

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MEME KANSERİNDE NANOPARÇACIKLAR  
KULLANILARAK KOMBİNE TEDAVİ  
UYGULAMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan  
Gizem SÜMER**

**Danışman  
Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**

**İstanbul – 2018**

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MEME KANSERİNDE NANOPARÇACIKLAR  
KULLANILARAK KOMBİNE TEDAVİ  
UYGULAMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan  
Gizem SÜMER**

**Danışman  
Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**

**İstanbul – 2018**

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Gizem SÜMER tarafından hazırlanan **Meme Kanserinde Nanoparçacıklar Kullanılarak Kombine Tedavi Uygulaması** adlı tez çalışma jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.06.2018


Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

İmzası

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Ayyub EBRAHİMİ  
: Danışman, Haliç Üniv.



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU  
: Asıl Üye, Haliç Üniv.



Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLARI  
: Asıl Üye, Kocaeli Üniv.



---

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Temel SAVASKAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Vekil Müdür

# Moleküler Biyoloji ve Genetik tezleri

ORIJINALLIK RAPORU

% **7**

BENZERLIK ENDEKSİ

% **6**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

% **4**

YAYINLAR

% **3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.halic.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.vahitozmen.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	link.springer.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.science.gov İnternet Kaynağı	<% 1
8	sosyalbilimler.cukurova.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	Submitted to Vrije Universiteit Brussel Öğrenci Ödevi	<% 1

Dr. Öğr. Üy. Aygün Ebrahim  
Ebrahim

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, 2015 - 2018 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün, bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına vermiş olduğu destek yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Başta çalışmam boyunca göstermiş olduğu sabır ve güler yüzlülüğü ile bilgi, tecrübe ve yardımlarını hiçbir zaman esirgmeden bana yol gösteren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ' ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tez çalışması için vermiş oldukları büyük destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Tamer ÖNDER ve çalışma arkadaşlarına ve Doç. Dr. Havva Funda YAĞCI ACAR ile Dr. Özlem ÜNAL' a teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak gelişmemde katkı sağlayan hocalarım Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI, Doç. Dr. Baki YOKEŞ, Prof. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Feyza TUFAN ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamız boyunca ihtiyacımız olan her anda, yardım ve desteklerini üzerimizden eksik etmeyen Arş. Gör. Anıl CEBECİ' ye çok teşekkür ederim.

Çalışmaya renk katan, pozitif enerjilerini ve yardımlarını eksik etmeyen laboratuvar arkadaşlarım Meryem OSUM, Pınar AYDINDAĞ, Ezgi KESKE, Feyza Nur ARGÜÇ, Ferhat ERDOĞAN ve Şafak ŞENER' e teşekkür ederim.

Varlığıyla bana dosttan çok kardeş olan, sıcacık kalbiyle sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her anımı onunla paylaşmaktan mutluluk duyduğum, biricik çok sevdiğim can canım Özge BARİM' a yürekten teşekkür ederim.

Mesleğime karşı duymuş olduğum ilgi ve merakın ilk tohumlarını eken ve bana sevdiren halam Prof. Dr. Sibel SÜMER' e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Her zaman bana güvenen, sevgi ve desteklerini üzerimden hiçbir zaman esirgemeyen, canımdan çok sevdiğim biricik kıymetli ailem, annem Selma SÜMER, babam İsmet Ünal SÜMER, ağabeyim Onur SÜMER ve kardeşim Ege SÜMER' e Tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim...

İstanbul, 2018

Gizem SÜMER

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
<b>KISALTMALAR</b> .....	III
<b>TABLolar</b> .....	V
<b>ŞEKİLLER</b> .....	VI
<b>ÖZET</b> .....	VII
<b>SUMMARY</b> .....	VIII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kanser .....	1
1.2. Meme Kanseri .....	3
1.2.1. Epidemiyolojisi .....	3
1.2.2. Moleküler Sınıflandırılması .....	4
1.3. HER2 ve EGFR Genlerinin Kanser Üzerindeki Etkisi .....	6
1.3.1. Monoklonal Antikor ve Küçük Moleküllere Genel Bir Bakış .....	7
1.4. HER2 ve EGFR İlişkili Genlerin Sinyal Yolaklarıyla Olan İlişkisi .....	9
1.4.1. PI3K-Akt Yolağı .....	11
1.4.2. Ras-Raf-MEK-MAPK Sinyal Yolağı .....	12
1.5. Nanoteknoloji.....	13
1.5.1. Nanoparçacıklar ve İlaç İletimindeki Önemi .....	13
1.5.2. Süperparamanyetik Demiroksit Nanoparçacıklar Kullanım Avantajları .....	15
<b>2. AMAÇ</b> .....	17
<b>3. MATERYAL</b> .....	18
3.1. Biyolojik Örnekler .....	18
3.2. Kimyasallar ve Solüsyonlar .....	18
3.3. Cihazlar .....	19
3.4. Kitler .....	21
3.5. Sarf malzemeler .....	21
3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Primerleri.....	23
<b>4. YÖNTEM</b> .....	25
4.1. Hücre Hatlarının Belirlenmesi .....	25
4.2. Hücre Hatlarının Çözülmesi.....	25
4.3. Hücrelerin Büyütülmesi .....	26
4.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	26
4.5. Hücrelerin Dondurulması.....	27
4.6. MTT Analizi.....	29
4.7. Total RNA İzolasyonu .....	30
4.8. cDNA Sentezi.....	32

4.9. Kantitatif GZ-PZR Analizi.....	33
4.10. Verilerin İstatistiksel Analizleri .....	35
<b>5. BULGULAR</b> .....	<b>36</b>
5.1. SKBR3 ve dH1f Hücre Hatlarının HER2 ve EGFR Ekspresyon Analizleri.....	36
5.2. MTT Analizi.....	37
5.2.1. SPION Doz Belirleme.....	37
5.2.2. 50 µg/ml SPION.....	39
5.3. Kantitatif GZ-PZR .....	40
<b>6. TARTIŞMA</b> .....	<b>46</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>49</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>55</b>

## KISALTMALAR

<b>AR</b>	: Amphiregulin
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lymphoma-2
<b>CDC</b>	: Siklin bağımlı kompleks
<b>CDK</b>	: Siklin bağımlı kinaz
<b>CKI</b>	: Siklin kinaz inhibitörü
<b>Cx26</b>	: Konneksin 26
<b>dH1f</b>	: H1 insan embriyonik kök hücrelerden farklılaşmış fibroblast
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>EGFR</b>	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>ER</b>	: Östrojen reseptörü
<b>ERK</b>	: Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz
<b>EXO-1</b>	: Eksonükleaz-1
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>GDP</b>	: Guanozin difosfat
<b>Grb2</b>	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
<b>GTP</b>	: Guanozin trifosfat
<b>HER2</b>	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	: Hipoksi indüklenbilir faktör -1 $\alpha$
<b>IACR</b>	: Uluslararası kayıtlar birliği
<b>IARC</b>	: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>GZ-PZR</b>	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>M</b>	: Mitoz
<b>mAb</b>	: Monoklonal antikor



<b>MAPK</b>	: Mitojen ile aktive olan kinaz
<b>Mcl1</b>	: Myeloid lösemi hücre farklılaşması proteini1
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MRI</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>NSCLC</b>	: Küçük olmayan hücre akciğer kanseri
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu salin
<b>pH</b>	: Potansiyel hidrojen
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinositol-3-kinaz
<b>PIP2</b>	: Fosfatidilinositol (4,5) bisfosfat
<b>PIP3</b>	: Fosfatidilinositol (3,4,5)
<b>PDK</b>	: Fosfatidilinositol bağımlı kinaz
<b>Rb</b>	: Retinoblastoma
<b>PR</b>	: Progesteron reseptörü
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>RTK</b>	: Reseptör tirozin kinaz
<b>S</b>	: Sentez
<b>sn</b>	: Saniye
<b>Sos</b>	: Son of sevenless
<b>SPION</b>	: Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacık
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	: Transforme büyüme faktörü alfa
<b>TMHDF</b>	: Türkiye meme hastalıkları dernekleri federasyonu
<b>UMKVT</b>	: Ulusal meme kanseri veri tabanı
<b>US FDA</b>	: Amerika birleşik devletleri gıda ve ilaç idaresi
<b>WHO</b>	: Dünya sağlık örgütü
<b><math>\mu</math>g</b>	: Mikrogram
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar

## TABLULAR

	<b>Sayfa No.</b>
<b>Tablo 1.1.</b> Moleküler Sınıflandırmayla Alt Sınıfların Ayrılması .....	5
<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar .....	19
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmaya Ait Cihazlar ve Marka Modelleri .....	20
<b>Tablo 3.3.</b> Kitler .....	21
<b>Tablo 3.4.</b> Çalışma İçin Kullanılan Sarf Malzemeler .....	21
<b>Tablo 3.5.</b> Genler ve Kantitatif GZ-PZR Primer Dizileri .....	23
<b>Tablo 4.1.</b> Hücre Hatları, Besiyeri Solüsyonları ve Oranları .....	26
<b>Tablo 4.2.</b> Dondurma Besiyeri Solüsyonları ve Oranları .....	28
<b>Tablo 4.3.</b> RNA Denatürasyonu Aşaması Bileşenleri ve Çalışma Hacimleri .....	33
<b>Tablo 4.4.</b> GZ-PZR Bileşenleri .....	34

## ŞEKİLLER

### Sayfa No.

Şekil 1.1. HER2 ile İlişkili Sinyal Yolakları.....	7
Şekil 1.2. HER Aktivasyonu ve PI3K-Akt Yolağıyla İlişkisi.....	11
Şekil 1.3. Ras-Raf-MEK-ERK Sinyal Yolağı.....	13
Şekil 1.4. Nanoparçacıkların Endositoz Yoluyla İçselleştirilmesi.....	15
Şekil 1.5. SPION Şematik Yapısı .....	16
Şekil 5.1. dH1f ve SKBR3 Hücreleri HER2 Ekspresyon Analizi .....	36
Şekil 5.2. dH1f ve SKBR3 Hücreleri EGFR Ekspresyon Analizi .....	37
Şekil 5.3. dH1f Hücre Hatlarında SPION Doz Belirleme Sonuçları .....	38
Şekil 5.4. SKBR3 Hücre Hatlarında SPION Doz Belirleme Sonuçları.....	38
Şekil 5.5. 50 µg/ml SPION ile Muamele Edilen dH1f Hücrelerinin MTT Analizi... 39	
Şekil 5.6. 50 µg/ml SPION ile Muamele Edilen SKBR3 Hücrelerinin MTT Analizi40	
Şekil 5.7. SKBR3 Hücrelerinde Cx26 Gen Ekspresyon Analizi .....	41
Şekil 5.8. SKBR3 Hücrelerinde EXO-1 Gen Ekspresyon Analizi .....	42
Şekil 5.9. SKBR3 Hücrelerinde HIF-1α gen ekspresyon analizi.....	43
Şekil 5.10. SKBR3 Hücrelerinde Mcl1 Gen Ekspresyon Analizi.....	44
Şekil 5.11. SKBR3 Hücrelerinin MDM2 Gen Ekspresyon Analizi.....	45

## GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Gizem SÜMER  
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ  
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans - Mayıs 2018

## ÖZET

### MEME KANSERİNDE NANOPARÇACIKLAR KULLANILARAK KOMBİNE TEDAVİ UYGULAMASI

Meme kanseri, kadınlarda yaygın olarak görülen, tümörün heterojen olması nedeniyle tedavisi oldukça zor olan ölümcül bir kanser türüdür. Kemoterapi gibi mevcut kanser tedavilerinde, ilaçların tümör dokusuna spesifik olarak ulaşamaması ve sağlıklı dokulara potansiyel toksik etki bırakmaları nedeniyle, hastalarda olası yan etkiler gözlenmesine neden olmaktadır. Günümüz nanoteknoloji ve biyotıp alanındaki gelişmelerle birlikte geliştirilen nanoparçacıklar, ilacın spesifik dağıtımı ve kontrollü salınımını sağlamaları nedeniyle, onkoloji alanında büyük yankı uyandırmıştır.

Bu çalışmada monoklonal antikorlar (mAb) ile yüklü biyo-uyumlu süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar (SPION) kullanılarak, aynı anda birden fazla reseptörün hedef alınması ve hücrelerin spesifik olarak öldürülmesi amaçlanmıştır. SKBR3 meme kanseri ve kontrol olarak dH1f fibroblast hücre hatları üzerinde, trastuzumab ve cetuximab mAb'larıyla yüklü SPION ile kombine ilaç tedavisi uygulanması gerçekleştirildi. Toksik doz, tekli ve kombine tedavinin etkisi, hücrelere uygulamanın ikinci gününde MTT hücre canlılığı testi kullanılarak belirlendi. Hücrelerin ölümü ve sinyal yollarıyla ilişkisi, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) kullanılarak, kanser yollarındaki anahtar genler üzerinden incelendi.

Sonuç olarak kontrol hücrelere kıyasla, kombine tedavi uygulanan hücrelerde kanser hücrelerinde ölüm oranının artmasının yanı sıra, apoptoz ilişkili genlerde ekspresyon artışı gözlenmiştir.

Bu sonuçlar ışığında, tasarlanan kombine ilacın, özellikle meme kanseri tedavisi kullanımını açısından oldukça umut verici olduğu gösterilebilir.

**Anahtar kelimeler:** Meme kanseri, SPION nanoparçacık, kombinasyon tedavisi

## **GENERAL INFORMATION**

Name and Surname : Gizem SÜMER  
Field : Molecular Biology and Genetics  
Program : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Assist Prof. Dr. Ayyub EBRAHIMI  
Degree Awarded and Date : Master of Science - May 2018

## **SUMMARY**

### **COMBINATION THERAPY BY USING NANOPARTICLES IN BREAST CANCER**

Breast cancer (BC) is one of the most common lethal cancer in women. The treatment of BC is very difficult due to the heterogeneity of the tumor. In current cancer treatments such as chemotherapy, potential side effects are observed in patients due to the delivery problems and effect of these drugs on both tumor and healthy cells. Nanoparticles developed together with the nanotechnology and biomedicine have great promises in the oncology field due to the specific distribution and controlled release of the drug.

In this study, biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) loaded with trastuzumab and cetuximab monoclonal antibodies were used to target multiple receptors at the same time and was performed on SKBR3 BC cell lines and dH1f fibroblasts as a control cells. The toxic dose, effect of single and combinational therapy was assessed by MTT cell viability test on the second day. Specific cell death related factors in cancer signaling pathways was determined by using qRT-PCR.

As a result, compared with control cells, beyond high mortality in cancer cell lines, increased expression of apoptosis-related genes was observed in combined treatment.

These results show that the combined drugs which designed is very promising, especially in terms of BC treatment.

