

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**NANOPARTİKÜL İÇERİSİNE KAPSÜLE EDİLEN
DOKSORUBİSİN VE EPOKSOMİSİN
KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNE
OLAN SİTOTOKSİK ETKİLERİ**

Ertan KÜÇÜKSAYAN

DOKTORA TEZİ

2017-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

NANOPARTİKÜL İÇERİSİNE KAPSÜLE EDİLEN
DOKSORUBİSİN VE EPOKSOMİSİN
KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNE
OLAN SİTOTOKSİK ETKİLERİ

Ertan KÜÇÜKSAYAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tomris ÖZBEN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2015-310 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıbbi Biyokimya Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 23/05/2017

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Murat CANPOLAT
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa Tahsin YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Ertan KÜÇÜKSAYAN

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Tomris ÖZBEN

İmza

TEŐEKKÜR

Eğitici ve öğretici olma konusundaki gayretlerini esirgemeden, çalışmam boyunca bana destek olan ve bu çalıőmayı yapmama olanak sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Tomris ÖZBEN' e ve Doç. Dr. Mustafa Tahsin YILMAZ' a,

Bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olarak destek verdikleri için Fatih BOZKURT ve Perihan Kübra ÇİÇEK'e,

Hücre kültür laboratuvar çalıőmalarındaki yardımlarından dolayı Ayőeđül HANİKOĞLU' na,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve SBAUM alıőanlarına,

HUVEC ve MCF-7 hücrelerinin temininde KARDEŐİM Hakan KÜÇÜKSAYAN'a

Öğrenim hayatım boyunca desteğini, ilgisini, sevgisini, fedakarlıklarını ve dualarını hep hissettiğim AİLEM'e,

Tanıőtıđımız günden beri sıkıntılara karşı koymada beni cesaretlendiren, bana ben olabilmeyi öğreten, ilgisini, őefkatini ve özverisini hiç esirgemeyen EŐİM Dr. Aslınur SIRCAN KÜÇÜKSAYAN'a

sonsuz teőekkür ederim.

Mayıs, 2017

Ertan KÜÇÜKSAYAN

ÖZET

Amaç: Nanopartiküller (NP) içinde kapsüllenmiş kemoterapötik ilaçların doğrudan tümörlere ulaşması amacıyla meme kanserinde kullanılmaktadır. Bu yolla, normal hücrelerde ilaçların sitotoksik etkileri azaltılır ve kanser hücrelerinde ilaç direnci engellenir. Bu çalışmanın amacı, kemoterapötik maddeleri kapsülleyen NP'leri sentezlenerek kanser ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırılmasıdır.

Yöntem: Doksorubisin (Dox) ve/veya Epoksomisin (Epo) yüklü Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) NP'leri, modifiye o/o/w çift emülsiyon faz ayırma yöntemi kullanılarak hazırlandı. Sentezlenen NP'lerin fiziko kimyasal özellikleri, zetasizer ile boyut analizi ve zeta potansiyeli, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile parçacık morfolojisi, termogravimetrik analiz (TGA) ile ağırlık kaybı, diferansiyel tarama kalorimetresi ile enerji değişimi (DSC) ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile kimyasal bağ analizleri kullanılarak belirlendi. Ayrıca, sentezlenen NP'lerin sitotoksitesine, apoptozis, apoptotik yollar ve ilaç direnci üzerindeki etkileri meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve normal hücreler (HUVEC) kullanılarak oluşturulan *in vitro* hücre kültürleri modellerinde araştırıldı.

Bulgular: Nanopartikül karakterizasyon analizleri Dox ve/veya Epo'nin NP'ler içindeki varlığı başarıyla yüklenebildiği kanıtlandı. Dox ve Epo yüklü NP'ler, serbest Dox ve Epo'den MCF-7 hücrelerine karşı daha sitotoksik olurken, normal HUVEC hücrelerine karşı serbest Dox ve Epo' e göre daha az sitotoksik olduğu bulundu. Sonuç olarak, Dox ve Epo yüklü NP'ler ilaç direncini azaltarak MCF-7 hücrelerinin sitotoksitesini, apoptozisini, apoptotik yolların aktivasyonunu arttırdı.

Sonuç: İlaç kombinasyonlarını (Dox ve Epo) kapsayan nanopartiküller, çoklu ilaç direncinin ve normal dokulara toksisitenin üstesinden gelmek için klinikte potansiyel bir tedavi olarak uygulanabilir.

Anahtar Kelimeler: Epoksomisin, Doksorubisin, Poli (laktik-ko-glikolik asit), Nanopartikül, İlaç Direnci

ABSTRACT

Objective: Delivery of chemotherapeutic drugs encapsulated in the nanoparticles (NPs) directly to the tumors has been used in breast cancer. This way, cytotoxic effects of drugs are reduced on normal cells and drug resistance is inhibited in cancer cells. In our study, we synthesized NPs encapsulating chemotherapeutics and investigated their cytotoxic effects on cancer and normal cells.

Method: Doxorubicin (Dox) and/or Epoxomicin (Epo) loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) NPs were prepared using a modified o/o/w double emulsion phase separation method. Physicochemical properties of the synthesized NPs were performed using size analysis and zeta potential with zetasizer, particle morphology with scanning electron microscopy (SEM), weight loss with thermogravimetric analysis (TGA), energy change with differential scanning calorimetry (DSC), and chemical bonds analysis with fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Furthermore, the effects of synthesized NPs on cytotoxicity, apoptosis, apoptotic pathways, and drug resistance were investigated *in vitro* in cell cultures models created using breast cancer cells (MCF-7) and normal cells (HUVEC).

Results: The presence of Dox and/or Epo within NPs was proven by these material characterization analyses, revealing that Dox and/or Epo could be successfully loaded into the nanoparticles. Dox and Epo loaded NPs are more cytotoxic than free Dox and Epo to MCF-7 cells while they are less cytotoxic than free Dox and Epo to normal HUVEC cells. As a result, Dox and Epo-loaded NPs reduced drug resistance and increased the cytotoxicity, apoptosis, and activation of apoptotic pathways in MCF-7 cells.

Conclusion: Clinical projects applying nanoparticles encapsulating drug combinations (Dox and/or Epo) might be carried out as a potential treatment to overcome multidrug resistance and toxicity to normal tissues.

Key words: Epoxomicin, Doxorubicin, Poly(lactic-co-glycolic acid), Nanoparticle, Drug resistance.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar	vi
ŞEKİLLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Etiyolojisi	5
2.1.3. Tedavi Yöntemleri	6
2.2. Doksorubisin	8
2.2.1. Etki Mekanizması	9
2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	11
2.2.3. Klinik Uygulamada Karşılaşılan Problemler	12
2.3. Apoptozis	13
2.3.1. Hücre Ölümünün İki Şekli: Apoptozis ve Nekrozis	14
2.3.2. Apoptozisin Aşamaları	15
2.3.3. Apoptozisde Meydana Gelen Biyokimyasal ve Morfolojik Değişimler	15
2.4. NF-κB Yolağı	18
2.5. Ubikitin-Proteazom Yolağı	19
2.5.1. Proteazom İnhibitörleri ve Epoksomisin	21
2.6. Alternatif İlaç Taşıyıcı Sistemler	22
2.7. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	25
2.8. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	26
2.8.1. Emülsifikasyon Yöntemi	28
2.8.2. Koaservasyon (Faz Ayrımı) Yöntemi	28
2.8.3. Poliyon Kompleks Yöntemi	29

2.8.4. Dondurma Çözme Yöntemi	29
2.8.5. Katı Lipid Nanopartikül Hazırlama Yöntemi	29
2.8.6. Nano Çöktürme Yöntemi	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. Dox ve Epo'nin Nanopartiküle Enkapsüle Edilmesi	31
3.2. Dox ve Epo İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	33
3.2.1. Partikül Boyutunun Belirlenmesi	33
3.2.2. Zeta Potansiyel Değerlerinin Belirlenmesi	33
3.2.3. Nanopartiküllerin SEM ile karakterizasyonu	34
3.2.4. Nanopartiküllerin ATR-FTIR ile Moleküler Karakterizasyonu	35
3.2.5. Nanopartiküllerin DSC İle karakterizasyonu	35
3.2.6. Nanopartiküllerin TGA İle Karakterizasyonu	37
3.2.7. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	37
3.3. Enkapsüle Edilen İlaçların İn Vitro Salınımlarının Belirlenmesi	40
3.4. Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkinliğinin Belirlenmesi	40
3.4.1. Deney Modeli ve Grupları	40
3.4.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler	41
3.4.3. Hücre Medyumlarının Hazırlanması	42
3.4.4. Hücrelerin Pasajlanması	42
3.4.5. Hücrelerin Dondurulması	43
3.4.6. Hücrelerin Çözülmesi	43
3.4.7. Nanopartiküllerin Doz Çalışması	44
3.4.8. XTT Sitotoksikite Analizi	44
3.5. Nanopartiküllerin Apoptozise ve Apoptotik Yollara Etkileri	46
3.5.1. Hücre İçine Alınan Dox Miktarının Belirlenmesi	47
3.5.2. Proteozom Aktivitesinin Belirlenmesi	48
3.5.3. Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi	48
3.5.4. Sitolitik NFκB-p65 Miktarının Belirlenmesi	49
3.5.5. Flow Sitometri ile Annexin V Yöntemi	52
3.5.6. TUNEL Yöntemi	54

3.6. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR	56
4.1.Dox ve Epo'nin Nanopartiküle Enkapsüle Edilmesi	56
4.2. Dox ve Epo İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	57
4.2.1. Partikül Boyutunun Belirlenmesi	57
4.2.2. Partikül Zeta Potansiyel Değerlerinin Belirlenmesi	59
4.2.3. Nanopartiküllerin SEM ile Karakterizasyonu	59
4.2.4. Nanopartiküllerin ATR-FTIR Spektroskopisi ile Moleküler Karakterizasyonu	62
4.2.5. Nanopartiküllerin DSC ile Karakterizasyonu	66
4.2.6. Nanopartiküllerin TGA İle Karakterizasyonu	69
4.2.7. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	70
4.3. Enkapsüle Edilen İlaçların <i>İn Vitro</i> Salınımlarının Belirlenmesi	71
4.4. Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkinliğinin Belirlenmesi	73
4.4.1. XTT Sitotoksosite Analizi	74
4.5. Nanopartiküllerin Apoptozise ve Apoptotik Yollara Etkileri	99
4.5.1.Hücre İçine Alınan DOX Miktarının Belirlenmesi	99
4.5.2. Proteozom İnhibisyonunun Belirlenmesi	99
4.5.3. Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi	103
4.5.4. Sitolitik NF-κB-p65 Miktarının Belirlenmesi	103
4.5.5. Flow Sitometri ile Apoptozis Belirlenmesi	105
4.5.6. TUNEL Yöntemi ile Apoptozis Belirlenmesi	110
5. TARTIŞMA	124
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	136
KAYNAKLAR	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

2.1. Ülkelere göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türü.	4
2.2. Yaşa bağılı olarak meme kanseri görülme sıklığı.	5
3.1. Epo enkapsülasyon.	39
3.2. Hücre ekstraksiyon tamponu kimyasalları ve son konsantrasyonları.	49
4.1. Zetasizer ile nanopartiküllerin boyutları.	59
4.2. Zetasizer ile nanopartiküllerin zeta potansiyelleri.	59
4.3. Nanopartiküllerin SEM ile ortalama boyutları.	60
4.4. PLGA'nın FTIR spektrumundaki karakteristik pikler.	65
4.5. Tüm nanopartiküllere ait DSC parametreleri.	68
4.6. Tüm NP'lere ait enkapsülasyon verimi.	71
4.7. HUVEC hücrelerinde Dox'in 24 saatlik H-IC ₅₀ değeri.	74
4.8. MCF-7 hücrelerinde Dox'nin 24 saatlik M-IC ₅₀ değeri.	75
4.9. HUVEC hücrelerinde Epo'in 24 saatlik H-IC ₅₀ değeri.	76
4.10. MCF-7 hücrelerinde Epo'in 24 saatlik M-IC ₅₀ değeri.	77
4.11. HUVEC hücrelerinde Doxil'in 24 saatlik H-IC ₅₀ değeri.	78
4.12. MCF-7 hücrelerinde Doxil'nin 24 saatlik M-IC ₅₀ değeri.	79
4.13. HUVEC hücrelerinde Free (PLGA)-Np'nün 24 saatlik H-IC ₅₀ değeri.	80
4.14. MCF-7 hücrelerinde Free (PLGA)-Np'nün 24 saatlik M-IC ₅₀ değeri.	81

4.15. HUVEC hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik H-IC ₅₀ değeri.	82
4.16. MCF-7 hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik M-IC ₅₀ değeri.	83
4.17. HUVEC hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik H-IC ₅₀ değeri.	84
4.18. MCF-7 hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik M-IC ₅₀ değeri.	85
4.19. HUVEC hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik H-IC ₅₀ değeri.	86
4.20. MCF-7 hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik IC ₅₀ değeri.	87
4.21. HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde tüm grupların 24 saatlik IC ₅₀ değerleri.	88
5.1. Klinik araştırma aşamasında olan nano boyutta olan ilaç formülasyonların.	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. İnvaziv ve In situ kanser.	3
2.2. Kadınlarda en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları.	4
2.3. Doksorubisinin kimyasal yapısı.	9
2.4. Doksorubisin etki mekanizması.	11
2.5. Apoptozisde meydana gelen morfolojik değişimler.	17
2.6. Ubikitin-proteozom yolağı.	20
2.7. Epoksomisin açık formülü.	22
2.8. Etken madde yükleme yollarına göre nanopartiküller: nanokapsül ve nanoküre.	26
2.9. PLGA'nın kimyasal yapısı.	27
3.1. Nanopartikülleri hazırlanması ve evaporasyonu.	32
3.2. Nanopartikülleri liyofilize eden dondurmalı kurutucu.	33
3.3. NP'lerin boyutları ve zeta potansiyellerinin belirlendiği Zetasizer cihazı.	34
3.4. Nanopartiküllerin boyutlarının görüntülediği SEM cihazı.	34
3.5. Nanopartiküllerin İnfrared spektrumlarının alındığı FTIR spektroskopisi.	35
3.6. Polimerik maddelerde karşılaşılan değişiklikleri gösteren diferansiyel termogram.	36
3.7. Nanopartiküllerin ısı alış verişindeki değişimleri ölçen DSC cihazı.	36
3.8. Dox enkapsülasyon verimini ölçmek için kullanılan HPLC cihazı.	38

3.9. Epo enkapsülasyon verimini ölçmek için kullanılan LC-MS-QTOF cihazı.	39
3.10. XTT canlılık testinin mekanizması.	45
3.11. XTT ve proteinin ölçüldüğü spektrometre.	45
3.12. DOX, ROS ve proteozom aktivitesinin ölçüldüğü spektroflorometre.	47
3.13. Flow sitometri cihazı.	53
3.14. Hücre görüntülerinin alındığı inverted mikroskop.	55
4.1. Nanopartiküllerin evaporasyondan sonraki görüntüleri.	56
4.2. Nanopartikülleri liyofilizasyondan sonraki son görüntüleri.	57
4.3. Zetasizer ile Free NP boyut analizi.	57
4.4. Zetasizer ile Epo NP boyut analizi.	58
4.5. Zetasizer ile Dox NP boyut analizi.	58
4.6. Zetasizer ile Dox+Epo NP boyut analizi.	58
4.7. Free-Np'nün SEM görüntüsü.	60
4.8. Epo-Np'nün SEM görüntüsü.	61
4.9. Dox-Np'nün SEM görüntüsü.	61
4.10. Dox+Epo-Np'nün SEM görüntüsü.	62
4.11. ATR-FTIR ile PLGA'dan oluşan ilaç içermeyen Free-Np spektrumu.	63
4.12. ATR-FTIR ile Epo-Np spektrumu.	63
4.13. ATR-FTIR ile Dox-Np spektrumu.	64

4.14. ATR-FTIR ile Dox+Epo-Np spektrumu.	64
4.15. ATR-FTIR ile Dox+Epo-Np spektrumları.	65
4.16. Free NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.	66
4.17. Epo NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.	67
4.18. Dox NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.	67
4.19. Dox+Epo NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.	68
4.20. Tüm NP'lere ait DSC diferansiyel termogramının karşılaştırılması.	69
4.21. NP'lere ait DSC termogramında camsı geçişkenlik bölgesi karşılaştırılması.	70
4.22. Tüm NP'lere ait TGA diyagramının karşılaştırılması.	70
4.23. Nanopartiküllerin ilk bozunma sıcaklıklarındaki kütle değişim diyagramı.	70
4.24. Zamana karşı kümülatif %Dox salınımı pH=7,4'de.	71
4.25. Zamana karşı kümülatif %Dox salınımı pH=5,5'de.	72
4.26. Zamana karşı kümülatif %Epo salınımı pH=7,4'de.	72
4.27. Zamana karşı kümülatif %Epo salınım pH=5,5'de.	73
4.28. HUVEC hücrelerinde Dox'nin 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	74
4.29. MCF-7 hücrelerinde Dox'nin 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	75
4.30. HUVEC hücrelerinde Epo'in 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	76
4.31. MCF-7 hücrelerinde Epo'in 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	77
4.32. HUVEC hücrelerinde Doxil'in 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	78

4.33. MCF-7 hücrelerinde Doxil'nin 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	79
4.34. HUVEC hücrelerinde Free (PLGA) -Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	80
4.35. MCF-7 hücrelerinde Free (PLGA)-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	81
4.36. HUVEC hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	82
4.37. MCF-7 hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	83
4.38. HUVEC hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	84
4.39. MCF-7 hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	85
4.40. HUVEC hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	86
4.41. MCF-7 hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.	87
4.42. HUVEC hücrelerinin kontrol grubunun morfolojisi.	89
4.43. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 3,924 µg/ml Dox grubunun morfolojisi.	89
4.44. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 26,93 ng/ml Epo grubunun morfolojisi.	90
4.45. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 2 µg/ml Dox grubunun morfolojisi.	90
4.46. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 114,3 µg/ml Doxil grubunun morfolojisi.	91
4.47. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 4279 µg/ml Free-Np grubunun morfolojisi.	91
4.48. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 2547 µg/ml Epo-Np grubunun morfolojisi.	92
4.49. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 1804 µg/ml Dox -Np grubunun morfolojisi.	92
4.50. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ 1695 µg/ml Dox+Epo-Np grubunun morfolojisi.	93
4.51. MCF-7 hücrelerinin kontrol grubunun morfolojisi.	93

4.52. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 1,328 µg/ml Dox grubunun morfolojisi.	94
4.53. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 22,20 ng/ml Epo grubunun morfolojisi.	94
4.54. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 1 µg/ml Dox ve 15 ng/ml Epo grubunun morfolojisi.	95
4.55. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 144,8 µg/ml Doxil grubunun morfolojisi.	95
4.56. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 2015 µg/ml Free-Np grubunun morfolojisi.	96
4.57. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 1558 µg/ml Epo-Np grubunun morfolojisi.	96
4.58. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 1423 µg/ml Dox-Np grubunun morfolojisi.	97
4.59. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ 233,3 µg/ml Dox+Epo-Np grubunun morfolojisi.	97
4.60. HUVEC hücrelerinin H-IC ₅₀ dozları uygulanmış tüm grupların morfolojisi.	98
4.61. MCF-7 hücrelerinin M-IC ₅₀ dozları uygulanmış tüm grupların morfolojisi.	98
4.62. HUVEC ve MCF-7'de hücre içine alınan Dox miktarının belirlenmesi.	99
4.63. HUVEC'lerin doz bağımlı proteozom aktivitesi.	100
4.64. MCF-7 hücrelerinin doz bağımlı proteozom aktivitesi.	100
4.65. HUVEC'lerin M-IC ₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra proteozom aktivitesi.	101
4.66. MCF-7'lerin M-IC ₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra proteozom aktivitesi.	102
4.67. İki hücre hattının proteozom inhibisyonunun karşılaştırılması.	102
4.68. İki hücre hattında oluşan ROS miktarının karşılaştırılması.	103

4.69. NF-kB standart grafiği.	104
4.70. HUVEC'lerde tüm grupların sitozolik NF-kB miktarı.	104
4.71. MCF-7 hücrelerinde tüm grupların NF-kB miktarı.	105
4.72. HUVEC'lerin serbest ilaçlar ile flow sitometri analiz görüntüleri.	106
4.73. HUVEC'lerin nanopartiküller ile flow sitometri analiz görüntüleri.	107
4.74. HUVEC'lerin flow sitometri apoptotik indeks yüzdeleri.	107
4.75. MCF-7 hücrelerinin serbest ilaçlar ile flow sitometri analiz görüntüleri.	108
4.76. MCF-7 hücrelerinin nanopartiküller ile flow sitometri analiz görüntüleri.	108
4.77. MCF-7 hücrelerinin flow sitometri apoptotik indeks yüzdeleri.	109
4.78. Flow sitometrisiyle serbest ilaçların ve Dox+Epo-Np'ün HUVEC ve MCF-7 üzerindeki etkisi.	110
4.79. M-IC ₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda HUVEC hücrelerinin apoptotik indeksi.	111
4.80. M-IC ₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda HUVEC'lere ait tüm grupların TUNEL boyama görüntüleri.	112
4.81. TUNEL sonucunda kontrol grubu HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	112
4.82. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1,33 µg/ml Dox ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	113
4.83. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 22,20 ng/ml Epo ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	113
4.84. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1µg/ml Dox ve 15 ng/ml Epo kombinasyonu ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	114

4.85. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 144,8 µg/ml Doxil ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	114
4.86. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 2015 µg/ml Free-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	115
4.87. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1558 µg/ml Epo-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	115
4.88. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1423 µg/ml Dox-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	116
4.89. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1233,3 µg/ml Dox+Epo-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.	116
4.90. M-IC ₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda MCF-7 hücrelerinin apoptotik indeksi.	117
4.91. M-IC ₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda MCF-7'lere ait bütün grupların TUNEL boyama görüntüleri	118
4.92. TUNEL sonucunda kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	118
4.93. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1,33 µg/ml Dox ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	119
4.94. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 22,20 ng/ml Epo ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	119
4.95. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1µg/ml Dox ve 15 ng/ml ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	120
4.96. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 144,8 µg/ml Doxil ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	120

4.97. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1558 µg/ml Epo ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	121
4.98. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1558 µg/ml Epo ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	121
4.99. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 1423 µg/ml Dox ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	122
4.100. TUNEL sonucunda M-IC ₅₀ 233,3 µg/ml Dox+Epo-Np ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.	122
4.101. TUNEL boyamasıyla serbest ilaçların ve Dox+Epo-Np'ün HUVEC ve MCF-7 üzerindeki etkisi	123
5.1. Nanopartiküller ve kan akışının hemodinamiği	126
5.2. Nanopartiküllerin endotel aralıktan sızarak tümör bölgesine geçmesi.	127
5.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınma mekanizmaları.	130
5.4. Lipid profiline göre membran yapısı.	131
5.5. Tezin şekilsel olarak özeti.	135

SİMGELER ve KISALTMALAR

AC	: Adriamycin -Cyclophosphamide
ATR-FTIR	: Attenuated Total Reflection-Fourier Transform İnfrared
AMC	: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin
ATCC	: American Type Culture Collection
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAF	: Cyclophosphamide-Adriamycin-Fluorouracil
CRP	: C-Reactive Protein
Cox-2	: Cyclooxygenase-2
DCF	: 2',7'-dichlorofluorescein
DCFH₂-DA	: 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
DLS	: Dynamic Light Scattering
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsulfoksit
DSC	: Differential Scanning Calorimetry
Dox	: Doxorubicin
E1	: Ubikitin Aktifleştirici Enzim
E2	: Ubikitin Konjuge Edici Enzim
E3	: Ubikitin Ligaz
EC	: Epirubicin-Cyclophosphamide
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
Epo	: Epoxomicin
ER	: Estrogen Receptor
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Food And Drug Administration
FEC	: Fluorouracil-Epirubicin-Cyclophosphamide
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HUVEC	: Tek Katmanlı Normal Hücreler

H-IC₅₀	: HUVEC hücrelerine ait inhibitör konsantrasyon yarı değeri
IARC	: Uluslararası Kanser Ajansı
IC₅₀	: Tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değeri
i.v.	: İntravenöz Yolla
IκB	: İnhibitor Kappa B
IKKα	: Iκb Kinaz A
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
MDR	: Multi-Drug Resistance
MCF-7	: Meme Kanser Hücreleri
M-IC₅₀	: MCF-7 hücrelerine ait inhibitör konsantrasyon yarı değeri
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PACA	: Poli(Siyanoakrilat)
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PE	: Phycoerythrin
PECL	: Polikaprolakton
PLA	: Poli(Laktik Asit)
PLGA	: Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SEM	: Scanning Electron Microscopy
TGA	: Thermogravimetric Analysis Termal Gravimetrik Analiz
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
uPA	: Urokinaz-Type Plasminogen Activator
XTT	: 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carbox-anilide

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir ve dünya genelinde, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde birinci sıradadır (Kim ve ark., 2014). Kemoterapi, birçok kanser için önemli bir tedavi seçeneğidir. Kombine kemoterapi uygulandıktan sonra bile gelişebilen ilaç direnci kemoterapinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ilaç duyarlılığının artırılması, kanser hastalarının tedavilerinin başarılı olması için önemli bir basamaktır (Wang ve ark., 2010).

Kemoterapötik ilaçlar hem erken hem de ileri evre meme kanserinin tedavisinde ve izlenmesinde hayati öneme sahiptirler. Sistemik olarak verilen kemoterapötik ilaçlar kanser hücreleriyle birlikte vücudun diğer normal hücrelerini de öldürerek kısa ve uzun vadede olumsuz yan etkilere neden olmaktadır. En iyi geliştirilmiş kemoterapötik ajanların bile normal ve kanserli hücreler üzerindeki etkileri ayıramamaktadır. Bu yüzden kemoterapötik ilaçlar vücutta non-spesifik dağılarak sistemik toksisiteye ve olumsuz yan etkilere sebebiyet vermektedir. Kemoterapi ilaçlarını doğrudan tümöre taşıyan nanopartiküller hem ileri hem de erken evre meme kanserinde kullanılmaktadır. Böylelikle normal hücreler üzerindeki sitotoksik etki azaltılmaktadır (Sinha ve ark., 2006).

Kanser tedavisinde nanopartiküllerin uygulanmak istenmesinin sebebi hızlı, güvenilir ve sistemik dolaşım aracılığıyla tam bir dağılımı sağlamasından dolayıdır. Nanopartiküller hücreler arası boşluklardan geçebilmeleri ve hedeflenebilme özellikleri nedeniyle önemlidir. Nanopartiküller kan dolaşımında tümöre ulaşabilecek ve tümör mikro damarından dışarı çıkabilecek kadar küçüktürler. Damar duvarı endotel hücrelerden oluşur ve endotel hücre membranı proteoglikan olan bir glikokaliks ile kaplı olduğundan dolayı negatif yüke sahiptir (Dull ve ark., 2003). Bu da nanopartiküllerin sağlıklı endotel bölgelere girememesini ve tümör bölgesinde ise nanopartiküllere endotel açıklıktan geçebilmelerinden dolayı bir seçicilik sağlar. Bu tezde öncelikli olarak kemoterapötik ilaç enkapsüle ederek sentezlediğimiz nanopartikülün bir endotel hücre olan HUVEC hücrelerine toksik etki yapıp yapmadığını araştırıldı.

Antrasiklin ilaçlar genellikle kötü huylu meme kanserinin tedavisinde kemoterapötik olarak kullanılır. Doksorubisin (Dox) tipik bir antrasiklin ilaçtır ve metastaz yapmış meme kanseri hastalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılır (Biganzoli ve ark., 2004; Humber ve ark., 2007). Bu tezde kombine tedavide en çok kullanılan ve ticari adı Adriamycin olan Dox kemoterapötik olarak seçildi. Dox'ın kemoterapötik aktivite mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, kanser hücrelerinde apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Minotti ve ark., 2004; Koceva-Chyla ve ark., 2005; Suzuki ve ark., 2005). Dox ile kanser tedavisinin başlangıcında iyi yanıtlar alınmasına rağmen, daha sonra gelişen Dox-direnci klinikte büyük bir problemdir ve tedavinin başarısız olmasının en önemli nedenidir (Esteva ve ark., 2001). Etkili bir tedavi için ilaç direncinin üstesinden gelebilen ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek kritik bir öneme sahiptir.

Epoksomisin (Epo) doğal selektif bir proteozom inhibitörüdür ve *in vivo* anti-inflamatuar etkisi iyi bilinmektedir. Bir epoksomisin türevi olan proteozom inhibitörü Cafilzomib 2012 yılında FDA onayı almıştır ve nüks eden dirençli multiple myeloma hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır (McCormack, 2012; Thompson, 2013). Ancak şu ana kadar literatürde Epoksomisin'in meme kanserinde ilaç dirençliliğine olan etkisi ile ilgili bilgi mevcut değildir. Bu nedenle bu tez çalışmasında proteozom inhibitörü olan Epoksomisin'in meme kanserinde ilaç direnci üzerine olası etkisini araştırdık.

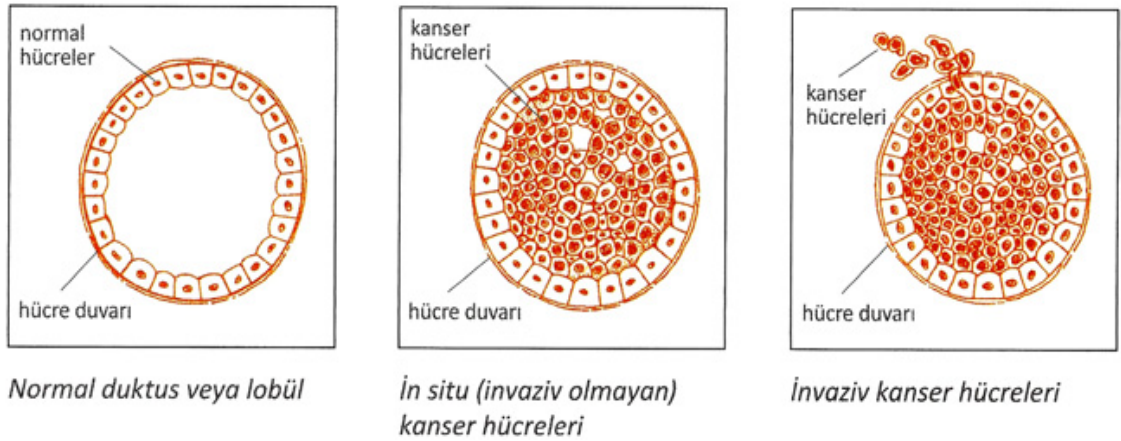
Günümüzde nanopartikül olarak hazırlanmış ve klinik uygulama aşamasına geçmiş nanopartikül-ilac kombinasyonu bulunmamaktadır. Ancak ilaç direncinin engellenmesi için çalışmalar devam etmektedir. Bu tez çalışmasında Dox ile Epo'ü nanopartikül içerisine enkapsüle ederek; ilaç direncinin azaltılmasını, ilaçların etkinliğinin artırılması ve normal hücrelere daha az sitotoksik olmaları hedeflendi. Sentezlenen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri, ilaç salınımı ve *in vitro* etkinliği belirlendikten sonra meme kanseri hücrelerinde ve tek katmanlı normal hücreler olan HUVEC hücrelerinde hücre kültürü modeli oluşturuldu. Sentezlenen yeni nanopartiküllerin *in vitro* hücre kültüründe sitotoksikite, apoptozis ve apoptotik yollara olan etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla başlar invazyon ve metastaz ile ilerler. Hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması, hücrede meydana gelen genetik değişimler ile başlar. Bu süreci, çevre dokulara yayılma (invazyon) takip eder ve sonunda başka organlara yayılma (metastaz) meydana gelir (Steinfors ve ark., 2016). Meme kanseri kısaca süt lobülleri (bezleri) ve kanallarını oluşturan hücrelerin kontrol dışı olarak çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleri olarak tanımlanabilir (Rosen, 2005). Süt kanallarından kaynaklanan meme kanseri duktal karsinom, süt lobüllerinden kaynaklanan meme kanseri de lobüler karsinom olarak adlandırılmaktadır.

Meme kanserleri Dünya Sağlık Örgütü tarafından histolojik olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre meme kanseri, *in situ* ve *invaziv* kanserler olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Singletary ve ark., 2002). *In situ* kanserde; malign epitelyal hücreler bazal membranla çevrili duktus ve asinuslar içinde sınırlı iken, *invaziv* kanserde; neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İnvaziv ve In situ kanser.

(<http://www.memesaglik.com/images/stories/invazif.jpg> Erişim Tarihi: 15.04.2017)

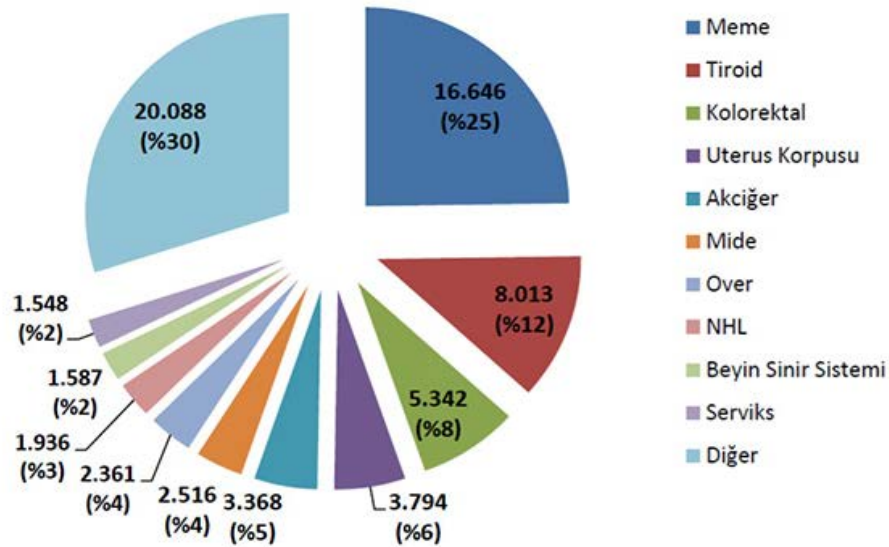
2.1.1. Epidemiyolojisi

Kanser, tüm dünyada giderek artan önemli bir sağlık sorunudur. Dünyada her yıl 14 milyon kişiye kanser teşhisi konulmakta ve 8,2 milyon kişinin ölümüne sebep olmaktadır. Uluslararası Kanser Ajansının (IARC) yayınladığı 2012 verilerine göre meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve dünya genelinde, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde birinci sıradadır (<http://globocan.iarc.fr> Erişim Tarihi:16.01.2017).

Tablo 2.1. Ülkelere göre kadınlarda en sık görülen ilk beş kanser türü.

	Türkiye	Dünya	AB	ABD
1	Meme	Meme	Meme	Meme
2	Tiroid	Kolorektal	Kolorektal	Akciğer
3	Kolorektal	Uterus serviksi	Akciğer	Kolorektal
4	Uterus korpusu	Akciğer	Uterus korpusu	Tiroid
5	Akciğer	Uterus Korpusu	Uterus serviksi	Uterus

Ülkemizde yapılan son araştırmalara; bir yıl içerisinde yaklaşık 67.200 kadın ve 96.200 erkeğin kanser tanısı aldığını göstermektedir. Bir yıl içinde yaklaşık 17.000 kadın meme kanseri tanısı almıştır (Şekil 2.2) ve her dört kadın kanserinden birisi meme kanseri olduğu görülmektedir (<http://kanser.gov.tr/2014-rapor.pdf> Erişim Tarihi: 15.04.2017).



Şekil 2.2. Kadınlarda en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları

2.1.2. Etiyolojisi

Meme kanserine neden olan etmenler tam olarak anlaşılmamıştır ancak bazı faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. Kadın cinsiyet (%99 kadınlarda, %1 erkeklerde) ve yaş; meme kanserinde en önemli risk faktörleridir. Meme kanserini etkileyen diğer faktörler, aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

Yaş: Meme kanserinin her sekiz kadından birinde görülme ihtimali vardır (% 12.56). Yaş; meme kanserinde en önemli risk faktörlerindedir. Görülme sıklığı premenopozal dönemde %25-30; postmenopozal dönemde %70-75 aralığındadır (<http://www.tmhdf.org.tr/MemeKanseri> Erişim Tarihi: 15.04.2017). Yaş ilerledikçe meme kanseri insidansı artmaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Yaşa bağlı olarak meme kanseri görülme sıklığı

Yaş	100.000 de insidans
0-39	1
40-44	126
50-54	228
60-64	348
70-74	450
80-84	477

Genetik Faktörler: Dünya Sağlık Örgütü'ne göre ailede meme kanseri olması meme kanseri görülme riskini 2-3 kat arttırmaktadır. Meme kanseri vakalarının, %20-30'unda ailede meme kanseri olmasına rağmen, vakaların sadece %5-10 unda genetik yatkınlık bulunmuştur. Genetik yatkınlık sebebi olan en önemli genetik mutasyonlar başta BRCA1 ve BRCA 2 olmak üzere PTEN, TP53, MLH1, MLH2 ve STK11 gen mutasyonlarını içerir. Bunlardan mutasyona uğramış BRCA1 genini taşıyan bir kadının ortalama 70 yıllık yaşam süresinde meme kanseri olma riskinin yaklaşık % 85 olduğu belirtilmiştir. Kadınlarda BRCA1 mutasyonu olduğunda, ergenlik sonrası memelerinde tümör gelişim riski %5-10 kat artar (Berryve Parmigiani, 1997; Couch ve ark., 1997; Phillips, 2001; Groep, 2011).

Endokrin Etkiler: Gebelik sayısı, emzirme, menarş yaşı, menapoz yaşı gibi reproduktif faktörlerin meme kanseri ile güçlü bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Erken menarş (12

yaşından önce), geç menapoz (55 yaşından sonra); östrojen hormonuna daha fazla maruz kalınmasına sebep olduğu için, meme kanseri gelişim riski ile ilişkilidir (Hsieh ve ark., 1990). Menarşın bir yıl gecikmesi meme kanseri riskinde % 20 azalışa sebep olduğu belirtilmektedir (Pike ve ark., 1981). Menopoz dönemi 45 yaşından önce başlayan kadınlarda östrojen azalacağından dolayı meme kanseri riskinin azaldığı gösterilmiştir (Ekbon ve ark., 1997). Gebeliğin daha ileri yaşta olması ve hiç doğum yapılmaması meme kanseri riskinde artışla ilişkilidir (Rosner ve ark., 1994).

2.1.3. Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri tedavisi mümkün olan bir hastalıktır. Erken fark edildiğinde bu hastalıktan tamamen tedavi edilebilir. Meme kanserinde; cerrahi, hormonoterapi, radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır.

Cerrahi: Meme kanserinin primer tedavisi cerrahi yöntemlerle yapılmaktadır. Cerrahi uygulama ile memeden tümör alınır ve hastalığın evresi belirlenir. Meme kanseri tanısında uygulanan cerrahi yöntemler; meme koruyucu cerrahi veya mastektomidir. Meme koruyucu cerrahide (kısmi mastektomi, lumpektomi) amaç sadece kanserli doku ve bu dokunun çevresinde bulunan küçük bir miktar normal dokunun alınmasıdır. Basit veya total mastektomi tüm memenin alındığı bir cerrahi yöntemdir. Modifiye edilmiş radikal mastektomi ile tüm meme ve kol altı lenf nodları alınır ancak göğüs duvarının altında bulunan kaslar alınmaz (Kruper ve ark., 2011).

Hormonoterapi: Cerrahi sonrası yeniden kanser oluşum riskini azaltmak için ve ileri evre meme kanserlerinde hormon tedavisi kullanılır. Hormonoterapide hedef, hormon reseptörü pozitif kanserlerde, hormonun etkisi inhibe edilerek kanser gelişimin engellenmesidir. Bu hedefi gerçekleştirmek için kullanılan tedavi yöntemleri;

- **Östrojen reseptör modülatörleri:** Bu tedavi yönteminde hastalara verilen ilaçlar, östrojenin reseptörüne bağlanmasını engelleyerek östrojen reseptörlerini bloke ederler. Tamoksifen (Nolvadex®) ve fulvestrant (Faslodex®) bu amaçla klinikte yaygın olarak kullanılan ilaçlardır (McNeil, 1998).

- **Aromataz inhibitörleri:** Hormonoterapide çok sık kullanılan yöntemdir. Aromataz enzimi, androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Aromataz inhibitörleri, aromatazı inhibe ederek östrojen sentezini durdururlar. Anastrozole (Arimidex), exemestane (Aromasin) ve letrozole (Femara) aromataz inhibitörleridir.
- **Yumurtalık işlevinin durdurulması:** Menopoza girmemiş kadınlarda östrojen seviyesini düşürmek için kullanılan yöntemdir. Bu amaçla yumurtalıklar cerrahi yöntemle çıkartılabilir (ooferektomi), ilaç veya düşük dozda radyasyon uygulaması ile östrojen üretimi durdurulabilir.

Radyoterapi: Bu yöntem, kanser hücrelerinin yüksek enerjili ışın verilerek öldürülmesidir. Radyoterapi cerrahi tedaviden sonra kanserin tekrarlamasını engellemek için veya meme kanserinin metastazı durumunda kullanılır (Darby ve ark., 2005). Meme koruyucu olarak cerrahi sonrası radyoterapi uygulanır. Çünkü radyoterapinin meme kanserinin tekrarlama riskini yaklaşık % 50 oranında ve meme kanseri ölüm riskini ise yaklaşık % 20 oranında azalttığı bilinmektedir (Darby ve ark., 2005). Lenf nodu metastazı olan veya beş cm'den daha büyük tümör çapına sahip mastektomi hastalarına radyoterapi uygulanır. İleri evre meme kanseri hastalarının tedavisinde radyoterapi kullanılır.

Kemoterapi: Kanser hücrelerinin öldürülmesi veya çoğalmasını kontrol etmek amacıyla çeşitli ajanların (kemoterapötik) kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Tümörü tamamen yok etmek veya küçülmesini sağlamak, hastayı tamamen iyileştirmek veya kanserin metastazını engellemek için kemoterapi uygulanır. Bunun için farklı mekanizmalara sahip antineoplastik ilaçlar genelde kombine kullanılarak sinerjistik etki amaçlanır. Meme kanserinde en çok kullanılan ilaç kombinasyonları; Adriamycin-Cyclophosphamide (AC), Cyclophosphamide-Adriamycin-Fluorouracil (CAF), Epirubicin-Cyclophosphamide (EC) ve Fluorouracil-Epirubicin-Cyclophosphamide (FEC)'dir (Kapse-Mistry ve ark., 2014). Kemoterapi tedavisinin etkinliği, verilen ilaçlar, ilaçların dozu, hastanın durumu, gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Kemoterapi tek başına ya da başka tedaviler ile kombine bir şekilde uygulanabilir (Organization, 2006). Uygulama amacına göre kemoterapi çeşitleri;

- **Adjuvan tedavi:** Ameliyat veya radyoterapi sonrası uygulanan kemoterapidir. Bu tedavi kanser hücrelerinin yeniden çoğalmasını engellemek amacıyla yapılır.
- **Neoadjuvan tedavi:** Cerrahi tedavi öncesi tümörü küçültmek için uygulanan kemoterapidir.
- **Metastatik tedavi:** Metastaz yapmış kanser hücrelerini öldürmek amacıyla yapılan tedavidir.

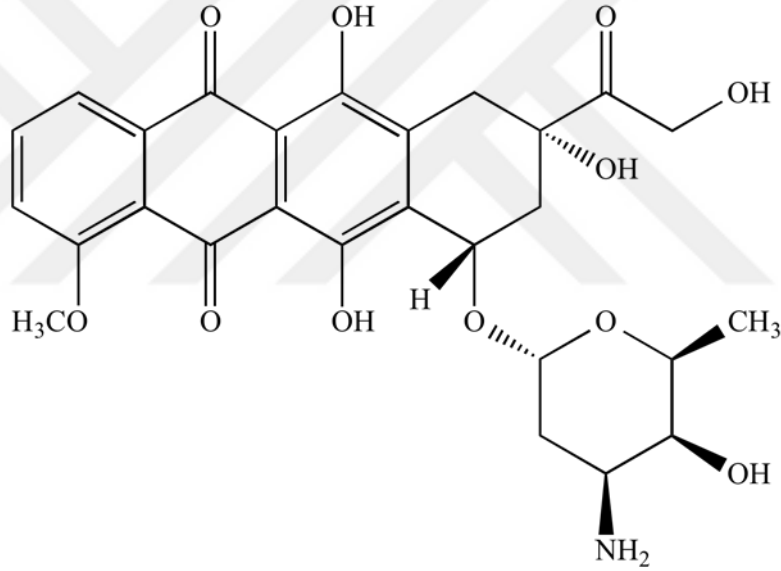
Kemoterapötik ajanların kullanımı, kemoterapinin etkinliğini engelleyen birçok sınırlamayı da beraberinde getirir. Bunlardan birincisi kemoterapötik ajanların çözünürlüğünün kötü olmasıdır. Bu uygulamada zorluk oluşturur. İkincisi vücutta spesifik bir şekilde dağılmadıklarından dolayı tümöre yetersiz nüfuz etmeleridir. Üçüncüsü sağlıklı dokulara zarar vermesidir. Dördüncüsü ise ilaç direncine sebep olmalarıdır (Creixellve Peppas, 2012). Günümüzde klinik yaklaşımlar kemoterapötik ilaçların sistemik uygulanmasına dayanmaktadır. Bu tedaviler ilaçların fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanan farmakokinetik faktörler ve çözünürlüklerinin düşük olması sebebiyle sınırlıdır. Ayrıca bu tedavilerde genellikle vücutta hızlıca bölünen saç, deri, dalak ve karaciğer gibi diğer organlar da hedef olmakta ve toksik etki oluşmaktadır. Uygulanan dozun ancak sadece küçük bir bölümü hedeflenen kanserli bölgeye ulaşip istenilen etkiyi gerçekleştirebilir. Tümöre uygulanan ilacın sınırlı dozu bile ilaç direncinin gelişmesine neden olabilir. Bu yüzden anti-kanser ajanlarının nanopartiküller kullanılarak iletilmesi bu yıkıcı yan etkilerin üstesinden gelmeye yardımcı olabilir (Chrastina ve ark., 2011).

2.2. Doksorubisin

Doksorubisin (adriamisin; Dox), çeşitli kanserleri tedavi etmek amacıyla kemoterapide kullanılan antrasiklin tipi (antineoplastik) geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. İlk antrasiklinler, 1960 yılının başında, Adriatik Denizi yakınlarında bulunan bir mantar türü olan *Streptomyces peuceitus*'dan izole edilmiştir (Singal ve ark., 2000). Dox, 1969'da ilk tedaviye giren ve grubun en yaygın kullanılan üyesidir (Cottin ve ark., 1994). Dox, polisiklik, aromatik ve kırmızı pigmentli antitümöral bir antibiyotiktir (Lown, 1993). Özellikle meme, akciğer, tiroid, gastrik, pankreas, hepatik, testis, lösemi,

yumuşak doku, lenfoma kanseri ve kemik tümörlerinin tedavilerinde kemoterapatik ilaç olarak kullanılmaktadır (Hortobagyi, 1997).

Doksorubisin, aglukonik ve şeker kısımlarına sahip, seçici olmayan bir antrasiklidir. Aglukon kinin-hidroksikinon komşu grupları, metoksi grubu kısa yan zincir ve bunu takip eden karbonil grubunun oluşturduğu bir tetrasiklik halka içermektedir (Şekil 2.3). Şeker bileşeni (daunosamin) bir glikozidik bağ ile bu halkalardan birine bağlanmıştır. Yapıdaki şeker ve tetrasiklin halkasının varlığı ilaca antitümoral aktivite kazandırmaktadır. İlacın moleküler formülü $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ ve molekül ağırlığı 580.0gr/mol'dür.



Şekil 2.3. Doksorubisinin kimyasal yapısı

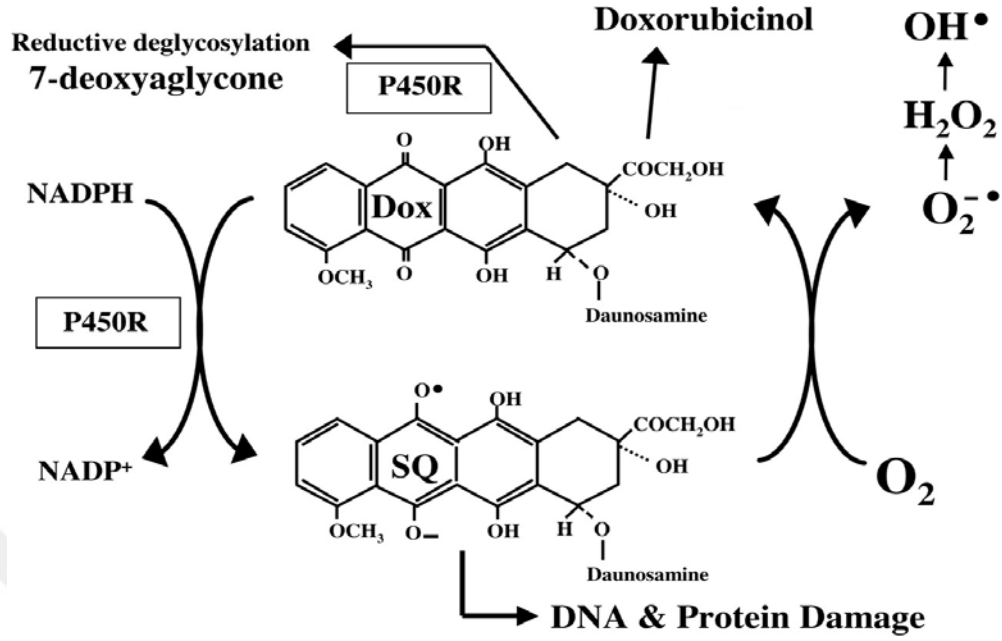
(<http://web.chem.ucla.edu /doxorubicin01.png> Erişim Tarihi: 15.04.2017)

2.2.1. Etki Mekanizması

Dox, çekirdekdeki DNA baz çiftlerinin arasına girerek topoizomeraz II ve helikazı inhibe etmektedir. Dox etkisini üç farklı kimyasal reaksiyonla göstermektedir. İlk iki reaksiyon Dox'ın hücre transport zinciriyle etkileşimi ile gerçekleşir. Üçüncü reaksiyon ise kromofor olan yan zincirin doksorubisin redüktaz tarafından karbonile indirgenmesi ile meydana gelir. Bu enzimatik olay için NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) gerekmektedir. Sonuç olarak antiproliferatif ve antineoplastik etkiye sebep olan

doksorubisinol açığa çıkmaktadır (Minotti ve ark., 2004). Dox'in tümör ve organlardaki sitostatik ve sitotoksik etkilerini açıklayan başlıca mekanizmalar:

1. **Yüksek afinite ile DNA'ya bağlanma:** DNA ile etkileşerek RNA sentezi dahil DNA'nın birçok fonksiyonunu bozar. Tek ve çift-zincir kırılmaları oluşur. Bu nedenle antrasiklinler mutajenik ve teratojenik etki gösterirler (Chabner ve ark., 2001). Dox'in etki mekanizmaları arasında topoizomerez II inhibisyonu, doksorubisin-demir kompleksinin DNA ile bağlanması ve DNA baz çiftlerinin ilaç ile etkileşmesi gibi radikale bağlı olmayan mekanizmalar ve serbest radikal üretimi ile DNA hasarı yer almaktadır (Li ve ark., 2000).
2. **Hücre membranı üzerinden:** Hücre membranıyla etkileşim sonucunda lipid peroksidlerinin oluşumuna neden olur. Doksorubisin'in yol açtığı lipid peroksidasyonu, membran potansiyelinde ve akışkanlığında azalmaya, membranın iyon geçirgenliğinde artışa ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açar. Bu durum gerek antitümör etkisinde ve gerekse kardiyak toksisitesinde önemli rol oynar (Chabner ve ark., 2001).
3. **Serbest radikal ürünlerine dönüşüm:** Dox'un sitokrom P450 redüktaz ile reaksiyonu sonucu semikinon radikali oluşur. Bu radikalin ise oksijenle reaksiyonu süperoksit anyonunu oluşumuna sebep olur. Süperoksit anyonu, hem hidrojen peroksit hem de hidroksil radikali oluşumunda rol oynar. Bu radikallerin de DNA bazlarını okside etmesi sonucu DNA hasarı meydana gelir. Serbest radikallerin üretimi büyük oranda Dox-demir kompleksi aracılığı ile olur (Chabner ve ark., 2001). Dox'un, Fe^{3+} 'e yüksek afinitesi vardır ve *in vivo* sistemlerde Fe^{3+} ile şelat oluşturur. Dox- Fe^{3+} kompleksi hidroksil radikali oluşumunu katalize eder.



Şekil 2.4. Apoptozisde meydana gelen morfolojik değişimler. (Riddick ve ark., 2005)

2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

Doksorubisin vücuda intravenöz yolla (i.v.) verilir (Türkerve Kayaalp, 2002). Doku hasarı yapmasından dolayı intramuskuler ve subkutan olarak, asit ortamda stabil olmamasından dolayı ise oral yolla hastaya verilmesi uygun değildir (Hidegve Kalai, 2007). İV uygulamadan sonra çok hızlı bir şekilde parçalanır ve kalp, karaciğer ve dalak dokularında birikir (Lipshultz ve ark., 2006). Tümör dokusu en yüksek doku konsantrasyonunu içerir (Robertve Gianni, 1993). Karaciğerde hızlı metabolize edilir, ancak dokulara fazla bağlanır yavaş salınır. Dolayısıyla Dox'un vücutta kalış süresi ve etkisi uzun sürer. Eliminasyon yarı ömrü 73 saattir (Türkerve Kayaalp, 2002). Vücuttan atılması karaciğer ve böbreklerden gerçekleşir. Doksorubisinol ve daunorubisinol olarak vücuttan atılır. Hidroliz sonucu vücutta kısmen serbest kalan aglukon kısmı etkinlik göstermez (Türkerve Kayaalp, 2002). Dox kan-beyin bariyerini geçememektedir (Chabner ve ark., 2001). Doksorubisin 60-75 mg/m² dozunda i.v. infüzyonla 3 haftada bir uygulanır. Dox'un hastaya verilen toplam kümülatif dozunun 550 mg/m² yi geçmemesi gerekmektedir. Özellikle hastada risk faktörleri varsa (kalp hastalığı, radyoterapi tedavisi verilmiş olması ve 50 yaşın üzerinde olma) bu sınır daha aşağıya çekilebilir (Türkerve Kayaalp, 2002).

2.2.3. Klinik Uygulamada Karşılaşılan Problemler

Birçok ilaç gibi Dox da hücreye pasif difüzyon ile girmekte ve hücre içinde konsantrasyonu 10-50 kat artarak birikmektedir. Dox, çekirdekte sitoplazmadaki miktarından 50 kat daha fazladır. Serbest hücre içi Dox (hücreye giren toplam ilacın % 2'si) diğer organellere (golgi aparatı, lizozom ve mitokondri) rastgele olarak dağılmaktadır (Lal ve ark., 2010). Karaciğerin metabolizmadaki önemli rolü dolayısıyla, muhtemelen Dox en çok karaciğerde birikmektedir. Ayrıca, Dox'un akyuvar ve kemik iliğindeki konsantrasyonu, plazmadakinden 200-500 kat daha fazladır. Dox'un dokulara bu kadar hızlı bir şekilde dağılması, kandaki miktarının hızla azalmasına neden olmaktadır.

Doksorubisinin klinikte saç dökülmesi, gastrointestinal toksisite, kemik iliği supresyonu, nefrotoksisite, mukozit, radyosensitizasyon, ekstrevasiyon zedelenmesi ve kardiyotoksisite gibi yan etkileri bulunmaktadır (Schimmel ve ark., 2004). Doksorubisin vezikan bir ilaçtır ve ekstrevasiyonu doku nekrozuna neden olur. Ayrıca teratojenik, mutajenik ve karsinojeniktir (Türker ve Kayaalp, 2002). İlacın kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi kardiyak toksisitedir. Enjeksiyondan (İ.v.) sonra vücuttaki dağılımı sırasında, Dox'u plazmadan en hızlı olarak alan dokulardan birisi kalp dokusudur. Dox kardiyotoksitesini, serbest radikal ürünleri oluşturmasından, Dox'un kardiyolipine bağlanmasından ve Dox'un kalsiyum metabolizmasını değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Dox'un bu etkileri kalp mitokondri yapı ve fonksiyon bozukluğuna ve kalp kas kontraktile kabiliyetinin azalmasına neden olmaktadır (Wallace, 2003). Kardiyomyopatinin görülmesi, kemoterapinin bitmesinden 10-15 yıl sonrasında bile olabilmektedir. Kardiyomyopatinin görülme ihtimali büyük ölçüde doza bağımlı olsa da; kardiyomyopati, bireyin artan duyarlılığına bağılı olarak düşük dozlarda da ortaya çıkabilmektedir (Jain, 2000).

Doksorubisin ile kanser tedavisinin başlangıcında iyi yanıtlar alınmasına rağmen, daha sonra gelişen Dox-direnci klinikte büyük bir problemdir ve tedavinin başarısız olmasının en önemli nedenidir (Esteve ve ark., 2001). Meme kanserinde çeşitli mekanizmaların Dox-direncine aracılık ettiği önerilmiştir. Bu mekanizmalardan bir tanesi çoklu ilaç direnci (Multi-drug resistance, MDR) proteinlerinin ve P-gp gibi diğer plazma

membranındaki çoklu ilaç taşıyıcılarının aşırı sentezlenmeleridir (overeskrepre) (Walker ve ark., 2004). Bu aşırı sentezlenen membran protein pompaları (ABC transporters), ilaçların hücre dışına atılmasına ve kanser hücrelerinin ilaç-dirençli fenotip bir hücreye dönüşmesine neden olurlar. Sonuç olarak kanser hücrelerinin apoptozise gitmesini zorlaştırırlar (Ruiz de Almodovar ve ark., 2001; Gariboldi ve ark., 2003; Pommier ve ark., 2004; Zilli ve ark., 2009).

2.3. Apoptozis

Apoptozis 'apo' =ayrı, 'ptosis' =düşmek kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (Cummings ve ark., 1997). Apoptozis kelimesi ilk kez Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür (Simstein ve ark., 2003). Apoptozis terimi Kerr ve arkadaşları tarafından programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Simstein ve ark., 2003). Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Apoptozis, embriyo döneminden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda izlenir. Apoptozis fizyolojik olarak doku gelişimi, hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımı (remodelling), normal hücre sirkülasyonu (turnover) ve immün cevap regülasyonu gibi süreçlerde rol olarak doku homeostazisinin devamlılığını sağlar. İnsanlarda normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır (Hungve Chow, 2004).

Apoptozis, yaşamın gerekli bir parçasıdır. Bağışıklık sisteminde, gelişme ve hücrel homeostazis gibi birçok biyolojik süreçte, istenmeyen ya da fazla üretilmiş hücrelerin yok edilmesi için, apoptozis gereklidir. Apoptozisin regülasyonunun bozulması, kanser, otoimmünite, nörodejenaratif hastalıklar, hemopoiyetik bozukluklar ve infertilite gibi klinik bozukluklarla ilişkilidir (Hunotve Flavell, 2001; Kiechleve Zhang, 2002). Belirli beyin nöronlarındaki kontrolsüz apoptozis, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıkların oluşumunu destekleyebilir, tam tersine DNA hasarına maruz kalmış hücrelerin apoptozis ile yok edilememesi ise kanser oluşumuna neden olabilir (Ashkenazive Dixit, 1998).

