelişmeye başlar. Servikal pre-kanser ve skuamöz servikal kanserin birincil nedeni, yüksek riskli HPV tiplerinden biri veya daha fazlası ile semptomsuz, kalıcı veya kronik enfeksiyondur. HPV, seksüel yolla bulaşan en yaygın enfeksiyondur. Neredeyse tüm kadınlar ve erkekler cinsel aktiviteye başladıktan kısa bir süre sonra HPV ile enfekte olmaktadır. Kadınlarda ergenlik ve hamilelik sırasında, ektoservikte transformasyon bölgesi genişler. Servikal epitel hücrelerine girdikten sonra, yüksek riskli HPV enfeksiyonu normal fonksiyonlarını etkileyerek pre-kanserin karakteristik değişikliklerine neden olur. HPV ile enfekte olmuş hücrelerin büyük bir kısmı normal bir duruma döner ve büyük bir miktar servikal pre-kanser kanser haline gelmez (şekil 4) (44, 45).



Şekil 4. Servikal kanserin oluşumu ve nüfus yoğunluğu şeması

Servikal kanser dünya çapında kadınlarda en yaygın görülen dördüncü kanser türüdür. Ayrıca, büyük bir küresel sağlık sorununu temsil etmektedir (22). 2018'de, tahmini

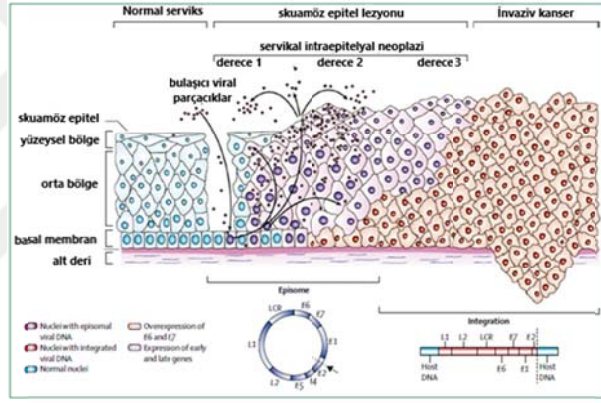
569.847 yeni servikal kanseri vakası teşhis edilmiştir ve bu malignite nedeniyle dünya çapında 311 365 ölüm meydana gelmiştir, ancak insidans ve mortalite coğrafi bölgelere göre geniş ölçüde değişebilmektedir. Yüksek gelirli ülkelerde, servikal kanseri insidansı ve mortalite, insidansı daha düşüktür (46). Servikal kanser, daha az gelişmiş ülkelerde, muhtemelen taramaların azalması ve HPV aşılarının yüksek maliyeti nedeniyle, orantısız şekilde daha yüksek oranlarda ortaya çıkmaktadır (47). HPV enfeksiyonu, servikal kanseri vakalarının çoğuyla ilişkilidir, HPV-16 ve 18, en fazla kanserojen alt tip olarak tanımlanır ve sırasıyla vakaların % 50'sinden ve % 10'undan sorumludur (47, 48). Bu iki HPV türden biri ile yapılan enfeksiyon, enfekte olmayan bir bireye kıyasla sırasıyla kanser riskinde 435 kat ve 248 kat artışa neden olur (49). Yüksek riskli HPV genotiplerine sahip kalıcı viral enfeksiyon, etken ajandır ve dünya çapında servikal kanseri olan hastaların % 99.7'sinde tespit edilebilmektedir (44). HPV enfeksiyonu cinsel yolla bulaşır ve kadınların aşağı yukarı % 80'i yaşamlarının bir döneminde, çoğu 45 yaşındayken enfekte olur (50). HPV enfeksiyonu genellikle ergenlik döneminde ve erken yetişkinlikte görülür (51), ve enfeksiyon asemptomatik olduğundan, servikte değişikliklerin ortaya çıkması 10-15 yıl sürebilir (4). Servikal kanserinin risk faktörleri hem davranışsal hem de enfeksiyöz katkıda bulunanları içerir. Davranışsal katkıda bulunanlar cinsel aktivite ve yaşam tarzı faktörlerini içerir. Cinsel olarak aktif kişilerde, servikal kansere HPV virüsü neden olur. HPV genetik olarak bulaşmaz ve diyetin servikal kanserini önlemede rolü yoktur. İlk cinsel ilişki yaşı, servikal kanseri riskini artırır (52), ilk cinsel ilişki daha genç yaşta veya menarşın yakınında enfeksiyon riskini artırır (53).

18 yaşından önceki cinsel ilişki, 21 yaşından büyük ilk cinsel ilişki yaşı ile karşılaştırıldığında servikal kanseri riskinde iki kat artışa yol açabilir. Bir partnere kıyasla, iki partnere risk yaklaşık ikiye katlanır ve altı veya daha fazla partner üç katına çıkartmaktadır (54). Sigara içmek servikal kanseri riskini artırır. Tütün yan ürünleri, servikal hücrelerinin DNA'sını tahrip eder; bu, servikal kanserinin ilerlemesine katkıda bulunabilir ve sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında servikal kanseri riskini potansiyel olarak ikiye katlar (55). Ayrıca, sigara içenler, HPV enfeksiyonlarına karşı savaşmak için zayıf bir bağışıklık sistemine sahip olabilir ve HPV enfeksiyonundan servikal maligniteye ilerleme olasılığını artırabilir (56). Oral kontraseptiflerin 5 yıldan uzun süredir kullanılması servikal kanseri riskini artırmaktadır. Her 5 yıllık oral kontraseptif kullanımı için risk 1.9 kat artmaktadır (57). Servikal kanseri, HPV'nin en karsinojen türlerini önlemek için etkili tarama ve aşılama nedeniyle çok önlenebilir bir hastalıktır (45). Kilit önleme girişimleri, önerilen aşılama serisinin tamamlanmasını, standardize edilmiş taramayı ve ilişkili risklerden kaçınmayı teşvik eden faktörlere ilişkin eğitimi içerir (58). Erken evre servikal kanseri genellikle asemptomatik olsa da, en sık görülen semptomlar özellikle cinsel ilişki sonrasında düzensiz veya ağır vajinal kanamadır. Bazı kadınlar, sulu, mukoid veya cürüflü ve kötü kokulu olabilen vajinal akıntı ile ortaya çıkabilir. İlerlemiş hastalık için, hastalar alt ekstremitelerin arka tarafı boyunca yayılabilen pelvik veya bel ağrısı ile ortaya çıkabilir.

2.2.1.Servikal kanser evreleri

Çoğu kanser türünün I-IV evre vardır. Bununla birlikte, 0 ile IV arasında evre olan servikal kanseri de dahil olmak üzere bazı kanser türleri vardır. Evre 0: Serviksin iç astarında anormal hücreler bulunduğunda; Evre 0 ayrıca in situ karsinom olarak da

adlandırılır; Evre I: Kanser yalnızca servikte sınırlı kaldığında; Evre II: kanser serviks dışına yayıldığında, ancak pelvik duvar veya vajinanın alt üçte birine yayılmadığında; Evre III: kanser vajinanın alt üçte birine yayıldığı ve / veya pelvik duvarına yayıldığı ve / veya böbrek hasarına neden olduğu; Evre IV: Kanser mesaneye, rektuma veya vücudun diğer kısımlarına yayıldığında şeklinde sınıflandırılmaktadır. servikal kanser tedavileri, kanserin evresi, kanserin vücudun diğer kısımlarına metastaz yapıp yapmadığı, tümörün büyüklüğü ve hastanın yaşı ve genel sağlığı gibi birçok faktöre dayanarak belirlenir (şekil 5) (5).



Şekil 5. Kanser ilerlemesine göre servikal doku değişiklikleri

2.2.2.Servikal kanseri önleme ve kontrolü

Servikal kanseri önleme ve kontrol programının amacı servikal kanser (59) ve HPV enfeksiyonlarını azaltmak, servikal pre-kanser lezyonların tanı ve tedavi etmektir (60). Servikal kanseri önlemenin başlıca yolu, HPV enfeksiyonları riskini azaltmaktır. Önlemler şunlardır: 1) cinsel aktiviteye başlamadan önce 9-13 yaş arası kızlar için aşılar; 2) HPV bulaşma riskini azaltmak amacıyla, yaşa ve kültüre uygun olarak hazırlanmış, erkekler ve kızlar için sağlıklı cinsellik eğitimi vermektir. Servikal kanserinin sekonder

önlenmesi, pre-kanserden invaziv kansere kadar olan ilerlemenin engellenmesi ile servikal kanseri ve buna bağlı ölümlerin görülme sıklığını ve prevalansını azaltmak için pre-kanser taraması ve tedavisidir. Önlemler arasında 1) danışmanlık ve bilgi paylaşımı; 2) genellikle asemptomatik olan pre-kanseröz lezyonları belirlemek için 30-49 yaş arası tüm kadınları taramak; HPV aşısı verilmiş kadınlar için bile, riskli yaşa geldiklerinde taramaya ve tedaviye devam etmek önemlidir. Servikal kanserinin üçüncül olarak önlenmesi için, servikal kansere bağlı ölümlerin sayısını azaltmak ve invaziv servikal kanserinin tedavisidir (61).

2.3.HeLa hücreleri

1 Şubat 1951'de Henrietta Lacks adlı 30 yaşında bir kadın, adet dönemleri arasında lekelenme semptomları nedeniyle Baltimore, Maryland'deki Johns Hopkins Kadın Hastalıkları Kliniğine başvurmuştur. Son adet dönemi 4 Ocak 1951'de gerçekleşmiştir (62). Genel muayenesinin sonuçları dikkat çekici olmamasına rağmen, serviksin muayenesinde yüksek, pürüzsüz, parlak ve mor yaklaşık 2.54 cm bir lezyonun tespit edilmiştir. Lezyon serviks ile sınırlanmış ve tedavi eden doktor tarafından görülen serviksin diğer karsinomlarından farklı olduğu tespit edilmiştir (63). Cinsel yolla bulaşan hastalıklar için yapılan test sonuçları negatif olup, serviks biyopsisi yapılmıştır. Biyopsiden dört doku parçası patoloji bölümüne gönderilmiş ve “epidermoid karsinom, serviks uteri, spinal hücre tipi” stroma'nın kesin istilası teşhisi konmuştur. Tedavi kanserin yayılmasını engelleyememiştir. 8 Ağustos 1951'de ciddi karın ağrısı geçirmiş ve Johns Hopkins Hastanesine yatırılmıştır. Acısı giderek daha şiddetli ve inatçı olmuştur. Henrietta Lacks, 4 Ekim 1951'de sabah saat 12: 15'te ölmüştür (62). Henrietta Lacks'in servikal biyopsisi, klinik değerlendirme için patoloji bölümüne ve araştırma

amaçlı olarak Johns Hopkins Hastanesi Cerrahi Bölümündeki Doku Kültürü Laboratuvarı'na doku sağlamıştır. (63). Laboratuarda bir araştırmacı, Henrietta Lacks'in biyopsi numunesinden elde edilen hücreleri silindir tüpü tekniğini kullanarak kültüre koymuş; hücreler sağlam bir şekilde büyümüş, önceki örneklerin sonuçlarının aksine, doku kültüründe ölümsüzleştirilen ilk insan kanser hücre hattı haline gelmiştir. Hücreler, Henrietta Lacks'in adı ve soyadı ilk 2 harfinden alınarak “HeLa” adlandırılmıştır. Kültürde normal servikal epitel veya servikal karsinomu büyütme için önceki çabaların zor olduğu; ancak, Henrietta'yı etkileyen agresif adenokarsinomdan hücreler yetiştirme çabaları başarılı olmuştur (64). Yirmi yıl sonra, Lacks'in cerrahi biyopsisi ve otopsisindeki histopatoloji slaydlarının yeniden incelenmesi, hastanın serviksine çok agresif bir adenokarsinoması bulunduğunu tespit ederek, ilk teşhiste bir revizyona yol açmıştır. Servikal karsinom malign ve hastada hızlı bir klinik bozulma tespit edilmişti (65). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, HeLa hücrelerinin HPV-18 DNA içerdiği ve HPV18-pozitif HeLa hücrelerinin mikroRNA ekspresyonundaki değişikliklerle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (66, 67). HeLa kültür edilen ilk insan hücre hattıydı ve o zamandan beri biyolojik araştırmalarda en yaygın kullanılan hücre hattı haline gelmiştir (68, 69). Son yıllarda, HeLa hücrelerinde mikroarray tabanlı gen ekspresyon profili, omik yaklaşımlara öncülük etmek (70-72), çevresel (73) ve genetik bozulmalara verilen yanıtları araştırmak için kullanılmıştır (74). HeLa'daki RNA izolasyonları, mitoz, sitokinez, endositoz ve diğer hücresel işlemlerde yer alan genlerin keşfedilmesine ve fonksiyonel sınıflandırmasına yol açmıştır (70, 75-77). Normal bir hücre 46 kromozom içerirken, HeLa hücreleri 76 ila 80 kromozom içerir. HeLa hücreleri, kanserli halleri göz önüne alınsa bile, alışılmadık derecede hızlı büyür. Gerçekten de, HeLa hücreleri kolay

ve hızlı bir şekilde büyür, hücresel sayımı sadece 24 saat içinde ikiye katlar, bu da büyük ölçekli testler için idealdir. HeLa hücreleri ölümsüzdür, bu da tekrar tekrar bölünecekleri anlamına gelir. Bu performans, her bölünmeden sonra telomerleri yeniden oluşturan, hücresel yaşlanmayı önleyen ve hücrelerin kalıcı bölünmelerini sağlayan aşırı aktif bir telomeras ifadesiyle açıklanabilir (78). Tüm bu özelliklerle HeLa hücreleri, hastalıkların etki mekanizmasını veya terapötik olarak aktif ilaç moleküllerini incelemeye istekli yaşam bilimcileri için giderek artan popüler hücresel modeller haline gelmiştir. DNA hasarı onarımı gibi hücre sinyal olaylarını açığa çıkartmak için de kullanılmıştır (79).

2.4.Kemoterapi

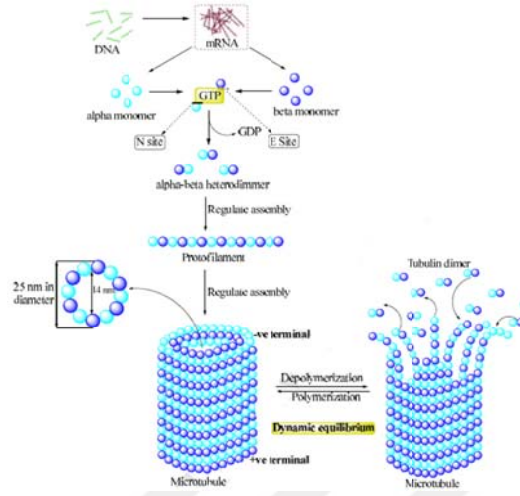
19. Yüzyılın başlarından beri ortaya çıkan kanser tedavisi örnekleri arasında radikal, süper radikal ve ultra radikal cerrahi yer alır (80). Radikal cerrahi kullanımı, lokal cerrahi ile birlikte sistemik adjuvan tedavinin benzer sonuçlar verdiğini doğruladıktan hemen sonra kullanımı azalmıştır (81). Sistemik adjuvan tedaviler radyasyon ve sitostatik ilaçların uygulanmasını içerir ve kanser yayılması ve metastazı tedavisi için gereklidir. Azot hardal, malign tümörleri tedavi etmek için kullanılan ilk sitotoksik ajanlardır (82). 1970'lerin sonunda, bleomisin, vinblastin ve sisplatin, kemoterapide kullanılan yeni ilaçlardan olmuştur; ancak, günde ~ 12 kez kusma gibi ciddi yan etkilere neden olmuşlardır. Antiemetik ilaçlar mevcut olmadığından, hastaların agresif kemoterapinin yan etkilerini tolere etmesi beklenmiştir (83). Sürekli çabaların ardından, kanser hücrelerinin veya dokusunun büyümesini kontrol etmek için çeşitli doğal, yarı sentetik ve sentetik bileşikler geliştirilmiştir (84, 85). Bu anti-kanser ajanları genel olarak alkilleyici ajanlar (örneğin siklofosfamid), antimetabolitler (örneğin metotreksat), antibiyotikler (örneğin, doksorubisin), antimikrotübüller (örneğin paklitaksel), doğal

ürünler (örneğin kolşisinler ve podofyilotoksik) ve hormonlar (örneğin aminoglutildimid) olarak sınıflandırılır (86). Ne yazık ki bu ilaçlar saç dökülmesi, şiddetli ağrı, bulantı, kusma, kemik iliği toksisitesi, anemi ve kısırlık gibi ciddi yan etkilereneden olabilmektedir . Bu yan etkiler, temel olarak kanser önleyici ajanların kanser hücrelerine spesipik olmamasından kaynaklanmaktadır (87). Kanser hücrelerinin özgüllüğü toksisiteyi azaltmak için önemli bir özelliktir, ancak kanser hücreleri normal hücrelere çok benzer olduğu için elde edilmesi zordur (88). Anti-kanser ilaçları temel olarak çeşitli etki alanlarını bloke ederek ve çeşitli enzimlerin salımını engelleyerek hücre bölünmesini durdurur. Günümüzde, uygulanan kemoterapötik ilaçlara birçok strateji adapte edilmiştir. Kemoterapötik ilaçlar, küratif amaçlı veya yaşamı uzatmak için kullanılabilir. 1) Kombine kemoterapi, radyasyon tedavisi, cerrahi ve / veya hipertermi gibi kanseri tedavi etmek için bir seferde birden fazla tedavinin uygulanabileceği bir çeşit tedavi stratejisidir Kombine kemoterapide, farklı ilaçlar farklı etki mekanizmalarına ve yan etkilerine sahiptir. Kombine kemoterapinin en önemli avantajı, herhangi bir ilaca direnç gelişme şansını en aza indirmektir. Ayrıca, ilaçlar minimum yan etki ve toksisite ile düşük dozda uygulanabilir. Bununla birlikte, 2) induksiyon kemoterapisi, kanser ilacı ile kanserin ilk kez tedavisi için kullanılır (89). 3) Konsolidasyon kemoterapisi genel olarak hastalıksız süreyi uzatmak ve genel sağkalımı artırmak için remisyondan sonra verilir (90). 4) Neoadjuvan kemoterapi cerrahi gibi lokal bir tedaviden önce kullanılır ve primer tümörü küçültmek için kullanılır. Ayrıca, yüksek mikrometastatik hastalık riskinin gözlendiği bir durumda da kullanılır. Bu terapi, az miktarda kanser olduğuna dair kanıt bulunduğu ve tekrarlama riski varlığında kullanılabilir (60). Kemoterapi ile tedavi edilen kanser hastaları, iştahsızlık, halsizlik,

bulantı ve enerji alımında azalma gibi bazı yaşam kalitesi özelliklerinin olumsuz yönde kötüleştiğini bildirmiştir (91). Sistemik kemoterapi genellikle spesifiklikten yoksundur ve alopesi, anemi ve duyuşal bozukluklar, özellikle uyarının moleküler özelliklerinin algılanmasına dayanan kemosensör sistemler gibi rahatsız edici yan etkilere neden olabilir. Sitotoksik kemoterapinin uygulanması sırasında kemosensör sistemler diğer duyuşal sistemlerden daha fazla değişikliğe maruz kalır (91). Bu fizyolojik değişikliklerin yanı sıra, tat ve koku almada zorluk ve bilinç de değişim meydana gelebilmektedir (92).

2.5. Tübülin ve antitübülin ajanları

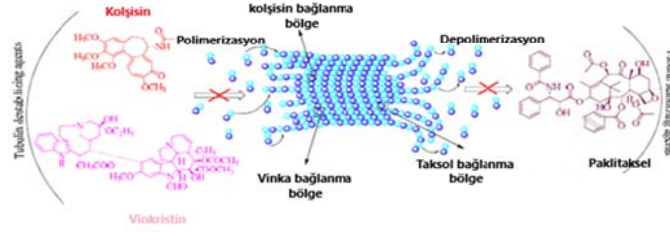
Tübülin, α ve β -heterodimerden oluşan küresel bir proteindir (93). Bu túbülin dimerleri, içi boş bir çekirdeğin etrafına düzenli bir heliks kafes içine monte edilmiş gibi 12 ve 17 doğrusal protofilamentten oluşan mikrotübüller oluşturmak üzere polimerleşir (94). Mikrotübüller, çapı 25 nm olan ve uzunluğu 200 nm ila 25 μ m arasında değişen üçüncü ana hücre iskeleti bileşenidir. Tübülin üretiminden sorumlu olan genler, mRNA'yı salmak için transkripsiyona uğrar. Bu mRNA, α -tübülin ve β -tübülin üretmek için çeviri işlemine tabi tutulur. Bu α -tübülin, N bölgesinde (değişmeyen bölge) GTP'ye (guanin trifosfat) ve β -tübülin ise, E bölgesinde (değişebilir bölge) GTP'ye bağlanır; α ve β -heterodimer (tübülin heterodimer) oluşturmak için GDP'ye hidrolize edilmiştir. Doğrusal protofilamentler oluşturmak için bu heterodimerlerin çoklu birimleri birbirine bağlanmıştır. Bu lineer protofilamentler, mikrotübüller oluşturmak için kendilerini paralel bir şekilde birleştirir. Mikrotübüller, alternatif polimerizasyon ve depolimerizasyon döngüsünün gerçekleştiği dinamik denge durumunda bulunur (şekil 6) (95-97).



Şekil 6. Mikrotübüller polimerizasyonu ve depolimerizasyonu

Mikrotübüller, yeni hücreler oluşturmak için anafazda mitotik iğ üreten hücre bölünmesinin önemli bileşenlerinden biridir (12). Hücre bölünmesinin yanı sıra hücre şeklini oluşturmak gibi birçok başka işlevi vardır. Mikrotübüller, hücre iskeletinin ana bileşenlerinden biridir. Bu nedenle, hücreyi desteklemek ve şekillendirmek için çeşitli kuvvetlere ve sıkıştırmaya dayanır. İç organizasyon da mikrotübüller tarafından sürdürülür (98). Hücre hareketi ise mikrotübüller ve flagellalar gibi bir yapı vermek için özel demetlerde birleşir. Bu yapılar, sürünerek ve genişleyerek hücrenin bir yerden diğerine taşınmasına yardımcı olur (99). Hücre içi hareketlilikte ise mikrotübüller, çeşitli hücre organellerine çekirdek dışındaki bir hücre içerisinde taşınması için yardımcı olur (100). Mikrotübüllerin dinamik polimerizasyon ve depolimerizasyon dengesi ile etkileşime giren ilaçlar, tübül etkileşicileri olarak adlandırılır (101). Etkileşim etkilerine dayanarak kemoterapik ajanlar, tübül stabilize edici ajanlar ve tübülün destabilize edici ajanlar olarak iki kategoriye sınıflandırılırlar (102). Bu ajanlar, denge işlemini bozan mikrotübüllerin kılınmasına (de stabilize edici ajanlar) ve uzamasına (stabilize edici ajanlar) neden olur (103). Sonuç olarak, hücre bölünmesi için mitotik iğ üretmek

amacıyla hiçbir mikrotübül yapı bulunamaz. Bu stabilize ve destabilize edici ajanlar ayrıca bağlanma alanlarına göre sınıflandırılır. Tübüline bağlanan ilaçların hücre bölünmesinin inhibisyonuna neden olduğu çeşitli bağlama alanları vardır. Temel olarak üç ana bağlanma bölgesi, yani kolşisin bağlanma alanı, vinka bağlanma alanı ve taksol bağlanma alanı bildirilmiştir; kolşisin ve vinka bağlanma alanları polimerizasyon inhibitörü adı altında ve taksol bağlanma alanı ise depolimerizasyon inhibitörleri adı altında tanımlanmıştır (104, 105). Tübülün stabilize edici maddeler, mikrotübüllerin tübüllere depolimerleşmesini önler, bu da sürekli polimerizasyon ile mikrotübül polimer kütlelerinde artışa neden olur. Ayrıca depolimerize edici inhibitörler olarak da adlandırılırlar. Bunlar esas olarak kolşisin ve vinka bağlanma bölgesinden farklı davranan taksol bağlanma bölgesine bağlanır. Bu ajanlar, polimerizasyon reaksiyonunu uyaran mikrotübül lümenin iç yüzeyinin β -tübüline bağlanır (106). Bu bağlanma bölgesi, taksol bağlama alanı olarak bilinir. Taksol bağlanma alanını bağlayarak ve engelleyerek mikrotübülünün polimerizasyonunu artıran çeşitli tübülün stabilize edici ajanlar vardır. Bu tübülün stabilize edici ajanlar, esas olarak hücre ölümüne ve apoptoza yol açan hücre döngüsünün G2 / M fazına saldırır. Çeşitli doğal, yarı sentetik ve sentetik tübülün stabilize edici ajanların bulunduğu bildirilmiştir. Wall, 1971'de *Taxus brevifolia* Nutt kök kabuğundan paklitaksel izole eden ilk kişi olmuştur. Temel olarak meme, yumurtalık, prostat kanseri, Kaposi sarkomu ve küçük hücre olmayan akciğer kanserlerini tedavi etmek için kullanılır (107). Taksol adı ile satılmaktadır. Bitkideki düşük düşük konsantrasyonu nedeniyle *Taxus baccata*'dan (porsuk ağacı) izole edilen doğal bir ürün olan Baccatin III'ün yarı sentetik modifikasyonları yoluyla ticari olarak sentezlenir (şekil 7).



Şekil 7. Tübüline kolşisin, vinka ve taksol bağlanma bölgeleri

Taksan ailesinin bir üyesi olan paklitaksel (PTX), birçok gelişmiş ve refrakter kanser türünün tedavisi için en faydalı ve etkili antineoplastik ajanlardan birisidir. Bu hastalıklarda PTX'in başarısı, geniş bir antitümör aktivitesi yelpazesi, hem katı hem de yayılmış tümörlerde etkinlik ve benzersiz bir etki mekanizması tekil özelliklerinden kaynaklanmıştır. Mikrotübül dinamiklerini seçici olarak bozan, mikrotübül stabilize edici bir ilaçtır, böylece hücre ölümüne yol açan mitotik tutuklamaya neden olur (108, 109). 1992'de Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) yumurtalık kanseri tedavisi için başlangıçta PTX ticarileşmesine izin vermiştir. Günümüzde, PTX meme kanseri, ileri yumurtalık kanseri, mikrositik akciğer malign neoplazmına karşı güçlü bir antineoplastik aktivite sergilemektedir. Ayrıca, PTX güçlü bir antineoplastik aktivite sergilediğinden, özofagus kanseri, mesane kanseri, prostat kanseri, servikal kanseri, mide kanseri, baş ve boyun kanseri, endometrial malignite, beyin oligodendroglioma ve testis kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılır (110). PTX, seçici olarak tübülün proteinlerinin β alt ünitesine bağlanarak, polimerizasyonlarını ve montajlarını teşvik ederek, böylece mikrotübüllerin oluşumunu stabilize ederek kemoterapötik bir ajan olarak görev yapar. Bu etki, G2 / M fazında şiddetli mitotik

durgunluğa neden olan disfonksiyonel bir mitotik iğ oluşmasına neden olur ve sonuçta apoptoz yoluyla hücre ölümünü sonuçlanır (111). PTX, tümör anjiyojenezini sınırlandırır, apoptoza ve hücre sel büyümenin inhibisyonuna yol açan genlerin ve sitokinlerin ekspresyonunu uyarır (112). Hem anti-proliferatif hem de sitotoksik özelliklerin kombinasyonu, PTX'in antitümör etkinliğine katkıda bulunur (113). PTX, plazma proteinlerinin % 90'dan fazlasına bağlanır. Eliminasyonun ana yolları hepatik metabolizma ve ardından biliyer atılımdır. Karaciğerde, PTX metabolizmasına sitokrom P450 aracılık eder ve dozun % 10'undan azı idrarla bozulmadan atılır (114). Albümine bağlı, polglumaks, polimerik-miçel, emülsiyonlar, nanosfer, nanopartiküller ve lipozomlarla paklitaksel formüle etmek için farklı stratejiler geliştirilmiştir.

2.6.Nanopartiküller

Nanomatyallerin varlığı, dispersiyon etkilerinin incelenmesi için submikron büyüklüğündeki altın nanopartikülünün (115) Faraday tarafından geliştirildiği 1850'lere dayanır (116). Nanosistemler son otuz yılda çeşitli aşamalarda gelişmiştir. Dökme malzemeler daha küçük bir ölçeğe, neredeyse moleküler seviyeye indirildiğinde, yeni özellikler sergilemeye başlar. Nano ölçekte “molekül” ve “mikron” arasındaki boyut, yüzey özellikleri, daha yüksek yüzey serbest enerjisi ve kimyasal reaktivite nedeniyle radikal bir değişime uğrar. Artan yüzey/hacim oranı, bu nanopartikülat sistemlerinin toksisitesinin yanı sıra etkinliğini de yeniden tanımlamaktadır. Dolayısıyla, geleneksel sistemlere kıyasla, nanosistemler, işlevsel yönleri üzerinde özgünlük, seçicilik ve kontrol sağlama potansiyeli olan farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Bu, ilaç dağıtma, tanı, görüntüleme, biyo-mühendislik, kozmetik, tıbbi cihazlar ve teranostiks alanlarında ileri düzeyde yeni uygulamalara yol açmıştır (117).

Nanoteknoloji, biyoteknoloji, ilaç, malzeme, polimer, kimyasal ve yaşam bilimlerinden oluşan disiplinlerarası bir alandır. İlaç dağıtımında keşfedilen nanosistemler bir aktif molekül ve bir taşıyıcı cihaz olmak üzere iki temel bileşenden oluşur. Bunlardan en azından herhangi biri bir nano boyutta olmalıdır. Aktif kısım, terapötik bir ilaç veya gen olabilir ve / veya tamamlayıcı etkiler için fonksiyonel grup olabilir. Nanoplatformlar ilacın yüklemesi ve güvenli bir şekilde salınması için taşıyıcı görevi görür. Biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için çeşitli nanopartikül sistemleri mevcuttur. Dendrimerler, kuantum noktaları, karbon nanotüpler, fullerenler, silika, metal oksitler, soy metaller, nanokristaller, lipitler ve polimerler gibi farklı malzemelerden çok sayıda nanopartikül sistemi ortaya çıkmıştır (118).

Nano ölçekte, yüzey serbest enerjisinde muazzam bir artışla önemli bir boyut azalması olur ve bu da kararsız olan agregalar oluşturur. Dolayısıyla, her zaman stabilize edici maddelere ihtiyaç vardır. Aktif hedefleme için, fizyolojik reseptör fonksiyonel gruplarıyla uyumlu olacak bir ligand kullanılması esastır (119). Biyolojik etkinlik, toksisite, in vitro / in-vivo kinetik ve hedefleme kabiliyeti gibi NP'lerin bazı özellikleri büyüklüklerinden, dağılımlarından ve şekillerinden etkilenir. Ayrıca, bunların etkileri ilaç yükleme, salıverme kinetiği ve sistemlerin kararlılığı üzerinde gözlenir (120). Parçacıkların morfolojisi ve nano boyutu biyolojik akıbetlerinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. Tipik olarak, 10 nm'den daha küçük bir boyuta sahip NP'ler hızla temizlenir. Bununla birlikte, ortadan kaldırılmak için maksimum nanosistem boyutu hedeflenen hücresel işlevsellik ile tanımlanır. Partikül büyüklüğü 150-200 nm'yi aşan nano taşıyıcılar, kan dolaşımından hızlı bir şekilde çıkarılması gerekir; ve karaciğer ve dalakta birikmesi ile kompleman sistemi aktivasyonunu uyarma eğilimindedir (121).