**Key words:** Breast Cancer, SPION nanoparticle, Combination therapy

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Kanser

Normal vücut dokularının çoğu, gerektiği zaman bölünme ve büyüme yeteneğine sahip olan hücrelerden oluşmaktadır. Hücrelerin bu proliferasyon süreci, hücre çekirdeğinin DNA' sında bulunan genler tarafından kontrol edilmektedir. Bu genler, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Proto-onkogenler, uygun büyüme sinyallerinin varlığında hücre proliferasyonunun pozitif olarak düzenlenmesinde, tümör baskılayıcı genler ise hücre büyümesinin negatif olarak düzenlenmesinde görevlidir. Dolayısıyla uygun büyüme sinyallerinin yokluğunda tümör baskılayıcı genler devreye girerek, hücrelerin düzensiz büyümesinin baskılanmasını veya kontrolünü sağlar (Stephens ve Aigner, 2009: 3-5). Kanser hücrelerinde ise bu genler ya mutasyondur ya da kontrolünü kaybetmiş durumdadır. Hücre bölünmesi, DNA hasar tamiri, programlı hücre ölümü olan apoptoz, hücrel farklılaşma, hücre-hücre etkileşimleri ve hücre göçü gibi daha pek çok hücrel süreç, bu mutasyonlardan etkilenmektedir. Bu hücreleri tehlikeli yapan en önemli neden ise, kontrolsüz bir şekilde çoğalmaları ve metastaz adı verilen diğer çevredeki dokulara, hücrelerin yayılmasıdır. Kanser, çoğunlukla somatik hücrelerdeki mutasyonlardan meydana gelmektedir. Ayrıca %5 oranında eşey hattı mutasyonlarıyla da ilişkilidir. Bu durum ise kişinin bazı kanser türlerine olan genetik yatkınlığının artmasına neden olmaktadır. Tek gen mutasyonlarıyla da oldukça nadir görülen kanser türleri, daha çok birden fazla mutasyonun birikmesinden kaynaklanır ve bu yönüyle diğer genetik hastalıklardan ayrılmaktadır (Klug ve diğ.,2018: 470). Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M fazı olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır. Hücrelerin döngü boyunca ilerleyebilmesi için siklinlerin, siklin bağımlı kinazları

(CDK) aktive etmesi gerekmektedir. G1' den S fazına geçiş için kontrol noktası olan retinoblastoma (Rb) proteinleri tümör baskılanması, hücre döngüsü düzenlenmesi ve apoptoz gibi hücre sel süreçlerde görev almaktadır. Rb proteinlerinin aktivasyonu için gerekli olan fosforilasyon, siklin-D-bağımlı kinazlar, CDK4 ve CDK6 ile kontrol edilmektedir. Bu kontrol ise, D siklinler ve CDK inhibitörlerinin değişen seviyeleriyle düzenlenmektedir. Mitojenik sinyallere karşı CDK' lar, Rb gen ailesi üyelerini fosforilleyerek, Rb aile üyeleri ve E2F transkripsiyon faktörü arasındaki kompleksin yıkılmasına neden olur. Böylece G1 fazından S fazına geçiş için E2F transkripsiyon faktörlerinin salınımı gerçekleşir. E2F, hem büyüme hem de büyüme baskılayıcı genlerin düzenlenmesinde ve hedef genlerin ekspresyon düzeylerine göre hücre kaderinin belirlenmesindeki dengenin sağlanmasında rol oynamaktadır. Genomik bütünlüğün izlenmesi, genomik kararlılığın kontrolü ve apoptoz gibi daha pek çok süreçlerde anahtar rol oynayan p53, Siklin kinaz inhibitörü (CKI) olan p21' in protein seviyelerini artırarak hasarlı olan hücrelerin G1 fazında tutuklanmasını sağlar. Hücre döngüsünün sentez (S) fazında ise DNA duplikasyonu gerçekleşmektedir. CDK' ların, S fazının başlangıcından G2-M fazının sonuna kadar DNA replikasyon faktörlerini fosforile ettiği gözlenmiştir. G2 fazından M fazına geçiş ise siklin bağımlı kompleks (CDC), CDC2/siklin B' nin aktivitesine bağlıdır. CDK2' nin aktivasyonu, DNA replikasyonu tamamlanmadan mitotik olayların başlamasına engel olur. Hücrelerin S fazına ilerlemesiyle Siklin B birikimi artmaya başlar ve G2' nin sonlarına doğru en üst seviyeye kadar ulaşır. Replikasyon tamamlandıktan sonra ise CDK2 defosforile olarak inaktif duruma geçer ve hücrelerin M fazına geçişi sağlanmış olur. Kanserli hücrelerde ise genellikle G2 kontrol noktasının kaybolduğu gözlenmiştir (Cassidy, Bisset, Obe, 2002: 21-24, Morris ve Dyson, 2001).

## **1.2. Meme Kanseri**

Bir meme dokusu, salgı bezleri, memebaşı lobülleri, bağ dokusu, lenfatik dokuyu bağlayan kanallar ve yağ dokusundan oluşmaktadır. Meme kanseri ise, memenin herhangi bir bileşenini oluşturan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesiyle meydana gelmektedir. Bu hücreler genellikle bir yumru olarak hissedilebilen ve röntgende de gözlenebilen bir tümör oluştururlar ve bu hücrelerin erken tespiti, mamografi yardımıyla gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle süt üretimini sağlayan bezlerin oluşturduğu lobüler meme dokusunda ve memebaşına lobülleri bağlayan kanallarda meme kanseri daha sık gözlenmektedir. İnvaziv özelliğe sahip olan bu hücreler, çevre dokular ve lenf dokuları dahil olmak üzere vücudun farklı bölgelerine metastaz yapabilirler (Winters ve diğ.,2017: 2; Alteri ve diğ.,2011; American Cancer Society, 2017).

### **1.2.1. Epidemiyolojisi**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), kanser araştırmaları için, 1965 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) ve 1966 yılında Uluslararası Kayıtlar Birliği (IACR) kurmuştur (Ferlay ve diğ.,2008). Bu iki merkez birbirleriyle iş birliği içerisinde çalışarak, dünya genelindeki kanser kayıtlarının oluşturulması, kanser insidansı ve uygulanan tedavilere karşı alınan sonuçların değerlendirilmesi adına büyük katkı sağlamaktadır (Özmen, 2014). Gelişmekte olan ülkeler dahil olmak üzere, tüm dünya genelindeki kadınlarda en sık teşhisi konulan ve erkeklerde de nadir olarak görülebilen ölümcül bir kanser türü olan meme kanseri, 2013 yılında kansere bağlı ölümlerin %15' ini oluşturmaktadır. Her yıl meme kanseri için tahmini 1,7 milyon yeni vaka teşhis edilmektedir (Globocan, 2012; Winters ve diğ.,2017:2-4).

Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu (TMHDF) bünyesinde kurulan Ulusal Meme Kanseri Veri Tabanı (UMKVT), 2005 yılından itibaren meme kanseri teşhisi konulan kadınların patolojik ve klinik analizlerini yaparak onların



kayıt altında tutulmasını sağlamaktadır. 1993 yılında meme kanserinin insidansı 24,1/100,000 oranında hesaplanırken, 2010 yılında bu oranın 50/100,000' ye yükseldiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, Türkiye' deki meme kanseri insidansında ciddi bir artış olduğunu göstermektedir (Özmen ve Anderson, 2008).

### **1.2.2. Moleküler Sınıflandırılması**

Meme kanserine yol açan hücrelerin moleküler olarak farklı histopatolojik ve biyolojik özellikler göstermeleri, uygulanan tedavilere farklı yanıt vermesine neden olmaktadır. Bu nedenle, mevcut tedavilere karşı daha iyi sonuç alınabilmesi için meme kanserinin sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmuştur (Bloom ve Richardson 1957; Viale, 2012). Perou ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan global gen ekspresyon profili çalışmalarının sonucunda, meme kanserinin heterojen bir hastalık olduğu ve moleküler olarak alt sınıflara ayrılabilceği öne sürülmüştür (Perou ve diğ.,2000).

İmmunohistokimyasal analiz yöntemi yardımıyla meme kanseri, luminal meme kanseri, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) aşırı eksprese olan meme kanseri, bazal benzeri meme kanseri ve normal meme benzeri olmak üzere toplam dört alt sınıfa ayrılmıştır. Luminal meme kanseri düşük proliferatif etki gösteren luminal A ve yüksek proliferatif etki gösteren luminal B olmak üzere, kendi içerisinde ikiye ayrılmaktadır (Subik ve diğ.,2010; Habashy ve diğ.,2011).

Luminal A alt sınıfını oluşturan hücrelerin, östrojen (ER) ve progesteron (PR) hormon reseptörleri pozitif, HER2 reseptörü ise negatiftir. Luminal B alt sınıfını oluşturan hücrelerin ise, ER ve PR hormonları ve HER2 reseptörlerinin pozitif olduğu gözlenmiştir. Artan HER2 seviyelerinin, hastalığın daha da agresif ilerleyişi ve hasta sağ kalımında azalma ile ilişkisi olduğunu gözlemleyen Slamon ve çalışma arkadaşları, yapmış oldukları bir araştırmada, meme kanseri teşhisi konulan kadınların yaklaşık olarak %20 ila %30' unda HER2 aşırı ekspresyonu olduğunu belirlemiştir. Meme kanserinin HER2 aşırı eksprese olan alt sınıfına ait hücrelerin, östrojen ve progesteron reseptörlerinin negatif olduğu gözlenmiş (Tablo 1.1) ve her

iki alt sınıfa ait hücrelerde ise epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) pozitif veya negatif olabildiği belirlenmiştir (Slamon ve diğ.,1987; Sorlie ve diğ.,2001; Subik ve diğ.,2010).

**Tablo 1.1.** Moleküler Sınıflandırmayla Alt Sınıfların Ayrılması (Subik ve diğ.,2010).

	ER and/or PR	HER2 over-expression	EGFR and/or CK5/6
Luminal A subtype	+	-	- or +
Luminal B subtype	+	+	- or +
HER2 subtype	-	+	- or +
Basal like subtype	-	-	+
Unclassified subtype	-	-	-

Bazal benzeri meme kanseri, üçlü negatif meme kanseri olarak da bilinmektedir. Bu alt sınıfa ait hücrelerin EGFR reseptörlerinde ekspresyon olmasına rağmen, ER ve PR hormon ve HER2 reseptörlerinde ekspresyon görülmemektedir (Marotti ve diğ.,2017; Park ve diğ.,2014). Ayrıca yapılan bir araştırmanın sonucunda, bazal benzeri meme kanserinin diğer alt sınıflara göre daha kötü prognoz gösterdiği gözlenmiştir (Bauer ve diğ.,2007).

2007 yılında, Herschkowitz ve çalışma arkadaşları tarafından “Claudin low” olarak adlandırılan yeni bir meme kanseri alt sınıfı tanımlanmıştır. Bu alt sınıfa ait tümörler, bazal benzeri yani östrojen, progesteron ve insan epidermal büyüme faktörü 2 reseptörleri negatif olan kötü prognozlu metaplastik ve yüksek medüller farklılaşmaya sahip invaziv duktal karsinomlardır (Herschkowitz ve diğ.,2007; Prat ve diğ.,2010).

### 1.3. HER2 ve EGFR Genlerinin Kanser Üzerindeki Etkisi

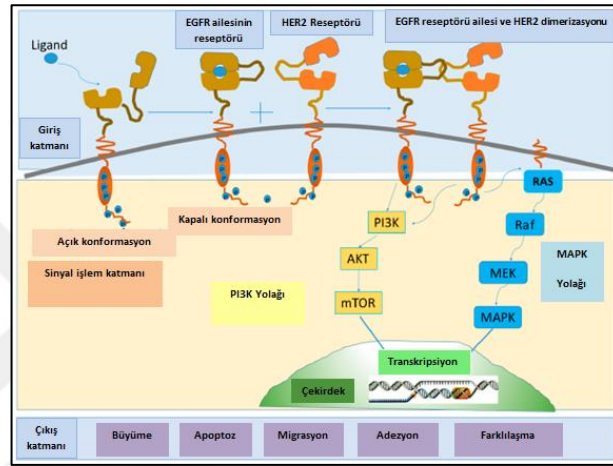
17. kromozomun uzun kolunun 21. bölgesinde lokalize olan (17q21), 1255 amino asit dizisine sahip 185 kilodalton (kDa) ağırlığında bir reseptör tirozin kinaz (RTK) kodlayan HER2/neu veya erbB-2 olarak da adlandırılan HER2 proto-onkogeni, insan kanserleri arasında en sık değişime uğrayan genler arasında yer almaktadır (Coussens ve diğ.,1985; Hynes ve Stern, 1994; Saini ve diğ.,2011).

HER ailesi, HER1 (EGFR, ErbB1), HER2 (c-Erb-2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4) olarak adlandırılan, birbirleriyle yapısal olarak ilişkili dört reseptörden oluşmaktadır. Bu reseptörlerin homo veya heterodimerizasyonu, hücre proliferasyonu, hareketi ve invazyonu için büyük katkı sağlamaktadır (Slamon ve diğ.,1987; Saini ve diğ.,2011; Holbro ve diğ.,2003). Birçok kanser türü, gen amplifikasyonu veya reseptör tirozin kinazların aşırı ekspresyonu sonucunda meydana gelmektedir. Tirozin kinaz reseptörünün aşırı ekspresyonunun, ortamda herhangi bir spesifik ligand bulunmamasına rağmen reseptör dimerizasyonu insidansını arttırdığı ve hücrelerin anormal, kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yol açarak tümör oluşumuna katkıda bulunduğu gözlenmiştir (Slamon ve diğ.,1987).

HER2 proteini, hücre dışı amino-terminal bölgesi, hidrofobik transmembran domaini ve karboksi-terminal kinaz domaini olmak üzere üç ana domainden meydana gelmektedir. Hücre dışı amino-terminal bölgesi, domain I, II, III ve IV olmak üzere, kendi içerisinde dörde ayrılmaktadır. Bunlardan domain III hariç, I, II ve IV domainleri, HER2-EGFR heterodimerizasyonu ile ilişkilidir (Margolis ve diğ.,1989; Kumagai ve diğ.,2001).

Ligandın hücre dışı domaine bağlanması, şekil 1.1 üzerinde belirtildiği gibi reseptör dimerizasyonunu indükleyerek RTK aktivitesinin artmasına neden olur. EGF reseptörüne ligandın bağlanması durumunda, hücre içi katalitik domainde sitoplazmik tirozin kinazın otofosforilasyonu gerçekleşir. Bu otofosforilasyon ise, Ras/Raf/mitojen ile aktive olan kinaz (MAPK) ve fosfatidilinositol-3-kinaz(PI3K)-Akt yollarının uyarılmasına neden olur.

Proliferasyonu destekleyen Ras-MAPK yolağı ve apoptozdan kaçışa neden olan PI3K-Akt yolağının aktive olması, tümör büyümesine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Cappuzzo, 2014: 7; Yarden ve Sliwkowski, 2001; Zwick ve diğ.,2002).



Şekil 1.1. HER2 ile İlişkili Sinyal Yolakları (Lv ve diğ., 2016).

### 1.3.1. Monoklonal Antikor ve Küçük Moleküllere Genel Bir Bakış

Son yirmi yıl içerisinde, seksenden fazla moleküler hedefli onkoloji ilacı Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanmıştır. Farklı etki ve mekanizmalara sahip olan bu ilaçlar, tümör büyümesi ve karsinogenezin hızlanmasında rol oynayan, spesifik yolakları hedef alarak bloke edilmesini sağlayan monoklonal antikorlar ve küçük moleküllerden oluşmaktadır. HER2 ve EGFR sinyali bileşenleri, kanser tedavisinde hedef alınan ve başarıyı sağlayan terapötik hedefler arasında yer alır (Twomey ve diğ.,2017). Bu ilaçlardan birkaç tanesi aşağıda verilmiştir.

- **Lapatinib**

EGFR ve HER2' yi aynı anda hedef alarak inhibe edilmelerini sağlamak amacıyla geliştirilen lapatinib (GW2016), HER2 ve EGFR tirozin kinaz katalitik aktivitelerinin inhibisyonunda görev alır (Rusnak ve diğ.,2001).

- **Pertuzumab**

Pertuzumab, HER2 reseptörünün hücre dışı domaini II' ye bağlanarak, diğer erbB/HER reseptörleriyle dimerizasyonuna engel olan monoklonal bir antikordur (Jhaveri ve Esteva, 2014).

- **Trastuzumab**

Herceptin olarak da bilinen trastuzumab, HER2 reseptörünün hücre dışı domainine bağlanarak, HER2 sinyalinin bloke edilmesini sağlayan monoklonal bir antikordur. Faz I ve II çalışmaları sonucunda, HER2 pozitif meme kanserine karşı klinik aktivite göstermesi nedeniyle trastuzumab, meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan temel ajanlardan biri olmuştur (Montemurro ve Aglietta, 2005; Slamon ve Mark Pegram, 2001).

- **Panitumumab**

EGFR içselleştirilmesini indükleyen, EGF reseptörüne karşı yönlendirilen ilk monoklonal antikordur. EGFR aktivasyonuna neden olan otofosforilasyon, dimerizasyon ve sinyal iletimi gibi hücresel süreçleri önleyerek, anjiyogenezin azalmasını ve tümör hücrelerinin apoptoza uğramasını sağlayan panitumumab, metastatik kolorektal kanseri tedavisinde tercih edilen ajanlardan biridir (Dubois ve Cohen, 2009).

- **Cetuximab**

Bir diğer adı erbitux olan cetuximab, kolorektal, meme, mesane ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere, birçok kanser türünde aşırı eksprese olan EGF reseptörünün hücre dışı domainine bağlanan monoklonal bir antikordur (Martinelli ve diğ., 2009; Bou-Assaly ve Mukherji, 2010).

- **Erlotinib ve Gefitinib**

EGF reseptörünün tirozin kinaz domainini, seçici ve geri dönüşümlü bir şekilde inhibe eden erlotinib ve gefitinib, özellikle küçük olmayan hücre akciğer kanseri (non-small cell lung cancer-NSCLC) hastaları için geliştirilmiş olan küçük moleküllerdir (Krawczyk ve diğ.,2017).

#### 1.4. HER2 ve EGFR ilişkili Genlerin Sinyal Yolaklarıyla İlişkisi

- **HIF-1 $\alpha$**

Hipoksi indüklenebilir faktör-1 (Hypoxia-inducible factor-1 / HIF-1) proteini, heterodimerik olup, bir alfa ( $\alpha$ ) bir de beta ( $\beta$ ) alt biriminden oluşmaktadır. EGFR aktivasyonu gerçekleştiği zaman sentezlenen HIF-1 $\alpha$  alt birimi, hızla bozulmaya uğradığı için hücrelerde tespit edilmesi zordur (Jiang ve diğ.,1996; Zhong ve diğ., 2000; Pore ve diğ., 2006).

HIF-1 $\alpha$ , enerji metabolizması, anjiyogenez, apoptoz ve oksijen dağıtımını artıran protein ürünleri veya birçok genin transkripsiyonunu aktive ederek, hipoksi için hücrel yanıtın ana düzenleyicisi olarak işlev görür. HIF-1 $\alpha$  protein sentezinin inhibisyonu, PI3K-Akt yolağının etkili bir şekilde inhibe edilmesine bağlıdır. Cetuximab monoklonal antikorunun ise, HIF-1 $\alpha$  sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir (Li ve diğ., 2008).

- **Mcl1**

HER2' nin aşırı ekspresyonu, B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) proteinlerinden olan anti-apoptotik myeloid lösemi hücre farklılaşması proteini1 (myeloid leukemia cell differentiation protein / Mcl1) ile ilişkilidir. Trastuzumab ile muamele edilen HER2 aşırı eksprese olan hücrelerde, Mcl1 ekspresyonunun azaldığı ve hücrelerin apoptoza daha duyarlı hale geldiği gözlenmiştir (Booy ve diğ., 2011; Henson ve diğ., 2006).

- **MDM2**

p53 geni, hücre hasarına bağlı olarak hücre döngüsünün durdurulması, yaşlanma (senescence) ve apoptoz gibi başlıca süreçlerde rol oynayan, tümör baskılayıcı bir genidir. MDM2, p53 tümör baskılayıcısını ubiquitinleyerek degradasyonunu sağlayan bir E3 ligazdır. HER2, Akt yolağının aktivasyonunu sağlayarak MDM2 geninin upregülasyonu ile p53 aracılı apoptozun bastırılmasına neden olmaktadır (Wu ve Levine, 1997; Levine, 1997; Moll ve Petrenko, 2003; Zhou, 2001).

- **EXO-1**

Eksonükleaz-1 (EXO-1) ekspresyonu, hücre proliferasyonu, genomik kararsızlık, Ras/Akt sinyal yollarının aktivasyonu ve meme tümörlerinde p53 aktivitesinin azalmasının göstergesi olarak bulunmuştur. Gen ekspresyonuna dayalı analiz sonuçlarında, meme tümörlerinde aktif olan EXO-1 için terapötik bir yaklaşım olarak Ras/PI3K inhibisyonu öne sürülmüştür. EGFR ve Ras ise, EXO-1' in pozitif düzenleyicileridir. EGFR' ı hedef alan gefitinib ile tedavi edilen meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmanın sonucunda, EXO-1' in ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir (Muthuswami 2013).

- **Cx26**

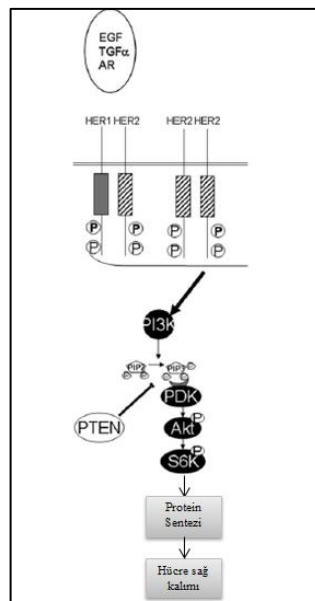
Konneksinler, konneksin adı verilen hekzamerik transmembran fonksiyonel kanal oluşturan, yüksek oranda korunmuş proteinlerden meydana gelen çoklu gen ailesinin bir üyesidir. Altı adet konneksin monomeri bir araya gelerek ortasında boşluk bulunan kurulu bir konneksin, başka bir deyişle hemikanal oluşturur. Birbirleriyle bitişik olan hücrelerin üzerindeki konneksinler kenetlenerek boşluk kavşağını (gap junction) oluştururlar. Boşluk kavşaklarının hücreler arasındaki etkileşim, iç denge, hücre farklılaşması ve hücre büyümesi kontrolünü içeren hücresel süreçler üzerinde önemli bir rolü vardır (Kumar ve Gilula, 1996; Kanczuga-Koda ve diğ.,2006; Vinken ve diğ.,2006).

Meme dokusunun iç dengesi, doğrudan hücre-hücre etkileşimleriyle gerçekleşir. Konneksin 26 (Cx26) ise, meme bezi gelişimi ve biyolojik fonksiyonu sırasında iç dengenin korunmasını sağlamaktadır. Çoğu çalışmalar, meme kanseri hücre hatlarında Cx26' nın bulunmadığı veya azaldığını ve erken meme kanserinin ilerlemesinde tümör baskılayıcı bir rolü olduğunu öne sürmüştür. Cx26 ekspresyonunun, lenfatik damar invazyonu ve tümör boyutu artışıyla insan meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Yang ve çalışma arkadaşları yapmış oldukları bir araştırmanın sonucunda, Cx26 ile PI3K-Akt sinyal yolağı arasında pozitif bir ilişki olduğunu bulmuştur.

Dolayısıyla Cx26 çoğalma, hücre sağ kalımı ve metastazı düzenleyerek tümör oluşumunu hem pozitif hem de negatif yönde düzenleyebilmektedir (Teleki ve diğ.,2014; Yang ve diğ.,2015; Thiagarajan ve diğ.,2018).

#### 1.4.1. PI3K-Akt Sinyal Yolağı

Şekil 1.2' de belirtildiği üzere; amphiregulin (AR) ve dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ) gibi EGFR aile üyelerinin ligandları tarafından indüklenen HER2, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) yolağını aktive eder. Aktifleşen PI3K, fosfatidilinositol (4,5) bisfosfat (PIP<sub>2</sub>)' a bir fosfat ekleyerek fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat (PIP<sub>3</sub>) molekülüne çevirir. Fosfatidilinositol bağımlı kinaz (PDK), Akt' ı fosforilleyerek aktive eder. Aktifleşen Akt ise, PI3K üzerindeki fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) etkisine karşı gelir. Bir çift fosfataz olan PTEN, PI3K' nın fonksiyonunu negatif düzenleyerek, Akt aktivasyonu ve tümör oluşumunun inhibe edilmesini sağlar. Dolayısıyla PTEN etkisinin ortadan kalkması, hücre sağ kalımının teşvik edilmesiyle sonuçlanır (Delord ve diğ., 2005; Valabrega ve diğ., 2007; Lu ve diğ.,1999).



Şekil 1.2. HER Aktivasyonu ve PI3K-Akt Yolağıyla İlişkisi (Valabrega ve diğ.,2007).

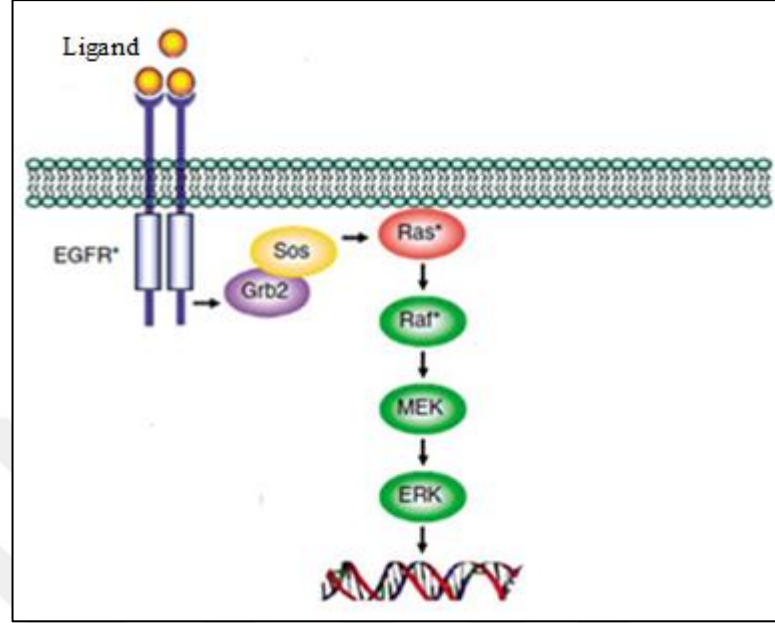


Nagata ve çalışma arkadaşları, trastuzumab monoklonal antikorunun PTEN fosforilasyonunun artmasını sağlayarak, PI3K sinyalini inhibe ettiği ve fosforile olan Akt' in defosforilasyonu ile hücre çoğalmasının nlenmesine yol açtığı sonucuna varmıştır (Nagata ve diğ.,2004).

#### **1.4.2. Ras-Raf-MEK-MAPK Sinyal Yolağı**

Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz (ERK) MAPK sinyal yolağı, hücre çoğalması, sağ kalımı ve metastazını destekleyen ve EGFR tarafından aktive edilen, diğer sinyal yolakları arasında en iyi karakterize edilen sitoplazmik bir sinyal yolağıdır. EGF reseptörünün hücre dışı domainine, reseptör spesifik ligandın bağlanmasıyla, homodimer veya heterodimer oluşumu gerçekleşir. Özellikle EGFR reseptör ailesi yelerinden HER2 ve HER3 reseptörlerinin heterodimerizasyonu, HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunda oldukça önemlidir (Roberts ve Der, 2007; Citri ve diğ.,2003; Holbro ve diğ.,2003).

EGF reseptörüne spesifik ligandın bağlanmasıyla, hücre içi domainin tirozin kinaz kalıntılarında fosforilasyon gerçekleşir. Büyüme faktörü reseptöre bağlı protein 2 (Grb2) proteini, EGF reseptörünün bir sonraki (down-stream) efektörü olup, EGF reseptörü ile “son of sevenless” (Sos) arasında bir adaptör protein olarak görev yapmaktadırdır. EGF reseptörünün fosforilasyonu üzerine fosforillenen Grb2, guanin nükleotit değişim faktörü olan Sos ile bir kompleks oluşturur. Sos proteini, guanozin trifosfatın (GTP), guanozin difosfata (GDP) dönüşümünü teşvik ederek Ras proteininin aktifleşmesini sağlar. Böylece (şekil 1.3' de gösterildiği gibi) sitoplazmadan çekirdeğe doğru uzanan Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolağı başlatılır (Callans ve diğ.,1995; Boguski ve McCormick, 1993; Chardin ve diğ.,1993; Riesco ve diğ.,2017).



Şekil 1.3. Ras-Raf-MEK-ERK Sinyal Yolağı (Roberts ve Der, 2007).

## 1.5. Nanoteknoloji

Polimerler (polimerik nanoparçacıklar, miseller veya dendrimerler) lipitler (lipozomlar), virüsler (viral nanoparçacıklar) ve organometalik bileşenleri içeren materyaller kullanımıyla elde edilen nanoparçacıkların sentezi ve gelişimini kapsayan nanoteknoloji, alanı oldukça gelişmekte olan bir bilim dalıdır (Cho ve diğ.,2008; Hasan, 2015).

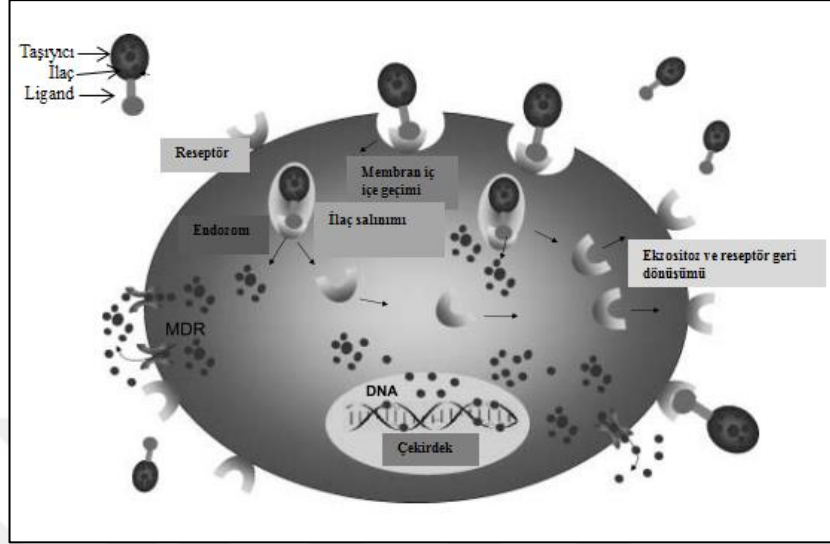
### 1.5.1. Nanoparçacıklar ve İlaç İletimindeki Önemi

Lipozomlar, albümin-bağlı nanoparçacıklar, polimerik nanoparçacıklar, demir oksit nanoparçacıklar, kuantum noktacıklar ve altın nanoparçacıklar olmak üzere

farklı boyut, şekil ve fonksiyonel özelliklere sahip birden fazla nanoparçacık türü mevcuttur (Wang ve Wang, 2014).

Kanser hastalarının tedavisinde kullanılan kemoterapi gibi terapötik ilaçlar, vücut içerisinde spesifik olarak dağıtılmadıkları için hedef tümör dokusundaki hücreler ile birlikte normal hücreleri de etkilemektedir. Bu durum ise, hedef hücrelere ulaşan ilaçların etkin dozunun azaltılması, aşırı toksisite nedeniyle yetersiz sonuçlar elde edilmesi ve vücut metabolizmasında ciddi yan etkiler yaratmasına neden olmaktadır (Khodabandehloo ve diğ., 2016; Williams ve diğ.,2003). Nano vektörler olarak bilinen nanoparçacıklar, küçük boyut ve yüzey alanı özellikleri sayesinde, ilacın spesifik olarak dağıtımını ve kontrollü salınımını sağlayarak başarılı bir tedavi için oldukça umut vaat eden bir araç olmuştur (Wahajuddin ve Arora, 2012).

Tümör spesifik ligand veya monoklonal antikorlarla yüklü parçacıklar, hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanır ve reseptör aracılı endositoz yoluyla şekil 1.4' te de gösterildiği gibi hücre içine alınımı gerçekleşir. Endozomun iç kısmının potansiyel hidrojen (pH) değeri asidik hale geldiğinde, lizozimlerin aktivasyonu gerçekleşir ve aktifleşen lizozimler yardımıyla, ilaçların nanoparçacıklardan salınarak sitoplazmaya geçişi sağlanır. Membran geçişi için uygun özelliğe sahip olan ilaçların hücre içerisine alınımının ardından, ilaçların hedef organellere yönelimi gerçekleşir (Cho ve diğ.,2008).



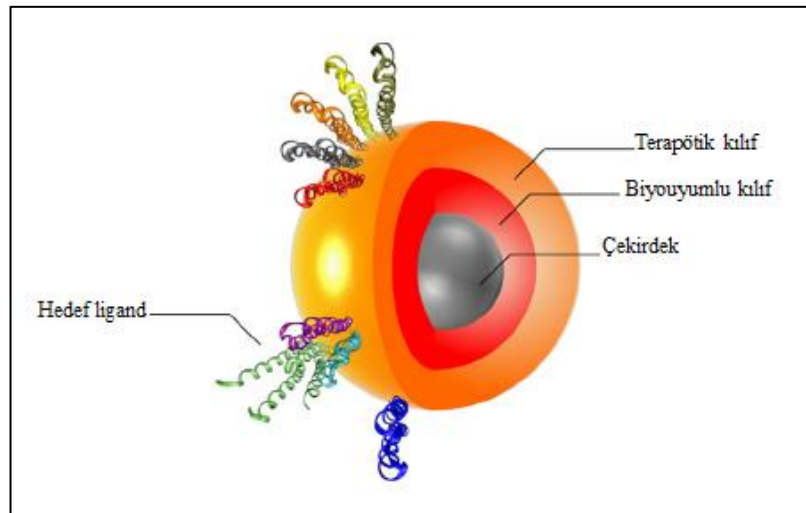
Şekil 1.4. Nanoparçacıkların Endositoz Yoluyla İçselleştirilmesi (Cho ve diğ.,2008).

