

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OVER KANSER HÜCRELERİNDEKİ ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNİ  
AŞMAYA YÖNELİK 5. JENERASYON PAMAM DENDRİMER-  
PACLITAXEL KOMPLEKSİNİN *in vitro* KULLANIMI**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Meltem KOCAMANOĞLU**

**İZMİR**

**2018**

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OVER KANSER HÜCRELERİNDEKİ ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNİ  
AŞMAYA YÖNELİK 5. JENERASYON PAMAM DENDRİMER-  
PACLITAXEL KOMPLEKSİNİN *in vitro* KULLANIMI**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Meltem KOCAMANOĞLU**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Yasemin AKÇAY**

**İZMİR**

**2018**

**Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri Sayfası**

**DEğERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

**Başkan (Danışman) : Prof.Dr. Yasemin AKÇAY**

**Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ**

**Üye : Pof.Dr. Leyla Didem KOZACI**

.....  
.....  
.....

**Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 10.07.2018**

## ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen, akademik ve kişisel gelişimim için bana yol gösteren ve güvenen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yasemin AKÇAY'a, kıymetli görüşlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ ve Sayın Doç. Dr. Emel Öykü Çetin UYANIKGİL'e, laboratuvar deneyimleri ile bu araştırmanın gerçekleştirilmesine katkıda bulunan ve bana her daim yardımcı olan Araş. Gör. Zihni Onur UYGUN ve Araş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA'ya, teknik bilgi birikimleri ile yüksek lisans tezimin araştırma süresi boyunca her danıştığım da bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Erhan CANBAY, doktora öğrencisi Mehmet GÜRDAL'a, bu aşamaya gelmemde katkıları olan tüm hocalarıma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına, eğitim hayatım boyunca beni her anlamda destekleyip yüreklendiren sevgili aileme ve biricik sevgilim Ersin KOCAMANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 16 TIP 007 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

## ÖZET

Kanser tedavisinde, kemoterapi çoklu ilaç direncinin geliştiği hücre tiplerinde çoğunlukla başarısız olmakta veya kullanılan antikanser ajanın etkinliği düşük kalmaktadır. Son yıllarda kanser hücrelerinde oluşan çoklu ilaç direncinin etkisiz hale getirilmesi için birtakım ilaç salım sistemlerine başvurulmakta ve bu alanda yapılan araştırmalar hız kazanmaktadır.

İlaç salım sistemleri kullanılarak ilacın hücre içinde kalış süresi ve dolayısıyla etkinliğinin artırılması hedeflenmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar dendrimerlerin ilaç salım sistemi olarak kullanımının etkili olabileceği doğrultusunda birtakım sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

Bu araştırmada over kanser hücrelerinde tedavi amaçlı sitotoksik etkinin, MDR-1 gen ekspresyonu ile açığa çıkan P-glikoproteininin yarattığı çoklu ilaç direncinin aşılması için 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi oluşturulmuştur.

Araştırmada MDAH-2774 endometrioid over kanseri hücre hattı ve Paclitaxel ilacına direnç kazandırılmış MDAH-2774 endometrioid over kanseri hücreleri kullanılmıştır.

Paclitaxel ilacı ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi MDAH-2774 hücrelerine sitotoksik etki yaratmaları için uygulanmıştır. MTT testi aracılığıyla bu iki molekülün sitotoksik etkileri belirlenmiştir. 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinin MDAH-2774 hücreleri üzerinde yarattığı sitotoksik etki Paclitaxel'e göre daha düşük bulunmuştur. Aradaki bu fark 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinden Paclitaxel'in salım kinetiğini anlamaya yönelik daha ayrıntılı bir araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** MDR1, Paclitaxel, PAMAM Dendrimerleri, çoklu ilaç direnci, over kanseri

## ABSTRACT

Chemotherapy is often unsuccessful in cell types developed by multidrug resistance, or the effectiveness of the anticancer agent used remains low at cancer treatment. In recent years, drug delivery systems have been resorted to inactivating the multidrug resistance gene in cancer cells, and research on this area is being accelerated.

Drug release systems are aimed at increasing the duration of the drug in the cell and therefore its efficacy. Recent research has revealed some evidence that dendrimers can be as effective as they are in the drug system.

PAMAM G5-Paclitaxel complex was established to overcome the delayed cytotoxic effect in cancer cells, the multidrug resistance caused by P-glycoprotein induced by MDR-1 gene expression in this study.

MDAH-2774 endometrioid over cancer cell line and MDAH-2774 endometrioid over cancer cells resistant to paclitaxel drug were used in the study.

The paclitaxel drug and PAMAM G5-Paclitaxel complex were applied to generate cytotoxic challenge to MDAH-2774 cells. Cytotoxic interactions of these two molecules via MTT assay. The cytotoxic effect of the PAMAM G5-Paclitaxel complex on MDAH-2774 cells was found to be lower than that of Paclitaxel. This difference supports the need for more detailed investigation into the efficacy of Paclitaxel in the PAMAM G5-Paclitaxel complex.

**Keywords:** MDR1, Paclitaxel, PAMAM Dendrimers, multidrug resistance, ovarian cancer

## İçindekiler

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. OVER KANSERİNİN RİSK FAKTÖRLERİ .....	2
2.1.1. Genetik Faktörler.....	2
2.1.2. Oral Doğum Kontrol İlacı ve Hormon Replasman Tedavisi .....	2
2.1.3. Reprodüktif Faktörler .....	3
2.1.4. Diğer Risk Faktörleri.....	3
2.2. OVER KANSER TİPLERİ .....	5
2.2.1. Seröz ve Müsinöz Borderline Tümörler.....	8
2.2.2. Over Karsinomaları.....	10
2.2.2.1. Seröz Tümörler.....	10
2.2.2.1.1. Yüksek Dereceli Seröz Karsinoma .....	10
2.2.2.1.2. Düşük Dereceli Seröz Karsinoma .....	13
2.2.2.2. Müsinöz Over Karsinoması.....	14
2.2.2.3. Berrak Hücreli Over Karsinoması .....	15
2.2.2.4. Endometrioid Over Karsinoması.....	16
2.2.2.4.1. Endometrioid Over Karsinomu Tedavi Yöntemleri.....	17
2.2.2.4.2. Epitelyal Over Karsinomalarına Yönelik Geliştirilen Kemoterapötik Tedavi Yöntemleri.....	18
2.3. Poli (amidoamin) (PAMAM) Dendrimerleri .....	25
2.3.1. PAMAM Dendrimerlerinin Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri ....	25
2.3.2. PAMAM Dendrimerlerinin Çözünürleştirme Mekanizması .....	26
2.3.3. PAMAM Dendrimerlerin Toksisitesi ve Biyodağılımı .....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	32
3.1. Gereç.....	32
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler ve Kimyasallar .....	32
3.2. Yöntem .....	34
3.2.1. 5.J PAMAM-Paclitaxel Komplekslerinin Oluşturulması.....	34

3.2.2. Fourier Transform İnfrared Spektrumu (FTIR) ile Ölçüm .....	35
3.2.3. <i>In vitro</i> Salım Kinetiği Ölçümü .....	35
3.2.4. Hücre Kültürü .....	36
3.2.4.1. Paclitaxel'in MDAH 2774 hücreleri üzerinde %50 öldürücü etki yaratan dozunun (IC <sub>50</sub> ) belirlenmesi .....	38
4. BULGULAR .....	39
4.1. Reaksiyon Ürünlerinin FTIR Sonuçları .....	39
4.2. <i>In vitro</i> Salım Kinetiği Ölçümü .....	40
4.3. MDR1 Gen Ekspresyon Düzeyleri .....	40
4.4. Sitotoksiste Testi .....	41
5. TARTIŞMA .....	46
6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	52
7. KAYNAKLAR .....	53
8. ÖZGEÇMİŞ .....	72

## Şekiller Dizini

Şekil 2.1. WHO over kanseri güncel sınıflandırması. BOT: Borderline over tümörü, MBOT: Müsinöz borderline over tümörü, BHBOT: Berrak Hücreli bordeline over tümörü, SBOT: Seröz borderline over tümörü .....	7
Şekil 3.1. IC50 dozu belirleme testinde oluşturulan deney gruplarının 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşimi.....	38
Şekil 4.1. Reaksiyon ürünlerinin FTIR sonuçları .....	39
Şekil 4.2. Reaksiyon ürünlerine Paclitaxel bağlanması ile elde edilen FTIR sonuçları.....	40
Şekil 4.3. Serbest Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi için <i>in vitro</i> salım kinetiği sonuçları.....	40
Şekil 4.4. MDAH 2774 dirençli ve dirençsiz hücre hatlarındaki MDR-1 gen ekspresyonu göstergeleri .....	41
Şekil 4.5. 24. Saatte hücre kültüründe Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.6. 48. Saatte hücre kültüründe Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.7. 72. Saatte hücre kültüründe Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.8. 24. Saatte hücre kültüründe 5.J PAMAM uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.9. 48. Saatte hücre kültüründe 5.J PAMAM uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.10. 72. Saatte hücre kültüründe 5.J PAMAM uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi .....	44

## Tablolar Dizini

Tablo 3.1. Tez projesi kapsamında kullanılan gereçlerin adları, marka ve modelleri.....	32
Tablo 3.2. Tez projesi kapsamında kullanılan kimyasalların adları, marka ve modelleri.....	33
Tablo 3.3: MDAH 2774 Hücre Hattı Özellikleri .....	36
Tablo 4.1. Spektrofotometrik ölçüm sonucu elde edilen absorbanlara göre uygulanan dozların %50 inhibitör konsantrasyonları .....	44



## Kısaltmalar Dizini

NSAID: Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

BOT: Borderline Tümörler

SBOT: Seröz Borderline Tümörler

MBOT: Müsinöz Borderline Tümörler

BHBOT: Berrak Hücreli Borderline Tümörler

DDSK: Düşük Dereceli Seröz Karsinomalar

YDSK: Yüksek Dereceli Seröz Karsinomalar

MOK: Müsinöz Over Karsinomaları

İEK: İntraepitelyal Karsinoma

BHOK: Berrak Hücreli Over Karsinomaları

EOK: Endometrioid Over Karsinomaları

ÇİD: Çoklu İlaç Direnci

MDR1: Multidrug Resistance 1

P-gp: P-glikoprotein

YİTS: Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

PLGA: Poli (laktik-ko-glikolik asit)

IC50: %50 inhibitör konsantrasyonu

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

PEG: Poli (etilen glikol)

KNT: Karbon Nanotüp

AF-1: Amfifilik fulleren

TDKNT: Tek Duvarlı Karbon Nanotüp

HKK: Hidrofilik Karbon Kümeleri

ÇDKNT: Çok Duvarlı Karbon Nanotüp

KD: Kuantum Dot

MRI: Magnetik Rezonans Görüntüleme

SPIO: Süperparamagnetik Demir Oksidi

MNP: Magnetik Nanoparçacıklar

PAA: Poli (akrilik asit)

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-thiazoli)-2,5-difenil-2Htetrazolyum bromid

DiI: 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate

DiR: DiIC<sub>18</sub>(7) (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide)

PAMAM: Poli (amidoamin)

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectrscopy

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ml: mililitre

µl: mikrolitre

µM: mikromolar

nM: nanomolar

nm: nanometre

## 1. GİRİŞ

Over kanseri jinekolojik kanserler arasında en ölümcül tip olup, kanser ilişkili kadın hasta ölümlerinde 2. sırada yer almaktadır (1).

Over kanserlerinin %70'ine geç evrede tanı konulabilmektedir. Geç evrede hastaların yalnızca % 25'i 5 yıllık yaşamda kalma süresine sahiptir (2), (3).

Over kanseri çeşitli subtiplerden meydana gelmektedir. Bunların arasında yaklaşık %90 oranında epitelyal over kanseri bulunmaktadır. Epitelyal olmayan kanser tipleri %10 oranında görülen germ hücre tümörleri ve stromal hücre tümörleridir (4). Bazı over kanserleri over dışındaki bölgelerden köken almaktadır, örneğin yüksek dereceli seröz adenokarsinomalar fallop tüpünden köken almaktayken bazı diğer over kanserleri peritonyumdan, endometrioid ve berrak hücre karsinomaları ise uterusun dışındaki endometriyum dokusundan kökenlenmektedir (5), (6). Halihazırda over tümörlerinin over yüzey epitelinde bulunan embriyonik kök hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir (7). Yüksek dereceli seröz over kanserinin oluşumunda fallop tüpü mukozasının önemi over yüzey epiteli ile karşılaştırıldığında tartışmaya açık bir konudur. Buna karşılık endometriozis ile orijinlenen tümörler endometrial kökenli olarak karşımıza çıkmaktadır. Bazı durumlarda over kanseri yerine “pelvik” veya “peritoneal” terimlerinin kullanılması önerilmektedir. Yine de literatürdeki karmaşadan dolayı, bu hastalıkların kökeninin daha iyi anlaşılana kadar over kanseri olarak adlandırılması daha doğru olarak belirtilmektedir (8). Bu bilgilerin ışığında yapılan over kanserleri sınıflandırmasında over kanserleri tubal ve ovaryan olarak iki gruba ayrılmıştır (9).

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. OVER KANSERİNİN RİSK FAKTÖRLERİ**

Over kanserinin gelişiminde genetik faktörler, yaş, postmenopozal hormon terapisi kullanımı, infertilite ve nullipariteyi içeren çeşitli risk faktörleri rol oynamaktadır (4).

#### **2.1.1. Genetik Faktörler**

Over kanser çeşitlerinde %17'lik bir oranla en çok karşılaşılan genetik bozukluk eşey hücrelerindeki BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarıdır. Epitelyal over kanserlerinin birçok subtipi, başta yüksek dereceli seröz over kanseri olmak üzere BRCA mutasyonları ile ilişkilidir. BRCA mutasyonlarının en az rastlandığı subtip müsinöz over kanseridir (5), (6), (7). Gen üzerindeki BRCA yerleşimi ve gelişen mutasyon tipi over kanseri gelişimi riskini etkileyebilmektedir. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarına sahip hastalarda over kanseri gelişme riski mutasyon tipi, nükleotid pozisyonu ve mutasyonun fonksiyonel sonucuna göre değişmektedir (8). Eşey hücrelerinin DNA onarımında görev alan RAD51C, RAD51D, BRIP1, BARD1 ve PALB2 genlerinde gerçekleşen mutasyonlar over kanseri gelişiminde rol oynamaktadır. DNA onarımında görev alan CHEK2, MRE11A, RAD50, ATM ve TP53 gibi diğer bazı genlerde bulunan kalıtsal mutasyonlar da over kanseri riskinin artırmaktadır (6), (9), (10).

Lynch sendromu over kanseri gelişimini etkileyen kalıtsal bir hastalıktır. Bu sendrom eşey hücrelerinde bulunan DNA yanlış eşleşme onarım sistemindeki MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 genlerinde meydana gelen değişik frekanslardaki mutasyonlar ile karakterize edilmektedir. Lynch sendromu görülen ortalama 48 yaşındaki hastaların yaklaşık %50'sinde 1. evre kanserle karşılaşmaktadır. Lynch sendromu hastalarında çoğunlukla endometrioid ve berrak hücreli over kanserlerine rastlanmaktadır (11), (12), (13). Tüm bu bilgilerle birlikte kalıtsal olarak gelişen gen mutasyonlarının belirli organlarda kanser gelişimine sebep oluşunun mekanizması henüz bilinmemektedir (4).

#### **2.1.2. Oral Doğum Kontrol İlacı ve Hormon Replasman Tedavisi**

BRCA1 mutasyonu bulunan veya herhangi bir genetik bozukluk bulunmayan kişilerde oral doğum kontrol ilacı kullanımı over kanseri gelişimi riskini azaltmaktadır

(14), (15). 5584 adet over kanseri olan hasta ve 1,3 milyon adet kadının katılımı ile gerçekleşen araştırmaların meta-analizleri sonucunda seröz, endometrioid, berrak hücreli kanserlerde oral doğum kontrol ilacı kullanımının over kanseri riskini azalttığı, müsinöz over kanserinde bu etkinin görülmediği belirlenmiştir (16). Yine de diğer meta-analizler oral doğum kontrol ilaçlarının over kanseri riskini düşürücü veya artırıcı yönde etki ettiğine yönelik yeterli kanıt içermemektedir (17).

Hormon replasman terapisinin postmenopozal dönemdeki kadınlarda yalnızca östrojen kullanımında over kanseri riskini %22 oranında, östrojenle birlikte progesteron kullanımında %10 oranında artırdığı belirlenmiştir (18), (19), (20). Bununla birlikte bir meta-analiz araştırmasında seröz ve endometrioid over kanserinde hormon replasman terapisi gören postmenopozal dönemdeki kadınların over kanserine yakalanma riskinin yalnızca östrojen ya da östrojenle birlikte progesteron kullanımında benzer oranlara sahip olduğu gösterilmiştir (21).

### **2.1.3. Reprodüktif Faktörler**

Doğum sayısı, önceden tübal ligasyon, salpingektomi, unilateral veya bilateral ooforektomi (cerrahi işleme overin alınması) over kanseri riskini etkileyen diğer faktörlerdir (22), (23), (24). Doğum yapmış kadınlar, doğum yapmamış kadınlara göre over kanserinin tüm subtiplerine yakalanma açısından daha az risk taşımaktadır, bu risk berrak hücreli over kanserinde en aza düşmektedir. Herhangi bir histolojik subtip over kanserine özgü olmaksızın ünilateral ooforektomi over kanseri riskini %30 oranında azaltmaktadır. Bilateral ooforektomi de over kanserine genetik açıdan yatkınlığı bulunan kadınların over kanserine yakalanma riskini azaltmaktadır (23), (25). Tübal ligasyon berrak hücreli ve endometrioid over kanserlerinin riskini azaltırken, histerektomi berrak hücreli over kanserinin riskini azaltmaktadır (16), (22), (23), (24). Endometrioid ve berrak hücreli over kanserlerinin endometriozis ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (16).

### **2.1.4. Diğer Risk Faktörleri**

Obezite postmenopozal kadınlarda over kanseri açısından bir risk faktörü olarak nitelendirilmektedir. Bir meta-analiz çalışmasının sonucu olarak hormon replasman terapisi görmeyen kadınlarda 5 kg'lık kilo alımı over kanseri riskinin yaklaşık %13 oranında arttığını göstermiştir (26). Obezite, yüksek dereceli seröz over kanserinden daha çok endometrioid ve müsinöz over kanserlerine yakalanma açısından risk

arzettmektedir (27). Düzenli fiziksel aktivitenin over kanserine yakalanma riskini azalttđđı bir meta-analiz tarafından gösterilmiştir; en aktif olan kadınların %30-60 arasındaki oranlarda daha az over kanserine yakalanma riski tařıdđđı belirtilmiştir (28).

Beslenmenin over kanserinin gelişimi ile ilişkisi üzerine yapđlmıř araştırmalar da mevcuttur. Süt tüketimi ile over kanseri gelişimi arasında önemli bir ilişki bulunmamasına rağmen yađđı alınmış süt ve laktoz tüketimi ile over kanseri oluşma riski arasında ters bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Bu ters korelasyonun endometrioid over kanserinde bulunduğu belirtilmiştir (29). Beslenmedeki vitamin ve flavonoidlerin over kanserine yakalanma ile ilişkisi de arařtırđlmıř diğer bir konudur. Yetişkinlikte folat veya A vitamini, C vitamini veya E vitamini alımı ya da spesifik bir diyet uygulanmasının over kanserine yakalanma riskini deđiřtirmedeđđi gösterilmiştir (30), (31). Daha ileri araştırmaların gerekmesiyle birlikte, flavonoidlerin ve siyah çayın azalmış over kanseri riski ile ilişkili olabileceđđi düşünülmektedir (32). Diğer yaşam stili faktörleri de over kanseri riskini etkilemektedir;  rneđđin talk pudrası kullanımı, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID)'ler ile tedavi ve sigara kullanımı. Bazı araştırmalar talk pudrası kullanımının over kanserinin gelişimi riskini artırdđđı yönünde (33) raporlama yaparken bazı araştırmalar over kanseri gelişimi ile talk pudrası kullanımı arasında herhangi bir ilişki bulunmadđđđı belirtmektedir (34). Aspirin kullanımı kişilerin yaşından bağımsız olmak üzere her gün düşük doz aspirin alındđđđında over kanserinin gelişimi açısından azalmış risk ilişkisi oluşmaktadır; bu durum asetaminofen için geçerli değildir. Düzenli aspirin kullanımı endometrioid ve müsinöz over kanserlerinin oluşum riskini azaltırken, seröz over kanserine yakalanma riskini önemli derecede düşürmektedir. Yine de düzenli aspirin kullanımının over kanserine yakalanma riskini düşürmesi ile ilgili yürütülen bir araştırma bulunmamaktadır. Non-aspirin NSAID'lerin kullanımı, over kanseri gelişimiyle, risk azaltma eđđilimini işaret eden bir ilişki içerisinde (35). Sigara kullanımı berrak hücreli over kanseri gelişimi açısından düşük risk taşıyan bir faktör olmakla birlikte, bu risk müsinöz over kanserinde artmaktadır (16). Son olarak, kalıcı depresyon geçiren kadınların over kanserine yakalanma riskinin depresyon belirtisi göstermeyen kadınlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (36).

## 2.2. OVER KANSER TİPLERİ

Over kanseri terimi etiyoloji, patogenezi, prognoz, patoloji ve moleküler patoloji özelliklerine göre değişen malign tümörlerin heterojen grubunu içermektedir (10). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun eski sınıflandırmasında epitelyal ovaryan tümörlerinin orijin noktası olarak işlev gören over mezotelyal yüzeyi üzerine odaklanılmıştır. Yeni sınıflandırma yüksek dereceli seröz karsinomaların tübal karsinogenezi üzerine tartışılarak hazırlanmıştır (9).