NP'ler inorganik NP'ler ve organik NP'ler olarak sınıflandırılır. İnorganik NP'ler metal ve metal oksitleri içerir (122) . Bazı metal oksit nanoparçacıklarına örnek olarak gümüş (123), demir oksit (Fe_3O_4), titanyum dioksit (TiO_2), bakır oksit (CuO) ve çinko oksit (ZnO) verilebilir. Organik NP'ler poli- ϵ -lisin, kuaterner amonyum bileşikleri, katyonik kuaterner polielektrolitler, N-halamin bileşikleri, lipozomlar ve kitosan içermektedir (124). İnorganik nanosistemlerin, bir dizi aktif molekül ve görüntüleme ajanı için üstün taşıyıcı olmalarını fiziksel, optoelektrik, elektromanyetik ve yapısal özellikleri ile daha iyi kontrol edilebilir. Kuantum hapsi ve kolay morfolojik değişiklikler, ayarlanabilir optik özelliklerle birlikte, terapötik, görüntüleme ve theranostik uygulamalarla çok fonksiyonlu ilaç dağıtımı için inorganik nanoplatformları çok yönlü sistemler yapar. Biyouyumlu altın NP'leri ve birinci sınıf antimikrobiyal nanokristal gümüş, kullanılan metal NP'lerdir. Kozmetik, teşhis, kataliz, immünolojik analizler ve detoksifikasyon uygulamaları için ZnO , TiO_2 , silika ve süperparamanyetik demir oksit NP'leri gibi metal oksit NP'leri araştırılmıştır (125). İnorganik nanosistemler, reaktif oksijen türlerini (126) ve serbest radikalleri üretmek için daha büyük partiküllerden daha yüksek reaktiviteye sahip üstün yüzey alanı sunarak oksidatif stres, inflamasyon, mutasyonlar ve protein / membran denatürasyonuna yol açar. Bu yüzden, bu nanosistemlerin terapötik faydaları, muhtemel riskleri ile birlikte değerlendirilmelidir (127). NP'ler kimyasal veya fiziksel yollarla üretilir. Bu teknikler arasında, NP'lerin kimyasal sentezi, faydalı materyaller yapımında büyük potansiyeli olan hızla büyüyen bir alandır (128). Herhangi bir NP çeşidini sentezlemek için kullanılan tüm farklı yöntemler, “Yukarıdan Aşağı” (büyük madde parçalarının parçalanmasını) ve “Aşağıdan Yukarı” (moleküler ölçeğinden veya nano ölçekte) olarak adlandırılan iki genel grupta sınıflandırılabilir. Yukarıdan aşağıya

yöntemi, küre frezeleme ve öğütme gibi mekanik kuvvet kullanımı ile ilişkilidir. Aşağıdan yukarı yöntemi ise, kristalizasyon, doğrudan üretim veya diğer benzer teknikler kullanarak doğru boyutta parçacıklar üretmektir. Her iki yöntem nanoteknolojide çok önemli rol oynamaktadır (129). Yaygın olarak kullanılanların arasında 1) Kopresipitasyon yöntemleri, 2) Mikroemülsiyon tekniği, 3) Solvotermal / hidrotermal yöntemler ve 3) sol-gel yöntemi yer alır. Sol-gel yöntemi, bir öncül çözeltinin kimyasal yollarla inorganik bir katıya dönüştürülmesini içerir. Genel olarak, prekürsör (metal alkoksit veya inorganik tuz) hidroliz, yoğunlaşma, kurutma ve sonra ısı işlem, katı oksit veya diğer bileşikler haline gelir (130, 131). NP'ler süspansiyonda yüzey yüküne sahiptir. Elektrik alanı uygulandığı anda, elektrik alanı ve yüklü parçacık arasındaki etkileşim nedeniyle bir parçacık hareket etmeye başlar. Hız ve hareket yönü, elektrik alanının, yükün ve süspansiyon ortamının bir fonksiyonudur. Kesme düzlemindeki parçacığın elektrik potansiyeli ile orantılı hıza zeta potansiyeli denir. Böylece, bir elektrik alanı altında, partikül hareketinin optik ölçümü, zeta potansiyelini belirlemek için kullanılabilir. Bir NP, sonuç yüzey yüküne sahip olduğunda, yük, nanopartikülün yüzeyine yakın zıt yüklü iyonların artan konsantrasyonu ile taranır. İyon tabakası nanoparçacık ile birlikte hareket eder ve yüzey yükü tabakası ve zıt yüklü iyonları olan elektriksel bir çift tabaka oluşur. Negatif zeta potansiyeli olan partikül, pozitif yüklü yüzeylere bağlanır ve bunun tersi de geçerlidir. Zeta potansiyelinin büyüklüğü partikül stabilitesi hakkında bilgi sağlar. Yüksek büyüklük, artan elektrostatik itme nedeniyle artan stabiliteyi temsil eder. Parçacıklar, 0-5 mV aralığında toplanma eğilimindedir. Minimal olarak stabil parçacıklar 5-20 mV aralığındadır. Orta derecede

stabil parçacıklar 20–40 mV aralığındadır. Oldukça stabil parçacıklar ise 40 mV aralığındadır (132).

Nano boyuta getirilmiş partiküllerin yüksek yüzey serbest enerjisinden kaynaklanan dengesizlik sorunlarının üstesinden gelinmesi için yüksek reaktif yüzeylerinin uyumlu yardımcı maddeler ya da kombinasyonları ile kaplanması gerekir. Yüzey mühendisliği araçları, in vivo ilaç salma kinetiğinin kontrol edilmesinde ve ayrıca seçilen kısmın aktif ve pasif ilaç hedeflemesinin tanımlanmasında yararlıdır. Nanosistemlerin peptidler, polimerler, ligandlar, enzimler, antikorlar, nükleik asitler veya markörlerle yüzey etiketlemesi, programlanmış ilaç iletimi ve teşhisi için gereklidir (133). Polietilen glikol ve türevleri yaygın olarak çeşitli nanosistemlerin yüzey dekorasyonunda inaktif polimerler olarak kullanılır, çünkü fizyolojik sistem bileşenleri ile herhangi bir etkileşimi sınırlar ve hedeflenen ilaç sunumu için "gizli" doğasını gösterir. Geniş güvenlik profili ve PEG sınıflandırması nedeniyle, ilaç dağıtımı için PEGilasyon yaygın olarak incelenmiştir (134). PEG, tekrarlanan birimlerden (-CH₂CH₂O-) oluşan doğrusal bir polimerdir ve NP'lerin modifikasyonu için en çok kullanılan polimerdir. Bu polimer, çok sayıda organik polar ve apolar çözücünün yanı sıra suda da iyi çözünür. Yüklenmemiş hidrofilik kalıntıları ve yüksek yüzey hareketliliği, sulu sistemlerde yüzeyi sabitleyen yüksek sterik dışlanmaya yol açar. Bu nedenle PEG, partiküllerin sterik stabilizasyonla toplanma eğilimini azaltır (135).

2.6.1. TiO₂ nanopartiküller

Titanyum dioksitin (TiO₂) geniş bir uygulama aralığı vardır (136). TiO₂ beyaz, yanmaz ve kokusuz bir tozdur. TiO₂ yaygın olarak beyaz bir pigment olarak kullanılan, zayıf

çözünür bir partiküldür (137). TiO_2 benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı geniş bir uygulama alanına sahiptir. TiO_2 , tekstil ürünlerinde, kağıtlarda, yiyeceklerde ve ilaçlarda kullanılır. Titanyum, yüksek biyouyumluluk, vücut sıvısı etkilerine karşı direnç, büyük çekme dayanımı, esneklik ve yüksek korozyon direnci gibi üstün özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalar için en çok kullanılan implant malzemelerinden biridir (136). TiO_2 NP'leri, yıllık 10.000 ton üretim kapasitesine sahip en çok üretilen nanomalzemeler haline gelmiştir (138). TiO_2 NP'ler, yüksek stabiliteleri ve antikorozyon ve foto-katalitik özellikleri nedeniyle beyaz bir boya maddesi, kişisel cilt bakım ürünü, su arıtma maddesi ve bakteri yok edici madde olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (139). Araştırmalar, TiO_2 NP'lerinin tüketici ürünlerinde kullanılan ilk beş NP tipi arasında olduğunu göstermiştir, çünkü parlaklıkları ve yüksek refraksiyon endeksleri TiO_2 NP'lerinin beyaz görünmesini sağlar. Nanotıp alanında, TiO_2 NP'leri, ileri görüntüleme ve nanoterapötiklerde faydalı araçlar olarak araştırılmaktadır (140). Örneğin, TiO_2 NP'leri fotodinamik tedavide kullanım için potansiyel ışığa duyarlılaştırıcılar olarak değerlendirilmektedir (141). TiO_2 NP'leri, cildi ultraviyole (142) radyasyonundan korumak için geniş UV spektrum zayıflatma özelliklerinden dolayı güneşten koruyucu olarak kullanılabilir ve NP'lerin insan derisine nüfuz etmediğine inanılır (143, 144). TiO_2 NP'lerinin kullanımının artması, partiküllerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olası maruziyetleri ve müteakip etkileri ile ilgili endişelere yol açmıştır (145). Ayrıca, TiO_2 NP'leri UV ışığına maruz kaldıklarında katalitik hale gelirler ve kimyasal olarak katalitik aktiviteleri yoluyla tahribat için su arıtımında kullanılırlar (137). Kaplanmamış TiO_2 NP'leri, diğer çözünmeyen nanomalzemeler gibi, sulu ortamlarda topaklanma eğilimindedir. TiO_2 NP'ler, TiO_2 NP'lerin doğal ve

mühendislik ortamlarında reaktivitesini, davranışını, kaderini ve risk sonuçlarını etkileyecek şekilde bir araya gelme eğilimindedir (146). NP'lerin ortamlardaki stabilitesini azaltan iki tür toplama vardır: homoaggregasyon ve heteroaggregasyon. Aynı özelliklere sahip partikülleri içeren agregat, homoaggregasyon olarak adlandırılır. Heteroaggregasyon, farklı fiziksel veya kimyasal özelliklere sahip partiküllerin eklenmesiyle mümkün olabilir (147). NP'ler ve diğer doğal kolloidler arasındaki homoaggregasyon ve daha da önemlisi heteroaggregasyon, TiO₂ NP'lerinin akibetini etkiler (148). TiO₂ NP'leri, yüksek yüzey alanı-hacmi ve spesifik ortamda yüzey değişimi nedeniyle toplanma eğilimindedir. TiO₂ NP'lerin büyük partiküllerdeki agregatları, birincil boyutlarından on veya yüz kat daha büyüktür. NP hareketliliği ve toksisitesinin agregat boyutuna bağlı olduğu ve genel olarak boyut azaldıkça arttığı gösterilmiştir. NP agregatı yanlış temsil sonuçlarına yol açabilir ve hücre alım ve partiküllerin toksisite profilini değiştirerek deneysel tekrarlanabilirliği engelleyebilir (149). Birleştirilmiş TiO₂ NP'lerinin in vivo ve in vitro çalışmaları, bu partiküllerin oksidatif stresi uyardığını ve ROS tarafından indüklenen apoptozun hücre içi TiO₂ NP kaynaklı organ hasarında anahtar faktörler olarak kabul edildiğini göstermiştir (150-153). Oksidatif stres, genel olarak memelilerde lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve DNA'ya zarar veren TiO₂ NP genotoksitesinde yer alan ana mekanizmalardan biri olarak önerilmiştir (154). Lipid peroksidasyonu, hücre zarında değişikliklere neden olarak hayati hücresel fonksiyonları bozabilir. TiO₂ NP kaynaklı oksidatif DNA hasarı, OH radikalının oluşumuna bağlanmıştır (155). TiO₂ maruziyetinden sonraki oksidatif stres hepatik malondialdehit seviyelerinde azalmaya ve indirgenmiş glutatyon seviyelerinde yükselmeye yol açabilir (156). TiO₂ NP'lerinin akibeti, uygulanabilirliği

ve etkisi, NP'leri bir agregasyon karşısında dengelemek için kullanılan stratejiye bağlıdır. NP'lerin istikrarını neyin etkileyebileceğini araştırmak zorunludur. TiO₂ NP'lerin bu zararlı biyolojik etkilerini azaltmak için, PEG, agregatlar oluşumunu en aza indirmek için TiO₂ NP'lere konjuge edilmiştir (153). PEG, hidrofiliklik, su ve organik çözücülerde çözünürlük ve toksisite eksikliği gibi birtakım önemli fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. PEG toksik ve immünojenik değildir ve olumlu farmakokinetiğe ve doku dağılımına sahiptir (157). TiO₂ NP'lerin yüzeyini PEG ile değiştirmek (PEGilasyon), sadece aglomerasyona engel olmakla kalmaz, aynı zamanda protein adsorpsiyonuna dirençli NP'ler sağlar ve bunların biyoyoumluluklarını artırır (158). PEG ayrıca in vivo dolaşım süresini de artırır, böylece retikuloendotel sistemi yoluyla klirensi azaltır (159). PEG-TiO₂ NP'lerin sitotoksik etkileri daha az şiddetlidir veya TiO₂ agregatları tarafından üretilenlere kıyasla herhangi bir sitotoksik etki oluşturmaz. Ayrıca, TiO₂ NP'lerin PEG ile modifikasyonu, sitotoksitelerini azaltmıştır, ayrıca bazı çalışmalara göre stres ve toksisite ile ilişkili genlerin indüklenmesini azaltmıştır (13).

2.7.İnorganik fosfat

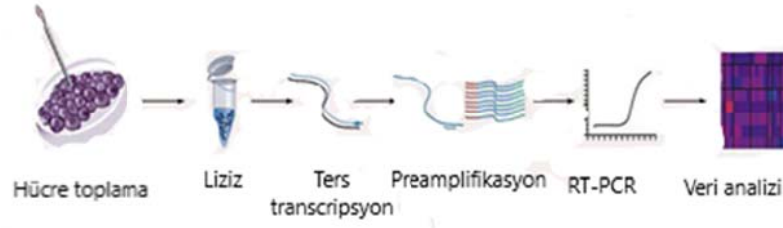
İnorganik Fosfat enerji metabolizması gibi çeşitli hücrel işlemlerde, enerji aktarma mekanizması tarafından ATP formunda veya metabolik yolların ara maddeleri için substrat olarak serbest formunda kritik bir rol oynar. ATP'nin bir kurucusu olarak Pi, hücrel sinyalleşme olaylarının ara maddelerinin fosforilasyon ve fosforilasyon mekanizmalarına da katılmaktadır. Pi, fosfolipidlerin ve DNA ve RNA'nın nükleotidlerinin temel bir bileşenidir (160). Tümörler, protein sentezi ve hızlandırılmış çoğalma ile ilişkili artan fosfor taleplerine sahiptir (161).

2.8. Glutasyon

GSH olarak bilinen tripeptit, γ -l-glutamil-l-sisteinil-glisin, hücrelerde sentezlenen en önemli düşük moleküler ağırlıklı antioksidandır. Glutamata ardışık sistein ilavesi ve ardından glisin ilavesi ile sentezlenir. Sisteinin sülfhidril grubu, genellikle GSH'nin en önemli işlevleri olarak kabul edilen redüksiyon ve konjugasyon reaksiyonlarında rol oynar. Bu reaksiyonlar, peroksitlerin ve birçok ksenobiyotik bileşiğin uzaklaştırılması için araçlar sağlar; ancak, GSH ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesinde de rol oynar. GSH, hücrelerin oksidatif hasardan ve ksenobiyotik elektrofiliklerin toksisitesinden korunmasında ve redoks homeostazının korunmasında kritik rol oynar (162). Tümör hücrelerinde yükselmiş GSH seviyeleri, bazı kemoterapötik ilaçlara direnç göstererek, kemik iliği, meme, kolon, gırtlak ve akciğer kanserlerinde bu hücreleri koruyabilir (163). Ayrıca yüksek GSH, hem melanomda hem de karaciğer kanserinde metastazı artırır (164).

2.9. Gen ekspresyon

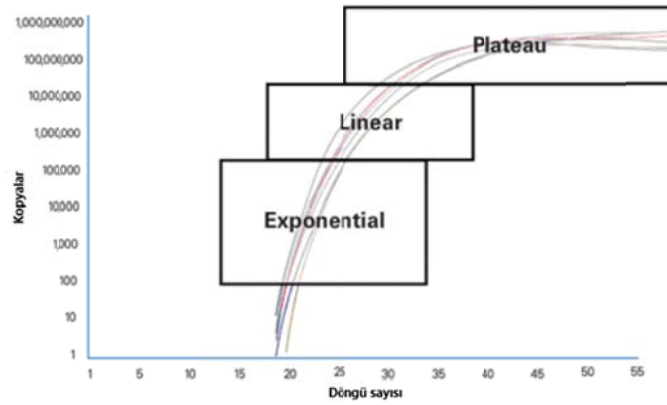
Gen ekspresyonu, bir genden gelen bilgilerin, fonksiyonel bir gen ürününün sentezinde kullanıldığı işlemdir. Bu ürünler genellikle proteinlerdir, ancak rRNA genleri veya tRNA genleri gibi protein olmayan kodlayan genlerde, ürün yapısal veya housekeeping amaçlı bir RNA'dır (165). Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ekspresyonunu incelerken, bilim adamları genlere özgü transkript yoğunluğunu ölçerek belirli bir genin veya gen profillerinin ekspresyonunda genellikle değişiklikleri - artar veya azalır - şeklinde tanımlamışlardır. Araştırma, bir genin belirlenmiş koşullar altında, ilgilenilen bir bileşik veya ilaçla tedaviye verdiği yanıtı izler (şekil8) (166).



Şekil 8. RT-PCR numune hazırlanması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) moleküler biyolojideki en güçlü teknolojilerden biridir. PCR kullanarak, bir DNA veya cDNA templatındaki spesifik diziler, sekans özgü oligonükleotitler, ısıya dayanıklı DNA polimeraz ve termal döngü kullanarak binlerce ila bir milyon kat kopyalanabilir veya çoğaltılabilir. Geleneksel (endpoint) PCR'de, amplifiye edilmiş sekansın saptanması ve nicelenmesi son PCR döngüsünden sonra reaksiyonun sonunda gerçekleştirilir ve jel elektroforezi ve görüntü analizi gibi PCR sonrası analizleri içerir. RT kantitatif PCR'de (qPCR), PCR ürünü her döngüde ölçülür. Kullanıcılar, reaksiyonun üssel amplifikasyon fazı sırasında reaksiyonları izleyerek, ilk gen miktarını büyük bir hassasiyetle belirleyebilirler. PCR teorik olarak DNA'yı üssel olarak yükseltir, her amplifikasyon döngüsünde hedef molekül sayısını iki katına çıkarır. İlk geliştirildiğinde, bilim adamları, bilinen bir standart ile karşılaştırılarak başlangıçtaki genetik materyalin miktarını hesaplamak için döngü sayısının ve PCR son ürün miktarının kullanılabilmesine karar verilmiştir. Sağlam niceliklendirme ihtiyacını ele almak için, qPCR tekniği geliştirilmiştir ve end point PCR çoğunlukla sekanslama, klonlama ve diğer moleküler biyoloji tekniklerinde kullanımı spesifik DNA'yı çoğaltmak için kullanılır. qPCR, "end point saptaması" PCR'sinden doğrudan geliştirilmiş olan hassas ve sağlam bir tekniktir. PCR, iki kısa oligodeoksinükleotit sekansından (primerler) yayılan belirli bir kalıbın kopyalarını üretebilen polimeraz

bağımlı bir tekrarlayan termal reaksiyondur. qPCR, endpoint tespitinden en az 100 kat daha hassastır ve dokuz logdan az olmayan dinamik bir aralık gösterir. Genel olarak, PCR, başlangıçtaki hedef sekans miktarı ile verilen herhangi bir döngüdeki yükseltilmiş PCR ürünü miktarı arasındaki nicel ilişkiye dayanır. Bu korelasyon, her döngüde biriken ürünün tam olarak iki katına çıkmasına neden olan üssel bir hız izler. Bu üssel faz, reaksiyonun klasik bir kapalı sistemde meydana gelmesi nedeniyle kısa sayıda PCR çevrimi ile sınırlıdır. Bu durum, ürünler zamanla biriktirirken, reaktan konsantrasyonlarının, enzim aktivitesinin ve diğer faktörlerin tükenmesine neden olur. Bu nedenle, PCR, bilinen, dört reaksiyon fazı ile karakterize edilir: bazal, amplifikasyon, doğrusal ve plato. Bazal faz, amplifikasyonun henüz tespit edilemediği çok kısa bir adımdır. Amplifikasyonun ikinci aşaması sırasında, reaksiyon kinetiği amplikonların olumlu bir iki katını belirler. Doğrusal faz, amplifikasyonun yavaşlama eğilimi ile karakterize edilir ve ürünler her döngüde artık iki katına çıkarılmaz. Son olarak, platoda reaksiyon esas olarak sonlandırılır, döngü sayısı arttırılsa bile artık amplikon birikimi elde edilemez, çok kullanılmazsa ve PCR ürünleri bozulmaya başlar (şekil 9).



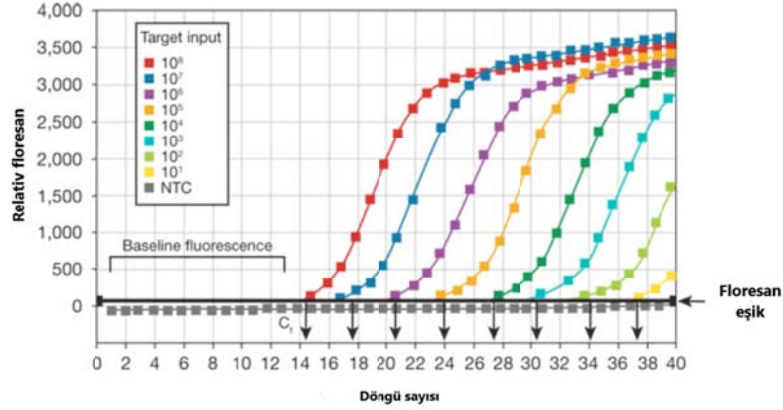
Şekil 9. RT-PCR reaksiyon fazları

qPCR, reaksiyonun başlangıcında, hedef sekans ile niceliksel bir ilişki kullanarak, herhangi bir döngüde amplife edilmiş ürünlerin hemen tespit edilmesini sağlar. Gerçek zamanlı saptama, floresans sinyalinin doğrudan DNA konsantrasyonuyla orantılı olduğu amplifikasyon faz sırasında yapılmalıdır. İki farklı temel tipte kimyasal strateji, bu tür floresan sinyal oluşumunu sağlar. Bir tanesi çift sarmallı birbirine geçen boyaya (SYBR- Yeşil) dayanmaktadır, diğeri ise farklı boya etiketli prob sistemlerinin bir bolluğunu kullanabilir (167). Kantitatif RT-PCR deneyleri için gerekli minimum bilgi sekiz bölümden oluşmaktadır. Bu sekiz bölüm şunları içermektedir:

1. Deneysel tasarım
2. Örnek özellikleri
3. Nükleik asit ekstraksiyonu ve kalite değerlendirmesi
4. Reverse transcription
5. Hedef bilgisi
6. Primer ve prob detayları
7. qPCR protokolü optimizasyonu ve validasyon detayları
8. Veri analizi (168, 169).

RT-PCR'de, DNA miktarı her döngüden sonra floresan boyalarla ölçülür ve üretilen PCR ürün moleküllerinin (amplikonlar) sayısına doğrudan orantılı olarak artan floresan sinyal verir. Reaksiyonun amplifikasyon fazında toplanan veriler, amplifikasyon hedefinin başlangıç miktarı hakkında nicel bilgi verir. Reaksiyon boyunca flüoresanstaki değişim, termal döngü flüoresan boya tarama kabiliyeti ile birleştiren bir cihazla ölçülür. Döngü sayısına karşı floresans çizilerek, RT-PCR

cihazı tüm PCR reaksiyonunun süresi boyunca ürünün birikimini temsil eden bir amplifikasyon grafiği oluşturur (şekil 10).



Şekil 10. Relativ floresan vs döngü sayısı

RT-PCR'nin avantajları şunlardır:

- PCR reaksiyonunun ilerleyişini gerçek zamanlı olarak gerçekleştirdiği şekilde izleyebilme.
- Her döngüdeki ampikon miktarını tam olarak ölçebilme, bu da numunelerdeki başlangıç materyali miktarının oldukça doğru bir şekilde ölçülmesini sağlar.
- Artan bir dinamik saptama aralığı
- Amplifikasyon ve saptama, PCR sonrası manipülasyonları elimine ederek tek bir tüpte gerçekleşir.
- Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca, RT-PCR, DNA veya RNA'nın tespiti ve nicelleştirilmesi için lider araç haline geldi.

Bir RT-PCR reaksiyonunda her bir döngü oluşturan üç ana adım vardır.

Reaksiyonlar genellikle 40 döngü boyunca gerçekleştirilir.

1. Denatürasyon: Yüksek sıcaklıkta inkübasyon, çift sarmallı DNA'yı tek sarmallarda "eritmek" ve tek sarmallı DNA'da sekonder yapıyı gevşetmek için kullanılır. DNA polimerazın dayanabileceği en yüksek sıcaklık tipik olarak kullanılır (genellikle 95 ° C). Templat GC içeriği yüksekse, denatürasyon süresi artabilir.
2. Annealing: anealing sırasında, tamamlayıcı diziler hibridize etme şansına sahiptir, bu nedenle primerlerin (primerin Tm'sinin 5°C altında) hesaplanan erime sıcaklığına (170) dayanan uygun bir sıcaklık kullanılır.
3. Uzatma: 70-72 °C'de, DNA polimeraz aktivitesi optimumdur ve primer uzatma, saniyede 100 baz oranına kadar meydana gelir. RT-PCR'deki bir ampikon küçük olduğunda, bu adım genellikle sıcaklık olarak 60 °C kullanılarak annealing aşaması ile birleştirilir.

RT-PCR deneylerinde yer alan ana reaksiyon bileşenleri DNA polimeraz, revers transkriptaz, dNTP'ler, magnezyum klorür ve kalıplardır.

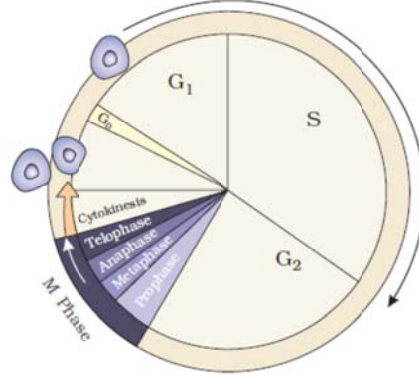
2.10.Primerler

DNA polimeraz, yeni DNA iplikçiklerinin sentezini başlatamaz. DNA polimeraz çalışması için serbest bir 3'-OH grubunun varlığını gerektirir. Bu nedenle, serbest 3'-OH grubunu doyurmak için bir primer gerekir. Bu primer bir RNA oligonükleotiddir. Organizma içindeki kalıp DNA'yı kopyalayan bir RNA polimeraz (primaz) ile 5'-3' arasında bir yönde sentezlenir. DNA polimeraz başlangıçta primerin 3-hidroksil grubuna bir deoksiribonükleotit ekler ve daha sonra büyüyen iplikçinin 3 ucuna deoksiribonükleotitler eklemeye devam eder. Bu nedenle primer, DNA sentezi için bir

temel oluşturmaya ve hazırlamaya yarar. Laboratuarda, bilim insanları, tek iplikçikli bir DNA molekülündeki dizilere bağlanan spesifik dizilerle DNA primerleri tasarlayabilir ve sentezleyebilir. Bu DNA primerleri, DNA parçalarını veya DNA sekansını kopyalamak için PCR'yi gerçekleştirmek için yaygın olarak kullanılır (171).

2.10.1.Hücre döngüsünün Primerleri

Hücre döngüsü, hücresel bileşenlerin iki katına çıktığı ve daha sonra doğru şekilde iki hücrelere ayrıldığı olaylar dizisidir. Ökaryotlarda, DNA replikasyonu belirgen bir sentez fazıyla sınırlandırılır ve kromozom ayrılması mitoz fazında meydana gelir. İki Gap fazı, G1 ve G2 olarak bilinen S fazını ve mitoz fazını ayırır. Bunlar hücrelerin büyüdüğü aldığı, büyüme sinyallerini bütünleştirdiği, çoğaltılmış bir genom organize ettiği ve kromozom ayrımı için hazırlandığı dönemlerdir. Hücre döngüsü ilerlemesini sağlayan proteinler, sikline bağımlı kinazlardır (CDK'lar). CDK'lar, DNA sentezini ve mitotik ilerlemeyi desteklemek için ana substratları fosforile eden serin / treonin protein kinazlarıdır. CDK katalitik alt birimleri, ubiquitin bağımlı proteolizinde sıkı bir şekilde düzenlenmiş olan konik siklin alt birimleri ile bağlanıncaya kadar aktivite gösterir (172). CDK aktivitesi, küçük inhibe edici proteinlerin, ve siklin bağımlı inhibitör proteinin (173) bağlanmasıyla negatif olarak düzenlenebilir. Ayrıca, CDK aktivitesi, substratlara fosfat transferini bloke eden tirozin fosforilasyonu da inhibe edilebilir. Ökaryotik hücre döngüsü üç kontrol noktasında korunur: G1/S sınırında, G2/M sınırında ve metafaz/anafaz sınırında (şekil 11) (174).

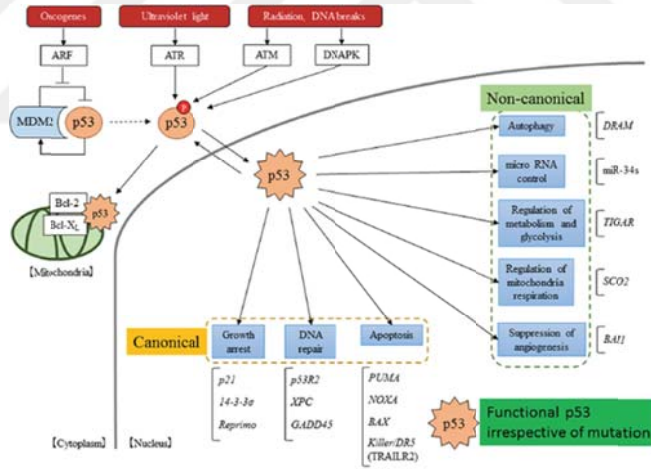


Şekil 11. Hücre döngüsü

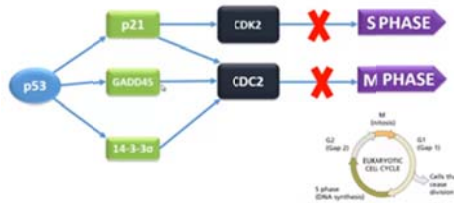
2.10.1.1. *Tp53 primer*

Yabani tip p53 proteini, hücre döngüsü, DNA onarımı ve apoptoz da dahil olmak üzere hücre homeostazında yer alan birçok fonksiyona sahiptir, oysa mutant p53 proteini çoğu kanserde görülür. Bu nedenle, *TP53* (*tümör proteini 53*) geni “Genomun Koruyucusu” veya “Ölüm Yıldızı” olarak adlandırılmıştır (175, 176). *TP53* geni, insan kanserinde sıklıkla delesyona uğrayan kromozom 17'nin kısa kolunda bulunur. *TP53* geninin kanonik fonksiyonları, transkripsiyonel aktivitesine ve hücre döngüsü durdurmasında yer alan *p21* geninin transaktivasyonunu desteklemesine dayanır (177). *TP53* gen mutasyonunun tipine ve konumuna bağlı olarak belirgin fonksiyonel anormallikler ortaya çıkar. Tek noktalı mutasyonların, % 95'ten fazla kanserojen mutasyonu *TP53* DNA bağlanma alanında bulunur (178). Normal hücrelerin sadece küçük bir miktarda p53 proteini bulunmasına rağmen, stres zamanlarında seviyeler yükselir. Bazal koşullar altında, P53 proteininin inaktivasyonu esas olarak MDM2 ve MDM4'e bağlanarak gerçekleşir (179, 180). MDM2 ve MDM4'ün herodrodimerleri, N-terminalleri vasıtasıyla p53'e bağlanır ve p53 proteininin proteasomal bozulmasını indüklemek için MDM2'nin E3 ligaz aktivitesini aktive eder (181, 182). WT p53'ün ana

kanonik işlevleri, büyüme durması, apoptoz ve DNA onarımını içerir. WT p53 tarafından hücre siklusünün durdurulması, *p21* gibi transkripsiyonel hedef genler aracılığıyla gerçekleşir. p21 hem G1/S hem de G2/M fazlarını baskılar (183). p53, doğrudan *p53* düzensiz apoptoz modülatörü (184) geninin ekspresyonunu indükleyebilir. PUMA proteini, Bcl-2 ile ilişkili X proteinini (Bax'ı) indüklemek için B hücreli lenfoma 2 (185) veya B hücreli lenfoma-ekstra büyük proteinine (Bcl-xL'ye) bağlanabilir. Bax, mitokondride sitokrom c salınımını teşvik eder ve kaspazların aktivasyonu ile apoptozise neden olur (184). DNA tamir genleri, *GADD45*, *XPC* ve *p53-R2* genlerinin ifadelerinin indüklenmesi yoluyla p53 kanonik yolunda da artar (şekil 12 ve 13) (123).



Şekil 12. P53 yolunun şeması

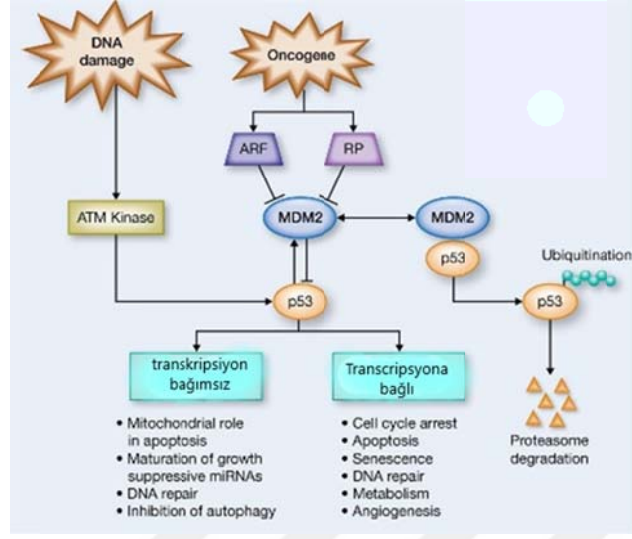


Şekil 13. Hücre döngüsünün durdurulmasında P53'ün rolü

Mutant *TP53*, terapötik bir hedef olabilir. Tedavi 3 hedefe göre sınıflandırılabilir: 1) genomik mutasyonla kaybedilen normal p53 fonksiyonunun restorasyonu (186); 2) p53 eksikliği olan hücrelere doğrudan saldırı (187) ve 3) normal p53 fonksiyonunun artırılması (188).

2.10.1.2.MDM2

İnsanlarda, *MDM2* (*mouse double minute 2*) geni 12q14.3-q15 kromozomunda bulunur ve 491 amino asit proteinini ifade eder (189). Belirgin *MDM2* amplifikasyonu olmayan bazı kanserlerde, artan gen ekspresyonu ile *MDM2* protein seviyeleri yükselir. (190-192). *MDM2* proteini, p53 tümör baskılayıcı proteini negatif olarak düzenler (193). P53'ün düzenlenmesi öncelikle bir düzenleyici sistem içerisinde protein stabilite düzeyinde gerçekleşir. p53, *MDM2* tarafından poliubikuitinlenir edilir ve daha sonra 26S proteazomu tarafından degrade edilir (194). Bu sistemin temel bir bileşeni, p53 turnoverinin *MDM2* tarafından düzenlendiği ve *MDM2*'nin ekspresyonun, p53'ün transkripsiyonel kontrolü altında olduğu p53/*MDM2* geri besleme döngüsüdür (195). Normal hücrelerde, p53, *MDM2* geninin ekspresyonu aktive eder. Hücre stresi sırasında, *MDM2* ve p53 fosforile edilir ve *MDM2* p53'ten ayrılıp proteinlere bağlanır (196-198). *MDM2*, p53'ü üç bağlantılı etkiyle inhibe eder. İlk olarak *MDM2*, p53 transaktivasyon domain alanına bağlanır. Bu bağlanma, p53'ün bazal transkripsiyon faktörlerine erişimini sterik olarak bloke eder. İkinci olarak, *MDM2*'nin E3 ubikuitin ligaz aktivitesi, p53'ün mono-ubikütilasyona aktive eder, p53-*MDM2* kompleksinin çekirdekten sitoplazmaya yer değiştirmesini teşvik eder. Üçüncüsü, sitoplazmada en kısa sürede, *MDM2* p53'ün poliubikuitine eder ve 26S proteazomu tarafından degrade olmasına neden olur (şekil 13) (181).



