

KENAN

UTKU

**İnsan Servikal Kanser (Hela) Hücreleri Üzerine Nanotaşıyıcı
Sistemlere Yüklennmiş Doksorubisin'in Sitotoksik Etki ve Bazı
Genlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi.**

SİVAS

2020



T.C.

**SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN SERVİKAL KANSER (HELA) HÜCRELERİ ÜZERİNE
NANOTAŞIYICI SİSTEMLERE YÜKLENMİŞ DOKSORUBİSİN'İN
SİTOTOKSİK ETKİ VE BAZI GENLERİN EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ.**

KENAN UTKU

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

SIVAS - 2020



T.C.

**SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN SERVİKAL KANSER (HELA) HÜCRELERİ ÜZERİNE
NANOTAŞIYICI SİSTEMLERE YÜKLENMİŞ DOKSORUBİSİN'İN
SİTOTOKSİK ETKİ VE BAZI GENLERİN EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ.**

KENAN UTKU

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YAVUZ SİLİĞ**

SIVAS – 2020

“İnsan Servikal Kanser (HeLa) Hücreleri Üzerine Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklenmiş Doksorubisin'in 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 _____
(Danışman)
Üye _____
Üye _____
Üye _____
Üye _____

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.

İTHAF SAYFASI



Bu tezi aileme ithaf ediyorum...

ÖZET

İNSAN SERVİKAL KANSER (HELA) HÜCRELERİ ÜZERİNE NANOTAŞIYICI SİSTEMLERE YÜKLENMİŞ DOKSORUBİSİN'İN SİTOTOKSİK ETKİ VE BAZI GENLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ.

Kenan UTKU

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ

2020, 162 Sayfa

Servikal kanser, gebelik çağındaki kadınları etkileyen jinekolojik kanserlerden biridir. Kadınlarda dördüncü en yaygın kanser servikal kanseridir. Servikal kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar arasından biri Doksorubisin (DOX) dir. DOX geniş bir antikanser aktivite spektrumuna sahiptir, ancak ciddi yan etkileri özellikle kardiyotoksitesisi nedeniyle klinik uygulaması sınırlıdır. Bu dezavantajlar azaltmak ve doksorubisinin antikanser etkinliğini arttırmak amacıyla, bu çalışmada ilk olarak titanyum dioksit (TiO_2) nanoparçacıkları sentezlendi. Ancak TiO_2 'nin toksisitesi çok yüksek olduğu için polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilerek yeni bir ilaç dağıtım sistemi, nanotaşıyıcı sistemi oluşturuldu. Son olarak sentezlenen nano taşıyıcı sistem anti kanser ilaç DOX ile modifiye edildi. İnsan servikal kanser hücre hattı (HeLa) üzerine sentezlenen TiO_2 , DOX, PEG- TiO_2 , PEG- TiO_2 -DOX nanoparçacıkları uygulayarak, sitotoksik dozları MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. İnsan servikal kanser hücre hattı HeLa üzerine 24, 48 ve 72 saat boyunca TiO_2 , DOX, PEG- TiO_2 , PEG- TiO_2 -DOX ilaçlarının farklı konsantrasyonları (0,5-50 μ g/ml) uygulanıp IC_{50} dozları hesaplandı. Bu ajanlar arasında en aktif 72 saat sonrası TiO_2 ve DOX olduğunu tespit edildi. PEG- TiO_2 -DOX nanotaşıyıcı temelli ilacın IC_{50} 6.467 \pm 0.135 μ g/ml olduğu saptandı. Sonraki aşamada, 48 saat inkübasyon nedeniyle her ilaç için elde edilen IC_{50} dozlarını HeLa hücre hattı üzerine uygulanıp 48 saat inkübe edildi ve hücrelerden RNA izole edildi. RNA örneklerinden cDNA senteze edildi ve bu örneklerde *GPX1*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1* ve *ABCB1* genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif PCR (qPCR) yöntemiyle belirlendi.

En sona PEG-TiO₂-DOX nanotaşıyıcı temelli ilacın tüm genlerin ekspresyonunu artırdığı tespit edildi. TiO₂ nanoparçacıkların *GPXI*, *PRDXI* ve *CTNNB1* genlerin ekspresyonu azaltırken, tüm diğer genlerinin ekspresyonu arttırdığı belirlendi. DOX ilacı ise *CTNNB1* geni hariç tüm diğer genlerin ekspresyonu arttırdığı saptandı. PEG-TiO₂ *CTNNB1*, *CCND1*, *NFκB* ve *ABCBI* genlerin ekspresyonu azaltırken, tüm diğer genlerin ekspresyonu arttığı tesbit edildi.

Anahtar kelimeleri: Servikal Kanser, Hela, Doksorubisin, Nanoparçacık, Gen Ekspresyonu, *GPXI*, *SOD1*, *CAT*, *PRDXI*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1*, *ABCBI*.



ABSTRACT

CYTOTOXIC EFFECT OF DOXORUBICIN LOADED ON NANOCARRIER SYSTEMS ON HUMAN CERVICAL CANCER (HELA) CELL LINE AND DETERMINATION OF SOME GENES EXPRESSION PROFILES.

Kenan UTKU

Doctorate Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ

2020, 162 Pages

Cervical cancer is one of the gynecological cancers that affects women in the gestational age. In women the fourth most common cancer is cervical cancer. Doxorubicin (DOX) is one of the drugs that used in treatment of cervical cancer. DOX has a wide spectrum of anticancer activity, but its clinical application is limited because of its serious side effects, especially cardiotoxicity. In this study, firstly titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles were synthesized in order to reduce or completely remove such disadvantages and increase the anticancer activity of doxorubicin. Due to the very high toxicity of TiO₂, a new drug delivery system called nanocarrier system, was created when it TiO₂ modified with polyethylene glycol (PEG). Finally, the synthesized nano-carrier system was modified with anti-cancer drug DOX. In this study, the synthesized nanoparticles TiO₂, DOX, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-DOX were applied on human cervical cancer cell line (HeLa) and cytotoxic dose was determined by MTT method. Different concentrations (0.5-50 µg / ml) of TiO₂, DOX, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-DOX drugs were applied on the human cervical cancer cell line HeLa for 24, 48 and 72 hours, and IC₅₀ doses were calculated. Among these drugs, TiO₂ and DOX were found to be the most active after 72 hours. PEG-TiO₂-DOX nanocarrier based drug was found to be IC₅₀ 6.467 ± 0.135 µg / ml. In the next step, obtained from the incubation of each drugs for 48 hours IC₅₀ doses were applied on HeLa cell line and incubated for 48 hours then RNA was isolated from the cells. After that we synthesized cDNA from RNA samples and *GPXI*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1* and *ABCB1* genes were determined by real time RT-PCR analysis method.

As a result, it was found that the drug PEG-TiO₂-DOX based on nanocarrier increased the expression of all genes. It was found that TiO₂ nanoparticles reduce expression of *GPXI*, *PRDX1* and *CTNNB1* genes, while increased the expression of all other genes. On the other hand, DOX drug was found to increase the expression of all genes except *CTNNB1* gene. While PEG-TiO₂ decreased the expression of *CTNNB1*, *CCND1*, *NFκB* and *ABCB1* genes, it increased the expression of all other genes.

Key words: Cervical Cancer, Hela, Doxorubicin, Nanoparticle, Gene Expression, *GPXI*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1*, *ABCB1*.



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. Öğr. Üyesi. Ayça TAŞ hocamıza teşekkür ederim. Aynı zamanda tez çalışmam için materyal desteği sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Neşe KEKLİKÇİOĞLU ÇAKMAK hocamıza teşekkür ederim. Ayrıca, Tuğba AĞBEKTAŞ ve Zuhâl TUNÇBİLEK'e teşekkür ederim.

İnsan Servikal Kanser (HeLa) Hücreleri Üzerine Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklenmiş Doksorubisin'in Sitotoksik Etki ve Bazı Genlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xv
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xvii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. Genel bilgiler.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Servikal kanser.....	8
2.1.1.1. Servikal kanserin belirtileri.....	10
2.1.1.2. Servikal kanserin taraması.....	11
2.1.1.2.1. PAP smear testi.....	11
2.1.1.2.2. HPV DNA testidir.....	12
2.1.1.3. HPV enfeksiyonunun önlenmesi.....	12
2.2. Kanser tedavi yöntemleri.....	13
2.3. Nanoteknoloji ve nanoparçacıkları.....	14
2.3.1. Titanyum dioksit (TiO ₂).....	17
2.3.2. Polietilen glikol (PEG).....	19

2.3.3. Antitümör Antibiyotik olan Doksorubisin (DOX).....	20
2.4. Oksidatif stres genleri.....	24
2.4.1. <i>Glutasyon peroksidaz 1 (GPX1)</i> geni.....	25
2.4.2. <i>Süperoksit dismutaz 1 (SOD1)</i> geni.....	27
2.4.3. <i>Peroksiredoksin 1 (PRDX1)</i> geni.....	28
2.4.4. <i>Katalaz (CAT)</i> geni.....	31
2.5. Wnt Sinyelleme yolu genleri.....	33
2.5.1. <i>Kazein kinaz 1 alfa 1 (CSNK1A1)</i> geni.....	34
2.5.2. <i>Katenin beta 1 (CTNNB1)</i> geni.....	37
2.5.3. <i>Siklin D1 (CCND1)</i> geni.....	40
2.6. Hücre ölümü genleri.....	42
2.6.1. <i>Nükleer faktör kappa B alt birim 1 (NFκB1)</i> geni.....	42
2.6.2. <i>DNA Topoisomerase II alpha (TOP2A)</i> geni.....	46
2.6.3. <i>BCL2 Associated X, apoptoz regülatörü (BAX)</i> geni.....	47
2.7. İlaç metabolizma genleri.....	50
2.7.1. <i>NAD(P)H kinon dehidrojenaz 1 (NQO1)</i> geni.....	50
2.7.2. <i>ATP bağlayıcı kaseti alt ailesi B üye 1 (ABCB1)</i> geni.....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	53
3.1. Kullanılan cihazlar.....	53
3.2. Kullanılan plastik malzemeler.....	53
3.3. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	54
3.4. Kullanılan hücre hattı.....	56
3.4.1. HeLa insan servikal kanser hücre hattı.....	56
3.5. TiO ₂ nanoparçacık sentezi ve regilasyon işlemi.....	56

3.6. PEG-TiO ₂ Nanotaşıyıcı sisteme DOX ilacının yüklenmesi.....	57
3.7. Hücre kültürü.....	57
3.7.1. 96'lık Plaka pasajlama işlemi.....	59
3.8. Sitotoksisite deneyleri.....	60
3.8.1. Dozlama süreci.....	60
3.8.2. MTT testi.....	61
3.9. Hücrelerden RNA izolasyonu.....	61
3.9.1. 6'lık plakaları hazırlaması.....	61
3.9.2. RNA İzolasyonu.....	62
3.10. cDNA Sentezi protokolü.....	62
3.11. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR)	64
3.12. Primerler.....	65
4. İstatistiksel analizi.....	65
5. HeLa hücre hattında bazı önemli bileşikleri tayini.....	66
5.1. İnorganik fosfat tayini.....	66
5.2. GSH Tayini.....	67
5.2.1. Çözeltiler hazırlaması.....	67
5.2.2. Deneyin Yapılışı.....	67
6. Bulgular.....	69
6.1. PEG-TiO ₂ ve PEG-TiO ₂ -DOX Sentezi ve Karakterizasyon Analizi.....	69
6.2. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	69
6.3. PEG-TiO ₂ Nanotaşıyıcı temelli DOX ilacının Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	70
6.4. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	73
6.4.1. <i>Glutasyon Peroksidaz 1 (GPX1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	74
6.4.2. <i>Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	74

6.4.3. <i>Katalaz (CAT)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	75
6.4.4. <i>Peroksidoksin 1 (PRDX1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	76
6.4.5. <i>Kazein Kinaz I Alfa 1 (CSNK1A1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	76
6.4.6. <i>Katenin beta 1 (CTNNB1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	77
6.4.7. <i>Siklin D1 (CCND1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	78
6.4.8. <i>Nükleer Faktör Kappa B1 (NFκB1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	78
6.4.9. <i>DNA Topoisomerase II Alpha (TOP2A)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	79
6.4.10. <i>BCL2 ilişkili X (BAX)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	80
6.4.11. <i>NAD(P)H Kinon Dehidrojenaz 1 (NQO1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	80
6.4.12. <i>ATP bağlayıcı kaseti alt ailesi B üye 1 (ABCB1) veya çoklu ilaç direncini 1 (MDR1)</i> geni ekspresyon düzeyi.....	81
6.5. İnorganik fosfat tayini bulguları.....	84
6.6. GSH tayini bulguları.....	86
7. Tartışma.....	88
7.1. <i>GPXI</i>	94
7.2. <i>SOD1</i>	96
7.3. <i>PRXDI</i>	98
7.4. <i>CAT</i>	99
7.5. <i>CSNK1A1</i>	101
7.6. <i>CTNNB1</i>	102
7.7. <i>CCND1</i>	104
7.8. <i>NFκB1</i>	105
7.9. <i>TOP2A</i>	106

7.10. <i>BAX</i>	108
7.11. <i>NQOI</i>	109
7.12. <i>ABCBI</i>	110
8. Kaynaklar.....	113
9. İzinler.....	135
10. Özgeçmiş.....	137



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Dünya çapında 2018 yılı tahmini yaş standardize insidans oranları, tüm kanserler, her iki cinsiyet, her yaş.....	5
Şekil 2: Dünya'daki tüm kanserlerin her iki cinsiyette 2040'taki tahmini vaka sayısı ve 2018 vaka sayısına karşılaştırması.....	5
Şekil 3: Dünya çapında her iki cinsiyette 2018'de en sık görülen kanser vakalarının ve ölümlerinin oranları.....	6
Şekil 4: Cinsiyete bağlı erkelerde (A) ve kadınlarda (B) dünya çapında kanser vakalarının ve ölümlerinin oranları.....	6-7
Şekil 5: Türkiye'de 2018'de her iki cinsiyette bütün yaş gruplarında kanser vakalarının (a) ve mortalitesinin (b) oranları.....	7
Şekil 6: Türkiye'de 2018 yılı, kadınlarda, 0-75 yaş en sık görülen kanserlerin vaka sayısı ve % oranı.....	8
Şekil 7: Kadında ürime sistemi ve serviks yerini.....	8
Şekil 8: Onkojenik HPV'nin patogenezi.....	10
Şekil 9: Nanoparçacıklar ile aktif ve pasif hedefleme.....	15
Şekil 10: Organik nanopartikülleri: a- dendrimerleri, b- ipozom, c- miciller.....	16
Şekil 11: Titanyum dioksit nanopartiküllerinin (TiO ₂ NP'ler) ışığın etkisiyle ROS oluşumunu ve ROS rolleri şematik diyagramı.....	18
Şekil 12: Doksorubisin Yapısı.....	20
Şekil 13: Doksorubisinin kanser hücrelerinde etki mekanizması.....	22
Şekil 14: Metabolizmasında rol oynayan katalitik enzimler ve inhibitörleri dahil olmak üzere memeli hücrelerinde hücre içi doksorubisin (DOX) biyotransformasyonunun ana yolları. Metabolitlerin etkileri de listelenmiştir.....	24
Şekil 15: Glutatyon peroksidaz 1 (GPXI) geninin kromozom üzerindeki konumu.....	26
Şekil 16: Süperoksit dismutaz (SOD1) geninin kromozom üzerindeki konumu.....	27

Şekil 17: SOD1 etki mekanizması.....	27
Şekil 18: <i>Peroksiredoksin 1 (PRDX1)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	28
Şekil 19: Oksidatif strese etkilenen apoptoz PRDX1'in rolleri.....	30
Şekil 20: Çekirdek PRDX1'in, H ₂ O ₂ etkisi ile indüklenen apoptozda rolleri.....	31
Şekil 21: <i>Katalaz</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	31
Şekil 22: Katalaz ROS'e karşı etkileri.....	32
Şekil 23: <i>Kazein Kinaz I Alfa 1 (CSNK1A1)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	34
Şekil 24: Wnt / β -katenin (Kanonika) sinyal yolları.....	36
Şekil 25: β -Katenin birincil yapısı.....	38
Şekil 26: <i>Beta katenin 1 (CTNNB1)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	38
Şekil 27: <i>Siklin D1 (CCND1)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	40
Şekil 28: Memeli hücre döngüsünün düzenlenmesi.....	40
Şekil 29: Siklin D1 etkisi ile Retinoblastom protein fosforilasyonu ve inaktivasyonu.....	40
Şekil 30: GSK-3 β Siklin D1 degradasyonunda rolü.....	42
Şekil 31: <i>Nükleer Faktör Kappa B Alt Birim 1 (NFκB1)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	42
Şekil 32: NF κ B alt birim yapıları ve dimerik kombinasyonlar.....	43
Şekil 33: NF κ B Aktivasyonu Yolağı.....	44
Şekil 34: kanserde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde NF κ B1'in rolü.....	45
Şekil 35: <i>DNA Topoisomerase II Alpha (TOP2A)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	46
Şekil 36: <i>BCL2 Associated X (BAX)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	48
Şekil 37: Mitokondriyal oligomerik porlar (MAP) oluşumu ve rolü.....	49

Şekil 38: Hücre ölümünde Bax rolü.....	49
Şekil 39: <i>NAD(P)H Kinon Dehydrojenaz 1 (NQO1)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	50
Şekil 40: Kinonlarda NQO1 enzim etkisi.....	50
Şekil 41: <i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1 (ABCB1)</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	51
Şekil 42: Doksorubisin taşınması.....	52
Şekil 43: HeLa hücre hattının mikroskopik görüntüsü.....	56
Şekil 44: Thoma lamının mikroskop görüntüsü.....	60
Şekil 45: PEG-TiO ₂ ve PEG-TiO ₂ -DOX nanopartiküllerinin spektrofotometre analizinde bölge absorpsiyon grafiği.....	69
Şekil 46: HeLa servikal kanser hücre hücre hattında PEG-TiO ₂ -DOX, PEG-TiO ₂ , TiO ₂ ve DOX'in IC ₅₀ dozlarının belirlenmesi.....	70
Şekil 47: HeLa hücre hattında 24 saat, 48 saat ve 72 saat 0,5-50 µg/ml doz aralıklarında PEG-TiO ₂ -DOX, PEG-TiO ₂ , TiO ₂ ve DOX'in uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....	71-72
Şekil 48: <i>GPXI</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	74
Şekil 49: <i>SOD1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	75
Şekil 50: <i>CAT</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	75
Şekil 51: <i>PRDX1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	76
Şekil 52: <i>CSNK1A1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	77

Şekil 53: <i>CTNNB1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	77
Şekil 54: <i>CCND1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	78
Şekil 55: <i>NFκB1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	79
Şekil 56: <i>TOP2A</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	79
Şekil 57: <i>BAX</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	80
Şekil 58: <i>NQO1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	81
Şekil 59: <i>ABCB1</i> genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	81
Şekil 60: <i>GPX1, SOD1, CAT, PRDX1, CSNK1A1, CTNNB1, CCND1, NFKB1, TOP2A, BAX, NQO1, ABCB1</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 61: Pi standart eğrisi.....	84
Şekil 62: HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçları etkisiyle kontrole karşı Pi konsantrasyonları.....	85
Şekil 63: GSH standart eğrisi.....	86
Şekil 64: HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçları etkisiyle kontrole karşı GSH enzimi konsantrasyonları.....	87
Şekil 65: <i>GPX1, SOD1, CAT, PRDX1, CSNK1A1, CTNNB1, CCND1, NFKB1, TOP2A, BAX, NQO1</i> ve <i>ABCB1</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	112

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Genomik DNA eliminasyon karışımı.....	63
Tablo 2. Reverse Transkriptaz karışımı.....	63
Tablo 3. RT-PCR koşulları.....	64
Tablo 4. Döngü koşulları.....	64
Tablo 5. RT-PCR yönteminde kullanılan genlerin listesi.....	65
Tablo 6. Pi tayin etmesi için kullanılan çözeltileri hazırlaması.....	66
Tablo 7. Deney tablosu.....	67
Tablo 8. GSH tayini deney tablosu.....	68
Tablo 9. PEG-TiO ₂ - DOX, PEG-TiO ₂ , TiO ₂ ve DOX ilaçlarının 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonrası HeLa servikal kanser hücre hattı üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	72
Tablo 10. Çalışmada kullanılan genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde grupların sınıflandırılması.....	73
Tablo 11. Çalışmada belirtilen genlerin kontrol grubuna göre katlama düzenlemesi değerleri.....	82
Tablo 12. RT-PCR verilerinin kontrol ve test gruplarında ortalama Ct değerleri.....	83
Tablo 13. İnorganik fosfat Pi standart eğrisi.....	84
Tablo 14. HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçların etkisi ile ve kontrole ait Pi konsantrasyonları.....	85
Tablo 15. GSH standart eğrisi.....	86
Tablo 16. HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçların etkisi ile ve kontrole ait GSH konsantrasyonları.....	87

Tablo 17. GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında her iki cinsiyette vaka ve ölüm oranlarına bağlı sırada gelen kanser türleri.....89

Tablo 18. GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında kadınlarda en sık görülen vaka ve ölüm oranlara bağlı kanser türleri.....89



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AML	Akut miyeloid lösemi
APC	Adenomatöz polipozis koli
AR	Androjen reseptörü
ARE	Antioksidan tepki elemanı
ASK	Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz
BAG-1	B hücreli lenfoma-2 ilişkili athanogene 1
Bak	B hücreli lenfoma-2 homolog antagonisti
Bax	B hücreli lenfoma-2 ilişkili x
BCL-2	B hücreli lenfoma-2
BRM	Brahma homologu
CAT	Katalaz
CCND1	Siklin D1
CD8	Farklılaşma kümesi 8
CDK4	Sikline bağımlı kinaz 4
CDK6	Sikline bağımlı kinaz 4
CK1α	Kazein kinaz 1 alfa
CTNNB1	Katenin Beta 1
CREB	Siklik adenozin monofosfat tepki elemanı bağlayıcı protein
CSNK1A1	Kazein kinaz 1 alfa 1
DMPI	Siklin D1 bağlayıcı myb benzeri protein 1
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DOX	Doksorubisin
DOXOL	Doksorubisinol
EEC	Endometrioid endometriyal karsinom
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
GPRC	G protein bağı reseptör
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSK-3β	Glikojen sentaz kinaz- 3 β
GSH	Glutasyon

HPV	İnsan papilloma virüsü
HRPV	Yüksek riskli insan papilloma virüsü
IFN	İnterferon
IKKβ	Nükleer faktör kapp β kinaz alt birim beta inhibitörü
IRE	Demir duyarlı elementler
IRP	Demir düzenleyici protein
İGE	İnsani gelişme endeksi
KNT	Karbon nanotüp
LEF	Lenfosit arttırıcı faktör
LRP6	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü proteini 6
MAP	Miyokondriyal oligomerik porlar
MAPK	Mitojenle aktifleştirilmiş kinaz
NFAT4	Aktive T hücreleri nükleer faktörü 4
NF$\kappa\beta$	Nükleer faktör kapp β
NO	Nitrik oksit
p53	Tümör baskılayıcı protein 53
Pi	İnorganik fosfat
PN	Peroksinitrit
PPARγ	Peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör γ
pRB	Retinoblastom proteini
PRDX	Piroredoksin
PTEN	Fosfataz ve tensin homoloğu
Rac1	Ras ile ilgili C3 botulinum toksin substratı 1
RAPGEF2	Rap guanin değişim faktörü 2
RES	Retikülo endotelial sistem
ROS	Reaktif oksijen türleri
RXR	Retinoid X reseptörü
SOD	Süperoksit dismutaz
SP1	Spesifikasyon proteini 1
TCF	T hücre faktörü
TFAP2C	Trankripsiyon faktörü AP-2 gamma
THR	Tiroid hormon reseptörü
TNF-α	Tümör nekroz faktörü α

TOP2A	DNA topoizomeraz II alfa
TP53	Tümör protein 53
TRAIL	TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand
Trx	Tioredoksin
VDAC	Voltaja bağlı anyon kanalı
VLP	Virüs benzeri parçacık



1.GİRİŞ:

Kanser günümüzde dünyada yayılan en tehlikeli hastalıklardan biri olarak kabul edilir ve vücuttaki anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile karakterize edilen bir hastalıktır (1). Kanser dünya çapındaki kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelen ikinci ölüm nedeni bir hastalıktır (2). Genetik olarak kanser, hücre fonksiyonlarını, bölünmeyi ve olgunlaşmayı kontrol eden genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir. Bu gen mutasyonları karsinogen ksenobiyotik ajanlar tarafından meydana gelir ve sağlıklı hücrelerde DNA hasarına yol açmaktadır (3). Servikal kanseri, serviks dokularında malign hücrelerin oluşturduğu bir hastalıktır. Servikal kanser, gebelik evresindeki kadınları etkileyen jinekolojik kanserlerden biridir. Kadınlarda kanser hastalıkları arasında insidans ve ölüm oranı ile servikal kanseri dördüncü en yaygın kanserdir. İnsan Papilloma virüsü (HPV), servikal kanserinin oluşumunda en önemli etiyolojik faktördür (4, 5).

Günümüzde, kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olup sistemik tedavi, kanserin ortadan kaldırılması için en önemli faktörlerdendir. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Kemoterapi yöntemiyle kanser hücrelerinin öldürülmesi amaçlanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan antikanser ilaçların çoğu sitotoksik etkileri sonucunda malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önleyerek onların ölümüne yol açarlar. Konvansiyonel kemoterapik ilaçlar kanser hücreleri etkilediğinde aynı zamanda sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Kemoterapötik ilaçların suda çözünürlüğü zayıf olduğundan dolayı hedef dokuda biyoyararlılığını düşük olur ve gereken dozlara ulaşmamaktadır. Kanser tedavisinde başarılı olmak için esas olarak terapötik ilaçları kanser doku tarafından alınması ve sağlıklı dokular üzerinde etkisinin sınırlı olmasıdır (6, 7).

Servikal kanserin kemoterapötik tedavisinde sisplatin, karboplatin, paklitaksel, topotekan, gemitabin ve doksorubisin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Doksorubisin (DOX) doğal olarak *Streptomyces peucetius* var. *caesius*'dan izole edilen bir antrasiklidir. Doksorubisin, DNA sentezinin ve fonksiyonunun inhibisyonu ile sonuçlanan DNA interkalasyonu ile kanser hücrelerine etki etmektedir. Diğer Taraftan DOX'in hücrel membranlar, DNA ve proteinlerin hasara neden olan serbest radikallerin üretimini indükleyebilmektedir. Doksorubisin çok düşük oral biyoyararlanım, düşük geçirgenlik ve ciddi bir şekilde kardiyotoksitesi göstermektedir. Diğer çoğu ilaçlar gibi oral şeklinde alındığında sitokrom p450 enzimlere duyarlıdır. Doksorubisinin bu gibi yan etkilerinden ve gelişen ilaç

direncinden dolayı bazı kısıtlamalar yaşanmaktadır. Bu nedenle etkili tedavi seçeneklerine aşırı derecede ihtiyaç bulunmaktadır (8, 9, 10).

Nanoteknoloji, kanser tedavisi için kemoterapi ilaç dağıtım sistemlerinin hazırlanmasında nanoparçacıkların kullanılmasına dayanan modern bir tekniktir. Nanoteknoloji teknikleri ile kemoterapötik ilaçlar hazırlamak için nanoparçacıklar taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. İlaç bağlı nanotaşıyıcı sistemler ile doğrudan kanser hücreleri hedeflenerek sağlıklı hücreler korunmaktadır (11). Nanotaşıyıcı sistemler, boyut ve hedef ligandın partikül yüzeyine bağlanma kabiliyetlerinden dolayı serbest kemoterapötik moleküllerden çok daha fazla tercih edilmektedir (12). Kanser tedavisinde kullanılan yeni dağıtım sistemleri en çok kullanılan nanoparçacıklar arasında titanyum dioksit (TiO_2) yer almaktadır. TiO_2 , iyi biyoyumluluk, düşük toksisite, kimyasal kararlılık ve fotokatalitik özellikleri gibi birçok benzersiz özelliğe sahip olduğu için yeni dağıtım sistemleri hazırlamak için kullanılmıştır (13). TiO_2 nanoparçacıklarının biyoyumluluğunu arttırmak için, polietilen glikol (PEG) kullanılmaktadır. Nanoparçacıkların yüzeyinin PEG ile modifikasyonunda, nanoparçacıkların kandaki dolaşım süresini uzatabilir ve mononükleer fagositik sistemden kaçma olasılığını artırabilmektedir (14).

İnorganik fosfat (Pi) canlı organizmalar için gerekli bir besindir ve hücreler büyümesinde önemli rol oynamaktadır. Enerji metabolizması, kinaz / fosfataz sinyalleşmesinin, lipidlerin, karbonhidratların ve nükleik asitlerin oluşumunda ve işlevinde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda birçok hücre tipinde sinyal iletim yollarını, gen ekspresyonunu ve protein bolluğunu değiştirerek önemli bir sinyal molekülü olarak ortaya çıkmaktadır (15).

Glutasyon (GSH), ilaçlarla reaksiyona girerek, ROS azaltarak, proteinlerin veya DNA'nın hasar görmesini önleyerek ve DNA onarım süreçlerine dahil olarak ilaç direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Glutasyon indirgenmiş ve oksitlenmiş (GSH/GSSG) şekiller arasında bir denge hali vardır. Bu dengenin, hücreler redoks dengesini koruması ve sonuçta oksidatif stres koşullarında hayatta kalması için gereklidir (16).

Bu çalışmada insan servikal kanser hücre hattı HeLa üzerine uygulanan TiO_2 , PEG- TiO_2 , PEG- TiO_2 -DOX ve DOX ilaçların etkisi ile hücreler için önemli olan inorganik fosfat (Pi) ve glutasyon (GSH) bileşiklerini etkilenip etkilenmediği tayin edildi.

Bu çalışmada ilk olarak kanser tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılan DOX ilacının PEG-TiO₂ nanotaşıyıcı sisteme yüklenmesi amaçlanmıştır. İkinci olarak elde edilen TiO₂, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-DOX ve DOX ilaçlarının servikal kanser hücre hattı olan HeLa üzerinden uygulanması ve sitotoksitelerinin 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5 - difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, oksidatif stres (*GPXI*, *SODI*, *CAT*, *PRDXI*), Wnt sinyal yolağı (*CSNKIAI*, *CTNNBI*, *CCNDI*), hücre ölümü (*NFκBI*, *TOP2A*, *BAX*) ve ilaç metabolizması (*NQOI*, *ABCBI*) gruplarından seçilmiş olan genlerin tayin edilen sitotoksik dozları uygulaması ile ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

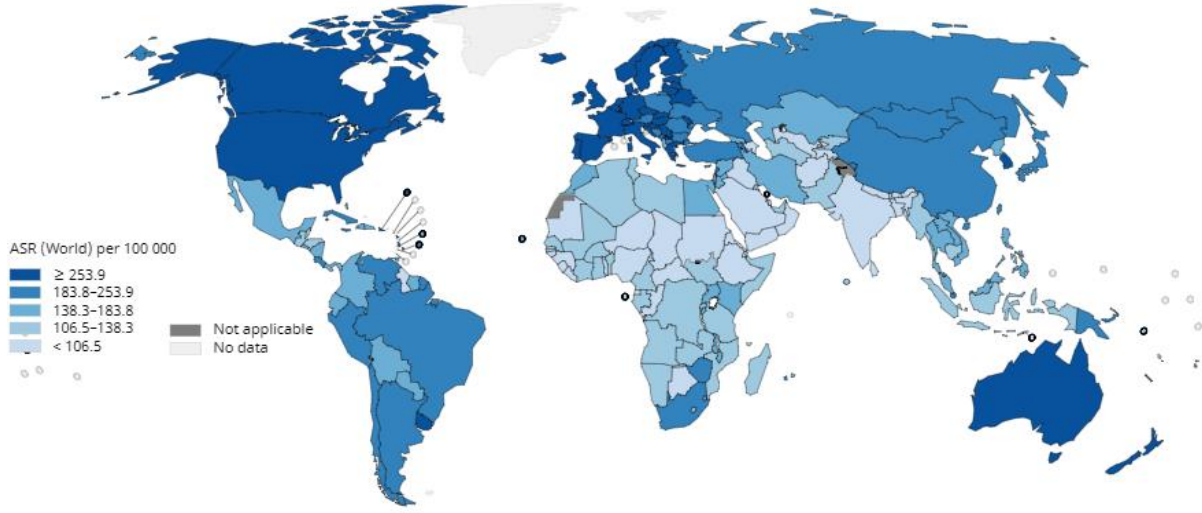


2. Genel bilgiler:

2.1. Kanser:

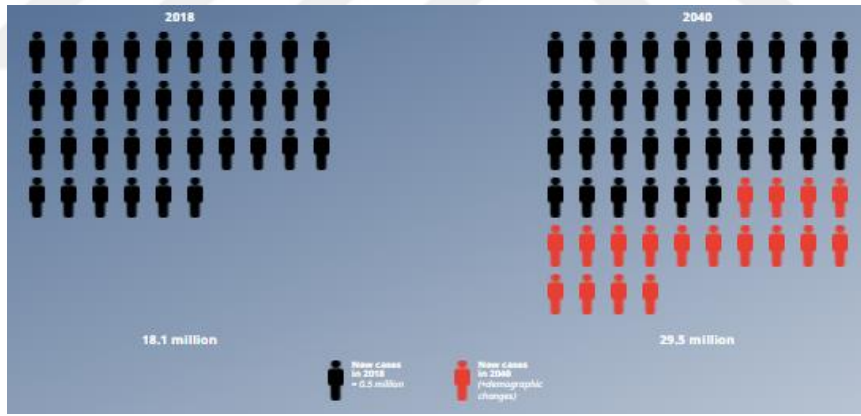
Kanser, günümüzde tüm dünya ülkeleri için büyük sorun teşkil eden hastalıkların başında gelen ve vücuttaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi sonucu oluşan bir hastalıktır. Tıp terimlerine göre tümör iki ana tipe ayrılmaktadır. Birincisi olan vücutta diğer bölgelere yayılmaz ve canlının yaşamın tehlikeye sokmayan benign tümör adı verilmektedir. İkincisi olarak oluştukları yerlerden tümör hücreleri ayrılıp lenf ve kan yoluyla vücuttaki uzak bölgelere metastaz yapma kapasitesine sahip olan malign tümör veya kanser adı verilmektedir (1). Genetik olarak kanser, hücre fonksiyonları, büyümesi, bölünmesi ve olgunlaşmayı kontrol eden genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (17). Bu gen mutasyonları normal hücrelerde DNA'nın hasar görmesine neden olur ve bu hasar onarılamamaktadır (18). Bu gen mutasyonları bazı dahili ajanlar; hormonlar, immün koşullar ve kalıtsal mutasyonları gibi, veya harici ajanlar; karsinogen kimyasal maddeleri, radyasyon, UV ışını ve virüsler gibi etkilere maruz kalma sonucu oluşmaktadır (19). Sağlıklı hücreler, vücudun ihtiyaç duyduğu gibi yeni hücreler oluşturmak için büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandıkça veya hasara girdiğinde ölür ve yerini yeni hücreler alınmaktadır. Ancak kanser geliştiğinde, kontrollü süreçleri bozulur ve ihtiyaç duyulmadığı halde yeni hücreler oluşmaktadır. Oluşan yeni hücreler sürekli ve kontrolsüz bölünür, böylece tümör oluşumu başlar ve ilerlemektedir. Normal koşullarda hücre büyümesi ve bölünmesi proto onkogen vasıtasıyla kontrol altındadır. Ancak gen mutasyonları ortaya çıkınca kontrolsüz hücre büyümesine ve bölünmesine yol açan oncogene dönüştürür ve böylece tümör hücreleri oluşmaktadır (20).

Dünyada her yıl yaklaşık 11 milyon kişi kansere yakalanmaktadır. Dünya genelinde ölüm nedenlerinin % 12,5'inin kanser kaynaklı olduğu bilinmektedir. Dünyada belirti olduğunda, Türkiye'de ikinci sırada ölüm nedenlerinden olan kardiyovasküler hastalıklardan kanser gelmektedir (2). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2017 raporunda, kanserin gelecek yirmi yıl içinde yaklaşık % 70 oranında artış göstermesidir (21). 2008 yılında küresel olarak 12.7 milyon yeni kanser vakası ve kanserden ölüm oranınının 7.6 milyon olduğu kaydedilmiştir (22). Bu sayılar 2012 yılında 14.1 milyon yeni vaka ve 8.2 milyon kanserden ölüm (4), 2013 yılında 14.9 milyon yeni vaka ve 8.2 milyon kanserden ölüm (23), ve son olarak 2015 yılında 8.8 milyon kanserden ölüm oranlarını artırmıştır (24). 2018 yılında elde edilen verilere göre, Dünya'da 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.6 milyon kanser ölüm vakası saptanmıştır (Şekil 1) (25).



Şekil (1): Dünya çapında 2018 yılı tahmini yaş standardize insidans oranları, tüm kanserler, her iki cinsiyet, her yaş (25).

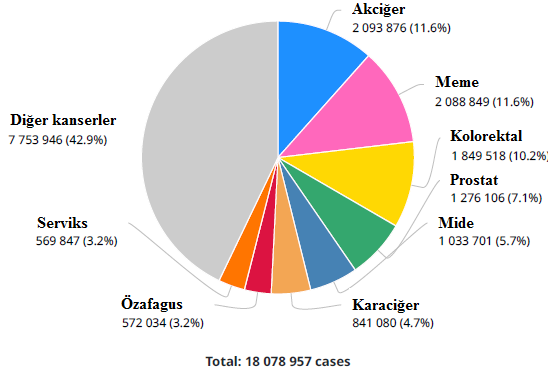
Verilerine göre 2030’de tüm kanserlerin her iki cinsiyette, dünya çapında görülen tahmini vaka sayısı 22.2 milyona, 2040 yılında ise 29.5 milyona yükselebileceği öngörülmektedir (Şekil 2) (25).



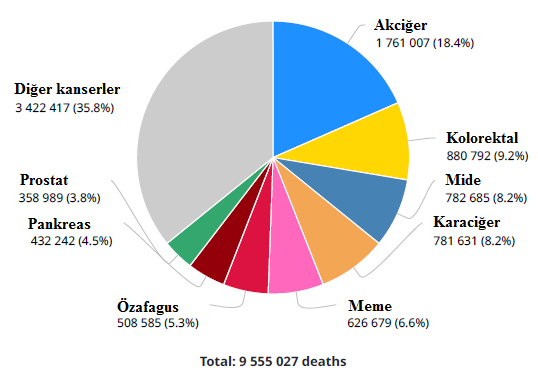
Şekil (2): Dünya’daki tüm kanserlerin her iki cinsiyette 2040’taki tahmini vaka sayısı ve 2018 vaka sayısı (GLOBOCAN 2018) (25).

Dünyada tahmin edilen vakalarla ve ölümlerle ilgili ilk 10 kanserlerinden biri her iki cinsiyet için en sık tanı olan %11.6 oranı ile ve ölümlerde ilk sırası yer alan %18.4 oranı ile akciğer kanseridir. İkinci sırada insidans oranına göre meme kanseri %11.6 oranı ile gelmiştir. Buna takiben insidans oranına göre (9.2%) kolorektal kanseridir. Mortalitesine tabi olarak kolorektal kanseri (% 9,2), mide kanseri (% 8,2) ve karaciğer kanseri (% 8,2) görülmektedir (Şekil 3) (25).

2018'de, her iki cinsiyette, bütün yaşlardaki yeni vakaların sayısı

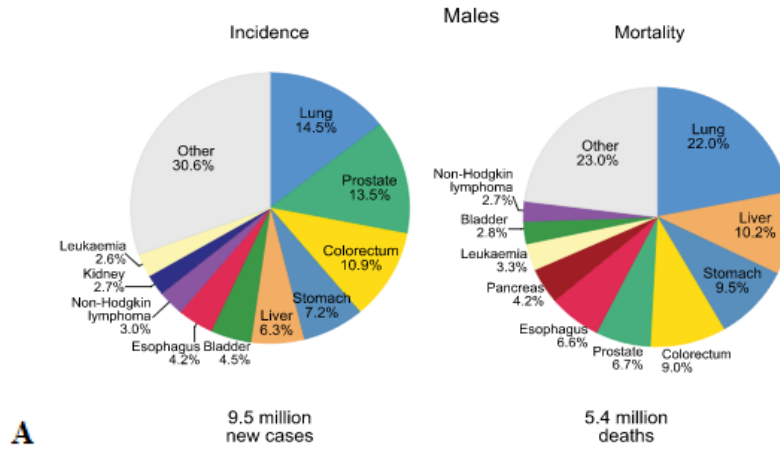


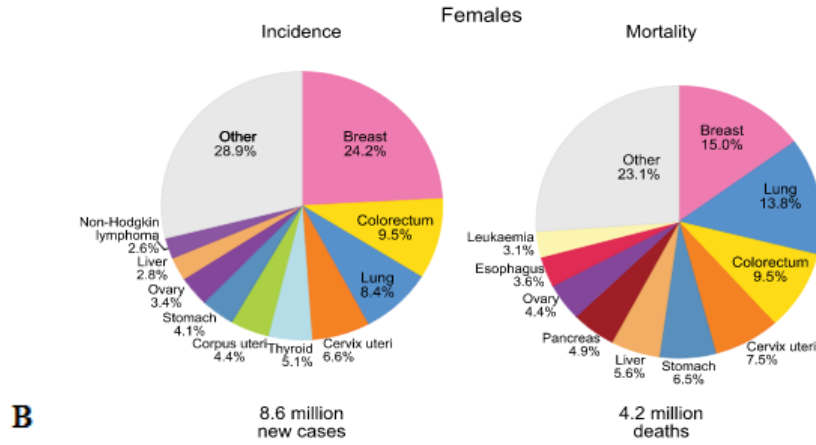
2018'de, her iki cinsiyette, bütün yaşlardaki ölümlerin sayısı



Şekil (3): Dünya çapında her iki cinsiyette 2018'de en sık görülen kanser vakalarının ve ölümlerinin oranları (GLOBOCAN 2018) (25).

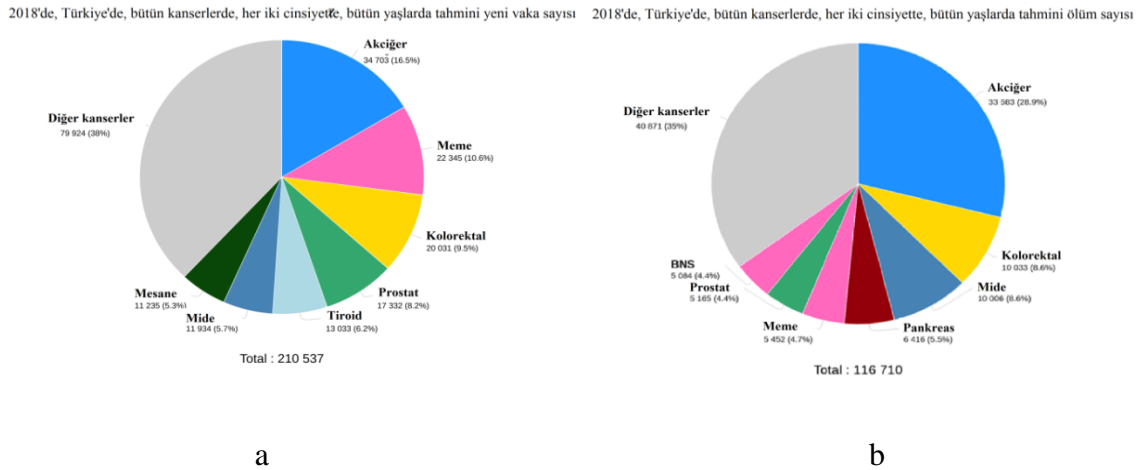
Cinsiyete bağlı kanser insidansı karşılaştırıldığında şekil (4)'e göre erkeklerde oranı (%52.49) kadınlardaki orandan (%47.51) daha yüksek görülmektedir. Cinsiyete göre, erkeklerde en sık teşhis edilen (%14.5) ve ölüme neden olan (%22) akciğer kanseri, ve insidans oranına göre prostat (%13.5) ve kolorektal (%10.9), mortalitesine göre karaciğer (%10.2) ve mide (%9.5) kanserleri takip etmektedir. Kadınlarda ise en sık teşhis edilen (%24.2) ve ölümüne neden olan (%15) meme kanseri, ve insidans oranına göre kolorektal (%9.5), akciğer (%8.4) ve serviks kanser (%6.6) mortalitesine göre akciğer (%13.8), kolorektal (%9.5) ve serviks (%7.5) kanserleri takip etmektedir, (Şekil 4) (25, 26).





Şekil (4): Cinsiyete bağlı erkeklerde (A) ve kadınlarda (B) dünya çapında kanser vakalarının ve ölümlerinin oranları (25).

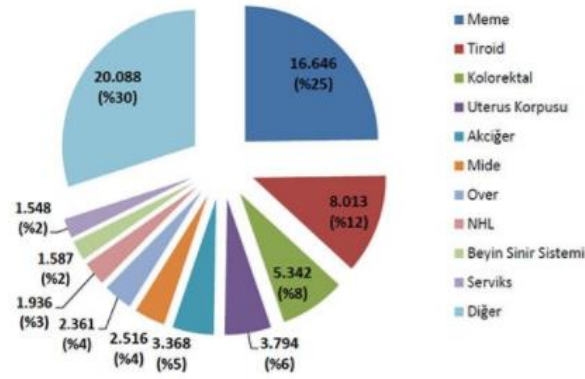
2018 verilerine göre Türkiye'de 210537 yeni kanser vakası ve kanser ölüm sayısının 118882 olduğu bildirilmiştir. Kanser vaka sayısına göre Türkiye'de her iki cinsiyette akciğer kanseri (34703) sayısı ile en sık görünmüştür. Akciğer kanserini takiben, meme kanseri (22345), kolorektal kanseri (20033), prostat kanseri (17332) ve tiroid kanseri (13033) görülme sıklığı sırasıyla görünmüştür. Ülkemizde her iki cinsiyette en sık ölüm nedeni kanser tiplerinden akciğer kanseridir ve ardından sırasıyla kolorektal kanseri (10033), mide kanseri (10006), pankreas kanseri (6416) ve meme kanseri (5452) yer almaktadır (Şekil 5), (25, 27).



Şekil (5): Türkiye'de 2018'de her iki cinsiyette bütün yaş gruplarında kanser vakalarının (a) ve mortalitesinin (b) oranları (GLOBOCAN 2018) (25, 27).

Türkiye'de yapılan istatistik çalışmalarda elde edilen verilerine göre kadınlarda en yaygın olan kanser türü meme kanseridir (% 24.4). Buna takiben, tiroid kanseri (% 11.5), kolorektal kanseri (% 9.3) şekil 6'de görünür, servikal kanseri ise (%2) vaka oranlarından oluşmaktadır.

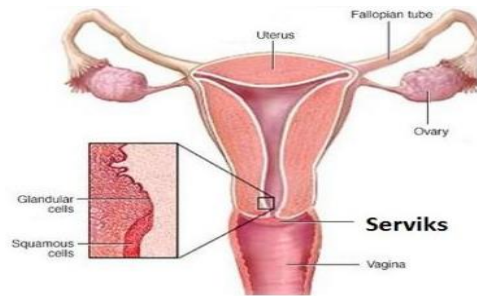
Buna karşılık ölümüne neden olan en sık görülen kanserlerden sırada meme kanseri (%12.9), akciğer kanseri (%12.2), kolorektal kanseri (% 10.6) ve servikal kanser ise ölüm oranından (%2) (25).



Şekil (6): Türkiye’de 2018 yılı, kadınlarda, 0-75 yaş en sık görülen kanserlerin vaka sayısı ve % oranı (25).

2.1.1. Servikal Kanser:

Rahim boynu serviks olarak da adlandırılır. Serviks, uterusun alt dar kısmına verilen addır. Serviksi kaplayan hücreler skuamos hücreler ve glandüler hücreler olarak adlandırılmaktadır. Servikal kanser, serviks dokularında malign hücrelerin oluşturduğu bir hastalıktır.



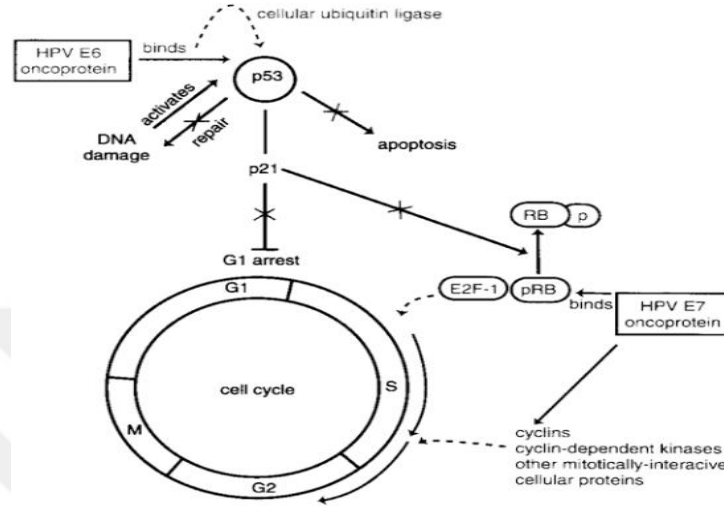
Şekil (7): Kadında üreme sistemi ve serviks yeri.

Servikal kanser hastalığı kadınlarda en sık teşhis edilen dördüncü kanser ve kanser ölümünün dördüncü nedeni olarak sıralanmaktadır (28). Kadınlarda servikal kanser muhtemelen dünyada her iki dakikada bir kadın ölümüne neden olmaktadır (4). Servikal kanser, yüksek / çok yüksek İnsani Gelişme İndeksi (İGİ) bölgelerinde kadınlar arasında meme kanserden sonra ikinci sırada yer almaktadır (25). Servikal kanserin, özellikle 50-60 yaş arası kadınlarda ve az gelişmiş ülkelerde yaşayan 15-44 yaş arası kadınlarda yaygın olarak görünmektedir (29). Aynı zamanda servikal kanser yavaş ilerlemesi, lezyonların varlığının saptanabilmesi ve

etkili tedavilerin sunulması nedeniyle en önlenebilir kanser tiplerinden birini oluşturmaktadır (30). 2012 yılında, dünya çapında 528000 yeni vaka ve 266.000 servikal kanserinden ölüm sayısı bildirilmiştir (4). 2018 yılında ise 569847 yeni vaka (% 3.2) ve 311365 (% 3.26) servikal kanserden ölüm sayısı ve oranı kaydedilmiştir (25). Servikal kanserden ölüm vakalarının yaklaşık % 86' sının gelişmekte olan, düşük ve orta gelirli ülkelerde bulunması nedeniyle, bu kanserden ölümlerin sağlık eşitsizliğinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (31). Bu nedenle, yeni tanı yöntemleri, servikal kanserinin erken teşhisini geliştirmeye ve sonuç olarak morbiditeyi ve daha iyi hastalık prognozunu en düşük seviyeye indirmesine yol açmıştır. Türkiye, servikal kanser vakalarının en düşük olduğu Batı Asya grubu ülkeleri içinde yer almaktadır (4). Servikal kanserin dünyada kadınlarda en sık dördüncü sırada görülmekte iken, ülkemizde iki cinsiyette yaşa göre 2.356 (1.12%) vaka sayısı ve oranı ile on sekizinci sırada, 1.280 (1.1%) ölüm sayısı ve oranı ile on yedinci sırada yer almaktadır (25).

Genital HPV enfeksiyonları ile servikal kanserin arasındaki ilişki 1980'lerin başında Alman bir virolog Harold zur Hausen tarafından ilk kez ortaya konmuştur. 1996 yılında, servikal kanserin oluşumunda önemli bir nedeni olarak HPV, Dünya Genital Enfeksiyon ve Neoplazi Araştırma Teşkilatı ve Ulusal Sağlık Enstitüleri Servikal Kanser Konferansı ile birlikte Dünya Sağlık Birliği tarafından kabul edilmiştir. Cinsel temas yoluyla yayılabilen ve öncelikle serviks, vajina, vulva, penis ve anusu enfekte edebilen yaklaşık 30 HPV tipi saptanmıştır (32). Epidemiyolojik çalışmalar, genital HPV enfeksiyonu ve serviks kanserine yakalanma riskinin cinsel aktiviteden etkilendiğini göstermiştir (33). Cinsel aktiviteden sonra HPV enfeksiyonunun riskinde önemli bir belirleyici yaş faktörüdür. HPV enfeksiyonu ergenlik ve ilk hamilelikte meydana gelen ve menopozdan sonra azalan metaplastik aktivite ile ilişkilidir. HPV enfeksiyonu 18 ila 30 yaş arasındaki cinsel olarak aktif kadınlarda en yaygın olmasına rağmen, servikal kanserin 35 yaşından üstü kadınlarda daha yaygın görünmektedir. Bu sonuçlar, HPV ile enfeksiyonun daha genç yaşlarda ortaya çıktığını ve servikal kanserine yavaş ilerlediğini açıklayabilmektedir (34). Araştırmalarda, servikal kanserin gelişiminde önemli roller oynayan diğer faktörler saptanmıştır. Bazı çalışmalarda, oral kontraseptiflerin uzun süreli kullanımının yüksek dereceli servikal hastalıkları için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (35). Diğer taraftan servikal kanser risk faktörü olarak kabul edilen sigara içme görünmektedir (36). Servikal kanser hücrelerde yapılan çalışma, sigara kimyasal bileşenlerden etkisiyle oluşan mutajenik aktivitesi ile indüklenen lokal bağışıklık süpresyonu HPV enfeksiyonu devamında rol oynadığını gösterilmiştir (37). Bu nedenle sigara içimi, servikal kanser gelişiminde rol oynayan HPV enfeksiyonundan bağımsız olarak önemli risk

faktörü olduğu görünmüştür (36). Diğer faktörlerinden biri olan düzensiz sinyalleşme yolları, WNT / β -katenin gibi, servikal kanserin hastalarda HPV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. HPV E6 ve E7 genleri, öncelikle hücresel p53 ve pRB proteinlerine bağlanan, işlevlerini bozan ve hücre döngüsü düzenleyici yollarını değiştirerek hücresel dönüşümüne yol açan çok fonksiyonel proteinleri kodlamaktadırlar (Şekil 8) (38).