2014 yılında (WHO) tarafından belirlenen over kanseri sınıflandırması şu şekildedir:

<b>Seröz Tümörler</b>	
Benign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kistadenoma</li><li>• Adenofibroma</li><li>• Yüzey papilloma</li></ul>
Borderline Tümörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Seröz BOT/atipik farklılaşan tümör</li><li>• SBOT, mikropapiller tip/ non-invaziv, seröz düşük dereceli karsinoma</li></ul>
Malign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Seröz düşük dereceli karsinoma</li><li>• Seröz yüksek dereceli karsinoma</li></ul>
<b>Müsinöz Tümörler</b>	
Benign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kistadenoma</li></ul>
Borderline Tümörler (MBOT)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Müsinöz BOT/atipik farklılaşan müsinöz tümör</li></ul>

Malign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Müsinöz karsinoma</li> </ul>
<b>Endometrioid Tümörler</b>	
Benign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endometriosis kisti</li> <li>• Endometrioid kistadenoma</li> <li>• Endometrioid kistadenofibroma</li> </ul>
Borderline Tümörler (EBOT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endometrioid BOT/atipik farklılaşan endometrioid tümör</li> </ul>
Malign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endometrioid karsinoma</li> </ul>
<b>Berrak Hücreli Tümörler</b>	
Benign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kistadenoma</li> <li>• Adenofibroma</li> </ul>
Borderline Tümörler (BOT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BHBOT/atipik farklılaşan berrak hücreli tümör</li> </ul>
Malign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Berrak hücreli karsinoma</li> </ul>
<b>Transisyonel Hücre Tümörleri</b>	
Benign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brenner Tümör</li> </ul>
Borderline Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Borderline-Brenner Tümör/atipik farklılaşan Brenner Tümör</li> </ul>
Malign Tümörler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Malign Brenner Tümör</li> <li>• Serömüsinöz Tümörler</li> <li>• Benign Tümörler</li> <li>• Serömüsinöz kistadenoma</li> <li>• Serömüsinöz adenofibroma</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Borderline Tümörler</li> <li>• Serömüsinöz Borderline tümör/atipik farklılaşan serömüsinöz tümör</li> <li>• Serömüsinöz karsinoma</li> </ul>
Sküamoz epitelyal tümörler	
Karışık epitelyal tümörler	
Farklılaşmamış karsinoma	

**Şekil 2.1.** WHO over kanseri güncel sınıflandırması. BOT: Borderline over tümörü, MBOT: Müsinöz borderline over tümörü, BHBOT: Berrak Hücreli bordeline over tümörü, SBOT: Seröz borderline over tümörü

Epitelyal over tümörleri, benign, borderline ve malignant (karsinomalar) olarak alt sınıfları şeklinde incelenmektedir. Bu ayırım tümörlerin davranış bağlantıları açısından önemlidir (9). Borderline ovaryan tümörler benign olanlara göre daha fazla epitelyal çoğalım ve değişken nükleer atipi göstermektedir. Borderline tümörler karsinomalarla karşılaştırıldığında, karsinomalar gibi yıkıcı stromal invazyon gözlenmemekle birlikte, prognozları karsinomalara göre daha iyidir. Stromal invazyon olmamasına rağmen özellikle ekzofitik büyümeye sahip olan seröz borderline tümörler peritoneal yüzeylere implantasyon yapabilmektedir (yaklaşık %10 peritoneal implant); nadiren düşük dereceli seröz karsinomaya ilerlemekte ve altta bulunan dokulara invazyonu söz konusu olabilmektedir (11).

Borderline tümörler aynı hücre tipine sahip benign tümörlerden biyolojik davranış açısından belli bir şekilde ayrılmaktadır. %1-3'ten daha az bir oranla invaziv karsinomaya ilerleyiş "borderline tümör" terimini doğrulamaktadır. Spesifik olmadıklarından dolayı "atipik çoğalan" gibi terimler tavsiye edilmemektedir. Tüm benign olmayan epitelyal tümörlerin (borderline ve karsinoma) nükleer atipi sergileyenleri, çoğalan neoplazmalar olarak tanımlanmaktadır. "Atipik çoğalan" terimi malignant potansiyeli bulunan küçük ama önemli miktarda tümörü saf dışı bırakmakta ve takibini engellemektedir (11), (12). "Borderline tümör" terimi belirsiz durumlarda

kullanımı tavsiye edilen, neoplazmaların biyolojik özellikleri ve histolojilerinden kuşku duyulduğu durumlarda kullanılabilen uygun bir terimdir. Son birkaç yıldır, WHO tarafından “borderline tümör” teriminin kullanımı tavsiye edilmektedir (9). Bu tip tümörlerin çoğu olumlu prognoz ile ilişkilidir ve “düşük malignant potansiyele sahip tümör” olarak nitelendirilmesi artık tavsiye edilmemektedir (8).

Ovaryan tümör patolojisinde en çok karşılaşılan sorunlardan biri borderline tümörler ile karsinomalar arasındaki ayrımdır, özellikle tanısal özellikleri ve tedavileri açısından borderline tümörlerin literatüründe bir karışıklık hakimdir. Skuamoz hücre tümörleri hariç diğer tüm tümör çeşitlerinde borderline konsepti geçerlidir. Bununla birlikte literatür, en çok karşılaşılan iki tip olan ve klinikopatolojik farklılıklar gösteren intestinal seröz ve müsinöz kategorilerine atıfta bulunmaktadır (8).

### **2.2.1. Seröz ve Müsinöz Borderline Tümörler**

Seröz borderline tümörler (SBOT) over seröz tümörlerinin yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır, ortalama 42 yaşında meydana gelmektedir. 1. evre tanısı bir veya her iki overde tutunmuş tümörler için, 2. evre tanısı pelvis içinde kalan tümörler için, 3. evre tanısı üst karına yayılmış tümörler için konulmaktadır. 1. evre tümörlerinin 1/3'ü bilateraldir (13), (9). Makroskopik olarak SBOT'ler bir veya daha fazla kist bulundurmaktadır; kistler çok yakın paketlenmiş (endofitik büyüme) papiller veya normalden fazla büyüyen polipoidler şeklinde sıralanmış durumdadır. SBOT'lerin neredeyse yarısında papiller büyüme overin dış yüzeyini kapsamaktadır (ekzofitik büyüme). SBOT'lerin mikroskopik gözleminde fallop tüpü hücrelerine benzeyen küboid, kolon şeklinde ve silier hücrelerin sıralanması ile oluşan stromal polipler, bezler ve papiller görülür (8).

Müsinöz borderline tümörler (MBOT) iki farklı klinikopatolojik grupta incelenmektedir. En yaygın form (%85-90) gastrointestinal tip epitelyumdan (gastrointestinal tip MBOT), daha az görülen tip, endoservikal tip epitelden (endoservikal tip MBOT) oluşmaktadır (14). Endoservikal benzeri MBOT aynı zamanda Müllerian tip MBOT'ler olarak adlandırılmaktadır ve MBOT'nin %10-15'ini oluşturmaktadır (14), (15), (16). Bu tümörler birçok açıdan intestinal MBOT'den ayrılmaktadır. Endoservikal MBOT ortalama 40 yaşında görülmektedir ve %35-50 oranında endometriozis ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır. Tanıda, çoğu tümör over sınırları içerisinde, yaklaşık olarak %20'si peritonyum ya da bölgesel lenf nodlarına

yayılmaktadır (14). Endoservikal tip MBOT’Nin prognozu kusursuz ve SBOT’Ye benzemektedir. Son araştırmalar, intraepitelyal karsinoma (İEK) kümelerinin ya da mikroinvazyonun prognozu etkilemediğini raporlamıştır (16). Bu tip tümörler ölüme yol açmamaktadır (14), (15), (16). Ovaryan müsinöz tümörlerin %10-15’ini oluşturan intestinal tip MBOT seröz benzerlerine göre son 20 yılda daha çok görülen tip olarak karşımıza çıkmaktadır (9). %80-90 oranında 1. evrededir, sadece %5’i bilateraldir (17), (18), (19), (20), (21). Overdeki metastatik müsinöz tümörler, genellikle primer ovaryan müsinöz neoplazmaları, kısmen pankreas ve kalın bağırsak adenokarsinomalarını andırmaktadır (22). 2. ve 3. evre MBOT tümörlerinin neredeyse hepsi *pseudomyxoma peritonei* ile ilişkilidir ve bu hastalarda over tümörü her zaman aslında primer apendiks tümöründen sekondere evrilmektedir (9). MBOT makroskopik olarak ortalama 19 cm çapında, genellikle kistik ve multiokülerdir, müsinöz sıvı içermektedir, mikroskobik olarak gastrik pilorik tip atipik epitelden oluşan kist ve bezlerden oluşmaktadır. Kistler tipik olarak ince ve dallanmış papiller içerebilmektedir. Etrafı kaplayan epitelyum hemen hemen her zaman goblet hücreleri barındırmaktadır, arjirofil hücreleri ve nadiren Paneth hücreleri içerebilmektedir. Epitel hücreleri genellikle iki ve üç katmanlıdır, nükleer atipi hafif ile orta derecede ve mitotik hücreler az ya da çok görülebilmektedir. Yüksek dereceli nükleer vasıfları bulunmamakla birlikte, stromal invazyon gözlenmemektedir (8). İntestinal tip MBOT 4 ya da daha fazla tabakada epitel hücre çoğalımı sergileyen alanlara sahiptir, kribriiform veya stromasız papiler yapı kümeleri dağılmış, orta derecede (2. derece) veya şiddetli atipik (3. derece) nukleus bulundurmaktadır. Birçok araştırma bu tümörlerin her zaman klinik olarak benign olduğunu göstermiştir (17), (18), (19), (20), (23), sınıflandırılmalarının İEK’li MBOT olarak yapılması tavsiye edilmektedir (9).

Genellikle homojen olan seröz tümörlere karşın, müsinöz intestinal tümörler heterojendir. Belli bir neoplazmada benign görünümlü, borderline ve invaziv yapılar birarada bulunabilmektedir. Bu devamlılık hali, kistadenoma ve borderline tümörden, invaziv olmayan, mikroinvaziv ve invaziv karsinomaya ilerleme olduğu izlenimini yaratmaktadır (9), (20). Bu durumun müsinöz ovaryan tümör oluşumunun erken döneminde geliştiği K-RAS mutasyonu araştırmaları ile desteklenmektedir (24).

### 2.2.2. Over Karsinomaları

Over kanserlerinde tüm hücre tipleri ovaryan orijinli değildir. Epitelyal kökenli kanserlerde seröz, endometrioid, berrak hücre, müsinöz, transisyonel hücre tiplerine rastlanmaktadır (58). Bu hücreler over yüzey epitelinden türevlenen ovaryan epitelyum karsinomalarının morfolojik subtipleridir. Histopatolojik, moleküler ve genetik araştırmalar sonucunda ovaryan karsinogenezis için iki temel sınıflandırma kategorisi belirlenmiştir: overdeki prekürsör lezyonların belli bir şekilde açıklandığı tip 1 kategorisi ve tubal ve/veya ovaryan yüzey epitelinden *de novo* gelişen tümörler ve belli bir şekilde açıklanamayan lezyonların oluşturduğu tip 2 kategorisi (59), (60). Tip 1 kategorisinde düşük dereceli seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücre ve transisyonel hücre karsinomaları bulunurken, tip 2 kategorisinde yüksek dereceli seröz karsinomalar, farklılaşmamış karsinomalar, karsinosarkomalar bulunmaktadır. Tip 1 ovaryan kanserler, gelişimi düşük hızda seyreden indolent neoplazmalar iken tip 2 ovaryan kanserler, gelişimi yüksek hızda gerçekleşen agresif neoplazmalardır (61).

Heterojen neoplazmalar olarak hücre tipine göre yapılan diğer bir sınıflandırmada ise seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücre, transisyonel ve sküamoz hücre tümörleri bulunmaktadır. Yüksek dereceli seröz karsinomalar %70, endometrioid karsinomalar %10, berrak hücreli karsinomalar %10, müsinöz karsinomalar %3, düşük dereceli karsinomalar yaklaşık %5 oranında görülmektedir (62), (63).

#### 2.2.2.1. Seröz Tümörler

Düşük dereceli seröz karsinomalar (DDSK) ve yüksek dereceli seröz karsinomalar (YDSK) temel olarak birbirinden farklı tümör tipleri olduğundan iki farklı hastalık olarak değerlendirilmektedir (25). DDSK, çoğu vakada seröz borderline bir bölüm içermektedir, K-RAS ve B-RAF mutasyonları taşımaktadır, TP53 ve BRCA anormallikleri ile ilintileri bulunmamaktadır (26). YDSK, seröz borderline tümörler ile ilişkili değildir, TP53 mutasyonu ve BRCA anormallikleri göstermektedir.

##### 2.2.2.1.1. Yüksek Dereceli Seröz Karsinoma

YDSK en çok karşılaşılan over kanseridir ve çoğu hasta (yaklaşık %80) hastalığın ilerlemiş düzeyindedir. Tanıda tümörler nadiren (%10) overle kısıtlıdır.

Mikroskopik olarak YDSK yarık benzeri glandüler lümenlerle papiller ve solid büyüme göstermektedir. Tümör hücreleri orta boyuttadır, belirgin çekirdekçik yapısı sergilemekle birlikte, hücreler dev boyutta tuhaf görünümlü çekirdeğe sahiptir. DDSK'nin aksine YDSK'de bulunan hücreler nükleer büyüklük açısından üç kattan fazla farklılık göstermektedir (27). Yüksek dereceli ve seröz farklılaşma gösteren solid karsinomalar ve hatta tümörün azınlıkta kalan kısmı YDSK olarak sınıflandırılmalıdır (28).

Çoğu YDSK p53, BRCA1, WT1 ve p16 için immun reaksiyon vermektedir, Ki-67'nin yüksek nükleer ekspresyonu ile belirlenen yüksek çoğalım indeksi de sergilemektedir. Sadece güçlü ve difüze p53 ve p16 reaksiyonu anormal olarak değerlendirilmektedir. Nükleer WT1 reaksiyonu YDSK ve DDSK'de yaklaşık %80 oranında gerçekleşmektedir, ancak diğer over karsinomalarında %5'ten düşük oranda görülmektedir (29), (30). Östrojen reseptörü ekspresyonu, YDSK vakalarının yaklaşık 2/3'ünde ve DDSK ve endometrioid karsinomada görülmekte iken berrak hücreli karsinoma ve müsinöz karsinomada negatiftir (30).

BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarına sahip kadınlarda 70 yaşında %30-70 oranla çoğunlukla YDSK olmak üzere over kanseri gelişme riski bulunmaktadır (31). TP53 mutasyonları gibi, BRCA inaktivasyonu YDSK'nin genetik değişimi olarak görünmektedir. Germ hücre mutasyonu yanısıra, BRCA yolundaki inaktivasyon, BRCA1 ve BRCA2'deki somatik mutasyon sonucu (32) ya da BRCA1'deki promotor hipermetilasyonu sonucu oluşabilmektedir (33). BRCA mutasyonuna sahip veya aile öyküsünde over kanseri bulunan kadınlarda risk azaltma için kullanılan salpingo-ooforektomi örneklerinde, seröz tübal intraepitelyal karsinomanın (STİK) keşfi, pelvik seröz karsinogenezde, fallopi tüpü rolünün kapsamlı olarak araştırılmasına yol açmıştır (5), (34), (35), (36), (37). İlk yapılan araştırmalar, histolojik açıdan yaygın olarak normal fallopi epitelyumunda, p53 immunoreaktif hücrelerin küçük odaklar halinde bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (36). Fallop tüpünün distal bölümünde ağırlıklı olarak bulunan bu odaklar, "p53 işareti" olarak adlandırılmaktadır. STİK'deki gibi, p53 işaretleri sekretuar hücrelerin çoğunda (en az ardışık 12 immunoreaktif hücre) görülmektedir ve çoğunluğu gama-H2AX için immunoreaksiyon yoluyla DNA hasarı sergilemektedir (36), (37). STİK bulunan tüplerde p53 işaretleri daha yoğun ve çok odaklı şekilde bulunmaktadır, bazı durumlarda STİK ile doğrudan devamlılık göstermektedir. p53 işaretlerinin %57'si TP53 mutasyonu taşımaktadır (36); yine de

Ki-67 çoğalım endeksi (%3 ortalama ile) düşüktür. p53 işaretleri, neoplastik çoğalım yokluğunda muhtemelen erken klonal yayılımı temsil etmektedir (38) ve şaşırtıcı bir şekilde hem BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu bulunan hem de bulunmayan kadınlarda hemen hemen aynı sıklıkta görülmektedir (sırasıyla, %10-38'e karşın %17-33) (36). TP53 mutasyonu YDSK oluşumunun erken döneminde gelişen bir olaydır, distal fallop tüpünde p53 işaretlerini oluşturur ve STİK'e öncülük eder. BRCA1 mutasyonu aynı zamanda öncelikli olarak STİK'i sonrasında TP53 mutasyonunu oluşturur (38).

Distal fallop tüpünde oluşan epitelyal değişiklikler şu şekilde süreklilik göstermektedir: Normal fallop tüpü epitelyumu, p53 ekspresyonunun artması, STİK, son olarak invaziv seröz karsinoma. Tubal epitelyumun sekretuar hücreleri düşük DNA çift zincir kırığı onarım yeteneğine sahiptir, DNA hasarından sonra gama-H2AX immunoreaksiyon odakları oluşmaması ile bu yeteneğin sınırlı olduğu görülmektedir (39). Bu durum aynı zamanda bu dokunun BRCA inaktivasyonuna sebep olan mutasyonlara neden özellikle hassas olduğunu göstermektedir (8).

YDSK'nin patogenetik modeli, erken dönemde BRCA kaybını takiben p53 kaybını, çift zincir kırığındaki homolog rekombinasyon onarımı bozukluğundan ileri gelen kromozomal instabilite ile yaygın kopya sayısı değişimini ileri sürmektedir. TP53 ve BRCA inaktivasyonu ile kromozomal instabilite gelişmektedir, YDSK gelişiminin en önemli bileşeni oluşan gen kopya sayısının değişimidir (38).

BRCA-pozitif asemptomatik kadınların %5-10'u erken YDSK'ye sahiptir, %80'i STİK ile bağlantılıdır (40). YDSK'lerin tümünün fallop tüpünden orijinlediği sonuç olarak bir spekülasyon konusudur. Yine de YDSK patogenezi daha kompleks olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelişmiş YDSK'lerin yalnızca %40'ı STİK göstermektedir (40), SET (solid, pseudo- endometrioid ve transisyonel) morfolojisine sahip YDSK'lerin yalnızca %8'i STİK göstermektedir, SET morfolojisine sahip YDSK'ler, BRCA-pozitif olma eğilimindedir, hastalar daha genç ve çıktılar daha iyidir (41). YDSK (BRCA-pozitif veya BRCA-negatif) homojen bir hastalık değildir. Yaş, histotip, STİK +/- ve hasta çıktısını içeren çeşitli değişkenler iki tümör grubunun oluşturulmasına izin vermektedir: genç, BRCA-pozitif, STİK bulundurmeyen ve daha iyi çıktıya sahip grup ile yaşlı, BRCA-negatif, STİK bulunduran, kötü prognoza sahip grup (40). En son yapılan araştırmalar, YDSK'nin en az iki farklı orijine sahip olduğunu öne sürmektedir: over yüzey epiteli ve tübal epitelyum (8).

### 2.2.2.1.2. Düşük Dereceli Seröz Karsinoma

DDSK tüm over kanserlerinin %5'inden az bir bölümünü oluşturmaktadır (79). DDSK'ler sıklıkla non-invaziv SBOT bileşenine sahiptir, SBOT gelişimine benzer bir gelişim sergilemektedir. Bir over borderline tümöründe küçük DDSK odağı bulunması iyi bir prognozla ilgilidir, yine de ilerlemiş evre hastalarında hastalık genellikle nispeten tedbirsiz bir seyir izlemektedir (43).

Mikroskobik olarak DDSK'ler küçük papillere sahip tümör hücreleridir, sıklıkla psammoma cisimcikleri içeren değişen miktardaki hyalinize stromalarla tekdüze küçük çekirdekler sergilemektedir. Çekirdekteki tekdüzelik DDSK ve YDSK ayrımının yapılmasında başlıca kriter olarak kullanılmaktadır (57), (70). DDSK nadiren YDSK'ye gelişim göstermektedir (43).

DDSK'nin biyobelirteç profili yüksek dereceli ile benzerlik göstermektedir ama ortalama Ki-67 işaretleme endeksi YDSK'de %22,4 iken DDSK'de %2,5' tir (66). BRAF ve KRAS mutasyonları DDSK'de bir araştırmada sırasıyla %30 ve %35 iken (65), diğer bir araştırmada sırasıyla %5 ve %40 olarak bildirilmiştir (80). DDSK'de kromozomal instabilite görülmemektedir., komplek genetik anormallikler YDSK'de görülmektedir. DDSK, BRCA germ hücre mutasyonları ile ilişkili değildir (43)

Tanı aşamasında DDSK ve SBOT ayrımı yapılması için tümörün invaziv bölümüne dikkat edilmektedir. İnvaziv bölüm 10 mm<sup>2</sup>'den daha dar bir alan kaplıyorsa tümör mikroinvazyonla borderline olarak değerlendirilmektedir (81). Tümörün kapladığı alan daha büyükse DDSK olarak değerlendirilmektedir. Yine de invaziv peritoneal implantlar ile DDSK histolojik olarak aynıdır, ama hastalığın ilerleyiş hızı ve tümör hacmi aynı değildir. İnvaziv implantlar mikroskobik ya da 1-2 cm' den daha az makroskopik boyutlarda erken yüzeysel lezyonlar şeklindedir, DDSK sıklıkla yığınsal bir hastalıktır (82). İnvaziv peritoneal implantların bağımsız orijininin ovaryan SBOT ile ilişkili olduğu tamamen istisna olarak kabul edilmemesine rağmen, tanımlayıcı BRAF ve KRAS mutasyonları kadar tanımlayıcı kromozomal heterojenite kaybı ovaryan SBOT ve invaziv implantlar için tekrarlar halinde görülmektedir. Bu tip bulgular bu tümörlerin monoklonal orijinini ve implantların sekonder doğasını desteklemektedir (83).

#### 2.2.2.2. Müsinöz Over Karsinoması

Primer ovaryan tümörlerinin %10-15'ini müsinöz over karsinomaları (MOK) oluşturmaktadır; buna rağmen %80'inin benign tümörler ve geri kalan kısmın çoğunluğu borderline tümörler oluşturmaktadır. Eğer overe metastaz geliyorsa, kısmi olarak gastrointestinal sistemden dikkatlice dışlanabilmektedir, sadece %3-4'lük oranda over karsinomalarının çeşidi müsinöz'dür. MOK hücreleri gastrik pilorus, ince bağırsak veya endoserviks hücreleri ile benzerlik göstermektedir (9). Yine de bu tip tümörlerin çoğunluğu gastrointestinal farklılaşma göstermektedir. Bu tümörlerin kökenleri bilinmemektedir. 13 cm'den büyük boyut ve unilaterallik primer MOK'yi açıkça belirlemektedir, metastaz sırasında tipik olarak daha küçük ve bilateraldir. Primer MOK genellikle *pseudomiksoma peritonei* veya ovaryan yüzey gelişimi olmaksızın overle sınırlı kalmaktadır.

Malignant MOK genellikle heterojendir. Benign görünümlü, borderline, invaziv olmayan komponentler her bir tümörde birarada bulunmaktadır, bu durum tümör gelişimini benignden borderline'a, borderline'dan karsinomaya şeklinde önermektedir. Bununla birlikte, histolojik analizler için kapsamlı bir örnekleme gerekmektedir (20). İEK'li MBOT kategorisi, belli stromal invazyonun olmadığı 10 mm<sup>2</sup>'lik alana yayılmış, tümör hücrelerinin sitolojik görünümleri açıkça malignant olduğu yerlerde kullanılmaktadır (42). İEK'li MBOT çok düşük bir tekrar etme oranına sahiptir (%5) (43).

