T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

1. Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Elvan BAKAR
2. Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

DOKSORUBİSİN'İN FARKLI FORMLARININ VİMENTİN, TOPOİZOMERAZ VE ANTİOKSİDAN ENZİM EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN DENEYSEL MEME TÜMÖR MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Emre BAYRAM

Referans no: 10072428

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

1. Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Elvan BAKAR
2. Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

DOKSORUBİSİN'İN FARKLI FORMLARININ VİMENTİN, TOPOİZOMERAZ VE ANTİOKSİDAN ENZİM EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN DENEYSEL MEME TÜMÖR MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Emre BAYRAM

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2015/93 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Tez No:

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve 1. Tez Danışmanı Doç. Dr. Elvan BAKAR ile 2. Tez Danışmanı Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Emre BAYRAM tarafından tez başlığı "Doksorubisinin Farklı Formlarının Vimentin, Topoizomeraz ve Antioksidan Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Deneysel Meme Tümör Modelinde Araştırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 24./06/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Unvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Elvan BAKAR
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Unvanı Adı Soyadı
Dr. Öğr. Üyesi Melek AKINCI
ÜYE

İmza
Unvanı Adı Soyadı
Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZCAN
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü Vekili

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren tez çalışmamda çok değerli katkıları olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Elvan BAKAR başta olmak üzere ikinci tez danışmanım Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a, laboratuvar çalışmalarında destek veren Prof. Dr. Ayşegül Çerkezkayabekir'e, istatistiksel çalışmalardaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Enis Uluçam'a, Doç. Dr. Aydan Dağ'a, tez çalışmasının deneysel kısımlarının TÜTAGEM'de gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı TÜTAGEM yönetimine, Uzm. Pelin TÜRKER'e ve Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'ne teşekkür ederim. Çalışmanın yürütülmesinde sağladıkları maddi destekten dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP- 2015/93) birimine ayrıca teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca maddi manevi destekleri ve sevgileriyle hep yanımda olan annem Nurdan BAYRAM, babam Mehmet BAYRAM'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**
GENEL BİLGİLER **3**
DOKSORUBİSİN **3**
MEMENİN ANATOMİK YAPISI **7**
MEME KANSERİ **8**
NANOPARTİKÜLLER **14**
GEREÇ VE YÖNTEMLER **28**
BULGULAR **39**
TARTIŞMA **52**
SONUÇLAR **64**
ÖZET **66**
SUMMARY **68**
KAYNAKLAR **70**
ŞEKİLLER LİSTESİ **85**
ÖZGEÇMİŞ **87**
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

CAT **:** Katalaz

CPEB4 **:** Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4

DLT **:** DOX-Lipozom-Tümör

DLPT **:** DOX-Lipozom-PEG-Tümör

DNA : Deoksiribonükleik asit

DOX : Doksorubisin

DT **:** DOX-Tümör

GSH **:** Glutatyon

İM : İmatinib

MDA : Malondialdehit

MT **:** Meme tümör

PEG **:** Polietilenglikol

SOD : Süperoksit dismutaz

TOP : Topoizomeraz

TOP2A **:** Topoizomeraz 2A

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. En fazla ölüme yol açan kanserler arasında akciğer, mide, karaciğer, kalınbağırsak ve meme kanserleri yer almaktadır (1). Kanserin her iki cinste görülme oranın % 2-6 arasında olduğu bilinmektedir (2-4). Otozomal dominant geçiş gösterdiği bilinmekle birlikte genetik faktörler kanserin tek nedeni değildir (5). Meme kanseri en yaygın olarak koltukaltında, parasternal, subklavikular, meme altı ve vulvar yerleşimli olarak görülmektedir (6,7). 2013 yılında yapılan bir araştırmaya göre dünya çapında 14,9 milyon kanser vakası rapor edilmiştir. Kadınlarda kansere yakalanma oranları; 1,8 milyon meme kanseri, 700000 kolorektal kanser ve 535000 akciğer kanseri olarak kaydedilmiştir (8). Meme kanseri lenf yolu ile yayılabilmektedir. Kemik, beyin, akciğer, karaciğer ve ciltte de yayılım göstermektedir (9). Tamoksifen, paklitaksel, dosetaksel, doksorubisin (Adriamycin®), siklofosfamid, metotreksat, 5-fluorourasil, vinka Alkaloidleri- vinkristin&vinblastin, gemsitabine, epirubisin gibi pek çok kemoteropatik ajan meme kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanlardan biri Doksorubisin (DOX)'dir. Ancak DOX yan etkileri fazla olan bir kemoterapik ajandır ve toksisitesinde oksidan hasarın önemli rolü vardır. Oksijen radikalleri DOX gibi ajanların etkisiyle daha fazla üretilerek hücrelerin membranlarında, organellerinde ve hatta genetik materyalinde oksidan hasara yol açmaktadırlar. Bu hasarın en iyi göstergelerinden birisi lipid peroksidasyondur. Antioksidan enzimlerden Süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) bu hasarı engellemeye çalışan ve oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştırmada önemli rol oynayan endojen kaynaklardır (10). DOX, Deoksiribonükleikasit (DNA)'e bağlanarak DNA'nın replike olmasını engeller. Bu süreç serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açar (11,12). Sitotoksik ilaçlar, antitumor

etkilerini, kanser hücrelerinin spesifik hücre yapılarını veya metabolik yolaklarını bozarak göstermektedirler (13). Birçok araştırıcı tarafından, kanser hastalarında kemoterapiye bağlı olarak lipit peroksidasyon ürünlerinin miktarında artışlar olduğu, bildirilmiştir (14). DOX ayrıca Topoizomeraz (TOP) 2A inhibitörü olarak rol oynar ve DNA kırılmalarına yol açar. DNA çift ipliğinde meydana gelen kırılmalar hücreyi apoptoza götüren nedenlerden birisidir (15). Meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalarda Vimentin ekspresyonunun arttığı (16) ve bu artışın hücre göçü ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (17). Kemoterapotik ajanların sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkilerini aza indirmek amacıyla mevcut ilaçların geliştirilmesi yönünde pek çok çalışma yapılmaktadır. Aktif maddelerin kolloid lipozomlar içine hapsedilmesi ve polietilen glikol (PEG) ile kaplanması bu çalışmalara verilebilecek örneklerdir. PEG kaplı lipozomlar, mononükleer fagositik sistem tarafından daha zor tanınırlar ve geleneksel lipozomlara göre kan dolaşımında daha uzun süre kalırlar (18).

Çalışma kapsamında kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan, kalp ve böbrek dokuları üzerinde toksik etkiye yol açan DOX'un kolloid lipozoma hapsedilmesinin ve kolloidal lipozomların pegilasyonunun meme tümör dokusu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

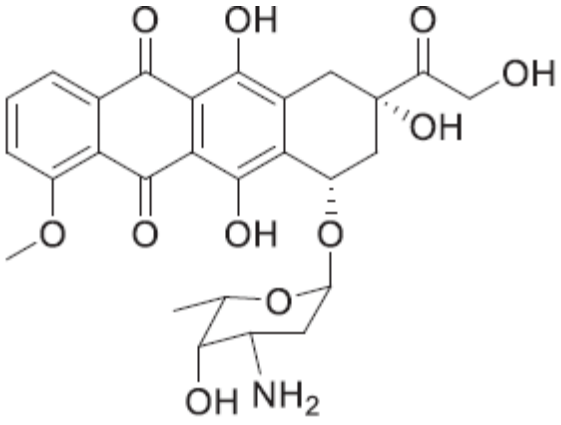
Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve yan etkileri fazla olan farklı formülasyonlardaki DOX'un deneysel olarak oluşturulan solid meme tümör modeli üzerindeki etki mekanizmaları Vimentin, TOP2A ve antioksidan enzimler ele alınarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, lipoze edilmiş ve lipozilasyon sonrasında pegilasyonu yapılmış DOX molekülünün Balb-c albino farelerin sol bacağında oluşturulmuş solid meme tümör modelindeki etkinliği incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

DOKSORUBİSİN

Tedavi amacıyla doğal ürünlerin kullanılması biyoaktif maddelerin izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları devam etmektedir (19-22). Günümüzde kemoteropotik ajanların yarısından fazlası bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan üretilmekte ve umut vaat eden sonuçlar elde edilmektedir (23,24). İzole edilmiş moleküllerin bir çoğu, tedavi için uygun olmasa da yeni yapıların üretilmesinde ve kullanılabilir ilaçların geliştirilmesinde öneme sahiptirler (25). Fitokimyasalların antikanser aktivitesi kanser hücrelerinin apoptoza uğramasında veya hücre siklusunun düzenlenmesi aşamalarında destekleyici olarak karşımıza çıkmaktadır (26-28). DOX, solid ve likit tümör tedavisinde sıklıkla kullanılan antrasiklin grubuna ait bir kemoterapotik ajandır (Şekil 1), (29,30). Geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen sitotoksik özelliğine dair kesin bir veri bulunmamaktadır. Antrasiklinin yüksüz formu, pasif difüzyon ile plazma membranını geçerek sitosole taşınmaktadır. DOX'un membrandan geçişi, asidik pH gradienti ve ilaç konsantrasyon gradienti ile gerçekleşmektedir. DOX, hücrede, asidik organellerde, intraselüler membranlara ve nükleik asitlere bağlanarak birikim yapmaktadır. DOX'un majör hedefinin DNA olduğu bilinmektedir (31).



Şekil 1. Doksorubisin yapısı (32)

Nukleus zarından geçen DOX, DNA çift ipliğindeki tetrasiklik bölgeye bağlanır ve yapıyı modifiye eder (33). Bu modifikasyon DNA'nın mekanik çeşitliliğindeki değişikliklere öncülük eder. Hasarlara karşı DNA'nın duyarlılığı arttırır ve biyolojik aktivitesini durdurur. Antrasiklinlerin insan eritrosit hücreleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar, DOX'un eritrositlere hızlıca bağlanabildiğini göstermektedir. Membrandan geçişinden sonra sitoplazmada, spektrine de etki ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (34, 35,36). DOX, nukleusu olmayan hücrelerde difüzyona uğradığında, zamana bağlı olarak artan bir toksisite ortaya çıkarmaktadır (37).

Doksorubisin tedavisinin, tümör baskılayıcı bir protein olan p53'ün kanser hücrelerinde hücre içi konsantrasyonunda azalmaya sebep olduğu ifade edilmektedir. DOX'un DNA hasarı oluşturması için p53'ün destekçi hedef genlerle etkileşime geçmesini geretirir. Bu hedef genler, inhibitör proteinlerle negatif etkiye sebep olan genlerdir. Eğer bu yapısal modüller değişikliğe uğrarsa, mutasyon ya da başka bir sebeple fonksiyonu bozulabilmekte ve bu durum tüm molekülün biyolojik fonksiyonunun bozulmasına sebep olmaktadır. Bir çok çalışma, DOX uygulamasına bağlı olarak p21 miktarının arttırdığı ve şaperonların hücre dışına salınımında azalmaya sebep olduğu vurgulanmıştır. Ekstraselüler şaperonların farklı hüceler, dokular ve organlar arasındaki iletişimi sağladıkları bilinmektedir (38). Bunlarla birlikte DOX'un, DNA ile etkileşime geçerek TOP2A enziminin fonksiyonunu inhibe ettiği ifade edilmiştir (39).

1982'de Tritton ve ark. antrasiklinlerle yaptıkları çalışmalarda antrasiklinlerin sitotoksik etkilerini, hücre içine girmeden de gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Hücre membran kopozisyonu sadece fosfolipit tabakadan oluşmamakta, membran yapısında aynı zamanda membrana gömülü halde bulunan integral proteinler de bulunmaktadır. Hücrenin

membran yapısı hücrenin hayatta kalması, farklılaşması, hücre ölümü ve bunun gibi bir çok aktiviteyi içerisinde barındırmaktadır. Bu sebeple genel lipit organizasyonu ve yapısındaki kemoterapotik bileşimlerin artışı gibi değişiklikler, sitotoksik etki göstererek apoptozu başlatabilmektedir. Antikanser ilaçların, membran lipitleri ile güçlü ve tahminen elektrostatik bir etkileşim içerisinde olduğu söylenebilir. Ayrıca DOX molekülü plazma membranının tek katmanı üzerinde kolesterol ile yarışmaktadır. Kolesterolün bulunmadığı mebran yüzeylerinde ise DOX'un fosfolipitlerle etkileşiminin daha kolay olduğu ifade edilmektedir (40).

Kemoterapotik ilaçlar tedavideki büyük etkinliklerine rağmen toksisite gibi şiddetli yan etkiler göstermektedir (39). Sitotoksik kemoterapi, kanser tedavisinde kullanılan en önemli köşe taşıdır. Fakat sitotoksik kemoterapotik ajanlar, dar teropotik indeksleri, tümörlü dokuya çok az ulaşmaları ve yan etki limitleri sebebiyle tedavinin etkinlik düzeyi üzerinde olumsuzluk yaratmaktadır. Bu olumsuzlukların ortadan kaldırılabilmesi amacıyla nanopartiküllerin tasarımı gündeme getirilmiştir (41).

Bu gün kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölümlerinin ikinci yaygın nedenidir (42). Bu durum kanserin tedavisinin önemli olduğunu ortaya koymaktadır ve bu sebeple günümüzde radyoterapi, kemoterapi ve cerrahiyi içerisinde barındıran tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle birlikte son on yılda yakalamış olduğumuz tedavi avantajlarına rağmen ilaca karşı direnç, tedavi verimliliğini etkilemektedir. Kanser hücrelerinin besin alımının artması, birbirleriyle olan etkileşimleri, enerji ve biyosentez gereksinimlerinin karşılanması gibi metabolik adaptasyonlarla desteklenmesiyle ortaya konan karakterizasyonları, hızlı hücre bölünmesini ve büyümesini desteklemektedir (43,44). Genetik kararsızlıkla ortaya çıkan metabolik tekrar programlama, inflamasyon ve immün sistemden kaçınma gibi nedenlerin kanserin oluşmasına ortam hazırladığı düşünülmektedir (44). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ilaç direncinin oluşum aşamasında düzensiz metabolizmanın da rolünün olduğu doğrulanmıştır (45,46,47). Bu konuyla ilgili yapılan bazı çalışmaların ışığında, hedeflemenin ilaç direnci ile mücadelede avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir (48).

Doksorubisin, lösemi, lenfoma ve meme tümörü gibi kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan antitümör ajan olmasına rağmen klinik kullanımında doz bağımlı olarak ventriküler disfonksiyon, kardiyomiyopati ve çeşitli kalp bozukluklarıyla sonuçlanan kardiyotoksisiteye sebebiyet vermektedir (49). Taksanların DOX'la yapılan kombinasyonları, metastatik meme kanseri ve diğer kanser türlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçlar yüksek etki göstermekte, çapraz dirence neden olmamakta ve düşük toksisite profili sergilemektedirler

(50). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı kanser hücresinin geliştirmiş olduğu direnç, aşılması gereken en önemli faktörlerden birisidir. Nano ilaçlar bu direnci kırma konusunda umut vaat etmektedir. İn vivo çalışmalarda yetersiz tümör hedefleme, düşük tümör penetrasyonu, zayıf selüler geçiş ve yetersiz ilaç salınımı konusunda belirli limitlerin üzerine çıkılmıştır. Bu beklentilerle, bazı çalışmalarda, polipeptid–DOX'un, hızlanmış hücresel alımı gözlenmiş, DOX'a dirençli hücrelerde sitotoksik etki yaptığı rapor edilmiştir. Bunun yanında nanotaşıyıcılara da çoklu ilaç yüklemesi yapılarak ilaçların yan etki potansiyellerinin minimize edilmesi sağlanabilmektedir. Son dönemlerde nanokristaller, karbon nanotüpler, polimerik nanopartiküller, lipozomlar, lipid nanopartiküller ve inorganik nanopartiküller gibi nanotaşıyıcılar kullanılarak, ilaçların vücut savunma sistemi tarafından tanınmaları engellenerek, kanser hücrelerine endositozla girişleri sağlanarak, hedefleme çalışmaları yapılmaktadır. Ancak in vivo terapotik etkileri sınırlandırmaktadır (51).

Doksorubisin Toksisitesi

Meme tümörü tedavisinde kullanılan ve antrasiklin grubu ilaçlardan olan DOX ve epirubicinin doza bağımlı olarak kardiotoksik etkisinin olduğu bilinmektedir. Antrasikline bağlı kardiyo toksisitenin, akut subklinik kardiyak hasar ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (52). Araştırmalar, DOX tedavisinin kalp ve böbrekte şiddetli doku hasarına yol açmakla birlikte renal hasara neden olduğu ve bu hasarın hematoürezis ve protein üriye yol açtığını ortaya koymuştur. Renal DOX'un glomeruluslarda lipid peroksidasyonununa sebep olan serbest radikal üretimini tetiklediğini ve bu nedenle dokuların normal fizyolojik fonksiyonunu etkilediği ifade edilmiştir (53). Bununla birlikte DOX kullanımına bağlı olarak farelerde, karaciğer dokusunda SOD aktivetisinin artışı, karaciğerde oksidatif strese karşı meydana gelen adaptif bir cevap olarak ifade edilmiştir (54). DOX'un artmış renal zararında kritik rol oynayan faktörlerde oksidatif stres ve inflamasyonun rol oynadığına dair kanıtlar mevcuttur (55).

DOX-Lipozom-Polietilenglikol Kullanımı

Lipozomal ilaç sistemlerinin kemoterapideki artan terapotik etkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Geleneksel doğal fosfolipitlerin, kolesterol ile karıştırılmasıyla oluşturulan geleneksel lipozomlar, vücutta birkaç dk veya s gibi kısa bir aralıkta sirkülasyonda kalmaktadırlar (56,57,58). Lipozomların vücutta kalış süresini arttırmak amacıyla polietilenglikol (PEG), serebrosid sülfat gibi polimerler kullanılmaktadır.

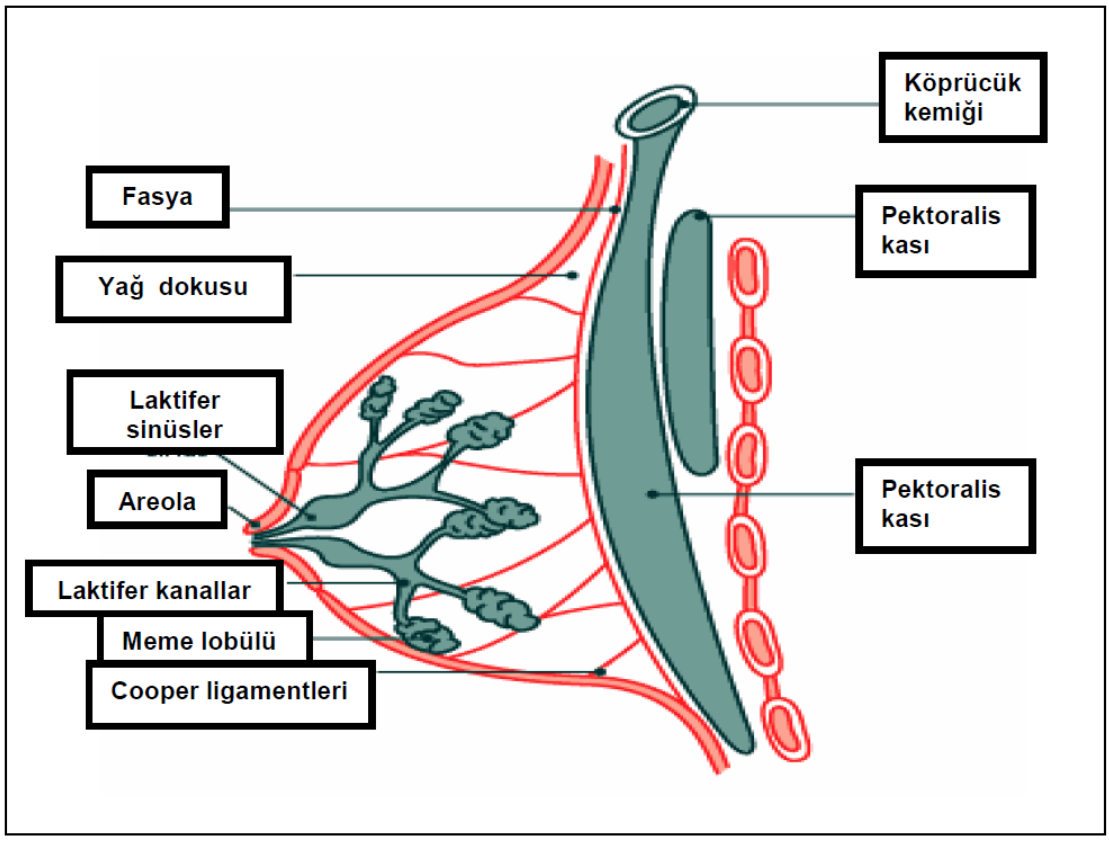
Bu sayede opsonizasyon inhibe olmakta ve yarılanma ömürleri uzamaktadır (59,60,61). Lipozomların uzatılmış yarılanma ömrü, lipozomal antrasiklinlerin tedavi etkinliğini arttırarak ilaç yüklü lipozomun tümör dokusunda birikimini olanaklı kılmıştır (62,63). Ancak lipozomal yüzeyde büyük moleküllerin varlığı hücrelerle lipozomların etkileşmesini engelleyerek, lipozomun tümör dokusuna girmesini baskılamaktadır (64,65). Bu sebeple tümör dokusundaki birikim azalabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PEG'in optimal miktarların 55mg/kg olduğu ifade edilmiş ve bu doğrultuda pegilasyonun kanser tedavisindeki etkinliği üzerinde yoğunlaşılmıştır (66).

Lipozomlarda, ilacın sirkülasyon süresini uzatmak için yüksek geçiş sıcaklığında fosfolipit kullanılması gerektiği (67), 55 mg/kg dozda PEG ile fosfotidilkolin/kolesterol lipozomal DOX'un, PEG'siz lipozoma göre kalış süresini bir buçuk kat arttırdığı belirtilmiştir (64,65).

MEMENİN ANATOMİK YAPISI

Memeler toraksın üzerinde, sternumun iki yanında, 2. ve 6. kostaların arasında bulunmaktadır. Her bir meme yapısı tam olarak pektoralis major ve pektoralis minör kaslarının üzerine yerleşmiştir. Meme bezinin önünde yüzeyel fasya, arkasında derin fasya bulunmaktadır. Meme derisinden derin fasyaya doğru uzanan ve memeyi yerine tespit eden ligamentler cooper ligamentleri olarak adlandırılırlar (Şekil 2). Kanserin yayılma ve ilk belirtilerini ortaya koyabilmek açısından büyük önem taşırlar (77).

Meme dokusu yaklaşık olarak 20 adet lob adı verilen birimlerden meydana gelmiştir ve bu loblar kendi içerisinde daha küçük kısımlara ayrılan ve süt üretimini sağlayan lobül adı verilen yapıları içerisinde barındırmaktadır. Her bir lobülün içerisinde süt salgısının akmasına olanak sağlayan duktus adı verilen süt kanalları bulunmaktadır. Lobüllerin süt kanalları birleşerek meme başına kadar uzanır. Süt kanalları ve lobüller, yağ dokusu ile sarılmış durumda meme yapısını oluşturmaktadır (78,79).



Şekil 2. Memenin anatomik yapısı (80)

MEME KANSERİ

Meme kanseri, kadın sağlığını hayati olarak etkileyen bir hastalıktır. Yaş, yaşam tarzı, üreme hikayesi, geçirdiği hormon replasman tedavisi ve genetik mutasyonlar risk faktörerini oluşturmaktadır. Vücut kitle indeksi yüksek kadınlarda kanser dokusundaki proinflamatuvar çevre ve hipoksik durum meme kanserinin gelişimine yatkınlık oluşturmaktadır. Bununla birlikte, diagnozdan sonraki ağırlık artışının meme kanserindeki mortalite oranını arttırdığı da gözlenmiştir. Bazı biyobelirteçler, şişmanlık ve immün tepkilerle bağlantılıdır. Tüm bunlara ilave olarak değişen immün fonksiyonlar, aktivasyon ya da baskılanma, kanser riskinin ve yatkınlığının belirleyicisi olarak kabul edilmektedir (68).

Meme kanserinin kadınlarda en çok rastlanan kanser türü olduğu düşünülmektedir ve günümüze kadar birçok diagnoz ve tedavi tekniği geliştirilmiştir (69). Yapılan DNA taramaları farklı meme kanseri türleri olduğunu göstermiş ve meme kanserinin alt tipleri ilk defa Perou ve ark. tarafından tanımlanmıştır (70). Bu türlerden birisi olan üçlü negatif meme kanseri, hayatta kalma süresi kısa ve yüksek metastatik karakterli bir kanser türüdür. Bu tür immünohistokimyada östrojen, projesteron ve Her2/neu belirteçleri negatif olarak tanımlanan meme kanserlerinin alt tipidir. Bazal belirteç taşıyan iki alt gruptan tamamen ayrılır. Bazal

görünümlü ve bazal görünümlü olmayan olarak adlandırılan bu alt gruplar sırasıyla pozitif ve negatif miyoepitelyal bazal belirteçlerdir. Tıpkı sitokeratin 5/6, düz kastaki aktin ve epidermal büyüme faktörü reseptörü gibidir (71). Her şeye rağmen, meme kanserini oluşturan risk faktörleri osteoporoza karşı koruyucu olabilmektedir. Birçok adjuvan terapileri, artmış kemik kayıpları ve büyük oranlardaki kırıklara öncülük etmektedirler. Endokrin tedavisi ve kemoterapi alan premenopozal meme kanserli hastalarda tedavi sonucunda % 10'dan fazla kemik kayıplarının olduğunu göstermiştir (72). Azalan hareketlilik ve ağrı, hastalarda beklenen semptomlar arasında seyretmektedir. Yukarıda bahsedilen birçok etkinin ve ağrının ortadan kaldırılması amacıyla analezik, radyoterapi ve bifosfonatlar gibi sistemik tedaviler, hormonal tedaviler, kemoterapi gibi kombine tedaviler uygulanmaktadır. Fakat bu konvansiyonel tedavi yöntemleri de 1/3 oranında yetersiz bir ağrı kontrolü sağlamaktadır. Radyoterapi % 60 oranında hastaların ağrısını azaltmaktadır ve bifosfonatlar kemik metastazlarında etkili olmaktadır (73). A, B, O ve Rhesus çeşitliliği de ilaç transfüzyonu için etkili bir parametredir. Ancak kimyasal literatürde bu durum bazı hastalıklar için zayıf bir parametredir. Alınan sonuçlara göre A kan grubuna sahip bireylerin, meme kanseri açısından yüksek risk taşıdığı, AB kan grubuna sahip bireylerin de ise görülme sıklığının en düşük olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca Rh^+ grubuna sahip kadınlarda meme kanserinin yayılma ihtimalinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu risk A grubunda % 44, 0 grubunda % 32, B grubunda %16, AB grubunda ise % 8 olarak belirtilmiştir. Rh^+ faktöre sahip bireylerde yayılma olasılığı farklı çalışmalarda % 88, %53.1, %21.8, % 17.5, % 7.5 olarak ifade edilmiştir. Kanser insidansının araştırıldığı pek çok araştırma göz önüne alındığında kanserin oluşumu ve yayılımında, yaş, cinsiyet, genetik yatkınlıklar gibi faktörlerin etkili olduğu açıktır (74).

Klinik biyobelirteçler, tanı ve tedavi yöntemi hakkında fikir yürütülmesi açısından önemlidir. Meme kanserinin kilit belirteçleri; östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü (HER2/ERBB2) reseptörleridir. Bunlara ek olarak, meme kanserinde BRCA1, BRCA2, p53 ve cerbB-2 moleküler biyobelirteçler olarak prognostik öneme sahiptirler. Bahsedilen belirteçlerin, protein ekspresyon dereceleri, immünohistokimyasal yöntem ve yerinde hibridizasyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmektedir (75). Bu sonuçlara göre tedavi yönteminin belirlenmesinde önemli role sahiptir. Bütün kanser türleri, tümör genomundaki somatik mutasyonlar, temel değişiklikler, eleme ve çıkarmalar, kopyalama sayı değişiklikleri ve yapısal tekrar, düzenlemelerle karakterize edilir (76).

Vimentin

Vimentin 57 kDal'luk tip 3 orta derece fiber ailesine ait bir proteindir. Vimentin, iskelet ağının mikrotübül ve mikrofilament formunun tamamıyla, sitoplazmada, hücre membranının çevresinde ve hücre dışında bulunmaktadır. Vimentin hücre bütünlüğünün korunmasına ek olarak hücre adezyonu, migrasyon, apoptoz ve genomik DNA ekspresyonunda da rol oynamaktadır. Hücre içi internal etkilerine de ilave olarak birçok virüsün meydana getirdiği enfeksiyonların yayılma aşamasında önemlidir (81). Ayrıca vimentin, hücresel onarım, hücreler arası sinyalizasyon, hücre farklılaşması ve büyümesinin düzenlenmesi ile birlikte hücrede strese gerekli cevabın oluşmasında, tümörün yayılmasında, mRNA'nın transportunda önemli roller üstlenmektedir. Vimentini kodlayan gen bölgesinin uzunluğu yaklaşık olarak 10 kb'dir (82).

Meme kanserinde vimentinin klinik önemi henüz tamamen anlaşılabilmiş değildir (83). Üçlü negatif meme kanserinde dikkate değer bir biçimde zayıf prognoz göstermektedir (84). Fakat birçok transkripsiyon faktörünün arasından vimentinin epitelial mezenkimal geçiş'te önemli olduğu vurgulanmıştır (85). Vuoriluoto ve ark. tarafından vimentin expresyonunun epitelial mezenkimal geçiş bağımlı migrasyon için gerekli olduğu ifade edilmiştir. Bir tirozin kinaz reseptörü olan Axl proteininin yüksek ekspresyon gösterdiği çalışmaların %78'inde vimentin negatif, % 22'si de ise vimentinin pozitif sonuç verdiği ifade edilmiştir (83).