2.3.1. Hücre Ölümünün İki Şekli: Apoptozis ve Nekrozis

Apoptozis ve nekrozis, farklı şartlarda indüklenen, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri farklı olan, hücre ölümünün iki değişik şeklidir (Leeve Shacter, 1999). Nekrozis, geri dönüşümsüz hasar sonucu oluşan ve hücrenin ölümüne yol açan pasif bir olaydır. Nekrozis, aşırı stres koşulları veya toksik ajanların neden olduğu akut hücresel disfonksiyonun bir sonucudur ve hızlı ATP tüketimi kendisine eşlik eder (Chandra ve ark., 2000). Nekrozisle ölen hücreler, şişerek lizize uğrar. Açığa çıkan hücre içerikleri, komşu hücreleri etkileyerek ve proinflamatuvar hücreleri lezyon alanına çekerek, daha ileri doku hasarına sebep olur ve inflamatuvar bir yanıt oluşturur (Chandra ve ark., 2000).

Apoptozis, morfolojik ve biyokimyasal olarak farklı, yaşlanmış, hasarlı ya da gereksiz hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmasına olanak sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis, hücre değişimi, doku yenilenmesi ve hasarlı hücrelerin uzaklaştırılması için yaygın bir mekanizmadır (Chandra ve ark., 2000; Haddad, 2004). Nekrozis patolojik bir olaydır; apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir. Apoptozisin nekrozise göre birçok avantajı vardır. Apoptotik hücreler, fagositler tarafından temizlenip, intraselüler olarak parçalanırlar. Böylece inflamatuvar yanıtın indüksiyonu önlenerek çevre dokular hasardan korunur (Shacter ve ark., 2000). Apoptozis, hücre büzülmesi, kromatin kondansasyonu, membran kabarcıklarının oluşumu (blebbing), oligonükleozomal DNA fragmentasyonu, komşu hücreler veya fagositler tarafından fagosite edilen apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterize edilen, iyi düzenlenmiş kompleks bir olaydır (Chandra ve ark., 2000; Shacter ve ark., 2000).

Apoptotik süreç, hem eksternal hem de internal faktörler tarafından başlatılabilir (Blattve Glick, 2001). İnternal faktörler sıklıkla reseptör aracılıdır ve FAS reseptörü, TNF (Tümör Nekroz Faktörü) ailesi reseptörleri ve purinerjik reseptör P_{2Z} apoptozisle ilgilidir. Büyüme faktörlerinin eksikliğinin ve hormon konsantrasyonlarının değişiminin lenfosit, memeli ve prostatik hücreler gibi hassas hücrelerde, apoptozisi başlattığı gösterilmiştir. Apoptozisi indükleyen eksternal tetikleyiciler, DNA hasarını, oksijen veya besin eksikliğini ve viral enfeksiyonları içermektedir. Oksidatif stres, iyonize ya da UV radyasyon, kemoterapötik ajanlar, yüksek ısı, büyüme faktörleri, hormon azalması,

glukokortikoidler, sitokinler gibi birçok uyarıcı ve onarılamayan DNA hasarı apoptozisi başlatabilir (Haddad, 2004).

DNA'ya hasar veren uyarıcılara maruz kalındığında, bir hücrenin apoptozis ya da nekrozis tarafından öldürüleceği, DNA hasarının tipine, maruziyetin süresine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Ayrıca apoptozis kurtarıcı moleküllerinin varlığına ve tetikleyici moleküllerin fonksiyonuna da bağlıdır (Guchelaar ve ark., 1997). ATP'nin hücre içi konsantrasyonu, hücre ölüm şeklinin seçilmesinde önemlidir. ATP'nin yüksek konsantrasyonda olması apoptozisin baskın olmasına sebep olurken, ATP'nin düşük konsantrasyonda olması hücrenin nekroze doğru kaymasına sebep olur (Simstein ve ark., 2003).

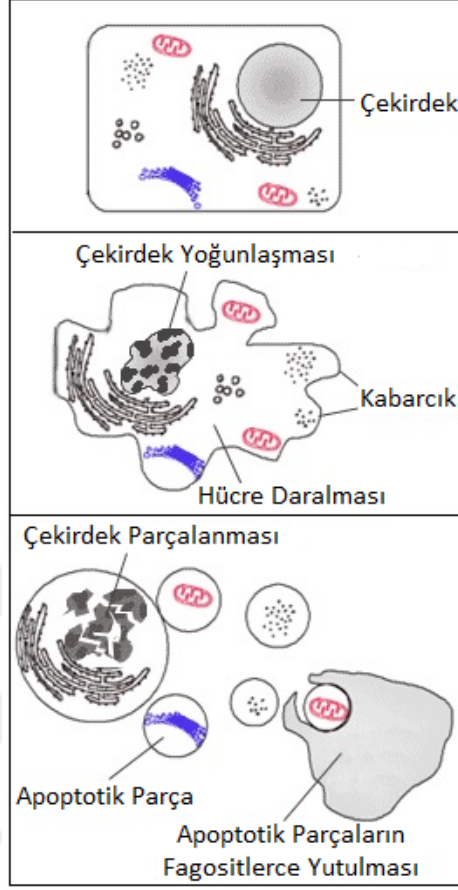
2.3.2. Apoptozisin Aşamaları

Apoptozis 3 aşamaya ayrılabilir. İlk aşamada, hücre apoptotik bir sinyal alır. Hücreye, hem içten hem de dıştan gelen çeşitli uyarıcılar, apoptotik yolları aktive edebilir. Bunlara örnek olarak, hücre yüzey reseptörlerinin bağlanma ile uyarılması, esansiyel büyüme faktörlerinin ortamdan uzaklaştırılması ya da hücrelerin çeşitli kimyasal ajanlara maruz bırakılması verilebilir. Bunlara ek olarak, hücrelerin UV ya da iyonize radyasyona, ısıya ve osmolarite değişikliklerine maruz kalmaları, apoptozisi uyarabilir. Apoptozisin ikinci aşamasında hücreler tüm bu çeşitli sinyalleri toplar ve apoptozisi devam ettirir ya da ettirmez. Bu olaylar aktivasyon-inaktivasyon, serin/treonin ve tirozin kinaz, fosfataz ve seramidleri de içeren lipid ikincil mesajcıların sentezi, değişmiş gen ekspresyonları ve kaspaz olarak bilinen özel proteazların aktivasyonu gibi birçok sinyal yollarını içerir. Apoptozisin devamı için son karar, apoptotik ve hayati faktörlerin (Bcl-2 grubu proteinleri içerir) göreceli düzeyleri, hücrelerin metabolik durumları ve hücre siklus durumu gibi birçok faktöre bağlıdır. Son çalışmalar birçok apoptotik uyarıcının mitokondri tarafından alınıp değerlendirildiğini göstermiştir. Apoptozisin son aşamasında genel yıkıcı bir sinyal yolağı aktive olur ve apoptozis ile ilgili karakteristik morfolojik değişiklikler tetiklenir (Blattve Glick, 2001; Simstein ve ark., 2003)

2.3.3. Apoptozisde Meydana Gelen Biyokimyasal ve Morfolojik Değişimler

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü hücre büzüşmesi, kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, membran cepcikleri ve apoptotik cisim oluşumu gibi morfolojik

değişimler ile tanımlanır. Biyokimyasal olarak apoptotik hücreler, mitokondriyal transmembran potansiyelin azalması, hücre içi asidifikasyon, reaktif oksijen türlerinin üretimi, fosfotidilserinin membranın iç yüzünden dış tarafına çıkması gibi olaylarla karakterize edilir (Carmodyve Cotter, 2001; Curtinve Cotter, 2003) Apoptozisin başlangıcında çok hafif değişiklikler meydana gelirken hücre membran bütünlüğü korunmaktadır. Daha sonra hücre, fagositler (makrofaj ve dendritik hücreler) tarafından in vivo olarak alınan, membranla çevrili fragmentlere (apoptotik cisim) parçalanır (Şekil 2.5). Apoptozisin geç döneminde, apoptotik cisimlerin plazma membranı, bütünlüğünü kaybeder ve bu olay sekonder nekroz olarak tanımlanır (Vermeulen ve ark., 2005). Apoptotik hücrelerin bir başka özelliği, transglutaminazların ekspresyonu ve aktivasyonu ile meydana gelen yoğun protein çapraz bağlanmalarıdır. Kalsiyum ve magnezyuma bağlı endonükleazlar tarafından DNA'nın kırılması, 180-200 baz çiftlik DNA parçalarının oluşumu ile sonuçlanır. Bu kırıklar, UV ışığı altında etidyum bromid boyasıyla agaroz jel elektroforezinde "DNA merdiveni" olarak tanımlanan karakteristik merdiven görüntüsünü verir (Elmore, 2007). Sitozolik serbest kalsiyum ve magnezyumun artması ve sitozolik pH'ın ve potasyumun azalması apoptozise katkıda bulunmaktadır. Fosfotidil serinin plazma membranının dış tarafına çıkması apoptozise uğrayan hücrelerde evrensel bir olaydır. Fosfotidilserinin membranın dış tarafında bulunması, büyük olasılıkla, nekrozda oluşan inflamasyondan farklı olarak, inflamasyona neden olmadan apoptotik hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması içindir. Fosfotidilserin, membranın dış tarafından iç tarafına aminofosfolipid translokazlar tarafından geçirilir. Bu mekanizma tamamen anlaşılammıştır. Apoptozis sırasında membranın dış tarafında fosfotidilserinin görülmesinin, hem aminofosfolipid translokaz aktivitesinin kaybından, hem de fosfolipidlerin spesifik olmayan membran boyunca hareketinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Bratton ve ark., 1997). Nötral ya da asidik sfingomiyelinazların aktivasyonu, apoptozisin pek çok modelinde meydana gelmektedir. Bu olay sfingomiyelinden seramidin üretimine yol açar. Seramid, proapoptotik sinyal kaskadını aktive eder. Transglutaminazlar tarafından proteinlerin çapraz bağlanması, hücrenin parçalanması esnasında, apoptotik cisimlerin oluşmasında etkilidir.



Şekil 2.5. Apoptozisde Meydana Gelen Morfolojik Değişimler

(<https://tr.wikipedia.org/File:Apoptosis-blank.png> Erişim Tarihi: 15.04.2017)

Apoptozis aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonun kaybı ile de karakterizedir. Apoptozisle ölen hücreler, plazma membran bütünlüğünü korurlar. Ancak apoptotik hücrelerin plazma membranlarındaki değişim, fagositik hücreler tarafından alınmaları için sinyal verir ve böylece degradasyon süreci tamamlanır. Hücreler, apoptotik cisimlere parçalanarak fagositik hücreler tarafından fagosite edilirler (Şekil 2.5). Apoptozisin önemli bir özelliği ölen hücrelerin inflamasyona yol açmadan ortadan kaldırılmasıdır. Buna karşın nekrotik hücreler, erken membran bütünlüklerini kaybederler. Bu da sitoplazmik içeriklerinin dış ortama sızması ve o bölgede inflamasyon gelişmesi ile sonuçlanır (Thompson, 1995).

2.4. NF- κ B Yolağı

NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), DNA bağlanmada işlev gösteren p50 ve p52 alt üniteleri ve transkripsiyonel aktivasyon görevi gören p65 (RelA, RelB ve RelC) alt

ünitelerinden oluşmaktadır. Herhangi bir uyarım olmaksızın inhibitör kappa B (IκB) proteini (Iκ-Bα, Iκ-Bβ, Iκ-Bγ Iκ-Bε) tarafından sitoplazmada inaktif bir durumda tutulur. Birçok büyüme faktörü ve sitokin ailesi aracılığıyla aktive olan PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından aktive edilen IκB Kinaz α (IKKα), IκB proteinlerini fosforiller. Bu fosforillenme, IκB'nin ubiquitinasyon-proteozomal degradasyon sürecine girmesine yol açmaktadır. IκB'nin degradasyonu sonucunda serbest kalan NF-κB çekirdeğe geçerek transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleştirmektedir (Lin ve ark., 1995; Karin, 1999). Güncel çalışmalar, akciğer ve meme kanseri gibi epitelyal kanserlerin invazyonlarını regüle ettiği gösterilmektedir (Hu ve ark., 2014).

NF-κB çoğu agresif tümörlerde sürekli aktif durumda olup, akciğer ve meme kanseri gibi epitelyal kanserlerin progresyonları ile ilişkili proteinleri, miRNA ve lncRNA gibi kodlanmayan RNA moleküllerini regüle etme yeteneğine sahip bir transkripsiyon faktördür. Hem in vitro hem de in vivo kapsamında gerçekleştirilen birçok çalışmadaki gözlemler, NF-κB aktivasyonunun kanser hücrelerinin artan agresif özellikleri ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Wu ve ark., 2015). Ayrıca, insan solid tümörleri üzerine gerçekleştirilmiş meta-analiz çalışmaları, NF-κB aktivasyonunun Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarının kötü sağ kalımıyla ilişkili olduğunu ve akciğer, meme kanseri gibi epitel kökenli kanserlerin tedavisinde NF-κB inhibisyonunun potensiyel terapötik bir strateji olarak kullanılabileceği önerisini vermektedir (Zeng ve ark., 2014).

NF-κB, karsinogenezde kritik role sahip olan migrasyon, invazyon, sağ kalım, hücre çoğalması ve apoptozisten kaçış süreçlerinde rol alan 150'den fazla genin transkripsiyonel regülasyonundan sorumludur. Örneğin; kanser hücrelerinin invazyonları süreçlerinde kritik öneme sahip olan MMP-2 ve MMP-9 proteinlerini transkripsiyonel olarak regüle etmektedir (Liu ve ark., 2010).

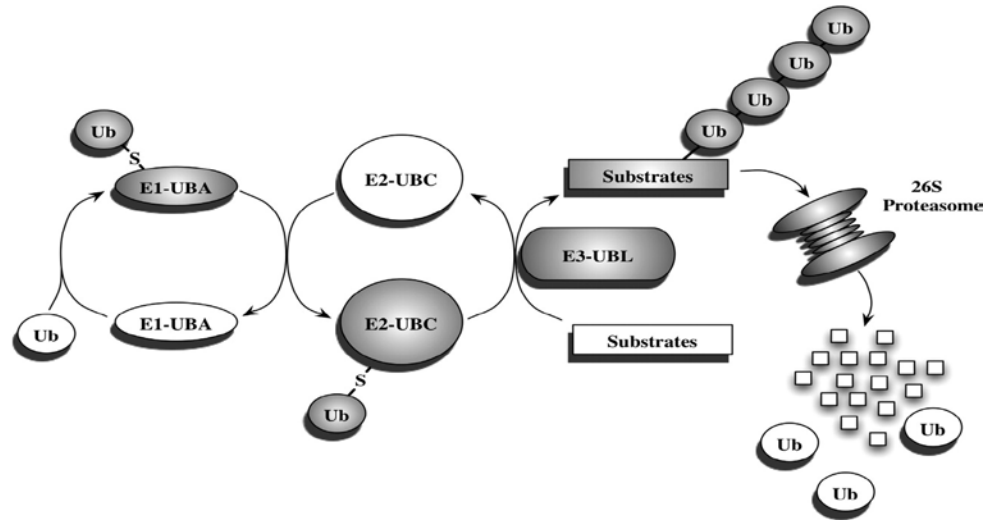
NF-κB, meme bezlerinin normal lobuloalveolar gelişimi için gereklidir (Srivastava ve ark., 2003). Ama NF-κB'nin aşırı aktivasyonu meme kanser progresyonunun farklı aşamaları ile ilişkilidir (Biswasve Iglehart, 2006). NF-κB'nin yüksek aktivasyonu, tedaviye aşırı direnç gösteren HER2(+) (Human Epidermal Growth Factor Receptor) ve ER(-)(Estrogen Receptor) meme kanser türlerinin %86'sında görülmektedir. HER2,

(ErbB2 olarak da isimlendirilir) reseptör tirozin kinaz aktivitesine sahip EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ailesi üyesidir. HER2'nin aşırı ekspresyonu, meme kanseri hastalarının kötü prognozları, ilaca dirençlilikleri ve agresif progresyonları ile yakından ilişkilidir. Bu sonucun altta yatan mekanizmalarından biri, HER2 ve NF- κ B arasındaki ilişkidir. HER2, IKK aracılığıyla I κ B'nin proteozomal degradasyonu yolunu açarak NF- κ B aktivasyonunu indükleyebilmektedir. Ayrıca; NF κ B, transkripsiyonel olarak HER2'nun ekspresyonunu indükleyebilmektedir (Ahmed ve ark., 2006). NF- κ B, meme kanseri için biyobelirteç olarak kullanılan kronik inflamasyon ile ilişkili C-reaktif protein (CRP) ve metastaz için önemli bir role sahip olan uPA (urokinase-type plasminogen activator) genleri regüle etmektedir (Pierce ve ark., 2009; Schmitt ve ark., 2010). Meme kanseri progresyonu süresince NF- κ B, kanser hücrelerinin transformasyonları sonucu ortaya çıkan içsel faktörler tarafından da aktive olabilmektedir. Bu faktörlerden biri, oksidatif stress ve DNA hasarı sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türleridir (ROS). Kanserleşme sürecinde ortaya çıkan bu ROS'lar aracılığıyla aktive olan NF- κ B, inflamasyonu artıran Cox-2 (Cyclooxygenase-2) ve iNOS (Inducible nitric oxide synthase) gibi moleküllerin ekspresyonunu indüklemektedir. Meme kanserine spesifik olarak, östrojene aşırı seviyede maruz kalan meme kanser hücreleri, aşırı ROS üretimini indüklemek suretiyle NF- κ B'nin aşırı aktivasyonuna yol açmaktadır (Shao ve ark., 2008; Min ve ark., 2011). Pre-klinik düzeyde, I κ B'nin proteozomal degradasyonunu dolayısıyla NF- κ B'nin aktivasyonunu engelleyen birçok NF- κ B inhibitörü kullanılmaktadır. Bu inhibitörler, meme kanser hücrelerinin çoğalmalarını önemli ölçüde azaltabilmektedir. Ancak, NF- κ B sinyal yolağının yüksek kompleks özelliği ve bu yolda rol alan faktörlerin fonksiyonel mekanizmalarının yeteri seviyede anlaşılammış olması, klinik denemeler için bir engel teşkil etmektedir (Lingve Kumar, 2012). Bu nedenle, NF- κ B aktivasyonunu doğrudan I κ B'nin proteozomal degradasyonunu inhibe etme yeteneğinde olan NF- κ B inhibitörlerinin nanopartiküller aracılığıyla kanser dokularına uygulanması, NF- κ B'nin aşırı aktive olduğu meme kanser hastalarının tedavileri için önemli bir strateji olabilir.

2.5. Ubikitin-Proteazom Yolağı

Hücre içinde oluşan anormal proteinler (yanlış katlanmış) veya zamanla oluşan istenmeyen proteinler, ubikitinlerle işaretlenir ve proteozom kompleksi (26S proteazom)

aracılığıyla yıkılır (Yewdell, 2001). Ubikitin, 76 aminoasit içeren küçük bir hücrel proteindir. Ubikitin aktifleştirici enzim (E1), ubikitin konjuge edici enzim (E2) ve ubikitin ligaz (E3) olarak adlandırılan üç enzimin sırasıyla etkinleşmesi ile hedef substratlara bağlanır ve onları proteoliz için proteozom kompleksine yönlendirir (Şekil 2.5). Ubikitin proteini hücrelerin habis hücreye dönüşümündeki hücre içi sinyaller, immün sistem yanıtı hücre çoğalmasını ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleküler homeostatik mekanizmaya katılır (Spataro ve ark., 1998). Proteozom kompleksi (26S), hücre siklusunun düzenlenmesinde ve ubikitinle işaretlenen proteinlerin yıkımında çok önemli rolü olan bir proteaz kompleksidir. Proteozom kompleksi yapısal olarak bozulmuş veya okside olmuş hücrel proteinleri aminoasitlerine kadar parçalayarak protein dönüşümünü sağlar (Meng ve ark., 1999). Substrat proteinin 26S proteozomal yıkıma yönlendirilebilmesi için en az dört ubikitin molekülünden oluşan bir poliubikitin zinciri ile bağlanmış olması gereklidir. Bir proteinin ubikitin-proteozom yolağı aracılığı ile yıkılması iki aşamayla olur (Şekil 2.5): Önce hedef substrat çoklu ubikitin zincirlerine kovalent olarak tutunur, sonra ise tutunan protein, ubikitini serbest bırakacak şekilde yıkılır (Glickmanve Ciechanover, 2002).



Şekil 2.6. Ubikitin-proteozom yolağı. Ub: ubikitin; E1-UBA, ubikitin-aktivasyon enzimi; E2-UBC, ubikitin konjugasyon enzimi; E3-UBL, ubikitin ligaz (Reid, 2005)

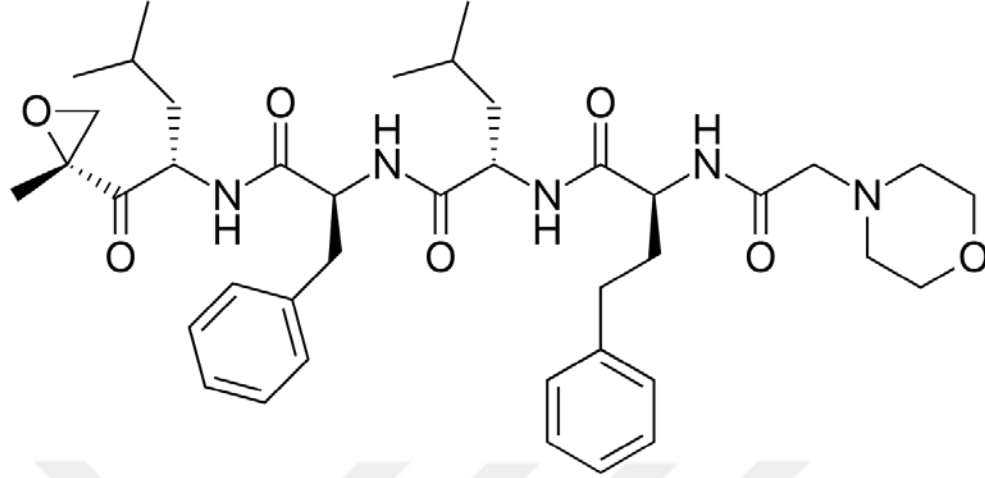
26S Proteozom, bir 20S ana yapıdan ve iki 19S düzenleyici yapıdan oluşan 40'dan fazla alt birim içeren 2400 kDa'luk bir proteaz kompleksidir (Wu ve ark., 2010). Proteozom kompleksinin çalışma şekli ve rolü son yıllarda aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Okside

olmuş ya da yapısı bozulmuş proteinlerin yanında aynı zamanda birçok pro- ve anti-apoptotik protein de, proteozom kompleksinin substratı olarak tanımlanmıştır (Nagy ve ark., 2006).

2.5.1. Proteozom İnhibitörleri ve Epoksomisin

Epoksomisin (Epo), bortezomib, MG132 ve lactacystin (laktasistin) en iyi bilinen ve en önemli proteozom inhibitörleridir. Bunlar çeşitli etki mekanizmaları ile ubiquitin proteozom yolağını proteozom üzerinden inhibe etmektedirler. Proteozom inhibitörleri ile yapılan araştırmalar hücre içi proteinlerinin yaklaşık olarak %80-90'ının yıkımında proteozom kompleksinin gerekli olduğunu göstermektedir. Proteozom kompleksi (26S) ile yıkılan proteinler arasında poliamin biyosentez enzimleri; ornitin dekarboksilaz, S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz, hücre yaşamında anahtar rol oynayan proteinlerden transkripsiyon faktörü c-Fos, M-, S-, G1- fazı spesifik siklinleri, siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri, hücre apoptozisinde rol alan önemli proteinler, p53, NF-κB inhibitörü IκB ve onkogenler bulunmaktadır (Pagano, 1997; Tu ve ark., 2012).

Epoksomisin *in vivo* ve *in vitro* olarak anti-inflamatuar etkinliği iyi bilinen hücre içine geçebilen bir proteozom inhibitörüdür (Meng ve ark., 1999). Epoksomisin, Actinomyces bakterilerinden izole edilmiş epoksi-keeton yapısında doğal bir proteozom inhibitördür (Hanada ve ark., 1992) (Şekil 2.6). Epoksomisin doğal, yüksek derecede seçici ve geri dönüşsüz olması önemli özelliklerindedir (Hanada ve ark., 1992; Meng ve ark., 1999; Glickman ve Ciechanover, 2002; Hetschko ve ark., 2008; Wu ve ark., 2010). Epoksomisin, proteozomal proteazlara seçici olmasına rağmen diğer bazı proteozom inhibitörleri, örneğin MG132 ve lactacystin, proteozomal proteazlara seçici değildir. Bunlar proteozomal proteazları geri dönüşümlü olarak inhibe etmesinin yanında katepsin B, kalpan, papain, kimotripsin ve tripsin gibi diğer bazı proteazları da inhibe etmektedirler (Leeve Goldberg, 1998).



Şekil 2.7. Epoksomisin ($C_{28}H_{50}N_4O_7$) açık formülü.

Proteozom inhibitörleri birçok çalışmada kanser hücrelerine karşı yeni bir tedavi seçeneği olarak denenmektedir (Rajkumar ve ark., 2005; Sorolla ve ark., 2008). Meme kanseri hücreleri ile yapılmış olan bir çalışmada, bir proteozom inhibitörü olan bortezomib'in Dox ile kombinasyonunun MKP-1 protein seviyelerini azalttığı ve JNK aktivasyonunu artırarak hücrelerin apoptoze gitmesine neden olduğu gösterilmiştir (Small ve ark., 2004). Yine meme kanseri hücrelerinde yapılmış başka bir çalışmada ise, MG132 ile yapılan proteozom inhibisyonunun GSK-3 β 'ya bağlı otofaji aktivasyonuna bağlı olarak hücrelerin öldüğü gösterilmiştir (Gavilan ve ark., 2013). Bortezomib/PS (Velcade), Amerikan Food and Drug Administration (FDA) tarafından 2003 yılında Multiple Myeloma hastalarında kullanılmak üzere onaylanan ilk anti-kanser etkili proteozom inhibitörü olmuştur (Chauhan ve ark., 2005). En son olarak 2012 yılında, epoksomisin türevi olan epoksi-keton yapılı geri dönüşümsüz proteozom inhibitörü Carfilzomib yapılan klinik faz çalışmaları sonucu başarılı olarak bulunmuş ve Multiple Myeloma hastalığında kullanılmak üzere FDA tarafından onay almıştır (Fostier ve ark., 2012; McCormack, 2012). Bu gelişmeler proteozom inhibitörlerinin anti-kanser ve pro-apoptotik etkilerinin araştırılmasını daha da cazip hale getirmektedir.

2.6. Alternatif İlaç Taşıyıcı Sistemler

Meme kanseri tedavisinde kemoterapötik ilaçlar hayati önem sahiptirler. Fakat bu yöntemlerde kullanılan ilaçların sağlıklı doku ve organlar üzerine yan etkiler gösterdikleri ve risk potansiyeli taşıdıkları da bilinmektedir. Kemoterapötik ajanların

kullanımı kemoterapinin etkinliğini engelleyen birçok sınırlamayı da beraberinde getirmektedir:

- Kemoterapötik ajanların çözünürlüğü çok iyi değildir. Çözünürlüklerinin iyi olmaması uygulamada zorluk oluşturur.
- Vücuda verildiklerinde spesifik bir şekilde dağılmazlar. Uygulanan dozun ancak sadece küçük bir bölümü hedeflenen kanserli bölgeye ulaşır istenilen etkiyi gerçekleştirebilir.
- Normal hücrelere de girerek sağlıklı dokulara zarar verirler. En iyi geliştirilmiş kemoterapötik ajanların bile normal ve kanserli hücreler üzerindeki etkileri ayrılamamaktadır. Bu tedavilerde genellikle vücutta hızlıca bölünen saç, deri, dalak ve karaciğer gibi diğer organlar da hedef olmakta ve toksik etki oluşmaktadır.
- İlaç direncine sebep olurlar (Creixellve Peppas, 2012). Tümöre uygulanan ilacın sınırlı dozu dahi ilaç direncinin gelişmesine neden olabilir. Sonuç olarak terapötik etki uyandırmak için uygulanacak olan bir sonraki doz daha yüksek olacak ve daha şiddetli bir toksik yan etki sürecini tetikleyecektir.

Bu olumsuzlukların giderilebilmesi ve ilaçların tümör bölgesine hedeflenerek, gerekli olduğu kadar iletilebilmesi için spesifik olarak tasarlanmış yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ilaçların hedef dokulara taşınması için nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler araştırılmaktadır (Sinha ve ark., 2006). Bu çalışmalarda amaç; ve ilacın toksik etkilerini azaltmak, ilaç salınımını kontrol etmek ve ilaç verimliliğini arttırmaktır. Böylece konvansiyonel ilaçlara alternatif olarak ilaç taşıyıcı sistemler kanser tedavisi için umut vaat etmektedir.

İlaç taşıyıcı sistemlerde ilaç, taşıyıcı sistemle etkileşim halindedir. Bu etkileşim ilacın farmakokinetik özellikleri ve vücutta dağılımının düzenlenmesini sağlamaktadır. Nanopartiküller, farklı boyut ve özelliklerde taşıyıcılar olarak geliştirilmiş ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadırlar. Lipozomların da çeşitli avantajlarından dolayı bir taşıyıcı olarak kullanımı araştırılmaktadır. Ancak lipozomlar düşük

enkapsülasyon verimine sahiptirler, depolanma stabiliteleri yeterli değildir ve kanda suda çözünebilen ilaçları çok hızlı bir şekilde sızdırabilmektedir. Nanopartiküllerin lipozomlara göre depolama sırasında stabilitelerinin yüksek olması ve *in vivo* uygulamadan sonra da stabil kalmaları çok büyük bir avantajdır (Jahanshahive Babaei, 2008). Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler serbestleştirme mekanizmalarına veya uygulama yollarına göre sınıflandırılabilirler:

Serbestleştirme mekanizmalarına göre kontrollü ilaç taşıma ve salım sistemleri;

1. Difüzyon kontrollü sistemler
 - Membran sistemler
 - Matriks sistemler
2. Kimyasal kontrollü sistemler
 - Vücutta aşınan sistemler
 - Zincire takılı sistemler
3. Çözücünün harekete geçirdiği sistemler
 - Şişme kontrollü sistemler
 - Ozmotik kontrollü sistemler
4. Diğer sistemler
 - Manyetik kontrollü sistemler
 - Ultrasonik sistemler
 - Ortama duyarlı sistemler

Uygulama yollarına göre kontrollü ilaç taşıma ve salım sistemleri;

1. Mikrokapsüller ve mikroküreler
2. Nanopartiküller
3. Lipozomlar
4. İmplantlar
5. Biyoadeziv sistemler (mukozaya yapışan sistemler)
6. Oküler sistemler
7. Transdermal sistemler
8. Nazal sistemler
9. Bukkal sistemler

10. İntrauterin sistemler

11. İntravajinal aygıtlar

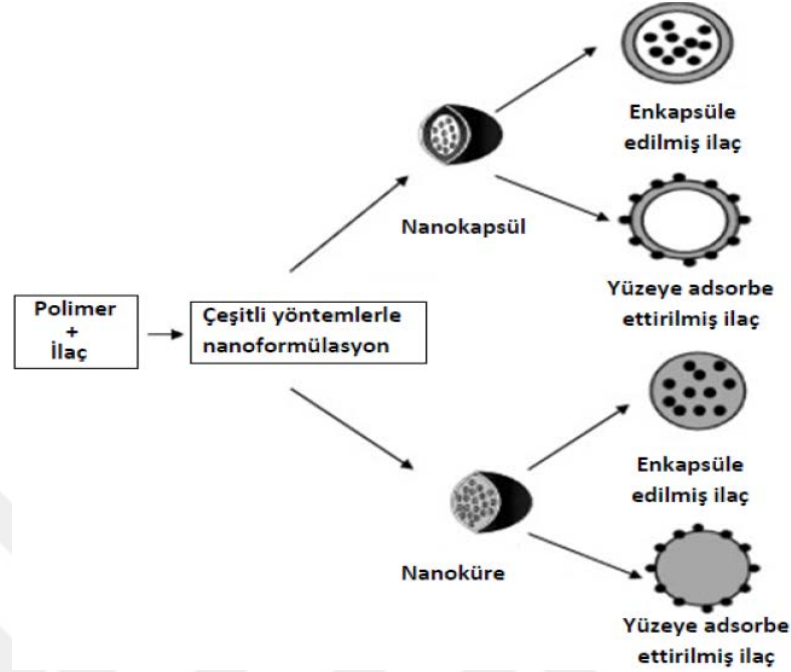
2.7. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Son yapılan çalışmalarda nanoteknoloji, ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi konusunda oldukça umut vermektedir. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak ilk kullanımı 1970'li yıllarda gerçekleştirilmiştir. Tıbbi uygulamalarda kullanılmak üzere üretilen nanopartikül türleri; miseller, dendrimerler, fullerenler, lipozomlar, nanoküreler, nanokapsüller, nanotüpler ve kuantum dot'lardır (Haleyve Frenkel, 2008).

Nanopartiküller, 10-1000 nm boyutunda, içindeki etken maddeyi kontrollü olarak salan katı koloidal maddelerdir. Taşıdığı etken madde nanopartikül içinde hapsedilmiş, çözünmüş veya adsorbe edilmiş olabilir. Nanopartiküllerde olması istenen nitelikler:

- Taşıdığı ilacı kontrollü bir şekilde salması,
- Vücutta etki göstermesi amaçlanan bölgeye gitmesi,
- *İn vivo* yada *in vitro* stabilizasyon problemleri içermemesi,
- Taşıyıcının hedefe ulaşmaya kadar parçalanması,
- Parçalandıktan sonra çıkan ürünlerin toksik olmaması,
- Safılaştırma ve sterilizasyon işlemlerinin yapılabilmesi.

Nanopartiküller, şekil 2.7'de görüldüğü gibi, hazırlanma yöntemlerine göre nanoküre ve nanokapsül olarak adlandırılmıştır (Kaş, 2002). Nanokapsülde etken madde polimerik bir membran ile bir kavite içerisinde hapsedilmiştir. Nanokürede ise etken madde matriks sistem içinde homojen olarak dağıtılmıştır. Bu tez çalışmasında etken maddenin enkapsüle edildiği nanoküreler hazırlandı.



Şekil 2.8. Etken madde yükleme yollarına göre nanopartiküller: nanokapsül ve nanoküre (Kumari ve ark., 2010)

2.8. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartikülün yapısı, bileşenleri ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak birçok nanopartikül hazırlama yöntemi vardır. Bu yöntemlerden hangisinin seçileceği polimerin yapısal özellikleri ve etkin maddenin çözünürlüğüne bağlıdır (Jaeghere ve ark., 1999). Nanopartikül hazırlamada kullanılacak polimer seçiminde dikkat edilmesi gereken noktalar: Nanopartikülün boyutu, biyoyumlu olması, biyobozunabilme davranışı, çözünürlük, stabilite, yük ve geçirgenlik gibi yüzey karakteristikleri, uygulama yolu ve ilacın istenilen salım profili (Jahanshahive Babaei, 2008). Nanopartikül hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılabilir:

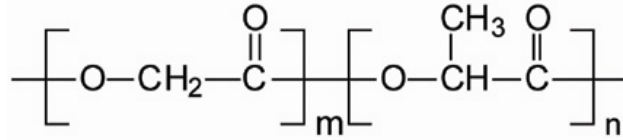
Doğal polimerler:

- Proteinler (albümin, jelatin, legümin)
- Polisakkaritler (aljinat, kitosan,dekstran)

Sentetik polimerler:

- Önceden sentezlenen; poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(laktik asit) (PLA), polianhidrit, polikaprolakton (PECL),
- Hazırlanma sırasında sentezlenen; poli(alkilsiyanoakrilat) (PACA)

Nanopartikül araştırmalarında ilk sentezlenen nanopartiküllerde albümin gibi doğal polimerler ve poliakrilamit gibi biyobozunumu olmayan sentetik polimerler kullanılmıştır. Protein bazlı doğal polimerlerde antijenik cevaplar alınması sorun teşkil etmektedir. Sentetik polimerlerin ise biyobozunum göstermemesi toksik etkileri dolayısıyla risk oluşturmaktadır. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (şekil 2.8) nanopartikül sentezinde sıklıkla kullanılan bir polimerdir.



PLGA

şekil 2.9. PLGA'nın kimyasal yapısı.

(<http://www.drug-dev.com/PLGAPEG-Block-Copolymers-for-Drug-Formulations-406.aspx>)

PLGA, parçalandığında laktik aside dönüşen, dolayısıyla toksik etkisi bulunmayan, FDA tarafından onaylanmış bir sentetik polimerdir. Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanılan ticari bir üründür. PLGA nanopartiküller birçok yöntemle üretilebilmektedirler. Üstelik bu yöntemler PLGA nanopartiküllerin hazırlanmaları sırasında birçok kanser ilacını enkapsüle edebilecek biçimde optimize edilmiştir. İlaç enkapsüle edilen nanopartiküllerin, çözünürlükleri azdır ve fizyolojik ortamda kararsız yapıdadırlar. Ayrıca kılcal damarlardan geçip, endozomlar tarafından hücre içine alınacak kadar küçük olarak sentezlenebilmektedirler (Panyam ve ark., 2002). PLGA nanopartiküllerin yüzeyleri hedef tümör dokusuna taşınarak içerdikleri etken maddelerin orada salınabilmesi için modifiye edilebilir (Nobs ve ark., 2004).

Bu tez çalışmasında nanopartiküller, poli(laktik-ko-glikolik asit) kullanılarak emülsiyon oluşturma çözücü difüzyon yöntemiyle hazırlandı.

2.8.1. Emülsifikasyon Yöntemi

Emülsiyon Oluşturma / Çözücü Buharlaştırma Yöntemi: Çift emülsiyon oluşturma; protein, peptit ve diğer makromoleküllerin hapsedilmesini sağlayan bir yöntemdir. Etken maddenin sulu çözeltisi polimer çözeltisi içinde dağıtılır ve bu karışım içine yağ/su emülgatörünün sulu çözeltisi ilave edilir. Bu işlemlerden sonra su/yağ/su

emülsiyonu, ilaç çözeltilisini içeren polimer çözeltilisi damlacıkları oluşur. Son olarak çözücünün buharlaştırılmasıyla etken maddenin sulu çözeltilisini içeren nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Çift emülsiyon oluşturma yönteminde bazı problemler vardır. Bu yöntemle sentezlenen nanopartiküller düşük ilaç yükleme kapasitesine sahiptir ve partikül büyüklüğünün dağılımı düzensizdir (Park, 2007). Ayrıca yöntemin en büyük problemlerinden biri yükleme etkinliğinin sınırlı olmasıdır. Çünkü düşük molekül ağırlığındaki hidrofilik ilaçların polimere karşı afinitesi azdır (Tewes ve ark., 2007).

Emülsiyon Oluşturma / Çözücü Difüzyon Yöntemi: Çözücü difüzyon yönteminde suda çözünmeyen etken madde ile polimer organik bir çözücüde sıcakta çözünür ve yüzey etken madde bulunan ortama karıştırılarak eklenir (Kawashima ve ark., 1989). Çözücü difüzyon yönteminde etken madde iç faz olarak adlandırılır. İç faz ve polimeri içeren organik çözücü, sabit karıştırma ile dış faza (su ve emülgatör maddeden meydana gelir) dağılır, böylece su içinde yağ emülsiyonu oluşturulur. İç faz ilk damlatıldığında sistemin emülsiyon benzeri opak bir görünümü vardır. Çözücünün, iç fazı oluşturan emülsiyon damlacıklarından, dış faza difüze olması ile damlacıklar sertleşerek etken maddeyi taşıyan nanopartiküllere dönüşmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çözücü difüzyon yöntemi kullanılarak PLGA/PLA nanopartikülleri (Murakami ve ark., 2000), flurbiprofen yüklü akrilat polimer nanopartikülleri (Pignatello ve ark., 2002) ve lipid bazlı nanopartiküller (Quintanar-Guerrero ve ark., 2005) sentezlenmiştir.

2.8.2. Koaservasyon (Faz Ayrımı) Yöntemi

Emülsifikasyon yöntemlerinin bazı problemleri vardır. En büyük problem çok fazla miktarda organik çözücü kullanılmasıdır. Ayrıca küçük boyutlu (< 500 nm) ve dar partikül boyutu dağılımında nanopartikül hazırlamak zordur. Çünkü ısı veya çapraz bağlama ile sertleştirme işleminden önce emülsiyonda stabilite problemi vardır. Koaservasyon yöntemi bu problemleri çözmek amacıyla geliştirilmiştir. Koaservasyon metodu birbirine karışmayan iki koloid sistemde faz ayrılması olarak tanımlanır. Bu durumda, partiküller faz ayrımı işlemiyle sulu fazda oluşur ve bir çapraz bağlama ajanıyla stabilize edilir.

2.8.3. Poliyon Kompleks Yöntemi

Poliyon kompleks yöntemi, koaservasyon yönteminden çok daha güvenli bir yöntemdir. İyonik etkileşim, koordinasyon veya hidrojen bağı oluşumu suretiyle oligomerik amfifillerin kompleksleştirme reaksiyonu nanometre boyutunda partiküllerin oluşumuna neden olmaktadır (Ikkalave ten Brinke, 2004).

2.8.4. Dondurma-Çözme Yöntemi

Dondurma-çözme yönteminde en önemli etkenler; eklenen yüzey etkin madde miktarı, dondurma döngü sayısı, karıştırma hızı ve dondurma/çözme sıcaklıkları (Ficek ve Peppas, 1993). Döngüsel dondurma-çözme yöntemiyle hazırlanmış, poli(vinil alkol) hidrojel nanopartiküllerin dondurma-çözme döngü sayısına bağlı olarak salım özellikleri olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 1998).

2.8.5. Katı-Lipid Nanopartikül Hazırlama Yöntemi

Katı lipid nanopartikül hazırlama yöntemi; yağ/su emülsiyonundaki sıvı yağ, katı lipidle yer değiştirilmesi esasına dayanır (Muller ve ark., 2000). Yağ/su tipi emülsiyonlar dondurularak kurutulur veya katı lipid/lipid karışımları yüksek basınçla homojenize edilir. Elde edilen ürünler, lipozom-nanopartikül arasında bir yapıda ilaç taşıyıcısı olarak kullanılan katı partiküllerdir. Yüksek basınçla homojenizasyon (sıcak/soğuk homojenizasyon) (Freitas ve Muller, 1998) mikroemülsiyon ve çözücü çöktürme yöntemleriyle hazırlanırlar (Jores ve ark., 2004).

2.8.6. Nano Çöktürme Yöntemi

Nano çöktürme yönteminde çözücü ve çözücü olmayan olmak üzere iki farklı sıvı faz kullanılır. Çözücü olarak adlandırılan ilk fazda etken madde ve polimer çözünmeli, ancak çözücü olmayan faz olarak adlandırılan ikinci fazda çözünmemelidir. Birinci faz ile oluşan polimer ve etken madde çözeltisi, ikinci faza eklendiğinde polimer hızlı bir şekilde katılır. Böylece nano çöktürme meydana gelir. Polimeri içeren çözücünün ikinci faza difüzyon yoluyla geçmesi sonucu polimer çökmektedir. Nanoçöktürme yöntemi, tek basamakta ve hızlı nanopartikül oluşumunu sağlamasından dolayı avantajlı bir tekniktir. Hızlı nanopartikül oluşumu, Gibbs-Marangoni etkisi dolayısıyla gerçekleşmektedir (Quintanar-Guerrero ve ark., 1998). Gibbs-Marangoni etkisinde, yüzey etkin maddeler, yağ ve su fazları arasındaki yüzey gerilimini düşürür ve

damlacıkların parçalanarak emülsiyon oluşumunu sağlar. Bu sırada parçalanmış damlacıkların tekrar birleşme eğilimini engelleyen mekanizmaya Gibbs-Marangoni etkisi denir (Yazan, 2004).

Nano çöktürme yönteminin bazı avantajları vardır: Bu yöntem ile boyutları 100-300 nm gibi dar bir dağılım aralığında olan nanopartiküllerin hazırlanması mümkün olmaktadır. Ayrıca sonikasyon veya yüksek sıcaklık dereceleri gerektirmez. Dolayısıyla protein yapısını bozabilecek şartları içermez. Son yıllarda nano çöktürme yöntemi kullanılarak suda çözünen ilaçların enkapsülasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar da umut vaat edicidir. Yapılan bir çalışmada protein ve polimeri (PLGA) içeren dimetilsulfoksit (DMSO) çözeltisi, sulu faza ilave edilmiştir ve yöntemin hidrofilik ilaçların yüklenmesinde de kullanılabileceği gösterilmiştir (Yoo ve ark., 2001).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Doktora Tez çalışması nanopartikülün sentezi, karakterizasyonu ve sentez sonrası *in vitro* sistem etkilerini kapsamakta olup aşağıdaki ana basamaklara göre deneyler planlandı:

1. Dox ve Epo'nin nanopartiküle enkapsüle edilmesi
2. Hazırlanan nanopartiküllerin karakterize edilmesi.
3. Nanopartiküllerin *in vitro* salınımlarının belirlenmesi.
4. Dox ve Epo enkapsüle edilen nanopartiküllerin *in vitro* ortamda meme kanseri ve normal HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi.
5. Dox ve Epo enkapsüle edilen nanopartiküllerin *in vitro* ortamda meme kanseri ve normal HUVEC hücrelerinde apoptozise ve apoptotik yollara etkilerini belirlemek ve değerlendirmek.

3.1. Dox Ve Epo'nin Nanopartiküle Enkapsüle Edilmesi

Dox Hazırlanması: 20 mg Dox (Lc Labs) tartıldı. 10ml metanolde çözüldü ve son konsantrasyonu 2mg/ml oldu.

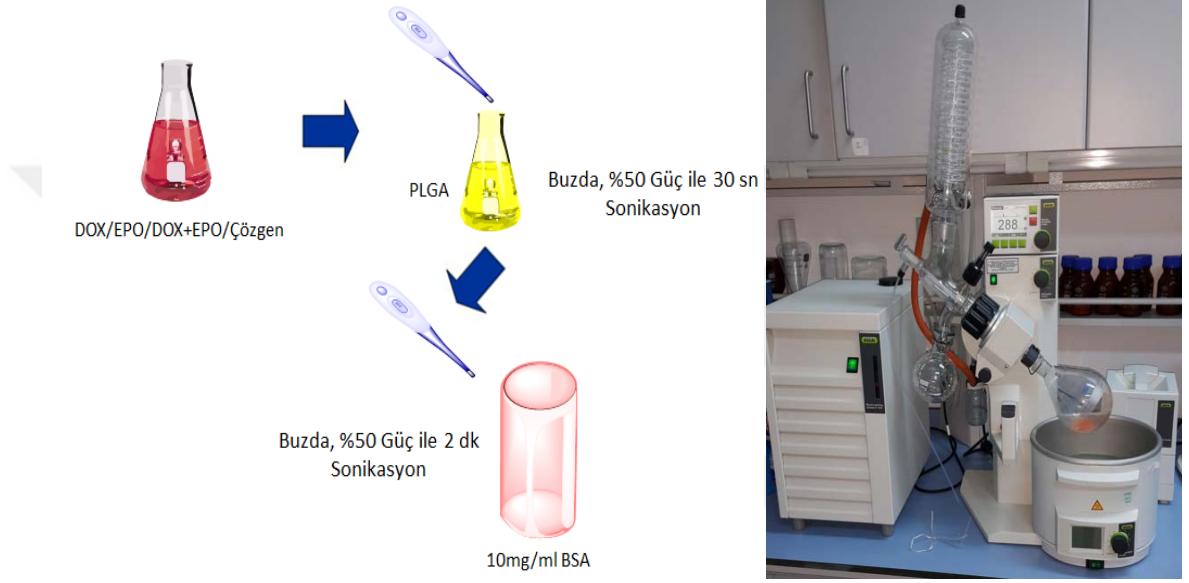
Epo Hazırlanması: 250 µl DMSO'da 25 µg çözülmüş Epo (Cayman) olacak şekilde Epo temin edildi ve 0,1 µg/ µl konsantrasyon stok olarak kullanıldı.

PLGA Hazırlanması: PLGA[Poly (D,L-lactie-co-glycolide)] (Sigma P2191,wt 30000-60000)'dan 100 mg tartıldı ve 1 ml etilasetat (Merck %99,8) da vortekslenerek çözüldü. Polimerin tamamen düzlemsel hale gelebilmesi için 18 saat bekletildi. Tüpün ağzı iyice kapatıldı. Tüpün içindeki sıvı miktarı belirtmesi amacıyla çizgi çekildi. 18 saat sonunda çözgüde uçma meydana geldiğinde işaretlenmiş yere kadar etilasetat eklendi. Daha sonra üstüne 2 ml daha etilasetat eklendi ve son konsantrasyonu 33 mg/ml oldu.

BSA (Bovine Serum Albumin) Hazırlanması: BSA (10 mg/ml) olacak şekilde PBS'de(Phosphate-Buffered Saline) hazırlandı (Sigma).

Dox enkapsülasyonu için Dox:Polimer:BSA 1:5:12,5 oranı ve Epo enkapsülasyonu için Epo:Polimer:BSA oranı 1:6,25:62,5 olacak şekilde yükleme yapıldı. Bunun için ilk

olarak polimer karışımı üzerine vortekste Dox'den damla damla eklendi ve bu karışım 30 saniye (sn) boyunca sonike edildi (Bandalin Sonopuls). Daha sonra bu karışım 10 mg/ml BSA karışımı üzerine damla damla eklendi. Emülsifiye etmek için sonikatörde %65 gücünde 2 dakika (dk) sonike edildi. En sonda örnek çözümlerin uçurulması için 25-30 dk evaporatör konuldu (Buchi Rotavapor R3).



Şekil 3.1. Nanopartikülleri hazırlanması ve evaporasyonu.

Daha sonra 50 ml'lik falcon tüpe aktararak 24000xg'de +4⁰C'de 60 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar kapsülasyon verimini hesaplamak için saklandı. Pellet ise partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçmek için saklandı.

Liyofilizasyon Aşaması: Liyofilizasyon işlemine başlamadan önce nanopartikülleri daha sonra çözünmesini kolaylaştırmak için %5'lik glukoz çözeltisi kullanıldı. Bunun için %20 lik glukoz çözeltisi hazırlandı. 1 ml saf içinde çözülmüş olan nanopartiküllere %5 olacak şekilde bu stok çözeltiden 250 µl eklendi ve -80⁰C de 2 saat bekletildi ve dondurmali kurutucu cihazı (Freezing Dry, Toros TRS 2/2v) açıldı. Nanopartiküller ağız açık bir şekilde 50 ml'lik tüplere aktarıldı ve - 49⁰C'de 5,8X10⁻² mbar koşullarına ayarlanarak dondurmali kurutucu cihazına konarak tamamen kuruması için 2-3 gün bekletildi.



Şekil 3.2. Nanopartikülleri liyofilize eden dondurmalı kurutucu.

3.2. Dox ve Epo İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.1. Partikül Boyutunun Belirlenmesi

Nanopartiküller partikül boyutu ölçümleri Nano ZSP zetasizer (Malvern Instruments Corp., Worcestershire, U.K.) cihazında yapıldı (Şekil 3.3). Nanopartiküller uygun sinyal yoğunluğunu sağlamak için PBS ile seyreltildi. Dinamik ışık saçınımı (Dynamic light scattering, DLS) yöntemi ile nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımları belirlendi. Kolloidal nanopartikül/nanoemülsiyon süspansiyonlarından 10 µl kadar alındı ve PBS ile seyreltildi ve ışık saçılımının yoğunluğu, gelen ışının 90°'lik bir saçılma açısında 25°C sıcaklıkta belirlendi.

3.2.2. Zeta Potansiyel Değerlerinin Belirlenmesi

Nanopartiküller zeta potansiyel ölçümleri Nano ZSP zetasizer cihazında faz analiz ışık saçılma tekniği kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.3). Bu amaçla, her bir nanopartikül süspansiyonundan 1 µl alınarak 10 mL PBS içinde disperse edilmiş ve elektrot bulunduran zeta potansiyel hücre sine alındı. Bütün ölçümler 25 °C'de gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Nanopartiküllerin boyutlarının ve zeta potansiyellerinin Zetasizer cihazı.

3.2.3. Nanopartiküllerin SEM ile Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM, FEI, Quanta Feg 250, USA) kullanılarak incelendi (Şekil 3.4). Görüntüleri alınmadan önce, örnekler liyofilizatör ile kurutularak görüntülemeye hazır hale getirildi. Daha sonra örnekler, uygun kaplama materyali ile kaplanarak (altın,-pladyum, platin veya alüminyum) iletken hale getirilerek taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri alındı. Nanopartiküller düşük vakum altında, 8 mm mesafede ve 5 kV voltaj kullanılarak analize tabi tutuldu. Görüntüler Image J yazılım programında analiz edildi.



Şekil 3.4. Nanopartiküllerin boyutlarının görüntülediği SEM cihazı

3.2.4. Nanopartiküllerin ATR-FTIR ile Moleküler Karakterizasyonu

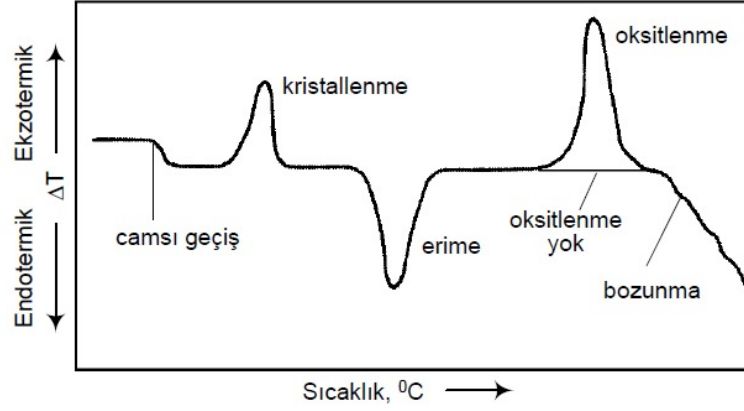
Referans olarak hiçbir ilaç içermeyen PLGA nanopartikülü kullanıldı. Bunu yapmaktaki amaç, PLGA nanopartikül ile ilaç yüklü nanopartiküller arasındaki değişimleri incelemektir. Nanopartikül numuneleri ATR-FTIR (Zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier Dönüşüm İnfrared, Attenuated total reflection-Fourier transform infrared) spektroskopisi kullanılarak karakterize edildi (Şekil 3.5). Spektrumların elde edilmesi için KBr ışın dağıtıcı ve DLaTGS detektörü ile teçhizatlandırılmış Bruker Tensor 27 spektroskopisi kullanıldı. Elmas ATR hücresi ile teçhizatlandırılmış ATR aksesuarı kullanıldı. Enstrüman kontrolü ve data eldesi OPUS programı (Windows için Versiyon 7.2, Bruker GmbH) kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin ATR-FTIR spektrası herbir spektrada 16 tarama biriktiren 2 cm^{-1} 'lik çözünürlük ile 4000 'den 600 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedildi. Arka plan olarak, bütün ölçümler öncesinde aynı şartlarda hava spektrumu incelendi. Kristal yüzey, herbir ölçüm sonrası yumuşak peçete kullanılarak saf etanol ile temizlendi ve kağıt peçete ile kurulandı.



Şekil 3.5. Nanopartiküllerin İnfrared spektrumlarının alındığı FTIR spektroskopisi.

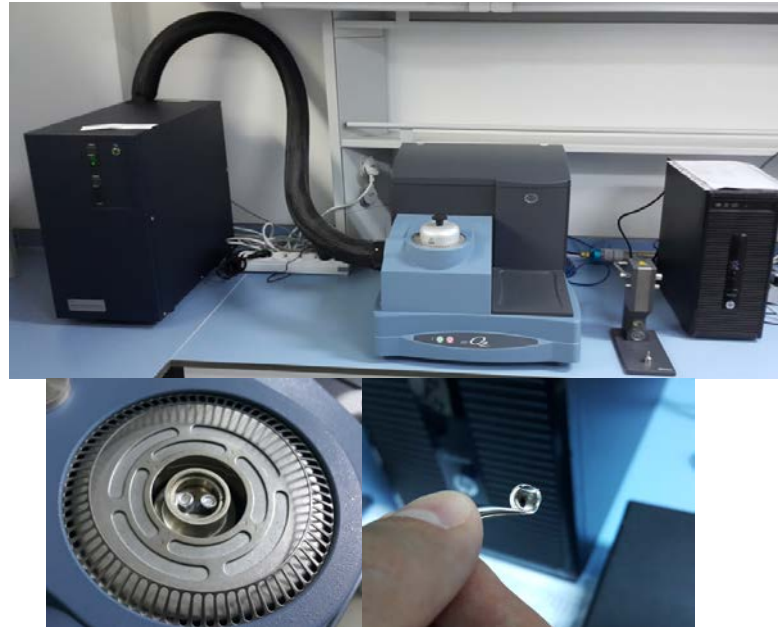
3.2.5. Nanopartiküllerin DSC ile Karakterizasyonu

Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC; Differential Scanning Calorimetry) yöntemi herhangi bir kimyasal bileşenin sıcaklık değişimiyle bozunması sırasında verdiği değişimler o maddeyle ilgili spesifik bilgileri verir. Bu bilgiler maddenin hal değiştirme sırasındaki ısı alış verişindeki değişimleri ölçmesidir. Maddenin endotermik mi ekzotermik mi olduğunu göstermesinin yanı sıra, spesifik kimyasal bozulmasını da gösterir (Şekil 3.6).



şekil 3.6. Polimerik maddelerde karşılaşılan değişiklikleri gösteren diferansiyel termogram

Nanopartiküllerin termal özellikleri diferansiyel taramalı kalorimetre (Differential Scanning Calorimetry, DSC, Q100, TA Instruments Inc., New Castle, DE, USA) kullanılarak tespit edildi (şekil 3.7). Analiz nitrojen atmosferi altında, 20 mL/dk sabit akış hızı gerçekleştirildi. Her bir analiz için 2 mg örnek alüminyum kap içine yerleştirildi ve hermetikli olarak kapatıldı. 20 ° C ile 300 ° C arasında sıcaklık uygulandı ve sıcaklık artışı 10°C/dk olarak ayarlandı. Referans olarak hermetikli kapatılmış boş bir alüminyum kap kullanıldı.



şekil 3.7. Nanopartiküllerin hal değiştirme sırasındaki ısı alış veriiindeki değişimleri ölçen DSC cihazı.

3.2.6. Nanopartiküllerin TGA ile Karakterizasyonu

Bu yöntem nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemeye yaramaktadır. Yüksek sıcaklıklarda nanopartiküllerin faz değişimleri ve termal stabiliteleri termal gravimetrik analiz cihazı (TGA, TA Instruments) ile belirlendi. Bunun için 8 mg tartılan nanopartiküller platin kap üzerine konuldu ve akış hızı 20 ml/dk azot gazı olacak şekilde 0 °C'den 700°C'ye kadar 10 °C/dk hızında ısıtıldı.