Şekil (8): Onkojenik HPV'nin patogenezi (38).

Virologlara göre HPV virüsü iki farklı genel grupta sınıflanmaktadır. Birinci grup yüksek riskli HPV 16, 18, 31, 33 ve 45 ikinci grup ise düşük riskli HPV 6 ve 11'i içermektedir (39). İnsan papilloma virüsü tiplerinden yüksek riskli insan papilloma virüsü (HRHPV) 16/18'dir ve HPV onkojenleri E6 ve E7'nin aşırı ekspresyonunun malign transformasyon ve servikal kanser gelişiminde bağlantılı olduğu bildirilmiştir (40).

Patolojik anatomik çalışmalara göre servikal kanserin invaziv skuamöz hücreli karsinom (ISCC, % 85-90) ve Adenokarsinom (ADC,% 10-15) olarak sınıflandırılmıştır. Rahim serviksini adenokarsinomu, müsinöz endoservikal epitelyumdan gelişen nadir bir servikal kanser türüdür (41). Sürekli HPV enfeksiyonu nedeniyle invaziv ADC gelişmektedir. Dünya çapında ISCC prevalansı önemli ölçüde azaldığı buna karşılık ADC vakalarını arttığı bildirilmiştir (42).

2.1.1.1. Servikal kanserin belirtileri:

Servikal kanserinde ağrısız kanama ve et suyu renkli vajinal akıntı en tipik bulgular olarak kabul edilmiştir (43). Servikal kanser belirtilerini, anormal vajinal kanama, postmenopozal kanama, adet kanamalarının uzun sürmesi ve normalden daha ağır geçmesi, ileri evrelerde

kötü kokulu vajinal akıntı, bel ve kasık ağrısı, genital ve anal mukozalarda karnabahar görünümünde tek veya çok sayıda olabilen ağrısız lezyonlar, anemi, kilo kaybı, idrar yapmada güçlük ya da bacak ödemi dahil edilmiştir. Serviks uterus bölgesinde bimanual muayene yaparken enfekte olan doku sert ve girintili, çıkıntılı ve pürüzlü hissedilmektedir (44, 45).

2.1.1.2. Servikal kanserin taraması:

Servikal kanser önlemek için, serviksin intraepitelyal öncü lezyonlarını doğru olarak tespit edilmesi ve doğru zamanda tedavi edilmesi için servikal kanser taramasının yapılması gerekmektedir (46). Servikal kanserin uzun bir preinvaziv döneme sahip olduğundan dolayı, sitolojik tarama testlerinin preinvaziv lezyonlar döneminde etkili bir şekilde kullanılmalıdır (47). Bu testleri kullanıldığında preinvaziv evrede daha fazla hasta teşhis edilebilir ve sağkalım oranları artırabildiği görünmüştür (48). Bu nedenle, servikal kanserin tarama programları servikal kanser insidans ve mortalite oranlarının azaltmak için uygulaması büyük önem taşımaktadır (49). Ülkemizde servikal kanser tarama programları geliştirmek ve taramaları halka yaymak için Papanikolaou testi (PAP smear) ve HPV DNA taraması gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir (50). Çalışmaların, kadınlarda 20-24 yaş arası taramanın 30 yaşına kadar invaziv servikal kanser oranları çok az etkisi olduğunu veya hiç etkisi olmadığını göstermiştir. İlk tarama yaşı 2003 yılında Servikal Kanserin Taraması Danışma Komitesi tarafından 20 yaşından 25 yaşına arttırılmıştır. 29 ila 45 yaşları arasındaki kadınlar servikal kanser tarama testi her 3 yıl yapılması, halbuki 50 ila 64 yaş arası kadınların bu taraması her 5 yıl yapılması belirlenmiştir (51, 52).

2.1.1.2.1. PAP smear testi:

PAP smear testi, serviks ve vajinal epitelden dökülen normal hücrelerin ve hastalığa bağlı olarak değişen hücrelerin incelenmesine bağlamaktadır (53). PAP smear testi, endoservikal kanalda preinvaziv ve kanserli hücreler tespitinde çok önemli rol oynar, ve bu aşama kanser tedavisi ile hücreler kansere dönüşümünü önlenebilmektedir (54). PAP smear testini erken tanı için kullanılabilir ve bu test kolayca uygulanabilir, diğer taraftan düşük maliyet, zararsız ve yüksek hassasiyet gibi bazı avantajlara sahiptir. Ayrıca tedavi yükünü, morbidite ve mortaliteyi azaltmaktadır (55). Bir negatif PAP smears testi kanser riskini %45 oranına azaltmakta iken, dokuz negatif PAP smears testi ömür boyu bu riski %99 oranına azaltmaktadır (56). Türkiye Sağlık Bakanlığına tabi Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı tarafından hazırlanan ve 2009–2015 yıllarını kapsayan kanser tarama programında, serviks kanseri ulusal tarama programı uygulanmıştır (48). PAP testi, 35-40 yaş arası servikal kanser

ulusal tarama standartlarına göre her kadın en az bir kez yapmasıdır. Daha sonra beş yıllık aralıklarla tekrarlanması ve son üç testi negatif olan 65 yaşındaki kadınlarda taramanın sonlandırılması önerilmektedir. Yüksek dereceli lezyonlar olarak kabul edilen servikal intraepitelyal neoplazi- CIN II / III nedeniyle histerektomize edilen olgularda son 10 yılda teknik olarak yeterli üç negatif sitoloji ve anormal / pozitif sitoloji olmadığında tarama kesintisi, HIV enfeksiyonu veya immünoşüpresif tedavi alan hastalarda ilk yılda iki kez ve sonuçların negatif olması durumunda yılda bir kez yapılması tavsiye edilmiştir (57, 58).

2.1.1.2.2. HPV DNA testidir:

Çalışmalarda, HPV DNA testinin servikal kanser ile ilişkisini, ve servikal kanser olan hastaların % 99.9'unda HPV DNA varlığının mevcudiyetiyle gösterilmiştir (59). Son yıllarda HPV DNA testinin sitolojik veya bilinen diğer tarama yöntemlerinden daha duyarlı olduğu geliştirilmiş bir test olduğu gösterilmiştir (60). HPV DNA testi, günümüzde 30 yaş üstü kadınlar için en kabul edilen tarama yöntemi gibi görünmektedir. ASCCP (Amerikan Kolposkopi ve Servikal Patoloji Derneği) ve ACOG (Amerikan Kadın Doğum Uzmanları ve Jinekologlar Koleji) kadınların 30-65 yaş arası her beş yılda HPV DNA test taramanın bir kez yapılmasını önermektedir (61). HPV enfeksiyonları oldukça geçici olduğundan HPV DNA testi, 30 yaşın altındaki HPV ile enfekte hastalarda persistansının düşük olmasından ve testin yanlış pozitif oranını arttırdığından önerilmemektedir. Bu nedenle, 21-30 yaş arasında her üç yılda sadece sitoloji tarama yapılması tavsiye edilmektedir (62).

2.1.1.3. HPV enfeksiyonunun önlenmesi:

HPV enfeksiyonunun önlemek için önerilen yolları hem risk azaltma hem de HPV aşılarının geliştirilmesini kapsamaktadır. Lateks kondom ve spermisit, HPV enfeksiyonunun riskini azaltabilmek için kullanılmaktadır. Ayrıca, HPV enfeksiyonu riskini azaltmak için birden fazla kişi ile cinsel ilişkiden uzak durulmalıdır (63). HPV enfeksiyonunu önlemek için önemli bir yol olan ve HPV'ye karşı kullanılan HPV aşılarıdır (64). HPV aşıları genellikle büyük HPV kapsid antijenini ve muhtemelen minör kapsid antijenini içeren ancak viral DNA içermeyen boş virüs kapsidleri olan virüs benzeri parçacıklardan (VLP) oluşmaktadır. Bu aşılar, L1 veya L1 ve L2 (Kapsid proteini L2, hem papillomavirüs mekanizmasında hem de bulaşıcı süreçte önemli roller oynar) ORF'lerin eksprese edilmesi suretiyle ökaryotik hücrelerde üretilmektedir (65). Optimal aşılar, en yaygın yüksek riskli HPV alt tiplerinden bir VLP karışık içermelidir. Birinci aşama güvenlik ve immünolojik test denemeleri, HPV-16 tüm L1 majör kapsid proteininden oluşturulan VLP'den oluşan bir aşı kullanılarak yapılmıştır

(32). HPV-16 L1 VLP aşısının 50 µg optimal dozunda, 0, 1 ve 4 ayda deltoid kasta enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Yapılan deneyler, bu aşının, yardımcı maddeler olmadan yüksek tip özel nötralize edici antikör üretti ve iyi tolere edildi göstermiştir (34, 66).

2.2. Kanser tedavi yöntemleri:

Kanser tedavisinde en yaygın kullanılan cerrahi, radyasyon ve kemoterapi teknikleridir (67). Tedavi seçeneklerinden biri, kanserli bölgeyi ortadan kaldıran cerrahi yöntemdir. Ancak kanserin tekrar ortaya çıkmasını bu yöntemin dezavantajlarından biridir. Ayrıca, kanserin tedavisinde tüm vakalar için cerrahi yöntemini uygun değildir (6). İkinci yöntem ise kanser tedavisinde radyasyon tedavisinin kullanılmasıdır. Bu yöntemde kanserli hücreler, spesifik frekans bandı ile radyasyon işlemine maruz bırakılmaktadır. Bu tedavi yönteminin kullanılarak sağlıklı hücrelerinde zarar görmesi, kanserli hücrelerin tamamen ortadan kaldırılamaması dezavantajlardan görünmüştür (68).

Kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerden diğeri ise kemoterapi tedavisi yöntemidir. Kemoterapi tedavisinde kanserli hücrelere toksik olan ilaçların uygulanması ile hücrelerin bölünmesi veya hücrelerin bölünmesinden sorumlu olan mekanizmaları durdurmaktadır. Sadece erken evrede değil, aynı zamanda hastalığın geç evresinde farklı kanserli hastalar kemoterapi ile daha fazla sağkalım faydası elde etmektedir (69). Kemoterapi tedavisinin dezavantajları arasında, sağlıklı hücrelerin zarar görmesi ve kanserin ileri evrede olması durumunda başarı oranının düşük olması yer almaktadır (11). Konvansiyonel kanser tedavisinin başarısızlığı ile ilgili birçok nedeni vardır. Bazı ilaçlar çoğalan kanser hücrelerinin çoğunu öldürür, ancak kemoterapiyi takiben bölünebilen ve nüklere neden olabilecek uyuyan kanser hücrelerinde etkilememektedir (70). Dolayısıyla, sadece çoğalan kanser hücrelerini hedeflemek kemoterapinin daha az etkilidir. Konvansiyonel kemoterapi başarısızlığından sorumlu olan bu uyku halindeki veya dirençli kanser hücreleri, kanser kök hücreleri olarak kabul edilmiştir (71). Kanser hücrelerini inhibe etmede kullanılan konvansiyonel kemoterapi normal dokulara zarar verebilir ve ayrıca kemik iliği baskılanması gibi birçok yan etkiye neden olabilmektedir (72). Kemoterapötik ilaçları hidrofobiktir, suda çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle düşük biyoyararlılığa neden olmaktadır. Bu ilaçlar bulantı, kusma ve nörotoksisite dahil olmak üzere birçok yan etkiye sahiptir (69, 73).

Bu nedenle, klasik kemoterapi etkinliğini arttırmak ve yan etkilerini azaltmak için, kanser hücrelerini (özellikle kanser kök hücreleri) hedefleyen potansiyel olarak etkili ilaçların araştırmak ve bu ilaçların normal dokulara değil, kanserli dokulara aktarılmasını sağlamak

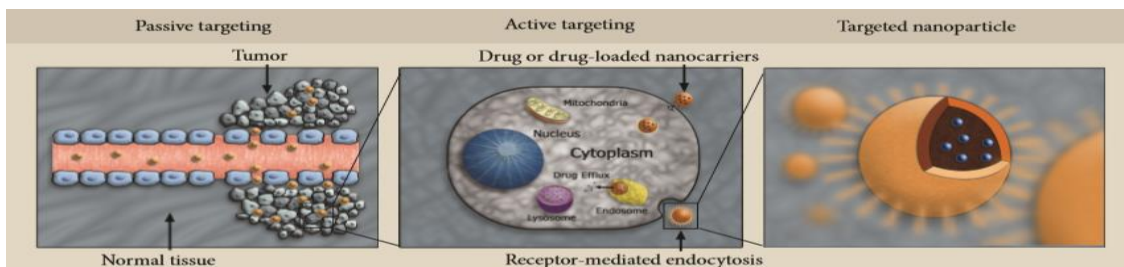
için yeni bir ilaç dağıtım sistemi tasarlanmasını gerekli hale gelmektedir. Bu süreç, hastanın yaşam kalitesini artırma açısından da önemlidir (72).

2.3. Nanoteknoloji ve nanoparçacıkları:

Nanoteknoloji, son yıllarda büyük ilgi çeken modern bir tekniktir. Nanoparçacıklar (NP'ler), nanoteknolojinin temel bileşenini oluşturmaktadır. Son yıllarda nanoteknoloji tekniklerinin hızlı bir şekilde geliştiği görülmektedir. Üretilen NP'ler fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle tekstil, elektronik, katalizörler, atık su arıtımı, biyotıp, plastik dolgu maddeleri, antibakteriyel maddeleri ve yeni farmasötik form üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (74). NP'ler, karbon, metal, metal oksitler veya organik maddelerden oluşan, ve (1-100) nanometre arasındaki boyutlarda olan parçacıklardır (75). NP'ler, sağlıklı dokuyu korurken ilacı doğrudan tümöre hedefleyen ilaç taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır. Nano taşıyıcıların klasik kemoterapiye göre birçok avantajları vardır ve nanomalzemelerin ilaç taşıyıcıları olarak çeşitli avantajlar sunmaktadır (76). Büyük olan ilaç parçacıkları vücudun uzak bölgelerine ulaşamazlar bu nedenle parçacıkların hücre sınırına nüfuz edip geçmeleri için nano ölçekli boyutlarda olması gerekmektedir. Küçük kılcal damarlar 5-6 µm çapa sahiptir ve mikroparçacıkların çoğu bunlardan geçememektedir. Bu nedenle NP'ler intravenöz uygulaması için mikroparçacıklardan daha uygundur. Sistemik dolaşımında, parçacık çaplarının vücudun çeşitli kısımlarına erişebilmek için 10-100 nm aralığında olması gerekmektedir (77). Nanomalzemeler ilaç etkinliğini artırır, çünkü bunlar mikro moleküllerden daha etkili bir biçimde hücreler tarafından tüketilmektedir. İlaç nanoparçacık matrisine entegre edilir veya parçacık yüzeyine eklemektedir. NP'ler, yüzey / hacim oranını çok yüksek olmasından dolayı, çözünme hızını artırmaktadır. Bununla beraber nanomalzemeler, hedeflenen bölgede ilaç dağıtımını artması yoluyla ilacın alımını arttırmaktadır (78). NP'ler, parçacık yüküne, yüzey özelliklerine ve hidrofobikliğe bağlı olarak organlar veya dokular üzerinde adsorbe etmek için formüle edilmektedirler. Nanomalzemelerin, istenmeyen yan etkilerinin kontrollü bir şekilde azaltılmasında rol oynamaktadır (79). Nanosferin ilacı kapsüllemesi herhangi bir kemoterapötik maddenin tercih edilen kalitesini oluşturur, çünkü bu yöntem kullanarak ilaç bozulmaya karşı koruma sağlar ve ilacın sınırlı salınımı ile maruz kalma süresini uzatmaktadır (77). Bu nedenle nanomalzemelerin farmasütikal endüstri alanı kullanıldığında tedavi endeksini iyileştirmiştir. Nanomalzemeler ile ilgili ilaç taşıyıcıları, ilaçları hedeflerine ulaşmadan önce vücutta bozulmalarını önleyebilir ve bu ilaçlardan en iyi etkiyi elde etmek için biyoyararları arttırabilmektedir (80). Nanomalzemeler yeni bir strateji olan kanser tedavisinde kullanılmıştır. Nanoteknoloji ile hazırlanan anti kanser ilaçların tümör bölgesine

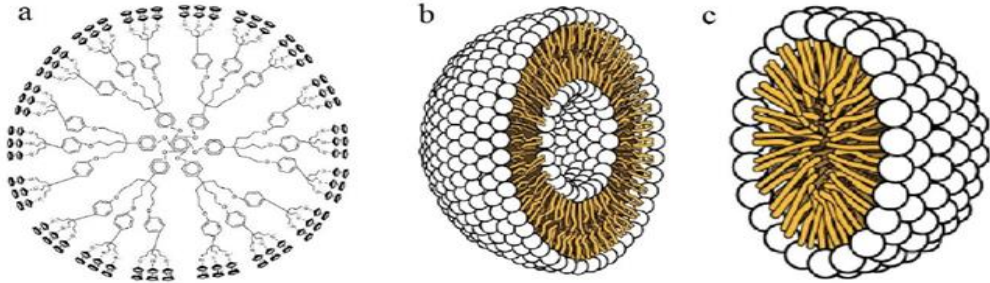
emilimini artırır ve böylece kanserli hücreler ilaçların normal hücrelerle etkileşime girmesini önleyerek yan etkileri ve toksisitesini azaltmaktadır (81). Bu nedenlerden dolayı nanaotaşıyıcı tabanlı hedefe yönelik anti kanser ilaç geliştirmeye çalışmalar dünyada ve ülkemizde oldukça üstünde durulan bir araştırma konusu olmayı başarmıştır.

1970'lerde yapılan ilk çalışmalarda anti tümör ilaçlar hazırlamak için nano boyutlarda lipozomlar kullanılmıştır (82). Nanoyapılı modellerin geliştirilmesinde ilaç dağıtımı ve kontrollü serbest bırakmak özelliklerinden dolayı yeni anti tümör kemoterapi tekniği oluşturmaktadır (83). NP'lere verilen antikanser etkileri fizikokimyasal özelliklere, ya intrinsik özelliklerine bağlı olarak antioksidan etkileri gibi, ya da infrared ışınların veya manyetik alanların uygulanmasına yanıt olarak hipertermi gibi dış uyarıların uygulanmasına dayanan aktivitelere bağlıdır (84, 85). Bazı özelliklere sahip nanopartiküllerin, fotodinamik terapide ve hipertermide terapötik antitümör yaklaşımlarında farklı roller oynamaktadır. Dışardan gelen radyasyon kaynağı vasıtası ile uyarılan nanoparçacıkların, serbest radikaller üretmekte apoptozun indüklenmesi ile kanser hücrelerini öldürmektedir (86). Radyoterapide nanoparçacıkların yardımcı faktörü olarak işlev gösterebilmektedir. Böylece iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile tümör hücrelerin öldürmesini arttırabilmektedir (87). Nanoparçacıklar, tümör çevresindeki bulunan kan damarları veya stroma gibi etkilediğinden dolayı tümör kütesinin gelişimini azaltmaktadır. Nanoparçacıkların antioksidan özellikler ile tümör ilerlemesi oranını azalttığı gösterilmiştir (88). Kanser tedavisi nanoparçacıklar kullanıldığında pasif veya aktif yollar ile gerçekleşmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan pasif yol, artan geçirgenlik ve tutma etkisine (EPR) bağlanmaktadır. Kanserli dokuda bulunan anjeogenez durumundan dolayı, nanoparçacıkların kanserli dokuya kolayca yayılmasını ve kanser hücreleri öldürmesini sağlamaktadır (89). Pasif yol ile ilaç verdiğinde bazı sorunlar vardır. Bu sorunların ana nedeni olan kanser hücrelerde bulunan sızıntılı vascülatürün ilaçlar hedef dokuya vermesini önlemektedir (90). Bu sorunları ilaç dağıtım sistemindeki olan aktif modeli ile verdiğinde azaltılabilmektedir (Şekil 9) (91).



Şekil (9): Nanoparçacıklar ile aktif ve pasif hedefleme (91).

NP'ler genellikle organik, inorganik ve karbon bazlı olarak sınıflandırılmıştır. Organik NP'ler polimerler olarak tanımlanır ve dendrimerler, miseller, lipozomlar içermektedir (Şekil 10). Yapılandırılmış nanokapsüller genellikle çekirdek-kabuk yapılı kolloidal sistemler olarak tanımlanmıştır. Hidrofobik çekirdek, hedef hücreye taşıma sırasında içeriği koruyan hidrofobik ilaçlar için bir rezervuar görevi yapmaktadır (92). Hidrofilik kabuk, mononükleer fagosit sistemi tarafından hedef alınması gibi özelliklere olması fizyo-kimyasal olarak modifiye edilebilmektedir. Çalışmalar, NP'ler'in biyolojik olarak vücutta parçalanabilme ve toksik olmayan gibi bazı özelliklere sahip olduğunu, miseller ve lipozomlar gibi bazı parçacıklar, nanokapsüller olarak da bilinen içi boş bir çekirdeğe sahip olduğunu, ısı ve ışık gibi termal ve elektromanyetik radyasyona duyarlı olduklarını göstermiştir (93). Benzersiz özelliklere sahip olan bu formlar, ilaç dağıtımı için ideal bir seçim haline getirmektedir (94). Organik NP'ler, ilaç taşıyıcılarından biri, kontrollü şekilde ilaç dağıtımı, biyotoksisite düşürmesi, zayıf suda çözünür ilaçların biyoyararlılığını iyileştirilmesi, daha iyi stabilite, kolay ve ekonomik büyük ölçekli üretim gibi avantajları sunmaktadır (95). Organik NP'ler en yaygın olarak biyomedikal alanda kullanılır, örneğin ilaç dağıtım sistemi, aynı zamanda etkili olan ve aynı zamanda hedefli ilaç dağıtımı olarak da bilinen vücudun belirli kısımlarına enjekte edilebilmektedir (96).



Şekil (10): Organik nanopartikülleri: a- dendrimerleri, b- lipozom, c- miceller (92).

NP'ler tamamen karbondan yapıldığında, karbon bazlı olarak bilinmektedir (97). Karbon bazlı NP'ler fullerenler, grafen, karbon nanotüpler (KNT), karbon nanofiberler ve bazen nano boyutta aktifleştirilmiş karbon olarak sınıflandırılmıştır (98).

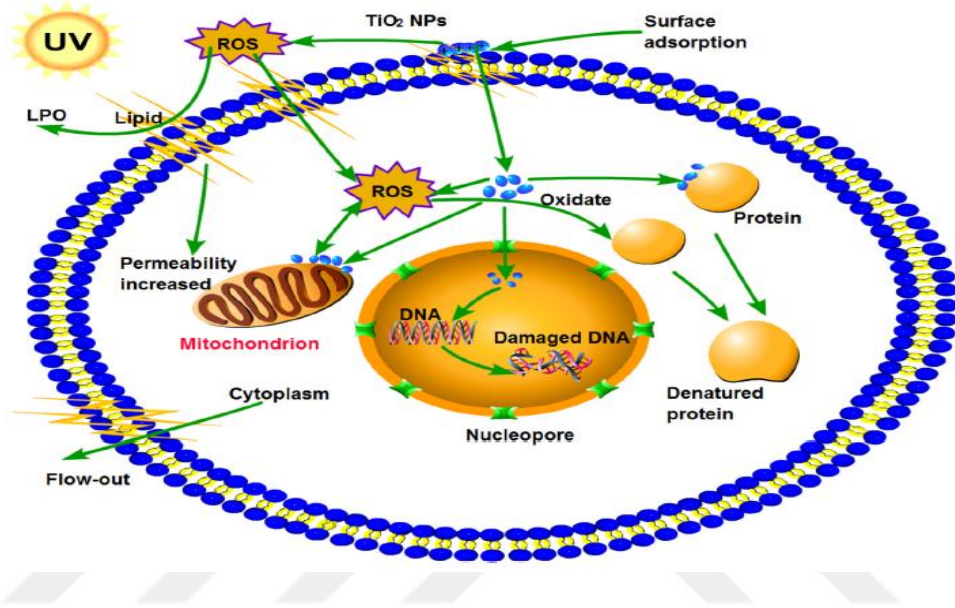
Karbondan yapılmayan başka bir nanoparçacık türü inorganik NP'ler adlandırılmıştır. Metal ve metal oksit bazlı nanoparçacıklar genellikle inorganik NP'ler olarak sınıflandırılmıştır (99). Metal oksit NP'lerin, metal NP'lerini özelliklerini değiştirmek için sentezlenmiştir. Metal oksit NP'leri esas olarak artan reaktiviteleri ve etkinlikleri nedeniyle sentezlenmiştir (100). Bazı çalışmalar, metal oksit NP'leri, tümör hücrelerini in vitro ve in vivo doğrudan öldürmek için

kanser tedavisinde deneysel olarak kullanıldığını göstermiştir (84). İnorganik NP' ler, tümör bölgelerinde ilaç birikimini arttırmak için tasarlanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan çeşitli inorganik nanotaşıyıcılar (demir oksit, mesoporoz silika, grafen oksit ve titanyum dioksit TiO_2 NP'leri gibi) başarılı ilaç dağıtımında ve terapisinde aktivite göstermiştir (101). Çalışmamızda TiO_2 NP'leri kullanılmıştır.

2.3.1. Titanyum Dioksit (TiO_2):

Titanyum Dioksit beyaz, kokusuz ve yanıcı olmayan bir tozdur. TiO_2 , titanyum (IV) oksit, titanya, titanik asit anhidrit ve Ti beyaz gibi birçok farklı isim altında adlandırılmaktadır. İki kristal yapısına sahip olan TiO_2 ve bunlar rutil ve kimyasal olarak daha aktif olan anatazdır. TiO_2 nanoparçacık formlarından biri olan rutil formu titanyum dioksit ince parçacıkları (FP) olarak da adlandırılmaktadır (102). Anataz kristal yapısı arttıkça, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi de artmaktadır. Bu nedenle, anataz TiO_2 sağlıklı hücreler için rutil titanyum dioksitten daha toksik olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar, TiO_2 NP'lerinin insan bronşiyal epitel hücrelerinde mikronükleus artışa neden olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşturduğunu bildirmiştir. Yapılan diğer çalışmada TiO_2 NP'lerin proinflamatuvar sitokinler seviyesi arttırmasında rol oynadığı göstermiştir (102). Bu toksisite, TiO_2 NP'lerin hücre zarından kolayca geçme kabiliyetinden kaynaklanabilmektedir. Çalışmalar, rutil TiO_2 'nin kimyasal olarak atıl kabul edildiğini, fakat parçacıkların küçüldüğünde yüzey alanının artacağını ve bu nedenle rutil TiO_2 parçacıkların zararlı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, NP'lerin yüzeyindeki değişiklikler TiO_2 parçacıklarının aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır (103). TiO_2 NP'leri, yüksek stabilite, antikorozyon ve fotokatalitik özelliklere sahip olması nedeniyle beyaz pigment, gıda renklendirmeleri, kişisel cilt bakım ürünleri, su arıtma maddesi, kozmetik, ve bakterisidal ajan olarak gibi çeşitli endüstri alanlarında kullanılmaktadır (104). Çalışmalara göre TiO_2 NP'lerin, parlaklık ve yüksek kırılma indisi TiO_2 NP'lerin beyaz görünmesini sağladığından, sanayi alanlarında ilk beş NP türünden biri kullanılmaktadır (105). TiO_2 , iyi biyoyumluluk, düşük toksisite, kimyasal kararlılık ve fotokatalitik özellikleri gibi birçok benzersiz özelliğe sahip olduğu için biyomedikal endüstrisinde kullanılmaktadır. Benzersiz özelliklerinden dolayı, TiO_2 NP'lerin ilaç dağıtımı, fotodinamik tedavisi, hücre görüntüleme, biyosensörler ve genetik mühendisliği gibi farklı biyomedikal uygulamalarda ve son zamanlarda kanser tedavisinde kullanılması konusunda birçok araştırma yapılmıştır (13). TiO_2 NP'lerin UV ışığına maruz bırakıldığında katalitik hale gelir ve bu özelliğin katalitik reaksiyonları yoluyla kimyasalları yok etmek için su arıtımında kullanılmıştır (106). Kanser tedavisinde kullanılan fotodinamik (PDT) yöntemi ile, hidrofobik

organik bir molekülden oluşan ve UV ışığı aralığında veya elektromanyetik radyasyon ile uyarılan foto-duyarlılaştırıcı (PS), sitotoksik ROS üretmekte apoptozun indüklemektedir (Şekil 11). Fotodinamik tedavisi UV ışımının gerekli yerinde sokulması gerektiği için, insanlarda kullanımını sınırlamaktadır. Sınırlamalar azaltmak için stratejilerden biri TiO_2 'nin yüzeyi işlevleştirilmesidir. Sonuçlar, işlevselleştirilmiş TiO_2 ve muhtemelen diğer NP'lerin, hedeflenen kanser tedavisi için yüzey mühendisliği yapılabileceğini göstermiştir (107, 108).



Şekil (11): Titanium dioksit nanopartiküllerinin (TiO_2 NP'ler) ışığın etkisiyle ROS oluşum ve ROS rolleri şematik diyagramı (108).

Işık ışınlanması olmadan TiO_2 NP'lerin vücutta uzun süre korunabilir, fakat aynı zamanda toksik değil ve stabil kalmaktadır. Fotodinamik tedavide, TiO_2 NP'leri tetiklemek için dokunun UV veya görünür ışıkla doğrudan aydınlatılması büyük bir engel teşkil etmektedir. Bununla birlikte, UV ve görünür ışığın dokuda sınırlı bir nüfuz mesafesi var olduğu için, kanser hücreleri yüzeyden derinde bulunduğu bir dezavantaj oluşmaktadır (109). Çalışmalar, TiO_2 NP'lerinin geniş çaplı ürün üretimi için kullanılan beş NP türünden ilkinde geldiğini göstermiştir (105).

2.3.2. Polietilen glikol (PEG):

Polietilen glikol (PEG) $HO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$ polieter omurgasını kapsamaktadır. Aktive edilebilen hidroksil gruplarıyla başka polimerlere veya ilaçlar bağlayabilmektedir. PEG'in, insanlarda kullanımı için FDA tarafından onay almıştır. PEG aktif, toksik ve immünojenik olmaması gibi bazı avantajlara sahip olduğundan, oral veya enjeksiyon

uygulamaları için bileşenler listesine dahil edilmiştir (110). PEG birkaç milyon daltona kadar çeşitli moleküler ağırlıklarda bulunur, biyolojik olarak parçalaması zordur ve bu durum vücuttan atılmasını etkileyebilmektedir. Molekül ağırlığındaki değişimlere ek olarak, PEG zincirleri, doğrusal veya dallı olmak üzere iki şekilde sentezlenebilmektedir (111). Su molekülleri, PEG'nin yapısında bulunan eter oksijen moleküllerine hidrojen bağı yoluyla yapılandırılmış bir kabuk oluşturmaktadır. Sıkıca bağlanmış su, parçacık etrafında hidratlanmış bir film oluşturur ve protein etkileşimlerini püskürtmektedir (112). Ek olarak, PEG yüzeyini modifikasyonu ile parçacığın hidrodinamik boyutunu arttırabilmekte parçacık boyutunun yanı sıra moleküler boyuta bağlı bir işlem olan klerensini de azaltabilmektedir (113). NP'lerin yüzeyi PEG ile kaplandığında spesifik olmayan bağlanma ve daha uzun plazma yarı ömrü göstermektedir (114). PEG modifikasyon teknolojisi kolayca kullanılmaktadır ve tümör hedeflemesi için birçok PEG modifiye nanotaşıyıcı ürünü geliştirilmiştir.

Hem ilaç verme hem de görüntüleme uygulamalarında, PEG'nin nanoparçacıklara eklenmesi retikloendotelyal sistem (RES) alımını azaltır ve kaplanmamış nanoparçacıklara karşı dolaşım süresini arttırmaktadır (110). PEG zincirleri, proteinlerin tipik olarak yüke bağlı temasını ve küçük molekül etkileşimlerini azaltmaktadır. Tampon ve serumda çözünürlük, hidrofilik etilen glikol tekrarları nedeniyle artmaktadır ve arttırılmış geçirgenlik ve tutma(EPR) etkisi, bir PEG kaplamanın eklenmesi ile NP boyutu değişikliklerinin meydana gelmesi nedeniyle modüle edilmektedir (115). Bu özelliklere bağlı olarak, PEG ile modifiye edilmiş NP'lerin karaciğerde yüksek oranda birikmektedir ve yapılan çalışmalarda tümör dokusunda daha yüksek birikime sahip olduğu gösterilmiştir (14).

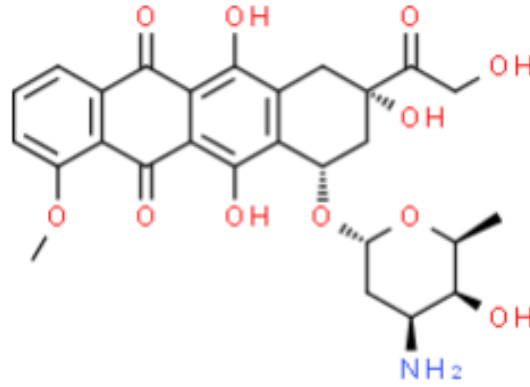
Çalışmamızın amaçlarından birisi de, TiO_2 NP'lerin yüzeyini PEG ile modifiye ederek TiO_2 NP'lerin tek başına olan dezavantajlarının ortadan kaldırılmasını sağlayabilmektir.

2.3.3. Antitümör Antibiyotik olan Doksorubisin:

Servikal kanserin kemoterapötik tedavisinde sisplatin, karboplatin, paklitaksel, topotekan, gemsitabin ve doksorubisin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Kemoterapötik olarak kullanılan bu ilaçlara bağlı olarak birçok istenmeyen yan etki gösterilmiştir. Bu nedenle yaşam kalitesini iyileştirmek ve kanserin uzun süre tedavisinde bu yan etkileri ortadan kaldırmak için, yeni anti-kanser bileşiklerinin keşfi çok önemli hale gelmektedir (116). Son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser önleyici etki gösteren nanoteknolojik moleküller üzerindeki araştırmalara önem verilmiş ve eczacılık alanında ilerleme göstermiştir. Apoptoz, iyonlaştırıcı radyasyon ve

kemoterapötik ilaçlar gibi DNA'ya zarar veren ajanların neden olduğu etkili bir süreçtir. Son çalışmalarda kemoterapötik ajan direnci ve azalmış apoptoz kapasitesi arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. Bu nedenle, apoptoz oluşumu, antineoplastik tedaviye yanıtını önemli bir belirleyicisidir (117).

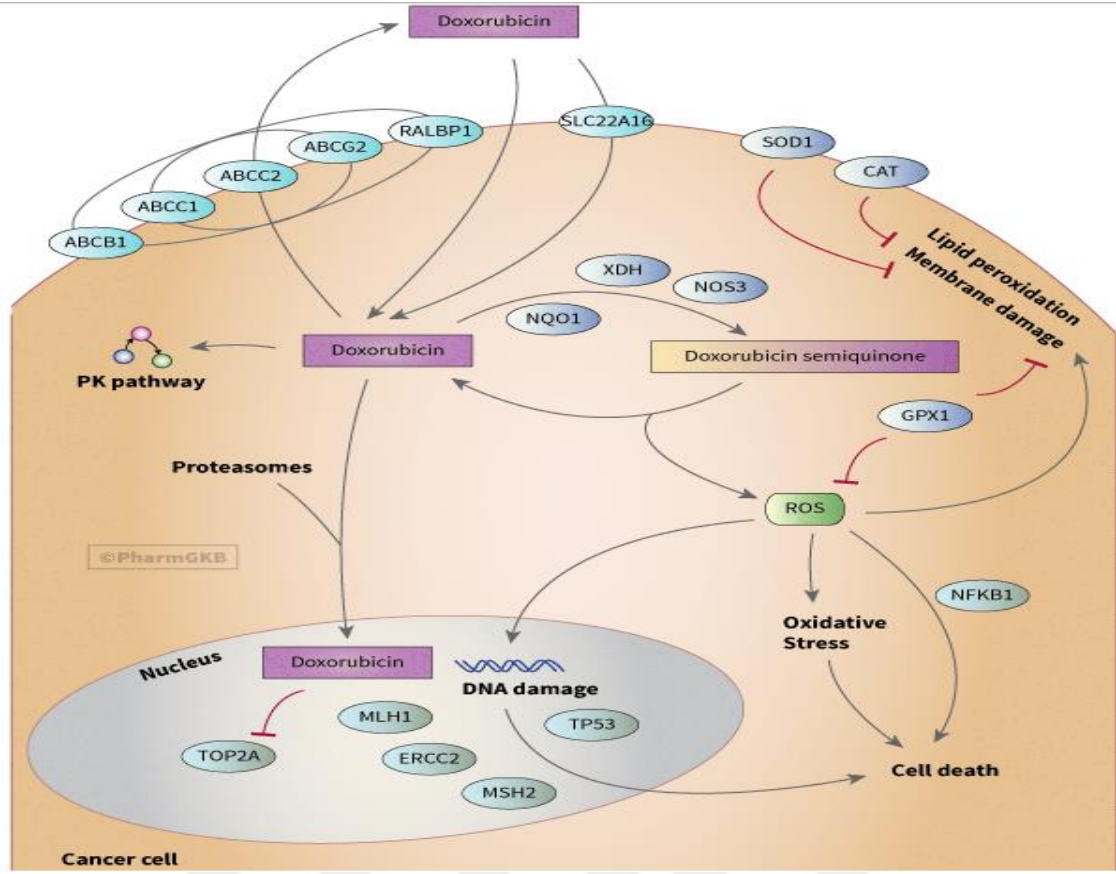
DOX doğal olarak oluşan antrasiklindir ve 1960'larda (pigment üretiminden türetilmiştir) *Streptomyces peucetius var. caesius*'dan izole edilmiştir (118). DOX, selektif olmayan sınıf I antrasiklin, aglikonik ve şeker parçalarına sahip bir ilaçtır. Aglikon kısmı, bitişik kinon-hidrokinon gruplara sahip bir tetrasiklik halka, metoksi yer değiştirmesi için kısa bir yan zinciri, ardından bir karbon grubu içermektedir. Şeker bileşeni (daunosamin olarak da bilinir) halkalardan birine glikozidik bağ ile bağlandırılmış ve 3-amino-2,3,4-trideoksi-L-fukosil parçasından oluşmaktadır (Şekil 12) (119).



Şekil (12): Doksorubisin Yapısı (119).

DOX'un günümüzde insan kanserlerinin tedavisinde kullanılan etkili anti-tümör ilaçlar arasından biri ve hem katı hem de katı olmayan tümörlere karşı etki göstermiştir. DOX pasif difüzyon yoluyla hücre içine girer, böylece hücre içi biriktiği için konsantrasyonu hücre dışı konsantrasyonuna göre 10 ila 500 kat artmaktadır (120). Nükleer bölmelerdeki DOX konsantrasyonunun hücre sitoplazmasındaki konsantrasyondan 50 kat daha yüksek olduğunu gösterilmiştir. Daha spesifik olarak, çekirdekteki DOX miktarı 340 mikron doygunluk seviyesine ulaşabilir, bu da DNA ipliği üzerindeki her beş temel bazın tamamında bir araya yerleştirilmiş DOX molekülü olarak temsil edilebilmektedir (121). DNA'yı için daha yüksek afiniteleri nedeniyle DOX proteazomlardan ayrılır ve DNA'ya bağlanmaktadır (122). DOX, meme, akciğer, mide, yumurtalık, tiroid, Hodgkin olmayan ve Hodgkin lenfoması, multipl

miyelom, sarkom ve pediatrik kanserler gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (123). DOX serviksin saf skuamöz hücreli karsinomasında aktivite göstermiştir (124). DOX'un kanser hücresinde etkili olduğu önerilen iki mekanizma vardır. Birinci mekanizma, DOX'un DNA ile interkalasyon sayesinde hem makromoleküller sentezi inhibe eder hem de topoizomeraz-II aracılı DNA onarımı bozar. DOX'un düzlemsel halka yapısı, bitişik DNA baz çiftleri arasında özellikle GC baz çiftleri arasına girmektedir (8). DOX topoizomeraz II kompleksini stabilize eder, bu nedenle DNA zincirini replikasyon için ayırdıktan sonra, DNA çift sarmalının tekrar oluşumunu önleyerek replikasyon durdurmaktadır (125). DNA çift iplikçik kopmaları (DSB'ler) ve DNA hasarı, öncelikle p53 yolunun aktivasyonu, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz da dahil olmak üzere çeşitli yanıtlara yol açmaktadır (126). İkinci mekanizma; DOX'un hücrel membranlar, DNA ve proteinlerin hasara neden olan serbest radikallerin üretimini indüklenmesidir (9). DOX, reaktif oksijen türlerini (ROS) serbest bırakan bir süreçte kararsız bir metabolit olan semikinona okside edilmektedir. ROS etkisi ile, lipid peroksidasyonuna ve membran hasarına, DNA hasarına, oksidatif strese neden olur ve hücre ölümü apoptotik yollarını tetikleyebilmektedir (127). Bu yolu düzenleyen genler, hem oksidasyon reaksiyonu (NADH dehidrojenazlar, nitrik oksit sentazlar, ksantin oksidaz) enzimlerini hem de glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi serbest radikalleri deaktive edebilen enzimleri kodlayan genleri içermektedir (Şekil 13) (128, 129).

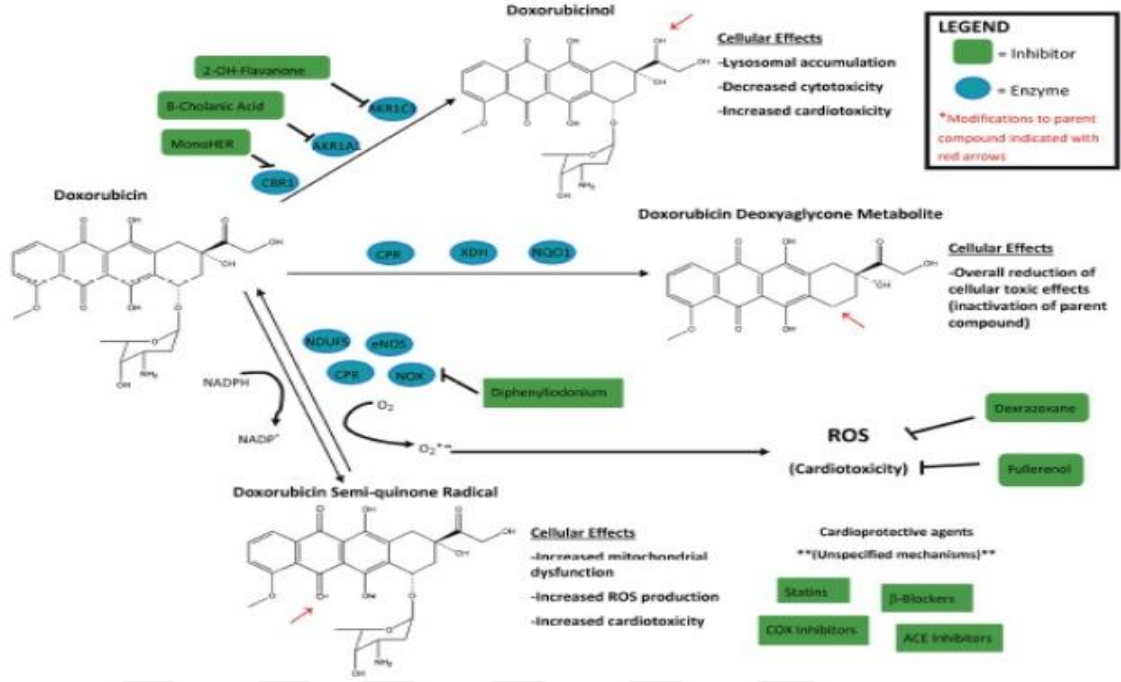


Şekil (13): Doksorubisinin kanser hücrelerinde etki mekanizmaları (125).

DOX'un en önemli yan etkilerinden biri bazı durumlarda kardiyotoksisiteye neden olmasıdır. DOX ile ilişkili kardiyomiopati kalp yetmezliğine yol açabilmektedir (130, 131). DOX kardiyotoksitesinin iki ana hipotez vardır. Birinci mekanizma DOX demir ile etkileşime girebilir ve hidroksil radikalini üretebilmektedir. Diğer taraftan mRNA'ların demir-duyarlı elemanı (IRE) bölgeleri ile etkileşerek demir düzenleyici proteinlerin (IRP'ler) fonksiyonu üzerinde etki yapabilir ve demir homeostazını bozabilmektedir (132). İkinci mekanizma ise, DOX mitokondriye lokalize olur, mitokondriyal DNA ile ve iç mitokondriyal zarında önemli bir bileşen olan kardiyolipin ile etkileşime girebilmektedir. Bunun sonucu mitokondriyal fonksiyonda önemli olan bazı proteinler işlevlerinde etkilenebilmektedir (133).

DOX metabolizması, DOX'un etki mekanizmasında ve toksisitesinde önemli roller oynadığından ayrıntılı şekilde açıklanmıştır. DOX'un yaklaşık% 50'sinin yapısında bir değişiklik olmadan vücuttan atıldığını gösterilirken, ilacın kalıntısı, üç ana metabolik yoluyla (hidroksilasyon, semikinon, deoksiaglikon oluşumu) üretilen antikanser özelliklerini artıran veya baskılayan metabolitlerin oluşumuna neden olabildiğini gösterilmiştir (134). Doksorubisinol (DOXOL) formasyonu, DOX içindeki C-13 karbonil grubunda hidroksilasyon

ile katalize edilir ve bu biyotransformasyonu sitosolik NADPH-bağımlı karbonil (CBR) ve aldo-keto redüktazlar (AKR) gibi enzimler aracılık etmektedir (135). DOX'un, sitokrom P-450 redüktaz (CPR), NADH dehidrojenaz, nitrik oksit sentaz (NOS) ve ksantin oksidaz enzimleri vasıtasıyla tek elektronik indirgenmesi uyarıldığında bu antrasiklin ilaçlarının kinon grubunun semikinon köküne dönüştürülmesine yol açmaktadır (Şekil 13) (122). Bu radikal anoksik koşullar altında stabil olmasına rağmen, oksijenin varlığında semikinon radikali, kinonu yeniden oluşturmak için kolayca oksitlenir ve bir süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumuyla sonuçlanır, böylece reaktif oksijen türlerinin oluşumu artmaktadır (136). DOX'un bu redoks döngüsü, hücreden kaçabilen toksik aldehitlerin üretiminde önemli bir rol oynar ve DOX toksisitesinden sorumludurlar. Bu süreç sitoplazma, mitokondri ve sarkoplazmik retikulumda gözlenmiştir (137). Glikozidik bağın ve yan zincirinde karbonil grubunun indirgeyici bölünmesi, 7 deoksi aglikonların ve hidroksi aglikonların oluşumuna yol açmaktadır (138). Bu reaksiyonun, ksantin dehidrojenaz (XDH) ile birlikte NADPH-bağımlı hidrolaz ve redüktaz tipi glikozidazlar [NADPH kinon oksidoredüktazlar (NQO1) ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz (CPR)] ile katalize edildiğini bildirmiştir (139). Hidroksiaglikonların oluşumu, sitozolda bulunan NADPH-bağımlı enzimlerden kaynaklanırken, 7-deoksiaglikon oluşumu ise mikrozomal veya mitokondriyal oksidoredüktazlar ile başlatılabilmektedir (Şekil 14) (138). Antrasiklin aglikonunun ROS üretebileceğini, ancak ortaya çıkan 7-deoksi aglikon metabolizmasının sitotoksik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir (140). Üretilen aglikonlar, başlangıç antrasiklinlerinden daha yüksek bir lipofilik özelliğe sahip olduğu için, mitokondriyal membranlara girdiği düşünülmektedir (141). Ayrıca çalışmalar, DOX aglyconun mitokondride daha fazla elektronu oksijene yönlendiren belirgin oksitleyici özellikleri nedeniyle miyokardiyal hasara neden olabileceğini önermektedir (142). Antrasiklin metabolik yolları ve metabolitleri dokudan dokuya ve in vitro veya in vivo koşullara göre değişiklikler olduğunda, iki elektron indirgeme (hidroksillenmiş) ürünü genellikle antrasiklinler için baskın metabolittir. Buna karşılık, algycone, 7-deoksi aglikon ve 7-deoksi hidroksillenmiş aglikon az miktarda üretilmektedir (143).



Şekil(14): Metabolizmasında rol oynayan katalitik enzimler ve inhibitörleri dahil olmak üzere memeli hücrelerinde hücre içi DOX biyotransformasyonunun ana yolları. Metabolitlerin etkileri de listelenmiştir (138).

Kardiyotoksosite ile ilgili sorunlara ek olarak, DOX'un değerli bir klinik antineoplastik ajan olarak kullanılmasında bir sorun da direnç ortaya çıkmasıdır (144). Direnç mekanizmasının özellikle ABCB1 (MDR1, Pgp) ve ABCC1 (MRP1) ile diğer taşıyıcıları içerdiği düşünülmektedir. Genel olarak, ABCB1, ATP'ye bağımlı bir ilaç akış pompası olarak hareket ederek direnç sağlar (145), ve değiştirilmiş veya artırılmış ekspresyon yoluyla artan ilaç akışına neden olmaktadır (146). ABCB1'in inhibisyonu gerçekleştiğinde, DOX sitotoksitesini artmaktadır (147).

DOX'e dirençli kanser hücre hatları üzerinde yapılan birçok çalışma, ABCB1, ABCC1 ve ABCC2'nin inhibisyonu yoluyla direncin aşılabileceğini göstermiştir (148). Ayrıca çalışmalar diğer taşıyıcıların direnci ve aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Örnek olarak RALBP1, DOX'e duyarlı bir hücre hattında DOX'e dirençli hücre hattına göre aktivitesinin 2 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir (149).

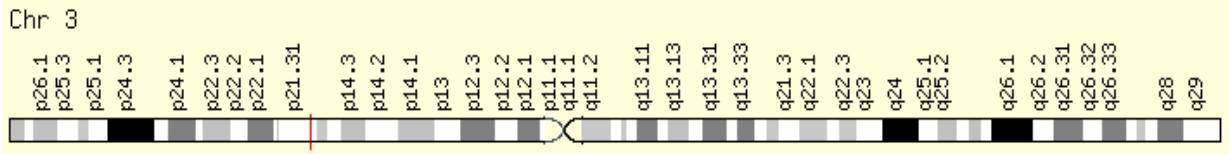
2.4. Oksidatif stres genleri.

Aşırı ROS üretiminin hücre içi homeostazda değişikliklere neden olabileceğini ve hücrelerin önemli bileşenlerine zarar verebileceğini gösterilmiştir (150). ROS'un kanser, diyabet,

obezite, nörodejeneratif ve diğer hastalıkların yanı sıra çok çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (151, 152). ROS'un, dış moleküller orbitalerinde (süperoksit radikalleri ve hidroksil radikalleri) bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren serbest radikal, veya kimyasal olarak reaktif olan ve eşleşmemiş elektron içermemelerine rağmen radikal ROS'e (hidrojen peroksit) dönüştürülebilen radikal olmayan iki grupta sınıflandırılmaktadır (153). Kronik oksidatif stres, mutasyonlara bağlı transformasyona neden olan kanserle ilişkili genlerin ekspresyonunu değiştirerek karsinogeneze yol açabilmektedir (150). Karsinogenez aktivasyonun başlangıç aşamasında, DNA hasarına neden olan ve DNA hasar yanıtına etki eden ROS'un çoklu etkilere sahip olabileceğini göstermiştir. Kanser hücrelerindeki ROS seviyelerinin normal hücrelere göre daha yüksek olduğunu tesbit edilmiştir (154). Gerçekten de, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve migrasyon / invazyon programının değiştirilmesi yoluyla kanser başlamasında ve ilerlemesinde ROS'in rolü iyi tanımlanmıştır (155). Bu etkiler önlemek için hücreler, glutatyon peroksidaz (GPX), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), ve Peroksiredoksin (PRDX) gibi birkaç antioksidan ROS temizleyiciyi içerdiğinden dolayı "ROS adaptasyon" mekanizmalarını aktive etmektedir (155, 156).