Yapılan bir çok çalışma, meme kanseri varlığında vimentin ekspresyonunda bir artış olduğunu göstermektedir (86,87). Bu sebeple de Axl son zamanlarda kanser tedavisinde terapotik hedef olarak düşünülmektedir (83). Vimentinin, Axl'nin uyarılması için gerekli olduğu yapılan son çalışmalarda gözlenmiştir (86). Axl ekspresyonunun sadece vimentin ile düzenlenmediği, bu konuda birçok başka faktörün rol oynadığı ifade edilmiştir (83).

Meme kanserinde, son on yılda yeni prognostik faktörler (ER, PR ve HER-2) ve teröpotik hedefleme konusunda büyük gelişmeler kaydedilmiştir, ancak tümoral yayılması altında yatan mekanizmalar ve metastaz tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun için kanserin mekanizmasının ve moleküler hedefleme yapılabilecek duyarlı hücrelerin tespit edilmesi gerekmektedir. Son yapılan çalışmalarda çoklu tümör tiplerinde Sitoplazmik poliadenilasyon element bağlama proteini 4 (CPEB4)'ün aşırı üretimi ve bunun sonucunda metastazda artışın meydana geldiği gözlenmiştir, fakat CPEB4 mekanizması, bu olaylar içerisinde çok fazla bir etkiye sahip değildir (88).

Topoizomeraz

Topoizomeraz, hücrenin hayatta kalma aşamasında, replikasyon prosesinde rahatlamaya gereksinimi olan DNA süper sarmal ipliğinin topolojik problemlerinin ortadan kaldırılmasında rol oynayan önemli bir nükleer faktördür (89,90). Topoizomerazlar topoloji üzerindeki etkilerini iki farklı şekilde gösterirler. TOP 1, DNA çift sarmalının tek zincirini kırar, TOP 2 ise DNA çift sarmalının iki zincirini de kırar. Uçtan uca yarılma ve replikasyon süreci boyunca DNA sıkı formundan kurtularak rahatlatılmış olur ve daha sonra hücre bölünme aşamasına ilerler. TOP 1 tek ipliği kırma görevini, 2 ise iki ipliği kırma görevini üstlenir (91). TOP ailesi, replikasyon ve transkripsiyonu kolaylaştırmak üzere DNA sarmalını gevşeterek açma konusunda anahtar rol oynarlar. DNA omurgasının geridönüşümlü olarak ayrılması sayesinde TOP çift sarmal yapıyı rahatlatabilmek için gerilim oluşturur (92,93). TOP DNA fonksiyonlarını düzenlediği için kanser tedavisinde potansiyel hedef olarak görülmektedir. Bugüne kadar birçok bileşiğin TOP aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Kamptotesin TOP 1'i direkt olarak inhibe eder (94). Aynı zamanda kamptotesinin iki ayrı türevi olan irinotekan ve topotekan da aynı şekilde etki etmektedirler ve klinikte hala kullanılmaktadırlar. Etoposit, DOX, daunorubisin ve epirubisin de DNA çift sarmalı ayrıldıktan sonraki tamir aşamasında TOP2A'yı bloke ederek etki göstermektedir. Bu sayede kanser hücrelerinin mitotik aktivitesi engellenmektedir (95).

Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz, bütün vücut hücrelerinde meydana gelen serbest superoksit radikallerinin oluşturduğu oksidatif hasara karşı hücrelerin korunmasında rol oynayan önemli bir enzimdir. İnsan vücudunda üç tip SOD izoenzimi bulunmaktadır. Bunlar SOD 1, SOD 2 ve SOD 3'tür. Yapılmış olan bir çok çalışma bize; meme kanseri, pankreatik adenokarsinom, papilloma ve prostat kanseri hücreleri gibi multiple kanser hücrelerinde, SOD 2'nin yüksek miktarda bulunduğunu göstermiştir (97-99). SOD 1'in yüksek miktarlarda bulunmasının Down Sendromu ile ilişkili olduğu da ropor edilmiştir (100,101). Cilt lekelerinde radyasyon ve talasemi ile karşı karşıya kalındığında oluşan oksidatif strese karşı hücrelerin korunması amacıyla SOD 1'in artış gösterdiği ifade edilmiştir (102,103). SOD'un kantitatif analizleri çeşitli hastalıkların doğru teşhis edilebilmesi için çok önemlidir.

Süperoksit dismutaz, iki molekül süperoksiti dihidrojen ve hidrojen perokside dönüştürerek süperoksit radikalleri üzerine etki etmektedir. Bu üç farklı süperoksit molekülü protein katlanmaları ve katalitik metal iyonları ile evrimleşmiştir. Bu metal iyonları

Cu/ZnSOD, MnSOD/FeSOD, NiSOD şeklinde karakterizedir. Cu/ZnSOD insan hücrelerinde SOD1 ve SOD3'ün yapısında bulunmaktadır. (104-106). Cu/ZnSOD ilk olarak sığır eritrositlerinden izole edilmiştir. Aslen SOD1 olan bu enzim ismini eritrokupreinden almıştır. Kütlesi 32kDal olarak tanımlanmıştır. insan eritrositleri ve beyin, tomurcuklanmış *Saccharomyces cerevisiae, Xenopus laevis, Spinacia oleracea* ve *Potentilla astrosanguinea*'da da SOD 1 varlığı ifade edilmiştir. Ökaryotik SOD 1 iki özdeş alt üniteden meydana gelmiştir, her birisi silindirik beta sarmal yapı ve peptid düğümleri içerimektedir (107).

Bu enzimle ilgili olarak fibromiyalji, diyabet, kanser, multiple skleroz, Alzheimer, Parkinson ve alkolün sebep olduğu etkilerin tedavisinde kullanılabilecek ilaç ve farmakolojik çalışmalar yapıldığında gayet faydalı sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. SOD, transplantasyonda kullanılan organ ve spermlerin korunmasında, deriyi koruyan kozmetik preparatların üretiminde kullanılabilecek bir antioksidandır (108).

Katalaz

Katalaz hemoglobin molekülünün proteinsiz kısmı olarak tabir edilen bir heme enzimidir ve her bir hem grubu karakteristik alt üniteden oluşan ferrik demir içerir (109). Ökaryotik organizmalar için yaşamın temel karakteristik özelliklerini aerobik metabolizmalar belirlemektedir (110). Yaşayan her ökaryotik hücrede, biyoenerjik ve biyosentetik proseslerde başlangıç için ulaşılabilir oksijen kullanımı, enzimatik reaksiyonların kompleks bölümlerini barındırmaktadır (111). Oksijen girişi ile yapılan hücre solunumu, partiküler olarak mitokondrilerde redoks tepkimeleriyle meydana gelen oksijenin oksidasyonunun tamamlanmasıyla oluşmakadır. Bu aşamalar esnasında ortaya çıkan elektron sızıntıları serbest oksijen radikallerinin üretilmesine öncülük etmektedir. Evrimsel olarak yaşayan hücreler, sofistike enzimler ve radikalleri temizlemeye devam eden nonenzimatik reaksiyon eşlemeleri ile uygun fonksiyonların ve hayatta kalma becerilerini yerine getirmektedirler (112,113). SOD, toksik süperoksidi, daha az toksik olan hidrojen peroksite dönüştürürken CAT ise hidrojen peroksiti suya dönüştürmektedir. Ağırlıklı olarak peroksizomlarda ve sitoplazmada bulunmaktadır. Bu antioksidan enzimler hücrenin hayatta kalabilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu düzenlemelerin yapılamaması durumunda diyabet, kanser ve yaşlanma gibi pek çok hastalık ortaya çıkabilmektedir (114). GSH ve CAT, peroksidaz, reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin etkilerini hafifleten ve lipitleri, DNA'yı, proteinleri oksidatif modifikasyondan koruyan anahtar antioksidan enzimlerdir (115). H_2O_2 temizleyicileri gibi

yarışmalarına rağmen esas işlemleri belirsizliğini korumaktadır (116). CAT, H_2O_2'yi oksijen ve suya indirgemekte (117) ve patojenlere karşı immün sistem hücrelerinin üretmiş olduğu H_2O_2'ye karşı koruma sağlamaktadır (118). Bir CAT molekülü, her saniye milyonlarca molekül H_2O_2 molekülünü su ve oksijene çevirebilmektedir (119,120).

Katalaz, deri üzerinde de antioksidan özellik gösteren enzimlerden bir tanesidir. Reaktif oksijen türlerinden sadece bir tanesi olan H_2O_2, endojen ve ekzojen faktörler tarafından üretilebilmektedir. Ultraviyole iritasyona maruz kalmak, ekzojen faktörlerinin başında gelmektedir, buna karşılık kronik enflamasyon da endojen faktöre örnek verilebilir (121).

Katalaz aktivitesi dramatik olarak stres uyaranından etkilenmemektedir. Kalmodulin içeren Nükleosid difasfat kinaz 1, Salt overly sensitive 2, Triple gene block protein 1 ve Lesion simulating disease 1 gibi proteinlerin CAT' la etkileşim kurduğu belirlenmiştir. Ancak bu proteinlerin CAT aktivitesinin düzenlenmesiyle olan direkt ilişkisi bilinmemektedir (122).

Glutatyon

Glutatyon, Prostaglandin-E sentaz sigma sınıfı glutatyon transferazın homoloğudur (123,124). Glutatyon, ɣ-L-glutamil-L-sisteinil glisin: (2S)-2-amino-4-{[(1R) -1[(karboksimetil)karbamoil] -2-sülfaniletil] karbamoil) bütanoik asit) tiyol tripeptididir ve bütün hücrelerde bulunmaktadır. GSH, oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarında ve enzim reaksiyonlarında kofaktör olarak, reaktif oksijen türlerine ve potansiyel toksik ksenobiyotiklere karşı hücrelerin korunmasında, sistein depolanmasında, gen ekspresyonlarında, DNA ve protein sentezinde ve bunlara ek olarak hücre çoğalması ve apoptozda, sinyal iletiminde, sitokinlerin üretilmesi ve immün cevap gibi hücresel fonksiyonlarda rol oynamaktadır (125).

Glutatyon sistemi evrimin ilk dönemlerinde bu fonksiyonları yerine getirmek için bir çözüm olarak ortaya çıkmıştır (126). Cys-gly dipeptid ile glutamata bağlı dipeptid bağı α-karboksil grubundan ziyade ɣ-glutamil transferazla hidrolize karşı korunma sağlamaktadır. Bu enzim hücre membranında lokalizedir. Bu da GSH sayesinde intraselüler bozunmayı önlemektedir (127). GSH majör olarak reaktif oksijen türleri gibi potansiyel toksik okside reajanların redüksiyonunda rol oynar (126). Hem ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu için hem de doymamış aldehit ve prostaglandin sentaz içeren endojen bileşikler için glutatyon konjugasyonu gereklidir (128,129).

Malondialdehit

Biyolojik sistemlerde elektron alıcı moleküllere verilen isim serbest radikaldir, bu serbest radikallerin aktif oksijen türevleri ise oksidanlar olarak bilinmektedir. Oksidanlar etkileşime girdikleri moleküllerden elektron alabilmektedirler. Bu yetenekleri sayesinde etkileşime girdikleri molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirirler bunun sonucunda hücre zarlarını, RNA, DNA gibi nükleik asitlerle birlikte bir çok enzimatik olaya etki ederek hücre hasarına sebep olmaktadırlar. Membranlarında bulunan fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleri nedeniyle biyomembranlar ve hücre içi organeller, oksidan moleküller tarafından saldırıya uğramaktadırlar. MDA lipit peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden birisidir ve hücre membranlarından iyon giriş çıkışını etkilemek suretiyle membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olmakta ve iyon geçirgenliği ile enzim aktivitesinin değişimi şeklindeki olumsuz durumlara sebep olmaktadır. MDA, DNA'da bulunan nitrojen bazları ile reaksiyona girerek mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etki göstermektedir. MDA oksidatif stres parametresi olarak kabul edilmektedir. Oksidatif stres parametresi, yaygın olarak lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, protein oksidasyonu; oksidatif DNA hasar göstergesi 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG); SOD, GPx, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi enzimatik olmayan antioksidanların ölçümü ile belirlenebilmektedir (130).

Yapılan klinik çalışmalarda in vivo lipit peroksidasyonu yansıtmak için doku, plazma ve ürinde oksidasyon ürünlerinin ölçümü, yapılmaktadır. Lipit peroksitler kararsız bileşikler olmaları sebebiyle hızlıca bozunma eğilimi gösterirler bu yüzden kısa zincirli alkanlar, aldehitler gibi farklı birçok ürüne dönüşebilmektedirler. Bu nedenle yaygın olarak tiyobarbitürik asitreaktif maddeler ile sitotoksik aldehitlerin ölçümleri yapılmaktadır (130).

NANOPARTİKÜLLER

Son yıllarda teknolojinin de gelişmesiyle birlikte hastalıklar ve tedavi alanında yeni fikirler ve bunların sonucunda yeni uygulamalar denenmeye ve kullanılmaya başlanmıştır. İlaç tedavisinde hücresel boyutta tedavi yöntemleri ve ilaç sistemleri geliştirilmiş ve yapılan araştırmalar bu partiküllerin olumlu etkinliklerini ortaya koymuştur. Bu boyuttaki tedavi sistemleri nano boyutlara kadar küçültülebilmiş ve bu boyuttaki ilaç ve ilaç sistemlerinin avantajları da tedavinin yararına kullanılmaya başlanmıştır (131).

Nanometre, metrenin milyarda biridir. Bu teknoloji, ilk defa 1959 yılında Amerikalı Nobel fizik ödülü sahibi Richard Feyman (1918-1988) tarafından başlatılmıştır. Daha sonra 1974 yılında Norio Taniguchi ilk defa nanoteknoloji kelimesini kullanmıştır (132).

Nano boyutta ilaçlarla tedavinin ortaya çıkması ile birlikte ortaya nanofarmasötik terimi çıkmıştır. Bu terim, nano büyüklüklerde toz ilacı, ilaç taşıyıcı sistemleri ve araçları kapsamaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler başlıca nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar, nanolipozomlar, niozomlar, dendrimerler, fulleren, karbon nanotüpler, polimer-protein kanjugatları, polimer-ilaç konjugatları, nanojeller, polimerik misellerdir. Bu sistemlere ilave olarak, hiçbir taşıyıcı kullanmadan doğrudun doğruya vücuda uygulanabilen nanokristal ilaçlar bulunmaktadır (131). ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI), ABD Patent ve Ticari Marka Ofisi (PTO), Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) aralarında fikir birliği oluşturarak, nano boyutlar için en düşük 1 nm, en yüksek 100 nm değerlerini kabul etmişlerdir. Ancak Avrupa'da Nanotıpla ilgili Avrupa Teknoloji Platformu gibi bazı kuruluşlar, tıpta uygulanacak büyüklük aralığını 1 nm ile 1000 nm aralığında kabul etmiştir (133,134).

Nano ölçünün 1 nm-100 nm arası olarak tanımlanıp düzenleme yapılması bazı problemlere neden olmaktadır. Zira bu limitlerin dışına çıkan ölçülerde maddenin özelliklerinin değişip değişmediği ya da bu özelliklerin değiştiği belli bir büyüklük eşik değeri olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu boyutlar ve bu boyutların uygunluğunu niteleyen bilimsel çalışmaların yetersiz olduğu tartışılmaktadır. Ayrıca bitmiş üründe büyüklük dağılımının tam olarak bilinmesi mümkün değildir ve ilacın vücuttaki büyüklük dağılımı da çok önemlidir (134).

Nanopartiküllerin avantajları aşağıdaki biçimde sıralanabilir;

- Nanopartiküllerin boyutları dolayısıyla damarlardan kolayca geçebilirler.
- Nanometre boyutunda partiküllerin yüzey alanı arttığı için çözünürlüklerinin fazla olması.
- Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması sonucu çözünülüklerinin artması, partikül absorbsiyonunun artmasından dolayı biyoyararlanımlarının artması.
- Nanopartiküllerin istenilen bölgeye hedeflendirilebilmeleri.
- Stabilitesi ve raf ömrü uzun yeni formülasyonların hazırlanmasını mümkün kılmaları.
- Nanofarmasötiklerin biyolojik tedavi uyumlarının yüksek olması.
- PEG veya polioksietilen molekülü bağlayarak dolaşımda uzun zaman kalabilmeleri (135).

- Bir nanotaşıyıcıya birden fazla etkin madde yüklenebilmesi ve birden fazla hedeflendirici molekül bağlanabilmesi (136).

Nanofarmasötikleri hazırlamak için temelde iki yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden ilki büyük maddeyi, öğütme, termal yöntemler, yüksek enerji uygulama, kimyasal sentez ve litografik yöntemlerle küçülterek nano boyuta ulaşmak, diğeri ise kimyasal sentez, supramoleküler sentez, birçok maddenin kovalent konjügayonu, kolloit kimya gibi yöntemler aracılığıyla en küçük nano boyuttan hareketle yeni bir nanomadde hazırlamayı kapsamaktadır (137)

Dünya üzerinde 1990 yılından bu yana önemli sayıda nano büyüklükte ürün, hastaların rutin kullanımı için ilaç ve görüntüleme maddesi olarak onaylanmıştır. Bu bağlamda kullanılan yöntemlerle, hem nanomateryalin hem de nanoilacın klinik öncesi güvenirliği belgelenmiş ve bu ürünler, güvenilirlik ve yeterlilik açısından farmakovijilans verileri ile de değerlendirilmiştir (138).

Nanoilaçlarla ilgili gelişmeler beraberinde nanotaşıyıcı sistemlerdeki yeni buluşları da gündeme getirmektedir. Günümüzde polimerik taşıyıcıların yanısıra, bakteriler, virüsler, alyuvarlar makrofajlar, lenfositler ve kök hücreler gibi birçok doğal hücre, ilaç taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (131).

Nanoilaçlarla ilgili gelişmeler, gelecek tedavi protokollerinin belirlenmesinde gelecek için umut vaat edicidir. Kanser, diyabet, santral sinir sistemi bozuklukları, kardiyovasküler hastalıklar, alerji, otoimmün ve kronik enflamasyon, hormon eksiklikleri gibi durumlarda tedavi için biyoteknoloji temelli ilaçların daha fazla kullanılacağı öngörülmektedir (131). Bu gelişmenin dinamiği ihtiyaç duyulan yeni ilaçlar ve ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Diğer taraftan hastalıkları önlemek, tedavi etmek ve yaşam standardını artırmak için ilaçta yeni gelişmelere ihtiyaç vardır (137)

Nanotaşıyıcılarda Kullanılan Polimerler

Kullanılan ilacın etkili olabilmesi için, istenen konsantrasyonda istenen hedef bölgeye ulaşması ve istenilen sürede o bölgede kalması gerekmektedir. Fakat bu konu ile ilgili olarak etkin maddenin kimyasal özelliklerine bağlı parçalanması, hücrelerle etkileşmesi ya da dokuya penetrasyonunun zor olması gibi bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı daha yüksek bir etki sağlayabilmek amacıyla yeni formülasyon stratejileri araştırılmakta ve nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için çalışılmaktadır. Bu sistemler ilaç ve biyomolekülleri taşımak amacıyla kullanılan nanometrik boyutlarda sistemlerdir (139).

Çoğu nanotaşıyıcının hazırlanmasında farklı polimerler kullanılmaktadır (140,141). Polimerik nanotaşıyıcılar olarak da adlandırılan bu sistemler ilaç, protein ve DNA'nın hedef organ ve hücrelere taşınmasında büyük üstünlük sağlarlar. Nanometrik boyutları sayesinde hücre zarlarından etkin bir şekilde penetre olurlar ve kan dolaşımında daha kararlı halde kalırlar (142)

Bu sistemlerde, ilaç polimerik sistemin içinde çözündürülür, hapsedilir ya da polimerik yüzeye bağlanırlar. Hazırlama yöntemine bağlı olarak nanoküreler ya da nanokapsüller elde edilmektedir. Polimerik nanoküreler matriks sistemler olup ilaç matriksin içinde dağılmış haldedirler. Nanokapsüller ise veziküler sistemlerdir ve ilaç polimerik zar ile çevrili bir boşluk içinde hapsedilmişlerdir. Polimer kullanılarak nanosistem hazırlanmasındaki iki ana yaklaşım vardır; ilk yaklaşımda, polimerizasyon reaksiyonu ile oluşturulurlar, ikinci yaklaşıma göre ise, doğrudan doğal bir makromolekül ya da önceden sentezlenmiş bir polimer kullanılarak hazırlanırlar (143). Bu amaçla sentetik ya da doğal polimerler kullanılmaktadır. Makromolekül olarak da adlandırılan polimerler, çok sayıda tekrarlanan birimlerden oluşan çok büyük moleküller olup, monomer denilen küçük molekülleri bir araya getiren polimerizasyon işlemi ile oluşturulur. Polimerlerin fizikokimyasal özellikleri, polimer yapısına, zincir uzunluğuna, monomerlerin polimer içerisindeki dizilişlerine bağlıdır. Polimerler homopolimerler ve heteromer olmak üzere iki farklı yapısal özellik gösterebilirler (142).

Polimerler yapılarına göre tek, iki ya da üç boyutlu olabilirler. En çok karşılaşılan polimerler tek boyutlulardır. Uzun zincirler düzenli şekilde yan yana bir araya gelerek kristal yapıya sahip polimerleri, düzensiz şekilde birbiri içine dolaşarak amorf yapıda polimerleri oluştururlar. Bu amorf polimerler iki farklı mekanik davranış gösterirler. Polimetilmetakrilet ve polistiren gibi bazı polimerler oda sıcaklığında sert, esnemez, camsı plastik özelliktedir, diğer taraftan polietilakrilat gibi polimer yapıları ise yumuşak, esnek ve lastiksi özelliktedir. Belirli bir sıcaklıkta ya da sıcaklık aralığında camsı ya da lastiksi halde olur. Bu sıcaklığa camsı geçiş sıcaklığı denir. Bu sıcaklık polimerin amorf fazını karakterize eder. Tüm polimerler bir dereceye kadar amorf özellik gösterir ve tümü camsı geçiş sıcaklığına sahiptir. Camsı geçiş sıcaklığı ilacın ve polimerin fiziksel özelliklerini değiştirmek için kullanılan büyük öneme sahip bir özelliktir. Kullanılan polimerlerin sıcaklığa dayanan başka bir özelliği de uygulanan kuvvete karşı vermiş oldukları yanıttır. Bu yanıtta polimerlerin iki tip davranışı önem arzeder. Birincisi uygulanan kuvvet kalktığı zaman orijinal şekline dönmeleri (elastik

polimerler), diğeri ise, eski şekline dönmüyor olmalarıdır. Bu polimerler plastik polimerler olarak adlandırılırlar. Çoğu polimer hem elastik hem de plastik davranışa sahiptir (142).

Polimerlerin sınıflandırılmasında kullanılan farklı kriterler söz konusudur. Polimerler elde edildikleri kaynağa göre (doğal ve sentetik), sudaki çözünürlüklerine göre (hidrofilik ve hidrofobik) veya parçalanır olup olmadıklarına göre (biyoparçalanan ya da biyoparçalanmayan) sınıflandırılırlar. Polimerler yüklerine göre de anyonik, katyonik ve noniyonik olarak da üç gruba ayrılmaktadır. Polemerlerin tüm farklı özellikleri hazırlanmış olan nanotaşıyıcının salım, biyoparçalanma, hücreden alım gibi özelliklerini etkilemektedir (Tablo 1), (142).

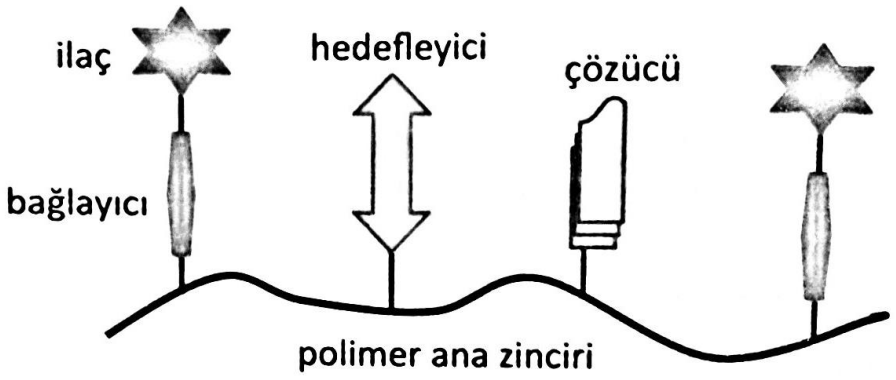
Tablo 1. Polimerlerin sınıflandırılması

SINIFLANDIRMA			**POLİMERLER**
Doğal polimeler	**Protein-bazlı polimerler**		Kolajen, albümin, jelatin
	Polisakkaritler		Agaroz, kitozan, hiyalüronik asit, aljinat, karagen, dekstron, siklodekstrinler
Sentetik polimerler	**Biyoparçalanır olanlar**	Poliesterler	Polilaktik asit, poliglikolik asit, polihidroksi bütirat, poliƐ-kaprolakton, poliβ-malik asit, polidioksanonlar
		Polianhidritler	Polisebazik asit, poliadipik asit, politerftalik asit ve çeşitli kopolimerler
		Poliamitler	Poliimino karbonatlar, poliamino asitler
		Fosfor-bazlı polimerler	Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosazenler
		Diğer polimerler	Polisiyano akrilatlar, poliüretanlar, poliorto esterler, polidihidropiranlar, poliasetaller
	Biyoparçalanır olmayanlar	Selüloz türevleri	Karboksimetil selüloz, etil selüloz selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, hidroksipropil meti selüloz
		Silikonlar	Polidimetilsiloksan, kolloidal silika
		Akrilik polimerler	Polimetakrilatlar, polimetil metakrilat, poli hidroeti-metakrilat
		Diğerleri	Polivinil pirolidon, etil vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler

Taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında doğal ya da sentetik polimerler kullanılır. Doğal polimerlerin çoğunluğu bitkisel veya hayvansal olmaları ve protein ya da polisakkarit yapılarında olup hidrofilik özelliktedir. Suda çözünmeyen ağ oluşturmak için çapraz bağlama yapılır, çapraz bağlamanın derecesi ilacın salım özelliklerini değiştirmektedir. Biyogeçimli ve biyoparçalanır özelliklere sahiptirler, büyük bir kısmı in vivo koşullarda enzimatik parçalanmaya uğrarlar. Doğal polimerlerin molekül ağırlıkları ve bileşimleri farklı olabilir. Sentetik polimerlere göre saflıkları daha düşük olabilmektedir ve fizikokimyasal özellikleri de daha zor kontrol edilebilmektedir. Bazı durumlarda immünojenik aktivite de gösterebilmektedirler. Sentetik polimerler ise tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir fizikokimyasal özelliklere ve parçalanma hızına sahiptir. Genellikle uzun zincirli dallar, zincir başına düşen birbiri içine girme sayısını arttırarak polimerin gücünü, sertliğini ve camsı geçiş sıcaklığını arttırır (142).

Polimer-İlaç Konjugatları

Polimer-ilaç konjügatlarının sentezlenmesi, ilaçların vücut içerisinde amaçlanan bölgeye hedefleme yapılması ve o bölgede etkinlik göstermesi amacıyla kullanılan bir metottur. Polimer-ilaç konjügatları, biyoaktif ajan ve polimerin kovalent ya da elektrostatik etkileşimler ile bağlanması sonucu elde edilen ve ilacın, hücre içinde istenilen bölümde ve istenilen süre için aktif olmasını sağlayan nanoboyutta hibrit yapılardır (144). Makromolekül yapısında olan polimerlerin taşıyıcı olarak kullanımı 1950'lerde başlamışır. Bu konuyla ilgili ortaya çıkan ilk çalışma, Jatzkewitz tarafından yapılmış ve ilaç suda çözünebilen polivinilpirolidon polimerine bağlanmıştır (145). 1975'te, Helmut Ringsdorf tarafından kovalent bağlı polimer-ilaç modelinin tanımı yapılmıştır. Bu modele göre polimer-ilaç konjugatında, şekilde gösterildiği gibi, polimer ana zinciri, ilaç, bağlayıcı, hedefleyici ve çözücü gruplar olmak üzere beş ana öğe bulunur (Şekil 3), (146).



Şekil 3. Polimer-ilaç konjugatı (144)

Bu modelin ortaya atılması, araştırmacıları yeni konjugatlar oluşturma yönüne itmiştir. 1994 yılında, faz I ve faz II denemelerine giren ilk polimerik kanser ilacı, Poli (N-2-hidroksipropil metakrilamit) ve DOX konjugatı olarak yapılmıştır (147).

Polimer-ilaç konjugatlarının serbest ilaç moleküllerine kıyasla üstünlükleri söz konusudur. Bu üstünlükler şu şekilde sıralanabilir;

- Terapotik etkilerinin yüksek olması,
- Yan etkilerinin çok az olması,
- Polimer varlığı ile ilacın toksik etkisinin engellenmesi,
- İlaç uygulanmasının kolaylığı,
- Hasta tarafından kabulünün kolaylığı,
- Geçirgenlik-tutulma etkisinin yüksek olması,
- PEG ile kaplanmasının ve yüzey modifikasyonunun mümkün olması,
- Ligant içerenler reseptör-bağımlı hedeflemeyi desteklemeleri,
- İlacın moleküle makromoleküle bağlanması, ilacın vücuttan atılımını geciktireceği için onun dolaşım sisteminde daha uzun süre kalmasının ve bunun neticesinde de ilacın terapotik etkisinin daha uzun olmasının sağlanması (148).