MOK iki kategoriye ayrılmaktadır: açık stromal invazyonla yayılan, minimal veya stromaya müdahil olmayan arka arkaya veya kompleks malignant bezler, 10 mm<sup>2</sup>'lik alanı aşan (iki boyutta 3 mm'den daha büyük) yayılan tip MOK ve bez, hücre topluluğu veya tek tek hücreler şeklinde belli stromal invazyon gösteren, stormadan karmaşık bir şekilde sızan ve sık sık desmoplastikstromal reaksiyon ile ilişkili sızan tip MOK. Yayılan tipe sahip model aynı zamanda invaziv olmayan şekilde de anılmaktadır ve prognozu sızan tip MOK'ye göre daha tercih edilir özelliğe sahiptir. Müsinöz tümörleri anaplastik karsinomdan veya yüksek dereceli sarkomadan ayıran eşsiz histopatolojik özelliği nadiren görülen mural nodüllerdir. Bu tip nodüller rüptüre olmamış bir kistin duvarında bulunduğu, prognoz daha tercih edilebilir olabilir, ancak bu tip tümörler tekrar edebilir ve anaplastik komponent olarak davranabilir (43), (44).

MOK'nin gen ekspresyon profilleri seröz, endometrioid ve berrak hücreli olanlarına göre farklılık göstermektedir. Müsinöz tümör oluşumunda KRAS mutasyonları erken evrede gelişmektedir. MOK'nin %43,6'sı ve MBOT'nin %78,8'inde rastlanmaktadır (45). Aksine HER2 yüksek ekspresyonu/amplifikasyonu MOK'de %18,8 ve MBOT'de %6,2 olarak bulunmuştur (45). KRAS mutasyonları ilginç bir şekilde HER2 amplifikasyonu ile görülmektedir. Yaklaşık olarak MOK'nin %34'ü ne HER2 amplifikasyonu ne de KRAS mutasyonuna sahiptir, bu vakalar tümördeki her iki genetik değişimden ziyade daha çok hastalığın tekrarlaması ve ölümlle ilişkilidir. Yüksek hassaslıktaki sonraki jenerasyon sekanslama, KRAS mutasyonlarının MOK'deki (%64,9) ve MBOT'deki (%92,3) sık karşılaşılan değişimlerden kaldığını göstermektedir (46). TP53 mutasyonlarına borderline tümörlerden (%20) çok karsinomalarda (%68) rastlanılmaktadır (46).

Primer ovaryan müsinöz tümörler çoğunlukla her zaman (%80'den fazla) sitokeratin 7'ye (CK7) karşı immünoreaktiftir, metastatik kolorektal adenokarsinomalar genellikle CK7 negatiftir (47). Ovaryan MOK vakalarının %65'i CK20'ye immünoreaktiftir, ancak reaktivite oldukça zayıf ve merkezidir; CDX-2 boyama (nükleer immünoreaksiyon) benzerdir (47). Aksine kolorektal adenokarsinomalar CK20 ve CDX-2 için difüze ve çok güçlü reaktivite sergilemektedir. Primer MOK'den overe serviks yoluyla metasaz yapan MOK ayırımı yapabilmek için insan papilloma virüsü DNA değerlendirmesi yapmak yardımcı olabilmektedir. P16 ekspresyonu insan papilloma virüsü markörü yerine kullanılabilir (48). MOK endometrioid (ER+) ve seröz (ER+ ve WT1+) karsinomalara karşılık, ER ve WT1'e eşit oranda negatiftir.

FIGO düzeyi tek ve en önemli prognostik faktördür ve 1. düzeydeki MOK çok iyi bir prognoza sahiptir, ancak over dışı yayılıma sahip vakalarda prognoz zayıftır (42), (20).

### **2.2.2.3. Berrak Hücreli Over Karsinoması**

BHOK diğer tüm over karsinomaları arasında %10 sıklıkla karşılaşılan tiptir ve bu kanser türündeki hastalar genellikle 1 veya 2. düzeydedir. Tümörler genellikle bilateraldir. Gelişmiş düzeyde hastalığın prognozu iyi seyretmemektedir (49). Endometriozis ile yakından ilişkilidir ve endometriozis ile ilişkili olduğunda prognozu daha iyi seyretmektedir (50).

Berrak hücrelerin bulunması berrak hücreli over tümörlerinin tanısı için yeterli olamamaktadır, YDSK ve endometrioid karsinomaların (EOK)'nin hücrelerinde de berrak sitoplazmalı hücrelere rastlanmaktadır. (BHOK)'nin tanısı için histolojik özelliklere de dikkat edilmektedir. Çoklu kompleks papilla, papillanın merkezini ayıran yoğun hyalin bazlı membran materyali ve vaalrın %25'inde gözlemlenen hyalin cisimcikleri histolojik bulgular arasında yer almaktadır. Diğer over karsinomalarına göre daha düşük mitoz frekansı göze çarpmaktadır. BHOK'de BRCA anormallikleri, YDSK kompleks karyotipleri, kromozomal instabilite bulunmamaktadır. YDSK'lerde çokça karşılaşılan TP53 mutasyonları genellikle BHOK'de görülmemektedir. Bu durum BHOK'de diğer anti-apoptotik mekanizmaların işlediğini göstermektedir. Erken fazdaki BHOK'de PTEN ekspresyonu kaybı %40 düzeyinde görülmektedir, vakaların %8'inde mutasyonlar inaktive edilmektedir. Buna karşılık PIK3CA'daki mutasyonlar vakaların %33'ünde aktifleşmektedir (51), (52). Son araştırmalar BHK'nin %46-57'sinde ARID1A mutasyonu nedeniyle BAF250 proteinin bulunmadığını göstermiştir. ARID1A mutasyonu endometriosisin erken malignant transformasyonunda meydana gelmektedir (53). BHK'nin %90'ından fazlası HNF1-beta bakımından pozitif ve %95'inden fazlası ER ve WT1 bakımından negatiftir. KRAS mutasyonları BHOK'de görülmele birlikte frekansları düşüktür (29), (30). Vakaların %15'inden fazlasında mikrosatelit instabilitesi görülebilmektedir.

Benign, borderline ve malign BHOK'de HNF1-beta regülasyonu artmıştır (54). HNF1-beta çeşitli spesifik genler üzerinde düzenleyici etkiye sahiptir: Dipeptidil peptidaz IV (glikojen sentezi), osteopontin ( progesteronla düzenlenen endometriyal sekretuar protein), anjiyotensin-dönüştürücü enzim 2 (ferritin indüksiyonu, demir depozisyonu, antiapoptoz), anneksin 4 (Paclitaxel direnci), UGT1A1 (detoksifikasyon) (55). HNF1-beta BHOK'nin prognozunda ve davranışında önemli bir rol oynamaktadır.

#### **2.2.2.4. Endometrioid Over Karsinoması**

EOK, over kanserleri arasında en çok görülen ikinci kanser tipidir. Olguların %10–20'sini oluşturmaktadır (28). EOK, spesifik gen mutasyonları ile karakterizedir. Olguların %38-%50'si CTNNB1 mutasyonu, %20'si PTEN mutasyonu, %19'u mikrosatelit instabilitesi şeklindeki spesifik mutasyonlara sahiptir. Borderline endometrioid neoplazmların %90'ında CTNNB1 mutasyonunun bulunduğu

kanıtlanmıştır. Bu durum EOK'nin patogenezinin erken dönemindeki genetik değişimleri gözler önüne sermektedir. Endometriozisde görülen PTEN mutasyonu ve heterozigosite 10q23 kaybı EOK ile ilişkilidir ve erken dönemdeki onkolojik olayları sergilemektedir (28). CTNNB1 ve PTEN gen mutasyonları ile mikrosatelit instabilitesi endometriozis veya borderline tümörlerden aşamalı biçimde köken alan düşük dereceli erken dönem EOK'de bulunmaktadır. Zayıf prognozlu yüksek dereceli EOK'nin *de novo* gelişiminde p53 overekspresyonu veya mutasyonu görülmektedir (56).

Çoğu EOK düşük dereceli adenokarsinomalar olup endometriotik kistlerden köken aldığı düşünülmektedir (47). Endometriotik kistlerin %52'si endometrioid/berrak hücre kanserlerinde görülürken, seröz karsinomalarda %20 civarında endometriotik kiste rastlanmaktadır (57). Buna karşın yüksek dereceli endometrioid adenokarsinomalar YDSK'den morfolojik olarak ayırt edilemez ve sıklıkla WT1 ekspresyon eder. Gen ekspresyon profili benzerdir, farklılığı çok belirgin bir tümör tipi değildir.

EOK gelişiminde onkogenik K-RAS ekspresyonunun indüklenmesi ve kromozom 10'da fosfatase ve tensin homologu tümör süpresör genin yok olması rol almaktadır (58), (59). EOK'de KRAS ve BRAF mutasyonlarıyla yaklaşık olarak %10 oranla karşılaşılmaktadır (26), (60), (61), (62), (63), (64).

Beta-katenin ( $\beta$ -katenin) ve fosfatase tensin homologu tümör süpresör genin somatik mutasyonu ovarian endometrioid karsinomalarda en fazla karşılaşılan genetik anormalliklerdir (59), (65), (66).

EOK'nin olası orijininin menstrüel geri döndürme ile overe geçen endometrial kök hücreler olduğu düşünülmektedir (8).

#### **2.2.2.4.1. Endometrioid Over Karsinomu Tedavi Yöntemleri**

Over kanserlerinin tedavisi genellikle cerrahi işlemi takiben platin ve taksan içeren kemoterapidir (96). Kanser tipi ve evresine göre cerrahiye kemoterapi, radyoterapi veya ikisinin kombinasyonu takip etmektedir (97), (98).

Kemoterapi sürecinin başarısızlığa uğramasının en önemli sebebi çoklu ilaç direnci (ÇİD)'dir (96), (99). Çoklu ilaç direnci geni (multi drug resistance 1) MDR1 ekspresyonu ile P-glikoprotein (P-gp) üretimi meydana gelmektedir. P-gp, ATP

hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak fonksiyonel ve yapısal ilgisi bulunmayan ilaçların hücre dışına transportunu gerçekleştirmektedir (100). ÇİD'i aşmak için P-gp inhibisyonunu sağlayan moleküller üzerine araştırmalar yapılmaktadır.

#### **2.2.2.4.2. Epitelyal Over Karsinomalarına Yönelik Geliştirilen Kemoterapötik Tedavi Yöntemleri**

Birçok kanser çeşidinin tedavi edilmesinde çoğunlukla uygulanan tedavi seçenekleri mevcuttur. Taksanlar (Paclitaxel, Docetaxel ve Cabazitaxel) over kanserlerinin tedavisinde çoğunlukla kullanılmaktadır. Taksanların birçok formu enjekte edilebilir formda ticarileşmiştir ve ototoksisite, nörotoksisite, kellik gibi birtakım yan etkilere sahiptir; bu etkilerin çoğu ilacın çözünmesi için kullanılan toksik çözücülerle ilgili olarak gelişmektedir. Toksik çözücü bulunduran ticari formülasyonların yanısıra ilacın çözünmesini sağlayan yeni ilaç taşıyıcı sistemler (YİTS) geliştirilmektedir. Bu sistemler, çözücü-bazlı alışlageldik formülasyonlarla antikanser aktivite, terapötik indeks, stabilite, biyoyumluluk, doku ve organ hedefleme, enkapsülasyon kapasitesi, doku geçirgenliği, oral biyobulunurluk, azalmış toksisite, anormal reaksiyonların azalmış insidansı, sürekli ve kontrollü salım sonuçları rapor edilerek karşılaştırılmaktadır (67).

Taksanlar, 1971 yılında doğal kaynağı olan, *Taxus* cinsi bitkiden elde edildiğinde keşfedilmiştir (68). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) – Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından paclitaxel, docetaxel ve cabazitaxelin enjekte edilebilir formları sırasıyla, 1992, 1996, 2010 yıllarında kullanıma uygun görülmüş ve onaylanmıştır (69). Kardiyovasküler ajanlardan sonra dünya üzerinde en büyük Pazar payı taksanlara aittir (67). Taksanlar mikrotübül stabilizasyonu engelleme, depolimerizasyonu artırarak tübülün proteinin polimerizasyonunu azaltma, hücre döngüsünde sentrozomal bozulmayı engelleme, anormal iğ ipi fonksiyonunu artırma, iğ ipi mikrotübül dinamiklerini bozma, hücre bölünme evrelerini durdurma etkisi yaratarak etkinlik göstermektedir (70). Taksanlar hücre döngüsünün G2/M fazını bloke ederek, hücreyi apoptoza götürmektedir (71).

Taksanların kemoterapide kullanımı birtakım sorunları beraberinde getirmektedir. Oral biyobulunurlukları %10 seviyesinin altında düşüktür, suda çözünürlükleri 0,01 mg/ml'den az olmakla birlikte oldukça kısıtlıdır, ÇİD'in geliştiği bir ilaç grubudur, invaziv yolla uygulanabilmektedir, biyolojik yarı-ömürleri kısadır,

dokuların taksanlara geçirgenlikleri düşüktür, hasta uyumu yoktur, beyinden geçirgenlikleri azdır, hipersensitif reaksiyonlar gerçekleştirmektedirler, nefro- ve nöro-toksisite geliştirmektedirler, yüksek fermentasyon maliyeti nedeniyle ticari üretimleri kısıtlıdır, vazodilasyon, rahavet ve hipotansiyon etkileri yaratmaktadır, ateşli nötropeniye sebep olmaktadır, doz uygulaması süreklilik arz etmektedir (72), (73), (74), (75), (76). Taksanları ticari enjekte edilebilir formları bazı sürfaktanları içermekte ve bu şekilde misel benzeri yapılar şeklini almaktadır, bundan dolayı hipersensitif reaksiyonlar gerçekleşmektedir (77). Taksanların ilaç taşıma sistemleri ile konjugasyonu araştırmaları sadece fizikokimyasal engelleri aşma açısından değil, ilaç etkinliği performansının iyileştirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir (67).

Herhangi bir ana ilacın daha etkili bir formda kullanılması için hazırlanan organizmaya verilmeden önce aktif olmayan, etkinliğini organizmaya verildikten sonra kazandığı formlarını hazırlama evresi karmaşıktır; bu formlar düşük stabilite ve yüksek maliyete sahiptir (78). Hidrofobik ilaçların taşınmasında hidrofobik merkez ve hidrofilik kabuğa sahip miselli formülasyonlar yaygın şekilde çalışılmaktadır (79). Paclitaxel'in miselli formülasyonları yalnızca çözünürlük problemini ortadan kaldırmamaktadır (80), aynı zamanda polimerik misellerin yüzeyinde oluşturulan birtakım modifikasyonlar aracılığıyla elde edilen retansiyon ve permeabilite etkisi ile tümöre hedeflenebilmesi sağlanmaktadır (79), (81), (82). İlaç taşıma sistemlerinin oluşturulmasında başvurulan diğer bir yaklaşım nanotaşıyıcı sistemlerin kullanımınıdır. Bu sistemler de ilaca çözünürlük kazandırmakla birlikte tümör bölgesine hedeflenebilmektedir. Örneğin albümin bağlı Paclitaxel nanoparçacığı formülasyonu, ABD' de FDA tarafından onkolojide nanodüzeyde ilaç taşıyıcı sistem olarak 2005'te onaylanmıştır (83).

### **Polimer Nanotaşıyıcılar**

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) biyobozunur ve biyouyumlu bir polimerdir. PLGA kullanımı ABD-FDA tarafından onaylanmıştır. PLGA nanoparçacıkları ilaca düşük bir çözünürlükle bağlanan, iyileştirilmiş retansiyon ve permeabilite etkisi ile tümör damar sistemine doğrudan geçebilen özelliktedir (84). Kitosanla modifiye edilmiş Paclitaxel yüklü PLGA nanoparçacıkları ortalama 200-300 nm çapa sahiptir ve oldukça düşük sitotoksik etki göstermektedir. Bu kompleks özellikle akciğer kanserine spesifik toksisite sergilemektedir, akciğer kanser hücreleri

tarafından akciğer kapillerlerinden bu kompleksin alımı artmıştır (85). Kanser hücrelerinin PLGA'yı alımı kitosanın PLGA yüzeyindeki negatif yükü pozitifize dönüştürmesi ile sağlanmaktadır. Paclitaxel salımı iki ayrı evre şeklinde gerçekleşmektedir; ilk evrede kompleks yüzeyindeki Paclitaxel moleküllerinin hızlıca salımı ve ardından polimer içinde yerleşmiş Paclitaxelin ikinci evrede daha yavaş salımı gerçekleşmektedir. Bunun dışında kitosanla modifiye edilmiş Paclitaxel yüklü PLGA kompleksinin, Paclitaxel'in kanser hücreleri üzerinde %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonunu (IC<sub>50</sub>) düşürdüğü bildirilmiştir (86). Düşük dozdaki kitosan- PLGA konjugatı oral uygulama ile tümör inhibisyonunda etki göstermektedir. Farmakokinetik araştırmalar sonucu kompleksin intakt formunun kana ulaşabildiği sonrası paclitaxel salımının gerçekleştiği gösterilmiştir (87). Didodesil dimetilamonyum bromid ile stabilize edilmiş PLGA nanoparçacıklarının *in vivo* oral uygulaması sürfaktan kremofor EL içinde çözülmüş konvansiyonel Paclitaxel'e göre tümör inhibisyonu açısından daha etkili olduğu gösterilmiştir (88). Kanser kemoterapötisinin hücre dışına atılmasına neden olan P-gp proteinin ekspresyonunun artışı ile gelişen ilaç direncini aşmaya yönelik PLGA nanoparçacıklarına biyotinle fonksiyonellik kazandırılarak P-gp proteini inhibitörü tariquidar ve Paclitaxel, PLGA içine enkapsüle edilmiştir. *In vitro* araştırmada ilaç direnci gelişen hücrelerde bu formun hücre içine alımının konvansiyonel Paclitaxel'e göre daha yüksek olduğu görülmüştür, *in vivo* tümör modelinde biyotinle fonksiyon kazandırılmış PLGA-tariquidar-Paclitaxel kompleksinin yüksek tümör inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir (89). Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)-hedeflenmiş nanoparçacık poli (D,L-laktid-ko-glikolid)/poli (etilen glikol) (PLGA/PEG/EGFR peptidi) ilaç taşınımı için tasarlanmıştır. Bu nanoparçacıklar EGFR reseptör ifadesinin yüksek olduğu hücreleri hedeflemektedir. Nanotaşıyıcıdan ilaç parçacıkları sürekli olarak salınmaktadır. Bu sistem ilacın tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin artmasını sağlamaktadır (90). Arjinil-glisil-aspartik asit peptidiyle bağlı PEGillenmiş PLGA bazlı nanoparçacıkların Paclitaxel'le komplekslerinin tümör endotelium dokusuna hedeflendiği ve yüksek anti-tümör etkinliğe sahip olduğu raporlanmıştır (91). Polimer bazlı nanotaşıyıcılar hidrofobik ilaçların taşınması ve salımı açısından biyobozunur materyaller olarak tercih edilme potansiyeli taşımaktadır, yine de uygulama sonrası izlemlerinin zor olması bir dezavantaj niteliğindedir. Polimer bazlı nanotaşıyıcıların diğer nanomateryaller kullanılarak yüzey özelliklerinde

gerçekleştirilen değişikliklerle kullanımı mümkün olabilir. Farklı nanomateryallerin birleşmiş kompleks hali her iki materyalin avantajlarını taşıyabilmektedir (92).

Karbon nanomateryalleri, ilaç taşıyıcı sistemler olarak her geçen gün daha fazla dikkat çekmektedir (93), (94). Karbon nanotüplerin (KNT) kimyasal kompozisyonu inerttir, bu açıdan güvenli malzemeler olarak nitelendirilmektedir. Raman ve lüminesansı da içeren spektroskopik özellikleri *in vivo* ilaç taşıma davranışlarının anlaşılması için izleme, saptama, görüntüleme imkanı sunabilmektedir. KNT'lerin geometrisi ve yüzey özellikleri toksisitelerini etkilemektedir. Yüzeyde yapılan fonksiyon kazandıran işlemler hem *in vitro* (91) hem *in vivo* düşük toksisite ile sonuçlanmıştır (95), (96). Amfifilik fulleren (AF-1) içeren suda çözünebilen 100-200 nm çapa sahip Buckysome küresel nanoyapısının paclitaxel ile yüklendiğinde, MCF-7 meme kanseri hücre hattında *in vitro* terapötik etki gösterdiği bildirilmiştir (97). Buckysome'ların hidrofobik kısımları hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için idealdir. Ticari olarak bulunan Abraxane (Paclitaxel'in albümin bağlı Cremophor® içermeyen formu) ile karşılaştırıldığında Paclitaxel gömülü Buckysome'lar benzer hücre yaşama etkinliğinin sergilenmesini sağlamaktadır, Buckysome'lar tek başına sitotoksik etki göstermemektedir. Bu bulgular Buckysome'ların Paclitaxel gibi hidrofobik özellikteki ilaçlar için uygun bir ilaç taşıma sistemi olduğunu göstermektedir (98). Suda çözünebilen tek duvarlı karbon nanotüpler (TDKNT) ile Paclitaxel kompleksi kopabilen ester bağları aracılığıyla polietilen glikol ile bağ kurabilmektedir (99). Oluşan TDKNT-Paclitaxel kompleksi, sıçangillerde oluşturulan meme kanseri tümör modelinde, düşük dozlarda uygulandığında, ticari olarak bulunan Taxol® ile karşılaştırıldığında daha yüksek tümör baskılayıcı etki göstermiştir. SWNT-Paclitaxel kompleksinin Taxol® ve PEG-Paclitaxel ile karşılaştırıldığında kan dolaşımındaki yarı ömrünün 10 kat daha uzun olduğu saptanmıştır. TDKNT-Paclitaxel'in selektif alımı normal organlar için kısmi olarak toksik etki gösterirken, tümör dokusu için oldukça yüksek inhibiyon etkisi sergilemektedir. TDKNT-Paclitaxel, Paclitaxel retikuloendotelial sisteme taşımakta, burada kırılan ester bağları ile Paclitaxel salınmakta, kayda değer bir toksiste görülmeden atılmaktadır (99). Diğer bir ilaç taşıma sistemi, hidrofilik karbon kümeleri (HKK) olarak isimlendirilen, stabil, Paclitaxel'in etkili bir şekilde taşınmasını sağlayan platformlar olarak tasarlanmıştır (100). Bu taşıma sistemi, paclitaxelin PEGillenmiş HKK (PEG/HKK) karıştırılmasıyla oluşturulmuştur (Paclitaxel/PEG-HKK) ve stabilitesini en az 20 hafta koruyabilen bir

formülasyondur. Birçok kanser hücre hattında Paclitaxel/Cremophor ile benzer etki göstermektedir. Sıçangillerde yapılan araştırmada Paclitaxel/PEG-HKK' nin tümör baskılama açısından paclitaxel kadar etki gösterdiği kanıtlanmıştır. PEG-HKK'nin dalak ve karaciğerde biriktiği ve akut toksisiteye neden olmadığı belirlenmiştir (100). Ayrıca iki modifiye KNT daha üretilmiştir: PEG-bağlı tek duvarlı KNT'ler (PEG-g-ÇDKNT), PEG-bağlı çok duvarlı KNT'ler (PEG-g-ÇDKNT). Bu KNT'ler Hela ve MCF-7 hücre halarında düşük toksisite göstermiştir. Her iki modifiye KNT Paclitaxel ile hidrofobik etkileşim yoluyla bağlanmıştır. PEG-g-ÇDKNT'lerin PEG-g-TDKNT'lere göre daha yüksek bir yükleme kapasitesine sahip olduğu anlaşılmıştır. Her iki Paclitaxel yüklü CNT'nin 24., 48. ve 72. saatlerde ölçülen IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarının daha düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir. Yani kanser hücrelerini öldürme etkinliklerinin paclitaxele göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Küçük agregatlar halinde PEG-g-KNT'lere yüklenen paclitaxelin serbest paclitaxele göre salım hızının daha yüksek olduğu görülmüştür. Solusyon pH'ı paclitaxel salımını etkilemiştir. pH:7'de PEG-g-TDKNT'ler PEG-g-ÇDKNT'lere göre daha yüksek bir salım hızı sergilemiştir; çünkü TDKNT'ler daha büyük bir yüzey alanına sahiptir ve paclitaxel'in küçük çapa sahip agregatları ile kurulan hidrofobik etkileşimler daha zayıftır. pH:5 olduğundaysa, paclitaxelin PEG-g-ÇDKNT'lerden salım hızı artmış, PEG-g-TDKNT'lerden salım hızı azalmıştır (101).

Poli (laktik ko-glikolik asit) (PLGA) ile modifiye edilmiş KNT'ler kuantum dotlarla (KD) konjuge edildiğinde güçlü lüminesans sergilediği farkedilmiştir, böylelikle kanserin erken tespiti ve tedavisi için in vivo görüntülenme niteliği taşımaktadır. Non-kovalent adsorpsiyon yoluyla PLGA ile modifiye KNT parçacıklarına 112,5±5,8 µg/mg Paclitaxel molekülü yüklemesi yapılabilmektedir. Serbest Paclitaxel'in insan prostat kanseri PC-3 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 5 ng/mL iken PLGA modifiye KNT'lere yüklenmiş paclitaxelin IC<sub>50</sub> değeri 100 ng/mL'dir ve Paclitaxel moleküllerinin %50'si 96 saatlik periyod içerisinde salınmıştır. KNT-KD kompleksi bir farenin kuyruk veninden enjekte edildikten sonra, karaciğer, böbrek, mide ve barsak tarafından alınmıştır, KNT-KD'nin lüminesans özelliği 6. günde de devam etmesi KNT-KD'nin stabilitesinin hala devam ettiğini göstermiştir. KNT-KD'nin avantajı tümör iyileştiren ilaçları taşıyabilmesi ve ilaç dağılımını izleme imkanı sunmasıdır (102).

TDKNT ilaç moleküllerini yalnızca yüzeylerinden değil aynı zamanda iç bölgelerinden de salımlamaktadır (103). Biotin-TDKNT-taksoid tümör hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerde bulunan biotinün kanser hücrelerindeki biotin reseptörleri tarafından tanınıp hücrelerdeki biotin reseptörü ekspresyonunun artışına sebep olduğu rapor edilmiştir (104).

KNT bazlı ilaç taşıyıcıları Raman ve optik özellikleri görüntüleme teknikleri ile kolayca belirlenebilmektedir. İlaç salımı yüzey modifikasyonları ile kontrol edilebilmektedir. Yine de karbon nanomateryallerin insanda uzun vadeli kullanımında bozunma ve atımları ile ilgili araştırma yapılması gerekmektedir (92).

### **Magnetik Nanotaşıyıcılar**

Biyobozunur doğası, biyoyumluluğu, magnetik rezonans görüntüleme (MRI) kontrast ajanı olarak süperparamagnetik etkisi gereği demir oksidi yoğunlukla kullanılan bir magnetik materyaldir (105). Klinik uygulamalarda MRI’da süperparamagnetik demir oksidi (SPIO) ve çok-küçük SPIO nanoparçacıklarının kullanımı oldukça yaygındır. Magnetik nanoparçacıklar (MNP) dış magnetik alanda değişiklikler meydana getirerek mekanik etki yoluyla ilaç salımını artırmakta ve kanser hücrelerini öldürebilmektedir (106). İlaç taşıma sistemi olarak, MNP, doğasında bulunan görüntüleme özellikleri ile *in vivo* ilaç salımını eş zamanlı olarak görüntüleme imkanı sunmaktadır (107), (108), (109). İlaç taşıma uygulamalarında MNP’nin hidrofilik polimerlerle kaplanması birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Bu nanoparçacıklar yüksek yüklenme kapasitesine, iyi dağılılabile ve yüksek biyoyumluluk özelliğine sahiptir (110), (111), (112). Biyoyumlu ve biyobozunur çok-fonksiyonlu süperparamagnetik demir oksidi nanoparçacıkları poli (akrilik asit) (PAA) ile kaplanarak bir çeşit ilaç taşıma sistemi sentezlenmiştir (113). Polimerik matriks içerisine Paclitaxel ve kıvılcı boyası (DiI veya DiR) enkapsüle edilmiştir. Hedefleme molekülü olarak folat yüksek selektivitesi olan 1,3-dipolar siklo-ekleme tepkimesi ile bağlanmıştır. Nanoparçacıklar tümör dokusuna hedefleme ve ilaç salımı işlemini gerçekleştirmekle birlikte, floresan ve MRI görüntülenebilir niteliği taşımaktadır. DiI boyası hücre ölümünü artıran hedeflenmiş nanoparçacığın içine yerleşmekte ve floresan özelliği ile hücre ölümünü belirleyebilmektedir (114).

Bir termal stabil Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> üzerine poli [anilin-ko-sodyum N-(1-bir-bütirik asit) anilin] (SPANa) kaplanmış nanoparçacıklar MNP Paclitaxel taşıyıcısı olarak

davranmaktadır. 37°C’de serbest Paclitaxel’e göre SPAnNa-MNP bağı Paclitaxel daha stabildir. Bu yüksek termal stabilite insan vücudunda Paclitaxel’in daha fazla dolaşımını artırmaktadır. Paclitaxel konjugatı serbest Paclitaxele göre daha düşük IC<sub>50</sub> değerine sahiptir, magnetik alan uygulaması ile IC<sub>50</sub> değeri bazı karsinoma hücrelerinde düşmektedir. Magnetik alan, konjugat belli bir anatomik bölgede uygulandığında vücuttaki diğer bölgelerin konjugatın öldürücü etkisine maruz kalmamasını sağlamaktadır (115). Polimer bazlı Paclitaxel yüklenmiş bir MNP ilaç taşıma sistemi olarak geliştirilmiştir. Paclitaxel yüklü MNP *in vitro* sıçan aortik düz kas hücreleri üzerinde serbest Paclitaxel ile aynı düzeyde çoğalmayı engelleyen etki göstermiştir. MNP’nin etkileri magnetik alan ile artırılabilir. MNP’den Paclitaxel salımı dikkate değerdir (48 saatte %88) (116).

Süperparamagnetik Fe-NP’ler paclitaxeli taşımak üzere tasarlanmıştır. Paclitaxel-Fe-NP konjugatının serbest Paclitaxel’e göre suda çözünürlüğü 780 kat daha fazladır. Fofodiesteraz fosfodiester bağlarını kırarak paclitaxelin salınmasına neden olabilmektedir. Araştırmalar paclitaxel-Fe-NP’nin IC<sub>50</sub> değerinin serbest Paclitaxel IC<sub>50</sub> değerine göre yaklaşık 1000 kat düşük olduğunu göstermiştir (117).

Oleik asit kaplı ve pluronik-stabilize MNPler sentezlenmiştir. Bu MNP’ye anti-kanser Doxorubicin ve Paclitaxel ilaçları birlikte yüklenmiştir (118). Bu iki ilaç MNP’nin hücre çoğalmasını engelleme etkisi üzerinde sinerjistik bir etki yaratmıştır. Farelerde MRI sinyal yoğunluğu izlenebilmiştir ve sirkülasyon zamanının arttığı gözlenmiştir (119).

Biyobozunur poli (D,L-laktid) mikroküre magemit nanoparçacıklarının birleşimi ile magnetik bir Paclitaxel taşıyıcısı hazırlanmıştır. Salınlı magnetik alan Paclitaxel salımını artırmıştır, termal enerji salım davranışlarını etkilememiştir. İlaç salımını iyileştirmek üzere nanoparçacıkların farklı hareketlerinin sağlanması için farklı magnetik kuvvet uygulaması yapılmıştır. Dış magnetik alan vasıtasıyla MNP’nin tedavi için belli bir bölgeye güdümlü hedeflenmesi sağlanmıştır (105).

Hem floresan hem de MRI görüntüleme özelliklerinin kazandırılması için QD’ler yüzeyi karboksilatla fonksiyonlandırılmış Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkları ile konjuge edilmiştir. MNP’nin termal özellikleri aynı zamanda kanser hücresi baskılanmasını sağlayan ilaç salımını artıran hipertermiyi indüklemiştir. Paclitaxel MNP’nin yüzeyine Paclitaxel’i aşamalı salınan ince bir PLGA tabaka ile yüklenmiştir. Paclitaxel-PLGA-

KD-MNP'ler insan prostat kanser hücreleri PC3mm2 üzerinde doz bağımlı sitotoksik etki göstermiştir. Paclitaxel-PLGA-KD-MNP üzerine hedefleme amaçlı spesifik membran antijeni (anti-PSMA) bağlanmıştır. Anti-PSMA- Paclitaxel-PLGA-KD-MNP parçacıkları anti-PSMA ifadesi bulunan insan prostat kanseri LNCaP hücreleri üzerinde etki gösterirken anti-PSMA-negatif olan yani anti-PSMA ifadesi bulunmayan PC3mm2 hücreleri üzerinde etki göstermemiştir. KD'den kaynaklanan floresan özelliği ile *in vivo* olarak anti-PSMA-Paclitaxel-PLGA-KD-MNP'nin yoğunlaştığı tümör bölgelerinde belirlenmesi mümkün olmuştur (120).

### 2.3. Poli (amidoamin) (PAMAM) Dendrimerleri

#### 2.3.1. PAMAM Dendrimerlerinin Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Tüm dendrimerler 3 adet yapısal bileşen içermektedir. Bu bileşenlerden bir tanesi diamin merkezidir. Diamin merkezin amin kollarına bağlı terminaller perifer yapılanmalar gerçekleşmektedir (121). En çok kullanılan terminaller karboksilik asit grupları, hidroksil grupları ve amin gruplarıdır. Bu yapılanma uygun pH koşullarını, negatif, pozitif ve nötral yükleri gerektirmektedir. PAMAM moleküllerin ağaç benzeri dallanmış yapısında oluşan boşluklar, olasılıkla farklı moleküllerin PAMAM dendrimerleri ile birleşmesine olanak sağlayabilmektedir. pH-pKa dengesi hangi ilaç moleküllerinin PAMAM'ın iyonize veya nötral formlarında bağlantı kurabileceğini belirlemektedir. Merkezdeki amin gruplarının pKa' sı 7,0-9,0 arasında olmakla birlikte üçüncü derece aminlerin pKa değerleri 3,0-6,0 aralığında bulunmaktadır (122), (123), (124), (125), (126). Fizyolojik pH olan 7,4'te çoğu primer amin protonlanmış olarak bulunmaktadır ve üçüncü derece aminlerin hepsi pH: 5' te protonlanmış durumdadır. Bu nedenle PAMAM dendrimerlerinin protonlanma düzeyleri içinde buldukları çözeltinin pH değerine göre değişkenlik göstermektedir. Amin protonlanma derecesi PAMAM'ın diğer moleküller ile kuracağı bağların oluşabilmesi için önemli bir etkendir (127).

Dendrimerler başlangıçta miselli yapıya sahip moleküller gibi görünmektedir, yine de solid yapıları kovalent bağlar oluşturmalarına olanak vererek spesifik bir ortam içerisinde spesifik bir kritik misel konsantrasyonu ile amfifilik misel oluşumunun kendiliğinden gelişimini sağlamaktadır. Yine de PAMAM'lar pH-pKa dengesine bağlı protonlanma özellikleri dolayısıyla alışlageldik misel özellikleri arasında bulunmayan fonksiyonel grup iyonizasyon potansiyeli taşımaktadır (128), (129).

Düşük jenerasyon PAMAM dendrimerlerinin (3. jenerasyona kadar) çoğunlukla düzlemsel bir yapı sergiledikleri kabul edilmektedir. Jenerasyon 3,0 ve 4,0 arasındaki ve daha üst jenerasyon PAMAM'ların globüler bir yapıya sahip oldukları bilinmektedir (130), (131), (132). Periferal terminal grupların açığa çıkmasını ve yapının içerisine diğer moleküllerin yerleşmesini sağlayan boşlukların bulunmasını düzlemsel ve globüler yapıya sahip olma nitelikleri etkilemektedir. Jenerasyon 5 ve daha yüksek jenerasyonlu PAMAM'ların üzerinde bulunan boşluk hacminin daha yüksek olduğu gözlemlenebilmektedir, bu yüksek boşluk hacmine sahip PAMAM'ların diğer küçük PAMAM'larla karşılaştırıldığında gen transfeksiyonunda kullanılan nükleik asit gibi büyük molekülleri, boşluk yükleme hacimlerinin yüksek olması nedeniyle, yapılarına kabul edebilmektedir. pH etkisi dendrimer boyutlarını etkilemektedir. pH: 10,0 ve daha yüksek pH' larda protonlanmamış PAMAM'ların protonlanmış PAMAM'lara göre daha düşük boşluk yükleme hacmine sahip olduğu gösterilmiştir (133).

### **2.3.2. PAMAM Dendrimerlerinin Çözünürleştirme Mekanizması**

Spesifik bir ilaç taşıyıcısına ilacın yüklenmesi olayının gerçekleşmesi klasik çözünürleştirme teorisi ile açıklanmaktadır. Çevresel etmenlerden dolayı ilaç, taşıyıcı görevi gören dendrimer yapısına katılabilir ya da katılmayabilir. İlaç molekülünün su içerisinde çözünürlüğü düşükse, dendrimer daha yüksek bir hidrofobik çevre sunuyorsa, ilaç dendrimer yapısına yerleşmeye eğilimli olmaktadır (134).

Çoğu hidrofobik ilaç, hidrofobik bağlanma gücüne gerek duyulmadan hidrofobik etkileşim gerçekleşebiliyor olsa da sudan kaçma eğilimi göstermektedir, sudan kaçabildikleri çevrelerde kendi başlarına hareket etme eğilimindedir. PAMAM dendrimerlerinin nötral hallerinde nötral ilaç molekülleri dendrimer üzerindeki boşlukların içerisine yerleşmeyi tercih etmektedir. Hidrofobik steroidler, örneğin testosteron, PAMAM dendrimerlerinin kollarının arasında bulunan boşluklara hidrofobik ekileşim aracılığıyla yerleşmektedir (127).

Dendrimer dalları arasındaki boşlukların sayısına bağlı olarak ilaç moleküllerinin bir kısmı dendrimer yapısına katılabilmektedir. Diğer ilaç-polimer bağlanmalarında da karşılaşılan bu kısıt, sınırlı yükleme kapasitesi olarak nitelendirilmektedir. İlaç moleküllerinin dendrimer içerisinde yerleşimi ilaç moleküllerinin birarada iken barındırdıkları kohezivlik (birbirine yapışkanlık)

özelliklerinde azalmaya neden olmaktadır. Dendrimer içeriğindeki “kritik” miktardaki ilaç moleküllerinin çözünürlüğü artmaktadır. Öncelikli olarak ilaç molekülleri dendrimer dış yüzeyine bağlanmaktadır, koheziv özellikleri bu şekilde azalmaya başlamaktadır, ilaç moleküllerinin belli bir bağlanma sayısını aşmaları durumunda oluşan termodinamik çözünme dengesi sonucu tekrar kohezivlik özelliklerinde artış meydana gelmektedir (127).

Benzer bir kısıtlamaya yüklü moleküllerin yüklenme kapasitesinde de karşılaşmaktadır. Bir dendrimer çoğunlukla perifer kollarında yüklü moleküller ile etkileşime girebilme özelliğine sahip belli sayıda yüklü gruplar içermektedir. Dendrimer yüzeyindeki yüklü grupların molar limiti aşıldığında bu alanlarla bağ oluşturabilme özelliğindeki yüklü ilaç moleküllerinin daha fazla bağlantı yapabilmesi mümkün olmamaktadır (127).

pH etkisine bağlı olarak PAMAM dendrimerleri ve ilaç molekülleri arasında önemli derecede değişkenlik gösteren pKa değerleri bulunmaktadır, bu değişkenlik farklı iyonizasyon derecelerinin görülmesine neden olmaktadır. Öyleki, ilaç PAMAM dendrimeri üzerine yüklenirken, yükleme ortamında önemli pH değişimleri meydana gelebilmektedir (135). Yükleme tamamlandığında hidrofobik etkileşimlerin gerçekleşmesini sağlamak amacıyla yükleme ortamının pH'ı tekrar ayarlanabilmektedir. Yine de fizyolojik koşullarda hem PAMAM hem de ilaç molekülleri tamamen iyonlaşabilmektedir. Aynı zamanda yükleme oranında dendrimer boşluklarına yerleşebilen ilaç moleküllerinin miktarı ile fizyolojik koşullarda yerleşebilen ilaç molekülü miktarı arasında farklılıklar bulunabilmektedir. Bu durum aynı zamanda elektrostatik etkileşimler gibi bazı etkileşimlerin dendrimere ilaç moleküllerinin yüklemesi sırasında değil sadece ilaç moleküllerinin dendrimere salımı sırasında gerçekleştiğini açıklamaktadır (127).

### **2.3.3. PAMAM Dendrimerlerin Toksikitesi ve Biyodağılımı**

Tüm diğer ilaç taşıyıcı polimer sistemlerinde olduğu gibi, dendrimerlerde de bir dereceye kadar toksisite ile karşılaşmaktadır. Katyonik dendrimerlerde yüzeyde bulunan yüklerin yoğunluğu nedeniyle ve dendrimer yapısının negatif yüklü membranlarla etkileşimi ve bozunması dolayısıyla toksisite görülmektedir (136), (137), (138), (139).

Amin terminalli PAMAM'ların yüzeyindeki yük yoğunluğu sahip oldukları jenerasyona göre değişiklik göstermektedir (140). Bu bilgiden yola çıkılarak daha fazla terminal grup içeren katyonik PAMAM dendrimerlerin negatif yüklü membranlarla daha fazla etkileşim kurup bu etkileşimleri yok edebileceği açıklaması yapılabilmektedir (141), (142).

Küçük boyuttaki dendrimerler membran katmanları tarafından daha kolay absorbe edilmektedir. Örneğin 2. jenerasyon PAMAM dendrimeri 6. jenerasyon PAMAM dendrimerine göre membran tarafından daha kolay absorblanmaktadır (143).

Bu gözlemler genellikle *in vitro* sistemlerde elde edilmiştir, *in vivo* modeller *in vitro* sistemlere göre daha gerçekçi bir sitotoksosite değerlendirmesi yapmaya olanak verebilmektedir, çünkü *in vitro* sistemler toksik etkilere bütüncül bir organizmaya göre daha hassastır (144). CD-1 fare türünde yapılan bir araştırmada anyonik PAMAM dendrimerlerin oral dozlarını katyonik PAMAM dendrimerlere göre 10 kat daha çok tolere edebildiği gösterilmiştir (145). Hemotoksosite, PAMAM dendrimerlerinde karşılaşılan istenmeyen bir toksisite çeşididir. Bu tip bir toksisiteye deneysel koşullar ve modeller de neden olabilmektedir. Katyonik PAMAM dendrimerlerinin kanda platelet aktivasyonu vasıtasıyla protrombotik etki yarattığı belirlenmiştir (146). 3. ve 4. jenerasyon PAMAM dendrimerlerinin vasküler endotelial lezyonlar oluşturmaya yatkın olduğu ve kanın pıhtılaşmasını desteklediği gösterilmiştir (127).

Nötral hidroksil- veya biyobozunabilir ester- merkezli dendrimerlere (147) ve negatif yüklü karboksilat merkezli dendrimerlere (148) göre yüzeyi kimyasal modifikasyona uğramış negatif veya nötral yüklü merkeze sahip dendrimerler daha az sitotoksosite sergilemektedir. PAMAM dendrimerlerine karşı tolerans, kitosan ve akrilat polimerleri gibi diğer polimerlere gelişen toleransa oranla daha fazladır (149), (150).

PAMAM dendrimerlerin toksik özelliklerinin azaltılması için PEGilasyon (polietilenglukolasyon) prosesinden faydalanılmaktadır. Nötral PAMAM dendrimerler, hücreleri, yüklü amin terminallerine maruz bırakmadıkları için daha düşük toksik etki yaratma eğilimindedir (151).

Diğer bir potansiyel toksisite tipi, PAMAM dendrimerlerinin *in vivo* uygulanmasından sonra spesifik olmayan bir yolla çeşitli organ ve dokularda

birikmesidir. Hem pozitif hem de negatif yüklü PAMAM dendrimerlerinin intravenöz uygulamasından sonra kandan hemen hemen hepsinin temizlendiği gözlemlenmektedir. Sıçanlarda gadolinyum-PAMAM kontrast ajanı için tüm PAMAM dendrimerlerinin karaciğerde biriktiği çok az bir kısmının böbreklerle atıldığı görülmüştür (152). İnsanlarda PAMAM fetal membrandan doğrudan geçebilmektedir. PAMAM-ilaç konjugatlarının, topikal intravajinal uygulaması sırasında, fetüse transportun engellenmemesi durumunda plasental membrandan geçebildiği gösterilmiştir (153). PAMAM dendrimerlerinin farelerde intranasal uygulamasından sonra beyinde biriktiği gösterilmiştir (154). Genel olarak modifiye edilmemiş ve 5. jenerasyona kadar olan küçük PAMAM dendrimerleri diğer PAMAM dendrimerlerine göre daha düşük toksisteye sahiptir, 6. jenerasyondan daha büyük PAMAM molekülleri jenerasyon numarası arttıkça artan toksisite özellikleri sergilemektedir (136), (155). Negatif ve nötral PAMAM dendrimer seçimi neredeyse non-toksik oldukları ispatlandığı için daha güvencelidir (136), (156). PAMAM dendrimerleri, su ve yağda çözünebilme özelliği nedeniyle çevre kirliliğine yol açma potansiyeli taşımaktadır, oksidasyon reaksiyonları ve irradyasyona maruz kalma sonucu oluşan ikincil PAMAM dendrimerlerinin, ana PAMAM dendrimerlerine göre daha toksik olduğu gösterilmiştir (157).

PAMAM dendrimerleri ile ilgili gelinen son noktada *in vitro* çalışmalar için birçok patent bulunmaktadır. *In vivo* ve insan araştırmaları için henüz PAMAM patenti bulunmamaktadır. PAMAM ilaç taşıma sistemlerinin farmasötik formları henüz yayınlanmaya başlanmıştır. Ticari üretimleri oldukça düşük olmasıyla birlikte, PAMAM dendrimerlerinin büyük ölçekli üretimi ile ilgili çalışmaların ilk adımları atılmıştır. Kilogram bazında PAMAM üretimi Amerika (Dendritech Inc.) ve Asya (Weihai CY Dendrimer Technology) kökenli iki firma tarafından gerçekleştirilebilmektedir. PAMAM dendrimeri ticari üretim kapasitesinin artmakta olduğu gözlemlenmektedir. Farmasötik yardımcı maddelerin düşük maliyetli, fazla miktarda üretilebilen, kanıtlanmış güvenlik kayırları bulunan, istenen teknolojik özelliklere sahip olmaları tercih edilmelerini sağlamaktadır. Henüz PAMAM dendrimerlerinin bu özelliklere sahip formları geliştirilememiştir. Çeşitli koşullar altında birçok tıbbi ajanın çözünmesi açısından PAMAM dendrimerleri yüksek bir kapasite sergilemektedir. Yine de yaklaşık olarak 30 yıldır varlığı bilinen bu

moleküllerin farmasötik yardımcı madde olarak geliştirilmesi için kısa bir süreç geçmiştir.

PAMAM dendrimerlerinin biyodağılımı ve organizmadan atılımı süreçlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için en az 1 yıllık gözlem yapılmasına olanak sağlayan çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu şekilde toksisite etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi olanağı bulunacaktır (158). Özellikle katyonik PAMAM'lar başta olmak üzere PAMAM dendrimerleri sitotoksik etki göstermektedir. Hücre içine ve nükleus içerisine girebilen polikatyonik peptidler göz önünde bulundurulduğunda bu moleküllerin hücre içi terapötik ajan salımında kullanıldığı ve bu peptid zincirlerinin de diğer birçok katyonik molekül gibi toksik etki sergiledikleri gözlemlenmektedir (159), (160). PAMAM dendrimerlerinin bazı dozlarının tolere edilebilir toksik etki yaratması özel salım sistemi olarak kullanımı olanağını gündeme getirmektedir.

Katyonik dendrimerlerin toksisitesinin düşürülmesi için yapılan araştırmalarda çeşitli modifikasyonlar denenmiştir. Bunların arasında yarım-jenerasyonlu dendrimerlerin kullanıldığı katyonik olmayan terminaller bulunmaktadır (161). Dendrimer terminallerine PEG ve lauroil zincirleri bağlantısı bulunmaktadır (140). Amin terminallerinin modifikasyonu nötral asetamid terminallerine dönüştürme ile sağlanmaktadır (162). PAMAM dendrimerlerinin hidroksil gruplarının esterifikasyonu, KB ve HepG2 hücrelerine gen transferinde sitotoksisteyi azaltan etki göstermiştir (163).

Gen transferinde biyobozunur esterler PAMAM-OH dendrimerlerine göre arjinin kopmasından sonra daha güvenli olarak değerlendirilmiştir (147). Bu sebepten dendrimer teknolojisinin geliştirilmesi evrelerinde nötral ya da negatif yüklü PAMAM dendrimerlerinin üstünde durulmasının gelecek çalışmalar için tercih sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. PAMAM dendrimerlerinin PEGilasyon yöntemi ile modifikasyonu yalnızca nötral PAMAM eldesinde değil, aynı zamanda karaciğer ve böbrekte birikimi engellemek açısından faydalı gözükmektedir (164).

Kovalent modifikasyonla oluşturulmuş ve terminal uçlarına ilaç parçacıklarının bağlanması sağlanmış PAMAM dendrimerleri dispersif ve elektrostatik etkileşimli pasif enkapsülasyon sistemlerine göre ilaç salımı açısından daha etkili sistemleridir. Bu yüzden ilaç-dendrimer konjugatlarının yeni kimyasallar olarak ruhsatlandırılması gündeme gelmektedir (165).

PAMAM dendrimerlerinin henüz farmasötik yardımcı madde olarak kullanımı gerçekleştirilememektedir, ancak bu bu dendrimerler nanotaşıyıcı olarak altın değerinde bir niteliğe sahip olabileceğini kanıtlama potansiyeline sahiptir (127).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler ve Kimyasallar

**Tablo 3.1.** Tez projesi kapsamında kullanılan gereçlerin adları, marka ve modelleri.

Gereç		Marka-Model
Otomatik Pipetler	100-1000 µl	Brand
	10-100 µl	Gilson
	1-30 µl	Gilson
Buzdolabı (+4 °C)		Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)		Arçelik
Derin Dondurucu (-80°C)		Thermo Scientific
Analitik Terazî		Scaltec SBC31
Santrifüj		Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400
İnkübatör		Thermo Electron Corporation's Class 100
Laminar Akım Kabini		Esco Class II, Biological Safety Cabinets
Işık Mikroskobu		Olympus-CH30
Inverted mikroskop		Olympus-CKX41
Nicolet™ iS50 FTIR Spektrofotometresi		Thermo Scientific
HPLC		Agilent 1100 Serisi
HPLC Kolonu		ACE C18-300 A
HPLC Guard Kolonu		ACE C18
Elektrokimyasal Dedektör		HP 1049A
İzokratik Pompa (G1310A)		Agilent 1100 Serisi
Manuel Enjektör Bloğu G1328A 7725I		Rheodyne LLC
Kolon Fırını		Agilent 1100 Serisi
Kromatografik Veri İşleyicisi		HP ChemStation for LC Rev A 06.03C509

**Tablo 3.2.** Tez projesi kapsamında kullanılan kimyasalların adları, marka ve modelleri.

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Marka</b>
5. generation PAMAM	536709 CAS No: 163442-68-0	Sigma
N-(3-Dimetilaminopropil)- N'-etilcarbodiimid hidroklorid, (EDC)	E6383 CAS No:25952-53-8	Sigma
Asetik anhidrid	242845 CAS No:108-24-7	Sigma
3-(4,5-dimetil-2-thiazoli)-2,5-difenil- 2Htetrazolyum bromid (MTT)	M2128 CAS No:298-93-1	Sigma
Folik Asit	F7876 CAS No:59-30-3	Sigma
Dimetil sülfoksit	D2650 CAS No: 67-68-5	Sigma
Paclitaxel	T7402 CAS No:33069-62-4	Sigma
Trietilamin	121-44-8	Sigma
Sodyum Dihidrojen Fosfat	331988 CAS No:7558-80-7	Sigma
Asetonitril	271004 CAS No:75-05-8	Sigma
Metanol	34860 CAS No:67-56-1	Sigma
Tıpan Mavisi	03-102-1B	Biological Industries
Selüloz Diyaliz Membran (8-10 kDA	131264	Spectrum

molecular weight cut off)		
DMEM (High Glucose)	DMEM-HPSTA	Capricorn Scientific
Penisilin-streptomisin	PS-B	Capricorn Scientific
L-glutamin	GLN-B	Capricorn Scientific

### 3.2. Yöntem

Deneysel olan bu araştırma *in vitro* koşullarda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarının imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1. 5.J PAMAM-Paclitaxel Komplekslerinin Oluşturulması

##### PAMAM-Paclitaxel Konjugasyonunun Oluşturulması İçin İzlenen Yöntem

5,6 µL PAMAM, 5 ml Dimetilsülfoksit (DMSO), 27,5 µL Trietilamin cam tüp içerisinde karıştırılarak 1 numaralı çözelti oluşturuldu. 13 µL asetik anhidrit ile 5 ml DMSO cam tüp içerisinde karıştırılarak 2 numaralı çözelti oluşturuldu. 2 numaralı çözelti damla damla 1 numaralı çözeltiliye eklendi. Ekleme işlemi sırasında her damlatmayı takiben 1 numaralı çözelti çalkalandı. Oluşan son çözelti 25°C’de 24 saat boyunca su banyosunda bekletildi. Bu şekilde PAMAM modifikasyonu elde edildi.

3,5 mg folik asit, 13,5 mg N-Ethyl-N’-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), 6 ml DMSO cam tüp içerisinde ve 25°C’de 3 saat boyunca karıştırıldı. Elde edilen bu çözelti PAMAM modifikasyonuna damlatılarak karıştırıldı.

Paclitaxel oluşan son ürün ile karıştırıldı. PAMAM-Paclitaxel konjugatı elde edildi.

Kullanılan tüm kimyasalların ve oluşturulan çözeltiler içerisinde elde edilen reaksiyon ürünlerinin FTIR ölçümü ile, yan gruplarında oluşan ve kopan bağlar değerlendirildi.

PAMAM-Paclitaxel kompleksi konsantrasyonları hücre kültüründe MTT sitotoksikite analizine tabi tutuldu.

### 3.2.2. Fourier Transform İfrared Spektrumu (FTIR) ile Ölçüm

5.J PAMAM'la başlayıp 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinin oluşumuna kadar izlenen her basamakta alınan 10 uL'lik örneklerde oluşan ve kırılan bağlar FTIR cihazı ile ölçülmüştür.

Ölçümler  $15-27,000\text{ cm}^{-1}$  spektral aralıkta yapılmıştır.

### 3.2.3. *In vitro* Salım Kinetiği Ölçümü

*In vitro* salım kinetiği ölçümü için HPLC cihazı kullanılmıştır. Moleküler büyüklük sınırlaması 10000 olan diyaliz membranının içine elde edilen 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi fosfat tamponunda çözdürülerek konmuştur. Diyaliz membran pH:7,4 olan 15 ml fosfat tamponu ortamına bırakılmıştır. Bu ortam  $37^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı su banyosunda bekletilmiştir. Her saat başı fosfat tamponu ortamından 3 ml örnek alınmış ve bu miktarın yerine yine 3 ml fosfat tamponu beslemesi yapılmıştır. Alınan örneklerdeki Paclitaxel konsantrasyonu HPLC metodu ile ölçülmüştür.

Ölçümler fosfat tamponu içerisinde çöken Paclitaxel konsantrasyonunun HPLC yöntemiyle belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Fosfat tampon ortamı  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda tutulmuştur. 10mg/mL DMSO'da çözülmüş Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  olacak şekilde 1 ml'lik fosfat tamponu çözeltileri elde edilmiştir. Çözeltiler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de karıştırılmıştır. Önceden belirlenen zaman aralıklarında çözeltiler 300 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar, presipitatların uzaklaştırılması için son olarak 10000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Presipitatların uzaklaştırılması ile elde edilen çözeltilerden alınan örnekler HPLC ölçümünde kullanılmıştır. *In vitro* salım kinetiği ortamı olarak 1 ml fosfat tamponu kullanılmıştır. Önceden belirlenen zaman aralıklarında 10000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. 0,8 mL süpernatant örnek olarak alınıp aynı miktardaki taze ortam fosfat tamponu içine eklenmiştir. Salım kinetiği çalışması sonlandıktan sonra örneklerdeki 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi içeriğindeki salınmamış Paclitaxel konsantrasyonu HPLC yöntemi ile belirlenmiştir.

### 3.2.4. Hücre Kültürü

MDAH 2774 hücre hattı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Cumhuri Gündüz'ün oluşturduğu hücre hattı koleksiyonundan temin edilmiştir.

**Tablo 3.3:** MDAH 2774 Hücre Hattı Özellikleri

Organizma	<i>Homo sapiens</i> (insan)
Morfoloji	Epitel
Kaynak	Over
Hastalık	Ovaryan endometrioid adenokarsinoma
Cinsiyet	Kadın
Kategori	Kanser hücre hattı

MDAH 2774 endometrioid over adenokarsinoma hücreleri, içeriğinde %10 FBS, %1 l-glutamin, %1 penisilin-streptomisin bulunan DMEM-High Glucose besi ortamında kültüre edilmiştir.

Hücrelerin kültürü 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda gerçekleştirilmiştir. İç ortam olarak %5 CO<sub>2</sub>, %95 hava ortamı ve nem içeren 37°C sabit sıcaklığa sahip inkübatörde tutuldu. Hücrelerin çoğalma durumları göz önünde bulundurularak taze besi ortamı eklenmesi haftada ortalama 3 kez gerçekleştirilmiştir.

Hücre çözündürme, pasajlama ve dondurma işlemleri laminar akım kabinde, hücre kültürü mikroskopik incelemesi inverted mikroskop ile, canlı hücre sayısını belirleme işlemi ışık mikroskopunda Tripkan Mavisini boyasıyla boyama işlemi ile, hücre stoğu saklama ve depolama işlemleri -80°C'deki buzdolabında gerçekleştirilmiştir.

Hücre çözündürme işlemi -80°C'de bulunan kriyoviyal tüp içerisindeki hücre stoğunun buz üzerinde kriyoviyal tüp içerisine taze besi ortamı eklenerek yavaş yavaş çözündürülmesi ile başlamıştır. Buz parçacıkları yok olana kadar otomatik pipet aleti ve filtreli steril pipet uçları kullanılarak nazikçe pipetleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözünen hücreler içinde 5 ml taze besi ortamı bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve tekrar pipetlendikten sonra tüp 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra santrifüj işlem aynı koşullarda tekrar gerçekleştirilmiştir.

Hücre pasajlama işlemi hücre sıyırıcıları vasıtası ile gerçekleştirilmiştir. Pasajlama yapmadan önce canlı hücre sayısı belirleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Canlı hücre sayısının 1 ml başına  $10^5$ - $10^6$  aralığında bulunmasına dikkat edilmiştir. Flaskta yüzeyi kaplamış durumdaki hücreler kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml fosfat tamponu ile yıkanmıştır. 5ml serumsuz besi ortamı flask içine konulup hücreler hücre sıyırıcısı vasıtasıyla yüzeyden kaldırılmıştır. Flask içeriğindeki hücre-serumsuz besi ortamı karışımı 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alınıp 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 15 ml taze besi ortamı eklenmiş ve nazıkçe pipetleme işlemi yapılmıştır. Bu karışımdan 50 µl ayrılarak geri kalan kısım iki ayrı flaska aktarılmıştır. Ayrılan 50 µl'lik kısım hücre canlılık testinde kullanılmıştır.

Hücre dondurma işlemi hücre kültürü ilk pasajından sonra, dirençli hücre geliştirme işleminin her aşamasında gerçekleştirilmiştir. Flask içerisinde hücreler yüzeyi en az %80 oranında kapladığında hücreler tarafından kullanılmış besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 ml fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Flaska 5 ml serumsuz besi ortamı eklenip hücre sıyırıcısı vasıtasıyla hücreler kaldırılmıştır, Elde edilen bu karışım 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Buz üzerine alınan hücre pelleti üzerine 900 µl taze-soğuk %10 serumlu besi ortamı konmuştur, hücre canlılık testi için 50 µl bu karışımdan ayrılmıştır, hücre-besi ortamı karışımına içeriğinde 1:9 oranında DMSO bulunan FBS'den 800 µl eklenmiş ve kriyoviyal tüpe aktarılmıştır. Kriyoviyal tüpler üzerine hücre hattı adı, pasaj sayısı ve tarih yazılıp, öncelikle 1 saat  $-20^{\circ}\text{C}$  dondurucuda bekletilmiştir, sonra  $-80^{\circ}\text{C}$  dondurucuya aktarılarak muhafaza edilmiştir.

Hücre canlılık testi-canlı hücre sayısını belirleme işlemi pasajlama ve dondurma işlemi sırasında elde edilen 50 µl'lik hücre süspansiyonunun üzerine 50 µl Tripan Mavisi eklenip Neubauer lamına aktarılarak ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiştir. Lam üzerindeki 16 kareden 4 tanesi seçilerek alan üzerindeki boyanmamış hücreler sayılmıştır ve ortalamaları hesaplanmıştır. Bulunan ortalama seyreltme faktörü ile  $2 \times 10^4$  ile çarpılarak 1 ml'deki canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

Hücrelerde direnç geliştirme işlemi MDAH 2774 hücrelerinde Paclitaxel için hesaplanan  $IC_{50}$  dozunun uygulanması ile 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir.  $IC_{50}$  dozu uygulandıktan 1 gün sonra kullanılmış besi ortamı

çekilerek yerine Paclitaxel içermeyen taze besi ortamı eklenmiştir. Canlı kalan hücreler kuyucuklar içerisinde koloniler oluşturmuştur. Elde edilen kolonilerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir, hücreler kuyucuk yüzeyinin en az %80'ini kapladıktan sonra IC<sub>50</sub> dozu uygulanmıştır. Her pasajlama işlemi yaklaşık 4-5 gün sonra yapılmıştır. Direnç kazanan hücreler IC<sub>50</sub> dozu uygulandığında mikroskopik gözlem yapıldığında koloni oluşturmaksızın hücre kültür kabı yüzeyini kaplamaya başladıklarında uygulanan Paclitaxel dozu artırılmıştır. Her doz artırım aşamasında hücre dondurma işlemi gerçekleştirilmiş ve hücrelerdeki MDR1 gen ekspresyonu düzeyleri ölçülmüştür. Toplam direnç geliştirme süresi 8 hafta sürmüştür.

### 3.2.4.1. Paclitaxel'in MDAH 2774 hücreleri üzerinde %50 öldürücü etki yaratan dozunun (IC<sub>50</sub>) belirlenmesi

IC<sub>50</sub> dozunun belirlenmesi için MTT testi uygulanmıştır. Sarı renkli MTT maddesi yaşayan hücrelerdeki mitokondri içerisinde mor renkli formazan kristallerine indirgenmektedir. Spektrofotometrik ölçüm yöntemi kullanılarak formazan kristallerinin oluşturduğu absorpsiyonlar 570 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. İstatistiksel anlamlı bir ölçüm gerçekleştirmek için hücreler 3'lü gruplar halinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa kuyucuk başına 9000 hücre düşecek şekilde 100 µl hacminde ekilmiştir. 10µM ile 1 nM aralığındaki Paclitaxel konsantrasyonlarında ilaç uygulandıktan sonraki 24., 48. ve 72. saatler için 10µl'lik MTT eklenerek ilk 30 dakika ile 4 saat arasındaki her yarım saatte bir ölçüm gerçekleştirilerek absorpsiyon değerleri kaydedilmiştir. 24., 48. ve 72. saatler için IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. İlacın uygulanmadığı son sıradaki hücre grubu kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Aşağıda IC<sub>50</sub> dozu belirlenirken 96 kuyucuklu kültür kabında Paclitaxel, PAMAM, 5.J PAMAM-Paclitaxel için oluşturulan gruplar gösterilmektedir.

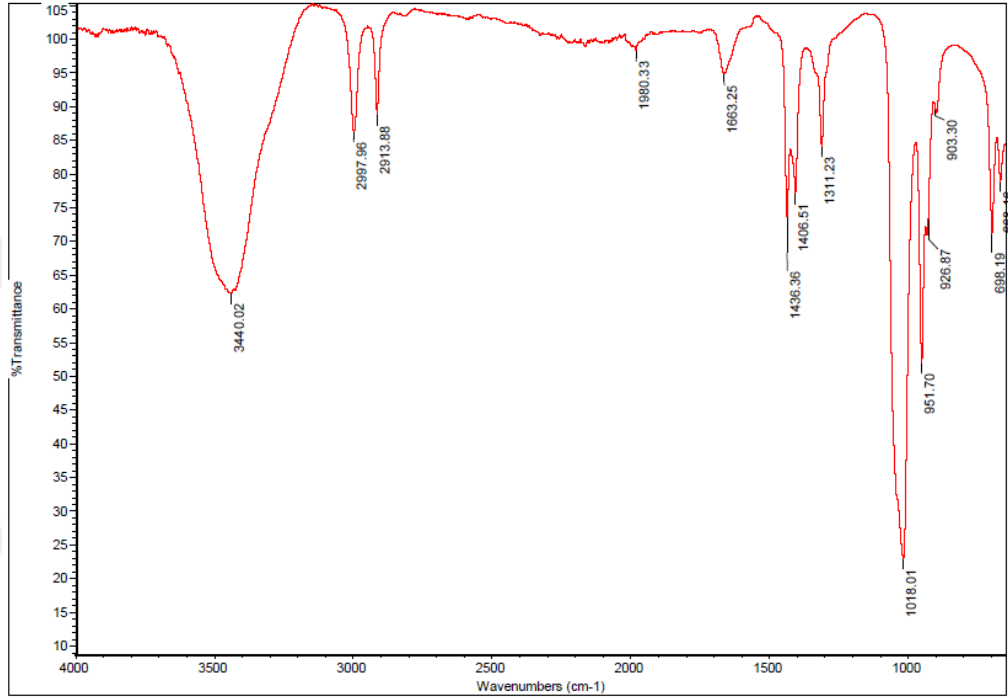
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	10µM	Paclitaxel			PAMAM			5.J PAMAM-Paclitaxel				
C	1µM											
D	100nM											
E	10nM											
F	1nM											
G	Kontrol											
H												

**Şekil 3.1.** IC<sub>50</sub> dozu belirleme testinde oluşturulan deney gruplarının 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşimi

## 4. BULGULAR

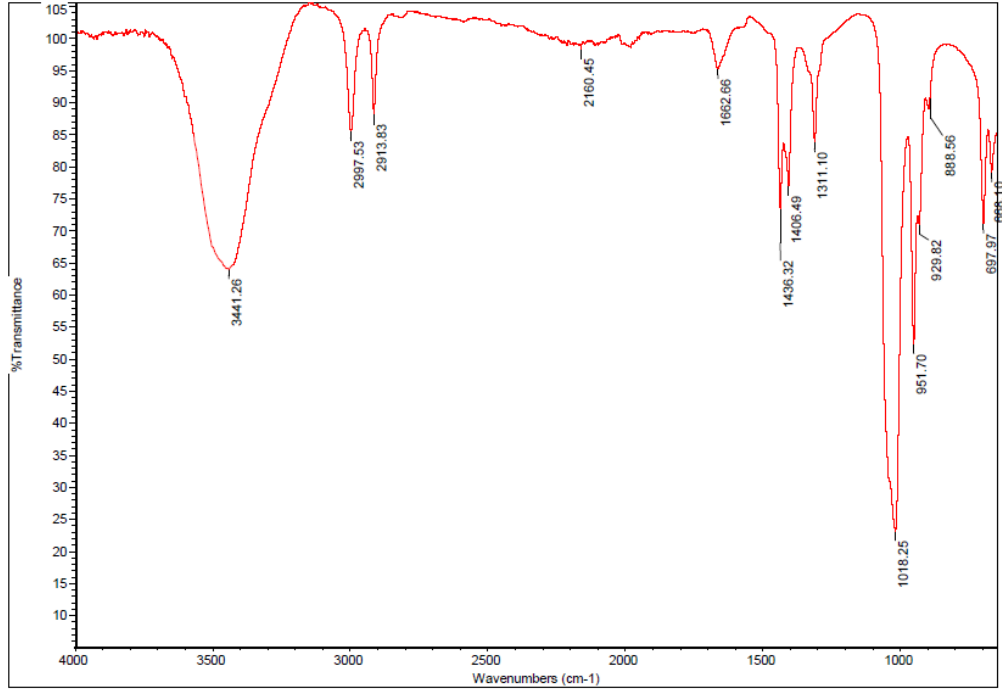
### 4.1. Reaksiyon Ürünlerinin FTIR Sonuçları

Gerçekleştirilen aşamalı reaksiyonlar sonusunda 5.J PAMAM asetillenmesi, folik asit bağlanması ve Paclitaxel ile kompleks oluşumu gerçekleşmiştir. Şekil 4.1.'de 5.J PAMAM'a folik asit bağlanması için gerçekleştirilen bir dizi reaksiyon sonucu oluşan bağların dalga numaralarına göre transmittans verileri gösterilmektedir.