3.2.7. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Dox enkapsülasyonu: 5 mg tartılan Dox-Np ve Dox-Epo-Np 1 ml DMSO'da çözüldü. Daha sonra etilasetat:metanol (9:1 v/v) oranında hazırlanan çözelti ile 10 kat seyreltildi. Kuvvetli bir şekilde çalkalandıktan sonra 20000xg'de 5 dk santrifüj edildi. Enkapsülasyon etkinliği, nanopartiküllerde tutulmuş olan madde miktarları ile nanopartikül hazırlama aşamasında yüklene Dox miktarının birbirine kütleli olarak orantılanması ile belirlendi. Verim için Shimadzu marka LC-20AD HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, High Performance Liquid Chromatography) cihazı kullanıldı. Bunun için RF-10AXL floresans dedektör kullanıldı.

Kolon şartları: 20 µl numune için;

- ✓ Kolon: Sepax C18-H (4,6 mm×250 mm, 5 µm) kolon.
- ✓ Mobil Faz: %0,1 Formik asit (suda) ve %0,1 Formik asit (asetonitrilde, organik).
- ✓ Gradyent: 1 ml/dk akış hızında, %5 organik çözgenle başlangıç ve 20 dk'ya kadar %65'e çıkartıldı. Son olarak 20,1 dk'da %5 organik çözgene düşürüldü ve 30.dk'da sonlandırıldı.
- ✓ Floresans dedektör: Dox için uyarım dalga boyu 480 nm, yayılım dalga 530 nm olarak ayarlandı.
- ✓ Tüm örneklerin analizleri 30°C'de yapıldı. Mobil faz 0,45 µm'lik naylon membran filtreden geçirildi ve ultrasonik su banyosunda tutularak çözülmüş gazların uçması sağlandı.



Şekil 3.8. Dox enkapsülasyon verimini ölçmek için kullanılan HPLC cihazı

Dox standartının hazırlanması: Metanol içerisinde 1,0 mg/ml Dox stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 200, 150, 100, 50, 25, 10, 5, 2 ve 1 µg/ml lik olacak şekilde metanol ile 9 dilüsyon yapıldı. Yukarıda belirtilen HPLC yöntemine göre farklı konsantrasyondaki Dox çözeltilerinin analizi yapıldı ve elde edilen verilerle kalibrasyon doğrusu çizilerek kalibrasyon denklemi bulundu ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

Epo enkapsülasyonu: 5 mg Epo-Np ve Dox-Epo-Np 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO)'de çözüldü. Daha sonra etilasetat: metanol (9:1; v/v) oranında hazırlanan çözelti ile 10 kat seyreltildi. Kuvvetli bir şekilde çalkalandıktan sonra 20000xg'de 5 dk santrifüj edildi. Enkapsülasyon etkinliği, nanopartiküllerde tutulmuş olan madde miktarları ile nanopartikül hazırlama aşamasında yüklene Epo miktarının birbirine kütleli olarak orantılanması ile belirlendi. Verim için Agilent 6530 marka LC-MS-QTOF (Sıvı Kromatografisi/ Dört kutuplu uçuş zamanlı-kütle spektrometresi, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry-Quadrupole Time-of-Flight) cihazı kullanıldı.



Şekil 3.9. Epo enkapsülasyon verimini ölçmek için kullanılan LC-MS-QTOF cihazı.

Epo için enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde aşağıdaki şartlar kullanıldı:

- ✓ 10 µl numune
- ✓ Kolon: Athena C18, 3 µm, 2.1 mm × 100 mm'lik kolon
- ✓ Çözgen A: %0,1 H₃PO₄ (asetonitrilde, organik),
- ✓ Çözgen B: %0,1 H₃PO₄ (suda)
- ✓ Gradyent: 0,4 ml/dk akış hızında
- ✓ Kütle spektrumları m/z oranı 25'den 1000'e kadar tarandı.

Tablo 3.1. Epo enkapsülasyon

Zaman (dk)	Çözgen A (Asetonitrilde)	Çözgen B (Suda)
0	%0	%100
2	%0	%100
6	%95	%5
9	%95	%5
10	%0	%100
10,1	Son	Son

Epo standart hazırlanması: DMSO içerisinde hazır olan 25 µg/µl (100000 ng/ml)'lik Epo stok çözeltisinden seri dilüsyonlar hazırlandı. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için 1000, 500, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2 ve 1 ng/ml lik olacak şekilde metanol ile dilüsyonlar yapıldı. Yukarıda belirtilen HPLC yöntemine göre farklı konsantrasyondaki Epo çözeltilerinin analizi yapıldı ve elde edilen verilerle kalibrasyon doğrusu çizilerek kalibrasyon denklemi bulundu ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

Kullanılacak etkin maddeler için enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \left(\frac{\text{PLGA içinde enkapsüle olmuş ilaç miktarı}}{\text{toplam ilaç miktarı}} \right) \times 100$$

3.3. Enkapsüle Edilen İlaçların *In Vitro* Salınımlarının Belirlenmesi

Üretilen nanopartiküller için *in vitro* kontrollü salınımı çalışma ortamı olarak asetat tamponu (pH=5,5) ve fosfat tamponu (pH 7,4) kullanıldı. 25 mg ilaç içeren nanopartiküller 50 ml tampon çözeltisi içine konularak 37⁰C'de 300 rpm de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Belirli zaman aralıklarında 0,5 ml alınan çözeltiler 0,1 µm polivinilidene diflorit (PVDF) şırıngadan geçirilerek salınan aktif madde miktarları ilaçların ölçümüne uygun cihazlarda belirlendi. Alınan çözelti taze tampon çözeltisiyle ikame edildi.

% salınım aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Salınım} = \left(1 - \frac{\text{depolama boyunca enkapsülasyon etkinliği}}{\text{başlangıçta enkapsülasyon etkinliği}} \right)$$

3.4. Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkinliğinin Belirlenmesi

3.4.1. Deney Modeli ve Grupları

Hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve *in vitro* kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda normal hücre hattı olarak insan göbek ven damarından türemiş olan endotel hücre (**Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC**) ve meme kanser hücre hattı olarak da insan metastatik meme kanserinden türemiş olan (**Michigan Cancer Foundation-7; MCF-7**) hücre dizileri kullanıldı. Bu hücre hatları **American Type Culture Collection**'dan (ATCC) alındı.

Normal **HUVEC** ve **Meme kanseri** hücreleri için deney grupları;

1. Kontrol
2. Serbest Dox
3. Serbest Epo
4. Serbest Dox+serbest Epo

5. Doxil (ticari, doksorubisin ilacın içeren lipozom nanopartikül)
6. PLGA-NP (İlaç içermeyen nanopartikül)
7. EPO-NP (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Epo)
8. DOX-NP (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Dox)
9. DOX-EPO-NP (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Dox+Epo)

3.4.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler

- ✓ F-12K Medyumu: ATCC'den alındı. +4°C'de saklandı.
- ✓ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): ATCC'den alındı.+4°C'de saklandı.
- ✓ FBS (Fetal Sığır Serumu): Sigma'dan inaktive edilmiş olarak temin edildi. 10 ml'lik tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.
- ✓ Penisilin-Streptomisin: Biological Industries'den alındı. Kullanılmadığı sürece -20°C'de saklandı.
- ✓ DMSO: Sigma'dan alındı. Oda ısısında saklandı.
- ✓ Hücre Dondurma Çözeltisi: %5 DMSO içeren medyum steril bir tüpte hazırlandı ve hücre pelleti üzerine 1 ml eklendi. Bu solusyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.
- ✓ Tripan Mavisi Çözeltisi (%0.5'lik): Biological Industries'den hazır olarak alındı. Oda ısısında saklandı.
- ✓ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Magnezyumsuz ve kalsiyumsuz), (PBS): Biological Industries'den hazır olarak alındı. 50 ml'lik tüplerde +15-20°C'de saklandı.
- ✓ Doksorubisin: Doksorubisin 50 mg liyofilize toz içeren flakon LC Laboratories firmasından alındı. Buzdolabında -20°C'de saklandı.
- ✓ Epoksomisin: 250 µl DMSO'da çözülmüş 25 µg Epoksomisin içeren flakon Cayman firmasından alındı. Buzdolabında -20°C'de saklandı.

3.4.3. Hücre Medyumlarının Hazırlanması

Doktora Tez çalışmasında kullanılan hücre hatları farklı kültür ortamlarında büyümektedir. HUVEC hücrelerinin çoğalması için ATCC tarafından formüle edilen F-12K medyum kullanıldı. Bu medyum içerisine 0,1 mg/ml heparin, 0,03-0,05 mg/ml

endotelial hücre büyüme destekleyicisi (endothelial cell growth supplement, ECGS) ve 10% cenin sığır serumu (fetal bovine serum, FBS) eklendi. Hazırlanan medyumlar +4°C’de saklandı.

MCF-7 hücrelerinin çoğalması için ise ATCC tarafından formüle edilen DMEM kullanıldı. Bu medyum içerisine 0.01 mg/ml human recombinant insulin ve 10% FBS eklendi. Hazırlanan medyumlar +4°C’de saklandı.

3.4.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler hazırlanan uygun steril besiyerinde, 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman, yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. Bunun için hücre tipine göre iki farklı hücre pasajlanması uygulandı. Birinci tip pasajlama işleminde tripsin enzimi ile kaldırma yapıldı, enzimin kullanılmadığı durumlarda ikinci tip pasajlama işlemi olan kazıyıcı (scraper) denilen bir malzeme kullanılarak hücreler flasktan kazınarak kaldırıldı. Tez çalışmamızda hücrelerin pasajlanması 0.25% (w/v) tripsin 0.53mM EDTA kullanılarak yapıldı. Tripsin gerektirmeyen deney koşullarında kazıyıcı kullanarak hücreler kaldırıldı. Yeterli yoğunluğa ulaşmış flasklardan hücreler pasajlandı. Tripsin-EDTA enzimi ile kaldırma yapılmadan önce ilk olarak medyum flasktan uzaklaştırıldı ve atıldı. Tripsin-EDTA’nın daha iyi etki gösterebilmesi için birkaç ml PBS eklenir. Hücre içi artıkların PBS ortamına geçebilmesi için hücreler birkaç dakika inkübatörde bekletildi. Bu işlemin ardından atık PBS atıldı ve 25 cm²’lik flask yüzeyi için 1 ml tripsin-EDTA, 75 cm² için ise 3 ml tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA eklenmesi sonrasında hücreler 5-15 dakika inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları flasktan ayrıldıkları mikroskop ile gözlenir gözlenmez 6-8 ml taze medyum eklenerek pipetaj yapıldı. Flasklardan toplanan hücreler 15 ml’lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve 125xg’de 5-7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve kalan pelletde olan hücreler yeni flasklara dağıtılacak şekilde 25 cm²’lik flask yüzeyi için 6-8 ml taze medyum eklenerek flasklara paylaştırıldı. Hücreler, 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren CO₂ inkübatöründe, 6-8 ml medyum içinde inkübe edilerek üretildi. Alt kültürleme işlemi 1 flaska 3 veya 6 flask

şeklinde gerçekleştirildi. Bu şekilde pasajlanan hücrelerin tam anlamıyla yoğunlaşması 2-5 gün arasında gerçekleşti.

3.4.5. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için hücreler uygun şekilde donduruldu. Hücreler flasktan uygun şekilde kaldırıldı ve medyum eklenerek 125xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet, %95 tam hücre medyumuna ve %5 (v/v) DMSO'den oluşan dondurma medyumuna içerisinde tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonları, cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı içinde 4 saat 80°C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

3.4.6. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Bu işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Hücreleri içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde (yaklaşık 2 dakika) yapıldı. İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırıldı ve dış yüzeyi %70'lik alkolle temizlendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. 1ml'lik vial içeriği tüpe boşaltılıp üzerine damla damla 9 ml medyum eklendi. 125xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre içeren pellet uygun medyumla tekrar süspansiyon edildi ve kültür flasklarına dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe üretildi.

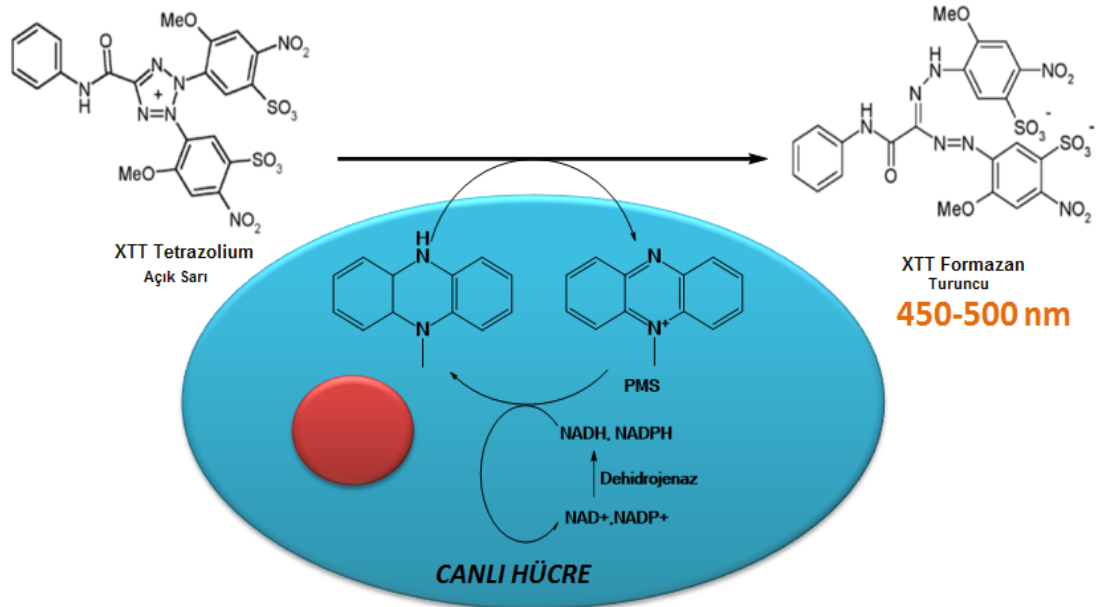
3.4.7. Nanopartiküllerin Doz Çalışması

Hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksik dozlarının belirlenmesi için ilk önce liyofilize halde bulunan nanopartiküller PBS içerisinde çözüldü ve ana stok konsantrasyonları 10 mg/ml olacak şekilde ayarlandı. Serbest ilaçların, ilaç içeren ve içermeyen nanopartiküllerin IC₅₀ (Tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değeri) dozları XTT canlılık testi ile belirlendi. Klinikte kullanılan ve Dox içeren ticari bir nanopartikül olan Doxil ile sentezleyeceğimiz nanopartikül arasında kıyaslama yapıldı. Aşağıdaki tüm gruplarda XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carbox-anilide) protokolü uygulanarak sitotoksik veriler analiz edildi.

1. Kontrol
2. Serbest Dox
3. Serbest Epo
4. Serbest Dox+serbest Epo
5. Doxil (ticari, doksorubisin ilacın içeren lipozom nanopartikül)
6. PLGA-NP (İlaç içermeyen nanopartikül)
7. EPO-NP (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Epo)
8. DOX-NP (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Dox)
9. DOX-EPO-NP (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Dox+Epo)

3.4.8. XTT Sitotoksisite Analizi

Hücreleri çoğalması ve kimyasalların hücre canlılığına olan etkisini belirlemek için, XTT testi kullanıldı. XTT, metabolik aktivitesi bozulmamış canlı hücreler tarafından parçalanarak turuncu renkte formazan ürünü veren açık sarı renkli bir maddedir. Oluşan rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür. Mekanizması Şekil 3.10'da gösterildi



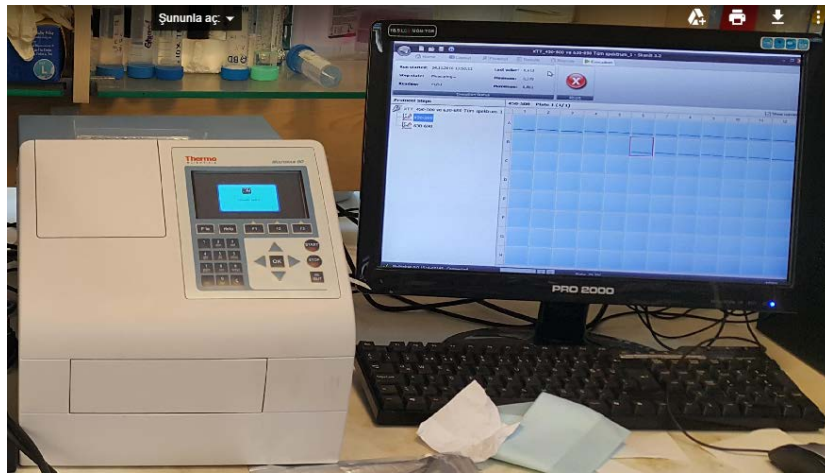
Şekil 3.10. XTT canlılık testinin mekanizması.

Bu deney, hem HUVEC hem de MCF-7 hücreleri ile yapıldı. Sitotoksisite deneyleri 2 gün sürdü. Deneyin birinci günü hücreler 96 kuyulu plaklara 7500 hücre olacak şekilde ekildi. Bunun için hücreler tripsin ile flasklardan kaldırıldı. Tripsini inhibe etmek için

medyum eklendi, hücreler toplandı ve 125xg'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet 1 ml PBS ile tekrar süspansiyon edildi. Seyreltilen hücre süspansiyonundan 10 µl bir ependorf tüpüne alındı. Tripan Mavisinden de 10 µl alınarak hücreler tekrar süspansiyon edildi. Elde edilen 20 µl'lik karışımdan 10 µl hücre sayım cihazının slide'ına eklendi ve hücreler sayıldı. Elde edilen değer ml'de bulunan hücre sayısını gösterir. Daha sonra PBS'li hücre karışımı yine santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, kalan pellet ise 100 µl'de kuyu başına 7500 hücre olacak şekilde medyum ile seyreltildi.

Hücrelerin yapışması için bir gece bekletildi. Daha sonra medyum atıldı, belirlenen dozları içeren medyum tüm gruplara uygulandı. Gruplara göre 24 saat süre inkübatörde bekletildi. İnkübasyon XTT protokolüne göre sonlandırıldı.

Çalışılacak her kuyucuğa 100 µl taze medyum ve 50 µl XTT karışımından (XTT 1=5000 µl + XTT 2=100 µl) eklendi. 3 saat 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, canlı hücre içeren kuyularda XTT'den oluşan formazan çözünebilir ve ölçüm yapılabilir formdadır. XTT eklendikten sonra 3 saat içinde, dalga boyu olarak 450-500 nm ve referans dalga boyu olarak da 630-690 nm'de, ELISA plak okuyucusunda plağın okuması yapıldı (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). Değerler kontrol grubuna oranlanarak yüzde canlılık olarak ifade edildi.



Şekil 3.11. XTT ve proteinin ölçüldüğü spektrometre.

Dox ve Epo'in sinerjik etkilerini belirlemek için Graphpad Prism yazılımı kullanıldı. Absorbans değerlerine göre hesaplanan sitotoksosite yüzdeleri programa girildi. Her

ilacın doz etki tablosu ve eğrisi çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} değerlerine göre Dox ve Epo'in düşük oranlarda kombine edilerek ilaç kombinasyonunun sinerjisi 24 saat inkübasyon sonunda belirlendi. 24 saat inkübasyondan sonra en iyi sinerjistik etkili kombinasyon oranı seçildi. Bu kombinasyon oranı sabit tutularak (x) artan ve azalan oranlarda (4x, 2x, x, 0,5x, 0,25x) ilaç kombinasyonları hücrelere uygulanarak kuyucuklara ilave edildi. 24 saat sonunda sitotoksisite yüzdeleri Graphpad programına girilerek sinerjistik etki bulunan kombinasyon oranı seçildi.

3.5. Nanopartiküllerin Apoptozise ve Apoptotik Yolaklara Etkilerinin Belirlenmesi

Sitotoksisite deneylerinden MCF-7 için elde edilen $M-IC_{50}$ dozları kullanılarak aşağıdaki deneyler sırasıyla yapıldı.

1. Hücre İçine Alınan DOX Miktarının Belirlenmesi,
2. Proteozom İnhibisyonunun Belirlenmesi,
3. Hücre İçi Alınan ROS Miktarının Belirlenmesi,
4. Sitolitik NF- κ B Miktarının Belirlenmesi,
5. Flow Sitometri ile Apoptozis Belirlenmesi,
6. TUNEL Yöntemi ile Apoptozis Belirlenmesi.

3.5.1. Hücre içine alınan DOX miktarının belirlenmesi

Hücre içine alınan Dox miktarı, Dox'in floresans özelliğinden yararlanarak hesaplandı. Bunun için HUVEC ve MCF-7 hücreleri 6 kuyulu plak içerisine 25×10^4 olacak şekilde ekildi ve 1 gece hücrelerin yapışması için bekletildi.

- ✓ Her iki hücre hattının kontrol gruplarına taze medyum ve her bir grup için belirlenmiş olan $M-IC_{50}$ dozları eklendi ve 6 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda medyumlar atıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Tripsin ile kaldırılan hücreler santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- ✓ Toplanan pellete 500 μ L PBS eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
- ✓ Dox ölçümü için siyah üstten okumaya uygun plakanın her bir kuyucuğuna 100 μ L bu hücre karışımından eklendi.

- ✓ Dox 480 nm uyarım dalga boyunda ve 592 nm yayılım dalga boyundaki floresans şiddetleri floresans mikroskop okuyucu ile ölçüldü (Elx 800, Bio-TEK. instruments, Inc., USA).
- ✓ Hesaplama yapılırken hücrelerden kaynaklanan ışık saçılmasını engellemek için her iki hücre hattı için kör değerleri çıkartıldı. Bu ölçüm tüm Dox içeren gruplarda en az 3 kere yapıldı.



Şekil 3.12. Dox, ROS ve proteozom aktivitesinin ölçüldüğü spektrofotometre.

3.5.2. Proteozom Aktivitesinin Belirlenmesi

Hücrelerin proteozom aktivitesini ölçmek için HUVEC ve MCF-7 hücreleri 6 kuyulu plak içerisine 4×10^5 olacak şekilde ekildi ve 1 gece hücrelerin yapışması için bekletildi.

- ✓ Her iki hücre hattının kontrol gruplarına taze medyum ve her bir grup için belirlenmiş olan M-IC₅₀ dozları eklendi ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda medyumlar atıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Tripsin ile kaldırılan hücreler santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- ✓ Proteozom aktivitesi 50 mM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin (AMC; Sigma-Aldrich) substratı kullanılarak kimotripsin benzeri aktivite ile belirlendi. Enzim aktivitesi ile peptide bağlı AMC serbest hale gelir.
- ✓ AMC'nin 380 nm de uyarım ve 460 nm'deki yayılım dalga boyundaki floresans şiddetleri floresans mikroskop okuyucu ile ölçüldü (Elx 800, Bio-TEK. instruments, Inc., USA). ile aktivite ölçüldü.

- ✓ Toplanan pelletin son hacmi 100 µL olacak şekilde 10 mg protein, substrat ve 50mM HEPES-KOH, pH 7.5 içeren tampon karıştırıldı.
- ✓ Numunelerin 37°C'de 1 saat boyunca floresans değerleri ölçüldü.
- ✓ Floresans emisyonu, substrat inkübasyonundan sonra ilk 2 dakikada belirlendi.
- ✓ Daha sonra toplamda 75 dakikalık inkübasyon süresince her 5 dakikada bir floresans değerleri kaydedildi.
- ✓ Toplam zaman aralığında ürün oluşumunun doğrusal olduğu gözlemlendi.
- ✓ HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde ölçümler üç kez paralel bir şekilde tekrarlandı.
- ✓ Aktivite, inkübasyon zamanına karşı floresans değerlerinden elde edilen grafiğin eğimlerinden hesaplanıp gruplar karşılaştırıldı. Arkaplan aktivitesi son konsantrasyonu 10 mM olan MG-132 ile belirlendi (Gavilan ve ark., 2013).

3.5.3. Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

Hücre içinde inkübasyon sonunda oluşan ROS miktarı, DCF (2',7'-dichlorofluorescein)'nin floresans özelliğinden yararlanarak hesaplandı. Bunu için HUVEC ve MCF-7 hücreleri 6 kuyulu plak içerisine 25×10^4 olacak şekilde ekildi ve 1 gece hücrelerin yapışması için bekletildi.

- ✓ Her iki hücre hattının kontrol gruplarına taze medyum ve her bir grup için belirlenmiş olan M-IC₅₀ dozları eklendi ve 18 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda medyumlar atıldı ve hücreler PBS yıkandı. Tripsin ile kaldırılan hücreler santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- ✓ Toplanan pellete 400 µL PBS eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
- ✓ Son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde DCFH₂-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) boyası eklendi, 30 dakika boyunca karanlıkta 37 °C su banyosunda bekletildi.
- ✓ Daha sonra 10 dakika 500xg'de santrifüj edildi. Elde edilen pellet 100 µL PBS ile hazırlanmış %1'lik Triton-X100 lizis edildi.
- ✓ ROS ölçümü için siyah üstten okumaya uygun plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL bu hücre karışımından eklendi.

- ✓ DCF, 485 nm uyarım dalga boyunda ve 530 nm yayılım dalga boyundaki floresans şiddetleri floresans mikroskop okuyucu ile ölçüldü (Elx 800, Bio-TEK. instruments, Inc., USA).
- ✓ Hesaplama yapılırken hücrelerden kaynaklanan ışık saçılması engellemek için her iki hücre hattı için kör değerleri çıkartıldı. Bu ölçüm tüm gruplarda en az 3 kere yapıldı.

3.5.4. Sitozolik NFκB-p65 Miktarının Belirlenmesi

NFκB-p65 (*Invitrogen*) kiti katı faz sandviç ELİSA ölçümüdür. Monoklonal antikor NFκB-p65 için spesifiktir. Deneyi kısaca şöyle özetleyebiliriz; NFκBp65 içeren tüm grupların örnekleri kuyucuklara pipetlenir. İlk inkübasyon süresince NFκBp65 antijen kuyucuktaki antikor tarafından bağlanır. Yıkamadan sonra NFκBp65'e spesifik tavşan antikoruna kuyucuğa eklenir. İkinci inkübasyon süresince bu antikor, birinci inkübasyon süresince tutulan NFκBp65 proteini için bir dedektör olarak hizmet eder. Fazla dedektör antikor çıkartıldıktan sonra horseradish peroxidase-etiketli Anti-Rabbit IgG (Anti-Rabbit IgG-HRP) kuyucuklara eklenir. Bu dedektör antikoruna tamamı dört üyeli olan sandviç bağlanır. Üçüncü inkübasyondan ve fazla Anti-Rabbit IgG-HRP yıkama işleminden sonra bir substrat solüsyonu eklenir. Substratın enzime bağlanmasıyla renkli ürün oluşur. Renkli bileşiğin yoğunluğu doğrudan NF-κBp65'nin konsantrasyonuyla orantılıdır.

Hücre Ekstraksiyon Tamponu: Hücreleri ekstrakte edebilmek için içeriği aşağıda belirtilen tampon hazırlandı.

Tablo 3.2. Hücre Ekstraksiyon tamponu kimyasalları ve son konsantrasyonları

Kimyasalın Adı	Son Konsantrasyon
Tris, pH 7.4	10 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	20 mM
NaCl	100 mM
NaF	1 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	% 1
Glycerol	% 10
SDS	% 0.1
Deoxycholate	% 0.5

Yukarıdaki tabloya göre hazırlanan tamponun 5 ml'si içine 250 µL Proteaz inhibitör kokteyl ve son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde PMSF (fenilmetilsulfonilflorid, serin proteaz inhibitörü) eklendi.

Hücre ekstraksiyon aşamaları:

- ✓ Bunun için HUVEC ve MCF-7 hücreleri 75 cm²'lik flasklar içerisine 3 x 10⁶ olacak şekilde ekildi ve 1 gece hücrelerin yapışması için bekletildi. Medyumların hepsi atıldı. Her iki hücre hattının kontrol gruplarına taze medyum ve her bir grup için belirlenmiş olan M-IC₅₀ dozları eklendi ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Hücreler PBS içinde flaskdan kaldırıldı ve santrifüj edildi.
- ✓ Soğuk PBS ile iki defa yıkandı ve santrifüj edildi.
- ✓ Süpernatant atıldı ve hücre pelleti toplandı.
- ✓ Hücre pelleti ekstraksiyon tamponu ile buz üzerinde 30 dakika boyunca lizis edildi ve buz üzerinde 10 dakika aralıklarla vortekslendi. Ekstraksiyon tampon hacmi hücre pelleti içindeki hücre sayısına ve NF-κBp65 ekspresyonuna bağlıdır. Bu yüzden tüm gruplara eşit hacimde Hücre Ekstraksiyon Tamponu eklendi.
- ✓ Ekstrakt mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve +4°C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Berrak lizat kısımlara ayrıldı. Bu örnekler ölçüm için hazır hale getirildi.

NF-κBp65 (Total) Standardının Sulandırılması ve Dilüsyonu: NF-κBp65 (Total) Standardı Standart dilüsyon tamponu ile seyreltildi. Hafifçe vortekslendi ve tamamen çözünmesi için 10 dakika bekletildi. 4,000 pg/mL NF-κBp65 olarak etiketlendi. Seyreltik Standart 1 saat içinde kullanıldı. 6 farklı tüpe 0,25 ml Standart Dilüsyon tamponu eklendi. Bu tüpler 2000, 1000, 500, 250, 125 ve 62.5 pg/mL NF-κBp65 şeklinde etiketlendi.

Anti-Rabbit IgG HRP (100X) Dilüsyonu ve Saklanması: Anti-Rabbit IgG HRP (100X), %50 gliserol içerisindedir. Bu çözelti vizkozdur (yapışkandır). Dilüsyonun doğru olabilmesi için Anti-Rabbit IgG HRP (100X)'nin oda sıcaklığına gelmesine izin verildi. Hafifçe karıştırıldı ve yavaşça pipetlendi. Yavaşça temiz emici kağıt ile silerek pipetten aşırı konsantrasyona sahip çözelti, 10 µL 100X konsantrasyona sahip çözelti, 1ml

HRP Dilüsyon ile seyreltildi. Hazırlanan çözelti Anti-Rabbit IgG-HRP çalışma solüsyonu olarak etiketlendi.

Yıkama Tamponunun Dilüsyonu: Konsantre (25X) yıkama tamponu oda sıcaklığına getirildi. Herhangi bir çözünmeyen çökmüş tuz varsa iyice karıştırıldı. Konsantre (25X) yıkama tamponunun 1 ml'si 24 ml deiyonize su ile seyreltildi.

Deneyin Yapılışı ve Hesaplama: Deneye başlamadan önce tüm reaktiflerin oda sıcaklığına getirildi. Tüm sıvı reaktifler kullanmadan önce hafifçe vortekslendi.

- ✓ Boş kuyucuklara Standart Diluent tampondan 100 µL eklendi. Kromojen körü için ayrılmış kuyucuk boş bırakıldı.
- ✓ Kuyucuklara standart ya da örneklerden 100 µL eklendi. Hücre ekstraksiyon tamponu içinde hazırlanmış örnekler 1:10 oranında ya da daha büyük oranda standart dilüsyon tamponu ile seyreltildi (90 µL tampon içine 10 µL örnek). **1:10** örnek seyreltmesi doyurucu bulunurken, İyice karıştırmak için plağın yan tarafına hafifçe dokunuldu.
- ✓ Plak kapağı ile kuyucukların üstü kapatıldı ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda sıvı kısım kuyucuklardan iyice aspire edildi. Kuyucuklar 4 kez yıkandı.
- ✓ 100 µL NF-κBp65 (Deteksiyon antikor) kromojen kör kuyuları hariç tüm kuyucuklara pipetlendi. Plak hafifçe sallanarak antikorun plak yüzeyini kaplaması sağlandı.
- ✓ Plak kapağı ile kuyucukların üstü kapatıldı ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda sıvı kısım kuyucuklardan iyice aspire edildi. Kuyucuklar 4 kez yıkandı.
- ✓ 100 µL anti-rabbit IgG-HRP çalışma solüsyonu kromojen kör kuyuları hariç tüm kuyucuklara pipetlendi.
- ✓ Plak kapağı ile kuyucukların üstü kapatıldı ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

- ✓ İnkübasyon sonunda sıvı kısım kuyucuklardan iyice aspire edildi. Kuyucuklar 4 kez yıkandı.
- ✓ 100 µL stabilize kromojen her kuyucuğa eklendi. Sıvı kuyucuğa eklendikten sonra maviye dönmesi beklendi.
- ✓ Plak 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 100 µL durdurma solüsyonu her kuyucuğa eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı. Sıvı kuyucuğa eklendikten sonra sarıya döndü.
- ✓ K r kuyucuğuna 100 µL durdurma solüsyonu ve 100 µL stabilize kromojen solüsyonu eklenerek 450 nm'de tüm kuyucuklar okundu. Standart konsantrasyonuna karşı absorbans değeri işaretleterek standart grafiği  zildi.

Hücrelerden elde edilen sitozolik fraksiyon NF-κBp65 konsantrasyonları standart grafiğinden bulundu. Örneklerden elde edilen değerler 3. basamakta yapılan dilüsyon için kullanılan dilüsyon faktörü ile çarpıldı.

3.5.5. Flow sitometri ile Annexin V Yöntemi

Anneksin V  l mleri ticari bir kit olan Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Catalog No. MCH100105 100 Tests) ile yapıldı. Apoptozis süreci sırasında bir membran fosfolipidi olan fosfotidilserin (FS) plazma membranının iç kısmından dış kısmına dönerek dış ortama sunulur. Anneksin V, Ca⁺² bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir (35-36 kDa). FS için yüksek afinitesi olması nedeniyle, hücre yüzeyinde FS bulunan erken apoptotik hücelere bağlanır. FS translokasyonu apoptozisin erken evrelerinde gerçekleştiğinden, Anneksin V boyama, DNA fragmentasyonu gibi daha geç evrede gerçekleşen değişikliklere dayalı olan deneylere göre apoptozisi daha erken bir evrede belirleyebilir. Tez  alışmamızda insan Anneksin V proteinine karşı fare monoklonal antikoru bağlı PE (phycoerythrin) kullanılmıştır.  l  hücrelerin erken apoptotik hücrelerden ayırt edilebilmesi için, sadece  l  hücreleri boyayan 7-AAD (7-amino-actinomycin D) boyası kullanılmıştır. Anneksin V bağlanması ve 7-AAD boyama, flow sitometrisi ile izlenerek apoptotik hücrelerin oranları belirlendi.

HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde Flow sitometrisinden Anneksin V yöntemi ile apoptozisi belirlemek için;

- ✓ 6 kuyulu plak içerisine 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve 1 gece hücrelerin yapışması için bekletildi.
- ✓ Her iki hücre hattının kontrol gruplarına taze medyum ve her bir grup için belirlenmiş olan M-IC₅₀ dozları eklendi ve 6 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyon sonunda medyumlar atıldı.
- ✓ Fazla bekletilmeden her kuyucuğa 1 ml PBS eklendi.
- ✓ Birkaç dakika PBS ile inkübatörde bekletildikten sonra PBS atıldı ve her kuyucuğa 1ml tripsin eklendi.
- ✓ Tripsin ile 5 dk inkübatörde bekletildikten sonra hücreler yapıştıkları plaktan ayrılmış oldu.
- ✓ Tripsin'in inhibisyonu için her flaska 1ml medyum eklendi.
- ✓ Elde edilen hücre süspansiyonu 5 ml'lik tüplere aktarıldı ve 120g'de 5 dk santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüjden çıkan tüplerin süpernatanı atıldı.
- ✓ Pellet ise 95 µl'de $1-5 \times 10^5$ hücre 1X Assay tamponu ile süspanse edildi.
- ✓ Tüm gruplara 5 µl Annexin V antikoru eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dk inkübe edildi.
- ✓ 100 µl'lik hücre süspansiyonu üzerine 5 µl 7-AAD eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk inkübe edildi.
- ✓ Tüpler okutmak için Muse® Cell Analyzer cihazına götürüldü.
- ✓ Elde edilen grafikler Muse 1.4 Analysis ile değerlendirildi.



Şekil 3.13. Flow sitometri cihazı.

3.5.6. TUNEL Yöntemi

Apoptozis'in en tanımlayıcı özelliği DNA fragmentasyonunun olmasıdır. Bu tezde HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde apoptozis gösterilmesi için mikroskopik DNA fragmentasyon tayini yapıldı. Bu yöntemde, ortama ilave edilecek terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT), fragmente DNA'nın 3'-OH uçlarına biotin işaretli deoksiniükleotid ekler. Daha sonra ortama streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı ilave edilerek biotinlenmiş nükleotidler bağlanır. Ortama ilave edilen diaminobenzidin ile renk oluşumunun belirlenmesi, dokudaki apoptotik hücrelerin saptanmasını sağlar.

HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde TUNEL Yöntemi ile apoptozisi belirlemek için;

- ✓ 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna yaklaşık 3.000-10.000 hücre inkübasyondan bir gün önce yapışmaları için ekildi.
- ✓ Kuyucuklar içindeki hücreler en az %70 konfluent olduğunda TUNEL analizi aşağıdaki şekilde uygulandı.
- ✓ Her iki hücre hattının kontrol gruplarına taze medyum ve her bir grup için belirlenmiş olan M-IC₅₀ dozları eklendi ve 11 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübe edilen hücreler ilk önce fikse edildi, bunun için;
- ✓ İnkübasyon medyumunu aspirasyon cihazı ile çekildi.
- ✓ %4'lük paraformaldehit ile 10 dk boyunca fikse edildi.
- ✓ Formaldehit uzaklaştırılıp ve 3 kez PBS ile yıkandı.
- ✓ Oda sıcaklığında PBS de hazırlanmış %0,2 Triton X-100 ile 15 dk permeabilizasyon yapıldı.
- ✓ Permeabilizasyon çözeltisi atıldı ve PBS ile 2-3 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Hücreler her kuyucuk başına 50 µl olacak şekilde denge (Equilibrium) tamponu ile 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ✓ TUNEL reaksiyon karışımı yukarıdaki inkübasyon sırasında hazırlandı. Bunun için çalışılacak her kuyucuk için 5 µl TdT çözeltisi ile 45 µl Biotin-dUTP çözeltisi karıştırıldı.
- ✓ Her kuyucukda 25 µl olacak şekilde 1X TdT denge (Equilibrium) tamponu ile 37°C'da sıcaklığında 60 dk inkübe edildi. Işıktan korunmasına dikkat edildi.

- ✓ Tampon çözeltisi atıldı ve iki dakika arayla PBS ile 3 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Endojen peroksidazların inaktivasyonu için PBS içerisinde hazırlanmış kuyucuk başına 100 µl %3'lük H₂O₂ çözeltisi ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- ✓ %3'lük H₂O₂ çözeltisi atıldı ve iki dakika arayla PBS ile 3 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Stok halde bulunan Streptavidin-HRP 100X çözeltisi PBS ile seyreltildi. Her kuyucuğa 50 µl eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonunda çözelti atıldı ve iki dakika arayla PBS ile 3 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Stok halde bulunan 20X DAB substrat çözeltisi % 0,3'lük H₂O₂ içeren PBS ile seyreltildi. Her kuyucuğa 50 µl eklendi, karanlıkta ve oda sıcaklığında kahverengi-siyah oluşuncaya kadar inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonunda çözelti atılıp, iki dakika arayla PBS ile 3 kez yıkama yapıldı.
- ✓ Görüntüleme ışık mikroskopunda yapıldı.



Şekil 3.14. Hücre görüntülerinin alındığı inverted mikroskop.

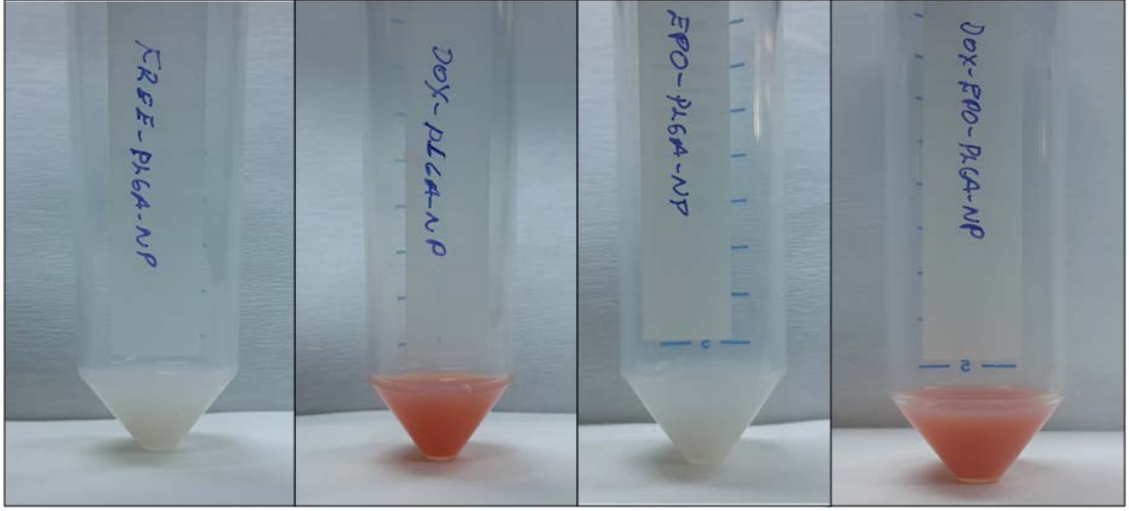
3.6. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm Standart sapma olarak verildi. İstatistiksel analiz Graphpad Prism Version 5.03 paket programı kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneyler her grup için 6 tekrarlı olarak yapıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapılırken, parametrik verilerde, Student T-Test ve ANOVA; non-parametrik verilerde Mann-Whitney U ve Kruskal–Wallis testi kullanıldı. Sinerjitik, additif ve antagonist etkiler yine Graphpad Prism programı ile belirlendi. P değeri < 0.05 olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

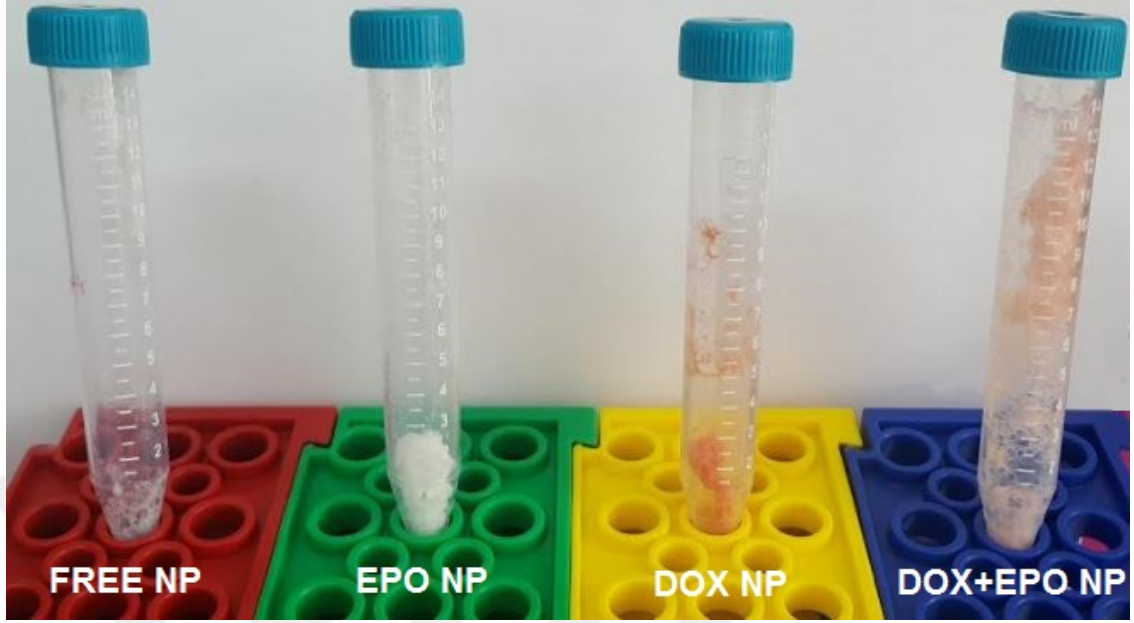
4.1. Dox ve Epo'nin nanopartiküle enkapsüle edilmesi

Dox enkapsülasyonu için Dox:Polimer:BSA 1:5:12,5 oranı ve Epo enkapsülasyonu için Epo:Polimer:BSA oranı 1:6,25:62,5 olacak şekilde yükleme yapıldı. Daha sonra çözenlerin uçurulması için 25-30 dk evaporatör konuldu. Çözenler uçtuktan sonra nanopartiküller sulu çözelti içerisinde Şekil 4.1 deki gibi görüldü.



Şekil 4.1. Nanopartiküllerin evaporasyondan sonraki görüntüleri.

Nanopartiküllerin daha fazla stabil kalması, bozulmaması ve istenilen konsantrasyonda çözeltiler hazırlayabilmek için liyofilizasyon işlemine uygulandı. Birkaç gün dondurmalı kurutucu da tutuldu. Nanopartiküller içerisinde hiç su kalmadan -20°C 'de muhafaza edilecek halde Şekil 4.2 deki gibi toz halinde görüldü.

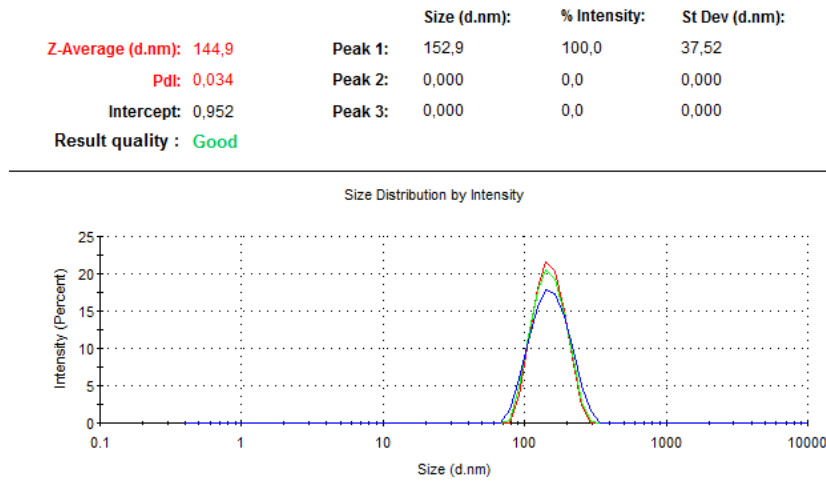


Şekil 4.2. Nanopartikülleri liyofilizasyondan sonraki son görüntüleri.

4.2. Dox ve Epo İçeren Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

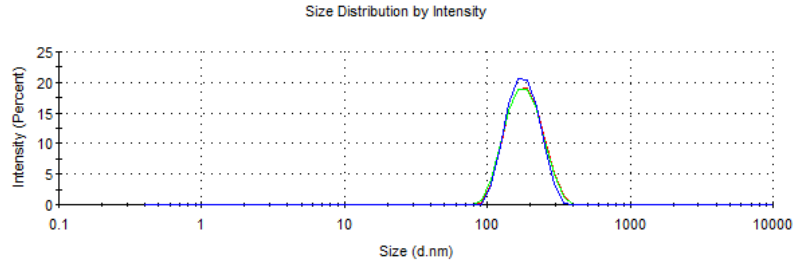
4.2.1. Partikül Boyutunun Belirlenmesi

Partikül büyüklüğü dağılımını ifade eden polidispersite indeksi (PDI) değeri tüm partikül formülasyon grubunda da 0.034-0.075 aralığındadır (Tablo 4.1). Bu dağılımın monodispers bir şekilde olduğu ifade etmektedir. Uygulanan yükleme işleminin nanopartikül büyüklüğü dağılımı üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye yol açmadığı belirlendi (Şekil 4.3,4,5,6).



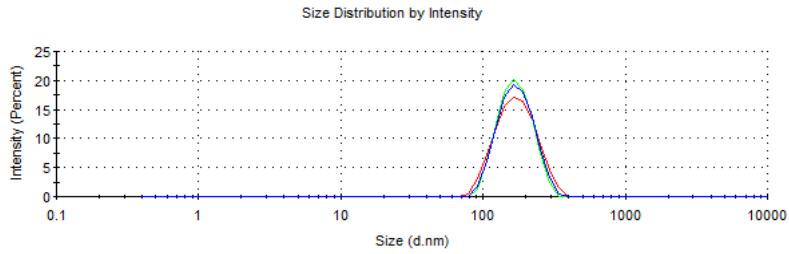
Şekil 4.3. Zetasizer ile Free NP boyut analizi.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 175,0	Peak 1: 187,9	100,0	51,90
Pdl: 0,058	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,954	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



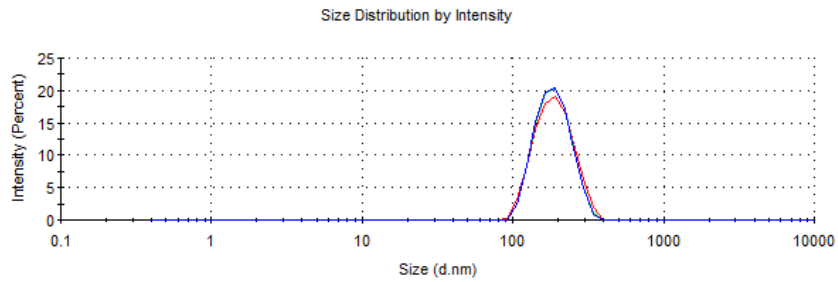
Şekil 4.4. Zetasizer ile Epo NP boyut analizi.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 162,1	Peak 1: 177,6	100,0	55,44
Pdl: 0,075	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,940	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Şekil 4.5. Zetasizer ile Dox NP boyut analizi.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 179,6	Peak 1: 192,6	100,0	53,87
Pdl: 0,047	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,969	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Şekil 4.6. Zetasizer ile Dox+Epo NP boyut analizi.

PLGA nanopartiküller hazırlandıktan sonra nanopartikül formülasyonları üzerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda yüklenen ilaca bağlı olarak partikül büyüklüğünün hiç ilaç olmayan nanopartikülün 144,9 nm olduğu ve Dox ve/veya Epo yüklenenlerde ise boyutun arttığı hatta her iki ilacında yüklendiği nanopartikülde ise 179,6 nm'ye yükseldiği görüldü. Dolayısıyla klinik uygulamalar için hedeflenen 100-200 nm arasında nanopartiküller sentezlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Zetasizer ile nanopartiküllerin boyutları.

Gruplar	Pdi	Ortalama Boyutlar (nm)	SD (±)
Free-NP	0,034	144,9	37,52
Epo-NP	0,058	175	51,9
Dox-NP	0,075	162,1	55,44
Dox+Epo-NP	0,047	179,6	53,87

4.2.2. Partikül zeta potansiyel değerlerinin belirlenmesi

Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin ise – 9,51 mV, – 11,3 mV değerleri arasında olduğu bulundu (Tablo 4.2). Bu potansiyel değerleri nanopartiküllerin aglomere olamayacağı bir potansiyeldir ve klinik uygulamalar için idealdir. Sentezlenen nanopartiküller hücre kültürü uygulamalarında PBS ile çözündü, topaklanma veya çökme gözlenmedi.

Tablo 4.2. Zetasizer ile nanopartiküllerin zeta potansiyelleri.

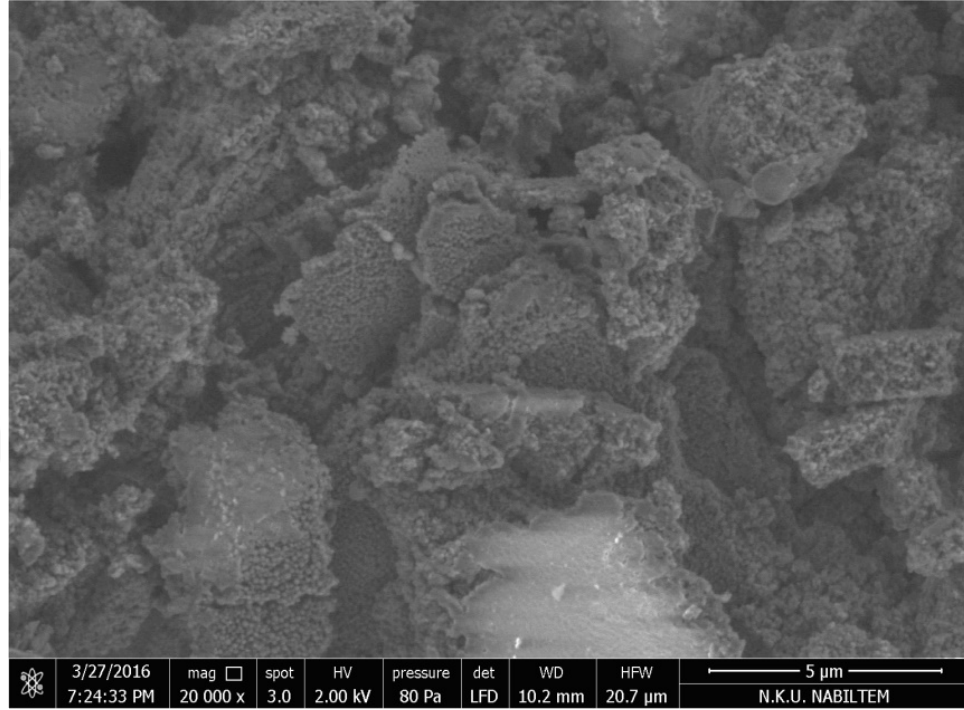
Gruplar	Zeta Potansiyeli ort (mV)	SD(±)
Free-NP	-9,51	0,316
Epo-NP	-9,72	0,509
Dox-NP	-11,3	1,22
Dox+Epo-NP	-11,1	0,115

4.2.3. Nanopartiküllerin SEM ile karakterizasyonu

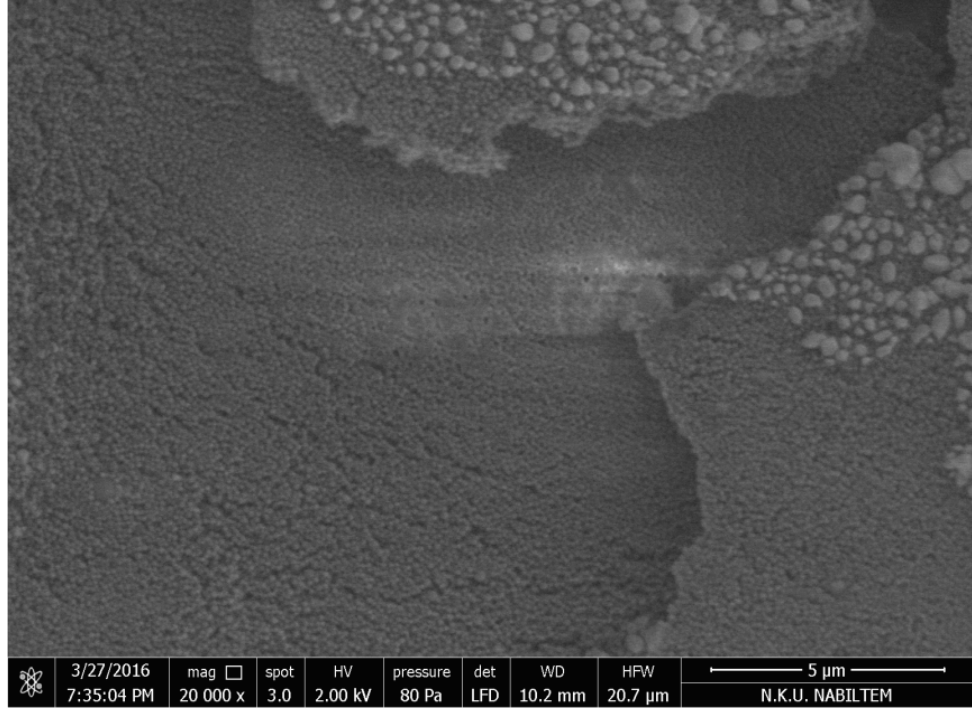
Nanopartiküllerin düşük vakum altında 20000 büyütme oranındaki SEM görüntüleri Free-Np şekil 4.7'de, Epo-Np şekil 4.8, Dox-Np şekil 4.9 ve Dox+Epo-Np şekil 4.10'da verildi. Image J programında analiz edilen partikül boyutlarının nanoboyutta olduğu ve 164-225 nm aralığında olduğu belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Nanopartiküllerin SEM ile ortalama boyutları

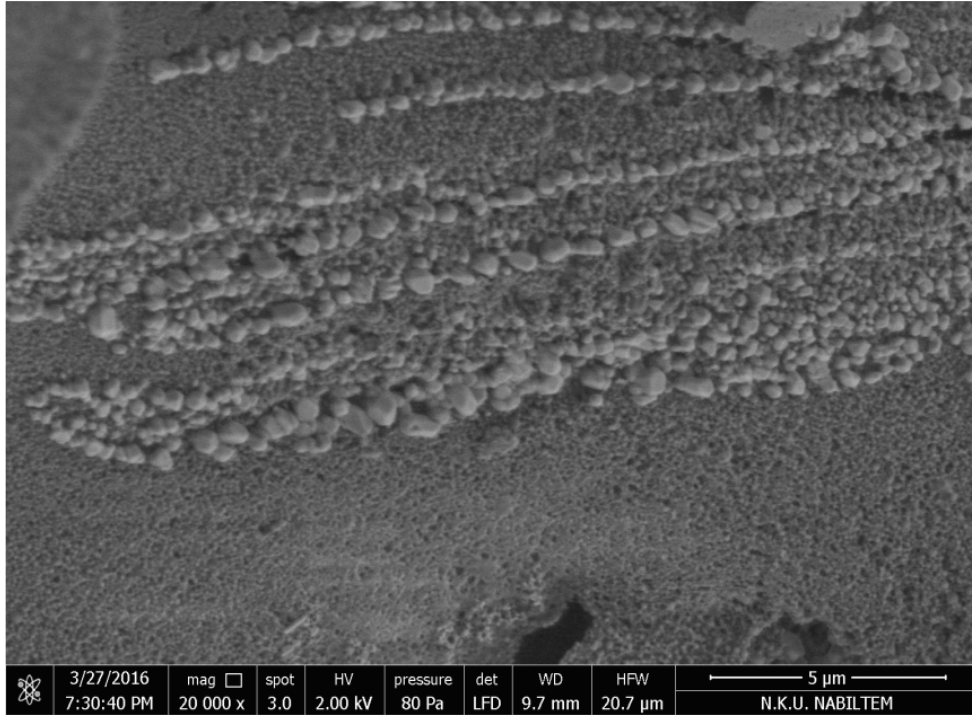
Gruplar	SEM Boyut ort (nm)	SD(\pm)
Free-NP	164	11,64
Epo-NP	182	16,3
Dox-NP	165	13,1
Dox+Epo-NP	225	15,2



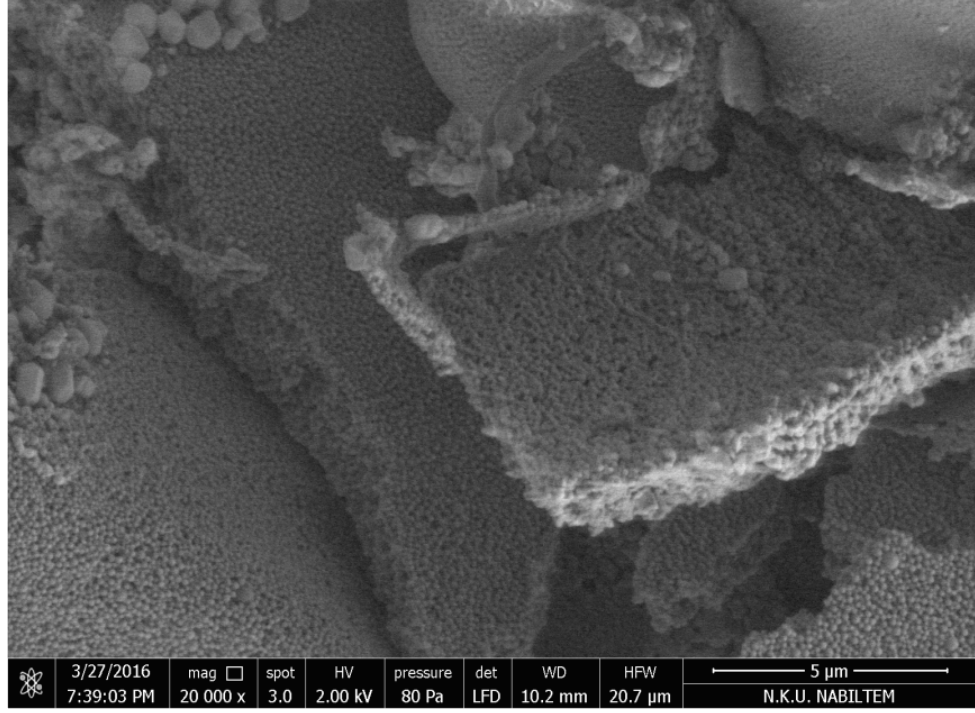
Şekil 4.7. Free-Np'nün SEM görüntüsü.