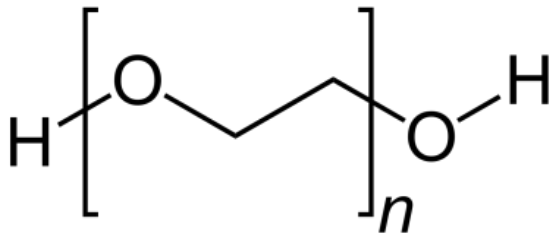
Bir kanser ilacı olan Paklitaksel (TXL)'in kanser ilacının serbest uygulandığı zamanlarda tümör büyümesinin önüne geçemediği, aynı dozda uygulanan poliglutamik asit-TXL konjugatının ise tümörü ufalttığı ve daha da ötesi ortadan kaybolmasına sebep olduğu raporlanmıştır (149).

Polietilen Glikol

Polietilen glikol lineer bir polieter molekülüdür. Yapısındaki hidroksil grupları sayesinde de su ile kolayca etkileşime girebilir (Şekil 4). PEG molekülünün ilaçlarla sorunsuz bir şekilde konjugasyonu, söz konusu ilacın kimyasal yapısına, molekül ağırlığına, sterik engellemesine reaktif özelliğine ve tabiki PEG'in sahip olduğu bir takım özelliklere bağlıdır. PEG molekülü ilaç konjugasyonunda en başta kullanılan polimerdir ve özellikle kanser ilaçlarının PEG ile bağlanarak uygulanması üzerine son yıllarda çok yoğun araştırmalar yürütülmektedir. PEG farklı molekül ağırlıklarında ticari olarak bulunabilen biyouyumlu bir polimerdir. Biyoaktif özellik gösteren proteinlerle de konjuge edilmiş yapıları yaygın olarak bulunmaktadır. Proteinler ile bağlandığında onların antijen olarak algılınmalarını maskeler, suda ve birçok organik çözücüde çözünür. PEG'in vücuttan atılma

süresi zincir uzunluğu ile doğru orantılıdır, zincir uzunluğu arttıkça vücutta kalma süresi de artış gösterir. Bu özellikleri sayesinde hem ilaçların yan etkilerini azaltır hem de onların vücutta daha uzun kalarak spesifik tedavi oluşturabilmelerini sağlamaktadır. Bu sayede yüksek molekül ağırlıklı ilaç konjugatları geliştirilmiştir (150).

Polietilen glikol toksik ve antijenik olmayan, immünojenik özellik göstermeyen, suda yüksek çözünürlüğe sahip, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmış bir polimerdir. PEG-ilaç konjugatları, insan vücudunda uzatılmış dayanıklılıkları, metabolik enzimler tarafından bozulmaya uğratılmalarının çok düşük olması, proteinlerin immünojenik etkilerine karşı dayanıklılık gibi birçok avantaja sahiptir. Bu sebeple Pegilasyon ilaç sistemlerinde önemli rol oynamaktadır (151).

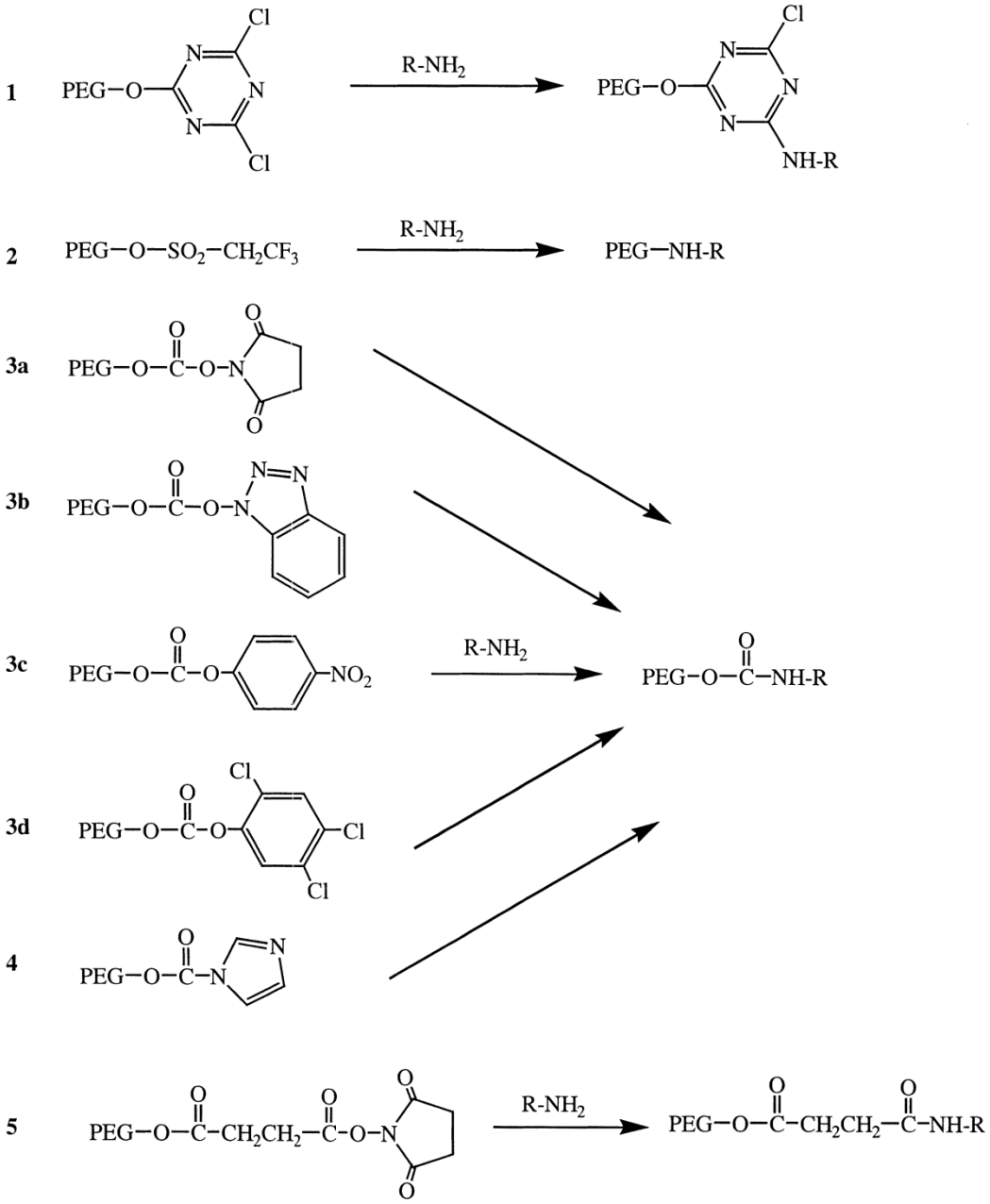


Şekil 4. Polietilenglikol molekülü yapısı (150)

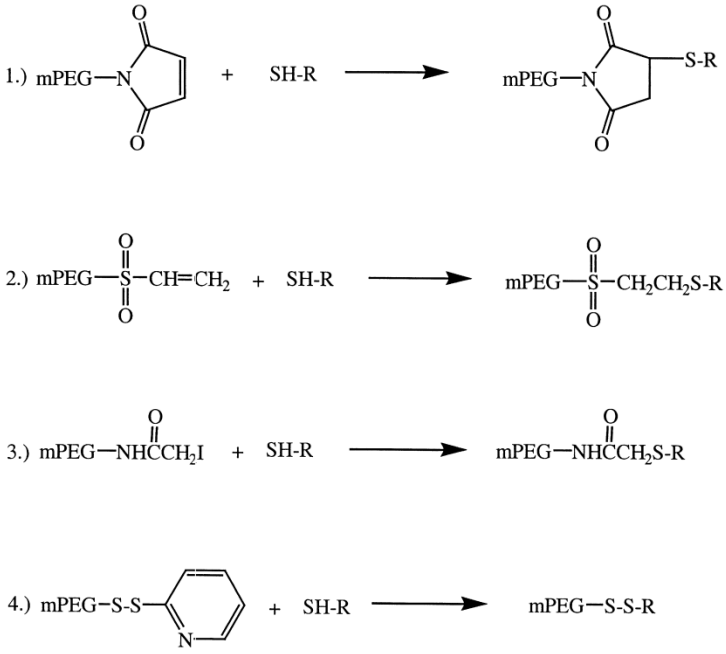
Pegilasyon

Pegilasyon, bir molekülün polietilenglikol polimeriyle bağlanmasıdır. Pegilasyon ilk olarak 1970'lerde Davies ve Abuchowsky tarafından albumin ve CAT modifikasyonu ile gündeme gelmiştir (152,153). İlk kez 1977 yılında serum albumini ve CAT'a PEG'in kovalent olarak bağlanmasının antikorlara karşı immunoreaktifliği azalttığı gösterilmiştir (154). Bu gibi birçok çalışma göstermiştir ki ilaç dağıtımında, hedeflenmesinde polimerik sistemlerin kullanımı ilaçların olumsuz birçok özelliğini baskılamak açısından çok önemli bir yer tutmaktadır. Çoğunlukla tümör tedavisi gibi durumlarda taşıyıcı olarak kullanılan sistemlerde vinil polimerleri, polisakkaritler, aminoasitler, proteinler ve polietilenglikol kullanılmaktadır (155). Pegilasyonun yapılabilmesi için fosforilasyon, metilasyon, açilasyon, glikozilasyon ve sülfasyon gibi bir takım tepkimelerden faydalanılır. Pegilasyon için ilk hedef bölge amino gruplarıdır (156).

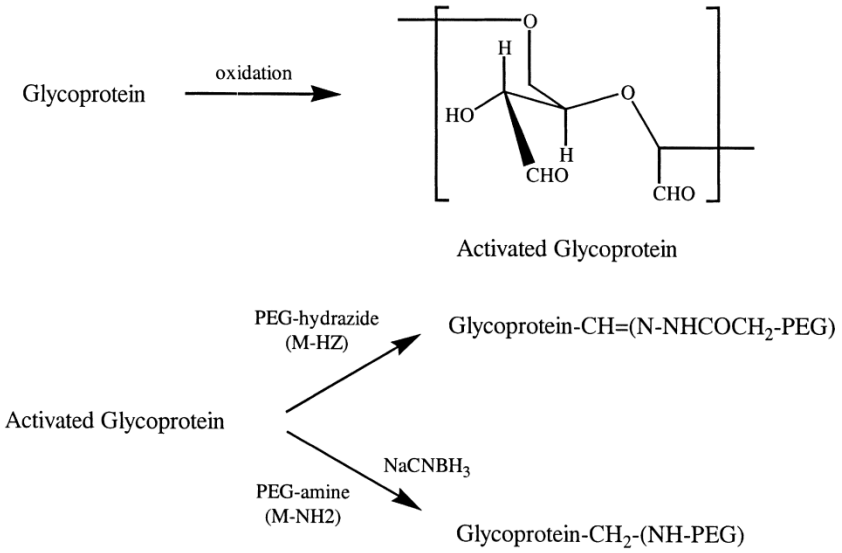
Ek olarak, yapılan çalışmalarda, dallanmış yapıdaki PEG'in lineer yapıdakilere oranla daha kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Şekil 5'de birinci jenerasyon amino gruplarının pegilasyonu görülmektedir. Farklı pegilasyon çeşitleri bulunmaktadır (Şekil 5,6,7), (157).



Şekil 5. Birinci jenerasyon amino gruplarının pegilasyonu



Şekil 6. Thiol reaktifi ile Pegilasyon, 1. PEG maleimid, 2. PEG vinil sülfon, 3. PEG iyodo asetamid, 4. PEG ortopiridil disülfit (157)



Şekil 7. PEG'in glikoproteinlerin okside karbonhidrat kısmına eklenmesi (157)

Polietilen glikol birçok tedavi edici proteinin stabilitesini ve plazma yarı ömrünü arttırmak, in vivo immünojenitesini düşürmek için sıklıkla kullanılmaktadır (155). Pegilasyonun konjugatlarının, antikanser ilaçların terapotik indeksini arttırdığı kanıtlanmış bir gerçektir (158,159). Son yapılan çalışmalarda suda çözünen poliasetal taşıyan aminopedant grupları (APEG) ilaç bağlayıcısı olarak PEG, divinileter ve serinül'ün terpolimerizasyonu ile sentezlenmiştir (160). Poliasetil, asidik pH'da hızlıca hidroliz olarak pH'a bağlı bozulmayı

açığa çıkarır (154) ve bu durum hepatotropik etki yaratmamaktadır Bu sebeple bu maddelerin, antikanser ilaçların tümöre hedeflenmesinde geliştirilebileceği düşünülmektedir (155). Polietilenoksit (PEO), polioksietilen ve polioksiran etilen oksit'in polimerizasyonuyla aynı lineer molekül yapısından meydana gelir PEG genellikle molekül ağırlığı 20000'den daha düşük olan polieterleri meydana getirir (161). Tablo 2'de bazı PEG türevleri görülmektedir. PEG, 500-20000 arası molekül ağırlığına sahiptir ve immünojenik değildir. Sulu çözeltilerde ve pek çok organik çözeltide çözünebilmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden onay almış bir polimer olan PEG toksik değildir, aktif proteinlere veya hücrelere hasar vermez (154). PEG vücuttan bütün olarak böbrekler (<30 kDa olan PEG' ler) veya feçes (>20 kDa olan PEG'ler) yoluyla atılmaktadır (162).

Polietilen glikol, 1'den 0.1 mmol/g'a kadar yükleme kapasitesine sahip olup, oda sıcaklığında düşük molekül ağırlığına sahiptir ve sıvı özelliği gösterir. Yüksek molekül ağırlığına sahip PEG molekülleri düşük yükleme kapasitesine sahiptir. Polimerizasyonuna bağlı olarak terminalden hidrosil grupları veya özel fonksiyonel gruplarla bağlanabilir (161). PEG'in suda ve diğer polar içeriklerdeki çözünürlüğü, bu çözücülerle benzer moleküler yapıya sahip olması ve oksijenle birlikte güçlü hidrojen bağlantılarına katılabilmesinden kaynaklanır. PEG suda çözünebildiği için, fiziksel olarak absorbe edildiğinde biyosıvılar sayesinde uzaklaştırılabilir (163).

Tablo 2. Bazı PEG türevleri

PEG TÜREVLERİ	YAPISI VE İŞLEVLERİ
Süksinimidil PEG	Terminal karboksil grubu bulunan mPEG çok yönlü bir türevdir. Karboksil grubu polimerin aktif esterlerinin hazırlanması ve biyolojik önemi olan moleküllere doğrudan bağlanması amacıyla kullanılabilmektedir (154). PEG'in N-hidroksisüksinimidil (NHS) esteri, pH 7-9 arasında protein yapısındaki amino grupları ile doğrudan etkileşmektedir (164).
PEG-Aminoasit	PEG'in aminoasit türevleri hazırlanmıştır. mPEG-asit norlösin' in α-amino grubuna veya lizinin Ɛ-amino grubuna bağlanmıştır (164).
PEG-Süksinimidil karbonat	Araştırmacılar PEG aktivasyonu amacıyla mPEG'in hidroksil grubunu $COCl_2$ (fosgen) ile reaksiyona sokup NHS ile aktive etmişlerdir (154). Elde edilen yapı olan PEG-süksinimidil karbonat pH 7-10 arasında proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek dayanıklı üretan bağı meydana getirmektedir (164).
PEG-Triazin	mPEG yapısındaki primer alkol siyanürik klorür ile reaksiyona girerek sırasıyla bir veya iki triazin grubu ile yer değiştirmekte ve aktive edilmiş PEG1 veya PEG2'yi oluşturmaktadır. Aktive edilmiş PEG1 veya PEG2, proteinlerin amino grupları ile pH 8-9 ve 9.5-10 arasında reaksiyona girmektedir. İki PEG zinciri protein yapısındaki bir amino grubuna triazin zinciri ile bağlanmakta ve böylece PEG1 ile PEG2'den daha etkili bir protein modifikasyonu sağlanmaktadır (154). Bu tip modifiye edici türevler "zincir şekilli PEG'ler" olarak isimlendirilmektedir (164).
Fırça şekilli PEG'ler	PEG ve maleik anhidrit kopolimeridir ve aktive edilmiş PM olarak kısaltılmaktadır. Fırça şeklinde olup çok değerlikli reaktif kısımları bulunmaktadır. Proteinlerin amino grupları PM yapısındaki maleik anhidriti ile birleşekrek amid bağı oluşturmaktadır (154). Fırça şekilli PEG'ler protein molekülünü örtmekte ve/veya protein yüzeyine anyonik gruplar (-COOH) yerleştirmektedir (164).

Pegilasyonun avantajları

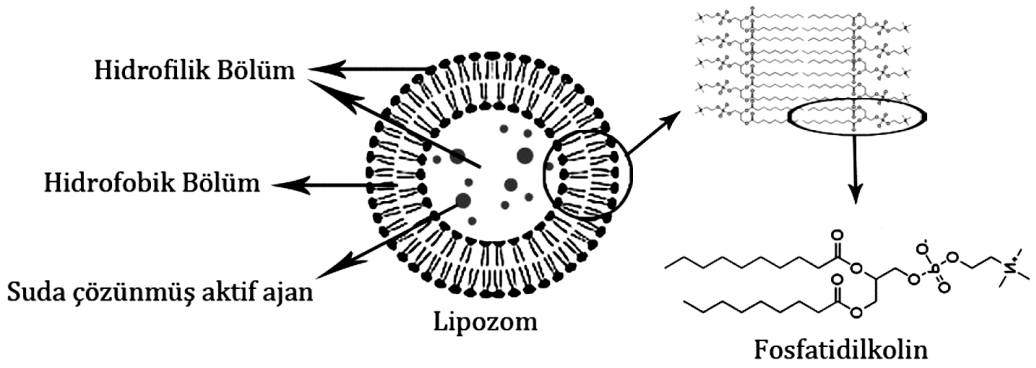
- PEG zincirleri, antijen-antikor etkileşimini engellenmektedir.
- PEG konjugasyonu polipeptidin görünür büyüklüğünü arttırır, bu durum renal filtrasyonu düşürerek biyodağılımı değiştirmektedir.
- Pegilasyon plazma yarı ömrünün artırarak, proteinlerin immünojenitesini düşürür.
- Vücutta uzun süreli kalabilmesi sayesinde dozlama sıklığını azaltır.
- Etkin maddenin çözünürlüğünü, organik çözücü ya da sulu çözeltilerdeki çözünürlüğünü arttırmaktadır.
- Etkin maddenin özelliklerini stabilize etmektedir.
- Belirli tümör dokularında birikim sağlamaktadır (154).

Pegilasyonun dezavantajları

- Her bir PEG alt ünitesi 2-3 su molekülünü bağlayabilir, peptit-ilaç konjugasyonu PEG ile birlikte eski haline göre 5-10 kat daha büyüktür, bu durum epitelyal permeabiliteyi ve dolayısıyla peptit yapıdaki ilacın aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır.
- PEG birçok sentetik polimer gibi kimyasal sentezle elde edilir, polidisperstir. Bu özellik sayesinde polimerler monomerlerin oluşturduğu yığınlar meydana getirirler. Bu durum, çeşitli biyolojik özellikteki moleküllerin, vücutta kalış sürelerinde ve immünojenitelerinde problem yaratmaktadır.
- PEG genellikle idrar ya da feçesle atılmakla beraber daha büyük molekülleri karaciğerde birikerek makromoleküler sendroma sebep olmaktadır (165).

Lipozomlar

Lipozomlar küresel şekilli, bir ya da birden fazla lipit çift tabakadan oluşan orta iç kısmında ve tabakalar arasında sulu faz bulunduran kapalı veziküllerdir (Şekil 8). Ana bileşenleri fosfolipitlerdir. Fosfolipitler, yapılarında hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplar içeren amfifilik yapılardır. Polar baş grubu hidrofilik, ona bağlı olan açil zinciri kuyruk kısmı ise hidrofobiktir. Lipozomların hazırlanmaları genellikle kimyasal stabilite açısından doymuş fosfolipitler ile gerçekleştirilmektedir. Lipozomların yapısında fosfolipitlere ek olarak membranı stabilize etmek için steroller kullanılmaktadır. Sterollerin en yaygın olarak kullanılanı kolesteroldür ve lipozomun kullanım amacına göre farklı oranlarda lipozomun membran bileşimine katılır (166).



Şekil 8. Lipozomun temsili yapısı (167)

Lipozomların hazırlanması

Fosfolipitler sulu çözeltide dağıtıldıkları zaman hidrofilik bölgeleri suya doğru yönelim gösterir, aynı zamanda hidrofobik bölg**e**leri sudan uzaklaşarak vezikül şeklini alır. Fosfolipit ve su molekülleri arasındaki hidrofilik/hidrofobik etkileşimler ile fosfolipit molekülleri arasındaki Van der waals etkileşimleri sayesinde çift tabakalı lipozom yapısı oluşur (130). Öncelikle boyutlarında hazırlanan lipozomlar daha sonra ekstrüzyon veya sonikasyon yöntemleri kullanılarak nanometre boyutlarına indirilirler. Bunların yanında mikro akışkanlaştırma yöntemi ve ısıtma yöntemi gibi yöntemler de nanolipozom hazırlanmasında kullanılan yöntemler arasındadır (168). μm boyutundaki lipozomların hazırlanmasında kullanılan yöntemler de ektstrüzyon yöntemi, film, ters faz buharlaştırma (REV), deterjan-diyaliz, emülsiyon, kurutma-yeniden su ilave etme (DRV), dondurma-çözme sonikasyon (FTS), etanol/eter enjeksiyon ve son yıllarda organik çözelti kullanıma gerek olmayan yoğun gaz ve süperkritik çözelti teknikleri gibi yöntemler sayılabilir (166,169-174). Ektstrüzyon yöntemi, nanolipozom hazırlamak için en güvenli ve en sık kullanılan yöntemdir. Lipozom çözeltisinin yüksek basınç altında belli por açıklığına sahip filtrelerden geçirilmesi işlemidir. Bu amaçla genellikle polikarbonat membran filtreler kullanılmaktadır. Ulaşılmak istenen partikül boyutuna göre 0.2 veya 0.1 μm por açıklığına sahip filtreler kullanılmaktadır. Lipozomlar esnek yapılar olduğu ve basınç altında şekil değiştirebildiklerinden filtrenin por açıklığından daha büyük olan veziküller de filtreden geçebilirler, bu nedenle tek düze bir dağılım elde etmek için son filtreden tekrarlayan şekilde en az 5-10 kez geçirilmesi önerilmektedir (175).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER VE CİHAZLAR

Tablo 3 ve 4'de çalışmada kullanılan kimyasallar ve cihazlar görülmektedir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitlerin marka ve katalog numaraları

Kullanılan Kimyasal Maddenin/Kitin Adı	Kullanılan Kimyasal Maddenin/Kitin Markası ve Katalog Numarası
Diyaliz Membran	D9777 Sigma
Sodyum Sülfat	Merck 106649
Sülfirik Asit	Merck K33449513
L-alfa-fosfatidilkolin(hidrojenlenmiş, HSPC)	Sigma P-4139
Kolesterol(CHOL)	Sigma C-8667
1,2-distearoil-sn-glisero-3-trimetilamonyumpropan (DSTAP)	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL,USA).
Doksorubisinhidroklorid (DOX)	Sigma D1515
polietilenglikol metileter (mPEG2000)	Sigma202509
Amonyum Sülfat	Pancreac 141140
80 nm, 100 nm ve 200 nm por çapındaki polikarbonat filtreler	WHATMAN
Dibazik sodyum fosfat	Merck106586
Ketamin hidroklorür	Ketalar, Alfamine %10'luk
Formaldehit	Sigma F1635
Parafin 42-44	Merck 107150
Parafin 56-58	Merck 107337
Ksilazin	Rompun- %2'lik

Tablo 3 (devamı). Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitlerin marka ve katalog numaraları

Kullanılan Kimyasal Maddenin/Kitin Adı	Kullanılan Kimyasal Maddenin/Kitin Markası ve Katalog Numarası
Absolü alkol	Merck 100986
Harisen Hematoksilen	Sigma HHS80
Eozin	Merck115935
Entellan	Merck107961
Polilizin kaplı lam	Menzel165014
Disposable SEC 35 Low Profil Mikrotom Bıçağı	Micron-152200
Lamel	Sigma 9802
Sodyum Sitrat	Sigma S1804
Hidrojen Peroksit	Merck 107298
Keçi serumu	Santa Cruz Biotechnology, Inc sc-2043
PBS	Thermo Scientific/LabVision AP-9009-10
TRİTON	Thermo Scientific 110331A Ultravision, Detection System-Large Volume Antipolivalent HRP (RTU)
Ultra V Blok A	
Ultra V Blok B	
Primer antikor	NOVUS TOP2A C199673 NOVUS Vimentin NBP1-31327
Seconder antikor	Abcam ab7481
Biyotinlenmiş Koyun Antipolivalent (SECI)	
PAP pen	Patolab- PEN01
UltraVision Polivalent (Tavşan-fare) HRP-DAB Kit	Thermo Scientific/LabVision TP-015-HD
Streptavidin peroksidaz	Lab Vision TS-125- HR
Streptavidin Alkalin Fosfataz	Lab Vision TPS-125-AP
DAB (3,3- diaminobenzidin tetrahidroklorid	Sigma D3939-1SET
Kapatma medyumu	BIOSTAIN ready reagents DPX MOUNTING MEDIUM RSP291B
RNA izolasyon Kiti	Thermo Fisher Scientific izolasyon kiti 12183018A
Nükleaz içermeyen su	Sigma Moleculer Biology Reagent W4502
cDNA sentez kiti	High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kiti Cat No: 4368814
Green Master Mix	Power SYBR ThermoFisher 4368706
Tiyobarbütirik Asit	Merck108180
Sodyum Dihidrojen Fosfat	Merck106342
Sodyum Hidroksit	Merck106482
Hidroklorik Asit	Merck107961
Aseton	Merck100014

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemelerin adı ve markası

Kullanılan Cihazın/Malzemenin Adı	Kullanılan Cihazın/Malzemenin Markası
Selüloz Diyaliz Tüpü	MWCO 100000, Spectrum Laboratories, Inc., CA, USA
Ultraviyole/Visible Spektrofotometre	Shimadzu 1240
Mikroskop	Olympus CX21
Kamera Sistemi	Kameram 318 CU
Nanodrop cihazı	NaNoQ OPTIZEN
qRT-PCR sistemi	Quant Studio 6 Flex
Derin Dondurucu -80°C	Sanyo Ultra Low
Mikrotom	Mikrocom HM 355-S
Masa Üstü Santrifüj, 5000 Rpm	Hettich EBA-21
Light Scattering Cihazı	Malvern Zetasizer Nano
Etüv (10-60 ^{0}C)	Heraeus
Buhar Banyo Cihazı	IHC
Buzdolabı (+4 ºc)	AEG
Hassas Terazi	Sartorius
Vortex	Nüve NM110
Ph Metre	Hanna Hı-221
Isıtma Tablası	IDL GMBH&CO.KG
Çekerocak	Esco Frontier Due Laboratory Fume Hood
İmmunohistokimyasal İnkübasyon Çemberi	Electron Microscopy Sciences 97060
Vakum Pompası	Vacuubrand MZ 2C

DİYALİZ MEMBRANIN HAZIRLANMASI

DOX-Lipozom-PEG hazırlanması aşamasında bağlanmamış PEG molekülünün ortamdan uzaklaştırılması amacıyla diyaliz membran kullanıldı. Diyaliz membranın hazır hale gelebilmesi için aşağıdaki protokol uygulandı.

- Diyaliz membranlar 4 s boyunca akan suyla yıkandı.
- % 0.3 lük sodyum sulfit solüsyonu ve 80℃'ye kadar ısıtıldı
- Diyaliz membranı sülfür komponentlerinin uzaklaştırılması için 1 dk bu çözeltide yıkandı.
- Bunu takiben membran % 0.2'lik H_2SO_4 solüsyonu içerisinde bekletildi ve
- 60˚C'deki distile suyla 2 dk boyunca yıkandı.

LİPOZOMUN HAZIRLANMASI

Çalışmamızda 39.55 mg HSPC, 29.55 mg CHOL, 14.15 mg DSTAP 5 mL kloroformda reaksiyon balonu içerisinde çözündürüldü. Evaporatörde ince bir film tabakası

kalana kadar kurutuldu. 250 mM 50 mL $(NH_4)_2SO_4$ solüsyonu hazırlamak için 1,65175 mg amonyum sülfat 50 mL distile suda çözüldü ve balonda bulunan film tabakasının üzerine boşaltıldı. Düşük vakum altında 30 mL oluncaya kadar 10'ar mL şeklinde 0,2 mikrometre por ölçüsündeki filtreden 2 defa, 0,1 µm ölçüsündeki filtreden de 5 kez geçirildi. Daha önceden hazırlamış olduğumuz diyaliz membranının içerisine döküldü ve 48 s boyunca diyaliz yapıldı. Diyaliz suyu 6 s'de bir değiştirildi. Bu şekilde yüksüz $(NH_4)_2SO_4$ karışımdan uzaklaştırıldı. Hazırlanan lipozomlar 4ºC buzdolabında saklandı (176).

DOKSORUBİSİNİN LİPOZOMA HAPSEDİLMESİ

Doksorubisin miktarı 5 mg/mL olacak şekilde hesaplandı (176). Bu orana göre daha önce hazırlanan 15 mL lipozom çözeltisine aynı hacimlerde karıştırılmak üzere 75 mg DOX 15 mL distile suda çözüldü, 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 15 mL lipozom ve 15 mL DOX çözeltisi aynı hacimlerde karıştırıldı. Bunu takiben hazırlamış olduğumuz karışımdaki yüksüz DOX'un uzaklaştırılması amacıyla daha önceden hazır hale getirmiş olduğumuz diyaliz membranda 48 s süre ile +4˚C'de diyaliz edildi.

