

**METFORMİN HCL/İRİNOTEKAN YÜKLÜ PLGA
NANOPARTİKÜLLERİNİN GLİOBLASTOMA
MULTİFORME ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN
VİVO VE İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ

Doktora Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanotıp Bilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

2015

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**METFORMİN HCL/İRİNOTEKAN YÜKLÜ PLGA
NANOPARTİKÜLLERİNİN GLİOBLASTOMA MULTİFORME
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİVO VE İN VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanotıp Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**METFORMİN HCL / İRİNOTEKAN YÜKLÜ PLGA NANO PARTİKÜLLERİN
GLİOBLASTOMA MULTİFORME ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİVO VE İN
VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU danışmanlığında, Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 04/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı Nanotıp Bilim tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Meltem ÇETİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Erdem SAĞSÖZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 01/10/2015 tarih ve 38/1333 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

METFORMİN HCL/İRİNOTEKAN YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN GLİOBLASTOMA MULTIFORME ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİVO VE İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ
Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı
Nanotıp Bilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Glioblastoma multiforme beyin primer tümörlerinin %77'sini teşkil etmektedir. Günümüzde kullanılan kemoterapiler selektivitelerinin az olması ve yan etkilerinin çok olması nedeniyle kanserin yanı sıra sağlıklı hücreleri de etkiler. Bu çelişkilerden dolayı tümöre spesifik teknolojilerin geliştirilmesi gereklidir. Polimerik nano-taşıyıcılar, özellikle poli (-DL-laktik-ko-glikolid) (PLGA) nanopartikülleri (NPs) anti-tümör taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. İrinotekan, yarı sentetik ve topoisomeras-1 enzimi yarışmalı analogudur. Tümörlere karşı GBM dâhil, çok etkili antikanser ajanlardan biridir. Metforminin hücre enerjisi yollarının regülasyonunda etkili olduğu saptanmıştır. Tip 2 diyabet tedavisinde sıklıkla kullanılır. Bu çalışma için etik kurul izni (no 36643897-13) alınmıştır. 1 günü geçmemiş 6 adet Sprague Dawley sıçan yavrusundan beyin korteksi alınmıştır. U-87MG Van Yüzüncü Yıl üniversitesinden temin edilmiştir. İrinotecan 1, 10, 100µM ve Metforminin 0.25, 0.5, 1, 2 mM saf halde veya nanopartiküller halinde kullanılmıştır. 154 Sprague Dawley sıçan (250±10 gr) bu çalışma için seçilmiştir. GBM hayvan modeli için U-87MG hücresi 10⁶ hücre stereotaksik olarak nigrosteriatal bölgesine enjekte edilmiştir. 15 gün sonra hazırlanan ilaçlar direkt beyine enjekte edilmiş ve beyinleri çıkartılıp fiks edilmiştir. Tümör alanı "cavalier prenciple" ölçüldü ve veriler SPSS 17.0'le analiz edildi. Boş PLGA NPs grubunda kanser ve nöron kültüründe anlamlı bir fark bulunamamıştır. İrinotekan ve metformin yüklü- PLGA NPs 10µm ve 0,5 mM dozlarında kullanıldığı zaman nörona zarar vermezken kanser hücrelerine hasar verdiği tespit edilmiştir. Ayrıca patolojik olarak kontrol ve boş PLGA NPs arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Ama irinotekan- ve metformin-yüklü PLGA NPs'nin ise daha fazla kansere zarar verdikleri saptanmıştır.

2015, 58 sayfa

Anahtar Kelimeler: irinotekan, metformin, GBM, in-vivo, in-vitro, PLGA, Nanoteknoloji

ABSTRACT

Doctoral Thesis

IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF THE EFFECT OF METFORMIN HCL/IRINOTECAN LOADED PLGA NANOPARTICLES ON GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Ali TAGHIZADEHGHALEHJOUGHİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanoscience and Nanotechnology
Nanomedicine Science

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ahmet HACIMUFTUOGLU

Glioblastoma multiforme (GBM) is forming 77% of all primary brain tumor. Current chemotherapeutics are limited by the low selectivity to cancer cells, which can cause unpleasant side effects and also can damage healthy cells. Hence, it is crucial to development of technology based, efficient tumor cell-targeted therapies for treating GBM. Polymeric nanocarriers, especially poly-(DL-lactid-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles NPs, have been used as an anti-tumor drug delivery systems. Irinotecan, a semi-synthetic competitive analogue of topoisomerase-I enzyme, is an important and affective chemotherapeutic. Metformin widely used against diabet type 2. And also metformin regulate energy pathway. For this study ethical permission is taken with the number 36643897-13. Brain cortex were obtained from 6 Sprague Dawley Rat which were one day old. U87MG culture were obtain from Van Yuzuncu Yil University. Irinotecan in 1, 10, 100 μM and Metformin in 0.25, 0.5, 1, 2 mM used as pure drug or nanoparticles. 154 Sprague Dawley Rats (250 ± 10 gr) were chosen and performed GBM model using U87MG cell line. 10^6 cells were injected stereotactically into the brain; into the nigrostriatal region. 15 days after injection, drugs were injected directly into cancer region. The brains were extracted and fixed. From sections, the tumor areas were measured using cavalier principle. The obtained data were compared statistically by SPSS version 17.0. The blank PLGA NPs control group didn't give any meaningful damage to neuron and cancer cells. Irinotecan PLGA NPs in 10 μM dosage and Metformin PLGA NPs in 0.5 mM concentrations gave damage to cancer cells but not to neuronal cells,. Also we found no difference in pathological evaluations between control and blank PLGA NPs controls. Irinotecan PLGA NPs and Metformin PLGA NPs groups gave damage to cancer cells.

2015, 58 pages

Keyword: Irinotecan, metformin, GBM, in-vivo, in-vitro, PLGA, Nanotechnology

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi ve desteği benden esirgemeyerek, her an yanımda olan tez yöneticim ve değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na sonsuz teşekkür ederek, kişisel ve akademik hayatta kendisine sağlıklar ve başarılar diliyorum.

Van yüzüncü yıl üniversitesinden Sayın Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR'a kanser hücrelerinin hazırlanmasında yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji ABD öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Meltem Çetin ve Sayın Arş. Gör. A. Büşra Uğur tarafından Metformin- ve İrinotekan- yüklü PLGA nanopartiküllerini hazırlayıp karakterize ettikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi, yanımda dimdik duran ve her zaman destekleriyle ilerlememi sağlayan eşime ve çocuğuma hediye ediyorum.

Her zaman bana umut ve öğütler ile bir hayat yaşatan, sevgili Annem ve değerli Babama sağlık ve mutluluk dolu bir yaşam arzu eder teşekkür ederim.

Tezimin farklı kısımlarında yardımcı olan ekip arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. yardımları olmadan bu tez çalışması yapılamazdı.

Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ

Ağustos, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Merkezi Sinir Sistemi	1
1.2. Glial Hücrelerinin Sınıflandırılması.....	3
1.2.1. Makroglialar	4
1.2.1.a. Astrositler	4
1.2.1.b. Oligodendro glialar.....	6
1.2.1.c. Ependimal hücreler	6
1.2.1.d. Radyal glia hücreleri	6
1.2.1.e. Schwann hücreleri	7
1.2.2. Mikroglia hücreleri.....	7
1.3. Glial Hücreler ve Hastalıkları.....	7
1.4. Glioblastoma Multiforme	8
1.5. Klinik Belirtileri	9
1.6. Tanı ve Evreleri	9
1.7. Etiyoloji.....	11
1.8. GBM Histopatolojisi	11
1.9. Tedavide Kullanılan Preparatlar.....	12
1.10. U-87MG Hücre Hattı.....	14
1.11. Nanobilim.....	14
1.11.1. Nanoteknolojinin uygulama alanları	15
1.11.2. Nanopartiküler sistemler	16
1.11.3. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler.....	17
1.11. Metformin.....	19
1.11.1. Metformin hidroklorür genel özellikleri.....	20

1.11.2. Metformin'in farmakodinamisi	20
1.11.3. Metforminin antineoplastik etkisi ve mekanizması.....	21
1.12. İrinotekan.....	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Malzemeler	25
3.1.1. Hücre kültürü cihazları	25
3.1.2. Sarf malzemeler.....	26
3.1.3. Cerrahi için gereken malzemeler	26
3.1.4. Sıçan kanser modeli için gereken kimyasallar ve cihazlar	27
3.1.5. Nöron kültürü	27
3.1.6. U-87MG kültürü.....	27
3.1.7. MTT sitotoksosite testi.....	27
3.2. Metformin HCl Yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması	28
3.2.1. İrinotekan yüklü-PLGA nanopartiküllerin hazırlanması.....	28
3.2.2. Hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu	29
3.3. Deney Hayvanları.....	29
3.4. Hücre Kültürü.....	30
3.5. Kanser Kültürü	31
3.6. MTT ile Sitotoksosite Testi.....	32
3.7. İn-vivo Deneyi.....	34
3.7.1. GBM sıçan modeli.....	34
3.7.2. Patoloji.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1. Nanopatikül Karakterizasyon Çalışmalarının Bulguları	37
4.2. Hücre Kültürü.....	40
4.2.1. Nöron kültürü	40
4.2.2. Kanser kültürü	41
4.3. Hayvan Deneyi	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMP	Adenozin mono fosfat
AMPK	AMP Kinaz
CCND1	cycline D1
CT	Bilgisayar Tomografi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FBS	Fetal Dana Serum
FDA	Food and drug administration
GBM	Glioblastoma Multiforme
Gy	Gray
HDL	High Densiti Lipo Protein Colestrol Seviyesini
HIF1a	Hipoksi indüklenebilir faktör 1a
IC50	İnhibitör Doz
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IR	İnsülin reseptörü
Iri	Irinotekan
KBE	Kan Beyin Engeli
LDL	Low Densiti Lipo Protein Colestrol Seviyesini
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MET	Metformin HCL
MRI	Manyetik Resonans Görüntüleme
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mTOR	Mamalian Target Of Rapamisin
MTT	[3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid]
NBM	Nöron Bazal Medyum
PBS	Fosfat İle Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase

PKB	Protein Kinaze B
PLGA	Poli (laktid-ko-glikolid)
PSS	Periferik Sinir Sistemi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S6K1	ribozomal S6 kinaz; hücre metabolismi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. MSS ve PSS.....	1
Şekil 1.2. Makroglia ve Mikroglia.....	2
Şekil 1.3. Glial hücrelerin değişik görüntüleri.....	3
Şekil 1.4. Değişik morfolojideki astrositler.....	5
Şekil 1.5. Çekilen MRI görüntüsü.....	10
Şekil 1.6. GBM çıkartıldıktan sonra alınan görüntü.....	10
Şekil 1.7. GBM doku kesiti.....	12
Şekil 1.8. PLGA'nın kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.9. İrinotekan maddesinin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 3.1. Nöron kültürü görüntüsü.....	31
Şekil 3.2. U-87MG hücrelerin görünümü.....	32
Şekil 3.3. Kanserin histopatoloji görüntüsü.....	35
Şekil 3.4. Kanser yayılım görüntüsü.....	36
Şekil 4.1. (a) Metformin Hcl ve (b) İrinotekan yüklü formülasyonların SEM fotoğrafları.....	38
Şekil 4.2. Metformin Hcl-yüklü PLGA nanopartiküllerinin PB Ph 7.4 içindeki salım profili (n=3; X±SS).....	39
Şekil 4.3. İrinotekan-yüklü PLGA nanopartiküllerinin PB Ph 7.4 içindeki salım profili (n=3; X±SS).....	39
Şekil 4.4. Nöron kültürü için irinotekan ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi.....	40
Şekil 4.5. Nöron kültürü için metformin ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi.....	41
Şekil 4.6. U-87 hücreleri için irinotekan ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi.....	41
Şekil 4.7. U-87 hücreleri için metformin ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi.....	42
Şekil 4.8. Alınan örneklerin patolojik olarak % alan (μm^3) "Cavalier prensiple".....	43

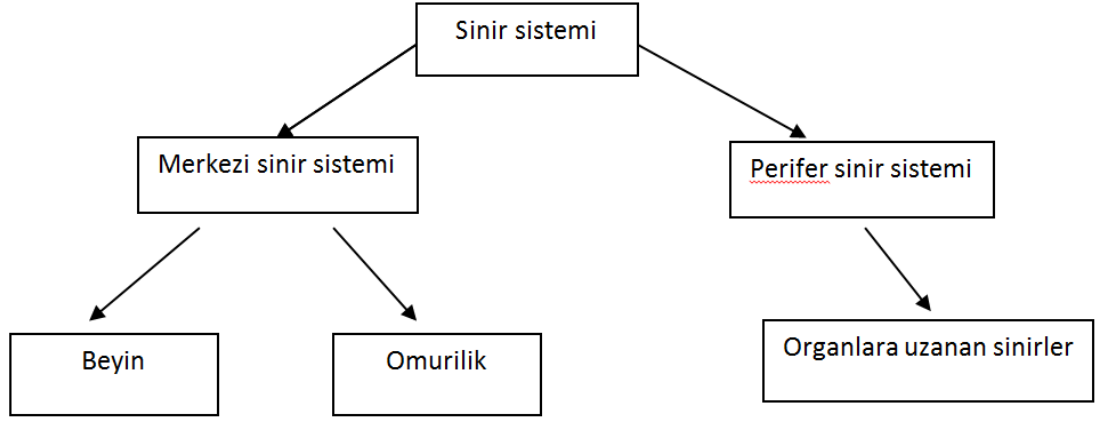
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. İn-vitro deneyi için kullanılan dozlar	33
Çizelge 3.2. İn-vivo deneyi için kullanılan dozlar	35

1. GİRİŞ

1.1. Merkezi Sinir Sistemi

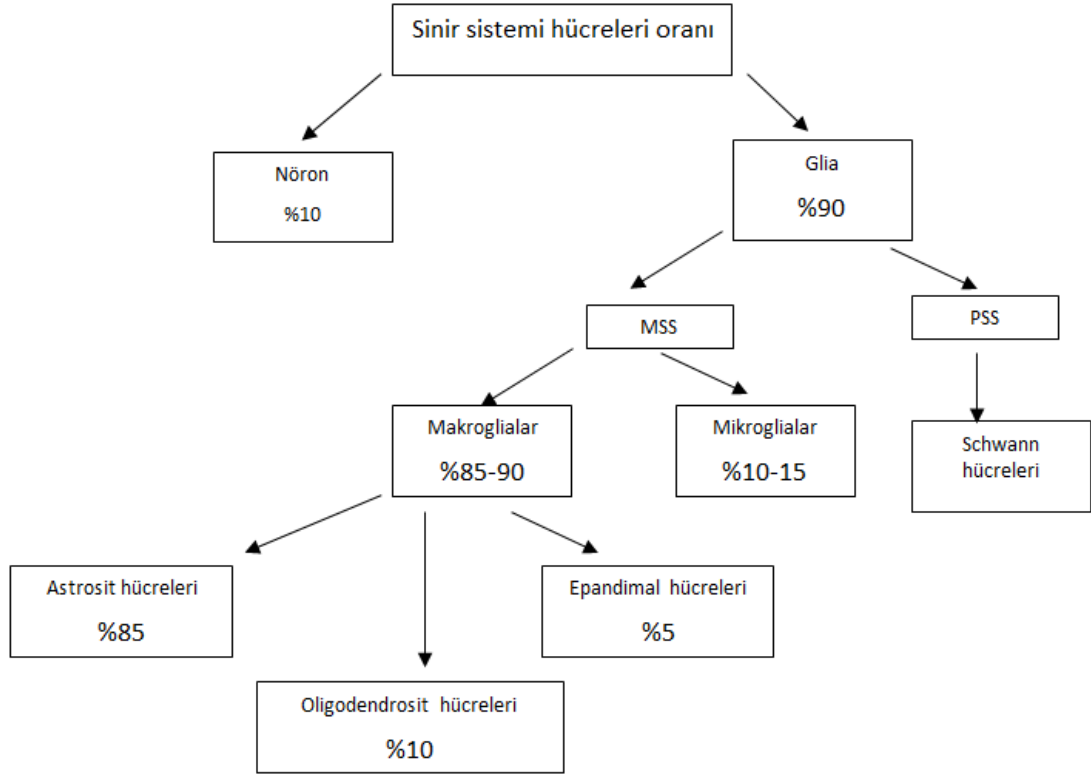
Vücutta bulunan sinir sistemi genel olarak merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır (Şekil 1.1). PSS, vücudun dış bölgesinden gelen algıları ve duyuları o duyuya özel olan MSS bölgesine iletir.



Şekil 1.1. MSS ve PSS

Sinir sistemimiz genel olarak “Nöron” ve “Glial” hücrelerden oluşmaktadır. Sinir sisteminde hücre kitle oranına baktığımızda bu sistemin %10’unu nöronlar ve %90’nını glial hücreleri oluşturmaktadır (Şekil 1.2) (Alexei Verkhratsky 2007). Yunanca “Gli” kelimesinden köken alınan glia kelimesi yapışkan görümlü ve yapışkan anlamlarına gelmektedir. İlk kez 1858 yıllarında bu kelime patolog Rudolf Ludwig Karl Virchow tarafından sinir macunu terimi olarak kullanılmıştır (Azevedo *et al.* 2009). Glia hücreleri değişik formlarda ve görünümde de olsalar da omurgasız canlılardan insana dek tüm varlıklarda bulunmaktadır. Farklı canlıların glial hücre miktarı canlının fiziksel büyüklüğüyle doğru orantılıdır. İplik kurdunda birkaç adet glial hücresi, meyve sineği beyninin %25’i, rat beyninin %65’i, insan beyninin %90’ı ve fil beyninin %97’sinin

glial hücre olduğu saptanmıştır (Azevedo *et al.* 2009). Canlınn gelişim oranı arttıkça glial hücrelerinin oranı, çeşitliliği, işlevi ve gerekliliği doğru orantılı olarak artmaktadır.



Şekil 1.2. Makroglia ve Mikroglia

Glial hücreleri nöronların etrafını sarmaktadır. Genel olarak nöronlara fiziki destek, besin, oksijen temini sağlarlar. Ayrıca, atıkların uzaklaştırılması, nöron iletişimi, patojenlerden ortadan kaldırılması, ölen hücre ve nöronların temizlenmesine kadar çeşitli görevlerde yer almaktadırlar (Allen and Barres 2009). Glial hücreleri ile nöron hücreleri birçok yönden bir biriyle farklıdır. Glial hücreleri nöronların aksine, gelen uyarılara karşın aksiyon potansiyeli oluşturamazlar. Glial hücreler mitoz evreyi tamamladıklarından bölüne bilmektedirler ancak nöronlar post-mitotik evrede kaldıklarından mitoz bölünmeyi tamamlayamazlar dolayısıyla bölünmeleri gerçekleşmez (Herrup and Yang 2007; Allen and Barres 2009).

Bu iki hücre türünün tek ortak yönü ektodermden köken almalarıdır (Allen and Barres 2009). Embriyogenezin ilk aşamasında, glial hücreler farklı prekürsör moleküller salgılayarak akson ve dendrit gelişimine, nöron göçüne ve nöronların lokalizasyonuna rehberlik ederler (van Noort 2006; Alexei Verkhratsky 2007). Glial hücrelerinin dinamik yapısı ve plastisitesi diğer hücrelerden farklıdır. Nöronlara göre daha esnek bir hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisi vardır. Bu özellik onların MSS içerisinde, kemokinlerin sinyallerine göre göç edebilmelerini sağlamaktadır (van Noort 2006).