Şekil 4.8. Epo-Np'nün SEM görüntüsü.



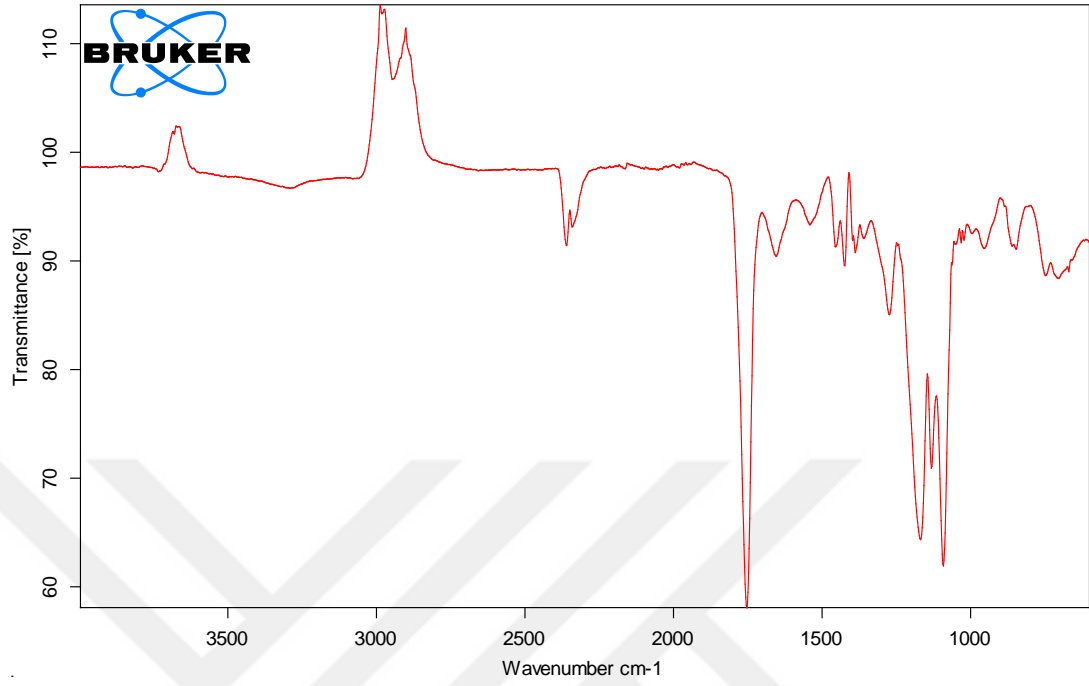
Şekil 4.9. Dox-Np'nün SEM görüntüsü.



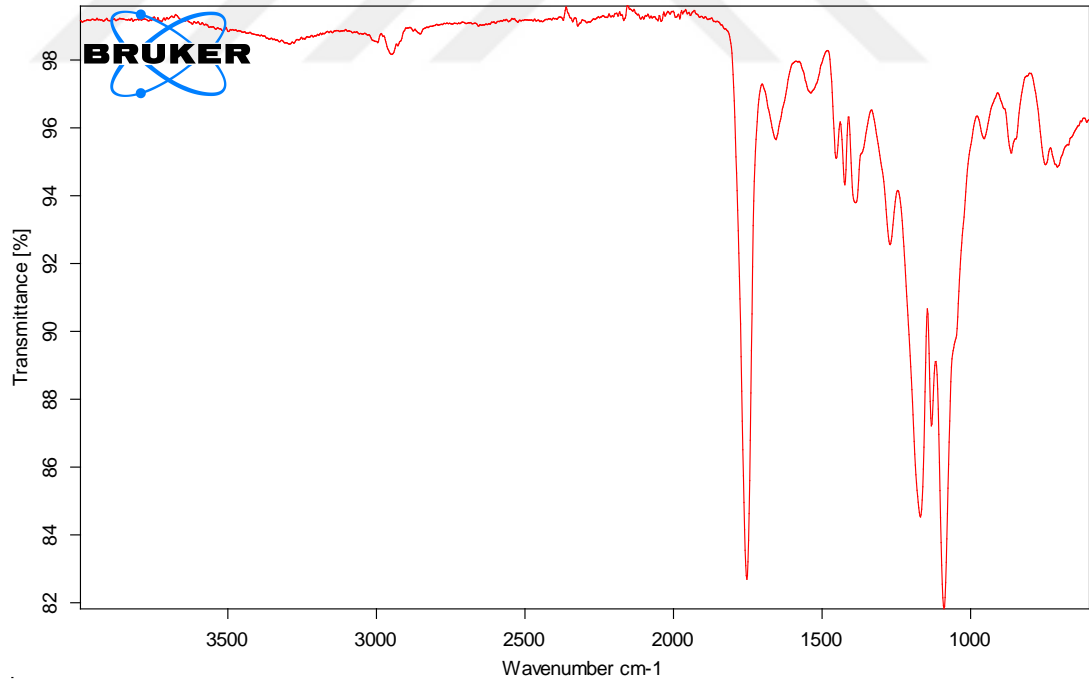
Şekil 4.10. Dox+Epo-Np'nün SEM görüntüsü.

4.2.4. Nanopartiküllerin ATR-FTIR Spektroskopisi ile Moleküler Karakterizasyonu

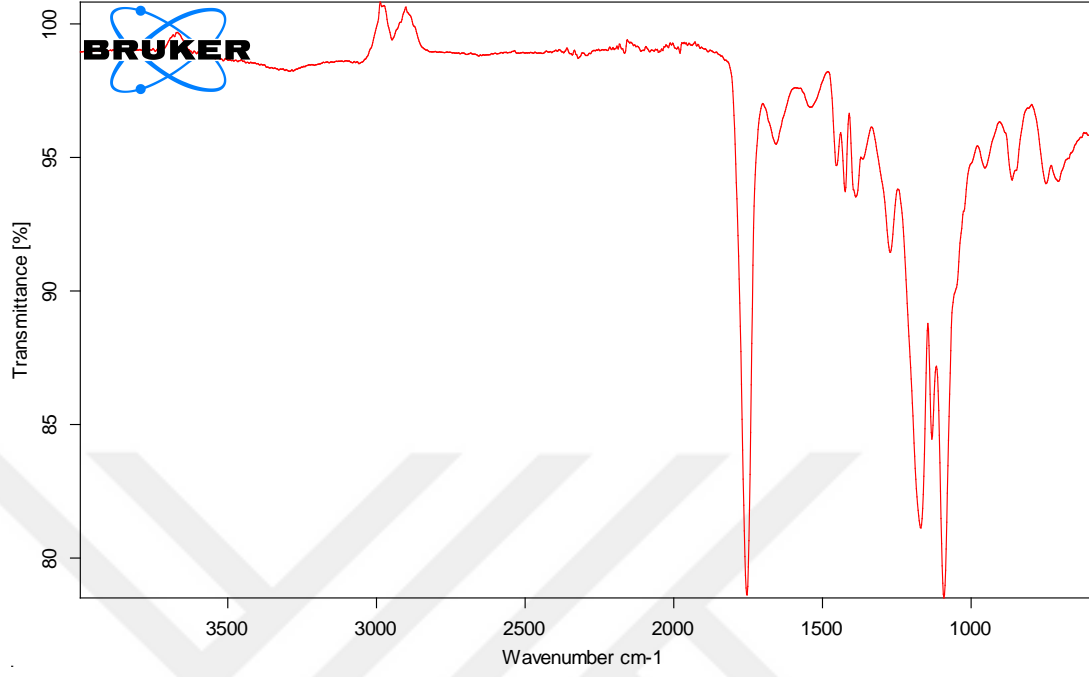
ATR-FTIR Spektroskopi analizi nanopartiküllerin moleküller arası kimyasal etkileşimlerini ve yapısal değişiklikleri tespit etmek için gerçekleştirildi. Nanopartiküllere ait spektrumlar Free-Np şekil 4.11'de, Epo-Np şekil 4.12, Dox-Np şekil 4.13 ve Dox+Epo-Np şekil 4.14'da gösterildi.



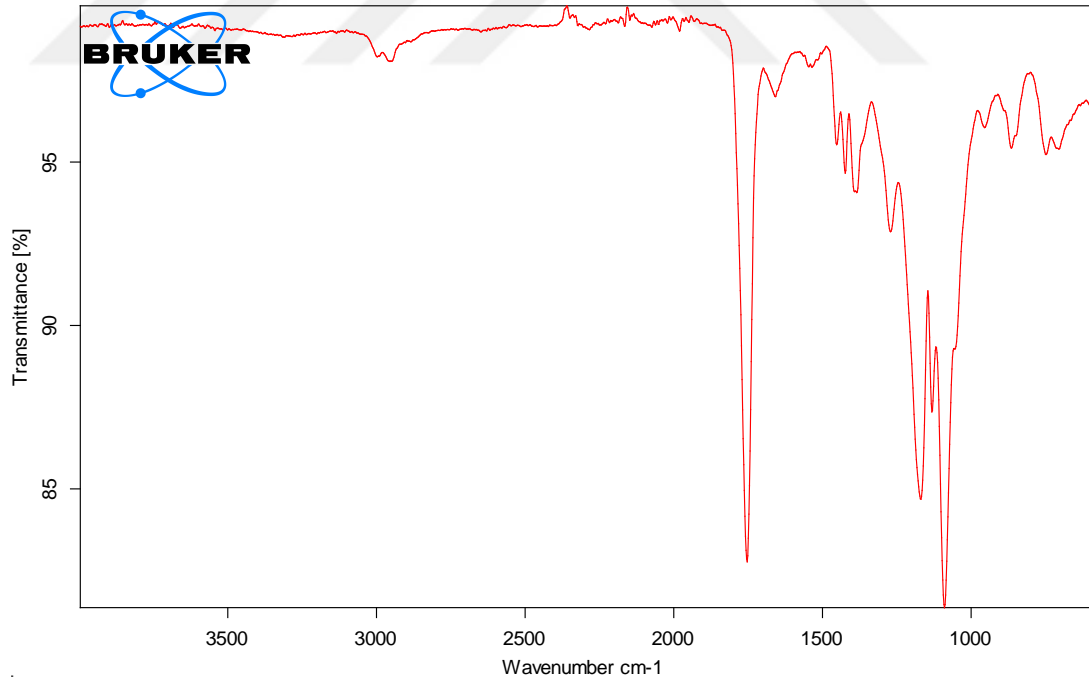
Şekil 4.11. ATR-FTIR ile PLGA'dan oluşan ilaç içermeyen Free-Np spektrumu.



Şekil 4.12. ATR-FTIR ile Epo-Np spektrumu.

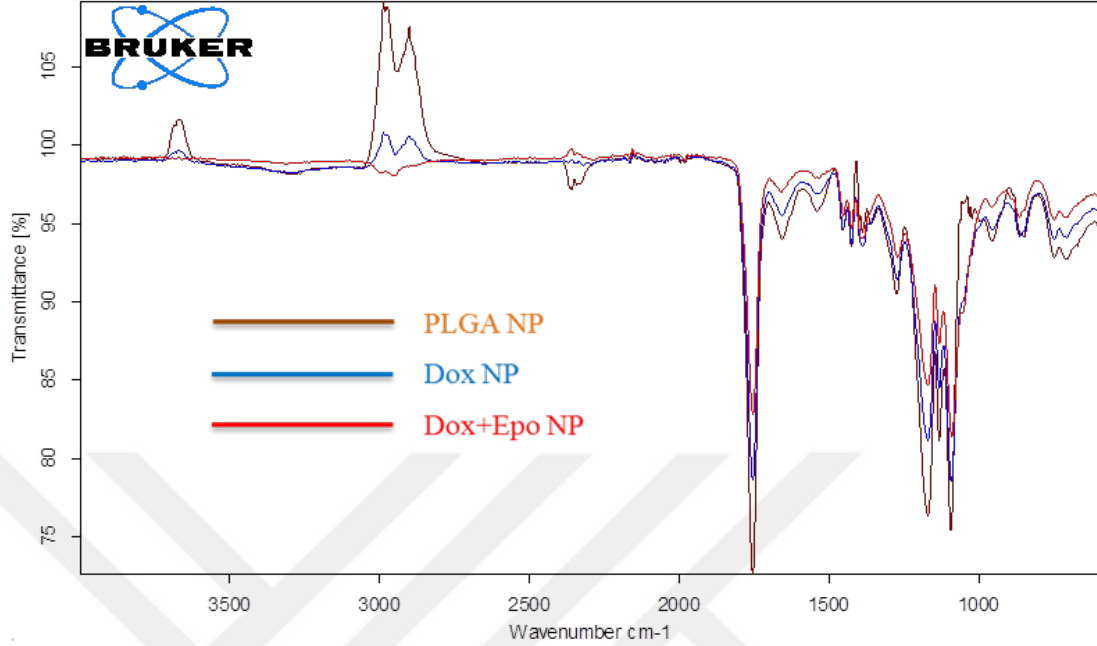


Şekil 4.13. ATR-FTIR ile Dox-Np spektrumu.



Şekil 4.14. ATR-FTIR ile Dox+Epo-Np spektrumu.

PLGA nanopartikülü, Dox yüklü nanopartikülü ve Dox+Epo yüklü nanopartiküllerine ait spektrumların tek bir grafik halinde Şekil 4.15’de gösterilmektedir.



Şekil 4.15. ATR-FTIR ile Dox+Epo-Np spektrumları.

PLGA nanopartikülünün spesifik pikleri aşağıdaki tabloda verildi.

Tablo 4.4. PLGA'nın FTIR spektrumundaki karakteristik pikler (Delhayeve Merlin, 1975).

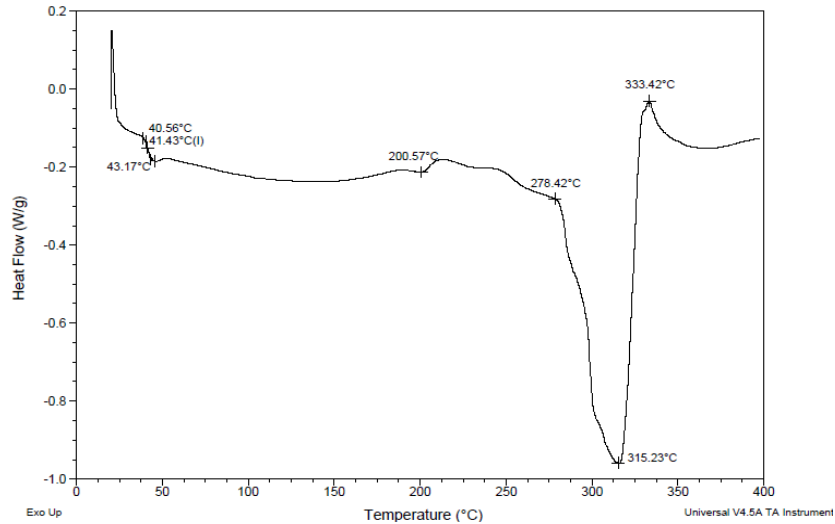
Absorpsiyon bantları (cm ⁻¹)	Pik Özelliği
3000 - 2700	CH, CH ₃ e CH ₂ (Gerilme)
1900 - 1550	C=O (Gerilme)
1500 - 1250	CH ₃ e CH ₂ (Bozulma)
1350 - 1150	CH ₂ e CH (Sallanma Titreşimi)
1300 - 1150	C-O (ester) (Bozulma)

PLGA, Laktid ve glikolid monomerlerinden oluşmaktadır. FTIR analizi yapılırken kopolimere ait olan C=O, C-O, CH₃, CH₂ ve C-H grupları referans alındı (Tablo 4.4). Kopolimerin her iki monomerinde de karbonil grubun bulunduğundan dolayı 1750 cm⁻¹ bölgesinde kuvvetli bir görüldü (Şekil 4.11). İlaç yüklendikçe hem Dox'de hem de Epo'de bulunan hidroksil gruplarından dolayı bu pik zayıflamıştır. Simetrik ve asimetric C-C(=O)-O titreşimlerinden kaynaklanan 1300 ve 1150 cm⁻¹ piklerinde de gerilme vardır. Bu bantlar esterlerin karakterizasyonu için kullanılan bölgelerdir. Her iki ilacında yüklediği nanopartiküllerde bu gerilme zayıflamaktadır. Hidroksil grubundan kaynaklanan 3600'den başlayıp 3000 cm⁻¹ de son bulunan absorpsiyon bandı Dox nanopartikülde kaybolmazken Dox+Epo içeren nanopartikülde bu hafif pik kayboldu. Alifatik C - H, O - H ve N - H esneme titreşimlerinin 3000- 2850 cm⁻¹ arasında pik

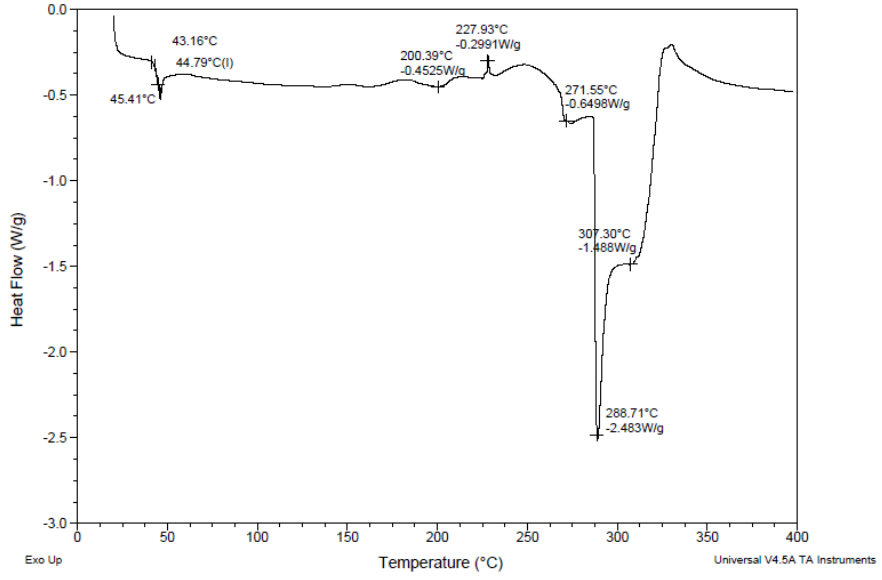
verdiği gözlemlendi. Hiç ilaç içermeyen PLGA nanopartikülde bunun alifatik C – H'den kaynaklanmaktadır. Ancak hem Dox hem de Epo'den gelen O – H ve N – H esneme pikleri görüldü. Ayrıca Dox+Epo içeren nanopartikülde bu hafif pik biraz daha kuvvetlendi. Bu her iki ilaç içeren nanopartiküle de ilaç yüklendiğini gösterdi. Çünkü N – H bağları hem Dox'de hem de Epo'de mevcuttur (Şekil 4.15).

4.2.5. Nanopartiküllerin DSC ile Karakterizasyonu

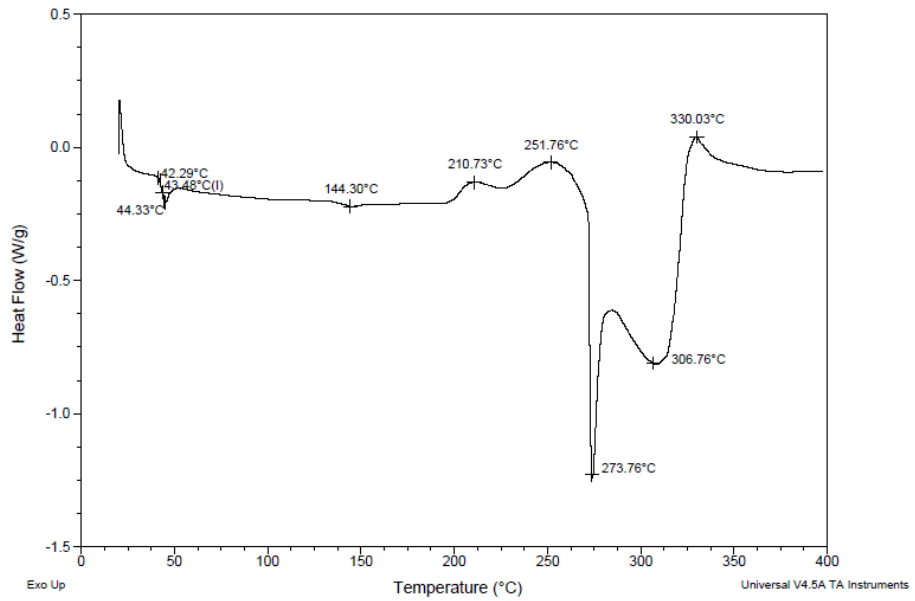
Diferansiyel taramalı kalorimetre ordinat skalasında (y eksen) sıfır noktasından daha yukarıda bulunan pikler ekzotermik prosesleri, daha aşağıda olan pikler de endotermik prosesleri tanımlar. Bu ısı değışiklikleri fiziksel veya kimyasal olayların bir sonucudur. Tüm nanopartiküller için yapılan ölçüm sonucunda DSC cihazının yazılım programında T_o (pikin başladığı sıcaklık), T_p (pik sıcaklığı) ve T_e (pikin sonlandığı sıcaklık) sıcaklıkları bulundu (Tablo 4.5). Bütün nanopartiküllerde endotermik ısı akışını ifade eden pikler gözlemlendi. Nanopartiküllerin DSC ile karakterizasyonu sonucunda nanopartiküllerin içine Dox ve/veya Epo ilaçlarının disperse olduğu pik değerlerinin farkından bulundu (Şekil 4.16,17,18,19). Ayrıca, ilaçların camsı geçişkenlik bölgesinde endotermik piklerin yüklenen ilaca göre farklılık gösterdi. Hiç ilaç yüklenmeyen PLGA nanopartikülde bu endotermik pik ilaç yüklenmeyenlere göre daha düşük bulundu (Şekil 4.21). Bu değerler ilaç yüklü nanopartiküllerin yüklü olmayanlara göre sıcaklıklara karşı daha dayanıklı olduğunu gösterdi.



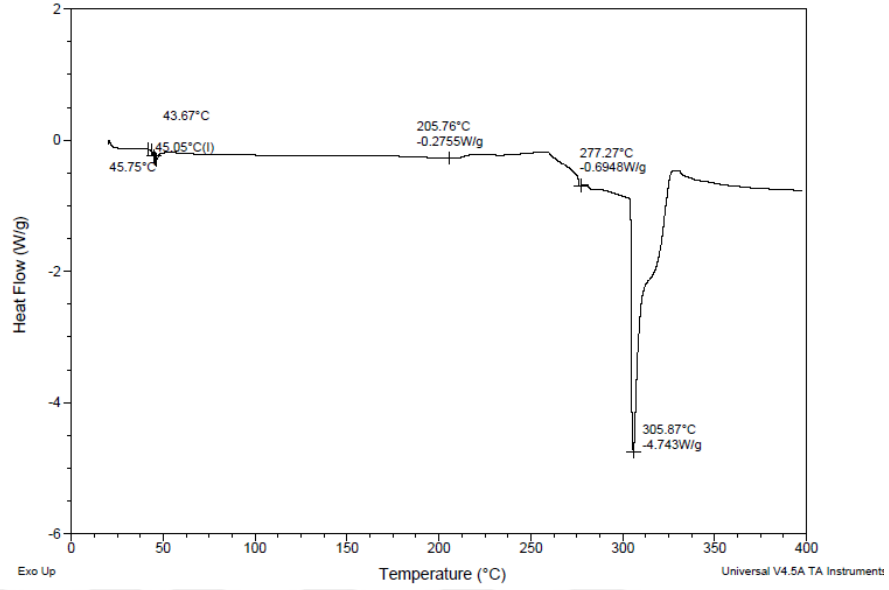
Şekil 4.16. Free NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.



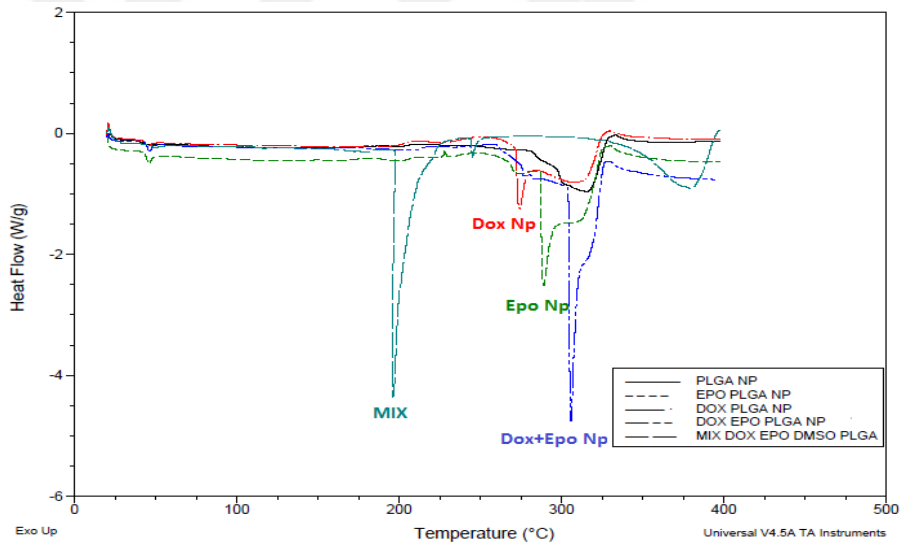
Şekil 4.17. Epo NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.



Şekil 4.18. Dox NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.



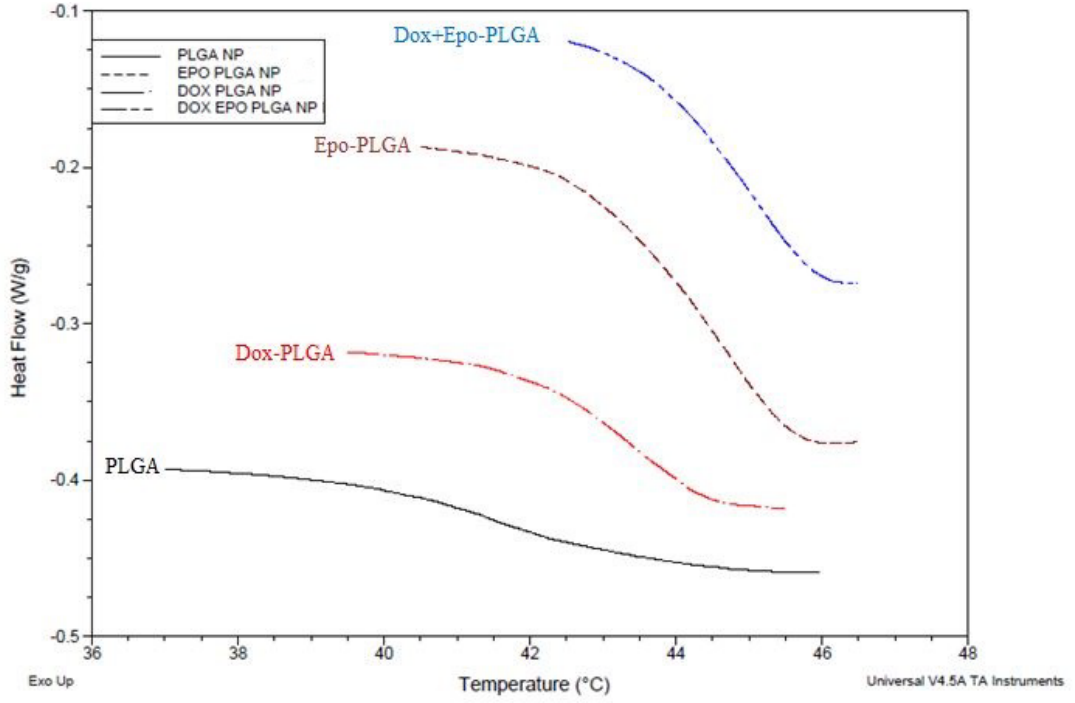
Şekil 4.19. Dox+Epo NP'ne ait DSC diferansiyel termogram.



Şekil 4.20. Tüm NP'lere ait DSC diferansiyel termogramının karşılaştırılması.

Tablo 4.5. Tüm nanopartiküllere ait DSC parametreleri.

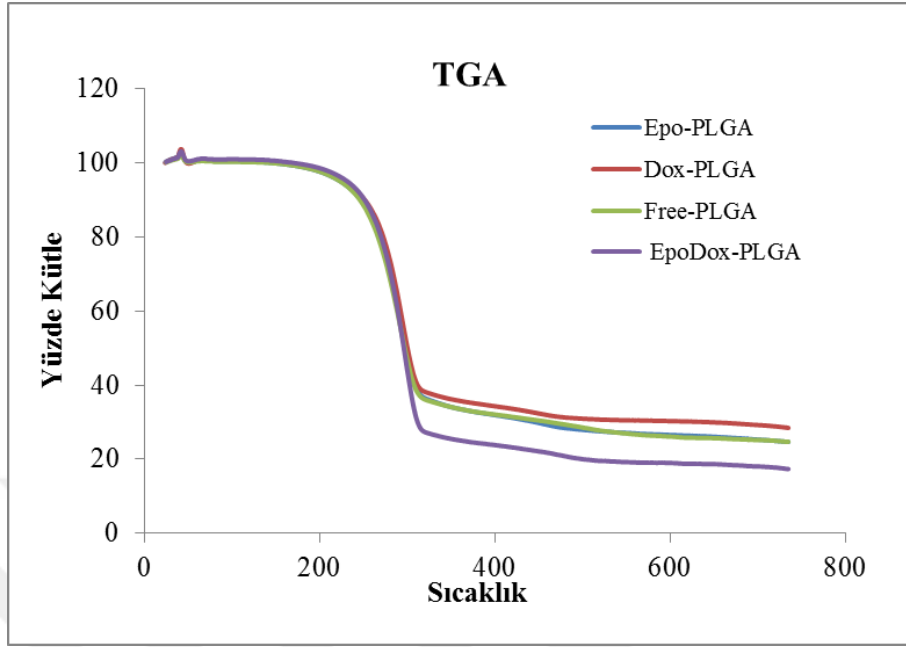
Gruplar	T_o °C	T_p °C	T_e °C
Free-NP	40,56	200,57	278,47
Epo-NP	43,16	200,39	271,55
Dox-NP	42,29	210,73	273,76
Dox+Epo-NP	43,67	205,76	277,27



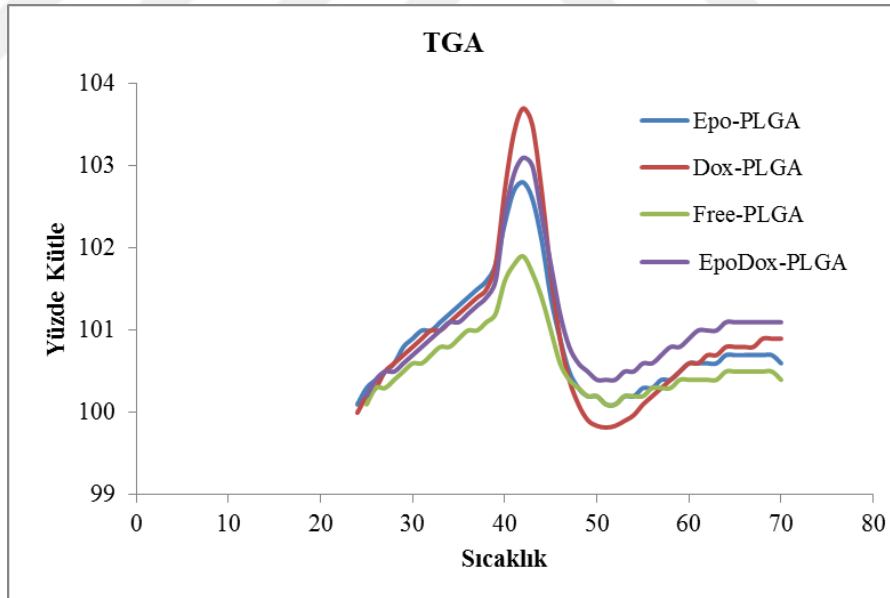
Şekil 4.21. NP'lere ait DSC termogramında camsı geçişkenlik bölgesinin karşılaştırılması.

4.2.6. Nanopartiküllerin TGA ile Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin termal gravimetrik analizi sonucunda bozunma sıcaklık (T_d) değerleri ölçülmüştür. Nanopartiküllerin 0°C'den 750°C'ye kadar sıcaklık aralıklarının bozunma diyagramı Şekil 4.22 gösterildi. Yüklenen ilaç konsantrasyonları düşük miktarlarda olduğu için belirgin bir farklılık görülmedi. Ancak nanopartiküllerin ilk bozunma sıcaklıklarındaki kütle değişim diyagramında farklılık görüldü (Şekil 4.23). Burada nanopartiküllerin ilaç yüklenmesine bağlı olarak 42⁰C'deki ilk bozunma sıcaklığında yüzde kütlelerinin birbirinden farklı olduğu bulundu.



Şekil 4.22. Tüm NP'lere ait TGA diyagramının karşılaştırılması.



Şekil 4.23. Nanopartiküllerin ilk bozunma sıcaklıklarındaki kütle değişim diyagramı

4.2.7. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Enkapsülasyon etkinliği, nanopartiküllerde tutulmuş olan madde miktarları ile nanopartikül hazırlama aşamasında yüklenen Dox ve/veya Epo miktarının birbirine kütleli olarak orantılanması ile belirlendi. Dox verim için HPLC cihazı kullanıldı. Epo verim içinse LC-MS-QTOF cihazı kullanıldı (Tablo 4.6.)

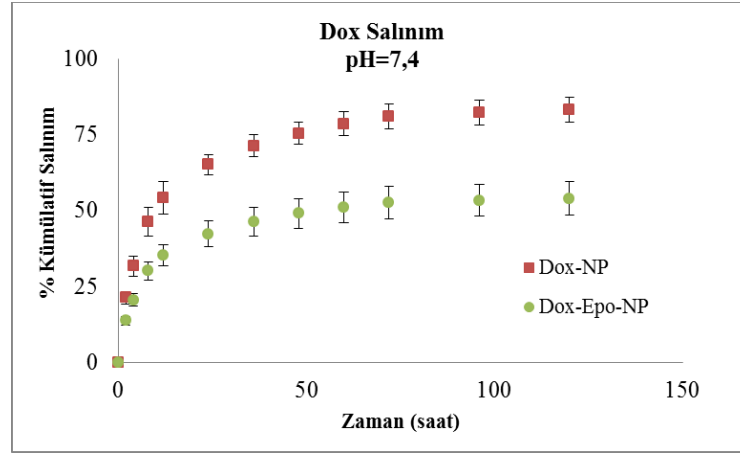
Tablo 4.6. Tüm NP'lere ait enkapsülasyon verimi.

Nanopartikül	% Dox	% Epo
Free-NP	-	-
Dox-NP	79,2±0,69	-
Epo-NP	-	83,56 ±0,78
Dox-Epo-NP	77,8 ± 0,88	82,4±0,74

Her iki ilaç da hidrofobik özellikte ilaçlar olduğundan dolayı amfipatik bir molekül olan PLGA içerisine yüksek oranda enkapsüle edildi.

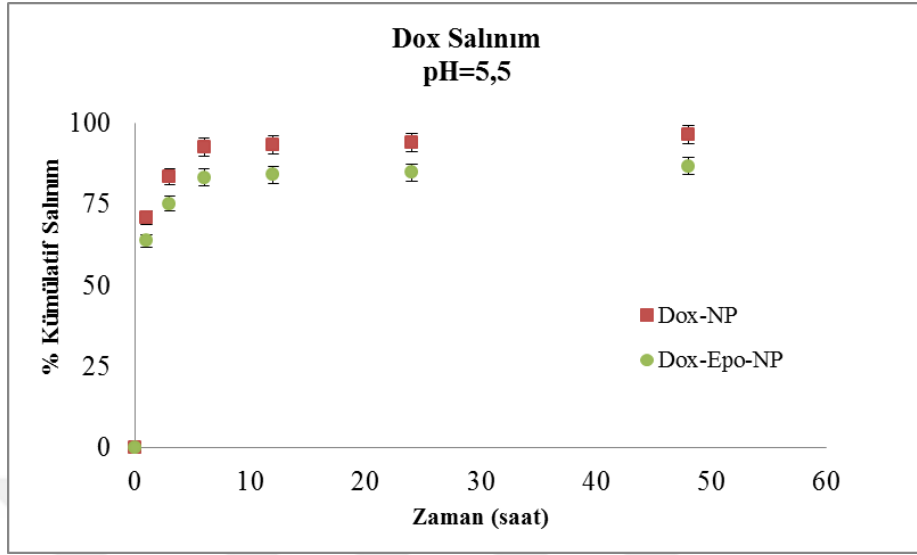
4.3. Enkapsüle Edilen İlaçların *In Vitro* Salınımlarının Belirlenmesi

Nanopartiküllerde tutulmuş olan madde miktarlarının pH=7,4 ve pH=5,5'da salınımları belirli zaman aralıklarında alınan numunelerde belirlendi. Burada pH=7,4 fizyolojik pH durumunda nanopartiküllerden salınımlarını temsil ettiği için, pH=5,5'da ise hücre içine giren nanopartiküllerin lizozomal pH'daki salınımlarını temsil ettiği için seçildi. Salınan aktif madde miktarları ilaçların ölçümüne uygun cihazlarda belirlendi. pH=7,4'de Dox yüklü olan Dox-Np ve Dox+Epo-Np gruplarında salınımın 1 gün içerisinde %50'sini hızlı ve birinci günden itibaren de yavaş olduğu görüldü (Şekil 4.24).



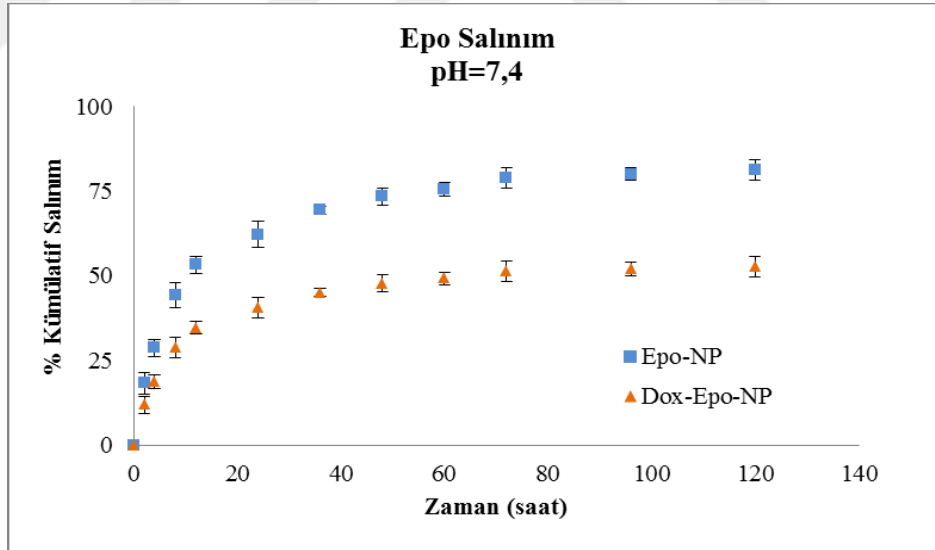
Şekil 4.24. Zamana karşı kümülatif %Dox salınımı pH=7,4'de

pH=5,5'da ise Dox yüklü olan Dox-Np ve Dox+Epo-Np gruplarında salınımın 1 saat içerisinde %50'sini hızlı ve altıncı saatten itibaren de tamamının salındığı belirlendi (Şekil 4.25)



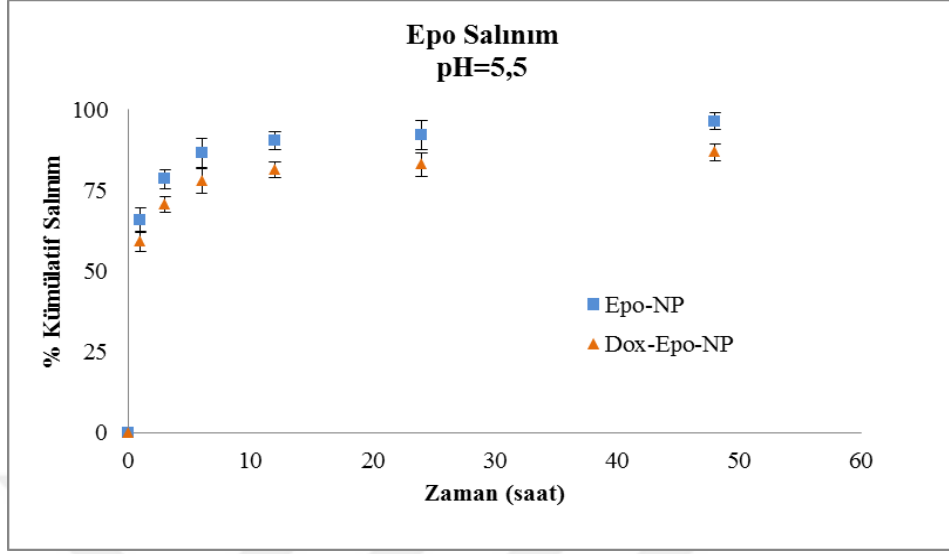
Şekil 4.25. Zamana karşı kümülatif %Dox salınımı pH=5,5’de

pH=7,4’de Epo yüklü olan Epo-Np ve Dox+Epo-Np gruplarında salınımın 1 gün içerisinde %50’sini hızlı ve birinci günden itibaren de yavaş olduğu görüldü (Şekil 4.24).



Şekil 4.26. Zamana karşı kümülatif %Epo salınımı pH=7,4’de

pH=5,5’da ise Epo yüklü olan Epo-Np ve Dox+Epo-Np gruplarında salınımın 2 saat içerisinde %75’sini hızlı ve on ikinci saatten itibaren de tamamına yakının salındığı belirlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.27. Zamana karşı kümülatif %Epo salınım pH=5,5'de

Sentezlenen nanopartiküller normal fizyolojik şartlarda istenildiği gibi ilacı yavaş ve düşük konsantrasyonlarda bırakırken, lizozomal pH'da ise hızlı ve yüksek konsantrasyonlarda bıraktığı belirlendi.

4.4. Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkinliğinin Belirlenmesi

Aşağıdaki tüm deney gruplarında sitotoksisite deneyleri gerçekleştirildi. İnkübasyonlar 24 saat sonunda sonlandırıldı.

Normal HUVEC ve Meme kanseri (MCF-7) hücreleri için deney grupları;

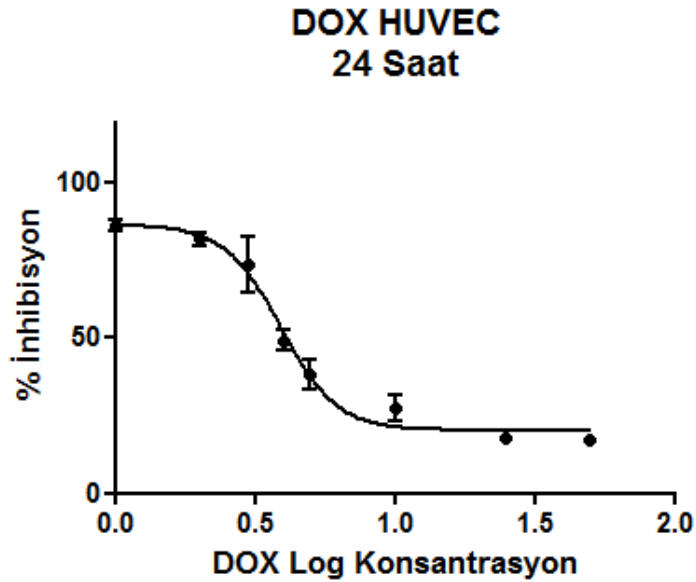
1. Kontrol
2. Serbest Dox
3. Serbest Epo
4. Serbest Dox+serbest Epo
5. Doxil (ticari, doksorubisin ilacın içeren lipozom nanopartikül)
6. PLGA-Np (İlaç içermeyen nanopartikül)
7. Epo-Np(PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Epo)
8. Dox-Np (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Dox)
9. Dox-Epo-Np (PLGA Nanopartiküle enkapsüle edilen Dox+Epo)

4.4.1. XTT Sitotoksisite Analizi

Tüm deney gruplarında IC₅₀ değerinin belirlenirken GraphPad Prism 5 programı kullanıldı. Doz-inhibisyon çoklu eğim denklemi kullanılarak IC₅₀ değerleri bulundu.

HUVEC hücrelerinde Dox'in IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

HUVEC hücrelerinde Dox'in doz çalışması yapılırken 0,5-500 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.28). HUVEC hücresinde Dox için IC₅₀ değeri 3,924 µg/ml bulundu (Tablo 4.7). Tez çalışması boyunca HUVEC hücresine ait IC₅₀ değeri **H-IC₅₀** olarak ifade edildi.



$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

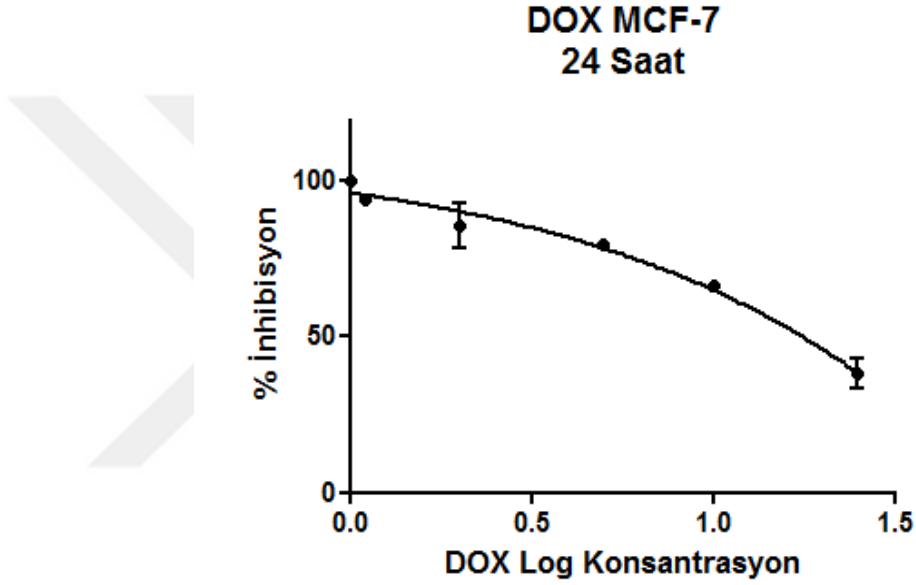
Şekil 4.28. HUVEC hücrelerinde Dox'nin 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.7. HUVEC hücrelerinde Dox'in 24 saatlik H-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	20,28
Top	86,40
LogIC50	0,5937
HillSlope	-4,334
IC50	3,924 µg/ml

MCF-7 hücrelerinde Dox'in IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

MCF-7 hücrelerinde Dox'in doz çalışması yapılırken 0,5-500 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.29). MCF-7 hücresinde Dox için IC₅₀ değeri 1,328 µg/ml bulundu (Tablo 4.8). Tez çalışması boyunca MCF-7 hücresine ait IC₅₀ değeri **M-IC₅₀** olarak ifade edildi.



$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

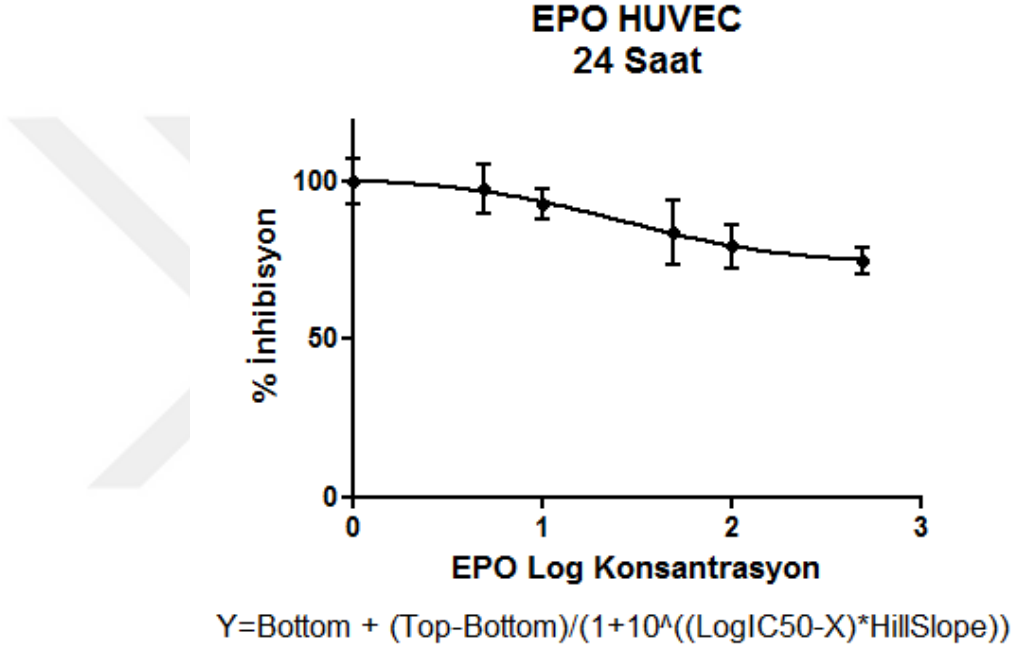
Şekil 4.29. MCF-7 hücrelerinde Dox'nin 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.8. MCF-7 hücrelerinde Dox'nin 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	~ -55396
Top	110,2
LogIC ₅₀	~ 7,120
HillSlope	~ -0,5047
IC ₅₀	1,328 µg/ml

HUVEC hücrelerinde Epo'in IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

HUVEC hücrelerinde Epo'in doz çalışması yapılırken 0,5-1000 ng/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.30). HUVEC hücresinde Epo için H-IC₅₀ değeri 26,93 ng/ml bulundu (Tablo 4.9).



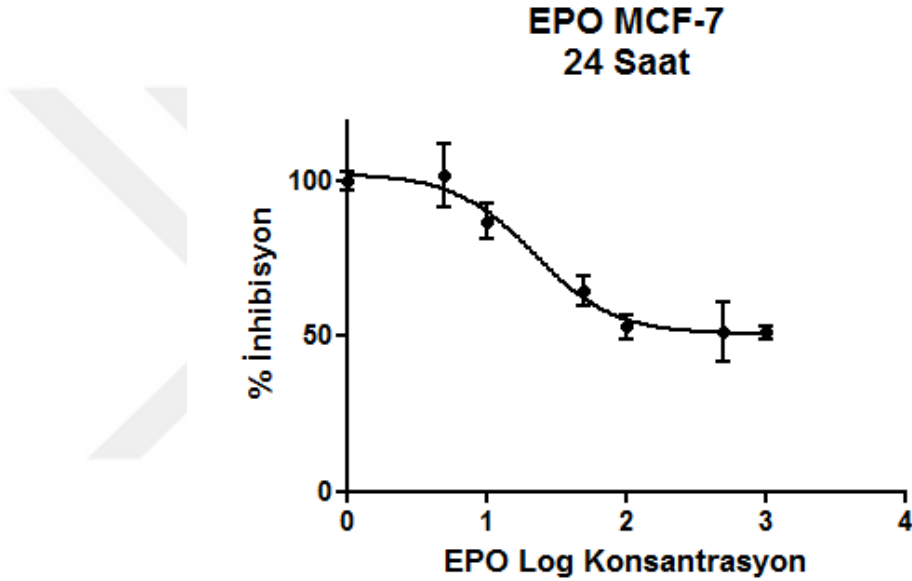
Şekil 4.30. HUVEC hücrelerinde Epo'in 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.9. HUVEC hücrelerinde Epo'in 24 saatlik H-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	73,40
Top	101,4
LogIC50	1,430
HillSlope	-0,9624
IC50	26,93 ng/ml

MCF-7 hücrelerinde Epo'in IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

MCF-7 hücrelerinde Epo'in doz çalışması yapılırken 0,5-1000 ng/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.31). MCF-7 hücresinde Epo için M-IC₅₀ değeri 22,20 ng/ml bulundu (Tablo 4.10).



$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

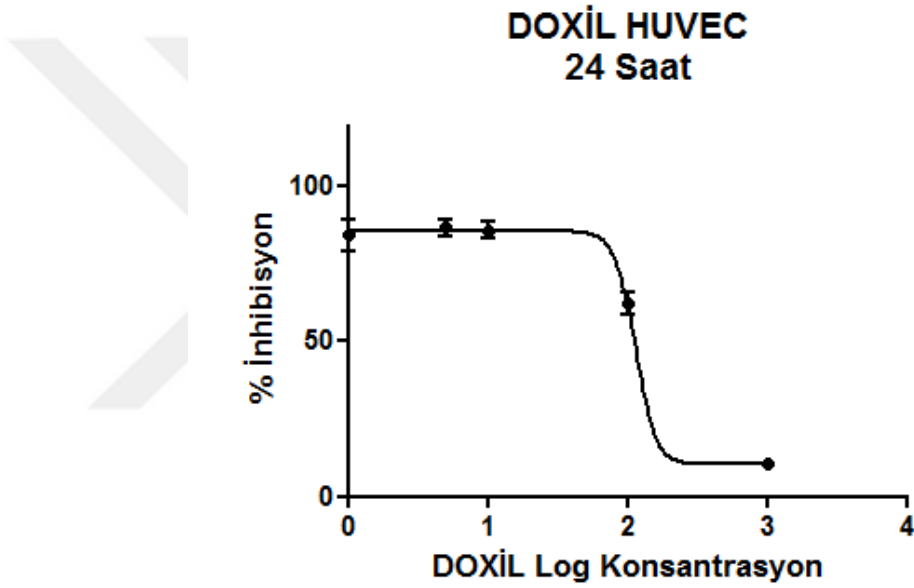
Şekil 4.31. MCF-7 hücrelerinde Epo'in 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.10. MCF-7 hücrelerinde Epo'in 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	50,65
Top	102,3
LogIC50	1,346
HillSlope	-1,515
IC50	22,20 ng/ml

HUVEC hücrelerinde Doxil'in IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

HUVEC hücrelerinde sentezlenen nanopartiküler ile ticari olarak satılan Doxil'in karşılaştırıldı. Doxil'in doz çalışması yapılırken 1-1000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.32). HUVEC hücresinde Doxil için H-IC₅₀ değeri 114,3 µg/ml bulundu (Tablo 4.11).



$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

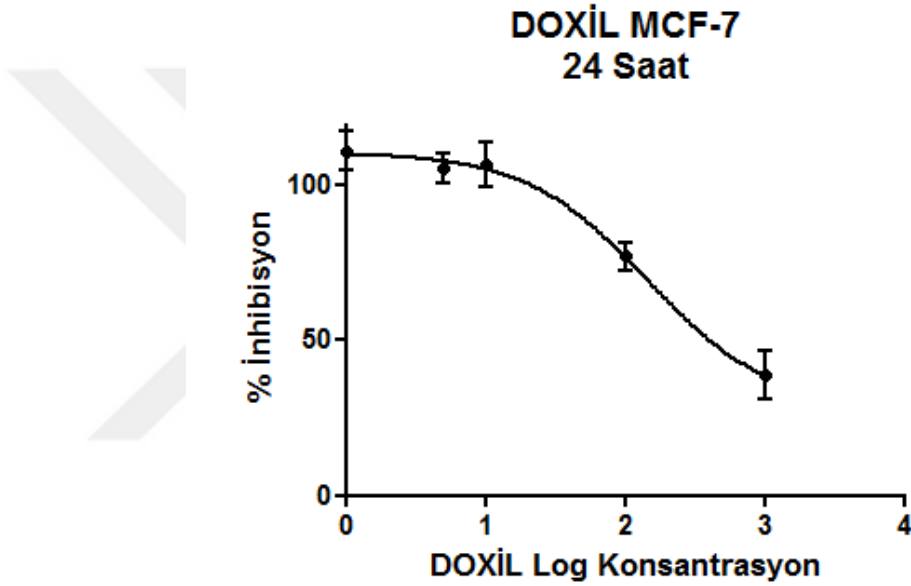
Şekil 4.32. HUVEC hücrelerinde Doxil'in 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.11. HUVEC hücrelerinde Doxil'in 24 saatlik H-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	10,30
Top	85,50
LogIC ₅₀	2,058
HillSlope	-6,008
IC ₅₀	114,3 µg/ml

MCF-7 hücrelerinde Doxil'in IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

MCF-7 hücrelerinde sentezlenen nanopartiküler ile ticari olarak satılan Doxil'in karşılaştırıldı. Doxil'in doz çalışması yapılırken 1-1000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.33). MCF-7 hücresinde Doxil için M-IC₅₀ değeri 144,8 µg/ml bulundu (Tablo 4.12).



$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

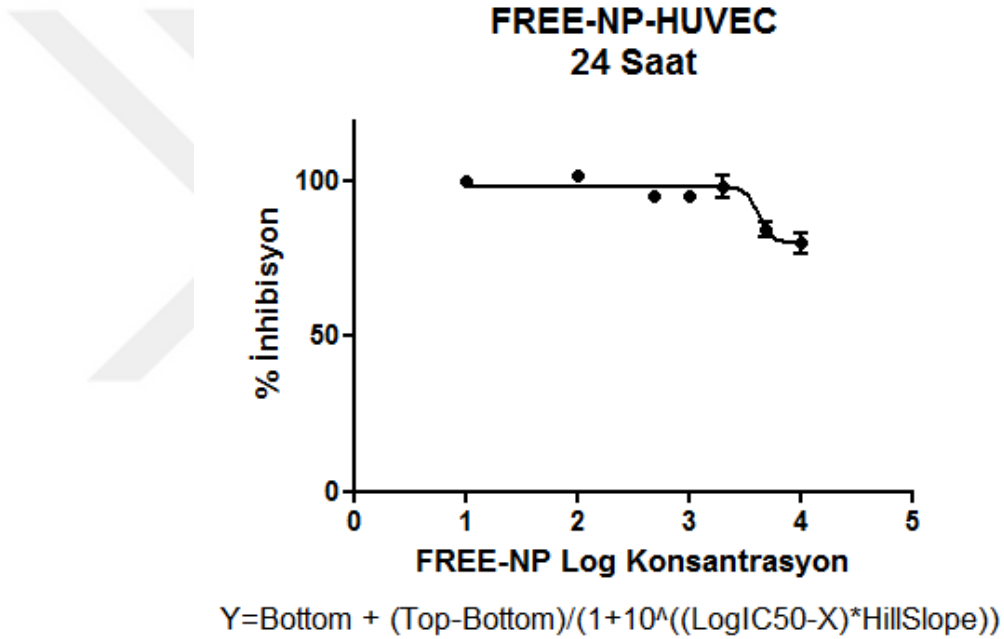
Şekil 4.33. MCF-7 hücrelerinde Doxil'nin 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.12. MCF-7 hücrelerinde Doxil'nin 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	28,41
Top	110,5
LogIC ₅₀	2,161
HillSlope	-1,000
IC ₅₀	144,8µg/ml

HUVEC hücrelerinde Free (PLGA) nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

HUVEC hücrelerinde sentezlenen hiçbir ilaç yüklü olmayan PLGA nanopartiküller PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna ile yapıldı. Free-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.34). HUVEC hücrelerinde Free-Np için H-IC₅₀ değeri 4279 µg/ml bulundu (Tablo 4.13).