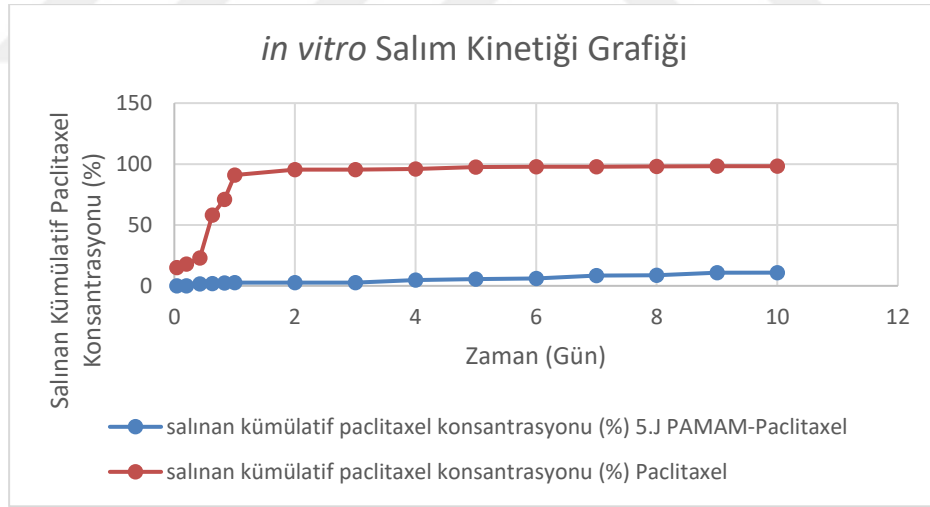
Şekil 4.1. Reaksiyon ürünlerinin FTIR sonuçları

Şekil 4.2.'de 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinin oluşması ile elde edilen bağların dalga numaralarına göre transmittans değerleri görülmektedir. Bağların transmittans verileri 5.J PAMAM ile Paclitaxel arasında non-spesifik bağlar oluştuğunun kanıtıdır.



Şekil 4.2. Reaksiyon ürünlerine Paclitaxel bağlanması ile elde edilen FTIR sonuçları

#### 4.2. In vitro Salım Kinetiği Ölçümü

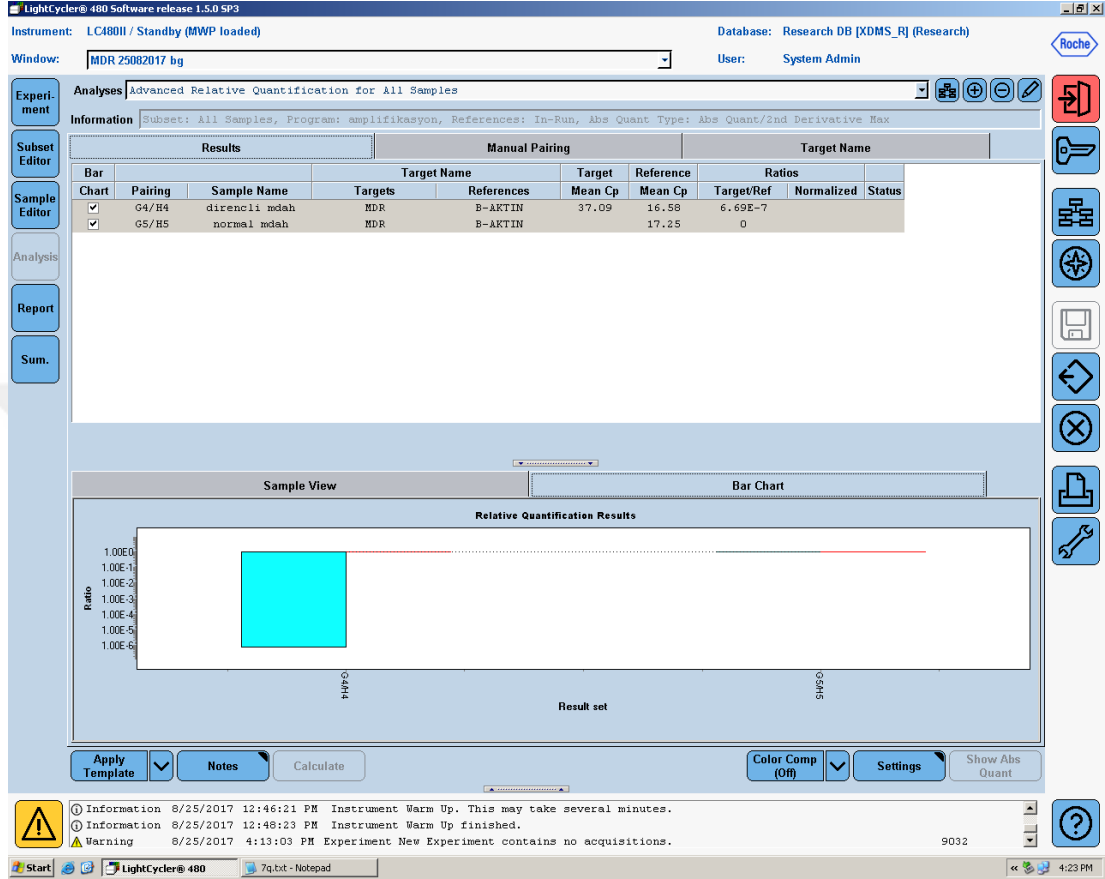


Şekil 4.3. Serbest Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi için *in vitro* salım kinetiği sonuçları

#### 4.3. MDR1 Gen Ekspresyon Düzeyleri

MDR1 gen ekspresyonunun artırılması ve direnç oluşması planlanan hücre grubunda 7 hafta boyunca Paclitaxel uygulaması sonucu herhangi bir uygulamaya maruz bırakılmamış MDAH 2774 hücrelerinde görülmeyen MDR1 gen ekspresyonu

oluşturmuştur. Şekil 4.1’de direnç oluşturulan hücrelerde MDR1 gen ekspresyonundaki farklılık gösterilmektedir.

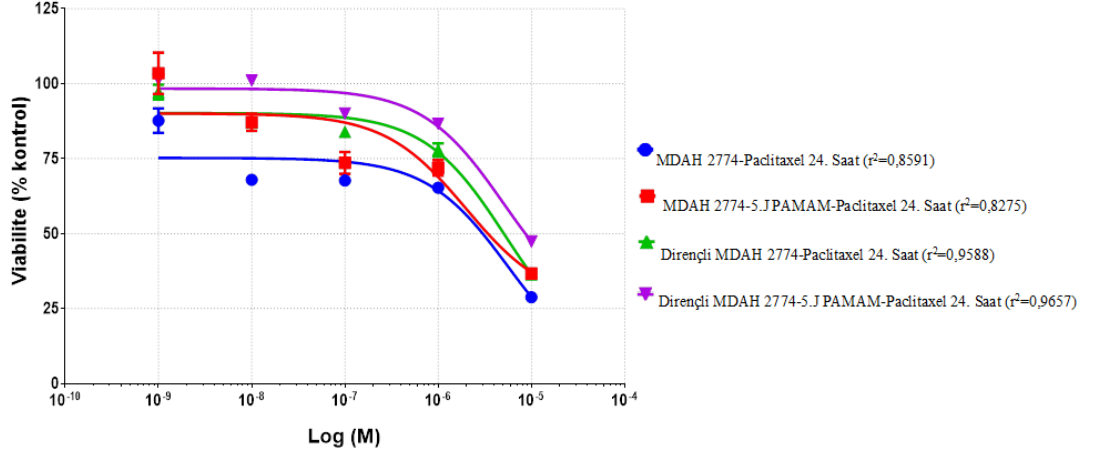


Şekil 4.4. MDAH 2774 dirençli ve dirençsiz hücre hatlarındaki MDR-1 gen ekspresyonu göstergeleri

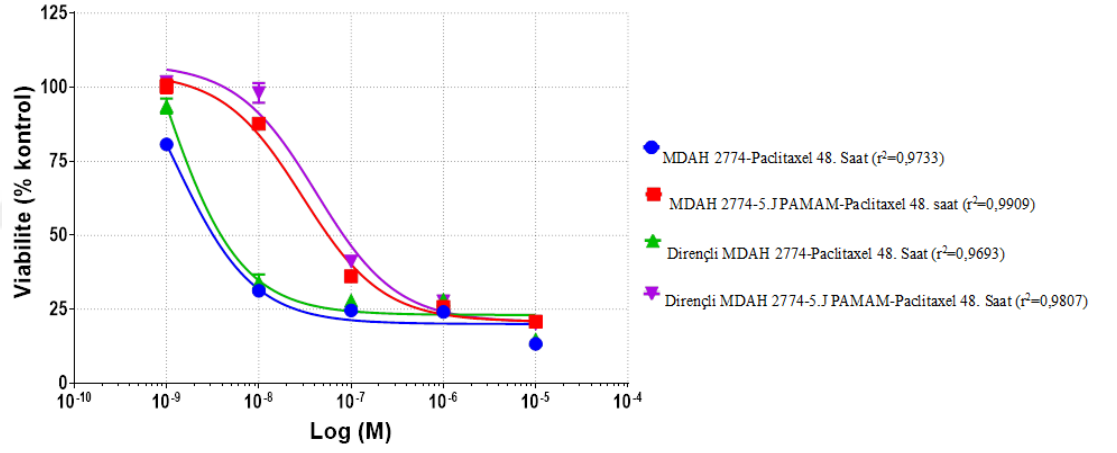
Şekil 4.4.’de gösterilen sonuçlar direnç geliştirilmeye çalışılan hatta yaklaşık 6/1000000 düzeyinde direnç geliştiğini göstermektedir.

#### 4.4. Sitotoksiste Testi

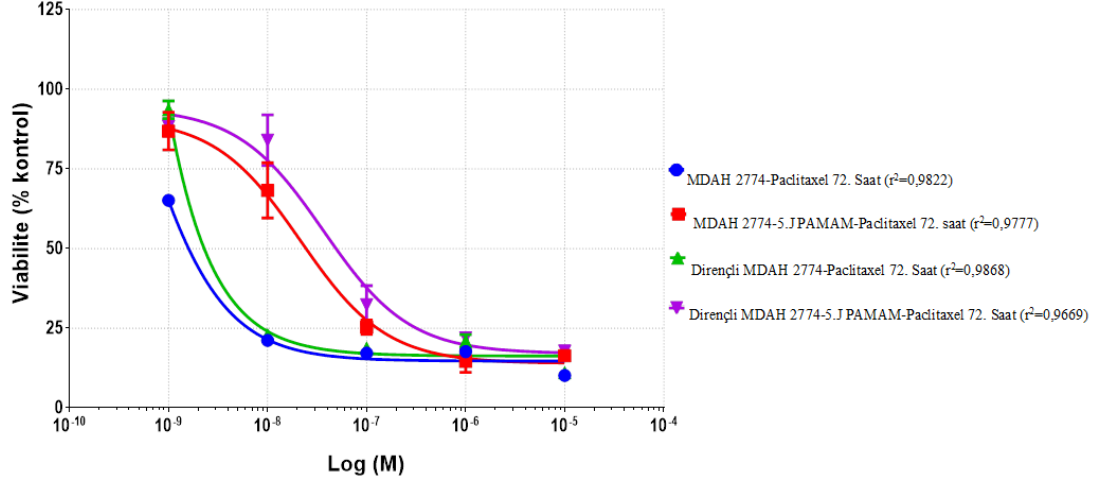
Sitotoksiste testi yapmak için paclitaxel etken maddesinin MDAH 2774 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi uygulanmıştır. 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarında gerçekleştirilen reaksiyon ölçümleri spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. 30 dk-4 saat arası her yarım saatte spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen absorbans değerleri kaydedilmiştir.



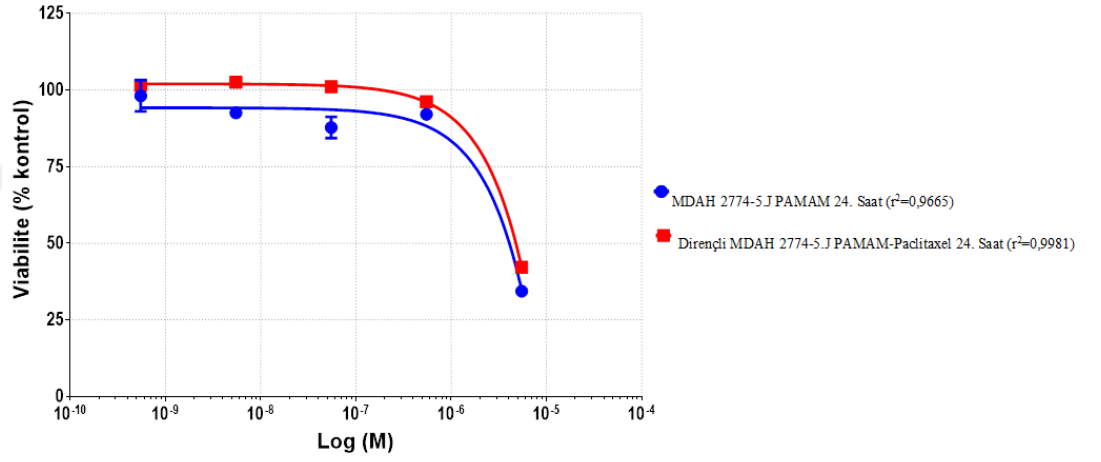
Şekil 4.5. 24. Saatte hücre kültüründe Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi



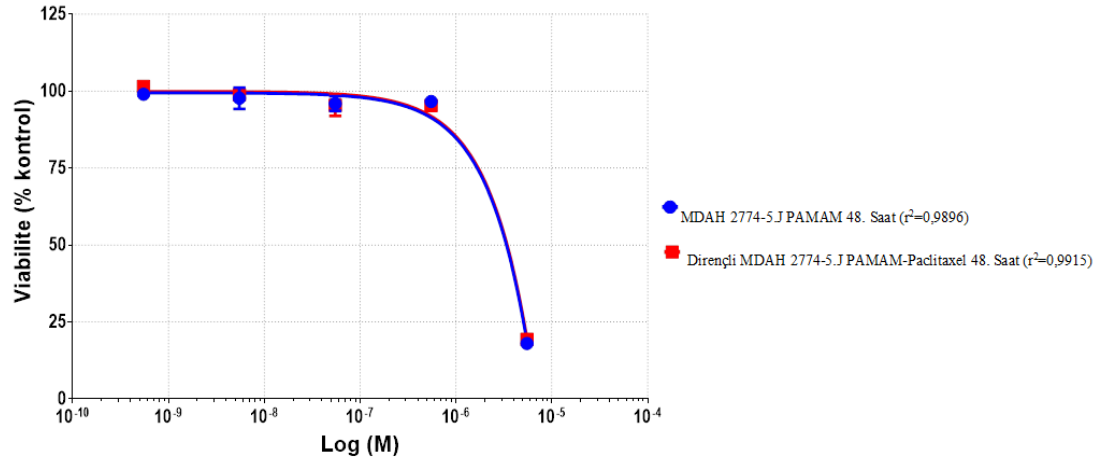
Şekil 4.6. 48. Saatte hücre kültüründe Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi



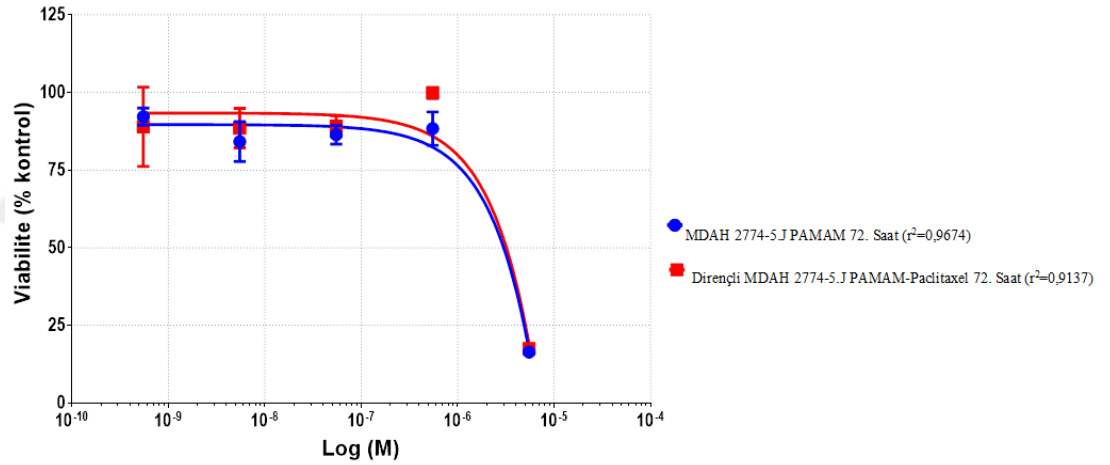
Şekil 4.7. 72. Saatte hücre kültüründe Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksi uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 4.8. 24. Saatte hücre kültüründe 5.J PAMAM uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 4.9. 48. Saatte hücre kültüründe 5.J PAMAM uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 4.10. 72. Saatte hücre kültüründe 5.J PAMAM uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi

**Tablo 4.1.** Spektrofotometrik ölçüm sonucu elde edilen absorbanlara göre uygulanan dozların %50 inhibitör konsantrasyonları

	MDAH 2774 Hücre Hattı			MDAH 2774 Dirençli Hücre Hattı		
	Paclitaxel	5.J PAMAM-Paclitaxel	PAMAM	Paclitaxel	5.J PAMAM-Paclitaxel	PAMAM
<b>24. saat IC50</b>	5,632 µM	1,99 µM	16,93 µM	5,276 µM	5,038 µM	3,33 µM
<b>48. saat IC50</b>	1,15 nM	29,82 nM	34,68 µM	0,78 nM	41,91nM	23,53 µM
<b>72. saat IC50</b>	0,39 nM	21,45 nM	24,70 µM	0,01 nM	36,62 nM	10.82 µM

Tablo 4.1.'deki verilere göre yalnızca 5.J PAMAM uygulanarak oluşturulan kontrol grubunda çalışılan konsantrasyon aralığının daha üstünde IC<sub>50</sub> değerleri elde edilmiştir.

Bu durum, araştırmamızda çalışılan konsantrasyon aralığında 5.J PAMAM'ın sitotoksik etkisinin bulunmadığını göstermektedir. 48. ve 72. saat verileri Paclitaxel ve 5.J PAMAM-Paclitaxel açısından çalışılan konsantrasyon aralığında 24.saatteki verilere göre daha düşük IC<sub>50</sub> değerleri elde etmemizi sağlamıştır. 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinin oluşturduğu sitotoksik etki için gerekli dozlar hem dirençsiz hem dirençli hücre hattında daha yüksek bulunmuştur. Dirençli hücre hattında Paclitaxel IC<sub>50</sub> dozu dirençsiz hücre hattına göre daha düşük bulunmuştur. Dirençli hücre hattında 5.J PAMAM-Paclitaxel IC<sub>50</sub> dozu dirençsiz hücre hattındaki doza göre daha yüksek ölçülmüştür.

## 5. TARTIŞMA

Over kanseri jinekolojik kanserler arasında en ölümcül tip olup kanser ilişkili kadın hasta ölümlerinde 2. sırada yer almaktadır (1). Over kanserlerinin tedavisi genellikle cerrahi işlemi takiben platin ve taksan içeren kemoterapidir (96).

Birçok kanser çeşidinin ve over kanserinin kemoterapi yoluyla tedavi edilmesinde çoğunlukla taksanlar kullanılmaktadır. Taksanların birçok formu enjekte edilebilir formda ticarileşmiştir ve ototoksisite, nörotoksisite, kellik gibi birtakım yan etkilere sahiptir; bu etkilerin çoğu ilacın çözünmesi için kullanılan toksik çözücülerle ilgili olarak gelişmektedir. Toksik çözücü bulunduran ticari formülasyonların yanısıra ilacın çözünmesini sağlayan YİTS geliştirilmektedir. Bu sistemler, çözücü-bazlı alışlageldik formülasyonlarla antikanser aktivite, terapötik indeks, stabilite, biyo-uyumluluk, doku ve organ hedefleme, enkapsülasyon kapasitesi, doku geçirgenliği, oral biyo-bulunurluk, azalmış toksisite, anormal reaksiyonların azalmış insidansı, sürekli ve kontrollü salım sonuçları rapor edilerek karşılaştırılmaktadır (67).

ABD-FDA tarafından Paclitaxel, Docetaxel ve Cabazitaxel'in enjekte edilebilir formları sırasıyla, 1992, 1996, 2010 yıllarında kullanıma uygun görülmüş ve onaylanmıştır (69). Kardiyovasküler ajanlardan sonra dünya üzerinde en büyük pazar payı taksanlara aittir (67). Taksanlar mikrotübül stabilizasyonu engelleme, depolimerizasyonu artırarak tübülün proteinin polimerizasyonunu azaltma, hücre döngüsünde sentrozomal bozulmayı engelleme, anormal iğ ipi fonksiyonunu artırma, iğ ipi mikrotübül dinamiklerini bozma, hücre bölünme evrelerini durdurma etkisi yaratarak etkinlik göstermektedir (70). Taksanlar hücre döngüsünün G2/M fazını bloke ederek, hücreyi apoptoza götürmektedir (71).

Taksanların kemoterapide kullanımı birtakım sorunları beraberinde getirmektedir. Oral biyo-bulunurlukları %10 seviyesinin altındadır; bu oran çok düşüktür. Taksanların suda çözünürlükleri 0,01 mg/ml'den az olup bu oran oldukça düşüktür. İnvaziv yolla uygulanan taksanlar çoklu ilaç direncinin geliştiği bir ilaç grubudur. biyolojik yarıömürleri kısadır, dokuların taksanlara geçirgenlikleri düşüktür, hasta uyumu yoktur, beyinden geçirgenlikleri azdır, hipersensitif reaksiyonlar gerçekleştirmektedirler, nefro- ve nörotoksisite geliştirmektedirler, yüksek fermentasyon maliyeti nedeniyle ticari üretimleri kısıtlıdır, vazodilasyon, rahavet ve hipotansiyon etkileri yaratmaktadır, ateşli nötropeniye sebep olmaktadır,

doz uygulaması süreklilik arz etmektedir (72), (73), (74), (75), (76). Taksanların ticari enjekte edilebilir formları bazı sürfaktanları içermekte ve bu şekilde misel benzeri yapılar şeklini almaktadır, bundan dolayı hipersensitif reaksiyonlar gerçekleşmektedir (77). Taksanların ilaç taşıma sistemleri ile konjugasyonu araştırmaları sadece fizikokimyasal engelleri aşma açısından değil, ilaç etkinliği performansının iyileştirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir (67).