1.2. Glial Hücrelerinin Sınıflandırılması

Glial hücrelerinin farklı morfoloji, fonksiyon ve yerleşke yerine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Glial hücrelerin değişik görüntüleri (Allen And Barres 2009)

MSS’de yer alan hücreler “Makroglia” ve “Mikroglia” olarak ikiye ayrılır, PSS’de ise sadece “Schwann hücreleri” bulunur. Makroglia hücreleri, beyinde bulunan glial hücrelerinin %85-90’ını, mikroglialar ise %10-15’ini teşkil eder. Makrogliaları Embriyonik köken açısından ektodermden, mikroglialar hematopoetik dokudan

gelişmişlerdir. Omurilik de yer alan Schwann hücreleri ve satellit hücreleri ise köken olarak nöronal krestten gelişmişlerdir.

1.2.1. Makroglialar

1.2.1.a. Astrositler

Astrositler (Astroglia) glial hücrelerin %80'ini teşkil ederler ve fonksiyonel açıdan beynin en önemli grubunu oluşturmaktadırlar (Şekil 1.4). Astro Yunanca da yıldız demektir. Bu hücreler elektriksel iletiye sahip olmasalar da Ca^{++} iyon dalgası yaratarak beynin farklı bölgelerinde bulunan astrositlerle irtibat halindedirler. Son zamanlardaki araştırmalar, astrositlerin beyindeki rolünün düşünülenden çok daha fazla olduğu yönündedir.

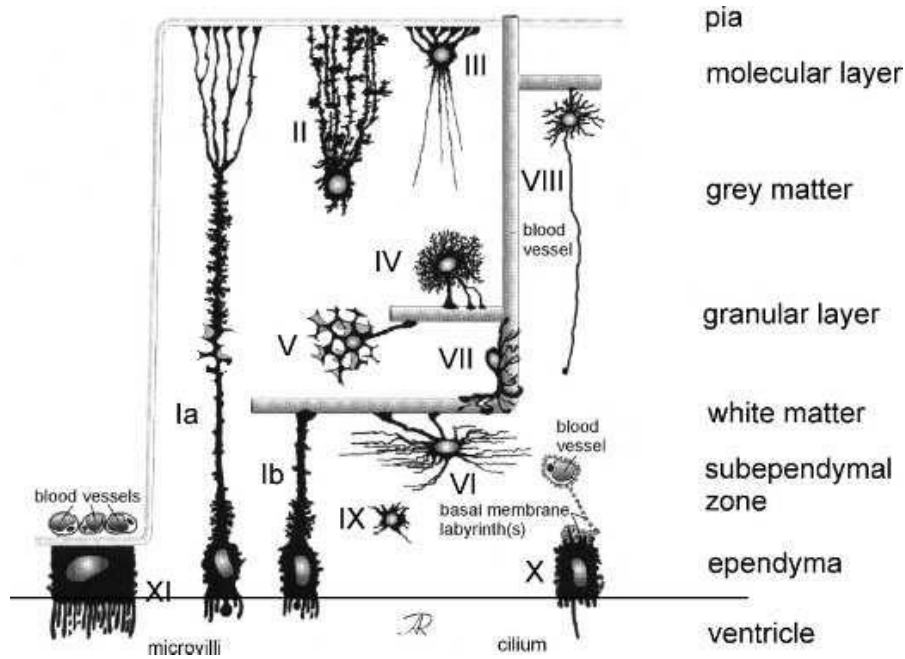
Bazı fonksiyonlar:

- 1- Embryonik dönemde çeşitli hormon ve sitokin salgılayarak nöron göçü ve lokalizasyonu.
- 2- Nöronlara oksijen ve besin sağlamak
- 3- Astrositlerin Hücre zarında bulunan çeşitli nörotransmitter ve hormon reseptörlerine bağlanan nöronal Ca^{++} iyon yolağını aktif hale getirerek nöron-astrosit ilişkisini düzenler.
- 4- Bilgi süreci.
- 5- Sinaps plastisitesini düzenler.
- 6- Kan beyin bariyeri (KBB) homeostazisini sağlayıp, çeşitli maddeler salgılayarak damar çapının genişliğini kontrol ederler ve artan nöronal faaliyetleri dengelemek için kan akışını arttırmaları.
- 7- K^+ iyonu düzeyi korurlar.
- 8- Salgılanan nörotransmitterlerin tekrar nöronal ileti döngüsüne girilmesini sağlarlar.
- 9- Hepatik ensefalopati, depresyon, ruhsal ve davranışsal bozukluklar, hafıza kaybı, Alzheimer, glutamat siklusu, nöronal dejenerasyon ve rejenerasyon, MS, ALS

(amyotrofik lateral skleroz) ve çeşitli metabolik hastalıklarla fonksiyonel olarak ilişkilidirler.

Morfolojik açıdan protoplazmik ve fibroz olmak üzere iki farklı türe ayrılır. Farklı morfolojilerine rağmen görevleri benzerlik gösterir. Görünüm olarak protoplazmik astrositler; çok sayıda kısa ve kalın uzantılara sahip olup ve genel olarak gri cevherde yer alırlar. Uzantılar nöronların hücre gövdesinden sinaptik bölgelerine kadar uzanırlar.

Protoplazmik astrositler görünüm olarak birbirinden farklılık göstermektedirler. Ön ve arka beyin kısmında bulunan astrositler yerleşke, üzerinde bulunun reseptör ve transporterler açısından farklılık gösterirler.



Şekil 1.4. Değişik morfolojideki astrositler (Alexei Verkhratsky 2007; Allen and Barres 2009)

*Ia-pial tanisiti, Ib damar tanisiti, II radyal astrositi, III marginal astrosit, IV protoplazmik astroit, V valet astrositi, VI fibroz astrosit, VII pre vaskular astrosit, VIII interlaminar astrosit, IX imaçür astrosit, X ependim hücreleri ve XI kroid pleksus hücreleri.

Fibroz astrositler, az dallanma gösterirler ve genelde tek bir uzun dalları vardır ve çoğunlukla beyaz cevherde yer alırlar. Fibroz astrositler çoğunlukla beyaz maddede buldukları için nöronların aksonlarıyla irtibat halindedirler (Allen and Barres 2009).

1.2.1.b. Oligodendro glialar

Oligodendrositler, makro gliaların %15'ini teşkil etmektedirler. Bu hücreler aksonları lipitten zengin bir maddeyle (myelin) örterek nöronların yalıtımından sorumlu hücrelerdir. Myelinleşme akson üzerinde bulunan iyon kanallarının kümeleşmesine neden olur. Bu yalıtım sayesinde elektriksel iletinin hızı artırılır. Olası hasar durumunda, myelinleşme bozulur ve dolayısıyla bazı hastalıkların gelişmesine (örneğin Multipl skleroz ve kalıtsal nöropati) neden olur (Allen and Barres 2009).

1.2.1.c. Ependimal hücreler

Ependimositler makroglia hücrelerinin %5'ini teşkil etmektedir. Bu hücreler ventriküllerin çeperini kaplarlar ve beyin omurilik sıvısını üretip ve ventriküllere salınımını gerçekleştirirler. Bu işlevleri sayesinde beyin basıncını sabit tutarlar ve mekanik olarak beyni darbelerden korurlar. Ependimal hücreler, nöronal ve glial hücreler arasındaki sıvıyı toplayarak tekrar kan dolaşım sistemine dönmelerini sağlarlar.

1.2.1.d. Radyal glia hücreleri

Radyal hücreler nöroepitel hücrelerden meydana gelmiştir. Ama bu hücrelerin farklılaşma kabiliyetleri nöroepitel hücrelerine göre düşüktür. Radyal glia hücreleri, gelişen Embryonik sinir sisteminde, nöronların göçünde progenitör olarak görev alırlar. Nöron hücrelerinin yerleşimi tamamlandıktan sonra bu hücreler protoplazmik astrositlere dönüşürler (Allen and Barres 2009). Evrimi tamamlanmış beyinde, radyal glia hücreleri beyincikte (bregmann glial hücreleri) ve retinada (Müller hücreleri) bulunurlar (Barres 2008).

1.2.1.e. Schwann hücreleri

Omurilikte yer alan glial hücreler tipidir. MSS'de aksonların yalıtımından sorumlu olan oligodendrositlerin PSS'de ki hücre tipleridirler. Sinaps oluşumunda yardımcı hücre tipidir (Allen and Barres 2009).

1.2.2. Mikroglia hücreleri

Mikroglialar MSS hücrelerinin %10-15'ini teşkil ederler. Mikroglialar, nöron kökenli olmayan glia hücre tipleridirler. Mezodermden gelişen ve hematopoetik kökene sahip olan mikroglialar heterojen görünümlü ve dikdörtgen yapıda hücrelerdirler. Bu hücreler makroglialara oranla daha küçük türler. Mikroglialar, erken gelişim evresinde beyne yerleşen makrofajlardan köken alırlar. Fagosit özelliği ve göç edebilme yeteneğine sahiplerdir (Allen and Barres 2009). Beyin parankimasında meydana gelen hasar sonucu parankima çevresindeki hücrelerden algılanan sinyallere göre hareket ederler. Mikroglialar, beyin dokusunu hasar ve enfeksiyon açısından inceler, olası hasarlarda çoğalıp hasar ve ölü hücreleri yok ederler. Bu hücrelerin fagosittik özelliği normal immun sisteminde bulunan makrofajlar kadar iyi değildir. Mikroglialar sinir sisteminin gelişim sıralarında uygun olmayan ve anormal sinaptik oluşumları yok ederler ve sinapsların yeniden şekillenmesini ve nöronal ağın yapılanmasını sağlarlar. Mikroglialar birçok dejeneratif nöronal hastalıklarında aktif duruma geçtiği tespit edilmiştir. Ama aktif hale gelen mikrogliaların bu hastalıkların iyileşme sürecine nasıl katkı sağladıkları tam olarak bilinmemektedir (Allen and Barres 2009).

1.3. Glial Hücreler ve Hastalıkları

Beyin hacminin popülasyonunun büyük bölümü glial hücreler tarafından oluşturulmaktadır. Bu yüzden sinir sistemi ile ilgili her türlü hastalığın (glial kanserler, travmatik hasarlar, felce neden olan hastalıklar, omurilik hasarları, epilepsi nöbetleri, Alzheimer hastalığı, Parkinson, otizm vb.) patogenezinde yer almaktadırlar (Sofroniew and Vinters 2010). Omurilik hasarlarında astrositler, bağ dokusu oluşturarak aksonların

rejenerasyonuna engel olurlar. ALS’de astrositler toksik bir molekül salgılayarak motor nöronları öldürürler. Sinir sistemi otoimmün hastalıklarda oligodendrositler hedef hücrelerdir. Ayrıca astrositlerin hasarı sonucu ortaya çıkan en ölümcül hastalıkların başında “gliomalar” gelmektedir (Alexei Verkhatsky 2007; Barres 2008; Allen and Barres 2009; Sofroniew and Vinters 2010).

1.4. Glioblastoma Multiforme

Virchow 1863 yılında Glioblastoma multiformeyi (GBM) ilk olarak tanımlamıştır. 1914’te Mallory spongioblastomayı, 1926’da yılında Bailey ve Cushing GBM terimi kullanmaya başladılar. GBM, 1940 yılından itibaren, Hans-Joachim tarafından primer ve sekonder olarak 2 alt tipe ayrılmıştır (Ohgaki and Kleihues 2007). Primer GBM vakalarının %90-95 teşkil etmektedir. Klinik belirtileri ilk 3 ayda hızlı bir şekilde gelişir. Sekonder GBM vakaların %5-10’unu teşkil etmektedir ayrıca düşük dereceli olan astrositom ve anaplastik astrositomadan köken alır. Genellikle genç bireylerde görülür ve belirtilerin ortaya çıkması aylar hatta 1 yıl bile sürebilir (Fujisawa *et al.* 2000; Ohgaki and Kleihues 2007). Her sene, 100,000 kişiden 5-6 kişiye beyin tümörü teşhis konulur ve bu vakaların %80’ini GBM teşkil eder (Stupp *et al.* 2010). GBM, beyin primer tümörlerinin en önemli kısmını teşkil etmektedir. World Health Organization (WHO)’e göre habis GBM’ler grad III.IV. içinde yer almaktadır. WHO tanımında belirtilen seviyeler çekirdek yapısı, mitotik aktivite, damarlanma, nekroz, çoğalma hızı, klinik belirtileri ve tedaviye verilen yanıtı göre belirlenmiştir (Louis *et al.* 2007). Ayrıca Amerika’da her yıl 10,000 yeni vaka teşhis edilir ve her 100,000 kişiden 3’ünün ölümüne neden olmaktadır. İlaveten MSS’nin habis tümörlerinin %45,5’ini primer habis tümörün tamamını ve habis gliomaların %54,4’ünü teşkil etmektedir. GBM’in görülme sıklığı 45-70 yaş arasındadır (Quint *et al.* 2014). 64 yaşı olan erkeklerde teşhis edilen GBM vakaları aynı yaşta olan kadınlara göre 1,5 kat daha fazladır ve beyaz ırklarda görülme sıklığı siyah ırklara göre 2 kat daha fazladır (Ostrom *et al.* 2013).

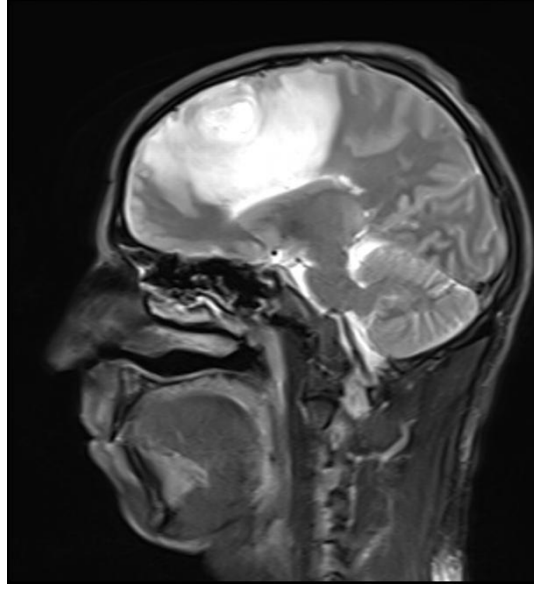
1.5. Klinik Belirtileri

Klinikte, GBM teşhisi konulmuş olan hastalarda görülen ilk belirtiler: artmış kafa içi basıncı, baş ağrısı, nörolojik bozukluklar, bulantı, kusma, görsel bozukluklar (örneğin çift görme, odaklanma bozuklukları), hafıza kaybı, motor işlev bozukluğu (kısmi felç, ayakta durmakta zorluk), konuşma bozuklukları (kekeleme, cümle kurma bozuklukları) konvülziyon, kişilik değişikliği ve nöbetlerdir. Bu belirtiler kanser kitlesinin yerleşmiş olduğu bölgeye göre değişmektedir. GBM'in ilk teşhisi Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) cihazıyla yapılmaktadır (Wen and Kesari 2008).

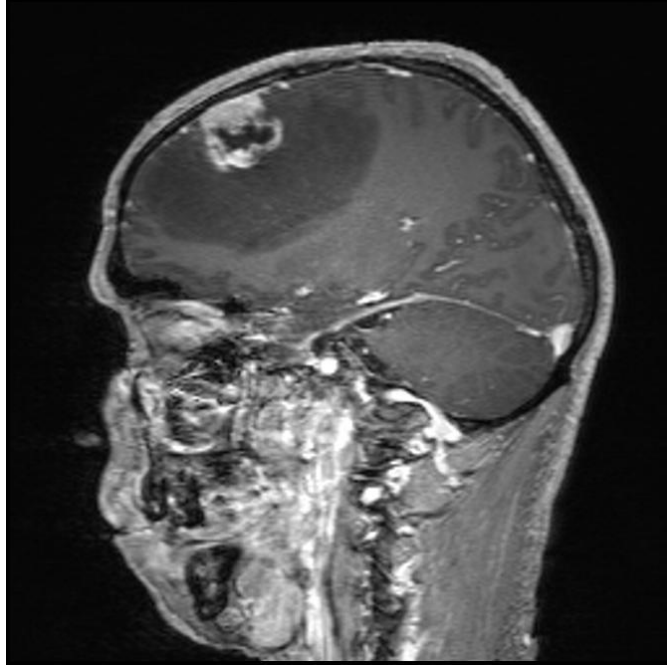
1.6. Tanı ve Evreleri

Klinik belirtilerinden sonra ilk olarak radyografik görüntüleme sistemleri kullanılmaktadır. Kullanılan radyolojik yöntemler; MRI, bilgisayar tomografi (CT), T1 ve T2 görüntülemelerden ibarettir. Bu yöntemlerde kontrast madde kanser bölgesine tutulur ve hiperdens bir görüntü verir ayrıca kanserin iç bölgesi sıvı veya nekroz olduğu için hipodens bir görüntü verir (Şekil 1.5) (Bink *et al.* 2005). Filmlerde en az kanser çapı kadar ödem de gözlenmektedir.

Kesin tanı için cerrahi yapılır ve kanser kitlesi alınabildiği kadar alınır ve bir kısmı patoloji bölümüne gönderilir (Şekil 1.6).



Şekil 1.5. Çekilen MRI görüntüsü



Şekil 1.6. GBM çıkartıldıktan sonra alınan görüntü

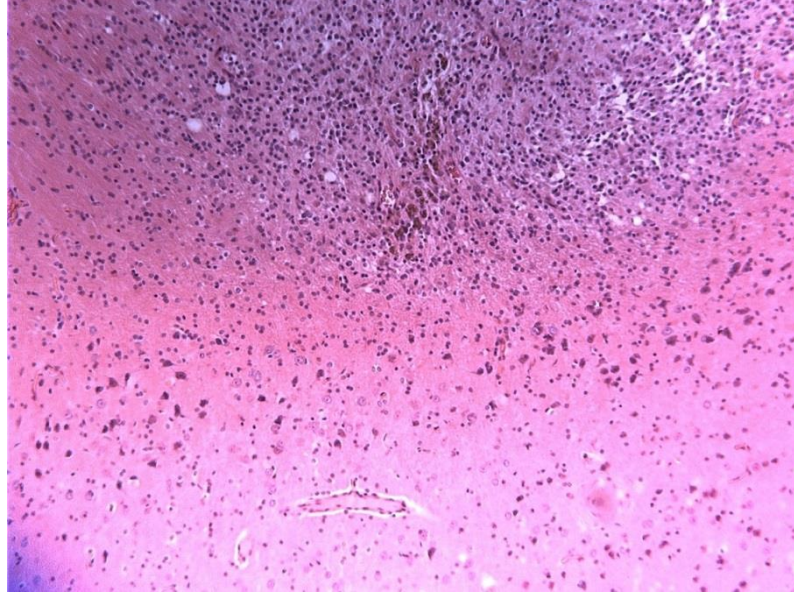
1.7. Etiyoloji

Beyin karmaşık bir yapı olduğundan dolayı farklı farklı hücrelerle meydana gelir. Ağırlıklı olarak beyin dokusunda glial hücreleri bulunmaktadır. GBM'in etiyojisinde çeşitli çevresel ve genetik faktörler belirlenmiş fakat şimdiye dek kesin bir neden bulunamamıştır. Bazı faktörler bu kanser türüne yatak hazırlamaktadır. Faktörlerin çevresel olanları; iyonize ışığa ve pestisit maruziyet, sigara kullanımı, petrol arındırma ya da sentetik madde üretimi yapan fabrikalarda işçi olmaktır (Wrensch *et al.* 2002). Genetik faktörler ise; 10. kromozomda heterozigosite, 10. kromozom q kolunda PTEN/MMAC 1 de mutasyon, 7. kromozom EGFR ekspresyonda artışı ve p53 geni mutasyonu (Larsen 2010; Watts *et al.* 2014).

1.8. GBM Histopatolojisi

GBM; infiltratif, poli-morfik, atipik astrosit görünümü ve farklı hücre tiplerini ihtiva eden, çekirdek koyu ve aktif aktif bölünen, merkezinde nekrotik hücreler (çekirdeği parçalanmış ve hücre bütünlüğü bozulmuş), damarlı bir yapıya sahiptir.

GBM genellikle subkortikal bölgede ve özellikle parietal, temporal ve frontal lobun sınırlarında lokalize olur. Frontal lobda bulunan GBM türleri diğer loblarda bulunanlara göre daha benign yapılıdır. Corpus collusumda bulunanlar ise daha malign yapıda olup morbidite ve mortalitesi daha yüksektir. Bunun sebebi cerrahi açıdan daha hayatı ve derin bölgeleri işkâl etmesi aynı zamanda tümörün daha invaziv olmasındandır (Şekil 1.7) (Burger *et al.* 1986; Burger *et al.* 1988; Halperin *et al.* 1989). Metastaz nadiren görülür ancak başarısız bir cerrahi operasyon ile kanserli dokunun hasar görmesi sonucu beyin içi metastaz yapabilir.



Şekil 1.7. GBM doku kesiti

1.9. Tedavide Kullanılan Preparatlar

Günümüzde 70 yaşını geçmemiş GBM teşhisi konulan hastalarında cerrahi yöntem, ışın tedavisi ve kimyasal tedavi ile rutin olarak tedavi gerçekleştirilmektedir (Schijns *et al.* 2015). Genellikle operasyon öncesi deksametazon gibi glukokortikoidler semptomatik tedavi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Glukokortikoidler, damar geçirgenliğinin artması sonucu oluşan ödemi ve artan BOS'u dengelemeye yardımcı olur (Asgeirsdottir *et al.* 2008).

Tümörün yayılımını azaltmak, artan beyin içi basıncını düşürmek ve tümör tipine kesin tanı koyabilmek amacıyla GBM hastalarına cerrahi uygulanmaktadır. Cerrahi yönetime başvuruda dikkate alınacak hususlar; kanser kitlesine erişim, kanser lokalizasyonu, hayatı önem taşıyan nöronal çekirdeklere yakınlık, yayılım şeklidir (Shamisa *et al.* 2013). Ayrıca günümüzde kullanılan mikro-cerrahi sayesinde operasyon sırasında ki ölüm oranı %8'den %1,7'ye çekilmiştir (Brzowska *et al.* 2015; Yano *et al.* 2015). Beyaz cevher ve gri cevher sınırına lokalizasyonu sonucu metastatik bir görünüme bürünür (Pasqualetti *et al.* 2006). Ayrıca infiltratif ve 3 boyutlu görünüme sahip olması,

cerrahi yöntemle tamamen alınamaması, tedavinin başarısız olması ve GBM'in nüksetmesine neden olan sebeplerdendir (Simpson and Golanis 2006).

Işın tedavisi, cerrahi yöntemle tamamen alınamayan veya cerrahi erişimi zor olan vakalarda kullanılmaktadır. Verilen nükleer ışın dozu 45-70 Gy arasındadır. Cerrahi yöntemle kombine kullanıldığı zaman sağ kalım süresini ortalama 3-4 ay uzattığı tespit edilmiştir (Pedicini *et al.* 2014). Verilen yüksek ışın dozu beyin dokusunda tahrip ve nekroza neden olmakta, bu yüzden total verilen ışın 2 Gy'i, 6 haftada (haftada 5 gün, toplam 6 hafta) toplam 60 Gy'i geçmemektedir (Balducci *et al.* 2012; Hashem *et al.* 2012). Ayrıca tedavi seyrinde düşük ve yüksek Gy doz arasında anlamlı bir fark bulunmaması nedeniyle düşük doz Gy verilmesi tavsiye edilmiştir (Dos Santos *et al.* 2015).

GBM dağılımı ve cerrahi sonrası beyinin farklı bölgelerine yayılan tekli veya çoklu kanser hücreleri sistemik yolla verilen kemoterapi ve adjuvant terapisiyle yok edilmeye çalışılır (Lai *et al.* 2015). Günümüzde yaygın olarak temozolamid, karmastin, vinkristin, buvacimuzab tek veya birkaçı kombine olarak kullanılmaktadır (Hofland *et al.* 2014; van Linde *et al.* 2015). Temozolamid, sıklıkla kullanılan guanin rezidulerinin N-7 ya da O-6 pozisyonlarını alkiler ve metaller bir ajandır. Kanserli hücrelerde ilaç direncine neden olan MGMT (o-6-metilguanin-DNA metil transferaz) geninin ekspresyonunu baskılayarak etki gösterir (Welzel *et al.* 2015). Temozolamid eş zamanlı olarak ışın tedavisiyle kombine olarak kullanılır, başlangıç dozu günde 75 mg ve 200 mg'a kadar yükseltilir. Yan etki olarak kemik iliği baskılanması (trombositopeni) gözlemlendiği zaman doz düşürülür (Gebhardt *et al.* 2014; Yang *et al.* 2014).

Bu tedavilere rağmen sıkça nükseder. Bu nedenlerle kanser hücrelerinin moleküler patolojisini, direnç mekanizmalarını daha iyi anlama ve yeni teknolojik yöntemleri kullanarak kan beyin engelini (KBE) daha rahat geçen ilaçlar tasarımına yöneltilmekteyiz. Bu çabalara rağmen bu hastalığın tedavisi ve prognozu umut verici değildir ve sağ kalım süresi 12-15 ayla kısıtlıdır (ortalama 14 ay). Ayrıca 2 seneye

uzayan sağ kalım oranı %3,3 ve 3. sene için %1,2'dir (Scott *et al.* 1998; Dean *et al.* 2005; Stupp *et al.* 2005).

1.10. U-87MG Hücree Hattı

1966 yılında Kafkas'ya da yaşayan 44 yaşlarında ki bir hastadan izole edilmiştir. 44 kromozomu olan U-87MG hücreleri adherent yapıda ve epitelyal hücre görünümündedirler. Genetiğine bakıldığı zaman, 512 mutasyon (dislokasyon, delesiyon, insersiyon) gözlemlenmiştir (Clark *et al.* 2010).

1.11. Nanobilim

Nanoteknoloji ilk olarak 29 Aralık 1959'da Nobel ödülü alan Dr. Richard Feynman'ın katıldığı konferansta "altta çok boş yer vardır" sözünden doğmüştür. Dr. Feynman, atomların kuantum seviyesinde kontrol edilebildiğini öne sürmüştür (Dominiczak 2015).

Dr. Feynman, geleceğin bilim insanlarının atom ve molekülleri kullanarak daha kompleks yapılar ortaya çıkarabileceklerini öne sürmüştür. "Nanoteknoloji" terimi ilk defa 1974 yılında Dr. Norio Taniguchi adındaki bir Japon bilim insanı tarafından mikrometre ve nanometre arasındaki ayrışımı yapmak için kullanılmıştır.

1981-1986 yılları arasında Gerd Binnig ve Heinrich Röhrer'in taramalı tünelleme mikroskobu (TTM) icat etmeleri sırasında, atomik kuvvet mikroskobu (AKM) icat edilmesiyle birlikte Curl Kroto ve Smalley tarafından Fulleren'lerin keşfi, bilim insanlarına nano ölçekteki yapıları manipüle edip görüntülerini alma şansını tanımıştır (Jackson 1997; De Santo *et al.* 2009). 2002 yılında ABD de Nanoteknoloji enstitüsü kuruldu ve nanoteknoloji anahtar sanayii olarak belirlendi. Hemen hemen gelişmiş tüm ülkelerde nanoteknoloji alanı, devletlerin araştırma ve geliştirme programlarında özel bir alan olarak yerini almıştır.

Nanoteknoloji tek bir alan ve disipline özel değildir ve bünyesinde farklı disiplinler barındırmaktadır. Bunlar başlıca; biyoloji, kimya, elektronik, fizik ve mühendislik alanlarından ibarettir.

1.11.1. Nanoteknolojinin uygulama alanları

1. Tıp (teşhis, tedavi, ilaç taşıyıcı sistemler, görüntüleme, doku mühendisliği)
2. Çevre (filterayson)
3. Enerji (enerji tüketimini azaltma, geri dönüşümlü piller, enerji üretim verimliliğinin artırılması)
4. Bilgi ve iletişim (bellek depolama, yeni yarıiletken cihazlar, yeni optoelektronik cihazlar, ekranlar, kuantum bilgisayarlar)
5. Ağır Sanayi (roket, katalizler, inşaat, metal)
6. Tekstil
7. Kozmetik
8. Tarım

Nanoteknolojinin tıp alanındaki uygulama alanı olan Nanotıp; çeşitli hastalıkların teşhisi, tedavisi ve önlenmesinde kullanılan nano düzeydeki materyal, yöntem ve cihazları kapsamaktadır. Nanotıp'ın başlıca alanları nano görüntüleme ve diagnostik preparatlar, rejeneratif tıp, ilaç taşıyıcı sistemler ve akıllı hedeflendirmelerdir (Cao *et al.* 2005; Saha 2009). Nanotıp; malzeme, bileşen, aygıt/araç ve yeni sistemleri moleküler ve atomik ölçekte yapılandırarak yeni nesil uygulamalar ve kullanılabilir yeni ürünleri ortaya çıkarmayı hedeflemektedir (Freitas 2005; Moghimi *et al.* 2005).

Nanotıpın yanında getirdiği artılar; multifonksiyonel nanoterapötik üretimi, aynı sistem içerisinde farklı hedefleme sistemleri, akıllı ve kontrollü ilaç salımı, işaretleyici moleküllerin tasarlanması ve tedavinin takibi gibi çeşitli alanlarda yararların sağlanabilmesidir (Sumer and Gao 2008). Hedeflenmesi gereken organa spesifik olarak ilaç taşınması için ilaç tasarımı günümüzün en önemli sıkıntısı haline gelmiştir. Vücutta normal olarak bulunan bariyerler, kan dolaşım sistemi, farklı organ özellikleri ve ilacın

lokalizasyonu aşılması gereken sıkıntılardan bazılarıdır. Ancak Nanotıp teknolojisiyle tasarlanıp üretilen ilaç yan ve toksik etkilerinin azaltılması ve aynı zamanda görüntülenmesini sağlayan birçok fonksiyonel nanosistemlerin geliştirilmesine ön ayak olmuştur. Tasarlanan nanosistemler arasında lipozomlar, miseller, nanoemülsiyonlar, polimerik ve lipit nanopartiküler sistemler, sıvı kristaller, nanokristaller, dendrimerler en popüler olanlarıdır (Sumer and Gao 2008; Saha 2009).

Nanosistemler yardımıyla hidrofilik ve hidrofobik ilaç etkin maddelerini, farklı proteinleri, aşılarda kullanılan antijenleri, biyolojik makromolekülleri vb. Maddelerin yeniden yapılandırılıp enkapsüle edilerek etkin bir şekilde taşıyabilmektedir. Farklı sistemlere örneğin tümör dokularına, damar ve lenfatik sisteme, akciğerlere, karaciğere, dalağa ve beyne özel hedeflendirilme ve istenilen süre boyunca dolaşımında kalmaları sağlanabilmektedir.

Diğer taraftan hassas olan ve hayati önem taşıyan organlarda özellikle santral sinir sisteminde ilaç taşıyıcı sistemler daha da ön plana çıkmaktadır. Biyolojik bariyerleri geçmesi zor olan ve yan etki bakımından sıkıntılı olan etkin maddeler için nanosistemler büyük değer taşımaktadır (Youan 2008; Farokhzad and Langer 2009).

1.11.2. Nanopartiküler sistemler

Biyoparçanabilme Nanopartiküller sistemler ilaç taşınımı için ideal sistemlerdir (Brigger *et al.* 2002; Panyam and Labhasetwar 2003). Nanopartiküller, 10–1000 nm boyutlarında olan, enkapsüle/adsorbe halde etkin madde içeren katı kolloidal partiküllerdir (Lamprecht *et al.* 2001, Panyam and Labhasetwar 2003).

Nanopartiküler sistemler çoğunlukla lipid veya biyoparçalanabilir polimer kullanılarak hazırlanabilirler. Farklı özelliklerdeki etkin maddelerin yanı sıra, proteinler/peptitler, genetik materyallerin ilgili hedef dokuya hedeflendirilmesi amacıyla nanopartiküler sistemlerden faydalanılmaktadır (Moghimi *et al.* 2001).

İlaç taşıyıcı sistemlerde çok yaygın olarak kullanılan taşıyıcı sistem polimerik taşıyıcılardır ama bunların yanı sıra: nanokapsüller, miseller, konjugatlar ve nanokompozitler de farklı etkin maddeler ve ajanlar için formüle edilmiştir (Lamprecht *et al.* 2001; Moghimi *et al.* 2005; Farokhzad and Langer 2009; Saha 2009).

1.11.3. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Doğal ve biyolojik olarak parçalanan/parçalanamıyan sentetik polimerler nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Albümin, poli-akrilamid ve poli-metil metakrilat, PLGA nanopartikül hazırlanmasında kullanılmıştır. Biyolojik olarak parçalanmayan nanoparçacıklar vücutta toksik etki yaparlar ve protein temelli polimerler de alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedirler. Ayrıca sentezlenen polimerlerde bazen toksik özellikteki olan monomerlerin birikmesi gözlemlenmiştir. Bu nedenle, farklı özellikli doğal polimerlere yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Vyas *et al.* 2006).

Nanopartiküllerin hazırlanmasında en önemli parametrelerden biri yüzey modifikasyonudur (yüzey alanının geniş olması veya farklı materyallerle kaplanması). Artırılmış yüzey alanı nanoparçacıklar da aynı zamanda hem avantaj hem de dezavantaj olarak ortaya çıkabilmektedir. Artırılan yüzey alanı üretim sırasında parçacıkların agrege olmasına neden olur veya yüzeyi modifiye nanopartiküler sistemler immün sistem uyarılmasını engeleyebilmektedir. Örneğim polietilen glikol (PEG) ile yüzey modifikasyonu, parçacıkların fagositler tarafından tanınamamasına yol açar ve bu yüzden nanoparçacıklar kan dolaşımında uzun süre kalabilmesine olanak sağlar (Gref *et al.* 1995; Illum *et al.* 2001; Hinkley *et al.* 2015).

Farklı amaçlarla nanopartiküllerin hazırlanmasında dekstran, kitosan, PLGA ve albümin gibi polimerler kullanılmaktadır (Couvreur *et al.* 2002; Vlaardingerbroek *et al.* 2015).

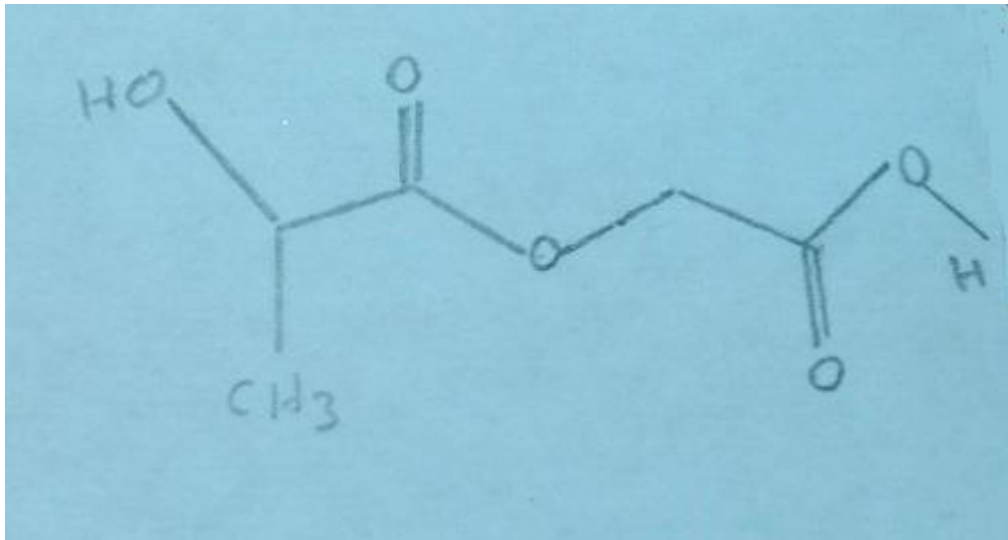
Polimer örnekleri

1- Sentetik polimerler Poli laktid, PLGA, Poli ϵ -kaprolakton, Poli izobütillsiyanoakrilat, Poli izoheksilsiyanoakrilat, Poli n-bütillsiyanoakrilat, Poli akrilat, Poli metakrilat

2- Doğal polimerler Kitosan, Aljinat, Jelatin, Albümin,

1.11.4. PLGA

Bioparçalanır polimerler uzun süreli veya kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar. PLGA parçalandıktan sonra laktik asit, glikolik aside yani biyomoleküllere dönüşür, bu yüzden ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 1.8) (Bao *et al.* 2015; Feng *et al.* 2015; Zhu and Braatz 2015).



Şekil 1.8. PLGA'nın kimyasal yapısı

PLGA, laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin polimerizasyonu sonucu üretilmektedir. Polimeri oluşturan monomerlerin farklı oranlarda karıştırılarak değişik molekül ağırlığında, farklı fiziko- kimyasal özelliklere sahip PLGA polimeri elde edilebilmektedir (Cooper and Harirforoosh 2014; Mariano *et al.* 2014; Yang *et al.*

2014). Bu özelliği kullanarak hastalığa bağlı ilaç salım sistemleri modifiye edilebilmektedir (Okada and Toguchi 1995; Andres *et al.* 2014; Ryu *et al.* 2014). Örneğin yüksek oranda glikolid içermesi ve molekül ağırlığının düşük olması parçalanma oranını ve hızını artırmaktadır (Okada and Toguchi 1995).

PLGA FDA tarafından insanlar üzerinde kullanımının onaylı olması, üretimlerinin kolaylığı ve karakteristiklerindeki çok yönlülükten dolayı polimerik taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. PLGA nanopartikülleri hidrofilik ve hidrofobik etkin maddeleri için uygun taşıyıcı sistemlerdir (Li *et al.* 2014; Yin *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015).

PLGA nanopartikülleri; oral, intravenöz, inhalasyon yoluyla uygulanabilmektedir. PLGA nanopartikülleri damar yoluyla sistemik olarak uygulandığı zaman RES (Reticular Endotelyal System) karaciğerde bulunan fagositik hücreler tarafından sistemik dolaşımdan uzaklaştırılır ama hücrelere geldiği zaman endositoz yoluyla alınmakta ve sitoplazmada toplanmaktadır. Vücutta metabolitlerine ayrıldıktan sonra sitrik asit döngüsüne girer ve CO₂ ve H₂O moleküllerine ayrıştırılır. Glikolik asidin fazlası ise böbreklerden itrah edilir (Panyam and Labhasetwar 2003; Li *et al.* 2006).

1.11. Metformin

Metformin (MET) [2- (N,N-dimethylcarbamidoyl)guanidine] (Şekil 1.9) rutin olarak diyabet tedavisinde kullanılmaktadır ve “*Galega officinalis*” isimli bir bitkiden elde edilir. Karaciğerde glikoz yapımını arttırmanın yanı sıra kas ve yağ dokusuna glikoz alımını artırır (Bailey and Turner 1996). Glikoz transporterleri olan GLUT-1 ve GLUT-4’ün seviyesini ve ekspresyonunu artırmaktadır (Llanos *et al.* 2015; Mishra *et al.* 2015).

LDL-K'yi (Low Densiti Lipo Protein Colestrol Seviyesini) azaltıcı ve HDL-K (High Densiti Lipo Protein Colestrol Seviyesini) arttırıcı etkisi vardır (Kendall *et al.* 2006; Matsuki *et al.* 2009).

Metforminin, oral alınımıyla birlikte ince bağırsaktan %50-60 oranında emilir ve ortalama 2 saat içinde en yüksek plazma seviyesine ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanmadığı için sadece böbrekten atılır ve vücudun başka bölümlerinde metabolize edilemez. Vücuttan atılım süresi 24-36 saattir. Sadece böbreklerden atıldığı için böbrek yetmezliği olan hastalarda kullanılmamalıdır (Pongwecharak *et al.* 2009; Lu *et al.* 2013).

1.11.1. Metformin hidroklorür genel özellikleri

Molekül Formülü: C₄H₁₁N₅HCl

Molekül Ağırlığı: 129,16 g/mol dür.