Şekil 14. MDM2-p53 yolu

2.10.1.3. *RAD51*

İnsanlarda, *RAD51* geni 15q15.1 kromozomunda bulunur. İnsan *RAD51* rekombinaz, iki tamamlayıcı DNA molekülü arasındaki DNA ipliklerinin bir değişimi olan homolog rekombinasyondaki (199) merkezi adımı katalize eder (200). *RAD51*, DNA çift iplik kırılmalarının, tek iplik DNA boşluklarının ve durmuş replikasyon çatallarının doğru bir şekilde onarımı için önemlidir (201). HR fonksiyonuna ek olarak, *RAD51* ayrıca hasarlı veya durmuş DNA replikasyon çatallarını aşırı nükleolitik bozulmadan korur (202). *RAD51* rekombinaz küçük bir monomerik moleküldür. Uzun, sarmal polimerler halinde toplanır, ssDNA kuyruğunun kırılma yerinin etrafına sarılır. *RAD51* monomerlerinin ssDNA'ya bağlanması yavaş bir işlemdir ve birkaç aracı protein tarafından kolaylaştırılır. Tümör baskılayıcı protein BRCA2, çift sarmal kırılmalarında *RAD51* monomerlerinin en iyi karakterize edici yükleyicisidir (203). Kırılma bölgelerinde *RAD51*'in bağlanması, henüz belirsiz hücresel rolleri olan bir protein ailesi *RAD51* paraloglarına da bağlıdır (204). *RAD51*, telomerlerde HR reaksiyonlarını

destekleyebilir. RAD 51 eksik olan hücreler'de telomer korumasında homolog rekombinasyonunun rolü ile tutarlı olarak telomeraz varlığında telomer kapama ve telomer kıslamlasının ortanan kalkmasıyla sonuçlanır (205).

2.10.1.4.BRCA2

İnsan *BRCA2* (*breast cancer 2*) geni 17q21.31 kromozomunda bulunur (206). *BRCA2*, çeşitli işlevleri yerine getirmek için çoklu proteinlerle etkileşime girer. *BRCA2*, hücre döngüsü kontrolü, DNA hasarı onarımı, transkripsiyon düzenlemesi, genom bütünlüğünün korunması, replikasyon, rekombinasyon ve kromatin hiyerarşik kontrolü gibi birçok hücrel fonksiyonları gerçekleştirir (207). *BRCA2*, gen transkripsiyonunun bir modülatörü olarak görev yapar. *BRCA2*, çeşitli hücrel işlemlerde yer alan genlerin transkripsiyonunu düzenleyen diğer proteinlerle birçok kompleks oluşturur. *BRCA2*'in C-ucu, birçok transkripsiyon faktörünün aktivasyon alanının ortak bir özelliği olan asidik amino asitler bakımından zengindir (208). DNA hasarına yanıt olarak *BRCA2*'in ATM ve ATR tarafından fosforilasyonu, P53 aracılı sinyallemenin aktivasyonu için çok önemlidir. Böylece, P53 aracılı p21 transkripsiyonunu artırır (209). *BRCA2*'in HR aracılı DNA DSBinin onarımındaki rolü iyi çalışılmış ve tanımlanmıştır. *BRCA2*'nin MutS Protein Homolog 2 (MSH2), MutS Protein Homolog 3 (MSH3) ve MutS Protein Homolog 6 (MSH6) ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Bu MSH proteinleri, uyumsuz DNA lezyonlarının tamirinde rol oynar (208). *BRCA1* farklı roller oynayarak apoptozis ile ilişkilendirilmiştir (170). Birçok çalışma, *BRCA2*'nin apoptozun yukarı regülasyonundaki rolünü de göstermiştir. Yabancı tip-*BRCA2*'nin ektopik ekspresyonu, stresle aktive olan protein kinaz c-Jun NH2 terminal kinazın upregulasyonuna yol açar. Aynı zamanda Fas/Fas ligandına bağlı

apoptozu tetikler. BRCA2 ile kolaylaştırılmış apoptoz, BRCA2'nin C-terminal bölgesinin kaspaz 3-aracılı kesimini içerir (210).

2.10.2.DNA tamirinin primerleri

DNA hasarı, çevresel faktörler ve hücre içindeki normal metabolik işlemler nedeniyle oluşur. Günde hücre başına 10000 ila 1000000 moleküler lezyon hızında meydana gelir. Bu modifikasyonlar, normal olmayan kimyasal bağlar veya eklentiler oluşturarak molekülün düzenli sarmal yapısını bozar (211). DNA hasarı, endojen hücresel süreç ve eksojen ajan nedeniyle oluşabilir. Endojen hücresel işlemler, azot bazlarının oksidasyonunu ve reaktif oksijen türlerinin DNA iplikçiklerinde kırılmaların oluşmasını içerir. Eksojen ajanlara bağlı hasar, pirimidin dimerleri oluşturan C ve T bazları arasında çapraz bağlanma yoluyla doğrudan DNA hasarına neden olan UV radyasyonları ve radikaller oluşturarak dolaylı hasarlara bağlı olarak ortaya çıkar (212). Çoğu kanserojen DNA hasarı oluşturarak ve mutasyonlara neden olur. Kanserin temel nedeni hasarlı veya hatalı genlerdir. Genler DNA ile kodlanmıştır, böylece DNA'ya zarar veren herhangi bir şey kanser riskini artırabilir. Kanserin çoğu, bir insanın yaşamı boyunca biriken DNA hasarından kaynaklanmaktadır. DNA onarımı, DNA hasarının ters çevrilmesini veya hasarlı elementlerin çıkarılmasını içeren iki temel mekanizma ile gerçekleşebilir (213). DNA onarım mekanizmalarının ortak yolu, a) lezyon tespiti b) hasarlı DNA uzaklaştırılması: nükleazlar, glikosilazlar vb c) onarım / resentez: DNA ligaz, DNA polimeraz d) diğer hücresel süreçler üzerindeki etkiler: onarımın gerçekleşmesi için daha fazla zaman tanımak amacıyla çoğaltma ve / veya hücre bölünmesi ile gerçekleşir (199).

2.10.2.1.CDKN1A

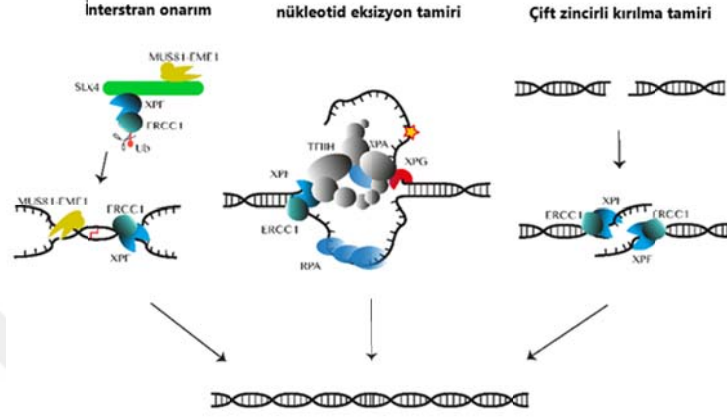
İnsan *CDKN1A* (*Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A*) geni 6p21.2 kromozomunda bulunur. *CDKN1A* geni tarafından kodlanan p21, sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin kurucu üyesidir (214). p21, genomik stabilite sağlayan ve sıklıkla insan kanserinde önemli hücre döngüsü düzenleyicisidir (215, 216). p21, birçok temel biyolojik işlemde yer alan bir dizi protein ile etkileşime girebilir (216). Basitçe bir hücre döngüsü inhibitörü, yaşlanma indükleyicisi ve tümör baskılayıcı olmak yerine, şimdi çok daha karmaşık ve daha geniş bir regülatör olarak kabul edilmektedir (217). Apoptoz, farklılaşma, DNA onarımı, transkripsiyon ve hücre göçünde önemli rol oynamaktadır (59). p21, G2/M geçişi ve mitotik ilerleme için önemlidir, kaybı mitoz kusurlarına ve muhtemelen genomik kararsızlığa neden olarak mitoz süresini uzatır (218). p21 *in vivo* olarak kromozomal bütünlüğünü korur (219). Proliferasyonun diğer tüm hücresel işlemlerle dengelenmesi ve koordine edilmesinde yer almaktadır. Genel olarak, p21 uygun hücre bölünmesini sağlayan hücre döngüsü kontrol noktalarının önemli bir düzenleyicisidir. p21, hücre proliferasyonunu Cdks'ye bağlanma ve hücre nükleer çoğaltma antijenini doğrudan, veya dolaylı olarak transkripsiyon seviyesinde önler. P53'e ek olarak, birçok onkogen, tümör baskılayıcı, enflamatuar sitokin ve besin p21 transkripsiyonunu başlatabilir (220). c-Myc 'nin p21 gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. c-Myc ayrıca hücre nükleer çoğaltma antijenini ile p21 etkileşiminin bozulmasına yol açan etkileşime girebilir ve DNA sentezi inhibisyonunda bir azalmaya neden olur (221). Bu nedenle p21'in koruyucu fonksiyonu, yüksek c-Myc seviyelerine sahip tümör hücrelerinde devre dışı bırakılır (222). Zararlı çevresel uyaranlara cevap olarak, p21 kontrole katılır ve hücre döngüsünün geçici olarak durması başlatılır. p21 ve

artan ekspresyonunun zaman periyodu, hücre döngüsünün baskılanması veya genomik stabiliteyi koruyan yanlış replike edilmiş DNA'nın onarımı arasındaki dengeye katkıda bulunur (223). p21 sıklıkla insan kanserinde düzenlenmez. p21, hücre döngüsünü düzenleyerek ve genomik stabiliteyi koruyarak bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmiştir (59). p21, fonksiyonel p53 kaybı veya hiperaktif c-Myc onkogen nedeniyle insan kanserinde sıklıkla azalır. (224).

2.10.2.2.ERCC1

ERCC1 (Eksizyon onarımı çapraz tamamlayıcı grup 1) 19q13.32'de insan kromozomunda bulunur. İnsan *ERCC1* geni, moleküler klonlama ile ilk insan DNA tamir geni keşfedildi (225). İnsan *ERCC1* ve *ERCC4* genleri, DNA onarımı ve kromozom stabilitesinin korunmasında yer alan bir nükleaz oluşturmak için birleşik proteinleri kodlar. ERCC1 - ERCC4, hasarlı DNA 5' tarafındaki insizyon yapar (226). ERCC1, genom bütünlüğünün yanı sıra, nükleotid eksizyon onarım sisteminine önemli bir hücresel bileşenidir. En önemli NER proteinleri şunlardır: XPC, RNAP, CSA ve CSB, TFIIH, ERCC1, ERCC4, XPG, DNA polimeraz ve DNA ligaz. Genel olarak, NER, çeşitli DNA hasarlarını tanıyarak ve hasarlı noktayı içeren DNA oligonükleotit bölümlerini keserek onarır (227). ERCC1, içsel nükleaz aktivitesinden yoksundur, ancak ERCC1/XPF endonükleaz tarafından gerçekleştirilen değiştirilmiş DNA sekanslarının ayrılması için vazgeçilmezdir. ERCC1 ve XPF genellikle çekirdekte bir dimer olarak bulunur ve moleküler stabilite açısından karşılıklı olarak esastır, bu nedenle, ERCC1 arızalı hücrelerin XPF eksikliği de vardır ve bunun tersi de geçerlidir (228). ERCC1-XPF dimer, gruplar arası çapraz bağlantıların doğrudan onarımında işlevlere sahiptir ve

DSB'nin onarımı için HR ve homolog olmayan birleştirmesine (NHEJ) müdahale eder (şekil15) (229).



Şekil 15. ERCC1 fonksiyonları

2.10.2.3. ATR

ATR (*Ataksia–telanjistasya ve Rad3'e bağlı*) 3q23'te insan kromozomunda bulunur. ATR, fosfatidilinositol 3-kinaza bağlı kinaz (PIKK) serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. ATR, DNA hasarı yanıt sisteminde katılan merkezi kinazlardan biridir. ATR, tek zincirli DNA yapıları tarafından aktive edilir. ATR, DNA onarımını, durdurulan replikasyon çatallarının stabilizasyonunu ve yeniden başlatmayı ve geçici hücre döngüsü durmasını teşvik etmek için downstream hedefleri üzerinden hareket eder (230). ATR, normal S-faz ilerlemesi sırasında ve DNA hasarına cevap olarak intra-S-faz hücre döngüsü kontrol noktasının uygulanmasında önemli bir rol oynar. ATR, Cdc25A'nın checkpoints kinaz 1(CHK1) ile bozulmasına aracılık ederek replikasyon orjininin ateşlenmesini önler, bu da DNA replikasyonunun ilerlemesini yavaşlatır ve stres kaynağının çözülmesi için zaman sağlar (173). ATR ayrıca, DNA replikasyonu tamamlanmadan önce veya DNA hasarı varlığında hücrelerin mitoz içine erken girişini

önlemek için G2 / M hücre döngüsü kontrol noktasının başlıca aracıdır. Bu ATR'ye bağımlı G2/M hücre döngüsü durdurmasına, Cdc25A'nın parçalanması ve Cdc25C fosfatazın serin 216 üzerinde CHK1 ile fosforilasyonu iki mekanizma ile aracılık eder (231).

2.10.2.4. CDKN1A

CDKN1A (sikline bağlı kinaz inhibitör) 6p21.2'de insan kromozomunda bulunur. Bu gen, DNA'ya bağımlı protein kinazın (DNA-PK) katalitik alt birimini kodlar. DSB onarımı, hücre sağkalımı ve DNA bütünlüğü için önemlidir. Üç farklı DSB onarım yolu var; mikrohomojoloji aracılı uç birleştirme (MMEJ), HR ve NHEJ baskındır (232). NHEJ, 1) DSB'nin her bir ucunda Ku'nun tanınması ve bağlanması; 2) DNA-PK'nın kırılma noktalarında birleştirilmesi ve köprülenmesi; 3) DNA uçlarının DNA-dependent protein kinaz katalitik subunit (DNA-PKcs) ile fosforilasyonu; 4) uçların DNA ligaz IV / XRCC4 kompleksi ile ligasyonu; 5) kompleks ayrışma birkaç aşamaya ayrılabilir. Bu faktörlerden, DNA-PKcs hızla kırılma noktalarında toplanır. DNA-PKcs, ATM ve ATR de içeren fosfatidilinositol-3 kinazların (PIKK) Ser / Thr protein kinaz ailesine aittir. İki birim DNA-PKcs, DNA-PK kompleksi oluşturmak için iki birim Ku ile toplar. DNA-PKcs'lerin Ku'ya ve çift sarmallı DNA'ya bağlanması kinaz aktivitesini aktive eder; ve Ku heterodimerlerinin diğer enzimlerin bağlanmasına izin vermek için kırılmaya doğru translokasyonu teşvik eder. Kırılmanın her iki tarafında DNA-PK varlığı, sinapsta iki uç arasında köprü oluşumuna izin verir ve uygunsuz birleşme şansını azaltır. Onarımın doğru olması için DNA-PK'nın katalitik aktivitesi gereklidir. DNA-PK'nın NHEJ'nin her aktörünü fosforile ettiği gösterilmiştir. DNA kırılması DNA-PK tarafından stabilize edildikten ve uçlar işlendikten sonra ligasyon meydana gelebilir (223). Ligasyon

işleminde sonra tamir tamamlanır. Disfonksiyonel NHEJ, genetik stabilitesinde ciddi sorunlara neden olabilir. Yetersiz NHEJ, iki farklı kromozomun iki ucunun ligasyonundan sorumlu olabilir. Bu veriler G1/S fazında NHEJ tarafından hızlı onarımın önemini göstermiştir. Ayrıca, NHEJ defekti olan hücreler, DNA'ya zarar veren ajanlara karşı daha hassastır ve DSB'lerin veya mutasyonların birikmesi, DNA bütünlüğü için dramatik olabilir (233).

2.10.3. Anjiyogenez primerleri

Anjiyogenez, vücutta üretilen belirli biyomoleküller tarafından kontrol edilen normal ve kompleks bir işlemdir. Yeni kan damarlarının oluşumu, endotel hücrelerinin tomurcuklanması yoluyla önceden var olan kan hücrelerinden gelir ve böylece damar ağacını genişletir (234). Anjiyogeneze yönelik adımlar, proteaz üretimini, endotel hücre göçünü ve çoğalmasını, vasküler tüp oluşumunu, yeni oluşturulmuş tüplerin anastomozunu, yeni bir bazal zarın sentezini ve perisitlerin ve düz kas hücrelerinin birleşmesine içerir. Büyümesi veya lokal olarak metastaz yapması için, tümör dokusunun kan damarları tarafından sağlanacak oksijen ve besin maddelerine ihtiyacı vardır (235). Oksijen hücre büyümesinde anahtar olduğundan, hipoksik tümör hücreleri bölünmez. Büyüyen kanserlerde, endotel hücreleri, anti-anjiyojenik faktörlerin üretimi azaldığında endotel hücre büyümesini ve hareketliliğini aktive edebilen prostaglandin E1 ve E2 ve Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok proteinin salgılanması nedeniyle kuvvetle aktiftir (236).

2.10.3.1.VEGFB

VEGFB (vasküler endotelyal büyüme faktörü B) geni, 11q13.1 kromozomunda bulunur. Bu gen, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)/VEGF ailesinin bir üyesini kodlar. VEGF ailesi üyeleri kan damarlarının oluşumunu düzenler ve endotel hücre fizyolojisinde yer alır. Bu üye VEGFR-1 için bir ligandır. VEGFB ekspresyonu birçok farklı tümör tipinde bulunabilir ve ekspresyonunun çoklu kanserlerde arttığı bulunmuştur (237). Düşük bir VEGFB ile kanser hücresi hattında VEGFB fonksiyonunun kazanımı, dolaşımdaki tümör hücrelerinde ve metastazlarında artışa neden olur (238). Artırmış VEGFB fonksiyonu, perivasküler hücreler azalışı ve vasküler sızıntı, inflamasyon, hipoksi ve M2 benzeri makrofajlara artışı neden olur.

2.10.3.2.PDGF-B

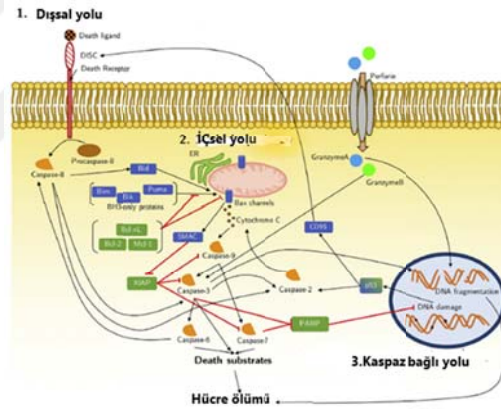
PDGF-B (Platelet Kökenli Büyüme Faktörü B) geni, 22q13.1 kromozomunda bulunur. PDGF-B mitojenik, diferensiyasyon, kemotaktik ve anjiyojenik özelliklere sahiptir ve yara iyileşmesinde rol oynar. PDGF-B birçok patolojiyle ilişkilendirilmiştir (239). Özellikle, PDGF-B çeşitli yaygın iyi huylu tümörlerde ve malignitelerde yer almıştır (240, 241). Tüm koşullarda anjiyojenez, çoğu durumda, tümör perfüzyonunu engelleyen sapkın ve sızdıran kan damarları oluşturur. Bu nedenle vasküler olgunlaşma, normalde perisitlerin yeni üretilen damarlara alınmasıyla gerçekleştirilen optimal tümör perfüzyonunu sağlamak için çok önemli bir prosedürdür (242). Vasküler olgunlaşmada oynanan PDGF-B / PDGF reseptör sinyallemesinin önemli rolü genetik olarak iyi tanımlanmıştır. Damar büyümesi sırasında, endotel hücreleri PDGF-B'yi salgılar. PDGF-B sadece perisitlerin hareketliliğini güçlendirmekle kalmaz aynı zamanda perisit alımını teşvik etmek için kemotaksis benzeri bir gradyan üretir (243). Son zamanlarda,

PDGF-B sinyalini tümörlerde vasküler yeniden şekillendirme ile ilişkilendirdiği ve tümörlerde transgenik PDGF-B ekspresyonunun perisit yoğunluğunu arttırabileceğini gösterdiği bildirilmiştir (244).

2.10.4.Apoptoz primerleri

Apoptozis, hücrenin programlanmış hücre ölümü için doğal mekanizmasıdır. Özellikle uzun ömürlü memelilerde, homeostazın yanı sıra gelişiminde kritik bir rol oynadığı için çok önemlidir (245). Gereksiz veya istenmeyen hücrelerin yok edilmesine ve oldukça düzenli bir işlem görev yapar. Apoptotik yol, hem hücre içi hem de hücre dışı sinyallerle aktive edilir. Apoptoza yol açan sinyal tipi ile ilişkili olan içsel ve dışsal yollar iki farklı yol vardır. Ayrıca sırasıyla mitokondriyal ve ölüm reseptörü yolları olarak da adlandırılırlar (246). Hücre içi sinyaller, DNA hasarı, büyüme faktörü ve sitokin yoksunluğunu içerirken, en yaygın hücre dışı sinyaller, bağışıklık sisteminden sitotoksik T hücreleri tarafından zarar görmüş veya enfekte olmuş hücrelere yanıt olarak üretilen ölüme neden olan sinyallerdir. Yollar öldürücü kaskadlarında birleşir (247). Apoptozis sinyali bildirildiği anda, hücre içinde değişiklikler meydana gelmeye başlar. Bu değişiklikler, hücre iskeleti ve nükleer proteinler gibi hücrenel bileşenleri parçalayan kaspazların aktivasyonunu içerir. Kaspaz aktivitesinin sonucu olarak, apoptotik hücreler büzülmeye başlar ve makrofaj tepkisine işaret eden plazma zarı değişikliklerine uğrar (245). Apoptoz, hedef proteinleri parçalayan bir sistein protein sınıfı olan kaspazlar tarafından gerçekleştirilir. Kaspaz proteaz aktivitesi, yüzlerce çeşitli proteini parçaladığı ve başarılı apoptoz için çok önemlidir. Dört adet başlatıcı kaspaz (kaspaz-2, -8, -9, 10) ve üç uygulayıcı kaspaz (kaspaz-3, -6, -7) vardır (247). Uygulayıcı kaspazları, sonunda hücrenin ölümüne yol açan hedef proteinleri ayırır. Apoptozun düzensizliği çok çeşitli

hastalıklarda bir belirtidir. Hızlandırılmış apoptoz, infertilite, immün yetmezlik ve akut ve kronik dejeneratif hastalıklarda bulunur ve inhibe edilmiş apoptoz kanser ve otoimmün hastalıklara neden olur. Kanserın önlenmesi apoptozun ana işlevlerinden biridir. Apoptotik kontrolün kaybı, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmalarını sağlar ve tümör ilerlemesi sırasında invazivliği artırabilen, anjiyogenezi uyaran, hücre çoğalmasını deregüle eden ve farklılaşmaya müdahale edebilen mutasyonların birikmesi için daha fazla zaman verir (245). Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçınmasının iki yolu vardır: kaspaz fonksiyonu inhibe edilebilir veya apoptoz tetikleme engeller (şekil 16) (246).

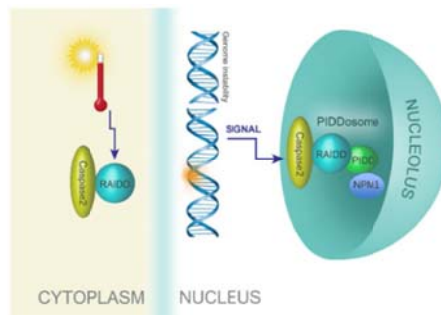


Şekil 16. Apoptoz yolları

2.10.4.1. *CASP2*

CASP2 (*kaspaz 2*) geni, 7q34 kromozomunda bulunur. Kaspaz-2, hasar görmüş hücreleri çıkarmayı amaçlayan hücresel sistemin kritik bir bileşenidir. Apoptoz yolundaki bir fonksiyonla uyumlu olarak kaspaz-2, bir tümör baskılayıcıdır (248). Kaspaz-2'nin, uyarıcıları takiben etkili bir apoptotik tepkisi başlatmak için gerekli olmasına rağmen, kaspaz-2'nin tükenmesi, genomik dengesizlik, değiştirilmiş hücre

döngüsü düzenlemesi, oksidatif stres tepkisinin aktivasyonu ve erken yaşlanma gibi çoklu hücre sonuçlarına sahiptir (249). Aslında, genomik instabilite, kanserin evrensel bir işaretidir. p53, genomik kararsızlığa karşı önemli bir yanıtlayıcı ve kaspaz-2, genomik stresden sonra, hem p53'e bağlı hem de bağımsız bir şekilde aktive edilir (185). Kaspaz-2, stres uyarıcılarının sinyallemesinde apikal konuma sahip bir başlatıcı kaspaz olarak kabul edilir. Bazı uyarıcılar, PIDDosome kompleksi yoluyla kaspaz-2 aktivasyonunu tetikler. PIDDosome kompleksi, kaspaz-2 için bir "aktivasyon platformu" olarak nitelendirilen ve PIDD1 ve RAIDD proteinlerini içeren yüksek moleküler ağırlıklı bir protein düzeneğidir (250). Ek olarak, kaspaz-2'nin, diğer uyarıcılara cevap olarak PIDDosome'dan bağımsız bir mekanizmada aktive edildiği, kaspaz-2'nin farklı hücresel yollarda yer alma ihtimalini arttırdığı gösterilmiştir (251). Sitoplazmada ve nükleollerde farklı kaspaz-2 aktivasyon platformları ve bunların PIDDosome proteinleri için gereksinimleri farklıdır. Caspase-2 iki farklı hücresel lokalizasyon ve aktivasyon profiline sahiptir. RAIDD sitoplazma, çekirdekler ve nükleollerde kaspaz-2 aktivasyonu için gerekli iken, PIDD sadece nükleolar kaspaz 2 aktivasyonu için gereklidir. Böylece, PIDD, kaspaz-2'nin DNA hasarına bağlı nükleolar aktivasyonu için kritik ve spesifiktir (şekil 17) (115).



Şekil 17. Kaspaz-2 aktivasyonunun iki bölmesi

2.10.4.2.c-MYC

c-MYC geni, 8q24.21 kromozomunda bulunur. MYC transkripsiyon faktörü ailesi *c-*, *L-* ve *N-MYC*'den oluşur. MYC familyası proteinleri çoğalma, farklılaşma, yapışma ve hayatta kalma dahil olmak üzere çoklu hücrenel süreçleri düzenleyen güçlü transkripsiyon faktörleri olarak işlev görür (252). Çeşitli araştırmalar MYC'nin genomdaki regüle edilmiş genlerin çoğuna bağlanan bir ana transkripsiyonel regülatör işlevi gördüğünü göstermiştir. MYC proteinlerinin ekspresyonu, normal dokularda transkripsiyonel, translasyonel ve translasyon sonrası seviyelerde sıkı bir şekilde, yaklaşık 20 dakikalık bir yarı ömürle düzenlenir (253). MYC amplifikasyonu, MYC'nin hastalık durumlarında deregüle edilmesi birincil yöntem olarak kabul edilir. Bununla birlikte, MYC'nin posttranslasyonunun düzenlemesi, MYC'nin stabilize ve etkinleştirildiği amplifikasyondan bağımsız olarak, önemli bir mekanizma olarak ortaya çıkmıştır. Araştırma, MYC stabilite ve fonksiyonunun düzenlenmesi için kritik olan birbirine bağlı iki fosforilasyon bölgesini belirlemiştir. Büyüme uyarıcı sinyallerin downstream, RAS / MEK / ERK kaskadı veya CDK'ler aktivasyonu, MYC'nin serin 62'de (S62) fosforilasyonuna yol açar (254). Bu modifikasyon, trans'tan cis konformasyonuna MYC'de prolin 63'ün izomerleştirilmesini destekler. Bu olaylar MYC DNA bağlanmasını artırır ve gen regülasyonunu hedefler. S62'nin fosforilasyonu ayrıca, MYC'de treonin 58'de (pT58-MYC) glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) aracılı fosforilasyon için MYC'yi bilgilendirir, ve böylece MYC turnover başlar. Çift fosforile edilmiş MYC (pS62 / pT58-MYC) daha sonra ikinci izomerizasyona girerek Proline 63 MYC'yi trans konformasyonuna döndürür. Bu ikinci izomerizasyon olayı, MYC'nin trans-spesifik fosfataz Protein Fosfat 2A (PP2A) ile birleştirilmesine yol açar. Bu

birleştirme, S62 reziduyu defosfore eder ve ubikuitin aracılı proteosomal bozunması ile MYC'yi hedefler (255). MYC'nin çok kısa bir yarı ömre sahip olduğu göz önüne alındığında, bu fosforilasyon ve izomerizasyon durumlarının dengesi, MYC proteininin kontrollü aktivitesi ve hızlı bir şekilde geri dönüşünü sağlar. Bu şekilde, normal hücrelerde gen hedeflerinin kalıcı ifadesini önlerken hücrel sinyallere hızlandırılmış bir tepki verir. Yüksek bir kanser oranının, hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve istila ediciliğini arttırmak için MYC aktivitesini artıracak mekanizmalar geliştirdiği iyi bilinmektedir (252). Hastalık durumlarında, anormal MYC ekspresyonunun hem yüksek hem de düşük afiniteli konsensüs sekanslarına MYC bağlanmasıyla promotor istilasına, çok sayıda hedef genin ekspresyonunu değiştiren, yol açtığını göstermiştir (256). Amplifiye veya yüksek Myc ekspresyonu, hemen hemen her insan kanser hattında, çeşitli derecelerde gözlemlendiği gibi tümör oluşumunu tetikleyebilir (126).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazi (Denver Instrument Company, USA)
- Laminar flow kabin (Steril-Vbh)
- Maestro Nanodrop (Green Bioresearch, USA)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Masaüstü mikro santrifüj (Msc Micro Centaur, UK)
- Mikropipetler -2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl- (Gilson, USA)
- pH metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı
- Mikroskoba bağlı fotoğraf sistemi
- RT-PCR Cihazı/Rotor Gene 6000 (Qiagen, Germany)
- Thermal cycler (Gen Amplifikasyon PCR 9700 applied biosystems, USA)
- Vorteks (Clifton Cyclone, UK)
- Karbondioksitli İnkübatör (Nüve, Türkiye)
- Prop-sonikatör (Fisher sonic 300, USA)
- UV-VIS spektrometre (Hitachi, Japan)
- Otoklav (Nüve- Türkiye)
- Zeta Potansiyel Cihazı
- Aspiratör
- UV Lambası
- Su Banyosu

- İvert Mikroskop (BestScope BS-2090, China)
- Dijital Pipetör
- Mikroplate Okuyucu (Biotech epoch, Germany)
- 4°C Buzdolabı
- -80°C Derin Dondurucu

3.2.Kullanılan plastik malzemeler

- 0,2 ml ve 2,0 ml mikro santrifüj tüpleri (Axygen)
- 0,5–10 µl, 1–200 µl, 100–1000 µl mikropipet uçları (Axygen)
- 100 µl PCR tüpleri (Qiagen)
- 15 ml ve 50 ml konik uçlu falkon tüpleri (LP's)
- 5 ml, 10 ml, 25 ml plastik pipetler (LP Italiana SPA)
- 6 ve 96 well plate
- 25 mL'lik flask
- 75 mL'lik flask
- Kryoviyaller 1.8 ml
- Eğimli boyun şişeleri
- Eldiven
- Büyük pastör pipeti
- Küçük pastör pipeti
- Hemocytometer

3.3.Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- Etil Alkol (Merck, Germany)
- Metanol (Merck, Germany)
- Merkabtoetanol (Sigma, USA)
- Etilendiamintetraasetik asit (Merck, Germany)
- Trikloroasetik asit (Merck, Germany)
- Sodyum byruvat (Merck, Germany)
- NADH (Sigma, USA)
- Tris(hidroksimetil)aminometan
- Gltasyon (Merck, Germany)
- Sodyum dihidrojen fosfat (Merck, Germany)
- Disodyum hidrojen fosfat (Merck, Germany)
- FospFate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Sodyum sitrat (Merck, Germany)
- Hidrojen peroksit (Merck, Germany)
- RNAlater (Qiagen, Germany)
- RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)
- RT First standart kit (Qiagen, Germany)
- RT² qPCR Primer Assay (Qiagen, Germany)
- RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, Germany)
- HeLa sevical kanseri hücre hattı
- MTT(3-(4.5-dimetilthiazol-2-yl) (Sigma, USA)

- Dimetil sulfoksit (Merck, Germany)
- TiO₂ nanoparticle (Sigma, USA)
- PEG-maleic acid anhydride (Merck, Germany)
- PTX (Sigma, USA)
- Propidium iyodit (Merck, Germany)
- Aquaguard
- Ultra saf su
- Distile su
- Dulbecco`s Modified Eagle Media (DMEM) (Biological industries, USA)
- Fetal bovine serum (FBS) (Biological industries, USA)
- Tripsin (Biological industries, USA)
- Penisillin (Sigma, USA)
- L-Glutamin (Sigma, USA)

3.3.Kullanılan Besiyerleri

DMEM

- % 10 fetal sığır serum
- % 1 L-glutamin
- 100 µg/ml Penisilin – streptomisin
- 450 ml steril DMEM içerisine 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penisilinstreptomisin ve 5 ml amfoterisin B ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi (257).