DOKSORUBİSİN-LİPOZOM-PEG HAZIRLANMASI

Çalışmamızda 150 mg PEG tartıldı. Tartılan PEG 10 mL distile suda çözüldü. Bu çözeltinin içerisine NaOH damlatılarak pH'ı 10'a ayarlandı. Çözelti 30 dk bekletildi. Bu sayede –COOH'dan hidrojen koparıldı ve PEG, lipozomun katyonik ucuna kolay bağlanabilir hale getirildi. 10 mL'lik kısım aynı hacimdeki lipozom çözeltisi ile karıştırılarak 2 s inkübasyona bırakıldı. Bunun sonucunda PEG-lipozom-DOX çözeltisi, bağlanmamış PEG'in ortamdan uzaklaştırılması amacıyla MWCO 100000 diyaliz membrana yüklendi. Diyaliz membranda diyaliz suyu 4 s'de bir değiştirilerek 24 s boyunca bekletildi.

DOX-Lipozom-PEG çözeltisi diyaliz membrandan alındı. 12 mL lipozom için 75 mg DOX tartıldı ve 15 mL suda çözüldü bunu takiben 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 15 mL DOX çözeltisi ve 12 mL lipozom solüsyonu birbiri ile karıştırıldı. Karışım 60˚C'deki su banyosunda 2 s inkübasyona bırakıldı. Daha sonra DOX-lipozom çözeltisi diyaliz membrana aktarıldı ve 48 s boyunca diyaliz edildi. Çözeltinin pH değeri 7.4 bulundu ancak DOX'un 7.4 pH aralığında çözünürlüğü az olduğu için fosfat tamponu ile pH 7.2'ye ayarlandı.

Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Doksorubisinin yükleme etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 497 nm'de Shimadzu UV/VIS spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Yükleme verimliliği % 20 olarak belirlendi.

DENEY GRUPLARI VE DENEY HAYVANLARINA UYGULAMA

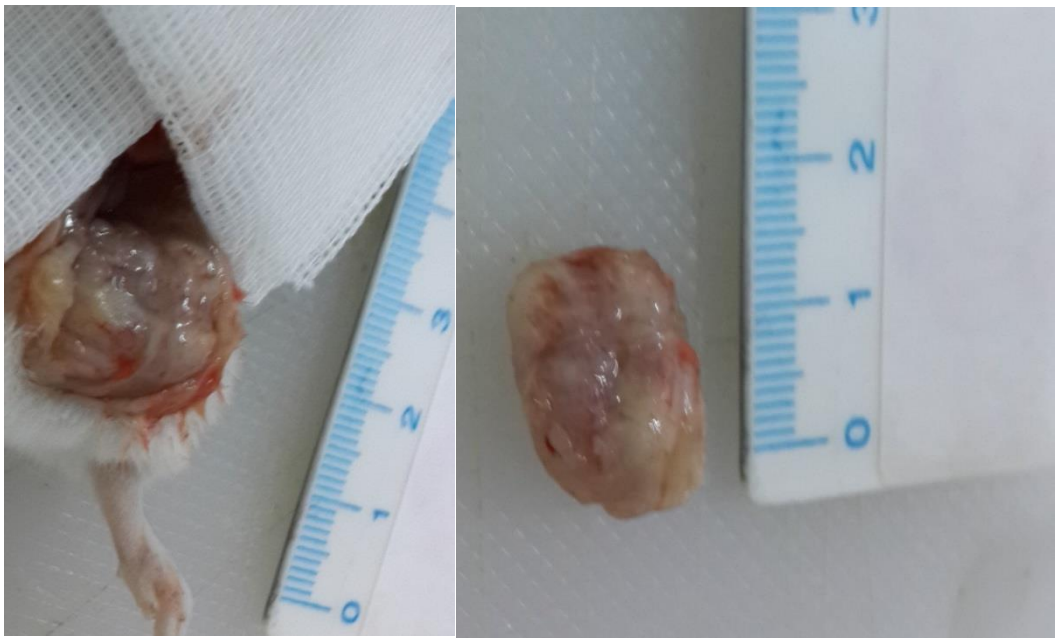
Bu proje kapsamında, T.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan TÜHADYEK-2015/18 protokol numarası ile etik kurul onayı alınmıştır. Çalışma kapsamında Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip 25-30 g ağırlığında 8-10 haftalık erkek Balb-c albino fare kullanılmıştır. Deney süresi boyunca, tüm deneklerimiz, optimum laboratuar koşulları (22±1 0C, 12 s aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi. Düzenli olarak kafes bakımları yapıldı. Denekler rastgele beş gruba ayrıldı ve her bir grupta 8 adet olacak şekilde Tablo 5'de belirtilen biçimde gruplandırıldı. Hayvanlar deney ortamına adaptasyonları için 24 s önce laboratuvar ortamına getirildi.

Tablo 5. Deney Gruplarının Sınıflandırılması

Deney Grubu Sınıflandırması	Deney Grubu Adı
Kontrol	Kontrol grubu
MT	Meme Tümör grubu
DT	Meme Tümör +DOX (20 mg/kg/i.p.) grubu
DLT	Meme Tümör+DOX (20 mg/kg/i.p.) Lipozom grubu
DLPT	Meme Tümör+DOX (20 mg/kg/i.p.) Lipozom+PEG grubu

Kontrol grubu dışındaki tüm deney gruplarında 200µL Ehrlich asit tümör hücresi subkutan olarak sol bacağa enjekte edilerek, Ehrlich solid meme tümör modeli oluşturuldu. Günlük olarak yapılan takiplerde meme tümör kitlesinin büyüme seyri tüm gruplarda gözlemlendi. Çalışma kapsamında deney gruplarına ip. olarak 1, 3, 5, 7, 9. Günlerde farklı formülasyonlardaki doksorubisin uygulandı (0.18 mg/mL). 10. Günün sonunda Kontrol ve MT grubu, im 5 mg/kg ksilazin, 50 mg/kg ketamin hidroklörür aneztesisi altında sakrifiye edildi. MT grubunda ki deneklerden çıkarılan meme tümör kitlesinin yaklaşık olarak 1.5-2 cm büyüklükte olduğu görüldü (Şekil 9). MT gruplarından tümör dokuları alındı ve dokular gen

ekspresyon çalışmaları için önce sıvı azota alınıp daha sonra -80 ºC derin dondurucuya kaldırıldı. Işık mikroskobik çalışmalar için dokular % 10 fomalinde fikse edildi. Diğer gruplara belirtilen dozlarda birer gün arayla 5 doz olacak şekilde ip. uygulama yapıldı. Vücut ağırlıklarına göre hesaplanarak 0.18 mg DOX olacak biçimde deneklere 0.36 mL enjeksiyon hacminde enjekte edildi. Deney süresinin sonunda bu gruplardaki denekler de sakrifiye edilerek dokuları alındı ve aynı işlemlere tabi tutuldu.



Şekil 9. Ehrlich asit tümörü

IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME

Çalışmamızda MT, DT, DLT, DLPT gruplarından alınan dokular %10 Formalinde 24 s süre ile fikse edildi. Fiksasyondan arındırma amacıyla tüm dokular bir gece akarsu altında yıkandı. Rutin takip işlemlerinden sonra 56-58 °C parafine gömülen dokulardan 5 µm kalınlığındaki kesitler alındı. Kesitlere rütin takip protokolü uygulandı. Dehidrasyon işleminden sonra Hematoksilen-Eozin ve Vimentin, TOP2A immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Boyama yöntemleri aşağıdaki gibidir.

Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

- Lam üzerine alınan kesitle deparafinizasyon işlemi için ksilol içerisinde 56-58° C'lik etüvde 24 s bekletildi.
- 24 s'nin sonunda dokular tekrar oda sıcaklığında 20 dk boyunca ksilolde bekletildi

- Hidrasyon işlemi için 15'er dk'lik dört alkol serisinden (sırasıyla % 96, % 90, % 80, %70) geçirildi.
- Bu işlemi takiben dokular distile su ile yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra dokular 5-10 dk hemotoksilen boyasında bekletildi.
- Boya içerisinde bekletilen dokular akarsu altında mor renge dönüşene kadar yıkandı.
- Daha sonra dokular 30 dk 1 s arasında eosin'de bekletildi.
- Süre bitiminde dehidratasyon için (10'ar dk sırasıyla % 70, % 80 bekletildi, sırasıyla % 90 ve 96'da 1-2 kez çalkalandı, 10'ar dk % 100 saf alkolde bekletildi, 10 dk 1:1 alkol/ksilolde bekletildi).
- Şeffaflaştırma işlemi için 15'er dk 2 kez ksilolde bekletildi.
- Şeffaflaştırma işleminden sonra dokular entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

- Polilizin kaplı lamlar üzerine alınan kesitlerden deparafinizasyon için dokular, 1 gece etüvde bekletildi.
- Deparafinizasyon için dokular, 10 dk 1., 5'er dk 2. ve 3. Ksilol banyosunda bekletildi.
- Hidrasyon işlemi için 5'er dk alkol serilerinden (sırasıyla % 95, %95, % 70, % 50) geçirildi.
- Hidrasyon işleminden sonra 5 dk saf suda bekletildi.
- Dokular 10 mM sitrat tamponu içerisinde (pH:6) ile 45 dk boyunca buhar banyosuna alındı.
- Dokular daha sonra 30 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
- % 3'lük H_2O_2 ile 15 dk inkübe edildi.
- İnkübe edilen dokular 5'er dk süreyle 2'şer defa distile su ile yıkandı.
- % 1'lik koyun serumu içeren % 0.4 tritonlu fosfat tamponunda (PBST) 2 kez 10'ar dk bekletildi.
- % 5'lik koyun serumu içeren % 0.4 tritonlu PBST'de 30 dk bekletildi.
- Ultra V blok A ve B'de 15'er dk bekletildi.
- PBST içerisinde hazırlanan ve % 1'lik hayvan serumu içeren primer antikor (1:200 oranında), dokulara uygulanıp 1-2 s süre ile oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra dokular, +4° C'de 1 gece inkübe edildi.
- Süre bitiminde, %1 koyun serumu içeren PBST tamponu ile 10'ar dk 2 kez yıkama işlemi yapıldı.

- Yıkama işlemi takiben, biyotinlenmiş koyun antipolivalent (SECI) içerisinde 10 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS ile 10 dk yıkama işlemi yapıldı.
- PBST'de 5 dk yıkama yapıldı.
- Streptavidin peroksidaz ile 1 s oda ısısında bekletildi (SECII).
- Bu işlemin ardında, PBS ile 10 dk yıkama yapıldı.
- DAP ile inkübasyona bırakıldı (5, 10, 15, 20 dk), mikroskopta boyanma takip edildi.
- 2'şer dk distile su ile yıkama işlemi yapıldı (2 kez).
- Hemotoksilen ile boyama yapıldı ve 30 sn bekletildikten sonra çeşme suyu ile yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkama işleminin ardından, %95'lik ve %100'lük alkolde 10'ar sn, ksilolde 2'şer kez 10'ar sn bekletildi.
- Kapatma medyumu ile kapatıldı.

Boyama işlemlerinden sonra kapatılan preparatlar fotomikroskop'ta incelenerek görüntülendi.

GEN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI

RNA İzolasyonu

Deneklerden elde dokulardan RNA izolasyonu, İnvitrogen by Thermo Fisher Scientific izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Bu yönteme göre yapılan izolasyon işleminde aşağıdaki takip sırası izlenmiştir.

- Örneklerin içlerine daha iyi homojenize olmaları amacıyla 1 mm çapındaki ZrSiO boncuklar konuldu, daha sonra sıvı azotta bekletilerek doku parçalayıcıdan geçirildi. Bunu takiben RNA'yı kolay izole edebilmek amacıyla örneklere protein denatürasyon işlemini hızlandıran % 1 merkapto etanol ve liziz tamponu ilave edildi.
- Bu işlemi takiben hücre homojenatlarına suyun uzaklaştırılması amacıyla örnekle aynı hacimde %70 etanol konuldu. Boncukların uzaklaştırılması amacıyla 21380 G'de santrifüjlendi.
- Santrifügatın 700 µL sıvı kısmı kitte bulunan kolonlu tüplere alındı. Bu tüplerdeki örnekler 12000 g'de 15 saniye santrifüjlendi ve bunu takiben tüplerin filtre kısımları toplama tüplerine aktarıldı.

- Örneklere 700’er µL yıkama tamponu 1 kondu ve 12000 g’de 15 saniye santrifüj yapıldı ve kolonlu tüplerin filtre kısımları yeni tüplere alındı.
- Üzerlerine 500’er µL yıkama tamponu 2 ilave edildi ve 12000 g’de 15 saniye santrifüj yapıldı.
- Daha sonra tekrar 500’er µL yıkama tamponu 2 eklenerek 2 dk santrifüj yapıldı ve bunu takiben tüpler kapaklı tüplere alındı.
- RNase içermeyen su bileşiminin 50’şer µL’lik kısmı tüplere eklendi. 50 µL eklenmesinin sebebi yapılan çalışmalarda optimum hacim olarak belirlenmesidir.
- Karışım 2 dk inkübasyondan sonra 2 dk, 30 sn 12000 g’de santrifüjlendi. Filtre kısımları atılarak alt kısımları ölçüm için alındı.

Elde edilen RNA örneklerinden 2 µL alınmış olup Nanodrop cihazı (NaNoQ OPTIZEN) üzerine pipetlenmiş ve 260-280 nm’de okunarak saflık ve absorbans değerleri belirlenmiştir. Ölçülen saflık değerleri 1.8-2.0 aralığında ölçülmüş olup bu örneklerden c-DNA sentezi yapılmıştır.

Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit (cDNA) SENTEZİ

cDNA sentezi, izole edilen RNA'lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kiti (Katalog No: 4368814) ile uygun protokol adımları yapılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA’lar, -20°C’de saklanmıştır.

PCR şartları Step 1: 25°C, 09:53 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez protokolü Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. cDNA sentez protokolü

Madde	Hacim
Total RNA	10
10 X RT tampon	2µL
25 X dNTP mix (100 mM)	0.8 µL
10 X RT Random Primer	2 µL
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 µL
Nukleaz free su	4.2 µL
Son hacim	20 µL

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Antioksidan kapasite GSH, SOD, CAT antioksidan enzimlerinin, Vimentin ve TOP2A'nın ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile belirlendi.

Gen ekspresyon çalışmalarında "RNA izolasyonu" bölümünde açıklandığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar kullanılmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada 384 kuyucuklu mikroplaka okuyabilen Quant Studio 6 Flex qRT-PCR sistemi kullanılmıştır. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları Tablo 7'de belirtilmiştir. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak GAPDH kullanılmıştır ve örnekler analiz edilmiştir. Genlerin ekspresyon düzeylerini tayin edebilmek için SYBR Green yöntemi kullanılmıştır. qRT-PCR karışımı; cDNA, SYBR Green ve ilgili genleri içermektedir. qRT-PCR reaksiyonu karışımının içeriği, 384 kuyucuklu plakanın her bir kuyusu için 6 µL SYBR Green Master Mix, 2 µL cDNA ve 2 µL RNaz free su ve 0,5 µL primer forward, 0,5 µL reverse'den ibarettir.

PCR programı: 1 döngü 2 dk 50ºC ve 10 dk 95ºC, bunu takiben, 40 döngü denaturasyon (95ºC 15 s) ve annelling ve uzatma (60ºC 'de 1 dk) ile çoğaltılmıştır.

Tablo 7. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları

Çalışılan genler	Primer sekans dizisi
SOD	F (5'-GTTCGGTGACAACACCAATG-3') R(5'-GGAGTCGGTGATGTTGACCT-3')
CAT	F(5'-TACGAGCAGGCCAAGAAGTT-3') R(5'-ACCTTGTACGGGCAGTTCAC-3')
GS	F (5'-TGGGACCAGCAAGTAAAACC-3') R(5'-TCGCGAATG TAGAACTCGTG-3')
VİM	F (5' GAUCCUCUGGCCGAGCUCTT 3') R (5' GAGCUCGGCCAGCAGGAUCTT 3')
TOP2A	F (5' FATTCCCAAACTCGATGATGC 3') R (5' CCCCATATTTGTCTC TCCCA 3')

BİOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Yapmış olduğumuz çalışmada 0,5 mL plazma örneği % 8.1'lik SDS, % 0,82'lik TBA ve asetat tamponu (3 M, pH: 3.5) içeren reaksiyon ortamına eklendi (177,178). Reaksiyonunun temeli, MDA'nın alkali pH'da TBA ile reaksiyona girmesi sonucu 532 nm de maksimum absorbans veren pembe renkli bileşiğin oluşmasına dayanmaktadır Reaksiyon sonucu 532 nm dalga boyunda spektrofotomertik olarak ölçüldü. MDA standart grafiği kullanılarak değerler μmol/L olarak hesaplanmıştır.

VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK ANALİZİ

Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde ▲▲Ct metodu ayrıca kalibrasyon eğrisi ve düzeltme faktörü olarak GAPDH gen ekspresyonu kullanılmıştır. Kontrol ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ($p<0.0001$) ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerin tamamında SPSS 20.0, XLSTAT ve PAUP demo version istatistik paket programları kullanılmıştır.

MDA düzeyinin istatistiksel analizleri için, SPSS 20.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart deviasyon (SD) olarak ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu "Tek Örneklem Kolmogorov Smirnov testi" ile yapıldı. Veriler normal dağılıma uygunluk göstermediği için gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki karşılaştırmalar için "Mann Whitney-U" testi ile yapıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi.

BULGULAR

Materyal metod kısmında belirtildiği biçimde hazırlanan formülasyonlar kontrol hariç tüm gruplara uygulandı. DT grubunda bazı deney hayvanlarında ilacın yan etkisine bağlı tüylerde azalma makroskobik olarak gözlenmiştir.

Lipozom, DOX-Lipozom, PEG-DOX-Lipozom çözeltilerinin zeta potansiyelleri, number değerlilikleri ve kararlılıkları lightscattering (Malvern Zetasizer Nano) cihazında Bezmialem Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde ölçüldü (Tablo 8).

Tablo 8. Lipozom, DOX-Lipozom, DOX-Lipozom-PEG çözeltilerinin number değerleri

Örnek	Number ortalama (nm)
Lipozom 1/2 seyrelti	52.31
DOX-Lipozom 1/2 seyrelti	173.16
PEG-DOX-Lipozom 1/2 seyrelti	194.26

Boş lipozomların number değerleri ortalama 52.31 nm boyutlarında ölçülmüştür. Lipozomlar DOX ile yüklendiklerinde bu değerler ortalama 173.16 nm olarak belirlenmiştir. DOX-Lipozom PEG ile bağlandığında ise ortalama 194.26 nm boyut kazanmışlardır. Gözlemlenen boyut büyüklüğünün artmasından da, DOX' un sağlıklı bir şekilde lipozoma yüklendiği ve PEG ile bağlandığı düşünülmüş ve örneklerin Zeta potansiyelleri ölçülmüştür (Tablo 9).

Tablo 9. Lipozom, DOX-Lipozom, PEG-DOX-Lipozom çözeltilerinin lightscattering cihazından çıkan zeta potansiyelleri

Örnek	Zeta potansiyeli (mV)
Lipozom	-15.16
DOX-Lipozom	-16.06
PEG-DOX-Lipozom	-17.53

IŞIK MİKROSKOBU BULGULARI

Hematoksilen-Eozin ile boyanmış rütin ışık mikroskobu preparatlarında yapılan incelemelerde meme tümör hücreleri her grupta gözlenmiş ve tümör modelinin oluştuğu görülmüştür.

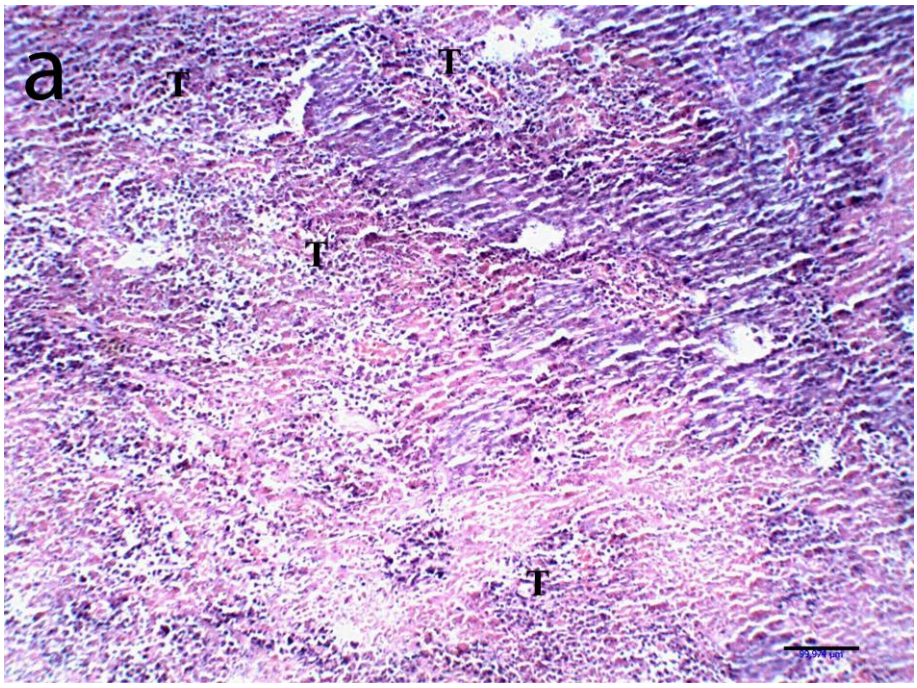
Hematoksilen Eosin Boyama Bulguları

Meme-Tümör grubundaki histopatolojik incelemede tümör hücre çekirdekleri yoğun bir şekilde gözlendi. Tümör hücre çekirdekleri net bir şekilde görüntülendi. Oval-yuvarlak şekilli çekirdeklerin olduğu, çekirdekçiklerin belirgin olmadığı, bazı hücrelerde şekilsiz, birden fazla ve düzensiz çekirdek yapılarının bulunduğu gözlendi. Tümör hücrelerinin bazı bölgelerde yoğun bazı bölgelerde ise seyrek olduğu, kümelenmiş biçimde konumlandığı görüntülendi. Hücre sınırları çok belirgin değildi. Hücre çekirdekleri arasında şekil ve büyüklük açısından farklılık olduğu gözlendi. Çok büyük hücre çekirdeklerine rastlandı (Şekil 10a,Şekil 10b).

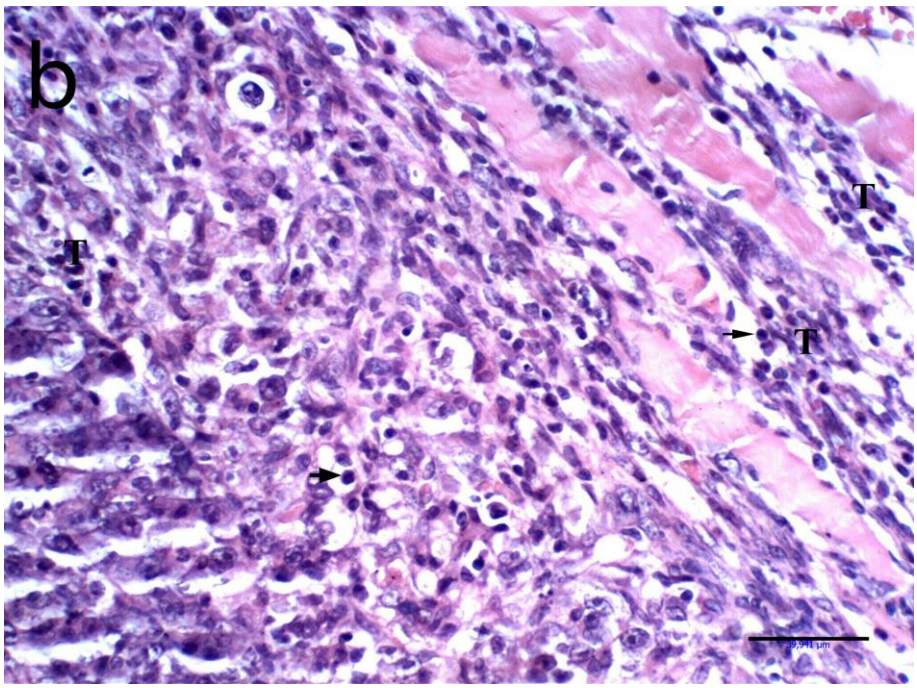
DOX-Tümör grubunda tümör hücre çekirdeklerinin yoğun olduğu gözlendi. Tümör hücre çekirdeklerinin boyut ve şekil acısından farklı olduğu, bazı hücre çekirdeklerinin aktif bir şekilde bölünmeye devam ettiği görüldü. Dokuda arter ve kılcal kan damarlarına rastlandı. Yer yer kanlanma görüntülendi (Şekil 11a, Şekil 11b).

DOX-Lipozom-Tümör grubunda düzensiz şekilli tümör hücre çekirdekleri gözlendi. Damarlanma bulgularına rastlandı. Tümör hücrelerinin düzensiz dağılım gösterdiği kümelendiği görüntülendi. Nekroza uğramış bölgeler ve kanlanmış bölgeler gözlendi. Yer yer küçük, yer yer büyük boyutta dev hücrelere rastlandı (Şekil 12a, Şekil 12b).

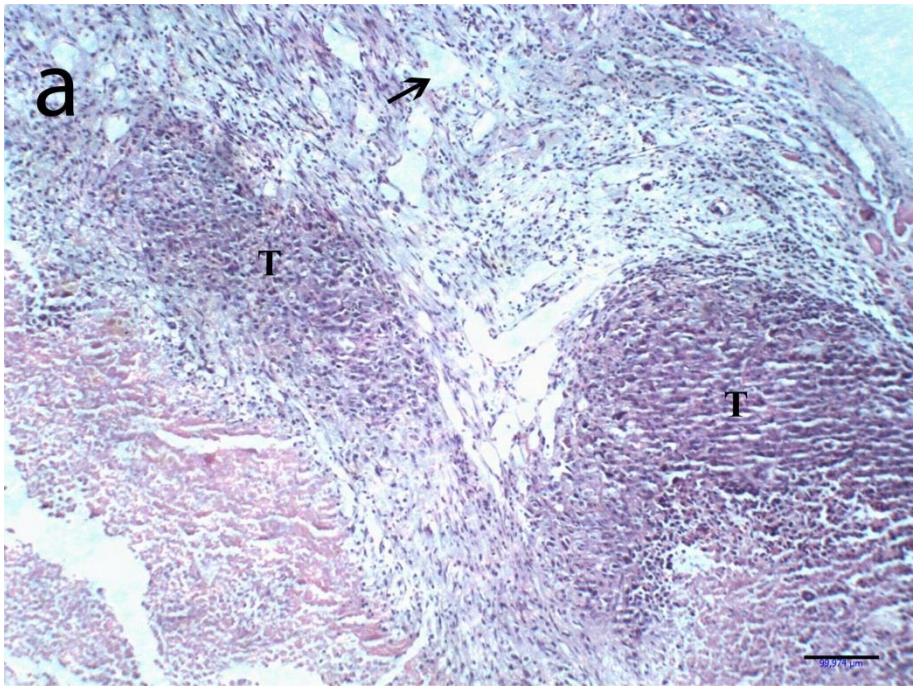
DOX-Lipozom-PEG-Tümör grubundaki histopatolojik inceleme sonucunda, yoğun damarlanma gözlendi. Geniş bir alanda nekrotik doku gözlendi. Dev hücre çekirdekleri izlendi. Kanlanmanın olduğu bölgelerin yoğun olduğu saptantı. Tümör hücre çekirdeklerinin MT, DT, DLT gruplarına kıyasla seyrekleştiği görüldü. Tümör hücre çekirdeklerinin boyutlarının ve şekillerinin düzensiz olduğu, bazı hücrelerde çekirdeklerin birden fazla olduğu gözlendi. Hücre sınırlarının belirgin olmadığı saptandı (Şekil 13a, Şekil 13b, Şekil 13c, Şekil 13d).