Hidrofobik ilaçların taşınmasında hidrofobik merkez ve hidrofilik kabuğa sahip miselli formülasyonlar yaygın şekilde çalışılmaktadır (79). Paclitaxel'in miselli formülasyonları yalnızca çözünürlük problemini ortadan kaldırmamaktadır (80), aynı zamanda polimerik misellerin yüzeyinde oluşturulan birtakım modifikasyonlar aracılığıyla elde edilen retansiyon ve permeabilite etkisi ile tümöre hedeflenebilmesi sağlanmaktadır (79), (81), (82). İlaç taşıma sistemlerinin oluşturulmasında başvurulan diğer bir yaklaşım nanotaşıyıcı sistemlerin kullanımınıdır. Bu sistemler de ilaca çözünürlük kazandırmakla birlikte tümör bölgesine hedeflenebilmektedir. Örneğin albümin bağlı Paclitaxel nanoparçacığı formülasyonu, ABD'de FDA tarafından onkolojide nanodüzeyde ilaç taşıyıcı sistem olarak 2005'te onaylanmıştır (83).

Kızıl ötesi spektrumu bir maddenin bağ yapılarını ve etkileşimlerini ölçebilen bir yöntemdir. Buna göre, IR spektrumlarında da görüldüğü gibi 5.J PAMAM üzerine yapılan Paclitaxel yüklemesi FTIR grafiklerinde ayrıntılı olarak görülmektedir. Molekülün interkalar özelliğinden dolayı bağ yapıları değişmemekte fakat bağ sinyal değerleri artmaktadır. Bu çalışmada bu sonuç net bir şekilde görülmüştür. Sinyal artışları Paclitaxel'in 5.J PAMAM molekülüne non-spesifik olarak bağlandığını göstermektedir.

Infrared piklerindeki, genlik değişimi, pik veren grupların yönelimlerinin değiştiğini göstermektedir. Şöyle ki; infrared pikleri bir molekülde bulunan, hidroksil grubu, hidrojen bağı, amid bağı veya karbon-karbon bağlarını göstermektedir. Bu bağların oluşturduğu pik spesifiktir. Bu pikler belli durumlarda değişmektedir. Örneğin molekülün bağ yönelimlerinde değişme olursa bu molekülün verdiği pikler de değişmektedir. Yaptığımız çalışmada ise pik genliklerinin değişmesi de özellikle interkalatör maddelerin yani kompleksleşmeyi, non-kovalent polar bağlar oluşmadan gerçekleştiğini ve varlığını göstermektedir.

Sistemde hücre kültürü uygulaması sonucu düşük verim alınmıştır. Düşük verim alınması salınımın az veya yavaş olduğunu göstermektedir. Bu yavaşlık, özellikle zaman optimizasyonu geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu tez kapsamındaki araştırmada Paclitaxel'e karşı kanser hücrelerinin oluşturduğu çoklu ilaç direncinin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Paclitaxel'in 5.J PAMAM molekülüne bağlanarak teorik olarak endometrioid over kanser hücre hattı MDAH 2774 tarafından ekspresyonu artırılan çoklu ilaç direnci geninin ifadesi ile sentezi artmış P-gp proteinin Paclitaxel'i tanınmasının ve hücre dışına atılması için başlattığı bir dizi tepkimenin engellenmesi hedeflenmiştir. 5.J PAMAM molekülüne Paclitaxel'in yanısıra folik asit de bağlanmıştır. Folik asit kullanılmasının nedeni, kanser hücrelerinin sağlıklı diğer hücrelere nazaran folik asit bağlayan reseptör sayısının oldukça fazla olmasından kaynaklanmaktadır, bu şekilde bir nevi hedefleme işlemi yapılmıştır.

Geliştirilen kompleksin MDAH 2774 hücreleri üzerinde yarattığı sitotoksik etki Paclitaxel'in serbest formda uygulandığı kontrollerle karşılaştırılarak bulgular üzerinde yorumlama işlemine geçilmiştir. Bizim araştırmamızda canlılık tayini için kullanılan deneysel konsantrasyon aralığında 5.J PAMAM molekülünün toksik etkisi bulunmamıştır. Majoros ve ark.'larının araştırması da bu bulguyu destekler niteliktedir. Majoros ve ark.'ları flow sitometri yöntemi ile yaptıkları sitotoksikite analizinde dendrimerden kaynaklanan önemli bir sitotoksik etki tespit etmemişlerdir (166). PAMAM'ın bizim deneysel çalışma konsantrasyon aralığımızda sitotoksik etkisiyle ilgili literatür verileri kısıtlı kalmaktadır. Bu nedenle araştırmamızın sonuçları PAMAM'ın sitotoksik konsantrasyonlarının bilinmesi açısından literatüre önemli bir bilgi sağlama potansiyeline sahiptir.

Bu tez araştırmasında canlılık testi sonuçlarında 24., 48., ve 72. saatler için 5.J PAMAM-Paclitaxel IC<sub>50</sub> konsantrasyonu serbest Paclitaxelin IC<sub>50</sub> dozuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu serbest Paclitaxel'in etkinliğinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Başka bir araştırmada folik asit reseptörlerinin yüksek düzeyde eksprese olduğu insan epidermoid hücre hattı KB ile canlılık testi- XTT kullanılmıştır. Parsian ve ark.'nın bu araştırması sonucunda 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinin 200 nM konsantrasyonda yarattığı öldürücü etkinin serbest Paclitaxel'in 800 nM konsantrasyonda yarattığı öldürücü etki ile eşdeğer olduğu gösterilmiştir (166). Bu

bulgu bizim araştırmamızın sonuçları ile tutarlılık göstermemektedir. Literatürde 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri konusunda çok kısıtlı veri bulunmaktadır. Hipotezimize göre ilaç taşıyıcı olarak kullandığımız 5.J PAMAM dendrimerinin Paclitaxel ile kompleks oluşturduğunda serbest Paclitaxel'e göre daha düşük IC<sub>50</sub> değerleri elde edilmesi öngörölmüştü. 5.J PAMAM-Paclitaxel'in sitotoksik etkisinin serbest Paclitaxel' e göre neden daha düşük olduğu sorusunun daha ayrıntılı bir araştırmayla belirlenmesi gerekmektedir.

Araştırmamızda Paclitaxel'in IC<sub>50</sub> değeri dirençli hücre hattında direnç kazanmamış hücre hattına göre daha düşük bulunmuştur. Araştırmamızın direnç geliştirme evrelerinde gelişmiş direnç verileri MDR1 gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ile elde edilmiştir. Bu veriler sitotoksikite testleri ile kontrol edilmemiştir. MDR1 gen ekspresyon düzeylerinin artmış olmasına rağmen Paclitaxel'e ait IC<sub>50</sub> değerlerinin düşmesi hücrelerde henüz P-gp aktivitesinin başlamamış olması veya hücrelerde gelişen direnç mekanizmasının geri dönmüş olması ile açıklanmaktadır.

Araştırmamız sırasında 5.J PAMAM molekülüne sadece tek bir konsantrasyonda folik asit bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Glioma hücreleri ile yapılan başka bir araştırmada 5.J PAMAM'a folik asit yanısıra borneol molekülü bağlanmıştır. Kemoterapötik ajan olarak Doxorubicin kullanılmıştır. Merkezi sinir sisteminde gelişen neoplazma hücreleri hedef alındığı için kan-beyin bariyerinin aşılarak küçük boyuttaki, moleküllerin merkezi sinir sistemi hücrelerine ulaşmasını sağlayan borneol molekülünün kullanımı tercih edilmiştir (167). Borneol molekülü PEG-PLGA gibi nanopartiküllerin sıçan beyin dokusundaki HBMEC hücrelerine ulaşmasını sağlamaktadır (168). Araştırmada HBMEC ve C6 glioma hücreleri üzerinde hücre canlılığı analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada borneol bağlı-, folik asit bağlı-, borneol-folik asit bağlı-5.J PAMAM olmak üzere 3 farklı kompleks kullanılmıştır. Bu çalışmada borneol bağlantısının hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Deneysel konsantrasyon aralığında çalışıldığı ve hücrelerin %50'sinden fazlası yaşadığı için folik asit bağlı- ve borneol- folik asit bağlı- 5.J PAMAM'ların sitotoksikite hesapları yapılmamıştır; her iki molekülün deneysel konsantrasyon aralığında hücre canlılığını azaltma etkilerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu moleküllere Doxorubicin yüklenmesi ile elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerinden yola çıkılarak serbest Doxorubicin molekülünün inhibisyon etkisinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Serbest Doxorubicin uygulaması sonucu elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 0.17

$\mu\text{mol/L}$  iken PAMAM/Doxorubicin'le 0.73, borneol-PAMAM/Doxorubicin'le 6.17, Borneol-folik asit-PAMAM/Doxorubicin'le 2.48  $\mu\text{mol/L}$   $\text{IC}_{50}$  değerleri tespit edilmiştir. Bu araştırmada yapılan analizler sonucu borneol-folik asit-PAMAM/Doxorubicin'in folik asit bağlı olmayan, folik asit ve borneol bağlı olmayan komplekslere göre hücreye girişinin dah yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum hücre yüzeyindeki folik asit reseptör yoğunluğunun fazla olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Serbest Doxorubicin molekülünün kompleks formlara göre daha düşük  $\text{IC}_{50}$  değerine sahip olması, Doxorubicin'in sitoplazmadaki taşıyıcı molekülden sürekli olarak salınması ve nükleusa sitotoksik etkisini göstermek üzere sonraki aşamada girmesi ile açıklanmıştır. Bizim araştırmamızda da 5.J PAMAM/Paclitaxel kompleksinin serbest Paclitaxel'e göre hücreleri öldürme açısından etkinliğinin düşük olması gelişen aynı fenomenle ilişkili olabileceği fikrini gclendirmektedir. İlaç salım sisteminde ilacın ayrılması ve nükleusa ulaşması çoklu ilaç direnci aşılsa da farklı bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Böyle bir sorun ilaç salım sistemlerinin dizaynında optimum ilaç salımı düzeylerinin elde edilmesine yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Bu tez kapsamında yürütülen araştırmada folik asit bağlanmayan kompleks geliştirilmemiştir. Parsian ve ark.'nın elde ettiği sonuçlar PAMAM/Doxorubicin komplekslerinin folik asit ile bağlandığında daha yüksek inhibisyon oranlarının bulunduğunu göstermiştir (167). Bu sonuç kompleks halindeki ilaç molekülünün etkinliğinde hedefleme yapılmasının önemli bir etken olduğu sonucunu doğurmaktadır. Sitotoksisite açısından değerlendirme yapılan başka bir araştırmada 5.J PAMAM amin gruplarına hidroksil iyonlarının bağlanması yoluyla 5.J PAMAM-ilaç kompleksi oluşturma yönteminin 5.J PAMAM yüzey özelliklerinde geliştirdiği değişimden dolayı sitotoksik etkisinin azaldığı gösterilmiştir. Hidroksil bağlantısının hücre yüzeyindeki pozitif yük oranını azaltması bu etkiye sebep olmuştur. Yine aynı araştırma sonuçlarında folik asit bağlanması yerine hidroksil bağlantısının kurulmasının sitotoksisite açısından aktif hedeflemede daha iyi etki gösterdiği belirtilmiştir (169). İleride yapılacak ayrıntılı çalışmalarda etken madde hedefleme işleminin hücre canlılığı ve etken madde aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasında fayda bulunduğunu düşünmekteyiz. Hedefleyici molekülün varlık ve yokluğundaki etkinin karşılaştırılması ve hedefleyici molekülün farklı yükleme dozlarının etkilerinin belirlenmesi ayrıca farklı hedefleyici moleküller kullanıldığında komplekslerin

etkinliği açısından karşılaştırma yapılması önemli bir araştırma konusu olma potansiyelini taşımaktadır. Çünkü böyle bir araştırma elde edilen komplekslerin belli bir hücre hattında yarattığı yarı yarıya öldürücü etkiyi karşılaştırma ve en uygun kompleksi belirleyebilme şansını doğurabilecektir.

Başka bir araştırmada insan epitelyal karsinoma hücreleri Hela ve insan akciğer karsinoma hücreleri ile yapılan 5.J PAMAM-folik asit-Baicalin kompleksinin antikanser etkinliği araştırmasında PAMAM ilaç taşıyıcı ve folik asit kanser hücrelerini hedefleyici birimler olarak kullanılmıştır. Bu araştırmada 5.J PAMAM'a bağlanan folik asit konsantrasyonu değiştikçe kompleks ile tepkime sırasında kullanılan ham maddelerin ayrılma oranlarının değişkenlik gösterdiği saptanmıştır, bu durumun suda çözünürlük üzerine etki ettiği belirlenmiştir ve folik asit bağlanma oranının arttıkça suda çözünürlüğün azaldığı bildirilmiştir; folik asit/5.J PAMAM oranının 1/1 olduğu koşullarda bağlanma etkinliğini 1/16 olduğu tespit edilmiştir. 5.J PAMAM-folik asit-Baicalin kompleksinin serbest Baicalin' e göre daha iyi toksisite etkinliği gösterdiği bildirilmiştir. Bu sonuç tez araştırmamızla tutarlılık göstermektedir. Dendrimere folik asit bağlanarak Hela hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite analizlerinde folik asit bağlanmamış 5.J PAMAM kompleksine göre daha iyi sitotoksosite sonuçları elde edilmiştir. Aynı araştırmada farklı jenerasyonlu PAMAM dendrimerleri ile çalışılmış ve toksisite etkinliği açısından en iyi sonuçlar 6. Jenerasyon PAMAM kullanıldığında elde edilmiştir (169). Bu bulgulardan farklı jenerasyonlu PAMAM molekülleriyle araştırma yapılması gerekliliği sonucu ortaya çıkmaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çoklu ilaç direnci kanser tedavisinde kullanılan ajanların etkinliğini düşürmekle birlikte günümüzde ilaç taşıyıcı sistemlerle ilgili araştırmalar yapılarak tedavi etkinliğinin artırılması amaçlanmaktadır. Bu araştırma ile 5.J PAMAM-Paclitaxel kompleksinin çoklu ilaç direncini aşmaya yönelik bir strateji olarak nitelendirilmesinin mümkün olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Daha ileri araştırmalar ile ilaç salım kinetiği konusunda daha ayrıntılı veriye ihtiyaç duyulduğu, ilaç taşıyıcı sistemin hedefleme molekülü olmadığındaki veya farklı yükleme dozlarındaki davranışının araştırılması gerekliliği sonuçlarıyla karşı karşıya kalınmıştır.

Araştırmamızda bir EOK olan MDAH 2774 hücre hattında Paclitaxel için  $IC_{50}$  dozu belirlenmiştir. Bu bilginin özgünlüğü literatüre sunulduğunda ilk kez raporlanmış olacağı için önem arz etmektedir. Oluşturduğumuz kompleksle yapılmış araştırmalar oldukça kısıtlıdır. Paclitaxel'i sitotoksik ajan olarak kullandığımız bu araştırmada çalışılan deneysel konsantrasyon aralığında PAMAM'ın sitotoksik etkiye sahip olmaması yine literatüre ilk defa sağlanacak önemli bir bilgi niteliği taşımaktadır

5.J PAMAM-Paclitaxel kompleks etkinliğinin *in vitro* koşullarda daha iyi anlaşılabilmesi için 5.J PAMAM'a bağlanan değişik folik asit konsantrasyonları arasında hücre içerisinde oluşan sitotoksik etki açısından nasıl bir fark bulunduğu belirlenmesi ileri çalışmalar açısından fayda sağlayacaktır.

Paclitaxel'in PAMAM'ın taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemlerde farklı jenerasyondaki PAMAM'larla sitotoksikite analizlerinin yapılması karşılaştırma açısından fayda sağlayacaktır.

Paclitaxel ilacının 5.J PAMAM kullanılarak taşınması ve hücre içindeki akıbetinin anlaşılabilmesi ve hücre içerisinde moleküler düzeyde zamana da bağlı olarak ne gibi değişimlere sebep olduğu ileri moleküler tekniklerle belirlenmelidir.

İlaç salım kinetiği çalışmaları farklı jenerasyondaki PAMAM'larla da kompleks oluşturularak detaylandırılmalıdır.

## **7. KAYNAKLAR**

- 1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin [Internet]. 2010;60(5):277–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610543>**
- 2. Gajjar K, Ogden G, Mujahid MI, Razvi K. Symptoms and Risk Factors of Ovarian Cancer: A Survey in Primary Care. ISRN Obstet Gynecol. 2012;2012:1–6.**
- 3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359–86.**
- 4. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. Nat Rev Dis Prim. 2016;2:16061.**
- 5. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. Am J Surg Pathol. 2007;31(2):161–9.**
- 6. Pentheroudakis G, Pavlidis N. Serous papillary peritoneal carcinoma: Unknown primary tumour, ovarian cancer counterpart or a distinct entity? A systematic review. Vol. 75, Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2010. p. 27–42.**
- 7. Crum CP, Herfs M, Ning G, Bijron JG, Howitt BE, Jimenez CA, et al. Through the glass darkly: Intraepithelial neoplasia, top-down differentiation, and the road to ovarian cancer. J Pathol. 2013;231(4):402–12.**
- 8. Prat J. Pathology of borderline and invasive cancers. Vol. 41, Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2017. p. 15–30.**
- 9. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Fourth Edition. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. 2014.**

10. **Meinhold-Heerlein I, Hauptmann S. The heterogeneity of ovarian cancer. Vol. 289, Archives of Gynecology and Obstetrics. 2014. p. 237–9.**
11. **Prat J, De Nictolis M. Serous borderline tumors of the ovary: a long-term follow-up study of 137 cases, including 18 with a micropapillary pattern and 20 with microinvasion. Am J Surg Pathol. 2002;26(9):1111–28.**
12. **McKenney JK, Balzer BL, Longacre T a. Patterns of stromal invasion in ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): a reevaluation of the concept of stromal microinvasion. Am J Surg Pathol. 2006;30(10):1209–21.**
13. **Prat J. Ovarian carcinomas, including secondary tumors: Diagnostically challenging areas. In: Modern Pathology. 2005.**
14. **Rutgers JL, Scully RE. Ovarian mullerian mucinous papillary cystadenomas of borderline malignancy. A clinicopathologic analysis. Cancer. 1988;61(2):340–8.**
15. **Shappell HW, Riopel MA, Smith Sehdev AE, Ronnett BM, Kurman RJ. Diagnostic criteria and behavior of ovarian seromucinous (endocervical-type mucinous and mixed cell-type) tumors: atypical proliferative (borderline) tumors, intraepithelial, microinvasive, and invasive carcinomas. Am J Surg Pathol. 2002;26(12):1529–41.**
16. **Rodriguez IM, Irving JA, Prat J. Endocervical-like mucinous borderline tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 31 cases. Am J Surg Pathol. 2004;28(10):1311–8.**
17. **Nomura K, Aizawa S. Clinicopathologic and mucin histochemical analyses of 90 cases of ovarian mucinous borderline tumors of intestinal and müllerian types. Pathol Int. 1996;46(8):575–80.**
18. **de Nictolis M, Montironi R, Tommasoni S, Valli M, Pisani E, Fabris G, et al. Benign, borderline, and well-differentiated malignant intestinal mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic, histochemical, immunohistochemical, and nuclear quantitative study of 57 cases. Int J Gynecol Pathol. 1994;13(1):10–21.**

19. **Rioped MA, Ronnett BM, Kurman RJ, M.A. R, B.M. R. Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal- type mucinous tumors: Atypical proliferative (borderline) tumors and intraepithelial, microinvasive, invasive, and metastatic carcinomas. Am J Surg Pathol. 1999;23(6):617–35.**
20. **Rodríguez IM, Prat J. Mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas. Am J Surg Pathol. 2002;26(2):139–52.**
21. **Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Suprasert P, Siriaunkgul S. Mucinous tumor of low malignant potential (&quot;borderline&quot; or &quot;atypical proliferative&quot; tumor) of the ovary: a study of 171 cases with the assessment of intraepithelial carcinoma and microinvasion. Int J Gynecol Pathol. 2011;30(3):218–30.**
22. **Young RH, Hart WR. Metastases from carcinomas of the pancreas simulating primary mucinous tumors of the ovary. A report of seven cases. Am J Surg Pathol. 1989;13(9):748–756.**
23. **Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Suprasert P, Siriaunkgul S. Mucinous Tumor of Low Malignant Potential (“Borderline” or “Atypical Proliferative” Tumor) of the Ovary. Int J Gynecol Pathol. 2011;33(3):218–30.**
24. **Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: A clinicopathologic and molecular study of 95 cases. Cancer. 1997;79(8):1581–6.**
25. **Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. Am J Surg Pathol. 2004;28(4):496–504.**
26. **Singer G, Oldt R, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. Mutations in BRAF and KRAS Characterize the Development of Low-Grade Ovarian Serous Carcinoma. JNCI J Natl Cancer Inst. 2003;95(6):484–6.**

27. **Prat J. Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. Vol. 460, Virchows Archiv. 2012. p. 237–49.**
28. **Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. Hum Pathol. 2009;40(9):1213–23.**
29. **Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: Implications for biomarker studies. PLoS Med. 2008;5(12):1749–60.**
30. **Köbel M, Kalloger SE, Carrick J, Huntsman D, Asad H, Oliva E, et al. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. Am J Surg Pathol. 2009;33(1):14–21.**
31. **Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Fan I, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: A kin-cohort study in Ontario, Canada. J Natl Cancer Inst. 2006;98(23):1694–706.**
32. **Geisler JP, Hatterman-Zogg M a, Rathe J a, Buller RE. Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer. J Natl Cancer Inst. 2002;94(6):61–7.**
33. **Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. J Natl Cancer Inst. 2000;92(7):564–9.**
34. **Piek JMJ, Van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJJ, Menko FH, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. J Pathol. 2001;195(4):451–6.**
35. **Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, et al. The Tubal Fimbria Is a Preferred Site for Early Adenocarcinoma in Women With Familial Ovarian Cancer Syndrome. Am J Surg Pathol. 2006;30(2):230–6.**

36. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol.* 2007;211(1):26–35.
37. Folkins AK, Jarboe EA, Saleemuddin A, Lee Y, Callahan MJ, Drapkin R, et al. A candidate precursor to pelvic serous cancer (p53 signature) and its prevalence in ovaries and fallopian tubes from women with BRCA mutations. *Gynecol Oncol.* 2008;109(2):168–73.
38. Bowtell DD. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(11):803–8.
39. Levanon K, Ng V, Piao HY, Zhang Y, Chang MC, Roh MH, et al. Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. *Oncogene.* 2010;29(8):1103–13.
40. Howitt BE, Hanamornroongruang S, Lin DI, Conner JE, Schulte S, Horowitz N, et al. Evidence for a dualistic model of high-grade serous carcinoma: BRCA mutation status, histology, and tubal intraepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(3):287–93.
41. Soslow RA, Han G, Park KJ, Garg K, Olvera N, Spriggs DR, et al. Morphologic patterns associated with BRCA1 and BRCA2 genotype in ovarian carcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25(4):625–36.
42. Lee KR, Scully RE. Mucinous tumors of the ovary: A clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with “pseudomyxoma peritonei.” *Am J Surg Pathol.* 2000;24(11):1447–64.
43. Silverberg SG, Bell DA, Kurman RJ, Seidman JD, Prat J, Ronnett BM, et al. Borderline ovarian tumors: Key points and workshop summary. In: *Human Pathology.* 2004. p. 910–7.
44. Provenza C, Young RH, Prat J. Anaplastic carcinoma in mucinous ovarian tumors: A clinicopathologic study of 34 cases emphasizing the crucial impact of stage on prognosis, their histologic spectrum, and overlap with sarcomalike mural nodules. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(3):383–9.