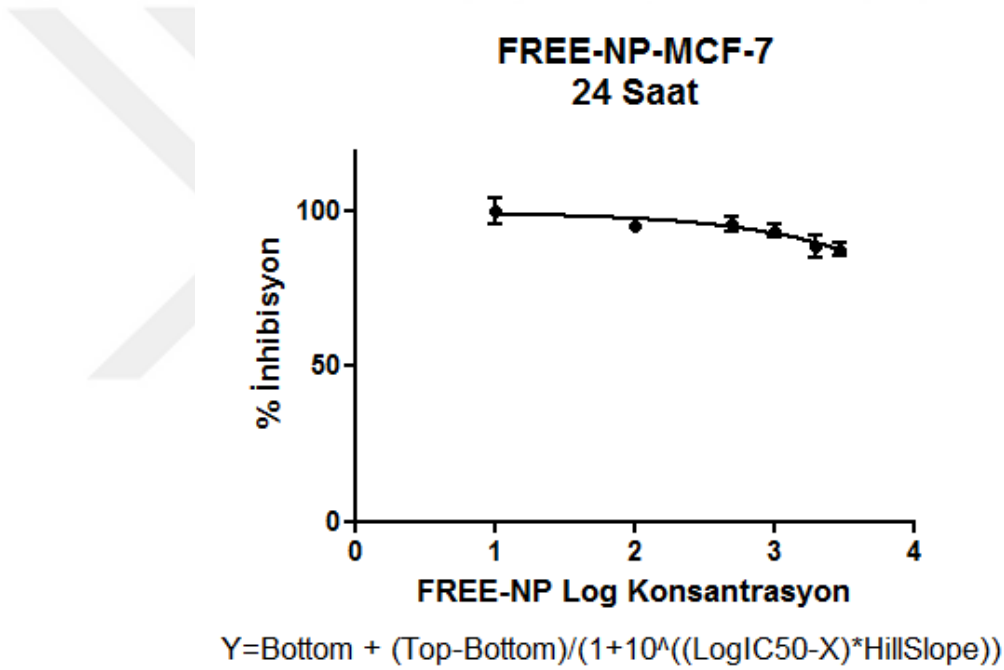
Şekil 4.34. HUVEC hücrelerinde Free (PLGA)-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.13. HUVEC hücrelerinde Free (PLGA)-Np'nün 24 saatlik H-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	79,96
Top	98,15
LogIC ₅₀	3,631
HillSlope	-7,201
IC ₅₀	4279µg/ml

MCF-7 hücrelerinde Free (PLGA) nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

MCF-7 hücrelerinde sentezlenen hiçbir ilaç yüklü olmayan PLGA nanopartiküller PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna ile yapıldı. Free-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.35). MCF-7 hücresinde Free-Np için M-IC₅₀ değeri 2015 µg/ml bulundu (Tablo 4.14).



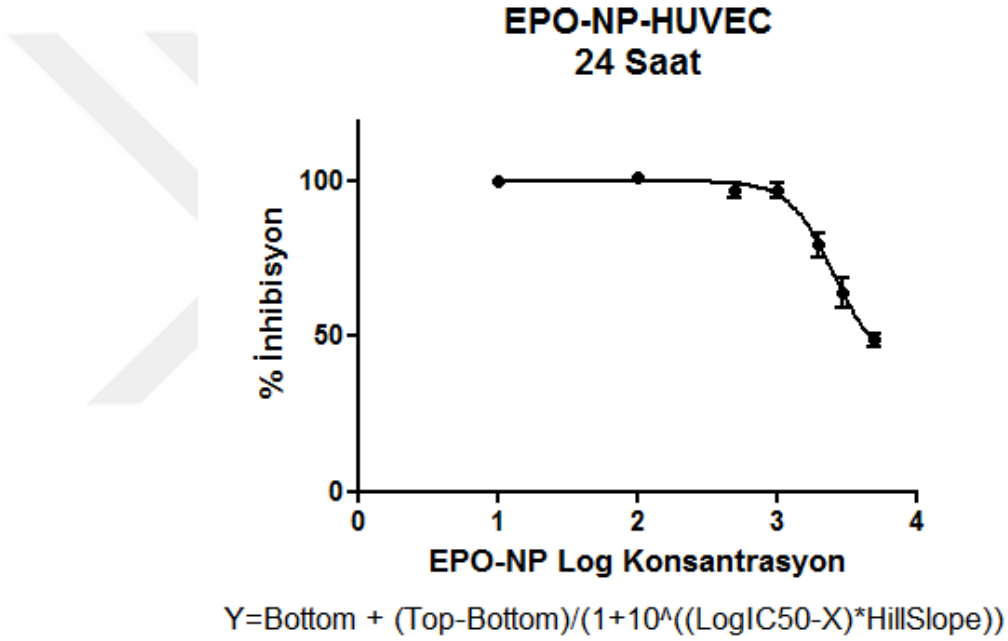
Şekil 4.35. MCF-7 hücrelerinde Free (PLGA)-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.14. MCF-7 hücrelerinde Free (PLGA)-Np'nün 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	-14871
Top	99,59
LogIC50	9,300
HillSlope	-0,5305
IC50	2015 µg/ml

HUVEC hücrelerinde Epo nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

HUVEC hücrelerinde sentezlenen Epo nanopartiküler PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna yapıldı. Epo-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.36). HUVEC hücresinde Epo-Np için H-IC₅₀ değeri 2547 µg/ml bulundu (Tablo 4.15).



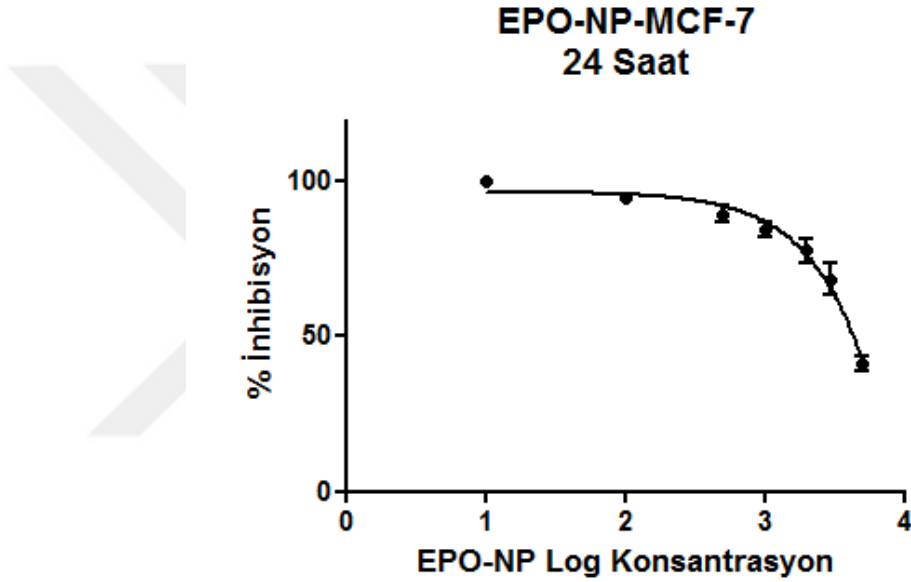
Şekil 4.36. HUVEC hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.15. HUVEC hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik H-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	40,94
Top	99,93
LogIC50	3,406
HillSlope	-2,754
IC50	2547 µg/ml

MCF-7 hücrelerinde Epo nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

MCF-7 hücrelerinde sentezlenen Epo nanopartiküler PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna yapıldı. Epo-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.37). MCF-7 hücresinde Epo-Np için M-IC₅₀ değeri 1558 µg/ml bulundu (Tablo 4.16).



$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}}$$

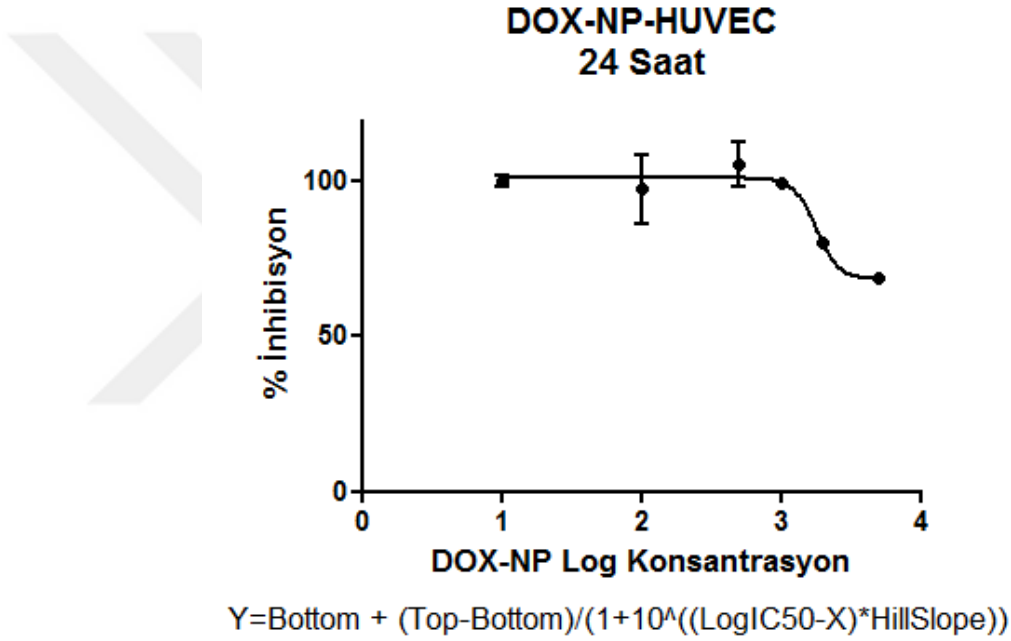
Şekil 4.37. MCF-7 hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.16. MCF-7 hücrelerinde Epo-Np'nün 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	-294226
Top	96,57
LogIC50	7,190
HillSlope	-1,071
IC50	1558 µg/ml

HUVEC hücrelerinde Dox nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

HUVEC hücrelerinde sentezlenen Dox nanopartiküller PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna yapıldı. Dox-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.38). HUVEC hücresinde Dox-Np için H-IC₅₀ değeri 1804 µg/ml bulundu (Tablo 4.17).



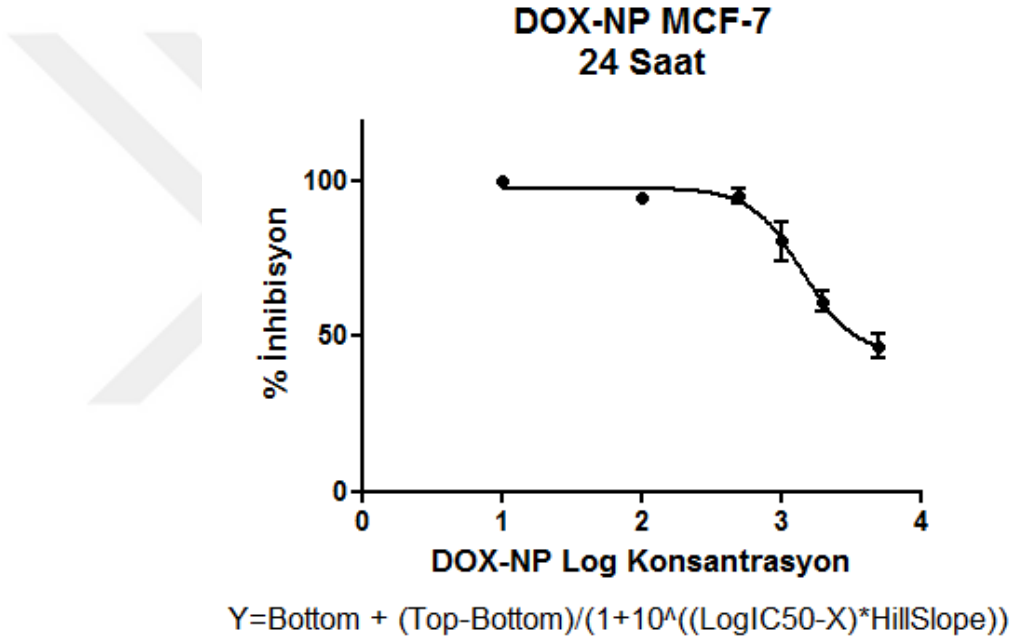
Şekil 4.38. HUVEC hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.17. HUVEC hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik H-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	68,44
Top	100,9
LogIC ₅₀	3,256
HillSlope	-5,463
IC ₅₀	1804 µg/ml

MCF-7 hücrelerinde Dox Nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

MCF-7 hücrelerinde sentezlenen Dox nanopartiküler PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna yapıldı. Dox-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.39). MCF-7 hücresinde Dox-Np için M-IC₅₀ değeri 1423 µg/ml bulundu (Tablo 4.18).



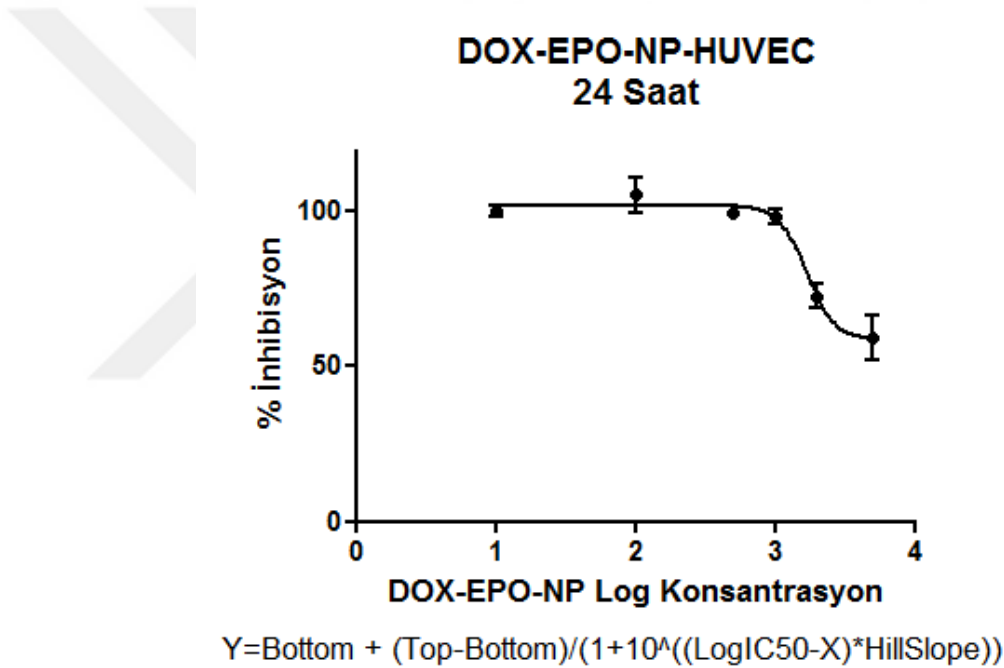
Şekil 4.39. MCF-7 hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.18. MCF-7 hücrelerinde Dox-Np'nün 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	44,31
Top	97,66
LogIC50	3,153
HillSlope	-2,375
IC50	1423 µg/ml

HUVEC hücrelerinde Dox+Epo Nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

HUVEC hücrelerinde sentezlenen Dox ve Epo içeren nanopartiküler PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna yapıldı. Dox+Epo-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.40). HUVEC hücresinde Dox+Epo-Np için H-IC₅₀ değeri 1695 µg/ml bulundu (Tablo 4.19).



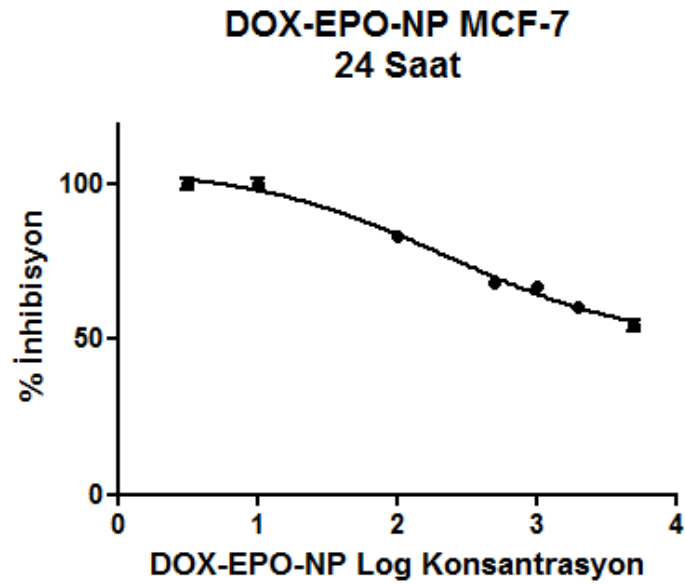
Şekil 4.40. HUVEC hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.19. HUVEC hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	58,66
Top	101,8
LogIC50	3,229
HillSlope	-4,383
IC50	1695 µg/ml

MCF-7 hücrelerinde Dox+Epo Nanopartikülün IC₅₀ değerinin belirlenmesi:

MCF-7 hücrelerinde sentezlenen Dox ve Epo içeren nanopartiküler PBS ile çözüldü, son konsantrasyonu 10 mg/ml oldu ve seyreltme işlemi hücre medyumuna yapıldı. Dox+Epo-Np'nün doz çalışması yapılırken 100-5000 µg/ml arasında çözeltiler hazırlandı ve bu dozlara karşılık olarak inhibisyon değerleri alınarak Hill denklemine fit edildi (Şekil 4.41). MCF-7 hücresinde Dox+Epo-Np için M-IC₅₀ değeri 233,3 µg/ml bulundu (Tablo 4.20).



$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

Şekil 4.41. MCF-7 hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik canlılık inhibisyonu.

Tablo 4.20. MCF-7 hücrelerinde Dox+Epo-Np'nün 24 saatlik M-IC₅₀ değeri.

log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)	
Best-fit values	
Bottom	47,89
Top	105,3
LogIC ₅₀	2,368
HillSlope	-0,6085
IC ₅₀	233,3 µg/ml

Kombinasyon İndeksin (CI) Hesaplanması: Dox ve Epo'in kombine uygulanmaları değişen oranlarda ancak sabit konsantrasyonda gerçekleştirildi. Değişik oranlarda kombinasyonların HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde 24 saat muamelesi sonucu bulunan sitotoksosite yüzdeleri, Graphpad Prism programına girilerek CI hesaplandı. Kombinasyonlar sonucunda sinerjistik etki bulundu. Belirlenen sinerjistik etkilerine göre HUVEC için; Dox 2 µg/ml +20 ng/ml ve MCF-7 için; Dox 1 µg/ml +15 ng/ml kombinasyonu hücrelere uygulanacak değerler olarak seçildi (Tablo 4.21).

HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde tüm grupların 24 saatlik IC₅₀ değerleri toplu halde verildi (Tablo 4.21). Amacımız normal hücrelere zarar vermeyen ancak meme kanseri hücrelerini apoptozise uğratmak olduğundan dolayı bu değerlerden MCF-7 hücreleri için hesaplanan IC₅₀ (M-IC₅₀) değerleri bundan sonra yapılacak olan hücre kültürü deneylerinde kullanılan dozlar oldu. Bu sebeple uygulanacak dozlar MCF-7 hücreleri için toksik olurken normal HUVEC hücreleri için toksik olmayacaktır.

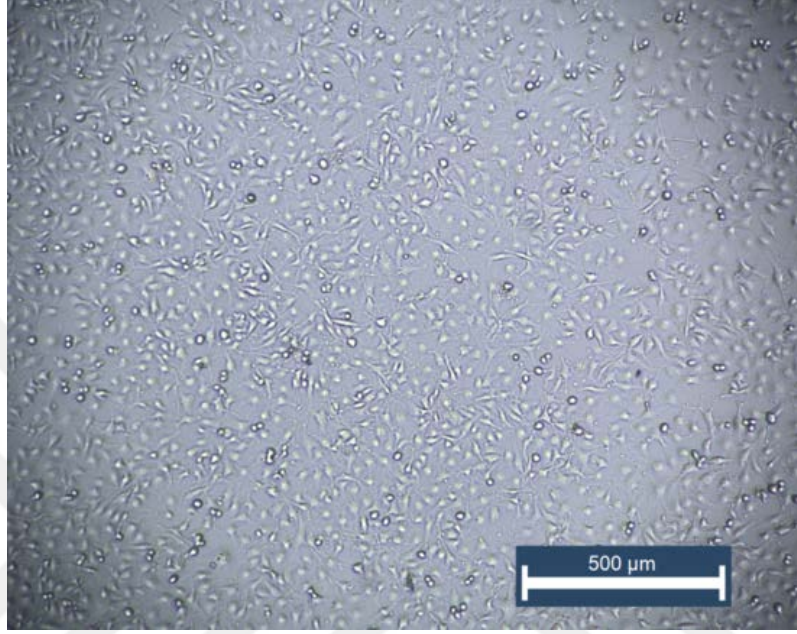
Tablo 4.21. HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde tüm grupların 24 saatlik IC₅₀ değerleri

IC ₅₀	DOX µg/ml	EPO ng/ml	DOX µg/ml + EPO ng/ml	DOXİL µg/ml	FREE NP µg/ml	EPO NP µg/ml	DOX NP µg/ml	DOX+ EPO NP µg/ml
HUVEC (H-IC ₅₀)	3,924	26,93	DOX=2 + EPO=20	114,3	4279	2547	1804	1695
MCF-7 (M-IC ₅₀)	1,328	22,20	DOX=1 + EPO=15	144,8	2015	1558	1423	233,3

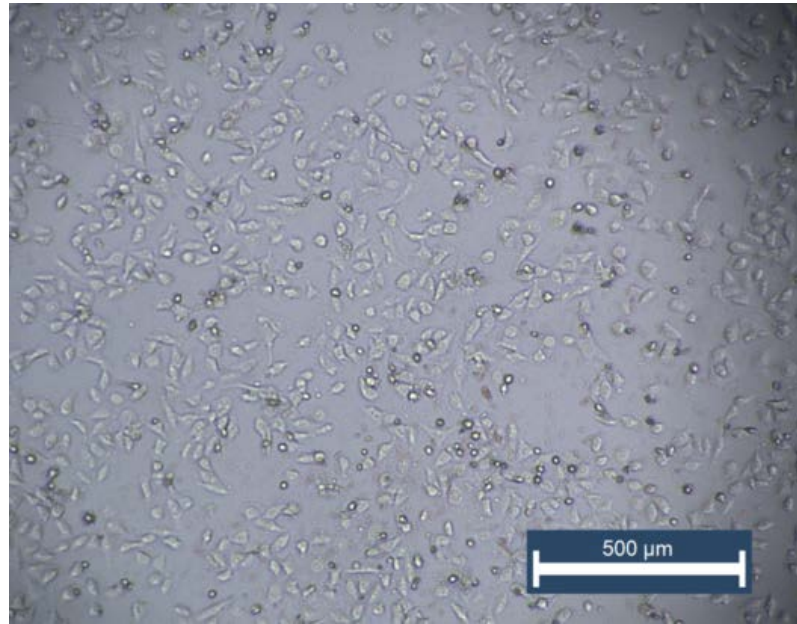
HUVEC hücrelerine ait IC₅₀ değeri ile hücre morfolojisinin değerlendirilmesi:

Bu tezde HUVEC hücrelerine ait IC₅₀ (H-IC₅₀) değerlerinin etkilerini kontrol grubu ile morfolojik olarak karşılaştırıldı. İnkübasyonlar 24 saatlik olup mikroskop görüntüleri 4X büyütmeyle alındı. Hücrelerin ilaç uygulanan gruplarında sitotoksosite sonuçlarıyla uyumlu olarak hücre sayılarının azaldığı ve apoptotik parçacıkların oluştuğu

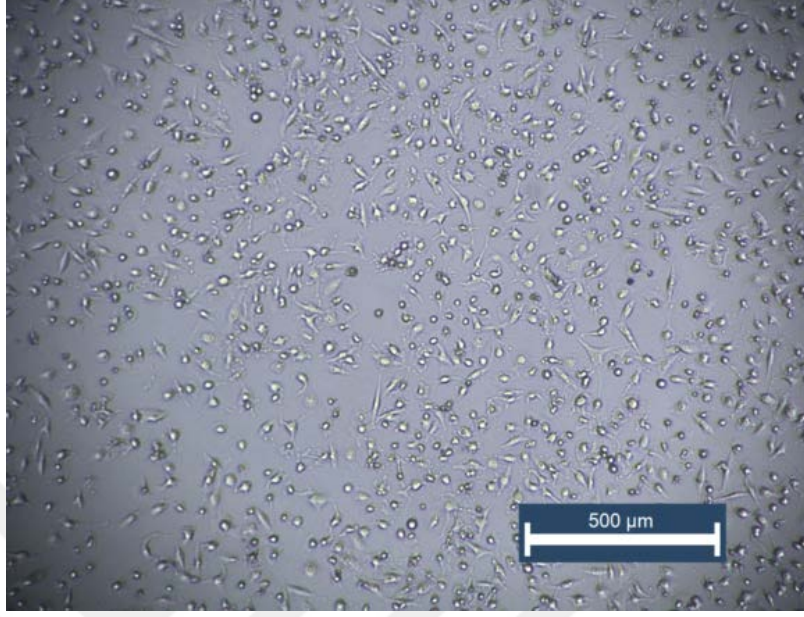
görülmektedir (Şekil 4.42,43,44,45,46,47,48,49,50). HUVEC hücre gruplarının fotoğrafları tümü Şekil 4. 60'da gösterildi.



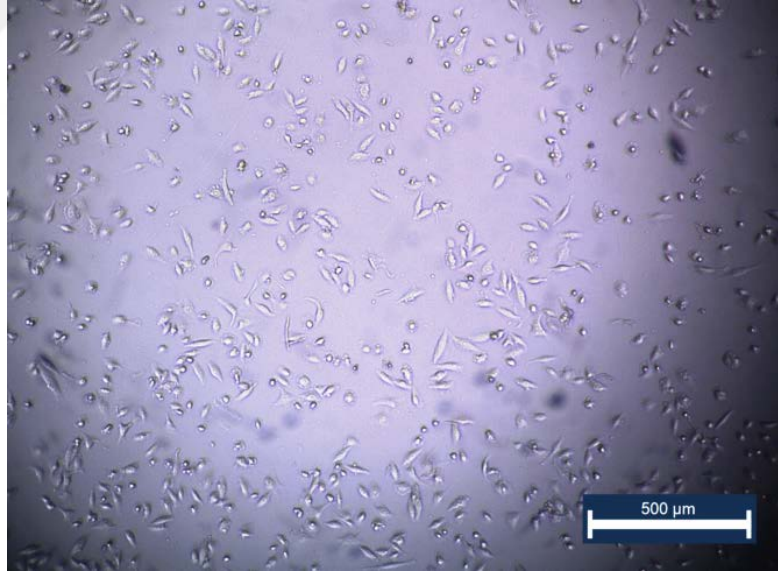
Şekil 4.42. HUVEC hücrelerinin kontrol grubunun morfolojisi.



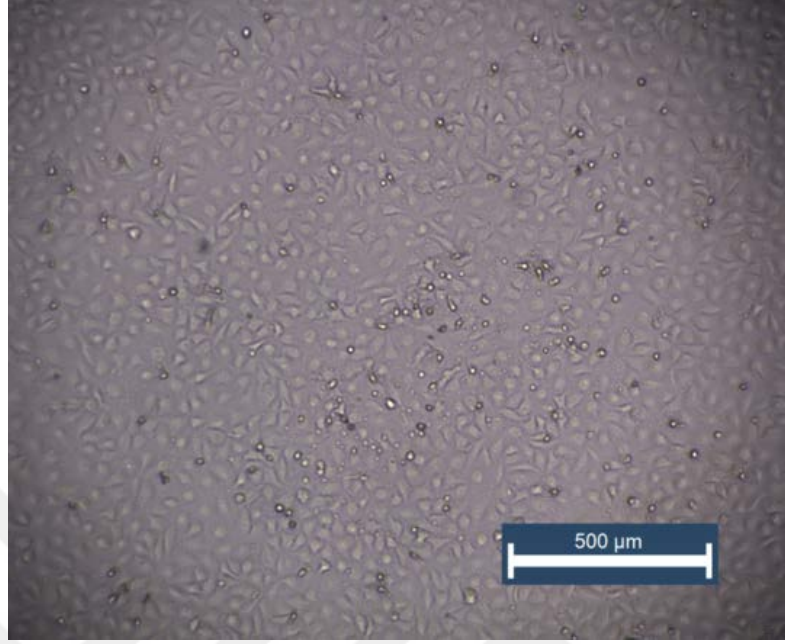
Şekil 4.43. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 3,924 µg/ml Dox grubunun morfolojisi.



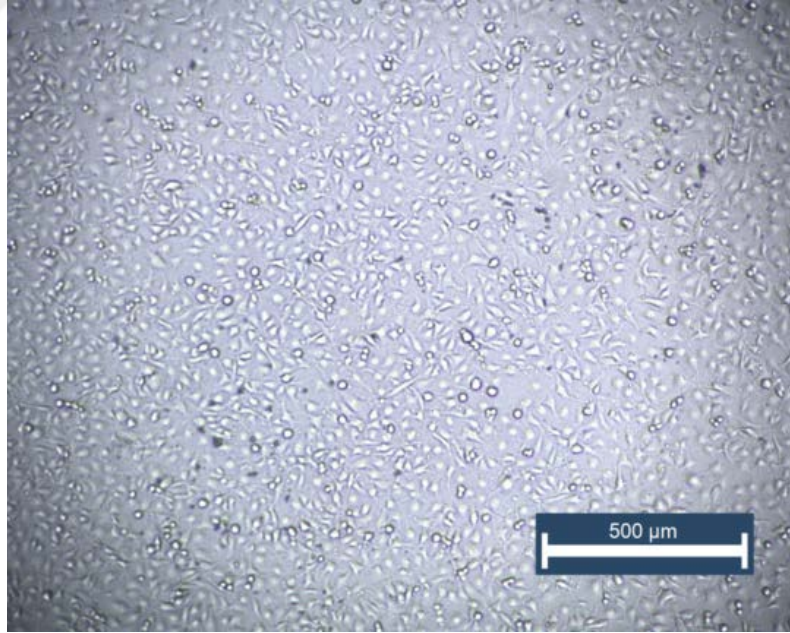
Şekil 4.44. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 26,93 ng/ml Epo grubunun morfolojisi.



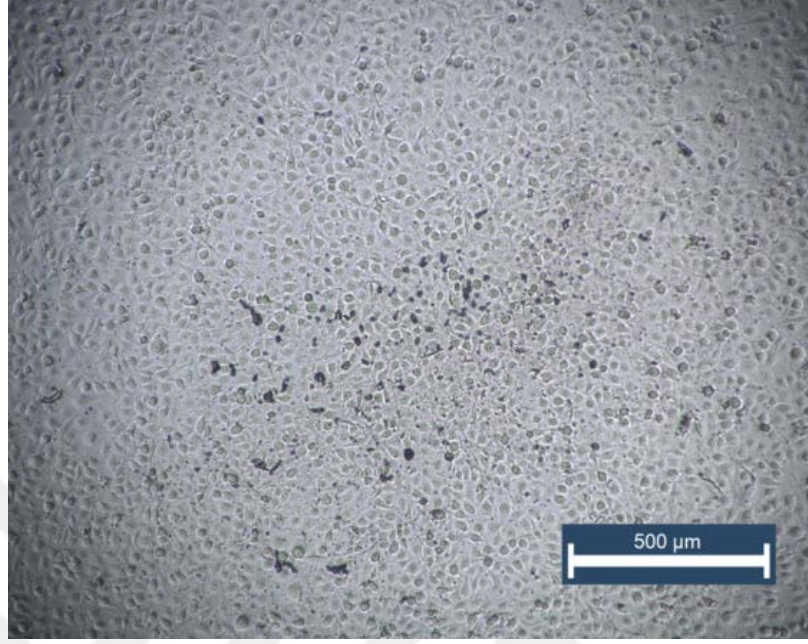
Şekil 4.45. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 2 µg/ml Dox grubunun morfolojisi.



Şekil 4.46. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 114,3 µg/ml Doxil grubunun morfolojisi.



Şekil 4.47. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 4279 µg/ml Free-Np grubunun morfolojisi.



Şekil 4.48. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 2547 µg/ml Epo-Np grubunun morfolojisi.



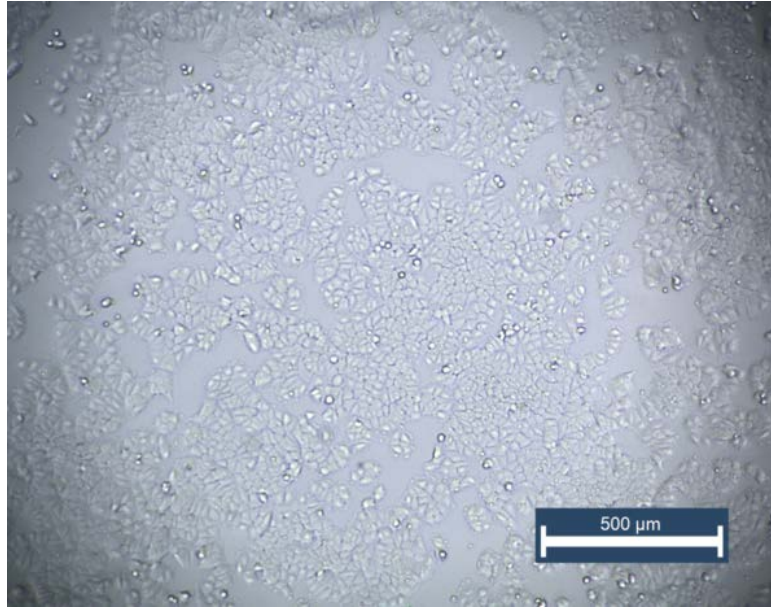
Şekil 4.49. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 1804 µg/ml Dox -Np grubunun morfolojisi.



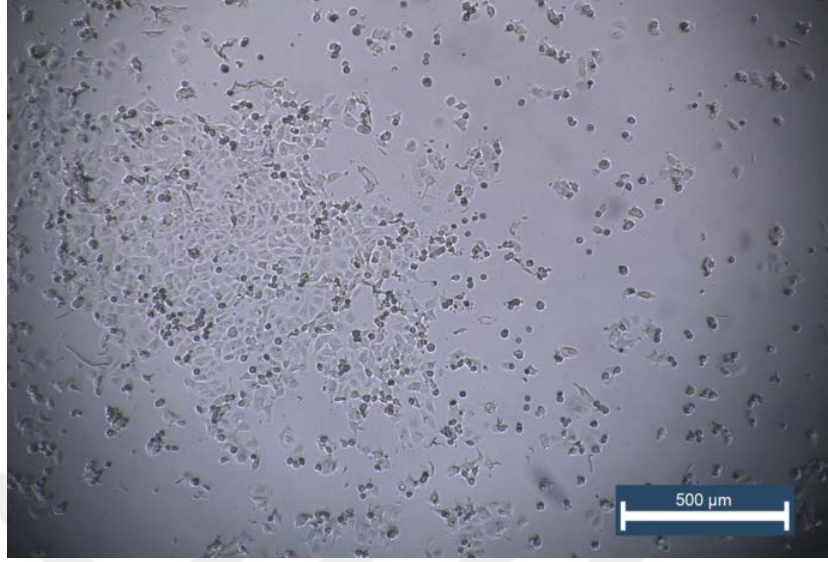
Şekil 4.50. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ 1695 µg/ml Dox+Epo-Np grubunun morfolojisi.

MCF-7 hücrelerinin IC₅₀ değeri ile hücre morfolojisinin değerlendirilmesi:

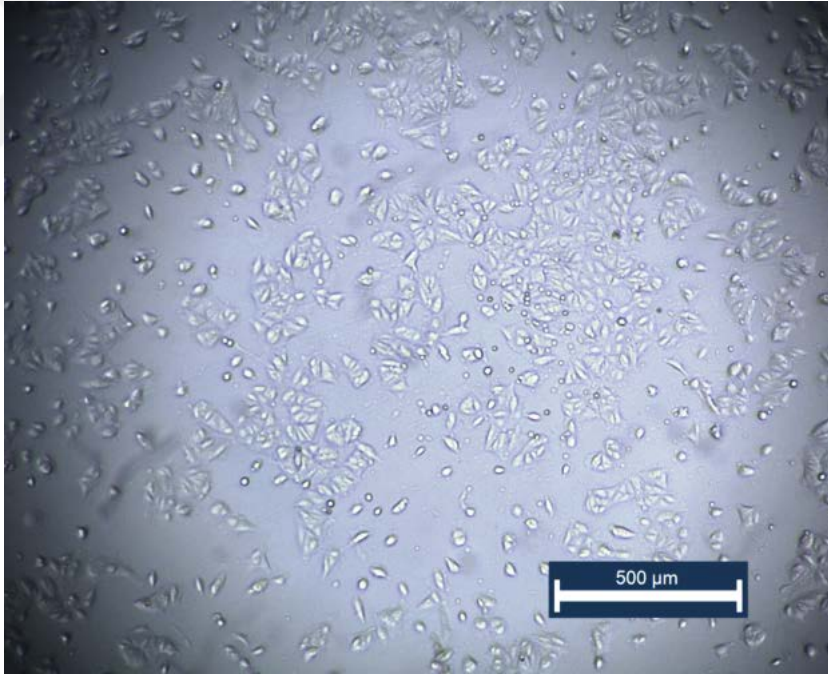
Bu tezde MCF-7 hücrelerine ait IC₅₀ (M-IC₅₀)değerlerinin etkilerini kontrol grubu ile morfolojik olarak karşılaştırıldı. İnkübasyonlar 24 saatlik olup mikroskop görüntüleri 4X büyütmeyle alındı. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59'da gösterildi. MCF-7 hücre gruplarının fotoğrafları tümü Şekil 4. 61'da gösterildi.



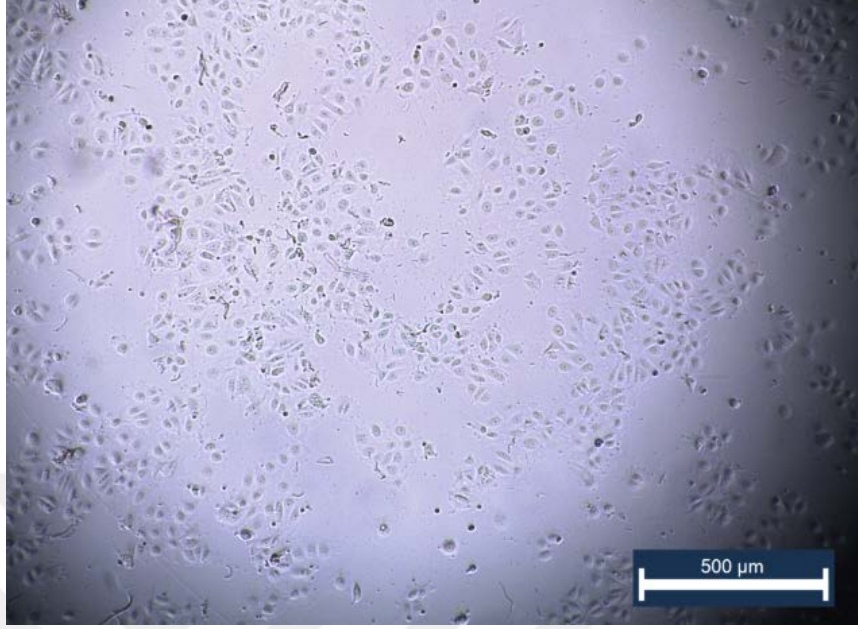
Şekil 4.51. MCF-7 hücrelerinin kontrol grubunun morfolojisi.



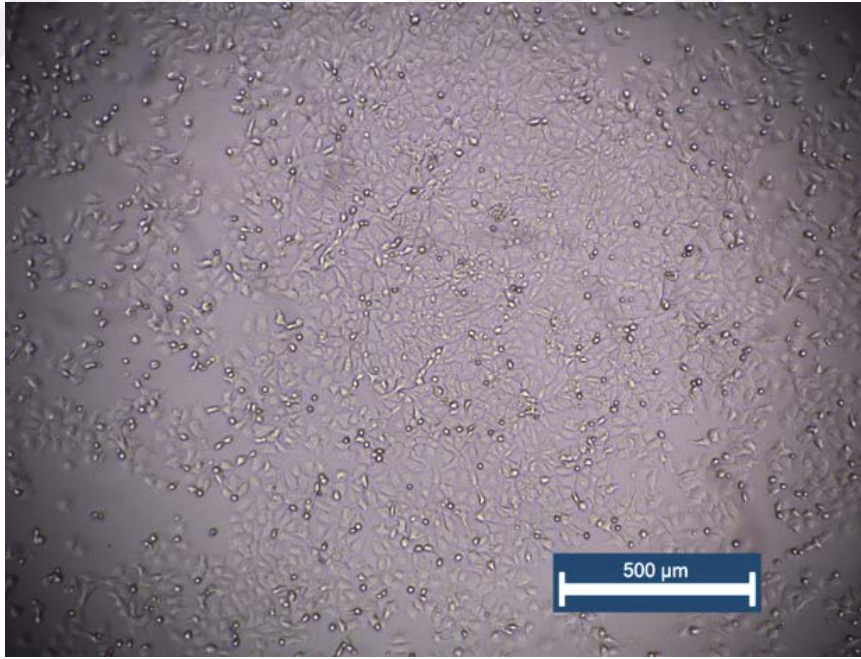
Şekil 4.52. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 1,328 µg/ml Dox grubunun morfolojisi.



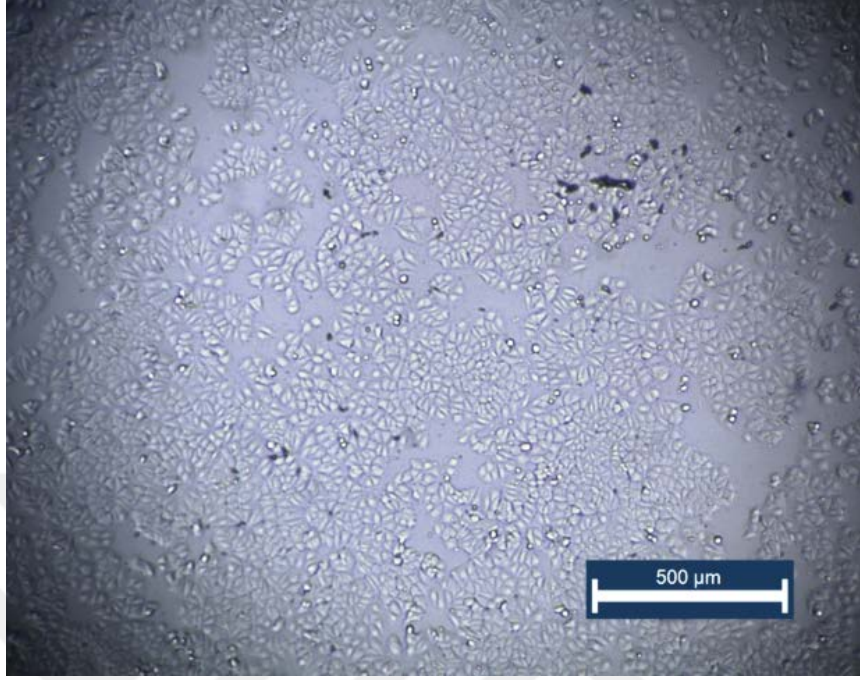
Şekil 4.53. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 22,20 ng/ml Epo grubunun morfolojisi.



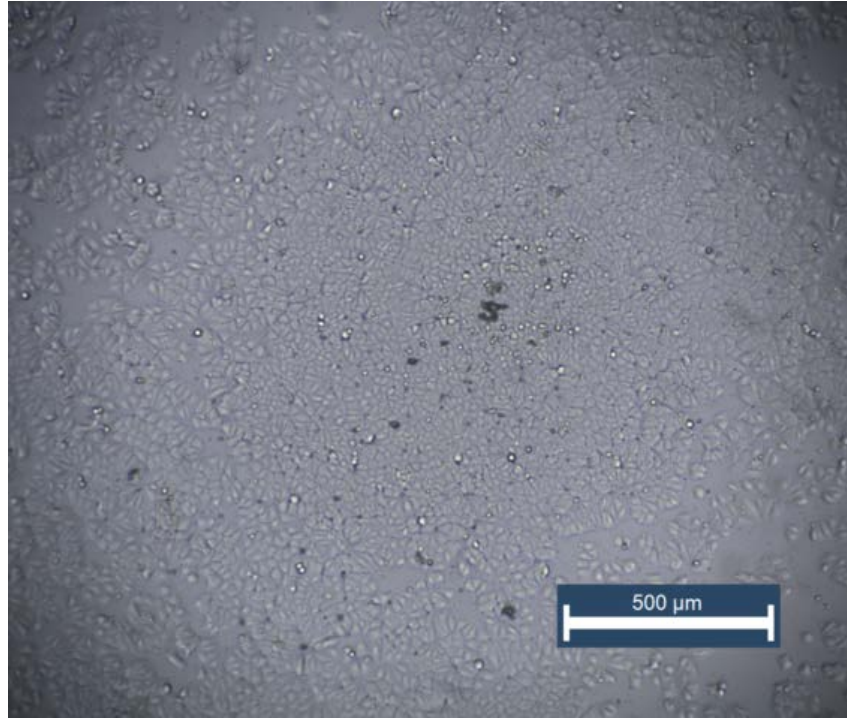
Şekil 4.54. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 1 µg/ml Dox ve 15 ng/ml Epo grubunun morfolojisi.



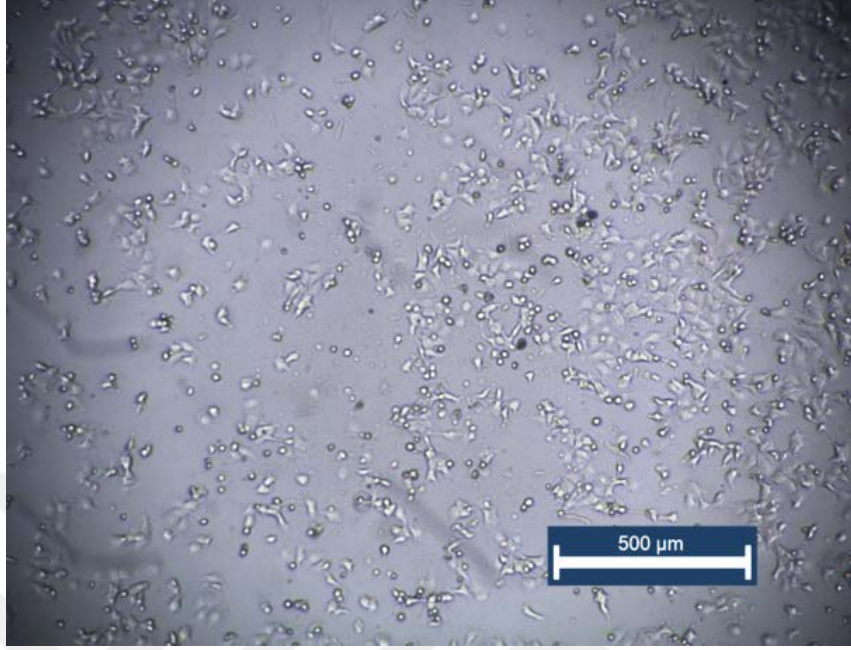
Şekil 4.55. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 144,8 µg/ml Doxil grubunun morfolojisi.



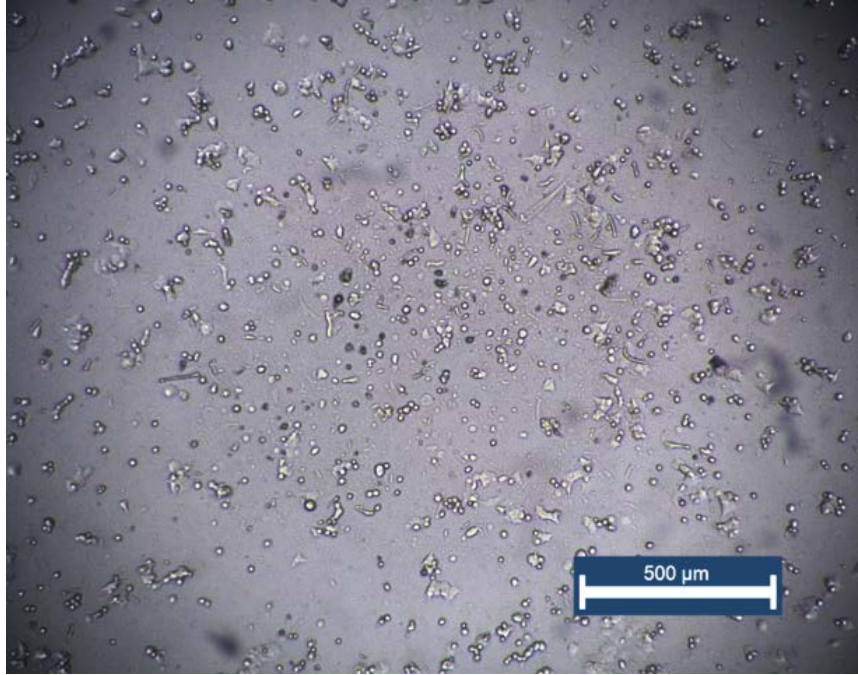
Şekil 4.56. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 2015 µg/ml Free-Np grubunun morfolojisi.



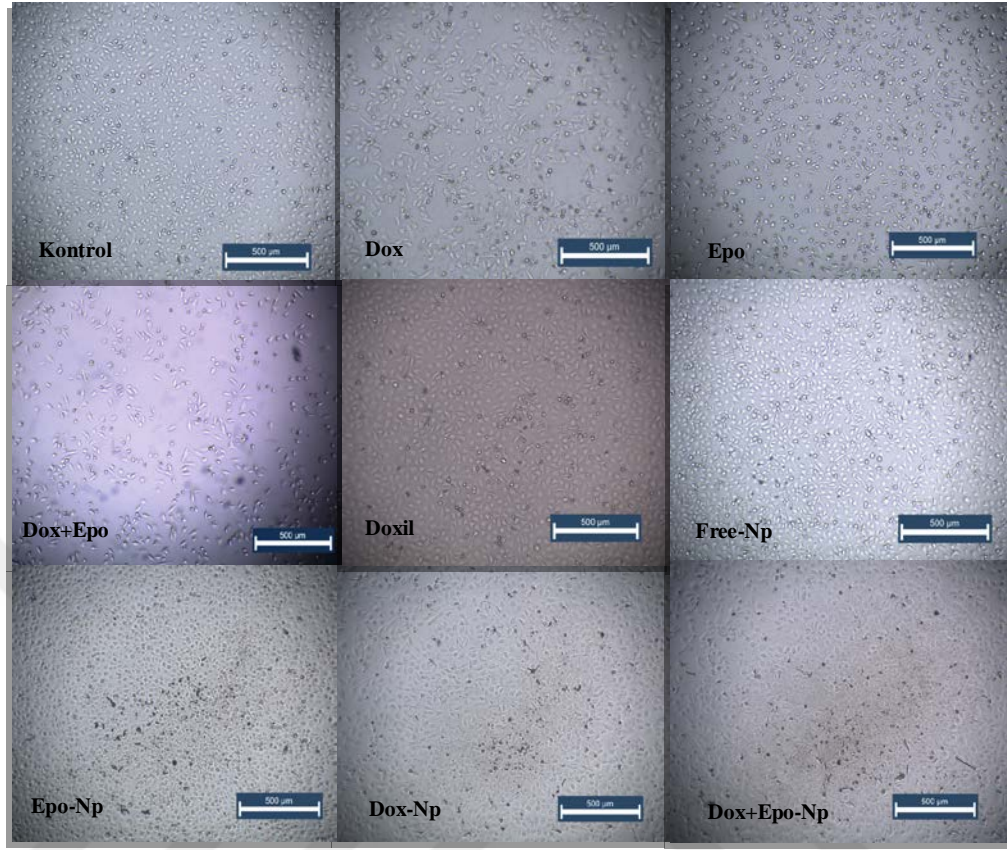
Şekil 4.57. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 1558 µg/ml Epo-Np grubunun morfolojisi.



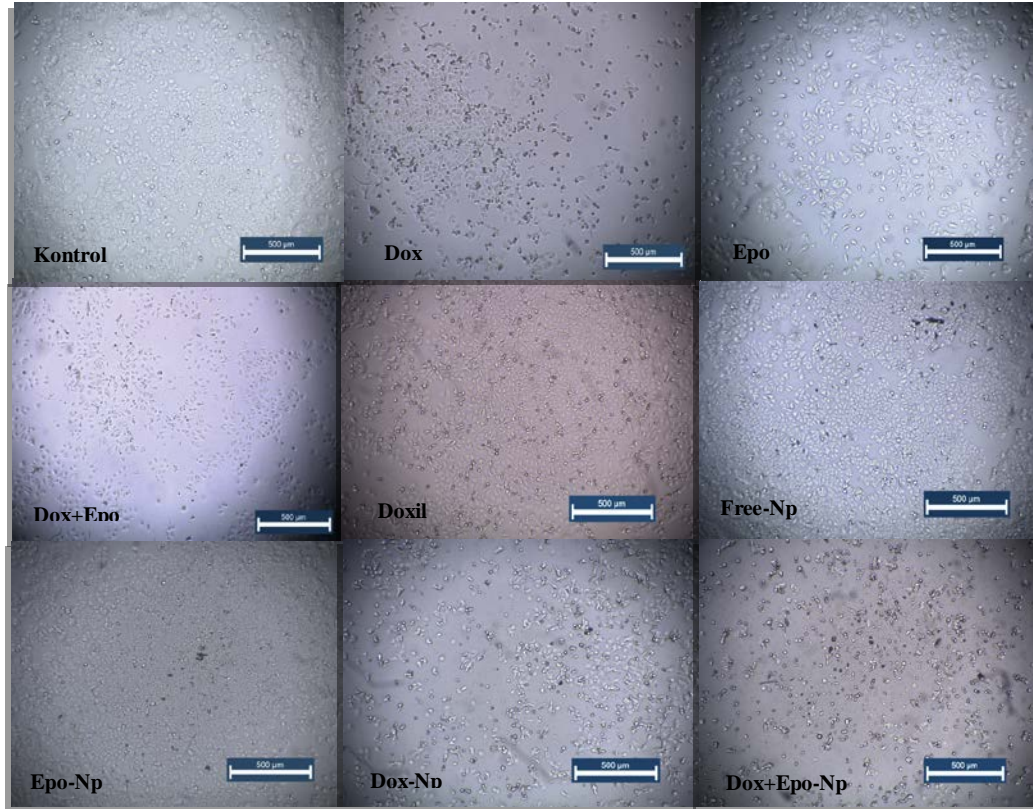
Şekil 4.58. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 1423 µg/ml Dox-Np grubunun morfolojisi.



Şekil 4.59. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ 233,3 µg/ml Dox+Epo-Np grubunun morfolojisi.



Şekil 4.60. HUVEC hücrelerinin H-IC₅₀ dozları uygulanmış tüm grupların morfolojisi.

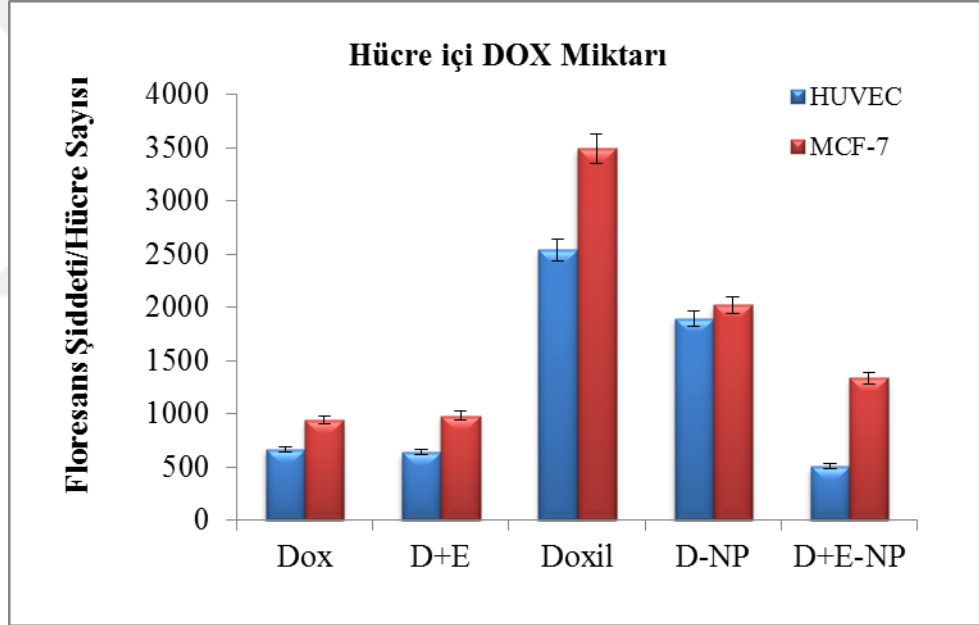


Şekil 4.61. MCF-7 hücrelerinin M-IC₅₀ dozları uygulanmış tüm grupların morfolojisi.

4.5. Nanopartiküllerin Apoptozise ve Apoptotik Yolaklara Etkilerinin Belirlenmesi

4.5.1. Hücre İçine Alınan DOX Miktarının Belirlenmesi

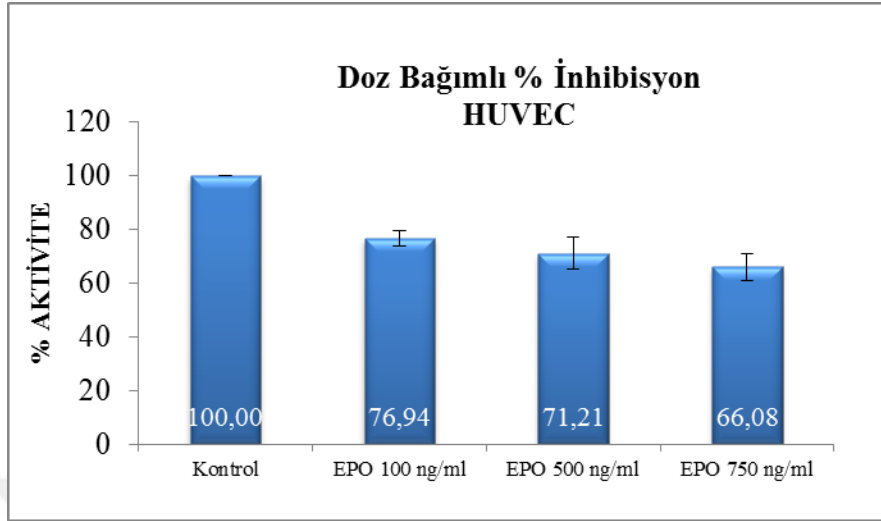
Hücre içine alınan Dox'ın floresans özelliğinden yararlanarak belirlendi. Dox içeren tüm gruplarda MCF-7 hücreleri içine giren Dox miktarı HUVEC hücrelerine göre daha fazla olduğu bulundu. Ticari lipozomal Doxil'in ise sentezlenen polimerik nanopartiküllere göre daha fazla Dox içerdiği bulundu ($p < 0,01$). Ancak Dox ve Epo içeren nanopartikül grubunda HUVEC'lere göre MCF-7 hücrelerinden 2,5 kat kadar az Dox girdiği bulundu ($p < 0,01$) (Şekil 4.62). Ayrıca HUVEC'lerde serbest Dox ve/veya Epo içeren gruplarda da Dox+Epo-Np grubuna göre daha fazla Dox girdiği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$).



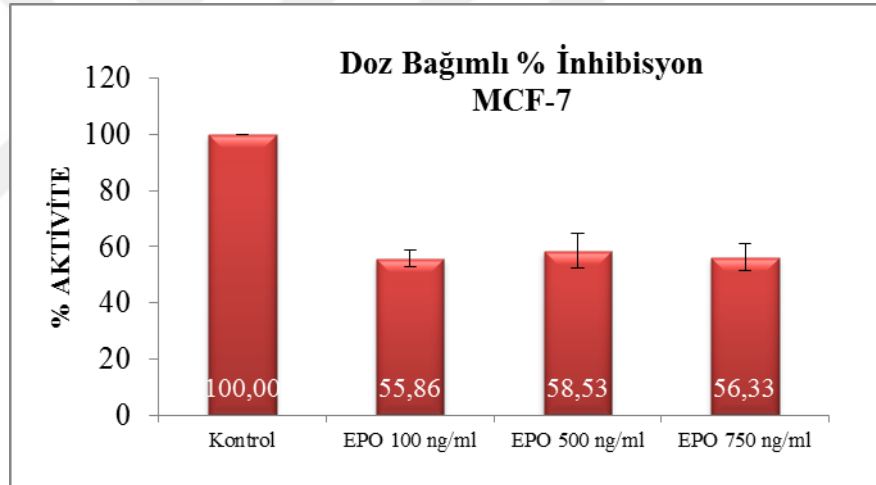
Şekil 4.62. HUVEC ve MCF-7'de hücre içine alınan Dox miktarının belirlenmesi.

4.5.2. Proteozom İnhibisyonunun Belirlenmesi

HUVEC ve MCF-7 hücrelerinin proteozom aktivitesinin doz bağımlı olup olmadığını belirlemek için Epo'in 100 ng/ml, 500 ng/ml ve 750 ng/ml'lik konsantrasyonlarında proteozom aktivitesi belirlendi (Şekil 4.63 ve Şekil 4.64). Epo'in 100 ng/ml'lik konsantrasyonu HUVEC'lerde aktivitede %23'lük inhibisyon yaparken MCF-7'lerde %45'lik bir inhibisyon gerçekleşti ($p < 0,001$).

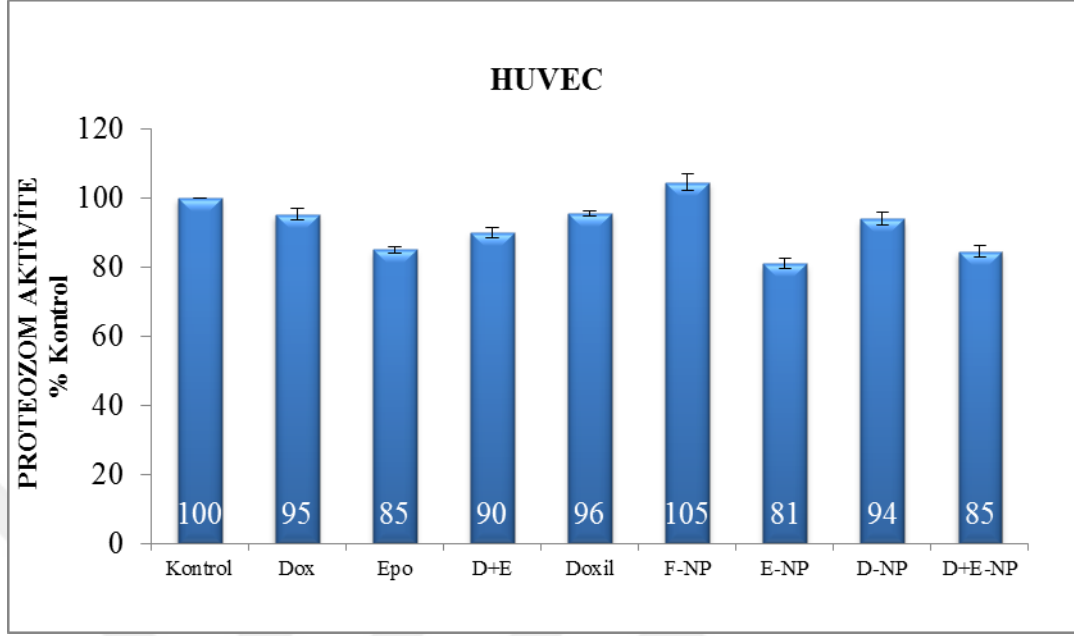


Şekil 4.63. HUVEC'lerin doz bağımlı proteozom aktivitesi.



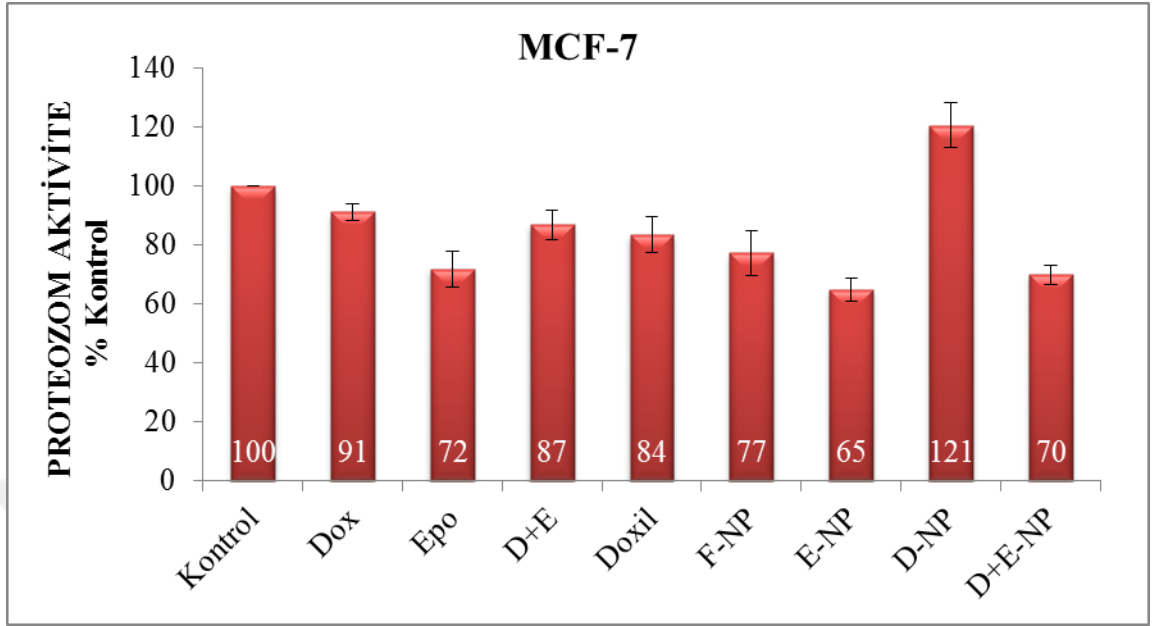
Şekil 4.64. MCF-7 hücrelerinin doz bağımlı proteozom aktivitesi.

HUVEC'lerin ve MCF-7 hücrelerinin MCF-7 hücrelerine ait olan M-IC₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra proteozom aktivitesi ölçüldü. İnhibisyon hiç ilaç uygulanmayan kontrol grubuna oranlanarak verildi. HUVEC'lerde Epo içeren gruplarda anlamlı bir inhibisyon görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 4.65). Ancak bu inhibisyon %10 seviyelerindedir. Epo içermeyen gruplarda proteozom inhibisyonu görülmedi. Epo-Np ve Dox+Epo-Np gruplarında proteozom inhibisyonunun görülmesi nanopartikül içerisine Epo'in enkapsüle edildiğini gösterdi ($p < 0,05$).



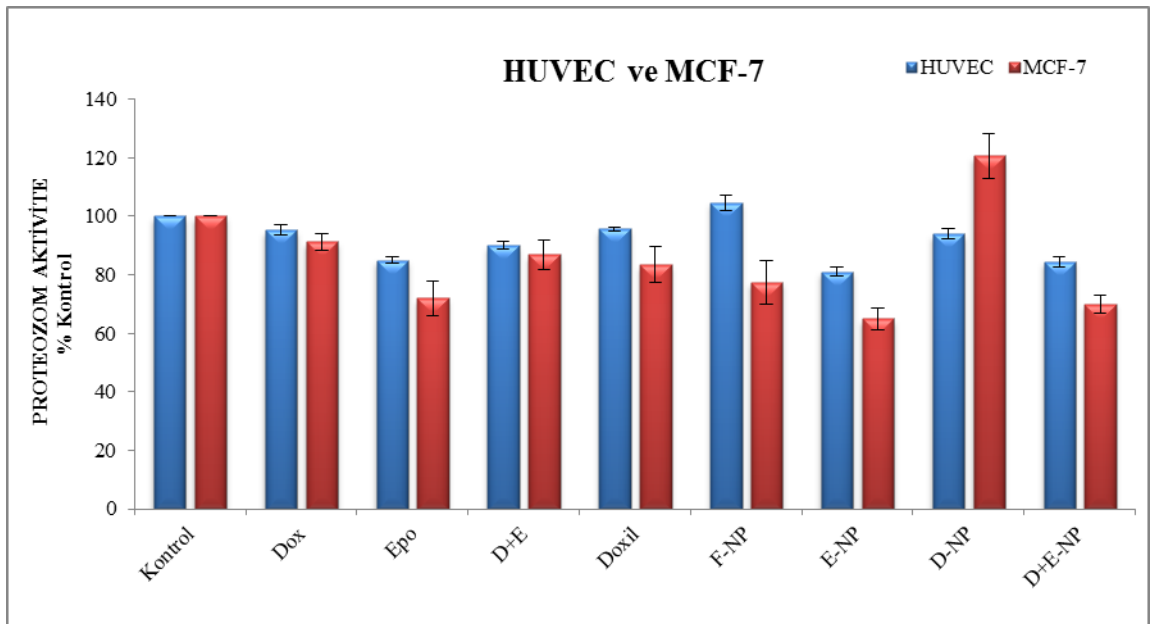
Şekil 4.65. HUVEC'lerin M-IC₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra proteozom aktivitesi.

MCF-7 hücrelerinde Epo içeren gruplarda anlamlı bir inhibisyon görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.66). İnhibisyon oranı %30-35 seviyelerinde olduğu belirlendi. Epo-Np ve Dox+Epo-Np gruplarında proteozom inhibisyonunun görülmesi nanopartikül içerisinde Epo'in enkapsüle edildiğini gösterdi ($p < 0,05$). İlginç bir şekilde Dox-Np grubunda proteozom aktivitesinin arttığı belirlendi. Bu sonuç ölüme giden kanser hücrelerinde, ilaç direnci mekanizmalarını aktive etmek için yeni proteinlere ihtiyaç duyduğu teorisini destekledi. Bu yüzden kombine kemoterapi uygulamalarında proteozomların hedeflenmesi stratejisinin önemi görüldü ($p < 0,001$).



Şekil 4.66. MCF-7'lerin M-IC₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra proteozom aktivitesi.

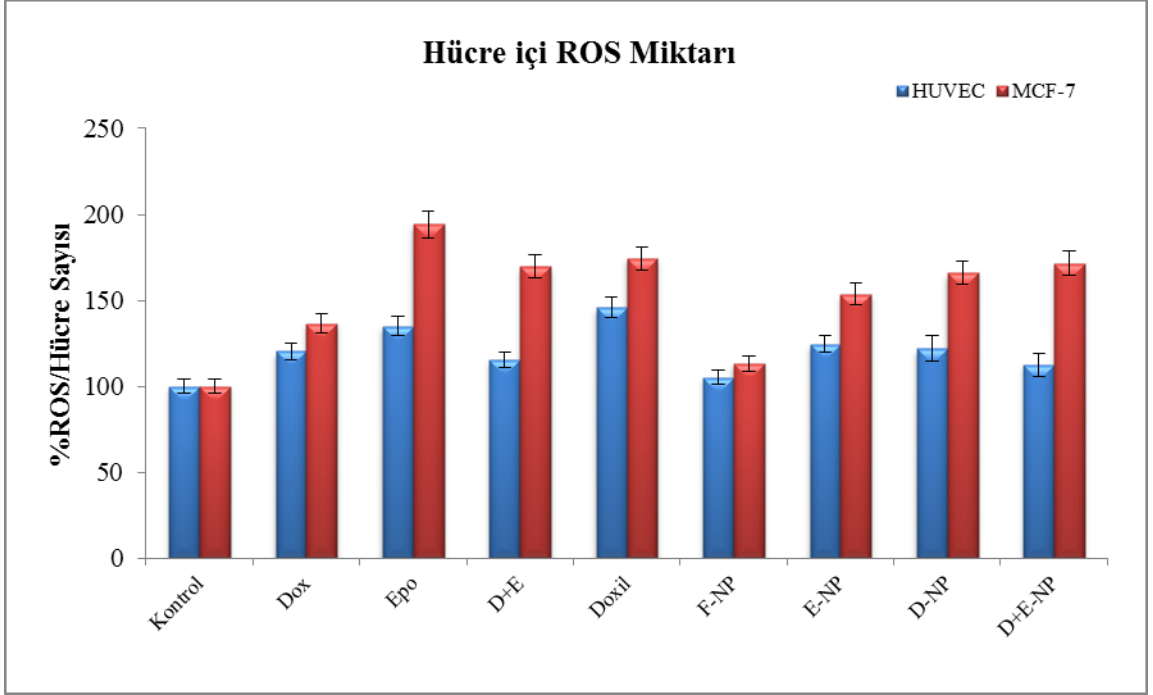
MCF-7 hüresine ait M-IC₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra her iki hücre hattının proteozom inhibisyonu karşılaştırıldı (Şekil 4.67). İstatistiksel olarak Epo-Np ve Dox-Epo-Np gruplarındaki proteozom inhibisyonunun MCF-7 hücrelerinde HUVEC'lere göre daha fazla olduğu bulundu ($p < 0,001$). Bu sonuçlar sitotoksosite verileriyle de uyumludur.



Şekil 4.67. İki hücre hattının proteozom inhibisyonunun karşılaştırılması.

4.5.3. Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

MCF-7 hücresine ait M-IC₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra her iki hücre hattında da ROS miktarı ölçüldü. Free-NP grubunda her iki hücre hattı içinde oksidatif hasara neden olmadığı bulundu. Ancak tüm ilaç içeren gruplarda ROS miktarında her iki hücre hattı içinde artışlar gözlemlendi ($p < 0,001$). Her iki ilaç da direkt olmasa da dolaylı yoldan oksidatif hasara neden olabilmektedir. Epo-Np, Dox-Np ve Dox+Epo-Np gruplarındaki ROS miktarı HUVEC'lere MCF-7 hücrelerinde daha fazla olduğu bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 4.68). Bu sonuçla hücrelerin kombine strateji ile hücrelerin redoks dengesinin bozulduğu ve apoptotik yolların aktive olduğu belirlendi.

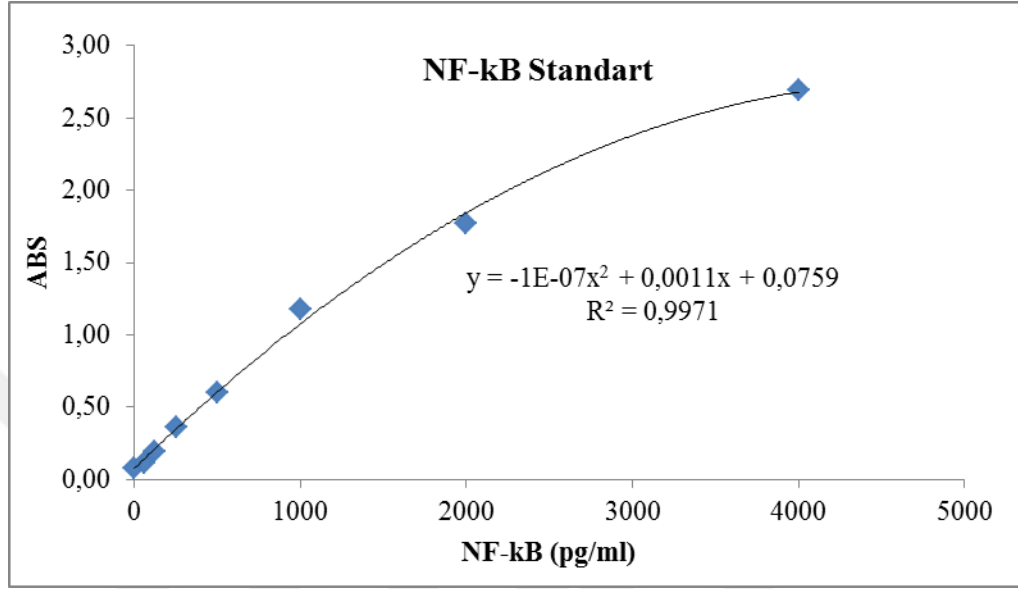


Şekil 4.68. İki hücre hattında oluşan ROS miktarının karşılaştırılması.

4.5.4. Sitozolik NF- κ B Miktarının Belirlenmesi

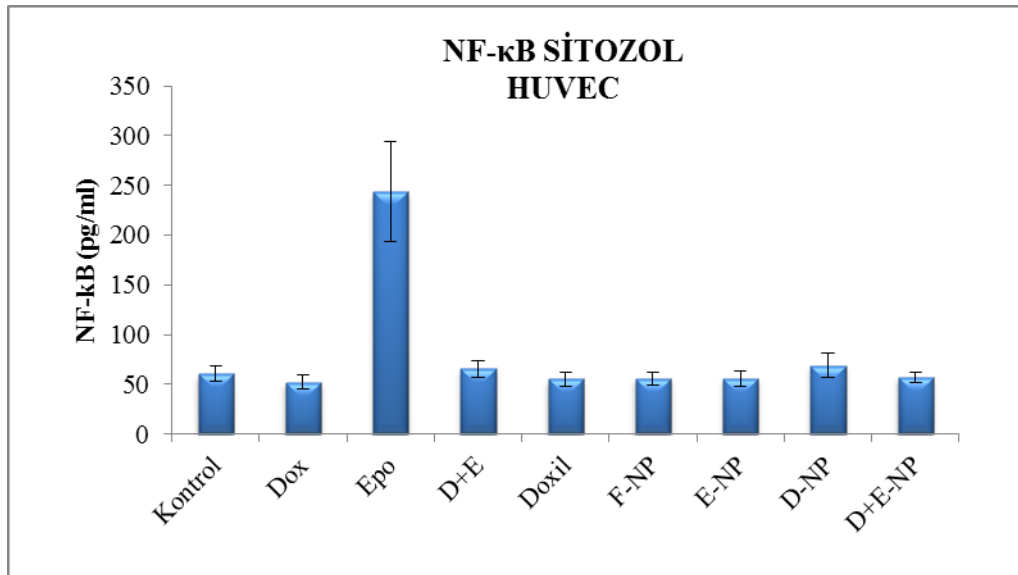
NF- κ B hücrede hayatta kalma mekanizmalarının uyarılması açısından kritik bir öneme sahip olan bir proteindir. Normalde sitozolde bulunan bu protein kanserde apoptozisten kaçış süreçlerinde rol alan 150'den fazla geni regüle edebilmek için çekirdeğe doğru geçer ve aktive olur. Bu yüzden NF- κ B'nin sitozolde bloke olarak apoptozisten kaçışın inhibe olması gerekmektedir. Doktora Tez çalışmasında her iki hücre hattında ve tüm gruplarda sitozolik NF- κ B miktarı belirlendi. NF- κ B miktarının belirlenebilmesi için

standart grafik oluşturuldu (Şekil 4.69). Bu grafikten yararlanarak hücrelerde gruplara göre sitozolik NF-κB miktarı belirlendi.



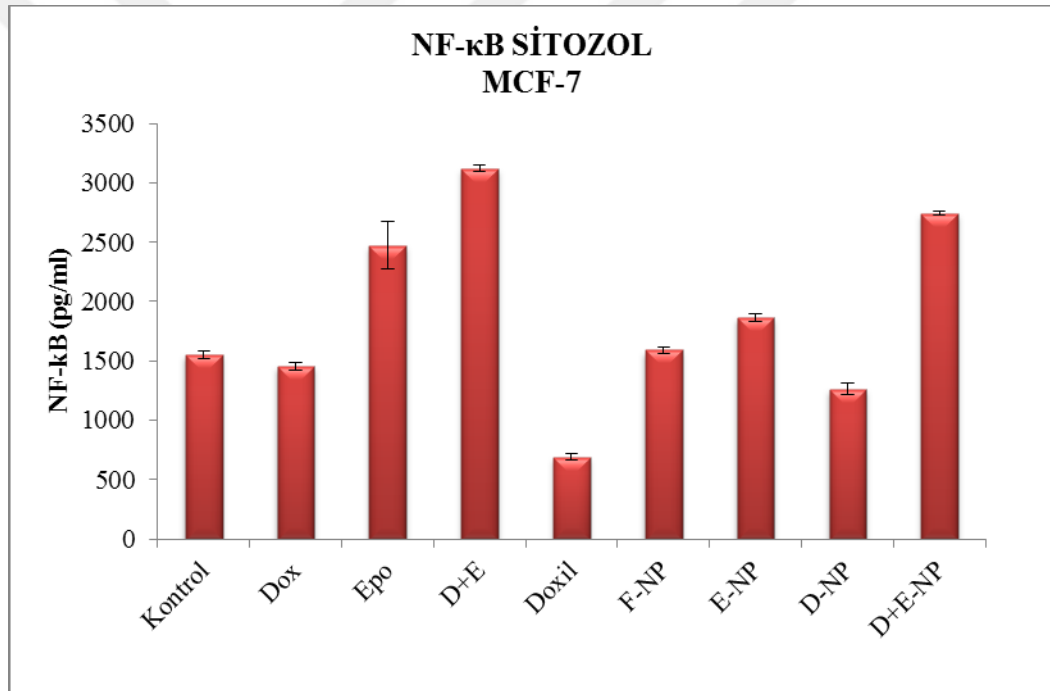
Şekil 4.69. NF-kB standart grafiği.

MCF-7 hücresine ait M-IC₅₀ dozları ile yapılan inkübasyondan sonra her iki hücre hattında da NF-κB miktarı ölçüldü. HUVEC'lerde sadece serbest Epo grubunda sitozolik NF-κB miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,001$). Diğer gruplarda NF-κB aktivasyonu görülmedi (Şekil 4.70).



Şekil 4.70. HUVEC'lerde tüm grupların sitozolik NF-kB miktarı.

MCF-7 hücrelerinde NF- κ B ekspresyonunun çok fazla olduğu bilinmektedir. Epo içeren tüm gruplarda sitozolik NF- κ B miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0,001$). Hem Epo-Np hem de Dox+Epo-Np gruplarında NF- κ B miktarındaki artış nanopartiküllerin içeriye girdiğini ve proteozom inhibisyonu yaparak NF- κ B'nin inhibitörü olan I κ -B α 'nin degradasyonunu önleyerek NF- κ B'nin sitozolde kalmasını sağladı. Böylelikle kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmaları inhibe edilmiş oldu. Doxil içeren grupta ise ciddi bir NF- κ B aktivasyonu gerçekleşti. Ayrıca serbest halde verilen Dox ve Epo'in kombine uygulamasının kanser hücrelerini öldürme açısından önemli olduğu görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.71).



Şekil 4.71. MCF-7 hücrelerinde tüm grupların NF- κ B miktarı.

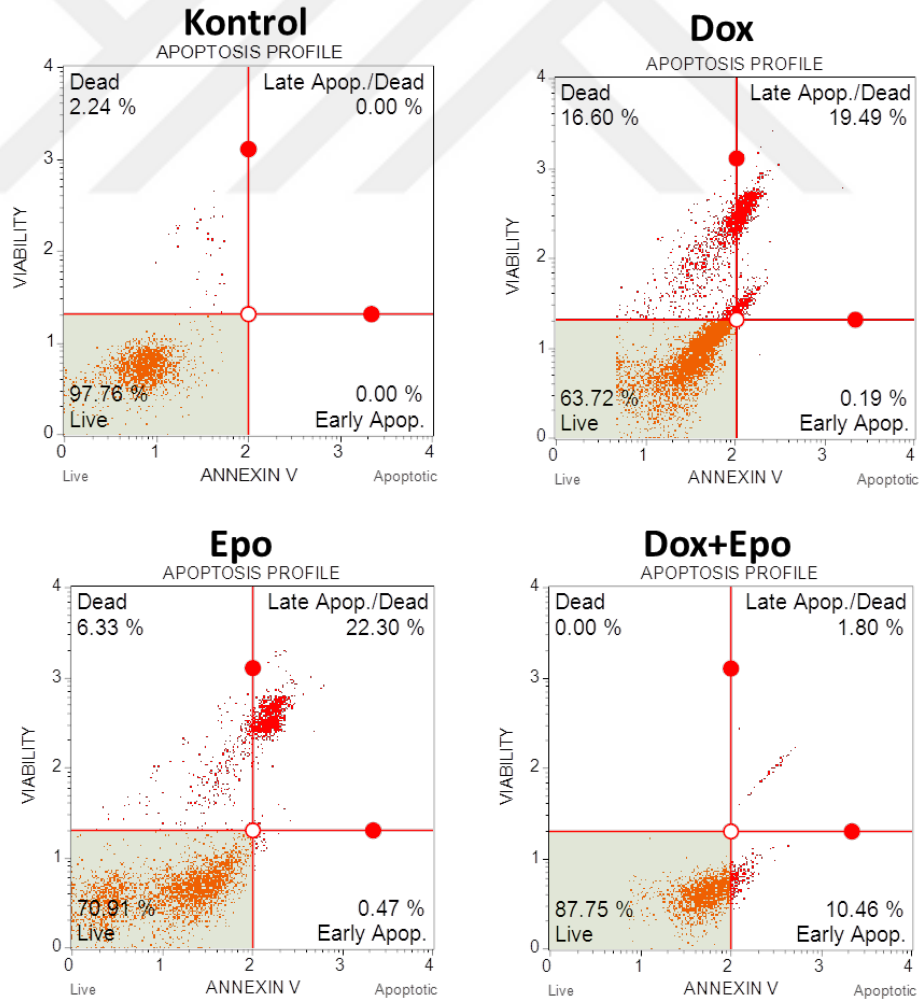
4.5.5. Flow Sitometri ile Apoptozis Belirlenmesi

HUVEC ve MCF-7 hücrelerinde, MCF-7 hücrelerine ait olan M-IC₅₀ dozları ile yapılan 6 saatlik inkübasyon sonrasında flow sitometrik yöntem kullanılarak, Annexin V-PE ile apoptotik hücreler ve 7-AAD ile de ölü hücreler boyandı. Floresans şiddetine göre HUVEC ve MCF-7 hücreleri ikili boyamaya göre analiz edildi. Apoptotik İndeks (AI), daha önceki çalışmalarda yapıldığı gibi (Kucuksayan ve ark., 2013; Kucuksayan ve ark.,

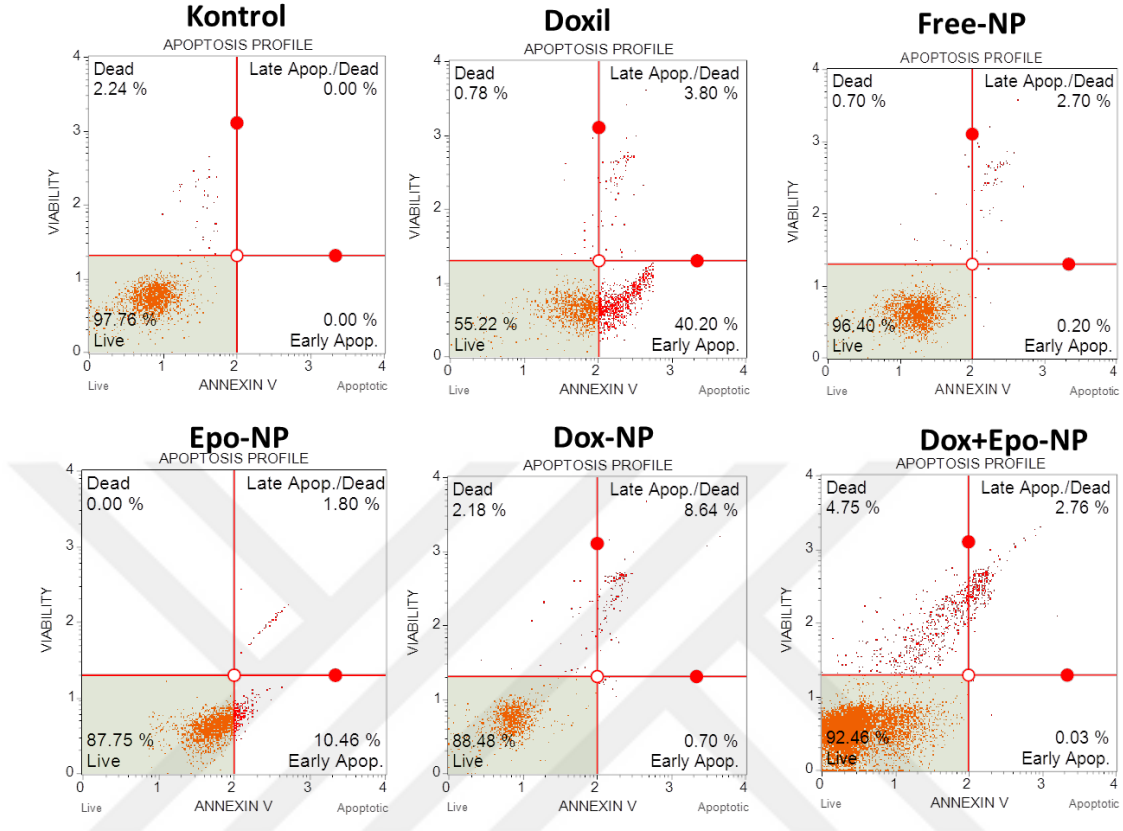
2014) her grup için farklı floresans şiddet bölgeleri seçilerek beş bölgede sayım yapıldı ve aşağıdaki formüle göre her grubun Apoptotik İndeksi yüzde (%) olarak hesaplandı.

$$AI (\%) = \left(\frac{\text{Annexin V-PE ve 7-AAD ile pozitif boyanan hücre sayısı}}{\text{Total hücre sayısı}} \right) \times 100$$

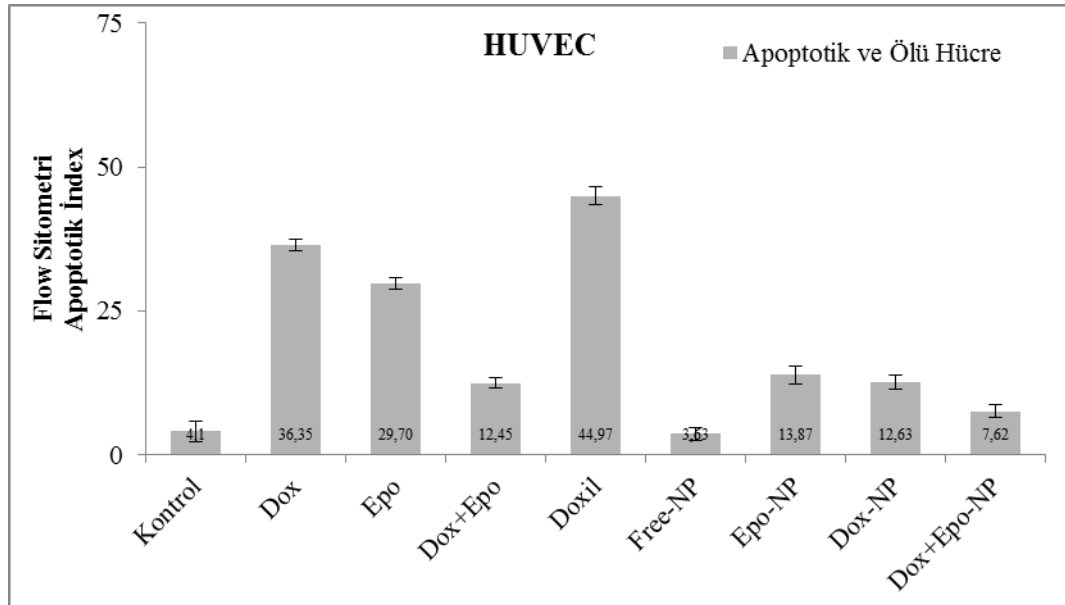
HUVEC'lerde serbest halde verilen Dox ve/veya Epo hücreleri apoptozise uğratarak öldürdüğü görülmektedir (Şekil 4.72). Ancak nanopartikül ile kapsüle edilen gruplarda apoptozisin istatistiksel olarak azaldığı görülmektedir ($p < 0,01$). Özellikle Dox+Epo-Np grubunda apoptotik indeks kontrol grubuyla aynı seviyeye düşmektedir (Şekil 4.73). Böylelikle nanopartikül ile kombine uygulama normal hücreleri apoptozisten kaçırarak canlı kalmasını sağladı (Şekil 4.74).



Şekil 4.72. HUVEC'lerin serbest ilaçlar ile flow sitometri analiz görüntüleri.

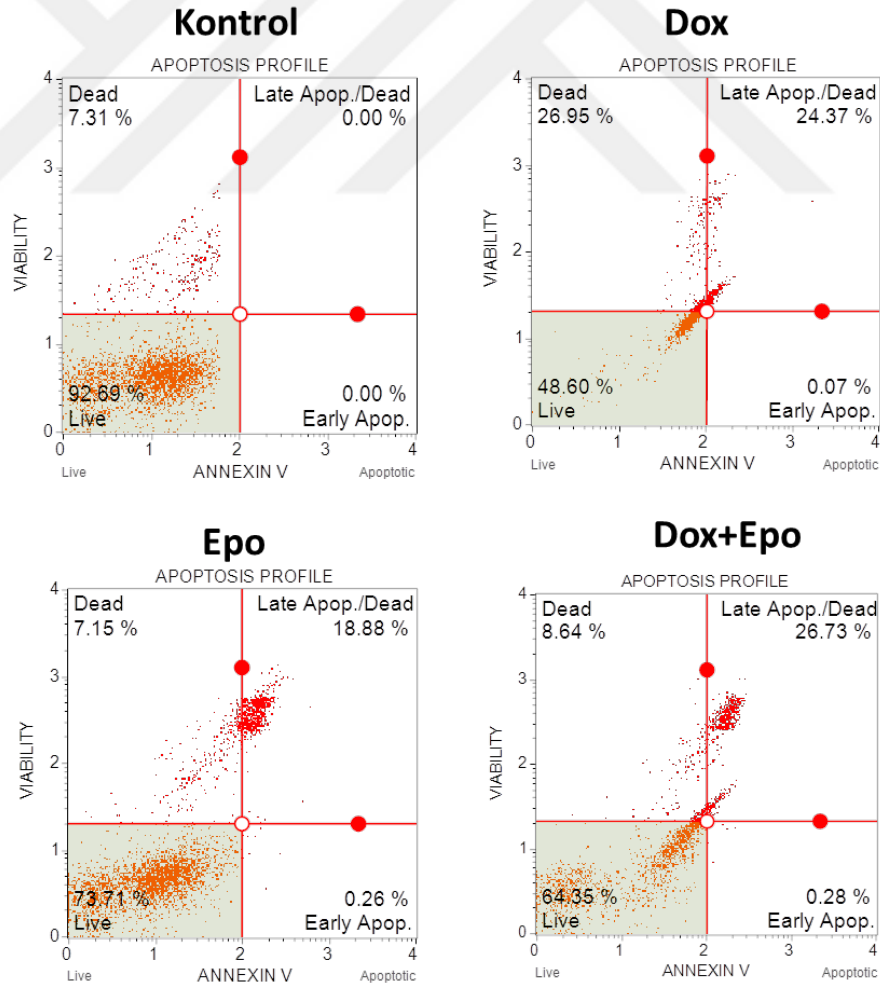


Şekil 4.73. HUVEC'lerin nanopartiküller ile flow sitometri analiz görüntüleri.

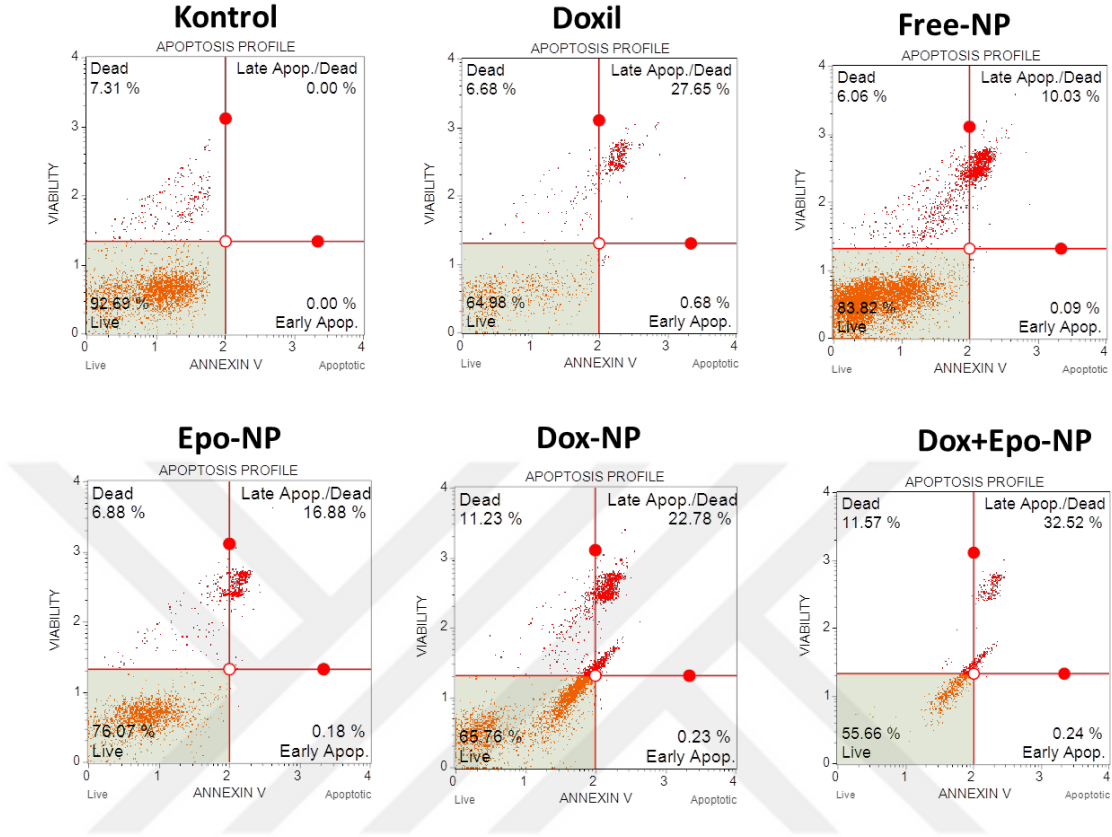


Şekil 4.74. HUVEC'lerin flow sitometri apoptotik indeks yüzdeleri.

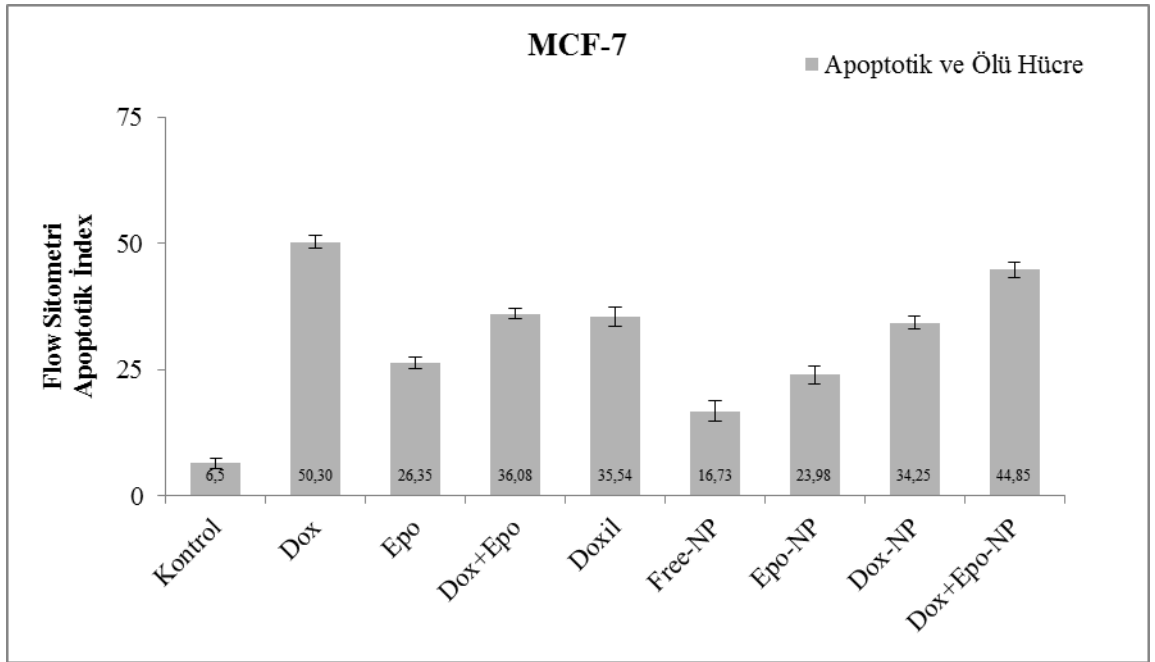
MCF-7 hücrelerinde serbest halde verilen Dox ve/veya Epo hücreleri yüksek bir oranda apoptozise uğratarak öldürdüğü görülmektedir (Şekil 4.75). Ancak nanopartikül ile kapsüle edilen gruplarda apoptozisin serbest ilaç gruplarına göre istatistiksel olarak azaldığı görülmektedir ($p<0,01$). Ancak özellikle Dox+Epo-Np grubunda apoptotik indeks serbest Dox ve Epo kombine grubuna göre daha da arttığı görüldü (Şekil 4.76). Böylelikle nanopartikül ile kombine uygulama kanser hücrelerinin apoptozisten kaçamadığını ve öldüğü görüldü (Şekil 4.77). Klinik uygulamalar için Dox ve Epo'ın nanopartiküle kombine edilerek uygulanması HUVEC'lerde apoptozis oranı %8 civarındayken, MCF-7 hücrelerinde ise bu oran %45 seviyelerine çıktı. Kemoterapötikler özellikle polimerik nanopartiküller enkapsüle edildiğinde ilaçların yan etkisinin ciddi oranda azaldığı görüldü ($p<0,001$).



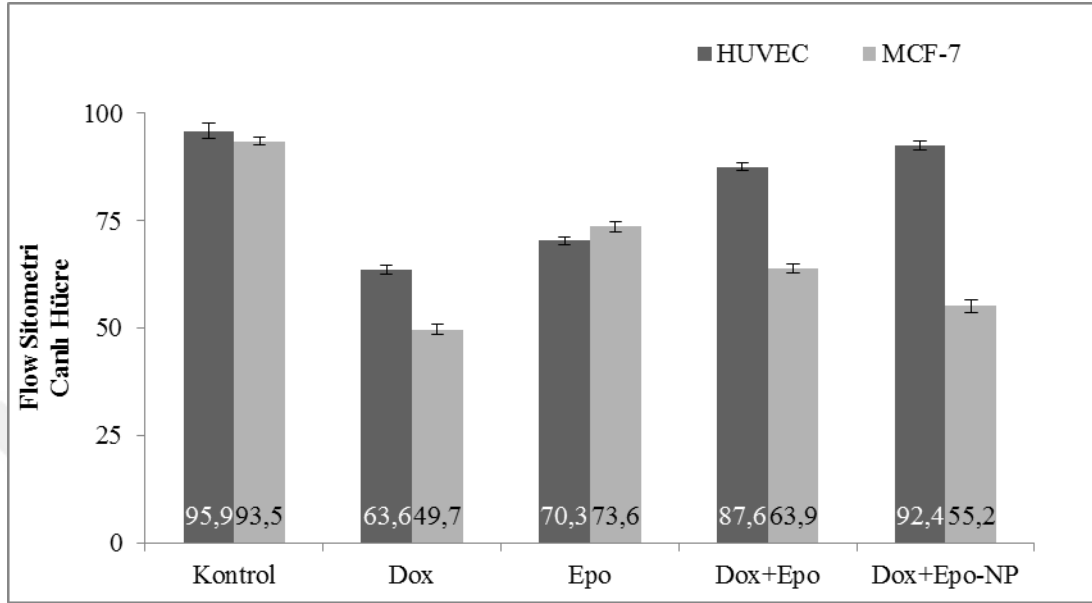
Şekil 4.75. MCF-7 hücrelerinin serbest ilaçlar ile flow sitometri analiz görüntüleri.



Şekil 4.76. MCF-7 hücrelerinin nanopartiküller ile flow sitometri analiz görüntüleri.



Şekil 4.77. MCF-7 hücrelerinin flow sitometri apoptotik indeks yüzdeleri.

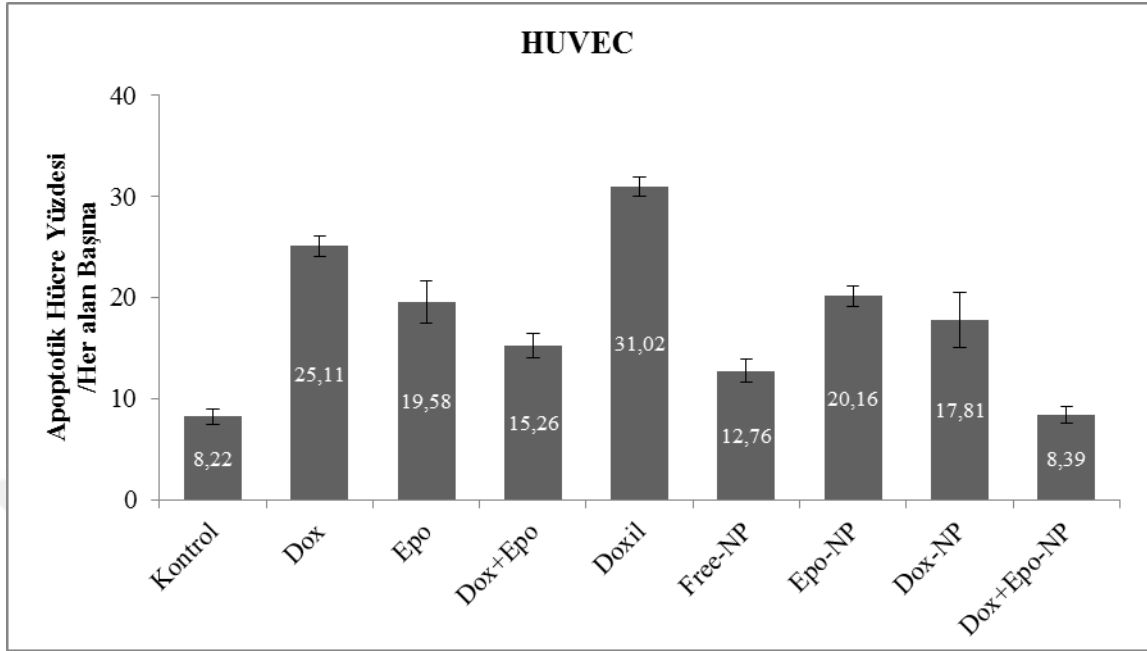


Şekil 4.78. Flow sitometrisiyle serbest ilaçların ve Dox+Epo-Np'ün HUVEC ve MCF-7 üzerindeki etkisi.

4.5.6. TUNEL Yöntemi ile Apoptozis Belirlenmesi

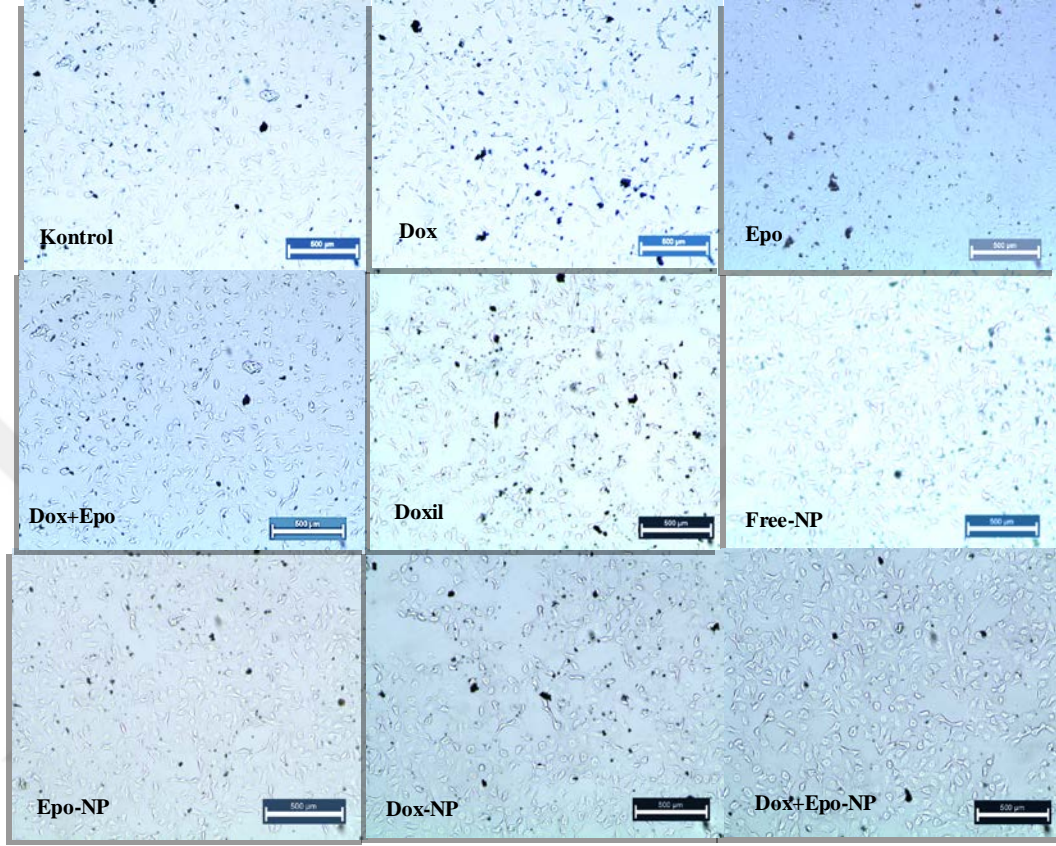
HUVEC ve MCF-7 hücre gruplarında, MCF-7 hücrelerine ait olan tüm grupların M-IC₅₀ dozları ile yapılan 11 saatlik inkübasyon sonrasında TUNEL metodu ile apoptotik hücreler boyandı. Anneksin V yönteminde erken apoptozis görülürken, TUNEL yönteminde apoptozisin son aşaması olan DNA parçalanmaları görülür. Bu yüzden inkübasyon süresi Anneksin V yöntemine göre biraz daha uzun tutuldu. TUNEL'da apoptotik İndeks (AI), daha önceki çalışmalarda yapıldığı gibi (Yoonve Yaksh, 1999; Kucuksayan ve ark., 2014) her grup için kuyucuk içerisinde üzerinde rastgele seçilen iyi boyanmış beş bölgede sayım yapıldı. Aşağıdaki formüle göre her grubun Apoptotik İndeksi yüzde (%) olarak hesaplandı (Şekil 4.79, 90 ve 101).

$$AI (\%) = (TUNEL\text{-pozitif boyanan hücre sayısı} / \text{Total hücre sayısı}) \times 100$$

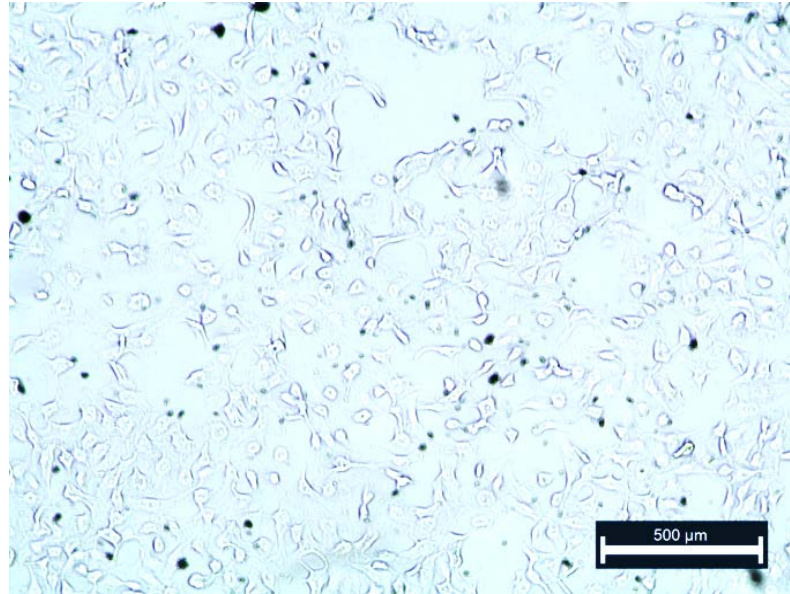


Şekil 4.79. M-IC₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda HUVEC hücrelerinin apoptotik indeksi.

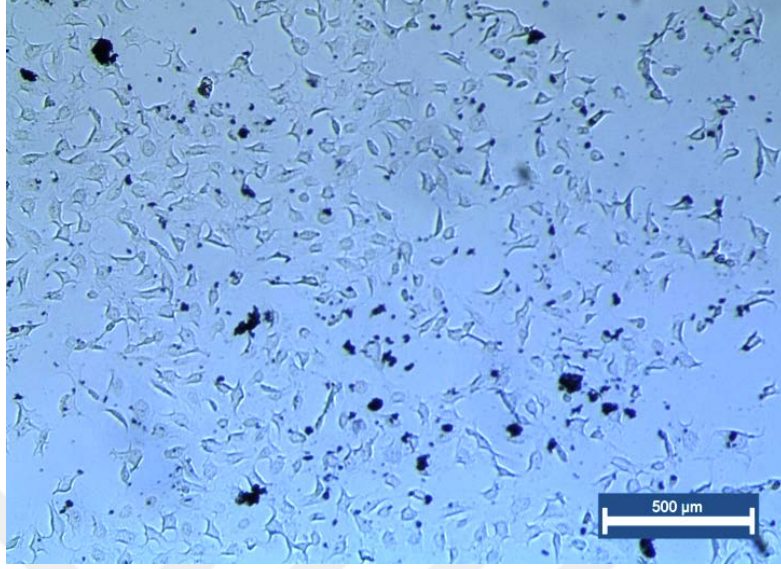
Doktora Tez çalışmasında HUVEC hücrelerinin MCF-7 hücrelerine ait M-IC₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucundaki etkileri morfolojik olarak da gösterildi. TUNEL boyaması ile apoptotik hücre çekirdeklerinin boyanması ile boyanmayan canlı hücreler arasındaki oran hesaplandı. Apoptotik hücrelerin çekirdekleri siyah renk ile boyandı. Bazı apoptozis olmuş hücrelerin ortamda olmasından dolayı açığa çıkan DNA parçaları da siyah ile boyandı. Bunlar kromozom paketleri açıldığından dolayı daha büyük göründüler. HUVEC'lerin serbest ilaç olan gruplarında apoptotik indekste önemli bir artış olduğu görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.79). Free-Np biyoyumlu olduğu ve sitotoksik olmadığı görüldü. Dox-Np ve Epo-Np gruplarında da apoptotik indeksin yükseldiği görüldü. Ancak kombine nanopartikül olan Dox+Epo-Np grubunda apoptotik indeksin kontrolle aynı olduğu görüldü. Bu sonuçlar erken apoptozisi gösteren Anneksin V verileri ve sitotoksosite sonuçlarıyla da uyumludur (Şekil 4.74, Şekil 4.79 ve Şekil 4.80). Ayrıca şuan klinikte kullanılan Doxil'in de apoptotik indeks değeri de çok büyük bulundu. HUVEC'lerin TUNEL boyama görüntüleri İnkübasyonlar 11 saatlik olup mikroskop görüntüleri 4X büyütmeyle alındı. HUVEC'lerin tüm gruplarının fotoğrafları Şekil 4.81,82,83,84,85,86,87,88,89'da gösterildi.



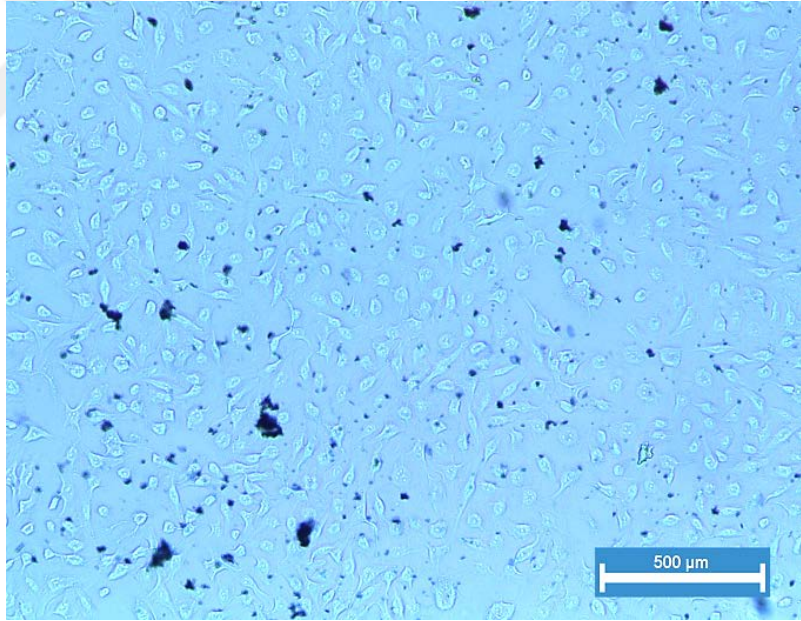
Şekil 4.80. M-IC₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda HUVEC'lere ait tüm grupların TUNEL boyama görüntüleri.