3.4.Kullanılan tampon ve çözeltiler

Tris-EDTA tamponu (TE): 10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 8.0

- 0.0605 g Tris
- 0.0146 g EDTA
- 0.0605 g Tris 25 ml DNase free su içerisinde çözüldürüldü.
- Hazırlanan Tris solüsyonu içerisine 0.0146 EDTA g eklendi. HCl ile pH 8'e ayarlandı. Son hacim DNase free su ile 50 ml tamamlandı. Bu çözelti primerler çözmek için kullanıldı.

0.1 M Sodyum fosfat tamponu

- 3.371 g Na_2HPO_4 ve 0.165 g NaH_2PO_4 tartılıp bir miktar dH_2O 'da çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. pH 8'e ayarlanıp son hacim dH_2O ile 200 ml'ye tamamlandı.

5.0 mM 5,5ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)

- 0.0049 g DTNB tartılıp 25 mL dH_2O eklenip ısıtma ile çözüldü.

% 5 Trikloroasetik asit (TCA)

- 10 g TCA tartılıp 200 mL dH_2O eklenip çözüldü.

0.2 M Tris tamponu

- 4.85 g tris HCl tartılıp 150 mL dH_2O eklenip pH 7.3'ye ayarlanıp 200 mL'ye tamamlandı.

6.6 mM NADH

- 0.234 g NADH tartılıp 50 mL Tris tamponu ile çözüldü.

30 mM Na pyruvat

- 0.165 g Na pyruvat 50 mL Tris tamponu ile çözüldü.

Fosfat bufferd saline (PBS)

- 4.94 g PBS tartılıp 500 ml dH₂O ile çözüldü.

5 mg/mL MTT çözelti

- g MTT tartılıp 200 mL PBS ile çözüldü.

3.5.HeLa servikal Kanseri Hücre Hattı

Bu çalışması kapsamında insan servikal kanser hücre hatlarından 31 yaşında servikal kanserli bir hastadan elde edilmiş HeLa epiteliyal servikal adenokarsinom hücre hattı kullanılmıştır.

3.6.Kullanılan Besiyeri

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

- % 10 fetal sığır serum
- % 1 L-glutamin
- 100 µg/ml Penisilin – streptomisin
- 450 ml steril DMEM içerisine 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin ve 5 ml Penisilin-streptomisin ilave edilerek hazırlandı.

3.7.İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Canlandırılması ve Çoğaltılması

1. -80°C’de buzdolabı içerisinde stok olarak dondurulmuş HeLa hücreleri, sıcaklığı 37°C ye ayarlanmış su banyosunda hızla çözdürüldü.
2. Çözdürülen hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınıp ve 5 ml DMEM besiyeri ilave edilerek 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatantın uzaklaştırılıp, peletin üzerine 1 ml DMEM eklenerek 25 cm²'lik flaska aktarıldı.
4. 5 ml DMEM eklenerek, 37 °C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi.
5. Hücreler uygun inkübe koşullarında kültüre edildikten sonra morfolojik özellikler ışık mikroskobu ile izlendi.
6. Hücrelerin iki günde bir besi ortamı değiştirildi. Hücreler haftada iki kez pasajlandı. Pasajlama işleminde besiyerinin dökülmesini takiben hücreler 2 ml PBS ile yıkandı ve hücre kültürü flaskına yapışık olarak yaşayan hücreler kalkması için 2 ml Tripsin-EDTA eklenerek 2-3 dakika inkübatörde bekletildi.
7. Hücreler kalktıktan sonra üzerine eklenen tripsin nötrleştirme için aynı hacim DMEM eklendi ve bulunan hacim 2 flaska ayrıldı.
8. Büyüyen HeLa hücreleri 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1*10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin zemine tutunması için 24 saat boyunca inkübe edildi.

3.8.TiO₂ nanopartiküllerinin ve PEG-TiO₂'nin sentezi

TiO₂ nanopartikülü sol jel yöntemi kullanılarak elde edildi. Bunun için 108 ml titanyum fosfit (TiP), 252.5 ml isopropanol içerisine eklendi ve karışım 500 rpm de 5 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 2 ml hidroklorik

asit (HCl) 25.5 ml n-propanol karışımı büret ile ekleme oranı 1ml/min olacak şekilde alkoksit çözeltisi üzerine eklendi. Bu durumda molar oran HCl/TIP 0.54 olarak ayarlandı. Karışım 30 dk karıştırıldı. Karıştırma işlemi bitiminde 25.33 ml su ve 160.3 ml isopropanol karışımı büret ile ekleme oranı 1ml/min. olacak şekilde alkoksit çözeltisi üzerine eklendi. Bu durumda molar oran H_2O/TIP_4 oldu. Karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve sonunda jel ürün elde edildi. Jel, çözücü ve sudan ayrılmak üzere santrifüjlendi ve gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 400°C de 1 saat kül fırınında bekletildi. Bu işlemler sonucu da TiO_2 nanopartikülü elde edildi.

PEG- TiO_2 'nin sentezinde ise öncelikle 100 mg/ml PEG-maleik asit anhidrit suda çözüldü ve pH'ı 0.1 M NaOH ile 4'e ayarlandı. Karboksil gruplarını aktive etmek için 0.8 mol/l derişiminde olan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) 0.6 ml hacimde eklendi ve solüsyon oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında 0.3 ml 0.2 M 4-amino-salisilik asit (ASA) solüsyonu eklendi ve solüsyon 40 °C'de 16 saat inkübe edildi. Tepkimeye girmeyen ASA ve diğer küçük moleküller 5 kez santrifüj işlemine tabi tutuldu ve tepkimeye giren PEGMA-ASA çözücüsünün değişimi 25 °C'de; 20 hPa 3 dakika ve 5 hPa 35 dakikada gerçekleştirildi. PEGMA-ASA'nın konsantrasyonu dimetil formamit (DMF) ile 50 mg/ml'ye ayarlandı. Asidik TiO_2 çözeltisi organik titanyum bileşğinin hidrolize dayalı termal sentez yoluyla hazırlandı ve bu işlemin sonrasında peptizasyon yapıldı. Klorotitanyum triizopropoksidin hidrolizinden sonra nitrik asit ile peptizasyon 80 °C'de gerçekleştirildi. Tepkiyen maddenin (reaktantın) %20 'lik katı içeriği (ağırlık/hacim) 1.5 M HNO_3 ile ayarlandı. Sonrasında 30 dk 200 kHz ultrasonifikasyona tabi tutuldu ve zeta potansiyel cihazı ile partikül boyut dağılımına bakıldı. TiO_2 solüsyonu (0.75 ml) 10 ml DMF eklendikten sonra 5 ml 50 mg/ml

PEGMA-ASA'nin içerisine eklendi ve karıştırıldı. 130 °C'de 16 saat inkübe edildi ve tepkime 600 rpm de hızlı bir şekilde karıştırılarak solüsyon elde edildi. Tepkime sona erdiğinde oda sıcaklığında soğutulan ve reaksiyona giren PEG-TiO₂ çözücüsünün değişimi 40 °C'de 5 hPa 10 dakikada gerçekleştirildi. PEG-TiO₂ sulu solüsyonunun konsantrasyonu su ile 10 mg/ml'ye ayarlandı ve PEG-TiO₂ sulu solüsyonu 5 kere santrifüj edilerek tekrar zeta potansiyel değerine bakıldı.

3.9.PEG-TiO₂ Nanotaşıyıcı sisteme PTX ilacın yüklenmesi

PEG-TiO₂ üzerine yüklenecek olan PTX 0.5 mmol/L pH 8'de gece boyunca PEG-TiO₂ solüsyonları (~ 0.2 mg / mL) ile karıştırıldı. Bağlanmamış fazla PTX 100 kDa filtreden geçirildi, ayırıldı ve yıkama işlemi tekrar edildi. Daha sonra elde edilen PEG-TiO₂-PTX 4 °C'de muhafaza edildi.

3.10.Hela kanser hücrelerinde TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX'in antikanser aktivitesi

24 saatlik inkübasyondan sonra, her ilacın farklı konsantrasyonlarda 1 µL'si kuyucuklara eklendi. Konsantrasyonlar 50, 25, 10, 5, 2.5, 1.25, 1.0 ve 0.5 µg/mL'idi. 24, 48 ve 72 saat süresi ile 5% CO₂ içeren 37°C'de inkübe edildi. Negatif kontrole sadece medya, oysa pozitif kontrole su eklendi. Belirtilen sürenin bittikten sonra 10 ul (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid MTT kuyucuklara ilave edildi. 3 saat süresi ile 5% CO₂ içeren 37°C'de inkübe edildi. Medya ve MTT uzaklaştırdıktan sonra yaşayan hücre içinde oluşturulan formazan kristallerini çözmek için DMSO eklendi. Her kuyucuka 100 µL DMSO ilave edilip oda sıcaklığında 15 dakika boyunca karıştırılarak inkübe edildi. Absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda okundu. Absorbans, ELISA

reader kullanılarak ölçüldü. Denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX için 24 saat, 48 saat ve 72 saatlerde sırasıyla IC₅₀ değerleri tespit edildi.

3.11.Hücrelerden RNA İzolasyonu

IC₅₀ değerleri hesaplandıktan sonra büyütülen HeLa hücre hatı hücre/kuyu 6 kuyucuklu platlara her bir kuyucta 1600 µL ekim yapıp hücrelerin zemine tutunması için 24 saat boyunca inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra, her ilacın IC₅₀ konsantrasyonu kuyucuklara eklenip 48 saat boyunca IC₅₀ dozları etkileştirildi.

RNA izolasyonu, katalog numarası 74104 olan RNeasy (Qiagen) mini izolasyon kiti yararlanarak üretici belirtildiği gibi adımlar takip edildi. Hücre hattıdan RNA izolasyon başlamadan önce sonraki tamponların hazırlanması önerindi. 1) İlk olarak tampon 10 µl β-merkaptoetanol alınıp 1 mL RLT buffere eklendi. Hazırlanan RLT bufferinin ömrü oda koşullarında 1 aydır. 2) İkinci olarak % 96'lık etanolden 44 mL alınarak 11 mL RPE bufferine eklendi.

1. Plate'deki sıvı döküldükten sonra hücreler 350 µL RLT miktarı ile homojenize edilerek lizat haline getirildi.
2. Homojeniz edilmiş lizat dikkatli şekilde 2 ml'lik toplama kabı içerisindeki spin kolona aktarıldı. 8000 xg'de santrifüj edilip kolon atıldı.
3. 350 µL %70 etanol supernatanta eklendi. Pipet yapılarak karıştırıldı.
4. 700 µL örnek, 2 ml'lik toplama kabı içerisindeki spin kolona aktarıldı. Kapak kapatılarak 15 saniye 8000 xg'de santrifüj edildi. Alt kısımdaki süpernatant atıldı.

5. Spin kolon 2 ml'lik toplama kabına alınıp üzerine 700 µL RW1 buffer eklendi. Kapak kapatılarak 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt kısımdaki supernatant uzaklaştırıldı.
6. RNaz spin kolonuna 500 µL RPE eklendi. Kapak kapatılarak 8000 xg'de 15 saniye santrifüj edilip alt kısım atıldı.
7. Spin kolona 500 µL RPE eklenmiştir. Kapak hafifce kapatılıp 8000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
8. Spin kolon 1.5 ml'lik yeni bir toplama kabına alındı. Spin kolon membranının üzerine doğrudan 30-50 µL RNaz free water eklendi. Kapak kapatılıp 8000 xg'de 1 dakika santrifüj edilerek, RNA kolondan ayrıldı. Bir miktar su ile bu adım tekrarlandı. Elde edilen RNA'lar, nanodrop cihazı ile kantitatif olarak ölçüldükten sonra RNA'lar cDNA sentezi kullanıldı.
9. RNA kaliteleri ve miktarları uygun değerler arasında elde edildi. Buna göre;

$$A_{260}/A_{280} = 1.9-2.1$$

$$\text{RNA miktarı} = 25 \text{ ng}-5 \text{ µg}$$

3.12.RNA'dan cDNA Sentezi

1. RT2 First Strand Kit, cDNA sentezi için kullanıldı. DNA sentezi için, protokole göre aşağıdaki adımlar takip edildi.
2. RT2 First Strand Kit çözündükten sonra 10-15 saniye santrifüj edildi.
3. Aşağıdaki tabloya göre RNA örneklerinden her biri için genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Karışım dikkatli şekilde santrifüj edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Genomik DNA eliminasyon karışımı.

Madde	Miktar
RNA	2 µL
GE buffer	2 µL
Nukleaz free water	6 µL
Total hacim	10 µL

4. Genomik DNA eliminasyon karışım 42 °Cde 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra hemen buz içerisinde 1 dakika bekletildi.
5. 10 µL genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her tüpe 10 µL reverse transkriptaz karışımı eklendi. Pipet ile alt-üst edilerek dikkatlice karıştırıldı. Reverz transkriptaz karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (tablo 2).

Tablo 2. Reverse transkriptaz karışımı.

Madde	Miktar
5xBC3	4 µL
P2 kontrol	1 µL
RE3 reverse transkriptaz karışımı	2 µL
Nükelaz free water	3 µL
Total hacim	10 µL

6. PCR ile reverz transkripsyon protokolü 15 dakika 42 °C’de ve 5 dakika 95 °C’de inkübasyon ayarlandı. Sonra reaksiyon hemen durduruldu.
7. Her bir örnek tüpüne 91µL RNase-free su eklenip pipet ile alt-üst edilerek dikkatlice karıştırıldı.

8. Reaksiyon tüpleri buz üzerine yerleştirildi ve bu durumda RT-PCR kullanıma hazır hale getirildi.

3.13.RT-PCR

RT-PCR için “RT² qPCR Primer Assay” ve “RT² SYBR Green Mastermixes” kitleri kullanıldı. 0.2 mL’lik tüplere her bir primer için mastermix karışımları ayrı hazırlandı. 12 primer ve house-keeping gen (GAPDH) olarak çalışıldı. Primer sayısı kadar (13) mastermix hazırlandı. Toplam örnek sayısı 6 olduğu için “6x” şeklinde her bir mastermix miktarı aşağıdaki tabloya göre hesaplandı (tablo 3).

Tablo 3. Mastermix karışımı.

Madde	Miktar
RT ² SYBR Green Mastermix	12.5 µL
cDNA	1.0 µL
RT ² qPCR primer	1.0 µL
RNase free water	10.5 µL
Total hacim	25.0 µL

Mastermix karışım 0.5 mL’lik eppendorf tüplerde hazırlandı. Mastermix karışımlar hazırlandıktan sonra RT-PCR strip tüpler bloğa dizildi (5x13=65 strip tüp). Önce her bir cDNA (1 µL) daha sonra hazırlanan mastermix’ler (24 µL) strip tüplere eklendi.

Tüplerin kapları kapatıldı, 72’lik mavi rotora 1’den başlayarak dizilmiş ve rotordaki boş kısımlar boş tüplerle dolduruldu. Üzerine kelepçesi takıldı ve RT-PCR cihazına yerleştirildi.

Aşağıdaki şartlara göre PCR döngü programı uygulanılarak çalıştırıldı (tablo 4).

Tablo 4. RT-PCR döngü koşulları

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95	10 dakika	1
95	15 saniye	40
60	1 dakika	40

Çalışmamızda kullanılan primerler Tablo 5’te verildi.

Tablo 5. RT-PCR yönteminde kullanılan primerler, firma ve katalog numaraları.

Primerler	Etkisi	Katalog Numarası	Firma
<i>Tp53</i>	Hücre döngüsü	QT00060235	Qiagen
<i>MDM2</i>	Hücre döngüsü	QT00056378	Qiagen
<i>RAD51</i>	Hücre döngüsü	QT00072688	Qiagen
<i>BRCA2</i>	Hücre döngüsü	QT00008449	Qiagen
<i>ERCC1</i>	DNA tamiri	QT00059374	Qiagen
<i>ATR</i>	DNA tamiri	QT00030779	Qiagen
<i>CDKN1A</i>	DNA tamiri	QT00062090	Qiagen
<i>PRKDC</i>	DNA tamiri	QT00086828	Qiagen
<i>VEGFB</i>	Anjiyogenez	QT00013783	Qiagen
<i>PDGFB</i>	Anjiyogenez	QT00001260	Qiagen
<i>CASP2</i>	Apoptoz	QT01342509	Qiagen
<i>MYC</i>	Apoptoz	QT00035406	Qiagen
<i>GAPDH</i>	İç kontrol	PPH00150F	Qiagen

3.14.İnorganik Fosfat Tayini

Çözeltiler

- 5 M 100 mL H₂SO₄
- %7.5 10 mL Na-Molibdat + 5M 10 mL H₂SO₄: 10 mL için %7.5'lik Na-Molibdat'tan tartılarak distile su ile hazırlandı. Üzerine 5M H₂SO₄'ten 10 mL alınarak karıştırıldı.
- %1'lik 10 mL Askorbik asit: Askorbik asitten 0.1 g tartılarak distile su ile 10 mL tamamlandı.
- 1 mg/mL KHPO₄ + 1 mL 5 M H₂SO₄: 1 mg/mL KHPO₄ 'ten 0.4393g tartılarak bir miktar suda çözüldü ve üzerine 5M'lık H₂SO₄'ten 1 mL eklendi. Ardından çözelti distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı

1. Stok standart fosfat çözeltisinden 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15 ve 0.2 mg/mL derişimlerinde çalışma standartları hazırlandı.
2. Çalışma standartları aşağıdaki çizelgedeki çözeltileri hazırlamada kullanıldı (tablo 6).

Tablo 6. İnorganik fosfat tayini için numune, standart ve kör karışımının hazırlanması.

	Numune (µL)	Standart (µL)	Kör (µL)
Standart	-	100	-
Hücre	100	-	-
Su	-	-	100
TCA	200	200	200

3. Tüplerde oluşan çökelti santrifüjlererek süpernatant dikkatlice alınıp aşağıdaki tabloya göre spektrofotometre küvetleri hazırlandı (tablo 7).

Tablo 7. İnorganik fosfat tayini için numune, standart ve kör süpernatant hazırlanması.

	Numune (µL)	Standart (µL)	Kör (µL)
Su	150	150	450
Numune	300	-	-
Standart	-	300	-
Na-Molibidat	300	300	300
Askorbik asit	300	300	300

4. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

3.15.GSH Tayini

Süpernatant hazırlanması

1. 1 mL hücre homojenatı alıp 4 mL %5'lik TCA eklendi.
2. 20 saniye karıştırıcıda vortexlendi.
3. 1000g'de 15 sanyie santrifüje edildi.
4. Süpernatant dikkatlice alınıp aşağıdaki tabloya göre spektrofotometre küvetleri hazırlandı (tablo 8).

Tablo 8. GSH tayini numune, standart ve kör için süpernatant hazırlanması.

	Örnek (µL)	Standart (µL)	Kör (µL)
Süpernatant	200	-	-
Tampon	2000	2000	2000
DTNB	250	250	250
Su	-	-	200
GSH Standartı	-	200	-

5. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü (258).

4.İstatistiksel Yöntem

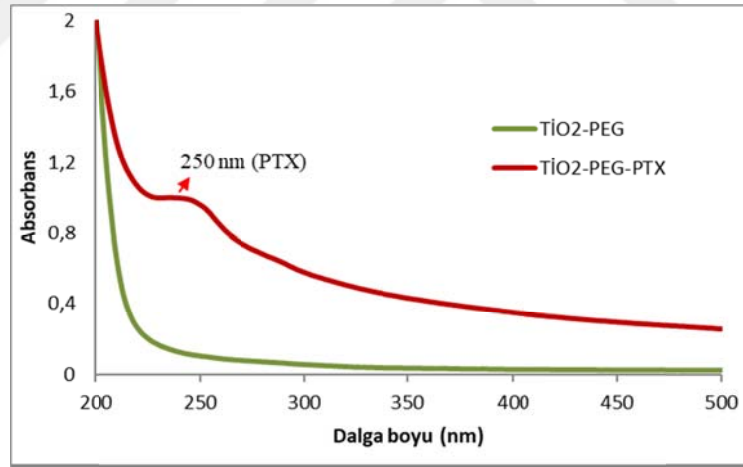
Sitotoksisite değerlendirmelerinde tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. IC_{50} , istatistiksel yazılım GraphPad Prism 8 (GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) tarafından belirlenmiştir. RT-PCR verilerinin $\Delta\Delta CT$ metodu ile istatistiksel analizi “RT2 profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5” yazılımı kullanılarak, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi Student’s Ttesti ile değerlendirildi. $p<0.05$ ve $p\leq 0.001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.BULGULAR

5.1.TiO₂-PEG ve TiO₂-PEG-PTX nanopartikülleri'nin sentezi ve Karakterizasyon

Analizi

Sentez işleminde ilk olarak TiO₂ nanoparçacıkları elde edildi, daha sonra kararlılıklarını ve biyoyumluluklarını arttırmak için TiO₂ NP'leri PEG ile modifiye edildi. PEG-TiO₂-PTX nanotaşıyıcı temelli ilaçları sentezlemek amacıyla PEG-TiO₂ NP'lerine PTX eklendi. PTX'in PEG-TiO₂ NP'lerine başarıyla yüklenip yüklenmediğini belirlemek için UV spektrum analizi yapıldı. Şekil'18 de görüldüğü gibi, PTX'in karakteristik pik değeri yaklaşık 250 nm'de bulundu. Bu sonuçlar, PTX'in PEG-TiO₂ nanotaşıyıcı sisteme başarılı bir şekilde yüklendiğini gösterdi.



Şekil 18. PEG-TiO₂ ve PEG-TiO₂-PTX nanopartiküllerinin UV-Görünür bölge absorpsiyon grafiği

5.2. TiO₂-PEG, PTX ve TiO₂-PEG-PTX sitotoksik aktivitesi (yada sitotoksik aktivitesi)

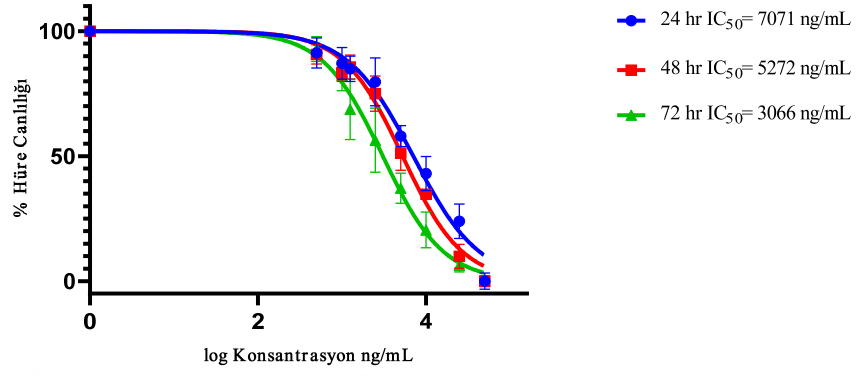
24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda su kontrol ile karşılaştırıldığında; HeLa hücre hattında 0.5-50 µg/ml doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyonlarda TiO₂ ve TiO₂-PEG, PTX ve TiO₂-PEG-PTX 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edildi. MTT testi yapılarak sitotoksik dozlar hesaplandı. TiO₂ için 24, 48 ve 72 saatlerde sırasıyla IC₅₀ değerleri 7.07±1.14 , 5.27±0.61 ve 3.06±0.48 µg/ml olarak tespit edildi. TiO₂-PEG için ise 24 saat, 48 saat ve 72 saatlerde sırasıyla IC₅₀ değerleri 80.99±2.80, 71.42±3.24 ve 54.27±3.27 µg/ml olarak tespit edildi. PTX için ise 24 saat, 48 saat ve 72 saatlerde sırasıyla IC₅₀ değerleri 8.99±1.67 , 4.78±0.95 ve 3.46±0.51 µg/ml olarak tespit edildi. TiO₂-PEG-PTX için ise 24 saat, 48 saat ve 72 saatlerde sırasıyla IC₅₀ değerleri 20.85±3.09, 14.90±2.73 ve 7.81±1.11 µg/ml olarak tespit edildi (şekil 19) (Tablo 9).

Tablo 9. 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyondan sonra HeLa hücrelerinde TiO₂, TiO₂-PEG, PTX ve TiO₂-PEG-PTX nanopartikülleri arasındaki IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması.

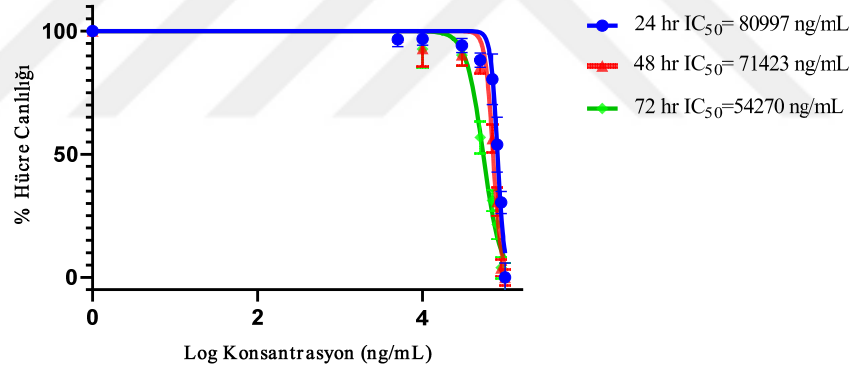
HeLa Hücre Hattı	IC ₅₀ (µg/mL ±SD*)		
	24 h	48 h	72 h
TiO₂	7.07±1.14	5.27±0.612	3.066±0.484
TiO₂-PEG	80.99±2.80	71.42±3.24	54.27±3.27
PTX	8.99±1.67	4.78±0.95	3.46±0.51
TiO₂-PEG-PTX	20.85±3.09	14.90±2.73	7.81±1.11

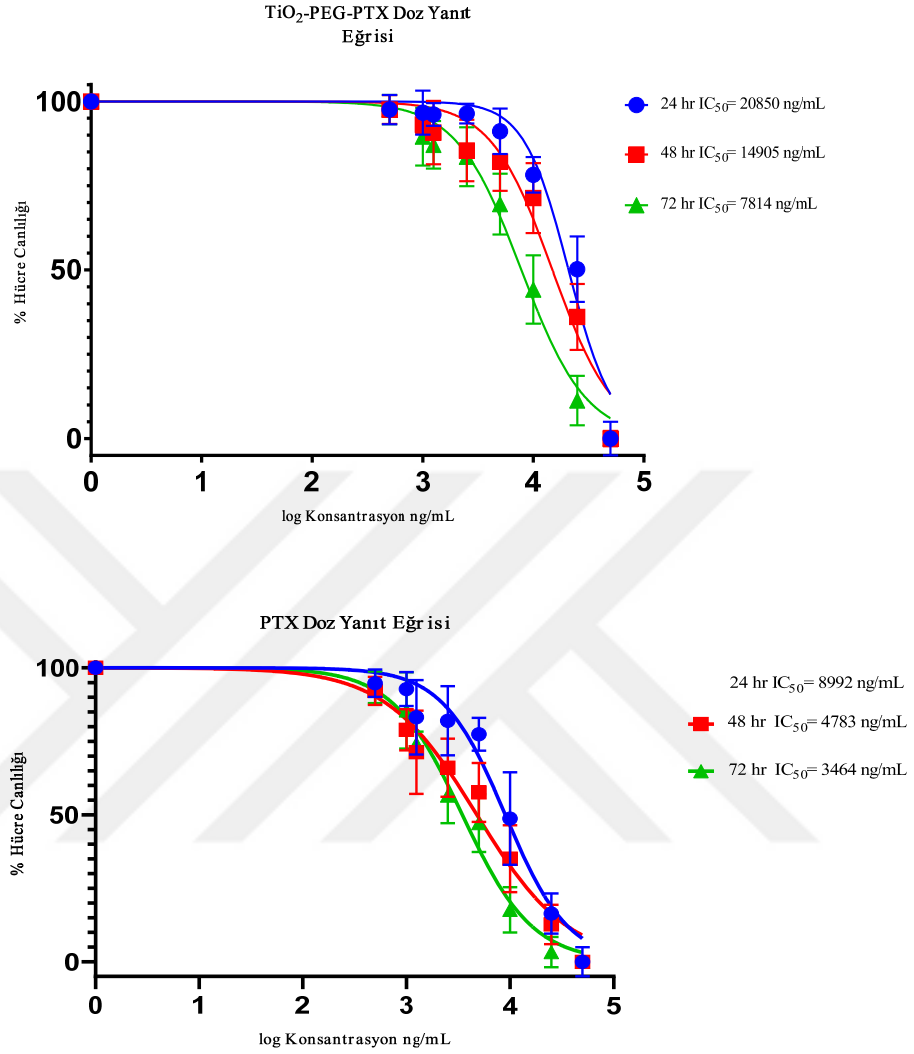
* Hela hücre çizgisi için IC₅₀ olarak sitotoksosite, 24, 48 ve 72 saat süreyle tedaviden sonra ortalama üç bağımsız deneydir.

TiO₂ Doz Yanıt Eğrisi



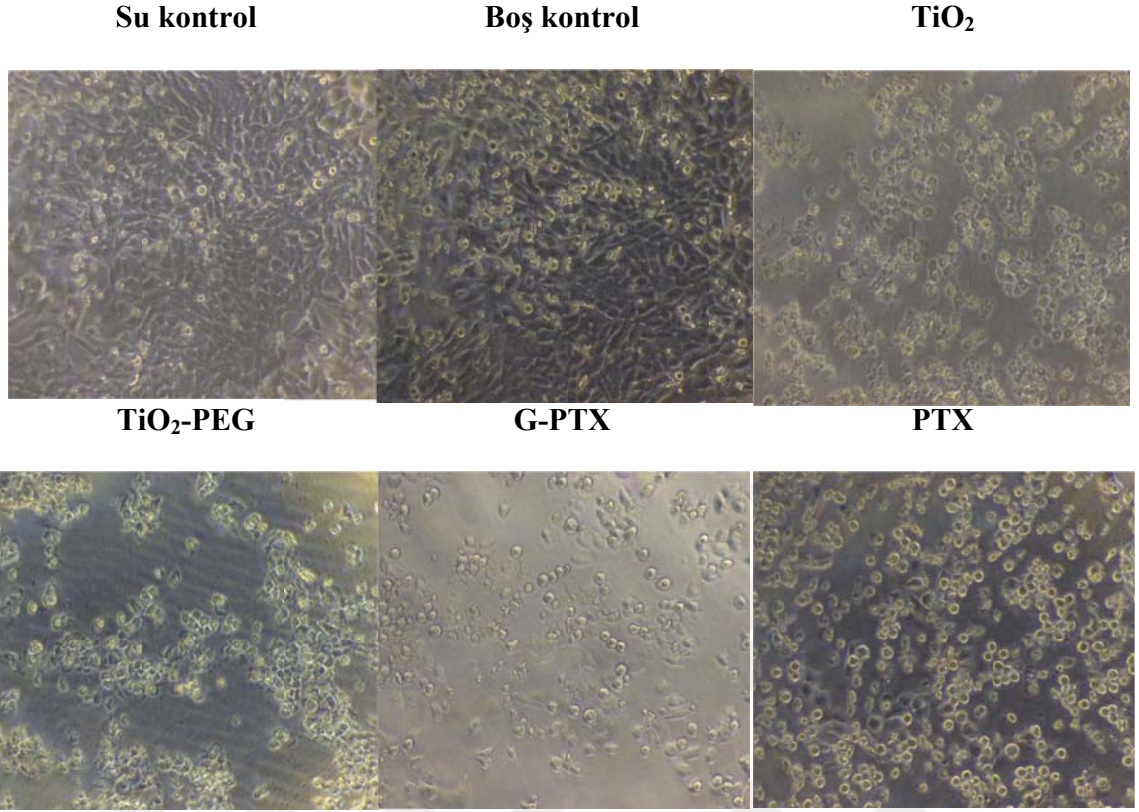
TiO₂-PEG Doz Yanıt Eğrisi





Şekil 19. HeLa hücre hattında 24 saat, 48 saat ve 72 saat 1-100 µg/ml doz aralıklarında, TiO₂, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-PTX ve PTX'in uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

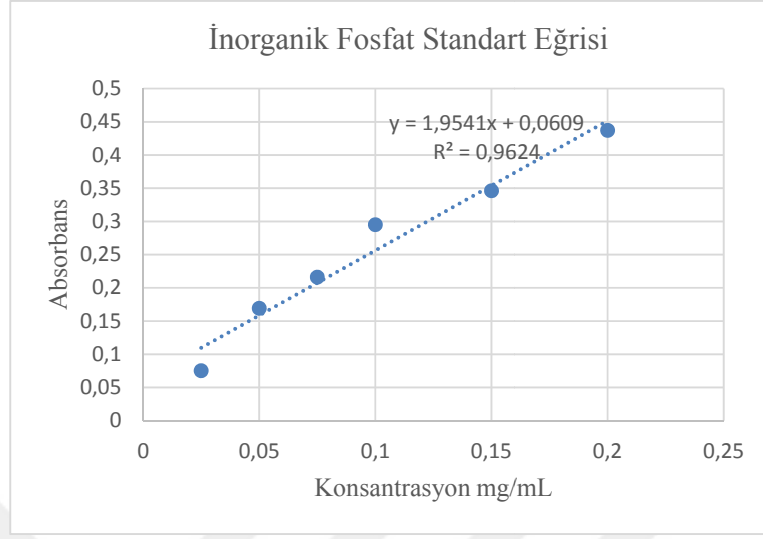
Çalışma kapsamında, Hela hücre hattında TiO₂, TiO₂-PEG, PTX ve TiO₂-PEG-PTX dozlarında yapılan MTT testi uygulanıp canlı ve ölü hücre oranlarını belirlendi. IC₅₀ değerleri hesaplanarak tespit edildi. Bundan sonraki basamakta yeniden 6'lık flask içinde ekilip büyütülen hücreler için 48 saat boyunca belirlenen dozlarda TiO₂, TiO₂-PEG, PTX ve TiO₂-PEG-PTX IC₅₀ dozları uygulanmıştır. RNA izolasyonu ve diğer deneyler için numuneler alındı.