45. **Anglesio MS, Kommos S, Tolcher MC, Clarke B, Galletta L, Porter H, et al. Molecular characterization of mucinous ovarian tumours supports a stratified treatment approach with HER2 targeting in 19% of carcinomas. J Pathol. 2013;229(1):111–20.**
46. **Mackenzie R, Kommos S, Winterhoff BJ, Kipp BR, Garcia JJ, Voss J, et al. Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms. BMC Cancer. 2015;15(1).**
47. **Kurman, R.J., Carcangiu, M.L., Herrington, C.S., Young RH. Mucinous Tumours. In: WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 2014. p. 1689–99.**
48. **Ronnett BM, Yemelyanova A V., Vang R, Gilks CB, Miller D, Gravitt PE, et al. Endocervical adenocarcinomas with ovarian metastases: Analysis of 29 cases with emphasis on minimally invasive cervical tumors and the ability of the metastases to simulate primary ovarian neoplasms. Am J Surg Pathol. 2008;32(12):1835–53.**
49. **Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, et al. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: A distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. Cancer. 2000;**
50. **Komiyama S, Aoki D, Tominaga E, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S. Prognosis of Japanese patients with ovarian clear cell carcinoma associated with pelvic endometriosis: clinicopathologic evaluation. Gynecol Oncol. 1999;**
51. **Kuo K-T, Mao T-L, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang T-L, et al. Frequent Activating Mutations of PIK3CA in Ovarian Clear Cell Carcinoma. Am J Pathol. 2009;**
52. **Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Iwaya K, Tamai S, Matsubara O. PIK3CA mutation is an early event in the development of endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma. J Pathol. 2011;**

53. **Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. *ARID1A* Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas. *N Engl J Med.* 2010;**
54. **Kato N, Sasou SI, Motoyama T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol.* 2006;**
55. **Kobayashi H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, et al. The role of hepatocyte nuclear factor-1beta in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;**
56. **Kobayashi H. Ovarian cancer in endometriosis: Epidemiology, natural history, and clinical diagnosis. Vol. 14, *International Journal of Clinical Oncology.* 2009. p. 378–82.**
57. **Modesitt SC, Tortolero-Luna G, Robinson JB, Gershenson DM, Wolf JK. Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet Gynecol.* 2002;100(4):788–95.**
58. **Dinulescu DM, Ince T a, Quade BJ, Shafer S a, Crowley D, Jacks T. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med.* 2005;11(1):63–70.**
59. **Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, et al. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 1998;58(10):2095–7.**
60. **Mayr D, Hirschmann A, Löhns U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol.* 2006;103(3):883–7.**
61. **Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, Barakat RR, Lin O, Soslow R, et al. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2003;90(2):378–81.**

62. Cuatrecasas M, Erill N, Musulen E, Costa I, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in nonmucinous ovarian epithelial tumors: A molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients. *Cancer*. 1998;82(6):1088–95.
63. Høgdall EVS, Høgdall CK, Blaakaer J, Christensen L, Bock JE, Vuust J, et al. K-ras alterations in Danish ovarian tumour patients. From the danish “Malova” Ovarian Cancer Study. *Gynecol Oncol*. 2003;89(1):31–6.
64. Okuda T, Otsuka J, Sekizawa A, Saito H, Makino R, Kushima M, et al. p53 mutations and overexpression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer. *Gynecol Oncol*. 2003;88(3):318–25.
65. Palacios J, Gamallo C. Mutations in the  $\beta$ -catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res*. 1998;58(7):1344–7.
66. Catasús L, Bussaglia E, Rodríguez I, Gallardo A, Pons C, Irving JA, et al. Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: Similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum Pathol*. 2004;35(11):1360–8.
67. Kumar P, Raza K, Kaushik L, Malik R, Arora S, Katare OP. Role of Colloidal Drug Delivery Carriers in Taxane-mediated Chemotherapy: A Review. *Curr Pharm Des*. 2016;22(33):5127–43.
68. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, Mcphail AT. Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*2. *J Am Chem Soc*. 1971;93(9):2325–7.
69. Yared JA, Tkaczuk KHR. Update on taxane development: New analogs and new formulations. Vol. 6, *Drug Design, Development and Therapy*. 2012. p. 371–84.
70. Abal M, Andreu JM, Barasoain I. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003;3:193–203.

71. Horwitz SB. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1994;5 Suppl 6:S3-6.
72. Baker J, Ajani J, Scotté F, Winther D, Martin M, Aapro MS, et al. Docetaxel-related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs.* 2009;13(1):49–59.
73. Biganzoli L, Licitra S, Moretti E, Pestrin M, Zafarana E, Di Leo A. Taxanes in the elderly: Can we gain as much and be less toxic? Vol. 70, *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2009. p. 262–71.
74. Jones S. Head-to-head: docetaxel challenges paclitaxel. *Eur J Cancer, Suppl.* 2006;4(4):4–8.
75. Singh S, Dash AK. Paclitaxel in cancer treatment: perspectives and prospects of its delivery challenges. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2009;26(4):333–72.
76. Surapaneni MS, Das SK, Das NG. Designing Paclitaxel Drug Delivery Systems Aimed at Improved Patient Outcomes: Current Status and Challenges. *ISRN Pharmacol.* 2012;2012:1–15.
77. Hennenfent KL, Govindan R. Novel formulations of taxanes: A review. Old wine in a new bottle? Vol. 17, *Annals of Oncology.* 2006. p. 735–49.
78. Skwarczynski M, Hayashi Y, Kiso Y. Paclitaxel prodrugs: Toward smarter delivery of anticancer agents. Vol. 49, *Journal of Medicinal Chemistry.* 2006. p. 7253–69.
79. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. Vol. 24, *Pharmaceutical Research.* 2007. p. 1–16.
80. Tekade RK, Kumar PV, Jain NK. ChemInform Abstract: Dendrimers in Oncology: An Expanding Horizon. *ChemInform.* 2009;40(19):no-no.
81. Musacchio T, Laquintana V, Latrofa A, Trapani G, Torchilin VP. PEG-PE micelles loaded with paclitaxel and surface-modified by a PBR-ligand: synergistic anticancer effect. *Mol Pharm.* 2009;6(2):468–79.

82. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. Vol. 6, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2010. p. 714–29.
83. Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. Vol. 60, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. p. 876–85.
84. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. Vol. 63, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011. p. 170–83.
85. Yang R, Yang SG, Shim WS, Cui F, Cheng G, Kim IW, et al. Lung-specific delivery of paclitaxel by chitosan-modified PLGA nanoparticles via transient formation of microaggregates. *J Pharm Sci*. 2009;98(3):970–84.
86. Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Feron O, et al. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. 2009;133(1):11–7.
87. Lee E, Lee J, Lee IH, Yu M, Kim H, Chae SY, et al. Conjugated chitosan as a novel platform for oral delivery of paclitaxel. *J Med Chem*. 2008;51(20):6442–9.
88. Bhardwaj V, Ankola DD, Gupta SC, Schneider M, Lehr CM, Kumar MNVR. PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: Safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat. *Pharm Res*. 2009;26(11):2495–503.
89. Patil Y, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J Control Release*. 2009;136(1):21–9.
90. Milane L, Duan Z, Amiji M. Development of EGFR-targeted polymer blend nanocarriers for combination paclitaxel/lonidamine delivery to treat multi-drug resistance in human breast and ovarian tumor cells. *Mol Pharm*. 2011;8(1):185–203.

91. Danhier F, Pourcelle V, Marchand-Brynaert J, Jérôme C, Feron O, Préat V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles. *Methods Enzymol.* 2012;508:157–75.
92. Liu Y, Zhang B, Yan B. Enabling anticancer therapeutics by nanoparticle carriers: The delivery of paclitaxel. Vol. 12, *International Journal of Molecular Sciences.* 2011. p. 4395–413.
93. Zhang Y, Bai Y, Yan B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. Vol. 15, *Drug Discovery Today.* 2010. p. 428–35.
94. Wu H-C, Chang X, Liu L, Zhao F, Zhao Y. Chemistry of carbon nanotubes in biomedical applications. *J Mater Chem.* 2010;20:1036.
95. Zhou H, Mu Q, Gao N, Liu A, Xing Y, Gao S, et al. A nano-combinatorial library strategy for the discovery of nanotubes with reduced protein-binding, cytotoxicity, and immune response. *Nano Lett.* 2008;8(3):859–65.
96. Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* 2009;2(2):85–120.
97. Partha R, Mitchell LR, Lyon JL, Joshi PP, Conyers JL. Buckysomes: Fullerene-based nanocarriers for hydrophobic molecule delivery. *ACS Nano.* 2008;2(9):1950–8.
98. Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, Bhar P, et al. Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2006;17(8):1263–8.
99. Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X, et al. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res.* 2008;68(16):6652–60.
100. Berlin JM, Leonard AD, Pham TT, Sano D, Marcano DC, Yan S, et al. Effective drug delivery, in vitro and in vivo, by carbon-based nanovectors noncovalently loaded with unmodified paclitaxel. *ACS Nano.*

2010;4(8):4621–36.

101. Lay CL, Liu HQ, Tan HR, Liu Y. Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graftcarbon nanotubes for potent cancer therapeutics. *Nanotechnology*. 2010;21(6).
102. Guo Y, Shi D, Cho H, Dong Z, Kulkarni A, Pauletti GM, et al. In vivo imaging and drug storage by quantum-dot-conjugated carbon nanotubes. *Adv Funct Mater*. 2008;18(17):2489–97.
103. Hilder TA, Hill JM. Probability of encapsulation of paclitaxel and doxorubicin into carbon nanotubes. *Micro Nano Lett*. 2008;3(2):41.
104. Chen S, Zhao X, Chen J, Chen J, Kuznetsova L, Wong SS, et al. Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. Validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release. *Bioconj Chem*. 2010;21(5):979–87.
105. Okon E, Pouliquen D, Okon P, Kovaleva Z V, Stepanova TP, Lavit SG, et al. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab Investig*. 1994;71(6):895–903.
106. Yin H, Yu S, Casey PS, Chow GM. Synthesis and properties of poly(D,L-lactide) drug carrier with maghemite nanoparticles. *Mater Sci Eng C*. 2010;30(4):618–23.
107. Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldöfner N, Scholz R, et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperth*. 2005;21(7):637–47.
108. Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, et al. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res*. 2000;60(23):6641–8.
109. Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, et al. Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer*

Res. 1996;56(20):4686–93.

110. Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, et al. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: Synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug Chem.* 2005;16(5):1181–8.
111. Kohler N, Sun C, Wang J, Zhang M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir.* 2005;21(19):8858–64.
112. Zhang JL, Srivastava RS, Misra RDK. Core-shell magnetite nanoparticles surface encapsulated with smart stimuli-responsive polymer: Synthesis, characterization, and LCST of viable drug-targeting delivery system. *Langmuir.* 2007;23(11):6342–51.
113. Santra S, Kaittanis C, Grimm J, Perez JM. Drug/dye-loaded, multifunctional iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and dual optical/magnetic resonance imaging. *Small.* 2009;5(16):1862–8.
114. Kingston DGI. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. Vol. 72, *Journal of Natural Products.* 2009. p. 507–15.
115. Hua M-Y, Yang H-W, Chuang C-K, Tsai R-Y, Chen W-J, Chuang K-L, et al. Magnetic-nanoparticle-modified paclitaxel for targeted therapy for prostate cancer. *Biomaterials.* 2010;31(28):7355–63.
116. Chorny M, Fishbein I, Yellen BB, Alferiev IS, Bakay M, Ganta S, et al. Targeting stents with local delivery of paclitaxel-loaded magnetic nanoparticles using uniform fields. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(18):8346–51.
117. Hwu JR, Lin YS, Josephrajan T, Hsu MH, Cheng FY, Yeh CS, et al. Targeted paclitaxel by conjugation to iron oxide and gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2009;131(1):66–8.

118. Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm.* 2005;2(3):194–205.
119. Jain TK, Richey J, Strand M, Leslie-Pelecky DL, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: Drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials.* 2008;29(29):4012–21.
120. Cho HS, Dong Z, Pauletti GM, Zhang J, Xu H, Gu H, et al. Fluorescent, superparamagnetic nanospheres for drug storage, targeting, and imaging: A multifunctional nanocarrier system for cancer diagnosis and treatment. *ACS Nano.* 2010;4(9):5398–404.
121. Hawker CJ, Fréchet JMJ. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J Am Chem Soc.* 1990;112(21):7638–47.
122. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, et al. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym J.* 1985;17(1):117–32.
123. Ottaviani MF, Montalti F, Romanelli M, Turro NJ, Tomalia DA. Characterization of starburst dendrimers by EPR. 4. Mn(II) as a probe of interphase properties. *J Phys Chem.* 1996;100(26):11033–42.
124. Chen W, Tomalia DA, Thomas JL. Unusual pH-dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: evidence for pH-responsive conformational changes. *Macromolecules.* 2000;33(25):9169–72.
125. Niu Y, Sun L, Crooks RM. Determination of the intrinsic proton binding constants for poly(amidoamine) dendrimers via potentiometric pH titration. *Macromolecules.* 2003;36(15):5725–31.
126. Maiti PK, Çağın T, Lin ST, Goddard WA. Effect of solvent and pH on the structure of PAMAM dendrimers. *Macromolecules.* 2005;38(3):979–91.
127. Otto DP, de Villiers MM. Poly(amidoamine) Dendrimers as a Pharmaceutical Excipient. Are We There yet? Vol. 107, *Journal of*

Pharmaceutical Sciences. 2018. p. 75–83.

128. Topp A, Bauer BJ, Klimash JW, Spindler R, Tomalia DA, Amis EJ. Probing the location of the terminal groups of dendrimers in dilute solution. *Macromolecules*. 1999;32(21):7226–31.
129. Tomalia DA, Hall VB, Hall M, Hedstrand DM. Starburst Dendrimers. 4. Covalently Fixed Unimolecular Assemblages Reimniscent of Spheroidal Micelles. *Macromolecules*. 1987;20(5):1164–7.
130. Naylor AM, Goddard WA, Kiefer GE, Tomalia DA. Starburst Dendrimers. 5. Molecular Shape Control. *J Am Chem Soc*. 1989;111(6):2339–41.
131. Porcar L, Liu Y, Verduzco R, Hong K, Butler PD, Magid LJ, et al. Structural investigation of PAMAM dendrimers in aqueous solutions using small-angle neutron scattering: effect of generation. *J Phys Chem B*. 2008;112(47):14772–8.
132. Faul CFJ, Antonietti M, Hentze HP, Smarsly B. Solid-state nanostructure of PAMAM dendrimer-fluorosurfactant complexes and nanoparticles synthesis within the ionic subphase. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2003;212(2–3):115–21.
133. Lee I, Athey BD, Wetzel a W, Meixner W, Baker JR. Structural molecular dynamics studies on polyamidoamine dendrimers for a therapeutic application: Effects of pH and generation. *Macromolecules*. 2002;35(11):4510–20.
134. Newkome GR, Moorefield CN, Baker GR, Behera RK. Cascade Polymers: Syntheses and Characterization of One-Directional Arborols Based on Adamantane. *J Org Chem*. 1991;56(25):7162–7.
135. Devarakonda B, Otto DP, Judefeind A, Hill RA, de Villiers MM. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int J Pharm*. 2007;345(1–2):142–53.
136. Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, et al. Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in

- vitro*, and preliminary studies on the biodistribution of <sup>125</sup>I-labelled polyamidoamine dendrimers *in vivo*. *J Control Release*. 2000;65(1–2):133–48.
137. King Heiden TC, Dengler E, Kao WJ, Heideman W, Peterson RE. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;225(1):70–9.
138. Lombardo D, Calandra P, Bellocco E, Laganà G, Barreca D, Magazù S, et al. Effect of anionic and cationic polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on a model lipid membrane. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016;1858(11):2769–77.
139. Klajnert B, Epanand RM. PAMAM dendrimers and model membranes: Differential scanning calorimetry studies. *Int J Pharm*. 2005;305(1–2):154–66.
140. Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown NB, D'Emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*. 2003;252(1–2):263–6.
141. Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Lett*. 2008;8(2):420–4.
142. Mukherjee SP, Davoren M, Byrne HJ. *In vitro* mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers - Towards quantitative structure activity relationships. *Toxicol Vitro*. 2010;24(1):169–77.
143. Parimi S, Barnes TJ, Prestidge CA. PAMAM dendrimer interactions with supported lipid bilayers: A kinetic and mechanistic investigation. *Langmuir*. 2008;24(23):13532–9.
144. Bodewein L, Schmelter F, Di Fiore S, Hollert H, Fischer R, Fenske M. Differences in toxicity of anionic and cationic PAMAM and PPI dendrimers in zebrafish embryos and cancer cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;305:83–92.

145. Thiagarajan G, Greish K, Ghandehari H. Charge affects the oral toxicity of poly(amidoamine) dendrimers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;84(2):330–4.
146. Watala C, Karolczak K, Kassassir H, Talar M, Przygodzki T, Maczynska K, et al. How do the full-generation poly(amido)amine (PAMAM) dendrimers activate blood platelets? Activation of circulating platelets and formation of “fibrinogen aggregates” in the presence of polycations. *Int J Pharm.* 2016;503(1–2):247–61.
147. Nam HY, Nam K, Hahn HJ, Kim BH, Lim HJ, Kim HJ, et al. Biodegradable PAMAM ester for enhanced transfection efficiency with low cytotoxicity. *Biomaterials.* 2009;30(4):665–73.
148. Labieniec M, Gabryelak T. Preliminary biological evaluation of poli(amidoamine) (PAMAM) dendrimer G3.5 on selected parameters of rat liver mitochondria. *Mitochondrion.* 2008;8(4):305–12.
149. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;56(3):290–9.
150. Fiume MZ. Final Report on the Safety Assessment of Acrylates Copolymer and 33 Related Cosmetic Ingredients. Vol. 21, *International Journal of Toxicology.* 2002. p. 1–50.
151. Luong D, Kesharwani P, Deshmukh R, Mohd Amin MCI, Gupta U, Greish K, et al. PEGylated PAMAM dendrimers: Enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery. Vol. 43, *Acta Biomaterialia.* 2016. p. 14–29.
152. Prieto MJ, Schilrreff P, Tesoriero MVD, Morilla MJ, Romero EL. Brain and muscle of Wistar rats are the main targets of intravenous dendrimeric sulfadiazine. *Int J Pharm.* 2008;360(1–2):204–12.
153. Menjoge AR, Navath RS, Asad A, Kannan S, Kim CJ, Romero R, et al. Transport and biodistribution of dendrimers across human fetal membranes: Implications for intravaginal administration of dendrimer-drug conjugates. *Biomaterials.* 2010;31(18):5007–21.

154. Win-Shwe TT, Sone H, Kurokawa Y, Zeng Y, Zeng Q, Nitta H, et al. Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. *Toxicol Lett.* 2014;228(3):207–15.
155. Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res.* 1996;30(1):53–65.
156. Dai H, Navath RS, Balakrishnan B, Guru BR, Mishra MK, Romero R, et al. Intrinsic targeting of inflammatory cells in the brain by polyamidoamine dendrimers upon subarachnoid administration. *Nanomedicine.* 2010;5(9):1317–29.
157. Santiago-Morales J, Rosal R, Hernando MD, Ulaszewska MM, García-Calvo E, Fernández-Alba AR. Fate and transformation products of amine-terminated PAMAM dendrimers under ozonation and irradiation. *J Hazard Mater.* 2014;266:102–13.
158. Opina AC, Wong KJ, Griffiths GL, Turkbey BI, Bernardo M, Nakajima T, et al. Preparation and long-term biodistribution studies of a PAMAM dendrimer G5-Gd-BnDOTA conjugate for lymphatic imaging. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10(9):1423–37.
159. Wyman TB, Nicol F, Zelphati O, Scaria P V., Plank C, Szoka FC. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry.* 1997;36(10):3008–17.
160. Michiue H, Eguchi A, Scadeng M, Dowdy SF. Induction of in vivo synthetic lethal RNAi responses to treat glioblastoma. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(23):2306–13.
161. Parsian M, Mutlu P, Yalcin S, Tezcaner A, Gunduz U. Half generations magnetic PAMAM dendrimers as an effective system for targeted gemcitabine delivery. *Int J Pharm.* 2016;515(1–2):104–13.
162. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, et al. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: Hole formation and the relation to transport. *Bioconjug Chem.*

2004;15(4):774–82.

163. Chen K, Chen Q, Wang K, Zhu J, Li W, Li W, et al. Synthesis and characterization of a PAMAM-OH derivative containing an acid-labile  $\beta$ -thiopropionate bond for gene delivery. *Int J Pharm.* 2016;509(1–2):314–27.
164. Kaminskas LM, Boyd BJ, Karellas P, Krippner GY, Lessene R, Kelly B, et al. The impact of molecular weight and PEG chain length on the systemic pharmacokinetics of pegylated poly L-lysine dendrimers. *Mol Pharm.* 2008;5(3):449–63.
165. Kaminskas LM, McLeod VM, Porter CJH, Boyd BJ. Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: An assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation. Vol. 9, *Molecular Pharmaceutics*. 2012. p. 355–73.
166. Majoros IJ, Myc A, Thomas T, Mehta CB, Baker JR. PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules*. 2006;7(2):572–9.
167. Xu X, Li J, Han S, Tao C, Fang L, Sun Y, et al. A novel doxorubicin loaded folic acid conjugated PAMAM modified with borneol, a nature dual-functional product of reducing PAMAM toxicity and boosting BBB penetration. *Eur J Pharm Sci.* 2016;
168. Zhang L, Han L, Qin J, Lu W, Wang J. The use of borneol as an enhancer for targeting aprotinin-conjugated PEG-PLGA nanoparticles to the brain. *Pharm Res.* 2013;
169. Lv T, Yu T, Fang Y, Zhang S, Jiang M, Zhang H, et al. Role of generation on folic acid-modified poly(amidoamine) dendrimers for targeted delivery of baicalin to cancer cells. *Mater Sci Eng C.* 2017;

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1) **Adı-Soyadı:** Meltem KOCAMANOĞLU

2) **Doğum Tarihi-Yeri:** 01.01.1987-Kdz. Ereğli

3) **Medeni Hali:** Bekar

4) **Uyruğu:** T.C.

6) **Adres:** Şirintepe Mah. 8154 Sok. No: 29 D:1 K1 Çiğli/ İZMİR

**Tel:** 0 542 261 29 99

**e-mail:** [meltemkcmnoglu@gmail.com](mailto:meltemkcmnoglu@gmail.com)

7) **Öğrenim Durumu :**



Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2006-2013
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	Ege Üniversitesi	2015-Devam ediyor