İçerik: C 37.20%, H 8.58%, N 54.22%

Erime Noktası: 223-226°C

UV Maksimum: 234 nm

Görünüm: Beyaz toz

Çözünürlük: Suda çözünür

Saklama Koşulları: Nem ve ışıktan korunarak saklanmalıdır (Windholz 1984; Jackson *et al.* 1986).

1.11.2. Metformin'in farmakodinamisi

- 1- Bağırsaktan emilen glikoz seviyesini düzene sokar (Gallwitz 2015).
- 2- GLUT-1 GLUT-4 proteininin sentezini arttırır ve glikozun çevre dokulara girişini artırır (Edgerton *et al.* 2009).
- 3- Metforminin anti kanser etkisi GLUT-4 ve AMPK (AMP-Activated Protein Kinaz) üzerindedir (Garrido *et al.* 2015; Llanos *et al.* 2015; Yokokawa *et al.* 2015; Rattan *et al.* 2012).

4- Yağ asitlerinin esterleşmesini arttırarak lipolizi baskılar (Giannarelli *et al.* 2003; Ohira *et al.* 2007).

1.11.3. Metforminin antineoplastik etkisi ve mekanizması

Metformin; AMP (Adenozin mono fosfat)'yi aktive eder ve fosforilasyonla aktif hale gelen AMP kinaz (AMPK); glikoz ve lipid metabolizmasını regüle eder (Krentz and Bailey 2005). Normal hücrelerde AMPK merkezi bir enerji sensörü olarak monofosfat/adenozin trifosfat oranını kontrol ederek adenozinin artışını sağlar (Chung *et al.* 2015).

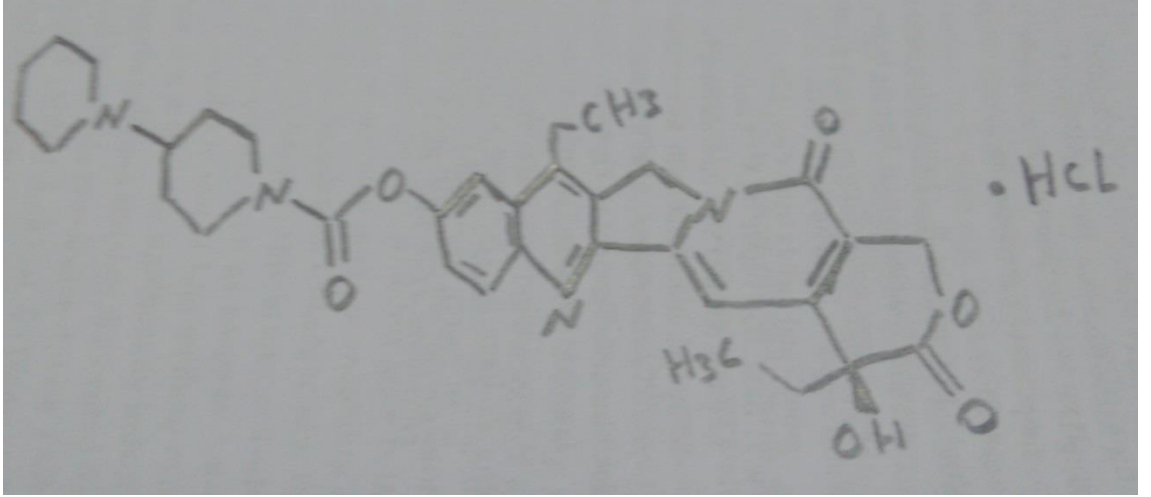
AMPK aktivasyonu fizyolojik olarak besin yoksunluğunda gerçekleşir ve enerji tüketen yollar ve organeller baskılanır. Enerji üreten organellerin uyarmasıyla, adenozin trifosfat üretimi yapılır (Shaw *et al.* 2004).

AMPK büyüme faktörü olan ‘‘mamalian Target Of Rapamisin’’ (mTOR) en önemli düzenleyici ajanlardan biridir. Ayrıca mTOR farklı faktörleri kontrol etmektedir. Bunlar: S6K1 (ribozomal S6 kinaz; hücre metabolizması), HIF1a (hipoksi indüklenebilir faktör 1a), c-Myc (hücre döngüsünde ve hücre sel iletimde rol alan düzenleyici gen dir ayrıca anjiogenezden de sorumludur) ve CCND1 (cycline D1; onkogendir) (Aguirre *et al.* 2004; Guertin and Sabatini 2007). IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü), IR (insülin reseptörü) ve HER2 aracılı sinyalleri engeller (Jalving *et al.* 2010).

1.12. İrinotekan

İrinotekan, ‘‘Kamptotesin’’ ağacından elde edilir. Etkin maddesi suda rahatça çözünür ve kansere karşı kullanılan etkili bir ilaçtır (şekil 1.10). Çin ve Tibet'in normal yeşil florasında yetişmektedir. DNA'nın replikasyonunda işlev yapan topoizomera z 1 enzimini seçici olarak baskılar ve bu da tek zincirdeki DNA kırıklarının birleşmesini engeller. Rutin olarak metastatik kolorektal kanserleri olan hastaların tedavilerinde kullanılmaktadır (Wiseman and Markham 1996; Oostendorp *et al.* 2010).

İrinotekan, karboksiesterazlar vasıtasıyla 1000 kat daha güçlü olan SN-38 adlı metabolitine dönüşür (Ramesh *et al.* 2010). SN-38 UGT1A1 karaciğer enzimi tarafından glukuronidasyon ile metabolize edilir. İrinotekan'ın yan etkileri genel olarak diyare, kemik iliği baskılanması, bulantı, kusma ve alopesi'den (saç dökülmesi)'den ibarettir.



Şekil 1.9. İrinotekan maddesinin kimyasal yapısı

İrinotekan, hücrel topoizomeraz-I kompleksleriyle etkileşime girer ve S-Fazını spesifik olarak sito-toksitesisi etkisi gösterir (Liu *et al.* 2000). Topoizomerazlar; tamir rekombinasyonu, replikasyon ve transkripsiyon gibi hayati hücrel işlemlerin gerçekleştiği DNA bölgelerindeki katlanmalarını ve süper sarmal oluşturmalarını redükler. Topoizomerazlar DNA'nın fosfodiester bağlarını açar ve tekrar birleştirirler. Aynı zamanda DNA çentiğinden tek ya da çift zincirli DNA'nın oluşmasına öncülük eden kovalent enzim-DNA bağı oluştururlar. Topoizomeraz-I tek zincir DNA kırıklarına bağlanır ve geri dönüşümlü olarak ayrılabilir. Topoizomeraz-I irinotekan kompleksi, kendi başına hücreler için ölümcül değildir. Fakat ilerleyen replikasyon çataları ile olan çarpışmaları; DNA çift zincir kırıklarını meydana getirir ve geri dönüşümsüz replikasyon çatalı tutuklanmalarına ve hücre ölümlerine yol açarlar. Bu çarpışmaların bir başka sonucu da; S-Fazı kontrol noktası mekanizmasına zarar veren DNA hasarına işaret eden G2 fazı tutuklanması/gecikmesi ile de sonuçlanır. İrinotekanın daha yüksek konsantrasyonları, S-fazında olmayan hücreleri de öldürür. Bu

S-fazında olmayan hücrelerin ölüm mekanizmaları; transkripsiyonel DNA hasarı ve apoptoz mekanizmaları olarak görünmektedir.

Bu çalışmada, metformin-yüklü/irinotekan-yüklü PLGA NPs'ni ve saf maddelerin kendilerini tek veya kombinasyonları kullanılarak in-vivo ve in-vitro olarak 4. seviye glioblastoma soyu olan U-87MG hücreleri üzerinde etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Bunun için in-vitro olarak hücre toksisitesi hem kanser hem de nöronda araştırılmıştır. Olumlu sonuç alındıktan sonra in-vivo olarak Sprague Dawley sıçanlarda kanser modeli oluşturularak, patolojik araştırma yöntemi olan "cavalier Principle" ile kanser alanları ölçülmesi planlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Glioblastoma multiforme en sık görülen beyin kanser türüdür. Bu hastalığa geliştirilmiş mevcut tedavilerin cevap oranları ise çok düşüktür. Şu an gliomalar içerisinde en tehlikeli olanıdır. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi birlikte olmasına rağmen cevap oranları tatmin edici düzeyde değildir. Bu alanda yeni ilaçların yeni moleküllerin/yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin acil olarak geliştirilmesi gerekmektedir.

Metformin tip 2 diyabet tedavisinde kan şekeri seviyesini düşürmek için yaygın kullanılan biguanid grubu bir ilaçtır. Kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmesi, apoptotik ve konsantrasyona bağlı anti proliferatif etkilerinin olması bilim insanlarına beyin kanserlerinde etkisinin olup olmayacağı sorusunu sordurmuştur. Hatta tip 2 diyabet hastalarında kanser insidansının düşük olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2011). Skuli N'nin 2015 yılında yaptığı çalışma gibi bazı araştırmalarda artık bu sorunun cevabı araştırılmaktadır. Apoptozu indüklemelerinden dolayı kolorektal kanserlerde, göğüs kanseri, over kanseri, prostat tümörlerinde ve hepatoselüler kanserlerinde de tedavi edici yönleri gösterilmiştir (Ben Sahara *et al.* 2008; Xiong *et al.* 2012).

Metforminin apoptotik etkisinin mitokondrideki Bcl-2 ailesinde ki proteinlerin değişiminden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Metformin yüksek yağ oranları nedeniyle oluşan kalp hücre ölümünü seramit sentez inhibisyonuyla azalttığı söylenmektedir. Son zamanlarda metformin tedavisi AMPK fosforilasyonuna onunda mTOR ve p70S6K sinyal yollarının supresyonuna yol açtığı bildirilmektedir. Bu yolların supresyonunun hücre proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Bolster *et al.* 2002). mTOR “down” regülasyonunu mRNA translasyon ve protein sentezi azaltmasıyla gözlenen anti-neoplastik etkilerde açıklanabilmiştir. Metformin kullanılan bazı hastalarda önemli yan etkileri olan saç kaybı, kilo kaybı, disfori (depresif duygu durumu) ve letarji (uyku durumu) gibi yan etkiler görülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Hücre kültürü cihazları

Sıra	Cihaz
1	İnkübatör: su ısıtmalı Co ₂ inkübatör, 37 c, %5 Co ₂ , %95 nem
2	Santrifüj: Allegra X-30R +4c 1200 rpm
3	Kabin: class I hepa filtreli tek kişilik
4	Otoklav: Lica
5	+4, -20 ve -80 buz dolaplar: Nu Aire
6	İnvert floresan mikroskop: Leica ebq 100-04
7	Distilatör: mega home MH943
8	Spectrofotometre: BİOTEK
9	Çalkalayıcı: Heidolph Titramax 100

3.1.2. Sarf malzemeler

Sıra	Sarf malzeme
1	Mikro pipet ve üç 1cc, 200 µl, 10 µl
2	Petri kabı
3	Gazlı bez
4	Povi iyodin
5	%70 metiol alkol
6	Pastör pipet
7	14-50 cc falkon
8	96 ploystyaren poly lisine kaplı plate
9	0.22 µm PVDF filtre
10	Pamük

3.1.3. Cerrahi için gereken malzemeler

Sıra	Cerrahi malzemeleri
1	Cerrahi önlük, maske ve bone
2	Cerrahi masa örtüsü
3	Pens dişli ve diş siz: ROBOZ, USA
4	Çift tarafı şarp makas, şarp blunt makas, blunt blunt makas: ROBOZ, USA
5	Beyin kaşığı ve spatul: ROBOZ, USA
6	Kan tıkaçı: ROBOZ, USA
7	Bisturi 15, 20 ve 24 no ve 3-4 nolu bisturi tutacağı
8	Dikiş ipliği: kat-gut 3/0 ve poly amid 3/0

3.1.4. Sıçan kanser modeli için gereken kimyasallar ve cihazlar

Sıra	Rat modeli gereçleri
1	Yetişkin erkek Spague Dawley
2	Sterotaksi cihazı
3	Matkap
4	Hamilton enjektörü
5	Cyclosporine ilacı
6	Sevofluran
7	Seftriakson

3.1.5. Nöron kültürü

Bir günü dolmamış sprague Dawley sıçan yavrusu. NBM (Neuro Basal Medium sigma gibco 21103-049), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (Fetal bovin Serum sigma aldrich MFCD00132239), Supplement B27 (life technology 12587-010), Trypsin (sigma aldrich no MFCD00130286).

3.1.6. U-87MG kültürü

DMEM, FBS, Penisilin – Streptomisin, amphotricin B (life technology gibco 15240-062), %1 L-Glutamine (life technology 25030-081).

3.1.7. MTT sitotoksisite testi

MTT [3- (4,5- Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid] tozu: sigma aldrich, No: MKBR4419V

MTT solüsyonu hazırlama: 5 mg toz halinde olan MTT 1 cc arınık PBS ilave edilir ve çözüldükten sonra filtre edilerek (0.22 µm'lik) kullanılır.

DMSO (dimethyl sulfoxide): MTT çözeltisi olarak kullanıldı. sigma aldrich, No: W29A015 96

3.2. Metformin HCl Yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Metformin HCl-yüklü PLGA nanopartikülleri Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı tarafından hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Özetle, 150 mg PLGA etil asetat içerisinde çözüldürülmüştür. Organik faz, metformin HCl'yi içeren %3'lük sulu PVA çözeltisine enjektör yardımıyla damlatılırken ultrasonik prob (%60 güç, 15 dakika) kullanılarak karışımın homojenizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra rotavapor kullanılarak (45°C, 30 dakika) organik çözücü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süspansiyona 5000 rpm'de 5 dakika (15°C) ön santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant alınarak 13500 rpm'de 50 dakika (15°C) santrifüj edilmiş ve elde edilen çökelek saf su içinde süspand edilmiş ve dondurulduktan sonra 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir.

3.2.1. İrinotekan yüklü-PLGA nanopartiküllerin hazırlanması

İrinotekan HCl-yüklü PLGA nanopartikülleri de Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı tarafından hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Özetle, 50 mg PLGA diklorometan içerisinde çözüldürülmüş ve bu çözeltiye irinotekan maddesinin çözeltisi (asetonitril içerisindeki) damla damla ilave edilmiştir. Hazırlanan bu organik faz, %3'lük (a/h) PVA sulu çözeltisine enjektör yardımıyla damla damla eklenirken ultrasonik prob (%60 güç, 9 dakika) ile homojenizasyonu sağlanmıştır. Bu işlemin ardından rotavapor kullanılarak (45°C, 15 dakika) organik çözücü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon için 5000 rpm'de 5 dakika (15°C) önsantrifüj yapılmış ve süpernatant alınarak 13500 rpm'de 50 dakika santrifüj

edilmiştir. Oluşan çökelek ultra saf su ile yeniden süspande edilmiş ve 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir.

3.2.2. Hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Hazırlanan nanopartiküllerin şekilleri ve yüzey özellikleri SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Formülasyonlar, altın ile kaplanarak incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Zetasizer 3000 HS cihazı kullanılarak saptanmıştır. Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarları valide edilmiş UV-VIS yöntemi (metformin miktarı 232 nm dalga boyunda; irinotekan miktarı ise 221 nm dalga boyunda) kullanılarak saptanmış ve nanopartikül formülasyonları için % yükleme etkinliği ve % yükleme kapasitesi değerleri hesaplanmıştır. Nanopartiküller için in vitro salım çalışmaları diyaliz torbası (molekül büyüklüğü geçirgenlik sınırı (MWCO) 14000 Da) yöntemi kullanılarak fosfat tamponu (PB) pH 7.4 içerisinde yatay çalkalayıcı su banyosu ($37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 50 rpm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında salım ortamlarından örnek alınmış ve alınan örnek yerine aynı hacimde taze ortam konmuştur. Alınan örnekler, 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda etkin madde miktar tayini UV-spektrofotometrik yöntem kullanılarak (metformin miktarı 232 nm dalga boyunda; irinotekan miktarı ise 221 nm dalga boyunda) gerçekleştirilmiştir.

3.3. Deney Hayvanları

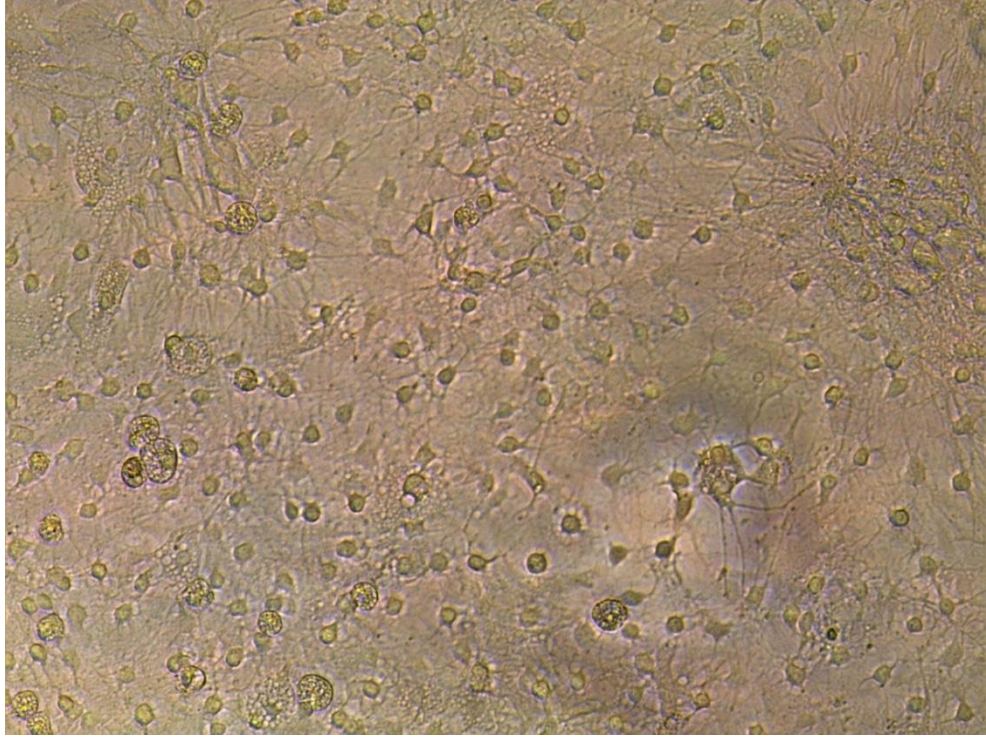
Bu çalışma Atatürk üniversitesi tıbbi deneysel araştırma merkezinde etik kurallar çerçevesinde temin edilmiş doğumunun 24 saati dolmamış Spargue Dawley cinsi Rat deney hayvanlarından yapılmıştır. Bu deney de 9 yavrusu (3 hayvan 3 tekrar) ve 154 yetişkin deney hayvanı etik kuralları çerçevesinde kullanıldı. Hayvanlar hızlı bir şekilde dekapite edildi ve deney de kullanılmak üzere 9 yavru dan nöron hücreleri alınıp kültür ortamında yaşatıldı ve yetişkin olan ratlar anestezi altında dekapite edildikten sonra formaldehit de patolojiye gönderildi. Bu çalışmaların uygun olduğu "Atatürk

Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul” tarafından verilen 20.12.2013 tarihinde ve 42190979-01-02/5815 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

3.4. Hücre Kültürü

9 adet yeni doğan rat yavrusu alındıktan sonra batekonla yıkandı. Steril petri kabına alınıp hızlı bir şekilde dekapite edildi (Buyukokuroglu, Gepdiremen *et al.* 2003). Kafa gazlı beze alındıktan sonra önce deri sonra kafatası ince makasla açılır. Beyin kaşığı yardımıyla korteks alınır ve 2 cc DMEM solüsyonu bulunan tüpe koyuldu. Tüm korteksler toplandıktan sonra dibe çökmüş beyinler petri kabına alınır ve çift bisturi yardımıyla 20 dakika boyunca hafif dokunuşlarla parçalanır. Bu işlemle makro parçalanma bittiği için mikro parçalama aşamasına geçilir. Tekrar DMEM solüsyonuna alınan parçalanmış korteks üzerine ¼ oranında trypsin EDTA ilave edilir ve 30 dakika etüvde bekletilir (Sengul *et al.* 2011).