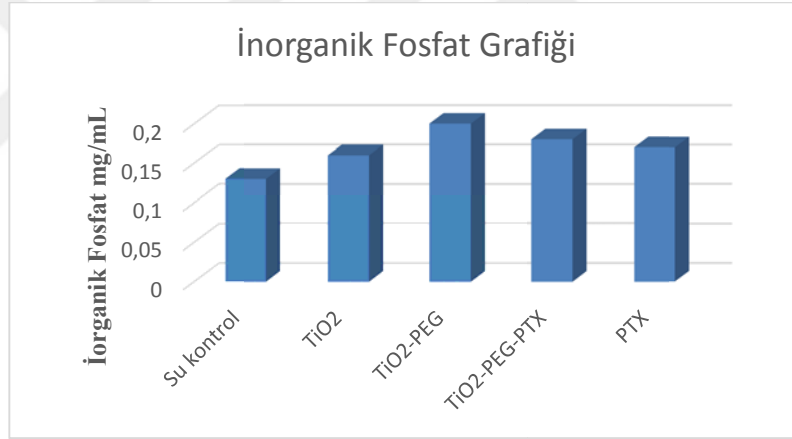
Şekil 20. HeLa hücre hattında TiO₂, PEG-TiO₂, PEG- TiO₂-PTX ve PTX'in morfolojik etkisi

5.3 İnorganik Fosfat (Pi) Tayini

HeLa hücre hattı, 48 saat TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX IC₅₀ dozları ile inkübasyonu edilmiştir. TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX ile inkübe edilen hücrelerde inorganik fosfat düzeyinin kontrol grubuna göre sırasıyla %23.07, %53.84, %38.46 ve %30.76 artışı izlendi.



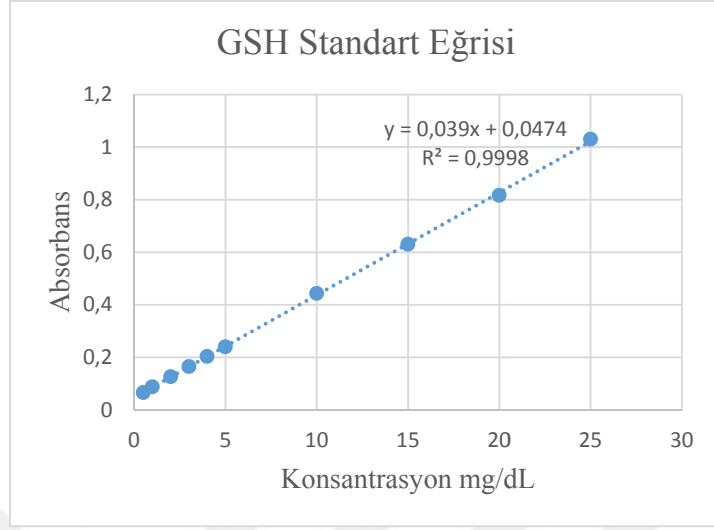
Şekil 21. İnorganik fosfat standart eğresi



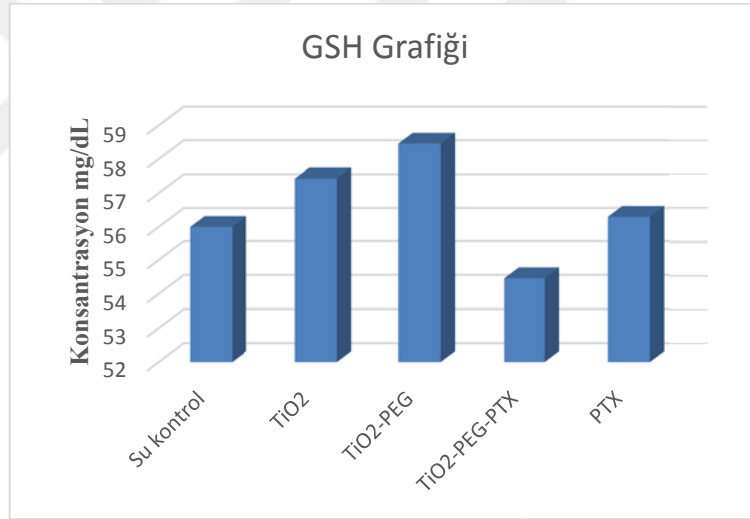
Şekil 22. HeLa hücre hattında 48 saat , TiO₂, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-PTX ve PTX IC₅₀ doz uygulamasının hücre inorganik fosfat üzerine etkisi

5.4. GSH Tayini

HeLa hücre hattı, 48 saat TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX IC₅₀ dozları ile inkübasyonu edilmiştir. HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO₂, TiO₂-PEG ve PTX inkübe edilen hücrelerde karşılaştırıldığında sırasıyla %2.5, %1.7 ve %3.4 artış, TiO₂-PEG-PTX % 6.85 azalma izlendi.



Şekil 23. GSH standart eğrisi

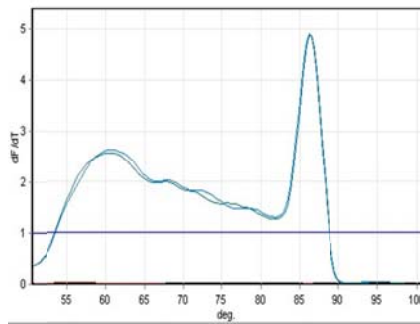


Şekil 24. HeLa hücre hattında 48 saat , TiO₂, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-PTX ve PTX IC₅₀ doz uygulamasının hücre GSH üzerine etkisi

5.5.RT-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi

5.5.1.Genlerin ekspresyon düzeyleri

TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX'in bazı hücre döngüsü, DNA tamiri, anjiyogenez ve apoptotik genler üzerine etkilerini incelemek amacıyla HeLa hücreleri; IC₅₀ konsantrasyonlarda 48 saat boyunca maruz bırakıldıktan sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak ekspresyon düzeyleri Delta Delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. Gen ekspresyon değerlendirme yazılım programında Ct (eşik döngü değeri) değerleri kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu çalışmada housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. GAPDH ile çalışma genlerinin ekspresyon düzeyleri normalize edilmiştir. RT-PCR reaksiyonu sonucunda GAPDH için örnek olarak spesifik Ct değeri ve erime eğrisi aşağıdaki tablo 10'da ve şekil 25'te verilmiştir.



Şekil 25. GAPDH geninin erime eğrisi

Tablo 10. GAPDH geninin Ct değeri

No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Blue	Boş Kontrol-HeLa-GAPDH	Unknown	26.17			
2	Green	Su Kontrol-HeLa-GAPDH	Unknown	27.75			

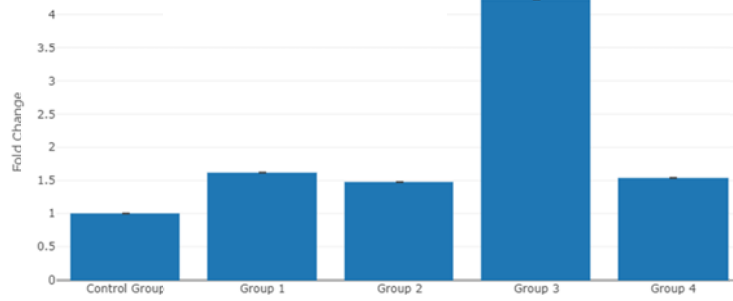
HeLa servikal kanseri hücre hattından elde edilen boş kontrol, TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX örneklerinin uygulanması sonrası RNA izolasyonu yapıldı. Sonra RNA örneklerinden elde edilen cDNA örneklerinde *Tp53*, *MDM2*, *RAD51*, *BRCA2*, *ERCC1*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2* ve *MYC* genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR cihazında delta delta Ct yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz grupları aşağıdaki tabloda sınıflandırılmıştır.

Tablo 11. *Tp53*, *MDM2*, *RAD51*, *BRCA2*, *ERCC1*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2* ve *MYC* genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde grupların sınıflandırılması.

Kontrol	Grup Kontrol
TiO ₂	Grup 1
TiO ₂ - PEG	Grup 2
TiO ₂ -PEG-PTX	Grup 3
PTX	Grup 4

5.5.1.1. *Tp53* ekspresyon düzeyi

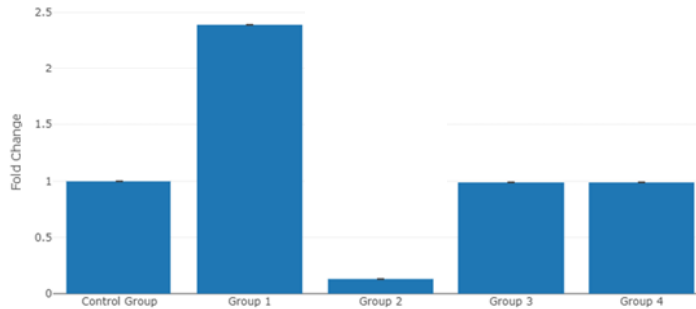
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX'in IC₅₀ dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *Tp53* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *Tp53* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde sırasıyla 1.62, 1.48, 4.23 ve 1.54 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (**p*<0,0001).



Şekil 26. *TP53* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.2. *MDM2* ekspresyon düzeyi

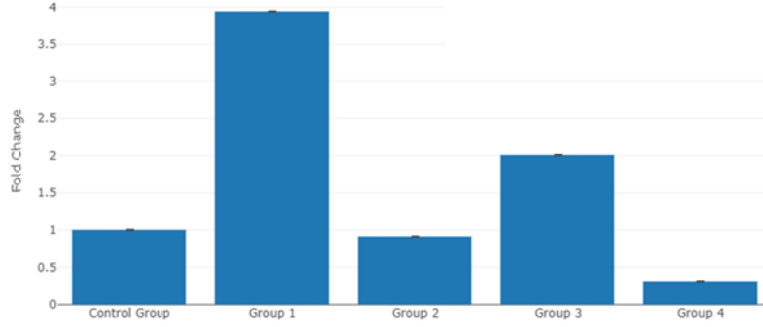
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *MDM2* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *MDM2* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 ekspresyon düzeyinde 2.39 kat artış, TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX ise 0.13, 0.99 ve 0.99 kat azalma izlendi. Farklılığı istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p < 0.0001$).



Şekil 27. *MDM2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.3. *RAD51* ekspresyon düzeyi

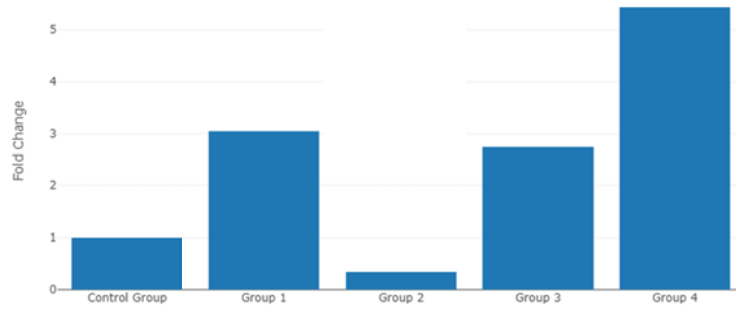
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *RAD51* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *RAD51* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 ve TiO_2 -PEG-PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 3.94 ve 2.01 kat artış TiO_2 -PEG ve PTX ise 0.91 ve 0.31 kat azalma izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p < 0.0001$).



Şekil 28. *RAD51* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.4. *BRCA2* ekspresyon düzeyi

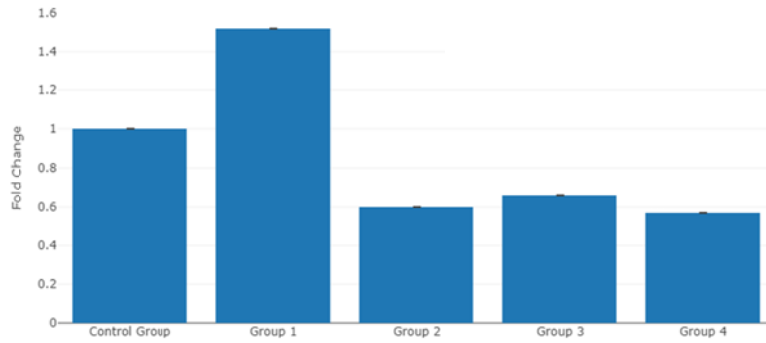
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *BRCA2* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *BRCA2* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 , TiO_2 -PEG-PTX ve PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 3.05, 2.75 ve 5.43 kat artış TiO_2 -PEG ise 0.34 kat azalma izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p < 0.0001$).



Şekil 29. *BRCA2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.5. *ERCC1* ekspresyon düzeyi

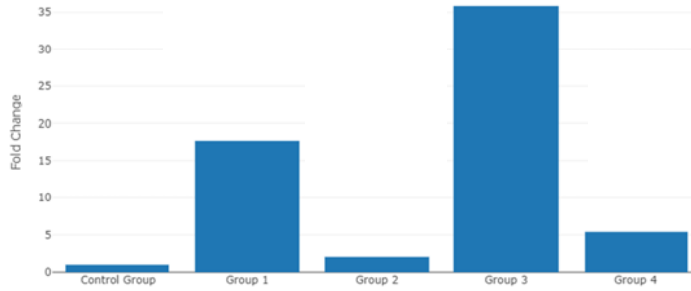
HeLa servikal kanseri hücre hattına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *ERCC1* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *ERCC1* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 ekspresyon düzeyinde sırasıyla 1.52 kat artış TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX ise 0.50, 0.66 ve 0.57 kat azalma izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p < 0.0001$).



Şekil 30. *ERCC1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.6. *ATR* ekspresyon düzeyi

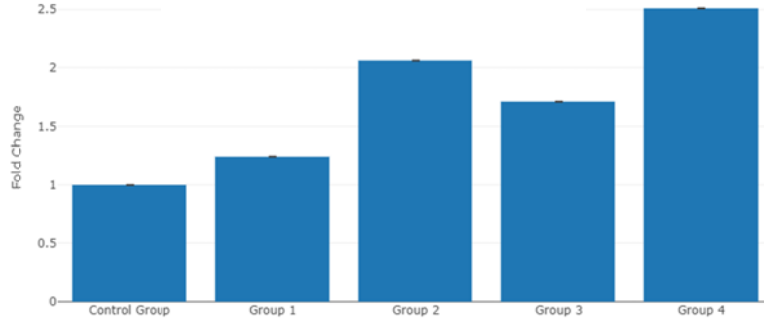
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *ATR* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *ATR* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX ekspresyon düzeyinde 17.67, 2.05, 35.84 ve 5.40 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p<0.0001$).



Şekil 31. *ATR* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.7. *CDKN1A* ekspresyon düzeyi

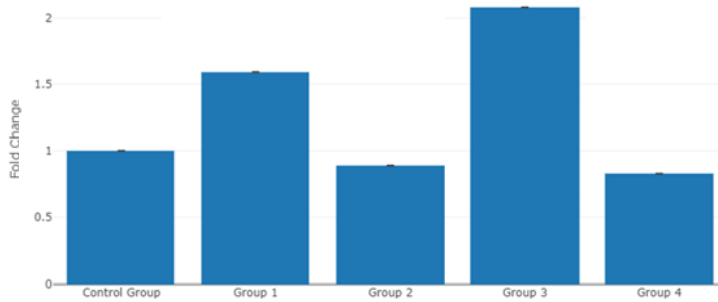
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *CDKN1A* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *CDKN1A* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 1.24, 2.06, 1.71 ve 2.51 kat görüldü ($*p<0.0001$).



Şekil 32. *CDKN1A* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.8. *PRKDC* ekspresyon düzeyi

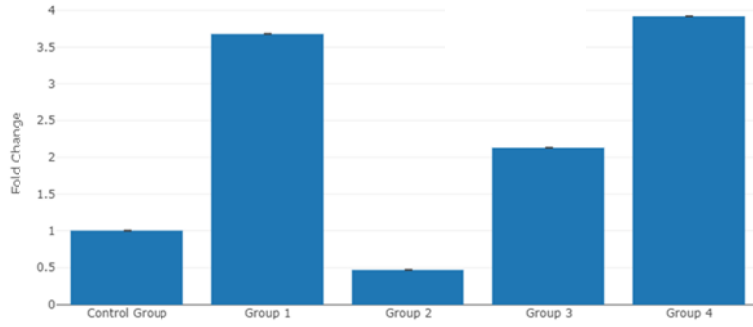
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *PRKDC* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *PRKDC* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 ve TiO_2 -PEG-PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 1.59 ve 2.08 kat artış, TiO_2 -PEG ve PTX ise 0.89 ve 0.83 kat azalma izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p < 0.0001$).



Şekil 33. *PRKDC* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.9. *VEGFB* ekspresyon düzeyi

HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *VEGFB* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *VEGFB* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 , TiO_2 -PEG-PTX ve PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 3.68, 2.13 ve 3.92 kat artış, TiO_2 -PEG ise 0.47 kat azalma izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p < 0.0001$).

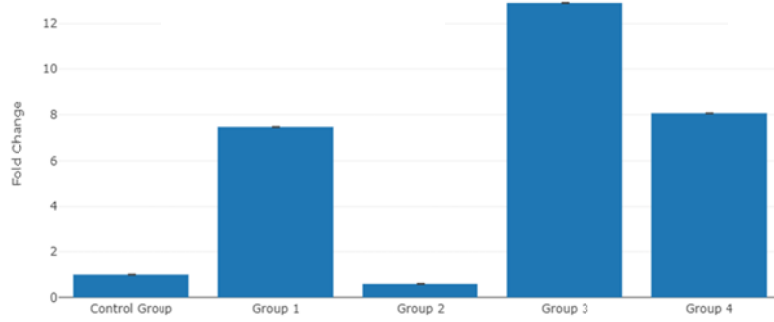


Şekil 34. *VEGFB* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.10. *PDGFB* ekspresyon düzeyi

HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *PDGFB* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *PDGFB* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 , TiO_2 -PEG-PTX

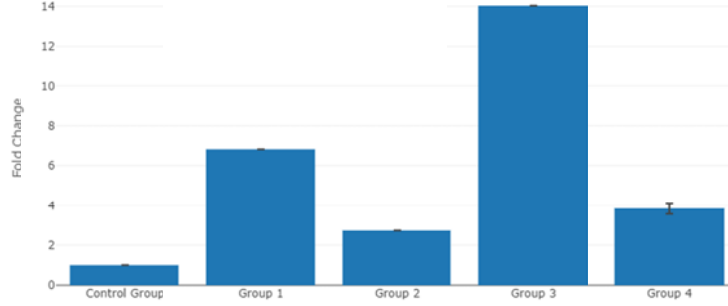
ve PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 7.46, 12.91 ve 8.06 kat artış, TiO₂-PEG ise 0.59 kat azalma izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (* $p < 0.0001$).



Şekil 35. *PDGFB* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.11. *CASP2* ekspresyon düzeyi

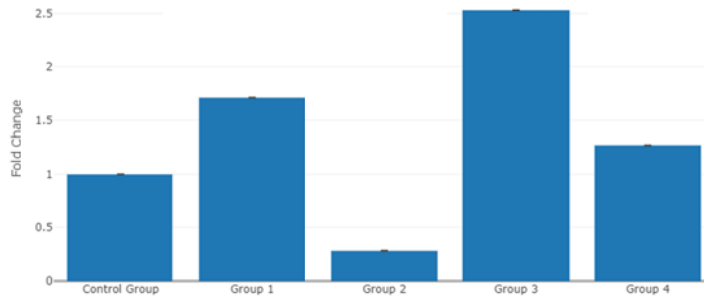
HeLa servikal kanseri hücre hattına TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX'in IC₅₀ dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *CASP2* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *CASP2* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO₂, TiO₂-PEG, TiO₂-PEG-PTX ve PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 6.82, 2.37, 14.03 ve 3.84 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (* $p < 0.0001$).



Şekil 36. *CASP2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.5.1.12. *MYC* ekspresyon düzeyi

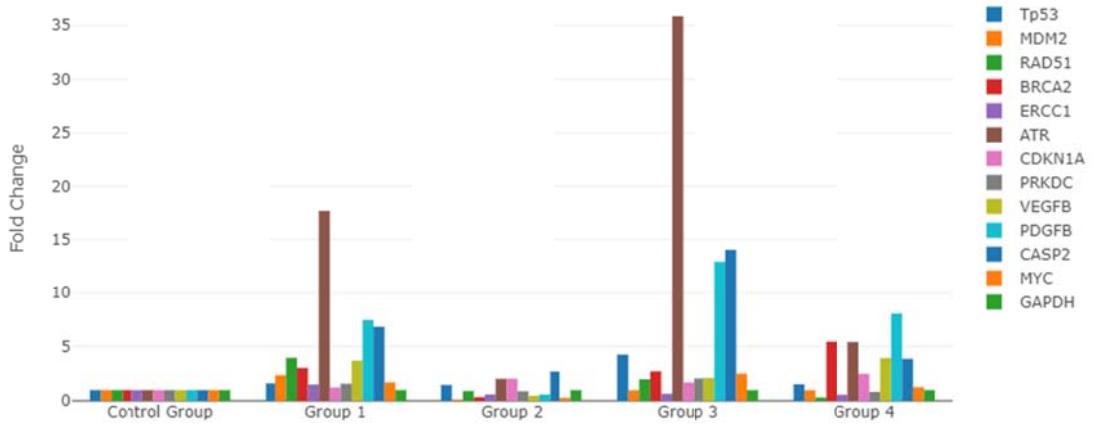
HeLa servikal kanseri hücre hatına TiO_2 , TiO_2 -PEG, TiO_2 -PEG-PTX ve PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *MYC* geni ekspresyon düzeyleri delta delta Ct metoduyla analiz edilmiştir. *MYC* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre TiO_2 , TiO_2 -PEG-PTX ve PTX ekspresyon düzeyinde sırasıyla 1.71, 2.53 ve 1.27 kat artış, TiO_2 -PEG ise 0.28 kat azalma izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($*p < 0.0001$).



Şekil 37. *MYC* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Tp53, *MDM2*, *RAD51*, *BRCA2*, *ERCC1*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2* ve *MYC* gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubu ve diğer gruplar

arasında kıyaslandığında tüm grupların *Tp53*, *ATR*, *CDKN1A* ve *CASP2* genlerin ekspresyon düzeyi artmıştır. *MDM2* ve *ERCC1* genlerin ekspresyon düzeyleri ise grup 1’de artarken diğer tüm gruplarda azalmıştır. *RAD51* ve *PRKDC1* genlerin ekspresyon düzeyleri ise grup 1 ve grup 3’te artarken diğer gruplarda azalmıştır. *BRCA2*, *VEGFB*, *PDGFB* ve *MYC* genlerin ekspresyon düzeyleri ise grup 1, grup 3 ve grup 4’te artarken grup 2’de azalmıştır. *Tp53*, *MDM2*, *RAD51*, *BRCA2*, *ERCC1*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2* ve *MYC* gen ekspresyon düzeyleri HeLa kanser hücre hattında tüm gruplar yönünden incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p<0,0001$) (Şekil 36). Tüm gen ve gruplara ait C_T değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 11).



Şekil 38. *Tp53*, *MDM2*, *RAD51*, *BRCA2*, *ERCC1*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2*, *MYC* ve *GAPDH* genlerinin kat değişimi değerlerinin karşılaştırılması.

<i>Ortalama Ct Değerleri</i>					
<i>Numuneler</i>					
Genler	<i>Boş kontrol</i>	<i>TiO₂</i>	<i>TiO₂-PEG</i>	<i>TiO₂-PEG-PTX</i>	<i>PTX</i>
<i>Tp53</i>	31.57	32.48	29.46	30.95	33.39
<i>MDM2</i>	31.07	31.42	32.42	32.54	33.53
<i>RAD51</i>	29.98	29.61	28.57	30.43	34.12
<i>BRCA2</i>	-	-	-	-	-
<i>ERCC1</i>	30.46	31.47	29.65	32.52	33.72
<i>ATR</i>	35.08	32.46	32.42	31.29	37.90
<i>CDKN1A</i>	30.01	31.31	27.43	30.70	31.12
<i>PRKDC</i>	31.18	32.12	29.81	31.58	33.89
<i>VEGFB</i>	31.76	31.49	31.31	32.13	32.23
<i>PDGFB</i>	32.10	30.81	31.32	29.87	31.53
<i>CASP2</i>	34.50	33.34	31.51	32.15	35.61
<i>MYC</i>	31.31	32.15	31.62	31.43	33.41
<i>GAPDH</i>	26.17	27.78	24.63	27.63	28.61

Tablo 12. RT-PCR verilerinin kontrol ve test gruplarında ortalama Ct değerleri.

Kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) test örneğinin normalize edilmiş gen ifadesinin ($2^{-\Delta C_t}$) kontrol örneğinin normalize edilmiş gen ifadesine ($2^{-\Delta C_t}$) bölünmesidir. Kat regülasyonu, kat değişiminin sonuçlarını biyolojik olarak anlamlı bir şekilde temsil eder. Birden fazla kat değişimi değerleri pozitif veya yukarı regülasyonu gösterir ve kat regülasyonu kat

değişimine eşittir. Birden az kat değişimi değerleri negatif veya aşağı regülasyonu belirtir ve kat regülasyonu kat değişiminin negatif tersidir (tablo 12, 13, 14, 15).

Tablo 12. Grup1'in kat regülasyonu ve P değeri

Gen	Kat regülasyonu	P değeri
<i>MDM2</i>	2.39	0.0000
<i>RAD51</i>	3.94	0.0000
<i>BRCA2</i>	3.05	0.0000
<i>ATR</i>	17.67	0.0000
<i>VEGFB</i>	3.68	0.0000
<i>PDGFB</i>	7.46	0.0000
<i>CASP2</i>	6.82	0.0000

Tablo 13. Grup2'in kat regülasyonu ve P değeri

Gen	Kat regülasyonu	P değeri
<i>ATR</i>	2.05	0.0000
<i>CDKN1A1</i>	2.06	0.0000
<i>CASP2</i>	2.73	0.0000
<i>MDM2</i>	-7.41	0.0000
<i>BRCA2</i>	-2.91	0.0001
<i>VEGFB</i>	-2.13	0.0000
<i>MYC</i>	-3.61	0.0000

Tablo 14. Grup3'ün kat regülasyonu ve P değeri

Gen	Kat regülasyonu	P değeri
<i>Tp53</i>	4.23	0.0000
<i>RAD51</i>	2.01	0.0000
<i>BRCA2</i>	2.75	0.0001
<i>ATR</i>	35.84	0.0000
<i>PRKDC</i>	2.08	0.0000
<i>VEGFB</i>	2.13	0.0000
<i>PDGFB</i>	12.91	0.0000
<i>CASP2</i>	14.03	0.0000
<i>MYC</i>	2.53	0.0000

Tablo 15. Grup4'ün kat regülasyonu ve P değeri

Gen	Kat regülasyonu	P değeri
<i>BRCA2</i>	5.43	0.000
<i>ATR</i>	5.40	0.000
<i>CDKN1A</i>	2.51	0.000
<i>VEGFB</i>	3.92	0.000
<i>PDGFB</i>	8.06	0.000
<i>CASP2</i>	3.84	0.000
<i>RAD51</i>	-3.25	0.000

6.TARTIŞMA

Günümüzde modern onkolojide hücreye meydana gelen genetik hasar, kanserin birincil nedeni olarak kabul edilir ve kanserin patogenezi, normal bir hücrenin tümör hücresine dönüşüm süreci olarak görülür (259). Kanser “gen hasarı hastalığı” olarak kabul edilir (260). Kanser hastalarının tedaviye karşı hayatta kalmasına ilişkin veriler, son 30 yıldır sadece% 14 artmıştır (% 50'den% 64'e) Kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Genel olarak, kanser prevalansı aslında artmıştır; sadece 2019'de Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.735.350 yeni kanser vakası ve 609.640 kanser ölümünün gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (22). Bu nedenle kanser, tüm insan toplumlarının sağlığını etkileyen ciddi bir sorundur. Ne yazık ki, doku düzeyinde çeşitli bir hastalıktır ve bu çeşitlilik, spesifik tanı ve tedavisi için büyük bir zorluktur (261, 262). Kanser üç etiyolojik nedeni vardır. Bunlar kimyasal karsinogenez (benzpiren, asbest ve 800'den fazla kimyasal madde), fiziksel karsinogenez (iyonlaştırıcı radyasyon, ultraviyole radyasyon, vb.) ve biyolojik karsinogenezdir (virüsler, bakteriler, mantarlar) (263). Bununla birlikte, klinik uygulamada, kanserin etiyolojik nedenini belirlemek ve her durumda uygun etiyotropik kanser tedavisini reçete etmek pratik olarak imkansızdır, bu nedenle nedensel kanser tedavisi mevcut değildir (264). Çeşitli malign tümörler için tipik olan bir takım patolojik süreçlerin, özellikle kanser hücrelerinin aktivitesinden kaynaklandığı kanıtlanmıştır. Kanser hücrelerinin neden olduğu patolojik süreçler inflamasyon (pro-enflamatuar sitokinlerin hücre üretimi, büyüme faktörleri ve diğerleri), bağışıklık sisteminin bozulması (NK hücrelerinin ihlali etkisi, sitotoksik lenfositler, makrofajlar), tümör hücreleri tarafından bağışıklık kaçağı, hücre bölünmesinin otokrin ve parakrin uyarımı, metastaz (istila faktörleri, hücre ürünleri, bozulmuş hücre içi

etkileşimler ve diğerleri), anjiyogenez (kan damarlarının hücreleri tarafından büyüme faktörü üretimi, endotel hücre proliferasyonu, vb.) altında tümör hücrelerinin kalıcı olarak yeniden üretilmesi.) ve oksidatif nitrosatif stres (ROS ve azot türlerinin hücre üretimi) (265-269). Sonuç olarak, büyüme, hayatta kalma ve istila / motilite gibi normal hücre fonksiyonları kontrol eden genlerin etkileri artar ve bu etkileri baskılayan genler bastırılır (270). Genetik kod, hücre çekirdeğindeki kromozomlarda paketlenmiş olan DNA formunda bulunur. Genlerin işlevi protein yapmaktır. Bu işlem iki aşamada gerçekleşir. DNA kodu, transkripsiyon işlemi sırasında mRNA'ya kopyalanır ve daha sonra mRNA proteine çevrilir. Bir genin mRNA'ya kopyalanması ve daha sonra bir hücre proteine çevrilmesi işlemi karmaşıktır ve çoklu kontrol seviyelerine tabidir. Kanser, her biri normal hücrelerde önemli bir işlev sağlayan iki sınıf gen, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler tarafından yönlendirilir. Kanserde, proto-onkogenlerin mutasyonlarının aktive edilmesi, kontrolsüz hücre bölünmesine, artmış sağkalım ve yayılmaya neden olur (271). Kanser, büyüme faktörü bağımsızlığı, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümünü önleme, replikasyon potansiyeli, anjiyogenez ve invazyon / metastazda altı temel değişiklik meydana gelir (272).

Dünya çapında olarak, servikal kanseri kadınlarda en sık görülen kanserlerden biri olmaya devam etmekte, meme, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır. 2012 yılında, yılda 265700 ölümlle yaklaşık 527 600 yeni servikal kanseri vakası olduğu tahmin edilmektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde, kadınlarda görülme sıklığında en sık görülen ikinci ve mortalite açısından en sık görülen üçüncü kanser türü daha yaygındır. Yeni vakaların ve ölümlerin çoğu düşük kaynak bölgelerinde veya toplumun sosyoekonomik olarak daha zayıf kesimlerinden insanlar

arasında meydana gelmektedir (273). Hemen hemen tüm servikal karsinom vakaları, dönüşüm bölgesinden ekto- veya endoservikal mukozadan kaynaklanır (274). Neredeyse tüm serviks kanseri vakaları HPV enfeksiyonu ile ilişkilendirilebilir (275). HPV, Amerika Birleşik Devletleri'nde hem erkekler hem de kadınlar arasında en yaygın cinsel yolla bulaşan hastalıktır ve yılda yaklaşık 14 milyon vaka teşhis edilir (276). Servikal HPV enfeksiyonlarının çoğu geçicidir ve 6 ila 24 ay içinde vücuttan temizlenir (277). HPV enfeksiyonunun kalıcılığını veya hastalığın ilerlemesini belirleyen faktörler tam olarak anlaşılammıştır. İmmünokompetan bir konakçıda, HPV enfeksiyonunun bir kadının invaziv serviks kanseri geliştirmesi için yeterli olmadığı görülmektedir (276). İnvaziv servikal kanserler lenfatik sistem tarafından, hematojen olarak veya doğrudan uzatma yoluyla yayılabilir. Doğrudan uzama en yaygın olarak uterus korpusu, vajina, parametri, periton boşluğu, mesane veya rektumu işgal eder; yumurtalıklar nadiren etkilenir (278). Servikal kanseri ameliyattan önce klinik olarak evrelendirilir ve evreleme tümör boyutu ve invazyon derinliği, çevre dokulara doğrudan yayılma ve uzak metastazlara dayanır (279). Servikal kanseri evreleri evre I (en az gelişmiş hastalık) ile evre IV (en ileri hastalık) arasındadır (280). HPV tipleri, onkojenik potansiyellerine bağlı olarak düşük riskli veya yüksek riskli suşlar olarak kategorize edilir. Düşük riskli HPV suşları asemptomatik olabilir veya anogenital siğillere neden olabilirken, yüksek riskli suşlar onkojeniktir (281). Prekanseroz lezyonların (servikal displazi) ve servikal karsinomların% 99'undan fazlası yüksek riskli HPV enfeksiyonundan kaynaklanır. Yaklaşık 40'ı anogenital bölgeyi enfekte eden 200'den fazla HPV suşu tanımlanmıştır. Bu HPV suşlarının 18'i yüksek riskli genotipler olarak sınıflandırılmıştır (282). Hemen hemen tüm servikal neoplaziler ve kanserler yüksek riskli HPV genotiplerine

atfedilebilir ve tüm servikal kanser vakalarının yaklaşık% 70'i tip 16 ve 18'e atfedilebilir (281). Tip 16, yassı epitel hücreli karsinomların % 50'sinden ve tüm servikal kanserlerin% 55-60'ından sorumluyken, tip 18, servikal adenokarsinomların yaklaşık% 20'sine neden olur (283). Bazı HPV tipleriyle enfeksiyon, anüs, vulva, vajina, penis ve orofarenks kanserlerinin bir kısmına da neden olur (284). Hemen hemen tüm servikal kanserler ya epitel hücreli karsinom veya adenokarsinomdur (277). Servikal karsinogenezde gerekli olduğu bilinen önemli adımlar arasında HPV enfeksiyonu, HPV kalıcılığı, displazi ilerlemesi ve invazyon bulunur. HPV enfeksiyonunun temizlenmesi ve prekanseröz lezyonların gerilemesi dahil olmak üzere ters yönde adımlar mümkündür. Regresyon ve klerens basamakları oldukça yaygındır, bu da servikal HPV enfeksiyonlarının çoğunu geçici ve kendi kendini sınırlar. HPV enfeksiyonlarının yaklaşık % 67'sinin 12 ay içinde müdahale edilmeden ve % 90'dan fazlasının 2 yıl içinde temizleneceği gösterilmiştir (285, 286). Servikal kanseri taraması, Amerika Birleşik Devletleri'nde insidans ve mortalitede iyi belgelenmiş düşüşlerle sonuçlanmıştır. Çoğu yeni serviks kanseri vakası, hiçbir zaman veya nadiren taranmamış kadınlarda görülür (287). Bu itibarla, Sağlıklı İnsanlar 2020 meme, servikal ve kolorektal kanserler için tarama oranlarını artırma hedeflerini içerir. Servikal kanseri için amaç% 93 tarama oranıdır (288). Aşılamanın serviks kanseri taraması ihtiyacını tamamen ortadan kaldırmayacağına dikkat etmek önemlidir, çünkü serviks kanserine neden olan tüm HPV tipleri şu anda kullanımda olan aşılarla dahil değildir (289). Bu nedenle aşılama, rutin serviks kanseri taramasının yerini tutmaz ve aşılanan hastalar önerildiği gibi serviks kanseri taramasından geçmelidir (290).

Servikal kanseri tedavisi, kanser evresi ve hastanın komorbiditeleri, nüks riski ve doğurganlık hedefleri tarafından yönlendirilir (279). Tedavi seçenekleri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi, radyasyon tedavisi veya bir kombinasyon bulunur. Hastanın kanser ve doğurganlık hedeflerine bağlı olarak, cerrahi müdahale koni biyopsisi, tachelektomi (serviksin ve vajinanın bölümlerinin çıkarılması) veya histerektomiyi içerebilir (291). Histerektomi tipi hastalık evresine bağlıdır ve laparoskopik veya robotik bir yaklaşım kullanılarak yapılabilir. Mikroinvaziv servikal kanserler basit histerektomi ile tedavi edilebilirken, daha ilerlemiş hastalık lenf dokusunu ve değişken ölçüde vajina, parametri ve mesanenin kısımlarını kaldıran radikal histerektomi gerektirir (279). Hastalık istilasına ve yayılmasına bağlı olarak kemoterapi ve radyasyon da tedavi rejiminin bir parçası olabilir; evre IV serviks kanseri genellikle tedavi edilemez olarak kabul edilir ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak ve hastanın semptomlarını hafifletmek için kemoterapi ve radyasyon kullanılır (292). Hastalık nüksünün tedavisi hastanın önceki tedavilerine ve tekrarlayan hastalığın derecesine bağlıdır. Lokalize nükste, histerektomi bir seçenektir ve eksenterasyonu, kadın üreme organlarını, alt idrar yolunu ve rektosigmoidin bir kısmını çıkartan cerrahi bir prosedürü içerebilir. Eksenterasyon% 50 kür oranına sahip olmasına rağmen, aynı zamanda% 3 ila% 5 mortalite oranı taşır ve hastaların yarısında büyük komplikasyonlar görülür (293). Hedefe yönelik tedaviler, sitotoksik tedavilerle birlikte ilerlemiş hastalığı olan hastaların sağkalımını iyileştirebilecek yeni bir varlık olarak ortaya çıkmıştır (294). Kemoterapinin terapötik etkileri hücre bölünmesini keserek hücre ölümüne yol açarak üretilir. Bazı kemoterapi ajanları sadece bölünen ve hücre döngüsüne spesifik olarak adlandırılan hücreleri etkileyebilir. Diğerleri, dinlenme fazı da dahil olmak üzere herhangi bir fazdaki

hücreleri etkiler ve hücre döngüsü spesifik değildir. Jinekolojik malignitede yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanları şunları içerir: 1) Karboplatin ve cisplatin bunlar DNA sentezini ve apoptoza yol açan hücre replikasyonunu inhibe eden intra ve inter-strand DNA çapraz bağları oluşturan Platin ajanlardır. 2) Paklitaksel - mitotik durmaya neden olan ve hücre ölümüne yol açan mikrotübülleri stabilize eden bir taksandır. 3) Lipozomal Doksorubisin - DNA'yı bağlayan ve hücre ölümüne yol açan nükleik asit sentezini inhibe eden bir antrasiklin. Doksorubisin, anormal tümör vaskülatürüne nüfuz eden ve daha sonra ilacı bu dokuya salan bir lipozom mikroskobik vezikülde verilir. 5) Gemcitabin - apoptoz ile sonuçlanan DNA replikasyonu sırasında sitidin yerine bir nükleosid analogu olarak çalışan bir antimetabolittir (295). Tedavinin yan etkilerinin çoğuna, ilaçların bölünürken normal dokuların hücreleri üzerindeki etkisi neden olur. Yan etkiler, tedavi sırasında akut olarak ortaya çıkabilir veya aylar ila yıllar sonra geç ortaya çıkabilir. Kemoterapinin en büyük etkisi, saç folikülleri, GI yolunun mukozal astar hücreleri ve kemik iliği gibi yüksek hücreli ciroya sahip olan normal hücrelerde görülür. Normal hücreler genellikle uzun süreli hasar riskini en aza indirerek tedavi dozları arasındaki hasarı onarabilir. Farklı kemoterapi ajanları farklı yan etkilere neden olur ve her bir hasta yan etkileri farklı derecelerde yaşayacaktır (296). Tubulin, hücre şekli, mitoz, mayoz, salgı, hücre içi taşıma ve aksonal fonksiyonun korunması dahil olmak üzere hücre fonksiyonunda çok önemli, çeşitli rollere sahip olan mikrotübüllerin temel alt birimidir.

Birkaç antikanser ilacı sınıfının tübülün fonksiyonuna müdahale ettiği bilinmektedir: 1) vinka alkaloidleri (vinkristin, vindesine, vinorelbin, vinblastin) tübülün dimerlerine bağlanır ve mikrotübüllere birleşmesini önler; 2) taksanlar (paklitaksel,

dosetaksel) mikrotübüllere bağlanır ve sökülmesini önler, böylece normal mikrotübül fonksiyonunu inhibe eder; 3) eribulin, taksana dirençli hücre hatlarında aktif olan ve meme kanserinde klinik olarak aktif gibi görünen deniz süngerinden elde edilen bir halifhondrin B türevidir (297, 298). Paklitaksel, taksan ilaç ailesinin önemli bir üyesidir ve tüm zamanların en başarılı anti-kanser ilaçlarından biridir. Taksanlar aslen Taxus cinsinden bitkilerden tanımlanmıştır. Taksanlar, birçok gelişmiş kanser türünün semptomlarını hafifletmek için eşsiz bir yetenek ve aynı zamanda kanserin önceki aşamalarının ilk tedavisinde etkililik göstermiştir (299). Paklitaksel, hücre bölünmesi üzerindeki etkisi ile terapötik değerine sahiptir. Mitotik iğ, kromozomlara sıkıştırılmış DNA moleküllerinin iki kızı hücre arasında bölündüğü süreç olan mitoz sırasında kromozomların hareketlerinden sorumludur (300). Mitotik iğ kromozom, sentromer ve mikrotübülden oluşur. Mikrotübüller, a- ve b-tubulin olmak üzere iki proteinin polimerleridir. İçi boş filamentler oluşturmak için mikrotübül silindirinin uzun eksenine tamamen paralel olarak hizalanırlar (301). Mikrotübüller dinamik kararsızlık ile tanımlanır, yani uçları polimerizasyon ve depolimerizasyon arasında dinamik olarak değişir. GTP'ye bağlı tübül dimerleri, polimerizasyon fazında mikrotübülün ucuna ilave edilir, ancak P-tubulin'e bağlı GTP, GDP'ye hidrolize edilebilir ve böylece depolimerizasyon fazını başlatabilir. Mikrotübülle etkileşen ajanlar iki gruba ayrılabilir: Birinci grup tübül polimerizasyon inhibitörleri ve ikinci grup mikrotübül stabilize edici ajanlardır (301). Mikrotübül stabilize edici ajanlar, mikrotübülleri normal destabilize etme koşulları altında stabilize eder. Paklitaksel ve benzer bileşikler, kovalent olmayan bir etkileşim yoluyla polimer çekirdeğindeki polimerleştirilmiş mikrotübüllere bağlanır. Böylece, GDP'ye bağlı b-tubulin protofilamentlerini

(depolimerizasyona eğilimli) daha stabil GTP'ye bağlı yapılarınkine benzer bir konformasyona doğru düzleştirerek stabilize ederler (302). Mitozun ilerlemesi bozulur ve böylece apoptoz veya hücre döngüsünün G-fazına dönme tetiklenir (303).

Ökaryotik hücreler hücre döngülerini iki ana periyotta bölerler. En uzun dönem interfaz, G1 fazı (hücrelerin büyümeye veya durgun bir duruma girmeye karar verdiği, G0), S fazı (DNA sentezinin olduğu yer) ve G2 (hücrelerin mitoz için hazırlandığı) olan dört farklı fazdan oluşur. İkinci ve daha kısa süre, hücrelerin genetik materyali bölüdüğü ve sitokinezin meydana geldiği mitoz veya M fazıdır. Hareketsiz bir hücrenin bölünmesi için mitojenik sinyaller, S fazının başlangıcında yer alan genlerin ekspresyonundan sorumlu olan E2F transkripsiyon faktörlerinin salınmasında birleşen bir dizi olayı tetiklemek için gereklidir. Memeli hücre döngüsünde, farklı fazlardan geçiş siklinler, sikline bağlı kinazlar (CDK'ler), CDK inhibitörleri (CKI) ve proteinlerin retinoblastom ailesi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (304). Hücre döngüsü ilerlemesi, siklinler veya CKI'lerle ilişkili olduğunda CDK'ların senkronize açık veya kapalı durumu ile sağlanır. CDK ve CKI'lerin aksine, siklin seviyeleri sentez ve bozunmaya bağlı olarak dalgalanır, böylece CDK'ları döngüsel olarak aktive eder. 20'den fazla CDK tanımlanmıştır ancak bunlar arasında CDK1, 2, 4 ve 6, hücre döngüsü ilerlemesinin düzenleyicileri olarak önemli roller oynamaktadır (305). Östrojen ve insan epidermal büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri, D-tipi siklinlerin ekspresyonunu teşvik eder, böylece çevresel endikasyonları hücre döngüsü makineleri ile doğrudan bağlar. Transkripsiyonel indüksiyondan sonra siklin D proteinleri etkileşir ve G1 fazı sırasında ilerlemeyi teşvik eden CDK4 ve CDK6'yı aktive eder. Siklin D bunu, Serine / Threonine olarak fosforile kinaz olarak pRb, p107 ve p130 içeren cep proteinlerini

kısmen etkisiz hale getiren karşılık gelen siklin partneri CDK4 veya CDK6 ile bir kompleks içinde hareket ederek yapar. Retinoblastom proteini (pRb), hücre döngüsünün ilerlemesini negatif olarak düzenleyen bir tümör baskılayıcı proteindir. PRb fosforilatlanmadığında, transaktivasyon alanlarını bloke ederek ve histon deasetilazın toplanmasıyla E2F transkripsiyon faktörlerini bastırır. Siklin DCCK4 / 6 kompleksi pRb'yi C-terminal bölgesinde fosforile ettiğinde, merkezi cep alanı ile moleküller arası bir entegrasyon meydana gelir ve histon deasetilazın bağlanmasını engeller, böylece aktif transkripsiyonel baskıyı serbest bırakır (306). E2F'ler daha sonra G1 / S faz geçişi için önemli olan DNA polimeraz a ve E ve A siklinleri gibi genleri kopyalamaya başlar. Siklin E-CDK2 kompleksleri aktif hale gelir ve pRb'yi hiperfosforile etmeye devam eder ve E2F'lerin ve dimerik partnerlerinin hücre döngüsü ilerlemesini garanti eden genlerin ekspresyonunu tamamen aktive etmesine izin veren pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturur (307). Kısıtlama noktası olarak adlandırılan bu noktadan sonra, hücre döngüsünün sonraki aşamaları artık dışsal faktörlere yanıt vermemektedir. Daha sonra siklin A, hücreyi S fazına sürerek CDK2'yi aktive eder. Son olarak, siklin B1 ve B2, DNA replikasyonuna, sentrozom ve kromozom fonksiyonuna ve sitokinez için gerekli yapıların organizasyonuna katılan çeşitli proteinleri fosforile ederek G2 boyunca ilerlemeyi ve M fazına girişi sağlamak için CDK1'i aktive eder (308). Kümülatif kanıtlar, gen transkripsiyonunda, DNA hasar onarımında, hücre farklılaşmasında ve son yıllarda metabolik süreçlerin kontrolünde kanonik olmayan siklin ve CDK rollerini göstermiştir (309).

6.1. TP53

TP53, 17q13.1 numaralı kromozomda bulunan bir tümör baskılayıcı genidir (310). *TP53* geni, 393 amino asitten oluşan tetramerik çift özgüllük transkripsiyon faktörü p53'ü kodlar. Normal koşullar altında p53'ün düşük bazal seviyesini korumak için MDM2-aracılı ubikitinasyonu takiben proteazomal degradasyon içeren düzenleyici mekanizma kullanılır. Bununla birlikte, p53'ün DNA hasarı gibi çeşitli hücrel stresler altında aktivasyonu, hücrelerin genomik bütünlüğünü korumak için hücre döngüsü durması, apoptoz ve diğer yollarda yer alan genlerin bir gerçekliğini düzenlemek için gereklidir. Bu kritik fonksiyonlarla p53, “genomun koruyucusu” olarak tanınır (311). P53 katı tümörlerin% 50'sinden fazlasında mutasyona uğramıştır ve negatif prognozu yönlendiren bir faktör olduğu belirlenmiştir. Mutasyona uğramış p53 gen formu, kontrolsüz hücre büyümesine yol açan apoptozu indükleyemez, böylece tümör oluşumunu destekler. Çeşitli stres koşulları altında ve fizyolojik süreçler sırasında, p53 çoğalma önleyici işlevini yerine getirmek için aktif hale gelir (224). P53 genindeki mutasyonlar, hematopoyetik malignitelerde% 10 ve yumurtalık seröz karsinomunda yaklaşık% 100 gibi değişen insidans oranlarında da olsa rapor edilmiştir (312). P53'ün fonksiyonel aktivitesinin kaybının, protein yapısındaki konformasyonel farklılıklar nedeniyle gen mutasyonlarını ve tümör oluşumunu indüklediği bilinmektedir. Genotoksik stresler, neoplastik hücre oluşumu ve tümör invazivliği, değiştirilmiş p53 proteininin aşırı ekspresyonuna neden olur (313).

Bizim çalışmamızda, tüm gruplarda *Tp53* geninin ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 4 (TiO₂-PEG-PTX) (IC₅₀=14.9±3,24 µg/ml) en az ise grup 2 (TiO₂-PEG)'de (IC₅₀=71.42±2,41 µg/ml) anlamlı derecede artmıştır

($p < 0.0001$). Hücreye uygulanan IC_{50} dozlarına bakıldığında TiO_2 -PEG dozunun TiO_2 -PEG-PTX'in beş katı olmasına rağmen TiO_2 -PEG-PTX nano taşıyıcı temelli ilacın daha fazla hücelere etki ederek *Tp53* ekspresyonunu etkinleştirdiği belirlenmiştir.

6.2.MDM2

Murin çift minute 2 olarak bilinen *MDM2*'nin p53 tümör süpresör geninin negatif bir regülatörü olduğu bilinmektedir. *MDM2* geni, faregiller hücre çizgilerinde çoğaltılmış onkogen olarak üç genden biri (*MDM1*, 2 ve 3) olarak tanımlandı. *MDM2* ekspresyonu, kendiliğinden transforme edilmiş bir fare BALB/c hücre çizgisinde (3T3-DM) 50 kattan daha fazla olacak şekilde dışarı atılmıştır (314). *MDM2* geninin amplifikasyonu, eşlik eden p53 mutasyonu olmadan tüm insan kanserlerinin yaklaşık% 7'sinde meydana gelir. *MDM2*, p53 geninin negatif regülatörüdür ve p53 transkripsiyon aktivitesini ve çekirdekten sitoplazmaya translokasyonu inhibe ederek etki eder. Strese tabi tutulmamış normal hücrelerde p53, 5 ila 30 dakikalık bir yarılanma ömrüne sahip oldukça kararsız bir proteindir ve nükleer ve sitoplazmik proteazomlar tarafından bozunmaya yol açan p53'ü monoubikuitinatlar sürekli olarak içerir. Normal hücrel koşullar altında, çekirdekte *MDM2* eksprese edilir, ancak sitoplazmaya yerleştiği ve bazı hedeflerinin proteazom tarafından bozunmasına aracılık ettiği bulunur (315). Tümörlerin% 17'sinden fazlası, günümüz kemoterapötiklerinde kötü prognoz ve tedavi başarısızlığına yol açan *MDM2* gen amplifikasyonu sergiler. *MDM2*, p53'ün hücrel seviyelerini, p53'ün N-terminal transaktivasyon alanını doğrudan bağlayarak ve gizleyerek veya p53'ün proteazomal degradasyonunu arttırarak iki ayrı mekanizma yoluyla kontrol eder (316). *MDM2*, p53'e doğru bir E3 ubiquitin ligazı olarak işlev görür ve E1, E2 ve E3 proteinlerini içeren karmaşık bir dizi adım yoluyla bozulmasını teşvik

eder. İyonlaştırıcı ışınlama, UV ışınlaması ve diğer DNA'ya zarar veren ajanlar, p53'e bağlı bir şekilde *MDM2* ekspresyonunu indükleyebilir. *MDM2* p53 aktivitesini inhibe ederek p53 fonksiyonunu sıkı bir şekilde düzenleyen negatif bir geri besleme döngüsü oluşturur (315).

Bizim çalışmamızda *MDM2* ekspresyonunun grup1'de (TiO_2) ($\text{IC}_{50}=5,27\pm 0,61$ $\mu\text{g/ml}$) anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.0001$) ve diğer gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. *MDM2* geninin en fazla ekspresyon düzeyinde azalması ise grup2'de ($\text{TiO}_2\text{-PEG}$) ($\text{IC}_{50}=71.42\pm 3.24$ $\mu\text{g/ml}$) olduğu belirlenmiştir.

6.3.RAD51

RAD51, genomik bütünlük, hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz ve tümör oluşumu gibi çeşitli hücrel süreçlerde rol oynar. Birden fazla tümör tipi, yüksek miktarda Rad51 içerir, tümör oluşumunun başlamasında veya ilerlemesinde bir rol önerir. Rad51'in, HR biyokimyasal reaksiyonundaki doğrudan rolüne ek olarak, Rad51'in hasar algılama ve hücre döngüsü kontrol noktası sinyalleşme yollarından oluşan karmaşık bir ağa katıldığı açıktır. Bu, uygun bir onarım kalıbı ile ilk eşleştirmeye ve etkileşime ve hücre bölünmesinden önce onarılan ürünlerin nihai çözünürlüğüne izin vermek için uygun hücre döngüsü kontrol noktalarının başlatılmasını sağlar (317). Rad51, HR aracılı DSB onarımının merkezindedir. Rad51, tek sarmallı DNA üzerinde nükleo-protein filamentleri oluşturur ve DNA dupleksleri arasındaki homolog çiftleşme ve sarmal değişimine aracılık eder. Rad51, hücre döngüsünün S veya S / G2 fazında en yüksek ekspresyona sahip çoğalan hücrelerde eksprese edilir. Rad51 ayrıca replikasyon sırasında ortaya çıkan DNA kırılmalarının onarımında rol oynar. S fazı sırasındaki

Rad51 aktivitesi ve DNA'ya zarar veren bir ajana maruz kalmanın ardından aktivasyon, yaygın dağılık Rad51 proteininin çekirdekdeki ayrı odaklara yeniden lokalizasyonu ile karakterizedir (318). HR reaksiyonunun merkeziyetine ek olarak Rad51, DNA hasar sensörleri, rekombinasyon proteinleri, tümör baskılayıcıları, hücre döngüsü ve apoptotik regülatörler ile (DNA hasarı, substrat ve hücre döngüsü fazına bağlı olarak) çok sayıda dinamik kompleks içinde birleşir. Belirli hasarlara veya hücre döngüsü sinyallerine yanıt olarak hangi Rad51 içeren komplekslerin oluştuğu hala bilinmemektedir. Etkileşimler, DNA hasarını takiben ayrı odakların nükleer ko-lokalizasyonu veya biyokimyasal etkileşimler ile tanımlanmıştır. Rad51 içeren nükleer odakların kesin rolü henüz net olarak tanımlanmamıştır, ancak bunların kırık DNA uçlarının belirteçleri ve onarım süreci olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Tümör hücreleri Rad51'i aşırı eksprese eder, ve primer tümör örneklerinin taranması aynı zamanda yüksek düzeyde wild tip Rad51 proteini tanımlamıştır. Yüksek seviyelerde Rad51, apoptoz sırasında kaspaz-3 ile normal bölünmesinin bozulmasını yansıtabilir, çünkü malign hücreler normalde DNA hasarından sonra indüklenen apoptotik sinyalleri baypas etme veya anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerinden birini eksprese etme eğilimindedir. Alternatif olarak, yüksek Rad51 seviyeleri, malign hücrelerin S fazı sırasında Rad51'in yüksek proliferatif kapasitesini ve normal aktivitesini basitçe yansıtabilir (319).

Bizim çalışmamızda *Rad51* ekspresyonunun grup1'de (TiO₂) (IC₅₀=5,27±0,61 µg/ml) anlamlı bir şekilde arttığı (p<0.0001) ve diğer gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. *RAD51* geninin en fazla ekspresyon düzeyinde azalması ise grup4'de (PTX) (IC₅₀=4.78±0.95 µg/ml) olduğu belirlenmiştir.

6.4.BRCA2

BRCA2, HR yoluyla transkripsiyon ve DSB'lerin onarımında önemli roller oynamaktadır (320). *BRCA2*, tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır. *BRCA2* geni sadece tümör oluşumunda değil, aynı zamanda kanser ilerlemesinde de önemli roller oynar. *BRCA2* genindeki mutasyonlar, etkilenen hücrelerin, hasar görmüş DNA ile başa çıkmak için NHEJ gibi alternatif hataya eğilimli DNA onarım yollarını takip etmesine izin verir. *BRCA2* geni, diğer anahtar kanser genleri *TP53*, *PTEN*, *BRIP1*, *PALB1* vb. ve kansere neden olabilecek diğer çeşitli çevresel faktörlerle etkileşime girer (321). Genin işlevi, DNA rekombinasyonu ve onarım işlemleri ile sınırlıdır. *BRCA2*, DSB'lerin onarımı ve tutuklanan replikasyon çatallarının *RAD51*'in aktivitesini düzenler. DNA hasarı bölgesinde, katalitik *RAD51* *BRCA2* tarafından toplanır. Birkaç hücresel rol arasında *BRCA2*, hücre döngüsü düzenlemesinde G2 / M kontrol noktasını aktive eder ve ayrıca kromatin yeniden şekillenmesinde rol oynar (322).

Bizim çalışmamızda, TiO_2 , TiO_2 -PEG-PTX ve PTX gruplarda *BRCA2* geninin ekspresyonunun arttığı ve TiO_2 -PEG grupta *BRCA2* geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 4'te (PTX) ($IC_{50}=4.78\pm 0.95$ $\mu g/ml$) anlamlı derecede artılmıştır ($p<0.0001$).

6.5.ERCC1

ERCC1, moleküler klonlama ile tanımlanan ilk insan DNA onarım genidir. *ERCC1*, 19q13.32'de insan kromozomu üzerinde bulunur ve yaklaşık 15 kilobazlık 10 ekzon içerir. *ERCC1*, DNA değişikliklerinin onarımında rol oynayan önemli bir proteindir. Alternatif birleştirme işleminden kaynaklanan dört *ERCC1* transkript izoformu açıklanmıştır. Nükleotid eksizyon onarımı (NER), sarmal bozucu kovalent

eklentilere neden olan kimyasallardan zarar gören DNA'nın onarımı için önemli bir mekanizmadır (229). ERCC1-kseroderma pigmentosum (XPF), hem çoğalan hem de çoğalmayan hücrelerde hasar görmüş DNA'nın onarımı için yapıya özgü bir endonükleazdır. İnsan ERCC1 proteini, 297 amino aside ve 32.500 Da'lık bir moleküler kütleyle sahipken, ERCC4 kodlu XPF proteini, 104.000 Da'lık bir moleküler kütleyle sahip 916 amino asit içerir. ERCC1 – XPF, DNA hasar onarımında aktif bir endonükleaz oluşturmak için bir kompleks olarak işlev görür. Aktif nükleaz alan kalıntıları XPF'de bulunur, ancak tek başına XPF bir nükleaz değildir. ERCC1, kritik bir DNA bağlama alt birimi olarak görev yapan bir ortak olarak gereklidir (229). ERCC1 – XPF, NER sırasında oluşan açık “kabarcık” ara maddesinin 5' ucunda hasarlı DNA zincirinde kesiler yapar (226). Bu süreçte ERCC1 – XPF, NER'deki insizyon işlemi için gerekli diğer protein faktörleri ile işbirliği içinde hareket eder. ERCC1 – XPF eksikliği olan hücreler, x-ışınları ve γ -ışınları tarafından üretilen iyonizasyon radyasyonu da dahil olmak üzere normalden DSB neden olan ajanlardan daha duyarlıdır (323). DNA interstrand çapraz bağları (ICL) onarılması zordur çünkü DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu engellerler. ERCC1 ve XPF-eksikliği hücreleri, cisplatin, psoralen ve mitomisin C gibi ICL'ler oluşturabilen ajanlara karşı son derece hassastır (324). ERCC1 – XPF proteininin shRNA aracılığıyla indirgenmesi baskılama, göğüs, prostat, yumurtalık ve diğer kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan cisplatin türevleri gibi DNA çapraz bağlama ajanları tarafından hücreleri öldürmeye karşı hassaslaştırır (325, 326). Bu nedenle, ERCC1-XPF inhibisyonunun kemoterapi ile birlikte bir kombinasyonu bazı kanserlerin tedavisinde etkili olabilir. Bu nedenle, ERCC1 ve XPF'nin immünohistokimyasal tanımlanmasında kullanılacak antikörlerin tanımlanması

önemlidir (326). ERCC1-XPF kompleksinin işlevini bozmak için çeşitli yaklaşımlar önerilmiştir. Bunlar, ERCC1 ve XPF'nin XPF nükleaz aktivitesinin inhibisyonunun ve ERCC1-XPF'nin DNA'ya bağlanmasının inhibisyonunun bozulmasını içerir (327).

Bizim çalışmamızda *ERCCI* ekspresyonunun grup1'de (TiO_2) ($\text{IC}_{50}=5,27\pm 0,61$ $\mu\text{g/ml}$) anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0.0001$) ve diğer gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. *ERCCI* geninin en fazla ekspresyon düzeyinde azalması ise grup2'de ($\text{TiO}_2\text{-PEG}$) ($\text{IC}_{50}=71.42\pm 3.24$ $\mu\text{g/ml}$) olduğu belirlenmiştir.

6.6.ATR

ATR, DNA hasar yanıt sistemi içinde önemli bir proteindir, ana rolü, onkogenlerin aktivasyonu ve G1 kontrol noktası kontrolünün bozulması nedeniyle kanserde yükselen bir replikasyon stres sensörü (SS) olarak ortaya çıkmaktadır. *ATR*, dsDNA içindeki ssDNA bölümlerini tanır. RS'in yanı sıra ssDNA, rezeke edilen DSB ve NER ara bileşiklerinden ortaya çıkabilir. *ATR*, DDR'ye dahil olan ATM ve DNA-PK / PRKDC ile birlikte fosfatidilinositol 3-kinaz benzeri kinaz (PIKK) ailesine ait bir proteindir. *ATR* ve ATM, DNA hasarına yanıt olarak DNA replikasyonu, rekombinasyon ve onarım; ve hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan proteinleri fosforile eder (328). *ATR*, replikasyon proteini A (RPA) kaplı ssDNA çatlakları tarafından aktive edilir (329). *ATR*, kontrol noktası sinyallemede önemli bir rol oynar. Aktif *ATR*, CHK1'in hem Ser317 hem de Ser345'te CHK1'in hasar yerine lokalizasyonu için gerekli olan başka bir protein, claspin tarafından kolaylaştırılan bir aşamada fosforile olmasını sağlar. Sonunda S-faz ilerlemesinin durdurulmasına ve hücre döngüsü tutuklanması yol açar (330). Hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonundaki ve DNA replikasyonunun düzenlenmesindeki rolüne ek olarak, *ATR*'nin DNA onarımında rolü vardır. *ATR*'nin

homolog rekombinasyon onarımı (HRR) sürecine dahil olduğu bulunmuştur. HRR, sadece S fazında meydana gelen yüksek kaliteli bir DSB onarım yoludur.

ATR'nin HRR'de yer alan çeşitli proteinlerle ilişkili veya fosforile olduğu bulunmuştur; BRCA1, PALB2, RAD51, H2AX ve RecQ sarmalları, BLM ve WRN (170, 331).

Bizim çalışmamızda ATR ekspresyonunun grup1 ve 3'te (TiO₂-PEG-PTX) (IC₅₀=14.90±2.73 µg/ml) anlamlı bir şekilde arttığı (p<0.0001) ve diğer gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. ATR geninin en fazla ekspresyon düzeyinde azalması ise grup4'te (PTX) (IC₅₀=4.78±0.95 µg/ml) olduğu belirlenmiştir.

6.7.CDKN1A

P21 kodlayan insan *CDKN1A* geni, 6p21.2 pozisyonunda kromozom 6 üzerinde bulunur. Hücrel strese yanıt olarak p53, memeli türleri arasında korunan yollarda p21 ve MDM2 gibi spesifik aşağı akım genlerini hedefler (332). P21'in aktivasyonu, hücre döngüsü ile ilgili genlerin aşağı regülasyonunun merkezi olan dimerizasyon partneri, RB benzeri, E2F ve multi-vulval sınıf B (DREAM) kompleksinin stabilizasyonuna yol açar. Genom geneli biyoinformatiğe dayanan çalışmalar, p53 tarafından tetiklenen G2 / M hücre döngüsü durdurması için birincil mekanizma gibi görünen 210 genin p53-p21-DREAM CDE / CHR yolağını aşağı regüle ettiğini tespit edilmiştir (333). P21, güçlü bir evrensel CDK inhibitörü (CKI) olarak kabul edilir (334). P21, siklin -CDK2, CDK1 ve -CDK4 / 6 komplekslerinin aktivitesi ile fiziksel olarak etkileşir ve bunu inhibe eder, böylece G1 ve S fazları sırasında hücre döngüsü ilerlemesinin bir regülatörü olarak işlev görür. Büyümenin durdurulmasına ek olarak, p21, çeşitli memeli hücreleri ve dokuları için gösterildiği gibi p53'e bağlı ve bağımsız yollar yoluyla hücrel yaşlanmaya aracılık

edebilir (334). Aslında, p21 ilk olarak normal insan diploid yaşlanan fibroblastlarında aşırı ifade edilen bir gen olarak tanımlanmıştır. Erken bulgular da p21'in yaşlanmaya ROS tabanlı bir mekanizma ile aracılık ettiğini ileri sürdü. p21, hem normal fibroblastlarda hem de p53-negatif kanser hücrelerinde hücre içi ROS seviyelerini artırır. p21 ayrıca Cdk4 ve Cdk6 kompleksleri için bir birleştirme faktörü olarak işlev görür. İnsan diploid fibroblastları hakkında, p21'in Cdk'ın zayıf bir inhibitörü olduğunu gösteren bir in vitro rapor da vardır (335). p21, patoloji ve kanser hücresi biyolojisi dahil olmak üzere çoklu biyolojik disiplinlerle ilgili en önemli proteinlerden biri haline gelmiştir. P21'in anahtar olumlu etkileri ve fonksiyonlarının hücre döngüsü regülasyonu, DNA onarımı, apoptozun modülasyonu, yaşlanmanın uyarılması ve kodlama geni CDKN1A transkripsiyonunun p53 bağımsız regülasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (336).

Bizim çalışmamızda, tüm gruplarda CDKN1A geninin ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 4 (PTX) ($IC_{50}=4.78\pm 0.95$ µg/ml) en az ise grup 1 (TiO₂)'de ($IC_{50}=5.27\pm 0.612$ µg/ml) anlamlı derecede artılmıştır ($p<0.0001$).