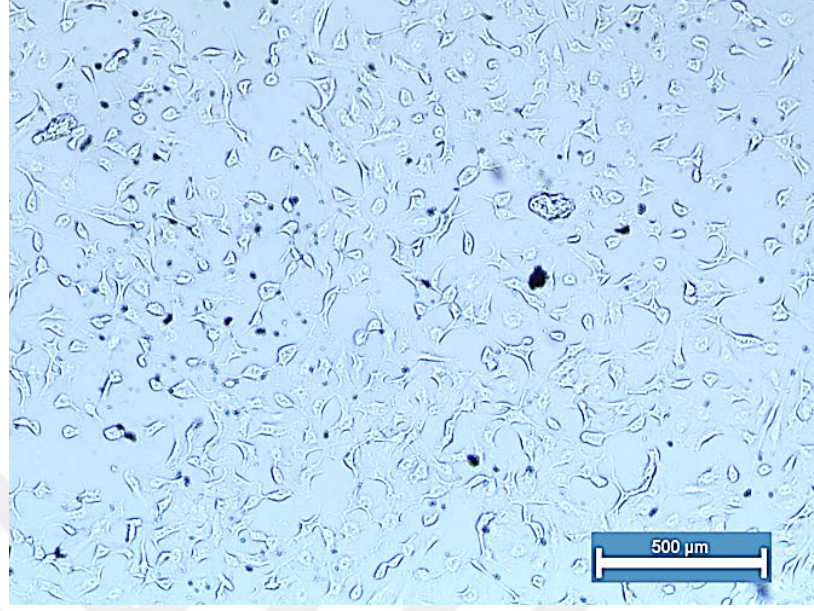
Şekil 4.81. TUNEL sonucunda kontrol grubu HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



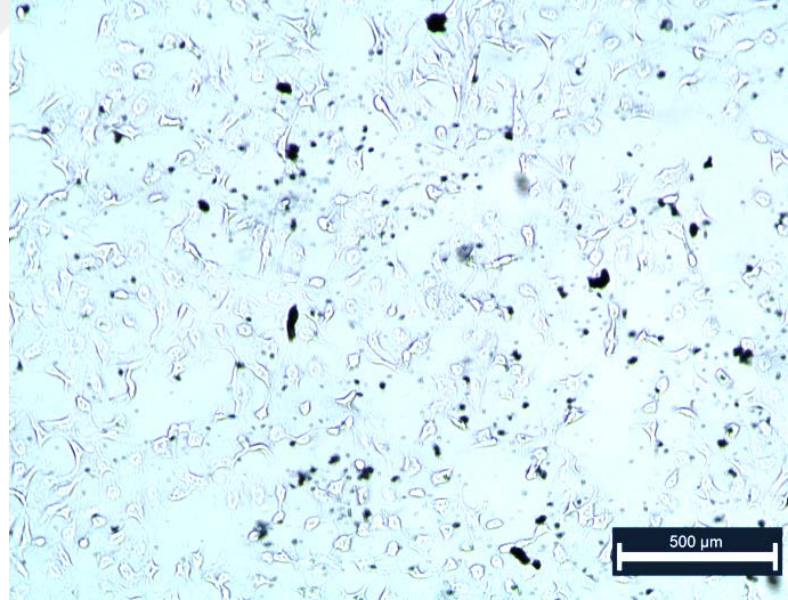
Şekil 4.82. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1,33 µg/ml Dox ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



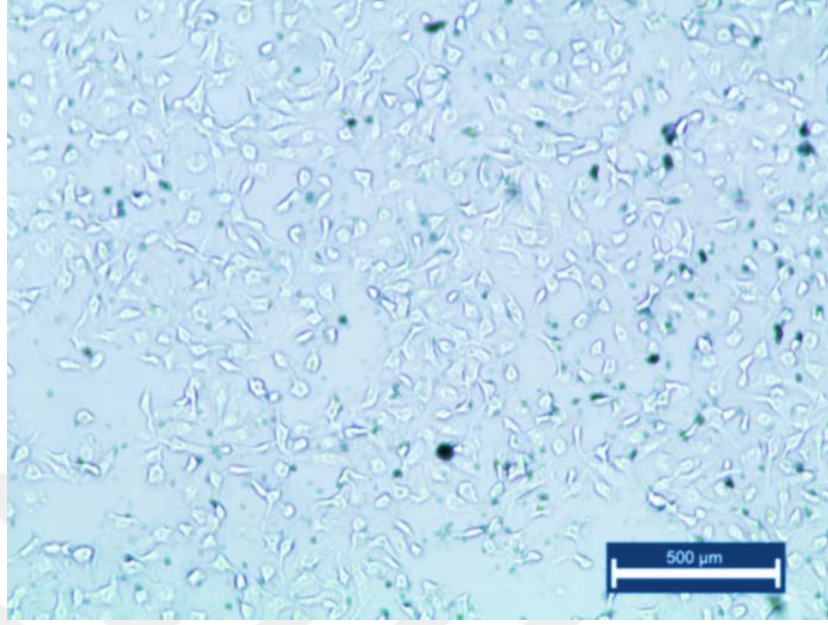
Şekil 4.83. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 22,20 ng/ml Epo ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



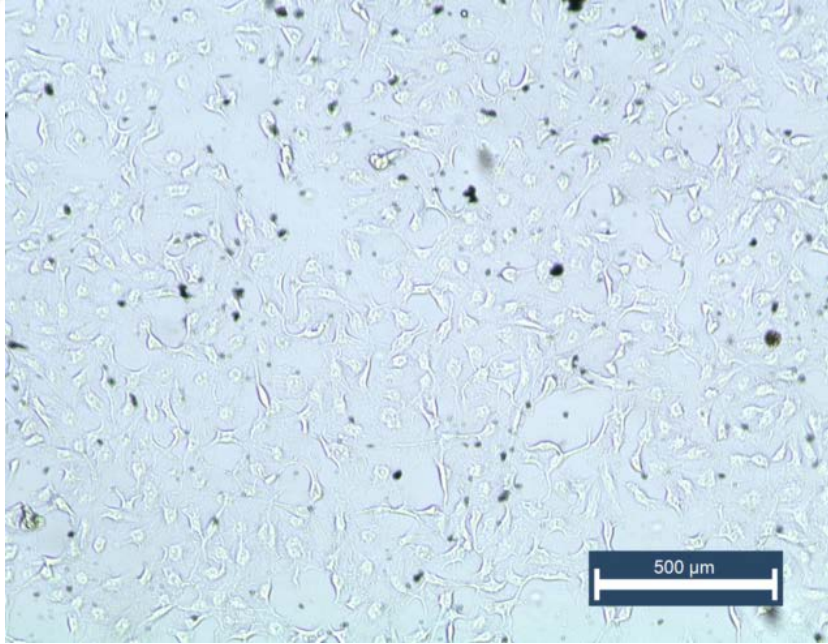
Şekil 4.84. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1 µg/ml Dox ve 15 ng/ml Epo kombinasyonu ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



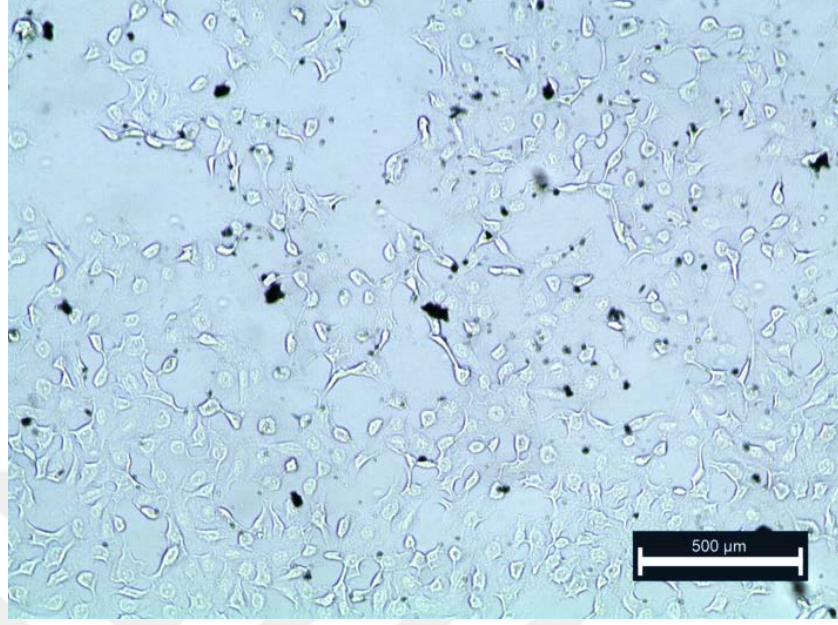
Şekil 4.85. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 144,8 µg/ml Doxil ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



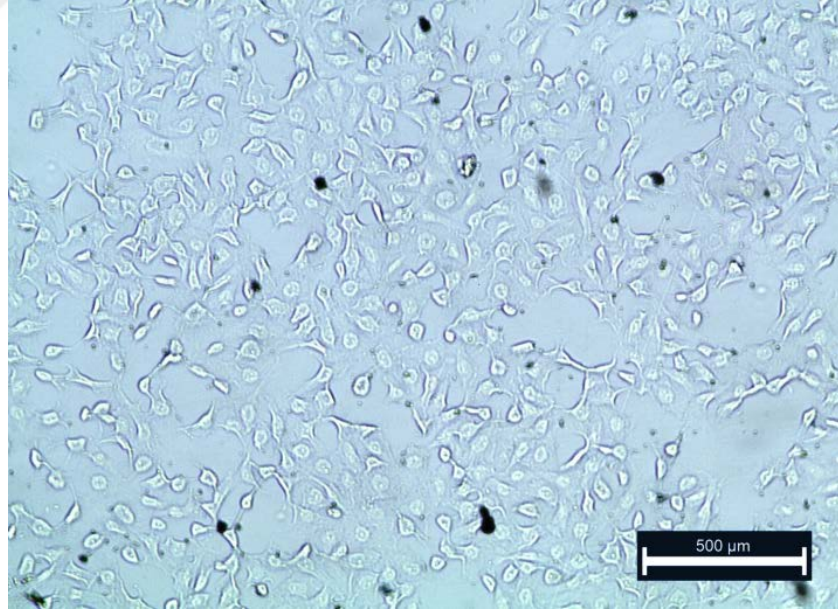
Şekil 4.86. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 2015 µg/ml Free-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



Şekil 4.87. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1558 µg/ml Epo-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



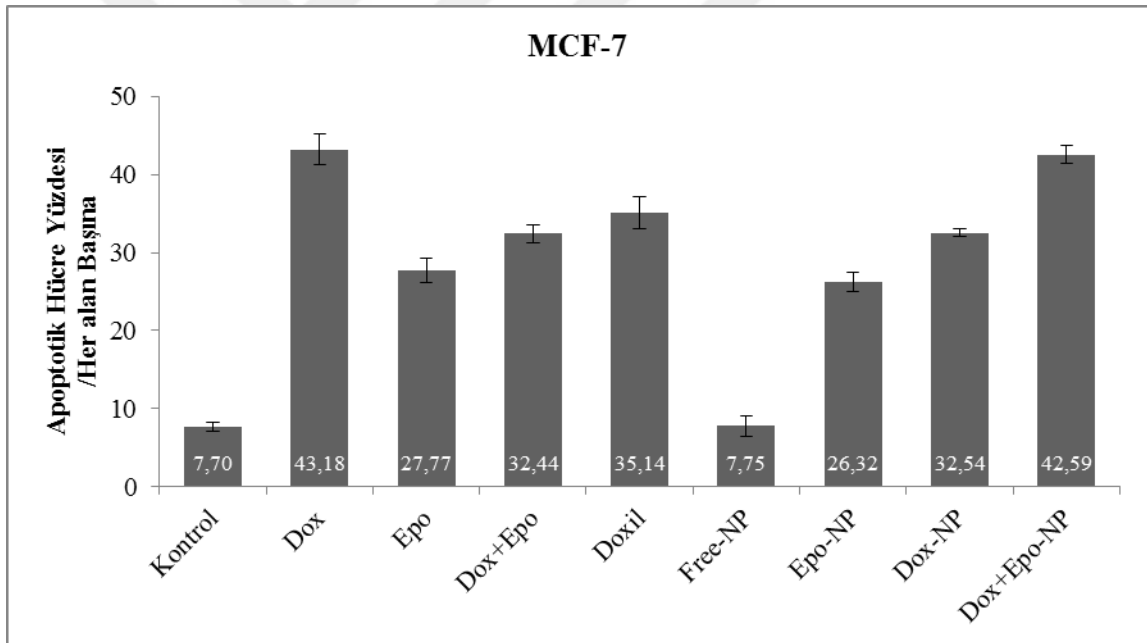
Şekil 4.88. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1423 µg/ml Dox-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.



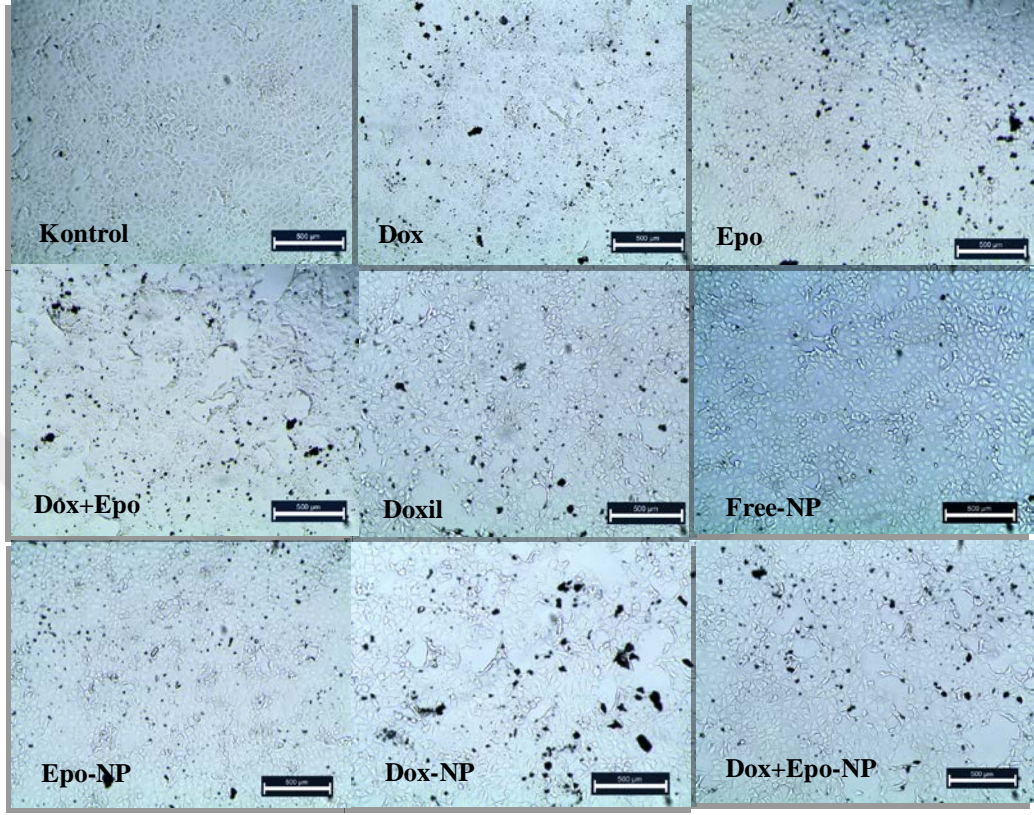
Şekil 4.89. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1233,3 µg/ml Dox+Epo-Np ile HUVEC hücrelerinin morfolojisi.

Doktora Tez çalışmasında MCF-7 hücrelerine ait M-IC₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucundaki etkileri morfolojik olarak da gösterildi. TUNEL boyaması ile apoptotik hücre çekirdeklerinin boyanması ile boyanmayan canlı hücreler arasındaki oran hesaplandı. MCF-7 hücrelerinin serbest ilaç olan gruplarında apoptotik indekste

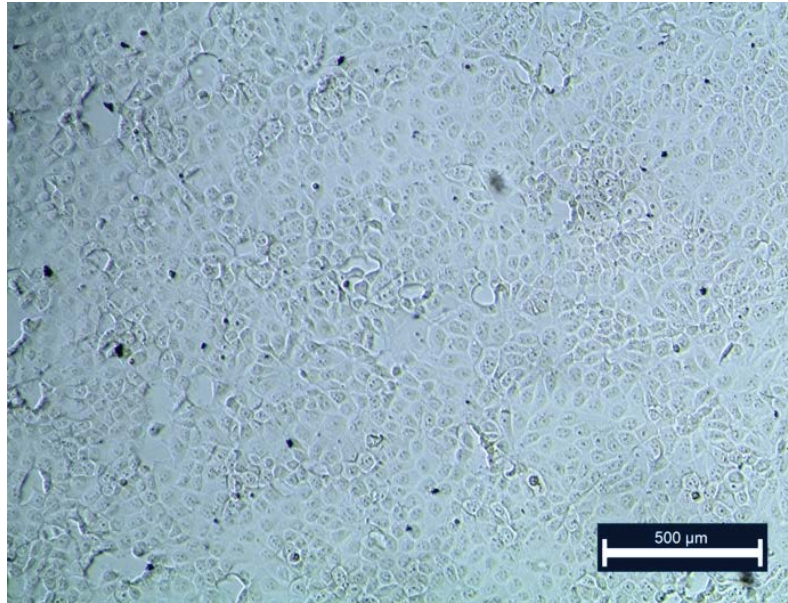
önemli bir artış olduğu görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.90). Free-Np biyoyumlu olduğu ve sitotoksik olmadığı görüldü. Dox-Np ve Epo-Np gruplarında da apoptotik indeks yükseldiği görüldü. Kombine nanopartikül olan Dox+Epo-Np grubunda apoptotik indeksin serbest Dox ile aynı olduğu ve kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü ($p < 0,001$). Bu sonuçlar erken apoptozisi gösteren Anneksin V verileri ve sitotoksitesite sonuçlarıyla da uyumludur (Şekil 4.77, Şekil 4.90 ve Şekil 4.91). Ayrıca şuan klinikte kullanılan Doxil'in de apoptotik indeks değeri de çok büyük bulundu. İnkübasyonlar 11 saatlik olup mikroskop görüntüleri 4X büyütmeyle alındı. MCF-7 hücrelerinin ait tüm grupların fotoğrafları Şekil 4.92,93,94,95,96,97,98,99,100'de gösterildi.



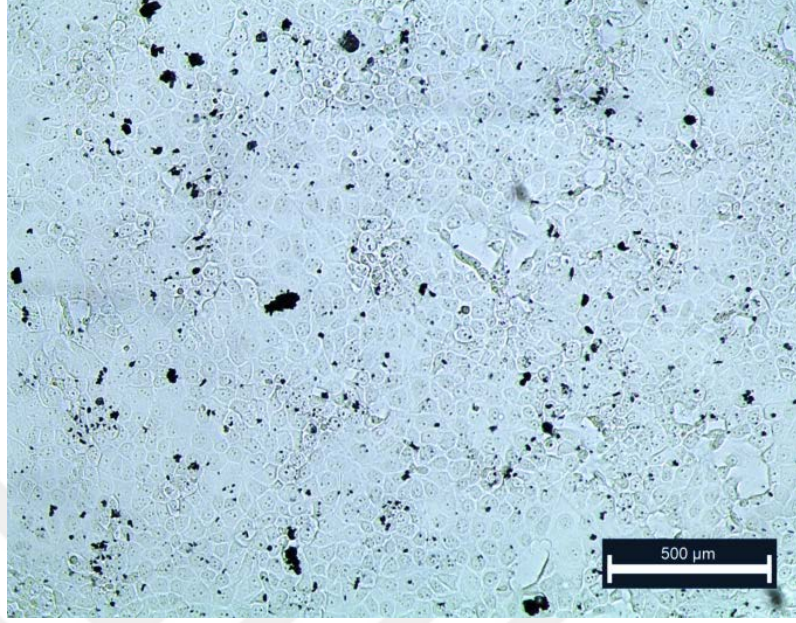
Şekil 4.90. M-IC₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda MCF-7 hücrelerinin apoptotik indeksi.



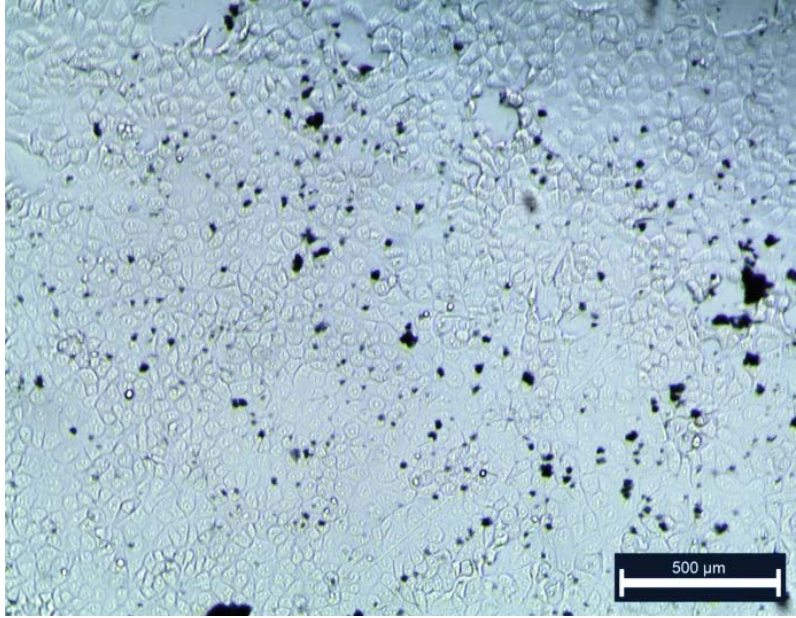
Şekil 4.91. M-IC₅₀ değerleri ile yapılan inkübasyon sonucunda MCF-7'lere ait bütün grupların TUNEL boyama görüntüleri



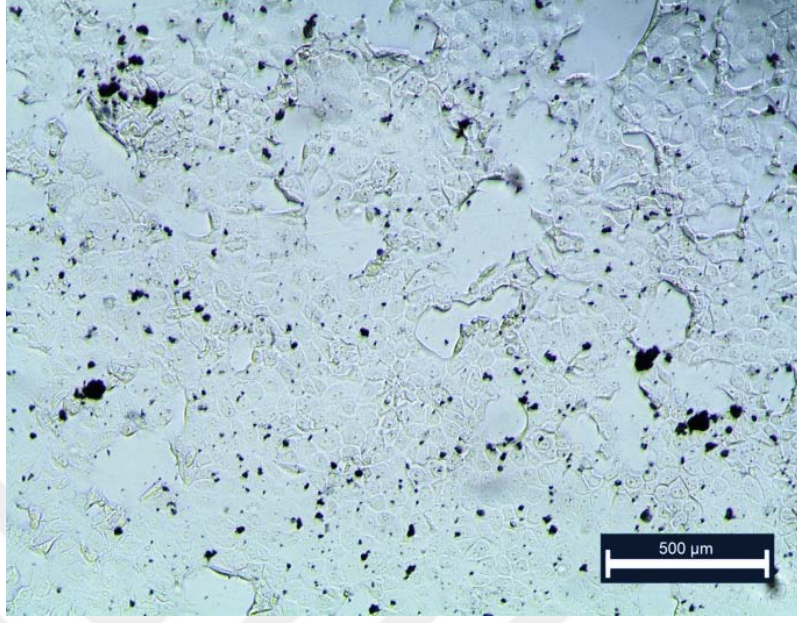
Şekil 4.92. TUNEL sonucunda kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



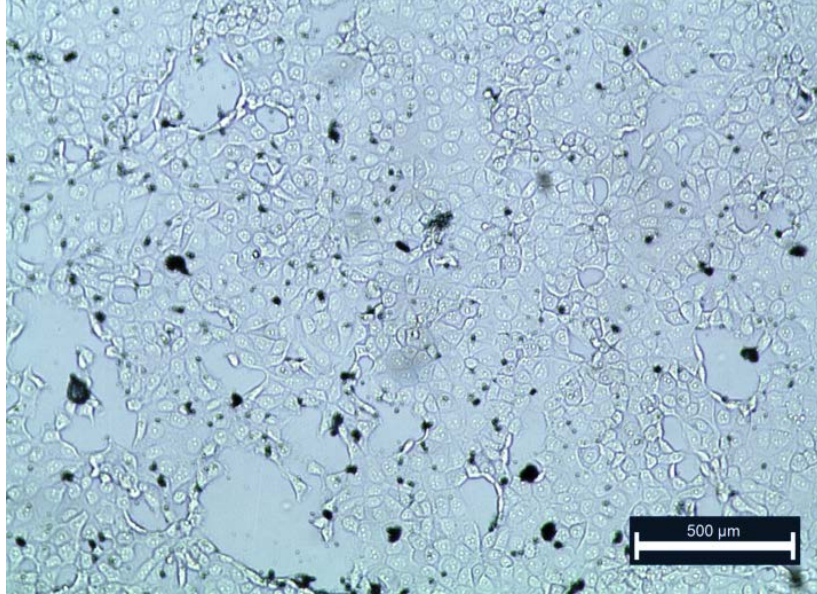
Şekil 4.93. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1,33 µg/ml Dox ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



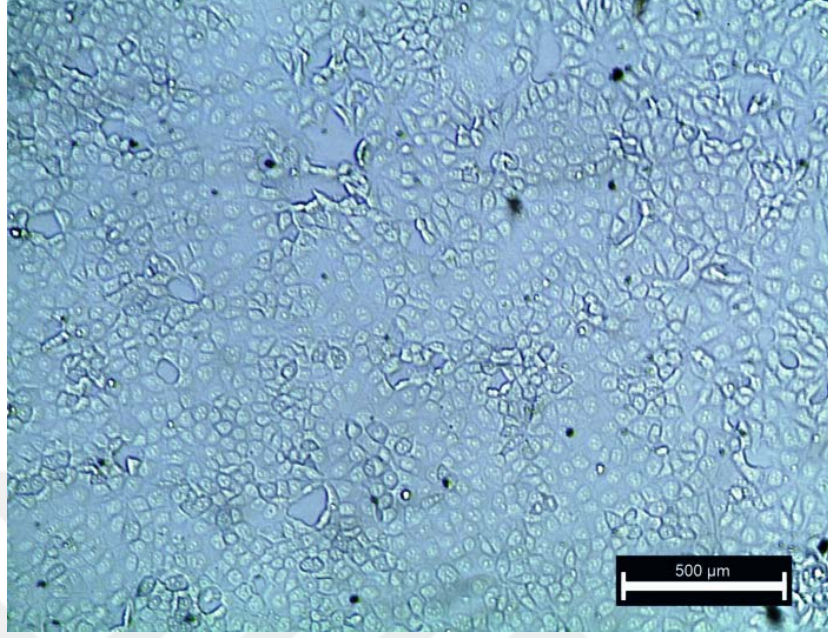
Şekil 4.94. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 22,20 ng/ml Epo ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



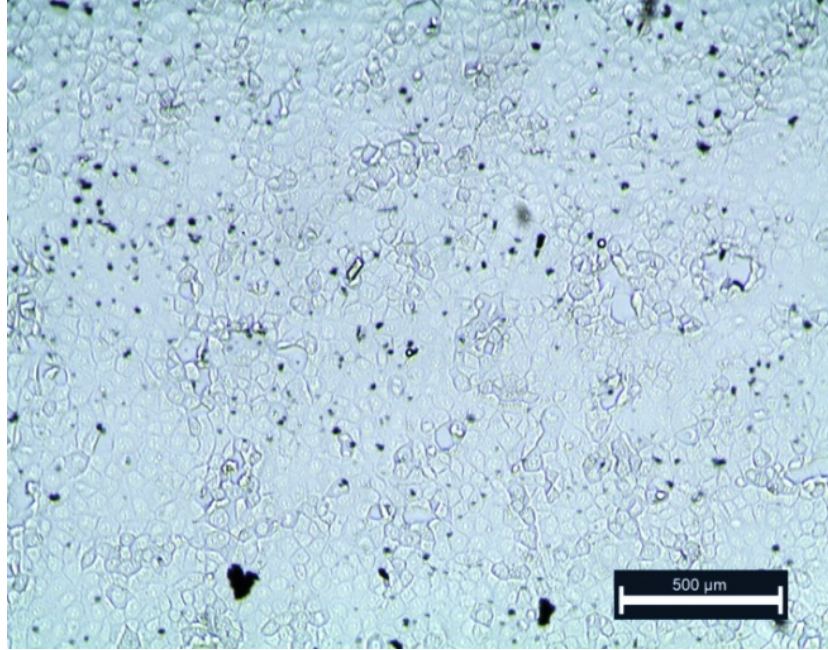
Şekil 4.95. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1µg/ml Dox ve 15 ng/ml ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



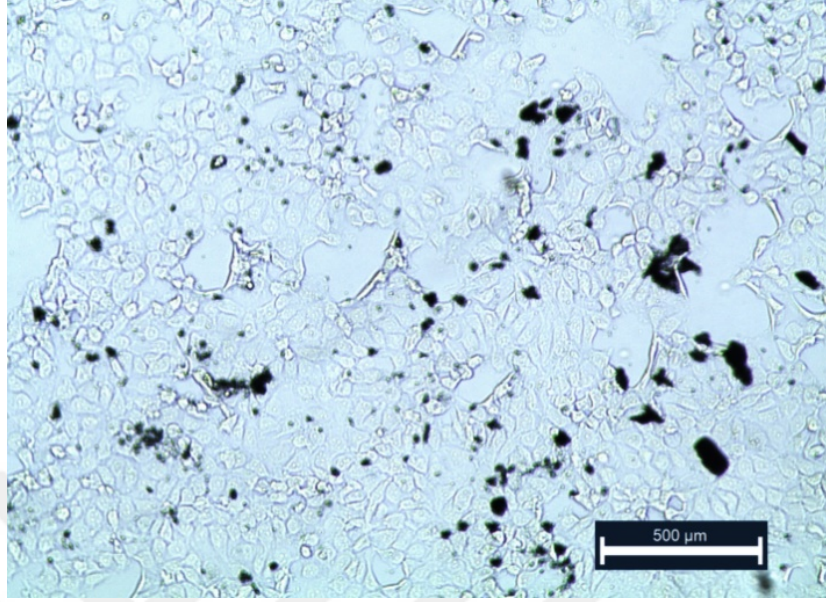
Şekil 4.96. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 144,8 µg/ml Doxil ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



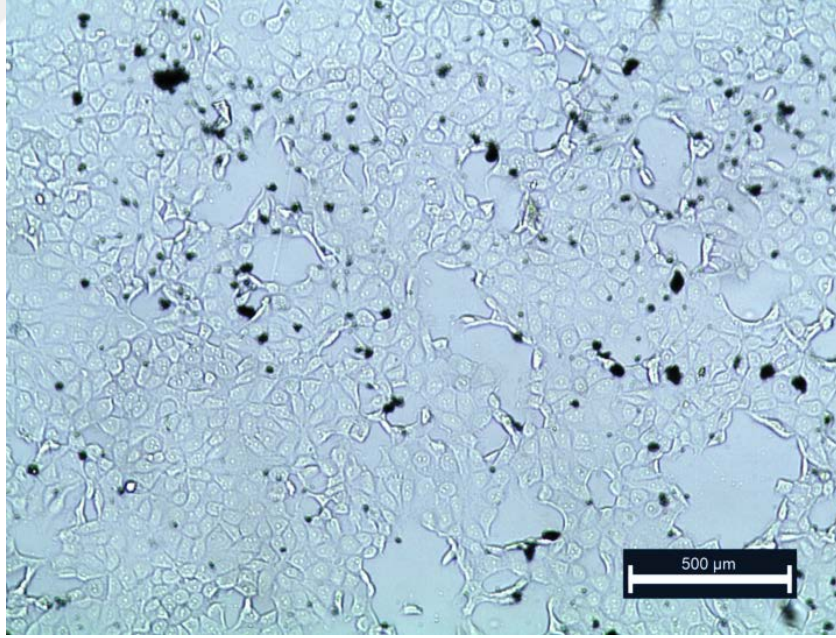
Şekil 4.97. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 2015 µg/ml Free-Np ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



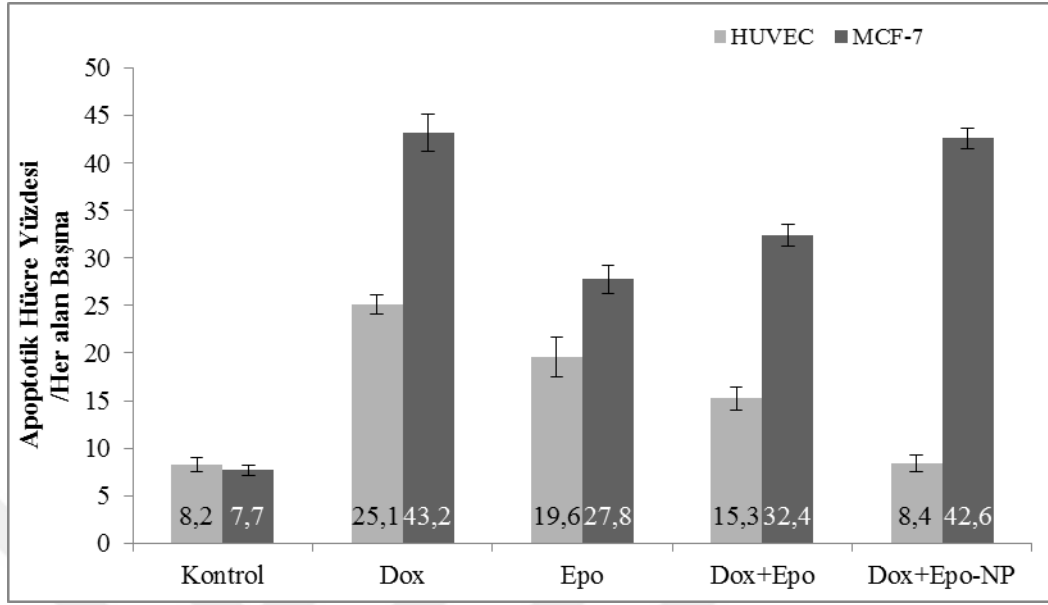
Şekil 4.98. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1558 µg/ml Epo ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



Şekil 4.99. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 1423 µg/ml Dox ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



Şekil 4.100. TUNEL sonucunda M-IC₅₀ 233,3 µg/ml Dox+Epo-Np ile MCF-7 hücrelerinin morfolojisi.



Şekil 4.101. TUNEL boyamasıyla serbest ilaçların ve Dox+Epo-Np'ün HUVEC ve MCF-7 üzerindeki etkisi

TUNEL boyama sonucunda serbest ilaçların sitotoksik etkileri kanser hücreleri üzerinde görülürken benzer etki normal hücreler üzerinde de olduğu görüldü. Serbest ilaçların kombine uygulamasında bu etki tekli ilaç uygulamasına göre biraz daha azaldığı görüldü ($p < 0,01$) (Şekil 4.101). Doktora Tez çalışmasında nanopartikül ile kombine uygulama ile normal hücrelere olan bu sitotoksik etkilerinin kaldırılması amaçlanmıştır. Her iki hücrenin de serbest ilaçlar ile Dox+Epo-Np karşılaştırmasında apoptotik indeks üzerindeki etkisi şekil 4.101 de verildi. Dox+Epo-Np uygulanmış gruplarda kanser hücrelerine sitotoksik etki görülürken normal hücrelere sitotoksik etki yapmadığı belirlendi ($p < 0,001$).

5. TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir ve dünya genelinde, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde birinci sıradadır (Kim ve ark., 2014). Kemoterapi birçok kanser için önemli bir tedavi seçeneğidir. Kombine kemoterapi uygulandıktan sonra bile gelişebilen ilaç direnci kemoterapinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ilaç duyarlılığının artırılması kanser hastalarının tedavilerinin başarılı olması için önemli bir basamaktır (Wang ve ark., 2010). “İndüksiyon tedavisi” ve “koruyucu tedavi” olmak üzere iki şekilde uygulanan kemoterapi, hastalığın tedavi başlangıcı ve kemoterapi süresince kanserin nüks etmesini azaltmak ya da var olan bir kanserin büyümesini önlemek amacıyla uygulanır. Bunun için farklı mekanizmalara sahip antineoplastik ilaçlar genelde kombine kullanılarak sinerjistik etki amaçlanır. Meme kanserinde en çok kullanılan ilaç kombinasyonları AC (Adriamycin, Cyclophosphamide), CAF (Cyclophosphamide, Adriamycin, Flurouracil), EC (Epirubicin, Cyclophosphamide) ve FEC (Flurouracil, Epirubicin, Cyclophosphamide)’dir (Kapse-Mistry ve ark., 2014). Bu tezde kombine tedavide en çok kullanılan ticari adı Adriamycin olan Dox seçildi.

Kemoterapötik ilaçlar hem başlangıç hem de ilerlemiş meme kanserinin tedavisinde ve izlenmesinde hayati önem sahiptirler. Bu ilaçlar oral ya da i.v. olarak uygulanır. Sistemik olarak verilen kemoterapötik ilaçlar kanser hücreleriyle birlikte vücudun diğer normal hücrelerini de öldürerek kısa ve uzun vadede olumsuz yan etkilere neden olmaktadır. En iyi geliştirilmiş kemoterapötik ajanların bile normal ve kanserli hücreler üzerindeki etkileri ayrılamamaktadır. Bu yüzden kemoterapötik ilaçlar vücutta non-spesifik dağılarak sistemik toksisiteye ve olumsuz yan etkilere sebebiyet vermektedir. Kemoterapi ilaçlarını doğrudan tümöre taşıyan nanopartiküller hem ileri hem de erken aşama meme kanserinde kullanılmaktadır. Böylelikle normal hücreler üzerindeki sitotoksik etki azaltılmaktadır (Sinha ve ark., 2006). Bu tezde nanopartiküllerin avantajlarından dolayı nanopartikül sentezlemeyi amaçlandı.

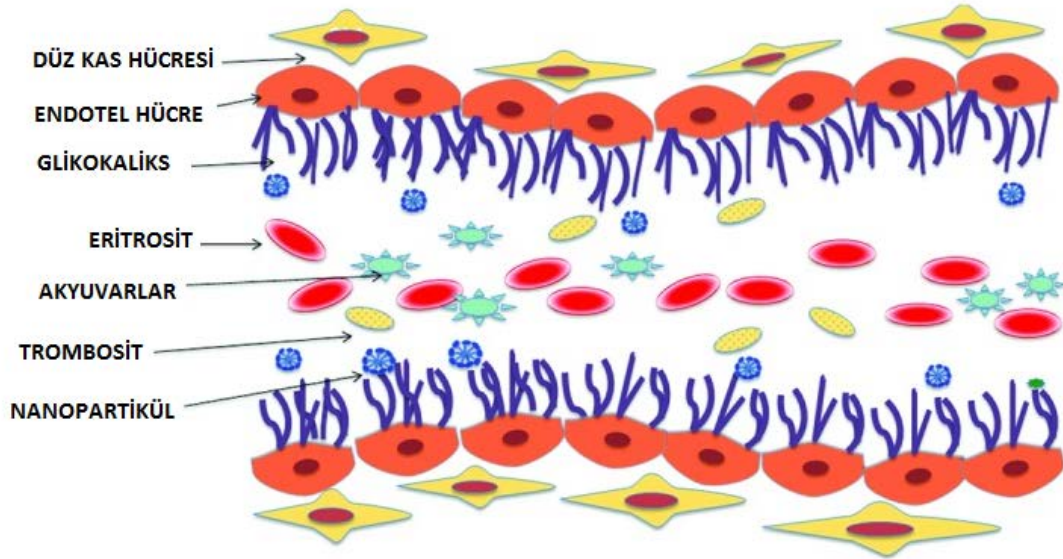
Kemoterapötik ajanların kullanımı kemoterapinin etkinliğini engelleyen birçok sınırlamayı da beraberinde getirir. Bunlardan birincisi kemoterapötik ajanların

çözünürlüğünün kötü olmasıdır ve uygulamada zorluklara neden olmaktadır. İkincisi vücutta spesifik bir şekilde dağılmadıklarından dolayı tümöre yetersiz nüfuz etmeleridir. Üçüncüsü sağlıklı dokulara zarar vermesidir. Dördüncüsü ise ilaç direncine sebep olmalarıdır (Creixellve Peppas, 2012). Günümüzde klinik yaklaşımlar kemoterapötik ilaçların sistemik uygulanmasına dayanmaktadır. Bu tedaviler ilaçların fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanan farmakokinetik faktörler ve çözünürlüklerinin düşük olması sebebiyle sınırlıdır. Ayrıca bu tedavilerde genellikle vücutta hızlıca bölünen saç, deri, dalak ve karaciğer gibi diğer organlar da hedef olmakta ve toksik etki oluşmaktadır. Uygulanan dozun ancak sadece küçük bir bölümü hedeflenen kanserli bölgeye ulaşip istenilen etkiyi gerçekleştirebilir. Tümöre uygulanan ilacın sınırlı dozu dahi ilaç direncinin gelişmesine neden olabilir. Sonuç olarak terapatik etki uyandırmak için uygulanacak olan bir sonraki doz daha yüksek olacak ve daha şiddetli bir toksik yan etki sürecini tetikleyecektir. Bu yüzden anti-kanser ajanlarının nanopartiküller kullanılarak iletilmesi bu yıkıcı yan etkilerin üstesinden gelmeye yardımcı olabilir (Chrastina ve ark., 2011). Dolayısıyla bu tezde nanopartikül ile taşıma sistemleri kullanarak kemoterapötiklerin normal hücrelerde etkinliğinin artırılması ve sitotoksitenin azaltılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda normal hücrelerde serbest ilaç uygulamalarına oranla nanopartikülle ilaç uygulaması anlamlı derece sitotoksiteyi azaltırken meme kanseri hücrelerinde sitotoksiteyi arttırdığı bulundu (Tablo 4.21).

Antikanser tedavisinde nanopartiküllerin i.v. olarak uygulanmak istenmesinin sebebi hızlı, güvenilir ve sistemik dolaşım aracılığıyla tam bir dağılımı sağlamasından dolayıdır. Nanopartiküllerin hücreler arası boşluklardan geçebilmesi, hedeflenebilme gibi özellikler sağlaması nedeniyle önemlidir. Hastalara i.v. uygulanan nanopartiküller kan dolaşımında tümöre ulaşabilecek ve tümör mikro damarından dışarı çıkabilecek kadar küçük olmalıdır. Bu tümör mikro damar yarıçapı genellikle 100 nm ile 2000 nm arasındadır. Dolayısıyla buradan geçen parçacıklara nanopartikül denilmektedir. İnsan vücudunda bu büyüklükte başka bir aralık mevcut değildir. Ancak buna benzer bir aralık 70-100 nm böbrek glomerüller endotel tabakasında bulunmaktadır. Dolayısıyla bu tezde nanopartikülleri kanser bölgesinde endotel aralıktan geçebilecek aynı zamanda da böbreklerden süzülme de engelleyecek boyut aralığı olan 100-200 nm boyutunda

sentezlendi(Tablo 4.1). Bu boyutu hem zetasizer ile hem de SEM cihazı ile doğrulandı (Tablo 4.3).

Damar duvarı endotel hücrelerden oluşur ve endotel hücre membranında bulunan bir proteoglikan olan glikokaliks ile kaplı olduğundan dolayı negatif yüke sahiptir (Dull ve ark., 2003). Bu da nanopartiküllerin sağlıklı endotel bölgelere girememesini ve tümör bölgesinde ise nanopartiküllere endotel açıklıktan girmesinden dolayı bir seçicilik sağlar (Şekil 5.1). Endotel hücrelerinin bu özelliğini dikkate alarak tezde kullanılan polimerin nanopartikül hale dönüştürdükten sonra zetasizer cihazı zeta potansiyellerini ölçüldü. Tezde sentezlenen tüm nanopartiküllerin zeta potansiyel sonuçları negatifti (Tablo 4.2). Bu negatif potansiyel nanopartiküllerin hem aglomere olmasını engelleyen hem de glikokaliksten kaynaklanan negatif yük ile endotel hücrelerinde uzak durmasını sağlayan bir potansiyeldir. Sonuçta sentezlenen nanopartiküller dolaşımdan dışarı çıkıp damar dışı bölge olan tümör mikro çevresine geçebilir özelliktedir.

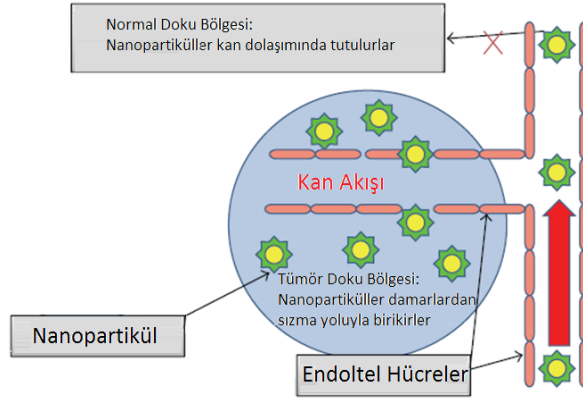


Şekil 5.1. Nanopartiküller ve kan akışının hemodinamiği

Etkili bir damar dışına çıkış için ikinci bir engel ise sonradan bir önceki bariyer olan tümör interstisyumdur. Burada nanopartiküller düz kas hücreleri, ekstrasellüler matriks, perisitler ve kanserle ilişkili fibroblastlara ek olarak çeşitli fizyolojik faktörler olan düşük pH, düşük oksijenlenme ve yüksek interstisyel akış basıncı ile karşılaşılır (Byrne ve ark., 2008; Rabanel ve ark., 2012). Tezde sentezlenen nanopartiküllerin ilaç

salınımları farklı pH’larda yapıldı. Nanopartiküllerin normal fizyolojik pH olan 7,4 seviyelerinde ilaç salınımlarının kısa vadede çok düşük olduğu, ancak pH’nın düştüğü durumlarda ise kısa vadede yüksek olduğu bulundu (Şekil 4.24,25,26 ve 27).

Günümüzde gelişmekte olan nanoteknoloji meme kanserinin erken teşhisi ve tedavisi için yeni bir yaklaşım sergilemektedir. Gittikçe yaygınlaşan meme kanserinde hastalar için tam anlamıyla tedavi seçeneği çok azdır. Nanopartiküller, meme kanserinin teşhisinin, hedeflenmesinin ve tedavisinin araştırılmasına olanak sağlamaktadır. Preklinik ve klinik fazda olan çeşitli nanopartikül tabanlı bazı formülasyonlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında; polimerik ilaç miselleri, lipozomlar, dendrimerler, karbon nanotüpler ve nanorodlar en yaygın kullanılanlardır (Sharma ve ark., 2013). Nanopartiküllerin içerisine kapsüle edilen kemoterapötik ilaçların aktif ve pasif hedefleme kullanılarak hedefe taşınması sistemik toksisiteyi ve normal hücrelerin ölmesi engelleyebilir (Şekil 5.2) (Geels ve ark., 2000). Kanser türlerinin çoğunda dört evre bulunmaktadır. Pasif hedeflemede genellikle dördüncü evre olan metastaz dışındaki kanser evrelerinde tercih edilen bir yöntemdir. Tezde aktif hedefleme yapılmayıp pasif hedefleme tekniği kullanıldı. Bu tip nanopartiküller ile endotel aralıktan geçip kanserli bölgeye ulaşması hedeflendi.



Şekil 5.2. Nanopartiküllerin endotel aralıktan sızarak tümör bölgesine geçmesi (Sharma ve ark., 2013).

Klinikte izin verilen faz aşamasında çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan nanopartiküller tablo 5.1’de listelendi. Küçük moleküllü kemoterapötik ilaçların

yüklendiği lipozomlar 1990'ların ortalarından itibaren kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu konuda klinikte kullanım iznini ilk alan doksorubisin içeren polietilenglikol kaplı lipozom nanopartikül Doxil® ve polietilenglikol kaplı olmayan lipozom nanopartikül Myocet®'dir. Daha sonra Kaposi sarkoma'nın tedavisi için daunorubisinin enkapsüle edildiği lipozomal DaunoXome® ve non-Hodgkin lymphoma'nın tedavisi için de vinkristin içeren lipozomal Onco-TCS® klinik olarak kullanım izni verilen ilaçlardır. İzin verilen diğer bir nano formülasyon da paklitaksel içeren albumine bağlı nanopartikül Abraxane® halen metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Abraxane, paklitaksel ile geleneksel tedaviye göre daha güvenli, yüksek tepki hızı ve geliştirilmiş farmokokinetiğe sahiptir. Bu nanopartiküllerin hepsi tezde sentezlenen nanopartikül gibi pasif hedefleme özelliğine sahiptir.

Tablo 5.1. Klinik araştırma aşamasında olan nano boyutta olan ilaç formülasyonları (Biswas ve Torchilin, 2014).

FORMÜLASYON	İLAC	İSİM	ENDİKASYON	FAZ DURUMU
Liposomes	Doxorubicin	ThermoDox®	Various cancers	II
Liposomes	Doxorubicin	JNS002		II
Liposomes	Cisplatin	LiPlaCis		I
Liposomes	Cisplatin	Lipoplatin		III
Liposomes	Cisplatin	SP1-77		II
Liposomes	Cisplatin analog	L-NDDP/aro-platin		II
Liposomes	Oxaliplatin	MBP426		I
Liposomes	Vincristine	Marqibo®		II
Liposomes	Annamycin	Liposomal Annamycin		II
Liposomes	Mitoxantrone	LEM		Pre-clinical
Liposomes	Paclitaxel	PNU-93914		II
Liposomes	Paclitaxel	LEP-ETU		II
Liposomes	CKD602 (Topoisomerase inhibitor)	S-CKD602	Various cancers	I/II
Liposomes				
Polymeric Nanoparticles (Cyclodextrin)	Camptothecin	CRLX101	Various cancers	II
Polymeric micelles (PEG-poly aspartate)	Paclitaxel	NK105	Various cancers	II
Polymeric micelles (PEG-poly(D,L-lactide))	Paclitaxel	Genexo1®-PM	Breast, lung, pancreatic cancer	II-III
Polymeric micelles (PEG-PLGA)	Docetaxel	BIND-014	Various cancers	I
Polymeric micelles (PEG-poly(D,L-lactide))	Docetaxel	Nanoxel®	Advanced breast cancer	I
Polymeric micelles (PEG-poly aspartate)	Doxorubicin	NK911	Various cancers	I
Polymeric micelles (Glycoproteins)	Doxorubicin	SP1049C	Various cancers	II
Polymer-drug conjugate	Paclitaxel	Xyotax®	Breast, ovarian, advanced lung cancer	II
Polymer-drug conjugate	Paclitaxel	Taxoprexin®	Various cancers	II-III
Polymer-drug conjugate	Doxorubicin	PK1	Breast, lung, colon cancers	II

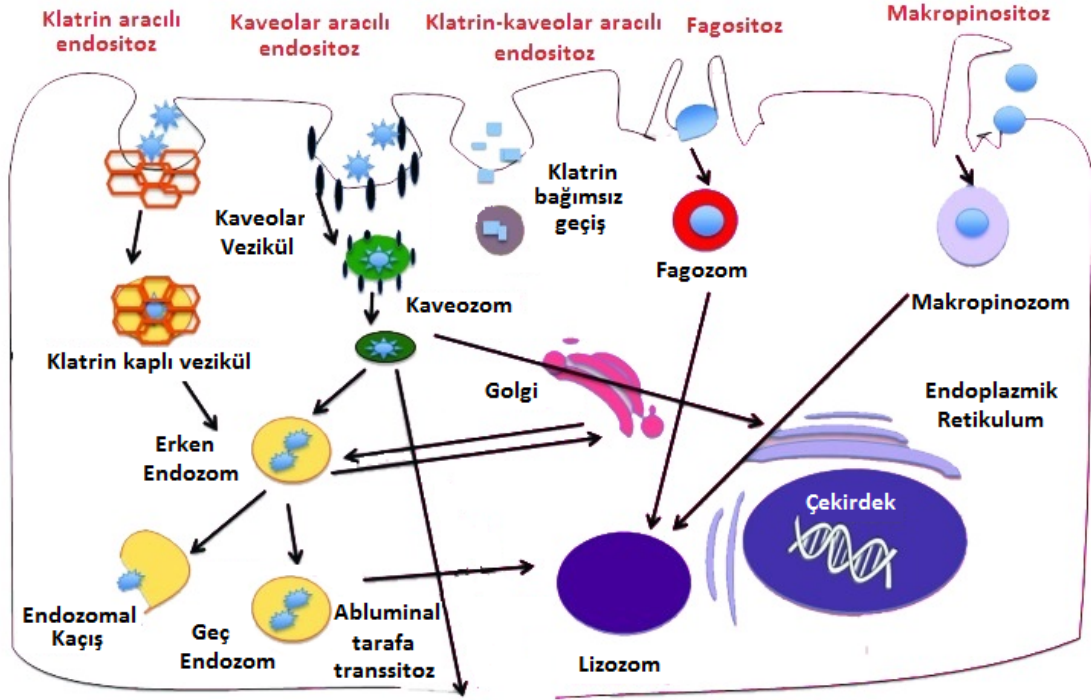
Nanopartikül içerisinde taşınan makro moleküler ilaçlar ve genler etkilerini hücre içinde gerçekleştirirler. Bu yüzden nanopartikül ve içerisinde getirilen ilaçlar hücrenin dış membranından içeriye geçmek zorundalardır (Torchilin, 2012). Bunun için çeşitli nanopartikül modelleri önerilmiştir. Nanopartiküllerin en belirleyici özellikleri, yüzey yükü, hidrofobiklik ve boyuttur (Chenve Bothun, 2014). Polietilenglikol ile hazırlanmış nanopartiküllerin yüzey yükünün zayıf olması ve sterik engel oluşturmasından dolayı membran ile etkileşimi azalır, yüklü nanopartiküllerin ise membran ile etkileşimi artar (Vermave Stellacci, 2010). Yüksüz nanopartiküller membran yüzeyinde birikerek diğer nanopartiküllerin hücre içine girmesine engel olabilmektedir. Bu sebeple tezde

nanopartiküller polietilenglikol ile kaplanmadı. Kullanılan polimer ile tezde sentezlenen nanopartikülün yüzey yükü ise -9,51 ile -11,3 mV arasındadır (Tablo 4.2.). Proteinler nanopartiküllerin yüklerine bağlı olarak üzerinde tutunabilir ve reseptör aracılı endositoz ile hücre içine nanopartiküllerin girmesini zorlayabilir (Rejman ve ark., 2004). 200 nm'den daha büyük olan nanopartiküller kaveolin aracılı endositoz ile hücre içine alınırken 200 nm'den küçüklerin ise kltrin aracılı endositoz ile içselleştirildiği gözlenmiştir. Epitel hücrelerde PLGA nanopartiküllerin hücre içselleştirilmesinin araştırıldığı diğer bir çalışmada kltrin ve kaveolin proteinlerinin ekspresyonunun artmadığı, ancak yine de nanopartiküllerin hücre içerisine girdiği bulunmuştur (Qaddoumi ve ark., 2003). Bu tezde nanopartiküllerin içselleştirilmesi Dox'in floresans özelliğinden yararlanarak belirlendi. Meme kanseri hücrelerine Dox+Epo-Np'lerinin normal hücrelere göre üç kat daha fazla girdiği belirlendi (Şekil 4.62).

Kanser hücreleri transferrin, folik asit, glukoz transporter, integrinler ve LDL gibi çeşitli yüzey reseptörlerini aşırı (overeksprese) sentezler. Nanopartiküllerin bu reseptörlere aktif hedeflenmesiyle kanser hücrelerinin nanopartikülleri içselleştirmesi gelecek vadetmektedir (Bhattacharjee ve ark., 2010). Ancak nanopartiküllerin ligandlara hedeflenmesi sadece istenilen bölgeye gitmesini arttırırken iyi bir şekilde içselleştirileceği anlamına gelmez. Bazen ligandlara hedefleme nanopartiküllerin periferik kanser hücrelerine yüksek afinite ile bağlanmasını sağlar ki bu diğer nanopartiküllerin hücreye penetre olmasını engelleyen “bağlanma bariyeri”nin oluşmasına neden olmaktadır. Heparan sülfat zincirlerine hedeflenmiş hücre-penetre peptitlerinin (CCP) kullanıldığı bir çalışma sonucunda nanopartikülün hücre içine alınmasında artış olmamış ve membranda önemli bir kümelenmeye neden olmuştur (Verdurmen ve ark., 2013). Dolayısıyla bu tezde sentezlediğimiz nanopartiküller pasif hedefleme gerçekleştirilerek kanser hücrelerinin nanopartikülleri içselleştirilmesi amaçlandı.

İçselleşme olduğunda, nanopartikülün yükünü boşaltması için hücre içine ulaşması gerekmektedir. Bunun için endozomal araçların nanopartikülü golgi, endoplazmik retikulum, çekirdek, mitokondri ve lizozom gibi çeşitli hücre içi bölgelerine iletmesi gerekmektedir. Kapsüle ilaçların iletilmesi ise hücre içi ilaç dağıtımı ile aynı temeli

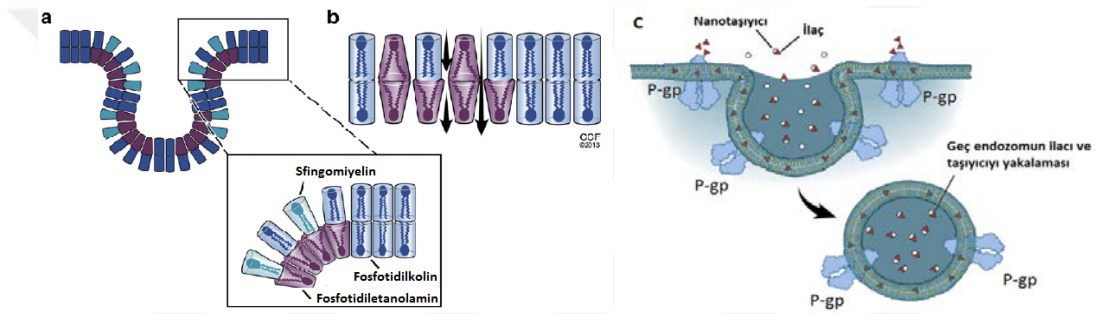
oluşturur (Trowbridge ve ark., 1993). Klatrin bağımlı endositoz, kaveolin bağımlı endositoz, makropinositoz ve fagositoz gibi birçok yolak ve proses endositoza aracılık eder. Böylelikle farklı nanopartiküller hücre tarafından içselleştirilir (Şekil 5.3) (Sahay ve ark., 2010).



Şekil 5.3. Nanopartiküllerin hücre içine alınma mekanizmaları (Sriraman ve ark., 2014).

Son yapılan çalışmalar membran lipidlerinin endositoz ve farklı membran iletim mekanizmalarında rol olarak nanopartikül tabanlı ilaç iletim sistemlerinin hücre içine alınımını etkilemesi üzerine odaklanmıştır (Ewersve Helenius, 2011). Endozomlar lipidlerin biyofiziksel özelliklerine göre membrana bağlı veziküller olarak sınıflandırılır. Örneğin akışkan lipid membranına sahip olan endositik veziküller yenilebilir endozom olarak sınıflandırılırken, daha rijid membrana sahip olanlar ise geç endozom olarak sınıflandırılır (McMahonve Gallop, 2005). İlaç iletim perspektifi açısından membran akışkanlığı ve ilaç direnç mekanizmalarında membran lipidlerindeki değişiklikler çok önemlidir (Pallares-Trujillo ve ark., 2000; Hendrichve Michalak, 2003). Bu değişimler ilaçların ve ilaç yüklü nanopartiküllerin transport dinamiklerini etkilemektedir. Bu yüzden ilaç direncinde, etkili bir tedavi ve ilaç direncinin üstesinden gelebilen ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek için membran biyofiziği kritik bir öneme sahiptir. İlacın

serbest halde veya nanopartiküle enkapsüle edilerek uygulandığı her iki durumda da hücre içerisinde ilacın birikmesi hücre membran profili ile ilacın ve nanopartikülün membran ile etkileşimine bağlıdır. Genellikle ilaç dirençli hücreler ilacın hücre içinde birikmesini üç yolla engeller. Bunu ilacın içerisine girmesini azaltarak, ABC (ATP Binding Cassette) transfer proteinler ile ilacı dışarı atarak veya hücre içinde veziküler halde bulunan ilaç tuzaklarını kullanarak yapar. Son yapılan çalışmalarda ilaç direncinde hücre membranlarında sfingolipid ve kolesterol miktarının arttığı gözlenmiştir (Şekil-5.4a ve 4b) (Peetla ve ark., 2013).



Şekil 5.4. Lipid profiline göre membran yapısı. a) Sfingomiyelinin konsantrasyonunun fazla olduğu b) Fosfotidiletanolaminin konsantrasyonunun fazla olduğu c) Nanotaşıyıcı ve ilacın membrandan geçişleri (Peetla ve ark., 2013).