Alınan hücreler 3 defa 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir ve her seferde üst sıvısı atılır ve yeni medyum koyularak santrifüj edilir. Elde edilen saf nöron hücreleri hazırlanan nöron solüsyonuna NBM, 1/10 FBS, 1/50 B27, 1/1000 antibiyotik konulur her kuyucuk başına 1×10^5 hücre 96’lık poly lysine kaplı poly styren kaplarda ekilir. Düzenli olarak her üç günden bir hücreler kontrol edilip medyum değişikliği yapılır (Şekil 3.1).

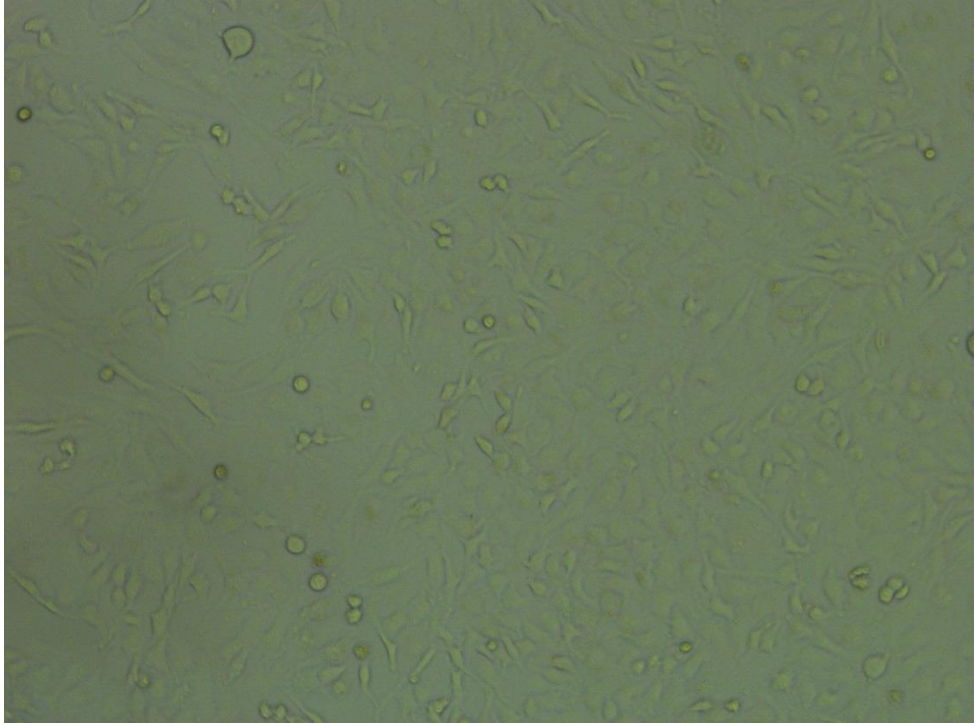


Şekil 3.1. Nöron kültürü görüntüsü

3.5. Kanser Kültürü

U-87MG kanser hattı Van üniversitesinden temin edildi. Krayo falkonlarda gelen hücreleri seri şekilde normal oda sıcaklığında çözündürülür. Sıvı hale gelen hücre ve medyum 2 cc yeni medyumla karıştırılarak 1200rpm +4 dereceli santrifüjda 5 dakika boyunca santrifüjlanır. Dibe çöken hücrelerin üstü atılarak yeni medyum (DMEM, 1/ FBS, %1 antibiyotik (pensilin-streptomisin-amfotrisin B), %1 L-Glutamat) la karıştırılır ve 25 cm² flaskda ekildi. Her 3 günden bir medyum değişikliği uygulandı. Hücreler flaskın %70'ini kaplanınca pasaj işlemi yapıldı. Bunun için hücrelerin medyumu atılarak uzaklaştırılır (Wang, Sun *et al.* 2015). Flask steril PBS (Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen) ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm²'lik flaskda 0,4 cc Tripsin/EDTA eklendi ve enkübe ederek 5 dakika hücreleri kaldırılması için zaman tanındı. 1:1 oranında FBS ilave edilir ve flaskın solüsyonunda yüzen hücreleri steril tüpe alarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet oluşturan hücrelerin, üst sıvısı atıldıktan sonra yeni medyum ilave edilir ve 96'lık plate 100 µl gelecek şekilde ekim

işlemi yapıldı ve hücre dağılımının homojen olmasına özen gösterildi. Toma camıyla, her kuyucuk başına 1×10^5 hücrenin geldiği saplandı. Platler 37 derece, %5 CO_2 enkabatorde tutuldular (Şekil 3.2) (Youn *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2015).



Şekil 3.2. U-87MG hücrelerin görünümü

3.6. MTT ile Sitotoksite Testi

Metformin ve irinotekan'nin hücreler üzerindeki sitotoksite düzeylerini saptamak amacıyla MTT testi kullanıldı (Çizelge 3.1).

Bekleme süresi sonrasında yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak farklı konsantrasyonlarda saf etkin maddeleri (Metformin ve İrinotekan)/ metformin PLGA NPs/ irinotekan PLGA NPs/ boş PLGA NPs (kontrol)'ni içeren besiyerleri eklendi. İlaçların etkisini görmek için, 48 Saat kuyucuklarda hücrelere maruz bırakılmıştır.

Çizelge 3.1. İn-vitro deneyi için kullanılan dozlar

Deney grupları	Dozlar
Kontrol	-
PLGA kontrol (Boş NPs)	-
İrinotekan	1 µm
İrinotekan	10 µm
İrinotekan	100 µm
Metformin	0.25mM
Metformin	0.5mM
Metformin	1mM
Metformin	2mM
İrinotekan PLGA NPs	1µm
İrinotekan PLGA NPs	10 µm
İrinotekan PLGA NPs	100 µm
Metformin PLGA NPs	0.25mM
Metformin PLGA NPs	0.5mM
Metformin PLGA NPs	1mM
Metformin PLGA NPs	2mM

Bunların yanı sıra kontrol amaçlı ilaç verilmeyen kuyucuklara ilacın çözücüsünden aynı oranda uygulandı. Hazırlanan farklı ilaç konsantrasyonlarının her biri için en az 6 kuyucuk kullanıldı. Deneyin süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri 90 µl tamamlanır, daha önce hazırlanan MTT solüsyonu (5mg/ml) 10µl kuyucuklara ilave edilir ve toplam hacim 100 µl tamamlandı. Platler 37°C’de, %5 CO2’li etüvde 4 saat bekletildi. 4 saat dolduktan sonra kuyucukların sıvısı alındı ve yerine 100 µl DMSO eklendi.

4 saatlik süre bittikten sonra spektrofotometre cihazında 570 nm dalga boyunda okundu.

Spektrofotometrik analiz: Spektrofotometrede boş ve hücre içeren kuyucuklardan elde edilen veriler Spss 17 programında değerlendirildi.

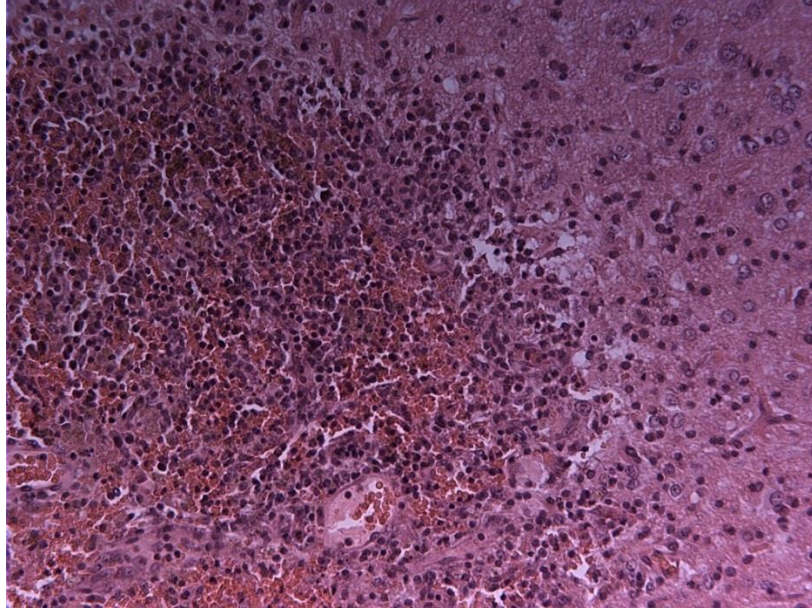
3.7. İn-vivo Deneyi

3.7.1. GBM sıçan modeli

156 adet Sprague Dawley sıçan cinsi 200-240 gr arasında Atatürk üniversitesi deney hayvan merkezinden temin edilmiştir. Bu çalışmada 13 deney grubu, her grupta 4 hayvan ve 3 tekerrür de yapıldı. Etik kuralları çerçevesinde yapılan bu çalışmada, modeli oluşturmadan 48 saat önce hayvanın bağışık sistemini çökertmek için Siklosporin ilacı 2 defa 24 saattan bir gavaj yardımıyla verilmiştir.

Hayvanlar sevoflurana maruz bırakıldıktan sonra stereotaksi cihazına bağlandılar. Beyinin üst kısmı batekonla dezenfekte edildi. Bir bisturi ve ince üçlü makas yardımıyla ense kısmından göz hizasına kadar açıldı ve iki pens yardımıyla deri aralandı.

Bregma noktasına göre X -1mm, Y 2.5mm ve Z 3.8mm eksenlerine ayarlandı. Girilecek nokta belirlendikten sonra dirille kafatasında ufak bir delik açıldı. Pasajlanmış hücreler Hamilton enjektörüne alınır ve 5 dakika boyunca yavaş yavaş 1 milyon hücre bölgeye enjekte edilir. Enjeksiyon sonrası kafatası tekrar dezenfekte edildi ve katgüt 3/0 ipliğiyle dikildi. Hayvanlara serbest su ve yem verildi ve 3 gün boyunca batekonla yaralara pansuman uygulandı. Deneyin oturup oturmamasından emin olmak için 7'inci gün rastgele 2 havan seçildi ve beyini alınarak patolojiye gönderildi. Kanserin var olduğu ispat edilmiştir. Deneyin 15'inci gününde hayvanlar tekrar bayıltıldı ve kafatasının aynı koordinatlarından 1 doz 50 µl saf etkin maddeler ve NPs formülasyonları verilmiştir (Çizelge 3.2) (Şekil 3.3-3.4).

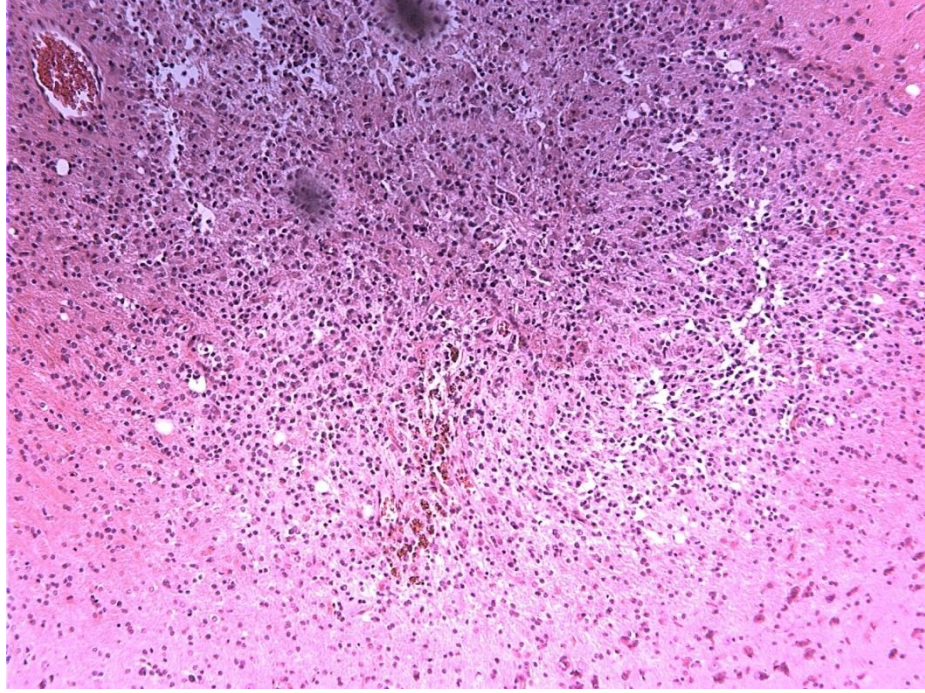


Şekil 3.3. Kanserin histopatoloji görüntüsü

48 saat ilacın enjeksiyonundan sonra, etik kurallar çerçevesinde hayvanlar hızlı bir şekilde dekapite edildiler ve örnekler 10/100 formaldehite konuldu ve patolojiye gönderilmiştir.

Çizelge 3.2. İn-vivo deneyi için kullanılan dozlar

Deney grupları	Dozlar
Kanser Kontrol	-
Normal Kontrol	-
PLGA Kontrol	-
Metformin	30 mM
Metformin PLGA NPs	30 mM
İrinotekan	100 μ M
İrinotekan PLGA NPs	1000 μ M
Metformin	300mM
Metformin PLGA NPs	300mM
İrinotekan	1000 μ M
İrinotekan PLGA NPs	1000 μ M
İrinotekan PLGA NPs +Metformin PLGA NPs	100-30 μ M-mM
İrinotekan PLGA NPs +Metformin PLGA NPs	1000-300 μ M-mM



Şekil 3.4. Kanser yayılım görüntüsü

3.7.2. Patoloji

Örnekler, alkol prosedüründen sonra parafine gömüldüler. Parafin kalıpları mikrotom cihazıyla 0.5 μ kalınlığında kesitler alınarak lam üzerine alındılar ve hematoksinin eosin boyasıyla boyandılar. Patolojik örneklerin hazırlanması için her 10 kesitten 1 tane alındı, toplam 29 adet lam elde edildi. Elde edilen lamlar histoloji bölümünde $\times 10$ ve $\times 20$ büyüteçlerinde Cavalier yöntemiyle μm olarak ölçüldü. Tüm ölçümler tamamlandıktan sonra tümörün 3D alan hesaplaması aşağıdaki formülden yapıldı.

$$2D\mu\text{m}\times 10 \text{ kesit}\times 5\mu\text{m} \text{ kalınlık} = 3D\mu\text{m}^2$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

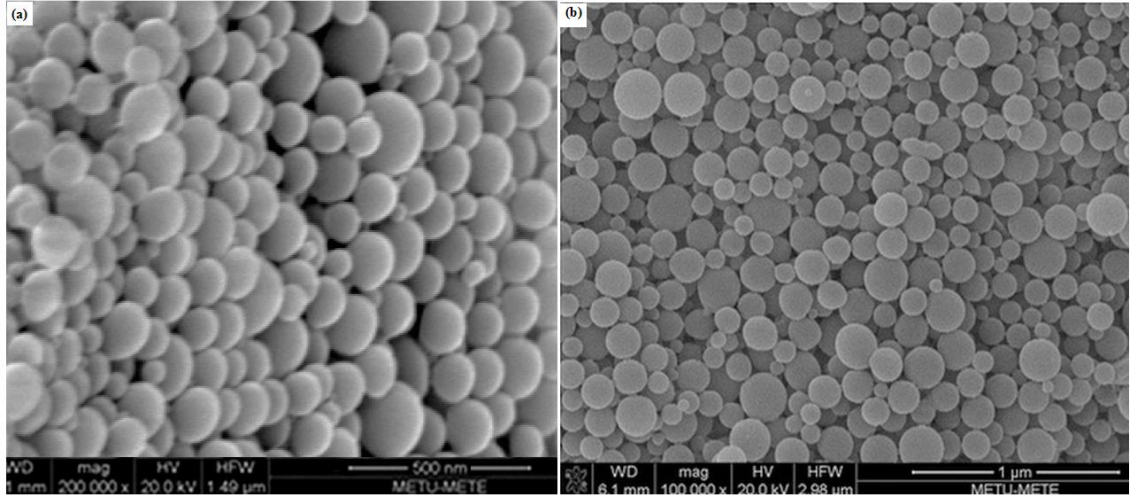
U-87MG kanser hücreleri, nöron hücre kültürü amacı için kullanıldı. Bu hücrelere 1, 10 ve 100 μ M irinotekan, PLGA'lı ve PLGA sız olarak verildi. Bu ilaçlar aynı zamanda ve aynı şekilde karşılaştırılabilmesi için nöron hücre kültürlerinede uygulandı. Kontrol gruplarına sadece medyum eklendi.

Yine U-87MG kanser hücrelerinin bir başka grubuna 0.25, 0.5, 1 ve 2 mM metformin saf etkin maddeler ve PLGA NPs halinde uygulanmıştır. Bu ilaçlar aynı zamanda ve aynı şekilde karşılaştırılabilmesi için nöron hücre kültürlerine uygulanmıştır.

Nöron hücre kültürlerinde boş PLGA NPs toksik etki göstermemiştir. Metformin 0,25 - 0,5 mM irinotekan ise 1 μ M dozlarında hem saf etkin maddeler hemde PLGA NPs halinde toksik etki göstermemiştir. Bu dozların üstündeki dozlarda ise toksik etkiler görülmeye başlamıştır. Kanseri hücre kültürlerinde ise boş PLGA NPs etkisiz bulunmuş. 0,25 mM Metformin, 1 μ M irinotekan dozlarında hem saf etkin madde halinde hemde bunlara eşdeğer PLGA NPs halinde toksik etki göstermemiştir. Fakat nöron hücrelerine zararlı etki göstermeyen metformin 0,5 mM konsantrasyonda kanser hücrelerinde öldürücü etki göstermiştir. Bu seçici bir doz olduğunu göstermektedir. Bu dozun üstündeki dozlarda ise toksik etkiler her iki hücre kültüründe de tespit edilmiştir.

4.1. Nanopatikül Karakterizasyon Çalışmalarının Bulguları

Nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntüleri alınmış ve yaklaşık küresel ve nano-boyutlu yapılar olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).



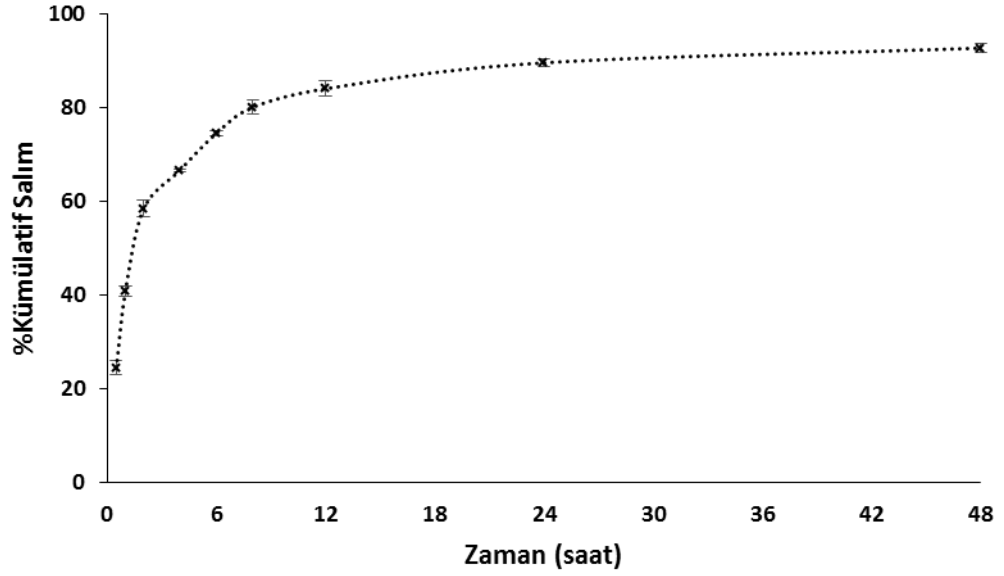
Şekil 4.1. (a) Metformin HCl ve (b) İrinotekan yüklü formülasyonların SEM fotoğrafları

Hazırlanan metformin HCl ve irinotekan yüklü nanopartiküler formülasyonların partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri sırasıyla, 300 ± 5.87 nm ve 216 ± 4.48 nm, -0.121 ± 0.26 mV ve -16.37 ± 1.86 mV olarak bulunmuştur.