6.8.PRKDC

DNA-PK, fosfatidilinositol 3-kinazlarla ilişkili kinazlar (PIKK) ailesinin bir üyesidir. ATM ve ATR ile birlikte DNA-PK'nin DDR üzerinde ana rolü vardır. DNA-PK, bir katalitik alt birimden (DNA / PKcs) ve düzenleyici bir heterodimer Ku'dan (Ku70 / Ku80) oluşur. DNA / PKcs hemen hemen tüm memeli hücrelerinde eksprese edilir ve farklı fonksiyonel alanlara sahip 469-kDa proteindir (337). DNA-PK'nın en çok tanınan rolü DSB'lerin onarımındadır. DNA-PK kinaz NEHJ onarımında anahtar bir role sahiptir. Kısaca, Ku70 ve Ku80 alt birimleri, monomerik DNA-PKc'lerin

toplanmasıyla kırılmış DNA uçlarını tanır ve bağlanır, bu da aktif heterodimer DNA-PK'nın oluşumuna yol açar. DNA-PKcs, sinaptik bir kompleks oluşturarak DNA terminleri boyunca dimerleşir. Bu, Ku heterodimerlerinin kırık DNA uçlarının bağlandığı DNA dupleksine translokasyonuna yol açar. DNA-PKcs, onarım proteininin hasar yerine yüklenmesini kolaylaştıran bir iskele proteini gibi davranır ve katalitik aktivitesi sayesinde, onarımın yürütülmesini destekleyen bir dizi substratı fosforile eder (338). NHEJ, hücre döngüsünün G1 fazındaki yaygın onarım yoludur, daha hızlıdır ve birkaç saat gerektiren HR'ye kıyasla 30 dakika içinde tamamlanabilir (339). Hücre döngüsü boyunca RAD51'den daha yüksek DNA-PKcs / Ku içeriği NHEJ'i destekleyebilir. Aynı zamanda BRCA1, S / G2 fazlarındaki NHEJ'nin DNA-PKcs oto fosforilasyonuna müdahale etmesini önler (340). NHEJ'deki rolüne ek olarak DNA-PK, ikinci büyük DNA çift zincirli kırık onarım yolunda, HR'da da rol oynar (337).

Bizim çalışmamızda, TiO₂ ve TiO₂-PEG-PTX gruplarda CDKN1A geninin ekspresyonunun arttığı ve TiO₂-PEG ve PTX gruplarda CDKN1A geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 3 (TiO₂-PEG-PTX) (IC₅₀=4.78±0.95 µg/ml) anlamlı derecede artmıştır (p<0.0001).

6.9. VEGFB

VEGFB geni 11q13.1 kromozomu üzerinde bulunur. VEGFB, VEGFB₁₆₇ (transkriptlerin% 80'inden fazlası) ve VEGFB₁₈₆'nın iki izoformu vardır (341). VEGFB'nin doku ekspresyon analizi, bu büyüme faktörünün kalp ve iskelet kasında yüksek oranda eksprese edildiğini ve diğer dokuların çoğunda sınırlı ekspresyonu gözlemlemiştir. VEGFB'nin genetik ekspresyonu oldukça stabildir ve büyüme faktörleri,

hipoksi veya hormonlar tarafından düzenlenmez (342). VEGF ailesinin diğer üyelerinin aksine, VEGFB karakteristik olmayan bir şekilde anjiyogenezi teşvik etmez. VEGFB'nin önemi, özellikle patolojik koşullar altında ilgili bir fonksiyon olan hücre hayatta kalmasında tanımlanmıştır (343). Son çalışmalar, anjiyogenezi indüklemek için VEGFB'nin VEGFA'ya duyarlı hücrelerde belirgin bir rol oynadığını göstermiştir (344). VEGFB ekspresyonu birçok farklı tümör tipinde bulunabilir ve ekspresyonunun çoklu kanserlerde arttığı bulunmuştur (237). İlginç bir şekilde, düşük VEGFB'li bir kanser hücre hattında VEGFB fonksiyonunun kazanılmasının, dolaşımdaki tümör hücreleri ve metastazlarında bir artışla sonuçlandığını bulmuştur. Artmış VEGFB fonksiyonu, perivasküler hücrelerin azalmasına ve vasküler sızıntı, inflamasyon, hipoksi ve M2 benzeri makrofajların artmasına neden olmuştur (238).

Bizim çalışmamızda, TiO₂, TiO₂-PEG-PTX ve PTX gruplarda VEGFB geninin ekspresyonunun arttığı ve TiO₂-PEG grupta VEGFB geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 4 (PTX) (IC₅₀=4.78±0.95µg/ml) anlamlı derecede artılmıştır ve grup 2 (TiO₂-PEG) (IC₅₀=71.42±3.24µg/ml) anlamlı derecede azalmıştır (p<0.0001).

6.10.PDGF

PDGF, insan trombositlerinden izole edilen proanjiyojenik bir faktördür. *PDGF*'ler güçlü hücre mitojenik ajanlar ve büyüme kemokinleridir; aynı zamanda normal ve patolojik vasküler gelişim için önemli düzenleyicilerdir (345). Vasküler endotelial büyüme faktörü olarak işlev gören *PDGF*, insan malignitelerinin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Son bulgular *PDGF*'lerin malign hücreleri, vasküler

hücreleri ve stromal hücreleri hedefleyerek tümör büyümesini ve metastazını düzenlediğini göstermektedir (345). PDGF, otokrin ve parakrin davranışlarıyla kanser hücresi çoğalmasını uyarır. PDGF sinyal yolu, SRC tirozin kinaz alt familyası, fosfolipaz C ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-K) dahil olmak üzere çeşitli substrat protein sinyal molekülleri içerir. Bu sinyal molekülleri sitoplazmik kompleks sinyalleşme ağlarına aracılık eder ve hücre zarı serin treonin kalıntılarında rol oynar, bu da çeşitli gen regülasyonu ve protein fosforilasyonu ile sonuçlanır, böylece kanser hücresi büyümesini ve bölünmesini destekler (346). PDGF'nin, insan meningoimlarının ve mezotelyoma hücresinin PI3-K yoluyla çoğalmasını teşvik ettiği kanıtlanmıştır. PDGF reseptörü sinyali, tümör hücrelerinin büyümesinin otokrin uyarılması, tümör stroma fibroblastlarının toplanması ve tümör anjiyogenezinin uyarılması dahil olmak üzere katı tümörlerde farklı süreçlere katılır (347). PDGF, doğrudan veya dolaylı olarak tümör anjiyogenezini indükleyen ve tümör metastazını önemli ölçüde etkileyen hücre dışı matris proteinleri üretmek için bağ dokusunu teşvik edebilir. PDGF, tümör gelişimindeki tümör büyümesini düzenler ve PDGF'nin hücre ekspresyonunu indükleyebilen çevresel faktörler tümör büyümesini uyarır. Ayrıca PDGF aracılı tümör anjiyogenezini, tümör büyümesi için beslenme sağlar (348). Anjiyogenez, kanserin invazyonunu ve metastazını destekleyen ileri kanserin belirtilerinden biridir. HepG2 hücreleri üzerindeki PDGF-BB ekspresyonu hipoksi altında önemli ölçüde artmıştır. Hipoksinin neden olduğu karaciğer kanseri hücresi PDGF-BB, hematopoietik kök hücrelerde VEGF-A ekspresyonunu uyarır ve anjiyogenezini teşvik eder (349).

Bizim çalışmamızda, TiO₂, TiO₂-PEG-PTX ve PTX gruplarda PDGFB geninin ekspresyonunun arttığı ve TiO₂-PEG grupta PDGFB geninin ekspresyonunun azaldığı tespit

edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 3 (TiO₂-PEG-PTX) (IC₅₀=14.90±2.73µg/ml) anlamlı derecede artılmıştır ve grup 2 (TiO₂-PEG) (IC₅₀=71.42±3.24µg/ml) anlamlı derecede azalmıştır (p<0.0001).

6.11.CASP-2

Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılması ve uygulanmasında önemli roller oynamaktadır. Bu kaspazlar iki gruba ayrılır: başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7). Fonksiyonel olarak, kaspaz-2, metabolik dengesizlik, DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi, mitotik afet ve diğerleri tarafından indüklenen hücre ölümünün düzenlenmesinde rol oynamıştır. Kaspaz-2 hem başlatıcı hem de uygulayıcı kaspazların özelliklerini sergilemede benzersizdir. Prokaspaz-2'nin çeşitli proteinlerle etkileşime girdiği ve 'PIDDozom' adı verilen bir kompleksin bir parçasını oluşturduğu gösterilmiştir. Bu kompleks PIDDozom, RAIDD ve prokaspaz-2'den oluşur ve fizyolojik koşullar altında bulunur. Artan PIDDozom ekspresyonu p53 aracılı apoptozu teşvik eder. PIDDozom içinde PIDDozom varlığı, p53 ve / veya p53 ile ilişkili proteinlerin kaspaz-2 aktivasyonunda bir rolünü gösterir, bu da PIDDozom ve kaspaz-2 montajının DNA hasarına yanıt olarak ortaya çıkmasının muhtemel olduğunu gösterir (350). Kaspaz-2 ayrıca hücre döngüsü düzenleyicisi olarak kabul edilir. DNA-PKcs-PIDDozom kompleksi içindeki artmış kaspaz-2 aktivitesi, G2 hücrelerinin M fazına ilerlemesini geciktirdiği görülmektedir. Kaspaz-2 eksik hücrelerde ve düşük regüle DNA-PK içeren hücrelerde G2 / M kontrol noktasının kısmi kaybı da gözlenmiştir. Kaspaz-2'nin tümör baskılayıcı fonksiyonuna benzer şekilde, hücre döngüsünde düzenleyici rolü p53 üzerindeki etkisine bağlı olabilir, çünkü kaspaz-2-null fareler p53 kaybından dolayı p21 ekspresyonunu azaltır (351). DNA-PK-PIDDozom

kompleksindeki varlığı nedeniyle NHEJ'de kaspaz-2'nin bir fonksiyonu önerilmiştir. HR onarımı hücre döngüsünün geç S ve G2 fazlarında çalıştığından, kaspaz-2'nin G2 kontrol noktasının düzenlenmesindeki rolü muhtemelen NHEJ'ye dahil edilmesinden ayrılır (352).

Bizim çalışmamızda, TiO₂ ve TiO₂-PEG-PTX gruplarda *CASP2* geninin ekspresyonunun arttığı ve TiO₂-PEG ve PTX gruplarda *CASP2* geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 3 (TiO₂-PEG-PTX) (IC₅₀=14.90±2.73µg/ml) anlamlı derecede artmıştır ve grup 2 (TiO₂-PEG) (IC₅₀=71.42±3.24µg/ml) anlamlı derecede azalmıştır (p<0.0001).

6.12.MYC

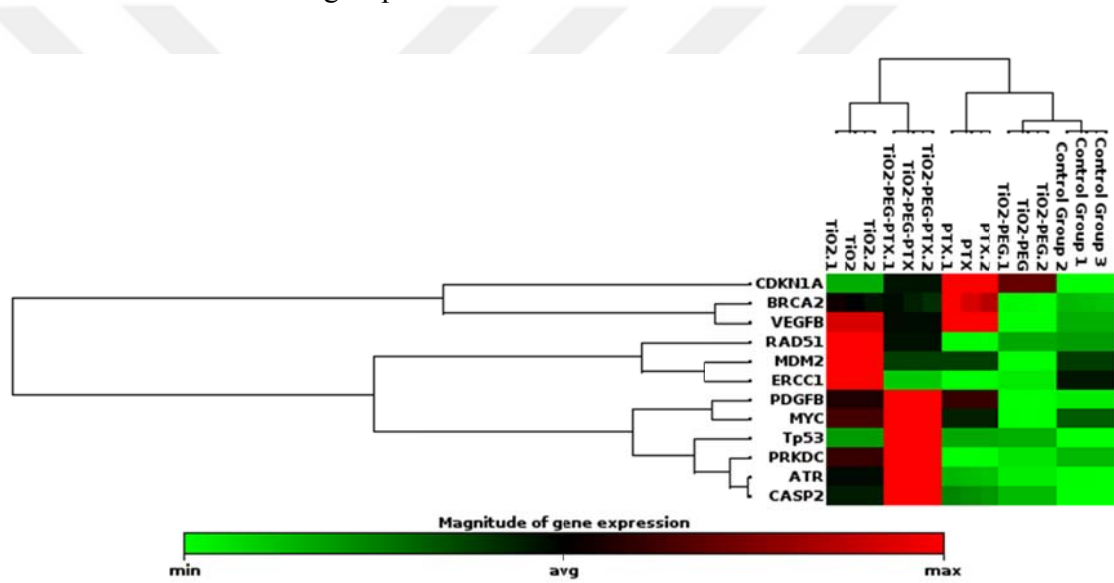
MYC, hedef DNA sekanslarına bağlanabilen bir transkripsiyon faktörüdür. Kromatine bağlandıktan sonra, MYC protein kodlamasını transkripsiyonel olarak düzenleyebilir, ayrıca RNA Pol I, RNA Pol II ve RNA Pol III tarafından üretilen kodlamayan RNA'ları kontrol eder. MYC, çoğunlukla proliferasyon, hücre büyümesi, metabolik yeniden programlama ve RNA biyogenezinde rol oynayan ayrı gen gruplarını düzenler (353). Kanserli olmayan hücrelerde sıkı bir şekilde düzenlenen, MYC'nin artık en sık deregülasyona uğramış onkogenlerden biri olduğu bilinmektedir. Sıklıkla hematopoietik kanserlerde yer değiştirir ve bir pan-kanser kopya-sayısı analizinde insan kanserlerinde en fazla çoğalan üçüncü gen olarak bulunmuştur. Birçok çeşidin transgenik murin dokularında düzensiz MYC ekspresyonu, bu dokulardaki tümör oluşumunu tetikleyebilir, bu da MYC'nin in vivo dönüşüm aktivitesini gösterir ve bunun bir insan onkojeni olduğu fikrini destekler (354). Onkojenik potansiyeli nedeniyle, MYC

proto-onkogen normal hücrelerde transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel seviyelerde sıkı bir şekilde düzenlenir. Transkripsiyonel olarak, miRNA'lar tarafından düzenlenir. Translasyondan sonra, MYC protein yarılanma ömrü ve transkripsiyonel aktivite kinazlar, ubikitin ligazları ve asetiltransferazlar tarafından kontrol edilir. Proto-onkojenin aktivasyonu her zaman büyüme faktörleri tarafından stimülasyona bağlıdır (355). Aksine, kanserde MYC kopya sayısını arttıran MYC amplifikasyonları, MYC'yi oldukça aktif arttırıcılar ile eşleştiren translokasyonlar veya MYC lokusundaki viral insersiyon olayları MYC'yi büyüme faktörü sinyaline bağımlılığından koparır. MYC'nin arttırıcılarının aktivitesindeki değişiklikler de MYC ekspresyonunu normalde gerekli uyaranlardan ayırabilir, bu da kanser riskini ve ilerlemesini etkiler (356). Kanserli olmayan hücrelerde, kontrol noktaları düzensiz MYC ekspresyonuna karşı daha fazla koruma sağlar. Bu nedenle, deneysel transgenik modellerde, akut düzensiz MYC ekspresyonu hücre proliferasyonunu indüklemeyi; daha ziyade p53, ARF, BIM ve PTEN aracılığıyla hücre büyümesinin durmasına veya ölmesine neden olabilecek kontrol noktalarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Örneğin, MYC güdümlü bir lenfoma modelinde, transkripsiyon faktörü FOXO3A'nın artan nükleer lokalizasyonu büyüme baskılamak için ARF'yi aktive edebilir. Ayrıca, ARF MYC'yi bağlayabilir ve doğrudan transkripsiyonel aktivitesini inhibe edebilir. Bu kontrol noktalarının kaybı, transformasyonu desteklemek için MYC ile sinerjikleşir. Bu nedenle, FOXO3A'yı fosforile edebilen ve inhibe edebilen AKT, neoplastik transformasyonda MYC ile işbirliği yapar (357).

Bizim çalışmamızda, TiO₂, TiO₂-PEG-PTX ve PTX gruplarda MYC geninin ekspresyonunun arttığı ve TiO₂-PEG grupta MYC geninin ekspresyonunun azaldığı tespit

edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 3 (TiO₂-PEG-PTX) (IC₅₀=14.90±2.73µg/ml) anlamlı derecede artılmıştır (p<0.0001).

Sonuç olarak TiO₂ nanopartikülünün tüm genlerin ekspresyonunu artırdığı tespit edildi. TiO₂-PEG-PTX'in *MDM2* ve *ERCC1* genlerinin ekspresyonunu azaltırken diğer tüm genlerin ekspresyonunu artırdığı belirlendi. PTX ise *Tp53*, *BRCA2*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2* ve *MYC* genlerinin ekspresyonunu artırırken *MDM2*, *RAD51* ve *ERCC1* azalttığı saptandı.



Şekil 39. *Tp53*, *MDM2*, *RAD51*, *BRCA2*, *ERCC1*, *ATR*, *CDKN1A*, *PRKDC*, *VEGFB*, *PDGFB*, *CASP2*, *MYC* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.

Sonuç olarak TiO₂-PEG-PTX nanopartikül temelli ilacın kanser tedavisinde farklı mekanizmalar üzerine olan etkileri hem in vitro hem de in vivo daha geniş araştırılmalıdır. Ayrıca sağlıklı dokular üzerine olan toksiteyi azaltmak ve kanser dokusu üzerine olan sitotoksiteyi artırmak amaçlı, ekspresyonu artan bir protein ile TiO₂-PEG-PTX işaretlenerek hedefli hale getirilebilir ve bu şekilde tedavi etkinliği daha fazla artırılabilir.

7.KAYNAKLAR

1. Thakkar, S., et al., *Tumor Microenvironment Targeted Nanotherapeutics for Cancer Therapy and Diagnosis: A review*. Acta biomaterialia, 2019.
2. Dillner, J., et al., *Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study*. Bmj, 2008. **337**: p. a1754.
3. Šarenac, T. and M. Mikov, *Cervical Cancer, Different Treatments and Importance of Bile Acids as Therapeutic Agents in This Disease*. Frontiers in Pharmacology, 2019. **10**.
4. Chelimo, C., et al., *Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer*. Journal of Infection, 2013. **66**(3): p. 207-217.
5. Cohen, P.A., et al., *Cervical cancer*. The Lancet, 2019. **393**(10167): p. 169-182.
6. Rupar, M.J., et al., *Human Papillomavirus and the use of nanoparticles for immunotherapy in HPV-related cancer: A review*. Reports of Practical Oncology & Radiotherapy, 2019. **24**(6): p. 544-550.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
8. Gu, F.X., et al., *Targeted nanoparticles for cancer therapy*. Nano today, 2007. **2**(3): p. 14-21.
9. Sonali, M.K.V., et al., *Nanotheranostics: emerging strategies for early diagnosis and therapy of brain cancer*. Nanotheranostics, 2018. **2**(1): p. 70.
10. Xu, F., *Review of analytical studies on TiO₂ nanoparticles and particle aggregation, coagulation, flocculation, sedimentation, stabilization*. Chemosphere, 2018. **212**: p. 662-677.
11. Xie, J., et al., *The role of surface modification for TiO₂ nanoparticles in cancer cells*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **143**: p. 148-155.
12. Penna, L.S., J.A.P. Henriques, and D. Bonatto, *Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment?* Pharmacology & therapeutics, 2017. **173**: p. 67-82.

13. Mano, S.S., et al., *Effect of polyethylene glycol modification of TiO₂ nanoparticles on cytotoxicity and gene expressions in human cell lines*. International journal of molecular sciences, 2012. **13**(3): p. 3703-3717.
14. Du, X., et al., *Current development in the formulations of non-injection administration of paclitaxel*. International journal of pharmaceutics, 2018. **542**(1-2): p. 242-252.
15. Bernabeu, E., et al., *Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead*. International journal of pharmaceutics, 2017. **526**(1-2): p. 474-495.
16. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA: a cancer journal for clinicians, 2013. **63**(1): p. 11-30.
17. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020. **70**(1): p. 7-30.
18. Kukreti, S., et al., *Characterization of metabolic differences between benign and malignant tumors: high-spectral-resolution diffuse optical spectroscopy*. Radiology, 2009. **254**(1): p. 277-284.
19. Koten, J., et al., *The difference between benign and malignant tumours explained with the 4-mutation paradigm for carcinogenesis*. Anticancer research, 1993. **13**(4): p. 1179-1182.
20. Nakashima, J., et al., *Differential diagnosis of primary benign and malignant retroperitoneal tumors*. International journal of urology, 1997. **4**(5): p. 441-446.
21. Bajdik, C.D., et al., *Identifying related cancer types based on their incidence among people with multiple cancers*. Emerging themes in epidemiology, 2006. **3**(1): p. 17.
22. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: a cancer journal for clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
23. Meacham, C.E. and S.J. Morrison, *Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 328.
24. Fisher, R., L. Pusztai, and C. Swanton, *Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics*. British journal of cancer, 2013. **108**(3): p. 479.

25. Huang, W.-J., et al., *RETRACTED: Silencing circular RNA hsa_circ_0000977 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma progression by stimulating miR-874-3p and inhibiting PLK1 expression*. 2018, Elsevier.
26. Blackadar, C.B., *Historical review of the causes of cancer*. World journal of clinical oncology, 2016. **7**(1): p. 54.
27. Ames, B.N., L.S. Gold, and W.C. Willett, *The causes and prevention of cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(12): p. 5258-5265.
28. Aizawa, K., et al., *Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation*. International journal of cancer, 2016. **139**(5): p. 1171-1181.
29. Poon, S.L., et al., *Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention*. Genome medicine, 2014. **6**(3): p. 24.
30. Antwi, S.O., et al., *Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer*. Cancer Causes & Control, 2015. **26**(11): p. 1583-1591.
31. Parkin, D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. International journal of cancer, 2006. **118**(12): p. 3030-3044.
32. Seto, M., K. Honma, and M. Nakagawa, *Diversity of genome profiles in malignant lymphoma*. Cancer science, 2010. **101**(3): p. 573-578.
33. Cigudosa, J.C., et al., *Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas*. Genes, Chromosomes and Cancer, 1999. **25**(2): p. 123-133.
34. Shtivelman, E., et al., *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia*. Nature, 1985. **315**(6020): p. 550.
35. Matlashewski, G., et al., *Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene*. The EMBO journal, 1984. **3**(13): p. 3257-3262.
36. Wood, R.D., et al., *Human DNA repair genes*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1284-1289.

37. King, C.R., M.H. Kraus, and S.A. Aaronson, *Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma*. Science, 1985. **229**(4717): p. 974-976.
38. Heinrich, M.C., et al., *Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies*. Journal of clinical oncology, 2002. **20**(6): p. 1692-1703.
39. Thomas, R.K., et al., *High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer*. Nature genetics, 2007. **39**(3): p. 347.
40. Chae, S.W., et al., *Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications*. Yonsei medical journal, 2011. **52**(3): p. 445-453.
41. Taylor, W.R. and G.R. Stark, *Regulation of the G2/M transition by p53*. Oncogene, 2001. **20**(15): p. 1803.
42. Wright, T.C. and A. Ferenczy, *Anatomy and histology of the cervix*. Blaustein's pathology of the female genital tract. Springer, New York, 2002: p. 207-224.
43. Fadare, O. and A.A. Roma, *Normal Anatomy of the Uterine Cervix*, in *Atlas of Uterine Pathology*. 2019, Springer. p. 193-196.
44. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. The Journal of pathology, 1999. **189**(1): p. 12-19.
45. Johnson, C.A., et al. *Cervical cancer: an overview of pathophysiology and management*. in *Seminars in oncology nursing*. 2019. Elsevier.
46. Party, C.C.A.C.C.S.G.W., *National Cervical Screening Program: Guidelines for the management of screen-detected abnormalities, screening in specific populations and investigation of abnormal vaginal bleeding*. 2016, Cancer Council Australia Sydney, Australia.
47. de Martel, C., et al., *Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type*. International journal of cancer, 2017. **141**(4): p. 664-670.
48. DiSaia, P.J., et al., *Clinical gynecologic oncology e-book*. 2017: Elsevier Health Sciences.

49. Basu, P., et al., *Efficacy and safety of human papillomavirus vaccine for primary prevention of cervical cancer: A review of evidence from phase III trials and national programs*. South Asian journal of cancer, 2013. **2**(4): p. 187.
50. Chesson, H.W., et al., *The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States*. Sexually transmitted diseases, 2014. **41**(11): p. 660-664.
51. Lopez, M.S., et al., *Cervical cancer prevention and treatment in Latin America*. Journal of surgical oncology, 2017. **115**(5): p. 615-618.
52. Ribeiro, A.A., et al., *HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors*. Infectious agents and cancer, 2015. **10**(1): p. 16.
53. Ruiz, Á.M., et al., *Proximity of first sexual intercourse to menarche and risk of high-grade cervical disease*. The Journal of infectious diseases, 2012. **206**(12): p. 1887-1896.
54. Frumovitz, M., et al., *Quality of life and sexual functioning in cervical cancer survivors*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(30): p. 7428-7436.
55. Collins, S., et al., *Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: a longitudinal study*. European Journal of Cancer, 2010. **46**(2): p. 405-411.
56. Plummer, M., et al., *Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study*. Cancer Causes & Control, 2003. **14**(9): p. 805-814.
57. Vesco, K.K., et al., *Risk factors and other epidemiologic considerations for cervical cancer screening: a narrative review for the US Preventive Services Task Force*. Annals of internal medicine, 2011. **155**(10): p. 698-705.
58. McGraw, S.L. and J.M. Ferrante, *Update on prevention and screening of cervical cancer*. World journal of clinical oncology, 2014. **5**(4): p. 744.
59. Abbas, T. and A. Dutta, *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(6): p. 400.
60. Peters III, W.A., et al., *Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical*

- surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix*. Obstetrical & Gynecological Survey, 2000. **55**(8): p. 491-492.
61. Cancer, I.A.f.R.o., *Planning and implementing cervical cancer prevention and control programs: a manual for managers*. 2004.
 62. Lucey, B.P., W.A. Nelson-Rees, and G.M. Hutchins, *Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination*. Archives of pathology & laboratory medicine, 2009. **133**(9): p. 1463-1467.
 63. Jones Jr, H.W., *Record of the first physician to see Henrietta Lacks at the Johns Hopkins Hospital: history of the beginning of the HeLa cell line*. American journal of obstetrics and gynecology, 1997. **176**(6): p. s227-s228.
 64. JONES, H.W., et al., *George Otto Gey (1899–1970): the HeLa cell and a reappraisal of its origin*. Obstetrics & Gynecology, 1971. **38**(6): p. 945-949.
 65. Schwartz, P.E., et al., *Rapidly progressive cervical cancer: the Connecticut experience*. American journal of obstetrics and gynecology, 1996. **175**(4): p. 1105-1109.
 66. Meissner, J.D., *Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines*. Journal of General Virology, 1999. **80**(7): p. 1725-1733.
 67. Martinez, I., et al., *Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(18): p. 2575.
 68. Gey, G., *Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium*. Cancer Res., 1952. **12**: p. 264-265.
 69. Blackburn, E.H., C.W. Greider, and J.W. Szostak, *Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging*. Nature medicine, 2006. **12**(10): p. 1133.
 70. Hnilicová, J., et al., *Histone deacetylase activity modulates alternative splicing*. PloS one, 2011. **6**(2): p. e16727.
 71. Whitfield, M.L., et al., *Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors*. Molecular biology of the cell, 2002. **13**(6): p. 1977-2000.

72. Chaudhry, M.A., et al., *Gene expression profiling of HeLa cells in G1 or G2 phases*. *Oncogene*, 2002. **21**(12): p. 1934.
73. Ludwig, H., et al., *Role of viral factor E3L in modified vaccinia virus ankara infection of human HeLa Cells: regulation of the virus life cycle and identification of differentially expressed host genes*. *Journal of virology*, 2005. **79**(4): p. 2584-2596.
74. Jaluria, P., et al., *Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog*. *BMC biotechnology*, 2007. **7**(1): p. 71.
75. Neumann, B., et al., *Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes*. *Nature*, 2010. **464**(7289): p. 721.
76. Kittler, R., et al., *An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division*. *Nature*, 2004. **432**(7020): p. 1036.
77. Pelkmans, L., et al., *Genome-wide analysis of human kinases in clathrin-and caveolae/raft-mediated endocytosis*. *Nature*, 2005. **436**(7047): p. 78.
78. Ambros, P. and H. Karlic, *Chromosomal insertion of human papillomavirus 18 sequences in HeLa cells detected by nonisotopic in situ hybridization and reflection contrast microscopy*. *Human genetics*, 1987. **77**(3): p. 251-254.
79. Bidon, B., et al., *XPC is an RNA polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1*. *Nature communications*, 2018. **9**(1): p. 2610.
80. Schirrmacher, V., *From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment*. *International journal of oncology*, 2019. **54**(2): p. 407-419.
81. Fisher, B., N. Wolmark, and w.t.c.o.N. Investigators, *The current status of systemic adjuvant therapy in the management of primary breast cancer*. *Surgical Clinics of North America*, 1981. **61**(6): p. 1347-1360.
82. Connors, T., *Anticancer drug development: the way forward*. *The Oncologist*, 1996. **1**(3): p. 180-181.
83. Mukherjee, S., *The emperor of all maladies: a biography of cancer*. 2010: Simon and Schuster.

84. Khazir, J., et al., *Anticancer agents from diverse natural sources*. Natural product communications, 2014. **9**(11): p. 1934578X1400901130.
85. Singh, H., et al., *Triazole tethered isatin-coumarin based molecular hybrids as novel antitubulin agents: Design, synthesis, biological investigation and docking studies*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2017. **27**(17): p. 3974-3979.
86. Silvis, N.G., *Antimetabolites and cytotoxic drugs*. Dermatologic clinics, 2001. **19**(1): p. 105-118.
87. Urushizaki, I., *Palliative therapy in cancer. 5. Side effects by anticancer drugs and their treatments*. Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy, 1990. **17**(9): p. 1959-1969.
88. Chakraborty, S. and T. Rahman, *The difficulties in cancer treatment*. ecancermedicalsience, 2012. **6**.
89. Adam, R., et al., *Tumor progression while on chemotherapy: a contraindication to liver resection for multiple colorectal metastases?* Annals of surgery, 2004. **240**(6): p. 1052.
90. Alam, A., et al., *Chemotherapy treatment and strategy schemes: a Review*. Journal of Toxicology, 2018. **2**(7).
91. Riga, M., et al., *Hyposmia: an underestimated and frequent adverse effect of chemotherapy*. Supportive Care in Cancer, 2015. **23**(10): p. 3053-3058.
92. Steinbach, S., et al., *Effect of platinum-containing chemotherapy on olfactory, gustatory, and hearing function in ovarian cancer patients*. Archives of gynecology and obstetrics, 2012. **286**(2): p. 473-480.
93. Sharma, S., et al., *Chalcone based azacarboline analogues as novel antitubulin agents: Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling studies*. European journal of medicinal chemistry, 2014. **85**: p. 648-660.
94. Nogales, E., *A structural view of microtubule dynamics*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 1999. **56**(1-2): p. 133-142.
95. Dumontet, C. and M.A. Jordan, *Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics*. Nature reviews Drug discovery, 2010. **9**(10): p. 790.

96. Liu, Z., et al., *Microtubule-targeting anticancer agents from marine natural substance*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2014. **14**(3): p. 409-417.
97. Kaur, R., et al., *Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: an overview*. *European journal of medicinal chemistry*, 2014. **87**: p. 89-124.
98. Fletcher, D.A. and R.D. Mullins, *Cell mechanics and the cytoskeleton*. *Nature*, 2010. **463**(7280): p. 485.
99. Mohri, H., et al., *Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2012. **88**(8): p. 397-415.
100. English, A.R. and G.K. Voeltz, *Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013. **5**(4): p. a013227.
101. Sharma, S., et al., *Thiazolidinone constraint combretastatin analogs as novel antitubulin agents: design, synthesis, biological evaluation and docking studies*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2017. **17**(2): p. 230-240.
102. Mahindroo, N., et al., *Antitubulin agents for the treatment of cancer—a medicinal chemistry update*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2006. **16**(5): p. 647-691.
103. Singh, H., et al., *Triazole tethered C5-curcuminoid-coumarin based molecular hybrids as novel antitubulin agents: Design, synthesis, biological investigation and docking studies*. *European journal of medicinal chemistry*, 2016. **116**: p. 102-115.
104. Nepali, K., et al., *Tubulin inhibitors: a patent survey*. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 2014. **9**(2): p. 176-220.
105. Sharma, S., et al., *Triazole linked mono carbonyl curcumin-isatin bifunctional hybrids as novel anti tubulin agents: design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2015. **23**(22): p. 7165-7180.

106. Mishra, R.C., *Microtubule binding natural substances in cancer chemotherapy. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 2011: p. 269-282.
107. Bocci, G., A. Di Paolo, and R. Danesi, *The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel*. *Angiogenesis*, 2013. **16**(3): p. 481-492.
108. Yvon, A.-M.C., P. Wadsworth, and M.A. Jordan, *Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells*. *Molecular biology of the cell*, 1999. **10**(4): p. 947-959.
109. Wall, M.E., *Camptothecin and taxol: discovery to clinic*. *Medicinal research reviews*, 1998. **18**(5): p. 299-314.
110. Fu, Y., et al., *Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues*. *Current medicinal chemistry*, 2009. **16**(30): p. 3966-3985.
111. Snyder, J.P., et al., *The binding conformation of Taxol in β -tubulin: a model based on electron crystallographic density*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(9): p. 5312-5316.
112. Taghian, A.G., et al., *Paclitaxel decreases the interstitial fluid pressure and improves oxygenation in breast cancers in patients treated with neoadjuvant chemotherapy: clinical implications*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(9): p. 1951-1961.
113. Fauzee, N.J.S., Z. Dong, and Y.-l. Wang, *Taxanes: promising anti-cancer drugs*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011. **12**(4): p. 837-51.
114. Rowinsky, E.K. and R.C. Donehower, *Paclitaxel (taxol)*. *New England journal of medicine*, 1995. **332**(15): p. 1004-1014.
115. Ando, K., et al., *NPM1 directs PIDDosome-dependent caspase-2 activation in the nucleolus*. *J Cell Biol*, 2017. **216**(6): p. 1795-1810.
116. Drexler, K.E., *Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981. **78**(9): p. 5275-5278.
117. Bhattacharya, R. and P. Mukherjee, *Biological properties of "naked" metal nanoparticles*. *Advanced drug delivery reviews*, 2008. **60**(11): p. 1289-1306.