### 1.5.2. Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacıklar ve Terapötik Olarak Kullanım Avantajları

Manyetik nanoparçacık tasarımında dikkat edilmesi gereken en önemli noktalar; vücut içerisine girdiği zaman hedefini bulabilmek için uygun farmasötik yapıda olması, hastaya herhangi bir zarar vermeyecek biyouyumlu yapıda olması ve biyomedikal görüntüleme sisteminde takip için kullanılan kontrast maddeye sahip olmasıdır (Ferrari, 2005; Sanvicens ve Marco, 2008; Farokhzad ve Langer 2006). Manyetik nanoparçacıklar, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yoluyla izlenmeye olanak veren, içsel manyetik özellikleri sayesinde biyomedikal alanında kullanım için büyük ilgi görmüştür. Bu tür manyetik nanoparçacık sınıfı metalik, bimetalik ve süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları (SPION) içermektedir (Sun ve diğ.,2008; McCarthy ve Weissleder, 2008).

Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar (Şekil 1.5), yaklaşık 10 ila 100 nm çapında bir çekirdeğe sahip olan maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), manyetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) veya hermatit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) parçacıklardır. Manyetit ve maghemit nanoparçacıklar, biyomedikal alanında en çok tercih edilenler arasında yer almaktadır. İlacın yükleme yapıldığı ve içerisinde bulunduğu organik veya organik kaplamaya sahip olan

SPION' lar, bir mıknatıs tarafından hedef dokulara kolayca yönlendirilebilmektedir. Süpermanyetizma özelliği gösteren nanoparçacıkların, doyumluğa ulaşana kadar dış manyetik alana maruz bırakılması durumunda, manyetik alan ortadan kaldırılrsa dahi herhangi bir manyetik kalıntı ile etkileşim içerisine girmedikleri bilinmektedir. Ancak bu durumun, yalnızca 10 ila 20 nm gibi düşük çapta olan nanoparçacıklar için geçerli olduğu bilinmektedir. SPION' a özgü olan süper paramanyetizma durumu, onların ilaç dağıtım aracı olarak kullanılmaları için büyük önem taşımaktadır. Bu durumun nedeni, ilaç yüklenebilir olan bu nanoparçacıkların mıknatıs manyetik alanı etkisi altında vücut içerisinde istenilen hedef dokulara doğrudan iletebilmesinden kaynaklanmaktadır. Oda sıcaklığında herhangi bir manyetizma özelliği göstermeyen bu nanoparçacıklarda yığılma durumu olsa da göz ardı edilebilir bir düzeyde olduğu için kolayca birbirinden ayrılarak fagositler tarafından ortadan kaldırılabilir. Bu durumda kan kılcal damarlarının tıkanma tehlikesi de ortadan kalkmaktadır. Bütün bu olaylar göz önünde bulundurulduğunda, SPION' ların biyomedikal alandaki önemi ve terapötik amaçlar için kullanımları artmaktadır (Kodama, 1999; Dave ve Gao, 2009; Arora, 2012).



Şekil 1.5. SPION Şematik Yapısı (Gobbo ve diğ.,2015).

## 2. AMAÇ

Günümüzde nanoteknoloji ve biyotıp alanındaki gelişmeler, özellikle onkoloji alanında tedavi açısından büyük umut uyandırmaktadır. Heterojen ve bir o kadar karmaşık özelliğe sahip olan meme kanseri hücrelerinin tedavisinde, kullanılacak olan terapotik ajanların seçimi için yapılan ön test ve immunohistokimyasal analizler, bu kanser tipinin tedavisinde kaçınılmaz zaman kaybı yaratmaktadır.

Bu tez çalışmasının temel amacı, meme kanseri hücrelerinde ön testler ve immunohistokimyasal analiz sonuçlarını beklemeden, tedavide zaman kaybının önlenmesi ve heterojen meme kanseri hücrelerinde en yüksek yüzdelerle sahip reseptörlere karşı spesifik olan ilaçlar yardımıyla kombine ilaç tedavi yaklaşımını test etmek ve bu ilaçların meydana getirdiği sonuçların altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatmaktır. Ayrıca kullanmış olduğumuz biyouyumlu nanoparçacıklarla, ilaç tedavisinin sağlıklı hücrelere zarar vermeden, doğrudan ilgili tümör hücrelerini hedef alması sayesinde mevcut kanser tedavilerinin yol açtığı, olası yan etkilerin önüne geçilmesi umut edilmektedir.

### **3. MATERYAL**

#### **3.1. Biyolojik Örnekler**

Tez çalışmasında kullanılan SKBR3 meme adenokarsinoma hücreleri, Koç Üniversitesi, Polimerler ve Nanomateryaller Araştırma Laboratuvarı, Doç. Dr. Havva Funda Yağcı Acar ve H1 insan embriyonik kök hücrelerden farklılaşmış fibroblast (dH1f) hücre hatları, Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kök Hücre Laboratuvarı, Doç. Dr. Tamer Önder tarafından sağlandı.

#### **3.2. Kimyasallar ve Solüsyonlar**

Tez çalışmasında kullanılan, trastuzumab ve cetuximab monoklonal antikorlarıyla yüklü süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar, Koç Üniversitesi, Polimerler ve Nanomateryaller Araştırma Laboratuvarı, Doç. Dr. Havva Funda Yağcı Acar' ın grubunda, Dr. Özlem Ünal tarafından sentezlendi. Kullanılan kimyasal ve solüsyonlara ait bilgiler Tablo 3.1' de gösterilmektedir.

**Tablo 3.1.** Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar.

<b>Kimyasallar ve Solüsyonlar</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b>	Thermo Fisher Scientific	31885-023	Hücre kültürü
<b>DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham</b>	ThermoFisher Scientific	31330-038	Hücre kültürü
<b>Penisilin/Streptomisin (100X)</b>	ThermoFisher Scientific	15140-122	Hücre kültürü
<b>Tripsin/EDTA</b>	ThermoFisher Scientific	2530054	Hücre Kültürü
<b>Esensiyel olmayan amino asit (100X)</b>	ThermoFisher Scientific	11140035	Hücre kültürü
<b>Fetal Sığır Serum</b>	ThermoFisher Scientific	10270106	Hücre kültürü
<b>Dimetil sülfoksit</b>	Sigma-Aldrich	D2650-100ML	Hücre kültürü
<b>Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi</b>	ThermoFisher Scientific	14190-094	Hücre kültürü
<b>Molecular Biology Grade Ethanol <math>\geq</math> 99,8%</b>	Sigma-Aldrich	51976	RNA izolasyonu
<b>2- Merkaptoetanol</b>	Merck	805740.0250	RNA izolasyonu
<b>Tıbbi etil alkol-5lt</b>	Alkomed	64-17-5	Hücre kültürü
<b>MTT</b>	Biomatik	A3338	Hücre kültürü

### 3.3. Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait genel bilgiler tablo 3.2' de gösterilmektedir.



**Tablo 3.2.** Çalışmaya Ait Cihazlar, Marka ve Modelleri.

<b>Cihazlar</b>	<b>Marka ve Modelleri</b>
<b>Tek kanallı otomatik pipet seti</b>	Thermo Fisher Scientific, Finnpiquette F2 Variable Volume Single-Channel Pipettes
<b>Elektrikli Pipet pompası</b>	Thermo Fisher Scientific, S1 Pipet Filler
<b>Çoklu Kanallı Otomatik Pipet</b>	Thermo Fisher Scientific, 703700 BRAND Transferpette® S-8 Multichannel Pipette, 8 Channels, Volume 20 to 200µL
<b>Laminar flow kabin</b>	Faster SafeFAST Classic, Class II
<b>Su banyosu</b>	Memmert, Waterbath WNB 14
<b>Karbondioksit inkübatörü</b>	Memmert, INCO2
<b>Likit nitrojen tankı</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Hassas terazi</b>	Biltek, Precisa XB220A
<b>Distile su cihazı</b>	Thermo Fisher Scientific, Barnstead Smart2Pure
<b>Mikrosantrifüj</b>	Eppendorf, MiniSpin Plus Microcentrifuge
<b>Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) cihazı</b>	Bio-Rad, T100 PCR Thermal Cycler
<b>Gerçek-zamanlı PZR cihazı</b>	Bio-Rad, CFX Connect Real-Time PCR Detection System
<b>Spektrofotometre cihazı</b>	Thermo Scientific, Multiskan GO Microplate Spectrophotometer
<b>Buz Cihazı</b>	Scotsman, AF80 Ice Flaker
<b>Vorteks</b>	Heidolph, Reax Top Vortexer
<b>Dik Tip Otoklav</b>	BES
<b>Santrifüj Cihazı</b>	Sigma-Aldrich, Hettich Universal 320/320R Centrifuge
<b>Ters mikroskop</b>	Zeiss, Axio Vert.A1 Inverted Microscope
<b>Ters mikroskop</b>	Olimpus, CK40
<b>Aspirasyon Cihazı</b>	Scilogex, SafeVac Vacuum Aspirator
<b>Etüv</b>	NÜVE, FN 500
<b>-80 Buzdolabı</b>	Haier Biomedical

### 3.4. Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kitlere ait genel bilgiler tablo 3.3' de gösterilmektedir.

**Tablo 3.3.** Kitler.

<b>Kitler</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
<b>NucleoSpin® RNA</b>	Macherey-Nagel	740955.50	RNA izolasyonu
<b>ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit</b>	New England Biolabs	E6300S	Komplementer DNA (cDNA) sentezi
<b>SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit</b>	Bioline	BIO-98005	kGZ-PZR reaksiyonları

### 3.5. Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler, temin edildikleri firmalar ve kullanım alanları hakkındaki genel bilgiler tablo 3.4' te gösterilmektedir.

**Tablo 3.4.** Çalışma İçin Kullanılan Sarf Malzemeler.

<b>Sarf Malzemeler</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
<b>Steril filtreli pipet ucu</b>	Corning, Axygen	TF-20-R-S TF-200-R-S TF-300-R-S TF-1000-R-S	Hücre kültürü, cDNA sentezi ve RNA izolasyonu
<b>Pipet ucu</b>	Sigma-Aldrich	CLS4840	cDNA sentezi

**Tablo 3.4.** (Devam) Çalışma İçin Kullanılan Sarf Malzemeler.

<b>Sarf Malzemeler</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
<b>Pipet ucu</b>	Corning, Axygen	T-200-Y T-1000-B	PZR reaksiyonları
<b>Serolojik pipet</b>	Corning, Axygen	CLS4487 CLS4488 CLS4489 CLS4490	Hücre kültürü
<b>Cam pastör pipet</b>	Marienfeld	3233049	Hücre kültürü
<b>Falkon Tüp</b>	Corning, Axygen	05-527-90 14-432-22	Hücre kültürü
<b>PZR tüp</b>	Corning, Axygen	PCR-02-L-C	Hücre kültürü
<b>Eppendorf tüp</b>	Corning, Axygen	MCT-150-C	Hücre kültürü ve PZR reaksiyonları
<b>Kriyovial tüp</b>	Isolab	091.11.102	Hücre kültürü
<b>Sızdırmaz film</b>	Corning, Axygen	UC-500	Hücre kültürü
<b>GZ-PZR plak</b>	Corning, Axygen	PCR-96-LP-FLT-W	Kantitatif GZ-PZR reaksiyonları
<b>Çoklu plakalar</b>	Corning, Costar	CLS3595 CLS3516	PZR reaksiyonları
<b>Petri Tabakları</b>	Sigma-Aldrich	CLS430293	Hücre kültürü
<b>Steril pipetleme rezervuarı</b>	Isolab	006.13.110	Hücre kültürü
<b>PZR tüpleri için dondurucu kutu</b>	Sigma-Aldrich	Z606634	Hücre kültürü
<b>Thoma lamı</b>	Bemis	52858-000	Hücre kültürü
<b>Steril plastik vakum filtrasyon sistemi</b>	Sigma-Aldrich	431154	Hücre kültürü

**Tablo 3.4.** (Devam) Çalışma İçin Kullanılan Sarf Malzemeler.

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası	Kullanım Alanı
Steril şırınga filtresi	Sigma-Aldrich	431222	Hücre kültürü
Şırınga	BD Syringes	302832	Hücre kültürü
Mezür	Isolab	015.01.901	Genel
Parafilm	Bemis	52858-000	Genel

### 3.6. Kantitatif GZ-PZR primerleri

Tez çalışmasında, Primer BLAST, Primer3 ve Integrated DNA Technologies Oligo Analyzer 3.1 programları kullanılarak primerlerin tasarımı gerçekleştirildi. Tasarlanan primerlerin sentezi, Sentromer DNA Teknolojileri Şirketi tarafından yapıldı. Çalışmada kullanılan genler ve genlere ait primer dizileri hakkındaki bilgiler tablo 3.5’ te gösterilmektedir.

**Tablo 3.5.** Genler ve GZ-PZR Primer Dizileri.

Gen ismi	Primer	Primer Dizileri (5'-3')
<b>HER2</b>	İleri Primer	GGTGGTCTTTGGGATCCTCA
	Geri Primer	ACCTTCACCTTCCTCAGCTC
<b>EGFR</b>	İleri Primer	AGGTGAAAACAGCTGCAAGG
	Geri Primer	CACAAACTCCCTTGGCTCAC
<b>β-Aktin</b>	İleri Primer	TGAAGTGTGACGTGGACATC
	Geri Primer	GGAGGAGCAATGATCTTGAT
<b>HIF-1α</b>	İleri Primer	ATTTTGGCAGCAACGACACA
	Geri Primer	CAGGGTCAGCACTACTTCGA
<b>EXO-1</b>	İleri Primer	TGTTTGTGCCTGACCTGGTA
	Geri Primer	AGCAGTTTCATCCAGAGGCT

**Tablo 3.5.** (Devam) Genler ve GZ-PZR Primer Dizileri.

Gen ismi	Primer	Primer Dizileri (5'-3')
<b>MDM2</b>	İleri Primer	AGCAGGAATCATCGGACTCA
	Geri Primer	TGTGGCGTTTTCTTTGTCGT
<b>Mcl1</b>	İleri Primer	ATCCATGTTTTTCAGCGACGG
	Geri Primer	AACTCCACAAACCCATCCCA
<b>Cx26</b>	İleri Primer	ATCTCCCACATCCGGCTATG
	Geri Primer	TCTGGGTTTTGATCTCCTCGA

## 4. YÖNTEM

### 4.1. Hücre Hatlarının Belirlenmesi

Subik ve çalışma arkadaşlarının yapmış olduğu immunohistokimyasal analiz sonucuna göre, meme kanseri hücre hatları belirlendi (Subik ve diğ.,2010). Kontrol olarak, dH1f fibroblast hücreleri kullanıldı.

### 4.2. Hücre Hatlarının Çözülmesi

Sıvı azot tankı içerisinde, -196 °C sıcaklıkta kriyo tüplerde dondurulmuş halde bulunan hücreler, 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda küçük buz tanesi görülünceye kadar çözdürüldü. Dondurma besiyeri içerisinde bulunan DMSO, hücrelerdeki suyu çektiği için hücrelerin patlamasını önlemek adına çözdürme işleminin vakit kaybetmeden yapılması oldukça önemlidir. Dondurma besiyeri içerisinde çözülmüş halde bulunan hücreler, kendisine özgü 4 ml tamamlanmış kültür besiyeri bulunan 15 ml' lik falkon tüp içerisine aktarıldı ve 1500 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet, 12 ml tamamlanmış kültür besiyeri içerisinde çözdürüldü. 100 mm' lik petri kabına aktarılan hücrelerin, kendine özgü besiyeri içerisinde homojen dağılımının gerçekleştirilmesi ardından 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

### 4.3. Hücrelerin Büyütülmesi

Her hücre hattı için, kendisine özgü besiyeri hazırlandı. Tamamlanmış kültür besiyeri hazırlamada kullanılan her solüsyon, belirli oranda eklenip birbirleriyle homojen olarak karıştırıldıktan sonra 0,22 µm' lik filtreden geçirildi. Hazırlanan tamamlanmış kültür besiyeri 37 °C' lik su banyosunda hücre için uygun sıcaklığa getirildikten sonra, hücelere verimi gerçekleştirildi. İnkübatörde büyümeye bırakılan hücrelerin besiyeri 2-3 günde 1 olacak şekilde değiştirildi. SKBR3 ve dH1f hücre hatlarının, besiyeri hazırlamada kullanılan solüsyonlar ve oranları tablo 4.1' de belirtildiği şekilde hazırlandı.