Dox'a karşı dirençli P388 hücreleri ile yapılan bir çalışmada membranda fosfotidilkolin/sfingomiyelin oranının azaldığı ve membran sınırının arttığı gösterilmiştir (Ramu ve ark., 1984). Diğer taraftan vinblastin dirençli lösemi T lenfosit hücreleri ile ilaca duyarlı hücrelerin membranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kolesterol-fosfolipid seviyelerinin yükseldiği ve protein/lipid oranının ise %60 arttığı gösterilmiştir (May ve ark., 1988). Dox'e duyarlı ve dirençli MCF-7 hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada ise Dox'in hücre membran lipidleri ve ilaç transportu ile etkileştiği gösterilmiştir. Sfingomiyelin, fosfotidilinositol, kolesterol ve kolesterol esterlerini ilaca dirençli hücrelerde daha yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Bu da membranın daha rijid bir membrana dönüşmesine neden olur (Monsky ve ark., 1999). Membranda ilaç direnci sonucunda sfingomiyelin, kolesterol ve protein oranının artmasıyla geleneksel kemoterapötik ilaçların hidrofobik membranda tutularak geçişlerinin zorlaştığı yukarıdaki çalışmalarda gösterilmiştir. Yine bu maddelerin oranlarının artmasıyla membranın yapısı Şekil 5.4a ve 4c'de görülen kaveolar yapıya dönüşür. Bu kaveolar

yapı daha sonra nanopartiküllerin içeri alınmasını sağlayan geç endozomların oluşmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak hidrofobikleşen membran hidrofobik olan antikanser ilaçların membranda yakalanmasına neden olurken, nanotaşıyıcılar ile ilacı dışarı atan ABC transfer pompalarının engeli endozomlar ile aşılabılır (Şekil 5.4c). Kanser hücrelerinin lipid membran profilindeki değişimler ve yüzey proteinlerinin ekspresyonlarındaki artışlar nedeniyle kanser hücrelerinde kaveolar yapılarının fazlalığı nanopartiküllerin kanser hücrelerine girişini artırırken normal hücrelerin membranında değişim olmadığı için azdır. Bu tezde kemoterapide kullanılan Dox'in Epo ile nanopartikül içerisine enkapsüle edilerek hücrelerde gelişen ilaç direncine olan etkilerinin NF-kB yolu aracılığı azaltıldığı bulundu (Şekil 4.70 ve 71). Normal hücrelerde Epo içeren nanopartiküller grubunda sitozolik NF-kB miktarında artış olmazken meme kanseri hücrelerinde artış olduğu bulundu. Bu aynı zamanda Epo içeren nanopartiküllerin hücre içerisine girdiğini gösterdi.

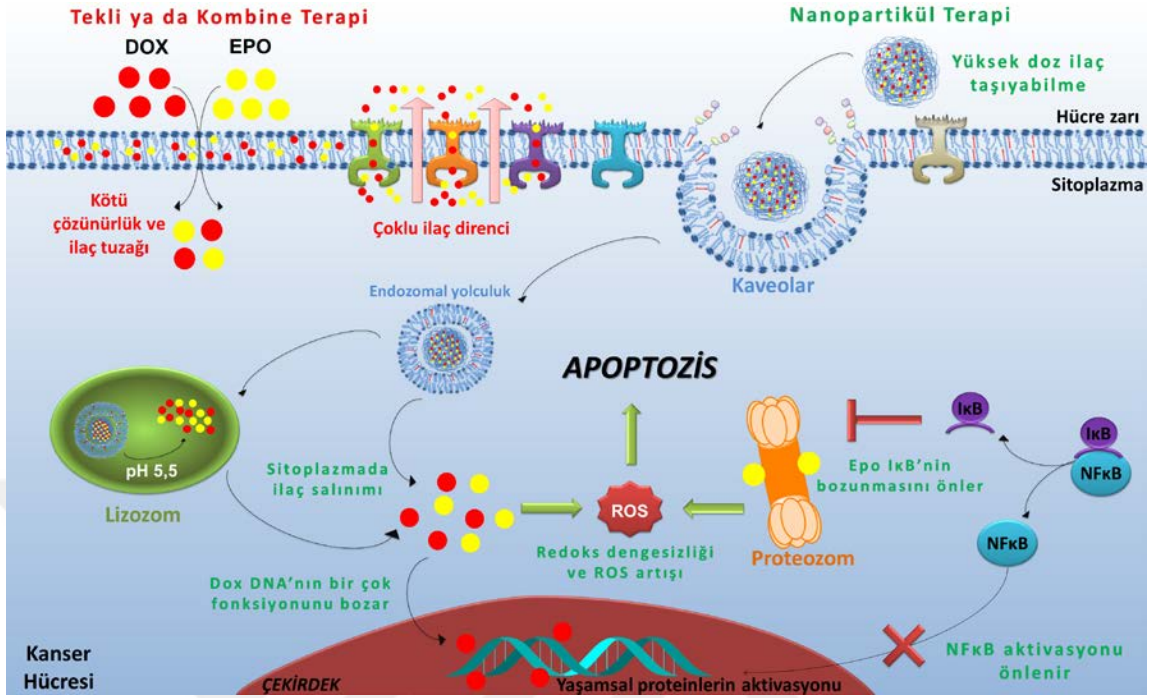
Proteozom, lizozom dışı protein degradasyonunun hücresel ana makinasıdır. Düzenli gen transkripsiyonu ve translasyonu birlikte, düzenli proteozomal aktivite hücrenin protein seviyelerinin belirlenmesinde önemlidir. Proteozomal aktivitenin fizyolojik olarak düzenli olması, hücre içi proteom bileşimini geniş bir şekilde etkiler ve hücre çoğalmasının, farklılaşmasının, hayatta kalmasının ve apoptozisinin düzenlenmesini sağlar (Brancolini, 2008; Konstantinova ve ark., 2008). Meme kanseri hücreleri ile yapılmış olan bir çalışmada, bir proteozom inhibitörü olan bortezomib'in Dox ile kombinasyonunun MKP-1 protein seviyelerini azalttığı ve JNK aktivasyonunu artırarak hücrelerin apoptozise gitmesine neden olduğu gösterilmiştir (Small ve ark., 2004). Yine meme kanseri hücrelerinde yapılmış başka bir çalışmada ise, MG132 ile yapılan proteozom inhibisyonunun GSK-3 β 'ya bağlı otofaji aktivasyonuna sebep olarak hücrelerin öldüğü gösterilmiştir (Gavilan ve ark., 2013). Ancak bu iki çalışmada ilaçlar bir nanopartiküle enkapsüle edilmeden sistemik olarak verilmiştir. MG132, 26S proteozom kompleksinin proteolitik aktivitesini etkin bir şekilde engelleyen bir peptid aldehittir ve kimotriptik benzeri aktivitenin potansiyel bir inhibitörü gibi davranır. Osteosarkom, küçük hücreli akciğer kanseri ve lenfoma hücrelerini de içeren çeşitli tümör hücrelerinde, MG132'nin etkin bir şekilde apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Bang ve ark., 2004; Kabore ve ark., 2006; Yan ve ark., 2007). Bu tezde proteozom

inhibitörü olarak kullandığımız kanser hücrelerinde Epo'de apoptozisi uyardığını hem flow sitometri hem de TUNEL yöntemi ile gösterildi (Şekil 4.74,77,79 ve 90). Serbest halde verilen ilaçların hem normal hem de kanser hücrelerini apoptozise götürdü. Serbest ilaçların kombine uygulaması da normal hücelere olan toksik etkiyi düşüktü olsa azaltmıştır. Ama meme kanseri hücrelerinde toksik etkiyi çokta arttırmamıştır. Ancak nanopartikül ile her iki ilacın kapsüle edilmesi normal hücelere olan apoptotik etkiyi neredeyse yokken meme kanseri hücrelerinde ise yarısı apoptozise uğradı. Flow sitometrisiyle serbest ilaçların ve Dox+Epo-Np'ün HUVEC ve MCF-7 üzerindeki etkisi (Şekil 4.78). TUNEL yönteminde ise şekil 4.101'de gösterildi.

MG132'nin ROS aracılığıyla birçok tümör hücresinde apoptozisi uyardığı rapor edilmiştir (Qiu ve ark., 2000; Wu ve ark., 2002; Bang ve ark., 2004). Bu tezde de kullanılan her iki ilaç da ROS'u aktive ettiği DCFH-DA yöntemiyle bulundu (Şekil 4.68). Serbest ilaçlarda her iki hücre içinde ROS artarken, nanopartikül olan gruplarda normal hücelerde ROS azalırken, meme kanseri hücrelerinde ROS arttı. MG132, NFκB'nin bir inhibitörü olarak da bilinmektedir ve NFκB'nin aktivasyonunun baskılanması sonucunda anti-apoptotik Bcl-2 ve MDR1 ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Bentires-Alj ve ark., 2003; Fujita ve ark., 2005; Yang ve ark., 2005). Antikanser ilaçlar tarafından uyarılan apoptozise karşı tümör hücrelerinde ABC transfer proteinlerinin ekspresyonunun artması, MDR oluşmasının en önemli nedenidir (Schmitt, 2003; Higgins, 2007). Gastrik kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada; proteozom inhibitörü olan MG132'nin vinkristin kemoterapötik ilacına karşı gelişen ilaç direncini azaltarak kanser hücrelerini apoptozise yönelttiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008). K562/DNR hücrelerinde bortezomib ile yapılan çalışmada ise NF Kappa B aracılığıyla P-gp seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2012). Bortezomib'in (PS341) ve MG132 ile yapılan çalışmada doksorubisine ve paklitaksele dirençli olan meme kanseri hücrelerinde P-gp seviyelerinin, proteozom inhibitörleri ile azaltıldığı gösterilmiştir (Fujita ve ark., 2005). MG132, bortezomib gibi bir proteozom inhibitörü olan epoksomisin kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım sunmaktadır (Rajkumar ve ark., 2005). Doğal selektif bir proteozom inhibitörü olan Epo *in vivo* anti-inflamatuar etkisi iyi bilinmektedir. Bir Epo türevi olan proteozom inhibitörü Cafilzomib 2012 yılında FDA onayı almıştır ve nüks eden dirençli multiple myeloma hastalarının tedavisinde

kullanılmaktadır (McCormack, 2012; Thompson, 2013). Ancak şu ana kadar literatürde Epo meme kanserinde ilaç dirençliliğine olan etkisi ile ilgili bilgi mevcut değildir. Dolayısıyla bu tezde proteozom inhibitörü olan Epo meme kanserinde NF-κB aktivasyonu engellenerek ilaç direncinin azaltıldığı bulundu.

Meme kanseri hücreleri ile yapılmış olan bir çalışmada, bir proteozom inhibitörü olan bortezomib'in Dox ile kombinasyonunun MKP-1 protein seviyelerini azalttığı ve JNK aktivasyonunu artırarak hücrelerin apoptoze gitmesine neden olduğu gösterilmiştir (Small ve ark., 2004). Yine meme kanseri hücrelerinde yapılmış başka bir çalışmada ise, MG132 ile yapılan proteozom inhibisyonunun GSK-3β'ya bağılı otofaji aktivasyonuna sebep olarak hücrelerin öldüğü gösterilmiştir (Gavilan ve ark., 2013). Ancak bu iki çalışmada ilaçlar bir nanopartiküle enkapsüle edilmeden sistemik olarak verilmiştir. şu ana kadar nanopartikül olarak hazırlanmış ve klinik uygulama aşamasına geçmiş ilaç kombinasyonu bulunmamaktadır. Ancak ilaç direncinin engellenmesi için çalışmalar devam etmektedir. Bir çalışmada Dox'e karşı dirençli olan meme kanseri hücrelerinde dokasahekzanoik asit ile lipid nanopartikül hazırlanmış ve Dox'e karşı ilaç direnci dokasahekzanoik asit nanopartikülü ile azaltılarak daha iyi bir sitotoksite elde edilmiştir (Mussi ve ark., 2014). Nanopartikül terapisinin serbest halde tekli ya da kombine uygulamaya olan üstünlükleri şekil 5.5'de özetlendi. Bu tezde Dox ile Epo'ı nanopartikül içerisine enkapsüle ederek; ilaç direncinin azaltıldığı, ilaçların etkinliğinin artırıldığı ve normal hücrelere daha az sitotoksik olduğu bulundu.



Şekil 5.5. Tezin şekilsel olarak özeti.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Partikül büyüklüğü dağılımını ifade eden polidispersite indeksi (PDI) değeri tüm partikül formülasyon grubunda da 0,034-0,075 aralığındadır. Partikül büyüklüğü ise 144,9-179,6 nm arasında değişmektedir. Bu boyutlar klinik uygulamalar için hedeflenen 100-200 nm arasında nanopartiküller sentezlendiğini göstermektedir.
2. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin ise – 9,51 mV, – 11,3 mV değerleri arasında olduğu bulundu. Bu potansiyel değerleri nanopartiküllerin aglomere olamayacağı bir potansiyeldir ve klinik uygulamalar için idealdir.
3. Nanopartiküllerin SEM görüntüleri Image J yazılım programının ile analiz edildi. Partikül boyutlarının zetasizer ile ölçülen boyutlara yakın olduğu ancak ortalama değerlerinin biraz daha yüksek olduğu bulundu. Problemin ise 5µm ölçeğinde fotoğraflar olmasından kaynaklanan bir çözünürlük hatası olduğu, bunun için 1µm veya daha az ölçekde fotoğraflar çekilebileceği düşünüldü.
4. Nanopartiküllerin ATR-FTIR Spektroskopi analizi sonucunda PLGA nanopartikülleri içerisine Dox ve/veya Epo girdiği belirlendi. İlaçların PLGA ile etkileşerek PLGA'ya spesifik piklerde kaybolmalar görüldü. İlaçların düşük konsantrasyonlarda olmasından dolayı yükleme sırasında ilaç olan gruplarda pik değişimleri keskin olmadı. Ancak ilaçların etken dozları mikrogram ve nanogram mertebesinde olduğu için sitotoksosite de problem yaşanmadı.
5. Nanopartiküllerin DSC ile karakterizasyonu sonucunda nanopartiküllerin içine Dox ve/veya Epo ilaçlarının disperse olduğu bulundu. Ayrıca, ilaçların camsı geçişkenlik bölgesinde endotermik piklerin yüklenen ilaca göre farklılık gösterdi.
6. Nanopartiküllerin TGA sonucunda bozunma sıcaklık (T_d) değerleri ölçüldü. İlk bozunma sıcaklığında Dox ve/veya Epo gruplarında yüzde kütle değişim farkları görüldü.
7. Her iki ilaç da hidrofobik özellikte ilaçlar olduğundan dolayı amfipatik bir molekül olan PLGA içerisine yüksek oranda enkapsüle edildi.

8. Salınım çalışmalarında pH=7,4 fizyolojik pH durumunda nanopartiküllerden salınımlarını, pH=5,5'da ise hücre içine giren nanopartiküllerin lizozomal pH'daki salınımlarını temsil etmektedir. Oluşturduğumuz *in vitro* ortamda fizyolojik pH'da salınım yavaş ve düşük konsantrasyonda, lizozomal ortamda ise hızlı ve yüksek konsantrasyonda olduğu belirlendi.
9. HUVEC ve MCF-7 hücrelerine sitotoksik etkinliğin belirlenmek amacıyla hem serbest ilaçların hem de nanopartikül gruplarının IC₅₀ dozları hesaplandı. Hiç ilaç yüklü olmayan nanopartikülün normal hücreler yüksek dozlarda bile toksik olmadığı bulundu.
10. Dox+Epo-Np gruplarında M-IC₅₀ dozu kanser hücrelerine toksik, normal hücrelere toksik değildir.
11. Dox'in floresans özelliğinden yararlanarak hücre içine giren Dox miktarı belirlendi. Dox ve Epo içeren nanopartikül grubunda HUVEC'lere göre MCF-7 hücrelerinden 2,5 kat kadar az Dox girdiği bulundu.
12. Epo'in doz bağımlı olarak proteozom inhibisyonu yapıp yapmadığı her iki hücre hattında da belirlendi. Her iki hücre hattında da Epo'nin 100 ng/ml'lik konsantrasyonu proteozom aktivitesini inhibe ettiği görüldü.
13. HUVEC'lerde Epo içeren nanopartikül gruplarında proteozom inhibisyon %10-15 seviyelerindedir.
14. MCF-7 hücrelerinde Epo içeren nanopartikül gruplarında proteozom inhibisyon %30-35 seviyelerindedir.
15. Epo-Np, Dox-Np ve Dox+Epo-Np gruplarındaki ROS miktarı HUVEC'lere MCF-7 hücrelerinde daha fazla olduğu bulundu.
16. MCF-7 hücrelerinde hem Epo-Np hem de Dox+Epo-Np gruplarında NF-κB miktarındaki artış nanopartiküllerin içeriye girdiğini ve proteozom inhibisyonu yaparak NF-κB'nin inhibitörü olan Iκ-Bα'nin degradasyonunu önleyerek NF-κB'nin sitozolde kalmasını sağladı.

- 17.** Flow sitometrisinde HUVEC'lerde serbest Dox ve Epo içeren gruplarda apoptozis gözlenirken Dox+Epo-Np grubunda apoptozis gerçekleşemeyerek hücreler canlı kalmıştır.
- 18.** Flow sitometrisinden MCF-7 hücrelerinde nanopartikül ile kombine uygulama kanser hücrelerinin apoptozisten kaçamadığını ve öldüğü görüldü.
- 19.** Klinik uygulamalar için Dox ve Epo'in nanopartiküle kombine edilerek uygulanması HUVEC'lerde apoptozis oranı % 8 civarındayken, MCF-7 hücrelerinde ise bu oran % 45 seviyelerine çıktı.
- 20.** TUNEL boyamasında HUVEC'lerde serbest ilaçların büyük oranda sitotoksik olduğu görüldü.
- 21.** TUNEL boyamasında HUVEC'lerde Free-Np biyouyumlu olduğu ve sitotoksik olmadığı görüldü.
- 22.** TUNEL boyamasında HUVEC'lerin serbest ilaç olan gruplarında apoptotik indekste önemli bir artış olduğu görüldü. Ancak kombine nanopartikül olan Dox+Epo-Np grubunda apoptotik indeksin kontrolle aynı olduğu görüldü.
- 23.** TUNEL boyamasında MCF-7 hücrelerinin kombine nanopartikül olan Dox+Epo-Np grubunda apoptotik indeksin serbest Dox ile aynı olduğu ve kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü.

KAYNAKLAR

Ahmed K M, Cao N, Li J J HER-2 and NF-kappa B as the targets for therapy-resistant breast cancer *Anticancer Research* 2006; 26: 4235-4243.

Ashkenazi A, Dixit V M Death receptors: Signaling and modulation *Science* 1998; 281: 1305-1308.

Bang J H, Han E S, Lim I, Lee C S Differential response of MG132 cytotoxicity against small cell lung cancer cells to changes in cellular GSH contents *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 659-666.

Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville M P, Bours V NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells *Oncogene* 2003; 22: 90-97.

Berry D A, Parmigiani G Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history - Response *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89: 1634-1634.

Bhattacharjee H, Balabathula P, Wood G C Targeted nanoparticulate drug-delivery systems for treatment of solid tumors: a review *Ther Deliv* 2010; 1: 713-734.

Biganzoli L, Minisini A, Aapro M, Di Leo A Chemotherapy for metastatic breast cancer *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16: 37-41.

Biswas D K, Iglehart J D Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF-kappa B) signaling in breast cancer *Journal of Cellular Physiology* 2006; 209: 645-652.

Biswas S, Torchilin V P Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 66: 26-41.

Blatt N B, Glick G D Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2001; 9: 1371-1384.

Brancolini C Inhibitors of the Ubiquitin-Proteasome System and the cell death machinery: How many pathways are activated? *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1: 24-37.

Bratton D L, Fadok V A, Richter D A, Kailey J M, Guthrie L A, Henson P M Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 26159-26165.

Byrne J D, Betancourt T, Brannon-Peppas L Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1615-1626.

Carmody R J, Cotter T G Signalling apoptosis: a radical approach *Redox Report* 2001; 6: 77-90.

Chabner B A, Ryan D P, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Calabresi P. Chemotherapy of Neoplastic Diseases. In: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, USA. 2001: 1426-1428.

Chandra J, Samali A, Orrenius S Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29: 323-333.

Chauhan D, Hideshima T, Mitsiades C, Richardson P, Anderson K C Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma *Molecular Cancer Therapeutics* 2005; 4: 686-692.

Chen K L, Bothun G D Nanoparticles meet cell membranes: probing nonspecific interactions using model membranes *Environ Sci Technol* 2014; 48: 873-880.

Chrastina A, Massey K A, Schnitzer J E Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2011; 3: 421-437.

Cottin Y, Ribouot C, Maupoil V, Godin D, Arnould L, Brunotte F, Rochette L Early Incidence of Adriamycin Treatment on Cardiac Parameters in the Rat *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1994; 72: 140-145.

Couch F J, DeShano M L, Blackwood M A, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber B L, Jablon L, Cobleigh M A, Hoskins K, Garber J E BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer *New England Journal of Medicine* 1997; 336: 1409-1415.

Creixell M, Peppas N A Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance *Nano Today* 2012; 7: 367-379.

Cummings M C, Winterford C M, Walker N I Apoptosis *American Journal of Surgical Pathology* 1997; 21: 88-101.

Curtin J F, Cotter T G Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis *Cellular Signalling* 2003; 15: 983-992.

Darby S C, McGale P, Taylor C W, Peto R Long-term mortality from heart disease and lung cancer after radiotherapy for early breast cancer: prospective cohort study of about 300 000 women in US SEER cancer registries *Lancet Oncology* 2005; 6: 557-565.

Delhaye M, Merlin J C [Introduction to Raman spectrometry] *Biochimie* 1975; 57: 401-415.

Dull R O, Dinavahi R, Schwartz L, Humphries D E, Berry D, Sasisekharan R, Garcia J G Lung endothelial heparan sulfates mediate cationic peptide-induced barrier dysfunction: a new role for the glycocalyx *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L986-995.

Ekbom A, Hsieh C C, Lipworth L, Adami H O, Trichopoulos D Intrauterine environment and breast cancer risk in women: A population-based study *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89: 71-76.

Elmore S Apoptosis: A review of programmed cell death *Toxicologic Pathology* 2007; 35: 495-516.

Esteva F J, Valero V, Puzstai L, Boehnke-Michaud L, Buzdar A U, Hortobagyi G N
Chemotherapy of metastatic breast cancer: what to expect in 2001 and beyond
Oncologist 2001; 6: 133-146.

Ewers H, Helenius A Lipid-mediated endocytosis *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;
3: a004721.

Ficek B J, Peppas N A Novel Preparation of Poly(Vinyl Alcohol) Microparticles without
Cross-Linking Agent for Controlled Drug-Delivery of Proteins *Journal of Controlled
Release* 1993; 27: 259-264.

Fostier K, De Becker A, Schots R Carfilzomib: a novel treatment in relapsed and
refractory multiple myeloma *Oncotargets and Therapy* 2012; 5: 237-244.

Freitas C, Muller R H Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN (TM)) *European
Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1998; 46: 145-151.

Fujita T, Washio K, Takabatake D, Takahashi H, Yoshitomi S, Tsukuda K, Ishibe Y,
Ogasawara Y, Doihara H, Shimizu N Proteasome inhibitors can alter the signaling
pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *Int J Cancer*
2005; 117: 670-682.

Gariboldi M B, Ravizza R, Riganti L, Meschini S, Calcabrini A, Marra M, Arancia G,
Dolfini E, Monti E Molecular determinants of intrinsic resistance to doxorubicin in
human cancer cell lines *Int J Oncol* 2003; 22: 1057-1064.

Gavilan E, Sanchez-Aguayo I, Daza P, Ruano D GSK-3beta signaling determines
autophagy activation in the breast tumor cell line MCF7 and inclusion formation in the
non-tumor cell line MCF10A in response to proteasome inhibition *Cell Death Dis*
2013; 4: e572.

Geels P, Eisenhauer E, Bezjak A, Zee B, Day A Palliative effect of chemotherapy:
objective tumor response is associated with symptom improvement in patients with
metastatic breast cancer *J Clin Oncol* 2000; 18: 2395-2405.

Glickman M H, Ciechanover A The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction *Physiological Reviews* 2002; 82: 373-428.

Groep P, Wall, E., Diest, P. Pathology of Hereditary Breast Cancer *Cell Oncology* 2011; 34: 71-88.

Guchelaar H J, Vermes A, Vermes I, Haanen C Apoptosis: Molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy *Pharmacy World & Science* 1997; 19: 119-125.

Haddad J J Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment *International Immunopharmacology* 2004; 4: 475-493.

Haley B, Frenkel E Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* 2008; 26: 57-64.

Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, Yamamoto H, Konishi M, Oki T Epoxomicin, a New Antitumor Agent of Microbial Origin *Journal of Antibiotics* 1992; 45: 1746-1752.

Hendrich A B, Michalak K Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells *Curr Drug Targets* 2003; 4: 23-30.

Hetschko H, Voss V, Seifert V, Prehn J H M, Kogel D Upregulation of DR5 by proteasome inhibitors potently sensitizes glioma cells to TRAIL-induced apoptosis *Febs Journal* 2008; 275: 1925-1936.

Hideg K, Kalai T Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity *Cardiovascular Toxicology* 2007; 7: 160-164.

Higgins C F Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters *Nature* 2007; 446: 749-757.

Hortobagyi G N Anthracyclines in the treatment of cancer - An overview *Drugs* 1997; 54: 1-7.

Hsieh C C, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S Age at Menarche, Age at Menopause, Height and Obesity as Risk-Factors for Breast-Cancer - Associations and Interactions in an International Case-Control Study *International Journal of Cancer* 1990; 46: 796-800.

Hu F Q, Qiao T, Xie X, Hu R, Xiao H B Knockdown of the Inflammatory Factor Pentraxin-3 Suppresses Growth and Invasion of Lung Adenocarcinoma through the Akt and Nf-Kappa B Pathways *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2014; 28: 649-657.

Humber C E, Tierney J F, Symonds R P, Collingwood M, Kirwan J, Williams C, Green J A Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration *Ann Oncol* 2007; 18: 409-420.

Hung R W Y, Chow A W Dissecting the "end game": clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis *Clinical and Investigative Medicine-Medecine Clinique Et Experimentale* 2004; 27: 324-344.

Hunot S, Flavell R A Apoptosis - Death of a monopoly? *Science* 2001; 292: 865-866.

Ikkala O, ten Brinke G Hierarchical self-assembly in polymeric complexes: Towards functional materials *Chemical Communications* 2004; 2131-2137.

Jaeghere F D, Doelker E, Gurny R. *Encyclopedia of controlled drug delivery*. New York, Wiley 1999.

Jahanshahi M, Babaei Z Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles *African Journal of Biotechnology* 2008; 7: 4926-4934.

Jain D Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives *Journal of Nuclear Cardiology* 2000; 7: 53-62.

Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mader K Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by

photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy *Journal of Controlled Release* 2004; 95: 217-227.

Kabore A F, Sun J, Hu X, McCrea K, Johnston J B, Gibson S B The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells *Apoptosis* 2006; 11: 1175-1193.

Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells *Front Pharmacol* 2014; 5: 159.

Karin M The beginning of the end: I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B activation *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 27339-27342.

Kaş S H. İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. *Kontrollü Salım Sistemleri*. A. Z. Gürsoy. İstanbul, *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*. 2002: 65-102.

Kawashima Y, Niwa T, Handa T, Takeuchi H, Iwamoto T, Itoh K Preparation of Controlled-Release Microspheres of Ibuprofen with Acrylic Polymers by a Novel Quasi-Emulsion Solvent Diffusion Method *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1989; 78: 68-72.

Kiechle F L, Zhang X B Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications *Clinica Chimica Acta* 2002; 326: 27-45.

Kim T H, Shin Y J, Won A J, Lee B M, Choi W S, Jung J H, Chung H Y, Kim H S Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 615-625.

Koceva-Chyla A, Jedrzejczak M, Skierski J, Kania K, Jozwiak Z Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation *Apoptosis* 2005; 10: 1497-1514.

Konstantinova I M, Tsimokha A S, Mittenberg A G Role of proteasomes in cellular regulation *Int Rev Cell Mol Biol* 2008; 267: 59-124.

Kruper L, Holt A, Xu X X, Duan L, Henderson K, Bernstein L, Ellenhorn J Disparities in Reconstruction Rates After Mastectomy: Patterns of Care and Factors Associated with the Use of Breast Reconstruction in Southern California *Annals of Surgical Oncology* 2011; 18: 2158-2165.

Kucuksayan E, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel S G, Ozben T N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors *J Cell Biochem* 2013; 114: 1685-1694.

Kucuksayan E, Konuk E K, Demir N, Mutus B, Aslan M Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells *Free Radic Biol Med* 2014; 72: 113-123.

Kumari A, Yadav S K, Yadav S C Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2010; 75: 1-18.

Lal S, Mahajan A, Chen W N, Chowbay B Pharmacogenetics of Target Genes Across Doxorubicin Disposition Pathway: A Review *Current Drug Metabolism* 2010; 11: 115-128.

Lee D H, Goldberg A L Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists *Trends in Cell Biology* 1998; 8: 397-403.

Lee Y, Shacter E Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 19792-19798.

Li J K, Wang N, Wu X S Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery *Journal of Controlled Release* 1998; 56: 117-126.

Li T M, Danelisen I, Bello-Klein A, Singal P K Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats Cardiovascular Research 2000; 46: 523-530.

Lin Y C, Brown K, Siebenlist U Activation of Nf-Kappa-B Requires Proteolysis of the Inhibitor I-Kappa-Alpha - Signal-Induced Phosphorylation of I-Kappa-B-Alpha Alone Does Not Release Active Nf-Kappa-B Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1995; 92: 552-556.

Ling J, Kumar R Crosstalk between NFkB and glucocorticoid signaling: A potential target of breast cancer therapy Cancer Letters 2012; 322: 119-126.

Lipshultz S E, Cohen H, Colan S D, Herman E H The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity Leukemia & Lymphoma 2006; 47: 1454-1458.

Liu P L, Tsai J R, Hwang J J, Chou S H, Cheng Y J, Lin F Y, Chen Y L, Hung C Y, Chen W C, Chen Y H, Chong I W High-Mobility Group Box 1-Mediated Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Contributes to Tumor Cell Invasiveness American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2010; 43: 530-538.

Lown J W Anthracycline and Anthraquinone Anticancer Agents - Current Status and Recent Developments Pharmacology & Therapeutics 1993; 60: 185-214.

May G L, Wright L C, Dyne M, Mackinnon W B, Fox R M, Mountford C E Plasma membrane lipid composition of vinblastine sensitive and resistant human leukaemic lymphoblasts Int J Cancer 1988; 42: 728-733.

McCormack P L Carfilzomib In Relapsed, or Relapsed and Refractory, Multiple Myeloma Drugs 2012; 72: 2023-2032.

McCormack P L Carfilzomib: in relapsed, or relapsed and refractory, multiple myeloma Drugs 2012; 72: 2023-2032.

McMahon H T, Gallop J L Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling *Nature* 2005; 438: 590-596.

McNeil C In search of the perfect SERM: Beyond tamoxifen and raloxifene *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90: 956-957.

Meng L H, Mohan R, Kwok B H B, Elofsson M, Sin N, Crews C M Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 10403-10408.

Min K J, Lee J T, Joe E H, Kwon T K An I kappa B alpha phosphorylation inhibitor induces heme oxygenase-1(HO-1) expression through the activation of reactive oxygen species (ROS)-Nrf2-ARE signaling and ROS-PI3K/Akt signaling in an NF-kappa B-independent mechanism *Cellular Signalling* 2011; 23: 1505-1513.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185-229.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity *Pharmacological Reviews* 2004; 56: 185-229.

Monsky W L, Fukumura D, Gohongi T, Ancukiewicz M, Weich H A, Torchilin V P, Yuan F, Jain R K Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor *Cancer Res* 1999; 59: 4129-4135.

Muller R H, Mader K, Gohla S Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50: 161-177.

Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA

and PLA polymers for preparation of nanoparticles Powder Technology 2000; 107: 137-143.

Mussi S V, Sawant R, Perche F, Oliveira M C, Azevedo R B, Ferreira L A, Torchilin V P Novel Nanostructured Lipid Carrier Co-Loaded with Doxorubicin and Docosahexaenoic Acid Demonstrates Enhanced in Vitro Activity and Overcomes Drug Resistance in MCF-7/Adr Cells Pharm Res 2014.

Nagy K, Szekely-Szuts K, Izeradjene K, Douglas L, Tillman M, Barti-Juhasz H, Dominici M, Spano C, Cervo G L, Conte P, Houghton J A, Mihalik R, Kopper L, Petak I Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria Pathology & Oncology Research 2006; 12: 133-142.

Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Allemann E Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin (TM) for active targeting European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 58: 483-490.

Organization W H. Guidelines for Management of Breast Cancer, EMRO Tehnical Publication Series.2006.

Pagano M Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway Faseb Journal 1997; 11: 1067-1075.

Pallares-Trujillo J, Lopez-Soriano F J, Argiles J M Lipids: A key role in multidrug resistance? (Review) Int J Oncol 2000; 16: 783-798.

Panyam J, Zhou W Z, Prabha S, Sahoo S K, Labhasetwar V Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery Faseb Journal 2002; 16.

Park K Nanotechnology: What it can do for drug delivery Journal of Controlled Release 2007; 120: 1-3.

Peetla C, Vijayaraghavalu S, Labhasetwar V Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 1686-1698.

Phillips K A Current perspectives on BRCA1- and BRCA2-associated breast cancers *Internal Medicine Journal* 2001; 31: 349-356.

Pierce B L, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner R N, Neuhaus M L, Wener M H, Baumgartner K B, Gilliland F D, Sorensen B E, McTiernan A, Ulrich C M Elevated Biomarkers of Inflammation Are Associated With Reduced Survival Among Breast Cancer Patients *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: 3437-3444.

Pignatello R, Bucolo C, Spedalieri G, Maltese A, Puglisi G Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application *Biomaterials* 2002; 23: 3247-3255.

Pike M C, Henderson B E, Casagrande J T, Rosario I, Gray G E Oral-Contraceptive Use and Early Abortion as Risk-Factors for Breast-Cancer in Young-Women *British Journal of Cancer* 1981; 43: 72-76.

Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward R L, Kohn K W Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks *Oncogene* 2004; 23: 2934-2949.

Qaddoumi M G, Gukasyan H J, Davda J, Labhasetwar V, Kim K J, Lee V H Clathrin and caveolin-1 expression in primary pigmented rabbit conjunctival epithelial cells: role in PLGA nanoparticle endocytosis *Mol Vis* 2003; 9: 559-568.

Qiu J H, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons *J Neurosci* 2000; 20: 259-265.

Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1998; 24: 1113-1128.

Quintanar-Guerrero D, Tamayo-Esquivel D, Ganem-Quintanar A, Allemann E, Doelker E Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 26: 211-218.

Rabanel J M, Aoun V, Elkin I, Mokhtar M, Hildgen P Drug-loaded nanocarriers: passive targeting and crossing of biological barriers *Curr Med Chem* 2012; 19: 3070-3102.

Rajkumar S V, Richardson P G, Hideshima T, Anderson K C Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 630-639.

Rajkumar S V, Richardson P G, Hideshima T, Anderson K C Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer *J Clin Oncol* 2005; 23: 630-639.

Ramu A, Glaubiger D, Weintraub H Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and -resistant P388 cells *Cancer Treat Rep* 1984; 68: 637-641.

Reid M B Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2005; 288: R1423-R1431.

Rejman J, Oberle V, Zuhorn I S, Hoekstra D Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis *Biochem J* 2004; 377: 159-169.

Riddick D S, Lee C, Ramji S, Chinje E C, Cowen R L, Williams K J, Patterson A V, Stratford I J, Morrow C S, Townsend A J, Jounaidi Y, Chen C S, Su T, Lu H, Schwartz P S, Waxman D J Cancer chemotherapy and drug metabolism *Drug Metabolism and Disposition* 2005; 33: 1083-1096.

Robert J, Gianni L Pharmacokinetics and Metabolism of Anthracyclines *Cancer Surveys* 1993; 17: 219-252.

Roses F D. *Breast Cancer*. Philadelphia, Elsevier. 2005: 3-29.

Rosner B, Colditz G A, Willett W C Reproductive Risk-Factors in a Prospective-Study of Breast-Cancer - the Nurses Health Study *American Journal of Epidemiology* 1994; 139: 819-835.

Ruiz de Almodovar C, Ruiz-Ruiz C, Munoz-Pinedo C, Robledo G, Lopez-Rivas A The differential sensitivity of Bcl-2-overexpressing human breast tumor cells to TRAIL or doxorubicin-induced apoptosis is dependent on Bcl-2 protein levels *Oncogene* 2001; 20: 7128-7133.

Sahay G, Alakhova D Y, Kabanov A V Endocytosis of nanomedicines *J Control Release* 2010; 145: 182-195.

Schimmel K J M, Richel D J, van den Brink R B A, Guchelaar H J Cardiotoxicity of cytotoxic drugs *Cancer Treatment Reviews* 2004; 30: 181-191.

Schmitt C A Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 286-295.

Schmitt M, Mengele K, Napieralski R, Magdolen V, Reuning U, Gkazepis A, Sweep F, Brunner N, Foekens J, Harbeck N Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1 *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2010; 10: 1051-1067.

Shacter E, Williams J A, Hinson R M, Senturker S, Lee Y Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis *Blood* 2000; 96: 307-313.

Shao C L, Folkard M, Held K D, Prise K M Estrogen enhanced cell-cell signalling in breast cancer cells exposed to targeted irradiation *Bmc Cancer* 2008; 8.

Sharma A, Jain N, Sareen R Nanocarriers for diagnosis and targeting of breast cancer *Biomed Res Int* 2013; 2013: 960821.

Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: Insights from the MCF-7 cell model system *Experimental Biology and Medicine* 2003; 228: 995-1003.

Singal P, Li T M, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation *Molecular and Cellular Biochemistry* 2000; 207: 77-86.

Singletary S E, Allred C, Ashley P, Bassett L W, Berry D, Bland K I, Borgen P I, Clark C G, Edge S B, Hayes D F, Hughes L L, Hutter R V P, Morrow M, Page D L, Recht A, Theriault R L, Thor A, Weaver D L, Wieand H S, Greene F L Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 3628-3636.

Sinha R, Kim G J, Nie S, Shin D M Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1909-1917.

Small G W, Shi Y Y, Edmund N A, Somasundaram S, Moore D T, Orlowski R Z Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role *Mol Pharmacol* 2004; 66: 1478-1490.

Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Perez de Santos A M, Llobet D, Schoenenberger J A, Casanova J M, Soria X, Egido R, Llombart A, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti R M Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines *British Journal of Dermatology* 2008; 158: 496-504.

Spataro V, Norbury C, Harris A L The ubiquitin-proteasome pathway in cancer *British Journal of Cancer* 1998; 77: 448-455.

Sriraman S K, Aryasomayajula B, Torchilin V P Barriers to drug delivery in solid tumors *Tissue Barriers* 2014; 2: e29528.

Srivastava S, Matsuda M, Hou Z Y, Bailey J P, Kitazawa R, Herbst M P, Horseman N D Receptor activator of NF-kappa B ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 46171-46178.

Steinfort D P, Siva S, Leong T L, Rose M, Herath D, Antippa P, Ball D L, Irving L B Systematic Endobronchial Ultrasound-guided Mediastinal Staging Versus Positron Emission Tomography for Comprehensive Mediastinal Staging in NSCLC Before Radical Radiotherapy of Non-small Cell Lung Cancer: A Pilot Study *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e2488.

Suzuki F, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Matsumoto H, Shimada J, Kawase M, Sunaga K, Tsuda T, Satoh K, Sakagami H Induction of tumor-specific cytotoxicity and apoptosis by doxorubicin *Anticancer Res* 2005; 25: 887-893.

Tewes F, Munnier E, Antoon B, Okassa L N, Cohen-Jonathan S, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Souce M, Dubois P, Chourpa I Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 66: 488-492.

Thompson C B Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease *Science* 1995; 267: 1456-1462.

Thompson J L Carfilzomib: a second-generation proteasome inhibitor for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma *Ann Pharmacother* 2013; 47: 56-62.

Torchilin V P Multifunctional nanocarriers *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64, Supplement: 302-315.

Trowbridge I S, Collawn J F, Hopkins C R Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 129-161.

Tu Y Q, Chen C, Pan J R, Xu J F, Zhou Z G, Wang C Y The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2012; 5: 726-738.

Türker A, Kayaalp O. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. K. O. Ankara, Hacettepe-Tas. 2002: 380-415.

Verdurmen W P, Wallbrecher R, Schmidt S, Eilander J, Bovee-Geurts P, Fanghanel S, Burck J, Wadhvani P, Ulrich A S, Brock R Cell surface clustering of heparan sulfate proteoglycans by amphipathic cell-penetrating peptides does not contribute to uptake J Control Release 2013; 170: 83-91.

Verma A, Stellacci F Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions Small 2010; 6: 12-21.

Vermeulen K, Van Bockstaele D R, Berneman Z N Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer Annals of Hematology 2005; 84: 627-639.

Walker J, Martin C, Callaghan R Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy Eur J Cancer 2004; 40: 594-605.

Wallace K B Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy Pharmacology & Toxicology 2003; 93: 105-115.

Wang H, Wang X, Li Y, Liao A, Fu B, Pan H, Liu Z, Yang W The proteasome inhibitor bortezomib reverses P-glycoprotein-mediated leukemia multi-drug resistance through the NF-kappaB pathway Pharmazie 2012; 67: 187-192.

Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi A S, Kong D, Banerjee S, Sarkar F H Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance Drug Resist Updat 2010; 13: 109-118.

Wu D, Wu P, Zhao L F, Huang L J, Zhang Z G, Zhao S, Huang J NF-kappa B Expression and Outcomes in Solid Tumors A Systematic Review and Meta-Analysis Medicine 2015; 94.

Wu H M, Chi K H, Lin W W Proteasome inhibitors stimulate activator protein-1 pathway via reactive oxygen species production FEBS Lett 2002; 526: 101-105.

Wu W K K, Cho C H, Lee C W, Wu K C, Fan D M, Yu J, Sung J J Y Proteasome inhibition: A new therapeutic strategy to cancer treatment *Cancer Letters* 2010; 293: 15-22.

Yan X B, Yang D S, Gao X, Feng J, Shi Z L, Ye Z Caspase-8 dependent osteosarcoma cell apoptosis induced by proteasome inhibitor MG132 *Cell Biol Int* 2007; 31: 1136-1143.

Yang C H, Murti A, Pfeffer L M Interferon induces NF-kappa B-inducing kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor-dependent NF-kappa B activation to promote cell survival *J Biol Chem* 2005; 280: 31530-31536.

Yazan Y. Emülsiyon sistemler. Kontrollü salım sistemleri. A. Z. Gürsoy. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği. 2004: 273-286.

Yewdell J W Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing *Trends in Cell Biology* 2001; 11: 294-297.

Yoo H S, Choi H K, Park T G Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 90: 194-201.

Yoon M H, Yaksh T L Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the formalin test in rats *Anesthesiology* 1999; 91: 1006-1013.

Zeng Q L, Li S L, Zhou Y B, Ou W J, Cai X D, Zhang L J, Huang W L, Huang L X, Wang Q Q Interleukin-32 contributes to invasion and metastasis of primary lung adenocarcinoma via NF-kappaB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression *Cytokine* 2014; 65: 24-32.

Zhang Y, Shi Y, Li X, Du R, Luo G, Xia L, Du W, Chen B, Zhai H, Wu K, Fan D Proteasome inhibitor MG132 reverses multidrug resistance of gastric cancer through enhancing apoptosis and inhibiting P-gp *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 540-546.

Zilli M, Grassadonia A, Tinari N, Di Giacobbe A, Gildetti S, Giampietro J, Natoli C, Iacobelli S Molecular mechanisms of endocrine resistance and their implication in the therapy of breast cancer *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795: 62-81.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ertan	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Soyadı	Küçüksayan	Tel no	05062812117
Doğum tarihi	07/05/1983	e-posta	ekucuksayan@akdeniz.edu.tr

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
İlkokul	Denizli Sümer İ.O	1994
Ortaokul-Lise	Denizli Cumhuriyet Lisesi	2000
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2007
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü	2011
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü	2017

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya A.D	2008-2017

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	KPDS	75
İngilizce	ÜDS	71,25

Proje Deneyimi

Destekleyen kurum	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi
Avrupa Konseyi Projesi	Effects of Somatostatin on the fatty acid profile of human breast cancer cell membranes	1 Şubat 2016- 30 Kasım 2016
Avrupa Konseyi Projesi	Prostat Kanseri Tanı ve Takibinde Yeni Bir BiyoBelirteç Olarak Dolaşımdaki Serbest DNA. Circulating free DNA assessment to recognize novel prognostic biomarkers in prostate cancer.	09.07.2015 – 13.08.2016

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	Meme Kanseri Hücrelerinde Somatostatin Ve Vitamin C'nin Hücre Membran Lipid Profili Üzerindeki Etkileri.	2016- Devam Ediyor
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	Nanopartikül İçerisine Kapsüle Edilen Doksorubisin ve Epoksomisin Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücrelerine Olan Sitotoksik Etkileri.	2015-2017
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	Prostat Kanseri Tanı ve Takibinde Yeni Bir BiyoBelirteç Olarak Dolaşımdaki Serbest DNA.	2015-2016
Tübitak Araştırma Projesi	Glokomda Görülen Endoplazmik Retikulum Stresinde ve Nitrik Oksit Sentaz Aktivasyonunda Nötral-Sfingomyelinazın Rolünün Araştırılması.	2012-2014
Tübitak Araştırma Projesi	Devamlı Glukoz Monitörize Edici Sistem İle Değerlendirilen Tip 2 Diyabet Hastalarında Kan Glukoz Düzeylerindeki Değişikliğin Lipoprotein Alt Grup Fraksiyonlarına Etkisi.	2012-2013
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	Tip I Diabetes Mellitus'da Plazma Kolesterol Ester Transfer Proteini, Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz ve Paraoksanaz Değişimlerinin Lipoprotein Alt Grup Fraksiyonlarına Etkisi.	2010-2012
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	Testis Kanseri Hücre Dizilerinde N-Asetilsisteinin Bleomisin'inin Sitotoksitesi Üzerine Etkileri.	2009-2011
TUBITAK, Turkey-COST	Testis Kanseri, Kemoterapötiklerin, TRAIL, Oksidatif Stres ve Antioksidan Aracılı, Apoptozis, Mekanizmaları, Yolakları ve TRAIL Reseptör Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri.	2007-2010

Burslar-Ödüller:

	Alındığı Kuruluş	Yıl
<i>Kimya Bölümü İkinciliği</i>	Akdeniz Üniversitesi	2007
<i>TBD Kongresi'ne Katılım Bursu</i>	Roche	2011
<i>Poster Üçüncülük Ödülü</i>	Türk Biyofizik Derneği 25. Ulusal Biyofizik Kongresi	2013
<i>IFCC Katılım Bursu</i>	Türk Biyokimya Derneği	2014
<i>Akademik Teşvik Puanı 100 Net Puan</i>	Akdeniz Üniversitesi	2017

Yayınlar ve Bildiriler:

SCI, SSCI, AHCI İndeksine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler:

1. **Kucuksayan E**, Ozben T. Hybrid Compounds as Multitarget Directed Anticancer Agents. Current topics in medicinal chemistry. **2017**;17(8):907-918.
2. Hanikoglu F, Hanikoglu A, **Kucuksayan E**, Alisik M, Gocener AA, Erel O, Baykara M, Cuoghi A, Tomasi A, Ozben T2. Dynamic Thiol/Disulphide Homeostasis Before and After Radical Prostatectomy in Patients with Prostate Cancer. Free Radic Res. **2016** Sep 13:1-10.
3. **Kucuksayan E**, Konuk EK, Demir N, Mutus B, Aslan M. Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells. Free radical biology and medicine. **2014**;2014 Jul;72:113-23. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.013. Epub 2014 Apr 15.
4. Aslan M, Ozcan F, **Kucuksayan E**. Increased Small Dense LDL and Decreased Paraoxonase Enzyme Activity Reveals Formation of an Atherogenic Risk in Streptozotocin-Induced Diabetic Guinea Pigs. Journal of diabetes research. **2013**;2013:860190. Epub 2013/05/22.
5. Aslan I, **Kucuksayan E**, Aslan M. Effect of insulin analog initiation therapy on LDL/HDL subfraction profile and HDL associated enzymes in type 2 diabetic patients. Lipids in health and disease. **2013**;12:54. Epub 2013/04/27.

6. Aslan M, Dogan S, **Kucuksayan E**. Oxidative stress and potential applications of free radical scavengers in glaucoma. Redox report : communications in free radical research. **2013**;18(2):76-87. Epub 2013/03/15.
7. **Kucuksayan E**, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel SG, Ozben T. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. Journal of cellular biochemistry. **2013**;114(7):1685-94. Epub 2013/02/07.
8. Cort A, Timur M, Dursun E, **Kucuksayan E**, Aslan M, Ozben T. Effects of N-acetylcystein on bleomycin-induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. Journal of physiology and biochemistry. **2012**;68(4):555-62. Epub 2012/05/09.
9. Cort A, Timur M, Ozdemir E, **Kucuksayan E**, Ozben T. Synergistic anticancer activity of curcumin and bleomycin: an in vitro study using human malignant testicular germ cells. Molecular medicine reports. **2012**;5(6):1481-6. Epub 2012/04/04.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. Ozben T., Ponti G., Hanikoglu A., **Kucuksayan E.**, Baykara M., Maccaferri M., Mandrioli M., Tomasi A. "Cell-Free DNA: The Search Of Prognostic Biomarkers In Prostate Cancer" 8th Santorini Conference Systems Medicine & Personalised Health & Therapy 3-5 October 2016. **SÖZLÜ SUNUM.**
2. Tomris Ozben, Giovanni Ponti, Aysegul Hanikoglu, **Ertan Kucuksayan**, Mehmet Baykara, Monia Maccaferri, Mauro Mandrioli, Aldo Tomasi." Circulating free DNA assessment to recognize novel prognostic biomarkers in prostate cancer" 4th Joint EFLM-UEMS Congress: Warsaw, Poland, 21–24 September, 2016. **SÖZLÜ SUNUM.**
3. Hanikoglu, F. Hanikoglu, **E. Kucuksayan**, M. Alisik, A. A. Gocener, O. Erel, M. Baykara, G. Ponti, A. Tomasi, T. Ozben. "Plasma thiol levels in patients with prostate cancer" The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808.
4. T. Ozben, G. Ponti, A. Hanikoglu, **E. Kucuksayan**, M. Baykara, M. Maccaferri, M. Mandrioli, A. Tomasi. "Cell-Free DNA: The Search Of Prognostic Biomarkers In Prostate Cancer" Balkan Journal of Clinical Laboratory XXIV, 16, 1.
5. Sircan-Kucuksayan Aslinur, **Kucuksayan Ertan**, Ozkan Ozlenen, Unal Kerim, Yilmaz Ceren, Ozkan Omer, Canpolat Murat. "Tissue oxygen saturation measurements by using optical fiber spectroscopy: Assessment of free flap perfusion" IEEE-Biomedical Engineering Meeting (BIYOMUT), 2014 18th National. 16-17 Oct. 2014. Page (s):1-4 10.1109/BIYOMUT.2014.7026366

6. **E. Kucuksayan**, G. Yucel, A. Cort, T. Ozben. "N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) Decreases Bleomycin Induced Mitochondrial Damage And Apoptosis In Malignant Testicular Tumor Cell" 22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC WorldLab Istanbul 2014. Istanbul, 22-26 June 2014 • DOI 10.1515/cclm-2014-4049.Clin Chem Lab Med 2014; 52, Special Suppl, pp S1 – S1760.
7. **Ertan Kucuksayan**, Esmâ Kirimlioglu Konuk, Necdet Demir, Bulent Mutus, Mutay Aslan. "Sphingomyelinase Inhibition Decreases Er Stress-Mediated Apoptosis and Inducible Nitric Oxide Synthase in Retinal Pigment Epithelial Cells" Society for Free Radical Biology and Medicine 2013 (SFRBM November 20 – 24 2013) San Antonio, TX, USA.
8. Aslinur Sircan-Kucuksayan, **Ertan Kucuksayan**, Burcu Gemici, Mutay Aslan, Murat Ozekinci Gulgun Erdogan, Murat Canpolat "Diagnosis of Ovarian Ischemia-Reperfusion Injury via Optical Fiber" Society for Free Radical Biology and Medicine 2013 (SFRBM November 20 – 24 2013) San Antonio, TX, USA.
9. Mutay Aslan, Esmâ Kirimlioglu Konuk, **Ertan Kucuksayan**, Mustafa Unal, Akif Ciftcioglu, Necdet Demir, Bulent Mutus." Sphingomyelinase Inhibition Decreases ER Stress-Mediated Apoptosis and Caspase Activation in RatOcular Hypertension." Society for Free Radical Biology and Medicine 2013 (SFRBM November 20 – 24 2013) San Antonio, TX, USA.
10. M. Ozekinci, A. Sircan-Kucuksayan, **E. Kucuksayan**, M. Erman-Akar, G. Erdogan, M. Canpolat "Assesment Of Reflectance Spectroscopy As A Diagnostic And Prognostic Tool In Torsion/Detorsion Injury In A Rat Model" International Federation of Fertility Societies and the American Society for Reproductive Medicine 2013 (ASRM 2013).
11. Aslan, M.; **Kucuksayan, E.**; Unal, M.; et al." Inhibition of neutral sphingomyelinase decreases elevated levels of nitrotyrosine and inducible nitric oxide synthase in ocular hypertensive rats." 38th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS). Saint Petersburg, RUSSIA.JUL 06-11, 2013.
12. Ozcan F., **Kucuksayan E.**, Aslan M."Decreased Paraonase Enzyme Activity and Increased Small Dense LDL Reveals Formation of an Atherogenic Risk in Diabetic Guinea Pigs." In this issue 21th Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation. September 25-28,2013.
13. Aslan, M; Dogan, S; Ozcan,; **Kucuksayan, E.** "Increased Small Dense LDL and Decreased Paraonase Enzyme Activity Reveals Formation of an Atherogenic Profile in Type 1 Diabetic Guinea Pigs." 19th Annual Meeting of the Society-for-Free-Radical-Biology-and-Medicine (SFRBM).San Diego, CA. NOV 14-18, 2012.
14. Dogan, Serdar; **Kucuksayan, Ertan**; Unal, Mustafa; et al." Neutral Sphingomyelinase Inhibition Decreases Elevated Levels of Inducible Nitric Oxide

Synthase and Nitrotyrosine in Ocular Hypertensive Rats.” 19th Annual Meeting of the Society-for-Free-Radical-Biology-and-Medicine (SFRBM). San Diego, CA.NOV 14-18, 2012.

15. **Kucuksayan, E.**; Cort, A.; Yucel, S. G.; et al. “The Effects of N-Acetyl-L-Cysteine on Bleomycin Induced Apoptosis Were Determinated in Malignant Testicular Germ Cell Tumours by Flow Cytometry.” 22nd Biennial Congress of the European-Association-for-Cancer-Research. Barcelona, SPAIN.JUL 07-10, 2012.
16. Cort A., **Kucuksayan E.**, Ozben T. “Antiproliferation induced by curcumin in human testicular cancer cell line.” EACR Anticancer Agents Research Congress, Antalya, 2011.
17. **Kucuksayan E.**, Cort A, Yucel G, Ozben T. “N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits Bleomycin Induced Oxidative Stress in Ntera-2 Cell Line.” EACR Anticancer Agents Research Congress, Antalya, 2011.
18. Cort A., Ozben T., **Kucuksayan E.** “Bleomycin Increases Trans Lipid Isomers In Human Testicular Cancer Cell Membrane.” 36. FEBS Congress, Torino, 2011.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :

1. **Ertan Küçükşayan**, Esmâ Kırmıhoğlu Konuk, Nejdîet Demir, Bülent Mutus, Mutay Aslan. “Sfingomyelinaz İnhibisyonu Retinal Hücrelerde Er Stresine Bağlı Apoptozisi Ve Nitrik Oksiti Azaltır” 25. Ulusal Biyokimya Kongresi,İzmir, 3-6 Eylül 2013. **SÖZLÜ SUNUM.**
2. Aslınur Sırcan-Küçükşayan, Murat Özekinci, **Ertan Küçükşayan**, Mutay Aslan, Gülgün Erdoğan, Murat Canpolat. “Over Torsiyonunda İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fiber Optik Spektroskopî Metodu İle Belirlenmesi.” 25. Ulusal Biyokimya Kongresi,İzmir, 3-6 Eylül 2013.
3. **Ertan Küçükşayan**, Esmâ Kırmıhoğlu Konuk, Nejdîet Demir, Bülent Mutus, Mutay Aslan. ”Retinal Hücrelerde Sfingomyelinaz İnhibitorü Nitrik Oksiti Düşürür Ve Endoplazmik Retikulum Stresinin Neden Olduğu Apoptozisi Azaltır.” 25. Ulusal Biyofizik Kongresi,Trabzon, 24-27 Eylül 2013.
4. Göksun Başaranlar, **Ertan Küçükşayan**, Narin Derin, Mustafa Ünal, Bülent Mutus, Mutay Aslan. “Sıçanlarda Oluşturulan Oküler Hipertansiyonun Nitrozatif Stres ve Nötral Sfingomyelinaz ile İlişkisi.” 25. Ulusal Biyofizik Kongresi,Trabzon, 24-27 Eylül 2013.
5. **Ertan Küçükşayan**, Gültekin Yücel, Tomris Özben. “Malign Testis Tümör Hücresinde Bleomisin ile Oluşturulan Mitokondriyal Hasar Üzerine N-asetil-L-Sistein’in (NAC) Etkisi” IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Bursa, 13-16 Aralık 2012. **SÖZLÜ SUNUM.**

6. **Ertan Küçükşayan**, Ayşegül Çört, Gültekin Yücel, Tomris Özben. “Malign Testis Tümörlerinde N-asetil-L-Sistein Bleomisin'in Oluşturduğu Apoptozisi 6 Saatte Azaltmıştır.” 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 25-28 Eylül 2012.
7. Mutay Aslan, Serdar Doğan, Filiz Özcan, **Ertan Küçükşayan**. “Tip 1 Diyabetik Kobaylarda Plazma Kolesterol Ester Transfer Proteini Değişiminin Ldl Subfraksiyonlarına Etkisi.” 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 25-28 Eylül 2012.
8. Serdar Doğan, İbrahim Aslan, **Ertan Küçükşayan**, Mutay Aslan. “İnsülin Analoglarının Tip 2 Diyabetik Hastalarda Revers Kolesterol Transportu Ve Ldl Subfraksiyon Profili Üzerine Etkisi “24. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 25-28 Eylül 2012.
9. **Ertan Küçükşayan**, Ayşegül Çört, Gültekin Yücel, Tomris Özben. N-TERA-2 Hücre Dizilerinde Nasetilsisteinin Bleomisinin Sitotoksitesisi Üzerine 24 Saatteki Etkileri. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, 29 Kasım -2 Aralık 2011.
10. Ayşegül Çört, **Ertan Küçükşayan**, Tomris Özben. Curcumin'in testis kanser hücreleri (NTera-2) üzerine olan sitotoksik etkisinin belirlenmesi. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, 29 Kasım - 2 Aralık 2011.
11. **Ertan Küçükşayan**, Ayşegül Çört, Tomris Özben, Gültekin Yücel. Bleomisin N-tera-2 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin belirlenmesi. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Eskişehir, 19-22 Ekim 2011.
12. Ayşegül Çört, **Ertan Küçükşayan**, Tomris Özben. Curcumin'in testis kanser hücreleri (NCCIT) üzerine olan sitotoksik etkisinin belirlenmesi. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Eskişehir, 19-22 Ekim 2011.