2.4.1. Glutatyon Peroksidaz 1 (GPX 1) geni:

Glutatyon peroksidaz-1 1957 yılında Mills tarafından hemoglobini oksidatif bozulmaya karşı koruyan bir eritrosit enzimi olarak keşfedilmiştir (157). Bu gen ailesinin birkaç izozimi, hücrel konum ve substrat spesifisitesinde değişen omurgalılarda bulunmaktadır. Glutatyon peroksidazlar, serbest radikalleri temizleme kapasitesine sahip antioksidan enzimler olarak sınıflandırılmaktadırlar. GPX1, glutatyon peroksidaz ailesine ait en yaygın izoformudur (158). GPX1 protein fonksiyonu için kritik olan bir selenosistein kalıntısı eklenmesini belirten bir UGA opal sonlandırma kodonu kullanmaktadır (159). Selenosistein sıradışı bir amino asittir, GPX'in aktif bölgesinde yer alır ve durdurma kodonu TGA tarafından kodlanmaktadır. Bu gen için farklı izoformları kodlayan alternatif olarak eklenmiş iki transkript varyantı gösterilmiştir. Her iki izoform da 49. pozisyonunda selenosistein içermektedir (160). *GPX1* geni 22088 Da moleküler kitlesi, 1183 baz hacminde, bu genin 203 amino asitten oluşan izoform 1 ve 98 amino asitten oluşan izoform 2 proteinleri kodlar. Kromozom üzerindeki konumu ise 3p21.31'dir (Şekil 15) ve mitokondri, sitoplazma ve çekirdekte bulunur. Ancak oranı hücrel fonksiyona bağlı değişebilmektedir (161).



Şekil (15): *Glutasyon peroksidaz 1* geninin kromozom üzerindeki konumu (161).

Bu gen tarafından kodlanan glutasyon peroksidaz, organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) glutasyon tarafından azaltılmasını katalizler ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korumada önemli rol oynamaktadır (162). H_2O_2 'nin büyüme faktörü aracılı sinyal iletimi, mitokondriyal fonksiyon ve tiyol redoks dengesinin korunması için de gerekli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle H_2O_2 birikimini sınırlandırarak glutasyon peroksidazlar da bu işlemlerin modüle edilmesinde rol oynamaktadır. GPX1'in endojen olarak oluşturulmuş olan çeşitli hidroperoksidlerin ve glutasyonun (GSH) glutasyon disülfide (GSSG) oksidasyonu ile sonuçlanan hidrojen peroksidin aşağıdaki reaksiyondaki olduğu gibi zararlı etkilerine karşı koruma sağlayan bir enzimdir (161):

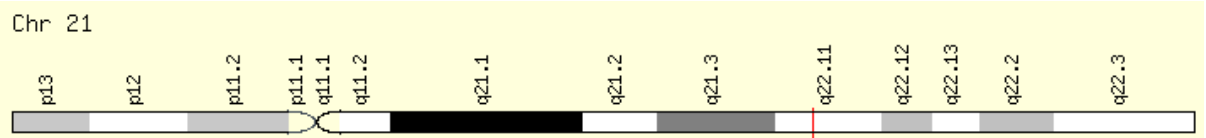
$$H_2O_2 + 2 \text{ GSH} \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{ GSSG} \text{ ve } \text{ ROOH} + 2 \text{ GSH} \rightarrow \text{ GSSG} + \text{ ROH} + \text{ H}_2\text{O}$$

(reaksiyonda ROOH, lipit hidroperoksitleri, membrana bağlı fosfolipid hidroperoksitleri temsil eder). GPX1'in protein, NADPH ve NADH oksidasyonunu azaltarak hücrelerin korunmasında önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. Cheng W.H., ve arkadaşları tarafından, GPX1'in ROS ile ilişkili strese karşı korunmadaki fizyolojik rolünün Se durumuna ve stresin şiddetine bağlı olduğunu göstermiştir (163). GPX1, nitrik oksit (NO) ile paralel olarak üretilen ve lipitler, amino asitler ve DNA da dahil olmak üzere birçok biyomolekülü okside ederek yüksek derecede toksik olan peroksinitrite (PN) karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır (164). Peroksinitrit tirozin kalıntılarla reaksiyona girdiğinde 3-nitrotirozin bileşiği oluşturarak proteinler üzerinde önemli zararlı etkiler oluşturabilmektedir. Bu kimyasal modifikasyonu protein nitrasyonu adlandırılmış ve bu süreçte tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu önlediğinde enzimleri veya proteinleri inaktif bir şekilde kalırlar ve rollerini kaybetmektedir (165). Bu nedenle GPX1 enziminin önemi, PN azalmasında ve hücrede tirozin nitrasyonunun önlenmesinde ortaya çıkmaktadır. p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve JNK yolları ROS etkisi ile indüklenen apoptozda önemli rollere sahip olmaktadır. *GPX1*'in aşırı ekspresyonunun, muhtemelen oksidatif strese neden olan hipoksi altında Thr-180 / Tyr-182'de p38 MAPK fosforilasyonunu önlediğini bildirilmiştir (166). GPX1'in oksidatif DNA mutasyonlarını önleyerek tümör oluşumunu önleyebildiğini gösterilmiştir (167). Meme kanserinde (168), ve mide kanserinde (169) *GPX1* ekspresyonu

gösterilmiştir. Başka bir çalışma, *GPXI* karaciğer ve prostat kanser ekspresyonu göstermiştir (170).

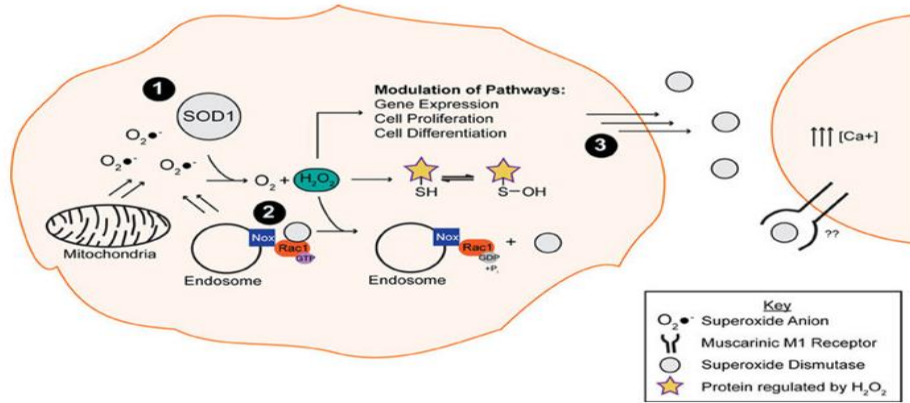
2.4.2. Süperoksit Dismutaz 1 (*SOD1*) geni:

SOD1, SOD'ların ana hücre içi formudur ve yaklaşık %80 toplam SOD proteininden oluşmaktadır. Molekül kütlesi 15936 Da ve 9307 baz hacmi olan *SOD1* genin 154 amino asitten oluşan bir protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu ise 21q22.11'dir (Şekil 16) ve mitokondride, sitozolda, peroksisomda ve çekirdekte yüksek eksprese etmektedir (171).



Şekil (16): Süperoksit dismutaz genin kromozom üzerindeki konumu (171).

Daha önce hemokuprein olarak bilinen *SOD1*'in enzimatik işlevi ilk olarak 1969'da karakterize edilmiştir. NADPH oksidaz (NOX), ksantin oksidaz ve sitokrom P450 enzimler etkisiyle veya elektron taşınması sırasında mitokondriyal zarlar arası boşlukta oluşan süperoksit radikalini O_2^- saldırarak yapısızlık olarak adlandırılan moleküler oksijene ve hidrojen perokside dönüştürme kabiliyeti de dahil olmak üzere *SOD1* biyolojisinin birkaç önemli yönünü ortaya çıkarmıştır (Şekil 17) (172).



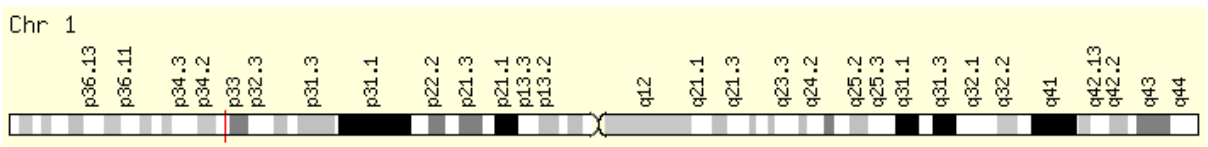
Şekil (17): *SOD1* etki mekanizması (172).

SOD1'in, *GPX1*'in inhibisyonundan süperoksit tarafından kaynaklanan hidrojen peroksit seviyesini arttırdığını gösterilmiştir. Yükselmiş hidrojen peroksit seviyesi büyümeyi ve metabolik süreçleri düzenlemek için ikinci haberci olarak görevi gösterebilmektedir (173). Diğer taraftan yükselmiş hidrojen peroksit, p38'in aktivasyonuna ve sonuç olarak anti-

apoptotik faktör MCL1'inde bir azalmaya yol açar, böylece SOD1'in apoptoz ile hücre ölümüne neden olmaktadır (174). SOD1'in aşırı ekspresyonunun NF-κB, kinazlar (MAPK, JNK ve Akt), AP-1 ve JAK-STAT dahil olmak üzere çoklu sinyal yollarını aktive edebileceğini bildirilmiştir (175). SOD1'in, mayadaki solunum ve fermantasyon arasındaki geçişi düzenlemek için besin mevcudiyetini içeren metabolizma odak noktası olduğu gösterilmiştir (176). Diğer taraftan ikinci türü olan nükleer SOD1, genomik DNA stabilitesinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. SOD1'in spesifik bir DNA bağlayıcı protein olarak tanımlandığından gen regülasyonunda doğrudan bir rol oynadığı görünmüştür (177). SOD1'in, hücrel çinko ve bakır tamponlamada, antioksidan genlerin ekspresyonunu kontrol etmek ve peroksit aracılı redoks sinyali için bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (178). SOD1 kaybı, doğal olarak oksidatif DNA hasarında rol oynayan ve karsinogenezi indükleyen ROS seviyesinde artışa neden olmaktadır. Bu nedenle SOD1 tumor gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Kansere hücrelerde SOD1'in aşırı ekspresyonu, oksidatif hasara karşı koruma sağlayarak muhtemelen büyüme avantajı sağlamaktadır (179). *SOD1* mutasyonu ile, SOD1 kümelenmesinin eğimini artır ve sonuçta motor nöron ölümüne yol açtığından dolayı aile amiyotrofik lateral sklerozun (fALS) oluşumunda rol oynayabileceğini gösterilmiştir (180). Çalışmalar, SOD1'in akciğer adenokarsinomu (181) prostat kanseri, servikal kanseri (175) ve primer meme kanserinin % 70'i (182) dahil olmak üzere birçok kanser tipinde eksprese edildiğini göstermiştir.

2.4.3. Peroksiredoksin 1 (*PRDX1*) geni:

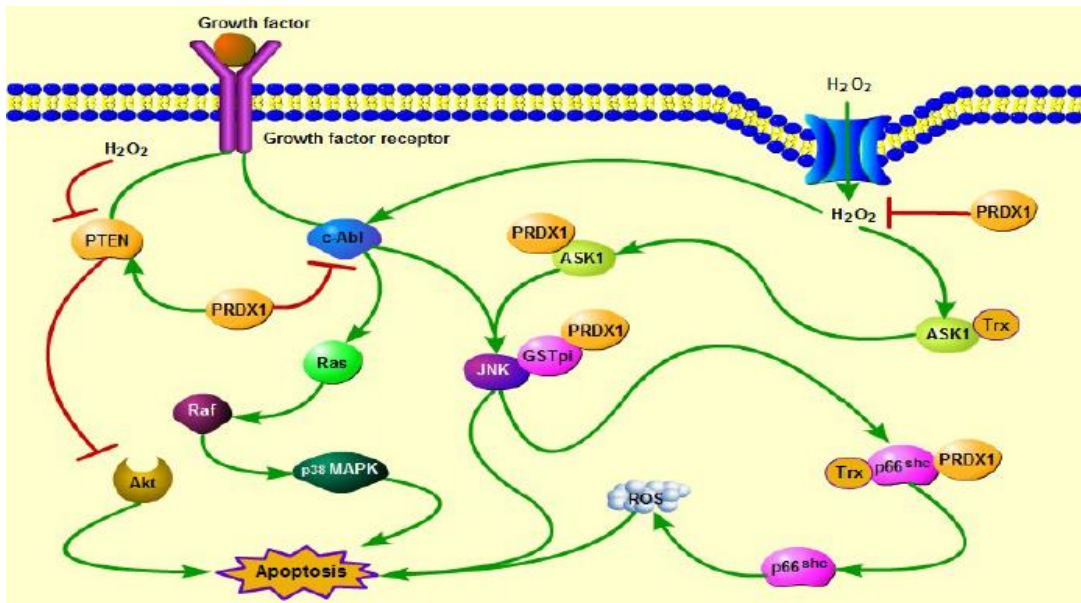
Peroksiredoksinlerin, bir ya da iki korunmuş sistein kalıntısına sahip olarak antioksidan ailesidir (183). Molekül kütlesi 22110 Da olan *PRDX1* geni 199 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu ise 1p34.1'dir (Şekil 18) ve *PRDX1 2-Cys PRDX*'ler alt ailesinin bir üyesidir. Esas olarak mitokondride, sitozolda, peroksizomda ve çekirdekte yüksek seviyede bulunmaktadır (184).



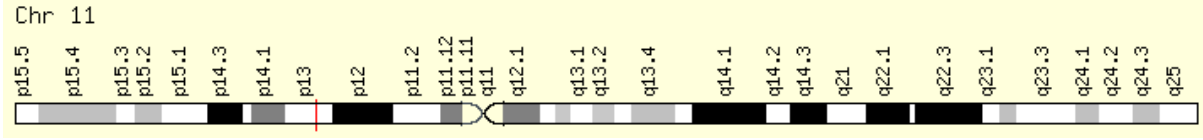
Şekil (18): Peroksiredoksin 1 geninin kromozom üzerindeki konumu (184).

Bu gen, hidrojen peroksit ve alkil hidroperoksitleri azaltan peroksiredoksin antioksidan enzimler ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. Kodlanan protein, hücrelerde antioksidan

koruyucu bir rol oynayabilir ve CD8 (+) T hücrelerinin antiviral aktivitesine katkıda bulunabilmektedir. PRDX1 oksidatif strese oldukça duyarlı olduğu için ilk önce bir antioksidan enzim olarak rapor edildi, ancak oksidasyon-indirgeme dengesindeki fizyolojik rolü belirsizliğini kalmaktadır. Peroksitleri detoksifiye ederek ve hidrojen peroksit aracılı sinyal olaylarının sensörü olarak oksidatif strese karşı hücre korumasında rol oynamaktadır. H_2O_2 hücre içi konsantrasyonlarını düzenleyerek büyüme faktörleri ve tümör nekroz faktörü-alfa ($TNF-\alpha$) sinyal yollarında katılabilmektedir. Cys peroksidasyonu oksitlendiğinde, PRDX1 yapısal olarak peroksidaz enziminden stres koşulları altında moleküler şaperona dönüştürülmektedir (185, 186). Ek olarak çalışmalar, PRDX1'in doğal öldürücü hücre sitotoksitesini arttırmak ve c-Myc ve c-Abl gibi onkojenik proteinleri baskılamak için ortaya çıkan başka bir fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (187, 188). Ayrıca, PRDX1 aynı zamanda birçok ROS sinyal yolunu düzenler ve hücre hayatta kalması ve programlanmış hücre ölümü için hücreler arası bir sitokin olduğu düşünülmektedir (189). Oksidatif stres ile etkilenen apoptoz üzerinde iki farklı tip PRDX1 gösterilmiştir. İlk olarak sitoplazmik PRDX1'in, apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1), p66Shc ve GSTpi / JNK gibi farklı tip kinazları ve enzimleri içeren H_2O_2 kaynaklı hücre ölümünün baskılanmasında Trx ile işbirliği yaptığını gösterilmiştir (190, 191). Ek olarak PRDX1, oksidatif stres koşulları altında c-Abl tirozin kinaz ile doğrudan etkileşim yoluyla hücre apoptozunu indükleyen JNK ve p38 MAPK gibi bazı enzimleri inhibe edebilmektedir (190). Özellikle, PRDX1 Akt ile çalışan tümör oluşumunu önler ve daha sonra fosfataz ve tensin homologu (PTEN) lipit fosfataz aktivitesini oksidasyona bağlı inaktivasyondan koruyarak hücre apoptozunu indüklemektedir, (Şekil 19) (189).



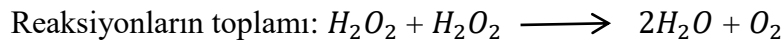
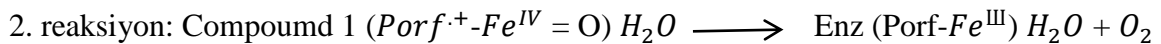
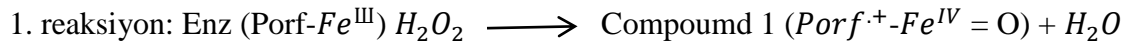
sitozolda ve peroksizomda yüksek eksprese edildiğinde mitokondride ve çekirdekte daha az eksprese edilmektedir (196).

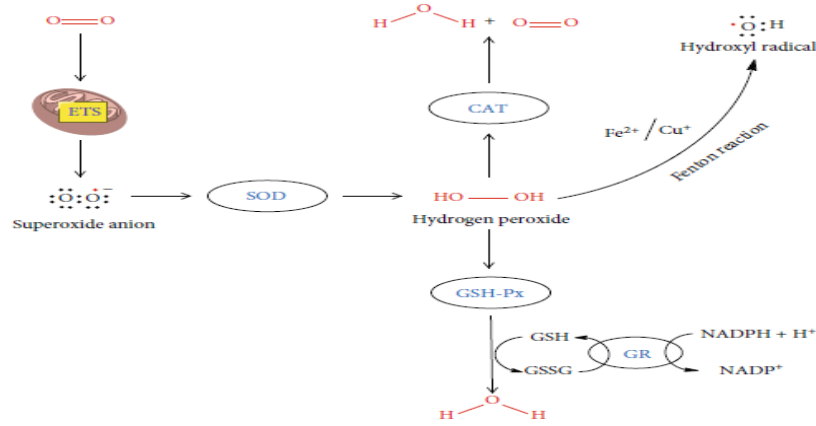


Şekil (21): Katalaz geninin kromozom üzerindeki konumu (196).

Katalaz, Thinnard'ın H_2O_2 'yi keşfettiği ondokuzuncu yüzyıla kadar izlenebilen bir enzimdir. Schönbein tarafından yapılan çalışmalar bir 'fermantasyonun' H_2O_2 'yi detoksifiye edebileceğini gösterdi ve daha sonra Loew üzerinde, H_2O_2 'yi suya ve oksijene dönüştüren enzime 'katalaz' adını vermiştir. 1920'lerde Warburg ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma, aktif katalaz bölgesinde bir demir atomu olduğunu göstermiştir. 1937 yılında katalaz Sumner ve Dounce laboratuvarında bovin serumda kristalize edilmiştir (197). Katalaz üç ana grupta sınıflandırılmıştır. Birinci ve ikinci grup katalaz peroksidazlardan oluşan hem içeren enzimler içerirken, üçüncü grup manganez katalazlar içermektedir (198).

Vücutta oksidatif strese karşı savunmada önemli bir antioksidan enzim olan *CAT* geni kodlamaktadır. Katalaz, neredeyse tüm aerobik hücrelerin peroksizomunda bulunan bir hem enzimdir. Katalaz, reaktif oksijen türleri olan hidrojen peroksidi iki molekül suya ve bir molekül oksijene dönüştürür, böylece hidrojen peroksidin toksik etkilerini azalttığına oksidatif hasara karşı hücrelerin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 22) (199). Reaksiyon mekanizmasının ilk aşaması, bir hidrojen peroksit molekülünün indirgenmesi yoluyla bir porfirin π -katyon radikaline sahip olan bir kovalent oksifirril türü ($Fe^{IV}O$) olan bileşik I'ın oluşturulmasını içerir (200). Reaksiyonun ikinci aşamasında serbest enzimi, oksijen ve su üretmek için bileşik I'e elektron vericisinden (ikinci hidrojen peroksit molekülü) iki elektron taşıyarak oksidasyon-indirgenme reaksiyon yoluyla indirgenmektedir (199).





Şekil (22): Katalaz ROS'e karşı etkileri (199).

ROS, çoğalma, migrasyon ve invazyon kapasitesini arttırmak için mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) gibi farklı sinyal yollarının aktivasyonunda önemli rol oynar. H_2O_2 diğer ROS oluşturma kabiliyeti ile toksisitesini gördüğünde, aynı zamanda morfoloji, proliferasyon, sinyalleşme (yani NF- κ B), apoptoz değişiklikleri de dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte ikinci bir haberci olarak rol oynamaktadır (201). Bu nedenle katalazın H_2O_2 'yi detoksifiye etme kabiliyeti ile sağlıklı ve kanserli hücrelerde büyüme oranı modüle edebilmektedir. Diğer bir yandan katalaz, Grb2 ve SHP2 gibi bazı proteinlere bağlayıp oksidatif hasardan koruyabilmektedir. Bu proteinler, çoğalma ve migrasyonunda rol oynayan integrin yollarında yer almaktadırlar (202). Katalazın aşırı ekspresyonunun ROS tarafından meydana gelebilecek DNA hasarına karşı hücreleri koruduğunu gösterilmiştir. Ayrıca katalazın toksik ve anti-tümör bileşiklerinin detoksifikasyonu veya aktivasyonu gibi ek rollere sahip olabilmektedir. Kanser hücresinin kemoterapötik ajanlara karşı direnci sırasında katalazın potansiyel bir rolü olduğunu bildirmiştir. CAT ekspresyonu, kanser hücre hatlarında bazı kemoterapötik ilaçlara doksorubisin gibi kronik maruziyet bırakıldığından oluşan dirençli hale modifiye edilmektedir (203). Katalazın, katalaz inhibisyonu veya inaktivasyonundan sonra, hücreler arası HOCl ve / veya NO peroksinitrit sinyalleşmesinin yeniden aktifleştirilmesi yoluyla apoptoza neden olan spesifik antikörler veya ekzojen singlet oksijen hedefleyerek kanserin tedavi etme olasılığında gösterilmiştir (204). PI3K sinyal yolundaki Akt / PKB proteini ile Foxo3a'nın aktivitesini modüle ederek katalaz ekspresyonu arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirilmiştir (205). Bu nedenle PI3K/Akt/mTOR hedeflendiğinde tümör hücrelerde katalaz ekspresyonu artırılabilir ve böylece kanser hücreleri büyümesini inhibe etmektedir (206). Ek olarak, epigenetik veya genetik değişiklikler de kanser hücrelerinde katalaz ekspresyon seviyelerinin yönetilmesinde rol oynayabilmektedir. Katalazın insan yaşamında önemi, geninin mutasyonları etkisi ile oluşan hastalıklarla

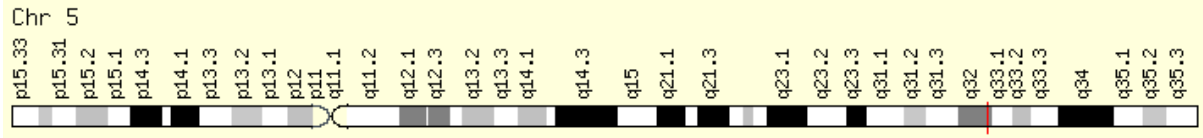
ilişkilidir. Örneğin akatalasemi, treonin delesyonuna veya guanin yerine adenin sokulmasına bağlı olarak otozomal kalıtsal olarak eritrosit katalaz eksikliğidir (202). Meme kanser türlerinde *CAT* eksprese olduğunu göstermiştir (207).

2.5. Wnt Sinyelleme yolağı genleri:

Wnt sinyal yolu organizmalarda hem embriyonik hem de yetişkin olmak üzere iki farklı dönemde önemli roller oynamaktadır (208). Yetişkinlerde Wnt sinyal yolları kendi kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda rol alırken, embriyonik evrede hedef genlerin transkripsiyonunun ve hücrelerin polaritesinin, çoğalmasının, farklılaşmasının ve hücre migrasyonu kontrolünde roller oynamaktadır (209). Wnt / β -katenin sinyal yolu ile kanser türleri arasında ilişki olduğunu bildirilmiştir. Bu ilişki 1982 yılında meme kanseri fare modelinde ilk kez gösterilmiştir (210). Bu çalışma başlangıçta bu geni *Int1* olarak adlandırıldı ve genin, hücreler arasındaki büyüme ve gelişme sinyallerini aktaran proteinleri kodladığı belirlenmiştir. Diğer birçok çalışma, bu genin normal embriyonik gelişimde kanatsız *Drosophila*'ya neden olabileceğini göstermiştir, bu nedenle adını Wnt'e değiştirilmiştir (211, 212). Hüresel Wnt sinyali, Wnt / β -katenin bağımlı yol ve β -katenin bağımsız yol dahil olmak üzere birkaç hücre içi sinyal iletim kaskadını uyarılmaktadır (213). Wnt proteinleri salgılanan glikoproteinler ve Frizzled (Fz) reseptör ailesinin N-terminal hücre dışı sisteinden zengin alanına bağlanmaktadır (214). Wnt'nin reseptör kompleksine bağlandıktan sonra sinyalin sitoplazmik fosfoprotein Disheveled'e (DVL) dönüştürüsü ortaya çıkarır, bu DVL, Fz ile doğrudan etkileşime girebilmektedir (215). DVL seviyesinde Wnt sinyalin en az üç ana kaskada ayrılmaktadır (216). Wnt hedef genlerinin β -katenin / T hücre faktörü (TCF) yoluyla ekspresyonunu düzenleyen ilk olan Wnt / β -katenin (kanonikal) yolu adlanmaktadır (217). Asimetrik hücre polaritelerini kuran ve hücre şekli değişikliklerini ve hüresel hareketi koordine eden ikincisi, düzlemsel hücre polaritesi (PCP) yolu adlanmaktadır (218). Üçüncü yol olarak, hücre yapışmasını ve hareketliliğini düzenler, buna Wnt / Ca^{+2} yolu adlanmaktadır (212). Çalışmalar, Wnt sinyal yolunun birçok tümör tipi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Wnt / β -katenin sinyal yolağında etkilebilen genlerin mutasyonları oluşumunda kanser ilerlemesinde rol oynamaktadırlar. Örnek olarak, Adenomatöz poliposis coli (APC) geninde mutasyon oluştuğunda β -Katenin seviyesini artar, Wnt aktivitesi artar ve kolorektal kanserin ilerlemesinde ana rol oynamaktadır. Aynı zamanda, yükselmiş β -katenin, melanom gelişimine hızlandırır ve metastazın teşvik edilmesine yol açmaktadır. Wnt / β -Katenin sinyal yolağı meme kanseri gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Wnt aktivitesi lösemide önemli ölçüde artmıştır (219).

2.5.1. Kazein Kinaz 1 Alfa 1 (CSNK1A1) gen:

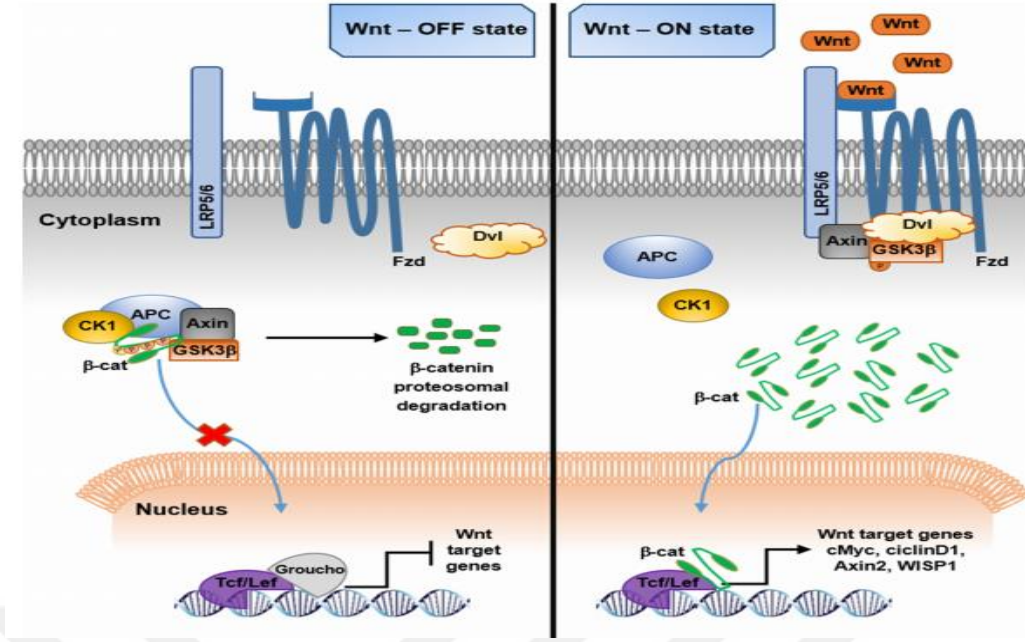
Kazein Kinaz 1 Alfa 1 (CSNK1A1), bir protein kodlanan genidir. Molekül kütlesi 38915 Da ve 58,571 baz hacmi olan *CSNK1A1* geni 373 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu ise 5q32'dir (Şekil 23), Kazein kinaz Seren/Treonin kinazdır ve sitozolda ve çekirdekte yüksek eksprese edildiğinde mitokondride ve hücre dışı alçak düzeyde eksprese etmektedir (220).



Şekil (23): *Kazein Kinaz 1 Alfa 1* geninin kromozom üzerindeki konumu (220).

Omurgalılarda Kazein Kinaz 1'in (CK1) yedi izoformu (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ ve ϵ) saptanmıştır. CK1 izoformları, sirkadiyen ritimler, WNT sinyalleri, hücre transformasyonu, membran kaçakçılığı, hücre iskeleti bakımı, DNA replikasyonu, DNA hasara yanıtı ve RNA metabolizması gibi çeşitli hücresel süreçleri etkisi ile düzenlemektedir (221, 222). CK1 α 'nın hücre bölünmesi sırasında mitotik iğ oluşumu, DNA onarım mekanizmalarında ve RNA metabolizmasına katılmasını gibi bazı biyolojik süreçlerde önemli roller oynadığını göstermiştir (221). Fareler üzerinde yapılan bazı in vivo çalışmalar, CK1 α 'nın spesifik antikör kullanıldığında hücre döngüsü ilerlemesi oositlerde M fazı sırasında bloke ettiği göstermiştir. Buna istinaden CK1 α 'nın hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli olduğunu gösterilmektedir (223, 224). CK1 α 'nın apoptotik sinyal yollarını düzenler, ve ekstrinsik apoptoz yolunda bir antiapoptotik fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. CK1 α 'nın inhibisyonu Fas etkisiyle Hela hücrelerinde indüklenen apoptozu arttırmıştır, buna karşılık, BID'in fosforilasyonunun neden olan CK1 α 'nın aşırı ekspresyonu, hücre ölümünü geciktirmiş ve bu da kaspaz 8'e bağlı BID bölünmesini önlemiştir (225). Diğer taraftan, CK1 α 'nın tümör nekroz faktör (TNF) ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) tarafından indüklenen apoptozu inhibe edebileceğini ve bu sürecin indükleme kompleksinde tümör nekroz faktör reseptörünün veya Fas-associated protein with death domain (FADD'nin) modifikasyonu ile gerçekleşebileceğini gösterilmiştir (226). CK1 α , retinoid X reseptörü (RXR) ile etkileşime girerek hücre sağkalımını artırır, bu nedenle RXR agonistleri tarafından uyarılan CK1 α 'nın inhibisyonu apoptoza yol açmıştır (227). Aksine, metastatik melanom hücrelerinde CK1 α 'nın aşırı ekspresyonu apoptozu indüklemiştir (228). Epitelyal hücreler üzerinde yapılan bir çalışma, hücre motilitesini destekleyen faktörlere yanıt olarak Rap guanin değişim faktörü

2'nin (RAPGEF2) CK1 α ve IKK β arasındaki konjügasyonla fosforile olduğunu göstermiştir. Bu süreç gerçekleştiğinde, meme kanseri hücrelerinin invazyonu için çok önemli olan proteazom tarafından bu faktörün bozulmasına yol açmıştır (229). CK1 α , Wnt / β -katenin sinyal yolunda ortak bir düzenleyici fonksiyona sahip olmaktadır (230). Vücuttaki oluşan bazı fizyolojik süreçler embriyonik gelişim, yetişkin kök hücre bakımı ve genomik stabilite gibi Wnt / β -katenin sinyali üzerinden düzenlemektedir (231). APC mutasyonlar meydana geldiğinde, özellikle kolorektal kanserde patolojisinde değişikliklere yol açmaktadır (232). Wnt sinyal yolu için β -katenin, hücre-hücre yapışmasını desteklemek için hücre zarındaki E-kaderin sitoplazmik kuyruğuna bağlanan önemli bir bileşendir. E-kaderin ayrıca sitoplazmaya yerleşir ve burada CK1 α ile birlikte yıkım kompleksini oluşturur ve hücre dışı Wnt ligandlarının yokluğunda β -katenin'in ubiquitinasyonunu ve proteazomal degradasyonunu aktive etmektedir (233, 234). Wnt sinyalinin Rac1 tarafından aktivasyonunda β -Katenin'in çekirdeğe taşınmasına yol açar, Wnt hedef genlerini aktive etmek için T hücresi faktörü, siklik cAMP tepki elemanı bağlayıcı protein (CREB) ve BRM / SWI2 ilgili gen ile kompleks oluşturmaktadır (235). CK1 α , β -Katenin'in fosforillenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu fosforillenme süreci gerçekleşmek için CK1 α glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) bağımlı ile bir kompleks oluştuğunda β -Katenin'in Ser 33 / 37 ve Thr 41 bölgelerinde fosforile eder ve daha sonra proteazomda degradasyona yol açmaktadır. Diğer taraftan, CK1 α 'nın β -katenin bağlanması için APC'deki Ser 1504 / 1505/1507 ve S1510'da fosforile eder (236). Bu nedenle CK1 α 'nın Wnt sinyallenme yolağında negatif regülatörü olduğunu etkilemiştir (237). Kanonikal yolu, salgılanan Wnt ligandlarının Frizzled reseptörlerine ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör protein 6 (LRP 6) bağlanması üzerine aktive edilir. CK1 α LRP6 treonin 1493'te fosforile eder, bu işlem etkisiyle, Dağınık (DVL) proteinleri, polimerize oldukları ve aktive oldukları plazma membranına alınmaktadır. DVL polimerleri Axin, APC, GSK3 β ve CK1 α içeren yıkım kompleksini inaktive ederler. Sonuç olarak, çekirdeğe geçen β -katenin birikmesine neden olmaktadır, (Şekil 24) (238, 219).



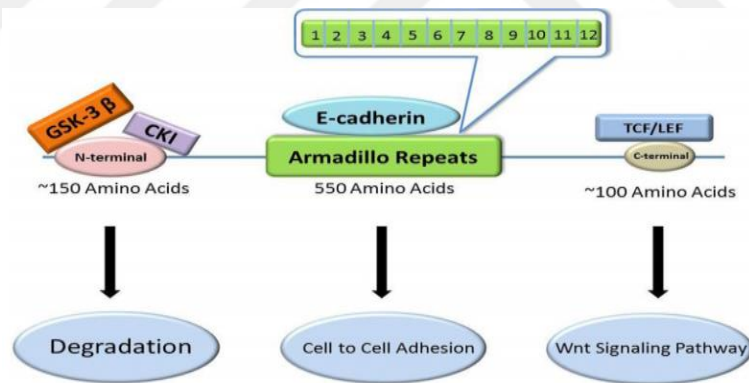
Şekil (24): Wnt / β -katenin (Kanonikal) sinyal yolları (219).

Wnt / β katenin sinyalleme yolağı kanser ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. CK1 α Wnt / β -katenin sinyal yolunun ilişkili olduğu için tümör baskılayıcı olarak işlev göstermiştir (239). DNA hasarı p53'ü CK1 α -MDMX etkileşimini bozarak ve MDMX-p53 bağlanma afinitesini azaltarak aktive eder. Ek olarak, DNA hasarı CK1 α ve MDM2 arasında gelişmiş bir etkileşime yol açar. Bu işlem, MDM2'nin CK1 α tarafından çok bölgesel fosforilasyonuna ve geliştirilmiş MDM2 degradasyonuna ve daha sonra p53 aktivitesinin artmasına yol açar (240). Sarasqueta AF ve ark. yapıldığı çalışmada; düşük *CSNK1A1* ekspresyonu olan kolon kanseri hastalarının yüksek *CSNK1A1* düzeyleri ve fonksiyonel olmayan p53 hastalarına kıyasla çok kötü prognoza sahip olduğunu gösterilmiştir (241). CK1 α 'nın yokluğu, β -katenin yapısal olarak aktif olsa bile bağırsak epitel hücrelerinin sınırsız çoğalmasını önleyen interferon sinyal yolunun (IFN) aktivasyonuna yol açmaktadır (242). Böylece CK1 α , Wnt / β -katenin, p53 ve IFN sinyalleri arasında bir denge sağlamaktadır. Çalışmalar, CK1 α 'nın otofajiye bağlı olan RAS (zara bağlı protein) ile yönlendirilen kolon kanseri gibi (243), ve aynı zamanda prostat kanseri (244), liposarkom (245), ve ultraviyole radyasyona bağlı cilt tümörlerinde negatif bir regülatör görevi de rol oynadığını göstermiştir (246). Bir çalışma, CK1 α tarafından pleckstrin homoloji alanı lösin açısından zengin tekrarlanan protein fosfataz 1'i (PHLPP1) Ser1359, Thr1363, Ser1379 ve Ser1381 yerlerinde fosforile edildiğinde ubiquitinasyona ve degradasyona yol açabilir ve böylece kolon kanseri ilerlemesine neden olabileceğini bildirmiştir (247). CK1 α , malign melanomda eksprese edilir, bu nedenle hastalıkta bir tanı işareti olarak rol oynayabilir (248). ancak melanom hücrelerinde CK1 α baskılanması, metastazı

desteklemek için β -katenin sinyallemede bir değişikliğe neden olmaktadır (249). CK1 α , miyelom ve plazma hücre lösemisinde onkojenik bir role sahip olmaktadır (250). CK1 α , retinoid X reseptörü a (RXRa) ile etkileşime girer ve kanser hücrelerinde RXR agonistleri kaynaklı apoptozu önleyerek hücre sağkalımını arttırmaktadır (227). CK1 α 'nın FADD'deki Ser 194 fosforilasyonu yoluyla KRASG12D kaynaklı akciğer kanserini teşvik etmede önemli bir rol oynadığını göstermiştir (251).

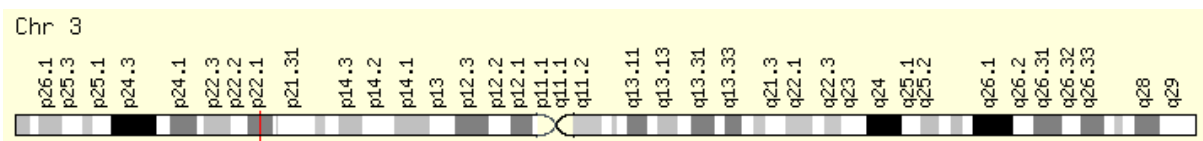
2.5.2. Katenin Beta 1 (CTNNB1) geni:

β -katenin 1 çok fonksiyonlu bir sitoplazmik proteindir ve bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır (252). Bu protein CTNNB1 geni tarafından kodlanır ve 781 amino asitten oluşmaktadır. Molekül kütlesi 85497 Da ve 65, 356 baz hacmi olan CTNNB1 geni. β -katenin 1'in birincil yapısı: merkezi tekrar (armadillo tekrarları), N-terminal alanı ve asit C-terminal alanı üç alandan oluşmaktadır. Bu alanların sırasıyla E-cadherin, GSK-3 β / CK-1 ve T hücre faktörü (TCF) / lenfoid arttırıcı faktör (LEF) için bağlayıcı bölgelerin şekil 25'te gösterilmiştir (253). CTNNB1 ekson 3, GSK-3 β için serin-treonin fosforilasyon bölgelerini kodlayan anahtar bir ekson olup, β -katenin degradasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (254).



Şekil (25): β -Katenin birincil yapısı (253).

Kromozom üzerindeki konumu şekil 26'ya göre 3p22.1'dir, sitozolda, çekirdekte ve plazma membranında yüksek eksprese edildiğinde mitokondride az eksprese etmektedir (254).



Şekil (26): Beta katenin 1 geninin kromozom üzerindeki konumu (254).

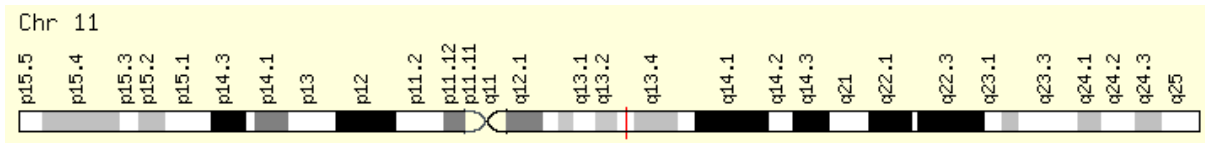
β -katenin'in iki önemli gelişim sürecine sahip olduğunu bildirilmiştir. Birincisi, hücre tipine özgü hücre-hücre yapışmasının kurulması ve sürdürülmesidir. İkinci fonksiyon olarak, hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesi için Wnt sinyal yoluna bağlamaktadır (255). Normal fizyolojik şartlar altında, β -katenin esas olarak hücre membranında bulunur ve armadillo tekrarları vasıtasıyla E-cadherin ile kompleks oluşturmaktadır (256). Bu kompleks, E-cadherin'in hücre iskeleti ile bağlantısında önemli bir rol oynarken, hücre yapışmasında rol oynamaktadır. Diğer bir yandan bu kompleks normal hücre morfolojisinin korunmasında rol oynayabilir ve tümör hücresi invazyonu ve metastazını baskılayabilmektedir (257). Bu gen tarafından kodlanan protein, yapışık eklemler (AJ'ler) oluşturan protein kompleksinden bir parçası oluşturmuştur (258). AJ'ler, hücre büyümesini, hücreler arasındaki yapışmayı, hücre dışı sinyalleri, hücre döngüsü ve gen transkripsiyonu gibi fonksiyonlardan düzenlemesi sorumludur (259). Wnt / β -katenin yolunun karmaşıklığı, çeşitli hücre içi tepkileri ortaya çıkarabilen ve sinyallemeye dahil olan çeşitli ligandlardan ve reseptörlerden kaynaklanmaktadır (260). β -katenin bu yolun anahtar hücre içi dönüştürücü olarak kabul edildiği için, tüm süreçlerde önemli roller oynamamıştır. APC, AXIN-1, AXIN-2, CK-1 α , protein fosfataz 2A (PP2A) ve GSK-3 β 'den oluşan yıkım kompleksi, beta katenin aktivitesinin kontrolünden sorumludur (219). Şekil 24'te gösterdiği benzeri, Wnt ligandlarının yokluğu, sitoplazmik β -katenin'in, yıkım kompleksi tarafından N-terminal serin-treonin kalıntılarında fosforile olur ve bu işlemin, ubiquitin-proteazom yolu vasıtasıyla proteazom tarafından parçalanmasını sağladığını göstermiştir (261). Alternatif olarak, Wnt ligandları varlığında, hücre yüzeyi Frizzled reseptöre bağlanırlar ve Dağınık protein (DVL) üzerine etki etmektedir (CK1- α 'da gösterdiğimiz gibi). Wnt ligandları mevcut olduğunda, β -katenin degradasyonu gerçekleşmeyecek ve çekirdeğe transfer edildikten sonra bir transkripsiyon faktörü olarak işlev yapmaktadır (219).

CTNNB1 gen mutasyonları, bazı kanser vakalarının gelişmesine katkıda bulunan Wnt / β -katenin sinyal yolunun yapısal aktivasyonuna yol açmaktadır (262). *CTNNB1* mutasyonları ve kanonik Wnt yolunun deregülasyonu ilk olarak kolorektal kanser vakalarında karakterize edilmiştir (263, 264). Bundan sonra, bu mutasyonlar diğer kanser türlerinde, servikal kanser (265), hepatoplastoma (266), nöroektodermal tümörleri (267), ve beyin tümörlerinde (268) karakterize edilmiştir. *CTNNB1* geninde mutasyonlar meydana gelince Beta katenin anormal ekspresyonu meydana gelir ve sitoplazmada seviyesini artacak, böylece çekirdekte yüksek düzeyde birikecektir. Daha sonra çekirdekte biriken β -katenin, TCF / LEF transkripsiyon faktörleri ile birleşebilir ve bu kompleks, insanlarda proto-onkogenlerin transkripsiyonunu

aktive edebilmektedir (269). Buna dayanarak, c-myc ve siklin D1 gibi down regülasyon genlerin hücre proliferasyonu ile ilgili transkripsiyonu aktive olacak ve bu süreç hücre proliferasyonunu aktive edecektir (270). Endometrioid endometriyal karsinom (EEC) üzerinde yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinin çekirdeğinde β -katenin birikiminin *CTNNB1* mutasyonları nedeni ile % 40-60'ında olduğunu bildirmiştir (261, 271). Başka bir çalışma, *CTNNB1* ekson 3'teki mutasyonlarının ve beta katenin birikiminin, yumurtalık karsinomunda gerçekleşmekte göstermiştir (272). Birçok farklı tümör tipinde hücre proliferasyonunu inhibe eden β -katenin antagonistlerinin olduğunu gösterilmiştir. Bu nedenle β -katenin antagonistlerinin birçok kanser tipleri, akut miyeloid lösemi (AML), pankreas nöroendokrin tümörleri, kolon kanseri, meme kanseri ve prostat kanseri gibi tedavisinde kullanılmıştır (273).

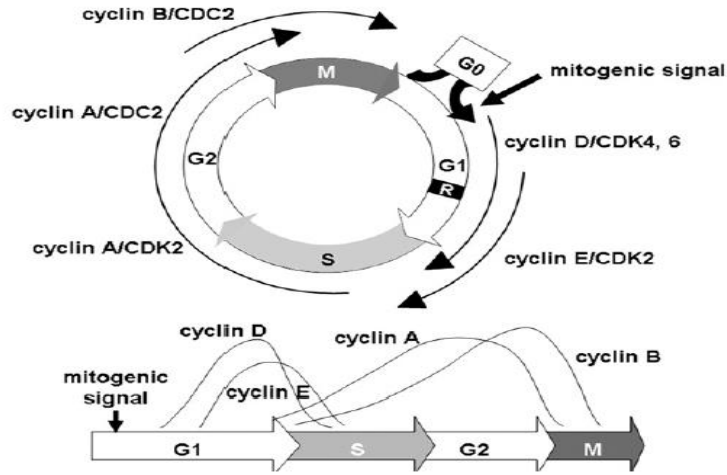
2.5.3. Siklin D1 (*CCND1*) geni:

Hücre döngüsünde önemli bir düzenleyici protein olan Siklin D1, *CCND1* geni tarafından kodlanır. Molekül kütlesi 33729 Da ve 13,388 baz hacmi olan *CCND1* geni 295 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu şekil 27'ye göre 11q13.3'tür, sitozolda ve çekirdekte yüksek ekspres edildiğinde mitokondride ve hücre dışı az ekspres etmektedir (274).

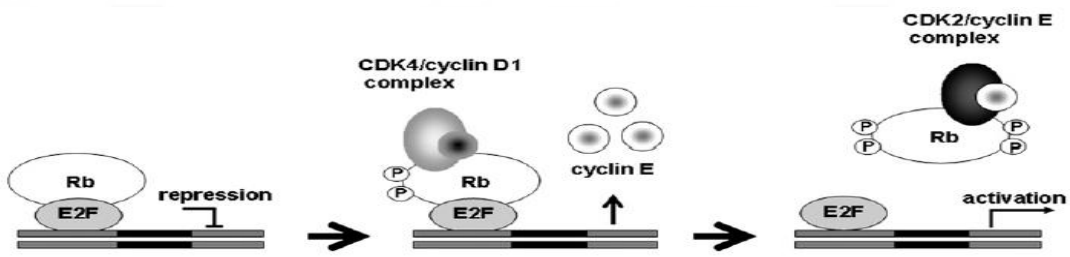


Şekil (27): Siklin D1 geninin kromozom üzerindeki konumu (274).

Siklin D1, G1 fazdan S faza ilerlemesi ve sikline bağlı kinaz 4 / sikline bağlı kinaz 6'ya (CDK4 / CDK6) bağlanarak retinoblastom proteininin (pRB) fosforilasyonunu ve inaktivasyonu desteklemektedir, bu mekanizması 28 ve 29 şekillerde gösterilmiştir (275, 276).



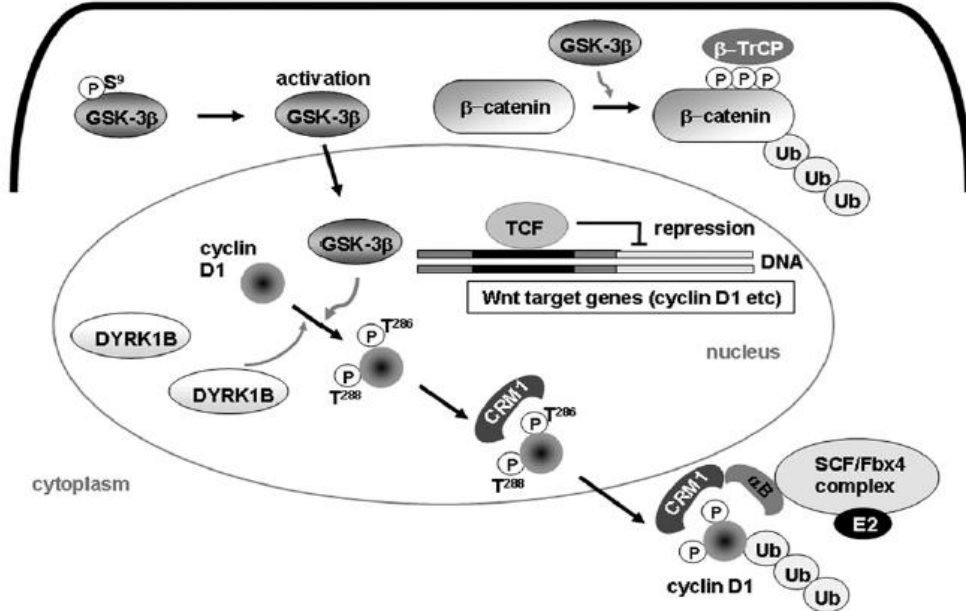
Şekil (28): Memeli hücre döngüsünün düzenlenmesi (276).



Şekil (29): Siklin D1 etkisi ile Retinoblastom protein fosforilasyonu ve inaktivasyonu (276).

Daha önce gördüğümüz gibi, Wnt ligandları varlığında β -katenin degradasyonu süprese edilmiş ve sitoplazmada birikmiş, böylece nükleer translokasyonu artmış, burada lenfoid arttırıcı faktör / T hücre faktörü (LEF / TCF) ile ilişkilendirilmiş ve anahtar hedef genlerinin ekspresyonunu sağlamıştır. Beta katenin çekirdekte biriktiğinde, hücre çoğalmasıyla ilişkili c-myc ve siklin D1 gibi bazı genleri aktive etmektedir (277). Sikline bağlı kinaz (cdk) aktivatörü siklin D1'in kodlayan *CCND1* geni, birkaç sistemde Wnt hedef geni olarak bulunmuştur. Siklin D1, hücre dışı mitojenleri sinyalleri ve cdk4 ve cdk6 ile kompleks hale geldiğinde hücre döngüsü ilerlemesine entegre etmektedir (278). Siklin D1'in ayrıca SP1 ve siklin D1 bağlayıcı myb benzeri protein 1 (DMPI) gibi transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu gibi bazı cdk4 ve cdk6 bağımsız fonksiyonlara sahip olduğunu bildirilmiştir (279, 280). Androjen reseptörü, peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör γ (PPAR – γ) ve tiroid hormon reseptörü gibi nükleer reseptörlerin inhibisyonunda başka bir rol oynamaktadır (281). Siklin D1'in, PPAR – γ ile aktive edilmiş reseptör koaktivatör-1 α (PGC-1 α) asetilasyonunu modüle edildiğinde, glukoneojenik süreçinde katılan bazı genlerin pirüvat karboksi kinaz 1 (*PCK1*) gibi aktivitesini inhibe etmiştir. Bu nedenle Siklin D1 vücutta bazı

metabolik süreçlerinde de katılabilmektedir. Cdk'tan bağımsız olarak durumunda, siklin D1'in hücrelerin migrasyonunda etkileyebileceğini bildirilmiştir. Siklin D1, hücre migrasyonu için önemli düzenleyiciler olan Rho-aktifleştirilmiş kinaz II (ROCKII) ve trombospondin 1'in (TSP-1) ekspresyonunu baskılamaktadır (275). Glikojen sentez işlemi, sitoplazmik serin / treonin protein kinazı olan GSK-3 β tarafından glikojen sentaz enzimi fosforile edildiğinde inhibe edilmektedir. GSK-3 β 'nin bazı önemli biyolojik süreçlerde, bir dizi sinyalleme yolu gibi özellikle Wnt / β -katenin yolun gelişiminde önemli roller oynadığını görünmüştür (282). Buna istinaden bu enzimin hasarı diyabet, Alzheimer ve kanser de dahil olmak üzere bir dizi hastalığın ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (283). Wnt ligandlarını yokluğunda, CK1 α benzeri GSK-3 β β -katenin yapısında var olan spesifik amino terminal kalıntıları (Ser 37 ve Thr 41) fosforile ederek moleküllerinin 26 S proteazom sisteminde degradasyonu aracılık etmektedir (284). Bu nedenle Wnt ligandlarını varlığında Frizzled reseptöre bağlandıktan sonra dağılık proteinleri oluşur ve böylece GSK-3 β inhibe etmektedir. Bu nedenle, fosforlanmamış β -katenin sitoplazmada birikir ve çekirdeğe taşınır, burada β -katenin hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Aktif olan GSK-3 β 'nin *CCND1* geni ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. Bu nedenle, Siklin D1 degradasyonu GSK-3 β etkisi ile düzenler ve Siklin D1 gen ekspresyonunu Wnt/ β -katenin sinyalleri ile aktive etmektedir (Şekil 30) (285).