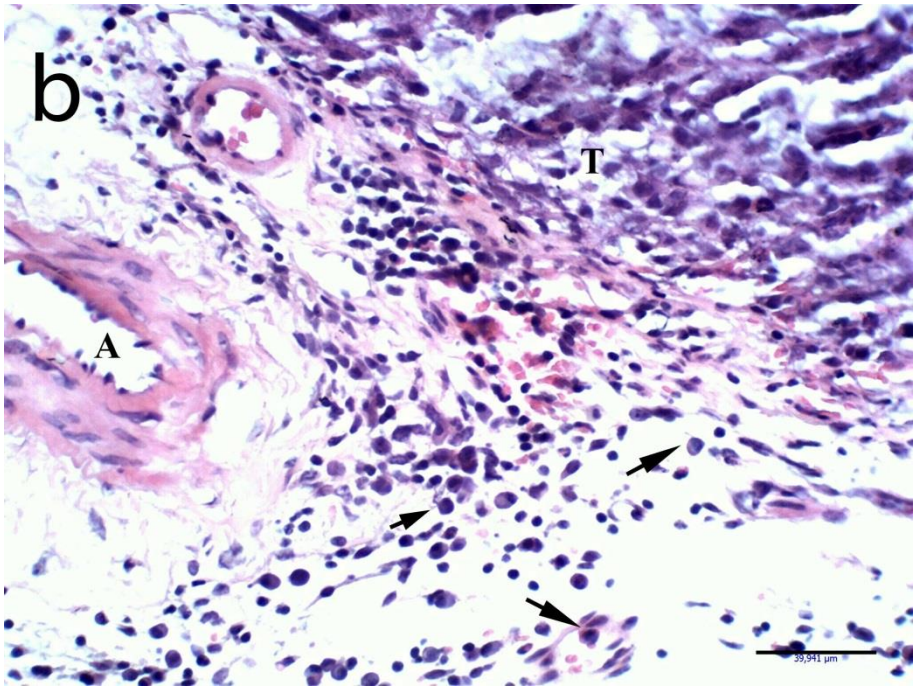
Şekil 10a. MT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama; T: Yoğun tümörlü bölge, bar: 99,974 µm (x10)



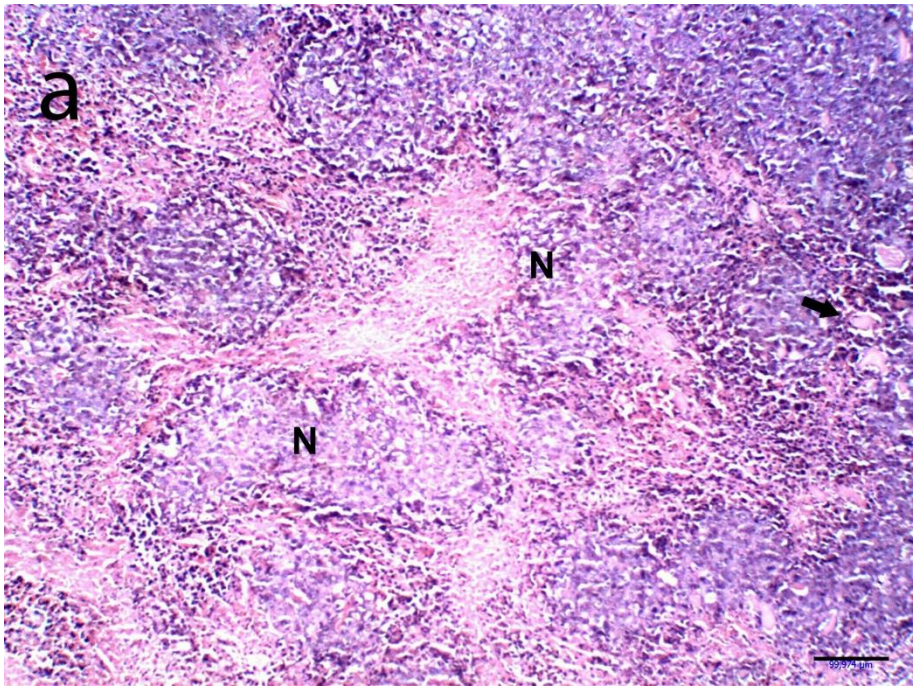
Şekil 10b. MT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama; ➡: Tümör hücresi, T: Yoğun tümörlü bölge, bar: 39.941 µm (x40)



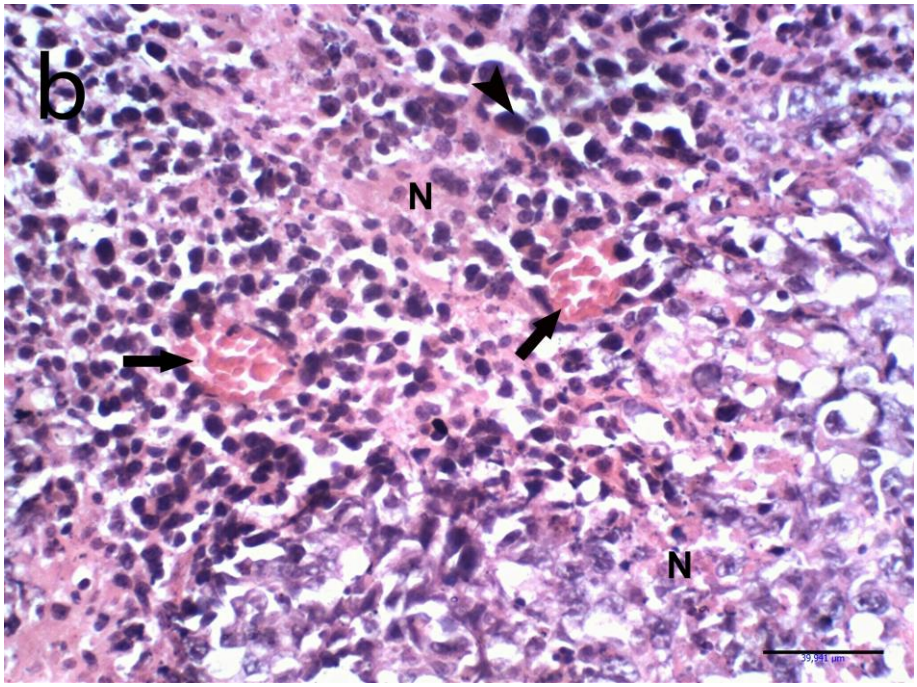
Şekil 11a. DT grubu Hemotoksilen-Eozin boyama; T: tümör, bar: 99.974 µm (x10)



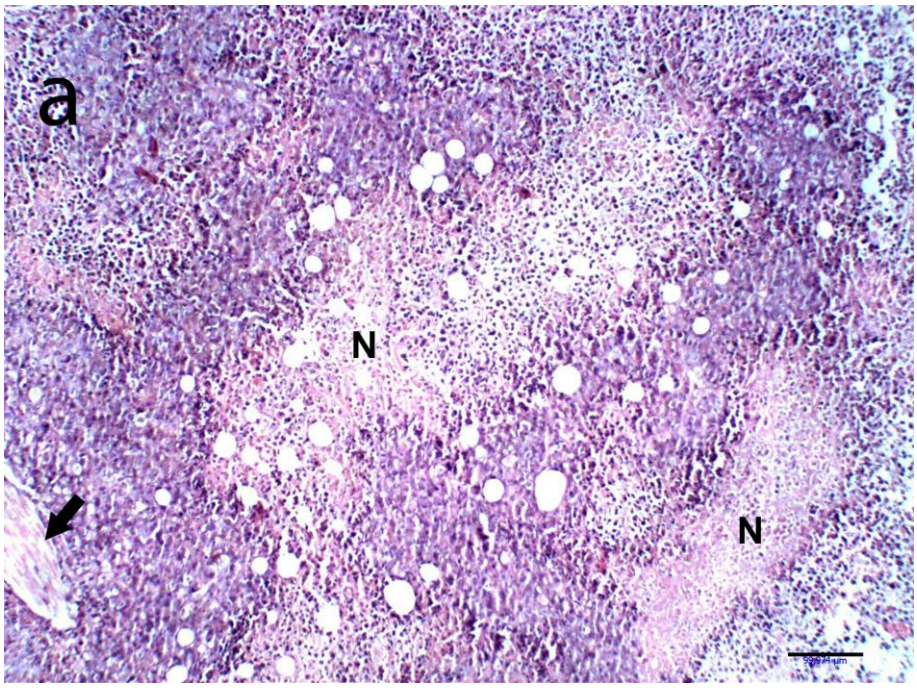
Şekil 11b. DT grubu Hemotoksilen-Eozin boyama; T: Yoğun tümörlü bölge, A: arter, ➡: tümör hücresi, bar: 39.941 µm (x40)



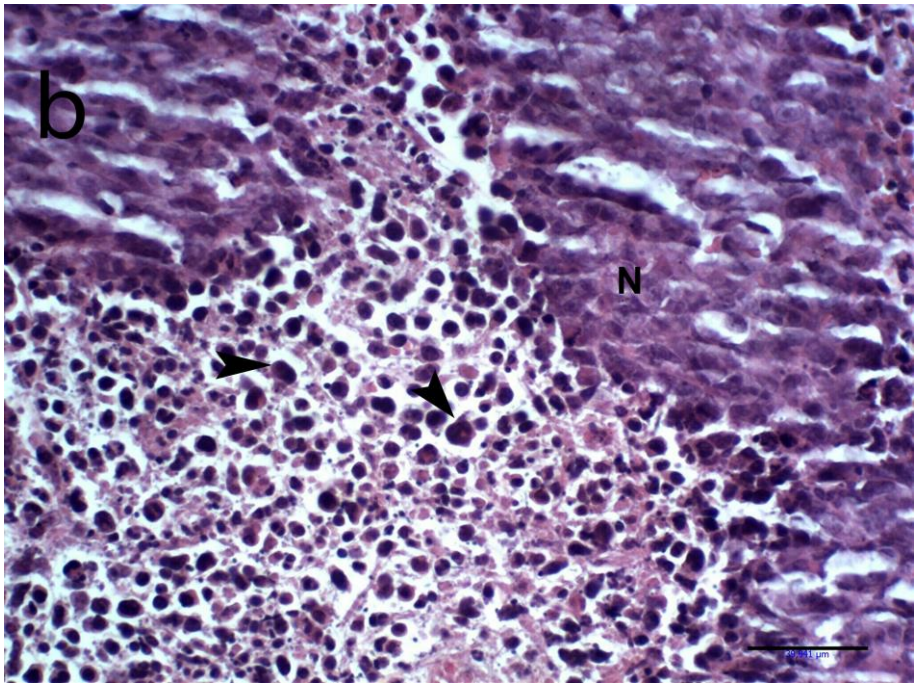
Şekil 12a. DLT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama, N: nekroz, ➡ : kan damarı, bar: 99.974 µm (x10)



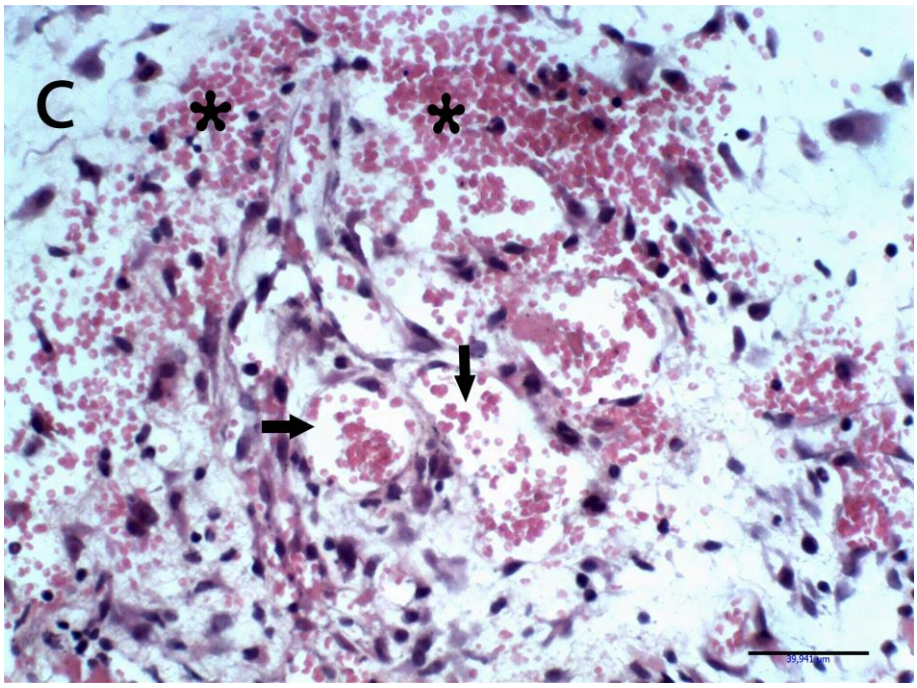
Şekil 12b. DLP grubu Hemotoksilen- Eozin boyama; N: nekroz, ➡: kan damarı, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



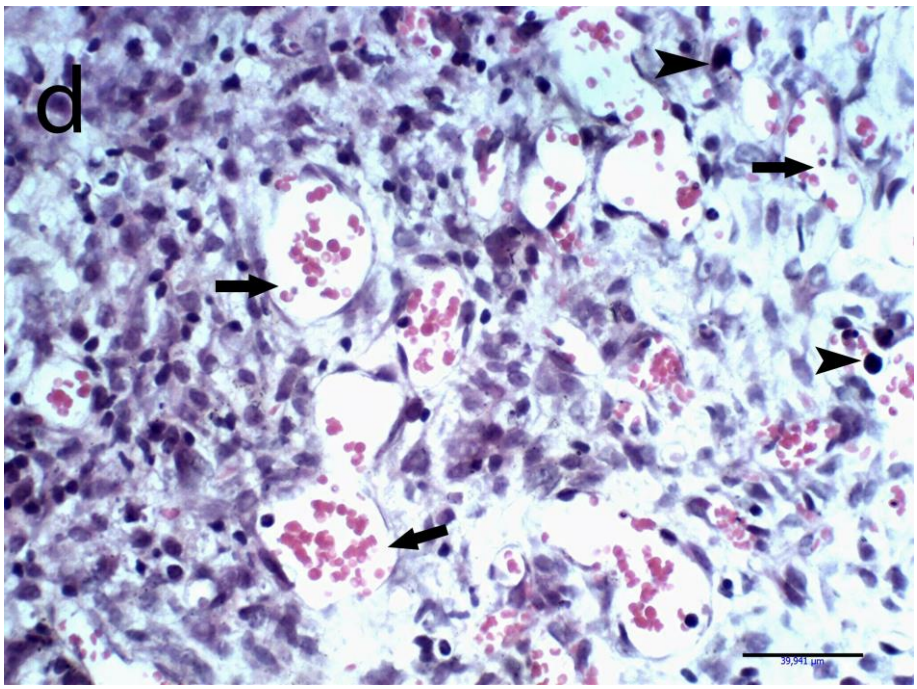
Şekil 13a. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama , ➡ : kan damarı, N: nekroz, bar: 99.974 µm (x10)



Şekil 13b. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama, ►: dev hücre, N: nekroz, bar: 39.941 µm (x40)



Şekil 13c. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama, ➡ : kan damarı, bar: 39.941 µm (x40) yıldız şekli: kanlanma bölgesi



Şekil 13d. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama, ➡ : kan damarı, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)

Vimentin İmmünohistokimya Bulguları

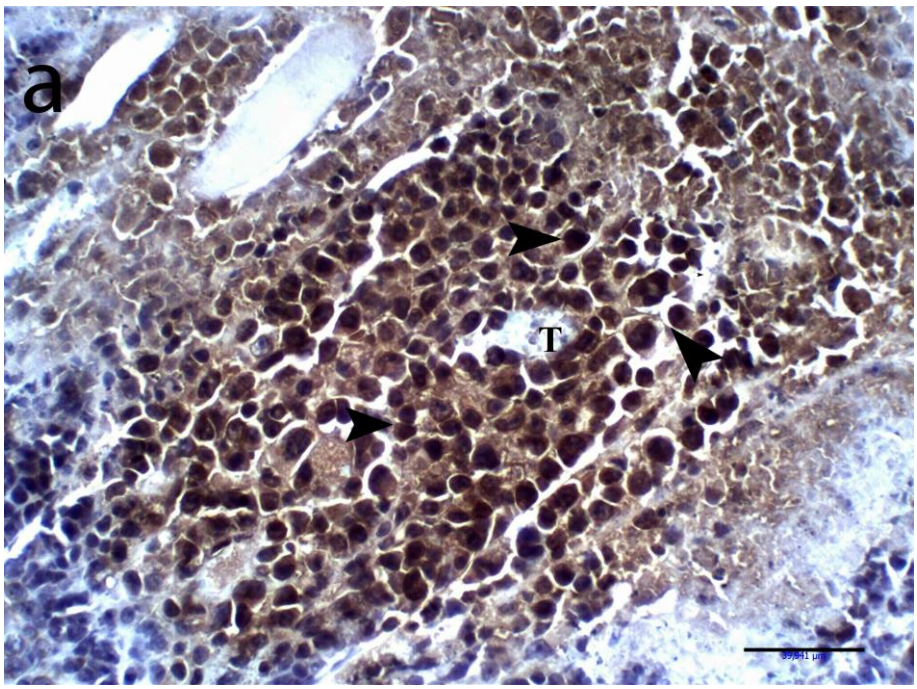
Yapılan mikroskobik inceleme sonucunda tüm gruplarda vimentin immünreaktivitesinin olduğu gözlendi (Şekil 14a, 14b, 14c, 14d). Vimentin immün aktivite en yoğun olarak MT grubunda gözlenmiş, DOX uygulamasına bağlı olarak DT grubunda azaldığı, DLT grubunda lipozilasyona bağlı olarak daha da az bir immünreaktivite görülmüş, en az immün aktivite ise DLPT grubunda tespit edilmiştir (Tablo 10).

Topoizomeraz 2A İmmünohistokimya Bulguları

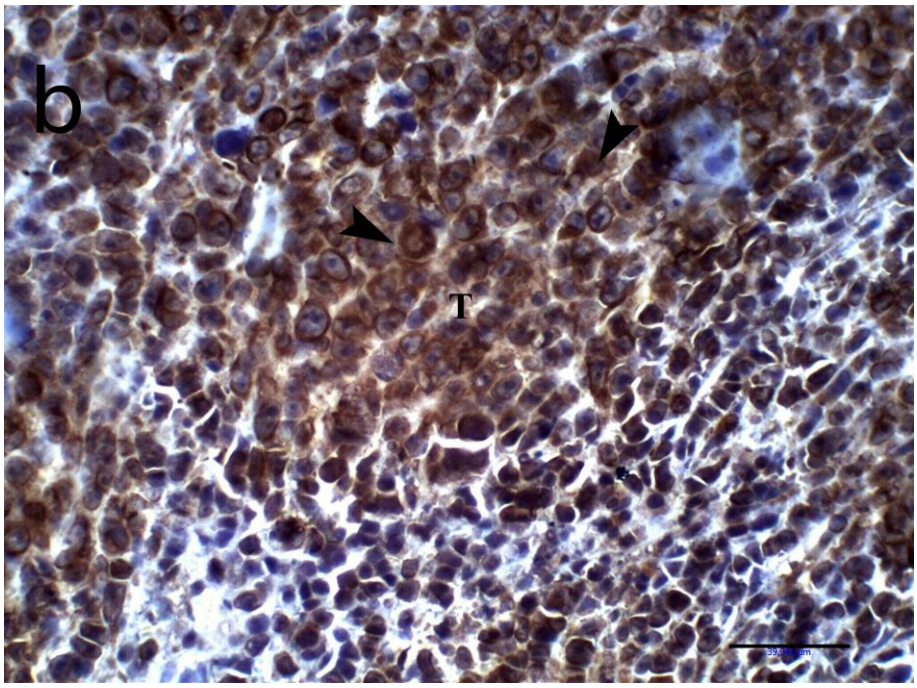
Topoizomeraz 2A ile yapılan immünohistokimyasal analizde aktivite olan yerler boyamada immün aktivite belirlendi (Şekil 15a, 15b, 15c, 15d). TOP2A aktivitesi MT ve DT gruplarında benzer yoğunlukta gözlenmiş olup en yüksek aktivitenin görüldüğü grup DLT grubu olarak tespit edilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. İmmünohistokimyasal skorlama

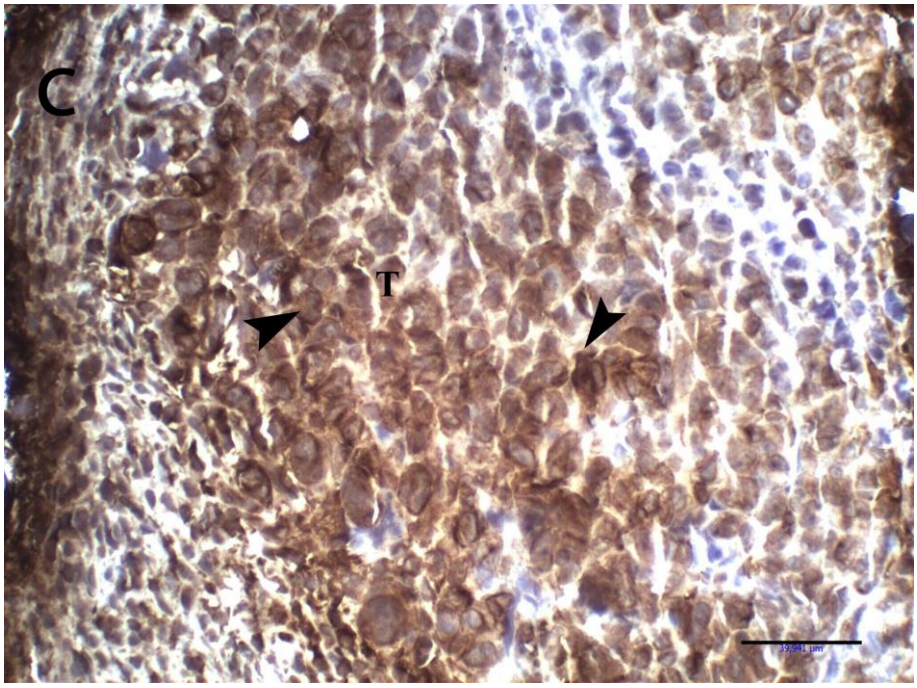
	MT	**DT**	**DLT**	**DLPT**
VIMENTIN	++++	+++	++	+
TOP2A	++	++	++++	+++



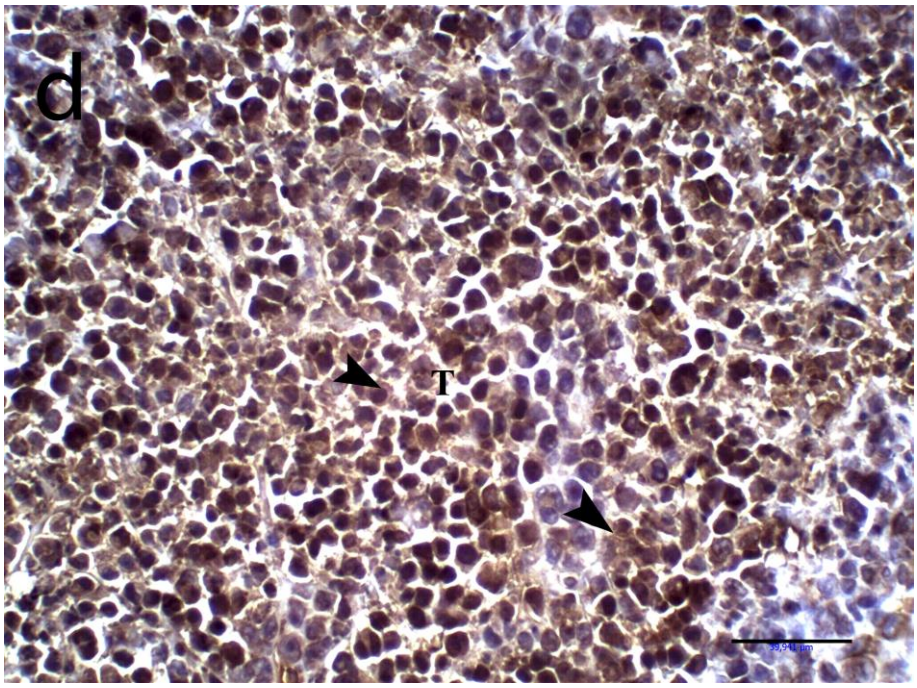
Şekil 14a. MT grubu Vimentin immünreaktivite, T: tümör, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



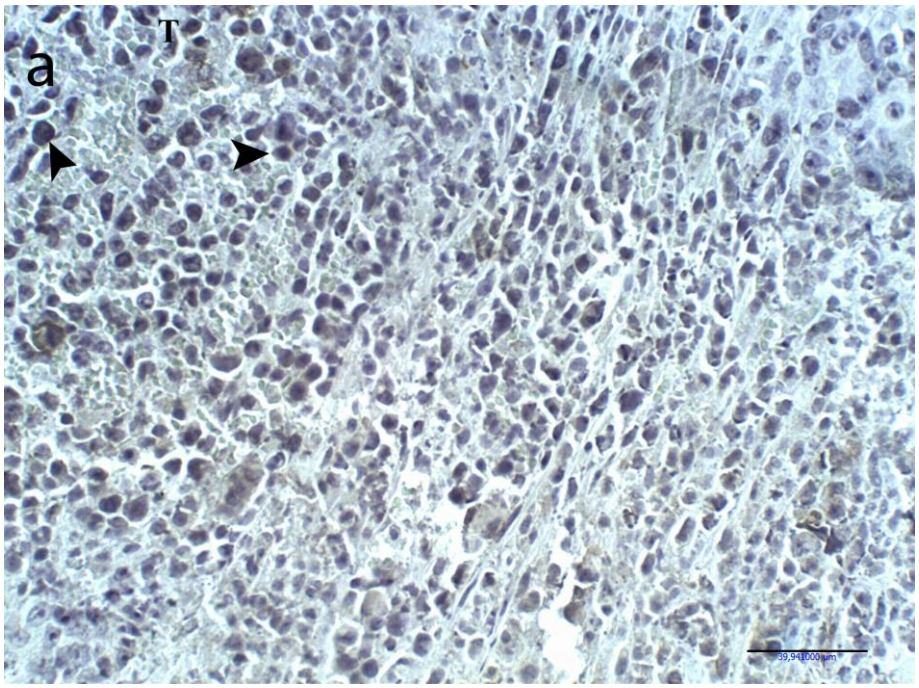
Şekil 14b. DT grubu Vimentin immünreaktivite , T: tümör, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



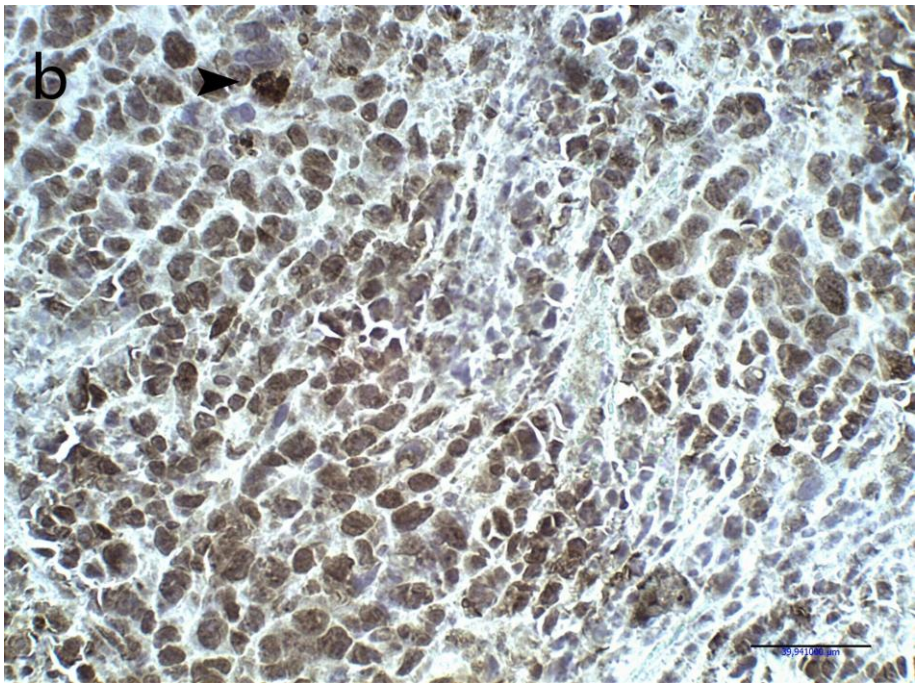
Şekil 14c. DLT grubu Vimentin immünreaktivite, T: tümör, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



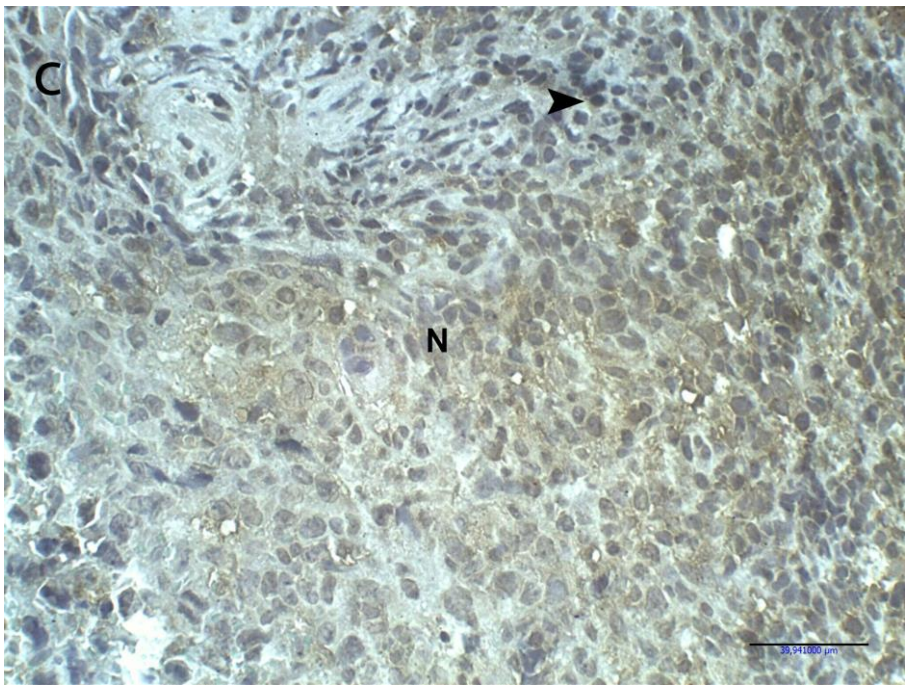
Şekil 14d. DLPT grubu Vimentin immünreaktivite, T: tümör, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



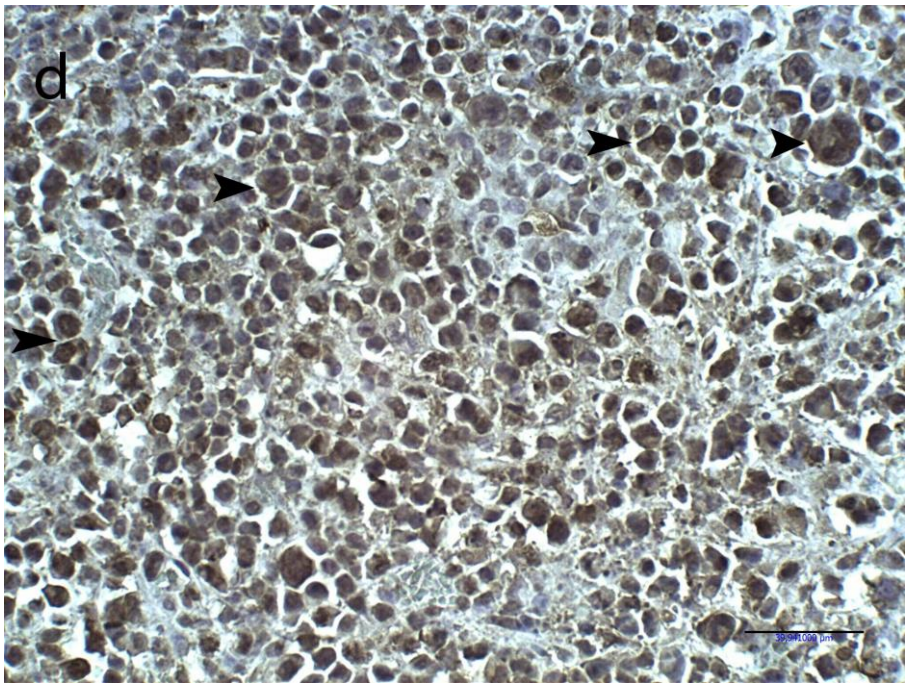
Şekil 15a. MT grubu Top2A ile immünreaktivite, T: tümör, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



Şekil 15b. DT grubu Top2A immünreaktivite, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



Şekil 15c. DLT grubu Top2A immünreaktivite, N: nekroz, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)



Şekil 15d. DLPT grubu Top2A immünreaktivite, ►: dev hücre, bar: 39.941 µm (x40)

GEN EXPRESYON DÜZEYİ BULGULARI

Süperoksit dismutaz, CAT, GSH, VIM ve TOP2A ekspresyon düzeylerindeki artışlar Tablo 11'de gösterilmiştir.