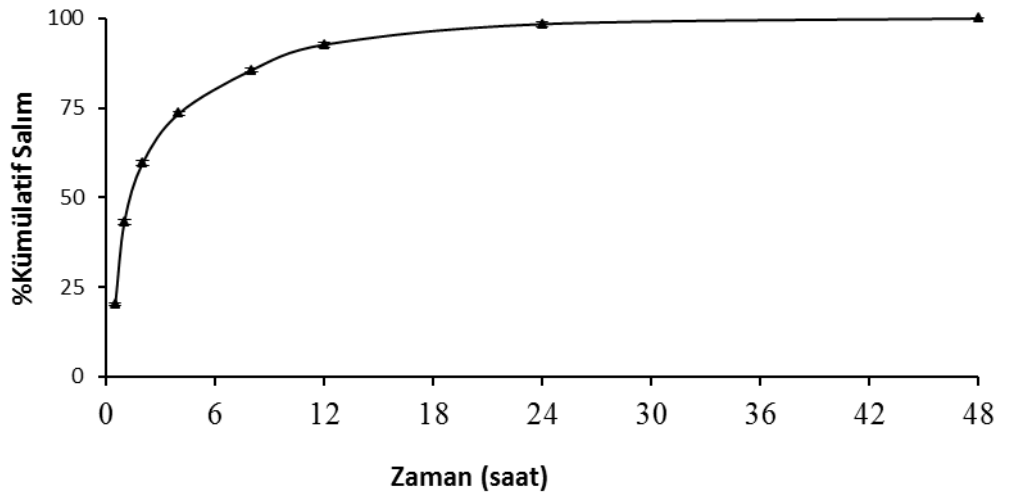
Metformin HCl-yüklü ve irinotekan-yüklü PLGA nanopartikülleri için elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla, $\%2.30 \pm 0.41$ ve $\%12.39 \pm 0.66$ olarak saptanmıştır. Özellikle, metformin HCl için elde edilen düşük enkapsülasyon etkinliği değeri, etkin maddenin sudaki yüksek çözünürlüğüne ve bundan dolayı sulu kısma kaçışına bağlanabilir.

PB pH 7.4 içerisinde in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmesiyle elde edilen salım grafikleri Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. 1 saatte metformin HCl-yüklü nanopartiküllerden yaklaşık $\%40$ metformin salımı gerçekleşirken, 48 saatte ise yaklaşık $\%93$ 'ü salımmıştır (Şekil 4.2). İrinotekan yüklü nanopartiküllerden ise yaklaşık $\%43$ irinotekan 1 saatte, $\%100$ 'ü ise 48 saatte salımmıştır (Şekil 4.3). PLGA nanopartiküllerinden etkin madde salımı iki fazlı olarak gerçekleşmektedir. İlk olarak nanopartikül yüzeyinde tutulan ve ortamla temas eden etkin maddeden dolayı ani bir salım görülürken, ikinci fazda ise, nanopartikül içerisine hapsedilmiş etkin maddenin devamlı bir salımı görülür. Bu çalışmada hazırlanan nanopartikül formülasyonları da ilk

bir saatte ani bir salım göstermiş ve sonrasında ise her iki formülasyon için de devamlı bir etkin madde salımı elde edilmiştir (Makadia 2011).



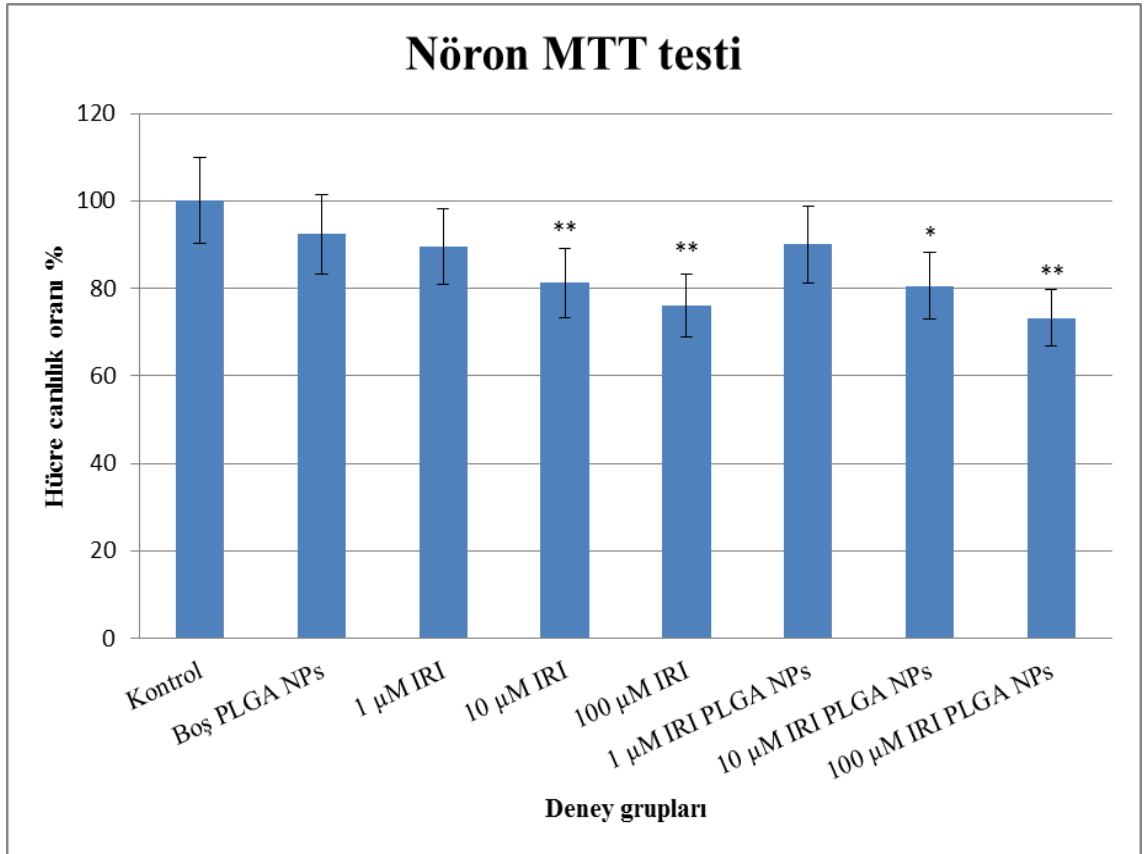
Şekil 4.2. Metformin Hcl-yüklü PLGA nanopartiküllerinin PB Ph 7.4 içindeki salım profili (n=3; X±SS)



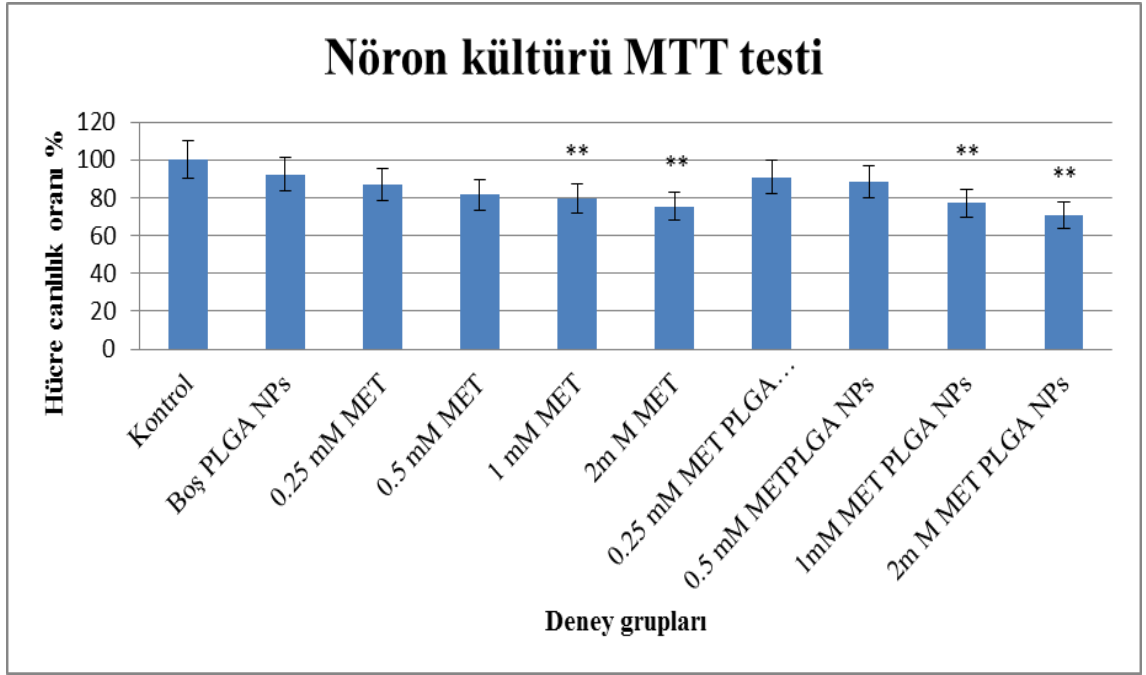
Şekil 4.3. İrinotekan-yüklü PLGA nanopartiküllerinin PB Ph 7.4 içindeki salım profili (n=3; X±SS)

4.2. Hücre Kültürü

4.2.1. Nöron kültürü

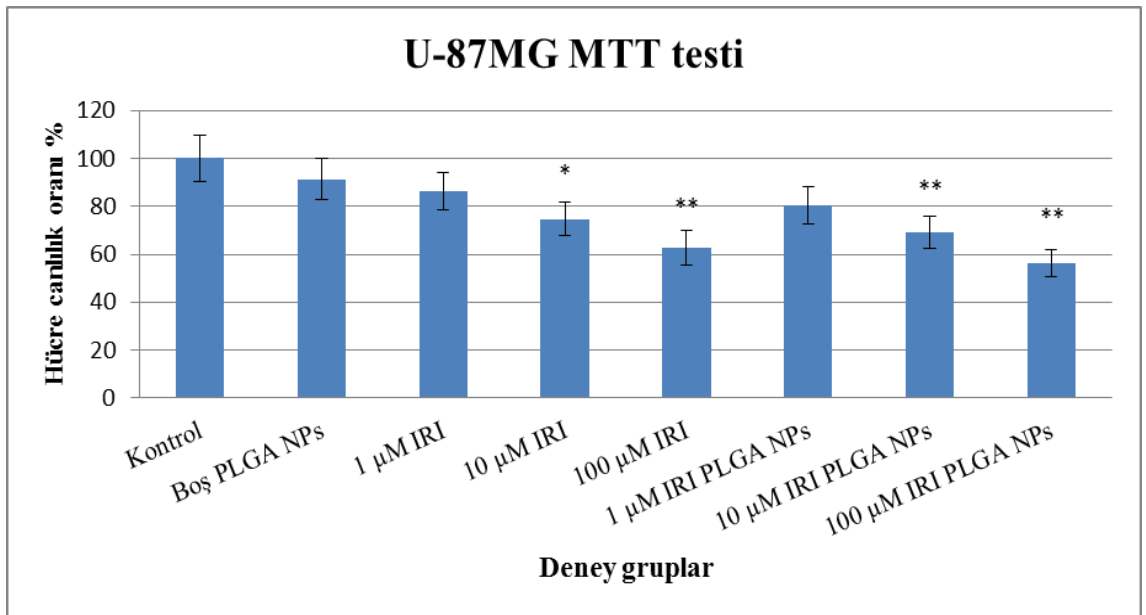


Şekil 4.4. Nöron kültürü için irinotekan ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi

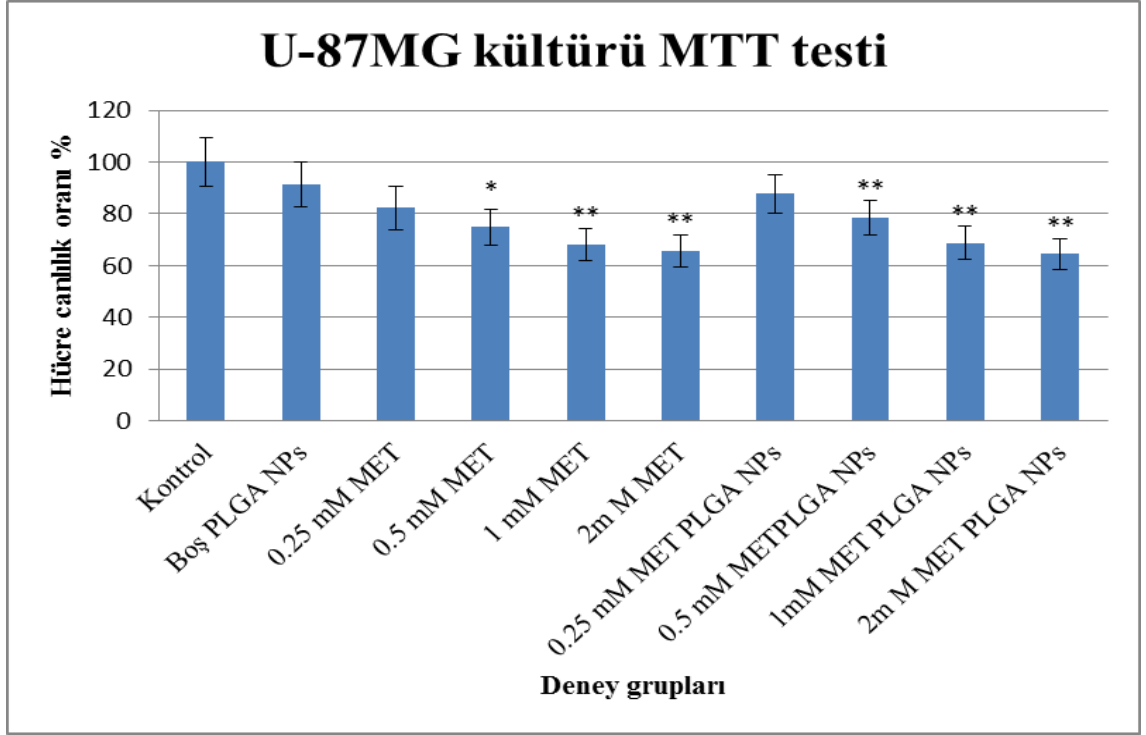


Şekil 4.5. Nöron kültürü için metformin ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi

4.2.2. Kanser kültürü



Şekil 4.6. U-87 hücreleri için irinotekan ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi

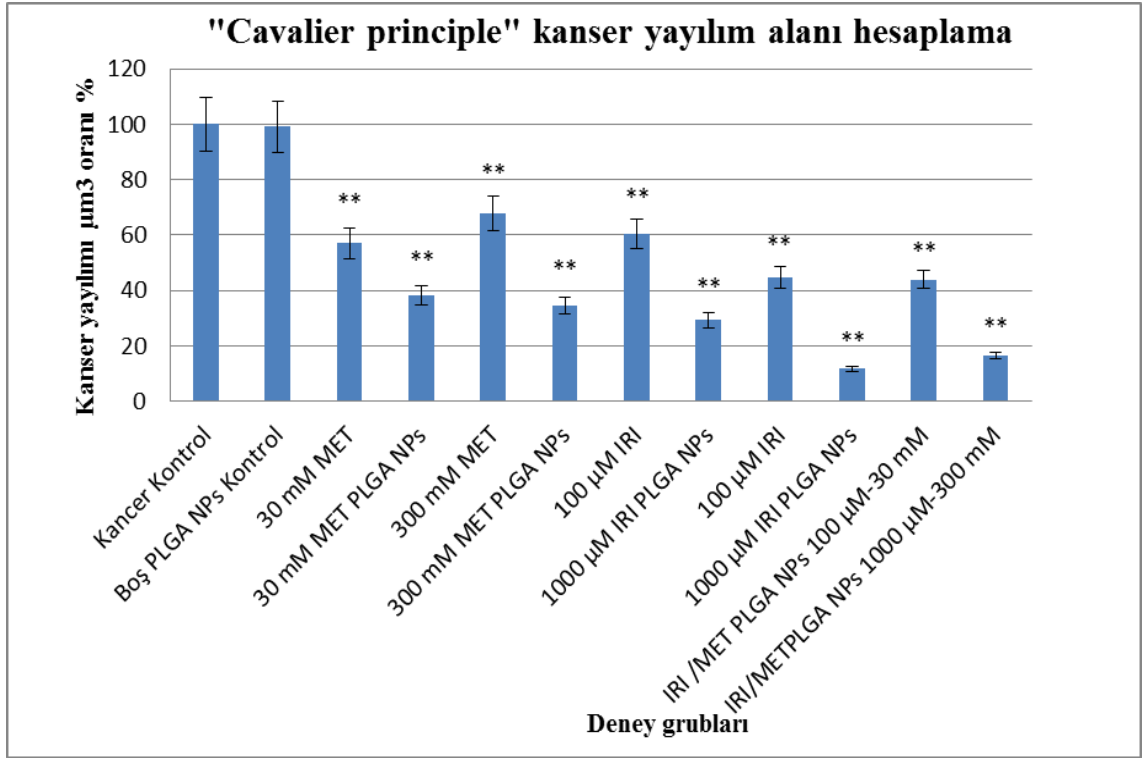


Şekil 4.7. U-87 hücreleri için metformin ve NPs formülasyonları için % canlılık oranları- MTT testi

4.3. Hayvan Deneyi

Hücre kültürlerinde yetiştirilmiş olan U-87MG hücrelerinin sıçan beynine inokülasyonu sonucu oluşturulan hayvan modelinde; metformin 30, 300 mM irinotekan ise 100, 1000 μ M dozlarında saf madde yada NPs formülasyonları halinde hayvanlara uygulanmış ve “cavalier princile” kanser miktarları ölçülmüştür.

Metformin 30-300 mM, irinotekan 100-1000 μ M tüm dozlarında dozlarında saf madde yada NPs formülasyonları halinde kanser alanlarını anlamlı şekilde azaltabilmiştir (Şekil 4.8)



Şekil 4.8. Alınan örneklerin patolojik olarak %alan (μm^3) "Cavalier prensiple"

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Glioblastoma multiforme en sık görülen beyin kanser türüdür. Bu hastalığa geliştirilmiş mevcut tedavilerin cevap oranları ise çok düşüktür. Şu an gliomalar içerisinde en tehlikeli olanıdır. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi birlikte olmasına rağmen cevap oranları tatmin edici düzeyde değildir. Bu alanda yeni moleküllerin/yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin acil olarak ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir.

Metformin tip 2 diyabet tedavisinde kan şekeri seviyesini düşürmek için yaygın kullanılan biguanid grubu bir ilaçtır. KBE'yi rahatlıkla geçebilmesi, apoptotik ve konsantrasyona bağlı anti proliferatif etkilerinin olması bilim insanlarına beyin kanserlerinde etkisinin olup olmayacağı sorusunu sordurmuştur. Hatta tip 2 diyabet hastalarında kanser insidansının düşük olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2011). Skuli N'nin 2015 yılında yaptığı çalışma gibi bazı araştırmalarda artık bu sorunun cevabı araştırılmaktadır. Apoptozu indüklemelerinden dolayı kolorektal kanserlerde, göğüs kanseri, over kanseri, prostat tümörlerinde ve hepatosellular kanserlerinde de tedavi edici yönleri gösterilmiştir (Ben Sahra *et al.* 2008; Xiong *et al.* 2012).