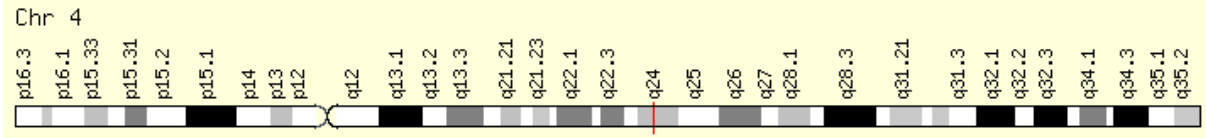
Şekil (30): GSK-3 β Siklin D1 degradasyonunda rolü (285).

Siklin D1 geninin insan kanserlerinin büyük bir kısmında eksprese edildiğini bulunmuştur.

2.6. Hücre ölümü genleri.

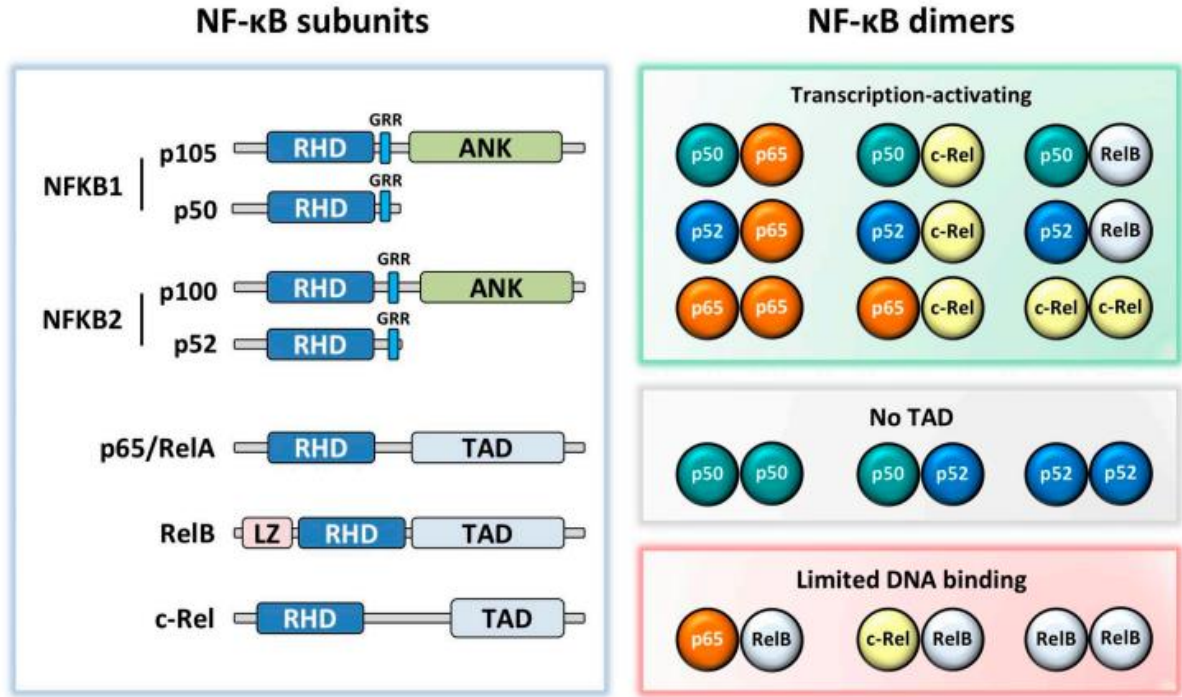
2.6.1. Nükleer Faktör Kappa B Alt Birim 1 (NFκB1) geni:

Molekül kütlesi 105356 Da ve 115,974 baz hacmi olan *NFκB1* geni 968 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu şekil 31'e göre 4q24'tür ve Hücre dışı, sitozolda, çekirdekte ve mitokondrid yüksek eksprese edildiğinde sitozolda ve plazma membranı az eksprese etmektedir (286).



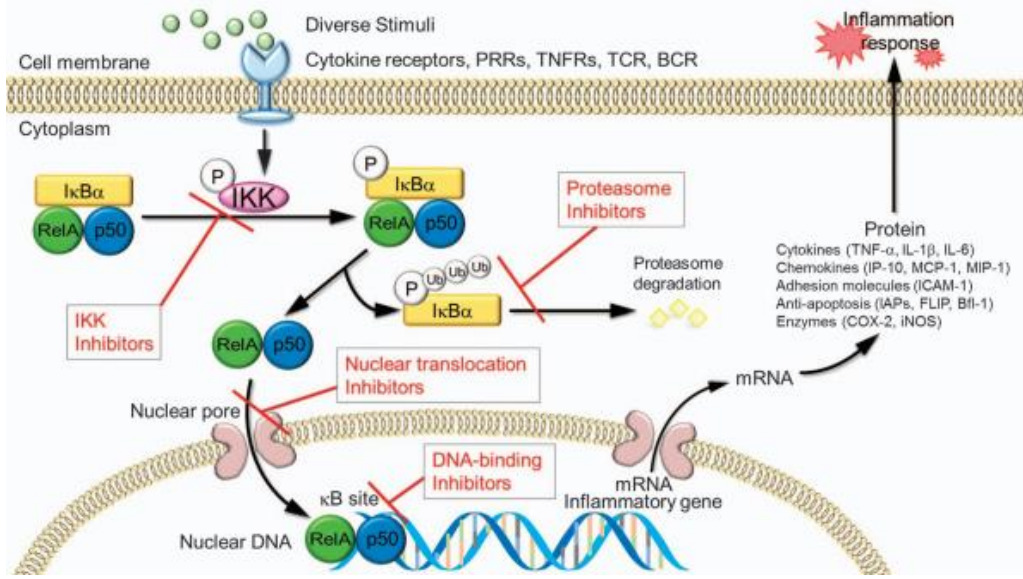
Şekil (31): Nükleer Faktör Kappa B Alt Birim 1 geninin kromozom üzerindeki konumu (286).

NFκB, 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından keşfedilmiş, B hücrelerindeki immüoglobulinlerin kappa hafif zincirinde bir transkripsiyon faktör olarak kabul edilmiştir. NFκB transkripsiyon faktörlerinin, bağışıklık tepkilerinin, farklılaşma, hücre büyümesi, apoptozun ve hücre sağkalımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar, bu nedenle kanser başlangıcı ve ilerlemesinin merkezi mediatörler olarak rol oynadığını bildirilmiştir (287). NFκB, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole ışınlama ve bakteriyel veya viral ürünler gibi çeşitli hücre içi ve hücre dışı uyaranlar tarafından aktive edilen bir transkripsiyon düzenleyicidir (288). Aktif olan NFκB beş alt biriminden p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p50 (NFκB1) ve p52 (NFκB2) şekil 32'de gösterilmiş gibi memeli hücrelerinde oluşmaktadır (289).



Şekil (32): NFκB alt birim yapıları ve dimerik kombinasyonlar (289).

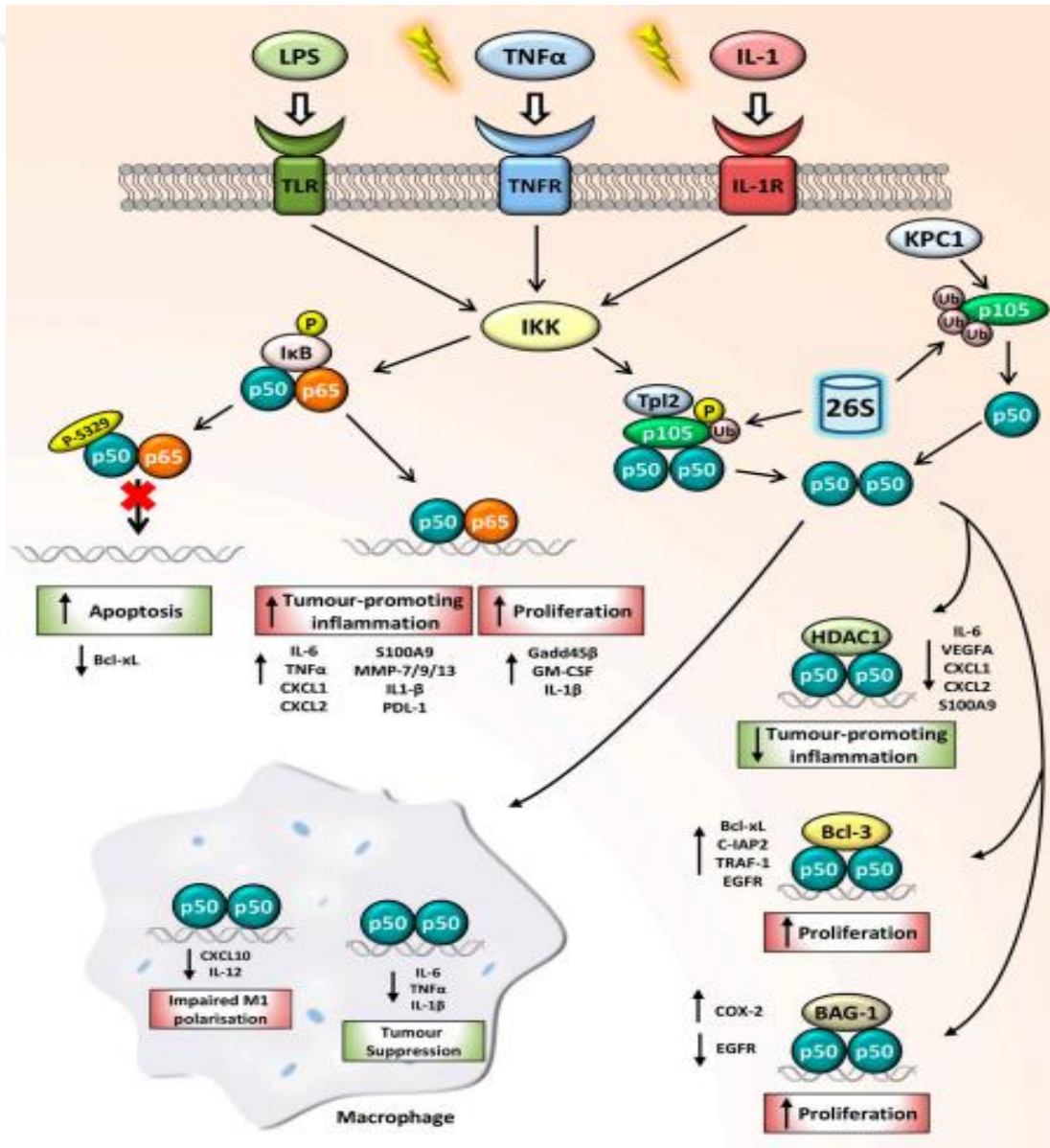
Genel olarak NFκB kompleksleri, NFκB inhibitörleri (IκB'ler) olarak adlandırılan başka bir ankirin tekrarı içeren protein ailesi tarafından inaktif bir sitoplazmik formda tutulmaktadır (290). Çoğu hücre tipinde, NFκB kompleksleri büyük oranda sitoplazmada kalır ve bu nedenle hücre uygun bir katalizör uyarılana kadar nispeten aktif olmamaktadır. Şekil 33'e göre, hücrelerin bakteriyel lipo poli sakkarid (LPS) veya proenflamatuar sitokinler (TNFα, IL-1) gibi farklı tip uyarıcılara yanıt verir, IκBα proteinleri amino terminal bölgesi içinde bulunan iki serin kalıntıları fosforile olmaktadır. Bu fosforilasyon işlemi, IκBα proteininin ubiquitinasyonuna ve ardından 26S proteazomu tarafından proteolize yol açmaktadır. IκBα proteininin degradasyondan sonra, NFκB'nin serbest bırakılması, böylece nükleusta birikir ve enflamatuar yanıtlarda ve hücre büyüme kontrolünde rol oynayan spesifik genlerin ekspresyonunu aktive etmektedir (291).



Şekil (33): NFκB Aktivasyonu Yolağı (291).

Benzo a pyrene, radyasyonlar vb. gibi çeşitli tümör promotörleri ve kanserojenler NFκB'yi aktive edebilir. NFκB, hücre hayatta kalmasından ve çoğalmasından sorumlu olan birkaç genin ekspresyonu regülasyonunun için çok önemlidir. Diğer bir yandan, tümör invazyonu ve anjeogenez ile ilgili bazı genlerin NFκB tarafından düzenlendiği bulunmuştur. Aktif *NFκB*'nin meme, kolon, pankreas, prostat ve diğerleri gibi kanser hücre hatlarının çoğunda eksprese edildiğini gösterildi. Doksorubisin, daunorubisin, taksol, cisplatin ve diğer ilaçlar gibi bazı kemoterapötik ajanların, kemoterapinin neden olduğu apoptoza karşı dirence yol açan NFκB'yi aktive edebileceği bildirilmiştir (292). p50 homodimerlerinin öncelikle gen transkripsiyonunu baskıladığı, enflamatuar yanıtları azalttığı ve anti-apoptotik sinyali kaldırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle p50 homodimerlerinin tümör baskılayıcı olarak kullanabilmektedir. Bazı kanser hücrelerinde KIP1 ubiquitinasyonu destekleyen kompleks 1 aşırı ekspresyonunu, tümör büyümesini inhibe eden p50 oluşumuna yol açmıştır (293). Enflamatuar stimülasyondan sonra İnhibitör Kappa Kinaz (IKK), NFκB1 sinyal yolu için ana stimülatör görevi yapmaktadır. IκB'nin fosforilasyonu ve ubiquitinasyonu, tümör destekleyen pro-enflamatuar genlerin (IL-1β, TNFα, CXCL1), anti-apoptotik (Bcl-xL, Bcl-2, Gadd45β) ve proliferatif (IL-6, GM-CSF) genlerin transkripsiyonunu yönlendirebilen p50:p65 dimerlerini serbest bırakmaktadır. Bu nedenle NFκB, bu tarafta bir tümör promotörü olarak görevi göstermiştir. Çalışmalar, p50 yapısında serin 329 fosforilasyonu meydana geldiğinde, p50:p65 heterodimerinin DNA'ya bağlanmasını bozulur ve bu işlemin, *Bcl-xL* ekspresyonunu azaltarak, kanserin ilerlemesini engellediğini göstermiştir. Serin 329'da ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış ve Rad3 ile ilişkili kinaz (ATR) vasıtasıyla p50 fosforilasyonu,

replikasyon ile ilişkili DNA hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar ve genomun korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Hücre döngüsünün S fazı sırasındaki bu fosforilasyon işlemi, p50 aktivitesini ve DNA'ya bağlanmasını inhibe eder, bu da anti-apoptotik protein Bcl-xL'nin ekspresyonunun azalır ve hücrelerin DNA iplik kopmalarına duyarlı hale getirilmesine neden olmaktadır. p105 fosforilasyon ve ubikuitinasyon, 26S proteazom tarafından işlenmesine yol açar ve p50 homodimerlerini serbest bırakmaktadır. P50: p50: HDAC1 kompleksi, inflammatuar gen ekspresyonunu destekleyen tümörü bastırır (294), böylece tümör baskılayıcı bir kompleks olarak işlev görürken, B hücre lymfoma 3 (Bcl-3) veya BAG-1 ile kompleks halinde bulunan p50 homodimerleri proliferasyonu yönlendirebilmektedir (295). Açıklanan tüm oayların şekil 34'te gösterilmiştir.

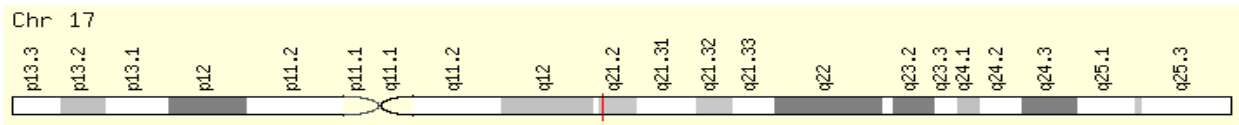


Şekil (34): Kanserde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde NFκB1'in rolü (294).

Çalışmalar NFκB'nin en sık enflamasyonla ilişkili kanserin aktive ettiği olarak gösterdiğinde (296) başka bir çalışmalar anti enflamatuar p50 homodimerlerinin hepatosellüler karsinomda tümör baskılayıcı olarak rol oynayabildiği bildirmiştir (297). Ek olarak, NFκB1 alkilleme ajanları gibi toksik gen hasarına neden olan kanserojenlere karşı doğrudan hücre koruyucu bir yanıt verebilmektedir. NFκB1'in alkilatör aracılı hücre hasara takiben hematolojik maligniteyi önleyen yola özgü bir tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı gösterilmiştir (298). Kravtsova-Ivantsiv Y. ve ark. bir çalışmalarında, baş-boyun ve glioblastom kanserlerinden insan tümör dokularında p50 eksprese olduğu bildirilmiştir (293). Kolorektal kanser hücre hatları üzerinde yapılan çalışma, p50 homodimerlerinin, anti-apoptotik BCL2 ile ilişkili athanogene (BAG-1) epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) genin promotörüne katılmasında bir rol oynadığını göstermiştir. BAG-1, EGFR ekspresyonunu baskılamak için p50'ye ihtiyaç duyar ve bu nedenle potansiyel olarak kolorektal kanserin başlaması ve ilerlemesi için önemli bir sinyal yolunu düzenlemektedir (299).

2.6.2. DNA Topoisomerase II Alpha (*TOP2A*) gen:

İnsanlarda, bu enzim *TOP2A* geni tarafından kodlanır. Molekül kütlesi 174385 Da ve 29,430 baz hacmi olan *TOP2A* geni 1531 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu ise 17q21.2'dir (Şekil 35), ve çekirdekte yüksek eksprese ederek mitokondride, sitozolda ve plazma membranında daha az eksprese etmektedir (300).



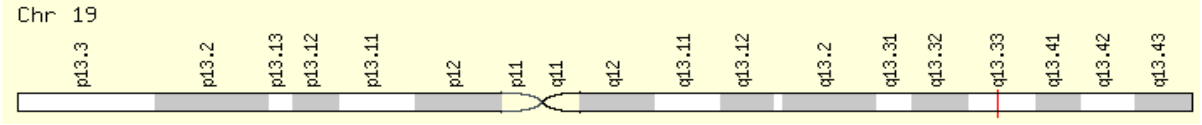
Şekil (35): DNA Topoisomerase II Alpha geninin kromozom üzerindeki konumu (300).

TOP2A, sağlam bir DNA çift sarmalının diğerine ATP'ye bağımlı taşınmasını katalizleyen yüksek oranda korunmuş enzimlerden biridir (301). Fonksiyonel enzim, N-terminal ATPase geçidinden, DNA bağlayıcı geçitten ve C-geçidinden oluşan bir yapı veren TOP2 monomerlerinin dimerizasyonu yoluyla oluşturulmaktadır (302). TOP2A, DNA replikasyonu ve transkripsiyon sırasında topolojik stresin giderilmesi için gerekli olan önemli bir nükleer enzimdir (303). İkili DNA dizisinin geçici olarak kırılmasını ve yeniden birleşmesini, ipliklerin birbirinden geçmesini ve böylece DNA'nın topoloji değiştirmesini katalize etmektedir. Bu enzim, çoğaltma, transkripsiyon, DNA onarımı ve kromozom yapısının bakımı gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır (304). Bu nükleer enzim özellikle kromozomun yoğunlaşması, kromatitlerin ayrılması ve DNA transkripsiyonu ve replikasyonu

sırasında oluşan topolojik stresinin hafifletilmesinde rol oynamaktadır. *TOP2A* bölünme aşamasında hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilir, bu nedenle hücre döngüsü yoluyla düzenlenmiş bir rol oynayabilir ve proliferasyon markeri olarak kullanılabilir (305). Yüksek seviyelerde *TOP2A*'nın birkaç kanser için ileri bir aşamaya işaret ettiğini gösterilmiştir (306). Bazı kanser tipleri tedavisinde *TOP2A* inhibitörleri *TOP2A*'yı üzerinde etkilediği için terapötik bir yöntem olarak kullanılmıştır (307). *TOP2A* inhibitörleri olarak sınıflandırılan ilaçların, klinik kullanımında çoğunu oluşturur. Doksorubisinin DNA bölünmesini / ligasyon döngüsünü engelleyerek, çift sarmalı DNA kopmalarını (DNA DSBs) ve hücre ölümünü tetikleyerek *TOP2A*'yı hedeflediğini bildirilmiştir (308). *TOP2A* enzim aktivitesi, post-translasyon modifikasyonlarla fosforilasyon gibi düzeltmektedir. Bu fosforilasyonu enzim yapısında bazı yerlerde gerçekleşmektedir (309). *TOP2A* post-translasyon modifikasyonları etkisi ile *TOP2A* dekinasyon aktivitesinde bir kusuru oluştuğunda, kanser hücrelerinde topoizomera inhibitörlerine karşı dirençli hale gelmiştir (310). İnsan kanserlerinde en yaygın genetik farklılıklardan biri TP53 eksikliği ve bildiğimiz gibi TP53'ün *TOP2A* ekspresyonunu negatif olarak düzenlemekte, kanser hücrelerinde TP53 mutasyonu olduğu için *TOP2A* seviyeleri yükselir ve bu hücreler *TOP2A* inhibitörlerine daha duyarlı olmaktadır (311). Diğer taraftan bu bölgelerindeki oluşan mutasyonları tümör hücrelerini *TOP2A* inhibitörlerine karşı direnç oluşumuna yol açmaktadır (312). In vitro ve in vivo çalışmalar, *TOP2A*'nın apoptoz inhibisyonu mekanizmaları ve hücre içi dağılımın değiştirilmesi ile kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir (313, 314). *TOP2A* gen anormal ekspresyonunun akciğer kanseri (315), meme kanseri (316), ve pankreatik adenokarsinom (317), dahil olmak üzere çoklu tümör belirtileri ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (318). Faggad A ve ark. çalışmasında, primer invaziv yumurtalık karsinomunda, yüksek dereceli ve ileri evre tümörlerde *TOP2A* eksprese edildiğini bildirmiştir (306). Diğer çalışmada, *TOP2A* agresif prostat kanserinde eksprese edildiği gösterilmiştir (319).

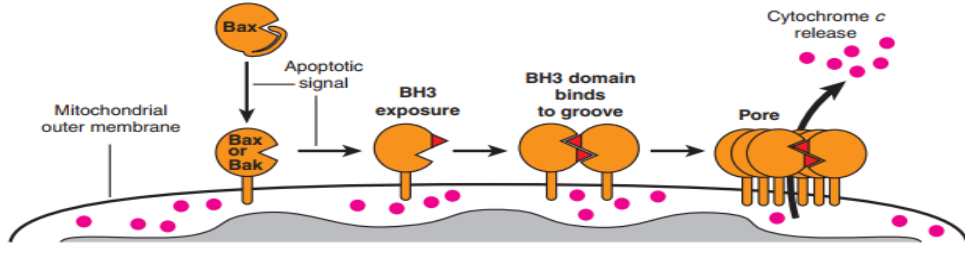
2.6.3. *BCL2* ilişkili X (*BAX*) geni:

Molekül kütlesi 21184 Da ve 6,984 baz hacmi olan *BAX* geni 192 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu şekil 36 gösterilmiş gibi 19q13.33, ve sitozolda, çekirdekte ve mitokondride yüksek eksprese edildiğinde plazma membranında daha az eksprese etmektedir (320).

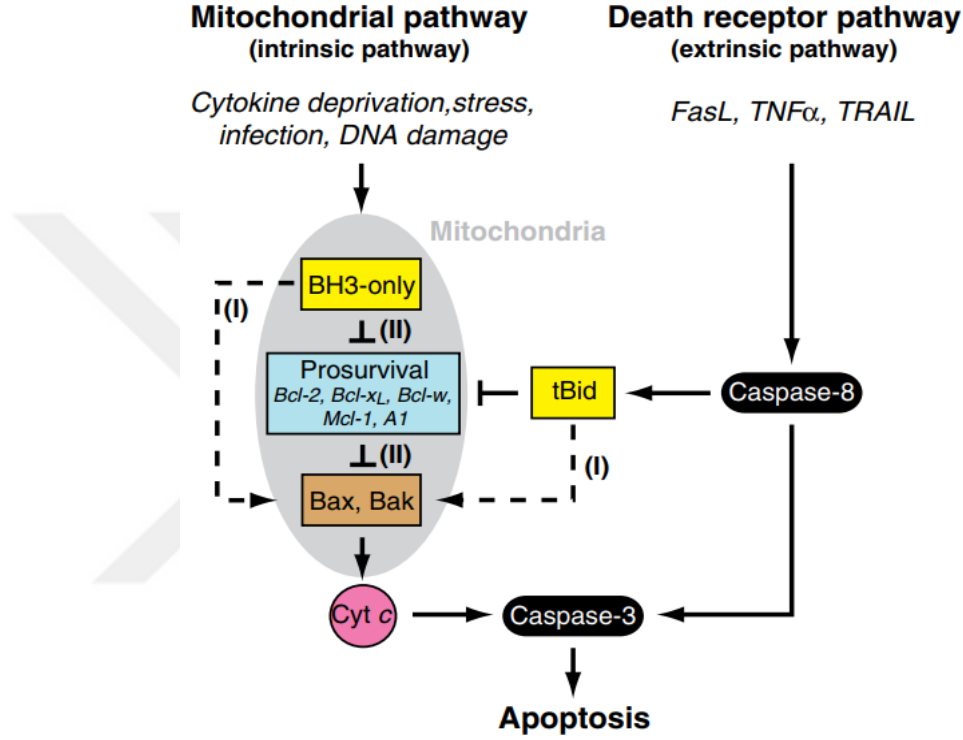


Şekil (36): *BCL2* ilişkili X geninin kromozom üzerindeki konumu (320).

BAX, yüksek oranda korunmuş evrimsel ve apoptotikle ilişkili proteinlerden oluşan bir grup olan B hücreli lenfoma-2 (*Bcl-2*) ailesi üyelerinden biridir. *BAX*, *Bcl-2* ailesinin ilk tanımlanmış proapoptotik bir proteindir (320). Bu ailenin yanı sıra *Bcl-2* ve *BCL-X* gibi antiapoptotik üyeler içermektedir. Normal koşullar altında, pro apoptotik ve anti apoptotik durumlar arasında dinamik bir denge olmaktadır. Anormal iç veya dış stimülasyonlar altında pro apoptotik ve anti apoptotik arasında var olan dengenin bozulur, bu nedenle vücut telafi edilemeyebilir ve bu da tümör oluşumuna yol açabilmektedir (321). *BAX* geni apoptotik genidir, direkt P53 tarafından düzenlenir ve yapısal anahtarlama, trafik işlemleri ve agregasyon durumu gibi bir dizi değişikliklerle intrinsik yoldan programlanmış hücre ölümünü aktive edebilmektedir (322). Hücre programlama ölümünün iki ana yolu mitokondrial (intrinsik) yolu ve ölüm reseptörleri (ekstrinsik) yolu üzerinden gerçekleşmektedir (323). Sağlık memeli hücrelerde *BAX* protein inaktif şeklinde sitozolda ve bazen mitokondriyal dış zarında monomerik durumunda bulunmaktadır. Apoptotik sinyallerin etkileri altında *BAX*'ta diğer *Bcl-2* proteinleri ile heterodimerizasyona veya homodimerizasyona yol açan birçok yapısal değişiklik meydana gelmektedir (324). *BAX* hücre ölümüne neden olduğu, mitokondriyal dış zar ile etkileşimleriyle ilişkili olduğunu gösteren bazı kanıtlar önermektedir. Hücresel stresle indüksiyona ek olarak, mitokondriyal veya intrinsik apoptoz yolunun pro-apoptotik BH3 proteinlerinin aktivasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir. BH3-proteinleri direkt olarak *BAX*'a bağlarken aktive edebilir ve ayrıca *BAX*'in dolaylı olarak aktive etmek için *rosurvival Bcl-2* benzeri proteinlere bağlanabilmektedir (325). Çalışmalar, *Bax* aktivasyonundan kaynaklı hücre ölüm yollarında yer alan mitokondriyal dış zarın bazı mekanizmalar üzerinden gerçekleşmektedir. Bu mekanizmaları, mitokondriyal voltaja bağlı anyon kanalının (VDAC) (326), mitokondriyal oligomerik porlar (MAP) oluşturma (Şekil 37) (327), ve mitokondriyal apoptoza bağlı kanalın (MAC) aktive edilmesi (328) içermektedir. Sonuç olarak aktive edilmiş *BAX*, mitokondriyal dış zarında sitokrom c salgılayan porlar oluşturmak için oligomerize yol açmaktadır. Sitozola salgılanan sitokrom c kaspaz aktivasyonunda hücre ölümüne yol açmaktadır (Şekil 38) (323).



Şekil (37): Mitokondriyal oligomerik porlar (MAP) oluşumu ve rolü (327).



Şekil (38): Hücre ölümünde BAX rolü (323).

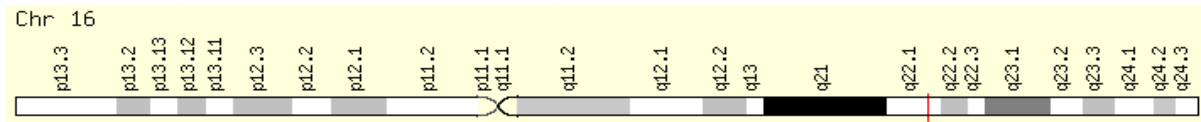
Birçok çalışma *BAX* ekspresyonunun katı tümörlerin ve hematolojik malignitelerin gelişimi ile bağlantılı olduğunu onaylamıştır (329). Bu nedenle *BAX* mutasyonu, apoptoza karşı tümör direncinde önemli bir rol oynamaktadır (330). Yumurtalık karsinomu hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, değişmiş *BAX* ekspresyonunun Cisplatin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (331). Manoochehri M. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, değişmiş *BAX* ekspresyonu hem kolorektal karsinogenez hem de 5-FU'ya hücre direnci sırasında temel bir faktör olarak rol oynayabileceği bildirilmiştir (332). Zoledronat-dirençli akciğer kanseri hücre hatları da değişmiş *BAX* ekspresyonu ile gerçekleşmiştir (333). *BAX*'ın pro-apoptotik fonksiyonunun Ser184 fosforilasyonu ile inhibe edilir, böylece *BAX*'ın sitoplazmada kalır ve anti apoptotik Bcl-2 proteinleri ile heterodimerize edilmesine yol açar, bu süreç insan akciğer

kanseri hücrelerinin hayatta kalmasına ve kemorezistansına katkıda bulunmuştur. Bu nedenlerle, pro-apoptotik özelliği aktive etmek için ve direncin üstesinden gelmek kabiliyetinde BAX uyarıcıları kullanabilir, böylece apoptozun indüklenir ve tümör büyümesini azaltmaktadır (334).

2.7. İlaç metabolizma genleri:

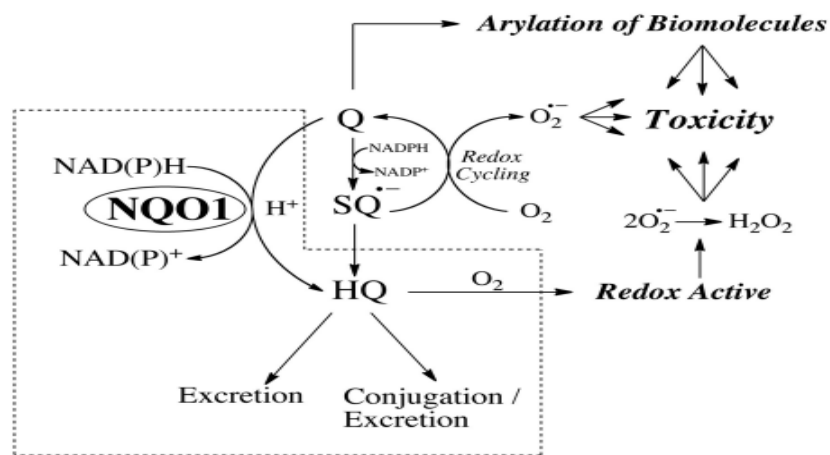
2.7.1. NAD(P)H kinon dehidrojenaz 1 (NQO1) geni:

Molekül kütlesi 30868 Da ve 19,673 baz hacmi olan *NQO1* geni 274 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu ise 16q22.1'dir (Şekil 39), ve sitozolda yüksek eksprese edildiğinde mitokondride ve çekirdekte daha az eksprese etmektedir (335).



Şekil (39): NAD(P)H Kinon Dehidrojenaz 1 geninin kromozom üzerindeki konumu (335).

NQO1, bu substratların hidrokinon (QH₂) formlarına iki ve dört elektron indirgenmesini katalize ederek endojen ve eksojen kinonların (Q) ve türevlerinin detoksifikasyonunu sağlayan bir sitozolik homodimerik flavoproteindir. NQO1 enzimi, kinonların ve türevlerinin direkt olarak iki elektron indirgenmesini katalize etmek için NADH veya NADPH indirgenmiş şekilleri kullanmaktadır (Şekil 40) (336). Bazen moleküler oksijenin süperoksit anyonuna indirgenirken QH₂'nin bir yarıkinon serbest radikaline (SQ^{•-}) ve orijinal kinona geri oksitlenebilecek, bu süreç stabilitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir (337).

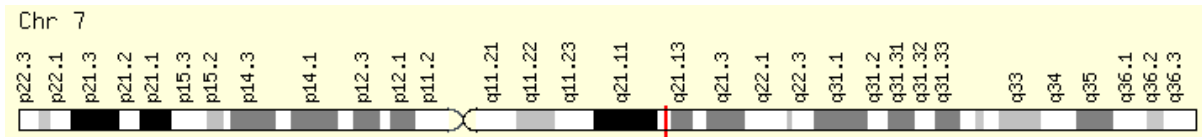


Şekil (40): Kinonlarda NQO1 enzim etkisi (336).

Bu nedenlerden dolayı NQO1 kinonların redoks döngüsü detoksifike edildiğinde, hücreler oksidatif stresten korunmasında ve karsinogenez önleminde önemli roller oynamaktadır (338). NQO1, faz I ilaç metabolize edici enzim olarak sınıflanmaktadır (339). *NQO1* aşırı ekspresyonu oksidatif strese ve kemoterapötik ajanlara karşı korunması için hücreler büyümesine ve geliştirmesine yol açar, bu nedenle kanser ilerlemesine ve kemo direncine yol açmaktadır (340). Normal hücrelerin aktivasyonu tümör oluşumunu önleyebilirken, NQO1'in inhibisyonunda kemoterapötik ilaçlarına ait terapötik etkinliğini artırabilmektedir. Kanser hücrelerinde düzenlenmiş NQO1'in, kemoterapötik ajanların oksidatif toksisitesini azaltarak ve tümör büyümesinin çevresel streslerini arttırarak kimyasal dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir. *NQO1* ekspresyonu, oksidatif stres koşulları sırasında antioksidan tepki elemanı (ARE) tarafından düzenlenmektedir (341). Destekleyici bölgedeki NQO1'in yapısı ARE dizisini içermektedir. Başka bir çalışmada, NQO1'in *NQO1* geninin ekspresyonunu ve indüksiyonunu düzenlemek için ARE'ye bağlanan nükleer faktör (eritroid türevi 2) benzeri 2 (Nrf2) ile regüle olabileceğini gösterdi (342). Hem enzim aktivitesinde hem de protein seviyelerinde tümör ve normal dokularda karşılaştığında farklı bir *NQO1* ekspresyon gösterilmiştir (343). NQO1'in, normal sağlıklı hücrelerin yapısının ve işlevinin korunmasından sorumlu olmasını sağlayan bir kanser önleyici / detoksifiye edici enzim olarak rol oynadığını gösterilmiştir (344).

2.7.2. ATP bağlayıcı kaseti alt ailesi B üye 1 (*ABCB1*) veya Çoklu ilaç direnci proteini 1 (*MDR1*) veya P-glikoprotein (P-gp):

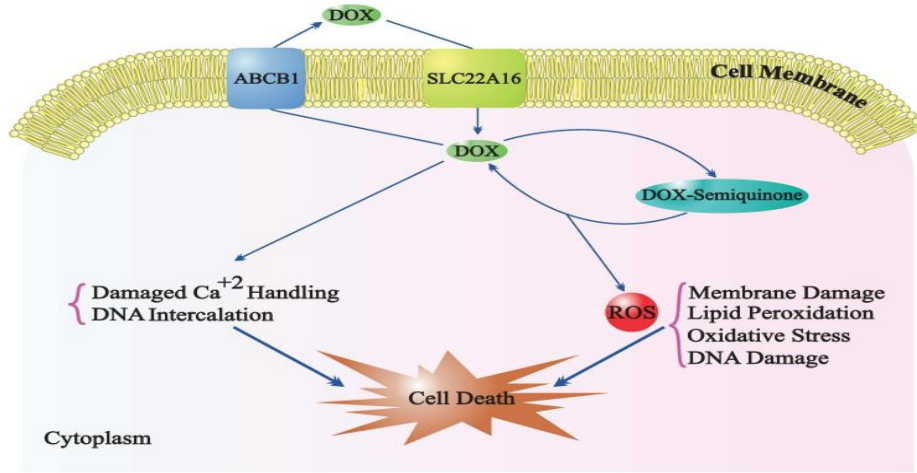
Molekül kütlesi 141479 Da ve 209,691 baz hacmi olan *ABCB1* geni 1280 amino asitten oluşan protein kodlar. Kromozom üzerindeki konumu şekil 41'de gösterilmiş 7q21.12'dir ve p-glikoprotein kodlanmaktadır. Çekirdekte ve plazma membranında yüksek eksprese edildiğinde mitokondride ve sitozolda daha az eksprese etmektedir (345).



Şekil (41): *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1* geninin kromozom üzerindeki konumu (345).

Bu gen tarafından kodlanan membrana bağlı protein, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının alt ailesinin bir üyesidir ve hücresel homeostazdan sorumluluğu olarak görevi

göstermiştir. ABC proteinleri, çeşitli molekülleri hücre dışı ve hücre dışı zarların boyunca taşınması sorumludur. Tüm ökaryotik ABC proteinleri akış pompaları gibi görev yapmaktadır. ABC taşıyıcıları, molekülleri hücre zarları boyunca taşıyarak hormonların, lipidlerin, iyonların, ksenobiyotiklerin ve diğer küçük moleküllerin hücre içi düzeylerini düzenleyebilir ve mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum ve golgi aparatı gibi organellerin hücre içi regülasyonu dahil olmak üzere önemli fizyolojik roller oynamaktadır (346). Bu nedenle *ABCB1* geni tarafından kodlanan protein, geniş substrat spesifitesine sahip ksenobiyotik bileşikler için ATP'ye bağımlı bir ilaç akışı pompası rolü oynamaktadır (345, 347). *ABC* genleri yedi ayrı alt aileye (*ABCB1*, *MDR / TAP*, *MRP*, *ALD*, *OABP*, *GCN20*, Beyaz) ayrılmaktadır (348). *ABCB1* protein *MDR/TAP* alt ailesi üyelerinden biri ve bu alt aile üyelerinin çoklu ilaç direncinde kapsamındadır. *ABCB1*, çoklu ilaç dirençli hücrelerde ilaç birikimini azaltmasından sorumludur ve sıklıkla anti kanser ilaçlarına direncini gelişimine aracılık etmektedir. *ABCB1* proteini ayrıca kan-beyin bariyerinde bir taşıyıcı olarak önemli bir rol oynamaktadır. *ABCB1*, kanser hücrelerinden ilaç akışını artırabilir, bu nedenle hücre içi ilaç konsantrasyonunun azalmasına yol açmaktadır (349, 350). Doxorubisin ilacı, hücre dışına *ABCB1* gen üzerinden kodlanan protein vasıtası ile taşınması gerçekleşmektedir (Şekil 42) (351).



Şekil (42): Doksorubisin taşınması (351).

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. Kullanılan cihazlar:

- Real-Time PCR Cihazı/Rotor Gene 6000 (Qiagen, Germany)
- Laminar hava akım kabini (Steril-Vbh)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Hassas Terazı (Denver Instrument Company, USA)
- Masaüstü mikro santrifüj (Msc Micro Centaur, UK)
- Maestro Nanodrop (Green Bioreserch, USA)
- Mikropipetler -10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl- (Gilson, USA)
- Dijital Pipet (İso Fill)
- PH metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Vorteks (Clifton Cyclone, UK)
- Karbondioksitli İnkübatör (Nüve Türkiye)
- Propsonikatör (Fisher-Sonic Model 300 USA)
- UV-Görünür Bölge spektrometresi
- Otoklav (Nüve- Türkiye)
- Zeta Potansiyel Cihazı
- -80° C Derin Dondurucu
- 4°C Buzdolabı
- Su Banyosu
- İnvrt Mikroskop (AXIO).
- Mikroplaka Okuyucu (BioTek)

3.2. Kullanılan plastik malzemeler:

- 6 kuyucuklu plaka
- 25'lik flask
- 75'lik flask
- 100 µl PCR tüpleri (Qiagen)
- 0,2 ml ve 2,0 ml mikro santrifüj tüpleri (Axygen)
- 0,5–10 µl, 1–200 µl, 100–1000 µl mikropipet uçları (Axygen)
- 15 ml ve 50 ml konik uçlu falkon tüpleri (LP Italiana SPA)
- 5 ml, 10 ml, 25 ml plastik pipetler (LP Italiana SPA)
- 96 oyuklu plaka
- Kriyo-tüb (1.8 ml)
- Pastör pipeti
- Eldiven

3.3. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler:

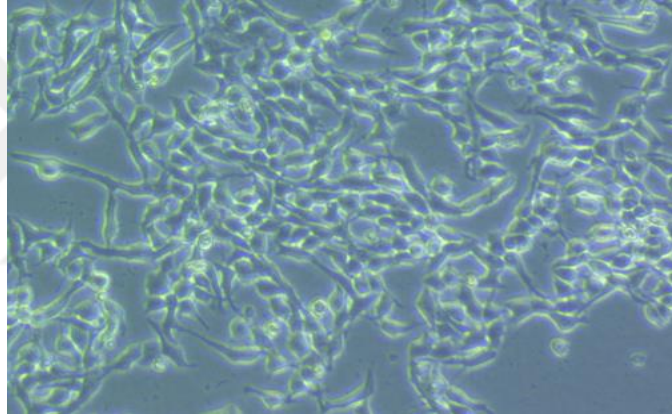
- HeLa Servikal Kanser hücre hattı
- RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)
- RT First standart kit (Qiagen, Germany)
- RT² qPCR Primer Assay (Qiagen, Germany)
- RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, Germany)
- Titanyum dioksit -TiO₂
- PEG-maleik asit anhidrit
- Etil Alkol (Merck, Germany)
- Fosfat Tamponu (PBS) (Sigma, USA)

- MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)
 - Aqua koruyucu (Sigma)
 - Ultra saf su (Sigma)
 - Penisillin/Streptomysin (%1) steril solusyonu (Biological Industries - Israel)
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biological Industries - Israel)- (Sigma)
 - Fetal sığır serumu (Biological Industries - Israel)
 - Tripsin (Biological Industries - Israel)
 - L-Glutamin (Biological Industries - Israel)
- Sülfirik asit (H_2SO_4)
- Sodium molibdat (Na_2MoO_4)
- Askorbik asit ($C_6H_8O_6$)
- Potasyum sülfat ($KHPO_4$)
- Triklorik asit (TCA)
- Disodium fosfat (Na_2HPO_4)
- Sodium dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)
- 5,5 dithiobis (2-nitro benzoik asit) (DTNB)
- GSH enzim
- HCl Tris ($NH_2C(CH_2OH)_3 HCl$)
- Sodium pirüvat ($C_3H_3NaO_3$)
- Nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)

3.4. Kullanılan hücre hattı:

3.4.1. HeLa insan servikal kanser hücre hattı:

HeLa hücre hattı, günümüzde servikal kanser çalışmalarında sıklıkla tercih edilen hücre hatlarından birisidir. İlk defa 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Baltimore'da servikal kanser nedeniyle takip edilen Afrika kökenli Amerikalı Henrietta Lacks adındaki yetişin bir kadının kanser dokuları alınarak hücre kültürü ortamında çoğaltılmış ve HeLa hücre serisi olarak adlandırılmıştır. Araştırmaların kültür yapmaya ve yetiştirmeye diğer insan hücrelerine kıyasla, HeLa hücreleri, yüksek büyüme hızı, çok dayanıklı, saklanması ve transferinin kolay gibi bazı özelliklere sahiptir. Bu özelliklerden dolayı HeLa hücre hattı tıbbi ve biyolojik çalışmalarda kullanmayı çok önemlidir.



Şekil (43): HeLa hücre hattının mikroskopik görüntüsü(10x).

3.5. TiO₂ nanoparçacık sentezi ve peglasyon işlemi:

TiO₂ nanopartikülü sol jel yöntemi ile elde edildi. Bunun için 108 ml titanyum trifosfid (TIP) öncü olarak kullanıldı, 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 oranı H₂O/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 TiO₂ nanopartikülü elde edildi.

PEG-TiO₂'nin sentezi ise suda çözülmüş 100 mg/ml'lik şekillendirilmiş PEG-maleik asit anhidridin pH'ı, 0.1 M NaOH ile 4.0'a ayarlandı. PEGMA'nın karboksil gruplarını aktive etmek için, 0.6 ml 0.8 mol/l l-etil-3- [3-dimetilaminopropil] karbodiimid hidroklorür eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra, 0.3 ml 0.2 M 4-amino-salisilik asit çözeltisi ilave edilecek ve karışık çözelti, 40°C'de 16 saat süreyle inkübe edildi. Reaksiyona girmemiş 4 ASA ve diğer küçük moleküller, üreticinin tavsiyelerini takip ederek beş kez santrifüjleme yoluyla uzaklaştırıldı. Reaksiyona giren PEGMA-4ASA çözücüsünün değişimi 25°C'de, 20 hPa'da 3 dakika ve 35 dakika boyunca 5 hPa'da vakumla kurutulduktan sonra gerçekleştirildi. PEGMA-ASA'nın konsantrasyonu dimetil formamit (DMF) ile 50 mg/ml'ye ayarlandı. Asidik TiO₂ çözeltisi organik titanyum bileşiğinin hidrolize dayalı termal sentez yoluyla hazırlandı ve bu işlemin sonrasında peptizasyon yapıldı. Kloro titanyum triizopropoksitin hidrolizinden sonra, HNO₃ ile peptitleme 80°C'de gerçekleştirildi. Reaktan maddeleri, 1.5 M HNO₃ ile % 20'lik (ağırlık / hacim) katı içeriğine ayarlandı. 200 kHz'de 30 dakika boyunca ultrasonifikasyon uygulamasından sonra, partikül büyüklüğü dağılım analizi, ve zeta potansiyel cihazı ile partikül boyut dağılımına bakıldı. Çözeltide yaklaşık 40 nm çapında TiO₂ partiküllerinin bulunduğunu gösterdi. 10 ml DMF'ye TiO₂ çözeltisi (0.75 ml) ilave edilecek ve DMF içindeki 5 ml 50 mg/ml PEGMA-4ASA ilave edildi, ardından karıştırıldı. 130°C 16 saat inkübe edilecek ve reaksiyon 600 rpm de şiddetli bir şekilde karıştırılarak solüsyon elde edildi. Reaksiyon sona erdikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Reaksiyona giren TiO₂/PEG çözücüsünün değişimi, 10 dakika boyunca 40 ° C'de 5 hPa'da vakumla kurutulduktan sonra gerçekleştirildi. TiO₂ / PEG konsantrasyonu su ile 10 mg/ml'ye ayarlandı ve TiO₂ / PEG sulu solüsyonu 5 kere santrifüj edilerek tekrar zeta potansiyel değerine bakıldı.

3.6. PEG-TiO₂ Nanotaşıyıcı sisteme DOX ilacının yüklenmesi:

Hazırlanan PEG-TiO₂ üzerine DOX yüklenecek. 0.5 mmol/L pH 8'de DOX gece boyunca PEG-TiO₂ solüsyonu ile (~ 0.2 mg / ml) karıştırıldı. Bağlanmamış fazla DOX filtre edildi, ayrıldı ve yıkama işlemi tekrar edildi. Daha sonra elde edilen PEG-TiO₂-DOX 4°C'de saklandı.

3.7. Hücre kültürü:

Çalışmamızda kullandığımız besiyeri; % 10 fetal sığır serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş DMEM (L-glutamin'li) besiyeridir. L-glutamin'li DMEM besiyeri ile üretilen HeLa insan servikal kanser hücre hattı 37° C'de ve % 95 nem, % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildiğinde çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi ve sonrasında aşağıdaki adımlar gerçekleştirildi:

1. -80°C'de kriyotüp içinde dondurulmuş HeLa insan servikal kanser hücre hattı 37°C 'ye ayarlanmış su banyosunda hızla çözündürüldü.
2. Kriyotüp içeriği 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınıp ve 5 ml üzerine besiyeri ilave edilerek 300g'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. %10 FBS (Fetal Sığır Serum), %1 Penisilin-Streptomisin (PS) ile birlikte L- glutamin'li DMEM'den oluşan besiyeri karışımı hazırlandı.
4. Süpernatantın uzaklaştırılıp, hücreler tüp dibinde kalır ve üzerine hazırlanan besiyeri (DMEM-FBS-PS) 5 ml eklenerek 25 ml'lik flask'a aktarıldı.
5. Flask'ın 37°C'deki % 5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi, müteakiben ilk gün 24 saat sonrasında, sonraki günlerde 48 saatte mikroskopla kontrol edildi ve besiyer ortamı yenilendi.
6. Hücreler bütün flask yüzeyini yoğun bir şekilde kapladığından dolayı 75 ml'lik flask'a transfere edildi, kaplamamışsa flasktaki sıvı dökülecek böylece yüzen ölü hücreler uzaklaştırıldı. Daha sonra flask'a besiyeri karışımından yaklaşık 5 ml eklenerek inkübasyona bırakıldı.
7. Yetmiş beş (75) ml'lik flask yüzeyini yoğun bir şekilde kapladığından dolayı başka flasklara pasaj yapıldı.

Not: Hücreler 25'lik flasktan 75'liğe transferi ve pasajlama süreci aynı adamlar izlenebilir.

8. Pasajlama için, flaskta bulunan sıvı aspire edildi ve flasklar iki kez fosfat tamponu ile yıkandı.

✓ Fosfat Tamponu hazırlama:

2.48 gr fosfat tampon salin ticari kotusundan aldık , 250 ml saf su üzerine ilave edildi, manyatik karıştırıcı üzerinde iyice karıştırıldı ve 4°C'de saklandı.

9. Hücrelerin üzerine 1.5 ml tripsin (25'lik flask) veya 3 ml tripsin (75'lik flask) ilave edilip flasklar 5-10 dakika inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.

10. İnkübatörden alınan flasklar mikroskopla incelenip, tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrolü yapıldı.

11. Hücreler kalktıktan sonra üzerine eklenen tripsin nötrilizasyon için aynı volum besiyeri eklendi ve toplam hacim iki 75'lik flask'a ayrıldı.

12. Her flask üzerine 10 ml besiyeri ilave edildi. Flasklar %5 CO₂ ve 37°C inkübe edildi.

13. Flasklar sayısı yüksek olduğunda birkaç flask içinde bulunan hücreleri donduruldu. Hücreler dondurmak için ilk aşamaları pasajlama gibi adımları yapıldı fakat hücreler kalkıp nötrilizasyon için besiyeri eklendi. Flasktan tam hacmi 15ml'lik santrefüj tübüne aktarıldı ve 300g, 5 dakikada santrifüj edildi. Üst fazı espire edildi ve dibinde kalan hücreleri 1 ml besiyeri ile süspanse edildi. Kriyotüp içinde bulunan 750 µl dondurma çözültisi üzerine hücreler süspansiyonu ilave edildi. Yine kriyotüpleri - 80°C saklandı.

3.7.1. 96'lık Plaka pasajlama işlemi:

- 75ml'lik flask yüzeyini yoğun bir şekilde kapladığında alındı, besiyeri aspire edildi, 2.5ml fosfat tamponu ile yıkandı, 3ml tripsin ilave edildi ve %5 CO₂ ve 37°C inkübatörde 10 dakika inkübe edildi.
- Hücreler tamamen kalkıp nötrilizasyon için 3 ml besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu iyice karıştırıldı. Hücre süspansiyondan az miktarı (100 µl) ependrof tübe alındı ve yoğunluğuna bağlı olarak seyreltme işlemi yapıldı.
- Hücre süspansiyondan 10 µl diğer ependrof tübe alındı ve üzerine 10 µl tripan mavisi ilave edilip karışık oluştu.
- 10 µl hücre/tripan mavi karışımından pipetle çekildi ve Thoma lamının tam ortasına damlatıldı.
- Thoma lamının üzeri hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel ile kapatıldı.
- Mikroskoba yerleştirilen Thoma lamının sayım çizgileri 40x mikroskop ayarında bulundu.
- Şekilde gösterildiği gibi, sadece merkezde çizgilerin keşiştiği 1mm²'lik alandaki 16 karenin içindeki maviye boyanmamış canlı hücreler sayıldı (Ölü hücrelerin her tarafı mavi oldu). Hücre sayıları birkaç 16 karesinden alındı ve ortalaması hesaplandı.

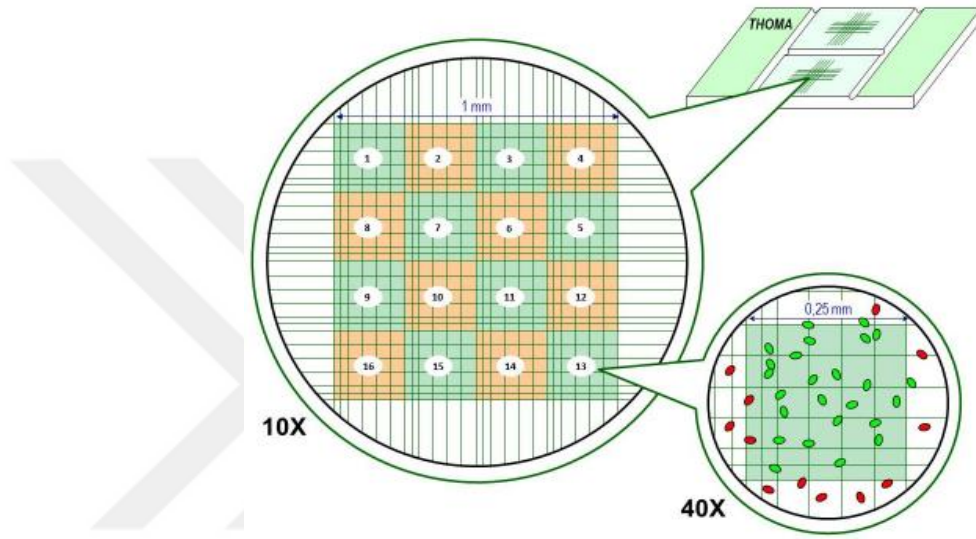
- Canlı hücre sayısı hesaplanmak için bu formula kullanıldı:

$$\text{Canlı hücre sayısı (hücre/ml)} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times 2 \times 10^5$$

Ortalama hücre sayısı: Birkaç defa 1 mm² 'lik alandaki 16 kare sayıldıktan sonra, toplam hücre sayısının kez sayısına bölünmesiyle elde edildi.

10⁵: Her 1 mm² alan hacim olarak 0.1 mm³'e, bu da 10⁵ ml'ye eşit olduğu için, ml'deki hücre sayısını bulmak için 10⁵ ile çarpılmıştır.

2: Seyreltme faktörü, çünkü biz aldığımız örnek hacmine eşit miktarda tripan mavisi konulduğu için 2 kat seyreltik.



Şekil (44): Thoma lamının mikroskop görüntüsü

Her plakada 96 oyuk vardır ve her oyuk 100 µl hacim eklendi. Her ilaç için 3 plaka hazırlandı ve hazırlanan plakaları 37°C sıcaklığında ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. Hücreler büyüdüktan sonra kullanılan ilaçları sitotoksisite saptanma deneyleri başlandı.

3.8. Sitotoksisite deneyleri:

3.8.1. Dozlama süreci:

Araştırmanın ilk aşamasında; TiO₂, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-DOX ve DOX hazırlanan ilaçları HeLa insan servikal kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi planlandı. Bu amaçla hazırlanan 96'lık plakaları belirli yoğunluktaki hücreler olduktan sonra inkübatörden tek tek çıkarıldı. Yukarıda belirtilen ilaçlar (0.5, 1, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50) µg/ml konsantrasyonlarda hücrelere 1µL hacimde uygulandı. Hücreler üzerine bu ilaçlar uygulandıktan sonra 24, 48, 72 saat (her ilaç için) 37°C ve %5 CO₂ inkübatörde bırakıldı.

3.8.2. MTT testi:

TiO₂, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-DOX ve DOX'un HeLa insan servikal kanser hücre hattı üzerine anti-kanser aktiviteleri (3-(4,5-dimetil tiazol2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) kullanılarak belirlendi. Bu süreler sonunda MTT ölçümü yapıldı. 96'lık plakalarda her bir oyuğa 10 µl MTT (5 mg/ mL) belirteci eklendi ve 2 saat süre ile 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. 2 saat süre dolduktan sonra plakalar tek tek inkübatörden çıkarıldı, besiyeri ve MTT aspire edildi. Her oyuğun üzerine 100 µl DMSO eklenerek 15 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. MikroBlakalar okuyucu üzerinden λ= 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Her bir örnek için bu ölçümler 3 tekrarda yapıldı. Elde edilen sonuçlar excel programında kayıt edildi. Daha sonra, IC₅₀ değerleri (inhibe edici konsantrasyon; hücre büyümesinin %50' sini inhibe eden bir bileşik konsantrasyonu) hesaplandı ve işleminden geçirilmeyen kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] deneyi, mitokondriyal fonksiyonu araştırmak için kullanılır. Sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesi için en sık kullanılan yöntemlerden birisi olan MTT, suda çözünen bir tetrazolyum tuzu olup çözültüsü sarımtırak renklidir. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT, çözünmeyen mor renkli formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri belirlemektedir. Oluşan bu formazan dimetil sülfoksit, izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk spektrofotometrik olarak okunup miktar tayini yapılır.

3.9. Hücrelerden RNA izolasyonu:

3.9.1. 6'lık plakaları hazırlaması:

IC₅₀ hesaplandıktan sonra 6'lık plakalar hazırlandı. 96'lık plakalar hazırlık aşamaları izlendi. 6'lık plakalarda her oyukta 1.6 ml hücre süspansiyondan eklendi ve 37°C sıcaklığında, %5 CO₂ koşullarda inkübatörde hücreler büyüme kadar inkübe edildi. Hücrele büyüdüktan sonra 6'lık plakalarda her oyuk için TiO₂, PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-DOX ve DOX'un IC₅₀ dozlarından 16 µl üzerine eklendi ve 48 saat inkübe edildi.

3.9.2. RNA İzolasyonu:

- ✓ 48 saat süresi dolduktan sonra 6'lık plakalar inkübatörden çıkarıldı ve üst fazı çekildi.
- ✓ RNA İzolasyonu, Qiagen firmasından gelen mini izolasyon kiti kullanılarak protokolü doğrultusunda yapıldı. İlk olarak RLT tamponu hazırlandı (her 1ml üzerine 10 µl β-merkaptotanol eklendi). Her oyukta hazırlanan RLT tampondan 600 µl ekleyerek homejenizasyon işlemi ile hücreler lizat haline getirildi.
- ✓ Lizat üzerine %70' lik etanolden bir hacim eklendi ve pipet yardımıyla iyice karıştırıldı.
- ✓ Örnekten 700 µl alındı 2 ml toplama tüpü içerisinde bulunan RNeasy mini spin kolona dikkatli bir şekilde aktarıldı ve kapağını kapatıldı. Sonra 8000xg' de 15 saniye kadar santrifüj edildi ve alt kısmında süpernatant atıldı.
- ✓ RNeasy mini spin kolona 700 µl RW1 tamponu eklendi ve 8000xg' de 15 saniye kadar santrifüj edildi ve alt kısmında bulunan sıvı atıldı.
- ✓ RNeasy mini spin kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 8000xg' de 15 saniye santrifüj edildi ve alt kısmında bulunan sıvı atıldı.
- ✓ Yine RNeasy mini spin kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 8000xg' de 2 dakika santrifüj edildi. İsteğe bağlı olarak RNeasy mini spin kolon 2 ml' lik yeni bir tüpe alındı. Membranı kurutmak için 1 dakika tekrar santrifüj yapıldı (bu adım 3 kez tekrarlandı).
- ✓ RNeasy mini spin kolon yeni bir 1,5ml' lik yeni bir toplama tüpüne alındı. Kolon membranına direk olarak 30–50 µl RNeasy-free su eklendi (50 µl eklendi). Toplama tüpünün kapakları kapatılarak 8000xg' de 1 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Elde edilen RNA' lar, nanodrop cihazı (Green Bioreserch, USA) ile kantitatif olarak ölçüldü. RNA' lar hemen cDNA sentezi için kullanıldı.

3.10. cDNA Sentezi protokolü:

cDNA sentezi için Qiagen firmasından gelen *RT²* First Strand cDNA Sentez Kiti (Qiagen, kat. no: 330404) kullanıldı.

Tablo 1. Genomik DNA eliminasyon karışımı.

Madde	Hacim
RNA	(25ng – 5µg) 2 µl
GE tampon	2 µl
Nükleaz free water	6 µl
Toplam hacmi	10 µl

- 1) RT² First Strand cDNA sentez kiti çözündükten sonra 15 saniye santrifüj edildi.
- 2) Tablo 1'e göre RNA örneklerinden her birini için genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı.
- 3) Genomik DNA eliminasyon karışımı 42°C sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi, sonra hemen buz banyosu içinde 1 dakika bekletildi.
- 4) Reverse transkriptaz karışımı Tablo 2'ye göre hazırlandı.

Tablo 2. Reverse Transkriptaz karışımı.

Madde	1 Reaksiyon karışımı	6 Reaksiyon karışımı	24 Reaksiyon karışımı
5xBC3 Tampon	4 µl	24 µl	96 µl
P2 Kontrol	1 µl	6 µl	24 µl
RE3 Reverse Transkriptaz	2 µl	12 µl	48 µl
Nükleaz free su	3 µl	18 µl	72 µl
Toplam hacmi	10 µl	60 µl	240 µl

- 5) 10 µl genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her tüpe 10 µl reverse transkriptaz karışımı eklendi. Elde edilen karışım pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alt üst edilerek karıştırıldı.
- 6) PCR ile reverse transkripsyon protokolü: 15 dakika 42°C'de ilk inkübasyonu, 5 dakika 95°C'de ikinci inkübasyondan sonra reaksiyon hemen durduruldu.
- 7) Her bir reaksiyon tüpüne 91 µl RNase-free su eklendi. Bir kaç saniye pipetle alt üst edilerek örnekler karıştırıldı.
- 8) Reaksiyon tüpleri buz üzerine yerleştirildi ve RT-PCR analiz hazırlıkları yapıldı.

3.11. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR):

RT² SYBR Green qPCR Mastermix kiti kullanılarak RT-PCR analizi yapıldı. Mastermix tüplerinde mühtemelen çökelti oluşabilecek bu nedenle 42°C’de 1 dakika bekletilip vortekslendi. Çalışmada, 25 µl qPCR karışımı 1 µl dilüe cDNA içerecek şekilde hazırlandı. Çalışmada housekeeping gen (GAPDH), kontrol ve çalışma grubu arasındaki ekspresyon düzeyi farklılıklarını belirlemek amacıyla iç kontrol olarak kullanıldı. Tablo 3’te bulunan hacimlere göre 1 PCR tüpünde karışımı hazırlandı. Tabloda ayarlanan hacimleri bir reaksiyon için gerçekleştirildi.

Tablo 3. RT-PCR koşulları.

Madde	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	1 µl
RT ² qPCR primer	1 µl
RNase free su	10,5 µl
Total	25 µl

PCR tüplere başlangıçta cDNA’ları birer µl eklendi. Diğer maddelerinden steril epindrofta bir karışık hazırlandı. Real Time-PCR reaksiyonu Rototor Gene 6000 marka cihazda Tablo 4’de verilen döngü programı uygulanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 4. Döngü koşulları.

Döngü	Zaman	Sıcaklık	Açıklama
1	10 dakika	95°C	HotStart DNA polimerazın
40	15 saniye	95°C	aktivasyonu.
40	1 dakika	60°C	Her döngünün uzama
			basamağında her bir örnek için
			SYBR Green floresans
			belirlenmesi ve kaydedilmesi.

3.12. Primerler:

SYBR Green, gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA' ya bağlanarak floresan özellik kazanan bir boyadır. Bu boyanın çift zincirli PCR ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak floresans açığa çıkmasını sağlar. SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü oluşturulmaması gereklidir. Çalışmamızda kullanılan primerler Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. RT-PCR yönteminde kullanılan genlerin listesi.

Primer	Katalog Numarası	Firma
GPX1	QT00203392	Qiagen
PRDX1	QT00036785	Qiagen
CAT	QT00079674	Qiagen
SOD1	QT01008651	Qiagen
CSNK1A1	QT00999138	Qiagen
CTNNB1	QT00077882	Qiagen
CCND1	QT00495285	Qiagen
NFκB1	QT00063791	Qiagen
TOP2A	QT00037632	Qiagen
BAX	QT00031192	Qiagen
NQO1	QT00050281	Qiagen
ABC1(MDR)	QT00081928	Qiagen
GAPDH	PPH00150F	Qiagen

4. İstatistiksel analizi:

Sitotoksisite çalışması için; tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. Veriler, tek yönlü varyans analizi kullanılarak analiz edildi. IC₅₀, istatistiksel yazılım GraphPad Prism7 (GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) tarafından belirlendi. Gen ekspresyon deneylerine ait tüm RT-PCR analiz sonuçları, Rotor-gene 6000 Series Software Version 1.7 yazılımı ile kantite edildi. Verilerin $\Delta\Delta CT$ metodu ile istatistiksel analizi "RT² profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5"

(<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

5. HeLa hücre hattında bazı önemli bileşikleri tayini:

Çalışmamızda hücreler için önemli olan bazı bileşikleri tayin edildi. Bu işlem gerçekleştiği için yukarıda belirttiğimiz gibi 6'lık plakaları hazırlandı, her kullanılan ilaç IC_{50} uygulandı, 48 saat inkübatörde inkübe edildi, ve inkübasyon süresi bitirdikten sonra 6'lık plakada her ilaca ait oyuğundan üst fazı çekildi. Yukarıda hazırlandığı RLT tamponundan 350 μ l her oyuğa eklendi ve pipet ucu yardımıyla karıştırıldı. Toplam hacmi ependrof tüpe aktarıldı ve $-80^{\circ}C$ saklandı.

5.1. İnorganik fosfat tayini:

5 M H_2SO_4 100 ml hazırlandı.

%7.5 Na-Molibdat 10 ml + 5M H_2SO_4 10 mL: %7.5 Na-Molibdat hazırlamak için 7.5gr tartılarak distile su ile 100 ml'e tamamlandı. Hazırlanan solusyonundan 10 ml alındı ve üzerine 5M H_2SO_4 'ten 10 ml eklendi.

%1'lik 10 ml Askorbik asit: Askorbik asitten 0.1 g tartılarak distile su ile 10 ml tamamlandı.

1 mg/ml $KHPO_4$ + 1 ml 5 M H_2SO_4 : 1 mg/mL $KHPO_4$ 'ten 0.4393g tartılarak bir miktar suda çözüldü ve üzerine 5M'lık H_2SO_4 'ten 1 ml eklendi. Ardından çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (stok standart çözeltis).

Triklorik asit (TCA) %30: 6g tartılarak 20 ml'e kadar saf su ile tamamlandı.

Stok standart çözeltisinden (0.0125, 0.0250, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2, 0.250, 0.3) mg/ml derişimleri standart eğrisi hazırlandı. Standart çözeltileri tablo 6'ya göre çözeltileri hazırlandı.

Tablo 6. Pi tayin etmesi için kullanılan çözeltileri hazırlaması.

Madde	Numune	Standart	Kör
Standart	-	100 μ l	-
Hücre	100 μ l	-	-
Su	-	-	100 μ l
TCA	200 μ l	200 μ l	200 μ l

Reaksiyon tüplerinde oluşan çökeleği santrifüj edilerek üstelik süpernatant kısmından 50 µl alındı ve tablo 7'ye göre spektrofotometre küvetleri hazırlandı.

Tablo 7. Deney tablosu.

Madde	Numune	Kör	Standart
Su	150 µl	450 µl	150 µl
Numune	300 µl	-	-
Na- Molibdat	300 µl	300 µl	300 µl
Askorbik asit	300 µl	300 µl	300 µl
Standart	-	-	300 µl

Spektrofotometre üzerinden 412 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

5.2. GSH Tayini:

5.2.1. Çözeltiler hazırlaması:

1. 0.1 M (pH=8) Sodyum Fosfat + 5 mM EDTA: 200 mL için 0.165 g NaH_2PO_4 , 3.371 g Na_2HPO_4 , 0.372 g EDTA tartılarak distile su ile hazırlandı.
2. 5 mM DTNB 5,5 dithiobis (2-nitrobenzoik asit): 25 mL için 0.0049 g DTNB tartılarak distile su ile hazırlandı ve ısıtılarak çözünmesi sağlandı. *Fresh hazırlandı.
3. %5'lik TCA: 200 mL için 10 g TCA tartılarak distile su ile hazırlanır.
4. 100 mg/dL GSH: 10 mL için 10 mg GSH tartılarak distile su ile hazırlanır. *Fresh hazırlandı.

5.2.2. Deneyin Yapılışı:

Süpernatant Hazırlandı:

1. 100 µl örnek alınır ve üzerine 400 µl %5'lik TCA eklendi.
2. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

4. 0.1 ml süpernatant alındı ve tablo 8'e göre küvetler hazırlandı ve çalkalanıp 3 dk sonunda spektrofotometre ile 412 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

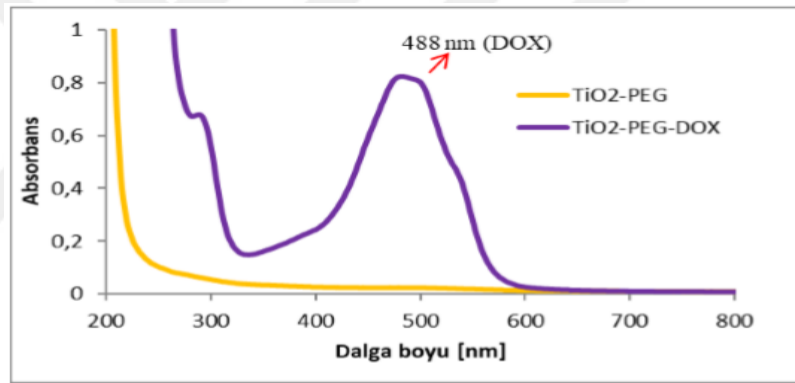
Tablo 8. GSH tayini deney tablosu.

Madde	Kör	Örnek	Standart
Süpernatant	-	200 µl	-
Tampon	2000 µl	2000 µl	2000 µl
DTNB	250 µl	250 µl	250 µl
Su	200 µl	-	-
Std. GSH	-	-	200 µl

6. BULGULAR:

6.1. PEG-TiO₂ ve PEG-TiO₂-DOX'in nanoparçacıklarının Sentezi ve Karakterizasyon Analizi:

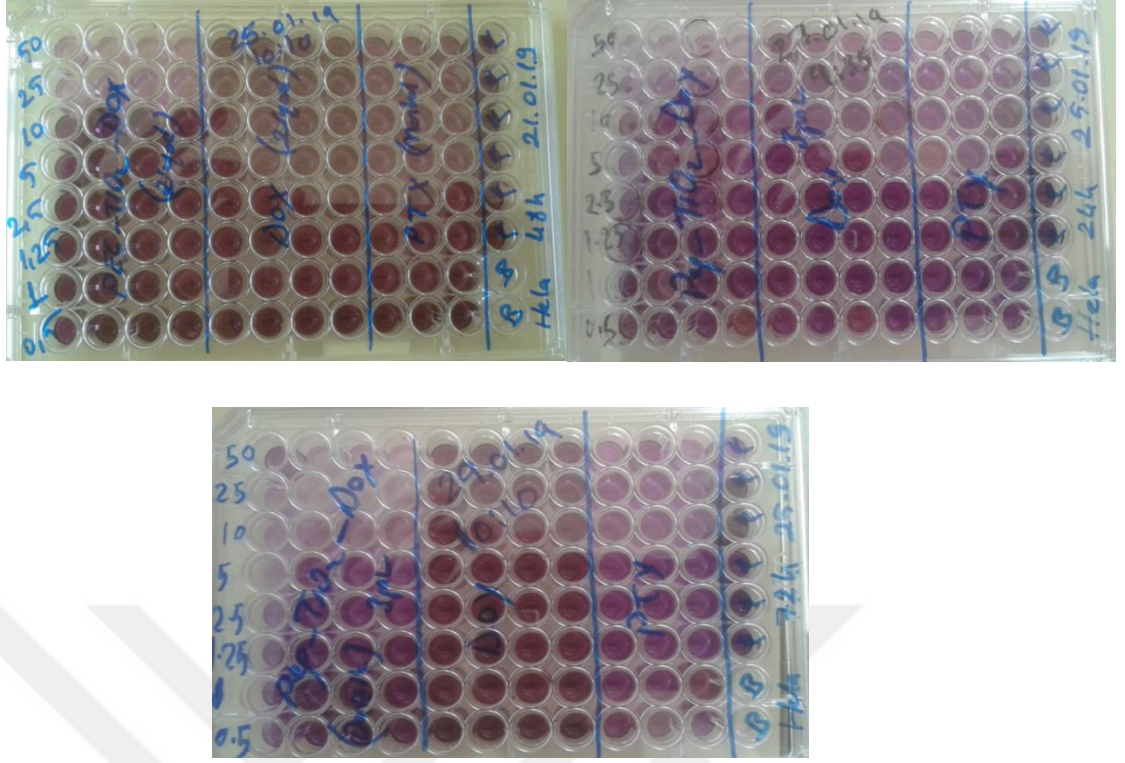
Sentez çalışmalarında ilk olarak TiO₂ nanoparçacıkları elde edildi, daha sonra kararlılıklarını arttırmak için TiO₂ NP'leri PEG ile modifiye edildi. PEG-TiO₂-DOX nanotaşıyıcı temelli ilaçları sentezlemek amacıyla PEG-TiO₂ NP'lerine DOX eklendi. DOX'un PEG-TiO₂ NP'lerine başarıyla yüklenip yüklenmediğini belirlemek için UV spektrum analizi yapıldı. DOX'un karakteristik pik değeri 488 nm'de bulundu. Şekil 45'e göre 488 nm'de bulunan pik DOX, PEG-TiO₂ yüzeyine adsorbe edilmiş gösterdi.



Şekil (45): PEG-TiO₂ ve PEG-TiO₂-DOX nanoparçacıklarının spektrofotometre analizinde bölge absorpsiyon grafiği.

6.2. Hücre Kültürü Çalışmaları:

Servikal kanser HeLa hücre hattına uygulanan PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂, TiO₂ ve DOX'in sitotoksik dozu MTT testi ile belirlendi (Şekil 46).

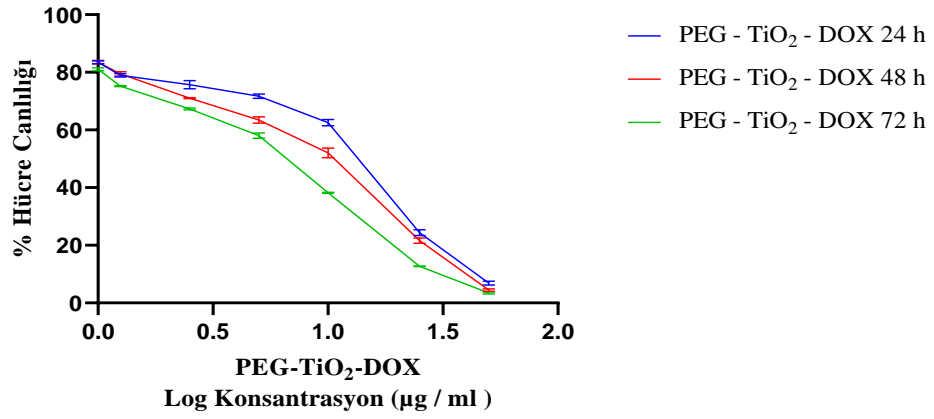


Şekil (46): HeLa insan servikal kanser hücre hücre hattında PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂, TiO₂ ve DOX'in IC₅₀ dozlarının belirlenmesi.

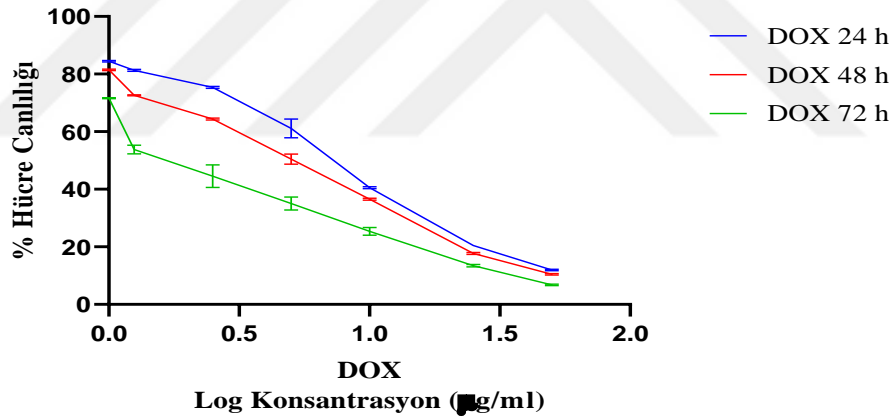
6.3. PEG-TiO₂ Nanotaşıyıcı temelli DOX ilacının Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi:

İnsan servikal kanser hücre hattı (HeLa) üzerine PEG-TiO₂-DOX, DOX, PEG-TiO₂, TiO₂'nin 0,5-50 µg/ml aralığındaki sekiz farklı derişimleri uygulandı. Her ilaç 24, 48, 72 saat inkübatörde inkübe edildi ve süre sonunda canlı kalan hücre sayısı MTT testi ile analiz edildi. Analizin sonuçları boş kontrol grubuna dahil olan hücreler ile kıyaslama yapılarak elde edildi. Elde edilen bulgulara göre; insan servikal kanser hücre hattı (HeLa) üzerinde uygulanan PEG-TiO₂-DOX, DOX, PEG-TiO₂ ve TiO₂'nin sitotoksik aktivitesi değerlendirildi. Sonuçlara değerlendirildiğinde PEG-TiO₂-DOX, DOX, PEG-TiO₂ ve TiO₂'nin HeLa hücre hattı üzerindeki sitotoksitesinin kontrol grubundaki hücrelere karşılaştığında en aktif 72 saat inkübasyondan gelen sonuçları saptandı. Nanotaşıyıcı sisteme bağlı olan PEG-TiO₂-DOX, sitotoksik aktivitesinin 24, 48, 72 saatte DOX ilacına göre az olduğunu gözlemlendi. DOX'in nanotaşıyıcı sisteme bağlatılıp sitotoksitesini azalmış ve böylece yan etkilrlerini azaltabilir, ayrıca sağlıklı hücrelere etki vermeden kanserli hücrelere net şekilde yönlendirebilmektedir. Ayrıca PEG-TiO₂'in diğerlerine kıyasla en düşük sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Diğer tarafından TiO₂ nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki toksik etkisinin PEG-TiO₂'ye karşı yüksek olduğu değerlendirildi.

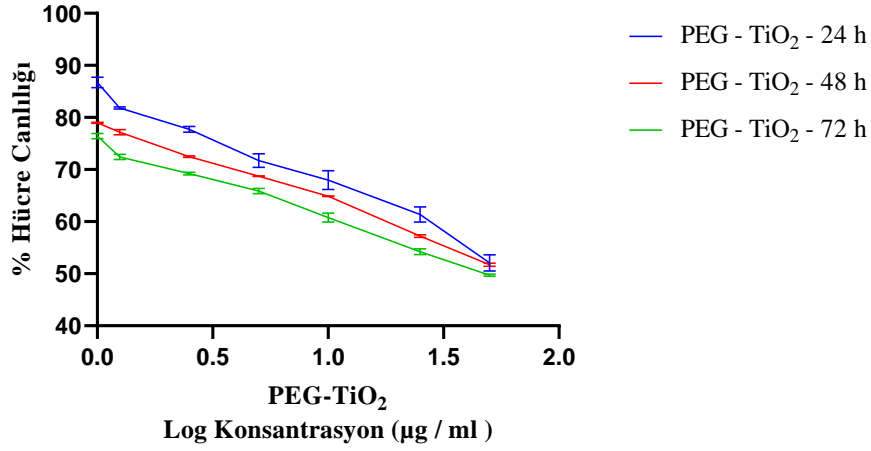
HeLa hücre hattı



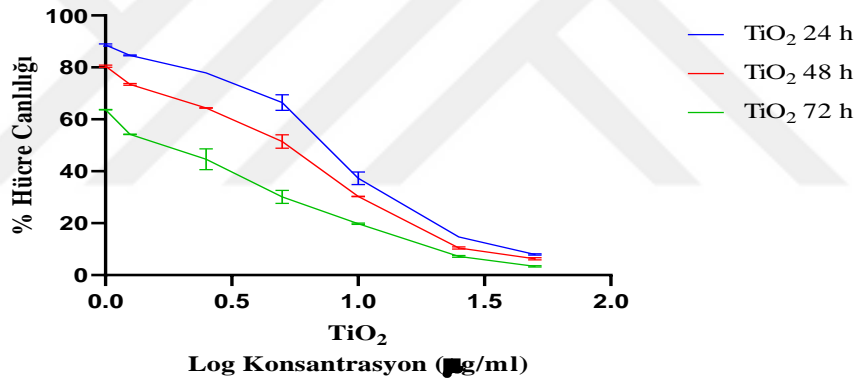
HeLa hücre hattı



HeLa hücre hattı



HeLa hücre hattı



Şekil (47): HeLa hücre hattında 24 saat, 48 saat ve 72 saat 0,5-50 µg/ml doz aralıklarında PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂, TiO₂ ve DOX'un uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

Tablo 9. PEG-TiO₂- DOX, PEG-TiO₂, TiO₂ ve DOX ilaçlarının 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonrası HeLa insan servikal kanser hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değerleri.

	IC ₅₀ (µg/ml±SD)		
	24 saat	48 saat	72 saat
PEG-TiO₂- DOX	12.823±0.423	9.646±0.357	6.467±0.135
DOX	7.638±0.540	4.883±0.196	2.428±0.137
PEG-TiO₂	80.792±1.192	70.37±1.378	47.635±1.179
TiO₂	7.835±0.562	4.753±0.267	2.105±0.118

6.4. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) Verilerinin İstatistiksel Analizi:

6'lık plakalarda büyütülen HeLa insan servikal kanser hücre hattı üzerine uygulanan TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, PEG-TiO₂-DOX ilaçların ve kontrol kontrol grubu 48 saat inkübasyondan sonra RNA izole edildi. Sonraki aşamasında izole edilen RNA örneklerinden cDNA'ları sentezini gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'ları kullanılarak oksidatif stres, Wnt sinyelleme yolu, hücre ölümü ve ilaç metabolizması gruplarından belirtilen genlerinin (*GPXI*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1* ve *ABCB1*) ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi kullanılarak analizi yapıldı. Bu çalışmada housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. GAPDH ile *GPXI*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1* ve *ABCB1* hedef genlerinin ekspresyon düzeyleri normalize edildi. GAPDH için RT-PCR kontrol gruplarına ait Ct değerleri aşağıda verildi.

Colour No.	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
5	Su Kontrol-HeLa-GAPDH	Unknown	28.49			
6	Boş Kontrol-HeLa-GAPDH	Unknown	26.17			

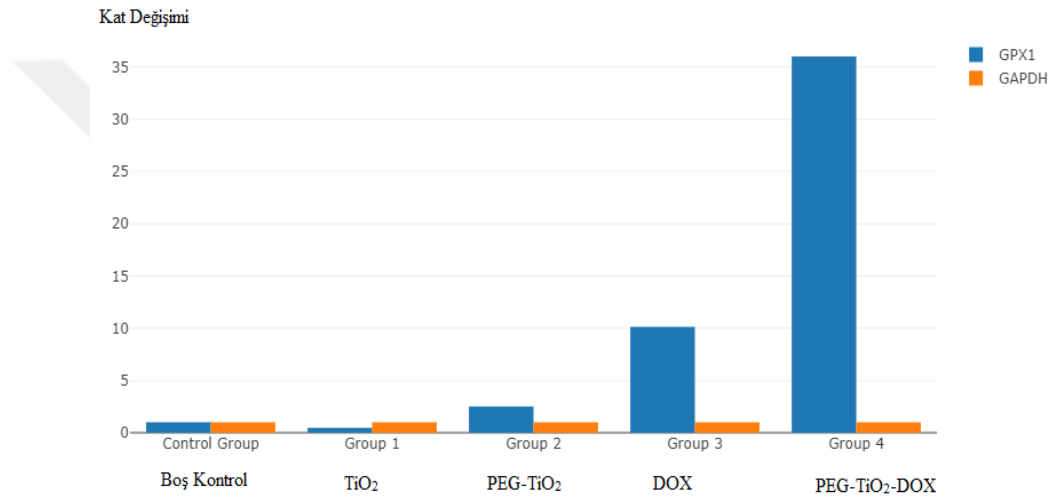
HeLa insan servikal kanser hücre hattından elde edilen boş kontrol, TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, PEG-TiO₂-DOX uygulandıktan sonra RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinden sentezlenen cDNA örneklerinde *GPXI*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1*, *ABCB1* genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz grupları aşağıdaki tabloda sınıflandırıldı (Tablo 11).

Tablo 10. Çalışmada kullanılan genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde grupların sınıflandırılması.

Kontrol (ilaç yok)	Kontrol Grup
TiO ₂	Grup 1
PEG-TiO ₂	Grup 2
DOX	Grup 3
PEG-TiO ₂ -DOX	Grup 4

6.4.1. Glutatyon Peroksidaz 1 (GPXI) geni ekspresyon düzeyi:

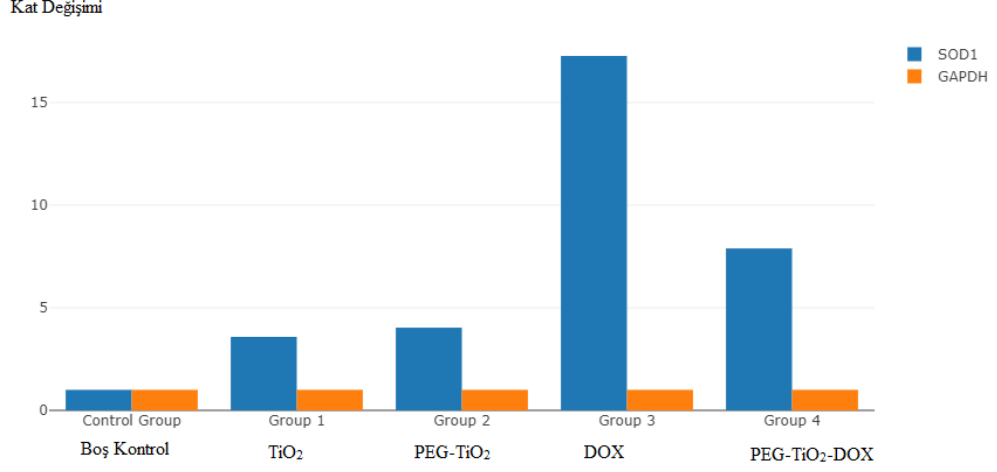
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak GPXI geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanılarak analiz edildi. GPXI geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre grup 1'de 2.16 kat azalma, grup 2'de 2.51, grup 3'te 10.13 ve grup 4'te 36.00 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (48): GPXI genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.2. Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1) geni ekspresyon düzeyi:

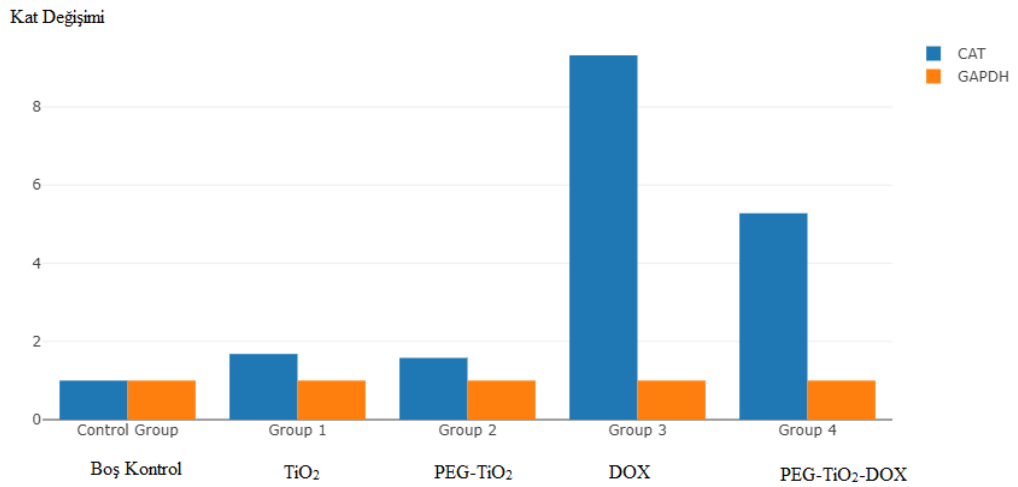
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerine uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak SOD1 geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanılarak analiz edildi. SOD1 geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre grup 1'de 3.58 ve grup 2'de 4.03, grup 3'te 17.27 ve grup 4'te 7.89 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (49): *SOD1* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.3. Katalaz (*CAT*) geni ekspresyon düzeyi:

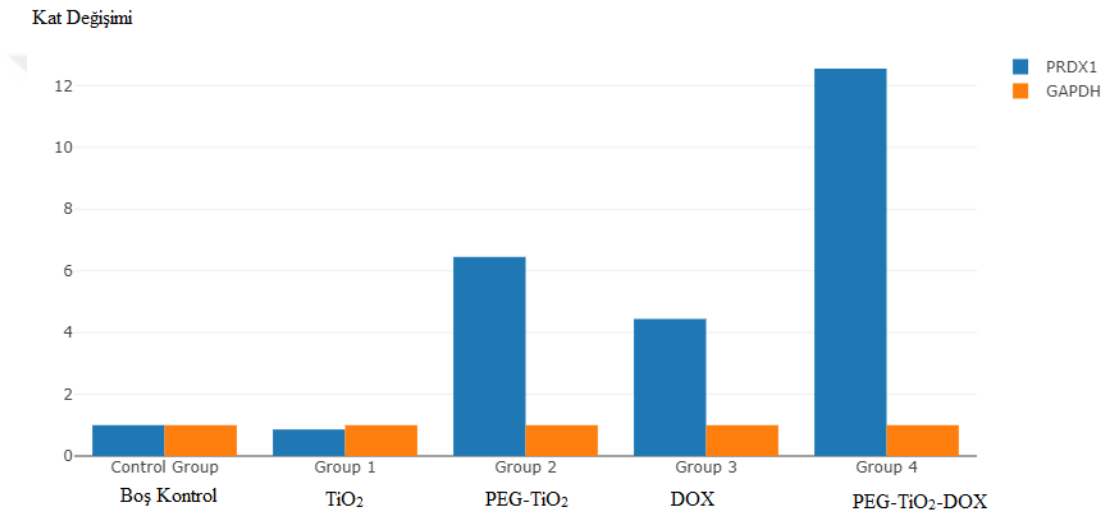
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *CAT* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanılarak analiz edildi. *CAT* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 1'de 1.86, grup 2'de 1.58, grup 3'te 9.32 ve grup 4'te 5.28 kat artışı izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (50): *CAT* genlerinin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.4. *Peroksiredoksin 1 (PRDX1) geni ekspresyon düzeyi:*

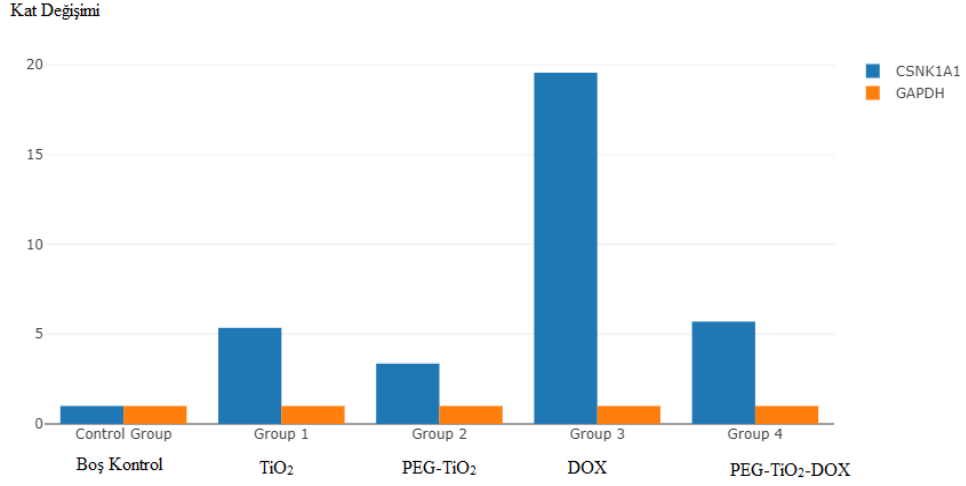
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *PRDX1* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanarak analiz edildi. *PRDX1* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 1'de 1.16 kat azalma, grup 2'de 6.45, grup 3'te 4.44 ve grup 4'te 12.55 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (51): *PRDX1* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.5. *Kazein Kinaz 1 Alfa 1 (CSNK1A1) geni ekspresyon düzeyi:*

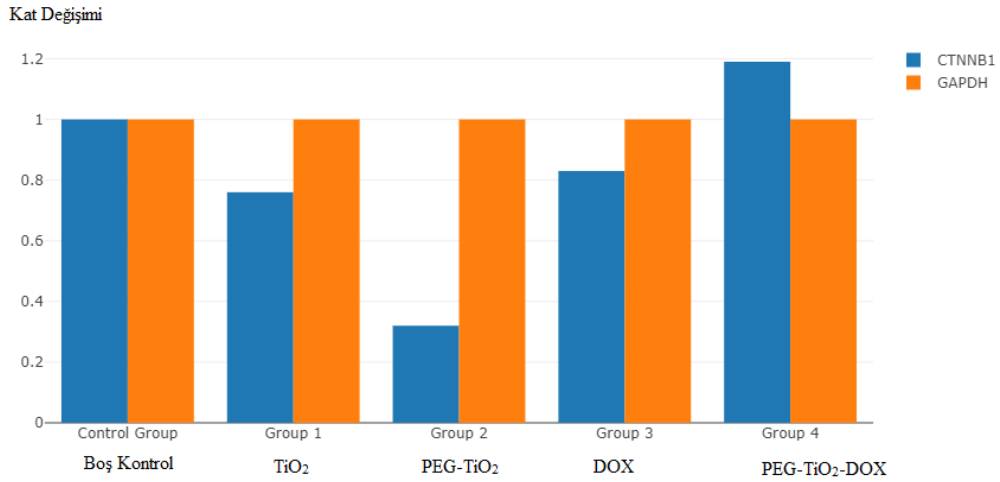
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *CSNK1A1* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanarak analiz edildi. *CSNK1A1* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 1'de 5.35, grup 2'de 3.36, grup 3'de 19.56 ve grup 4'te 5.70 kat artışı izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (52): *CSNK1A1* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.6. Katenin beta 1 (*CTNNB1*) geni ekspresyon düzeyi:

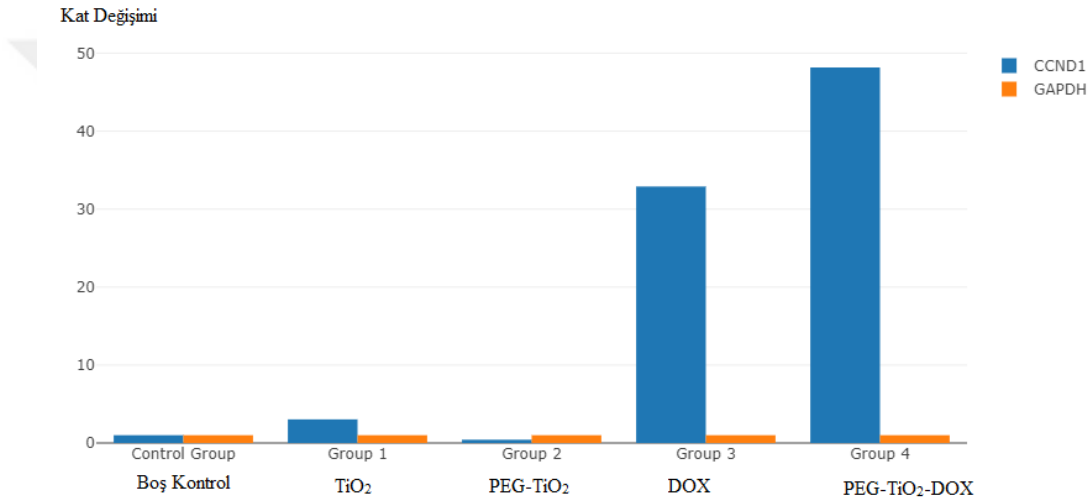
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *CTNNB1* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanarak analiz edildi. *CTNNB1* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 1'de 1.32, grup 2'de 3.12 ve grup 3'te 1.21 kat azalma, grup 4'te ise 1.19 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (53): *CTNNB1* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.7. Siklin D1 (CCND1) geni ekspresyon düzeyi:

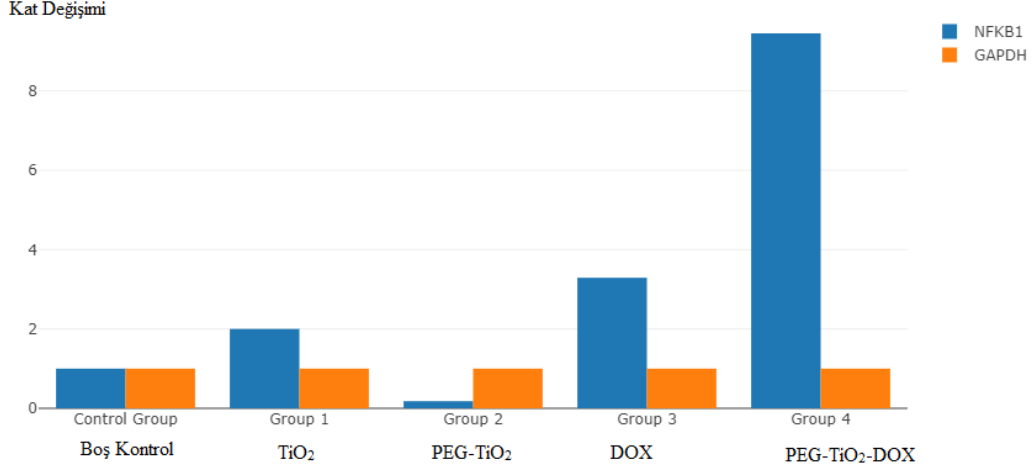
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak CCND1 geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanılarak analiz edildi. CCND1 geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 2'de 2.36 kat azalma, grup 1'de 3.03, grup 3'te 32.90 ve grup 4'te 48.17 artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (54): CCND1 genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.8. Nükleer Faktör Kappa B1 (NFκB1) geni ekspresyon düzeyi:

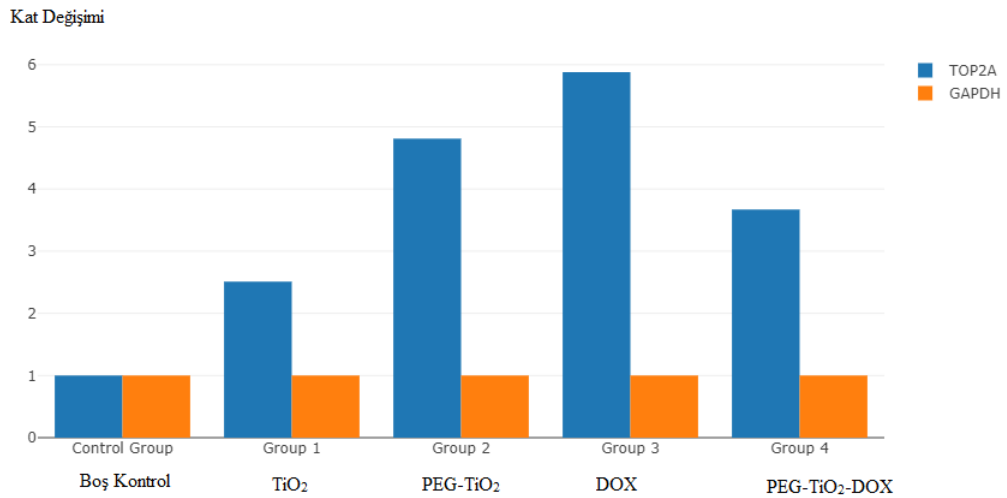
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak NFκB1 geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanılarak analiz edildi. NFκB1 geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 2'de 5.50 kat azalma, grup 1'de 2.00, grup 3'te 3.29 grup 4'te ise 9.45 artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (55): *NFκB1* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.9. DNA Topoisomerase II Alpha (*TOP2A*) geni ekspresyon düzeyi:

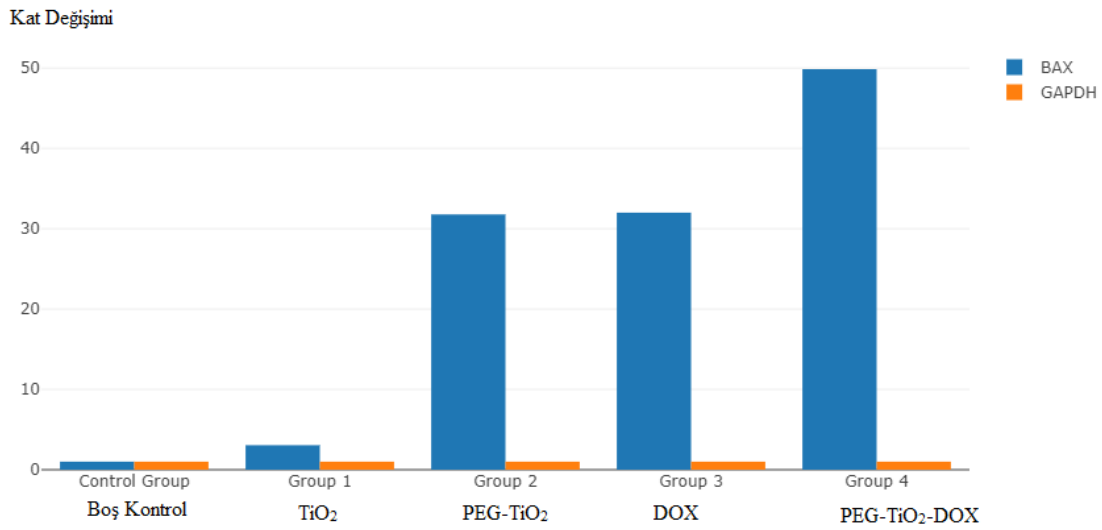
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *TOP2A* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanarak analiz edildi. *TOP2A* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 1'de 2.51, grup 2'de 4.81, grup 3'te 5.88 ve grup 4'te 3.67 artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (56): *TOP2A* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.10. *BCL2* ilişkili X (*BAX*) geni ekspresyon düzeyi:

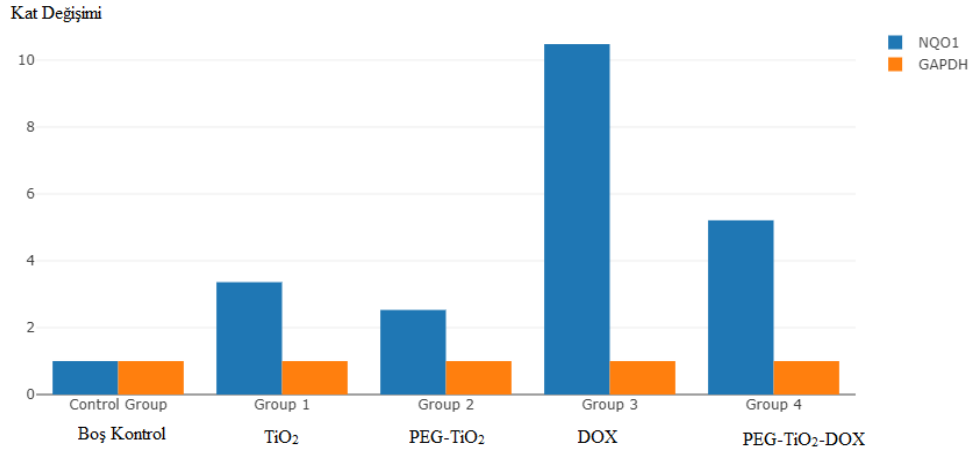
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *BAX* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanılarak analiz edildi. *BAX* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 1'de 3.05, grup 2'de 31.78, grup 3'te 32.00 ve grup 4'te 49.87 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (57): *BAX* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.11. *NAD(P)H* Kinon Dehidrojenaz 1 (*NQO1*) geni ekspresyon düzeyi:

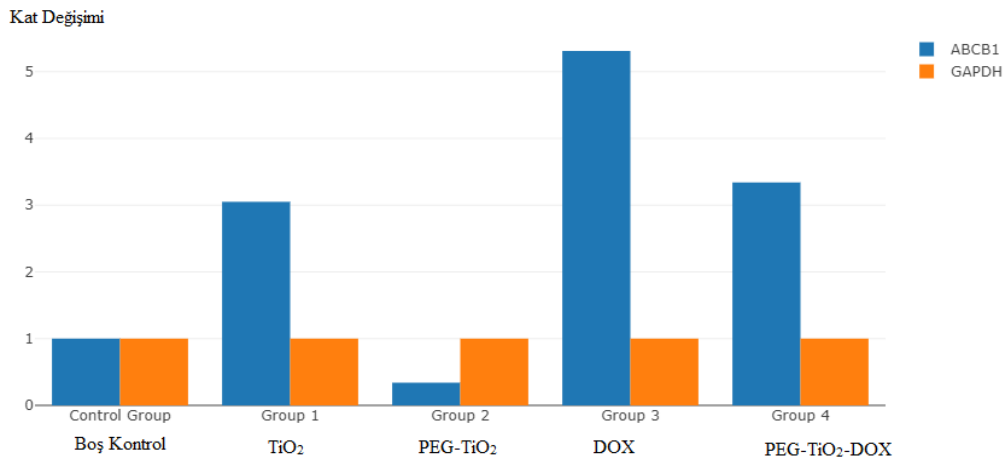
HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *NQO1* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanılarak analiz edildi. *NQO1* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 1'de 3.36, grup 2'de 2.53, grup 3'te 10.48 ve grup 4'te 5.21 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



Şekil (58): *NQO1* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

6.4.12. *ATP bağlayıcı kaseti alt ailesi B üye 1 (ABCB1) veya çoklu ilaç direncini (MDR1) geni ekspresyon düzeyi:*

HeLa insan servikal kanser hücre hattına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX ve PEG-TiO₂-DOX'in IC₅₀ dozları hesapladıktan sonra hazırlanan 6'lık plakalar üzerinde uygulandı, 48 saat inkübasyon süresinden sonra izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *ABCB1* geni ekspresyon düzeyleri qPCR ile delta delta ct metodu kullanarak analiz edildi. *ABCB1* geni ekspresyon düzeyleri, HeLa insan servikal kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde grup 2'de 2.91 kat azalma, grup 1'de 3.05, grup 3'te 5.31 ve grup 4'te 3.34 kat artış izlendi. Farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p<0.0001).



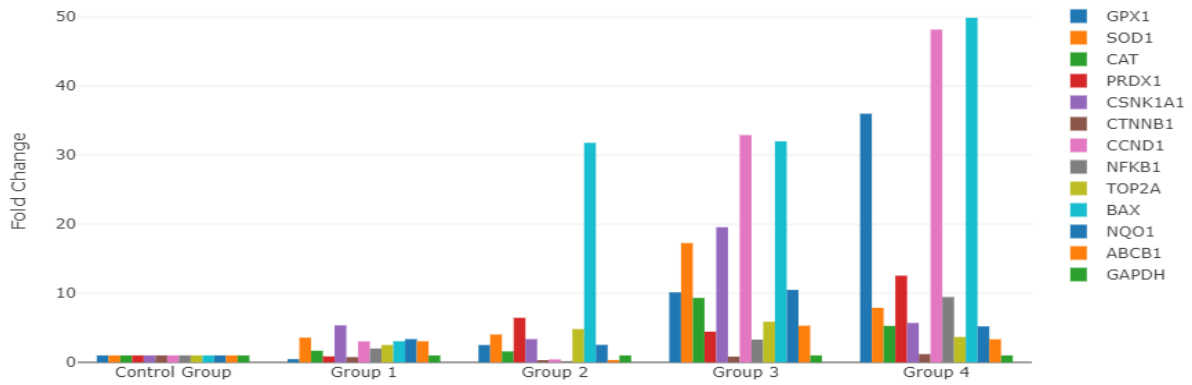
Şekil (59): *ABCB1* genin ekspresyon düzeylerinin farklı gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırılması.

GPXI, SODI, CAT, PRDXI, CSNK1A1, CTNNB1, CCND1, NFKB1, TOP2A, BAX, NQO1 ve *ABCB1* gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubu ve diğer gruplar arasında kıyaslandığında tablo 11’de belirlenmiştir.

Tablo 11. Çalışmada belirtilen genlerin kontrol grubuna göre kat düzenlemesi değerleri.

Gen	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
<i>GPXI</i>	-2.19	2.51	10.13	36.00
<i>SODI</i>	3.58	4.03	17.27	7.89
<i>CAT</i>	1.68	1.58	9.32	5.28
<i>PRDXI</i>	-1.16	6.45	4.44	12.55
<i>CSNK1A1</i>	5.35	3.36	19.56	5.70
<i>CTNNB1</i>	-1.32	-3.12	-1.21	1.19
<i>CCND1</i>	3.03	-2.36	32.90	48.17
<i>NFKB1</i>	2.00	-5.50	3.29	9.45
<i>TOP2A</i>	2.51	4.81	5.88	3.67
<i>BAX</i>	3.05	31.78	32.00	49.87
<i>NQO1</i>	3.36	2.53	10.48	5.21
<i>ABCB1</i>	3.05	-2.91	5.31	3.34
<i>GAPDH</i>	1.00	1.00	1.00	1.00

Sonuç olarak grup 1 etkisiyle *GPXI, PRDXI* ve *CTNNB1* genleri hariç tüm gen ekspresyonu artmıştır. Grup 2 etkisiyle *CTNNB1, CCND1, NFKB1* ve *ABCB1* genlerin ekspresyon düzeyi azalırken, tüm diğer genlerin ekspresyon düzeyleri artmıştır. Diğer taraftan grup 3 etkisiyle *CTNNB1* genin ekspresyon düzeyi azalırken diğer genlerin ekspresyon düzeyleri artmıştır. Grup 4 etkisi incelendiğinde tüm genlerin ekspresyon düzeyleri artmıştır. *GPXI, SODI, CAT, PRDXI, CSNK1A1, CTNNB1, CCND1, NFKB1, TOP2A, BAX, NQO1* ve *ABCB1* gen ekspresyon düzeyleri HeLa servikal kanser hücre hattında tüm gruplar yönünden incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi (Şekil 60). Tüm gen ve gruplara ait Ct değerleri tablo 12’de verilmiştir.



Şekil (60): *GPX1*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1*, *ABCB1* ve *GAPDH* genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

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

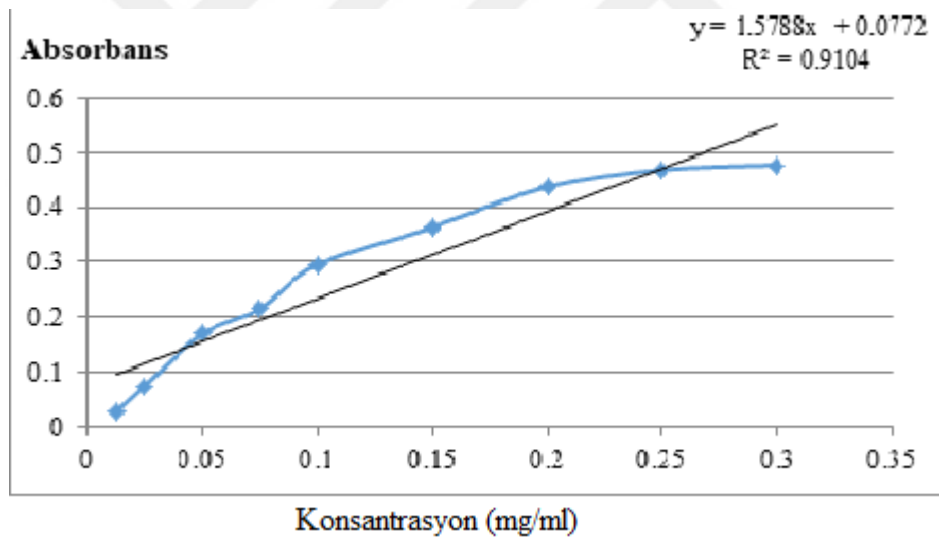
Ortalama Ct Değerleri					
	Numuneler				
	Boş kontrol	TiO ₂	PEG-TiO ₂	DOX	PEG-TiO ₂ -DOX
<i>GPX1</i>	27.54	30.28	24.67	26.61	24.11
<i>SOD1</i>	33.78	33.55	30.23	32.08	32.54
<i>CAT</i>	30.62	31.48	28.42	29.81	29.96
<i>PRDX1</i>	30.83	32.65	26.6	31.09	28.92
<i>CSNK1A1</i>	31.85	31.04	28.56	29.97	31.08
<i>CTNNB1</i>	28.37	30.38	28.47	31.05	29.86
<i>CCND1</i>	34.18	34.19	33.88	31.55	30.33
<i>NFKB1</i>	31.93	32.54	32.85	32.62	30.43
<i>TOP2A</i>	31.93	32.21	28.12	31.78	31.79
<i>BAX</i>	-		28.47	32.41	31.10
<i>NQO1</i>	31.19	31.05	28.31	30.21	30.55
<i>ABCB1</i>	-	-	-	-	-
<i>GAPDH</i>	26.17	27.78	24.63	28.58	27.91

6.5. İnorganik fosfat tayini bulguları:

Başlangıçta standard çözeltilerden standart eğrisi çizmek için farklı derişimlerde çözeltiler tablo 13'e göre hazırlandı:

Tablo 13. İnorganik fosfat Pi standart eğrisi

Konsantrasyon(mg/ml)	Absorbans
0.0125	0.027
0.025	0.075
0.05	0.169
0.075	0.216
0.1	0.295
0.15	0.364
0.2	0.437
0.25	0.469
0.3	0.478



Şekil (61): Pi standart eğrisi.

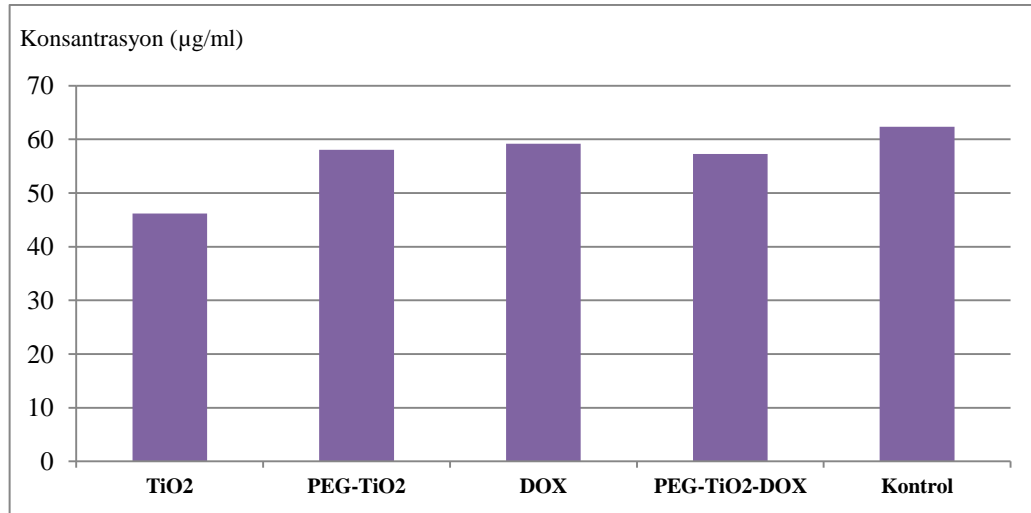
Standart eğri denkleminin şekil 61'de kullanıldığında HeLa hücre hattı üzerine uygulanan TiO_2 , PEG- TiO_2 , DOX, ve PEG- TiO_2 -DOX'in iaçlarından IC_{50} dozları ve kontrol grubunu etkisiyle elde edilen absorbans değerlerinden Pi konsantrasyonlarını hesaplandı ve tablo 14'te belirlendi:

Tablo 14. HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçlarından IC₅₀ dozları etkisi ile ve kontrole ait Pi konsantrasyonları.

İlaç grubu (Örnekler)	Absorbans	Konsantrasyon (µg/ml)
TiO ₂	0.369	46.21
PEG-TiO ₂	0.444	58.08
DOX	0.451	59.21
PEG-TiO ₂ -DOX	0.439	57.31
Kontrol (ilaç yok)	0.471	62.36

İnorganik fosfat (Pi) canlı organizmalar için gerekli bir besindir. Enerji metabolizması, kinaz / fosfataz sinyalleşmesinin, lipidlerin, karbonhidratların ve nükleik asitlerin oluşumunda ve işlevinde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda birçok hücre tipinde sinyal iletim yollarını, gen ekspresyonunu ve protein bolluğunu değiştirerek önemli bir sinyal molekülü olarak ortaya çıkmaktadır.

Pi hücreler büyümesinde önemli rol oynamaktadır. Konsantrasyon değerlerine bakarsak ilaçlarından IC₅₀ dozları üzerine uygulanan HeLa hücre hattında Pi konsantrasyonları kontrol grubuna göre (ilaç yok) azalışı gözlemlendi, çünkü uygulanan ilaçların etkisi ile HeLa hücreleri proleferasyonu azaldı (Şekil 62).



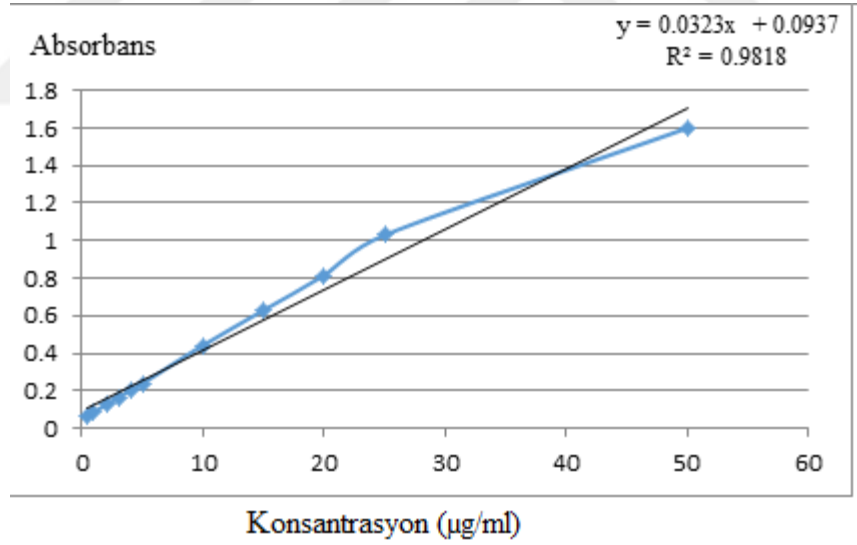
Şekil (62): HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçlarından IC₅₀ dozları etkisiyle kontrole karşı Pi konsantrasyonları.

6.6. GSH tayini bulguları:

Başlangıçta standard çözeltilerden standart eğrisi çizmek için farklı derişimlerde çözeltiler tablo 15'e göre hazırlandı:

Tablo 15. GSH standart eğrisi.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbans
0.5	0.066
1	0.088
2	0.126
3	0.165
4	0.203
5	0.240
10	0.443
15	0.630
20	0.816
25	1.030
50	1.600



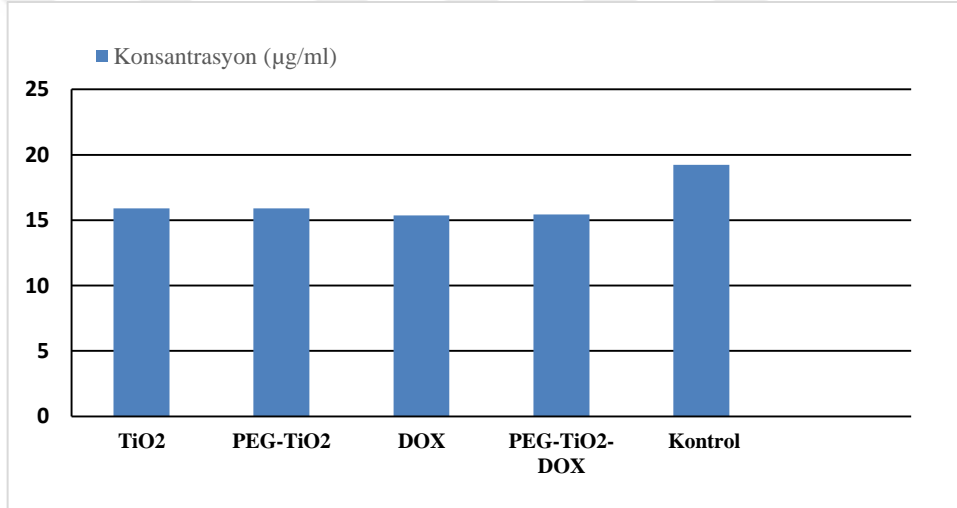
Şekil (63): GSH standart eğrisi.

Standart eğri denklemini kullanıldığında HeLa hücre hattı üzerine uygulanan TiO_2 , PEG- TiO_2 , DOX, ve PEG- TiO_2 -DOX'in ilaçlarından IC_{50} dozları etkisiyle ve kontrol grubunu (ilaç yok) absorbans değerlerinden elde edilen GSH konsantrasyonları hesaplandı ve tablo 16'da belirlendi.

Tablo 16. HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçlarından IC₅₀ dozları etkisi ile ve kontrole ait GSH konsantrasyonları.

İlaç grubu (Örnekler)	Absorbans	Konsantrasyon (µg/ml)
TiO ₂	0.607	15.89
PEG-TiO ₂	0.607	15.89
DOX	0.59	15.365
PEG-TiO ₂ -DOX	0.592	15.427
Kontrol (ilaç yok)	0.715	19.235

Konsantrasyon değerlerine bakarsak üzerine uygulanan ilaçları HeLa hücre hattında GSH konsantrasyonları kontrol grubuna göre (ilaç yok) azalışı gözlemlendi, çünkü HeLa hücre hattında GSH antioksidan savunma için kullanılır ve içeriği sürekli azaltılır (Şekil 64).



Şekil (64): HeLa hücre hattı üzerine uygulanan ilaçlarından IC₅₀ dozları etkisiyle kontrole karşı GSH konsantrasyonları.

7. TARTIŞMA:

Kanser günümüzde dünya çapında yayılan en tehlikeli hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. Kanser, genetik ve çevresel koşulların altında anormal hücrelerin kontrolsüz bölünmesi, çoğalması ve vücuttaki uzak bölgelere metastaz yapma kapasitesi sahip ortaya çıkan bir hastalıktır. Genellikle kanserlerin genetik hasarıdır. Genetik olarak kanser, hücre fonksiyonlarını, bölünmeyi ve olgunlaşmayı kontrol eden genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açan genetik düzensizliği, büyümeyi desteklenen onkogenlerin aktivasyonundan veya büyümeyi inhibe eden tümör baskılayıcı genlerin silinmesinden ya da inaktivasyonundan kaynaklanmaktadır (352). Kanser dünya çapında bir katildir ve ABD'deki toplam ölümlerin yaklaşık% 23'ünden sorumludur, bu nedenle kanser kalp hastalığından sonra ikinci en yaygın ölüm nedenidir. Dünya genelinde ölüm nedenlerinin % 12,5'inin kanser kaynaklı olduğu bilinmektedir (19). Bu nedenle kanser insanlığa ve toplumlara büyük sorun teşkil etmektedir. Etyolojik olarak, kansere neden olan karsinogenez faktörleri dört ana grupta sınıflandırılmıştır. Kimyasal veya toksik bileşikler (mesleki, çevresel ve terapötik içerir), enfektif (vüüsler gibi), fiziksel (X-ışını, gama ışını) ve immünsüpresif (HIV, immünsüpresif ilaçlar) (352). Kanser hücreleri kanserin temelini oluşturur. Kanser hücreleri daha az tutunma özelliğe sahip olduğu için kanser kütesinden ayırabilir ve kan dolaşımına girerek vücutta diğer bölgelere taşınmaktadır. Bu kanser hücreleri, enzimler ve sitokinler dahil olmak üzere patolojik özelliklere sahip olduğundan etkisi ile giden bölgelerdeki bulunan dokuların değişikliklere yol açmaktadır. Kanser hücreleri büyümesini devam etmek için bağımsız bir vasküler destek oluşumu olan tümör anjiyogenez faktörleri üretir. Üretilen anjiyogenez faktörleri etkisi ile kanser hücrelere yeterli beslenme ve oksijen ulaştığında çoğaltmasını sürdürür. Böylece, kanser hücreleri normal hücrelerden histopatolojik anlamda farklılaşma, proliferasyon, vaskülarite, enflamasyon ve invazivlik gibi çeşitli farklılıklar içerir (353). 2008 yılında küresel olarak 12.7 milyon yeni kanser vakası ve kanserden ölüm oranının 7.6 milyon olduğu kaydedilmiştir. 2013 yılında ise 14.9 milyon yeni vaka sayısı ve yaklaşık 8.2 milyon kanserden ölüm vakası tesbit edilmiştir. 2018 yılında dünyada kanser yeni vaka sayısı 18.1 milyona ve 9.6 milyon ölüme yükseldiği bildirilmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda dünya nüfusunun artışına bağlı olarak 2040 yılında kanser vaka sayısını 29.5 milyon olacağı tahmin edilmektedir (25). Dünya çapında 5 erkekten biri ve 6 kadından biri yaşamları boyunca kanser geliştirmektedir ve aynı zamanda 8 erkekten biri ve 11 kadından biri bu hastalıktan ölmektedir. Dünyada her iki cinsiyette yapıla istatistiksel verilerine göre kanser türlerinden en sık görülen ve kanser

ölümlerinden ilk sırada gelen akciğer kanseridir. Buna takiben meme kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanserinin yer aldığı servikal kanser sekizinci sırada yer almaktadır. Mortalitesine bağlı olarak akciğer kanserinden sonra gelen kolorektal, mide, karaciğer ve meme kanserlerinin yer almaktadır tablo 17 (25).

Tablo 17. GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında her iki cinsiyette vaka ve ölüm oranlarına bağlı sırada gelen kanser türleri.

Kanser türü	Vaka oranı	Kanser türü	Ölüm oranı
Akciğer	% 11.6	Akciğer	% 18.4
Meme	% 11.7	Kolorektal	% 9.2
Kolorektal	% 10.2	Mide	% 8.2
Prostat	% 7.1	Karaciğer	% 8.2
Mide	% 5.7	Meme	% 6.6
Karaciğer	% 4.7	Özafagus	% 5.3
Özafagus	% 3.2	Pankreas	% 4.5
Servikal	% 3.2	Prostat	% 3.8

Cinsiyete bağlı kanser insidansı verilerine göre karşılaştırıldığında erkeklerde oranı (%52.49) kadınlardan oranı (%47.51) yüksek görünmektedir.

Kadınlarda ise en sık teşhis edilen ve ölümüne neden olan meme kanseridir, ve insidans oranına göre kolorektal, akciğer ve servikal kanser, mortalitesine bağlı akciğer, kolorektal ve servikal kanserleri takip etmektedir tablo 18 (25).

Tablo 18. GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında kadınlarda en sık görülen vaka ve ölüm oranlarına bağlı kanser türleri.

Kadınlar			
Kanser türü	Vaka oranı	Kanser türü	Ölüm oranı
Meme	% 24.2	Meme	% 15.0
Kolorektal	% 9.5	Akciğer	% 13.8
Akciğer	% 8.4	Kolorektal	% 9.5
Servikal	% 6.6	Servikal	% 7.5

Kadınlarda servikal kanser hastalığı dünyada en sık teşhis edilen ve kanser ölümünün nedeni olan dördüncü sırada gelmektedir. Servikal kanserin az gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınların 15-44 yaş arası yaygın olarak görünmektedir. 2018 yılına ait istatistiksel verileri sayesinde dünya çapında 569847 yeni vaka sayısı tesbit edilmiştir. Küresel olarak, daha az gelişmiş ve hastalığı tedavi etmek için çok sınırlı kaynaklarla bölgelerinde, servikal kanseri yükünün yaklaşık % 85'i, öte yandan 2018 yılında dünyada 311365 servikal kanserden ölüm vakası bildirilmiştir. Bu ölüm vakalarının neredeyse % 87'si az gelişmiş ülkelerde gerçekleşmiştir. Servikal kanserin dünyada kadınlarda en sık dördüncü sırada gelmişken, ülkemizde iki cinsiyette yaşa göre 1.12% vaka oranı ile on sekizinci sırada ve 1.1% ölüm oranı ile on yedinci sırada yer almaktadır. Serviks kanseri, ölümcül jinekolojik neoplazi olup kadınları üreme çağında etkilemektedir (355). Servikal kanser oluşumunda en önemli risk faktörlerinden olan human papillomavirus (HPV), fakat kendini yeterli olmayan nedenidir. Biyolojik olarak insan immun yetmezlik virüsü (HIV) ve klamidya enfeksiyonları risk faktörleridir. Diğer risk faktörlerden uzun süreli oral kontraseptif tüketimi, kötü beslenme, düşük sosyoekonomik durum, sigara, yüksek kilo, çok sayıda çocuk doğurma, erken yaşta cinsel ilişki, partner sayısının fazla olması ve ailesel öyküdür (356). Etiyolojik olarak HPV servikal kanserin oluşumunda başlıca gelir, ve 200 türünden fazla var olduğunda HPV 16 ve HPV 18 yaklaşık % 70'i vakalarından sorumludur. HPV enfeksiyona Kadınların cinsel yolla bulaşan hayatlarının bir noktasında sahip olacağı tahmin edilir, fakat sadece % 3-4'ünde servikal kanseri gelişir, çünkü kadınların çoğunluğu kendilerinden enfeksiyonu temizlemektedirler (357). HPV'nin, cinsel yolla bulaşan en sık hastalıktır ve servikal kanserlerinin çoğu %99.7 HPV ile ilişkilidir. HPV enfeksiyonu % 65 oranında cinsel temastan etkisiyle gelişmektedir. Kadınlarda, HPV ile enfekte olmayan servikste skuamöz hücreli düşük iken, enfekte olanlarda karsinom gelişme riski 250-400 kat yükselmektedir. Serviks özellikle skuamoz metaplazinin en aktif olduğu adolesan dönemde bu enfeksiyona açıktır. Nitekim HPV prevalansının en yüksek olduğu yaş grubu 20-24, daha sonra ise 15-19'dur. Çoğu kadın, özellikle de genç yaşta etkin bir immün yanıt vererek ortalama 1-2 yıl içinde enfeksiyonu temizler veya viral yükü saptanamayacak düzeylere indirir. Böylece 30 yaştan sonra prevalans hızla azalır, bunda en önemli etken enfeksiyona yatkın olan transformasyon zonunun yaşla regrese olmasıdır. Ama sigara içenlerde ve immün yetmezliği olanlarda bu enfeksiyon epitelde premalign ve preinvazif lezyonlara ilerleyebilir. Buna göre serviks kanseri, hassas kişilerde yüksek riskli HPV tiplerinin seksüel yolla bulaşan enfeksiyonuna yanıt olarak meydana gelir (358). HPV bazal hücre tabakalarına yerleşir, çoğalır ve çekirdek içinde onun replikasyonu gerçekleşir (43). Yüksek riskli HPV enfeksiyonu olan kadınların

HPV onkoproteinleri E6 ve E7'nin aşırı ekspresyonu etkisi ile kanserojen süreci başlar. fonksiyonel olarak bir ubikuitin ligaz olan HPV oncoprotein E6 tarafından tümör baskılayıcı protein p53'ün bozulur, ve sonuç olarak hücre döngüsü durması ve apoptoz kontrolünün düzensizliğine yol açmaktadır (359). Diğer onkoprotein olan E7 hücre döngüsü regülatörde rol oynayan retinoblastom proteini (pRB) ile komplexe ederek bozulmasına yol açar (360). P53 ve pRb'nin degradasyonu, düzenlenmemiş hücresel proliferasyona yol açar, bu nedenle HPV ile enfekte olan hücreler displazi adı verilen prekanseröz bir duruma dönüşür. Premalign aşamalar, servikal intraepitelyal neoplaziler (CIN'ler) olarak adlandırıldı, ve onkojenik sürecin sürekliliğini vurgulamak için CIN 1 (hafif displazi), CIN 2 (orta derecede displazi) ve CIN 3 (şiddetli displazi ve yerinde karsinom kombine) olarak kategorize edildi (355).

Servikal kanserin erken tanısı tedavisinde önemli rol oynar. Erken teşhis servikal kanser semptomlarını anlamak ve saptamak yardımcı olur ve erken teşhis edilmediği durumlarda mortalitesi yüksek olur. Servikal kanserinde erken tanı ile hayat kurtaran pap smear ve HPV DNA testleri büyük önem taşımaktadır. Tarama testleri uygulanırken servikal kanser erken teşhisi edilir ve önlenebilir. Korunmada primer olarak profilaktik aşı uygulaması yer alırken; uygulanan tarama testleri ile HPV'yi erken dönemde belirleyip, sebep olduğu lezyonları erken tedavi ederek invaziv kanser gelişmesini önleyen ikincil korunmadır. Profilaktik olarak verilen HPV aşısı yeni bir enfeksiyon gelişimini önler, ancak vücutta var olan enfeksiyonu tedavi edemez. Cinsel aktif olmadığı kişilerin aşı uyguladığında yüksek derecede korum sağlar. HPV enfeksiyonun önlemek için bazı yaygın olan HPV alt tiplerine karşı özellikle 16 ve 18'i aşı bulunmaktadır. Bu aşılardan servikal kanserine karşı yaklaşık %15'i koruma sağlamaktadır. Dünyada yaygın olarak aşılarından iki tipi vardır. Birincisi olan Bivalent aşı HPV 16 ve 18'e karşı kullanılır, ikincisi ise kuadrivalent aşı ise HPV 6, 11,16 ve 18'e karşı etkisi vermektedir. Bu aşılardan üretilmiş olup dünya çapında uygulamaya başlamıştır. Türkiye'de bu aşılardan 2007 yılından itibaren kullanmaya başlamıştır (361, 49).

Servikal kanser vakalarını son yıllarda gençlik aşamasında artmaya başlamıştır. Servikal kanserin hastalığında, servikal displazinin derecesine, hastanın yaşına ve genel sağlık düzeyine göre tedavi seçimi değişmektedir. Bir tedavi seçerken hem tedaviyi daha yüksek kür oranıyla uygulamak, hem de daha düşük mortalite ve morbiditeye sahip olması gerekmektedir. Preinvaziv lezyonlar evrede hem kriyoterapi hem de elektrokoagülasyon tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. İnvaziv lezyonlar evrede ise radyoterapi, kemoradyoterapi, cerrahi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (362). Küçük, erken evre kanseri olan hastalar histerektomi (rahim ve rahim ağzının çıkarılması) ile cerrahi olarak tedavi edilebilir.

Servikal kanserinin yayılımına bağlı olarak değişik histerektomi tipleri önerilebilir. Servikal kanserinin cerrahi tedavisinde rahim çevre dokular ve 2-3cm üst vajen ile birlikte çıkartılır (radikal histerektomi). Ayrıca hastalığın ilk yayılım bölgeleri olan pelvik lenf bezleri de çıkartılır (lenfadenektomi). Cerrahi operasyon, klasik ya da laparoskopi veya robotik cerrahi gibi en az invaziv yöntemler kullanılarak yapılabilir (363). Diğer taraftan servikal kanserin, kanser hücrelerini öldürüp yayılımlarını önlemek üzere radyoterapi, kemoterapi ya da her ikisi birden kullanılarak da tedavi edilebilir. Kanser evresine bağlı olarak radyoterapi, vücut dışından cihaz kullanarak veya kanser içine ya da yakınına direk radyasyon vermeye yarayan bir cihaz kullanarak uygulanabilir. Servikal kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavi radyoterapidir ve bu tedavi kemoterati ile birlikte yapılır. Radyo-kemoterapi tedavide hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak ve hastanın semptomlarını hafifletmek için kullanılmıştır (364).

Kemoterapi, genellikle kanser hücrelerinin büyümesini, bölünmesini ve daha fazla hücre üretmesini önleyerek kanser hücrelerini yok etmek için ilaçların kullanılmasıdır. Bir kemoterapi rejimi veya programı genellikle belirli bir süre boyunca verilen belirli sayıda döngüden oluşur. Hastanın bir seferde tek ilaç veya aynı anda verilen farklı ilaçların bir kombinasyonunu alabilir. Servikal kanserle hasta olan Kadınlar için kemoterapi genellikle radyasyon tedavisi ile birlikte verilir. Antikanser kemoterapi ilk olarak kemosensitif tümörlerin tedavisinde uygulanmaktadır. Bu ilaçların bazen tümör çıkarıldıktan sonra hafifletici olan metastaz için adjuvan tedavi şeklinde kullanılır. Diğer taraftan bu ilaçların tümör hacmini azalmakta başka bir tedavi yöntemi ile cerrahi gibi çıkartmasını ihtimali arttırmak için kullanılır (neo adjuvant tedavi) (365). Kanser kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçların birkaç grup kapsamaktadır. Örnek olarak, Alkilleyici ajanlar (mekloretamin ve siklofosfamid gibi), Tubulin bağlayıcı maddeler (paklitaksel ve etoposide gibi), Antrasiklin antibiyotikler (Doksorubisin gibi), anti metabolitler (metotreksat ve 5-fluorourasil gibi) ve platin türevleri (sisplatin ve karboplatin gibi) içermektedir. Kemoterapi ilaçlarının çoğu, hücre döngüsüne bağımlıdır ve yüksek bir büyüme fraksiyonu olan tümörlere karşı daha etkili olmaktadır. Bazı ilaçlar, tek bir ilaç maruziyetiyle sınırlı sayıda hücre öldürerek faza özgüdür, diğerleri ise hücre döngüsünden bağımsızdır (366).

Servikal kanserin kemoterapötik tedavisinde kullanılan ajanlardan biri Doksorubisin'dir. Antrasiklin bileşiklerinin bir üyesi olan doksorubisin, Streptomyces türlerinden izole edildi ve anti kanser ajan olarak 1974 yılından itibaren kullanıldı. Fizyolojik olarak doksorubisin, çok düşük oral biyoyararlanım, düşük geçirgenlik ve normal dokuya şiddetli toksisite bazı

özellikleri sahiptir (367). Doksorubisin, DNA sentezi ve fonksiyonunun inhibisyonuna yol açan DNA'ya interkalasyon yoluyla kanser hücreleri üzerinde etki eder. Doksorubisin Topoizomerez enzimleri I ve II'ye bağlanarak anti-proliferasyon ile birlikte bir dizi sitotoksik etkisi meydana gelir ve böylece DNA hasarı ile sonuçlanır. G1 ve G2 fazlarında hücresel büyüme inhibe edildiğinde ve DNA'daki kopmaları onarma girişimi başarısız olduğunda apoptoz yolağı indüklenir. Doksorubisin, DNA ve RNA polimerazın inhibisyonu ile DNA'ya (hem nükleus hem de mitokondri DNA) araya girebilir (interkalasyon) ve sonuçta DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu kesilebilir. Doksorubisin difüzyon yoluyla hücreye girerek proteazom 20S alt birimi ile komplekse ederek çekirdeğe girer. DOX çekirdek DNA'ya yüksek affiniteye sahip olduğu için kompleksten ayrıldığında DNA'ya bağlanır, böylece bu süreç gerçekleşmektedir (119). Doksorubisinin başka eylemleri, daha fazla DNA hasarına neden olan serbest radikal üretimi, makromolekül üretiminin inhibisyonu, DNA gevşemesini / ayrılmasını ve alkilasyonun artmasını bulunmaktadır. NAD(P)H sitokrom P450 reduktaz enzimi etkisiyle doksorubisinin flavoprotein valığı ile semikinona dönüştürür ve süperoksit (O_2^-) oluşur. Oluşan O_2^- semikinon etkisi ile O_2 'ye ya da süperoksit dismütaz etkisi ile H_2O_2 'ye dönüştürür. Oluşan H_2O_2 daha sonra Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile OH radikaline dönüştürülür. Doksorubisin tarafından indüklenen oksijenden türetilmiş serbest radikal oluşumunun enzimatik olmayan yolu demire bağlıdır ve bu da doksorubisin demir kompleksinin oluşumuna yol açar. Bu kompleks, flavoproteinlerin varlığında glutatyon redüktaz enzimi ile doksorubisinferrik kompleks haline dönüştürür ve OH radikalleri oluşumuna yol açar. üretilen OH radikali DNA ve mitokondriyal hasarı, lipid peroksidasyonunu, nekrozu, apoptozu tetiklediğinde hücre ölümüne yol açar (368). Bazı çalışmalar doksorubisinin Bcl-2 / Bax apoptoz yolu üzerindeki etkilerini göstermiştir. Bcl-2, antiapoptotik özellikleriyle bilinirken, Bax'ın proapoptotik özellikleri vardır ve ikisi arasında, bir hücrenin apoptozu girip girmediği veya hayatta kalacağı arasında bir denge vardır. Doksorubisin uygulandığında, p53 seviyeleri sıklıkla artar ve böylece p53 yolunu aktive eder. P53 yolağı aktive edildiğinde proapoptotik proteinleri (Bcl-2/Bax, Puma, Noxa... gibi) ekspresyonu artmaktadır (369). Doksorubisin, kalsiyum kullanımını bozmaya neden olur. Doksorubisin hücre içine girdikten sonra kalsiyum kanalı geçirgenliği artar, sarkomerde ve sitoplazmik kalsiyum seviyesinin artmasına neden olur ve sonra hücresel şişmeye yol açan mitokondriyal kalsiyum konsantrasyonu artar. Bu süreçler mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c akışını tetikler. Tetiklenen sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktive edildiğinde apoptozun indüklenir. Diğer taraftan doksorubisinin etkisi ile oluşan ROS'leri kaspaz 8'i ve sonra kaspaz 3'ü FADD ile etkileşerek apoptozu indükler (368).

Faz II ve III çalışmaları sırasında doksorubisin akut kusma ve bulantı, gastrointestinal problemler, kellik ve nörolojik sistemdeki bozuklukları ortak yan etkilerini göstermiştir. Doxorubisin sadece kanserli hücrelerde değil vücutta diğer hücrelerin büyümesinde etkilebilir. Doksorubisin uyguladığında bağışıklık sistemini etkiler ve bağışıklık hücreler sayısı azalır, böylece hastalığın mikrobiyal enfeksiyonlara karşı daha hassas hale gelmesine, yorgunluğa ve iyileşme süresi azalmasına neden olur. Doksorubisine bağlı toksisite en büyük risk kardiyotoksitesidir. Doksorubisin, kalpte kardiyomiyositlerin yapısal değişikliklerine neden olan ve kardiyak hipertrofiye yol açan beyin natriüretik peptidi (BNP) ve atriyal natriüretik peptidi (ANP) ekspresyonları arttırır. ROS seviyeleri arttığında mitokondriden salgılanan sitokrom c etkisi ile apoptotik kaskadı aktive eder. Bu nedenle doksorubisin yüksek miktarda plazmada biriktiğinde kardiyomiyopati özellikle konjestif kalp yetmezliğine yol açmaktadır (370). Diğer taraftan Doksorubisin TNF- α 'nın oluşumunu stimüle eder, bundan dolayı indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu aktive ederek reaktif azot türlerinin (RNS) seviyelerinin yükselmesine neden olur. RNS seviyesini yükselmeye devam edileceğinde çevresindeki proteinler nitrasyon altındadır ve ROS oluşumunu stimüle eder. Bu süreç mitokondride bulunan gözenekten sitokrom c salımını gerçekleştirir ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olur. Öte yandan ROS aşırı üretimi ile I κ B inhibitörleri fosforile eden I κ B kinz enzimi aktive eder ve bu süreç etkisi ile NF κ B aktive etmektedir. NF κ B daha sonra apoptozu sağlamak için pro-enflamatuar sitokinleri aktive eder (369).

Düşük sitotoksisite ile birlikte ilaç iletimini verimli bir şekilde geliştirmek için yeni ilaç verme sistemlerinin geliştirilmesi sürekli olarak araştırılmaktadır. Nanoparçacıkları içinde hazırlanan doksorubisin, hücreye ligand-reseptör afinitesi ile değil, pasif difüzyon yoluyla girebilir. Ayrıca, Doksorubisin nanoparçacıklardan yavaş salınımı nedeniyle sitotoksitesini ve istenmeyen yan etkileri azaltılabilir. Son olarak doksorubisin nanoparçacıklara bağlandığında seçici olarak tümör hücrelere yönlendirilebilir.

7.1. GPXI:

Kromozom üzerindeki konumu 3p21.31'dir, Glutasyon ailesinden anti oksidan enzim fonksiyonu yapan bir üyesidir. GPXI geni 5'-kuşak bölgesinde oksijene duyarlı bir eleman ORE içerir. GPXI, glutasyon-glutasyon redüktaz sistemi yoluyla NADPH'den indirgenen eşdeğerleri kullanarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitleri ortadan kaldırarak hücreleri oksidatif strese karşı koruyan GPX1 selenyum içeren enzimi kodlayan bir genidir. GPX1, hücrelerin yüksek oksijen koşullarında meydana gelen oksidatif DNA hasarından

korunmasında önemli bir rol oynar ve vücudun hücre içi redoks sistemleri dengesini korur. Patolojik olarak, kanser gelişiminde *GPXI* ekspresyonu anormal halinde görünür. GPX1'in anormal ekspresyonu, malign hücre proliferasyonunu, istilasını ve metastazını teşvik edebilir (371). GPX1, ROS aracılı kanser başlangıcını önlemede önemli rol oynamaktadır. GPX1, kriptojen rejenerasyonu ve hayatta kalması için gerekli olan proinflamatuvar mediatör PEG2 oluşumunu azaltmaya yol açan siklooksijenazların aktivitesini inhibe etmede başka bir rol oynamaktadır (372). Hidropiroksitin kaldırması ile veya p53'ün hidroperoksitle tetiklenen stabilizasyonunun önlenmesi yoluyla GPX1'in ROS etkisi ile tetiklenen apoptozu inhibe eder. Bu iki mekanizma ile GPX1'in hücre çoğalmasını aktive edebilir. Diğer taraftan GPX1'in tümör baskılayıcı işlev yapan P53 tarafından indüklenebilir (373). Bazı çalışmalar, GPX1 aşırı ekspresyonunun kanser hücrelerinde bir kontrast rol oynadığını göstermiştir. İlk durumda, hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasıyla, hidroperoksit aracılı büyüme stimülasyonunu baskılar ve kanser hücresi büyümesini inhibe edebilir. İkinci durumda GPX1'in hidroperoksit aracılı apoptozun inhibisyonu ile tümör büyümesini desteklemiş olabilir. Bu iki durumun etkisi ile, kanser hücre tipine, hidroperoksit konsantrasyonuna ve kanser aşamasına göre GPX1 etkilebilir (374). GPX1, fosforilasyon ile aktif hale getirir. Epidermal büyüme faktörü (EGF) tarafından uyarılan iki reseptör olmayan tirozin kinaz, oksidatif stresle aktive edilen ve apoptoz başlamasında rol oynayan c-Abl ve Arg, GPX1'i Tyr-96'da fosforile eder (375). Öte yandan apoptoz indüklenen faktörü adenozin, GPX1 mRNA stabilitesini arttırdığında, GPX1 protein seviyelerindeki artışa ve sonuçta hücre hasarına neden olan H₂O₂'ye karşı koruması artışa neden olmaktadır. Aynı zamanda bazı kanser hücrelerde adenozin apoptoz faktörleri kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktive eder.

GPXI yüksek ekspresyonu, meme kanseri onkogenezi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. *GPXI* aktivitesi doğrudan kemoterapiye duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir. T47D meme kanseri hücrelerinde *GPXI*'in aşırı ekspresyonu, doksorubisine dirençlerini önemli ölçüde arttırdı (168).

Min, S.Y., ve diğerleri tarafından yapılan çalışma, gastrik kanser vakalarının % 24.4'ünde *GPXI*'in regülasyonunu azaldı ve *GPXI* ekspresyonu kaybı ile kansere özgü kötü sağkalım arasında bir ilişki olduğunu saptadı. Bu çalışma GPX1 inaktivasyonunun mide kanserinde promoter metilasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Gastrik karsinogenez sırasında önemli bir rol oynayabilen *GPXI* metilasyonunda gastrit neden olan *H.pylori* ile bağlantılı metilasyonundan sorumlu olan birkaç gen vardır. Mide kanserinde, oksidatif stres ile ortaya çıkan DNA hasarı seviyesi, en önemli faktör *H. pylori* tarafından belirlenir. Öte yandan DNA

hasarı 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) seviyesinden değerlendirildi. Reaktif oksijen metabolitleri etkisi ile indüklenen 8-OHdG, DNA modifikasyonunda ve DNA bazı mutasyonunda rol oynayabilir (169).

Gladyshev, V.N., ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada karaciğer tümör dokusunda karaciğer sağlıklı dokusuna göre *GPXI* ekspresyonunda azalma göstermiştir. Aynı anda bu çalışmada *GPXI* ekspresyonu, bir prostat kanseri model sisteminde in vitro olarak incelenmiştir. Prostat kanser hücre hattında sağlıklı prostat hücre hattına karşılaştırıldığında *GPXI* ekspresyonunda azalma göstermiştir (170).

Yaptığımız çalışmada uygulanan ilaçlarından birinci grup etkisi ile *GPXI* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldığı tesbit edildi. İkinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla ise *GPXI* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon grup 1 TiO_2 'de ($\text{IC}_{50}= 4.753\pm 0.267 \mu\text{g/ml}$) anlamlı derecede azaldığı tesbit edildi. Grup 2 PEG- TiO_2 ($\text{IC}_{50}= 70.37\pm 1.378 \mu\text{g/ml}$), grup 3 DOX ($\text{IC}_{50}= 4.883\pm 0.196 \mu\text{g/ml}$) ve grup 4 PEG- TiO_2 -DOX'de ($\text{IC}_{50}= 9.646\pm 0.357 \mu\text{g/ml}$) karşılaştırıldığında grup 4'te en fazla anlamlı derecede ekspresyon arttığı gösterdi ($p<0.0001$).

Hücreye uygulanan IC_{50} dozlarına bakıldığında TiO_2 temelli ilacın daha fazla hücelere etki ederek *GPXI* ekspresyonunu baskıladığı belirlendi. Öte yandan Hücreye uygulanan IC_{50} dozlarına bakıldığında PEG- TiO_2 dozunu PEG- TiO_2 -DOX dozundan yedi katı olmasına rağmen, PEG- TiO_2 -DOX nanotaşıyıcı temelli ilacın daha fazla hücelere etki ederek *GPXI* ekspresyonu arttırdığı tesbit edildi.

7.2. SOD1:

SOD1 geni 21q22.11 kromozomu ile eşleşir ve 16 kDa homopolimer antioksidan enzimi üretir. Süperoksit dismutaz 1 (SOD1), süperoksitin oksijen ve hidrojen peroksit parçalanmasını katalizleyen enzimdir ve SOD ailesi aktivitesinin çoğu katkıda bulunmaktadır. Yükselmiş hidrojen peroksit seviyesi büyümeyi ve metabolik süreçleri düzenlemek için ikinci haberci olarak görevi gösterebilmektedir. SOD1, sitozolde düşük seviyelerde bulunan süperoksitten koruyarak hücrenin oksidatif strese ve sonraki hücre ölümlerinden korunmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, SOD1 inhibisyonunda potansiyel olarak kanser hücresi ölümüne neden olabilir (376). Spesifik SOD1 inhibisyonu, azaltılmış H_2O_2 ve yüksek O_2^- hücrelerde içeriğine yol açar. SOD1 inhibisyonu, normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerindeki H_2O_2 seviyelerini azaltabilir, ancak kanser hücrelerinde H_2O_2

seviyesinin azalması, test edilen koşullar altında normal hücrelerden çok daha büyüktür ve bu da kanser hücrelerinde ROS homeostazının bozulmasına neden olur. Kanser hücrelerde ROS homeostazının bozulmasında sinyelleme yollarından sorumlu olan genlerin en çok etkilenir (175). SOD1'in spesifik inhibisyonu, seçici olarak ROS sinyalleme ağının düzenlenmesi yoluyla kanser hücrelerinin apoptozunu aktive eder. H₂O₂ içeriğinin azalmasına yol açan spesifik SOD1 inhibisyonu, kanser hücrelerinin apoptozu için çok önemlidir. H₂O₂ tarafından fosfatazların PTEN'ler gibi oksidatif inaktivasyonu gerçekleştiğinde kanser hücrelerinin tümör oluşumuna, anjiyogenezine ve metastazına yol açan hücrelerin kontrol edilemeyen büyümesini desteklemek için sinyal yolları arasında çapraz etkileşimi tetikler (377). SOD1'in yüksek ekspresyonu etkisi ile H₂O₂ seviyesini arttırdığında kanser hücrelerinin kontrol edilemeyen büyümesi aktif hale gelir. Öte yandan, SOD1 ekspresyonu azaldığında kanser hücreleri içindeki H₂O₂ seviyesi azalır ve sonuçta protein fosforilasyonunu azaltarak ERK, PI3K ve NFκB sinyal yollarının kesintiye uğramasına neden olur. ERK inhibisyonu, hücre döngüsü yollarının durdurulmasına yol açar, bu nedenle SOD1 inhibisyonu, kanser hücre döngüsü durmasını aktive etmek için gerekli olan yolları uyarır (175). SOD1 inhibisyonu, hücre döngüsü inhibitörleri p19, p21 ve p53'ün ekspresyonunu arttırarak p53 sinyal yollarını aktive eder, ve böylece kanser hücrelerinin mitokondriya bağlı bir şekilde büyümesini baskılar ve apoptozuna neden olur. Sonuç olarak, SOD1 inhibisyonu kanser hücrelerini iki ana yolda öldürmeye başlatabilir. Birincisi olan, hücre büyümesini sürdürmek için ROS yollarını baskılar, ikincisi olarak hücre döngüsü durması ile, apoptozun aktivasyon yoluyla gerçekleşir (156).

Li, X., ve diğerleri tarafından yapılan çalışma, LD100 ile tedavi edilmiş DU145 prostat kanseri ve HeLa servikal kanser hücre hatlarında *SOD1* gen ekspresyonunun azaldığını ve O₂⁻ seviyelerinin arttığını göstermiştir. Özet olarak bu çalışmanın, LD-100 etkisi ile *SOD1* ekspresyonu azaldığında, malign tümör oluşumu için çok önemli olan ROS sinyal yollarını bastırdı ve DU-145 prostat kanser ve HeLa servikal kanser hücre hatlarında çok sayıda genin ekspresyonunun düzenlenmesiyle hem hücre döngüsü durmasını hem de apoptozu aktive etmek için sinyal yollarını uyardı (175).

Somwar, R. ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada *SOD1* ekspresyonu çoğu akciğer tümöründe anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. *SOD1*'in aşırı ekspresyonunun artmış büyümeye yol açtığı için, yüksek SOD1 seviyelerine sahip hücrelerin tümör oluşumu sırasında seçici bir avantaja sahip olduğu görülmüştür. Farklı transkripsiyon faktörlerinin (örn., AP1, p53 ve NF-κB) aktivitelerinin, bir hücrenin redoks durumu ile düzenlendiği

gösterilmiştir. LCS-1 (4,5-dikloro-2-m-tolilpiridazin-3 (2H) -on) ile tedavi edilen akciğer kanseri hücre hatları SOD1 inhibisyonuna yol açar, ve sonuç olarak ROS artışına yol açmıştır. ROS, büyüme faktörü sinyal yollarında yer alan proteinlerin post-translasyon modifikasyonunu indükleyerek DNA hasarı ve apoptoza yol açabilir. Bu nedenle SOD1 aşırı ekspresyonu akciğer kanser hücreler büyümesinde önemli rol oynamıştır (181).

Papa, L. ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada SOD1'in insan primer meme kanserlerinin% 70'inde aşırı eksprese edildiğini bulundu. Bu çalışmanın SOD1'in kanser tedavisi için önemli bir hedef olabileceği önermiştir. Bu çalışma, meme kanseri hücre hatlarında SOD1'in aşırı ekspresyonunun, mitokondrideki toplam ROS seviyelerini kritik bir eşiğin altında tutmak için bir adaptasyon mekanizması olarak işlev gösterebileceğini ve böylece organelin bütünlüğünün korunacağını önermiştir (182).

Yaptığımız çalışmada uygulanan ilaçlarından etkisi ile, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla *SOD1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon gruplar arasında en az grup 1 TiO₂ (IC₅₀= 4.753±0.267 µg/ml) etkisi ile *SOD1* ekspresyon arttığında, en yüksek grup 3 ile DOX (IC₅₀= 4.883±0.196 µg/ml) *SOD1* genin ekspresyonu daha fazla arttığı anlamlı derecede gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında TiO₂'nin dozu DOX dozunun ile karşılaştırıldığında aynı olmasına rağmen DOX temelli ilacın daha fazla hücrelere etki ederek *SOD1* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.3. PRDX1:

PRDX1, esas olarak sitozolde bulunan, 2 - Cys PRDXs alt ailesinden bir üyesi bir enzimdir. PRDX1 yapısında N- terminal bölgesinde Cys⁵² içerir ve C-terminali Cys¹⁷³ kalıntısı ile moleküller arası disülfid oluşumu yoluyla peroksitleri detoksifiye edilmesinde önemli bir oynamaktadır (189). PRDX1, H₂O₂ ve peroksinitriti azaltarak ve tiol radikallerini atarak hücreleri oksidatif hasardan koruyan önemli bir endojen antioksidandır. PRDX1 etkisi ile H₂O₂ miktarı azaldığında H₂O₂ kaynaklı hücre ölümünün baskılanır. Bu süreç, hücre ölümü ve / veya apoptozun düzenlenmesinde anahtar rol oynayan kinazları (JNK, ASK1) baskıladığında gerçekleşir. Öte yandan PRDX1'in, oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünde rol oynayan ve JNK, p38 MAP kinaz yolları düzenlenmesinde işlev yapan c-Abl tirozin kinaza fizyolojik olarak bir inhibitördür. Diğer taraftan, Akt ile indüklenen tümörögen PRDX1 etkisi ile önler, sonra PTEN aktivitesini oksidasyonla indüklenen inaktivasyondan

koruyarak hücre ölümünü indükler (378). Ayrıca, PRDX1 c-Myc onkojenle etkileşime girdiğinde transkripsiyonel aktivitesini baskılar, bundan dolayı kanser hücreleri apoptozunu aktive edilir ve tümör oluşumunu inhibe etmektedir. Bununla birlikte, PRDX1 transkripsiyon faktörleri (NFκB, AR) ile birbirine etkileştiğinde tümör hücresi ölümünü baskılar (378).

Yaptığımız çalışmada uygulanan ilaçlarından birinci grup etkisi ile *PRDX1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldığı tesbit edildi. İkinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla ise *PRDX1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon grup 1 TiO₂'de (IC₅₀= 4.753±0.267 µg/ml) azaldığı gösterdi. Diğer gruplar en az arttığı grup 3 DOX (IC₅₀= 4.883±0.196 µg/ml) en fazla ekspresyon grup 4'te PEG-TiO₂-DOX (IC₅₀= 9.646±0.357 µg/ml) arttığı anlamlı derecede gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında TiO₂ dozunun ile, TiO₂ temelli ilacın hücrelere etki ederek *PRDX1* ekspresyonunu baskıladığı belirlendi. Öte yandan Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂-DOX temelli nanotaşıyıcı ilaç ile en fazla *PRDX1* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.4. CAT:

İnsan katalaz geni kromozom 11'in kısa kolunda bulunur ve 527 amino asitten oluşmaktadır. İlk olarak Loew tarafından 100 yıldan daha önce tarif edilen enzim (EC 1.11.1.6), her monomerin (62.5 kDa) enzimatik aktiviteden sorumlu bir hem grubu içerdiği bir homotetramerdir. İnsan katalaz, H₂O₂ su ve moleküler oksijene dönüştürmesini uyararak tipik katalaz enzimler ailesinden bir üyesidir. Katalaz, peroksinitriti parçalayabilir, nitrik oksidi azot dioksite oksitlenebilir, ve ayrıca oksidaz aktivitesi azaltılmış gibi diğer işlevleri yapmaktadır (202). Katalaz düşük seviyelerde ekspresyonunda, kanser hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve invazyonu indüklemek için sinyal yollarının aktivasyonunda yer alan yüksek bir H₂O₂ üretimine yol açacaktır. ROS, MAPK gibi çoğalma, göç ve istila kapasitesini artırmaya yol açan çeşitli sinyal yollarının aktifleştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (379). Katalaz, ilki mekanizma ile H₂O₂'yi detoksifiye etme kabiliyetinde, büyüme hızını çeşitli mekanizmalarla modüle edebilir. İkinci mekanizma olan, katalazın, çoğalma ve göç süreçlerinde rol oynayan integrin yolağında katılan spesifik proteinleri Grb2 ve SHP2 gibi potansiyel oksidatif hasardan bağlama ve koruma etkisiyle gerçekleşir. Sonuç olarak katalazın, kanser hücrelerinde hücre büyümesini ve göçmesini kontrol etmektedir (380). Katalaz, elektron donörlerine ek olarak oksijen gerektiren oksidaz aktivitesine sahiptir. Fenoller (benzen türevleri), alkoller ve aril aminler gibi bazı kanserojenler oksidaz

fonksiyonunun inhibitörleri işlev göstermişir. Ayrıca katalazın, toksik ve anti-tümör bileşiklerinin detoksifikasyonu veya aktivasyonu ek rollere sahip olabilmektedir (381). Tümör hücrelerinde mitokondriyal kusurların varlığı ve antioksidan enzimlerin ekspresyonunun (katalaz gibi) azalmasıyla büyük miktarlarda ROS üretilmektedir. ROS, DNA mutasyonlarını ve genomik karasızlığını indükleyerek tümör oluşumunda ve tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Öte yandan, ROS yüksek seviyelerde üretimini hücre ölümünü, redoks regülasyonunda ve redoks sinyellemesinde değişiklikleri yeni anti kansert tedavisi geliştirmek için indüklenir (382).

Christophe Glorieux ve diğerleri tarafından yapılan çalışması, mem kanser (MCF-7 CAT3) hücrelerinde katalaz aşırı ekspresyonunun, hücrelerinin çoğalma ve göç etme yeteneğinde bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. Bu sonuç, hücrelerde bulunan ve ERK / MAPK yolu gibi mitojenik sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasına indüklenen ROS'un daha düşük seviyeleri olduğuna bağlanır. Çoğalma ve göç etme kapasitesi azalmış hücreler antikanser ilaçlara veya maruz kalmaya karşı daha duyarlı olmalıdır. Bununla birlikte MCF-7 CAT3 hücreleri sisplatin, doksorubisin veya 5-florourasile ilaçlara karşı daha duyarlı olmamıştır. Katalaz aşırı eksprese eden hücreler paklitaksel veya etoposid ile inkübe edildiğinde hücre toksisitesi ana hücrelere göre daha önemli derecede görünmüştür (207).

James Chung-man Ho ve diğerleri tarafından yapılan çalışma, İnsan A549 akciğer karsinom hücrelerinde katalaz ekspresyonunu azalttığı gösterdi. Azalan katalaz ekspresyonu tümör hücrelerinde azalmış katalaz aktivitesine yol açar, sonuçta DNA hasarına ve / veya hücre büyümesine neden olan H₂O₂ birikmesine yol açmaktadır. Bu süreç insan A549 akciğer karsinom hücrelerinde gerçekleştiğinde tümör gelişimini uyarmaktadır (383).

Yaptığımız çalışmada uygulanan ilaçlarından, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla *CAT* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon en az grup 2 PEG-TiO₂ (IC₅₀= 70.37±1.378 µg/ml) ile arttığında, en fazla grup 3 ile DOX (IC₅₀= 4.883±0.196 µg/ml) arttığı anlamlı derecede gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında grup 2 olan PEG-TiO₂ dozunun DOX dozunun 15 katı olmasına rağmen, DOX temelli ilacın daha fazla hücrelere etki ederek *CAT* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.5. *CSNK1A1*:

CSNK1A1 geni Kromozom üzerindeki konumu 5q32 ve 373 amino asitten oluşmaktadır. *CSNK1A1* yapısında C-terminal alanı substrat spesifitesinde ve kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (221). $CK1\alpha$, DNA onarım mekanizmalarında, RNA metabolizmasında ve hücre bölünmesi sırasında mitotik iğ oluşumunda rol oynamaktadır. Öte yandan $CK1\alpha$ M fazında hücre döngüsü ilerlemesi tetiklemektedir (384). mTOR'un, endojen mTOR inhibitör olan DEPTOR'un sürekli degradasyonun yoluyla kendi aktivasyonunu desteklemek için $CK1\alpha$ ile işbirliği yaptığı gösterilmiştir (385). $CK1\alpha$ apoptotik sinyal yollarını düzenlemesinde önemli rol oynar. BID'nin fosforilasyonunun neden olduğu hücre ölümü, kaspaz 8'e bağlı BID bölünmesini önleyen $CK1\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonu ile gecikebilir. Ek olarak $CK1\alpha$, ölüm indükleyen sinyal kompleksinde (DISC) TNF reseptörünün veya FADD'nin modifikasyonu ile TRAIL ile indüklenen apoptozu inhibe eder. Bu nedenle $CK1\alpha$ 'nin ekspresyonu azalması ile TRAIL ile indüklenen hücre ölümünü artmaktadır. $CK1\alpha$, Wnt / β -katenin sinyal yolağında düzenleyici fonksiyona sahiptir. Wnt / β -katenin yolunda, salgılanan Wnt ligandlarının Frizzled (Fzd) reseptörlerine ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü protein 6 (LRP 6) bağlanması üzerine aktive edilir. Wnt yolağı aktivasyonunda, Wnt / β -katenin sinyal yolunda anahtar bir bileşen olan dağılık proteinler (Dvl) $CK1\alpha$ 'nin tarafından fosforile olur. DVL polimerleri Axin, APC, GSK3 β ve $CK1\alpha$ içeren yıkım kompleksini inaktive ederler. Sonuç olarak, çekirdeğe geçen β -katenin birikmesine neden olmaktadır (219). $CK1\alpha$ Wnt / β -katenin sinyal yolunun ilişkili olduğu için tümör baskılayıcı olarak işlev göstermiştir. Tümör baskılayıcı protein p53 ve p53 etkileşen proteinler MDM2 ve MDMX, $CK1\alpha$ substratlarıdır. $CK1\alpha$ N-terminal olarak p53'ün MDM2 ile etkileşiminin azaltılmasıyla p53'ün stabilizasyonuna ve aktivasyonuna yol açan tümör baskılayıcı protein p53'ü fosforile eder. p53'ü aktive edebilen *CK1 α* 'nin ekspresyonu veya aktivasyonu yükseldiğinde, hücre döngüsü durması ve apoptoz indüksiyonu artar. $CK1\alpha$ 'nın, p53'ün aktivasyonunda veya inhibisyonunda rolü, hücre tipine göre değişmektedir. Muhtemelen $CK1\alpha$, Thr18 ve Ser20'nin doğrudan fosforilasyonu ile p53'ü uyarabilir (240).

Julia Richter ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışma, *CK1 α* 'nin kolorektal karsinom (CRC) hücre hatlarında ve dokularında aşırı ekspresyonu gösterdi. artmış *CK1 α* ekspresyon seviyeleri, CRC hastalarının kötü prognozu ile ilişkilidir. Tümörlerdeki yüksek *CK1 α* ekspresyon seviyeleri, CRC hastalarının genel hayatta kalma oranlarının zayıf olmasıyla önemli ölçüde ilişkilidir. APC / Wnt / β -katenin yolunun kolorektal karsinogenezde önemli bir rol oynadığından ve $CK1\alpha$ Wnt sinyallemede düzenleyici rol oynadığından, *CK1 α* 'nin

aşırı ekspresyonunun Wnt / β -katenin- kolorektal tümör hücrelerinin bağımlı malign fenotipi (386).

Yaptığımız çalışmada uygulanan ilaçlarından etkisi ile, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla *CSNK1A1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon grupları arasında en az grup 2 PEG-TiO₂ (IC₅₀= 70.37±1.378 μ g/ml) etkisi ile *CSNK1A1* ekspresyon arttığı, en yüksek grup 3 ile DOX (IC₅₀= 4.883±0.196 μ g/ml) *CSNK1A1* genin ekspresyonu daha fazla arttığı anlamlı derecede gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂'nin dozu DOX dozunun ile karşılaştırıldığında 15 kat olmasına rağmen DOX temelli ilacın daha fazla hücrelere etki ederek *CSNK1A1* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.6. CTNNB1:

Wnt / β -katenin sinyalleme yolağı, biyolojik homeostazın sürdürülmesi için düzenlenen önemli bir yoldur. Bu sinyal yolundaki anahtar proteinleri kodlayan çoklu genler, mutasyon değişiklikleri için hedeflerdir. Bu proteinler arasında β -katenin'dir. β -katenin, nükleer programlama için hücre dışı sinyallerin taşınmasında önemli rol oynamaktadır. β -kateninde mutasyonlar meydana gelirse, bu Wnt / β -katenin sinyal yolunun aktivasyonuna ve azalan nükleer transkripsiyon ağlarının yeniden programlanmasına yol açar. β -katenin, Wnt / β -katenin yolunun hücre içi dönüştürücüsü olduğundan dolayı, tüm süreçte önemli roller oynar. β -katenin aktivitesini APC, AXIN-1, AXIN-2, CK1 α , protein fosfat 2A (PP2A) ve GSK-3 β 'dan oluşan yıkım kompleksi tarafından kontrol edilir (387). Wnt ligandlarının yokluğunda sitoplazmik β -katenin, N-terminal serin-treonin kalıntılarında yıkım kompleksi tarafından fosforile edilir ve ubiquitin-proteazom yolu etkisi ile proteazom tarafından degrade etmektedir. Wnt varlığında, ligand, Frizzled yapısında, Wnt proteinini bağlamak için özel bir yapıya sahip ve Dağınık protein üzerine etki eden sistein açısından zengin bir alan adı verilen uzun bir amino terminal uzantısı ile hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır. Yardımcı reseptör fonksiyonuna sahip olan, LRP (5, 6), reseptör benzeri tirozin kinaz ve reseptör tirozin kinaz benzeri orfan reseptör-1/2 gibi diğer tek geçişli transmembran proteinleri, Wnt sinyallemesinde etkilemektedir. Wnt bağlandıktan sonra, GSK-3 β fosforilasyonu, (A, B, C) protein kinaz, MAPK, PI3K/Akt etkisi ile inhibe eder ve böylece yıkım kompleksi aktivitesini kaybetmektedir. Bu işlem β -katenin fosforilasyonunu ve bozulmasını önlemeye yol açacaktır. Fosforile edilmeyen β -katenin sitoplazmada biriktiğinden dolayı transkripsiyonel bir faktör olarak işlev yapacağı için çekirdeğe taşınır (388). β -katenin fizyolojik gelişimsel için,

hücreden hücreye yapışmanın kurulması ve sürdürülmesi ve Wnt sinyalleme yolu vasıtasıyla hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi önemli olan süreçlerde çok önemli role sahiptir (255). Normal fizyolojik koşullar altında, β -katenin esas olarak hücre zarında bulunur ve E-cadherin ile bir kompleks oluşmaktadır. Bu kompleks hücre yapışmasında, normal hücre morfolojisini korumasında ve tümör hücresi istilasını ve metastazını inhibe etmesinde önemli bir rol oynamaktadır. β -katenin gen mutasyonları, bazı kanser vakalarının gelişiminde erken olay olan Wnt / β -katenin sinyal yolunun aktivasyonuna yol açmaktadır. Öte yandan, kanser başlatması için yüksek seviyede β -katenin aktivitesini gereklidir (257).

Seung Ho Shin ve diğerleri tarafından yapılan çalışma, HI-B1 ile tedavi edilen kolon kanseri hücre hattı, β -katenin / TCF4 lusiferaz aktivitesini inhibe ederek Wnt / β -katenin yolunu inhibe etmeye yol açtığı gösterdi. Wnt / β -katenin aktivitesinin inhibisyonunun nedeni ile kolon kanser hücrelerini büyümesini baskıladığı ve öldürebildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar β -katenin ekspresyon seviyesinin Wnt / β -katenin inhibitörlerinin kolon kanserine karşı etkinliği ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (389).

Wenyan Lu ve Yonghe Li tarafından yapılan çalışma, salinomisin ile tedavi edilen meme kanseri HS578T ve MDA-MB-231 hücre hatlarının ve prostat kanseri PC-3 ve DU145 hücre hatlarının, meme ve prostat kanseri hücre hatlarında LRP6 ekspresyonunu ve fosforilasyonunu azaltmaya yol açtığını gösterdi. LRP6, Wnt / β -katenin sinyal yolunda önemli Wnt ko-reseptörüdür ve LRP6 fosforilasyonu, Wnt proteinleri tarafından indüklenen Wnt / β -katenin sinyal aktivasyonunda kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle, LRP6 fosforilasyonu ve ekspresyonu silinomisin etkisi ile inhibe edildiğinde Wnt/ β -katenin yolu inhibe eder. Bu çalışma, LRP6 yüksek ekspresyonunun mTORC1 sinyalini indükler, bu nedenle salinomisinin GSK3 β 'nin aktive ettiğinde, prostat ve meme kanseri hücre hatlarında mTORC1 sinyalini inhibe ettiğini onaylamıştır (390).

Yaptığımız çalışmada, birinci, ikinci ve üçüncü gruplarla *CTNNB1* geninin ekspresyonu azaldığı tesbit edildi. Dördüncü grup ise *CTNNB1* geninin ekspresyonu arttığı tesbit edildi. Ekspresyon en fazla grup 2 ile (PEG-TiO₂) anlamlı derecede azalttı (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂ dozunun ile nanotaşıyıcı temelli ilacın daha fazla hücrelere etki ederek *CTNNB1* ekspresyonunu baskıladığı belirlendi.

7.7. CCND1:

CCND1 geni tarafından kodlanan Siklin D1, hücrel çoğalmayı destekleyen ve sıklıkla insan kanserlerinde aşırı eksprese edilen hücre döngüsü ana düzenleyicisidir. Siklin D1, G1 fazdan S faza ilerlemesi ve sikline bağlı kinaz 4 / sikline bağlı kinaz 6'ya (CDK4 / CDK6) bağlanarak retinoblastom proteininin (pRB) fosforilasyonunu ve inaktivasyonu desteklemektedir (275). Siklin D1, sırasıyla migrasyon ve DNA hasar yanıtı üzerinde etkilere yol açan p21 veya p27'yi bağlayabilir. Ayrıca RAD51 ve BRCA2 ile etkileşimler yoluyla, Siklin D1 DNA hasar tepkisi üzerinde de etkileri bulunmaktadır. Siklin D1, nükleer hormon reseptör ailesi üyeleri (östrojen reseptörü-a (ERa), androjen reseptörü (AR) ve peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör- γ (PPAR like) gibi birkaç transkripsiyon faktörünün bağlanarak hücre proliferasyonunu, hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenler. Ayrıca, Siklin D1, histon asetiltransferazlar (HAT'ler) ve histon deasetilaz kompleksleri (HDAC'ler) dahil olmak üzere kromatin modifiye edilen enzimleri bağlar (391).

Yan-Shen Shan ve ark. tarafından yapılan çalışmada, insan mide kanserinde *CCND1* ekspresyonunun incelendiğinde, *CCND1*'in aşırı ekspresyonunun yükseldiği gösterilmiştir, ve hastaların hayatta kalması ile ilişkili zayıf olduğunu tespit edilmiştir. Bu çalışma, *CCND1* proteininin aşırı ekspresyonunun, zayıf diferansiye mide kanserinde düşük PFS ile korele olduğunu doğrulamıştır. Bu çalışma, *CCND1*'in insan mide karsinomunda aşırı eksprese edildiğini ve bu proteinin ekspresyonunun tümör farklılaşmasında rol oynadığı göstermiştir. Bu nedenle, *CCND1* ekspresyonu mide kanseri için değerli bir prognostik faktörü bildirilmiştir (392).

Li, R., ve diğerleri çalışma sonuçları *CCND1*'in akciğer kanseri malign dokularında anlamlı olarak daha yüksek bir ekspresyona sahip olduğunu göstermiştir (393).

Yaptığımız çalışmada, uygulanan ilaçlarından ikinci grup etkisi ile *CCND1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldığı tesbit edildi. Birinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla ise *CCND1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon grup 2'de PEG-TiO₂ (IC₅₀= 70.37±1.378 µg/ml) anlamlı bir şekilde azaldığı tesbit edildi. Diğer gruplar ise ekspresyon en az arttığı grup 1 TiO₂ (IC₅₀= 4.753±0.267 µg/ml), grup 4 ise PEG-TiO₂-DOX (IC₅₀= 9.646±0.357 µg/ml) en fazla ekspresyon arttığı anlamlı derecede gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂ dozunun ile PEG-TiO₂ temelli nanotaşıyıcı ilacın daha fazla hücelere etki ederek *CCND1* ekspresyonunu baskıladığı belirlendi. Öte yandan Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂-DOX dozunun ile PEG-TiO₂-DOX nanotaşıyıcı temelli ilacın daha fazla hücelere etki ederek *CCND1* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.8. NFκB1:

Memelide NFκB ailesi beş üyeden, p50 / p105 (NFκB1), p65 / RelA, c-Rel, RelB ve p52 / p100 (NFκB2) oluşur ve farklı dimerik kombinasyonlar oluşturabilirler. *NFκB1* geninin, 4q24 kromozomuna konumu, kanser başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynayan NFκB'nin p105 / p50 izoformlarını kodlar (394). Sınıf 1 alt birimleri, NFκB1 (p105 / p50), proteolitik olarak daha kısa DNA bağlanma formlarına işlenebilen daha uzun öncü proteinler olarak sentezlendi. Fizyolojik olarak, NFκB alt üniteleri her yerde vücutta eksprese edebilir ve innat ve adaptif immüniye, hücre proliferasyonu, stres tepkileri ve apoptozun önemli düzenleyicileridir (395). Enflamatuar stimülasyondan sonra İnhibitör Kappa Kinaz (IKK), NFκB1 sinyal yolu için ana stimülatör görevi yapmaktadır. İκB'nin fosforilasyonu ve ubikuitinasyonu, tümör destekleyen pro-enflamatuar genlerin (IL-1β, TNFα, CXCL1), anti-apoptotik (Bcl-xL, Bcl-2, Gadd45β) ve proliferatif (IL-6, GM-CSF) genlerin transkripsiyonunu yönlendirebilen p50:p65 dimerlerini serbest bırakmaktadır. Bu nedenle NFκB1, bu tarafta bir tümör promotörü olarak görevi göstermiştir. Çalışmalar, Serin 329 (ser329) bölgesindeki P50 fosforilasyonu meydana geldiğinde, p50: p65 heterodimerinin DNA'ya bağlanmasını bozulur ve bu işlemin, Bcl-xL ekspresyonunu azaltarak, kanserin ilerlemesini engellediğini göstermiştir. Serin 329'da ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış ve Rad3 ile ilişkili kinaz (ATR) vasıtasıyla p50 fosforilasyonu, replikasyon ile ilişkili DNA hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar ve genomun korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Hücre döngüsünün S fazı sırasındaki bu fosforilasyon işlemi, p50 aktivitesini ve DNA'ya bağlanmasını inhibe eder, bu da anti-apoptotik protein Bcl-xL'nin ekspresyonunun azalır ve hücrelerin DNA iplik kopmalarına duyarlı hale getirilmesine neden olmaktadır. p105 fosforilasyonu ve ubikuitinasyonu, 26S proteazom tarafından işlenmesine yol açar ve p50 homodimerlerini serbest bırakmaktadır. P50: p50: HDAC1 kompleksi, inflammatuar gen ekspresyonunu destekleyen tümörü bastırır (294), böylece tümör baskılayıcı bir kompleks olarak işlev görürken, B hücre lymfoma 3 (Bcl-3) veya anti apoptotik olan BCL2 ile ilişkili athanogene (BAG-1) ile kompleks halinde bulunan p50 homodimerleri proliferasyonu yönlendirebilmektedir (295).

Yaptığımız çalışmada, uygulanan ilaçlarından ikinci grup etkisi ile *NFκB1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldığı tesbit edildi. Birinci, üçüncü ve dördüncü grup ise *NFκB1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon grup 2’de PEG-TiO₂ (IC₅₀= 70.37±1.378 µg/ml) anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. Diğer gruplar ise en az arttığı grup 1 TiO₂ (IC₅₀= 4.753±0.267 µg/ml). Grup 4 ise PEG-TiO₂-DOX (IC₅₀= 9.646±0.357 µg/ml) en fazla arttığı ekspresyonu anlamlı derecede gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂ temelli nanotaşıyıcı ilacın hücrelere etki ederek *NFκB1* ekspresyonunu baskıladığı belirlendi. Öte yandan Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂-DOX nanotaşıyıcı temelli ilacın en fazla hücrelere etki ederek *NFκB1* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.9. TOP2A:

Topoizomeraz II alfa (TOP2A), 17q12-q21 kromozomu üzerinde bulunan *TOP2A* geni tarafından kodlanan enzimdir. Çift iplikli DNA’da geçici kopma oluşturarak topolojik DNA durumlarının kontrolünde önemli bir rol oynayan nükleer bir enzimdir. DNA’nın topolojik durumlarındaki rolü nedeniyle, hem DNA replikasyonu ve transkripsiyonu, hem de kromozom oluşumu, zenginleşmesi ve ayrılması gibi süreçlerde katılmaktadır (396). TOP2A’nın anormalliği, kromozom instabilitesi ve tümör oluşumunda kritik bir rol oynar. Ayrıca, TOP2A’nın aktif olarak çoğalan hücrelerde (hücre döngüsünün geç S, G2 ve M fazlarında) hassas ve spesifik bir belirteç olduğu bildirilmiştir (397). Çalışmalar, TOP2A’nın DNA hasarına yol açan antrasiklinlerin doğrudan hedefi olabileceğini bildirmiştir (8). TOP2A, çoğalan hücrelerde yüksek oranda eksprese eder, bu nedenle proliferasyon markeri olarak görevi göstermektedir. TOP2A aşırı ekspresyonu, tümör davranışındaki değişiklikler ve tedavisinde kullanılan ilaç yanıtlarla anlamlı bir şekilde ilişkilidir (398).

Kim ve ark. primer kas invaziv olmayan mesane kanserinde (NMIBC) *TOP2A* mRNA’nın ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğunu gösterdi. Bu çalışmanın bulguları, *TOP2A*’nın daha yüksek ekspresyonunun, birincil NMIBC’de yüksek derecede nüks ve ilerleme ile doğrudan korelasyona sahip olduğunu göstermiştir. *TOP2A*’nın aşırı ekspresyonu, gelişmiş tümör evresi ile ilişkilidi gösterilmiştir (399).

Fagge ve diğerleri, yumurtalık kanseri hastalarında daha kısa sağkalımın *TOP2A* ekspresyonu ile doğrudan korelasyonu olduğunu ve hastalığın ileri evresinde *TOP2A* mRNA yüksek ekspresyonunun fark edildiğini bulmuştur (306).

Tian-Lu Wang ve arkadaşları tarafından küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHK) üzerinde yapılan çalışma, TOP2A rs471692 tek polimorfizm nükleotid (SNP) olan hastaların yanıtı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Aynı anda, Ayrıca TOP2A SNP'nin genel sağkalım ile ilişkili olduğunu da bulamadı. Bu çalışmada kemoterapi ajan olan platinyum ile tedavi edildikten sonra sonuçlara göre, TOP2A rs471692 SNP'nin kemoradyoterapi yanıtı ile ilişkili olmadığını bildirmiştir (315).

Alíz Nikolényi ve diğerleri tarafından meme kanser hastalıkları üzerinden yapılan çalışmada, TOP2A gen ekspresyonu genellikle yüksek proliferasyon oranına sahip meme kanserinde yükselmeyi tesbit edilmiştir. Öte yandan, antrasiklin grubundan kullanılan ilaçları TOP2A ekspresyonu azalmaya neden olmuştur (400). Diğer taraftan, Jisela Dimas-González ve ark. tarafından yapılan çalışmada, meme kanserinde amplifikasyonlar veya delesyonlar ve TOP2A'nın protein ekspresyonu arasında herhangi bir ilişkili bulamadı (316).

Zhou Zhou ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada TOP2A'nın pankreas karsinomunda önemli ölçüde aşırı ekspresyon olduğunu bulmuştur. Bu çalışma, TOP2A'nın yüksek ekspresyonunun daha kısa genel sağkalım süresine neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, TOP2A'nın ekspresyonu pankreas karsinomunun prognozunda önemli bir biyobelirteç rol oynayabilir (317).

Hughes C. Ve diğerleri tarafından yapılan çalışma, hormona dirençli prostat karsinomunda TOP2A ekspresyonunu inceledi. TOP2A, klinik çalışmalarda hormona duyarsız prostat karsinomunun kombine kemoterapisinde aktif bir ajan olan ilaç etopositin hedefidir. Bu çalışmada hormona dirençli prostat karsinomlarında, hormon tedavisi olmayan prostat karsinomlarına kıyasla artmış TOP2A ekspresyonu tespit edilmiştir (319).

Yaptığımız çalışmada uygulanan ilaçlarından etkisi ile, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla TOP2A genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon grupları arasında en az grup 1 TiO₂ (IC₅₀= 4.753±0.267 µg/ml) etkisi ile TOP2A ekspresyon arttığında, en yüksek grup 3 ile DOX (IC₅₀= 4.883±0.196 µg/ml) TOP2A genin ekspresyonu daha fazla arttığı anlamlı derecede gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında TiO₂'nin dozu DOX dozunun ile karşılaştırıldığında aynı olmasına rağmen DOX temelli ilacın daha fazla hücrelere etki ederek TOP2A ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.10. BAX:

İnsan BAX geni, kromozom 19q13.3 üzerinde eşleşir. BCL2 ile ilişkili X (BAX) proteini, BCL2 ailesinin ilk keşfedilen pro-apoptotik üyesidir. BCL-2 protein ailesinin çözünür pro-apoptotik bir üyesi olan BAX, sağlıklı hücrelerde sitozol boyunca dağınık bir şekilde yerleşir. Hücre apoptozunu desteklemede önemli bir adım BAX'in sitosolden mitokondriye translokasyonudur. BAX mitokondri'ye yerleştiğinde, çeşitli apoptotik uyarılar etkisi ile stimüle edildikten sonra dış mitokondriyal membrana sokulur. Sonuç olarak mitokondriyal fonksiyonu bozukluğunda geçirgenlik geçiş gözenegindeki değişiklikler oluştuğunda sitokrom c'nin salınmasına yol açar. Sitokrom c salınımında hücre hayatta kalması için gerekli hücre içi hedefleri ayıran Apaf-1 ve kaspazların aktive eder (401). BAX, korunmuş BH1, BH2 ve BH3 alanlarını taşır ve BCLXL ve BCL2'ye benzeyen bir üçüncül yapıya sahiptir. BAX'in homodimerizasyonu ve BCL2 ve BCLXL ile heterodimerizasyonu için yapısında bulunan BH3 alanı önemli rol oynamaktadır. Apoptozun düzenlenmesi, BAX ve BCL2 ailesi diğer üyeleri arasında heterodimerlerin oluşumunda gerçekleşir (402). Sitoplazmik bir BAX bağlayıcı protein olan BIF-1, C terminaline yakın bir Src homoloji 3 (SH3) alanı içerir ve BAX bağlayıcı aktivitesi, BAX'in tirozin kinazlarla etkileşimler yoluyla apoptoza aracılık edebileceğini gösterilmiştir. BAX'ın, porin ile etkileşime girdiğinde büyük gözenekler (VDAC) oluşturur. Dış zar proteinlerinden olan Porin, iç zar proteinlerinden olan adenin nükleotit taşıyıcı (ANT) ve diğer proteinlerle adenilat kinaz ve heksokinaz gibi birlikte, geçirgenlik geçiş gözenegi (PTP) adı verilen büyük bir gözenek oluşturan bir multi-merik kompleks oluşturur. BAX'ın PTP ile etkileşime girdiğinde mitokondriyal geçirgenliği arttıran dimeri oluşturur. Oluşturulmuş dimer membrana girdiğinde, N-terminal bölgesini sitozole doğru uzatarak konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Fizyolojik olarak bu sürecin etkisi ile, apoptotik bir uyarı ortaya çıkana kadar molekülü yakın bir konformasyonda tutması rol oynamaktadır (403). C-terminal kuyruğu olmayan BAX, hem MAPK1 hem de protein kinaz A (PKA) tarafından fosforile edilir ve Ser184'ün BAX aktivitesinin düzenlenmesi için önemlidir. BAX fosforelasyonu için protein kinaz B (Akt) gereklidir. BAX'ın fosforelasyonu gerçekleştiğinde sitozolda kalır ve anti apoptotik rollere sahip olan Bcl2 aile üyeleri ile heterodimerizasyonları oluştuğunda inaktif şekilde kalır (404). BAX tümör baskılayıcı olarak rol oynamaktadır. Sağlıklı hücrelerde, hasarlı hücrelerin apoptotik ölümünü indükleyerek doku homeostazına katkıda işlev yapmaktadır. Bununla birlikte, malign olaylarda, kanser hücrelerindeki BAX proteininin konsantrasyonu azalır BAX geni apoptotik gendir, direkt P53 tarafından düzenlenir ve yapısal anahtarlama, trafik işlemleri ve agregasyon durumu gibi bir

dizi değişiklikle intrinsik yoldan programlanmış hücre ölümünü aktive edebilmektedir (322). *p53* genindeki mutasyonlar etkisi ile *BAX* konsantrasyonları azalır. Çalışmalar *BAX* ekspresyonunun tümör gelişimi ile ilişkili göstermiştir (405).

Bizim çalışmamızda, tüm gruplarda *BAX* geninin ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup 4 (PEG-TiO₂-DOX) (IC₅₀=9.646±0.357 µg/ml) en az ise grup 1 (TiO₂)'de (IC₅₀=4.753±0.267 µg/ml) anlamlı derecede artmıştır (p<0.0001). Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂-DOX temelli nanotaşıyıcı ilacın daha fazla hücelere etki ederek *BAX* ekspresyonunu arttığı belirlendi.

7.11. NQO1:

NQO1, 16q22 gen üzerinde yerleştiği sitozolik bir flavoenzimdir. *NQO1* geni vücutta çeşitli dokularda eksprese edilir. *NQO1* gen ekspresyonu, hem normal durumda hem de oksidatif stres koşulları sırasında antioksidan yanıt elemanı (ARE) tarafından düzenlenmektedir. *NQO1* gen yapısı, promotör bölgesinde ARE içerir ve nükleer faktör eritroid kaynaklı benzeri 2 (Nrf2) tarafından düzenlenmektedir. *NQO1* geninin, diğer Nrf2 ile indüklenen detoksifiye edici enzim (glutatyon S-transferaz ve hem oksijenaz) ile bazı fizyolojik koşullar altında antioksidanlar, iyonlaştırıcı radyasyon, ksenobiyotikler, ısı şoku, hipoksi ve ağır metaller gibi aktive edildiği gösterilmiştir (406). *NQO1*, kinonların bir elektron indirgenmesinin yarıkinon serbest radikallerine ve diğer taraftan ROS'a girmesini önleyerek hücrelerin oksidatif streslerden korunmasında rol oynadığından antikanser enzimi olarak kabul edilir (407). Bu nedenle, *NQO1* ekspresyonunu indükleyen bileşiklerin kullanılması, kanserin önlenmesi için bir strateji olarak onaylanmıştır. Düşük veya eksik bir *NQO1* aktivitesi nedeniyle, insan kanserlerinin gelişimine yol açar. Kofaktör olan NADH veya NADPH kullanılarak iki elektronun aktarılmasının benzersiz özelliği nedeniyle, *NQO1* doğal ve eksojen kuinonları toksik bileşikleri olan hidrokinonlarına dönüştürmeye katalize eder. *NQO1* yapısal olarak önemli tümör baskılayıcı *p53*'e bağlanır ve proteazomal degradasyonu inhibe ederek protein stabilitesini artırır (344).

Yang Yang ve diğerleri tarafından yapılan çalışma, *NQO1* proteini, meme kanserinde esas olarak sitoplazmik bir boyama modeli gösterdi. *NQO1* proteini, meme kanserinde esas olarak sitoplazmik bir boyama modeli gösterdi. Meme kanserinde *NQO1* geni kuvvetli pozitif oranı 61.9'du ve DCIS (% 31.1), hiperplazi dokuları (% 13.6) ve bitişik tümör olmayan dokulardan (% 13.5) önemli ölçüde daha yüksek tesbit edildi. *NQO1* genin yüksek düzeyde ekspresyonu geç klinik evre, zayıf farklılaşma, lenf nodu metastazı ile bağlandı. Sonuç olarak, bu çalışma,

meme kanseri ilerlemesi ile yüksek seviyeli *NQO1* ekspresyonu ilişkilendirilmiştir. Meme kanserlerinin kötü prognostik değerlendirilmesi için *NQO1* yüksek ekspresyonu bir biyobelirteç olabilir (408).

Zhenling Li, ve ark. tarafından yapılan çalışma, *NQO1* proteini, adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom (SCC) dahil olmak üzere akciğer kanseri hücrelerinde esas olarak sitoplazmik bir boyama modeli gösterdi. *NQO1* ekspresyonu KHDAK hücrelerde anlamlı derecede yüksekti (% 59.3), halbuki sağlıklı akciğer dokularında (%0) oranı verdi. *NQO1*'in yüksek ekspresyonu, klinik evre ve lenf nodu metastazı ile ilişkiliyken, *NQO1* ekspresyonu kuvvetli şekilde yüksek kesilmesi, KHDAK'de tümör boyutu, zayıf farklılaşma, ileri klinik evre ve lenf nodu metastazı ile anlamlı derecede bağlandı (409).

Xuelian Cui, ve diğerleri tarafından yapılan çalışma, *NQO1* yüksek ekspresyonu, sınırda seröz tümörlerden (% 32.3) veya iyi huylu seröz tümörlerden (% 11.3) önemli ölçüde yüksek olan yumurtalık karsinomlarının % 63.8'inde gösterdi. Yumurta karsinomda, yüksek *NQO1* ekspresyonu, daha yüksek histolojik derece ve ileri klinik evre ile ilişkiliydi. Yumurtalık kanserinde, *NQO1* yüksek ekspresyonu seröz yumurtalık karsinomlu hastaların kötü prognostik değerlendirilmesi için etkili bir biyobelirteç olabilir (410).

Yaptığımız çalışmada uygulanan ilaçlarından, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplarla *NQO1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon en az grup 2 PEG-TiO₂ (IC₅₀= 70.37±1.378 µg/ml) ile arttığında, en fazla grup 3 ile DOX (IC₅₀= 4.883±0.196 µg/ml) anlamlı derecede arttığı gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında grup 2 olan PEG-TiO₂ dozunun DOX dozunun 15 katı olmasına rağmen, DOX temelli ilacın daha fazla hücrelere etki ederek *NQO1* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

7.12. ABCB1:

P-glikoproteini kodlayan *ABCB1* geni, 7q21 kromozomu üzerinde bulunur ve İnsan P-glikoproteini veya çoklu ilaç direnci 1 (MDR1) geni o da adlandırır. *ABCB1* çoğu insan ve kemirgen dokusunda düşük seviyelerde eksprese edilirken, yüksek ekspresyon seviyeleri epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunur. *ABCB1* geni, bir akıntı pompası olarak görev yapan ve bir dizi endojen maddeyi, ilacı ve ksenobiyotik hücrenin dışına taşıyan ATP bir transmembran taşıyıcı P-glikoproteini (Pgp) kodlar (411). *ABCB1*, ksenobiyotiklerin ve metabolitlerin bağırsak lümenine, hatta idrara çıkarmasından sorumludur, böylece emilim, toksisite ve

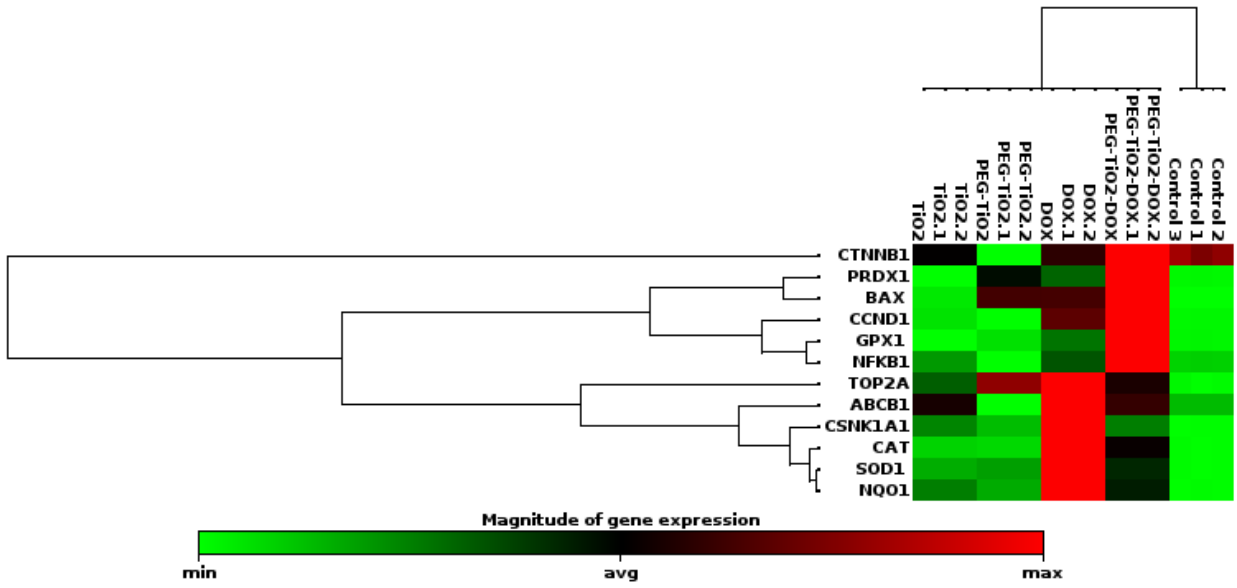
biyoyararlanımlarını azaltır ve böylece emilim, dağılım, metabolizma ve atılım büyük bir katkıda görev yapmaktadır. ABCB1 muhtemelen hem endojen moleküllerin ve metabolitlerin taşınmasında hem de adrenal bezden ve uterus epitelinden hormonların atılmasında önemli rol oynamaktadır (412). *ABCB1* gen ekspresyonu önemli ölçüde yükseldiğinde anti kanser ilaçları akışı ABCB1 taşıyıcı vasıtasıyla artar ve ABCB1 aracılı ilaca dirençli tümörlerde MDR'ye yol açar (413).

Hamdan S. Al-malky ve ark. tarafından yapılan çalışma, *ABCB1*, 0.25 ve 1 µg / ml DOX ile tedavisinden sonra MCF-7 hücrelerinde aşırı eksprese edildi ve muhtemelen ilaç direncine yol açtığı gösterdi. *ABCB1* mRNA'nın bu aşırı ekspresyonu, 20 µg / ml Dilteazim ilavesinden sonra azaldı, bu da Dilteazim ilavesinin ABCB1 / P-gp aracılı MDR'yi tersine çevirdiğini belirlendi. Bu alçak regülasyon, MCF-7 hücrelerini DOX tedavisine yeniden duyarlı hale getirdi ve *ABCB1* protein ekspresyonunun Dilteazim tedavisi ile düşürüldüğünü doğruladı ve muhtemelen DOX alımına ve sitotoksositeye yol açtı. Bu çalışma, DIL tedavisinin, GPx seviyesinde bir artış gösteren antioksidan özellikleri ile sıçanda DOX kaynaklı kardiyotoksositeyi önlediğini bulmuştur (414).

Yaptığımız çalışmada, uygulanan ilaçlarından ikinci grup etkisi ile *ABCB1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre azaldığı tesbit edildi. Birinci, üçüncü ve dördüncü grup ise *ABCB1* genin ekspresyonu kontrol grubuna göre arttığı tesbit edildi. Ekspresyon grup 2'de PEG-TiO₂ (IC₅₀= 70.37±1.378 µg/ml) anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. Diğer gruplar ise en az arttığı grup 1 TiO₂ (IC₅₀= 4.753±0.267 µg/ml). Grup 3 ise DOX (IC₅₀= 4.883±0.196 µg/ml) en fazla ekspresyonu anlamlı derecede arttığı gösterdi (p<0.0001).

Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında PEG-TiO₂ temelli nanotaşıyıcı ilacın hücrelere etki ederek *ABCB1* ekspresyonunu baskıladığı belirlendi. Öte yandan Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında DOX temelli ilacın en fazla hücrelere etki ederek *ABCB1* ekspresyonu arttırdığı belirlendi.

Sonuç olarak PEG-TiO₂-DOX tüm genlerin ekspresyonu arttırdığı tesbit edildi. DOX ilacı *CTNNB1* gen ekspresyonu azaltırken tüm diğer genlerin ekspresyonu arttığı saptandı. TiO₂ nanoparçacıklarının *GPX1*, *PRDX1* ve *CTNNB1* gene ekspresyonu azaltırken diğer tüm genlerin ekspresyonu arttığı belirlendi. PEG-TiO₂ nanoparçacıkları ise *CTNNB1*, *CCND1*, *NFκB* ve *ABCB1* genlerin ekspresyonu azaltırken, tüm diğer genlerin ekspresyonu arttığı tesbit edildi.



Şekil (65): *GPX1*, *SOD1*, *CAT*, *PRDX1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *NFKB1*, *TOP2A*, *BAX*, *NQO1* ve *ABCB1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

Sonuç olarak PEG-TiO₂-DOX nanoparçacık 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 bu molekül işaretlenerek hedefli hale getirilebilir ve bu şekilde tedavi etkinliği daha fazla artırılabilir.

8. KAYNAKLAR:

1. Meacham, C.E. and S.J. Morrison, *Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 328-337.
2. Wang, H., et al., *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. The lancet, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
3. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-724.
4. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. International journal of cancer, 2015. **136**(5): p. E359-E386.
5. Plummer, M., et al., *Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis*. The Lancet Global Health, 2016. **4**(9): p. e609-e616.
6. Singh, O.P. and R. Nehru, *Nanotechnology and cancer treatment*. Asian J Exp Sci, 2008. **22**(2): p. 6.
7. Wang, X., et al., *Advances of cancer therapy by nanotechnology*. Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association, 2009. **41**(1): p. 1.
8. Tewey, K., et al., *Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II*. Science, 1984. **226**(4673): p. 466-468.
9. Gewirtz, D., *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. Biochemical pharmacology, 1999. **57**(7): p. 727-741.
10. Roti, E.C.R., et al., *Acute doxorubicin insult in the mouse ovary is cell-and follicle-type dependent*. PloS one, 2012. **7**(8): p. e42293.
11. Kakde, D., et al., *Cancer therapeutics-opportunities, challenges and advances in drug delivery*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2011. **1**(9): p. 1-10.
12. Smith, L., et al., *Nanoparticles in cancer imaging and therapy*. Journal of Nanomaterials, 2012. **2012**.
13. Yin, Z.F., et al., *Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide*. Physical chemistry chemical physics, 2013. **15**(14): p. 4844-4858.
14. Gref, R., et al., *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1600-1603.
15. Sapio, L. and S. Naviglio, *Inorganic phosphate in the development and treatment of cancer: a Janus Bifrons?* World journal of clinical oncology, 2015. **6**(6): p. 198.
16. Drozd, E., et al., *Intracellular glutathione level and efflux in human melanoma and cervical cancer cells differing in doxorubicin resistance*. Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej, 2016. **70**.
17. 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.
18. Sudhakar, A., *History of cancer, ancient and modern treatment methods*. Journal of cancer science & therapy, 2009. **1**(2): p. 1.
19. Anand, P., et al., *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*. Pharmaceutical research, 2008. **25**(9): p. 2097-2116.
20. Weinstein, I.B. and A.K. Joe, *Mechanisms of disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy*. Nature clinical practice Oncology, 2006. **3**(8): p. 448-457.

21. Naghavi, M., et al., *Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. The Lancet, 2017. **390**(10100): p. 1151-1210.
22. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. International journal of cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-2917.
23. Fitzmaurice, C., et al., *The global burden of cancer 2013*. JAMA oncology, 2015. **1**(4): p. 505-527.
24. McGuire, S., *World cancer report 2014*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015. 2016, Oxford University Press.
25. 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.
26. Morounke, S.G., et al., *Epidemiology and incidence of common cancers in Nigeria*. Population, 2017. **84**(82,231,000): p. 166,629,000.
27. Kurumu, T.H.S., *Türkiye kanser istatistikleri*. 2015, Ankara.
28. Arbyn, M., et al., *Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis*. The Lancet Global Health, 2020. **8**(2): p. e191-e203.
29. INCA, Y., *Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva*. Available on: <http://www.inca.gov.br>. (Accessed March 26, 2016).
30. 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.
31. Sreedevi, A., R. Javed, and A. Dinesh, *Epidemiology of cervical cancer with special focus on India*. International journal of women's health, 2015. **7**: p. 405.
32. Harro, C.D., et al., *Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine*. Journal of the National Cancer Institute, 2001. **93**(4): p. 284-292.
33. Roden, R.B., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, *Papillomavirus is resistant to desiccation*. Journal of Infectious Diseases, 1997. **176**(4): p. 1076-1079.
34. Burd, E.M., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clinical microbiology reviews, 2003. **16**(1): p. 1-17.
35. Doorbar, J., et al., *The biology and life-cycle of human papillomaviruses*. Vaccine, 2012. **30**: p. F55-F70.
36. Adam, E., et al., *Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease*. American journal of obstetrics and gynecology, 2000. **182**(2): p. 257-264.
37. Yang, X., et al., *Malignant transformation of HPV 16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis*. International journal of cancer, 1996. **65**(3): p. 338-344.
38. Halim, T.A., A.A. Farooqi, and F. Zaman, *Nip the HPV encoded evil in the cancer bud: HPV reshapes TRAILS and signaling landscapes*. Cancer cell international, 2013. **13**(1): p. 1-18.
39. Bosch, F.X., *International biological study on cervical cancer study group; aprevalaence of human papillomavirus in cervical cancer: world wide perspective*. J Natle Cancer Inst, 1995. **87**: p. 796-802.

40. Ganguly, N. and S.P. Parihar, *Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis*. Journal of biosciences, 2009. **34**(1): p. 113-123.
41. Das, B.C., et al., *Prospects and prejudices of human papillomavirus vaccines in India*. Vaccine, 2008. **26**(22): p. 2669-2679.
42. Takeuchi, S., *Biology and treatment of cervical adenocarcinoma*. Chinese Journal of Cancer Research, 2016. **28**(2): p. 254.
43. Aref-Adib, M. and T. Freeman-Wang, *Cervical cancer prevention and screening: the role of human papillomavirus testing*. The Obstetrician & Gynaecologist, 2016. **18**(4): p. 251-263.
44. Bates, C.K., N. Carroll, and J. Potter, *The challenging pelvic examination*. Journal of general internal medicine, 2011. **26**(6): p. 651-657.
45. Kumar, N., *Cervical cancer; a nightmare for womanhood: review of recent advances*. Women's Health Gynaecol, 2016. **9**: p. 30-34.
46. Jeronimo, J., et al., *Secondary prevention of cervical cancer: ASCO resource-stratified clinical practice guideline*. Journal of global oncology, 2017. **3**(5): p. 635-657.
47. Mishra, G.A., S.A. Pimple, and S.S. Shastri, *An overview of prevention and early detection of cervical cancers*. Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology, 2011. **32**(3): p. 125.
48. DEMİREL, G. and Z. GÖLBAŞI, *Kadın Sağlığı Taramasında Güncel Durum*. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2015. **4**(4): p. 638-659.
49. Aydoğdu, S.G.M. and Ü. Özsoy, *Serviks kanseri ve HPV*. Androl Bul, 2018. **20**: p. 25-29.
50. YÜKSEL, K.B., et al., *Human Papilloma Virus HPV Enfeksiyonu ve HPV Aşısı Hakkında Bilgi Düzeyi ve Genel Eğilimler; Dumlupınar Üniversitesi-Evliya Çelebi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi'ndeki Doktor, Hemşire ve Sağlık Personellerini İçeren Anket Taraması*. Jinekoloji Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi, 2015. **12**(2): p. 64-67.
51. Sasieni, P., A. Castanon, and J. Cuzick, *Effectiveness of cervical screening with age: population based case-control study of prospectively recorded data*. Bmj, 2009. **339**.
52. Chrysostomou, A.C., et al., *Cervical cancer screening programs in Europe: the transition towards HPV vaccination and population-based HPV testing*. Viruses, 2018. **10**(12): p. 729.
53. Safaeian, M., D. Solomon, and P.E. Castle, *Cervical cancer prevention—cervical screening: science in evolution*. Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2007. **34**(4): p. 739-760.
54. Demirgöz Bal, M., *Kadınların pap smear testi yaptırma durumlarının sağlık inanç modeli ölçeği ile değerlendirilmesi*. 2014.
55. Meme, B.E.H.Ç.H., *Serviks Kanserlerinin Erken Tanısındaki Bilgi ve Uygulamaları*. TAF Preventive Medicine Bulletin, 2010. **9**(6): p. 605-612.
56. Kög, İ., et al., *Etlik KETEM Grubunun Serviks ve Meme Kanseri Tarama Programı Sonuçları*. TAF Preventive Medicine Bulletin, 2012. **11**(2).
57. Sönmez, Y., et al., *ŞBir sağlık ocağı bölgesi'nde 20 yaş ve üzeri kadınların meme ve serviks kanseri erken tanısına ilişkin davranışları*. Medical Journal of Suleyman Demirel University, 2012. **19**(4).
58. Sopracordevole, F., et al., *Abnormal pap smear and diagnosis of high-grade vaginal intraepithelial neoplasia: a retrospective cohort study*. Medicine, 2015. **94**(42).
59. Meijer, C.J., et al., *Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older*. International journal of cancer, 2009. **124**(3): p. 516-520.

60. Coutlée, F., et al., *The laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections*. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2005. **16**.
61. Saslow, D., et al., *American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer*. American journal of clinical pathology, 2012. **137**(4): p. 516-542.
62. Gökgöz, N. and D. Aktaş, *KADINLARIN SERVİKS KANSERİ VE PAP SMEAR TESTİ YAPTIRMA DURUMLARINA YÖNELİK FARKINDALIK DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ*. YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ HEMŞİRELİK E-DERGİSİ, 2016. **3**(2).
63. Finocchiaro-Kessler, S., et al., *Cervical cancer prevention and treatment research in Africa: a systematic review from a public health perspective*. BMC women's health, 2016. **16**(1): p. 29.
64. Lew, J.-B., et al., *Primary HPV testing versus cytology-based cervical screening in women in Australia vaccinated for HPV and unvaccinated: effectiveness and economic assessment for the National Cervical Screening Program*. The Lancet Public Health, 2017. **2**(2): p. e96-e107.
65. Buck, C.B., P.M. Day, and B.L. Trus, *The papillomavirus major capsid protein L1*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 169-174.
66. Dillner, J., et al., *Monitoring of human papillomavirus vaccination*. Clinical & Experimental Immunology, 2011. **163**(1): p. 17-25.
67. Parvanian, S., S.M. Mostafavi, and M. Aghashiri, *Multifunctional nanoparticle developments in cancer diagnosis and treatment*. Sensing and Bio-Sensing Research, 2017. **13**: p. 81-87.
68. Hein, A.L., M.M. Ouellette, and Y. Yan, *Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival*. International journal of oncology, 2014. **45**(5): p. 1813-1819.
69. Liu, H., L. Lv, and K. Yang, *Chemotherapy targeting cancer stem cells*. American journal of cancer research, 2015. **5**(3): p. 880.
70. Bu, H., et al., *A TPGS-incorporating nanoemulsion of paclitaxel circumvents drug resistance in breast cancer*. International journal of pharmaceutics, 2014. **471**(1-2): p. 206-213.
71. Abubaker, K., et al., *Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden*. Molecular cancer, 2013. **12**(1): p. 1-15.
72. Mousa, S.A. and D.J. Bharali, *Nanotechnology-based detection and targeted therapy in cancer: nano-bio paradigms and applications*. Cancers, 2011. **3**(3): p. 2888-2903.
73. Płonka, P.M., *Hair pigmentation disorders or 50 years of German-Polish alliance for study on a severe side effect of chemotherapy: Kostanecki's legacy*. Exp Dermatol, 2015. **24**(1): p. 10-1.
74. Hou, J., et al., *Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms*. Journal of environmental sciences, 2019. **75**: p. 40-53.
75. Hasan, S., *A review on nanoparticles: their synthesis and types*. Res. J. Recent Sci, 2015. **2277**: p. 2502.
76. Skandalis, S.S., et al., *Advances and advantages of nanomedicine in the pharmacological targeting of hyaluronan-CD44 interactions and signaling in cancer*, in *Advances in cancer research*. 2014, Elsevier. p. 277-317.
77. Kumar Khanna, V., *Targeted delivery of nanomedicines*. ISRN pharmacology, 2012. **2012**.
78. Dreaden, E.C., et al., *Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery*. Therapeutic delivery, 2012. **3**(4): p. 457-478.
79. Cai, X.-J. and Y.-Y. Xu, *Nanomaterials in controlled drug release*. Cytotechnology, 2011. **63**(4): p. 319-323.

80. Kumar, A., et al., *Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation*. *Nanoscale*, 2013. **5**(18): p. 8307-8325.
81. Sebastian, R., *Nanomedicine-the future of cancer treatment: A review*. *J. Cancer Prev. Curr. Res*, 2017. **8**(1): p. 00-265.
82. Li, Z., et al., *Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives*. *Oncology reports*, 2017. **38**(2): p. 611-624.
83. Felice, B., et al., *Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective*. *Materials Science and Engineering: C*, 2014. **41**: p. 178-195.
84. Vinardell, M.P. and M. Mitjans, *Antitumor activities of metal oxide nanoparticles*. *Nanomaterials*, 2015. **5**(2): p. 1004-1021.
85. Mroz, P., et al., *Photodynamic therapy with fullerenes*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2007. **6**(11): p. 1139-1149.
86. Chatterjee, D.K., L.S. Fong, and Y. Zhang, *Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm*. *Advanced drug delivery reviews*, 2008. **60**(15): p. 1627-1637.
87. Juzenas, P., et al., *Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer*. *Advanced drug delivery reviews*, 2008. **60**(15): p. 1600-1614.
88. Caputo, F., M. De Nicola, and L. Ghibelli, *Pharmacological potential of bioactive engineered nanomaterials*. *Biochemical pharmacology*, 2014. **92**(1): p. 112-130.
89. Danhier, F., O. Feron, and V. Préat, *To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. *Journal of controlled release*, 2010. **148**(2): p. 135-146.
90. Bregoli, L., et al., *Nanomedicine applied to translational oncology: a future perspective on cancer treatment*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016. **12**(1): p. 81-103.
91. Yoo, J., et al., *Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems*. *Cancers*, 2019. **11**(5): p. 640.
92. Yoo, H.S. and T.G. Park, *Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer*. *Journal of controlled Release*, 2001. **70**(1-2): p. 63-70.
93. Tiwari, D.K., J. Behari, and P. Sen, *Application of nanoparticles in waste water treatment 1*. 2008.
94. ud Din, F., et al., *Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors*. *International journal of nanomedicine*, 2017. **12**: p. 7291.
95. Zeb, A., et al., *High payload itraconazole-incorporated lipid nanoparticles with modulated release property for oral and parenteral administration*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017. **69**(8): p. 955-966.
96. Mehnert, W. and K. Mäder, *Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**: p. 83-101.
97. Mauro, C., dos Santos, Marlon C. Maynard, Luci R. Aveiro, Edson C. da Paz and Victor dos Santos Pinheiro, *Carbon-Based Materials: Recent Advances, Challenges, and Perspectives*. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, Elsevier, 2017.
98. Ismar, E. and A.S. Sarac, *Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes, Graphene, and Carbon Nanofibers*, in *Nanotechnology in Aerospace and Structural Mechanics*. 2019, IGI Global. p. 1-33.
99. Salavati-Niasari, M., F. Davar, and N. Mir, *Synthesis and characterization of metallic copper nanoparticles via thermal decomposition*. *Polyhedron*, 2008. **27**(17): p. 3514-3518.

100. Tai, C.Y., et al., *Synthesis of magnesium hydroxide and oxide nanoparticles using a spinning disk reactor*. Industrial & engineering chemistry research, 2007. **46**(17): p. 5536-5541.
101. Wu, J., et al., *Graphene oxide used as a carrier for adriamycin can reverse drug resistance in breast cancer cells*. Nanotechnology, 2012. **23**(35): p. 355101.
102. Bogdan, J., J. Pławińska-Czarnak, and J. Zarzyńska, *Nanoparticles of titanium and zinc oxides as novel agents in tumor treatment: a review*. Nanoscale research letters, 2017. **12**(1): p. 1-15.
103. Shi, H., et al., *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data*. Particle and fibre toxicology, 2013. **10**(1): p. 15.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. Du, Y., et al., *The enhanced chemotherapeutic effects of doxorubicin loaded PEG coated TiO₂ nanocarriers in an orthotopic breast tumor bearing mouse model*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(8): p. 1518-1528.
108. Thevenot, P., et al., *Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2008. **4**(3): p. 226-236.
109. Cui, S., et al., *In vivo targeted deep-tissue photodynamic therapy based on near-infrared light triggered upconversion nanoconstruct*. ACS nano, 2013. **7**(1): p. 676-688.
110. van Vlerken, L.E., T.K. Vyas, and M.M. Amiji, *Poly (ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery*. Pharmaceutical research, 2007. **24**(8): p. 1405-1414.
111. Monfardini, C., et al., *A branched monomethoxypoly (ethylene glycol) for protein modification*. Bioconjugate chemistry, 1995. **6**(1): p. 62-69.
112. Gref, R., et al., *The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres*. Advanced drug delivery reviews, 2012. **64**: p. 316-326.
113. Moghimi, S.M., et al., *An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1993. **1157**(2): p. 233-240.
114. Suk, J.S., et al., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **99**: p. 28-51.
115. Kwon, G.S., *Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds*. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2003. **20**(5).
116. Yang, X., et al., *High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(45): p. 17554-17558.
117. Dive, C. and J. Hickman, *Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death?* British journal of cancer, 1991. **64**(1): p. 192-196.
118. W Edwardson, D., et al., *Role of drug metabolism in the cytotoxicity and clinical efficacy of anthracyclines*. Current drug metabolism, 2015. **16**(6): p. 412-426.
119. Hilmer, S.N., et al., *The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin*. Drug metabolism and disposition, 2004. **32**(8): p. 794-799.

120. Cai, S., et al., *Cellular uptake and internalization of hyaluronan-based doxorubicin and cisplatin conjugates*. Journal of drug targeting, 2014. **22**(7): p. 648-657.
121. Rook, M., et al., *Individual differences in renal ACE activity in healthy rats predict susceptibility to adriamycin-induced renal damage*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2005. **20**(1): p. 59-64.
122. Chabner, B.A. and D.L. Longo, *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
123. Cortes-Funes, H. and C. Coronado, *Role of anthracyclines in the era of targeted therapy*. Cardiovascular toxicology, 2007. **7**(2): p. 56-60.
124. Rose, P.G., et al., *Evaluation of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) as second-line chemotherapy of squamous cell carcinoma of the cervix: a phase II study of the Gynecologic Oncology Group*. Gynecologic oncology, 2006. **102**(2): p. 210-213.
125. Rivankar, S., *An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy*. Journal of cancer research and therapeutics, 2014. **10**(4): p. 853.
126. Reinert, K., *Anthracycline-binding induced Dna stiffening, bending and elongation; stereochemical implications from viscometric investigations*. Nucleic acids research, 1983. **11**(10): p. 3411-3430.
127. Doroshow, J.H., *Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986. **83**(12): p. 4514-4518.
128. Pawłowska, J., et al., *Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase*. Oncology research featuring preclinical and clinical cancer therapeutics, 2003. **13**(5): p. 245-252.
129. Fogli, S., P. Nieri, and M. CRISTINA BRESCHI, *The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage*. The FASEB Journal, 2004. **18**(6): p. 664-675.
130. Carvalho, C., et al., *Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect*. Current medicinal chemistry, 2009. **16**(25): p. 3267-3285.
131. Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer, *Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2003. **97**(11): p. 2869-2879.
132. Minotti, G., et al., *Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms*, in *Methods in enzymology*. 2004, Elsevier. p. 340-361.
133. Wallace, K.B., *Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis*. Cardiovascular toxicology, 2007. **7**(2): p. 101-107.
134. Scatena, R., P. Bottoni, and B. Giardina, *Advances in mitochondrial medicine*. Vol. 942. 2012: Springer Science & Business Media.
135. Menna, P., et al., *Anthracycline cardiotoxicity*. Expert opinion on drug safety, 2012. **11**(sup1): p. S21-S36.
136. Luo, X., et al., *Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1997. **1360**(1): p. 45-52.
137. Šimůnek, T., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. Pharmacological reports, 2009. **61**(1): p. 154-171.

138. Licata, S., et al., *Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction*. Chemical research in toxicology, 2000. **13**(5): p. 414-420.
139. Mordente, A., et al., *Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications*. Biochemical pharmacology, 2003. **66**(6): p. 989-998.
140. Dessypris, E.N., et al., *Uptake and intracellular distribution of doxorubicin metabolites in B-lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia*. Cancer research, 1988. **48**(3): p. 503-506.
141. Sokolove, P.M., *Interactions of adriamycin aglycones with mitochondria may mediate adriamycin cardiotoxicity*. International journal of biochemistry, 1994. **26**(12): p. 1341-1350.
142. Conklin, K.A., *Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness*. Integrative cancer therapies, 2004. **3**(4): p. 294-300.
143. Mross, K., et al., *Pharmacokinetics and metabolism of iodo-doxorubicin and doxorubicin in humans*. European journal of clinical pharmacology, 1990. **39**(5): p. 507-513.
144. Kaye, S. and S. Merry, *Tumour cell resistance to anthracyclines—a review*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 1985. **14**(2): p. 96-103.
145. Germann, U., *P-glycoprotein—a mediator of multidrug resistance in tumour cells*. European Journal of Cancer, 1996. **32**(6): p. 927-944.
146. Germann, U.A., et al., *Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporin A, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP*. Anti-cancer drugs, 1997. **8**(2): p. 141-155.
147. Qadir, M., et al., *Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(6): p. 2320-2326.
148. Folmer, Y., et al., *Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-ABCC2 antisense constructs*. Cancer gene therapy, 2007. **14**(11): p. 875-884.
149. Vatsyayan, R., et al., *Role of RLIP76 in doxorubicin resistance in lung cancer*. International journal of oncology, 2009. **34**(6): p. 1505-1511.
150. Kruk, J. and H. Y Aboul-Enein, *Reactive oxygen and nitrogen species in carcinogenesis: implications of oxidative stress on the progression and development of several cancer types*. Mini reviews in medicinal chemistry, 2017. **17**(11): p. 904-919.
151. Gill, J.G., E. Piskounova, and S.J. Morrison. *Cancer, oxidative stress, and metastasis*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
152. Tafani, M., et al., *The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016. **2016**.
153. Calaf, G.M., et al., *Oxidative stress in female cancers*. Oncotarget, 2018. **9**(34): p. 23824.
154. Waris, G. and H. Ahsan, *Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions*. Journal of carcinogenesis, 2006. **5**: p. 14.
155. Leone, A., et al., *Vorinostat synergizes with EGFR inhibitors in NSCLC cells by increasing ROS via up-regulation of the major mitochondrial porin VDAC1 and modulation of the c-Myc-NRF2-KEAP1 pathway*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **89**: p. 287-299.
156. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. Nature reviews Drug discovery, 2013. **12**(12): p. 931-947.

157. Mills, G.C., *Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown.* Journal of Biological Chemistry, 1957. **229**(1): p. 189-197.
158. Kryukov, G.V., et al., *Characterization of mammalian selenoproteomes.* Science, 2003. **300**(5624): p. 1439-1443.
159. Arthur, J., *The glutathione peroxidases.* Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2001. **57**(13-14): p. 1825-1835.
160. Mullenbach, G.T., et al., *Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathione peroxidases.* Protein Engineering, Design and Selection, 1988. **2**(3): p. 239-246.
161. Reeves, M. and P. Hoffmann, *The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(15): p. 2457-2478.
162. Ursini, F., M. Maiorino, and C. Gregolin, *The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1985. **839**(1): p. 62-70.
163. Cheng, W.H., et al., *Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein.* The FASEB journal, 1999. **13**(11): p. 1467-1475.
164. Sies, H., et al., *Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations a new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(44): p. 27812-27817.
165. Takakura, K., et al., *Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite.* Archives of biochemistry and biophysics, 1999. **369**(2): p. 197-207.
166. Emerling, B.M., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling.* Molecular and cellular biology, 2005. **25**(12): p. 4853-4862.
167. Baliga, M.S., et al., *Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage.* Biological trace element research, 2007. **115**(3): p. 227-241.
168. Kulak, M.V., et al., *Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer.* Oncogene, 2013. **32**(34): p. 4043-4051.
169. Min, S.Y., et al., *Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 (GPX1) down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer.* Anticancer research, 2012. **32**(8): p. 3169-3175.
170. Gladyshev, V.N., et al., *Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells.* Biochemical and biophysical research communications, 1998. **251**(2): p. 488-493.
171. Sturtz, L.A., et al., *A fraction of yeast cu, zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, ccs, localize to the intermembrane space of mitochondria a physiological role for sod1 in guarding against mitochondrial oxidative damage.* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(41): p. 38084-38089.
172. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein).* Journal of Biological chemistry, 1969. **244**(22): p. 6049-6055.
173. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan, *Hydrogen peroxide sensing and signaling.* Molecular cell, 2007. **26**(1): p. 1-14.
174. Glasauer, A., et al., *Targeting SOD1 reduces experimental non-small-cell lung cancer.* The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(1): p. 117-128.

175. Li, X., et al., *The specific inhibition of SOD1 selectively promotes apoptosis of cancer cells via regulation of the ROS signaling network*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**.
176. Reddi, A.R. and V.C. Culotta, *SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration*. *Cell*, 2013. **152**(1-2): p. 224-235.
177. Hu, S., et al., *Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling*. *Cell*, 2009. **139**(3): p. 610-622.
178. Li, X., et al., *A new function of copper zinc superoxide dismutase: as a regulatory DNA-binding protein in gene expression in response to intracellular hydrogen peroxide*. *Nucleic acids research*, 2019. **47**(10): p. 5074-5085.
179. Papa, L., G. Manfredi, and D. Germain, *SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy*. *Genes & cancer*, 2014. **5**(1-2): p. 15.
180. Kruman, I.I., et al., *ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis*. *Experimental neurology*, 1999. **160**(1): p. 28-39.
181. Somwar, R., et al., *Superoxide dismutase 1 (SOD1) is a target for a small molecule identified in a screen for inhibitors of the growth of lung adenocarcinoma cell lines*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(39): p. 16375-16380.
182. Papa, L., et al., *SOD2 to SOD1 switch in breast cancer*. *Journal of biological chemistry*, 2014. **289**(9): p. 5412-5416.
183. Rhee, S.G., et al., *Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases*. *IUBMB life*, 2001. **52**(1): p. 35-41.
184. Hirotsu, S., et al., *Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(22): p. 12333-12338.
185. Jang, H.H., et al., *Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function*. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 625-635.
186. Moon, J.C., et al., *Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(31): p. 28775-28784.
187. Mu, Z.M., X.Y. Yin, and E.V. Prochownik, *Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(45): p. 43175-43184.
188. Wen, S.-T. and R.A. Van Etten, *The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity*. *Genes & development*, 1997. **11**(19): p. 2456-2467.
189. Neumann, C.A., J. Cao, and Y. Manevich, *Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling*. *Cell cycle*, 2009. **8**(24): p. 4072-4078.
190. Kim, S.Y., T.J. Kim, and K.-Y. Lee, *A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway*. *FEBS letters*, 2008. **582**(13): p. 1913-1918.
191. Gertz, M., et al., *Identification of Peroxiredoxin 1 as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p66Shc*. *Aging*, 2009. **1**(2): p. 254.
192. Chhipa, R.R., et al., *Prx1 enhances androgen receptor function in prostate cancer cells by increasing receptor affinity to dihydrotestosterone*. *Molecular Cancer Research*, 2009. **7**(9): p. 1543-1552.

193. Hansen, J.M., S. Moriarty-Craige, and D.P. Jones, *Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-I differentially regulate NF- κ B activities*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. **43**(2): p. 282-288.
194. Morinaka, A., et al., *Oligomeric peroxiredoxin-I is an essential intermediate for p53 to activate MST1 kinase and apoptosis*. Oncogene, 2011. **30**(40): p. 4208-4218.
195. Xiao, L., et al., *The c-Abl-MST1 signaling pathway mediates oxidative stress-induced neuronal cell death*. Journal of Neuroscience, 2011. **31**(26): p. 9611-9619.
196. Murakami, K., et al., *VCP Is an integral component of a novel feedback mechanism that controls intracellular localization of catalase and H₂O₂ levels*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56012.
197. Glorieux, C. and P.B. Calderon, *Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach*. Biological chemistry, 2017. **398**(10): p. 1095-1108.
198. Zámocký, M., P.G. Furtmüller, and C. Obinger, *Evolution of structure and function of Class I peroxidases*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. **500**(1): p. 45-57.
199. Deisseroth, A. and A.L. Dounce, *Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role*. Physiological reviews, 1970. **50**(3): p. 319-375.
200. Ivancich, A., et al., *EPR investigation of compound I in Proteus mirabilis and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates*. Biochemistry, 1997. **36**(31): p. 9356-9364.
201. Sies, H., *Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress*. Redox biology, 2017. **11**: p. 613-619.
202. Glorieux, C., et al., *Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **87**: p. 84-97.
203. Kalinina, E., et al., *Changes in expression of genes encoding antioxidant enzymes, heme oxygenase-1, Bcl-2, and Bcl-xl and in level of reactive oxygen species in tumor cells resistant to doxorubicin*. Biochemistry (moscow), 2006. **71**(11): p. 1200-1206.
204. Riethmüller, M., N. Burger, and G. Bauer, *Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling*. Redox biology, 2015. **6**: p. 157-168.
205. Akca, H., et al., *Tumour suppressor PTEN enhanced enzyme activity of GPx, SOD and catalase by suppression of PI3K/AKT pathway in non-small cell lung cancer cell lines*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2013. **28**(3): p. 539-544.
206. LoPiccolo, J., et al., *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations*. Drug Resistance Updates, 2008. **11**(1-2): p. 32-50.
207. Glorieux, C., et al., *Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy*. Biochemical pharmacology, 2011. **82**(10): p. 1384-1390.
208. Nusse, R., *Wnt signaling in disease and in development*. Cell research, 2005. **15**(1): p. 28-32.
209. Willert, K. and R. Nusse, *β -catenin: a key mediator of Wnt signaling*. Current opinion in genetics & development, 1998. **8**(1): p. 95-102.
210. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*. Cell, 1982. **31**(1): p. 99-109.
211. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. Genes & development, 1997. **11**(24): p. 3286-3305.

212. Kühl, M., et al., *The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. Trends in genetics, 2000. **16**(7): p. 279-283.
213. Habas, R. and I.B. Dawid, *Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?* Journal of biology, 2005. **4**(1): p. 1-4.
214. He, X., et al., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. **131**(8): p. 1663-1677.
215. Wallingford, J.B. and R. Habas, *The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity*. Development, 2005. **132**(20): p. 4421-4436.
216. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. Organogenesis, 2008. **4**(2): p. 68-75.
217. Moon, R.T., et al., *The promise and perils of Wnt signaling through β -catenin*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1644-1646.
218. Mlodzik, M., *Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation?* TRENDS in Genetics, 2002. **18**(11): p. 564-571.
219. Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros, *Wnt signaling in cancer*. Oncogene, 2017. **36**(11): p. 1461-1473.
220. Tapia, C., et al., *Cloning and chromosomal localization of the gene coding for human protein kinase CKI*. FEBS letters, 1994. **349**(2): p. 307-312.
221. Knippschild, U., et al., *The casein kinase I family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes*. Cellular signalling, 2005. **17**(6): p. 675-689.
222. Price, M.A., *CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling*. Genes & development, 2006. **20**(4): p. 399-410.
223. Brockman, J.L., et al., *Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(20): p. 9454-9458.
224. Gross, S.D., et al., *A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte*. Journal of Cell Science, 1997. **110**(24): p. 3083-3090.
225. Desagher, S., et al., *Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8*. Molecular cell, 2001. **8**(3): p. 601-611.
226. Izeradjene, K., et al., *Casein kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex*. Cancer Research, 2004. **64**(21): p. 8036-8044.
227. Zhao, Y., et al., *Casein kinase I α interacts with retinoid X receptor and interferes with agonist-induced apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(29): p. 30844-30849.
228. Sinnberg, T., et al., *Suppression of casein kinase I α in melanoma cells induces a switch in β -catenin signaling to promote metastasis*. Cancer research, 2010. **70**(17): p. 6999-7009.
229. Magliozzi, R., et al., *Control of epithelial cell migration and invasion by the IKK β -and CKI α -mediated degradation of RAPGEF2*. Developmental cell, 2013. **27**(5): p. 574-585.
230. Knippschild, U., et al., *The role of the casein kinase I (CKI) family in different signaling pathways linked to cancer development*. Oncology Research and Treatment, 2005. **28**(10): p. 508-514.
231. Sturgeon, C.M., et al., *Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells*. Nature biotechnology, 2014. **32**(6): p. 554-561.

232. Phelps, R.A., et al., *A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss*. Cell, 2009. **137**(4): p. 623-634.
233. Benham-Pyle, B.W., B.L. Pruitt, and W.J. Nelson, *Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β -catenin activation to drive cell cycle entry*. Science, 2015. **348**(6238): p. 1024-1027.
234. Major, M.B., et al., *Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/ β -catenin signaling*. science, 2007. **316**(5827): p. 1043-1046.
235. Wu, X., et al., *Rac1 activation controls nuclear localization of β -catenin during canonical Wnt signaling*. Cell, 2008. **133**(2): p. 340-353.
236. Caspi, M., et al., *Nuclear GSK-3 β inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a β -catenin phosphorylation-independent manner*. Oncogene, 2008. **27**(25): p. 3546-3555.
237. Liu, J., et al., *The third 20 amino acid repeat is the tightest binding site of APC for β -catenin*. Journal of molecular biology, 2006. **360**(1): p. 133-144.
238. Zeng, X., et al., *A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 873-877.
239. Lin, T.-C., et al., *The nucleolar protein NIFK promotes cancer progression via CK1 α / β -catenin in metastasis and Ki-67-dependent cell proliferation*. Elife, 2016. **5**: p. e11288.
240. Wu, S., et al., *Casein kinase 1 α regulates an MDMX intramolecular interaction to stimulate p53 binding*. Molecular and cellular biology, 2012. **32**(23): p. 4821-4832.
241. Sarasqueta, A.F., et al., *Integral analysis of p53 and its value as prognostic factor in sporadic colon cancer*. BMC cancer, 2013. **13**(1): p. 277.
242. Katlinskaya, Y.V., et al., *Type I interferons control proliferation and function of the intestinal epithelium*. Molecular and cellular biology, 2016. **36**(7): p. 1124-1135.
243. Cheong, J.K., et al., *Casein kinase 1 α -dependent feedback loop controls autophagy in RAS-driven cancers*. The Journal of clinical investigation, 2015. **125**(4): p. 1401-1418.
244. Li, L., et al., *GLIPR1 suppresses prostate cancer development through targeted oncoprotein destruction*. Cancer research, 2011. **71**(24): p. 7694-7704.
245. Zhang, P., et al., *MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1 α and enhances β -catenin signaling*. Cancer research, 2012. **72**(7): p. 1751-1762.
246. Prasad, R. and S.K. Katiyar, *Ultraviolet radiation-induced inflammation activates β -catenin signaling in mouse skin and skin tumors*. International journal of oncology, 2014. **44**(4): p. 1199-1206.
247. Li, X., J. Liu, and T. Gao, *β -TrCP-mediated ubiquitination and degradation of PHLPP1 are negatively regulated by Akt*. Molecular and cellular biology, 2009. **29**(23): p. 6192-6205.
248. Sun, D., et al., *Differential expression patterns of capping protein, protein phosphatase 1 and casein kinase 1 may serve as diagnostic markers for malignant melanoma*. Melanoma research, 2011. **21**(4): p. 335.
249. Sinnberg, T., et al., *Casein kinase 1 α has a non-redundant and dominant role within the CKI family in melanoma progression*. BMC cancer, 2016. **16**(1): p. 1-15.
250. Manni, S., et al., *Inactivation of CK1 α in multiple myeloma empowers drug cytotoxicity by affecting AKT and β -catenin survival signaling pathways*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 14604.
251. Bowman, B.M., et al., *Phosphorylation of FADD by the kinase CK1 α promotes KRASG12D-induced lung cancer*. Science signaling, 2015. **8**(361): p. ra9-ra9.
252. Xing, Y., et al., *Crystal structure of a full-length β -catenin*. Structure, 2008. **16**(3): p. 478-487.

253. Städeli, R., R. Hoffmans, and K. Basler, *Transcription under the control of nuclear Arm/ β -catenin*. Current Biology, 2006. **16**(10): p. R378-R385.
254. Xia, J., et al., *beta-Catenin mutation and its nuclear localization are confirmed to be frequent causes of Wnt signaling pathway activation in pilomatricomas*. Journal of dermatological science, 2006. **41**(1): p. 67-75.
255. Baum, B. and M. Georgiou, *Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling*. Journal of Cell Biology, 2011. **192**(6): p. 907-917.
256. Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, and A. Ben-Ze'ev, *The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(8): p. 987-991.
257. Howng, S.-L., et al., *Differential expression of Wnt genes, β -catenin and E-cadherin in human brain tumors*. Cancer letters, 2002. **183**(1): p. 95-101.
258. Daniels, D.L., K.E. Spink, and W.I. Weis, *β -catenin: molecular plasticity and drug design*. Trends in biochemical sciences, 2001. **26**(11): p. 672-678.
259. Beyer, C., et al., *β -catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis*. Annals of the rheumatic diseases, 2012. **71**(5): p. 761-767.
260. Kikuchi, A., H. Yamamoto, and A. Sato, *Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways*. Trends in cell biology, 2009. **19**(3): p. 119-129.
261. Machin, P., et al., *CTNNB1 mutations and β -catenin expression in endometrial carcinomas*. Human pathology, 2002. **33**(2): p. 206-212.
262. Lax, S.F., *Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification*. Virchows Archiv, 2004. **444**(3): p. 213-223.
263. Rubinfeld, B., et al., *Association of the APC gene product with beta-catenin*. Science, 1993. **262**(5140): p. 1731-1734.
264. Wang, Z., B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, *Phosphorylation of β -catenin at S33, S37, or T41 can occur in the absence of phosphorylation at T45 in colon cancer cells*. Cancer research, 2003. **63**(17): p. 5234-5235.
265. Su, T.-H., et al., *Mutation analysis of CTNNB1 (β -catenin) and AXIN1, the components of Wnt pathway, in cervical carcinomas*. Oncology reports, 2003. **10**(5): p. 1195-1200.
266. Udatsu, Y., et al., *High frequency of β -catenin mutations in hepatoblastoma*. Pediatric surgery international, 2001. **17**(7): p. 508-512.
267. Koch, A., et al., *Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors*. International journal of cancer, 2001. **93**(3): p. 445-449.
268. Lee, C.-I., et al., *CTNNB1 (β -catenin) mutation is rare in brain tumours but involved as a sporadic event in a brain metastasis*. Acta neurochirurgica, 2009. **151**(9): p. 1107-1111.
269. Barker, N., P.J. Morin, and H. Clevers, *The Yin-Yang of TCF/ β -catenin signaling*, in *Advances in cancer research*. 1999, Elsevier. p. 1-24.
270. Fukuchi, T., et al., *β -Catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium*. Cancer research, 1998. **58**(16): p. 3526-3528.
271. Byron, S.A., et al., *FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features*. PloS one, 2012. **7**(2): p. e30801.
272. Saegusa, M. and I. Okayasu, *Frequent nuclear β -catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation*. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 2001. **194**(1): p. 59-67.

273. Zeller, J., et al., *Investigation of 3-aryl-pyrimido [5, 4-e][1, 2, 4] triazine-5, 7-diones as small molecule antagonists of β -catenin/TCF transcription*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2013. **23**(21): p. 5814-5820.
274. Zhu, X., et al., *Roles of cell cycle regulators cyclin D1, CDK4, and p53 in knee osteoarthritis*. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2016. **20**(9): p. 529-534.
275. Qie, S. and J.A. Diehl, *Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment*. Journal of Molecular Medicine, 2016. **94**(12): p. 1313-1326.
276. Chen, Y.-Y., et al., *Cyclin D1 regulates osteoarthritis chondrocyte apoptosis via WNT3/ β -catenin signalling*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2019. **47**(1): p. 1971-1977.
277. Tetsu, O. and F. McCormick, *β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. Nature, 1999. **398**(6726): p. 422-426.
278. Coqueret, O., *Linking cyclins to transcriptional control*. Gene, 2002. **299**(1-2): p. 35-55.
279. Opitz, O.G. and A.K. Rustgi, *Interaction between Sp1 and cell cycle regulatory proteins is important in transactivation of a differentiation-related gene*. Cancer research, 2000. **60**(11): p. 2825-2830.
280. Inoue, K. and C.J. Sherr, *Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism*. Molecular and Cellular Biology, 1998. **18**(3): p. 1590-1600.
281. Wang, C., et al., *Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and transactivation*. Molecular and cellular biology, 2003. **23**(17): p. 6159-6173.
282. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nature reviews Molecular cell biology, 2001. **2**(10): p. 769-776.
283. Martinez, A., et al., *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation*. Medicinal research reviews, 2002. **22**(4): p. 373-384.
284. Liu, C., et al., *Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. **108**(6): p. 837-847.
285. Takahashi-Yanaga, F. and T. Sasaguri, *GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy*. Cellular signalling, 2008. **20**(4): p. 581-589.
286. Mathew, S., et al., *Chromosomal localization of genes encoding the transcription factors, c-rel, NF-kBp50, NF-cBp65, and I κ B ζ by fluorescence in situ*. Oncogene, 1993. **8**: p. 191-193.
287. Chung, G.T.Y., et al., *Constitutive activation of distinct NF- κ B signals in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma*. The Journal of pathology, 2013. **231**(3): p. 311-322.
288. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF- κ B signaling pathways*. Nature immunology, 2011. **12**(8): p. 695.
289. Lawrence, T., *The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2009. **1**(6): p. a001651.
290. Trinh, D.V., et al., *The nuclear I κ B protein I κ B ζ specifically binds NF- κ B p50 homodimers and forms a ternary complex on κ B DNA*. Journal of molecular biology, 2008. **379**(1): p. 122-135.
291. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annual review of immunology, 1998. **16**(1): p. 225-260.
292. Bharti, A.C. and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy*. Biochemical pharmacology, 2002. **64**(5-6): p. 883-888.

293. Kravtsova-Ivantsiv, Y., et al., *KPC1-mediated ubiquitination and proteasomal processing of NF- κ B1 p105 to p50 restricts tumor growth*. Cell, 2015. **161**(2): p. 333-347.
294. Concetti, J. and C.L. Wilson, *NFKB1 and cancer: friend or foe?* Cells, 2018. **7**(9): p. 133.
295. Collins, P.E., et al., *Mapping the interaction of B cell leukemia 3 (BCL-3) and nuclear factor κ B (NF- κ B) p50 identifies a BCL-3-mimetic anti-inflammatory peptide*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(25): p. 15687-15696.
296. DiDonato, J.A., F. Mercurio, and M. Karin, *NF- κ B and the link between inflammation and cancer*. Immunological reviews, 2012. **246**(1): p. 379-400.
297. Wilson, C., et al., *NF κ B1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma*. Nature communications, 2015. **6**(1): p. 1-15.
298. Voce, D.J., et al., *Nfkb1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor*. Oncogene, 2015. **34**(21): p. 2807-2813.
299. Southern, S.L., et al., *BAG-1 interacts with the p50-p50 homodimeric NF- κ B complex: implications for colorectal carcinogenesis*. Oncogene, 2012. **31**(22): p. 2761-2772.
300. Erriquez, J., et al., *TOP2A gene copy gain predicts response of epithelial ovarian cancers to pegylated liposomal doxorubicin: TOP2A as marker of response to PLD in ovarian cancer*. Gynecologic oncology, 2015. **138**(3): p. 627-633.
301. Champoux, J.J., *DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism*. Annual review of biochemistry, 2001. **70**(1): p. 369-413.
302. Wendorff, T.J., et al., *The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage*. Journal of molecular biology, 2012. **424**(3-4): p. 109-124.
303. Nitiss, J.L., *DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(5): p. 327-337.
304. Zhou, T., et al., *Over-expression of TOP2A as a prognostic biomarker in patients with glioma*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2018. **11**(3): p. 1228.
305. Bower, J.J., et al., *Topoisomerase II α maintains genomic stability through decatenation G 2 checkpoint signaling*. Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4787-4799.
306. Faggad, A., et al., *Topoisomerase II α mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis*. Modern Pathology, 2009. **22**(4): p. 579-588.
307. Hande, K.R., *Topoisomerase II inhibitors*. Update on cancer therapeutics, 2008. **3**(1): p. 13-26.
308. Chen, W., J. Qiu, and Y. Shen, *Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs*. Drug discoveries & therapeutics, 2012. **6**(5): p. 230-237.
309. Qi, X., et al., *Phosphorylation and stabilization of topoisomerase II α protein by p38 γ mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(41): p. 35883-35890.
310. Chen, T., et al., *Topoisomerase II α in chromosome instability and personalized cancer therapy*. Oncogene, 2015. **34**(31): p. 4019-4031.
311. Liu, D., et al., *Topoisomerase II α gene expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients*. Cancer, 2002. **94**(8): p. 2239-2247.
312. Chikamori, K., et al., *Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II α regulates enzymatic activity and drug sensitivity*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(15): p. 12696-12702.

313. Engel, R., et al., *The cytoplasmic trafficking of DNA topoisomerase II α correlates with etoposide resistance in human myeloma cells*. Experimental cell research, 2004. **295**(2): p. 421-431.
314. Zini, N., et al., *Discrete localization of different DNA topoisomerases in HeLa and K562 cell nuclei and subnuclear fractions*. Experimental cell research, 1994. **210**(2): p. 336-348.
315. Wang, T.-L., et al., *Association of Topoisomerase II (TOP2A) and Dual-Specificity Phosphatase 6 (DUSP6) single nucleotide polymorphisms with radiation treatment response and prognosis of lung cancer in Han Chinese*. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2017. **23**: p. 984.
316. Dimas-González, J., et al., *Overexpression of p53 protein is a marker of poor prognosis in Mexican women with breast cancer*. Oncology Reports, 2017. **37**(5): p. 3026-3036.
317. Zhou, Z., et al., *Overexpression of topoisomerase 2- α confers a poor prognosis in pancreatic adenocarcinoma identified by co-expression analysis*. Digestive diseases and sciences, 2017. **62**(10): p. 2790-2800.
318. Heestand, G.M., et al., *Topoisomerase expression and amplification in solid tumours: Analysis of 24,262 patients*. European Journal of Cancer, 2017. **83**: p. 80-87.
319. Hughes, C., et al., *Topoisomerase II- α expression increases with increasing Gleason score and with hormone insensitivity in prostate carcinoma*. Journal of clinical pathology, 2006. **59**(7): p. 721-724.
320. Oltval, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. cell, 1993. **74**(4): p. 609-619.
321. Feng, Y., et al., *Prognostic value and susceptibility of BAX rs4645878 polymorphism in cancer: A systematic review and meta-analysis*. Medicine, 2018. **97**(29).
322. Liu, Z., et al., *Direct activation of bax protein for cancer therapy*. Medicinal research reviews, 2016. **36**(2): p. 313-341.
323. Westphal, D., et al., *Molecular biology of Bax and Bak activation and action*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2011. **1813**(4): p. 521-531.
324. Bleicken, S., et al., *Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(9): p. 6636-6647.
325. Westphal, D., et al., *Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial outer membrane*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(39): p. E4076-E4085.
326. Cheng, E.H.-Y., et al., *VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis*. Science, 2003. **301**(5632): p. 513-517.
327. Buytaert, E., et al., *Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum*. Autophagy, 2006. **2**(3): p. 238-240.
328. Martinez-Caballero, S., et al., *Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(18): p. 12235-12245.
329. K Kontos, C., M.-I. Christodoulou, and A. Scorilas, *Apoptosis-related BCL2-family members: Key players in chemotherapy*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2014. **14**(3): p. 353-374.
330. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-288.

331. Perego, P., et al., *Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems*. *Cancer research*, 1996. **56**(3): p. 556-562.
332. Manoochehri, M., et al., *Down-regulation of BAX gene during carcinogenesis and acquisition of resistance to 5-FU in colorectal cancer*. *Pathology & Oncology Research*, 2014. **20**(2): p. 301-307.
333. Aoyagi, T., et al., *Lung cancer cell line sensitivity to zoledronic acid is BAX-dependent*. *Anticancer research*, 2013. **33**(12): p. 5357-5363.
334. Gardai, S.J., et al., *Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt Regulates Its Activity and Apoptosis in Neutrophils*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(20): p. 21085-21095.
335. Jaiswal, A., et al., *Human dioxin-inducible cytosolic NAD (P) H: menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(27): p. 13572-13578.
336. Nakamura, Y., et al., *Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates*. *Cancer research*, 2000. **60**(2): p. 219-225.
337. Glorieux, C. and P.B. Calderon, *Cancer cell sensitivity to redox-cycling quinones is influenced by NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 polymorphism*. *Antioxidants*, 2019. **8**(9): p. 369.
338. Ross, D., et al., *NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms*. *Chemico-biological interactions*, 2000. **129**(1-2): p. 77-97.
339. Parkinson, A. and B.W. Ogilvie, *Biotransformation of xenobiotics*. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*, 2008. **7**: p. 161-304.
340. Srijiwangsa, P. and K. Na-Bangchang, *Roles of NAD (P) H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) on cancer progression and chemoresistance*. *J. Clin. Exp. Oncol*, 2017. **6**: p. 1-6.
341. Nioi, P., et al., *Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence*. *Biochemical Journal*, 2003. **374**(2): p. 337-348.
342. Nioi, P. and J.D. Hayes, *Contribution of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2004. **555**(1-2): p. 149-171.
343. Hungermann, D., et al., *Influence of whole arm loss of chromosome 16q on gene expression patterns in oestrogen receptor-positive, invasive breast cancer*. *The Journal of pathology*, 2011. **224**(4): p. 517-528.
344. Dinkova-Kostova, A.T. and P. Talalay, *NAD (P) H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2010. **501**(1): p. 116-123.
345. Vaclavikova, R., et al., *Development of high-resolution melting analysis for ABCB1 promoter methylation: Clinical consequences in breast and ovarian carcinoma*. *Oncology reports*, 2019. **42**(2): p. 763-774.
346. Robey, R.W., et al., *Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer*. *Nature reviews. Cancer*, 2018. **18**(7): p. 452.
347. Löscher, W. and H. Potschka, *Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs*. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2002. **301**(1): p. 7-14.

348. Borst, P. and R.O. Elferink, *Mammalian ABC transporters in health and disease*. Annual review of biochemistry, 2002. **71**(1): p. 537-592.
349. Fukuda, Y. and J.D. Schuetz, *ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance*. Biochemical pharmacology, 2012. **83**(8): p. 1073-1083.
350. Hee Choi, Y. and A.-M. Yu, *ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development*. Current pharmaceutical design, 2014. **20**(5): p. 793-807.
351. Shaffer, B.C., et al., *Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML*. Drug Resistance Updates, 2012. **15**(1-2): p. 62-69.
352. Hill, B.T., *Etiology of Cancer*, in *Clinical Ophthalmic Oncology*. 2019, Springer. p. 11-17.
353. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
354. Toptaş Kılıç, S., *Kanser Hastalarının Bütüncül İyilik Hallerinin ve Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi*. 2019.
355. Basu, P., et al., *Secondary prevention of cervical cancer*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2018. **47**: p. 73-85.
356. KANBUR, A.G.A. and Y.D.D.C. ÇAPIK, *Servikal kanserden korunma, erken tanı-tarama yöntemleri ve ebe/hemşirenin rolü*. Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi, 2011. **18**(1): p. 61-72.
357. Kamzol, W., et al., *Assessment of knowledge about cervical cancer and its prevention among female students aged 17–26 years*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2013. **166**(2): p. 196-203.
358. Woodman, C.B., et al., *Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study*. The Lancet, 2001. **357**(9271): p. 1831-1836.
359. White, E.A., et al., *Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity*. Journal of virology, 2012. **86**(24): p. 13174-13186.
360. White, E.A., et al., *Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(5): p. E260-E267.
361. KOÇ, F., et al., *Serviks Kanseri Hakkında Hekimlerin Bilgi Düzeyleri*. Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology, 2010. **20**(5): p. 281-286.
362. Tornatta, J.M., et al., *Representations of vaginal symptoms in cervical cancer survivors*. Cancer Nursing, 2009. **32**(5): p. 378-384.
363. 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**: p. 484.
364. Kissel, M., et al., *Challenges and advances in cervix cancer treatment in elder women*. Cancer Treatment Reviews, 2020. **84**: p. 101976.
365. Tangjitgamol, S., et al., *Adjuvant chemotherapy after concurrent chemoradiation for locally advanced cervical cancer*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014(12).
366. Bibu, J.K., *Antineoplastic drugs: Treatment principles and toxicity*. Veterinary World, 2011. **4**(8): p. 380.
367. Wakharde, A., et al., *Synergistic activation of doxorubicin against cancer: a review*. American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2018. **1**: p. 1-6.
368. Mobaraki, M., et al., *Molecular mechanisms of cardiotoxicity: a review on major side-effect of doxorubicin*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. **79**(3): p. 335-344.

369. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. Journal of pharmacy and pharmacology, 2013. **65**(2): p. 157-170.
370. Sakata, Y., et al., *Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007. **292**(1): p. H503-H509.
371. Lee, E., et al., *Glutathione peroxidase-1 regulates adhesion and metastasis of triple-negative breast cancer cells via FAK signaling*. Redox biology, 2020. **29**: p. 101391.
372. Kulmacz, R.J., *Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **338**(1): p. 25-33.
373. Tan, M., et al., *Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(17): p. 12061-12066.
374. Brigelius-Flohe, R. and A. Kipp, *Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2009. **1790**(11): p. 1555-1568.
375. Cao, C., et al., *Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases*. Journal of biological chemistry, 2003. **278**(41): p. 39609-39614.
376. Zhang, S., et al., *The superoxide dismutase 1 3' UTR maintains high expression of the SOD1 gene in cancer cells: The involvement of the RNA-binding protein AUF-1*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **85**: p. 33-44.
377. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Current biology, 2014. **24**(10): p. R453-R462.
378. Ding, C., X. Fan, and G. Wu, *Peroxiredoxin 1—an antioxidant enzyme in cancer*. Journal of cellular and molecular medicine, 2017. **21**(1): p. 193-202.
379. Wu, W.-S., *The signaling mechanism of ROS in tumor progression*. Cancer and Metastasis Reviews, 2006. **25**(4): p. 695-705.
380. Yano, S., N. Arroyo, and N. Yano, *Catalase binds Grb2 in tumor cells when stimulated with serum or ligands for integrin receptors*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **36**(12): p. 1542-1554.
381. Vetrano, A.M., et al., *Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(42): p. 35372-35381.
382. Glasauer, A. and N.S. Chandel, *Targeting antioxidants for cancer therapy*. Biochemical pharmacology, 2014. **92**(1): p. 90-101.
383. Ho, J.C.-m., et al., *Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer*. Cancer research, 2001. **61**(23): p. 8578-8585.
384. Wang, L., et al., *Casein kinase 1 alpha regulates chromosome congression and separation during mouse oocyte meiotic maturation and early embryo development*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63173.
385. Duan, S., et al., *mTOR generates an auto-amplification loop by triggering the β TrCP-and CK1 α -dependent degradation of DEPTOR*. Molecular cell, 2011. **44**(2): p. 317-324.
386. Richter, J., et al., *CK1 α overexpression correlates with poor survival in colorectal cancer*. BMC cancer, 2018. **18**(1): p. 1-11.
387. Clevers, H., *Wnt/ β -catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-480.
388. Gao, C., et al., *Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review*. Oncotarget, 2018. **9**(4): p. 5492.

389. Shin, S.H., et al., *A small-molecule inhibitor of the β -catenin-TCF4 interaction suppresses colorectal cancer growth in vitro and in vivo*. 2018, AACR.
390. Lu, W. and Y. Li, *Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/ β -catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells*. Journal of cellular biochemistry, 2014. **115**(10): p. 1799-1807.
391. Musgrove, E.A., et al., *Cyclin D as a therapeutic target in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2011. **11**(8): p. 558-572.
392. Shan, Y.S., et al., *Cyclin D1 overexpression correlates with poor tumor differentiation and prognosis in gastric cancer*. Oncology letters, 2017. **14**(4): p. 4517-4526.
393. Li, R., et al., *Expression of cyclin D1 splice variants is differentially associated with outcome in non-small cell lung cancer patients*. Human pathology, 2008. **39**(12): p. 1792-1801.
394. Wang, D., et al., *Genetic association between NFKB1- 94 ins/del ATTG Promoter Polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 42 case-control studies*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 30220.
395. Cartwright, T., N.D. Perkins, and C.L. Wilson, *NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer*. The FEBS journal, 2016. **283**(10): p. 1812-1822.
396. An, X., et al., *The prognostic significance of topoisomerase II alpha protein in early stage luminal breast cancer*. BMC cancer, 2018. **18**(1): p. 1-10.
397. De Resende, M.F., et al., *Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer*. Journal of translational medicine, 2013. **11**(1): p. 1-9.
398. Ali, Y. and S. Abd Hamid, *Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer chemotherapy*. Tumor Biology, 2016. **37**(1): p. 47-55.
399. Kim, E.-J., et al., *Clinical implications and prognostic values of topoisomerase-II alpha expression in primary non-muscle-invasive bladder cancer*. Urology, 2010. **75**(6): p. 1516.e9-1516.e13.
400. Nikolényi, A., et al., *Tumor topoisomerase II alpha status and response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. Oncology, 2011. **80**(3-4): p. 269-277.
401. Eischen, C.M., et al., *Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(22): p. 7653-7662.
402. Thomadaki, H. and A. Scorilas, *BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer*. Critical reviews in clinical laboratory sciences, 2006. **43**(1): p. 1-67.
403. Marzo, I., et al., *Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis*. Science, 1998. **281**(5385): p. 2027-2031.
404. Lewis, S., et al., *Purification and biochemical properties of soluble recombinant human Bax*. Protein expression and purification, 1998. **13**(1): p. 120-126.
405. Knudson, C.M., et al., *Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice*. Cancer Research, 2001. **61**(2): p. 659-665.
406. Oh, E.-T. and H.J. Park, *Implications of NQO1 in cancer therapy*. BMB reports, 2015. **48**(11): p. 609.
407. Peng, Q., et al., *The NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer susceptibility: evidence from an updated meta-analysis*. Diagnostic pathology, 2014. **9**(1): p. 100.
408. Yang, Y., et al., *Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2014. **33**(1): p. 1-9.

409. Li, Z., et al., *NQO1 protein expression predicts poor prognosis of non-small cell lung cancers*. BMC cancer, 2015. **15**(1): p. 207.
410. Cui, X., et al., *High expression of NQO1 is associated with poor prognosis in serous ovarian carcinoma*. BMC cancer, 2015. **15**(1): p. 1-8.
411. De Iudicibus, S., et al., *ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer*. Anticancer research, 2008. **28**(6B): p. 3921-3928.
412. Genovese, I., et al., *Not only P-glycoprotein: amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins*. Drug Resistance Updates, 2017. **32**: p. 23-46.
413. Ji, N., et al., *Midostaurin reverses ABCB1-mediated multidrug resistance*. Frontiers in oncology, 2019. **9**: p. 514.
414. Al-malky, H.S., et al., *Modulation of doxorubicin-induced expression of the multidrug resistance gene in breast cancer cells by diltiazem and protection against cardiotoxicity in experimental animals*. Cancer Cell International, 2019. **19**(1): p. 191.



İZİNLER :

	CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU
---	--

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan Servikal Kanser (HeLa) Hücreleri Üzerine Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklümlü Doksorubisin'in Sitotoksik Etki ve Bazı Genlerin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi
-----------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Sivas 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 Silig			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Sivas 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	İnsan Servikal Kanser (HeLa) Hücreleri Üzerine Nanotaşıyıcı Sistemlere Yüklenmiş Doksorubisin'in 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		
	ŞİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERİYEL 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: 2019-02/22	Tarih: 20.02.2019		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/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 İlişki	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 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 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 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 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 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 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 type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Engin Altınkaya	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 type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Melih İlgey	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 type="checkbox"/>	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Kenan UTKU
2. **Uyruk:** Suriye Cumhuriyeti Vatandaşlığı - T.C Vatandaşlığı (2018) (çift vatandaşlık)
3. **Doğum Tarihi:** 15.07.1984
4. **Doğum Yeri:** Suriye – Deyr Azzor
5. **Medeni Hali:** Evli
6. **Ana Dili:** Arapça
7. **Yabancı Dil:** Türkçe - İngilizce
8. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Eczacılık Fakültesi	Tişrin Üniversitesi – Eczacılık Fakültesi - Suriye	2007
Yüksek Lisans	Eczacılık – Farmasütik kimya ve ilaç Kalite Kontrol Ana bilim dalı	Damaskus Üniversitesi – Eczacılık Fakültesi - Suriye	2014
Doktora	Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Tıp Fakültesi	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi – Sivas/Türkiye	2016 – 2020

9. İletişim Bilgileri

- **Adres:** Merkez, Fatih Mah. – 60/76 Sok. – No: 22 – Daire: 3 – Kat: 3. Sivas
- **Telefon:** 0537 608 40 15
- **E-mail:** alhamadzyad1984@gmail.com