Süperoksit dismutaz ekspresyon düzeyinde DT grubunda MT grubuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlenmiştir, DLT grubu, MT ve DT grubuyla karşılaştırıldığında gözlenen artış anlamlıdır ($p<0.01$). DLPT grubundaki SOD düzeyi, DT ve DLT gruplarına kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.01$).

Katalaz ekspresyon düzeyi, DT grubunda MT grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir, DLT grubunda MT ve DT gruplarına kıyasla görülen artış anlamlıdır ($p<0.01$). DLPT grubundaki CAT düzeyinde, MT grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0.01$).

Glutatyon ekspresyon düzeyi, DT grubunda MT grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir, DLT grubunda gözlenen artış, MT ve DT gruplarına kıyasla anlamlıdır ($p<0.01$). DLPT grubunda MT, DT, DLT gruplarına kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Vimentin ekspresyon düzeyi DT grubunda MT grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir, DLT grubundaki azalma MT ve DT grubuna kıyasla anlamlıdır ($p<0.01$). DLPT grubunun VIM ekspresyon düzeyinde, MT, DT ve DLT grubuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlenmiştir ($p<0.01$).

Topoizomeraz ekspresyon düzeyi DT grubunda MT grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir, DLT grubundaki TOP2A ekspresyon düzeyindeki artış MT ve DT grubuna kıyasla anlamlıdır ($p<0.01$). DLPT grubunda, MT ve DT grubuna kıyasla anlamlı bir artış, DLT grubuna kıyasla ise anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Tablo 11. Deney gruplarının SOD, CAT, GSH, VIM, TIM miktarlarının karşılaştırmalı değerleri

	MT	DT	DLT	DLPT
VIM	1,31 ± 0,06	0,80 ± 0,07[a]	0,41 ± 0,11[a,b]	0,28 ± 0,06[a,b,c]
TOP2A	0,90 ± 1,52	1,52 ± 0,11[a]	3,61 ± 0,35[a,b]	2,31 ± 0,19[a,b,c]
SOD	1,46 ± 0,06	0,89 ± 0,10[a]	2,70 ± 0,34[a,b]	3,72 ± 0,17[a,b,c]
CAT	10,37 ± 0,34	40,56 ± 1,18[a]	43,97 ± 1,18[a,b]	42,41 ± 2,58[a]
GSH	1,48 ± 0,31	1,64 ± 0,24	11,96 ± 1,64[a,b]	81,32 ± 0,86[a,b,c]

Ortalama ± Standart sapma ve tüm gruplar 6 tekrarlı çalışılmıştır
a Meme-Tümör grubuyla karşılaştırma ($p < 0.01$)
b DOX-Tümör grubu ile karşılaştırma ($p < 0.01$)
c DOX-Lipozom-Tümör ve DOX-Lipozom-PEG-Tümör gruplarıyla karşılaştırma ($p < 0.01$)

BİOKİMYASAL BULGULAR

Çalışmamızda MDA düzeylerine ait değerler Tablo 12'de görülmektedir. Buna göre MDA değeri açısından MT grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$), DT grubunda kontrol ve MT grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$), DLT grubunda kontrol, MT ve DT gruplarına kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$).

DOX-Lipozom-PEG-Tümör grubundaki artış kontrol, MT ve DT gruplarına kıyasla anlamlıdır, DLT grubuyla kıyaslandığında anlamsızdır ($p<0.05$).

Tablo 12. Deney gruplarının MDA bulguları

	KONTROL Mean ± SD	**MT Mean ± SD**	**DT Mean ± SD**	**DLT Mean ± SD**	**DLPT Mean ± SD**
MDA	6,66±1,20	9,92±0,92[a]	13,73±1,66[a,b]	9,10±1,10[a,c]	8,66±1,25[a,b,c]

a: kontrol grubu ile kıyaslama ($p<0.05$)
b: MT grubu ile kıyaslama ($p<0.05$)
c: DT grubu ile kıyaslama ($p<0.05$)
DLT ile DLPT arasındaki fark anlamsız ($p>0.05$)

TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya geneline bakıldığında kadın nüfusu arasında en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Meme kanseri 30 yaşından önce nadir olarak görülmekle birlikte 30 yaşı takip eden süreçte hızlı bir artış göstermektedir (179). Bilindiği üzere, sağlıklı hücreler ile kanser hücreleri arasında hücrelerin moleküler düzenlenmeleri ve fizyolojileri açısından farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıklar, antioksidan aktivitelerde değişiklikler, protein ve ara ürünlerin üretimindeki uyumsuzluklar, bazı toksik maddelerin kandaki ve dokulardaki oranlarının artması ve kanser hücrelerinin poliferatif özellikleri ve nihayetinde metastaz özellikleri şeklinde ifade edilebilir. Ortaya çıkan hastalığın tanımlanması, bu hastalığa uygulanacak doğru tedavi yönteminin belirlenmesine katkı sağlamaktadır. Tümörün doğru tanımlanması, kanserin tedavi edilebilmesinde hayati öneme sahiptir. Aynı zamanda tedavi amacıyla kullanılan teröpatik ilaçların, söz konusu değişimleri ne oranda ve ne şekilde etkilediklerinin de bilinmesi önem arz etmektedir.

Genetik ve epigenetik faktörler, meme kanserinin başlamasını ve ilerlemesini düzenlemektedir. Meme kanserinin farklı histolojik türlerinde verilecek tedavi yöntemi ile ilgili problemler ortaya çıkabilmektedir. Yüksek verimli genom dizileme teknolojisi ile meme kanserinde değiştirilmiş gen ekpresyonları gözlendiği ifade edilmiştir (180).

Kemoterapi, genellikle kanser hücrelerinin çoğalma ve bölünme yeteneğini durdurarak bu hücreleri yok etmek amacıyla uygulanan bir tedavi biçimidir (181). Kemoterapotikler, hızla büyüyen hücreleri hedef alan toksik bileşiklerdir. Bu ilaçların çoğu, DNA replikasyonu için gerekli olan öncü moleküllerin sentezini engelleyecek şekilde tasarlanmış olup, bununla birlikte hücre döngüsünün sentez fazını tamamlanmasına engel olmaktadırlar. Mitoz sırasında, kromozomların kutuplara dağılımı, mikrotübüllerden yapılmış iğ iplikçiklerini gerektirir; iğ

hücreli karsinom inhibitörleri, mikrotübül sentezini inhibe ederek mitotik aktiviteye engel olurlar (182). Kemoterapide sıklıkla kullanılan, kemoterapotik ajan ve antrasiklin grubu olan DOX, kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Ancak DOX'un kalp ve böbrek dokusunda ciddi toksik etkileri bulunmaktadır. DOX'un neden olduğu reaktif oksijen türlerinin varlığı ve proinflamatuvar sitokinazların, lipit peroksidasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir. Lipit peroksidasyonun, biyolojik makromoleküllerin yapısal ve fonksiyonel değişimlerinin sonucu olarak renal hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir. Birçok çalışmada DOX kaynaklı renal hasarda, inflamatuvar sitokinlerin büyük miktarlarının inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile beraber bulunduğu rapor edilmiştir (55). Yan etkilerin azaltılması amacıyla etken maddenin, lipozom içerisine hapsedilerek uygulanmaları amaçlanmaktadır. Lipozomların ilacın yarılanma ömrünü ve antrasiklinlerin tedavi etkinliğini arttırdığı ifade edilmiştir. Aynı zamanda lipozilasyon sayesinde ilaç yüklü lipozomun tümör dokusunda birikiminin olanaklı hale geldiği bilinmektedir (62,63).

Kheirolomoom ve ark. tarafından lipozom içerisinde Bakır-DOX kompleksi ile çoklu dozlama çalışılmıştır. Araştırıcılar bu uygulamanın, DOX'un antitümör etkisinin korunduğunu, hedef tümör dokusuna birikim yaparak kardiyak hipertrofi, kıl kaybı ve ağırlık kaybı gibi sistemik toksisitesinin azaldığını, aynı zamanda çoklu dozlama stratejisinin tümörü gerilettiğini ya da yok ettiğini bildirmişlerdir. Bununla beraber DOX'un dolaşım sisteminde stabil kalarak tümöre salımının gerçekleştiği gözlenmiştir (183).

Petersen ve ark.'ın yapmış oldukları çalışmanın meta analizleri değerlendirildiğinde, lipozomal formülasyonların uzun sirkülasyonu ve tümör dokularında artmış ilaç dağılımı gibi avantajlarının olduğunu ancak bu avantajların, hasta gruplarında antikanser etki göstermediğini ifade etmişlerdir. Bu durumu, hasta gruplarının bir çoğunun hastalığının ileri seviyelerde olması, birçoğunun hastalığında ise metastatik kanserlerin mevcut olması ile ilişkilendirmişlerdir. Araştırıcılar, lipozomal DOX ile ilgili mevcut kanıt olarak, doz ve döngü bağımlı farmakokinetik değişikliklerin buna sebebiyet verebileceğini ve tek doz ilaç uygulamasının bölünmüş dozlamaya nazaran daha etkili olabileceğini düşünmüşlerdir. Bu durumu DOX ve daunorubisin gibi antrasiklin gruplarında gözlediklerini ifade etmişlerdir. Oysaki sisplatin çalışmalarında lipozomal formülasyonların geleneksel tedavi yöntemine göre daha etkin sonuç verdiğini ve aynı şekilde antrasiklin gruplarında yapılan pegilasyonda da tedavide gözle görülür üstünlüğün olduğunu belirtmişlerdir (184).

Xing ve ark. tarafından 2018 yılında HeLa hücreleriyle yapılmış olan bir çalışmada serbest DOX, DOX-Lipozom ve Au/DOX-Lipozom'un hücre içerisine ve hücre çekirdeğine

girişleri ile ilgili etkinlikleri değerlendirilmiştir. Uzun süreler boyunca DOX ile inkübe edilen hücrelerin çekirdeğinde DOX birikimi kolaylıkla gözleyebilmişlerdir. Fiili olarak, NIR (yakın infrared bölge) ışıması altındaki Au/DOX-Lipozomda ortaya çıkarılan hipertermi, nanotaşıyıcıların ve hücrelerin membran geçirgenliklerinin arttırılması vasıtasıyla nanotaşıyıcıların yalnızca hücresel içeri alınmasını desteklemediğini gözlemlemişlerdir. Au/DOX-Lipozom içerisindeki DOX'un daha fazla salınmasını da tetiklediğini tespit etmişlerdir. Aynı sonuçları akış sitometrisi ile de elde etmişlerdir (185).

Aynı çalışmada antitümöral aktivitenin ölçülmesi amacıyla metiltiazol difenil tetrazolyum analizlerine bakıldığında, DOX-Lipozom ve Au/DOX-Lipozom grupları arasında hücresel hayatta kalış oranları açısından ciddi bir farklılık gözlemlememişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, bu iki grubun ortaya çıkardığı tümör hücrelerinin hayatta kalış oranlarının 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 2.5 µg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanan DOX grubuna göre daha düşük olduğunu gözlemişlerdir. Bu sebeple, DOX yüklü lipozomların antitümör aktivitesinin arttığı görülmüştür, bunun esas sebebi olarak, yüksek ihtimalle lipozomların hücre içerisine sürekli DOX salınımı olabileceğini ifade etmişlerdir (185).

Wang ve ark.'ın 2017 yılında Pegile DOX'la yapmış oldukları çalışmalarında, farklı tedavi formları ile fare vücut ağırlığında değişiklikler gözlediklerini belirtmişlerdir. Vücut ağırlığındaki en belirdin azalmanın DOX'un uygulandığı grupta olduğunu belirlemişlerdir. Bu gözlemler DOX'un in vivo olarak ciddi bir toksisitesinin olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Serbest DOX ile yapılan tedaviler sonucu farelerin kalp dokularında da belirgin histopatolojik değişiklikler gözlemişlerdir. Miyokard liflerinin düzensiz bir dizilime sahip, liflerin arasındaki boşlukların yayılmış ve hücre çekirdeklerinin belirgin bir biçimde deforme olduğu görülmüştür. Fakat PEG-DOX'un bu kardiyotoksik etkilerin ortaya çıkmasını önlediğini ifade etmişlerdir (186).

Gazzanoa ve ark. 2018 yılında fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada LNDF (folat eklenmiş lipozomal nitrooksi-doksorubisin), LND (lipozomal nitrooksi-doksorubisin) ve ND (nitrooksi-doksorubisin)'nin etkileri araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçları, hazırlanan formülasyonların ND<LND<LNDF şeklinde giderek tümör aktivitesinin azalmasında daha iyi bir etki meydana getirdiği şeklinde raporlanmıştır. Çalışmada tümör aktivitesinin yavaşlamasının, tümör hücre gelişiminin azalmasıyla birlikte paralellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, ışık mikroskobu verileri ile de desteklemişlerdir. Sonuç olarak LNDF'nin düşük dozlarının tümör büyümesine dikkat çekici bir etkisinin olduğunu gözlemişlerdir (187).

Chen ve ark.'ın 2018 yılında, DOX ve imatinib (IM) ile yapmış oldukları çalışmada, 48 s süre ile serbest DOX, serbest IM, serbest DOX/IM, Folat reseptör hedeflenmiş (F) Lipozom (L)-DOX/IM, pH hassasiyetli(P)L-DOX/IM, FPL-DOX ve FPL-DOX/IM uygulamalarını yaparak ilaç etkinliklerini değerlendirmiş ve ışık mikroskobu verilerini incelemişlerdir. Bu ilaç formları tümör oluşumunu takiben 3 günde bir 9, 12, 15 ve 18. günlerde fare kuyruk venine uygulanmıştır. Serbest DOX ve IM ayrı ayrı verildiği zaman DOX/IM kombinasyonuna göre daha az tümör baskılayıcı etki gösterdiği ifade edilmiştir. Serbest ilaç gruplarıyla lipoze edilmiş olanlar karşılaştırıldığında bütün lipozom gruplarında daha küçük tümör oluşumu gözlenmiştir. Çünkü lipozomlar tümöre olan birikimi arttırmıştır buna ek olarak Pegile edildiklerinde lipozomların aside duyarlılıkları ve sirkülasyonda uzun süre kalış yeteneklerinin arttığı gözlenmiş, tümör hedeflemeleri ve tümörde ilaç birikimleri PEG-Lipozom-ilaç gruplarında artış göstermiştir. Bu grupta daha küçük tümör boyutu ve daha az tümör ağırlığı gözlendiği belirtilmiştir. Işık mikroskobu verileri de PEG-Lipozom-ilaç konjugatının daha iyi antitümör etkinliği olduğunu desteklemektedir (188). Bizim çalışmamızda da özellikle DLP ve DLPT gruplarında tümör dokusunda yoğun nekrotik alanların varlığı dikkat çekmiştir (Şekil 12a,b). Ayrıca özellikle DLPT grubunda mononükleer hücre infiltrasyonları (Şekil 13a,b,c,d) uygulamaya bağlı olarak tümör dokusunda bir küçülmenin olması doğrultusunda adaptif bir cevap olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar Gazzanoa ve ark. İle Chen ve ark.'ın bulguları ile paralellik göstermektedir.

Lou ve ark.'ın meme kanserli hücre hatlarıyla yaptıkları bir çalışmada CPEB4 proteininin ekspresyonunun araştırmışlar, bu araştırmaya göre aşırı CPEB4 üretimiyle vimentin artışı gözlenmiştir. Buna ek olarak vimentin üretimi CPEB4' ün göçünün ve kanser hücrelerinin yayılımını uyarmaktadır. Tüm bu veriler CPEB4 ve vimentin'in, onkojenik bir faktör olarak etki ettiklerini bize göstermektedir. Fakat bu mekanizma hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır (88).

Oh ve ark.'ın 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada DOX'un normal ve tümörlü hücrelerdeki dağılımının gözlenebilmesi için Balb/c bağışık yetersizliği olan tüysüz fareye kuyruk veninden serbest DOX, DOX/Vimentin siRNA-Lipozom ve Galaktoz-DOX/Vimentin siRNA-Lipozom verilmiştir. Bu çalışmada DOX/Vimentin siRNA-Lipozom ve Galaktoz-DOX/Vimentin siRNA-Lipozomun, serbest DOX'a kıyasla kalp ve böbrek gibi normal organlara daha düşük oran da yayılım göstermiştir, aynı zamanda serbest DOX'a kıyasla tümör hücrelerinde daha yüksek oranda birikim yaptığı tespit edilmiştir. DOX/Vimentin siRNA-Lipozom ve Galaktoz-DOX/Vimentin siRNA-Lipozom birbiriyle kıyaslandığında,

galaktoz ile işaretlenmiş lipoze DOX' un tümör hücrelerinde işaretlenmemiş DOX'a nazaran belirgin oranda birikim yaptığı gözlenmiştir. Bu çalışmada hedef tümör bölgesine DOX ile birlikte Vimentin de uygulanmıştır. Sonuç olarak yapılan bu in- vivo çalışmada, gözle görülür bir biçimde tümörün baskılandığı belirlenmiştir (189).

Jafaria ve ark.'ın yapmış olduğu bir çalışmada ise partenolid isimli bir bileşiğin meme kanseri hücrelerindeki protein ifadeleri incelenmiştir. Partenolid, sesiterpen lakton yapıda olan ve uzun yıllar migren ve romatoid artrit tedavisinde kullanılan bir bileşiktir. MCF7 meme kanseri hücre hatlarında partenolid ile tedavisinde, plazma membranının kabarcıklanması ve apoptotik cisim oluşumları gibi tipik morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Meme kanserinin aşamalarında vimentin gibi biyobelirteçlerin ifade artışları gözlendiğinde birçok meme kanseri türünün çok fazla etkinlik gösteremediği fark edilmiştir. Vimentin, epitelyal hücre göçü esnasında ortaya çıkmaktadır. Partenolid bileşiği ile yapılan çalışmada ise partenolidin vimentin'i baskıladığı ve bu baskılama sonucunda meme kanseri hücre hattının epitelyalden mezenkimale geçiş davranışının durduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada partenolidin bu şekilde etki göstererek metastaz üzerine etki gösterdiği düşünülmektedir (190).

Yamashita ve ark.'ın yapmış olduğu çalışmada, meme kanseri ve lenf nodlarındaki E-kaderin ve vimentin proteinini incelemişlerdir. E-kaderin proteininin tersine primer tümör hücrelerindeki vimentin ifadesi metastatik lenf nodülleriyle tamamen uyumlu bulunmuştur. Son yapılan çalışmalar vimentin'in epitelyal mezenkimal geçiş sürecinde majör rolünün olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmalarda, düşük östrojen seviyeleri gösteren yüksek sınıf duktal karsinomada ileri derecede baskınlık gösteren Vimentin gen ifadeleri bulunmuştur. Bu çalışma insan meme kanseri örneğinde ilk olarak E-kaderin ve vimentin proteininin aynı tümör hücrelerinde birlikte lokalize olduğunu ortaya çıkarmıştır. Primer bölgede tümör hücreleri E-kaderin ve vimentin gen ifadelerinin her ikisinin de düzensiz bir dağılım sergilediğini göstermiştir. Tümör hücreleri, metastatik lenf nodlarında, E-kaderin ve Vimentin' in eşit ve eş zamanlı dağıldığı gözlenmiştir. Bu durum da, vimentin ve e-kaderin kanser hücrelerinin metastazı üzerinde artan bir etki göstermektedir. Bu etki klonal seleksiyon olasılığını düşündürmüştür. Kısmi epitelyal mezenkimal geçiş ihtimali, bu alt popülasyon için gözönünde bulundurulabilmektedir (191).

Yapılan bu çalışmalardaki ışık mikroskobu verileri, gen ekspresyon çalışmaları ve oksidatif steres parametrelerinin meme tümörü varlığında meydana getirdiği değişiklikleri ortaya koymaktadır ve vimentin gen ekspresyonunun meme tümöründe ayırt edici bir belirteç olduğunu ortaya koymaktadır. Araştırıcılar yapmış oldukları çalışmalarda ışık mikroskobu

bulguları ile sonuçlarını desteklemişlerdir. Bizim çalışmamızdaki ışık mikroskobu bulgularını değerlendirecek olursak, tüm gruplarda hücre sınırları belirsiz, düzensiz yapıda ve dağılımda, farklı şekil ve büyüklükte tümör yapıları gözlendi. Dev hücre çekirdekleri hemen hemen tüm gruplarda gözlendi. DT gurubunda aktif bölünmenin devam ettiği, arter ve kan damarı gibi oluşumların bulunduğu gözlendi. DLT ve DLPT gruplarına gidildikçe yoğun damarlanma ve nekrotik bölgelerin oluştuğu gözlendi. Nekrotik bölgelerin varlığı, tümör metastazının ve büyümesinin durduğu şeklinde yorumlanmıştır, hücrelerin iyileşme sürecine girdiğinin bir göstergesi olduğu düşünülmüştür.

Yapılan literatür taramalarında meme tümör modellerinde vimentin gen ekspresyonunun artmış olduğu ifade edilmektedir (88,189-191). Buna göre vimentin gen ekspresyonunun kanser hücrelerindeki aşırı artışı, artan tümör büyümesi, istila ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda qRT-PCR sonuçları dikkate alındığında, MT grubuna göre DLT grubunda vimentin ekspresyonunda azalış gözlenmiştir. Bu azalış MT, DT, DLT, DLPT gruplarında sırasıyla; 1.31, 0.809, 0.41, 0.28 şeklindedir ($p<0.01$). MT grubunda vimentin gen ekspresyonu, hücre çoğalmasının bloke olmadığının ve hücre bölünmesinin tetiklendiğinin göstergesidir. Yapılan immünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarına göre tüm gruplarda vimentin aktivitesinin olduğu gözlendi. Vimentin immünreaktivite en yoğun olarak MT grubunda gözlendi, DOX uygulamasına bağlı olarak DT grubunda azaldığı, DLT grubunda daha da az immünreaktivite görüldü, en az immünreaktivite DLPT grubunda görüldü. İmmünohistokimyasal bulgularımız gen ekspresyon bulgularını destekler niteliktedir. MT grubu ile uygulama gruplarının immünohistokimyasal verileri ve gen ekspresyon düzeyleri dikkate alınarak kıyaslandığında uygulama gruplarındaki vimentin geninin ekspresyonunda azalış ile tümör metastazının baskılandığını söyleyebiliriz. Çalışmamızda DT, DLT, DLPT grupları, MT gruplarıyla kıyaslandığında vimentinin ekspresyon düzeyindeki azalış bizlere tümörün metastaz yeteneğinin azalmış olabileceğini düşündürmektedir. MT grubuna kıyasla uygulama yapılan DT, DLT ve DLPT gruplarında Vimentin düzeylerinde olan azalışın uygulamaların yapılması ile metastaz yeteneğinde azalmaya yol açabileceği düşünülmektedir. Çalışmanın sonuçları farlı form uygulamalarının yapıldığı diğer çalışmaların sonuçlarını destekler nitekliktedir. Lipozilasyon ve pegilasyonun metastazı engelleme doğrultusunda etkilerinin olabileceği sonucu ile paralellik göstermektedir.

Meme kanserinin alt tipleri bazal benzeri, HER2 pozitif, Lumanal A ve Luminal B şeklinde tanımlanmaktadır. Bu türler çeşitlilik, klinik davranış, tedavi yanıt profili ve

prognostik işaret olarak farklılık göstermektedir. Meme kanserinde DNA replikasyonunda kilit rol oynayan enzim olan TOP2A tedavi içerisinde yaygın olarak tanımlanan bir hedef proteinidir. Hua ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada zayıf ilerleme görülen meme kanseri hastalarında TOP2A gen ifadesinin yakından ilişkili olduğu keşfedilmiş fakat bu ilişkinin bazal benzeri ve HER2 pozitif meme kanseri türlerinde, zayıf ilerleme görülen meme kanseri türündeki kadar olmadığı tespit edilmiştir (180).

Almeida ve ark'ın 2014 yılında yaptığı çalışmada TOP2A gen değişikliği % 22.6 olarak bulunmuş ve bu oran literatür taramalarıyla eş değer olmuştur. TOP2A artışı gösteren vakaların % 35.7'si HER-2 geni ile birlikte artış gösterdiği bulunmuştur. Ancak bu çalışmada HER-2 artışı olan 10 vaka ve bu 10 vakanın 5'inde de TOP2A değişikliği gözlenmiştir. Aslında HER-2 artışı meme kanserinde TOP2A geninin artış oranı % 7'den % 50'ye kadar değiştiği raporlanmıştır. Tümörlerin biyolojik karakteristiklerine ilişkin olarak, TOP2A değişikliğinin nükleer düzeydeki, çok sık HER-2 artışı olan ve inflamatuvar tipteki tümörlerde daha agresif olduğu araştırıcılar tarafından tespit edilmiştir. Biyolojik agresifik karakterine rağmen TOP2A artışı görülen meme kanseri hastalarının antrasiklin temelli kemoterapiye daha iyi cevap verdiği rapor edilmiştir. Araştırıcılar bu bilginin antrasiklin kullanımının yararları açısından TOP2A geninin değerlendirilmesinin klinik gerekliliğini pekiştirdiğini düşünmüşlerdir. TOP2A geninin intratümöral heterojenitesinin sinyalleri, meme kanserli örneklerin % 14'ünden fazlasında gözlenmiştir ve bu durumun TOP2A gen artışının sıklığına ilişkin literatürlerdeki fikir ayrılıklarına ek bir açıklama getirdiğini düşünmektedirler (192).

Üçlü negatif meme kanserindeki hormon ve hedefleme gibi tedavi yöntemleri açışından meydana gelen ilerlemelere rağmen kemoterapotik ajanlar, bu kanser türünün tedavisinde hala daha fazla önceliğe sahiptir. TOP 2'nin bir alt türü olan TOP2A, kanser hücrelerinin çoğalım göstermesinin bir göstergesidir. TOP2A, DOX ve etopozit gibi TOP'un aktivitesini azaltan bileşiklere karşı yüksek duyarlılıktadır. Bu durum da TOP'un inhibe edilebilmesi için uyarı yapan TOP2A'yı etkileyen yeni tedavilerin keşfedilebilmesi açısından yararlı bulunmaktadır (193).

Bazı çalışmalarda, meme tümörü varlığında TOP2A gen ekspresyonunun, tümörün biyolojik karakterine veya tümörün ilerleme hızına göre artış ya da azalış gösterdiği ifade edilmekte, başka bir çalışmada ise kanser çoğalma göstergesi olarak kabul edilmektedir (180,192,193). Literatürlerde TOP2A geninin tümör varlığındaki ekspresyon düzeyleri ile ilgili sabit bir veri rapor edilebilmiş değildir. Bilindiği üzere oksidatif stres apoptotik hücre ölümü esnasında ortaya çıkmaktadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve diğer reaktif oksijen türleri

oksidatif stresi tetiklemektedir. 1999 yılında Li ve ark. tarafından reaktif oksijen türlerinin TOP 2 aracılı DNA hasarını etkinleştirip etkinleştiremediğini araştırmak amacıyla U937 myeloid lösemi hücrelerindeki DNA eksizyonundaki H_2O_2'nin etkisini in vitro incelemek için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda H_2O_2'nin, TOP2 aracılı kromozomal DNA halkalarının eksizyonunu aktive ettiği ve bu aktivasyon sonucunda erken evre apoptotik hücre ölümünün ortaya çıkabileceği sonucuna varmışlardır (192). Çalışmamızda qRT-PCR sonuçları dikkate alındığında TOP2A ekspresyon düzeyleri MT, DT, DLT, DLPT gruplarına ait veriler sırasıyla 0.90, 1.52, 3.61, 2.31 şeklindedir ($p<0.01$). TOP2A ise DLT grubuna doğru artış, DLPT grubunda azalış göstermiştir. DLPT grubunun TOP2A ekspresyon düzeyi DT grubuna kıyasla daha fazla bulunmuştur. TOP2A ile yapılan immünohistokimyasal analizde MT ve DT gruplarında benzer yoğunlukta reaktivite gözlendi, en yüksek aktivitenin DLT grubunda olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre immünohistokimyasal analizlerin gen ekspresyon düzeyleri ile paralellik gösterdiği görüldü. TOP2'nin hücre çoğalması dışında hücre ölümünde de rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stres varlığında H_2O_2, TOP2 aracılığıyla oluşturulan DNA bozulmasını aktive etmekte ve bu durum hücrenin apoptoza gitmesine sebep olmaktadır (194). Bizim çalışmamızdaki immünohistokimyasal bulgular ve TOP2A gen ekspresyonundaki artış, tümör hücresinin uygulama yapılan gruplarında oksidatif stresin artması DNA yapısında hasarın meydana geldiğini ve topoizomeraz ekspresyonunun, tümör hücrelerinde meydana gelen bu hasarı gidermek üzere indüklendiğini göstermektedir. DLP grubunda ve DLPT grubundaki TOP2A ekspresyon düzeyinin DT grubundan anlamlı biçimde yüksek olması ($p<0.01$), bu gruplardaki DOX birikiminin ve etkisinin daha yüksek olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda Vimentin ve TOP2A ekspresyon düzeyleri ışık mikroskobik bulgularımız ile paralellik göstermekte olup, ekspresyonu yapılan genlerin hücredeki lokalizasyonları ortaya konmuştur.