Metforminin apoptotik etkisinin mitokondri deki Bcl-2 ailesinde ki proteinlerin değişiminden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Metformin yüksek yağ oranları nedeniyle oluşan kalp hücre ölümünü seramit sentez inhibisyonuyla azalttığı söylenmektedir. Son zamanlarda metformin tedavisi AMPK fosforilasyonuna onunda mTOR ve p70S6K sinyal yollarının supresyonuna yol açtığı bildirilmektedir. Bu yollarının supresyonunun hücre proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Bolster *et al.* 2002). mTOR dawn regülasyonunu mRNA translasyon ve protein sentezi azaltmasıyla gözlenen anti neoplastik etkilerde açıklana bilmiştir. Metformin kullanılan bazı hastalarda önemli yan etkileri olan saç kaybı, kilo kaybı, disfori ve letarji gibi yan etkiler görülmemiştir.

GBM hücreleri için mTOR yolağının dışında epitelyal büyüme faktörü fosfo inozitol-3 kinaz (PIP3) sinyal yolağının da önemli olduğu gösterilmiştir (Kraakstad and Chekenya 2010; Mao *et al.* 2012).

Şu anda 100'un üzerinde ki klinik çalışma, metforminin kanser üzerinde ki etkilerini araştırmaktadır.

Metforminin sistemik etkilerinin dolaşım deki insülin seviyesi ve insülin benzeri büyüme benzeri faktör 1'in azalmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. İnsülin/IGF-1 sadece glikoz up takin de sorumlu değil, karsinogenезin düzenlenmesinde de rol oynayabilir. İnsülin reseptör substratı (IRS) üzerinden sinyal fosfo inozitid 3 kinaz ve AKT/protein kinaz B'ye dönüştürülür ve dolaylı olarak memeli rapamisin kompleks 1'in hedefini (mTOR) aktive eder. Ayrıca insülin reseptörü büyüme faktörü bağlanma reseptörü proteini 2 üzerinden Ras/Raf/ERK yolağını güçlendirerek hücre büyümesine neden olur. Bu yolağın tümör hücreleri için önemli olduğu gösterilmiştir (LeRoith *et al.* 1995).

Metformin insülin seviyelerini düşürür, insülin/IGF sinyal yolağını inhibe eder normal ve kanser hücrelerinin hücreselele metabolizmalarını değiştirir (Memmott *et al.* 2010). mTOR'un metformin tarafından inhibisyonu AMPK'ya bağımlı veya bağımsız olarak gerçekleşebilir. Metformin mTOR yolağı inhibisyonunu IGF-1/insülin reseptörü, Akt ve ERK aktivasyonunu baskılayarak, AMPK bağımsız şekilde gerçekleştirmiş olur (Memmott *et al.* 2010). Metformin göğüs karsinom hücre büyümesine epidermal büyüme faktör reseptör-2 (EGF-2) seviyelerini azaltarak engeller.

İrinotekan “*Camptotheca acuminata*” ağacından izole edilen Camptothecin maddesinin yarı sentetik analogudur. İrinotekan, hücreselele topoizomeraz I kompleksleriyle etkileşime girer ve S-Fazı spesifik sito-toksisitesi vardır (Liu *et al.* 2000). Topoizomerazlar; tamir rekombinasyonu, replikasyon ve transkripsiyon gibi hayati hücreselele işlemlerin gerçekleştiği DNA bölgelerindeki katlanmalarını ve süper sarmal oluşturmalarını redükler. Topoizomerazlar DNA'nın fosfodiester bağlarını açar ve

tekrar birleştirirler. Aynı zamanda DNA çentiğinden tek ya da çift zincirli DNA'nın oluşmasına öncülük eden kovalent enzim-DNA bağını oluştururlar. Topoizomeraz 1 tek zincir DNA kırıklarına bağlanır ve geri dönüşümlü ayrılabilir Topoizomeraz 1-İrinotekan kompleksi, kendi başına hücreler için ölümcül değildir. Fakat ilerleyen replikasyon çataları ile olan çarpışmaları; DNA çift zincir kırıklarını meydana getirir ve geri dönüşümsüz replikasyon çatalı tutuklanmalarına ve hücre ölümlerine yol açarlar. Bu çarpışmaların bir başka sonucu da; S-Fazı kontrol noktası mekanizmasına zarar veren DNA hasarına işaret eden G2 fazı tutuklanması/gecikmesine ile de sonuçlanır. İrinotekanın daha yüksek konsantrasyonları, S-fazında olmayan hücreleri de öldürür. Bu S-fazında olmayan hücrelerin ölüm mekanizmaları; transkripsiyonel DNA hasarı ve apoptoz mekanizmaları olarak görünmektedir. Fakat irinotekanın özellikle kanser hastalarındaki beyin klirensi, uzaklaşmasının çok daha yüksek olması bu ilaca karşı önemli direnç mekanizmalarından birini oluşturmaktadır. Hâlbuki bizim kullandığımız PLGA'lar bu klirensi azalttığı için irinotekana karşı direnççide azaltmaktadır. Diğer önemli direnç mekanizmalardan biri irinotekanla birlikte kullanılan ikinci ilacın genelde karaciğer enzim indiksyonuna yol açması ve irinotekanın düzeylerini azaltmasıydı fakat bizim kullanmış olduğumuz metformin irinotekana karşı düzey azaltıcı etkisi tespit edilmemiştir. Ayrıca Pgp, mrrp irinotekani hücre dışına aktif atabilen hücre elemanlardır. Bu elemanların hücre içerisine giren irinotekani dışarı atması bir başka direnç mekanizmasıdır.

İrinotekanın kolorektal, özofagus, akciğer kanserleri, lösemi, lenfoma ve MSS malin gliomalarına karşı aktivitesi gösterilmiştir. İrinotekan kullanımıyla kemik iliği depresyonu ve diyare yan etkileri bildirilmiştir.

Metformin HCl-yüklü nanopartiküllerden yaklaşık 1 saatte %40 metformin salımı gerçekteşirken, 48 saatte ise yaklaşık %93'ü salımmıştır (Şekil 4.1). İrinotekan yüklü nanopartiküllerden ise yaklaşık %43 irinotekan 1 saatte, %100'ü ise 48 saatte salımmıştır (Şekil 4.2). PLGA nanopartiküllerinden etkin madde salımı iki fazlı olarak gerçekteşmektedir. İlk olarak nanopartikül yüzeyinde tutulan ve ortamla temas eden etkin maddeden dolayı ani bir salım görülürken, ikinci fazda ise, nanopartikül içerisine

hapsedilmiş etkin maddenin devamlı bir salımı görülür. Bu çalışmada hazırlanan nanopartikül formülasyonları da ilk bir saatte ani bir salım göstermiş ve sonrasında ise her iki formülasyon için de devamlı bir etkin madde salımı elde edilmiştir.

Metformin 30 ve 300 mM, irinotekan 100 ve 1000 μ M ve yine saf maddelere eşdeğer dozda NPs formülasyonları, boş PLGA NPs süspansiyonu kanserli sıçanlara uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de sunulmuştur. Kontrol ve boş PLGA NPs kontrol grupları arasında in-vivo olarak kanser yayılımında anlamlılık ($p < 0.05$) bulunamamıştır. Boş PLGA NPs in-vivo olarak herhangi bir toksik etki oluşturmamıştır. Fakat etkin madde yüklü PLGA NPs'nin tamamı saf maddelere göre Glioblastoma Multiforme hücrelerin sayılarını daha da azaltmıştır. Bu etki bütün ilaç gruplarında mevcuttur. Beyin içine verilen saf metformin ve irinotekan ve etkin madde yüklü PLGA NPs bu derece farklı etkiler oluşturması beyinde PLGA NPs'nin daha uzun süreli etkin madde salımı sağlamasına bağlanabilir. Çünkü irinotekan ve metformin in-vivo olarak hele bide tümör varken artmış kan beyin bariyeri geçirgenliği söz konusu olduğunda hızlıca sistemik dolaşıma geçecek ve vücuttan uzaklaştırılacaktır. Tekrar beyine dönecek olan miktarları kanserli dokuda hücrelerin sayılarını azaltmaya yetmeyebilir. Ancak irinotekan- ve metformin-yüklü PLGA NPs beyin dokusu çevresinde uzun süreli etkin madde salım yapabilecek özelliktedir. tutabilecek özelliktedir. Şekil 4.8'deki sonuçlara göre metformin ve irinotekanın artan dozları daha fazla kanser hücrelerini öldürebilmiş ($P < 0.001$) hatta birlikte kullanımlarında şekle göre en az kanser hücre sayısını elde etmemizi sağlamıştır.

Çalışmamızda saf etkin maddeler ve etkin madde içeren NPs formülasyonlarında aynı dozda kullanılmasına rağmen etkinlik deki bu fark çok değerlidir çünkü özellikle irinotekan dozunun artmasıyla ortaya çıkan kemik iliği toksisitesi ve diyare yan etkileri düşük doz kullanımlarda çok çok azalmaktadır. Yan etkiler nedeniyle kullanılmayan irinotekan birçok hastada artık kullanılabilir. Bu sonuçlarımız Verreault'nın 2012 de yapmış olduğu çalışmayla örtüşmektedir onlarda mikroküreler içerisindeki irinotekanın kanser hücrelerine karşı 5 kata kadar daha etkili olduklarını göstermişlerdir (Verreault *et al.* 2012).

Uygulama yolu olarak irinotekanı direk beyin içine verilmesi kana geçecek olan irinotekan düzeylerini azaltacağı için kemik iliği depresyonu ve diyare gibi ilacın kan düzeyi ile bağlantılı yan etkilerinin daha az görüleceği düşünülmektedir. Bir de NPs formülasyonunu halinde uygulamanın etkin maddenin kana geçeceği düzeylerini iyice azaltacağı düşünülmektedir.

Kunthur A'nın 2011 yılındaki yapmış olduğu çalışmada irinotekan ve Metforminin birlikte kullanıldı kolorektal kanserleri üzerinde tek başına oluşturduklarından çok daha yüksek etki oluşturdukları gösterilmiştir (Kunthur A *et al.* 2011). Farklı iki etki mekanizmasıyla kanser hücrelerinin sayılarını azaltan bu iki ilacın kombine kullanılması bizim çalışmamız için de önemli bulunmuş ve gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.8'deki verilerimizi incelediğimizde metformin-yüklü PLGA NPs (300mM)+ irinotekan-yüklü PLGA NPs (1000µM) tek başına oluşturdukları etkiye göre çok daha fazla etkili olduğu gösterilmiş ve kanser hücrelerinin %90'a kadar yok edildiği görülmüştür. Özellikle yüksek dozlarda irinotekan ve metforminin birlikte kullanıldığında etkilerinin daha da fazla olduğu saptanmıştır.

Sonuç

Tüm sonuçlar göz önüne alındığı zaman metformin 0,5 mM'ın un nöron hücrelerine zarar vermemesi ve kanseri yok etmesi yani seçici olarak glioblastoma multiforme hücrelerine toksisite oluşturması çok önemlidir çünkü bu dozda kanser çevresinde bulunan sağlam nöronlara zarar vermeyecek ve sadece toksisitesini kanser hücrelerine gösterecektir.

Metformin yüklü NPs formülasyonunda yine 0.5 mM'da (saf metformine eşdeğer dozda) nöron hücrelerine karşın bir toksisite yapmamış ama kanser hücrelerini öldürmüştür. İrinotekanda ise bu kadar seçici bir durum söz konusu değildir.

verilerimizi incelediğimizde metformin-yüklü PLGA NPs (300mM)+ irinotekan-yüklü PLGA NPs (1000µM) tek başına oluşturdukları etkiye göre çok daha fazla etkili olduğu gösterilmiş ve kanser hücrelerinin %90'a kadar yok edildiği görülmüştür.

Etkin made yüklü NPs'lerin saf etkin maddelerin etkisinin artırılması yönünde olumlu etki gösterdiği görülmüştür. Etkin made yüklü nanopartiküllerin verdiği etkinlik ve seçicilik sayesinde saf maddelere göre nöron hücrelerine verilen hasarı azaltıldığı ve kanser hücreleri üzerinde ise toksik etkinin artırıldığı gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aguirre D, Boya P, Bellet D, Faivre S, Troalen F, Benard J, Saulnier P, Hopkins-Donaldson S, Zangemeister-Wittke U, Kroemer G, Raymond E. 2004. Bcl-2 and CCND1/CDK4 expression levels predict the cellular effects of mTOR inhibitors in human ovarian carcinoma. *Apoptosis*, 9: 797-805.
- Alexei Verkhratsky AB. 2007. *glial neurobiology*. Baskı. england, jhon willy & sons ltd.
- Allen NJ, Barres BA. 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457: 675-677.
- Andres-Guerrero V, Arango-Gonzalez B, Zong MM, Mihov G, Dias A, Ueffing M, Herrero-Vanrell R 2014. Biodegradable polyesteramide microspheres for controlled drug delivery in ophthalmology. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 247.
- Asgeirsdottir SA, Zwiers PJ, Morselt HW, Moorlag HE, Bakker HI, Heeringa P, Kok JW, Kallenberg CG, Molema G, Kamps JA 2008. Inhibition of proinflammatory genes in anti-GBM glomerulonephritis by targeted dexamethasone-loaded AbEsel liposomes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294: F554-561.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*, 513: 532-541.
- Bailey CJ, Turner RC. 1996. Drug therapy - Metformin. *New England Journal of Medicine*, 334: 574-579.
- Balducci M, Chiesa S, Diletto B, D'Agostino GR, Mangiola A, Manfrida S, Mantini G, Albanese A, Fiorentino A, Frascino V, De Bari B, Micciche F, De Rose F, Morganti AG, Anile C, Valentini V. 2012. Low-dose fractionated radiotherapy and concomitant chemotherapy in glioblastoma multiforme with poor prognosis: a feasibility study. *Neuro Oncol*, 14: 79-86.
- Bao W, Liu R, Wang YL, Wang F, Xia GH, Zhang HJ, Li XM, Yin HX, Chen BA. 2015. PLGA-PLL-PEG-Tf-based targeted nanoparticles drug delivery system enhance antitumor efficacy via intrinsic apoptosis pathway. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 557-566.
- Barres BA. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60: 430-440.
- Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. 2008. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*, 27: 3576-3586.
- Bink A, Gaa J, Franz K, Weidauer S, Yan B, Lanfermann H, Seifert V, Zanella FE. 2005. Importance of diffusion-weighted imaging in the diagnosis of cystic brain tumors and intracerebral abscesses. *Zentralbl Neurochir*, 66: 119-125.
- Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. 2002. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated

- mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 23977-23980.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 54: 631-651.
- Brzozowska A, Torun A, Mazurkiewicz M. 2015. The impact of surgery on the efficacy of adjuvant therapy in glioblastoma multiforme. *Adv Clin Exp Med*, 24: 279-287.
- Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P. 1988. Topographic Anatomy and Ct Correlations in the Untreated Glioblastoma-Multiforme. *Journal of Neurosurgery*, 68: 698-704.
- Burger PC, Shibata T, Kleihues P. 1986. Topographic Anatomy and Cytologic Composition of the Untreated Glioblastoma-Multiforme. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45: 326-326.
- Buyukokuroglu ME, Gepdiremen A, Hacimuftuoglu A, Oktay M. 2003. The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *J Ethnopharmacol*, 84: 91-94.
- Cao R, Villalonga R, Fragoso A. 2005. Towards nanomedicine with a supramolecular approach: a review. *IEE Proc Nanobiotechnol*, 152: 159-164.
- Chung MM, Chen YL, Pei D, Cheng YC, Sun BG, Nicol CJ, Yen CH, Chen HM, Liang YJ, Chiang MC. 2015. The neuroprotective role of metformin in advanced glycation end product treated human neural stem cells is AMPK-dependent. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1852: 720-731.
- Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF. 2010. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet*, 6: e1000832.
- Cooper DL, Harirforoosh S. 2014. Design and Optimization of PLGA-Based Diclofenac Loaded Nanoparticles. *PLoS One*, 9.
- Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. 2002. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 19: 99-134.
- De Santo LS, Bisaccia C, De Santo RM. 2009. Water, from Gilgamesh Epic to Nobel Laureate Richard Feynman: a look into polywater and the memory of water. *J Nephrol*, 22 Suppl 14: 86-91.
- Dean M, Fojo T, Bates S. 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*, 5: 275-284.
- Dominiczak MH. 2015. Individuality in science: richard feynman. *Clin Chem*, 61: 894-895.
- Dos Santos MA, Pignon JP, Blanchard P, Lefeuvre D, Levy A, Touat M, Louvel G, Dhermain F, Soria JC, Deutsch E, Le Teuff G. 2015. Systematic review and meta-analysis of phase I/II targeted therapy combined with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme: quality of report, toxicity, and survival. *J Neurooncol*, 123: 307-314.
- Edgerton DS, Ramnanan CJ, Grueter CA, Johnson KM, Lautz M, Neal DW, Williams PE, Cherrington AD. 2009. Effects of insulin on the metabolic control of hepatic gluconeogenesis in vivo. *Diabetes*, 58: 2766-2775.
- Farokhzad OC, Langer R. 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3: 16-20.

- Feng SB, Nie L, Zou P, Suo JP. 2015. Effects of Drug and Polymer Molecular Weight on Drug Release from PLGA-mPEG Microspheres. *Journal of Applied Polymer Science*, 132.
- Freitas RA, Jr. 2005. What is nanomedicine? *Nanomedicine*, 1: 2-9.
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2000. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Laboratory Investigation*, 80: 65-72.
- Gallwitz B. 2015. Type-2-Diabetes Metformin: first Choice at the Start of Therapy Comments from the Practice. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 140: 236-236.
- Garrido P, Osorio FG, Moran J, Cabello E, Alonso A, Freije JMP, Gonzalez C. 2015. Loss of GLUT4 Induces Metabolic Reprogramming and Impairs Viability of Breast Cancer Cells. *J Cell Physiol*, 230: 191-198.
- Gebhardt BJ, Dobelbower MC, Ennis WH, Bag AK, Markert JM, Fiveash JB. 2014. Patterns of failure for glioblastoma multiforme following limited-margin radiation and concurrent temozolomide. *Radiat Oncol*, 9: 130.
- Gepdiremen A, Hacimuftuoglu A, Duzenli S, Oztas S, Suleyman H. 2000. Effects of salicylic acid in glutamate- and kainic acid-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rats. *Pharmacological Research*, 42: 547-551.
- Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S. 2003. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab*, 29: 6S28-35.
- Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Muller RH, Verbavatz JM, Langer R. 1995. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 16: 215-233.
- Guertin DA, Sabatini DM. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 12: 9-22.
- Halperin EC, Bentel G, Heinz ER, Burger PC. 1989. Radiation-Therapy Treatment Planning in Supratentorial Glioblastoma-Multiforme - an Analysis Based on Post-Mortem Topographic Anatomy with Ct Correlations. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 17: 1347-1350.
- Hashem SA, Salem A, Al-Rashdan A, Ezam N, Nour A, Alsharbaji A, Rejeeth C, Mohamad I, Sughayer M, Elyan M, Al-Hussaini M, Addasi A, Almousa A. 2012. Radiotherapy with concurrent or sequential temozolomide in elderly patients with glioblastoma multiforme. *J Med Imaging Radiat Oncol*, 56: 204-210.
- Herrup K, Yang Y. 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci*, 8: 368-378.
- Hinkley GK, Carpinone P, Munson JW, Powers KW, Roberts SM. 2015. Oral absorption of PEG-coated versus uncoated gold nanospheres: does agglomeration matter? *Part Fibre Toxicol*, 12: 9.
- Hofland KF, Hansen S, Sorensen M, Engelholm S, Schultz HP, Muhic A, Grunnet K, Ask A, Costa JC, Kristiansen C, Thomsen C, Poulsen HS, Lassen U. 2014. Neoadjuvant bevacizumab and irinotecan versus bevacizumab and temozolomide followed by concomitant chemoradiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme: A randomized phase II study. *Acta Oncol*, 53: 939-944.

- Illum L, Church AE, Butterworth MD, Arien A, Whetstone J, Davis SS. 2001. Development of systems for targeting the regional lymph nodes for diagnostic imaging: in vivo behaviour of colloidal PEG-coated magnetite nanospheres in the rat following interstitial administration. *Pharm Res*, 18: 640-645.
- Jackson FI, Richard feynman. 1997. *J R Soc Med*, 90: 360.
- Jackson RA, Hawa MI, Jaspan JB, Sim BM, Disilvio L, Featherbe D, Kurtz AB. 1986. Metformin - Mechanism of Action in Type-2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes. *Diabetologia*, 29: A552-A552.
- Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de Jong S, Reyners AKL, Gans ROB, De Vries EGE. 2010. Metformin: Taking away the candy for cancer? *European Journal of Cancer*, 46: 2369-2380.
- Kendall DM, Rubin CJ, Mohideen P, Ledeine JM, Belder R, Gross J, Norwood P, O'Mahony M, Sall K, Sloan G, Roberts A, Fiedorek FT, DeFronzo RA. 2006. Improvement of glycemic control, triglycerides, and HDL cholesterol levels with muraglitazar, a dual (alpha/gamma) peroxisome proliferator-activated receptor activator, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin monotherapy: A double-blind, randomized, pioglitazone-comparative study. *Diabetes Care*, 29: 1016-1023.
- Krakstad C, Chekenya M. 2010. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer*, 9: 135.
- Krentz AJ, Bailey CJ. 2005. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65: 385-411.
- Kunthur, A., A. Aldwairi, et al. 2011. "Effect of metformin alone and in combination with 5-fluorouracil (5FU), oxaliplatin (O) and irinotecan (I) on human colon cancer cell lines." *Journal of Clinical Oncology* 29(15).
- Lai IC, Shih PH, Yao CJ, Yeh CT, Wang-Peng J, Lui TN, Chuang SE, Hu TS, Lai TY, Lai GM. 2015. Elimination of cancer stem-like cells and potentiation of temozolomide sensitivity by Honokiol in glioblastoma multiforme cells. *PLoS One*, 10: e0114830.
- Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schafer U, Takeuchi H, Maincent P, Kawashima Y, Lehr CM. 2001. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 299: 775-781.
- Larsen C. 2010. Genetic and molecular abnormalities of glioblastomas (GBM). *Bulletin Du Cancer*, 97: 1389-1407.
- LeRoith D, Werner H, Neuenschwander S, Kalebic T, Helman LJ. 1995. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 766: 402-408.
- Li J, Li L, Yu H, Cao H, Gao C, Gong Y. 2006. Growth and metabolism of human hepatocytes on biomodified collagen poly (lactic-co-glycolic acid) three-dimensional scaffold. *ASAIO J*, 52: 321-327.
- Li LL, Wang QF, Li HL, Yuan MW, Yuan ML. 2014. Preparation, Characterization, In Vitro Release and Degradation of Cathelicidin-BF-30-PLGA Microspheres. *PLoS One*, 9.
- Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. 2000. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci*, 922: 1-10.
- Llanos P, Contreras-Ferrat A, Georgiev T, Osorio-Fuentealba C, Espinosa A, Hidalgo J, Hidalgo C, Jaimovich E. 2015. The cholesterol-lowering agent methyl-beta-

- cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308: E294-E305.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system (vol 114, pg 97, 2007). *Acta Neuropathologica*, 2007, 114: 547-547.
- Lu WR, Defilippi J, Braun A. 2013. Unleash metformin: reconsideration of the contraindication in patients with renal impairment. *Ann Pharmacother*, 47: 1488-1497.
- Makadia HK, Siegel SJ. 2011. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3: 1377-1397.
- Mao H, Lebrun DG, Yang J, Zhu VF, Li M. 2012. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Invest*, 30: 48-56.
- Mariano RN, Alberti D, Cutrin JC, Crich SG, Aime S. 2014. Design of PLGA Based Nanoparticles for Imaging Guided Applications. *Molecular Pharmaceutics*, 11: 4100-4106.
- Matsuki K, Tamasawa N, Yamashita M, Tanabe J, Murakami H, Matsui J, Imaizumi T, Satoh K, Suda T. 2009. Metformin restores impaired HDL-mediated cholesterol efflux due to glycation. *Atherosclerosis*, 206: 434-438.
- Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, Kawabata S, Fox SD, Dennis PA. 2010. Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3: 1066-1076.
- Mishra RK, Wei CY, Hresko RC, Bajpai R, Heitmeier M, Matulis SM, Nooka AK, Rosen ST, Hruz PW, Schiltz GE, Shanmugam M. 2015. In Silico Modeling-based Identification of Glucose Transporter 4 (GLUT4)-selective Inhibitors for Cancer Therapy. *Journal of Biological Chemistry*, 290: 14441-14453.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53: 283-318.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb Journal*, 19: 311-330.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*, 100: 2235-2241.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170: 1445-1453.
- Ohira M, Miyashita Y, Ebisuno M, Saiki A, Endo K, Koide N, Oyama T, Murano T, Watanabe H, Shirai K. 2007. Effect of metformin on serum lipoprotein lipase mass levels and LDL particle size in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 78: 34-41.
- Okada H, Toguchi H. 1995. Biodegradable Microspheres in Drug-Delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 12: 1-99.
- Oostendorp LJ, Stalmeier PF, Pasker-de Jong PC, Van der Graaf WT, Ottevanger PB. 2010. Systematic review of benefits and risks of second-line irinotecan monotherapy for advanced colorectal cancer. *Anticancer Drugs*, 21: 749-758.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen YW, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. 2013. CBTRUS Statistical Report: Primary

- Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 15: 1-56.
- Panyam J, Labhasetwar V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 329-347.
- Pasqualetti F, Scotti V, Grandinetti A, Grespi S, Giraldo D, Fabrini MG, Romanini A, Vannozzi R, Salvadori B, Ricci S, Cionini L. 2006. Treatment of recurrent glioblastoma multiforme with fotemustine and brachithery. *Annals of Oncology*, 17: Xi61-Xi61.
- Pedicini P, Fiorentino A, Simeon V, Tini P, Chiumento C, Pirtoli L, Salvatore M, Storto G. 2014. Clinical radiobiology of glioblastoma multiforme: estimation of tumor control probability from various radiotherapy fractionation schemes. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 190: 925-932.
- Pongwecharak J, Tengmeesri N, Malanusorn N, Panthong M, Pawangkapin N. 2009. Prescribing metformin in type 2 diabetes with a contraindication: prevalence and outcome. *Pharm World Sci*, 31: 481-486.
- Quint K, Stiel N, Neureiter D, Schlicker HU, Nimsky C, Ocker M, Strik H, Kolodziej MA. 2014. The role of sphingosine kinase isoforms and receptors S1P1, S1P2, S1P3, and S1P5 in primary, secondary, and recurrent glioblastomas. *Tumor Biology*, 35: 8979-8989.
- Ramesh M, Ahlawat P, Srinivas NR. 2010. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomed Chromatogr*, 24: 104-123.
- Rattan R, Ali Fehmi R, Munkarah A. 2012. Metformin: an emerging new therapeutic option for targeting cancer stem cells and metastasis. *J Oncol*, 2012: 928127.
- Ryu TK, Kim SE, Kim JH, Moon SK, Choi SW. 2014. Biodegradable uniform microspheres based on solid-in-oil-in-water emulsion for drug delivery: A comparison of homogenization and fluidic device. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 29: 445-457.
- Saha M. 2009. Nanomedicine: promising tiny machine for the healthcare in future-a review. *Oman Med J*, 24: 242-247.
- Schijns VEJC, Pretto C, Devillers L, Pierre D, Hofman FM, Chen TC, Mespouille P, Hantos P, Glorieux P, Bota DA, Stathopoulos A. 2015. First clinical results of a personalized immunotherapeutic vaccine against recurrent, incompletely resected, treatment-resistant glioblastoma multiforme (GBM) tumors, based on combined allo- and auto-immune tumor reactivity. *Vaccine*, 33: 2690-2696.
- Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, Movsas B, Jones CU, Simpson JR, Fischbach AJ, Curran WJ. 1998. Validation and predictive power of radiation therapy oncology group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: A report using rtog 90-06. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 40: 51-55.
- Sengul G, Coskun S, Cakir M, Coban MK, Saruhan F, Hacimuftuoglu A. 2011. Neuroprotective Effect of ACE Inhibitors in Glutamate - Induced Neurotoxicity: Rat Neuron Culture Study. *Turkish Neurosurgery*, 21: 367-371.
- Shamisa A, Bance M, Nag S, Tator C, Wong S, Noren G, Guha A. 2013. Glioblastoma multiforme occurring in a patient treated with gamma knife surgery: case report and review of the literature. *Journal of Neurosurgery*, 119 Suppl: 816-821.

- Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kasmatka M, DePinho RA, Cantley LC. 2004. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell*, 6: 91-99.
- Simpson L, Golanis E. 2006. Recurrent glioblastoma multiforme: advances in treatment and promising drug candidates. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6: 1593-1607.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119: 7-35.
- Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PMJ, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M. 2010. Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 28: 2712-2718.
- Stupp R, Mason WP, van den Beuf MJ. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma (vol 352, pg 19, 2005). *Annals of Oncology*, 16: 949-949.
- Sumer B, Gao J. 2008. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine (Lond)*, 3: 137-140.
- Van Linde ME, Verhoeff JJ, Richel DJ, van Furth WR, Reijneveld JC, Verheul HM, Stalpers LJ. 2015. Bevacizumab in combination with radiotherapy and temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Oncologist*, 20: 107-108.
- Van Noort JM. 2006. Human glial cell culture models of inflammation in the central nervous system. *Drug Discov Today*, 11: 74-80.
- Vlaardingerbroek H, Schierbeek H, Rook D, Vermeulen MJ, Dorst K, Vermes A, van Goudoever JB, van den Akker CH. 2015. Albumin synthesis in very low birth weight infants is enhanced by early parenteral lipid and high-dose amino acid administration. *Clin Nutr*.
- Verreault, M., D. Strutt, et al. 2012. "Irinophore C (TM), a lipid-based nanoparticulate formulation of irinotecan, is more effective than free irinotecan when used to treat an orthotopic glioblastoma model." *Journal of Controlled Release* 158(1): 34-43.
- Vyas TK, Shah L, Amiji MM. 2006. Nanoparticulate drug carriers for delivery of HIV/AIDS therapy to viral reservoir sites. *Expert Opin Drug Deliv*, 3: 613-628.
- Wang SY, Shi XD, Gan ZH, Wang F. 2015. Preparation of PLGA Microspheres with Different Porous Morphologies. *Chinese Journal of Polymer Science*, 33: 128-136.
- Wang WX, Sun ZH, Chen HM, Xu BN, Wang FY. 2015. Role and mechanism of Sophoridine on proliferation inhibition in human glioma U87MG cell line. *Int J Clin Exp Med*, 8: 464-471.
- Watts C, Piccirillo S, Kearney L, Potter N, van Delft F, Coleman S, Lillis S, Carnicer MJ, Greaves M. 2014. Interrogation of Sub-Clonal Genetic Diversity of Human Gbm Reveals Genetic Heterogeneity in Tumour-Propagating Cells, Which Display Variable Competitive Capacity for Tumour Propagation in Vivo. *Neuro-Oncology*, 16.

- Welzel G, Gehweiler J, Brehmer S, Appelt JU, von Deimling A, Seiz-Rosenhagen M, Schmiedek P, Wenz F, Giordano FA. 2015. Metronomic chemotherapy with daily low-dose temozolomide and celecoxib in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a retrospective analysis. *J Neurooncol*.
- Wen PY, Kesari S. 2008. Malignant gliomas in adults. *New England Journal of Medicine*, 359: 492-507.
- Windholz M. 1984. The merck index online. *Science*, 226: 1250.
- Wiseman LR, Markham A. 1996. Irinotecan. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the management of advanced colorectal cancer. *Drugs*, 52: 606-623.
- Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. 2002. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, 4: 278-299.
- Xiong Y, Lu QJ, Zhao J, Wu GY. 2012. Metformin inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells by inducing apoptosis via mitochondrion-mediated pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13: 3275-3279.
- Yang HT, Li J, Dezzutti CS, Palmer K, Rohan LC. 2014. Design of Biodegradable Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Nanoparticles for Co-Delivery of Anti-HIV Protein Griffithsin and Dapivirine in the Vagina. *Journal of Womens Health*, 23: 873-873.
- Yang LJ, Zhou CF, Lin ZX. 2014. Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review. *Cancer Invest*, 32: 31-36.
- Yano S, Miwa S, Kishimoto H, Toneri M, Hiroshima Y, Yamamoto M, Bouvet M, Urata Y, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Hoffman RM. 2015. Experimental Curative Fluorescence-guided Surgery of Highly Invasive Glioblastoma Multiforme Selectively Labeled With a Killer-reporter Adenovirus. *Molecular Therapy*, 23: 1182-1188.
- Yin SP, Li J, Li NN, Wang GJ, Gu XC. 2014. Preparation and characterization of long-circulating PELMD/mPEG-PLGA-mixed micelles for 10-hydroxycamptothecin. *Journal of Nanoparticle Research*, 16.
- Yokokawa T, Sato K, Iwanaka N, Honda H, Higashida K, Iemitsu M, Hayashi T, Hashimoto T. 2015. Dehydroepiandrosterone activates AMP kinase and regulates GLUT4 and PGC-1 alpha expression in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*, 463: 42-47.
- Youan BB. 2008. Impact of nanoscience and nanotechnology on controlled drug delivery. *Nanomedicine (Lond)*, 3: 401-406.
- Youn P, Chen Y, Furgeson DY. 2015. Cytoprotection against beta-amyloid (A β) peptide-mediated oxidative damage and autophagy by Keap1 RNAi in human glioma U87mg cells. *Neurosci Res*, 94: 70-78.
- Zhang HY, Liu H, Huang N, He Y, Lei TT, Wang X, Yang M, Luo GM. 2014. Studies Based on Preparation, Physical Characteristics, and Cellular Pharmacological Activities of Thin PLGA Film Loaded with Geniposide. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Zhang ZJ, Zheng ZJ, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao G, Kip KE. 2011. Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 34: 2323-2328.

- Zhu XX, Braatz RD. 2015. A mechanistic model for drug release in PLGA biodegradable stent coatings coupled with polymer degradation and erosion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103: 2269-2279.
- Zhu Y, Liu A, Zhang X, Qi L, Zhang L, Xue J, Liu Y, Yang P. 2015. The effect of benzyl isothiocyanate and its computer-aided design derivants targeting alkylglycerone phosphate synthase on the inhibition of human glioma U87MG cell line. *Tumour Biol*, 36: 3499-3509.

ÖZGEÇMİŞ

1.GENEL

DÜZENLEME TARİHİ	10.01.2015		
T.C. KİMLİK NO	99292309878		
ADI SOYADI	Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ		
DOĞUM YILI	15.02.1984		
E-POSTA	Alitgzd@gmail.com	FAX	

2. EĞİTİM

MEZUNİYET TARİHİ	DERECE	ÜNİVERSİTE-FAKÜLTE-BÖLÜM-ANABİLİM DALI
2011-2015	Doktora	Atatürk Üniversitesi, NANOTIP
2002-2008	Y. Lisans	İslami Azad Üniversitesi, İran, Veteriner Hekim

3- PROJELER

- I.** Beyin hastalıklarının teşhis ve tedavisi için yeni yöntem olan mikro sensor teknolojisi , 113S083 Tubitak 1003 projesi , 2013
- II.** In vivo ve in vitro olarak anti kanser ilaçların glioblastoma üzerine etkilerin araştırılması, Atatürk University 2011270 nolu BAP, 2012

4. ÖDÜLLER/BURSLAR

- 1- 113S083 nolu Tubitak 1003 projesi bursu (2013-2015).
- 2- İranın doğu anadoludaki yabancı uyruklu öğrenciler arasında düzenlediği etkili bilim insanı yarışmasında 3'lük (2014)
- 3- Atatürk Üniversitesi 2011270 nolu BAP bursu (2012-2013).
- 4- İran Sulduz şehrinde erkekler arasında üniversiteye en yüksek puanla kazanan öğrenci ödülü (2002)

5. YÜKSEK LİSANS VE DOKTORA TEZLERİ

- 1- FARMAKOLOJİ Doktora tezi: Antikanser İlaçların Nöron ve Glioblastoma Multiforme Kanser Kültürlerinde Glutamat Taşıyıcıları ve Reseptörleri Üzerindeki Etkileri (2015) Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU
- 2- NANOTIP Doktora tezi: Metformin HCL ve Irinotecan PLGA nanopartiküllerin Glioblastoma Multiforme üzerindeki etkilerinin in vivo ve in vitro olarak araştırılması.(2015) Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU
- 3- Veterinerlik Yüksek lisans tezi: cristal soil maddesinin ras 308 civcivleri üzerinde "yemek alımı / kas" oranının araştırılması (2008) Prof.Dr.Mesoud TESHFAM

6-ARAŞTIRMA ALAN(LAR)I

- 1- Nano ilaç taşıma sistemleri
- 2- glioblastoma multiforme
- 3- Nanotoksikoloji
- 4- Hücre ve kanser Kültürü Teknikleri
- 5- deneysel hayvan modelleri (beyin kanseri, hepatoensefalopati, deneysel ağrı modelleri, hipertansiyon modelleri, depresyon modelleri)

7. YAYINLAR

A) ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER (SCI & SSCI & ARTS AND HUMANITIES)

- 1- Ahiskalioglu, A., I. Ince, M. Aksoy, E. O. Ahiskalioglu, M. Comez, A. Dostbil, M. Celik, H. H. Alp, R. Coskun, **A. Taghizadehghalehjoughi** and B. Suleyman (2014). "Comparative Investigation of Protective Effects of Metyrosine and Metoprolol Against Ketamine Cardiotoxicity in Rats." *Cardiovasc Toxicol*

B) ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN BİLDİRİLER

1. 11th nanoscience and nanotechnology conference (nano TR-11) Ankara, turkey
“biosynthesis of gold nanoparticles using ziziphusjuba fruit and gum Arabic extract as reducing and stabilizing agents” 22-25 june, 2015
2. Poster presentation in IPTS International Pharmaceutical Technology "Metformin hcl-loaded plga-ethyl cellulose (ec) nanoparticles (nps): preparation and in vitro evaluation" (2014)
3. Poster presentation in international Nano tr 9 conference "The effect of metformin and doxorubicin nanoparticles on glioblastoma multiforme cancer cell culture" (2013)
4. D.V.M thesis titled "Impacts of different levels of crystal soil materials on the performance and blood Parameters of Ross-308 broiler chickens," Under supervision of Prof. Dr. Teshfam & Prof. Dr. Talebi. (2008)

8- Sertifikalar

- 1- “5th applied cell culture and molecular biology researches course” by examination (PCR, RT-PCR, apoptosis analyse method, siRNA technologies application area, Western Blot application area, Cell biology, tunel assay, XTT assay) 2015
- 2- “Nöropatoloji kursu” atatürk üniversitesi ve anadolu patoloji derneği Prof. Dr. Tarık TİHAN, 25 nisan 2015
- 3- Prof. Dr. S. Oğuz Kayaalp Toplantısı “ kuşaklararası bilimsel etkileşme semineri” katılım belgesi 17-19 mart 2014
- 4- Immunohistokimyasal Görüntüleme Teknikleri (IHC) Eğtmi Sertifikası (2013)
- 5- In-Situ Hibridizasyon (ISH) Görüntüleme Teknikleri Eğtmi Sertifikası (2013)
- 6- Nöron Kültürü Kursu Sertifikası (2013)
- 7- Voltametri Kursu (2013)
- 8- Psikiyatride Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri (2012)
- 9- İleri Hücrel Sinir Bilim Toplantısı, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Ana bilim Dalı (2012)

9- Toplantı Organizasyon

- 1- 4. İleri Hücrel Sinir Bilim Toplantısı (2013)