118. Dhapte, V. and V. Pokharkar, *Nanosystems for drug delivery: Design, engineering, and applications*, in *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. 2019, Elsevier. p. 321-345.
119. Arias, J.L., *Key aspects in nanotechnology and drug delivery*. Nanotechnology and Drug Delivery. Volume 1: Nanoplatfoms in Drug Delivery, 2014: p. 1-27.
120. Kumar, B., et al., *Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2017. **41**: p. 260-268.
121. Hoshyar, N., et al., *The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction*. Nanomedicine, 2016. **11**(6): p. 673-692.
122. Loomba, L. and T. Scarabelli, *Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: aluminosilicates, nanobiomagnets, quantum dots and cochleates*. Therapeutic delivery, 2013. **4**(9): p. 1179-1196.
123. Adimoolam, S. and J.M. Ford, *p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(20): p. 12985-12990.
124. Petersen, G.H., et al., *Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin*. Journal of Controlled Release, 2016. **232**: p. 255-264.
125. Pokharkar, V.B., V.V. Dhapte, and S.S. Kadam, *Metallic Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, in *Nanotechnology and Drug Delivery, Volume One*. 2014, CRC Press. p. 261-301.
126. Allen-Petersen, B.L. and R.C. Sears, *Mission Possible: Advances in MYC Therapeutic Targeting in Cancer*. BioDrugs, 2019: p. 1-15.
127. Kim, C.S., et al., *Inorganic nanosystems for therapeutic delivery: status and prospects*. Advanced drug delivery reviews, 2013. **65**(1): p. 93-99.
128. Bilecka, I., I. Djerdj, and M. Niederberger, *One-minute synthesis of crystalline binary and ternary metal oxide nanoparticles*. Chemical Communications, 2008(7): p. 886-888.
129. Amendola, V., et al., *Top-down synthesis of multifunctional iron oxide nanoparticles for macrophage labelling and manipulation*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(11): p. 3803-3813.

130. Lee, K., et al., *Organic sol-gel method in the synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles*. American Journal of Applied Sciences, 2014. **11**(6): p. 959-962.
131. Bayal, N. and P. Jeevanandam, *Synthesis of TiO₂- MgO mixed metal oxide nanoparticles via a sol- gel method and studies on their optical properties*. Ceramics International, 2014. **40**(10): p. 15463-15477.
132. Xu, R., *Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement*. Particuology, 2008. **6**(2): p. 112-115.
133. Mehta, P.P. and V.S. Pawar, *Electrospun nanofiber scaffolds: technology and applications*, in *Applications of nanocomposite materials in drug delivery*. 2018, Elsevier. p. 509-573.
134. Tobio, M., et al., *The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2000. **18**(3-4): p. 315-323.
135. Knop, K., et al., *Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angewandte chemie international edition, 2010. **49**(36): p. 6288-6308.
136. Roy, P., S. Berger, and P. Schmuki, *TiO₂ nanotubes: synthesis and applications*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(13): p. 2904-2939.
137. Warheit, D.B., et al., *Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties*. Toxicology, 2007. **230**(1): p. 90-104.
138. Szymańska, R., et al., *Titanium dioxide nanoparticles (100–1000 mg/l) can affect vitamin E response in Arabidopsis thaliana*. Environmental pollution, 2016. **213**: p. 957-965.
139. Tan, X., et al., *Effect of soil humic and fulvic acids, pH and ionic strength on Th (IV) sorption to TiO₂ nanoparticles*. Applied Radiation and Isotopes, 2007. **65**(4): p. 375-381.
140. Yuan, Y., et al., *TiO₂ nanoparticles co-doped with silver and nitrogen for antibacterial application*. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2010. **10**(8): p. 4868-4874.

141. Szaciłowski, K., et al., *Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms*. Chemical reviews, 2005. **105**(6): p. 2647-2694.
142. Raj, S., et al. *Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy*. in *Seminars in cancer biology*. 2019. Elsevier.
143. Shukla, R.K., et al., *ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells*. Toxicology in vitro, 2011. **25**(1): p. 231-241.
144. Schulz, J., et al., *Distribution of sunscreens on skin*. Advanced drug delivery reviews, 2002. **54**: p. S157-S163.
145. Shi, H., et al., *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data*. Particle and fibre toxicology, 2013. **10**(1): p. 15.
146. Hotze, E.M., T. Phenrat, and G.V. Lowry, *Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment*. Journal of environmental quality, 2010. **39**(6): p. 1909-1924.
147. Bansal, P., A.P. Deshpande, and M.G. Basavaraj, *Hetero-aggregation of oppositely charged nanoparticles*. Journal of colloid and interface science, 2017. **492**: p. 92-100.
148. Bennett, S.W., et al., *Photoinduced disaggregation of TiO₂ nanoparticles enables transdermal penetration*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48719.
149. Moore, T.L., et al., *Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions*. Chemical Society Reviews, 2015. **44**(17): p. 6287-6305.
150. Hamilton, R.F., et al., *Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity*. Particle and fibre toxicology, 2009. **6**(1): p. 35.
151. Jin, C.-Y., et al., *Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells*. Chemical research in toxicology, 2008. **21**(9): p. 1871-1877.
152. Shimizu, M., et al., *Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse*. Particle and fibre toxicology, 2009. **6**(1): p. 20.

153. Thangaraja, A., V. Savitha, and K. Jegatheesan, *Preparation and characterization of polyethylene glycol coated silica nanoparticles for drug delivery application*. *Comp. Gen. Pharmacol*, 2010. **4**: p. 31-38.
154. Kohen, R. and A. Nyska, *Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. *Toxicologic pathology*, 2002. **30**(6): p. 620-650.
155. Reeves, J.F., et al., *Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008. **640**(1-2): p. 113-122.
156. Rajapakse, K., et al., *Acclimation of Tetrahymena thermophila to bulk and nano-TiO₂ particles by changes in membrane fatty acids saturation*. *Journal of hazardous materials*, 2012. **221**: p. 199-205.
157. Wang, W., et al., *The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress*. *Nanotechnology*, 2009. **20**(10): p. 105103.
158. Matsumura, S., et al., *Prevention of carbon nanohorn agglomeration using a conjugate composed of comb-shaped polyethylene glycol and a peptide aptamer*. *Molecular pharmaceutics*, 2009. **6**(2): p. 441-447.
159. Prencipe, G., et al., *PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(13): p. 4783-4787.
160. Russo-Abrahao, T., et al., *Characterization of inorganic phosphate transport in the triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231*. *PloS one*, 2018. **13**(2): p. e0191270.
161. Elser, J.J., et al., *Biological stoichiometry in human cancer*. *PloS one*, 2007. **2**(10): p. e1028.
162. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. *Molecular aspects of medicine*, 2009. **30**(1-2): p. 1-12.

163. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.
164. Bansal, A. and M.C. Simon, *Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance*. The Journal of cell biology, 2018. **217**(7): p. 2291-2298.
165. Taft, R.J., et al., *Non-coding RNAs: regulators of disease*. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 2010. **220**(2): p. 126-139.
166. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method*. Nature protocols, 2008. **3**(6): p. 1101.
167. Yarden, R.I. and M.Z. Papa, *BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions*. Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(6): p. 1396-1404.
168. Bustin, S.A., et al., *MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments*. 2010, BioMed Central.
169. Johnson, G., et al., *Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments*, in *Quantitative Real-Time PCR*. 2014, Springer. p. 5-17.
170. Ahlskog, J.K., et al., *ATM/ATR-mediated phosphorylation of PALB2 promotes RAD51 function*. EMBO reports, 2016. **17**(5): p. 671-681.
171. Lieberman, M. and A. Peet, *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. 2018: Wolters Kluwer.
172. Barnum, K.J. and M.J. O'Connell, *Cell cycle regulation by checkpoints*, in *Cell Cycle Control*. 2014, Springer. p. 29-40.
173. Bartek, J., C. Lukas, and J. Lukas, *Checking on DNA damage in S phase*. Nature reviews Molecular cell biology, 2004. **5**(10): p. 792.
174. Novák, B., J.C. Sible, and J.J. Tyson, *Checkpoints in the cell cycle*. e LS, 2001.
175. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**: p. 15-16.
176. Vousden, K.H., *p53: death star*. Cell, 2000. **103**(5): p. 691-694.
177. El-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-825.

178. Soussi, T., *p53 alterations in human cancer: more questions than answers*. *Oncogene*, 2007. **26**(15): p. 2145.
179. Kruse, J.-P. and W. Gu, *Modes of p53 regulation*. *Cell*, 2009. **137**(4): p. 609-622.
180. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities*. *Cancer cell*, 2014. **25**(3): p. 304-317.
181. Wang, X. and X. Jiang, *Mdm2 and MdmX partner to regulate p53*. *FEBS letters*, 2012. **586**(10): p. 1390-1396.
182. Pei, D., Y. Zhang, and J. Zheng, *Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx*. *Oncotarget*, 2012. **3**(3): p. 228.
183. Bunz, F., et al., *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. *Science*, 1998. **282**(5393): p. 1497-1501.
184. Yu, J., et al., *PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells*. *Molecular cell*, 2001. **7**(3): p. 673-682.
185. Sidi, S., et al., *Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 864-877.
186. Roth, J.A., et al. *Gene replacement strategies for treating non-small cell lung cancer*. in *Seminars in radiation oncology*. 2000. Elsevier.
187. Bischoff, J.R., et al., *An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells*. *Science*, 1996. **274**(5286): p. 373-376.
188. Hietanen, S., et al., *Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(15): p. 8501-8506.
189. Momand, J., et al., *The MDM2 gene amplification database*. *Nucleic acids research*, 1998. **26**(15): p. 3453-3459.
190. Araki, S., et al., *TGF- β 1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer*. *The Journal of clinical investigation*, 2010. **120**(1): p. 290-302.
191. Bond, G.L., et al., *MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner*. *Cancer research*, 2006. **66**(10): p. 5104-5110.

192. Bond, G.L., et al., *MDM2 SNP309 accelerates colorectal tumour formation in women*. Journal of medical genetics, 2006. **43**(12): p. 950-952.
193. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1237-1245.
194. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 296.
195. Chen, C.-Y., et al., *Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(7): p. 2684-2688.
196. Shinozaki, T., et al., *Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export*. Oncogene, 2003. **22**(55): p. 8870.
197. Maya, R., et al., *ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage*. Genes & development, 2001. **15**(9): p. 1067-1077.
198. Li, M., et al., *Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(52): p. 50607-50611.
199. Ambekar, S.S., S.S. Hattur, and P.B. Bule, *DNA: Damage and repair mechanisms in humans*. group, 2017. **1**: p. 7.
200. Morrical, S.W., *DNA-pairing and annealing processes in homologous recombination and homology-directed repair*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2015. **7**(2): p. a016444.
201. Moynahan, M.E. and M. Jasin, *Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis*. Nature reviews Molecular cell biology, 2010. **11**(3): p. 196.
202. Kolinjivadi, A.M., et al., *Moonlighting at replication forks—a new life for homologous recombination proteins BRCA1, BRCA2 and RAD51*. FEBS letters, 2017. **591**(8): p. 1083-1100.
203. Pellegrini, L., et al., *Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51–BRCA2 complex*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 287.

204. Thacker, J., *The RAD51 gene family, genetic instability and cancer*. Cancer letters, 2005. **219**(2): p. 125-135.
205. Tarsounas, M., et al., *Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein*. Cell, 2004. **117**(3): p. 337-347.
206. Clark, S.L., et al., *Structure-function of the tumor suppressor BRCA1*. Computational and structural biotechnology journal, 2012. **1**(1): p. e201204005.
207. Parvin, J.D., *Overview of history and progress in BRCA1 research: the first BRCA1 decade*. Cancer biology & therapy, 2004. **3**(6): p. 505-508.
208. Wang, Q., et al., *BRCA1 and cell signaling*. Oncogene, 2000. **19**(53): p. 6152.
209. Fabbro, M., et al., *BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(30): p. 31251-31258.
210. Quinn, J.E., et al., *BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis*. Cancer research, 2003. **63**(19): p. 6221-6228.
211. Hakem, R., *DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly*. The EMBO journal, 2008. **27**(4): p. 589-605.
212. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071.
213. Dexheimer, T.S., *DNA repair pathways and mechanisms*, in *DNA repair of cancer stem cells*. 2013, Springer. p. 19-32.
214. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701.
215. Kreis, N., F. Louwen, and J. Yuan, *Less understood issues: p21 CIP1 in mitosis and its therapeutic potential*. Oncogene, 2015. **34**(14): p. 1758.
216. Follis, A.V., C.A. Galea, and R.W. Kriwacki, *Intrinsic protein flexibility in regulation of cell proliferation: advantages for signaling and opportunities for novel therapeutics*, in *Fuzziness*. 2012, Springer. p. 27-49.
217. Romanov, V.S. and K.L. Rudolph, *p21 shapes cancer evolution*. Nature cell biology, 2016. **18**(7): p. 722.
218. Kreis, N.-N., et al., *Mitotic p21Cip1/CDKN1A is regulated by cyclin-dependent kinase 1 phosphorylation*. Oncotarget, 2016. **7**(31): p. 50215.

219. Barboza, J.A., et al., *p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(52): p. 19842-19847.
220. Engeland, K., *Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM*. Cell death and differentiation, 2018. **25**(1): p. 114.
221. Kitaura, H., et al., *Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21 cip1/waf1/sdi1 in DNA replication and transcription*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(14): p. 10477-10483.
222. Warfel, N.A. and W.S. El-Deiry, *p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after*. Current opinion in oncology, 2013. **25**(1): p. 52-58.
223. Barr, A.R., et al., *DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression*. Nature communications, 2017. **8**: p. 14728.
224. Perri, F., S. Pisconti, and G.D.V. Scarpati, *P53 mutations and cancer: a tight linkage*. Annals of translational medicine, 2016. **4**(24).
225. van Duin, M., et al., *Genomic characterization of the human DNA excision repair gene ERCC1*. Nucleic acids research, 1987. **15**(22): p. 9195-9214.
226. Evans, E., et al., *Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors*. The EMBO journal, 1997. **16**(21): p. 6559-6573.
227. Friedberg, E.C., *How nucleotide excision repair protects against cancer*. Nature Reviews Cancer, 2001. **1**(1): p. 22.
228. Bhagwat, N.R., et al., *Immunodetection of DNA repair endonuclease ERCC1-XPF in human tissue*. Cancer research, 2009. **69**(17): p. 6831-6838.
229. Manandhar, M., K.S. Boulware, and R.D. Wood, *The ERCC1 and ERCC4 (XPF) genes and gene products*. Gene, 2015. **569**(2): p. 153-161.
230. Errico, A. and V. Costanzo, *Mechanisms of replication fork protection: a safeguard for genome stability*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2012. **47**(3): p. 222-235.

231. Peng, C.-Y., et al., *Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216*. *Science*, 1997. **277**(5331): p. 1501-1505.
232. Chapman, J.R., M.R. Taylor, and S.J. Boulton, *Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice*. *Molecular cell*, 2012. **47**(4): p. 497-510.
233. Schwartz, C., O. Rohr, and C. Wallet, *Targeting the DNA-PK complex: its rationale use in cancer and HIV-1 infection*. *Biochemical pharmacology*, 2018.
234. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nature medicine*, 2000. **6**(4): p. 389.
235. Rajabi, M. and S.A. Mousa, *The role of angiogenesis in cancer treatment*. *Biomedicines*, 2017. **5**(2): p. 34.
236. Pavlakovic, H., W. Havers, and L. Schweigerer, *Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: implications for anti-angiogenic tumour therapy*. *Angiogenesis*, 2001. **4**(4): p. 259-262.
237. Jayasinghe, C., N. Simiantonaki, and J. Kirkpatrick, *VEGF-B expression in colorectal carcinomas and its relevance for tumor progression*. 2013.
238. Yang, X., et al., *VEGF-B promotes cancer metastasis through a VEGF-A-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. **112**(22): p. E2900-E2909.
239. Alvarez, R.H., H.M. Kantarjian, and J.E. Cortes. *Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2006. Elsevier.
240. Cimpean, A.M., et al., *Platelet Derived Growth Factor BB: A "Must-have" Therapeutic Target "Redivivus" in Ovarian Cancer*. *Cancer Genomics-Proteomics*, 2016. **13**(6): p. 511-517.
241. Costa, P.M., et al., *PDGF-B-mediated downregulation of miR-21: new insights into PDGF signaling in glioblastoma*. *Human molecular genetics*, 2012. **21**(23): p. 5118-5130.

242. Mazzone, M., et al., *Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization*. Cell, 2009. **136**(5): p. 839-851.
243. Wang, C., Y. Liu, and D. He, *Diverse effects of platelet-derived growth factor-BB on cell signaling pathways*. Cytokine, 2019. **113**: p. 13-20.
244. McCarty, M.F., et al., *Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content*. The Journal of clinical investigation, 2007. **117**(8): p. 2114-2122.
245. Hassan, M., et al., *Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer*. BioMed research international, 2014. **2014**.
246. Pfeffer, C.M. and A.T. Singh, *Apoptosis: a target for anticancer therapy*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(2): p. 448.
247. Zaman, S., R. Wang, and V. Gandhi, *Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies*. Leukemia & lymphoma, 2014. **55**(9): p. 1980-1992.
248. Puccini, J., L. Dorstyn, and S. Kumar, *Caspase-2 as a tumour suppressor*. Cell death and differentiation, 2013. **20**(9): p. 1133.
249. Shalini, S., et al., *Impaired antioxidant defence and accumulation of oxidative stress in caspase-2-deficient mice*. Cell death and differentiation, 2012. **19**(8): p. 1370.
250. O'byrne, K.J. and D.J. Richard, *Nucleolar caspase-2: Protecting us from DNA damage*. J Cell Biol, 2017. **216**(6): p. 1521-1523.
251. Bouchier-Hayes, L., et al., *Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity*. Molecular cell, 2009. **35**(6): p. 830-840.
252. Dang, C.V., *MYC on the path to cancer*. Cell, 2012. **149**(1): p. 22-35.
253. Farrell, A.S. and R.C. Sears, *MYC degradation*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2014. **4**(3): p. a014365.
254. Hydbring, P., et al., *Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(1): p. 58-63.
255. Arnold, H.K., et al., *The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc*. The EMBO journal, 2009. **28**(5): p. 500-512.

256. Sabo, A., et al., *Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis*. Nature, 2014. **511**(7510): p. 488.
257. Gavamukulya, Y., et al., *In search of new anticancer drugs: Data for cytotoxic activities of green synthesized silver nanoparticles from ethanolic extracts of fruits and leaves of Annona muricata and 5-Fluorouracil against HeLa, PC3 and PNT1A cell lines*. Data in brief, 2019. **26**: p. 104442.
258. Salbitani, G., C. Bottone, and S. Carfagna, *Determination of reduced and total glutathione content in extremophilic microalga Galdieria phlegrea*. Bio Protoc., 2017. **7**: p. e2372.
259. Kushlinskiĭ, N. and M. Nemtsova, *Molecular biological characteristics of cancer*. Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk, 2014(1-2): p. 5-15.
260. Bizzarri, M. and A. Cucina, *Tumor and the microenvironment: a chance to reframe the paradigm of carcinogenesis?* BioMed research international, 2014. **2014**.
261. Meacham, C.E. and S.J. Morrison, *Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 328-337.
262. Fisher, R., L. Pusztai, and C. Swanton, *Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics*. British journal of cancer, 2013. **108**(3): p. 479-485.
263. Pitot, H.C. and Y. Dragan, *Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis*. The FASEB journal, 1991. **5**(9): p. 2280-2286.
264. Bukhtoyarov, O.V. and D.M. Samarin, *Pathogenesis of cancer: cancer reparative trap*. Journal of Cancer Therapy, 2015. **6**(05): p. 399.
265. Burkholder, B., et al., *Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2014. **1845**(2): p. 182-201.
266. Baccelli, I. and A. Trumpp, *The evolving concept of cancer and metastasis stem cells*. Journal of Cell Biology, 2012. **198**(3): p. 281-293.
267. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* Free radical biology and medicine, 2010. **49**(11): p. 1603-1616.

268. Crawford, S., *Anti-inflammatory/antioxidant use in long-term maintenance cancer therapy: a new therapeutic approach to disease progression and recurrence*. Therapeutic advances in medical oncology, 2014. **6**(2): p. 52-68.
269. Ferretti, C., et al., *Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts*. Human reproduction update, 2007. **13**(2): p. 121-141.
270. Harrington, K.J., *The biology of cancer*. Medicine, 2016. **44**(1): p. 1-5.
271. Hassanpour, S.H. and M. Dehghani, *Review of cancer from perspective of molecular*. Journal of Cancer Research and Practice, 2017. **4**(4): p. 127-129.
272. Weinberg, R. and D. Hanahan, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
273. Ferlay, J., et al., *GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. 2013.
274. Bhatla, N., et al., *Cancer of the cervix uteri*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2018. **143**: p. 22-36.
275. MM wALBooMER, J., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J. pathol, 1999. **189**: p. 12-19.
276. Satterwhite, C.L., et al., *Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008*. Sexually transmitted diseases, 2013. **40**(3): p. 187-193.
277. Rodríguez, A.C., et al., *Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections*. Journal of the National Cancer Institute, 2008. **100**(7): p. 513-517.
278. Sutton, G.P., et al., *Ovarian metastases in stage IB carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study*. American journal of obstetrics and gynecology, 1992. **166**(1): p. 50-53.
279. Wipperman, J., T. Neil, and T. Williams, *Cervical cancer: evaluation and management*. American family physician, 2018. **97**(7): p. 449-454.
280. Calvagna, M., *Risk Factors for Cervical Cancer*.
281. Rerucha, C.M., R.J. Caro, and V. Wheeler, *Cervical cancer screening*. American family physician, 2018. **97**(7): p. 441-448.

282. Obstetricians, A.C.o. and Gynecologists, *Committee on Practice Bulletins—Gynecology. Practice bulletin no. 136: management of abnormal uterine bleeding associated with ovulatory dysfunction*. *Obstet Gynecol*, 2013. **122**(1): p. 176-85.
283. Workowski, K.A., *Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. **61**(suppl_8): p. S759-S762.
284. Martin-Hirsch, P.L. and N.J. Wood, *Cervical cancer*. *BMJ clinical evidence*, 2011. **2011**.
285. Plummer, M., et al., *A 2-Year Prospective Study of Human Papillomavirus Persistence Among Women With a Cytological Diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion*. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 2008. **12**(2): p. 152.
286. Papillomaviruses, H., *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon, France: IARC, 2011.
287. Leyden, W.A., et al., *Cervical cancer in women with comprehensive health care access: attributable factors in the screening process*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005. **97**(9): p. 675-683.
288. People, H., *C-15. Increase the proportion of women who receive a cervical cancer screening based on the most recent guidelines*. 2020.
289. Lagheden, C., et al., *Nationwide comprehensive human papillomavirus (HPV) genotyping of invasive cervical cancer*. *British journal of cancer*, 2018. **118**(10): p. 1377-1381.
290. Velentzis, L.S., et al., *How will transitioning from cytology to HPV testing change the balance between the benefits and harms of cervical cancer screening? Estimates of the impact on cervical cancer, treatment rates and adverse obstetric outcomes in Australia, a high vaccination coverage country*. *International journal of cancer*, 2017. **141**(12): p. 2410-2422.
291. Stumbar, S.E., M. Stevens, and Z. Feld, *Cervical cancer and its precursors: a preventative approach to screening, diagnosis, and management*. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 2019. **46**(1): p. 117-134.

292. Höckel, M. and N. Dornhöfer, *Pelvic exenteration for gynaecological tumours: achievements and unanswered questions*. *The lancet oncology*, 2006. **7**(10): p. 837-847.
293. Berek, J.S., et al., *Pelvic exenteration for recurrent gynecologic malignancy: survival and morbidity analysis of the 45-year experience at UCLA*. *Gynecologic oncology*, 2005. **99**(1): p. 153-159.
294. Lontos, M., et al., *Systemic therapy in cervical cancer: 30 years in review*. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2019.
295. Lind, M.J., *Principles of systemic anticancer therapy*. Medicine, 2020.
296. Smith, S. and S. Prewett, *Principles of chemotherapy and radiotherapy*. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine, 2020.
297. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 2009. **361**(10): p. 947-957.
298. Cortes, J., et al., *Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study*. *The Lancet*, 2011. **377**(9769): p. 914-923.
299. Heinig, U., S. Scholz, and S. Jennewein, *Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi*. *Fungal diversity*, 2013. **60**(1): p. 161-170.
300. O'Connell, C.B. and A.L. Khodjakov, *Cooperative mechanisms of mitotic spindle formation*. *Journal of cell science*, 2007. **120**(10): p. 1717-1722.
301. Ezrahi, S., A. Aserin, and N. Garti, *Basic principles of drug delivery systems—the case of paclitaxel*. *Advances in colloid and interface science*, 2019. **263**: p. 95-130.
302. Castle, B.T., et al., *Mechanisms of kinetic stabilization by the drugs paclitaxel and vinblastine*. *Molecular biology of the cell*, 2017. **28**(9): p. 1238-1257.
303. Ganguly, A., H. Yang, and F. Cabral, *Paclitaxel-dependent cell lines reveal a novel drug activity*. *Molecular cancer therapeutics*, 2010. **9**(11): p. 2914-2923.
304. Leal-Esteban, L.C. and L. Fajas, *Cell cycle regulators in cancer cell metabolism*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2020: p. 165715.

305. Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. Development, 2013. **140**(15): p. 3079-3093.
306. Harbour, J.W., et al., *Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1*. Cell, 1999. **98**(6): p. 859-869.
307. Alimbetov, D., et al., *Pharmacological targeting of cell cycle, apoptotic and cell adhesion signaling pathways implicated in chemoresistance of cancer cells*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(6): p. 1690.
308. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-231.
309. Hydbring, P., M. Malumbres, and P. Sicinski, *Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases*. Nature reviews Molecular cell biology, 2016. **17**(5): p. 280.
310. Pundir, S. and C. Pundir, *Detection of tumor suppressor protein p53 with special emphasis on biosensors: A review*. Analytical biochemistry, 2019: p. 113473.
311. Efeyan, A. and M. Serrano, *p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes*. Cell cycle, 2007. **6**(9): p. 1006-1010.
312. Ahmed, A.A., et al., *Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary*. The Journal of pathology, 2010. **221**(1): p. 49-56.
313. Rivlin, N., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis*. Genes & cancer, 2011. **2**(4): p. 466-474.
314. Momand, J., H.-H. Wu, and G. Dasgupta, *MDM2—master regulator of the p53 tumor suppressor protein*. Gene, 2000. **242**(1-2): p. 15-29.
315. Gupta, A., et al., *Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: A novel therapy for cancer treatment*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019. **109**: p. 484-492.
316. Iwakuma, T. and G. Lozano, *MDM2, an introduction*. Molecular Cancer Research, 2003. **1**(14): p. 993-1000.
317. Hashimoto, Y., et al., *Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(11): p. 1305.

318. Bhattacharya, S., et al., *RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity*. Nucleic acids research, 2017. **45**(8): p. 4590-4605.
319. Richardson, C., *RAD51, genomic stability, and tumorigenesis*. Cancer letters, 2005. **218**(2): p. 127-139.
320. Anantha, R.W., et al., *Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance*. Elife, 2017. **6**: p. e21350.
321. Samtani, R. and D. Saksena, *BRCA gene mutations: A population based review*. Gene Reports, 2019: p. 100380.
322. Famorca-Tran, J. and G. Roux, *The consequences of a BRCA mutation in women*. Journal of the advanced practitioner in oncology, 2015. **6**(3): p. 194.
323. Ahmad, A., et al., *ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(16): p. 5082-5092.
324. Hodskinson, M.R., et al., *Mouse SLX4 is a tumor suppressor that stimulates the activity of the nuclease XPF-ERCC1 in DNA crosslink repair*. Molecular cell, 2014. **54**(3): p. 472-484.
325. Arora, S., et al., *Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells*. DNA repair, 2010. **9**(7): p. 745-753.
326. Smith, D.H., et al., *Measuring ERCC1 protein expression in cancer specimens: validation of a novel antibody*. Scientific reports, 2014. **4**: p. 4313.
327. McNeil, E.M. and D.W. Melton, *DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy*. Nucleic acids research, 2012. **40**(20): p. 9990-10004.
328. Bradbury, A., et al., *Targeting ATR as Cancer Therapy: A new era for synthetic lethality and synergistic combinations?* Pharmacology & Therapeutics, 2019: p. 107450.
329. Ball, H.L., et al., *Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(9): p. 3367-3377.
330. Sørensen, C.S. and R.G. Syljuåsen, *Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication*. Nucleic acids research, 2012. **40**(2): p. 477-486.

331. Buisson, R., et al., *Coupling of homologous recombination and the checkpoint by ATR*. Molecular cell, 2017. **65**(2): p. 336-346.
332. Benson, E.K., et al., *p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes*. Oncogene, 2014. **33**(30): p. 3959-3969.
333. Fischer, M., et al., *The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes*. Nucleic acids research, 2016. **44**(1): p. 164-174.
334. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-704.
335. Macip, S., et al., *Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence*. The EMBO journal, 2002. **21**(9): p. 2180-2188.
336. El-Deiry, W.S., *p21 (WAF1) mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy*. Cancer research, 2016. **76**(18): p. 5189-5191.
337. Goodwin, J.F. and K.E. Knudsen, *Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer*. Cancer discovery, 2014. **4**(10): p. 1126-1139.
338. Damia, G., *Targeting DNA-PK in cancer*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2020: p. 111692.
339. Mao, Z., et al., *Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells*. DNA repair, 2008. **7**(10): p. 1765-1771.
340. Davis, A.J., et al., *BRCA1 modulates the autophosphorylation status of DNA-PKcs in S phase of the cell cycle*. Nucleic acids research, 2014. **42**(18): p. 11487-11501.
341. Li, X., *VEGF-B: a thing of beauty*. Cell research, 2010. **20**(7): p. 741-744.
342. Enholm, B., et al., *Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia*. Oncogene, 1997. **14**(20): p. 2475-2483.
343. Kivelä, R., et al., *VEGF-B-induced vascular growth leads to metabolic reprogramming and ischemia resistance in the heart*. EMBO molecular medicine, 2014. **6**(3): p. 307-321.

344. Robciuc, M.R., et al., *VEGFB/VEGFR1-induced expansion of adipose vasculature counteracts obesity and related metabolic complications*. Cell metabolism, 2016. **23**(4): p. 712-724.
345. Huang, F., et al., *PDGF signaling in cancer progression*. Int. J. Clin. Exp. Med, 2017. **10**: p. 9918-9929.
346. Finlay, G.A., et al., *Platelet-derived growth factor–induced p42/44 mitogen-activated protein kinase activation and cellular growth is mediated by reactive oxygen species in the absence of TSC2/tuberin*. Cancer research, 2005. **65**(23): p. 10881-10890.
347. Furuhashi, M., et al., *Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate*. Cancer research, 2004. **64**(8): p. 2725-2733.
348. CUMĂNĂNAS, A.A., et al., *The involvement of PDGF-B/PDGFR β axis in the resistance to antiangiogenic and antivascular therapy in renal cancer*. Anticancer research, 2016. **36**(5): p. 2291-2295.
349. Lu, Y., et al., *Hypoxia-induced secretion of platelet-derived growth factor -BB by hepatocellular carcinoma cells increases activated hepatic stellate cell proliferation, migration and expression of vascular endothelial growth factor -A*. Molecular medicine reports, 2015. **11**(1): p. 691-697.
350. Baptiste-Okoh, N., A.M. Barsotti, and C. Prives, *A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(6): p. 1937-1942.
351. Vakifahmetoglu-Norberg, H. and B. Zhivotovsky, *The unpredictable caspase-2: what can it do?* Trends in cell biology, 2010. **20**(3): p. 150-159.
352. Shi, M., et al., *RETRACTED: DNA-PKcs-PIDDosome: A Nuclear Caspase-2-Activating Complex with Role in G2/M Checkpoint Maintenance*. Cell, 2009. **136**(3): p. 508-520.

353. Pelizzola, M., et al., *Selective transcriptional regulation by Myc: Experimental design and computational analysis of high-throughput sequencing data*. Data in brief, 2015. **3**: p. 40-46.
354. Morton, J.P. and O.J. Sansom, *MYC-y mice: from tumour initiation to therapeutic targeting of endogenous MYC*. Molecular oncology, 2013. **7**(2): p. 248-258.
355. Stine, Z.E., et al., *MYC, metabolism, and cancer*. Cancer discovery, 2015. **5**(10): p. 1024-1039.
356. Conacci-Sorrell, M., L. McFerrin, and R.N. Eisenman, *An overview of MYC and its interactome*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2014. **4**(1): p. a014357.
357. Bouchard, C., et al., *FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf*. Genes & development, 2007. **21**(21): p. 2775-2787.

8.İZİNLER



CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklenmiş Paklitakselin İnsan Servikal Kanser (HeLa) Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etki ve Bazı Genlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi
-----------------------	---

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 219 10 10 / Dahili: 2092
	FAKS	-
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Yavuz Siliğ
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Doktora tezi
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> ULUSAL <input type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez
İmza:



CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklenmiş Paklitakselin İnsan Servikal Kanser (HeLa) Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etki ve Bazı Genlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2018-12/24	Tarih: 05.12.2018		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacı/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacı/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Muhittin Sönmez

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Muhittin Sönmez	Anatomi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yalçın Karagöz	Biyoistatistik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hatice Özer	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Binnur Bağcı	Beslenme ve Diyetetik	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Mehmet Ataç	Farmasötik Mikrobiyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Engin Altankaya	İç hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Melih Ülgey	Protetik Diş Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez
İmze:

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Manhal TULIMAT
Doğum Yeri ve Tarihi	Suriye-1983
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce-Arapça
İletişim Adresi	Sivas- Merkez 0551 037 06 36
E-posta Adresi	ph.manhal@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Abdulhamid Lisesi, 2002
Lisans	Ürdün Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 2007
Yüksek Lisans	Ürdün Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyofarmasötik ana bilim dalı, 2014
Doktora	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, 2016-2020