Artmış oksidatif stresin etkilerini telafi etmek amacıyla kanser hücreleri mononüklear fagositik sistem etkilerini önleyebilme potansiyeline sahip redox adaptif mekanizmaları başlatabilme yeteneği kazanır. Meme kanseri hücrelerindeki, oksidatif stres genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış antioksidan aktivite belirtecidir. Bunlardan en çok karşımıza çıkan glutatyon sistemidir. Son yapılan çalışmalarda, kemoterapi tedavisi alan hastalarda, GSH ekspresyonunun metastazla ilişkili olduğu saptanmıştır. Perry ve ark. meme kanseri hücrelerinde normal hücrelere oranla iki misli fazla, aynı zamanda lenf dokularından alınan örneklerde de dört misli fazla GSH seviyesi saptamışlardır (195).

Ramirez-Exposito ve ark.'ın yapmış olduğu çalışmada postmenopozal ve premenopozal dönemlerdeki sağlıklı ve meme kanserli neoadjuvan tedavi yapılmış ve yapılmamış kadın hastaların serumlarındaki SOD, CAT, GSH seviyeleri ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda; kanserli ve neoadjuvan tedavi almamış meme kanserli hastalarda sağlıklı kadınlara oranla SOD seviyesi düşük olduğu gözlenmiştir. Meme kanserli neoadjuvan tedavisi almış hastaların SOD seviyesi sağlıklı kadınlara oranla daha düşük ölçülmüştür. Araştırmacılar premenopozal ve postmenopozal dönemlerde SOD seviyelerinde belirgin bir fark bulamamışlardır. CAT seviyelerinde de post ve premenopozal dönemdeki kadınlar arasında belirgin bir farklılık gözlememişlerdir. Neoadjuvan tedavi alan meme kanserli hastalardaki CAT seviyeleri, sağlıklı hastalardakinden daha düşük olduğu görülmüştür. Postmenopozal meme kanserli hastaların, neoadjuvan tedavi aldıktan sonra sağlıklı kadın ve neoadjuvan tedavisi almayan meme kanserli hastalara oranla CAT seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlemişlerdir. Postmenopozal dönemdeki sağlıklı kadınlarda premenopozal dönemdeki sağlıklı kadınlara oranla daha düşük GSH seviyeleri tespit etmişlerdir. Meme kanserli pre ve postmenopozal dönemdeki neoadjuvan tedavi almayan hastalarda GSH oranlarının sağlıklı kadınlara kıyasla daha düşük ölçmüşlerdir. Meme kanserli ve neoadjuvan tedavi alan hastalarda GSH seviyelerinin sağlıklı kadınlara oranla daha düşük olduğunu gözlemişlerdir (196).

Tulubas ve ark. in vivo olarak yaptıkları çalışmada DOX'un böbrek üzerine toksik etkisi araştırılmıştır. Sıçanlara, doksorubisini 30 mg/kg tek doz ip verilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında böbrek dokularında GSH, SOD düzeylerinde azalma tespit etmişlerdir. Doksorubisin ve omega-3 yağ asitleri verilen grupta ise sadece doksorubisin verilen grupla karşılaştırıldığında serum, böbrek ve karaciğer dokularında GSH, SOD düzeylerinde ise anlamlı bir artış tespit etmişler (197).

Kalaiselvi ve ark.'ın böbrek dokusu ile yaptıkları benzer bir çalışmada, 10 mg/kg i.v doksorubisin uygulaması sonrasında enzimatik antioksidan seviyelerinde (SOD, CAT, GSH Px, GSH redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve GSH-S-transferaz) önemli derecede düşüş saptanmıştır (198).

Koul ve ark. DOX ve likopenin etkilerini böbrek dokularında incelemişlerdir. Doksorubisin uygulaması yapılan böbrek dokularında, GSH, GSH Px, GSH redüktaz ve CAT aktivitelerinde önemli bir azalma olduğunu saptamışlar. Ancak DT grubuyla kıyaslandığında likopen verilen grupta GSH, CAT, GSH-Px ve GSH redüktaz düzeylerinde belirgin artış izlemişlerdir (199).

Harisa ve ark.'ın sıçanlarda yaptıkları in vivo çalışmada, sisplatin verilen sıçanların, kontrol grubuna göre renal hasar ve oksidatif stres belirteçlerinden NO, MDA, SOD düzeylerinde artış saptamışlardır (200).

Mantawy ve ark.'ın erkek sıçanlar'da yapmış oldukları çalışmada; DOX'un, lipid peroksidasyonunda, GSH tükenmesinde ve antioksidan enzim aktivitelerinde belirgin bir düşüşün gözlendiği (SOD ve CAT) ve oksidatif stres profilinde ise bir artışa neden olduğu bulunmuştur (201). Bizim çalışma bulgularımız, MT, DT, DLT, DLPT için SOD ekspresyon düzeyleri, CAT ekspresyon düzeyleri ve GSH ekspresyon düzeyleri sırasıyla Tablo 11'de verilmiştir ($p<0.01$). Bu verilere göre yapmış olduğumuz çalışmanın oksidatif stres parametrelerinde MT grubuna göre DT<DLT<DLPT şeklinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.01$). Bizim çalışma sonuçlarımız bu anlamda Mantawy ve ark.'ın çalışmasıyla paralellik göstermektedir.

Cai ve ark. 2017 yılında, glisiretinik asit ile in vitro olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada, bu maddenin mitokondrial hasar ve oksidatif stres ile meydana gelen apoptozu indüklediğini gözlemişler ve reaktif oksijen türlerinin oksidatif strese sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun sonucu GSH' ın reaktif oksijen türlerini yok ederek ve antikanser ilaçların sitokoksisitesine karşı koyarak etkisini gösterdiği şeklinde yorumlamışlardır. GSH'ın glisiretinik asit sebebi ile azalması reaktif oksijen türlerini arttırdığını, bu durumun da hücreyi apoptoza götürdüğünü ifade etmişlerdir (193).

Kumral A. ve ark.'ın 2015 yılında sıçanlarla yaptığı bir çalışmada, DOX tedavisi esnasında, organlarda artmış reaktif oksijen özellikleri, enflamatuvar reaksiyonlar, apoptotik ve nekrotik değişimler görülmüştür, kalp, karaciğer ve böbreklerde GSH miktarlarının düşmüş olduğu gözlenmektedir. Bu sonuçların yüklenen DOX dozuna, maruz kalma zamanına ve organların oksidatif hasara duyarlılığına da bağlı olduğunu düşünmüşlerdir (54).

Çalışmamız doğrultusunda yapılmış olan literatür taramalarında da Lipoze DOX, örneklerdeki hücresel geçirgenliğin artmasını sağlamış, DOX'un hücreye girişini kolaylaştırmış, lipozom içerisinden sürekli DOX salınımı sağlayarak antitümöral aktivite artışına sebep oluğu, bu sayede tümörün aktivitesinin azaldığı, hücrenin gelişiminin yavaşladığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar düşük dozlarda ortaya çıkmıştır (185). Pegilasyon yapıldıktan sonra da kardiyotoksik etkilerin azaldığı ve hedefleme, antitümöral aktivite gibi etkilerinde belirgin bir biçimde artış olduğu belirtilmektedir. Pegilasyon sayesinde lipozomun sirkülasyonda kalış yeteneğinin arttığı tümör dokusunda birikiminin arttığı ve tümör dokularında küçülme olduğu ifade edilmiştir (186,188).

Çalışmamızda fare sol bacağında oluşturulan meme tümör modeline uygulamış olduğumuz farklı formülasyonlarda hazırladığımız DOX ile elde ettiğimiz sonuçlar daha önce bu konuda yapılmış olan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Gen ifadesi bulgularında da belirtmiş olduğumuz gibi, MT grubunda daha yüksel olan SOD ekspresyon düzeyi DT grubunda anlamlı bir şekilde azalmıştır. DLT ve DLPT grubunda ise anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.01$). Bulgularda gördüğümüz üzere lipozom ve PEG'siz DOX uygulamasına kıyasla DLT ve DLPT formları ile tedavi sonuçları anlamlı bir farklılık ortaya koymaktadır. Uygulamış olduğumuz ilaç formlarından DLT ve DLPT formlarında, DT grubuna kıyasla CAT, GSH ve SOD düzeylerinde artış olduğunu göstermektedir. Bu durum, meme tümör dokusunda oksidatif stres artışının olduğunu göstermektedir. MT grubu ile DLP ve DLPT grupları karşılaştırıldığında antioksidan enzimler ve GSH ekspresyon seviyelerinde gözlemlenen artışların ışık mikroskobik bulgular ile uyumlu olduğu görülmektedir. Tümör dokusundaki ilaç birikiminin bu gruplarda daha fazla ve uzun süreli olmuş olabileceği ve bu durumun da tümör dokusunda nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanmış olduğu şeklinde yorumlanmıştır. MDA düzeylerine bakıldığında Kontrol<MT<DT şeklinde anlamlı bir artış olmuştur ($p<0.05$). DLT grubu Kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir artma ($p<0.05$), DT grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir azalma söz konusudur ($p<0.05$). DLPT grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir artma ($p<0.05$), MT ve DT grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir azalma söz konusudur ($p<0.05$). Bu verilere göre tümör varlığında artmış olan lipit peroksidasyonu DOX verildiğinde daha da arttığı anlamını taşımaktadır. DLP ve DLPT gruplarındaki plazma MDA düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış ($p<0.05$) söz konusu olmakla birlikte MDA düzeyleri incelendiğinde tümör oluşumuna bağlı olarak plazma MDA düzeylerinin tüm gruplarda kontrole göre artış gösterdiği ve bu sonucun tümörün sistemik olarak lipit peroksidasyonunu tetiklediği şeklinde değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, DT grubunda en yüksek plazma MDA düzeyinin ölçülmüş olması, DOX'a bağlı toksisiteyi ortaya koyma bakımından önemlidir.

Yapmış olduğumuz çalışmanın DLT ve DLPT gruplarındaki plazma MDA düzeyleri DT grubundan istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük bulunmuş ($p<0.05$) ve bu sonuç lipozilasyonun ve pegilasyonun lipit peroksidasyon açısından olumlu etkisi olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar, lipoze edilmiş ve pegilasyonu yapılmış DOX'un sistemik etkiler bakımından olumlu etkilerinin, aynı zamanda da tümör hücreleri üzerinde olumsuz

etkilerinin olduğu sonucunun, hem tedavi etkinliği açısından hem de yan etkilerin azalması açısından ortaya koyduğu için önem arz etmektedir.

Çalışmamız sistemik etkilerin antioksidan kapasitenin ve metaztazın değerlendirilmesi konusunda veriler sunma açısından ayrıca önem taşımaktadır. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuçlar, literatürde kayıtlı bu konuyla ilgili yapılmış çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Yapılmış olan bütün çalışmalarda DOX ve diğer antrasiklin türevlerinin lipozom ve PEG ile kaplanması, tümör dokusuna olan seçici tedavinin gerçekleşmesini sağlamıştır. Bizim çalışmamız da bu sonucu desteklemektedir.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, DOX'un lipoze ve pegile-lipoze formlarının epitelial mezenkimal geçişi önlemede etkili olduğu, tümör hücrelerinde DNA hasarını arttırdığı, nekrotik hücre ölümüne sebebiyet verdiği, antioksidan kapasite üzerinde etkili olduğu ve sistemik olarak lipit peroksidasyonda azalmaya neden olduğu görülmektedir. Bu anlamda, çalışmamızdan elde edilen verilerin, DOX'un toksik etkilerinden, karaciğer, böbrek ve kalp gibi hayati organları koruyup korumayacağının tespit edilmesine katkı sağlayacağı açıktır. Bu veriler dikkate alındığında, hazırlamış olduğumuz farklı formülasyonlardaki DOX molekülünün tümör bölgesine seçici bir şekilde gönderildiği sonucuna varmış bulunuyoruz. Bizim çalışmamızın ileriki dönemlerde yapılacak çalışmalara faydalı olacağı ve ışık tutacağı konusunda büyük bir öneme sahiptir.

SONUÇLAR

1. Işık mikroskobik inceleme sonucunda tüm deney gruplarında Ehrlich asit tümör modelinin oluştuğu belirlendi.

2. Hematoksilen-Eosin boyama bulguları değerlendirildiğinde, MT ve DT gruplarında yüksek yoğunlukta gözlemlenen meme tümör hücrelerinin, DLT ve DLPT gruplarında daha az yoğunlukta oldukları görüldü. Bu gruplarda gözlemlenen anjiogenesis imflamasyonun bir göstergesi, nekrotik alanlar ise tümör hücrelerinin ölümünün nekroz aracılığı gerşekleştiği şeklinde yorumlandı. Nekrotik alanların bu gruplarda daha yoğun görülmesi, DOX'un lipoze ve pegile-lipoze formlarının daha etkili olabileceğinin göstergesi olarak kabul edildi. Pasif hedefleme sonucu DOX'un tümör dokusu üzerindeki etkinliğinin daha fazla olduğu sonucuna varıldı.

3.İmmünohistokimyasal inceleme sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde en yüksek vimentin immünreaktivitesi MT grubunda gözlendi. Vimentin immünreaktivitesi skorlandığında, yüksek aktiviteden düşüğe doğru sıralama, MT>DT>DLT>DLPT olacak şekilde belirlendi. Bu sonuç DOX'un lipoze ve pegile-lipoze formlarının, epitelial mezenkimal geçişi yavaşlattığı şeklinde yorumlandı. Vimentin ekspresyon sonuçlarının immünohistokimyasal sonuçlar ile uyumlu olduğu Vimentin ekspresyon düzeyinin aynı doğrultuda azalış gösterdiği belirlendi ($p<0.01$).

4. En yüksek TOP2A immünreaktivitesinin DLT grubunda olduğu tespit edildi. TOP2A immünreaktivitesi skorlandığında sonucun DLT>DLPT>DT>MT şeklinde olduğu belirlendi. TOP2A ekspresyon sonuçlarının bu bulgular ile paralellik gösterdiği görüldü ($p<0.01$). Bu sonuçlar, DOX'un lipoze ve pegile-lipoze formlarının dokudaki birikimin daha

fazla olduğu ve sebeple tümör hücrelerinde daha fazla DNA hasarına yol açtığı şeklinde değerlendirildi.

5. MT grubu ile karşılaştırıldığında DT grubunda SOD ekspresyon düzeyin azaldığı ($p<0.01$), DLT ve DLPT gruplarında ise ekspresyon düzeyinin arttığı tespit edildi ($p<0.01$).

MT grubu ile karşılaştırıldığında CAT ekspresyon düzeyinin DT, DLT ve DLPT gruplarında arttığı ($p<0.01$) ancak DLT ve DLPT arasında bir farkın bulunmadığı belirlendi.

MT grubuna kıyasla DT, DLT ve DLPT gruplarında GSH ekspresyonunun arttığı görüldü ($p<0.01$). En yüksek ekspresyon düzeyi DLPT grubunda belirlendi.

Antioksidan enzimler ve GSH ekspresyon düzeylerindeki bulgular, DOX'un lipoze ve pegile-lipoze formlarının, dokuda antioksidan kapasiteyi arttırıcı etki gösterdiklerini ve antitümör aktivite üzerine daha etkili olduklarını kanıtladı.

6. MT, DT, DLT, DLPT gruplarında, kontrol grubu ile kıyaslandığında, plazma MDA düzeyinin arttığı belirlendi ($p<0.05$). En yüksek plazma MDA düzeyi DT grubunda belirlendi ve bu sonuç, DOX'un sistemik olarak lipit peroksidasyon üzerinde ki olumsuz etkisi olarak yorumlandı.

DLT, DLPT grupları plazma MDA düzeyleri, DT grubu plazma MDA düzeyi ile karşılaştırıldığında azalmış ($p<0.05$) olarak tespit edildi ve bu durum DOX'un lipoze ve pegile-lipoze formlarının sistem üzerindeki koruyucu etkisi ile ilişkilendirildi.

DLT ve DLPT grupları arasında plazma MDA düzeyleri açısından bir fark görülmedi ($p>0.05$).

Antioksidan enzim ve topoizomeraz ekspresyonlarında MT<DT<LIP<PEG yönünde anlamlı bir artış, vimentin ekspresyonunda anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0.01$). MDA değerlerinde Kontrol<MT<DT gruplarına doğru anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0.05$). DLT, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artmış ($p<0.05$), DT'ye kıyasla azalmıştır ($p<0.05$). DLPT grubunun değeri kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artmış, MT ve DT'ye kıyasla azalmıştır ($p<0.05$).

ÖZET

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve günümüzde kanser ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Mevcut tedavi yöntemi olarak kullanılan doksorubisin, solid ve likit tümörlerde sıklıkla kullanılan antrasiklin grubuna ait bir kemoterapotik ajandır. Ancak bu tedavi yönteminin sebep olduğu yan etkiler nedeniyle yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Nanomateryaller, nano boyutta olmaları, hücre içerisine kolayca girebilmeleri, mononüklear fagositik sistem tarafından fark edilmemeleri nedeniyle bu alanda umut vaat edici alternatifler olarak görülmektedirler.

Bu çalışma kapsamında, kontrol, Meme-Tümör, Doksorubisin-Tümör, Doksorubisin-Lipozom-Tümör ve Doksorubisin-Lipozom-PEG-Tümör grubu (n=8) olmak üzere, kontrol grubu dışındaki tüm gruplara 200 µL Ehrlich asit tümör hücresi subkutan olarak sol bacağa enjekte edilerek solid meme tümör modeli oluşturuldu. Doksorubisin'in, serbest, lipoze ve lipoze-pegile edilmiş farklı formülasyonlarının, meme tümör modelinde vimentin, topoizomeraz ve antioksidan enzim ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırıldı. Çalışma kapsamında deney gruplarına ip. olarak 1, 3, 5, 7, 9. Günlerde farklı formülasyonlardaki doksorubisin uygulandı (0.18 mg/mL). 10. günün sonunda gruplar anestezi altında sakrifiye edildi. Tümör dokuları ışık mikroskobu çalışmaları ve gen ekspresyon çalışmaları için alındı. Süperoksit dismutaz, Katalaz, Glutatyon, Vimentin ve Topoizomeraz 2A ekspresyon düzeyleri qRT-PCR metodu ile saptandı. Vimentin, Topoizomeraz 2A immünreaktiviteleri belirlendi ve plazma MDA düzeyleri ölçüldü.

Doksorubisin'in lipoze ve pegile lipoze formülasyonlarının, tümör dokusunda antioksidan kapasite üzerine etki ettiği belirlendi. Doksorubisin-Tümör grubu ile kıyaslandığında Süperoksit dismutaz, Katalaz ve Glutatyon ekspresyon düzeylerinin arttığı

görüldü ($p<0.01$). Vimentin ekspresyon seviyesinin azaldığı, Topoizomeraz 2A ekspresyon seviyesinin ise artarak nekrotik hücre ölümüne sebep olduğu belirlendi ($p<0.01$). Bu gruplarda plazma MDA düzeyleri, hem meme tümör grubundan hem de Doksorubisin-Tümör grubundan daha düşük olarak tespit edildi ($p<0.05$).

Anahtar kelimeler: Doksorubisin, meme kanseri, vimentin, topoizomeraz, antioksidan kapasite

EXAMINATION OF EFFECTS OF DIFFERENT FORMS OF DOXORUBİCİN ON VIMENTIN, TOPOISOMERASE AND ANTIOXIDANT ENZYME EXPRESSIONS IN EXPERIMENTAL BREAST TUMOR MODEL

SUMMARY

Breast cancer is the most common type of cancer in women and is now one of the leading causes of death from cancer. Doxorubicin, which is used as the current treatment method, is a chemotherapeutic agent belonging to the anthracycline group which is frequently used in solid and liquid tumors. However, new treatment methods are investigated because of the side effects caused by this treatment method. Nanomaterials are considered to be promising alternatives in this field because they are nano-sized, can easily penetrate into the cell, and are not recognized by the mononuclear phagocytic system.

In this study, 200 μL of Ehrlich acid tumor cells were injected to left leg subcutaneously to all groups except control, including Breast-Tumor, Doxorubicin-Tumor, Doxorubicin-Liposome-Tumor and Doxorubicin-Liposome-PEG-Tumor group (n = 8) in order to create a solid breast tumor model. The effects of different formulations of doxorubicin on free, lipose and lipose-pegylated vimentin, topoisomerase and antioxidant enzyme expression in breast tumor model were investigated. Under the scope of the study doxorubicin in different formulations was treated (0.18 mg / mL) with single ip. İnjection on day 1, 3, 5, 7, 9. At the end of the 10th day, the groups were sacrificed under anesthesia.

Tumor tissues were taken for light microscopy studies and gene expression studies. Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione, Vimentin and Topoisomerase 2A expression levels were determined by qRT-PCR method. Vimentin, Topoisomerase 2A immunoreactivities were determined and plasma MDA levels were measured.

Liposomal and pegylated liposome formulations of doxorubicin were found to affect antioxidant capacity in tumor tissue. Superoxide dismutase, catalase and glutathione expression levels were observed to increase compared to doxorubicin-tumor group ($p < 0.01$). It was determined that Vimentin expression level decreased and topoisomerase 2A expression level increased to cause necrotic cell death ($p < 0.01$). Plasma MDA levels in these groups were determined to be lower than both breast tumor group and Doxorubicin-Tumor group ($p < 0.05$).

Key words: Doxorubicin, breast cancer, vimentin, topoisomerase, antioxidant capacity

KAYNAKLAR

1. Dünya Sağlık Örgütü, Kanser 2008;297.

2. Gutermuth J, Audring H, Voit C, Haas N. Primarycarcinoma of ectopic axillary breast tissue. J Eur Acad Dermatol Venereol 2006;20:217-21.

3. Schmidt H. Supernumerary nipples: prevalence, size, sex and side predilection a prospective clinical study. Eur J Pediatr 1998;157:821-3.

4. Scanlan KA, Propeck PA. Accessory breast tissue in an unusual location. AJR Am J Roentgenol 1996;166:339-40.

5. Loukas M, Clarke P, Tubbs RS, Accessory breasts : a hastorical and current perspective. Am Surg 2007;73:525-8.

6. Marshall MB, Moynihan JJ, Frost A, Evans SRT. Ectopic breast cancer: case report and literatüre review. Surg Oncol 1994;3(5):295-304.

7. Page RN, Dittrich L, King R, Boulos F, Page DL. Syringomatous adenoma of the nipple occurring within a supernumerary breast: a case report. J Cutan Pathol 2009;36:1206-9.

8. https://www.merck.com/mmhe/sec22/ch251/ch251f.html Erişimtarihi: 16.03.2015

9. Rousset-Jablonski C, Gompel A. Screening fr familial cancer risk: Focus on breast cancer. Maturitas 2017;105:69-77.

10. Demir F, Narin F, Akgun H, Üzüm K, Saraymen R, Baykan A ve ark. Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Kardiyotoksisite Üzerine Melatoninin Etkisi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2004;47:260-8.

11. Mo J. A noveltheory: biological processes mostly involve twotypes of mediators, namely general and specificmediators Endogenous small radical ssuch as superoxide

andnitricoxide may play a role of general mediator in biological processes. MedHypotheses 2005;65(4):728-35.

12. Monstrey SJ, Mullick P, Narayanan K, Ramasastry SS. Hyperbaric oxygen therapy and free radical production: an experimental study in doxorubicin (adriamycin) extravasation injuries. Ann Plast Surg. 1997;38(2):163-8.

13. Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2011;31(2):137-150.

14. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol. 2004;142(2):231-55.

15. Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. Doxorubicin-DNA AdductsInduce a Non-Topoisomerase II–Mediated Form of Cell Death. Cancer Res 2006;66(9):4863-71.

16. Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P et al. Transactivation of vimentinby beta-catenin in human breast cancer cells. Cancer Res 2003;63(10):2658-64.

17. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wulfing P, VanDiest PJ et al. Theorigin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? J Pathol 2005;206(4):451-7.

18. Ishida T, Ichihara M, Wang X, Yamamoto K, Kimura J, Majima E et al. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. J Controlled Release 2006;112(1):15–25.

19. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. Meta 2012;2:303-36.

20. Gabbia D, Dall'Acqua S, Di Gangi LM, Bogialli S, Caputi V, Albertoni L et al. The phytocomplex from Fucus vesicilosus and Ascophylum nodosum controls postprandial plasma glucose levels: an in vitro and in vivo study in a Mouse model of NASH. Mar Drugs 2017;15(2):41.

21. Catanzaro D, Rancan S, Orso G, Dall'Acqua S, Brun P, Giron MC. et al. Boswellia serrata preserves intestinal epithelial barrier from oxidative and inflammatory damamge. PLoS One 2015;10(5).

22. Dall'Acqua S, Catanzaro D, Cocetta V, Igl N, Ragazzi E, Giron MC et al. Protective effects of taraxasterol 3-O-myristate and arnidiol 3-O-myristate isolated from Calendula officinalis on epithelial intestinal barrier. Fitoteapia 2016;109:230-5.

23. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. 2003;66(7):1022-37.

24. Wang H, Khor OO, Shu L, Su Z, Fuentes F, Lee JH et al. Plants against cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. Anticancer Agents Med. Chem. 2012;12(10):1281-305.

25. Anticancer Agents from Natural Products. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ (Eds.). Bioscience, Physical Sciences 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2011. p.1-785.

26. Bailon-Moscoso N, Cevallos-Solorzano G, Romero-Benavides JC, Ramirez-Orellana MI. Natural compounds as modulators of cell cycle arrest: application for anticancer chemotherapies. Curr. Genomics 2017;18(2):106-31.

27. Catanzaro D, Ragazzi E, Vianello C, Caparrotta L, Montopoli M. Effect of quercetin on cell cycle and cyclin expression in obarian carcinoma and osteosarcoma cell lines. Nat. Prod. Commun. 2015;10(8):1365-8.

28. Casarin E, Dall'Acqua S, Smejkal K, Slapetova T, Innocenti G, Carrara M. Molecular Mechanisms of Antiproliferative Effects İnduced by Schisandra-derived ddibenzocyclooctadiene lignans (+)-deoxyschisandrio and (-)-gomisin N in human tumor cell lines. Fitoterapia 2014;98:241-7.

29. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. Curr. Med. Chem. 2009;16:3267-85.

30. Malla S, Niraula NP, Singh B, Liou K, Kyung Sohng JK. Limitations in doxorubicin production from Streptomyces peucetius. Microbiol. Res. 2010;165:427-35.

31. Speelmans G, Staffhorst RWHM, De Kruijff B, De Wolf FA. Transport studies of doxorubicin in model membranes indicate a difference in passive diffusion across and binding at the inner leaflets of the plasma membrane. Biochemistry 1994;33:13761-8.

32. Şentürk N, Top A. PEG-peptide conjugate containing cathepsin B degradation unit as a doxorubicin carrier system. Turk J Chem 2018;42:385-400.

33. Perez-Arnaiz C, Busto N, Leal JM, Garcia B. New insights into the mechanism of th DNA/doxorubicin interaction. J.Phys. Chem. B. 2014;118:1288-95.

34. Garnier-Suillerot A, Gattegno L. İnteraction of adriamycin with human erythrocyte mebranes. Role of the negatively charged phspholipids. Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 1988;936:50-60.

35. Bandak S, Czejka M, Schüller J. Schüller. In vitro and in vivo binding of epirubicin to red blood cells and human plasma proteins. Z Naturforsch [C] 1994;49:483-8.

36. Szwarocka A, Robak T, Krykowski E, Jozwiak Z. İnteraction of anhracyclines with human erythrocytes at hyperthermic temperature. İnt J Pharm 1996;135:167-76.

37. Fraczkowska K, Bacia M, Przybylo M, Drabik D. Kaczorowska A, Rybka J et al. Alterations of biomechanics in cancer and normal cells induced by doxorubicin. Biomed pharmacother 2018;97:1195-203.

38. Gammazza AM, Campanella C, Barone R, Bavisotto CC, Gorska M, Wozniak M et al. Doxorubicin anti-tümor mechanisms include Hsp60 post-translational modifications leading to the Hsp60/p53 complex dissociation and instauration of replicative senescence. Cancer Lett 2017;385:75-86.

39. Hajian R, Tayebi Z, Shams N. Fabrication of an electrochemical sensor for determination of doxorubicin in human plasma and its interaction with DNA. J Pharm Anal 2017;7:27-33.

40. Alves AC, Nunes C, Lima J, Reis S. Daunorubicin and doxorubicin molecular interplay with 2D membrane models. Colloids Surf B Biointerfaces 2017;160:610-8.

41. Mastria EM, Cai LY, Kan MJ, Li X, Schaal JL, Fiering S et al. Nanoparticle formulation improves doxorubicin efficacy by enhancing host antitumor immunity. J Control Release 2018;269:364-73.