**Tablo 4.1.** Hücre Hatları, Besiyeri Solüsyonları ve Oranları

SKBR3 hücre hattı	Oranlar
DMEM/F12	%88
FBS	%10
Penisilin Streptomisin	%1
Esensiyel olmayan aminoasit	%1
dH1f hücre hattı	Oranlar
DMEM	%89
FBS	%10
Penisilin Streptomisin	%1

### 4.4. Hücrelerin Pasajlanması

İnkübatör içerisinde 100 mm' lik Petride büyümeye bırakılan hücreler, inkübatörden çıkarılarak inverted mikroskobunda incelemeye alındı. Hücrelerin Petri kabında %80 yoğunluğa ulaştığı gözlemlendikten sonra hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

Hücre pasajlaması için ilk adım, hücrelerin büyüdüğü besiyerinin aspire edilip ortamdan uzaklaştırılması ile gerçekleştirildi. Petri kabında besiyeri kalma ihtimaline karşılık Petri kabı yüzeyini örtecek hacimde (4 ml) PBS eklenerek hücreler 1 kez yıkandı ve PBS ortamdan aspire edildi. Petri kabı yüzeyine yapışık halde bulunan hücreleri kaldırmak için, 2 ml %0,05 Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 5 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin tamamen kalktığı emin olunduktan sonra, Tripsin-EDTA' nın enzim aktivitesini inhibe etmek için, aynı hacimde (2 ml) kültür besiyeri eklendi ve 15 ml' lik falkon tüpler içerisine aktarıldı. Buldukları petri kabında herhangi bir hücre kalma ihtimaline karşılık, 1 ml kültür besiyeri ile Petri kabı 1 kez daha yıkandı ve ilgili falkon tüpe aktarıldı. Hücreler 1:4 oranında, 10 ml yeni kültür besiyeri içeren 100 mm' lik Petri kaplarına aktarıldı ve ardından 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub> koşulunda inkübatöre bırakıldı.

#### **4.5. Hücrelerin Dondurulması**

İnkübatörde 100 mm' lik Petride büyümeye bırakılan hücrelerin %80 oranında yoğun olduğu ışık mikroskobunda gözlemlendikten sonra, hücrelerden besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelere Petri kabının yüzeyini örtecek miktarda (4 ml) PBS eklendi ve hücreler yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin tutunmuş oldukları Petri kabının yüzeyinden ayrılmaları için, belirli hacimde (2 ml) %0,05' lik Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 5 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Işık mikroskobu yardımıyla hücrelerin tamamen kalkmış olduğu emin olunduktan sonra, Tripsin-EDTA ile aynı hacimde (2 ml) kültür besiyeri eklenerek Tripsin-EDTA' nın enzim aktivitesi inhibe edildi ve Petri kabında kalkmış halde bulunan hücreler toplanarak 15 ml' lik falkon tüplere aktarıldı. Hücre kalma ihtimaline karşılık, 1 ml tamamlanmış kültür besiyeri



ile 1 kez daha Petri kabı yıkandı ve ilgili falkon tüplere, kalan hücrelerin aktarımı gerçekleştirildi. Falkon tüp içerisinde bulunan hücreler iyice karıştırıldı. Daha sonra mikropipet yardımıyla 10 µl alınarak Thoma lamına aktarıldı ve mikroskopta hücre sayımı gerçekleştirildi. Kullanılan her sıvı materyalin hücrelere verilmesi ve hücrelerin aktarılma işlemleri, tek kullanımlık serolojik pipetler yardımıyla gerçekleştirildi. Hücrelerin bulunduğu falkon tüp, 1500 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet, her hücre için kendine özgü olan dondurma medyumunda her ml' sinde  $10^6$  hücre olacak şekilde çözdürüldü. Serolojik pipet yardımıyla falkon tüplerden 1 ml alınarak kriyo tüpler içerisine hücreler aktarıldı. Kademeli dondurma ve ısının hücrelere daha homojen dağıtılması adına, kriyo tüpler içerisinde bulunan hücreler strafor kutu içerisine kondu ve  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  soğutucuda 1 gece bekletildi. Ertesi gün hücreler, strafor kutudan çıkarılarak  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' lik sıvı azot tankı içerisine aktarıldı. Hücrelerin dondurma besiyeri hazırlanmasında kullanılan malzemeler tablo 4.2' de gösterilmektedir.

**Tablo 4.2.** Dondurma Besiyeri Solüsyonları ve Oranları.

<b>SKBR3 hücre hattı</b>	<b>Oranlar</b>
<b>DMEM/F12 kültür besiyeri</b>	%50
<b>FBS</b>	%40
<b>DMSO</b>	%10
<b>dH1f hücre hattı</b>	<b>Oranlar</b>
<b>DMEM kültür besiyeri</b>	%50
<b>FBS</b>	%40
<b>DMSO</b>	%10

#### 4.6. MTT Analizi

Hücrelerin canlılığını belirtmek için, 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) kullanıldı. Sarı renkli MTT reaktifinin, mitokondriyal dehidrojenazlar aracılığıyla tetrazolyum halkasının parçalaması ve mor-mavi renkli formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanır. Hücre proliferasyonu, hücre yaşayabilirliği ve sitotoksikite çalışmaları için oldukça sık başvurulan yöntemlerden biridir (Mosmann, 1983; Stockert ve diğ.,2012).

SPION nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi ve uygun dozunun belirlenmesi için, 96-kuyucuklu iki kültür kabına üçlü tekrarlar halinde meme kanseri hücrelerinin  $1 \times 10^4$  ve kontrol olarak kullanılan fibroblast hücrelerinin ise  $5 \times 10^3$  olacak şekilde 100  $\mu$ l kültür besiyeri içerisinde ekimi gerçekleştirildi. Ardından hücreler 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kültür kabında bulunan hücelere, SPION nanoparçacıklarının farklı konsantrasyonları (50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml) uygulandı ve 48 saat boyunca 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

100 mg MTT tozunun, PBS içerisinde konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde çözülmesiyle hazırlanan MTT reaktifinden, 10  $\mu$ l alınarak (son konsantrasyon 0,5 mg/ml) hücelere verimi gerçekleştirildi. Ardından 3-4 saat boyunca hücreler, 37 °C olan %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Yaşayan hücrelerdeki formazan kristalleri inverted mikroskopu altında gözlenmeye başladıktan sonra, hücrelerden medyumun aspire edilmesi gerçekleştirildi. PBS ile hücrelerin yıkanması işleminin ardından formazan kristallerini çözmek için, hücelere 100  $\mu$ l DMSO eklendi ve 10 dakika boyunca karanlıkta çalkalandı (Firdhouse ve Lalitha 2015). Sonuçlar, Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer cihazı yardımıyla 540 nm absorbansta ölçüm yapılarak analiz edildi.

Doz belirleme için kontrol olarak, nanoparçacıklarla herhangi bir işlem görmeyen hücreler kullanıldı. Monoklonal antikor yüklü SPION nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi için, monoklonal antikor yüklü olmayan

SPION nanoparçacıkları kontrol olarak kullanıldı. Kontrol (blank) olarak her iki çalışmada da hücrelerin kendine ait olan kültür besiyeri kullanılmıştır.

SPION nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki toksik etkilerinin incelenmesi ve uygun dozunun belirlenmesi için, 96-kuyucuklu iki kültür kabına SKBR3 meme kanseri hücrelerinin  $1 \times 10^4$  ve kontrol olarak kullanılan fibroblast hücrelerinin ise  $5 \times 10^3$  olacak şekilde 100 µl kültür besiyeri içerisinde ekimi gerçekleştirildi. Ardından hücreler 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kültür kabında bulunan hücrelere SPION, SPION-HER, SPION-EGFR ve SPION-HER/EGFR nanoparçacıklarının toksik olmayan dozda (50 µg/ml) uygulandı ve 48 saat boyunca 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ardından yukarıda anlatıldığı gibi, antikor yüklü SPION nanoparçacıklarının hücreler üzerine, özellikle meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi için MTT testi yapıldı. Nanoparçacıkların etkisinin analizi için, deneyler üç teknik tekrar ve iki biyolojik tekrar ile yapıldı.

#### **4.7. Total RNA İzolasyonu**

Her kuyucukta, SKBR3 meme kanseri hücreleri için  $3 \times 10^5$ , dH1f fibroblast hücreleri için ise  $1,5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde, içerisinde 2 ml besiyeri bulunan 6 kuyucuklu kültür kaplarına hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücrelerin kültür kabına homojen olarak yayılması sağlandıktan sonra hücreler, 37 °C' lik %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından SPION ve monoklonal antikorlarla yüklü olan SPION nanoparçacıklarının, son konsantrasyonu 0,05 mg/ml olacak şekilde hücrelere verimi gerçekleştirildi. Ardından hücreler, 37 °C' lik %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde 48 saat boyunca nanoparçacıklarla muamele edildi. 48 saat inkübasyondan sonra, hücrelerden medyum aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml PBS ile 1 kez yıkandı ve aspire edildi. Hücreleri

kaldırmak için 0,5 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 37 °C’ de %5 CO<sub>2</sub>’ li inkübatörde 5 dakika boyunca bekletildi. Işık mikroskobu yardımıyla, hücrelerin tutunmuş oldukları kültür kabından tamamen kalkmış oldukları emin olunduktan sonra 0,5 ml kültür besiyeri eklenerek, Tripsin-EDTA’ nın enzim aktivitesi inhibe edildi. Ardından hücreler toplanarak, kendilerine ait olan 1,5 ml’ lik eppendorf tüpler içerisine aktarıldı. Eppendorf tüpler içerisinde bulunan hücrelere, 1500 rpm’ de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, hücre pelletine “Macherey-Nagel 2015 NucleoSpin RNA Mini” protokolü uygulanarak, total RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirildi. RNA izolasyonu basamakları aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

- ✓ İzolasyon için ayrılan dH1f ve SKBR3 hücre hattı pellet örnekleri, kit içerisinde verilerek hazırlanan 350 µl lizis tamponu RA1 + 3,5 µl β-merkaptoetanol karışımı içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Çözdürülen pellet karışımı, kit içerisinde bulunan 2 ml’ lik toplama tüpü içerisine yerleştirilen mor renk halka filtresine aktarıldı ve ardından 11,000 g’ de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüj işleminden sonra mor renk halka filtresi atıldı ve toplama tüpü içerisinde bulunan homojen hücre içeriğine 350 µl %70 etanol eklenerek, içeriğin iyice karışması sağlandı. Hücre içeriğine 2-3 kez pipetleme işlemi uygulanması ardından, her örnek için ayrı hazırlanan toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş açık mavi renk halka filtresine, hücre içeriğinin aktarımı gerçekleştirildi. 11,000 g’ de 30 saniye boyunca santrifüj işlemi uygulanmasının ardından, açık mavi renk halka filtresi yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- ✓ Toplama tüpünde bulunan açık mavi renk halkalı filtre içerisindeki hücre içeriğine 350 µl membran tuzu çözücü tamponu (Membrane Desalting Buffer / MDB) eklendi. 11,000 g’ de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmasının ardından her birine, belirtilen oranlarda önceden hazırlanan rDNaz reaksiyon karışımından 95 µl olacak şekilde eklenerek, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi.

- ✓ Tüp içerisinde bulunan hücre içeriğine 200 µl RAW2 tamponu eklenerek, rDNaz enzim aktivitesinin durdurulması sağlandı. 11,000 g' de 30 saniye boyunca santrifüj işlemi uygulanmasının ardından, açık mavi renk halka filtresi yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirildi. 600 µl RAW3 tamponu eklendikten sonra, 11,000 g' de 30 saniye boyunca santrifüj işlemi uygulanarak ikinci yıkama gerçekleştirildi. Kolondan geçen yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra, tekrar toplama tüpü içerisine yerleştirilen filtreye, 350 µl RA3 tamponu eklendi ve 11,000 g' de 2 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanarak üçüncü yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- ✓ Santrifüj işlemi sonrası açık mavi renk halka filtresi, kitin içerisinde verilen 1,5 ml' lik nükleaz içermeyen toplama tüpüne yerleştirildi. Kitin içerisinde verilmiş olan RNaz içermeyen sudan, 30-50 µl olacak şekilde eklenerek filtre içerisinde bulunan RNA örneklerinin ayrışması sağlandı.
- ✓ 11,000 g' de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulanmasının ardından, buzun üzerine alınan RNA örnekleri -80 °C' ye kaldırıldı.

Hücre peletinden izole edilen RNA' nın saflığı ve konsantrasyon analizi 230, 260 ve 280 nm absorbanslarındaki ölçümleri "Multiskan™ GO Microplate Spektrophotometer" cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

#### **4.8. cDNA Sentezi**

Nanoparçacıklarla muamele edilen hücrelerden farklı konsantrasyonlarda izole edilen RNA örneklerine "*ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit*" protokolü uygulanarak, son konsantrasyonu 400 ng olacak şekilde, cDNA sentezi işlemi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA örneklerinin son konsantrasyonu, 3,2 ng olacak şekilde seyreltilmesinin ardından -20 °C' ye kaldırıldı. cDNA sentez protokolü, aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 4.3’ de belirtildiği gibi, reaksiyon hacmi 8  $\mu\text{l}$ ’ ye tamamlanan RNA örnekleri, 70  $^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 5 dakika boyunca denatüre edildi.

**Tablo 4.3.** RNA Denatürasyonu Aşaması Bileşenleri ve Çalışma Hacimleri.

Bileşenler	Çalışma hacmi
RNA örneği (400 ng)	6 $\mu\text{l}$ ’ ye kadar
d(T)23VN oligonükleotit	2 $\mu\text{l}$

Denatürasyon işleminin ardından, buzun üzerine alınan örneklere M-MuLV reaksiyon karışımından (2X) 10  $\mu\text{l}$ , M-MuLV enzim karışımından ise 2  $\mu\text{l}$  olacak şekilde eklenerek, 20  $\mu\text{l}$  reaksiyon hacmine ayarlandı. Ardından 42  $^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 1 saat ve 80  $^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 5 dakika olmak üzere inkübasyona işlemine bırakıldı. Elde edilen cDNA’ lar 30  $\mu\text{l}$  RNaz içermeyen su eklenerek, 50  $\mu\text{l}$ ’ ye tamamlandı.

#### 4.9. Kantitatif GZ-PZR Analizi

SPION ve monoklonal antikor ile yüklü olan SPION nanoparçacıklarıyla muamele edilen meme kanseri ve fibroblast hücrelerinin, hücre ölümü üzerinde etkili olan genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, “CFX Connect™ Real-Time PZR Detection System” cihazı ile gerçekleştirildi. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) için kullanılan bileşenler tablo 4.4’ te gösterilmektedir.

**Tablo 4.4.** GZ-PZR Bileşenleri.

	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Hacim	Son Konsantrasyon
SensiFAST SYBR® No-ROX Kit	2X	10 µl	1X
ddH <sub>2</sub> O	-	6 µl' ye kadar	-
İleri Primer	5 µM	1 µl	1,25 µM
Geri Primer	5 µM	1 µl	1,25 µM
cDNA	3,2 ng	2 µl	6,4 ng
Toplam Reaksiyon Hacmi	-	20 µl	-

Bu tez çalışmasında 3 teknik tekrarlı olacak şekilde GZ-PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmada incelenen her bir örneğe ait olan genin siklus eşiği değerleri (threshold cycle / Ct) değerlerinden, referans gen olarak kullanılan o örneğe ait β-aktin Ct değerlerinden çıkarılarak normalize edilerek, delta siklus eşiği ( $\Delta Ct$ ) değerleri hesaplandı. Her bir örneğin  $\Delta Ct$  değeri, kontrol grubunun Ct değerlerinden çıkarılarak  $\Delta\Delta Ct$  değerleri hesaplandı. Her bir genin ne kadar eksprese olduğu kontrol hücrelerine göre,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü kullanılarak incelendi. Teknik tekrarlar arasındaki hata payı oranı, grafiklerde genlerin ekspresyon seviyeleri üzerinde gösterildi.

Çalışmada uygulanan GZ-PZR protokolü aşağıda belirtildiği gibidir.

PZR Protokolü	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk.	} 45
Denatürasyon	95 °C	10 sn.	
Bağlanma	55 °C	10 sn.	
Uzama	72 °C	30 sn.	
Son uzama	95 °C	10 dk.	
Erime sıcaklığı	65-95 °C		

#### **4.10. Verilerin İstatiksel Analizleri**

Verilerin analizi için, çift kuyruklu dağılım ve iki örnekli eşit varyans (homoskedastik) t-test analizi kullanıldı. Elde edilen sonuçların istatistiksel anlamlılık P değeri 0,05 üzerinden değerlendirildi ve P değeri  $\leq 0,05$  olan değerler güvenilir kabul edildi.

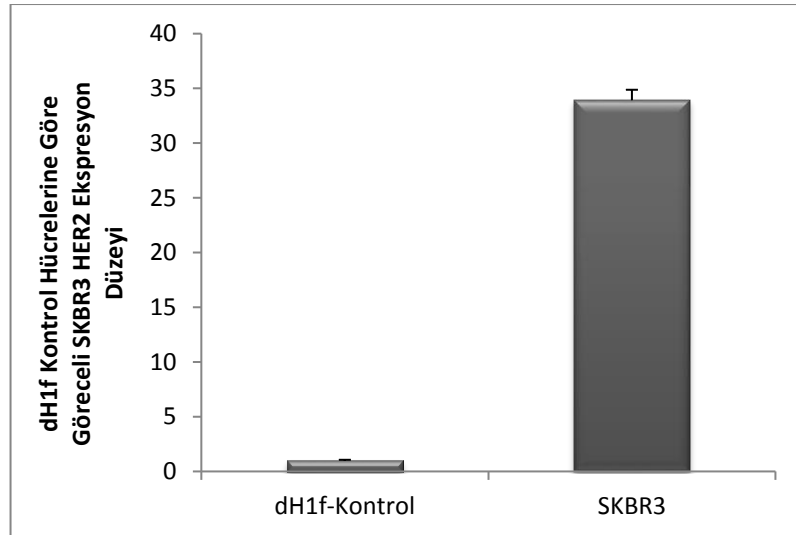




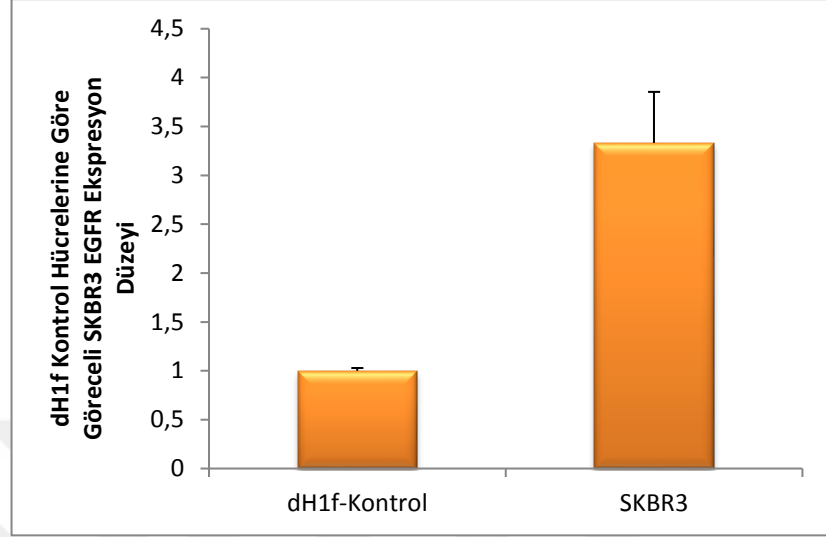
## 5. BULGULAR

### 5.1. SKBR3 ve dH1f Hücre Hatlarının HER2 ve EGFR Ekspresyon Analizleri

Kontrol olarak kullanılan HER2 ve EGFR reseptörleri kapalı olan dH1f hücreleri ile her iki reseptörü de açık olan SKBR3 hücreleri arasında HER2 ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, SKBR3 hücreleri HER2 seviyelerinde yaklaşık olarak 33 kat fazla artış olduğu gözlemlendi (Şekil 5.1). Bununla birlikte SKBR3 hücreleri ile dH1f hücrelerinin EGFR ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, SKBR3 hücrelerinde 3 kat daha fazla EGFR ekspresyonu olduğu gözlemlendi (Şekil 5.2).



Şekil 5.1. dH1f ve SKBR3 Hücreleri HER2 Ekspresyon Analizi.



Şekil 5.2. dH1f ve SKBR3 Hücreleri EGFR Ekspresyon Analizi.

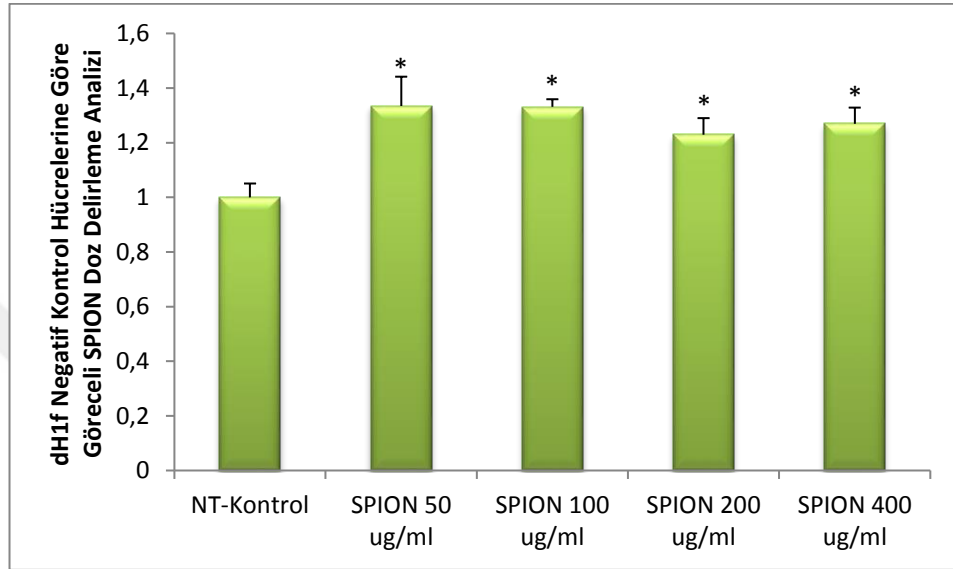
## 5.2. MTT Analizi

Nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi için MTT testi kullanıldı. Spektrofotometre cihazında 540 nm absorbans değerine göre elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

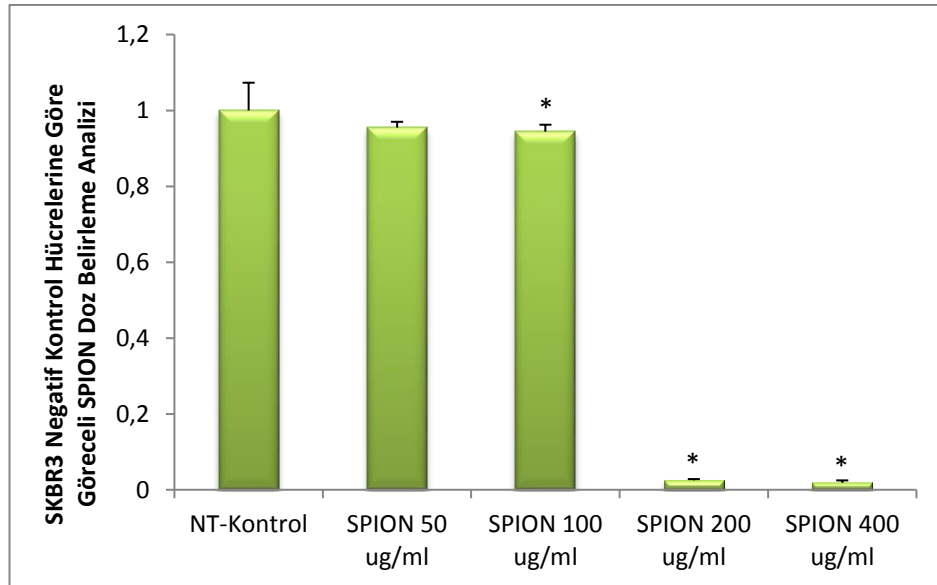
### 5.2.1. SPION Doz Belirleme

SPION nanoparçacıklarının toksik dozunun belirlenmesi için, dH1f ve SKBR3 hücreleri, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml konsantrasyonlarında SPION nanoparçacıklarıyla muamele edildikten 48 saat sonra elde edilen sonuçlara göre; negatif kontrol hücrelerine oranla toksik olmayan en etkin dozun, dH1f hücrelerinde, hücre canlılığını negatif yönde etkilemeyen (Şekil 5.3) ve SKBR3 hücrelerinde ise negatif kontrol hücrelere oranla, kabul edilebilir konsantrasyonun

yaklaşık %5 oranında hücre ölümüne neden olan 50 µg/ml konsantrasyonundaki SPION olduğu belirlendi (Şekil 5.4).



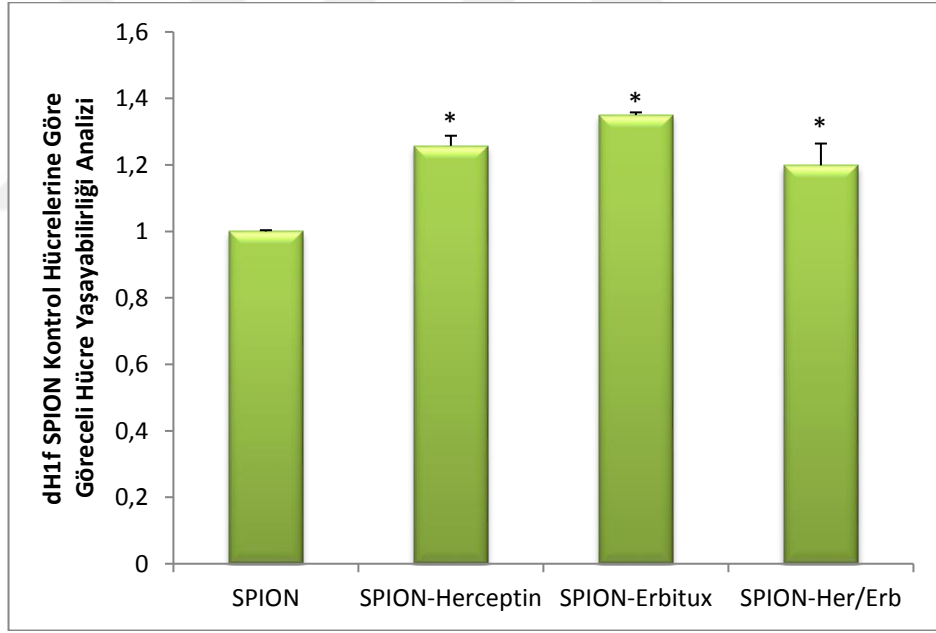
Şekil 5.3. dH1f Hücre Hatlarında SPION Doz Belirleme Sonuçları, \*P değeri  $\leq 0,05$ .



Şekil 5.4. SKBR3 Hücre Hatlarında SPION Doz Belirleme Sonuçları, \*P değeri  $\leq 0,05$ .

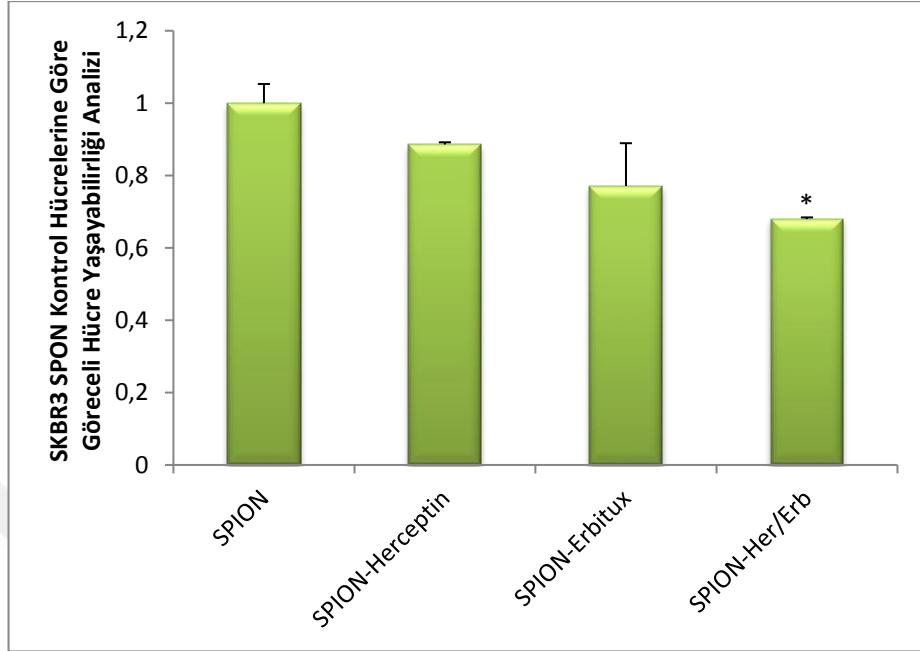
### 5.2.2. 50 µg/ml SPION

dH1f ve SKBR3 hücreleri üzerinde toksik dozu belirlenen SPION nanoparçacıklarının, hücreler üzerindeki etkinliğinin incelenmesi için, hücrelere son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde SPION, SPION-HER2 (Herceptin), SPION-EGFR (Erbix) ve SPION-HER2/EGFR monoklonal antikorlarıyla yüklü olan nanoparçacıklar uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra, SPION nanoparçacıklarının, kontrol dH1f hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı ve aksine kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelerde SPION uygulanan kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığında %19 oranında bir artma olduğu gözlemlendi (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. 50 µg/ml SPION ile Muamele Edilen dH1f Hücrelerinin MTT Analizi, \*P değeri ≤ 0,05.

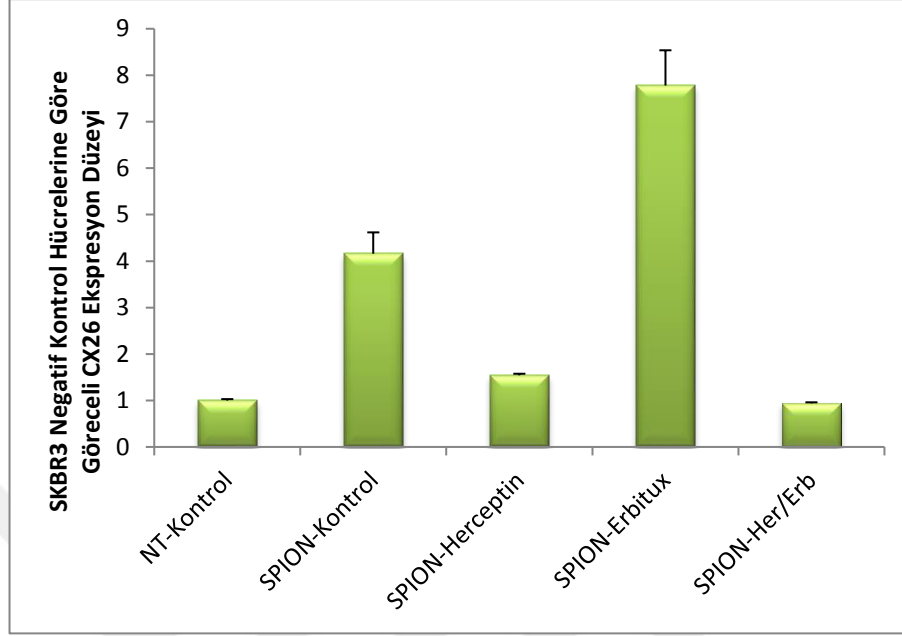
SKBR3 kontrol hücrelere oranla, SPION-HER2 ve SPION-EGFR tekli ilaç uygulamasında sırasıyla %12 ve %22 oranında bir düşüş olduğu, kombine ilaç tedavisi uygulanan hücrelerde ise hücre canlılığında yaklaşık %40 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi. (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. 50 µg/ml SPION ile Muamele Edilen SKBR3 Hücrelerinin MTT Analizi, \*P değeri  $\leq 0,05$ .

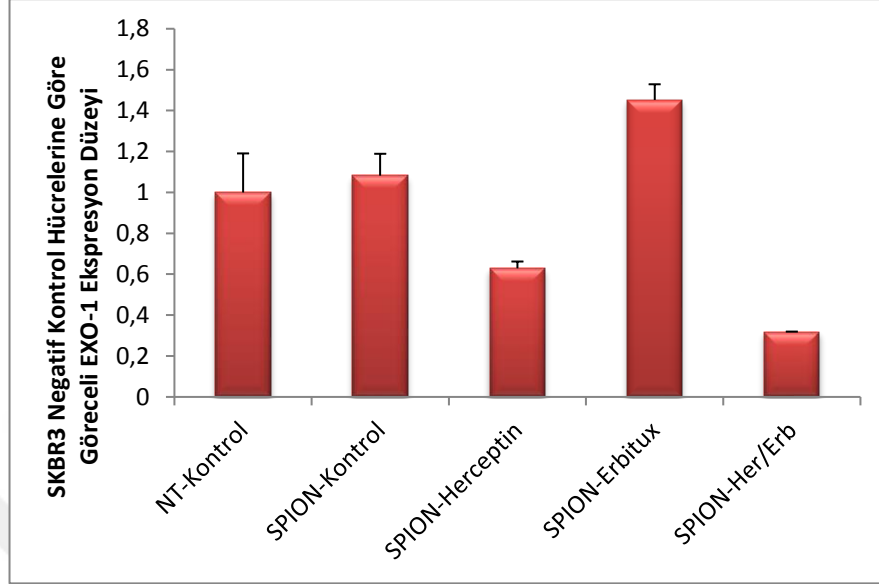
### 5.3. Kantitatif GZ-PZR

SPION, SPION-HER2 (Trastuzumab) ve SPION-EGFR (Cetuximab) monoklonal antikorlarının, SKBR3 meme kanseri hücreleri yüzeyindeki HER2 ve EGFR reseptörlerine bağlanması durumunda, reseptörlerle ilişkili olan genlerin ekspresyon seviyeleri incelenerek, hücre ölümü ve sinyal yollarıyla olan ilişkisi analiz edildi. Elde edilen grafik sonuçlarının analizi,  $\beta$ -aktin internal kontrol genine göre normalize edildi.



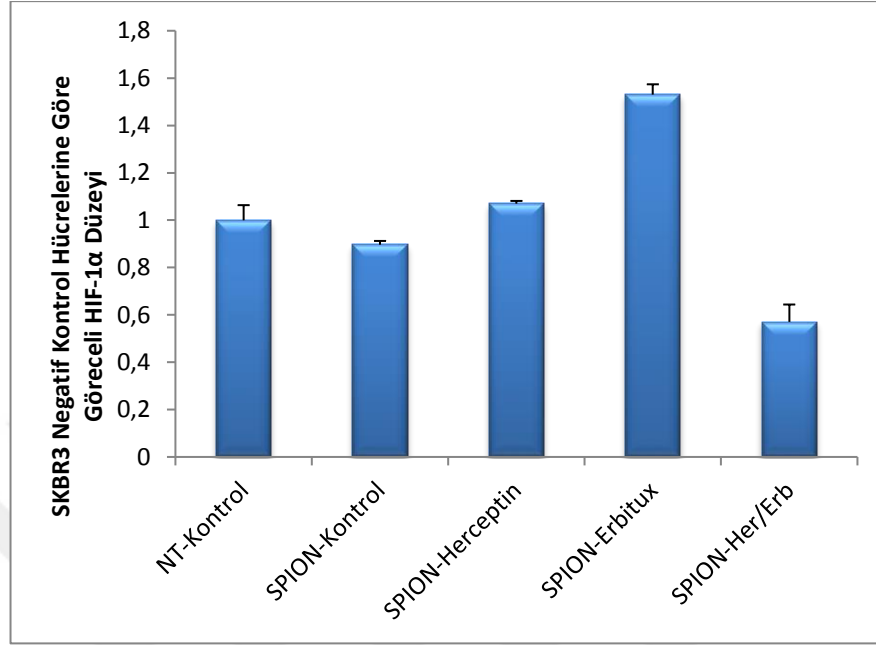
Şekil 5.7. SKBR3 Hücrelerinde Cx26 Gen Ekspresyon Analizi.

Herceptin ile muamele edilen hücrelere kıyasla, kombine ilaç tedavisi uygulanan hücrelerde Cx26 gen ekspresyon seviyelerinde yaklaşık 1,6 kat azalma olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda erbitux ile muamele edilen hücrelerde kombine tedaviye kıyasla, Cx26 seviyelerinde 8,5 kat artış olduğu gözlemlendi. Kombine ilaç tedavi uygulanan hücreler, negatif kontrol hücreler ile kıyaslandığında ise bu genin seviyelerinde %6 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 5.7).



Şekil 5.8. SKBR3 Hücrelerinde EXO-1 Gen Ekspresyon Analizi.

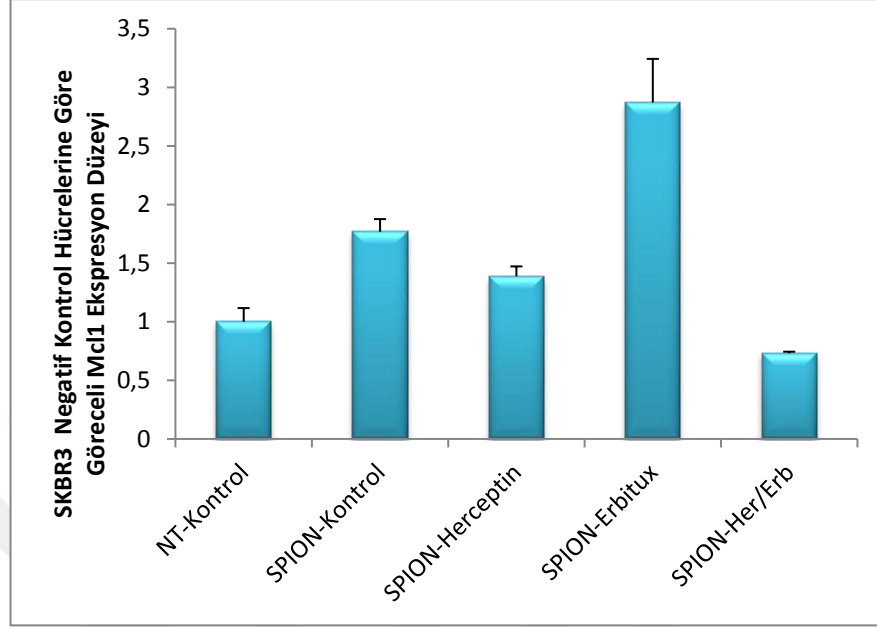
Negatif kontrol hücrelerine oranla, kombine ilaç tedavisi uygulanan hücrelerde EXO-1 gen ekspresyon seviyelerinde %68 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte kombine ilaç tedavi uygulanan hücreler, yalnızca herceptin ile muamele edilen hücrelerle kıyaslandığında 2 kat bir düşüş olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda erbitux ile muamele edilen hücrelerin EXO-1 ekspresyon seviyelerinde, kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelere oranla 5 kat oranında bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 5.8).



Şekil 5.9. SKBR3 Hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  Gen Ekspresyon Analizi.

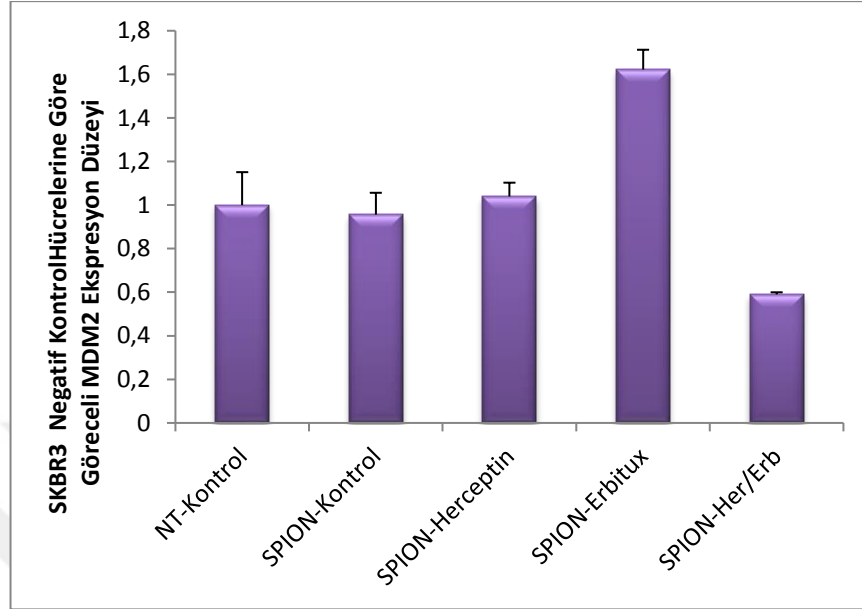
Negatif kontrol hücrelerine kıyasla, kombine tedavi uygulanan hücrelerin HIF-1 $\alpha$  ekspresyon seviyelerinde %43 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi. Kombine tedavi uygulanan hücreler, yalnızca herceptin ile muamele edilen hücrelerle kıyaslandığında, yaklaşık 2 kat bir azalma olduğu gözlemlendi. Ancak yalnızca erbitux ile muamele edilen hücrelerin HIF-1 $\alpha$  ekspresyon seviyelerinde kombine ilaç tedavisi uygulanan hücrelere oranla yaklaşık olarak 3 kat bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 5.9).





Şekil 5.10. SKBR3 Hücrelerinde Mcl1 Gen Ekspresyon Analizi.

Negatif kontrol hücreleri ile kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelerin Mcl1 gen ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelerin Mcl1 ekspresyon seviyelerinde %30 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi. Herceptin ile muamele edilen hücreler, kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelerle kıyaslandığında Mcl1 ekspresyon seviyelerinde yaklaşık 2 kat bir artış olduğu, aynı zamanda erbitux ile muamele edilen hücrelerde, kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelere kıyasla aralarında 4 kat ekspresyon artışı olduğu gözlemlendi (Şekil 5.10).



Şekil 5.11. SKBR3 Hücrelerinin MDM2 Gen Ekspresyon Analizi.

MDM2 gen ekspresyon seviyeleri negatif kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelerde %41 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi. Kombine ilaç tedavi uygulanan hücreler, herceptin ile muamele edilen hücrelerle kıyaslandığında, kombine tedavi uygulanan hücrelerin MDM2 ekspresyon seviyelerinde yaklaşık 2 kat bir azalma olduğu gözlemlendi. Erbitux ile muamele edilen hücrelerde, kombine ilaç tedavi uygulanan hücrelere kıyasla, yaklaşık olarak 3 kat ekspresyon artışı olduğu gözlemlendi (şekil 5.11).

## 6. TARTIŞMA

Onkoloji alanında, tedavi açısından başarıyı sağlayan terapötik hedefler arasında HER2 ve EGFR sinyali bileşenleri büyük önem taşımaktadır (Twomey ve diğ.,2017). Bu tez çalışması kapsamında yeni bir yaklaşım olarak ilk kez, meme kanseri tedavisi için nanoparçacıklar kullanılarak tek reseptörün hedeflenmesi yerine, SKBR3 heterojen meme kanseri hücrelerinde yüksek bir ekspresyona sahip olan HER2 ve EGFR reseptörleri hedef alındı. Tek başına veya kombinasyon halinde SPION nanoparçacıklarına yüklü olan trastuzumab ve cetuximab monoklonal antikorlarının, HER2 ve EGFR ekspresyonuna sahip SKBR3 meme adenokarsinoma hücreleri üzerindeki etkisi, 48 saatlik bir inkübasyon sonrasında hücre ölümü ve kanser ile ilişkili yollarda önemli olan 5 genin ekspresyon seviyeleri, kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi ile değerlendirildi (Poller ve diğ.,2017).

EGFR aile üyelerinden olan HER2 ve HER3 reseptörünün heterodimerizasyonu, HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinin proliferasyon artışında büyük öneme sahiptir. HER2/HER3 heterodimer oluşumu, PI3K-Akt yolağının aktivasyonunu indükleyerek hücre sağ kalımında rol oynayan en güçlü ana uyarıcıdır. HER2 reseptörünün hücre dışı domainine bağlanarak HER2 sinyalinin azalmasında rol oynayan trastuzumab (herceptin) monoklonal antikorunun, PTEN fosforilasyon artışının indüklenmesini sağlayarak PI3K-Akt yolağını inhibe ettiği gözlenmiştir (Nagata ve diğ.,2004). MDM2 geninin upregülasyonu ile p53 aracılı apoptozun bastırılmasına neden olan Akt aktivasyonu, PI3K üzerindeki fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) etkisine karşı gelerek tümör oluşumu ve hücre sağ kalımının teşvik edilmesine neden olur (Valabrega ve diğ., 2007). Tümör spesifik olan ligandın EGF reseptörüne bağlanmasıyla hücre içi domain tirozin kinaz kalıntılarında fosforilasyon gerçekleşmesi ile fosforile olan Grb2, Sos ile bir kompleks oluşturur ve Sos proteini Ras proteinin aktivasyonu sağlayarak Ras-MAPK yolağının aktifleştirilmesine neden olur (Roberts ve Der, 2007). Gen ekspresyon analizine dayalı çalışmalar sonucunda, hücre proliferasyonu ve genomik kararsızlıkta

rolü olan ve EGFR ve Ras' ın pozitif düzenleyicisi olan EXO-1 için terapötik bir yaklaşım olarak Ras/PI3K yolağının inhibisyonu öne sürülmüştür. (Muthuswami 2013). Anjiyogenez, apoptoz ve birçok gen transkripsiyonunu aktive olmasını sağlamada görev alan HIF-1 $\alpha$ ' nın sentezi, EGFR ekspresyonuna bağlıdır. Li ve çalışma arkadaşları cetuximab monoklonal antikorunun, PI3K-Akt yolağını etkili bir şekilde inhibe etmesi ile HIF-1 $\alpha$  sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (Li ve diğ., 2008). Bu çalışmada SKBR3 hücreleri üzerinde uygulanan SPION nanoparçacıklarına yüklü ilaçlarla uygulanan kombine tedavi sonucunda, HIF-1 $\alpha$  ekspresyon seviyelerinde negatif kontrol hücrelerine kıyasla %50, EXO-1 gen ekspresyon seviyelerinde ise %70 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi. Yang ve çalışma arkadaşları Cx26 ile PI3K-Akt sinyal yolağı arasında pozitif bir ilişki olduğunu ve dolayısıyla hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve metastazını düzenleyerek tümör oluşumunu pozitif yönde düzenlediğini öne sürmüştür (Yang ve diğ.,2015). Bu çalışmada uygulanan kombine ilaç tedavisi sonucunda Cx26 gen ekspresyon seviyelerinde negatif kontrol hücrelere oranla %6, yalnızca herceptin ve cetuximab ile muamele edilen hücrelerle karşılaştırıldığında ise sırasıyla yaklaşık 1,6 ve 8,5 kat düşüş olduğu gözlemlendi. Mcl1 ve MDM2 ekspresyon seviyelerinde ise, negatif kontrol hücrelerine kıyasla sırasıyla %30 ve %41 oranında bir azalma olduğu gözlemlendi.

Tek başına cetuximab monoklonal antikorunu uygulanan hücrelerde negatif kontrol hücrelerine oranla hücre ölümü ilişkili genlerde ilginç bir şekilde ekspresyon artışı olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde herceptin uygulanan hücrelerinde azalan EXO-1 seviyelerinin p53 aktivitesini artırması beklenirken, MDM2 ekspresyonunda artış gözlenmesi, bu beklentiyi ortadan kaldırdı. Ancak kombine tedavi uygulanan hücrelerde hücre ölümü ile ilişkili olan 5 gende, kontrol ve tekli ilaç uygulanan hücrelere oranla ciddi bir azalma olduğu gözlemlendi. Sonuçlara bakıldığında kombine ilaç tedavisinin kanser hücrelerinin ölümü üzerinde daha etkili olduğu ve bu da SKBR3 kanser hücre hatlarında, kontrol ve tekli nanoparçacık yüklü tedavi yaklaşımından daha yüksek bir oranda ölümün gözlemlendiğini açıklıyor.

Süperparamanyetik nanoparçacık çekirdeği, hipetermi özelliği sayesinde kanser hücrelerinin apoptoza daha duyarlı olmasını, ayrıca SPION, hızlı rotasyonu ve kristal kafesindeki moment değişimiyle SPION içeren hücrelerin apoptoz indüklenmesini başlatacak kadar ısınmalarını sağlar (Kievit ve Zhang, 2009). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda çalışmada kontrol olarak kullanılan SPION' un, SKBR3 hücrelerindeki HIF-1 $\alpha$  ve MDM2 gen ekspresyonu seviyelerini artırması sonucunda hücrelerin apoptoza daha duyarlı hale geldiği düşünülmektedir.

Bu bilgilerin ışığında, meme kanserinde önemli olan EGFR ve HER2 reseptörlerinin aynı anda inhibisyonu gerçekleştirilmesi, tek ilaç uygulanan hücreler ve kontrol hücrelerle kıyaslandığında hücre canlılığına daha fazla etki ettiği ve kanser yollarında rol oynayan önemli genlerin ekspresyonunda daha fazla azalma olduğu gözlenmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, başta meme kanseri olmak üzere, diğer heterojen kanser türlerinde de kombine tedavi uygulanması ve ilişkili birkaç faktörün nanoparçacıklar aracılığıyla hedef alınmasının, kanser tedavilerinde daha fazla başarı getireceğini ve bunun sonucunda insan sağlığına büyük katkı sağlaması umut edilmektedir. Ayrıca tek başına veya monoklonal antikor yüklü nanoparçacıklarla yüklü olan SPION' un hipetermi ve manyetik alan oluşturarak istenen bölgeye hedefleme özelliği göz önünde bulundurulduğunda, hızla değişen bir manyetik alan kullanılarak kanser hücreleri üzerindeki öldürücü etkisi ve nanoparçacıkların dağılımı ve hedeflenmesinin daha da artırılacağı düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Alteri R, Bandi P, Brinton L, Casares C, Cokkinides V (2011). Breast cancer facts and figures 2011–2012. Atlanta: American Cancer Society, Inc.
- Arora WS (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*. (2012):7 3445-3471.
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V (2007). Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER)-Negative, Progesterone Receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer, the So-called Triple-Negative Phenotype. *CANCER*. Volume 109 / Number 9.
- Bloom HJG ve Richardson WW (1957). Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. *Br J Cancer*. 11(3):359–377.
- Boguski MS, McCormick F (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. 366(6456):643-654.
- Booy EP, Henson ES, Gibson SB (2011). Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene* 19;30(20):2367-78.
- Bou-Assaly W ve Mukherji S (2010). Cetuximab (Erbix). *American Journal of Neuroradiology*. 31(4):626-627.
- Callans LS, Naama H, Khandelwal M, Plotkin R, Jardines L (1995). Raf-1 protein expression in human breast cancer cells. *Annals of Surgical Oncology*. 2(1):38-42.
- Cassidy J, Bisset D, Obe RAS (2002). *Oxford Handbook of Oncology*. Oxford University Press, New York.
- Cappuzza F (2014). Guide to Targeted Therapies: EGFR mutations in NSCLC. *The Human Epidermal growth factor Receptor (HER) family: structure and function* içinde p.7. Springer International Publishing, Switzerland.
- Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wigler MH, Bar-SD (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*. 260(5112):1338-1343.
- Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin Cancer Res*. 14(5):1310-1316.
- Citri A, Skaria KB, Yarden Y (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Experimental Cell Research*. 284(2003):54–65.
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A (1985). Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene. *Science*. 230(4730):1132-1139
- Delord JP, Allal C, Canal M, Mery E, Rochaix P, Hennebelle I, Pradines A, Chatelut E, Bugat R, Guichard S, Canal P (2005). Selective inhibition of HER2 inhibits AKT signal transduction and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma. *Annals of Oncology*. 16(12):1889-1897.

Dave SR ve Gao X.(2009) Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 1(6):583-609.

Farokhzad OC ve Langer R. (2006) Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58(14): 1456–1459.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2008). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 127(12):2893–2917.

Ferrari M (2005). Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *CANCER*. 5(3):161-171.

Firdhouse JM, Lalitha P (2015). Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. *Prog Biomater*. 4(2-4):113-121.

Gobbo OL, Sjaastad K, Radomski MW, Volkov Y, Prina-Mello A (2015). Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Theranostics*. 5(11): 1249-1263.

Habashy HO, Powe DG, Abdel-Fatah TM, Gee JMW, Nicholson RI, Green AR, Rakha EA, Ellis IO (2011). A review of the biological and clinical characteristics of luminal-like oestrogen receptor-positive breast cancer. *Histopathology* 60(6):854-863.

Hasan S (2015). A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*. Vol. 4(ISC-2014), 1-3.

Henson ES, Hu X, Gibson SB (2006). Herceptin Sensitizes ErbB2-Overexpressing Cells to Apoptosis by Reducing Antiapoptotic Mcl-1 Expression. *Clin Cancer Res*. 12(3): 845-853.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Dyke TV, Perou CM (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*. 8(5):R76.

Hynes NE, Stern DF (1994). The biology of erbB-2/neu/HER2 and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1198(2-3):165-184.

Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas III CF, Hynes NE (2002). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *PNAS*. 100(15):8933–8938.

Jhaveri K, Esteva FJ (2014). Pertuzumab in the Treatment of HER2+ Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 12(4):591-598.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996). Dimerization, DNA Binding, and Transactivation Properties of Hypoxia-inducible Factor 1. *THE Journal Of Biological Chemistry*. 271(30):17771-17778.

Khodabandehloo H, Zahednasab H, Hafez AA (2016). Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Iran J Cancer Prev*. 2016 April; 9(2):e3966.

Klug WS, Cummings MR, Spencer CA, Palladino MA, Killian D (2018). *Genetik kavramlar*. (11.Baskı). S. Sümer (Çev). Palme Yayınevi, Ankara.

Kodama RH (1999). Magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 200(1-3):359-372.

Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A, Baltaziak M, Sulkowska M (2006). Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 59:429–433.

Kievit FM ve Zhang M. (2009) Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Acc Chem Res*. 44(10): 853–862.

Krawczyk P, Kowalski DM, Ramlau R, Warzocha EK, Winiarczyk K..., Krzakowski M (2017). Comparison of the effectiveness of erlotinib, gefitinib, and afatinib for treatment of non-small cell lung cancer in patients with common and rare EGFR gene mutations. *Oncology letters*. 13(6):4433-4444.

Kumagai T, Davis JG, Horie T, O'Rourke DM, Greene MI (2001). The role of distinct p185neu extracellular subdomains for dimerization with the epidermal growth factor (EGF) receptor and EGF-mediated signaling. *PNAS* . 98(10):5526–5531.

Kumar NM ve Gilula NB.(1996) The Gap Junction Review Communication Channel. *Cell*. 84(3):381–388.

Levine AJ (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 88(3):323-331.

Li X, Lu Y, Liang K, Pan T, Mendelsohn J, Fan Z (2008). Requirement of hypoxia-inducible factor-1A downregulation in mediating the antitumor activity of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab. *Mol Cancer Ther* 7(5):1207-17.

Lv Q, Meng Z, Yu Y, Jiang F, Guan D, Liang C, Zhou J, Lu A, Zhang G (2016). Molecular Mechanisms and Translational Therapies for Human Epidermal Receptor 2 Positive Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(12):2095.

Margolis BL, Lax I, Kris R, Dombalagian M, Honegger AM, Howk R, Givol D, Ullrich A, Schlessinger J (1989). All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/neu are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 264(18):10667–10671.

Marotti JD, Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ (2017). Triple-Negative Breast Cancer Next-Generation Sequencing for Target Identification. *The American Journal of Pathology*. 187(10):2133–2138.

Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical and Experimental Immunology*. 158(1): 1-9.

McCarthy JR ve Weissleder R. (2008) Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 17;60(11):1241–1251.

Moll UM, Petrenko O (2003). The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research*.1(14):1001-1008.

Montemurro F, Aglietta M (2005). Incorporating Trastuzumab into the Neoadjuvant Treatment of HER2-Overexpressing. *Clinical Breast Cancer*. 6(1):77-80.

Mossman T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods*. 16;65(1-2):55-63.



Morris EJ ve Dyson NJ.(2001) Retinoblastoma Protein Partners. *Advances in Cancer Research*. 82:1-54.

Muthuswami M, Ramesh V, Banerjee S, Thangaraj SV, Periasamy J, Rao DB, Barnabas GD, Raghavan S, Ganesan K (2013). Breast Tumors with Elevated Expression of 1q Candidate Genes Confer Poor Clinical Outcome and Sensitivity to Ras/PI3K Inhibition. *PLOS ONE* . 8(10):e77553.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Şahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen T, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell*. 6(2):117-127.

Özmen V, Anderson BO (2008). The Challenge of Breast Cancer in Low- and Middle-income Countries – Implementing the Breast Health Global Initiative Guidelines. *Asia-Pacific Oncology & Haematology* 1(1):31-4.

Özmen V (2014). Breast Cancer in Turkey: Clinical and Histopathological Characteristics (Analysis of 13.240 Patients). *J Breast Health*. 10:98-105.

Park HJ, Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Lee HJ, Kim YJ, Kim JH, Kang E, Kim SW, Kim IA, Park SY (2014). High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Modern Pathology*. 27(9):1212–1222.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffreyk SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406(6797):747-752.

Poller JM, Zaloga J, Schreiber E, Unterweger H, Janko C, Radon P, Eberbeck D, Trahms L, Alexiou C, Friedrich RP (2017). Selection of potential iron oxide nanoparticles for breast cancer treatment based on in vitro cytotoxicity and cellular uptake. *International Journal of Nanomedicine*. 12: 3207–3220.

Pore N, Jiang Z, Shu HK, Bernhard E, . Kao GD, Maity A (2006). Akt1 Activation Can Augment Hypoxia-Inducible Factor-1A Expression by Increasing Protein Translation through a Mammalian Target of Rapamycin–Independent Pathway. *Mol Cancer*. 4(7).

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 12(5):R68.

Riesco A, Santos-Buitrago B, De Las Rivas j, Knapp M, Santos-García G, Talcott C (2017). Epidermal Growth Factor Signaling towards Proliferation: Modeling and Logic Inference Using Forward and Backward Search. *BioMed Research International*.2017(1):11.

Roberts PJ ve Der CJ (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* . 26(22):3291-3310.

Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, Keith BR, Murray DM, Glennon K, Knight WB, Mullin RJ, Gilmer TM (2001). The Effects of the Novel, Reversible Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB-2 Tyrosine Kinase Inhibitor, GW2016, on the Growth of Human Normal and Tumor-derived Cell Lines *in Vitro* and *in Vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1(2): 85–94.

Saini KS, Azim HA Jr, Metzger-Filho O, Loi S, Sotiriou C, de Azambuja E, Piccart M (2001). Beyond trastuzumab: New treatment options for HER2-positive breast cancer. *The Breast*. 20(3):20–27.

Sanvicens N ve Marco MP.(2008) Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. 26(8):425-433.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich LA, Mcguir WL (1987). Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2neu Oncogene. *Science*. 235(4785):177-82.

Slamon D ve Pegram M (2001). Rationale for Trastuzumab (Herceptin) in Adjuvant Breast Cancer Trials. *Seminars in Oncology*.28(1):13-19.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Dale A (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*. 98(19):10869-10874.

Stephens, FO ve Aigner, KR (2009). *Basics of Oncology*. (1.Baskı). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 2010:4 35–41.

Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*. 114(8):785-796.

Sun C, Lee JSH, Zhang M (2008). Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 17;60(11):1252–1265.

Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, Krenacs T (2014). Correlations of Differentially Expressed Gap Junction Connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with Breast Cancer Progression and Prognosis. *PLOS ONE*. 9(11): e11254.

Thiagarajan PS, Sinyuk M, Turaga SM, Mulkearns-Hubert EE, Hale JS, Rao V, Demelash A, Saygin C, China A, Alban TJ, Hitomi M, Torre-Healy LA, Alvarado AG, Jarrar A, Wiechert A, Adorno-Cruz V, Fox PL, Calhoun BC, Guan JL, Liu H, Reizes O, Lathia JD (2018). Cx26 drives self-renewal in triple-negative breast cancer via interaction with NANOG and focal adhesion kinase *NATURE COMMUNICATIONS*. (2018)9:578.

Tkaczuk KHR, Kesmodel SB, Feigenberg SJ (2017). *Handbook of Breast Cancer and Related Breast Disease*. Demos Medical Publishing, New York.

Twomey JD, Brahme NN, Zhang B (2017). Drug-biomarker co-development in oncology – 20 years and counting. *Drug Resistance Updates*. 30:48-62.

Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2 overexpressing breast cancer. *Annals of Oncology*. 18(6): 977-984.

Viale G (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology* 23 (Supplement 10): x207–x210.

Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V (2006). Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cellular Signalling*. 18 (05):592-600.

Yang J, Qin G, Luo M, Chen J, Zhang Q, Li L, Pan L, Qin S (2015). Reciprocal positive regulation between Cx26 and PI3K/Akt pathway confers acquired gefitinib resistance in NSCLC cells via GJIC-independent induction of EMT. : *Cell Death and Disease*. 6(7):e1829.

Yarden Y ve Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature*. 2(2):127–137.

Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL (2000). Modulation of Hypoxia-inducible Factor 1a Expression by the Epidermal Growth Factor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/FRAP Pathway in Human Prostate Cancer Cells: Implications for Tumor Angiogenesis and Therapeutics. *CANCER RESEARCH*. 60: 1541–1545.

Zwick E, Bange J, Ullrich A (2002). Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *TRENDS in Molecular Medicine*. 8(1):1471-4914.

Wahajuddin ve Arora S. (2012) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2012(7):3445-3471.

Wang EC ve Wang ZW.(2014) Nanoparticles and Their Applications in Cell and Molecular Biology. *Integr Biol (Camb)*. 6(1):9-26.

Williams J, Lansdown R, Sweitzer R, Romanowski M, LaBella R, Ramaswami R, Ungera E (2003). Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors. *Journal of Control Release*. 91(2003):167-72.

Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK (2017). *Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening*. Published by Elsevier Inc, United States.

Wu L, Levine AJ (1997). Differential Regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 Genes after High-Dose UV Irradiation: p53-Dependent and p53-Independent Regulation of the mdm2 Gene. *Molecular Medicine*.3(7):441-451.

#### Internet

American Cancer Society (2017). Erişim Tarihi: 03 Nisan 2018, <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8577.00.pdf>.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### **Gizem SÜMER**

Atatürk Mahallesi, Sedef Caddesi Ata 4-2B No:25  
Ataşehir/İSTANBUL

**Telefon:** 0 (216) 455 57 89

**Cep:** 0 (536) 765 76 58

**E-posta:** gzmsmr@hotmail.com

### **Kişisel Bilgiler**

**Doğum Yeri:** Konak/İZMİR

**Medeni Hali:** Bekar

**Ehliyet:** 30.11.2010(B)

### **Eğitim**

2005-2009 Yeni Levent Lisesi

2009-2014 Haliç Üniversitesi

2015-2018 Haliç Üniversitesi (Yüksek Lisans)

### **Teknik Bilgiler**

PCR ve RT-PCR Optimizasyon ve Uygulamaları

Spektrofotometrik Ölçümler

MS Office

Hücre kültürü çalışmaları.

### **Staj**

İstanbul – Gülhane Askeri Tıp Akademisi, GATA, Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Moleküler Patoloji Laboratuvarı

### **Yabancı Dil**

İngilizce (Orta seviye)

Korece (Temel seviye)