42. Abubakar II, Tillmann T, Banerjee A. Mortality and Causes of Death Collaborators, Global regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Gobal Burden of Disease Study 2013. Lancet 2015;385(9963):117-71.

43. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requiremets of cell proliferation. Science 2009;324:1029-33.

44. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144:646-74.

45. Morandi A, Indraccolo S. Linking metabolic reprogramming to therapy resistance in cancer. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2017;1868(1):1-6.

46. Montopoli M, Bellanda M, Lonardoni F, Ragazzi E, Dorigo P, Froldi G et al. “Metabolic reprogramming” in ovarian cancer cells resistanta to cisplatin. Curr Cancer Drug Targets 2011;11(2):226-35.

47. Catanzaro D, Gaude E, Orso G, Giordano C, Guzzo G,Rasola A et al. Inhibition of glucose-6-phosphate ehydrogenase sensitizes cisplatin resistanta cells to death. Oncotarget 2015;6(30):30102-14.

48. Catanzaro D, Gabbia D, Cocetta V, Biagi M, Ragazzi E, Montopoli M et al. Silybin counteracts doxorubicin resestance by inhibiting GLUT1 expression. Fitoterapia 2018;124:42-8.

49. Ma Y, Yang L, Ma J, Lu L, Wang X, Ren J et al. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2017;1863(8):1904-11.

50. Pieniazek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwozdzinski K, Koceva-Chyla A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. Adv Med Sci 2013;58(1):104-11.

51. Wang Z, He Q, Zhao W, Luo J, Gao W. Tumor-homing, ph- and ultrasound-responsive polypeptide-doxorubicin nanoconjugates overcome doxorubicin resestance in cancer therapy. J Control Release 2017;264:66-75.

52. Kirkham AA, Shave RE, Bland KA, Bovard JM, Eves ND, Gelmon KA et al. Protective effects of acute exercise prior to doxorubicin on cardiac function of breast cancer patients: a proof-of-concept RCT. İnt J Cardiol 2017;245:263-70.

53. Liu L, Zhao YF, Han WH, Chen T, Hou GX, Tong XZ. Protective effect of antioxidant on renal damage caused by doxorubicin chemotherapy in mice with hepatic cancer. Asian Pac J Trop Med 2016;9(11):1101-4.

54. Kumral A, Giriş M, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Türkoğlu Ü et al. Effect of live leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. Pathophysiology 2015;22(2):117-23.

55. Zhang Y, Xu Y, Qi Y, Xu L, Song S, Yin L et al. Protective effects of dioscin against doxorubicin-induced nephrotoxicity via adjusting FXR-mediated oxidative stress and inflammation. Toxicology 2017;378:53-64.

56. Cowens JW, Creawen PJ, Greco WR, Brenner DE, Tung Y, Ostro M et al. Initial clinical (phase I) trial of TLC D-99 (doxorubicin encapsulated in liposomes). Cancer Res. 1993;53:2796-802.

57. Rahman A, Treat J, Roh JK, Potkul LA, Alvord WG, Forst D et al. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of liposome-encapsulated doxorubicin. J Clin Oncol 1990;8(6)1093-100.

58. Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. Trends Pharmacol Sci 1994;15:215-20.

59. Papahadjopoulos D, Gabizon A. Targeting of liposomes to tumor cells in vivo. Ann N Y Acad Sci 1987;507:64-74.

60. Allen TM, Hansen C, Rutledge J. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. Biochim Biophys Acta 1989;981(1):27-35.

61. Gabizon A, Goren D, Barenholz Y. Investigations on the antitumor efficacy of liposome-associated doxorubicin in murine tumor models. Isr J Med Sci 1988;24:512-7.

62. Mayer LD, Tai LC, Ko DS, Masin D, Ginsberg RS, Cullis PR et al. Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. Cancer Res 1989;49(21):5922-30.

63. Gabizon AA. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. Cancer Res 1992;52(4):891-6.

64. Parr MJ, Masin D, Cullis PR, Bally MB. Accumulation of liposomal lipid and encapsulated doxorubicin in murine Lewis lung carcinoma: the lack of beneficial effects by coating liposomes with poly(ethylene glycol). J Pharmacol Exp Ther 1997;280(3):1319-27.

65. Mayer LD, Cullis PR, Bally MB. Designing therapeutically optimized liposomal anticancer delivery systems: Lessons from conventional liposomes. In: Lasic DD, Papahadjopoulos D (Eds.) Medical Applications of Liposomes Amsterdam:Elsevier; 1998, p.231-57.7.

66. Hong RL, Huang CJ, Tseng YL, Pang VF, Chen ST, Liu JJ et al. Direct Comparison of Liposomal Doxorubicin with or without Polyethylene Glycol Coating in C-26 Tumor-bearing Mice. Clin Cancer Res 1999;5(11):3645-52.

67. Gabizon A, Chemla M, Tzemach D, Horowitz AT, Goren D. Liposome longevity and stability in circulation: effects on the in vivo delivery to tumors and therapeutic efficacy of encapsulated anthracyclines. J Drug Target 1996;3(5):391-8.

68. Pudkasam S, Tangalakis K, Chinlumprasert N, Apostolopoulos V, Stojanovska L. Breast cancer and exercise: The role of odipositiy and immune markers. Maturitas 2017;105:16-22.

69. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B et al. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 1990;250:1684-9.

70. He YD, Friend SH. Microarrays – the 21st century divining rod. Nat Med 2001;7:658-9.

71. Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer KJ, Fritzsche F, Gansukh T, Pahl S, et al. Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. J Clin Pathol 2006;59:403-9.

72. Bruyere O, Bergmann P, ECavalier E, Gielen E, Goemaere S, Kaufman JM et al. Skeletal health in breast cancer survivors. Maturitas 2017;105,78-82.

73. Kenny LM, Orsi F, Adam A. İnterventional radiology in breast cancer. Breast 2017;35:98-103.

74. Meo SA, Suraya F, Jamil B, Roug FA, Meo AS, Sattar K et al. Association of ABO and Rh blood groups with breast cancer. Saudi j biol sci 2017;24:1609-13.

75. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2010;120(2):293-308.

76. Lal S, McCart Reed AE, de Luca XM, Simpson PT. Molecular signatures in breast cancer. Methods 2017;131:135-46.

77. Karayurt Ö. Meme kanseri
http://www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/meme_kanseri.pdf

78. Ramsay DT, Kent JC, Hartmann RA, Hartmann PE. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. J Anat 2005; 206(6):525-32.

79. Türkseven A. Meme kanserinde yayılım korunma ve erken tanı.
www.saglik.gov.tr/extras/ birimler/ksdb/kkmme/MK_Bel_Yay_Kor_ET-2.ppt

80. Meme anatomisi http://ekosut.com/memeanatomi.htm

81. Wang ZJ, Xu CM, Song ZB, Wang M, Liu QY, Jiang P et al. Vimentin modulates infectious porcine circovirus type 2 in PK-15 cells. Virus Res 2018;243:110-8.

82. Rile N, Liu Z, Gao L, Qi J, Zhao M, Xie Y et al. Expression of Vimentin in hair follicle growth cycle of inner Mongolian Cashmere goats. BMC Genomics 2018;19(1):38

83. Tanaka K, Tokunaga E, Inove Y, Yamashita N, Saeki H, Okano S et al. Impact of expression of vimentin and axl in breast cancer. Clin Breast Cancer 2016;16(6):520-6.

84. Yamashita N, Tokunag E, Kitao H, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S et al. Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2013;139:739-46.

85. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cell Mol Life Sci 2011;68:3033-46.

86. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. Oncogene 2011;30(12):1436-48.

87. Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. Proc Natl Aca Sci U S A 2010;107(3):1124-9.

88. Lou R, Zhou Z, Yu W, Xia Y, Zi X. CPEB4 promotes cell migration and invasion via upregulating vimentin expression in breast cancer. Biochem Biophys Res Commun 2017;489(2):135-41.

89. Bates AD, Maxwell A . DNA topology: Topoisomerases keep it simple. Curr Biol 1997;7(12):778-81.

90. Champoux JJ. DNA Topoisomerases: Structure, function, and mechanism. Annu Rev Biochem 2001;70(1):369-413.

91. Jeon KH, Yu HB, Kwak SY, Kwon Y, Na Y. Synthesis and topoisomerases inhibitory activity of heteroaromatic Chalcones. Bioorg Med Chem 2016;24(22):5921-8

92. Cumming J, Smyth JF. DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. Ann Oncol 1993;4(7):533-43.

93. Romero A, Caldes T, Diaz-Rubio E, Martin M. Topoisomerase 2 alpha: a real predictor of anthracycline efficacy? Clin Transl Oncol 2012(3);14:163-8.

94. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S,Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. J Biol Chem 1985;260(27):14873-8.

95. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. Chem Biol 2010;17(5):421-33.

96. Weydert CJ, Waugh TA, Ritchie JM, Iyer KS, Smith JL, Li L et al. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breastcancer growth. Free Radic Biol Med 2006;41:226-37.

97. Li N, Oberley TD, Oberley LW, Zhong W. Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. Prostate 1998;35(3):221-33.

98. Zhao Y, Xue Y, Oberley TD, Kiningham KK, Lin SM, Yen HC et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis nodel. Cancer Res 2001;61:6082-8.

99. Cullen JJ, Weydert C, Hinkhouse MM, Ritchie J, Domann FE, Spitz D et al. The role of maganese superoxide dismutase in the growth of poncreatic adenocarcinoma. Cancer Res 2003;63(6):1297-303.

100. Avraham KB, Schickler M, Sapoznika D, Yarom R, Groner Y. Down's syndrome: abnormal neuromuscular junction in tongue of tronsgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase. Cell 1988;54(6):823-9.

101. Groner Y, Elroy-Stein O, Avraham KB, Schickler M, Knobler H, Minc-Golomb D et al. Cell damage by excess CuZnSOD and Down's syndrome. Biomed Pharmacother 1994;48(5-6):231-40.

102. Rujito L, Mulatsih S, Sofro AS. Status of superoxide dismutase in transfusion dependent thallassaemia. N Am J Med Sci 2015;7(5):194-8.

103. Gu Q, Feng T, Cao H, Tang Y, Ge X, Luo J et al. HIV-TAT mediated protein transduction of Cu/Zn-superoxide dismutase-1 (SOD1) protects skin cells from ionizing radiation. Radiat Oncol 2013;8:253.

104. Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochim Biophys Acta 2010;1804(2):245-62.

105. Miller AF. Superoxide dismutases ancient enzmes and new insights. FEBS Lett 2012;586(5):585-95.

106. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M. et al. Superoxide dismutases and superoxide reductases. Chem Rev 2014;114(7):3854-918.

107. Lewandowski L, Kepinska M, Milnerowicz H. Inhibition of copper – zinc supperoxide dismutase activity by selected enviromental xenobiotics. Environ Toxicol Pharmacol 2018;58:105-13.

108. Zeinali F, Homaei A, Kamrani E. Identification and kinetic sharacterization of a novel superoxide dismutase from Avicennia marina: An antioxidant enzyme with unique features. Int J Biol Macromol 2017;105:1556-62.

109. Krych-Madej J, Gebicka L. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetic studies. J Inorg Biochem 2017;171:10-7.

110. Koch LG, Britton SL. Aerobic metabolism underlies compexity and capacity. J Physiol 2008;586(1):83-95.

111. Storey KB. Adventures in oxygen metabolism. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2004;139(3):359-69.

112. Kodydkov J, Vavrova L, Kocik M, Zak A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. Folia Biol (Praha) 2014;60(4):153-67.

113. Jena BS, Patnaik BK. Changesin catalase activity and its thermolability in liver and kidneys of ageing male garden lizard. Gerontology 1992;38(5):252-7.

114. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. Free Radic Biol Med 2015;87:84-97.

115. Ceballos-Picot I, Nicole A, Clement M, Bourre JM, Sinet PM. Agerelated changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. Mutat Res 1992;276(3-6): 281-93.

116. Bolzan AD, Biachi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities inhuman blood: influence of sex, age and cigarette smoking. Clin Biochem 1997;30(6):449-54.

117. Loewen PC, Switala J, Triggs-Raine BL. Catalases HPI and HPII in Escherichia coli are induced independently. Arch Biochem Biophys 1985(1);243:144-9.

118. Day WA Jr, Sajecki JL, Pitts TM, Joens LA. Role of catalase in Campylobacter jejuni intracellular survival. Infect Immun 2000;68(11):6337-45.

119. Nguyen DT, Le TH, Bui TT. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N - (tetra – O – acetyl – β – D - galactopyranosyl) thiosemicarbazide. Eur J Med Chem 2013;60:199-207.

120. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. Cell Mol Life Sci 2004;61(2):192-208.

121. Nocchi S, Björklund S, Svensson B, Englom J, Ruzgas T. Electrochemical monitoring of native catalase activity in skin using skin covered oxygen electrode. Biosens Bioelectron 2017;93:9-13.

122. Li G, Li J, Hao R, Guo Y. Activation of catalase activity by a peroxisome-localized small heat shock protein Hsp17.6CII. J Genet Genomics 2017;44(8):395-404.

123. Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R. et al. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. Cell 1997;90(6):1085-95.

124. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakame M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. J Biol Chem 2000;275(42):32775-82.

125. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr 2004(3);134:489-92.

126. Rae CD, Williams SR. Glutathione in human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy. Anal Biochem 2017;529:127-43.

127. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Annu Rev Biochem 1983;52:711-60.

128. Oakley A. Glutathione transferases: A structural perspective. Drug Metab Rev 2011;43(2):138-51.

129. Board PG, Menon D. Glutathione transferases regulators of cellular metabolism and physiology. Biochim Biophys Acta 2013;1830(5):3267-88.

130. Eken A. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri. J Clin Anal Med 2017;160-9.

131. Yadava P, Singhb R. A short review on nanotechnology – The new trend in the medical field. J Adv Scientific Res 2012;3(1):13-6.

132. Jain KK. Nanomedicine: Application of nanobiotechnology in medical practice. Med Princ Prac 2008;17(2):89-101.

133. Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. The emmerging nanomedicine landscape. Nat Biotechnol 2006;24(10):1211-7.

134. SCENIR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) ‘’Scientific basis for the definition of the term nanomaterial’’ Pre-consultation opinion, 6 july (2010).

135. Marcato PD, Duran N. New aspects of nanopharmaceutical deliverysystems. J Nanosci Nanotechnol 2008;8(5):2216-29.

136. Torchilin VP. Multifunctional pharmaceutical nanocarriers: Development of the concept. In: Torchilin V (Eds.). Fundamental Biomedical Technologies, Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. New York: Springer; 2008. p.1-32.

137. Zırh-Gürsoy A. Giriş. Zırh-Gürsoy A (Editörler). Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2014. s.1-7.

138. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under microscope. Mol Pharm 2011;8(6):2101-41.

139. Ferreira SA, Gama FM, Vilanova M. Polymeric nanogels as vaccine deliverysystems. Nanomedicine 2013;9(2):159-73.

140. Kim S, Kim JH, Jeon O, Kwon IC, Park K. Engineered polymers for advanced drug delivery. Eur J Pharm Biopharm 2009;71(3):420-30.

141. Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for drug delivery systems. Annu Rev Chem Biomol Eng 2010;1:149-73.

142. Şenel S. Nanotaşıyıcılarda kullanılan polimerler. Zırh-Gürsoy A (Editörler). Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2014. s.9-19.

143. Fattal E, Hillaireau H, Mura S, Nicolas J, Tsapis N. Targeted delivery using biodegredable polymeric nanoparticles. In: Siepmann J, Siegel RA, Rathbone MJ (Eds.). Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery, Springer, Springer New York Dorchrecht Deidelberg London; 2012. p.255-88.

144. Hasırcı N. Polimer-ilaç ve polimer-protein konjügatları. Zırh-Gürsoy A (Editörler). Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2014. s.151-65.

145. Jatzkewitz H. Incorporation of physiologically-active substances into a colloidal blood plasma substitute. I. Incorporation of mescaline peptide into polyvinylpyrrolidone. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1954;297(3-6):149-56.

146. Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. Journal of Polymer Science: Polymer Symposia 1975;51:135-53.

147. Kopecek J. Polymer-drug conjugates: Origins, progress to date and future directions. Adv Drug Deliv Rev 2013;65(1):49-59.

148. Duncan R. Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. Curr Opin Biotechnol 2011;22(4):492-501.

149. Li C, Price JE, Milas L, Hunter NR, Ke S, Yu DF. ve ark. Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. Clin Cancer Res 1999;5(4):891-7.

150. Banerjee SS, Aher N, Patil R, Khandare J. Poly(ethylene glycol)-prodrug conjugates: concept, design, and applications. J Drug Deliv 2012;2012:1-17.

151. Veronese FM, Pasut G. Pegylation, succesful approach to drug delivery. Drug Discov Today 2005;10(21):1451-8.

152. Abuchowski A, Van Es T, Palczuk NC, Davis FF. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. J Biol Chem 1977;252(11):3578–81.

153. Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, Van Es T, Davis FF. Effect of covalentattachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. J Biol Chem 1977; 252(11):3582–6.

154. Bayındır ZS, Yüksel N. Pegilasyon: PEG konjugatlarının hazırlanması ve uygulamaları. Ankara Ecz. Fak. Derg. 2007;36:249-66.

155. Qiu LY, Bae YH. Polymer Architecture and Drug Delivery. Pharm Res 2006;23(1):1-30.

156. Hunter, T. Protein kinases and phosphatases; the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. Cell 1995:80(2):225–36.

157. Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. Adv Drug Deliv Rev 2002;54:459-76.

158. Ho DH, Wang CY, Lin JR, Brown N, Newman RA, Krakoff IH. Polyethylene glycol-L-asparaginase and L-asparaginase studies in rabbits. Drug Metab Dispos 1988;16(1):27-9.

159. Tanaka H, Satake-Ishakawa R, Ishakawa M, Matsuki S, Asano K. Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to poly(ethylene glycol) in rats. Cancer Res 1991;51(14):3710-4.

160. Tomlinson R, Heller J, Brocchini S, Duncan R. Polyacetal doxorubicin conjugates designed for pH-dependent degradation. Bioconjug Chem 2003;14(6):1096-106.

161. Gravert DJ, Janda KD. Organic Synthesis on Soluble Polymer Supports: Liquid-Phase Methodologies. Chem Rev 1997;97(2):489-510.

162. Haris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nat Rev Drug Discov 2003;2(3):214-21.

163. Alcantar NA, Aydil ES, Israelachvili JN. Polyethylene glycol coated biocampatible surfaces. J Biomed Mater Res 2000;51(3):343-51.

164. Kodera Y, Matsushima A, Hiroto M, Nishimura H, Ishii A, Ueno T. et al. Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications. Prog Polym Sci 1998;23:1233-71.

165. Kumar GT, Prakash NJ, Laxmi N, Krishna TD. Biotechnology Based Drug Delivery By Pegilation Method. Rungta College of Pharmaceutical Sciences and Research 2011;2:95-102.

166. News RRC. Liposomes. In: Torchilin V, Weissing V (Eds.) A practical approach. 2nd ed. IRL Press. Oxford New York Tokyo 1990;1-31.

167. Kırtıl Öztop MH. Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi Akademik Gıda 2014;12(4):41-57.

168. Mozafari MR. Nanoliposomes: Preparation and Analysis. Methods Mol Biol 2010;605:29-50.

169. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol 1965;13(1):238-52.

170. Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc Natl Acad Science 1978;75(9):4194-8.

171. Jiskoot W, Teerlink T, Beuvery EC, Crommelin DJ. Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution. The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics. Pharm Weekbl Sci 1986;8(5):259-65.

172. Deamer DW. Preparation and properties of ether-injection liposomes. Ann N Y Acad Sci 1978;308:250-8.

173. Meure LA, Foster NR, Dehghani F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. AAPS PharmSciTech 2008;9(3):798-809.

174. Leosin L, Boutin O, Crampon C, Badens E. CO2/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO2: a review. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2011;377:1-14.

175. Erdoğan S. Nanolipozomlar. Zırh-Gürsoy A (Editörler). Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2014. s.53-60.

176. Jun SH, Jung SH, Seong H, Cho SH, Jeong KS, Shin BC. Polyethylene glycol-complexed cationic liposome for enhanced cellular uptake and anticancer activity. İnt J Pharm 2009;382(1-2):254-61.

177. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 1990;186:421-31.

178. Marciniak A, Szpringer E, Lutnicki K, Betowski J. Influence of thymus extract (tfx)on lıpıd peroxıdatıon ın the plasma of rats followıng thermal ınjury. Bull Vet Inst Pulawy 2003:47;231-8.

179. Çakır S, Kafadar MT, Arslan ŞN, Türkan A, Kara B, İnan A. Meme kanseri tanısı konmuş kadınlarda risk faktörlerinin güncel veriler ışığında gözden geçirilmesi. İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi 2016;2(3):186-94.

180. Hua W, Sa KD, Zhang X, Jia LT, Zhao J, Yang AG. et al. MicroRNA-139 suppresses proliferation in luminal type breast cancer cells by targeting Topoisomerase II alpha. Biochem Biophys Res Commun 2015;463:1077-83.

181. Greenhalgh TA, Symondst RP. Principles of chemotherapy and radiotherapy. Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine 2014;24(9):259–65.

182. Does A, Thiel T, Johnson N. Rediscovering biology: molecular to global perspectives. In: Learner A (Eds.). Cell Biology and Cancer, Washington; 2003;ch 13,8:1-17.

183. Kheirolomoom A, Mahakian LM, Lai CY, Lindfors HA, Seo JW, Paoli EE et al. Copper-doxorubicin as a nanoparticle cargo retains efficacy with minimal toxicity. Mol Pharm 2010;7(6):1948–58.

184. Petersen GH, Alzghari SK, Chee W, Sankari SS, La-Beck NM. Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancerefficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin. J Control Release 2016;232:255-64.

185. Xing S, Zhang X, Luo L, Cao W, Li L, He Y. et al. Doxorubicin/gold nanoparticles coated with liposomes for chemo-photothermal synergetic antitumor therapy. Nanotechnology 2018;29(40):405101.

186. Wang Y, Wanb G, Lia Z, Shi S, Chen B, Lib C. et al. PEGylated doxorubicin nanoparticles mediated by HN-1 peptide for targeted treatment of oral squamous cell carcinoma. Int J Pharm 2017;525:21-31.

187. Gazzanoa E, Rolando B, Chegaev K, Salaroglioa IC, Kopeckaa J, Pedrini I. et al. Folate-targeted liposomal nitrooxy-doxorubicin: An effective tool against Pglycoprotein-positive and folate receptor-positive tumors. J Control Release 2018;270:37-52.

188. Chen Y, Cheng Y, Zhao P, Zhang S, Li M, He C. et al. Co-delivery of doxorubicin and imatinib by pH sensitive cleavable PEGylated nanoliposomes with folate-mediated targeting to overcome multidrug resistance. Int J Pharm 2018;542(1-2):266-79.

189. Oh HR, Jo HY, Park JS, Kim DE, Cho JY, Kim PH, Kim KS. Galactosylated Liposomes for Targeted Co-Delivery of Doxorubicin/Vimentin siRNA to Hepatocellular Carcinoma. Nanomaterials (Basel). 2016;30:6(8).

190. Jafaria N, Nazeri S, Enferadi ST. Parthenolide reduces metastasis by inhibition of vimentin expression and induces apoptosis by suppression elongation factor $\alpha - 1$ expression. Phytomedicine 2018;41:67-73.

191. Yamashita N, Tokunaga E, Limori M, Inoue Y, Tanaka K, Kitao H. et al. Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer. Clin Breast Cancer 2018;18(5):1003-9.

192. Almeida D, Gerhard R, Leitão D, Davilla C, Damasceno M, Schmitt F. Topoisomerase II-alfa gene as a predictive marker of response to anthracyclines in breast cancer. Pathol Res Pract 2014;210(10):675-9.

193. Cai Y, Zhao B, Liang Q, Zhang Y, Cai J, Li G. The selective effect of glycyrrhizin and glycyrrhetinic acid on topoisomerase IIα and apoptosis in combination with etoposide on triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. Eur J Pharmacol 2017;809:87-97.

194. Li TK, Chen AY, Yu C, Mao Y, Wang H, Liu LF. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops duringoxidative stress. Genes Dev 1999;13(12):1553-60.

195. Devi GR, Allensworth JL, Evans MK, Sauer SJ. The Role of Oxidative Stress in Breast Cancer. Department of Surgery, Division of Surgical Sciences and Duke Cancer Institute, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA (1):3-14.

196. Remirez-Exposito MJ, Sanchez-Lopez E, Cueto-Urena C, Duenas B, Carrera-Gonzalez P, Navarro-Cecilia J. et al. Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-meopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy. Exp Gerontol 2014;58:34-42.

197. Tulubas F, Gurel A, Oran M, Topçu B, Çağlar V, Uygur E. The protective effects of ω3 fatty acids on doxorubicin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. Toxicol Ind Health 2015;31(7):638-44.

198. Kalaiselvi P, Pragasam V, Chinnikrishnan S, Veena CK, Sundarapandiyan R, Varalakshmi P. Counteracting adriamycin-induced oxidative stress by administration of N-acetyl cysteine and vitamin E. Clin Chem Lab Med 2005;43(8):834-40.

199. Koul A, Shubrant, Gupta P. Phytomodulatory potential of lycopene from Lycopersicum esculentum against doxorubicin induced nephrotoxicity. Indian J Exp Biol 2013;51(8):635-45.

200. Harisa GI. Benfotiamine enhances antioxidant defenses and protects against cisplatin-induced DNA damage in nephrotoxic rats. J Biochem Mol Toxicol 2013;27(8):398-405.

201. Mantawy EM, El-Bakly WM, Esmat A, Badr AM, El-Demerdash E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. Eur J Pharmacol 2014;728:107–18.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Doksorubisin yapısı....4
Şekil 2. Memenin anatomik yapısı....8
Şekil 3. Polimer-ilaç konjugatı....19
Şekil 4. Polietilenglikol molekülü yapısı....21
Şekil 5. Birinci jenerasyon amino gruplarının pegilasyonu....22
Şekil 6. Thiol reaktifi ile Pegilasyon 1, PEG maleimid 2, PEG vinil sülfon 3, PEG iyodo asetamid 4, PEG ortopiridil disülfit....23
Şekil 7. PEG'in glikoproteinlerin okside karbonhidrat kısmına eklenmesi....23
Şekil 8. Lipozomun temsili yapısı....27
Şekil 9. Ehrlich asit tümörü....33
Şekil 10a. MT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....41
Şekil 10b. MT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....41
Şekil 11a. DT grubu Hemotoksilen-Eozin boyama....42
Şekil 11b. DT grubu Hemotoksilen-Eozin boyama....42
Şekil 12a. DLT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....43
Şekil 12b. DLP grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....43
Şekil 13a. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....44
Şekil 13b. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....44
Şekil 13c. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....45
Şekil 13d. DLPT grubu Hemotoksilen- Eozin boyama....45
Şekil 14a. MT grubu Vimentin immünreaktivite....46

Şekil 14b. DT grubu Vimentin immünreaktivite 47
Şekil 14c. DLT grubu Vimentin immünreaktivite 47
Şekil 14d. DLPT grubu Vimentin immünreaktivite 48
Şekil 15a. MT grubu Top2A ile immünreaktivite 48
Şekil 15b. DT grubu Top2A immünreaktivite 49
Şekil 15c. DLT grubu Top2A immünreaktivite 49
Şekil 15d. DLPT grubu Top2A immünreaktivite 50

TABLOLAR

Tablo 1. Polimerlerin sınıflandırılması 18
Tablo 2. Bazı PEG türevleri 25
Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitlerin marka ve katalog numaraları 28
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemelerin adı ve markası 29
Tablo 5. Deney Gruplarının Sınıflandırılması 32
Tablo 6. cDNA sentez protokolü 36
Tablo 7. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları 37
Tablo 8. Lipozom, DOX-Lipozom, DOX-Lipozom-PEG çözeltilerinin lightscattering cihazından çıkan number değerleri 39
Tablo 9. Lipozom, DOX-Lipozom, PEG-DOX-Lipozom çözeltilerinin lightscattering cihazından çıkan zeta potansiyelleri 40
Tablo 10. Histolojik değerlendirme sonuçları 46
Tablo 11. Deney gruplarının SOD, CAT, GSH, VIM, TIM miktarlarının karşılaştırmalı değerleri 51
Tablo 12. Deney gruplarının MDA bulguları 51

ÖZGEÇMİŞ

15 Ekim 1981 yılında Aydın' da doğdum. İlköğretimimi Aydın Güzelhisar İlköğretim Okulu' nda tamamladıktan sonra, ortaöğretimimi Aydın Efeler İlköğretim Okulu' nda tamamladım. 1999 yılında Aydın Efeler Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi' ni bitirdim. 1999 yılında kazandığım Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldum. 2004 yılında Edirne SSK Hastanesi'nde göreve başladım. 2005 yılı nisan ayında askerlik hizmetimi yerine getirdim. 2006 yılında Edirne Devlet Hastanesi'nde eczacılık görevime devam ettim. 2009 yılında İzmir Selçuk Devlet Hastanesi' ne atandım. Orada 10 ay çalıştıktan sonra İzmir Yeşilyurt Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi' ne atandım. Daha sonra tekrar 2011 yılında Edirne Sultan I. Murat Devlet hastanesi' ne atandım ve halen buradaki görevime devam etmekteyim.

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

Oturum Sayısı: 2015/03 **Karar Tarihi: 27.03.2015**

KARAR NO: 2015.03.02

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR'ın yaptığı, Emre BAYRAM'ın yüksek lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2015/18 protokol nolu "**Doksorubisinin Farklı Formlarının Vimentin, Topoizomeraz ve Antioksidan Enzim Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Deneysel Meme Tümör Modelinde Araştırılması"** başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☑ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☑ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☑ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☑ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır