

MELLEK KARACA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2017



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

(DOKTORA TEZİ)

**PANKREAS KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
GEMSİTABİN VE VİSMODEGİB İÇEREN MİSELLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

MELEK KARACA

**DANIŞMAN
PROF. DR. YILDIZ ÖZSOY**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Teknoloji Programında Doktora öğrencisi Melek Karaca tarafından Prof.Dr. Yıldız Özsoy Erginer'in danışmanlığında hazırlanan "Pankreas Kanseri Tedavisine Yönelik Gemsitabin ve Vismodegib İçeren Misellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06 /06/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Ahmet O. Araman

İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri-Danışman

Prof.Dr. Yıldız Özsoy Erginer
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr. Neslihan Üstündağ Okur
İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri

Prof.Dr. Erdal Cevher
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr. Oya Kerimoğlu
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



MELEK KARACA

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Başta değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana her zaman yol gösteren ve her konuda destek olan, hayatıma yön veren doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yıldız Özsoy'a,

Desteğini her zaman hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi Güngör'e,

Tez çalışmalarımı Amerika Birleşik Devletleri'nde yürüttüğüm süre boyunca bana rehberlik eden, University of Nebraska Medical Center, College of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Ram I. Mahato'ya ve çalışmam sırasında kimyasal sentezler konusunda bana yardımcı olan Sayın Dr. Rinku Dutta'a,

Her zaman desteği ve sevgisi ile yanımda olan Uzm. Ecz. Hale Erbilir'e, Ecz. İmren Esentürk'e, Ecz. Beyza Betül Koçak'a, Dr. Meriem Rezigue'a, Ecz. Alper Nak'a, Ecz. Emre Şefik Çağlar'a, Uzm. Ecz. Burcu Mesut'a ve Dr. Hande Tekarslan'a,

Sayın yöneticim Ecz. Dicle Balbay ve çalışma arkadaşlarım Ecz. Derya Dönmez ve Kimya Mühendisi Nedret Kesmen'e,

Hayatım boyunca maddi ve manevi açıdan beni sonsuz destekleyen, fedakarlık ve sevgide sınır tanımayan canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora programı süresince 2211-Yurt İçi Lisans Üstü Burs Programı kapsamında beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİ
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT.....	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pankreas Kanseri.....	4
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Risk Faktörleri.....	4
2.1.3. Hastalık Biyolojisi.....	5
2.1.3.1. Gen Değişimi ve Moleküler Patoloji.....	5
2.1.4. Pankreas Kanseri ve Hedgehog Sinyali	6
2.1.4.1. SHH.....	6
2.1.4.2. PTCH1.....	7
2.1.4.3. SMO	7
2.1.5. Desmoplazi.....	8
2.1.6. Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm	9
2.1.6.1. Pankreas Kanseri EMD İndükleyici Faktörler	10
2.1.7. Tanı ve Tedavi	12
2.1.7.1. Antimetabolit Tedavisi.....	15
2.1.7.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör İnhibitörleri ile Tedavi	16
2.1.7.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü İnhibitörleri ile Tedavi.....	17
2.1.7.4. GEM + Nab-Paklitaksel Tedavisi	18
2.1.7.5. Hedgehog Yolağı Bileşenlerinin Hedeflenmesi.....	19
2.2. Çalışmada Kullanılan Etkin Maddeler	23

2.2.1. Gemsitabin	23
2.2.2. Vismodegib (GDC-0449).....	24
2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	25
2.4. Polimerik Miseller	26
2.4.1. Misellere İlaç Yüklenmesi	28
2.4.1.1. Diyaliz:.....	28
2.4.1.2. Çözücü Buharlaştırma Metodu	28
2.4.1.3. Su İçinde Yağ Emülsiyon Metodu	28
2.4.1.4. Dondurarak Kurutma (liyofilizasyon) Metodu	28
2.4.2. Pasif Hedeflendirme ve Miseller İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	28
2.4.3. Kanser Tedavisinde Polimerik Misellerin Terapötik Uygulamaları	31
2.4.3.1. Pluronikler (Pluronics®).....	31
2.4.3.2. PEG-PLA	32
2.4.3.3. PEG-PCL.....	32
2.4.3.4. PEG-lipid.....	32
2.4.3.5. PEG-PLGA	33
2.4.3.6. PEG-poli(amino asit)	33
2.4.3.7. Uyarıya Duyarlı Polimerik Miseller.....	34
2.4.4. Misellerin Hücre İçi Akıbeti	34
2.5. Hücre Kültürü Yöntemleri	35
2.5.1. Hücre Kültürü Yönteminin Avantajları	36
2.5.2. Hücre Kültürü Yönteminin Sakıncaları	36
2.5.3. Hücre Kültürü Kullanım Alanları	36
2.5.4. Hücre Canlılığı Değerlendirme Çalışmaları	37
2.5.4.1. Tetrazolium İndirgeme Deneyleri	37
2.5.4.2. MTT Tetrazolium Deneyi Konsepti.....	37
2.5.4.3. Hemositometre ile Hücre Sayımı	38
2.6. Protein Ekspresyonu Değerlendirmesi için Kullanılan Yöntemler.....	38
2.6.1. BCA Protein Konsantrasyonu Tayini	38
2.6.2. Western Blot Yöntemi	39
2.6.3. İmmünohistokimya ve İmmünoflorasan Çalışmaları.....	42
2.6.3.1. Florasan Prensibi.....	44
2.6.3.2. İmmünoflorasan Yöntemi Protokolü.....	46

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler.....	48
3.2. Kullanılan Cihazlar	49
3.3. Çalışmalarda Kullanılacak Polimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu	50
3.3.1. 2-metil-2-benziloksikarbonil-propilen karbonat (MBC) Sentezi.....	50
3.3.2. Reaksiyon Yöntemi:.....	50
3.3.3. PEG-MBC Sentezi	52
3.3.4. PEG-MBC Hidrojenizasyonu	52
3.3.5. PEG-PCC' ye Gemsitabin ve Dodekanol Konjugasyonu	52
3.3.6. Saflaştırma İşlemi	53
3.3.7. PEG-PCC' ye Dodekanol Konjugasyonu	54
3.3.8. Saflaştırma İşlemi	54
3.3.9. mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ve mPEG-b-PCC-g-DC Polimerlerinin Karakterizasyonları	55
3.4. Analitik Miktar Tayini Yöntemleri.....	56
3.4.1. Gemsitabin Miktar Tayini Yöntemi.....	56
3.4.2. Vismodegib için HPLC ile Miktar Tayini.....	56
3.4.3. Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyon Parametreleri.....	57
3.4.3.1. Özgünlük (Seçicilik)	57
3.4.3.2. Doğrusallık.....	58
3.4.3.3. Kesinlik	58
3.4.3.4. Tekrar Edilebilirlik.....	58
3.4.3.5. Tekrar Elde Edilebilirlik	59
3.4.3.6. Doğruluk	59
3.5. Formülasyon Geliştirme.....	60
3.5.1. Boş Misellerin (etkin madde içermeyen) Hazırlanması.....	60
3.5.2. Gemsitabin Misel Formülasyonlarının Hazırlanması	60
3.5.3. Vismodegib Misel Formülasyonlarının Hazırlanması	60
3.6. Hazırlanan Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonları.....	61
3.6.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Misel Oluşumunun Doğrulanması	61
3.6.2. Misellerin Partikül Büyüklüğü Ölçümleri.....	62
3.6.3. GEM'in Polimere Yüklenme Etkinliğinin Araştırılması	62

3.6.4. Vismodegib'in Misel Yapılarına Yükleme Etkinliği ve Miseller Çözünürlüğün Araştırılması.....	62
3.6.5. Misel Formülasyonlarından Gemsitabin ve Vismodegib'in In Vitro Salımı	64
3.6.5.1. Gemsitabin'in Çözünürlük Çalışması	64
3.6.5.2. Vismodegib'in Çözünürlük Çalışması	64
3.6.5.3. In Vitro Salım Deneyleri	64
3.7. In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları	65
3.7.1. Kullanılan Hücre Hattı ve Hücre Kültür Koşulları	65
3.7.2. Formülasyonların ve Kombinasyonlarının Sitotoksisitelerinin Araştırılması ..	66
3.7.3. Formülasyon Uygulanması ile Hücrelerdeki Protein Ekspresyonundaki Değişikliklerin Western Blot Analizi ile Kontrolü	67
3.7.4. İnvazyon, Migrasyon ve Koloni oluşumu Araştırılması	70
3.8. İn Vivo Çalışmalar	71
3.8.1. Histokimya ve İmmünoflorasan Çalışmaları	73
3.8.1.1. Gli-1 ve Aktif Caspase-3 İmmünoflorasan İşaretleme	73
3.8.1.2. Hematoksilin ve Eosin (H&E) Boyama Yöntemi	74
3.8.1.3. Ki-67 ve ZEB-1 İşaretleme	75
4. BULGULAR.....	76
4.1. MBC, PEG-MBC ve PEG-PCC Bileşiklerinin Karakterizasyonları	76
4.2. mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ve mPEG-b-PCC-g-DC Polimerlerinin Karakterizasyonları	78
4.3. Analitik Miktar Tayini Yöntemleri	79
4.3.1. Özgünlük (Seçicilik)	80
4.3.2. Doğrusallık	80
4.3.3. Kesinlik	81
4.3.3.1. Tekrar Edilebilirlik	81
4.3.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik	81
4.3.4. Doğruluk	83
4.4. Etkin Madde İçermeyen Misel Formülasyonlarının Hazırlanması	86
4.5. Etkin Madde İçeren Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı	86
4.5.1. GEM Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı	86
4.5.2. Vismodegib (GDC-0449) İçeren Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı	86
4.6. Hazırlanan Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonları	87

4.6.1. Kritik Misel Konsantrasyonlarının Tayini	87
4.6.2. Misellerin Partikül Büyüklüğü Ölçümleri.....	89
4.6.3. GEM Yükleme Etkinliği ve Miseller Çözünürlüğünün Araştırılması	90
4.6.4. Vismodegib (GDC-0449) Yükleme Etkinliği ve Miseller Çözünürlüğünün Araştırılması.....	91
4.6.5. Stabilité Değerlendirmesi.....	91
4.6.6. Misel Formülasyonlarından GEM ve Vismodegib (GDC-0449) Salımı	91
4.6.6.1. GEM Çözünürlük Çalışması	91
4.6.6.2. Vismodegib Çözünürlük Çalışması.....	92
4.6.6.3. Tween 80'in Misel Stabilitesi Üzerine Etkisi	92
4.6.6.4. In Vitro Salım Deneyleri	93
4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	94
4.7.1. Formülasyonların Sitotoksitelerinin Araştırılması	94
4.7.2. İnvazyon, Migrasyon ve Koloni Oluşumu Araştırılması	99
4.7.3. Formülasyon Uygulanması ile Hücrelerdeki Protein Ekspresyonundaki Değişikliklerin Western Blot Analizi ile Kontrolü	103
4.8. In vivo Çalışmalar.....	104
4.8.1. İmmünoflorasan ve İmmünohistokimya Çalışmaları.....	108
5. TARTIŞMA	115
KAYNAKLAR	120
HAM VERİLER	135
FORMLAR	136
ETİK KURUL KARARI	137
PATENT HAKKI İZNİ	140
TELİF HAKKI İZNİ.....	141
ÖZGEÇMİŞ	142

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Pankreas Kanseri Risk Faktörleri	5
Tablo 2-2: Pankreas kanseri için adjuvan tedavi klinik çalışmaları	15
Tablo 2-3: Tirozin kinaz inhibitörleri ile yapılan bazı klinik çalışmalar	17
Tablo 2-4: Bevasizumab ile yapılan bazı klinik çalışmalar	18
Tablo 2-5: Hedgehog inhibitörleri	22
Tablo 2-6: Protein molekül ağırlıkları ve kullanılması önerilen jel yüzdeleri	40
Tablo 3-1: GEM miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi parametreleri	56
Tablo 3-2: Vismodegib miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi parametreleri	57
Tablo 3-3: Protein tayini için referans standartların hazırlanması	69
Tablo 3-4: Western Blot analizinde kullanılan primer antikorlar, katalog numaraları, kaynakları ve seyreltme oranları	70
Tablo 4-1: GEM için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)	81
Tablo 4-2: Vismodegib (GDC-0449) için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)	81
Tablo 4-3: GEM için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)	82
Tablo 4-4: Vismodegib (GDC-0449) için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)	83
Tablo 4-5: GEM için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen doğruluk sonuçları	84
Tablo 4-6: GDC-0449 için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen doğruluk sonuçları	85
Tablo 4-7: Farklı yöntemlerle ve farklı yükleme oranlarında hazırlanan vismodegib formülasyonlarına ait yükleme etkinliği ve boyut değerleri	87
Tablo 4-8: GEM misellerinin zaman ile boyut ve GEM yüzdesi değişimi	91
Tablo 4-9: Vismodegib (GDC-0449) misellerin zaman ile boyut Vismodegib yüzdesi değişimi	91
Tablo 4-10: pH 7.4 farklı yüzdelerde Tween 80 içeren PBS’de vismodegib çözünürlüğü	92
Tablo 4-11: pH 5.5 farklı yüzdelerde Tween 80 içeren PBS’de vismodegib çözünürlüğü	92

Tablo 4-12: Tween 80 oranının misel stabilitesi üzerine etkisi	93
Tablo 4-13: % 2 Tween 80 içeren PBS içinde hazırlanan misellerin 10 gün boyunca boyut ölçümü.....	93



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Pankreas kanseri gelişim modeli (Hruban, 2000)	8
Şekil 2-2: Aktif ve inaktif Hedgehog sinyal mekanizması	20
Şekil 2-3: Gemcitabin' in moleküler yapısı	23
Şekil 2-4: Vismodegib (GDC-0449) molekül yapısı	24
Şekil 2-5: Artmış permeabilite ve retansiyon etkisi. Uzun süre sirküle halinde polimerik miseller (1) zayıf patalojik vasküler (2) solid tümör (3) salınan serbest ilaç (4).	31
Şekil 2-6: Misel ilaç taşıyıcı sistem avantajları	35
Şekil 2-7: MTT'nin mitokondriyal redüktaz enzimi ile formazan kristaline indirgenmesi	37
Şekil 2-8: Direkt ve indirekt immüno-florasans	43
Şekil 2-9: Florasans Prensibi	45
Şekil 3-1: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC miselleri	63
Şekil 3-2: mPEG-b-PCC-g-DC misellerine Vismodegib enkapsülasyonu	63
Şekil 3-3: Hemasitometre ile hücre sayısı tayini	67
Şekil 3-4: Migrasyon deneyi dizaynı	71
Şekil 3-5: Subkütan yol ile MIA PaCa-2 hücresi enjeksiyonu	72
Şekil 4-1: MBC ¹ H-NMR spekturumu	76
Şekil 4-2: PEG-MBC ¹ H-NMR spekturumu	77
Şekil 4-3: PEG-PCC ¹ H-NMR spekturumu	77
Şekil 4-4: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ¹ H-NMR spekturumu	78
Şekil 4-5: mPEG-b-PCC-g-DC ¹ H-NMR spekturumu	79
Şekil 4-6: GEM standart çözeltisinin örnek kromatogramı	79
Şekil 4-7: Vismodegib (GDC-0449) standart çözeltisinin örnek kromatogramı	80
Şekil 4-8: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ve mPEG-b-PCC-g-DC'nin kritik misel konsantrasyonu hesaplaması	88
Şekil 4-9: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC miselleri ve vismodegib enkapsüle mPEG-b-PCC-g-DC miselleri boyutları	89
Şekil 4-10: Alkali hidroliz yöntemi uygulanmadan misel formülasyonunun HPLC kromatogramı (A)	90
Şekil 4-11: Gemcitabin ve Vismodegib (GDC-0449) misellerinin pH 5.5 ve pH 7.4 in vitro salım profilleri	94

Şekil 4-12: Gemsitabin miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 24 saat sonra canlılık değerlendirmesi.....	95
Şekil 4-13: Vismodegib (GDC-0449) miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 24 saat sonra canlılık değerlendirmesi.....	95
Şekil 4-14: Kombinasyon miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 24 saat sonra canlılık değerlendirmesi.....	96
Şekil 4-15: Gemsitabin miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 48 saat sonra canlılık değerlendirmesi.....	96
Şekil 4-16: Vismodegib (GDC-0449) miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 48 saat sonra canlılık değerlendirmesi.....	97
Şekil 4-17: Kombinasyon miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 48 saat sonra canlılık değerlendirmesi.....	97
Şekil 4-18: Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 72 saat sonra canlılık değerlendirmesi..	98
Şekil 4-19: İnvazyon değerlendirmesi	99
Şekil 4-20: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinin 24 saat ve 72 saat sonra migrasyonlarının değerlendirilmesi	100
Şekil 4-21: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinin 24 saat ve 72 saat sonra koloni oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi	101
Şekil 4-22: BSA Deneyi ile Protein Konsantrasyonu Belirlenmesi. Renk oluşumu (A), BSA standart eğrisi (B).....	102
Şekil 4-23: 72 saat boyunca Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile inkübe edilen MIA PaCa-2 hücrelerindeki protein ekspresyonunun Wester Blot analizi ile değerlendirilmesi.....	103
Şekil 4-24: 16 günlük tedavi sonucu çıkarılan tümörler.....	105
Şekil 4-25: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile tedavi edilen farelerin tedavi süresince tümör hacmi ölçümleri	106
Şekil 4-26: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile tedavi edilen farelerden 16 gün sonunda izole edilen tümörlerin ağırlıklık ölçümleri.....	107

Şekil 4-27: Kontrol, Gempitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile tedavi edilen farelerin tedavi süresince vücut ağırlıkları ölçümü	108
Şekil 4-28: Gli-1 ekspresyonu değerlendirmesi için immünohistoflorasans işaretleme Kontrol grubu (A), GEM miselleri ile tedavi (B), Vismodegib miselleri ile tedavi (C), Kombinasyon tedavisi (D)	110
Şekil 4-29: Active Caspase-3 ekspresyonu değerlendirmesi için immünohistoflorasans işaretleme. Kontrol grubu (A), GEM miselleri ile tedavi (B), Vismodegib miselleri ile tedavi (C), Kombinasyon tedavisi.....	111
Şekil 4-30: ZEB-1 İşaretleme.....	112
Şekil 4-31: KI-67 İşaretleme.....	113
Şekil 4-31: Hematoxylin and Eosin (H&E) İşaretleme.....	114

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

-b-: Blok

BMI: Vücut kütle indeksi

DC: Dodekanol

EGFR: Epitelyal büyüme faktörü reseptörü

EMD: Epitelyal mezankimal dönüşüm

FA: Folik asit

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu

FU: Fluoro urasil

-g-: graft

GEM: Gempitabin

GDC-0449: Vismodegib

Hh: Hedgehog

H & E: Hematoxylin and Eosin

PanIN: İnsan pankreas intraepitel neoplazi

PBS: Fosfat tamponu

PET: Pozitron emisyon tomografisi

PTCH1: Patched1

SHH: Sonic Hedgehog

SMO: Smoothened protein

VEGFR: Vasküler epitelyal büyüme faktörü reseptörü

ÖZET

Karaca, M. (2017). Pankreas Kanseri Tedavisine Yönelik Gemsitabin ve Vismodegib İçeren Misellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Hedgehog (Hh) sinyali pankreas duktal adenokarsinoması gelişiminde ve metastasında önemli bir rol oynamaktadır. Hastalığın tedavisinde ilk seçenek olan Gemsitabin (GEM)’ in kullanımı hızlı metabolizmaya uğraması ve kısa yarı ömrü sebebiyle sekteye uğramaktadır. Birden fazla ilaç kullanılarak uygulanan kombinasyon tedavisi yaklaşımı kanser tedavisinde umut vadeden bir yaklaşımdır. Bu tez çalışmasında, poli (etilen glikol)-blok-poli(2-metil-2-karboksil-propilen karbonat)-graft-dodekanol (mPEG-b-PCC-g-DC) kopolimeri sentezlenerek bu kopolimere GEM konjuge edilerek miselleri hazırlanmış veya hidrofobik bölgesine bir Hh inhibitörü olan vismodegib (GDC-0449) enkapsüle edilmiştir. Çalışmanın amacı ise bu misellerin kombinasyonunun tekli misel formülasyonlarına göre Hh sinyalini inhibe etmede ve pankreas kanserinin proliferasyonu ve metastazını engellemede daha etkili olup olamayacağının gösterilmesidir. Tez çalışması sonucunda, GEM’ in konjugasyon sonrası in vivo stabilitesinin etkili şekilde artırıldığı bunun da daha yüksek antitümör etki sağladığı gösterilmiştir. Enkapsüle olan Vismodegib’ in yaklaşık %80’ i ve konjuge olmuş GEM’ in yaklaşık %19’ u in vitro pH 5.5’ de 48 saatte uzatılmış salım ile salınmıştır. MIA PaCa-2 kanser hücre hattı üzerine yapılan çalışmada misel kombinasyonunun tekli misel formülasyonlarına göre hücrelerin invazyon, migrasyon ve koloni oluşturma potansiyellerini anlamlı derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Kombinasyon miselleri ile tedavi tekli misel formülasyonlarına göre PARP kesilmesinde ve Bax ekspresyonunda fark edilebilir bir artış sağlamıştır. İn vivo ve in vitro çalışmalar sonucunda, misel kombinasyonunun etkili şekilde tümör büyümesini engellediği, apoptozisi artırdığı, Hh ligandları PTCH-1 ve Gli-1’ in ekspresyonunu azalttığı ve epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) aktivatörü ZEB-1 düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir. Sonuç olarak, GEM ve Vismodegib (GDC-0449) taşıyan misel kombinasyonu pankreas kanseri tedavisi için potansiyel taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler : pankreas kanseri, hedgehog sinyali, gemsitabin, vismodegib, polimerik miseller, kombinasyon tedavisi

ABSTRACT

Karaca, M. (2017). Preparation and Characterization of Micelles Containing Gemcitabine and Vismodegib for Pancreatic Cancer Treatment. İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Technology Department. Doktora Tezi. İstanbul.

Hedgehog (Hh) signaling has a pivotal role in the growth and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Gemcitabine (GEM) has long been used as a first-line therapy for PDAC, however its clinical benefits are compromised due to rapid metabolism and short plasma half-life. Combination therapy approach emerges as a promising alternative for treating cancer. In this thesis study, we conjugated the GEM to methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(2-methyl-2-carboxyl-propylene carbonate)-graft-dodecanol (mPEG-b-PCC-g-DC) copolymer and encapsulated a Hh inhibitor, vismodegib (GDC-0449), into its hydrophobic core individually for pancreatic cancer treatment. The aim of this study is to determine the combination effect of GEM and Vismodegib (GDC-0449) to inhibit Hh signaling pathway and block the proliferation and metastasis of pancreatic cancer. Micellar delivery system has enabled sustain delivery which was evaluated in in vitro release studies. It was shown to be that almost 80% of encapsulated GDC-0449 and 19% conjugated GEM were released in vitro at pH 5.5 in 48 h. Combination of two micelles composed of GEM and vismodegib (GDC-0449) significantly inhibited the invasion, migration, and colony forming features of MIA PaCa-2 pancreatic cancer cell line. In vitro protein analysis showed that micellar mixture treatment resulted in notably increased apoptosis that was evaluated via PARP cleavage and Bax expression. Combination approach applied on athymic nude mice bearing subcutaneous tumor generated using MIA PaCa-2 cells and resulted in inhibited tumor growth, increased apoptosis, reduced Hh ligands Gli-1, and lowered EMT- activator ZEB-1 compared to monotherapy as demonstrated in immunohistochemical analysis. In conclusion, micelle combination composed of GEM and GDC-0449 have the potential to treat PDAC.

Key Words: pancreatic cancer, hedgehog signaling, gemcitabine, GDC-0449, polymeric micelles, combination therapy

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ölüme sebebiyet veren kanser türleri arasında pankreas kanseri öne çıkan bir türdür. Hem erken hem de ileri derece pankreas kanserinde tek faydalı yöntem cerrahi çıkarım işlemidir, ancak hastalığın prognozu oldukça zayıftır (Cheol Kim ve ark., 2012). Hastalarda metastaz ve lokal tekrarlama gerçekleşmekte ve adjuvan tedavi uygulanması gerekmektedir. Geliştirilen tedavi yöntemlerine rağmen toplam sağkalım oldukça düşük olup, hastalarda ilaca karşı direnç ve toksisite görülmektedir (Oberstein ve Olive, 2013).

Bir pirimidin antimetaboliti olan gemsitabin (GEM), 15 yıldan uzun süredir kemoterapik ajan olarak kullanılmaktadır ve etkisi kromozomal replikasyonu engelleyerek ve apoptozisi indükleyerek göstermektedir (Ewald, Sampath ve Plunkett, 2008). Ancak, ilacın vücuda alınmasını takiben hızla metabolize olması klinik potansiyelini kısıtlamaktadır. İlaç, vücuda alındıktan sonra sitidin deaminaz enzimi tarafından metabolize olarak 2'-2'-diflorodeoksiüridin inaktif metabolitine dönüşmekte ve böbreklerden atılıma geçmektedir. Bu durumda hastalara daha yüksek dozlarda uygulama gerekmekte ve bu da ciddi yan etkilere ve toksisiteye yol açmaktadır (Reddy ve Couvreur, 2008).

Gemsitabin'in bir başka kısıtlayıcı özelliği ise hidrofilik bir yapıya sahip olması ve bu durumun ilacın uzatılmış salımını ve kanser dokusuna ekstrasözasyonunu engellemesidir (Chitkara ve ark., 2013).

Gemsitabin'in farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek için nanoformülasyonlar geliştirilmiş, plazmadaki instabilitesi engellenmeye çalışılmıştır. İlacın salımını iyileştirmek için enkapsülasyon ve konjugasyon teknikleri kullanılmıştır.

Gemsitabin ile polimer konjugasyonları modifiye polietilen glikol (PEG) kullanımı ile ilacın stabilitesi ve sitotoksitesi artırılmış ve farmakokinetik özelliği iyileştirilmiştir (Vandana ve Sahoo, 2010).

Gemsitabinin skualen konjugatları hazırlanarak lipozomal formülasyonları oluşturulmuş, ilacın farmakokinetik profili iyileştirilmiş ve dirençli kanser hücrelerinde birikmesi sağlanmıştır. Fakat bu formülasyonlar retikulo endotelial sistem (RES) hücreleri tarafından alınarak karaciğer ve dalakta birikime yol açmıştır (Pili ve ark., 2010).

Kanser kök hücreleri, stroma oluşumu, ekstraselüler matriks proteinlerinin aşırı üretimi pankreas kanseri patolojisi oluşturur. Pankreas kanseri ile Hedgehog sinyali arasında korelasyon olduğu pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu çalışmalarda Hedgehog sinyal yolağının düzensizliğinin kanser mikroçevresinde anlamlı bozukluğa sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Feldmann ve ark., 2007). Hedgehog sinyali, embriyonik gelişim sırasında hücreler farklılaşmadan sorumluyken, erişkinlerde sessiz konuma geçer, yeniden aktivasyonu ise kanser gelişimine yol açmaktadır (Jiang ve Hui, 2008). Siklopamin, erismodegib, vismodegib (GDC-0449) gibi Hedgehog antagonistleri Smoothened (SMO)'a bağlanarak hücre içi pek çok kaskadı etkileyerek transmembran proteini PTCH-1 ve Gli transkripsiyon faktörlerinin inaktivasyonuna yol açarak Hedgehog sinyalini bloke eder (Gupta, Takebe ve LoRusso, 2010). Vismodegib (GDC-0449)'in yüksek dozlarda Hedgehog sinyalini baskıladığı ancak anjiyogenezisi artırdığı gösterilmiştir (Mathew ve ark., 2014). Gemsitabin, vismodegib (GDC-0449) ve nab-paklitaksel kombinasyonunun Gemsitabin ve kombinasyonundan üstün olduğu gösterilmiştir (Teague, Lim ve Wang-Gillam, 2015). Pek çok çalışmada gemsitabin ve Hedgehog inhibitörü kombinasyonunun pankreas kanseri tümör büyümesi redüksiyonu sağladığı gösterilmiştir. Fakat, gemsitabin ve vismodegib (GDC-0449) kombinasyonunun değerlendirildiği pilot klinik çalışmada kombinasyon tedavisinin yalnızca gemsitabin tedavisine göre toplam medyan sağkalımda veya progresyonsuz sağkalımda bir üstünlük göstermediği görülmüştür (Kim ve ark., 2014). Bu yüzden etkili tedavi sağlanabilmesi için dengeli Hedgehog inhibisyonu yapılmalıdır.

Gelişimsel bir proses olan epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) ile Hedgehog sinyali arasındaki bağlantı pek çok çalışmada gösterilmiştir. EMD'de polar, hareketsiz fenotipe sahip epitel hücreler nonpolar, hareketli mezankimal hücrelere dönüşür ve bu durum tümör gelişimini ve metastazı hızlandırır (Wang ve ark., 2016). Hedgehog sinyalinin inhibisyonu ile EMD'nin tersine çevrilmesini sağlayarak sitotoksik ilaçların tümör duyarlılığı artırılabilir.

Tez çalışmasında biyoyumlu PEG ve biyobozunur polikarbonattan oluşan amfifilik polimer poli(etilen glikol)-blok-poli(2-metil-2-karboksil-propilen karbonat) (PEG-PCC)'in karboksil grubuna gemsitabin konjuge edilerek etkili yüklenme sağlanmıştır. Yine polimere gemsitabin ile birlikte dodekanol de konjuge edilerek

polimerin lipofilik özelliği artırılmaya çalışılmıştır ve misel formölasyonları oluşturulmuştur.

PEG-PCC'nin yalnızca dodekanol ile konjugasyonuna ise Hedgehog inhibitörü vismodegib (GDC-0449) enkapsüle edilmiştir. Tekli miseller ve kombinasyonları in vitro MIA PaCa-2 insan pankreas kanseri hücre hattı ve in vivo atimik nude fareler üzerinde değeriendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji

Pankreas kanseri 5 yıllık sağ kalım oranı %1.2-6 olan öldürücü bir hastalıktır (Torre ve ark., 2015; Siegel, Miller ve Jemal, 2015). Dünyada her yıl 200.000'den fazla insan pankreas kanseri yüzünden ölmektedir. Amerika'da pankreas kanserinin 2030 yılına kadar kanser ölümlerinde ikinci sırayı yer alması beklenmektedir (Rahib ve ark., 2014). Avrupa popülasyonlarında da pankreas kanserine bağlı ölümler raporlanmakta, bu da hastalığın dünya genelindeki ciddiyetini gözler önüne sermektedir (Malvezzi ve ark., 2016).

2.1.2. Risk Faktörleri

Hastalık Hindistan, Afrika ve Güneydoğu Asya'da dünyanın diğer bölgelerine oranla daha az sıklıkta görülmektedir (Kamisawa ve ark., 2016). Afrikalı-Amerikanlarda Amerika'daki diğer etnik gruplara oranla görülme sıklığı daha yüksektir. Fakat bu farkın sebebi sigara içme veya diyabet gibi risk faktörlerinden kaynaklanıyor olabilmektedir. Cinsiyet de pankreas kanseri görülme sıklığını etkileyen bir başka faktördür. Hastalık kadınlara oranla erkeklerde %50 daha sık görülmektedir. Yine aynı şekilde 60-80 yaş hastalarda daha sık görülmektedir (Kamisawa ve ark., 2016). Pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %10'u ailesel temele dayanmaktadır ve ailesel bir öykü kişinin hastalığı geçirme riskini artırmaktadır (Hruban ve ark., 2010; Klein, 2004). Ailesel geçmişten sonra pankreas kanserine sebep olan en temel risk faktörü sigara kullanımıdır. Kullanıma ara verdikten 10 yıl sonra dahi %75 artmış risk bulunmaktadır (Iodice ve ark., 2008). Kronik pankreas iltihabına sahip hastalar yaşam boyu pankreas kanseri riski taşımaktadır (Raimondi ve ark., 2010). Diyabet hastalarında pankreas kanseri gelişme riski %30 olarak bilinmekte ve bu risk hastalık teşhis edildikten 20 yıl sonrasında dahi ciddiyetini devam ettirmektedir (Bosetti ve ark., 2014). Pankreas kanseri oluşumu ile obezite, özellikle vücut-kütle indeksi (BMI) ve merkezi yağ dağılımı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır (Arslan, 2010).

Tablo 2-1: Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Sigara kullanımı
Alkol kullanımı
Beslenme alışkanlıkları
Kahve tüketimi
Ailesel öykü ve genetik yatkınlık
Diyabet ve kronik pankreas iltihabı gibi pankreas kanseri tetikleyici predispozan hastalıklar

2.1.3. Hastalık Biyolojisi

2.1.3.1. Gen Değişimi ve Moleküler Patoloji

Pankreas kanseri genomunda 63 genetik değişim bulunmuştur. Yapılan moleküler analizlerde tümörögenез ve tedavi etkinliğini etkileyen kanser genleri ve kanser sinyal yolları gözlenmiştir (Jones ve ark., 2008).

GTPaz, guanosin trifosfat (GTP)'ı hidroliz eden enzimdir. KRAS geni bu enzimi kodlar ve GTPaz, büyüme faktörü reseptörlerinin downstream sinyalini düzenler. KRAS geni ileri aşamadaki pankreas kanserlerinde mutasyona uğramış onkogen olarak kodon 12'de bulunur. Kras mutasyonları insan pankreas intraepitel neoplazi (PanIN) gelişiminde erken safhada gözlemlenmiştir (Karanikas ve ark., 2016).

Pankreas kanserinde CDK4/Rb yolağı, BRCA2 ve LKB1 gibi tümör supresor genlerin ekspresyonunda da değişiklikler meydana gelir (Karanikas ve ark., 2016).

P53 geni hücre döngüsü ve apoptoziste önemli bir role sahiptir ve pankreas kanserinde p53 geni mutasyonu olduğu görülmüştür (Muller and Vousden, 2013)

Hastaların %55'inde transforming büyüme faktörü (TGF- β)'yı kodlayan tümör supresor gen SMAD4 te de değişiklikler bulunmuştur (Maitra and Hruban, 2008).

Proto onkogen B-Raf'ta mutasyonlar gözlenmiştir. BRAF, mitojen-aktif protein kinaz (MEK) ailesine ait olan RAF'ı kodlar. MEK, ekstraselüler sinyal regüle kinazları (ERK) aktive ederek mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) sinyal yolağını aktive eder (Karanikas ve ark., 2016).

KRAS ve BRAF mutasyonlarının en sonunda MAPK sinyal yolağını tetikleyerek pankreas kanseri gelişimine sebep olduğu bulunmuştur (Furukawa, 2015).

Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz (PI3K) bir diğer önemli sinyal yolağıdır, hücre büyümesini ve sağkalımını yönetir ve pankreas kanseri ile yakın ilişkisi gösterilmiştir (Payne ve ark., 2015).

2.1.4. Pankreas Kanseri ve Hedgehog Sinyali

Hedgehog sinyal yolağı, embriyonik organ oluşumu sırasında önemli bir role sahiptir. Fakat, yetişkin doku hücrelerinde bu yolağın aktivitesi anlamlı derecede azalmıştır. Yetişkin hücrelerinde bu sinyal yolağının uygun olmayan aktivasyonu deri, cerebellum, akciğer, pankreas ve prostat gibi organlarda tümör oluşumu ile bağlantılıdır (Abidi, 2014).

Memelilerde bilinen 3 tane hedgehog ligandı vardır. Bunlar Sonik Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) ve Desert Hedgehog (Dhh)'dir. Üçü de aynı transmembran reseptörü, Patched (Ptch)'e bağlanır. Bu ligandların yokluğunda, Patched sinyal bileşeni Smoothened'ı (Smo) akışını bloke ederek sinyal yolağını inhibe eder. Bir Hedgehog ligandının Ptch'e bağlanmasıyla, Ptch'in Smo üzerindeki inhibisyon fonksiyonu baskılanır ve sonucunda Gli ailesi transkripsiyon faktörleri nükleusa translokasyon yapar ve Hedgehog genlerinin ekspresyonunu aktive eder (Şekil 2-2). Bu ailenin memelilerde bulunan 3 üyesi vardır. Bunlar Gli1, Gli2 ve Gli3'tür. Gli1 ve Gli2 genel olarak hedef transkripsiyonun aktivatörü olarak hareket eder. Gli3'ün ise Hedgehog ligandlarının yokluğunda gen transkripsiyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Rimkus ve ark., 2016).

2.1.4.1. SHH

Pankreas kanserinde Hedgehog sinyalinin öneminin kanıtı ilk olarak PanIN lezyonlarının ve invaziv pankreas karsinomalarının SHH ligandı eksprese ettiğinin gözlemlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu bulgu bir şekilde şaşırtıcı olarak görülmüştür çünkü SHH ekspresyonu normal embriyonik ve yetişkin pankreas dokusunda

bulunmamıştır. Bu durum pankreas hücrelerinin tümör oluşumu süresince transkripsiyon profilinin oldukça aktif olduğunu desteklemektedir (Thayer ve ark., 2003).

2.1.4.2. PTCH1

12-transmembran proteini olan ve Hedgehog sinyalinde reseptör olarak görev alan Ptc1, Patched geni tarafından kodlanır (Lum, 2004). Patched bir tümör baskılayıcı gendir ve bu genin mutasyonu Gorlin sendromu, medulloblastoma ve özofagal ve skuamöz kanserine yol açar (Bai ve ark., 2016).

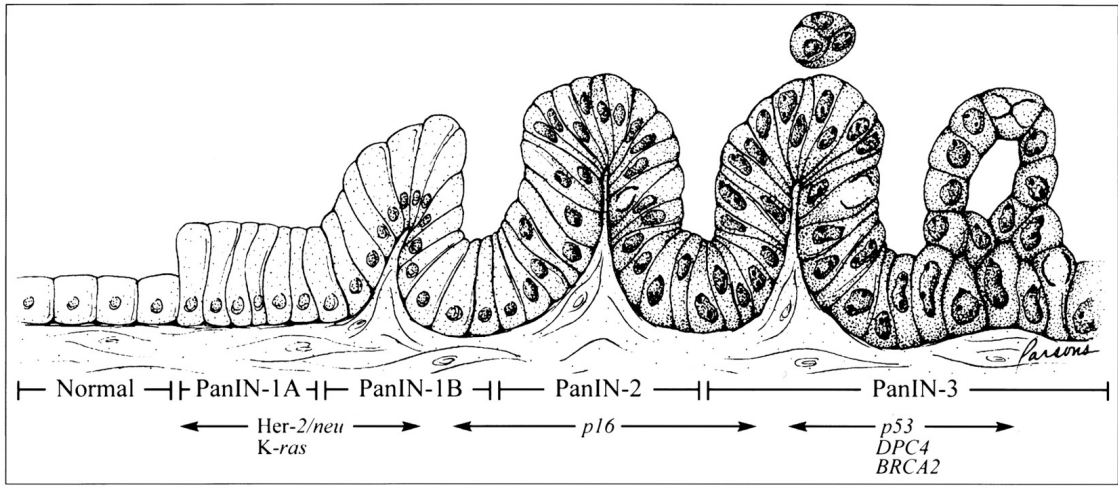
2.1.4.3. SMO

Hedgehog peptidleri salındığında ve hedef hücrelerin Hedgehog reseptörlerini aktive ettiğinde, Ptc aktivitesi baskılanır ve bu durum Smo'nun plazma membranına translokasyonuna öncülük eder. Smo, bir protoonkogen olan Smo geni tarafından kodlanır. Heterotrimerik G-proteini ile bağışık bir 7-transmembran proteindir (Bai ve ark., 2016).

Çekirdekte, Gli transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanarak Fox, Myc ve cyclin D gibi doku gelişimi, farklılaşması, epitel-mezenkimal dönüşüm ve kök hücrelilikte rol alan genlerin transkripsiyonunu düzenlerler.

Hh sinyal yolağı normalde reseptöre ligand bağlanmasıyla aktive olmasına rağmen, Hh ligandları olmadığında da Gli protein aktivitesini artıran pek çok mekanizma bulunmuştur. Meme kanserinde TGF- β sinyalinin Gli2 hedef genlerini aktive ettiği ve ileri kemik metastazına sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Johnson ve ark., 2010). Bazal hücre karsinomasında (BCC) mutasyona uğramış PTCH1 ekspresyonu Gli aktivasyonuna sebep olmuştur (Chen, 2002). Burkitt lenfomasında onkogen c-MYC'nin Gli1 ekspresyonunu SMO, PTCH veya Hh ligandlarının varlığından bağımsız olarak düzenlediği bulunmuştur (Yoon ve ark., 2013). Pankreas kanseri modelleriyle yapılan pek çok çalışma da Hh yolağının parakrin yolla aktive olduğu doğrulanmıştır. PI3K/AKT ve RAS/ERK gibi diğer sinyal yollarının da pek çok kanser türünde doğrudan Gli proteinlerini aktive ettiği gösterilmiştir (Hanna ve Shevde, 2016). Bütün bunlar Gli proteinlerinin aktivasyonunun ve onların hedefindeki genlerin transkripsiyonu sadece PTCH reseptörüne Hh ligandı bağlanmasıyla aktive olan klasik Hh yolağına bağlı olmadığını göstermektedir.

İnsanlarda PanIN oluşumu için ilk basamak KRAS mutasyonudur ve bunu Hedgehog sinyalinde bir artış takip eder. Hücre-otonom Hedgehog aktivasyonunun PanIN oluşumunu hızlandırıp hızlandırmayacağını anlamak için aktif Kras ve Hh mutasyonlarına sahip transgenik fareler (Kras/GLI2) üretilmiştir. Bu hayvanlardan pankreasları izole edilmiştir ve karsinomaya dönüşmek üzere olan çeşitli PanIN lezyonları gözlemlenmiştir (Pasca di Magliano and Hebrok, 2010).



Şekil 2-1: Pankreas kanseri gelişim modeli (Hruban, 2000)

2.1.5. Desmoplazi

Desmoplazi, desmoplazik reaksiyon olarak isimlendirilen pankreas kanserinin temel karakteristiklerinden biridir. Ekstraselüler matriks proteinlerinin anlamlı düzeyde aşırı üretimi ve miyofibroblast-benzeri hücrelerin aşırı çoğalması sonucu hücresel ve hücresel olmayan bileşenlerden oluşan kalın ve fibröz bir dokunun oluşması olarak tanımlanır (Whatcott ve ark., 2012). Desmoplazinin hücresel bileşenleri yıldız hücre türevi miyofibroblast benzeri hücreler ve immün hücre tipleridir. Hücresel olmayan bileşenler ise kollajen 1, 2 ve 4, fibronektin, laminin, hiyaluronan ve glikoprotein osteonektin gibi ekstraselüler matriks proteinleridir (Apte ve ark., 1999).

Ekstraselüler matriks proteinlerinin üretiminin artması ve interstitiyal sıvı basıncının yükselmesi zayıf doku perfüzyonuna sebep olur. Bu durum ise fizyolojik kemorezistansa yol açar. Diop-Frimpong ve ark, anti-hipertansif ajan Losartan'ın kollajen düşürücü etkisi ile nanopartiküllerin penetrasyonunda anlamlı artış gerçekleştiğini

göstermişlerdir (Diop-Frimpong ve ark., 2011). Kollajen gibi dokunun hyaluronan içeriğinin de ilaçlarının perfüzyonuna etkisi söz konusudur. Hyaluronan yani bir diğer adıyla hyaluronik asit ekstraselüler matriks proteinleri ağının yapısal rijiditesine katkıda bulunur ve damarlardan dışarıya geçecek moleküller için adeta moleküler elek görevinde bulunur (Stern, 2004). Bu durum ise pankreas kanserinde kemoterapik ajanların bölgeye penetrasyonunu azaltır.

Desmoplazi, birçok hücre içi ve hücreler arası biyolojik sinyal olayları ile meydana gelmektedir. Olive ve ark transgenik farelerin pankreasında kendiliğinden gelişen tümörlerin transplante ksenograft tümörlere veya normal pankreas dokusuna göre zayıf damarlanmaya sahip olduğunu ve bu sebeple ilaç perfüzyonunun az olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan hedgehog inhibitörü artan perfüzyon ve azalan fibrozis ile kemoterapik ajan gemsitabinin terapötik etkisini artırmıştır (Olive ve ark., 2009).

2.1.6. Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm

Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) hücrelerin rijid yapılarından kaçarak uzak bölgelere yayılmasına izin veren gelişimsel bir prosestir (Lee ve ark., 2006; Thiery ve ark., 2009; Kalluri ve Weinberg, 2009). Hücreler EMD'e uğradıkça epitel özelliklerini, polaritelerini kaybederler ve E-kadherin down-regülasyona uğrar. Hücreler mezenkimal fenotip geliştirir, levha şeklinden çubuk şeklinde bir morfolojiye dönüşür, motilasyonları artar ve N-kadherin, fibronektin, vimentin gibi mezenkimal belirteçleri eksprese etmeye başlarlar (Thiery ve ark., 2009; Dangi-Garimella ve ark., 2012). İnsan pankreatik tümör örnekleri üzerine yapılan çalışmalarda fibronektin ve vimentinin yükseldiği ve E-kadherin ekspresyonunun azalmış olduğu gözlenmiştir. Bu hastaların daha az EMD kanıtı gösteren hastalara göre sağkalım oranlarının anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (Dangi-Garimella ve ark., 2012).

EMD'nin anahtar regülatörleri zinc finger transkripsiyon faktörleri Snail, Slug, Zeb1 ve Twist'tir. Bunlar epitel fenotipten sorumlu genleri baskırlar. Zeb1 ekspresyonun ileri tümör derecesi ve kötü sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Dangi-Garimella ve ark., 2012).

2.1.6.1. Pankreas Kansерinde EMD İndükleyici Faktörler

Moleküller

- **E-Kadherin**
 - Hücre adhezyonu ve hareketini düzenler.
 - Epitel hücre plastisitesini oluşturur ve stabilize eder.
 - Kansер invazyonunu baskılar (Lamouille, Xu ve Derynck, 2014).
- **Snail ailesi (Snail 1, Snail 2 ve Snail 3)**
 - E-Kadherin promötörünü baskılar.
 - EMD'yi indükler.
 - İmmünosupresyonu indükler.
 - Hücre proliferasyonunu artırır ve hücreleri ölüme karşı korur (de Herreros ve ark., 2010).
- **ZEB ailesi (ZEB1 ve ZEB2)**
 - E-Kadherin promötörünü baskılar.
 - EMD'yi indükler.
 - Kök hücreliği inhibe eden mikro RNA'ları baskılar (Abba ve ark., 2016).
- **bHLH ailesi (E47 ve TWIST)**
 - E-Kadherin promötörünü baskılar.
 - EMD'yi indükler.
 - Hücre döngüsünü, proliferasyonu ve sağkalımı regüle eder (Vesune ve ark., 2008).
- **HDACs**
 - E-Kadherin promötörünü baskılar.
 - EMD'yi indükler.
 - Kromatin yapısını modifiye eder (Serrano-Gomez, Maziveyi and Alahari, 2016).

Sinyal yolları

- **Ras**
 - Hücre sinyali ve tümör mikroçevresini regüle eder.
 - Tümör gelişimini ve ilerlemesini sürdürür
- **Notch**
 - Hücre farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptozisi regüle eder.
 - EMD'yi indükler (Wang ve ark., 2009).
- **Wnt**
 - Hücre farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptozisi regüle eder.
 - EMD'yi indükler (Morris, Wang ve Hebrok, 2010).
- **Hedgehog**
 - Embriyonik gelişimi, hücre rejenerasyonu ve kök hücre proliferasyonunu regüle eder.
 - EMD'yi indükler.

Faktörler

- **TGF- β**
 - EMD'yi indükler.
 - Hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisi regüle eder (Jiang ve ark., 2015).
- **PDGF**
 - Embriyonik gelişimi, hücre proliferasyonunu, hücre migrasyonunu, sağkalımını regüle eder.
 - EMD'yi indükler (Luo ve ark., 2012).
- **HGF**
 - Hücre büyümesini ve motilitesini regüle eder.
 - EMD'yi indükler (Jiang ve ark., 2015).

- **EGF**
 - Hücre büyümesini, proliferasyonunu ve farklılaşmasını regüle eder.
 - EMD'yi indükler (Luo ve ark., 2012).
- **MikroRNAlar**
 - Gen ekspresyonunu regüle eder.
 - Epigenetik programlar kurar.
 - EMD'yi etkiler (Jiang ve ark., 2015).
- **Stroma**
 - Mezenkimal özellikler sergiler.
 - Tümör mikroçevresini etkiler.

2.1.7. Tanı ve Tedavi

Tedavi cerrahi işlem, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve yatıştırıcı tedavi olmak üzere gruplandırılmaktadır.

Erken teşhis ve doğru derecelendirme cerrahi işlem uygulanarak tedavi sağlanabilmesi açısından oldukça önemlidir. Multidedektör CT (MDCT) pankreas kanseri teşhis ve derecesinin belirlenmesi için kullanılan temel görüntüleme tekniğidir. Bununla beraber glukoz analogu 2-deoksi-2[18F]-floro-D-glukoz (FDG) ile pozitron emisyon tomografisi de (PET) alternatif görüntüleme stratejileridir. FDG-PET, tüm vücudu değerlendirebilme ve kemik metastazları gibi durumları dedekte edebilme avantajı sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar FDG-PET yönteminin klinik kararlar açısından MDCT yöntemine göre anlamlı bir ilave veri vermediğini göstermiştir. Ancak her iki yöntemin birlikte kullanılması (FDG-PET/CT) daha fazla avantaj sağlayabilmektedir (Castellanos, Berlin ve Cardin, 2011).

Şu anda CT görüntüleme tanı ve tedaviye yanıtın izlenmesinde tercih edilen yöntemdir. Bu yöntemlerde kullanılacak biomarker hastalığın derecesine göre yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlayabilecek etkinlikte olmalıdır. Günümüzde en fazla çalışılan biomarker CA19-9 (karbonhidrat antijen 19-9)'dur. Koprowski ve ark tarafından 1979 yılında insan kolorektal kanser hücre serisinden monoklonal antikör kullanılarak izole

edilmiştir (Koprowski ve ark., 1981). İleri pankreas kanseri hastalarının %80'inde yüksek düzeyde bulunmaktadır (Wasan ve ark., 2009). Fakat, CA-19-9 hepatoselüler kanser, kolanjiokarsinom, gastrik, ovaryum ve kolorektal kanserde, akut kolanjit, siroz ve kolestatik hastalıklar gibi diğer malign ve benign koşullarda da yükselme göstermektedir. Fakat yine de pankreas kanseri hastalarında tanı ve prognostik potansiyeli ile önem arz etmektedir (Castellanos, Berlin ve Cardin, 2011).

Pankreas kanser tanısı konan hastaların yaklaşık %15-20'si için cerrahi çıkarım işlemi değerlendirilir. Cerrahi çıkarım işlemi tedavi potansiyeli sağlamasına rağmen 5 yıllık sağkalım %20'den azdır ve hastaların çoğunda hastalık tekrarlanır (Castellanos ve Merchant, 2013). Cerrahi çıkarım işleminde dahi mikroskobik sistemik yayılma görüldüğünden sağkalımı artırmak için adjuvan ve neoadjuvan tedaviye yönelik araştırmalara yönelim olmuştur.

Adjuvan tedavi, cerrahi işleme ek olarak yapılan radyasyon veya kemoterapi tedavisidir.

Neoadjuvan terapi ise, cerrahi işlem öncesinde tümörün çıkarılmasını kolaylaştırmak ve yayılmasını engellemek amacıyla uygulanan tedavi yöntemidir.

Yapılan histolojik çalışmalar ve klinik gözlemlerle invazif kanserin final oluşumundan önce adım adım prokürsör lezyonların gelişiminin olduğu gösterilmiştir. PanIN olarak isimlendirilen intraepitel neoplazi, PanIN-1 (PanIN-1A, PanIN1B), PanIN-2 ve PanIN-3 olarak 3 dereceye ayrılır (Şekil 2-1) (Gu D ve ark., 2016). Klinik olarak pankreas kanseri tümör boyutu, lenf nodları görünümü ve distal metastaza göre 4 aşamada değerlendirilir. Birinci ve ikinci aşama tümörler genellikle çıkarılabilir (rezektabl) veya sınırda çıkarılabilir olarak değerlendirilirken, bütün dördüncü aşama ve bazı üçüncü aşama tümörler rezektabl değildir (Wolfgang ve ark., 2013).

1985 yılında infüzyonel 5-Fluoro Urasil (5-FU) ile adjuvan kemoterapi avantajlarının Gastrointestinal Tümör çalışmasının (GITSG) yayınlanmasından beridir kemoterapi ve kemoradyasyon tedavilerinin değerlendirilmesi üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (Kaiser, 1985). 2004 yılında yayınlanan ESPAC-1 çalışmasında adjuvan kemoterapinin toplam sağkalım üzerine olumlu etkisi olduğu ve kemoradyasyonun sağkalımı düşürdüğü öne sürülmüştür (Neoptolemos ve ark., 2004).

2007 yılında Charite Onkologie (CONKO)-001 çalışması 6 ay boyunca 4-haftalık döngülerle 3 hafta 1,000 mg/m² uygulanan gemitabin ile sağlanan adjuvan kemoterapi etkisini göstermiştir (13.4 ay hastalıksız sağ kalım vs. 6.9 ay) (Oettle ve ark., 2013). Sonrasında RTOG 9704 çalışmasında kemoradyasyona ilave olarak cerrahi çıkarım işlemi gerçekleştirilen 451 pankreas kanseri hastasında 5-FU'a karşı gemitabin değerlendirilmiştir. Hastalar haftalık 1,000 mg/m² olmak üzere 3 ay boyunca gemitabin ve onu takip eden kemoradyasyon veya günlük 250 mg/m² olmak üzere 3 ay boyunca infüzyonel 5-FU ve kemoradyasyon almışlardır ve çalışma sonunda gemitabinin toplam sağkalımda anlamlı tedavi etkinliği sağladığı gösterilmiştir (Regine ve ark., 2011). Gemitabin'e dayalı adjuvan terapi sonrasında Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (EORTC)'nin gemitabin ile gemitabin ve eşzamanlı radyasyon tedavisini karşılaştırdığı faz 2 çalışmasında incelenmiştir ve iki grup arasında ortalama hastalıksız (progresyonsuz) sağkalım veya toplam sağkalım arasında bir fark görülmemiştir (Van Laethem ve ark., 2010). Yine bu çalışmayı takip eden ESPAC-2(v2), çoklu randomize faz 3 çalışmasında 5-FU'ya ve Gemitabin'e dayalı adjuvan tedavi karşılaştırılmış ve toplam sağkalım süresinde fark bulunmamıştır (23 ay-5 FU/FA grubu, 23.6 ay-GEM grubu) (Neoptolemos ve ark., 2010). Bu çalışmalara istinaden, rezektabl pankreas kanseri hastalarının gemitabin veya 5-FU adjuvan terapisinden fayda sağlarken, kemoradyasyonun faydası netleşmemiştir.

Tablo 2-2: Pankreas kanseri için adjuvan tedavi klinik çalışmaları

Çalışma adı	Yıl	Katılımcı sayısı	Faz	Tedavi	DFS (ay)	MS (ay)	Toplam Sağkalım %
GITSG	1985	49	2	Rad+5-FU Gözlem	11	20	2 yıl %42
ESPAC-1	2004	286	3	Rad+5-FU	RE	15.9	5 yıl %13
				Gözlem	RE	17.9	5 yıl %5
				5FU/FA	RE	20.1	5 yıl %11
				Gözlem	RE	15.5	5 yıl %7
CONKO-001	2007	368	3	GEM	13.4	22.1	5 yıl %14
				Gözlem	6.9	20.2	5 yıl %8
RTOG 9704	2008	451	3	5-FU>RAD>5-FU	RE	20.5	3 yıl %32
				GEM>RAD>GEM	RE	16.9	3 yıl %21
EORTC	2009	90	2	GEM	11	24	RE
				GEM>RAD>GEM	12	24	RE
ESPAC-2 (v2)	2012	2088	3	5-FU/FA	RE	23	RE
				GEM	RE	23.6	RE

Rad: Radyasyon RE: Rapor Edilmedi

Bevacizumab ve cetuximab gibi biyolojik ajanların gemsitabin ile kombine kullanılması da çalışılmıştır. RTOG 0848 faz 3 çalışmasında ise gemsitabin ile gemsitabin ve erlotinib kombinasyonu karşılaştırılmıştır (Chuong ve ark., 2014).

ESPAC-4 faz 3 çalışmasında gemsitabin ile gemsitabin + kapesitabin kombinasyonu karşılaştırılmıştır. Kapesitabin, 5-FU'nun oral ön ilacıdır. Ancak kombinasyon tedavisinin yalnızca gemsitabine göre daha etkili olmadığı görülmüştür (Castellanos, Berlin ve Cardin, 2011).

2.1.7.1. Antimetabolit Tedavisi

Bir oral floropirimidin olan Kapesitabin timidin fosforilaz tarafından vücutta 5-FU'a dönüşmektedir. Pankreas kanser hücrelerinde timidin fosforilaz enzim düzeyleri normal hücrelere nazaran daha yüksek olduğu için ilacın tümör hücrelerine seçici özellik gösterdiği düşünülmüştür (O'Neil ve McLeod, 2006). Bu sebeple, Kapesitabin hem monoterapi hem de kombinasyon tedavisinde değerlendirilmiştir. 42 hasta üzerine

yapılan faz 2 çalışmasında hastalar 3 haftalık sıklılarda 2,500 mg/m² dozda (2 hafta tedavi-1 hafta dinlenme) Kapesitabin almışlardır. Hastaların %7.3'ü parsiyel objektif cevap vermesine rağmen, %24 klinik yarar yanıtı gözlenmiştir. Hastalarda mide bulantısı, kusma, diyare ve el-ayak sendromu yan etkileri meydana gelmiştir (Cartwright ve ark., 2002).

Bu çalışmadan sonra gemitabin ve kapesitabin kombinasyonu üzerine yapılan faz 3 çalışmasında yalnızca gemitabine göre toplam sağ kalım üzerine anlamlı bir iyileşme görülmemiştir (Lee ve ark., 2017).

ACCORD-11 denemelerinin faz 3 çalışmalarında FOLFIRINOX tedavisi gemitabine göre çok daha iyi yanıt vermiştir. Metastatik pankreas kanseri hastaların toplam sağ kalım süresi artmıştır. FOLFIRINOX oksaliptin, leukovorin, irinotekan ve fluorourasilden oluşan bir kombinasyon tedavi rejimidir (Conroy, 2011).

2.1.7.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör İnhibitörleri ile Tedavi

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), erbB reseptör tirozin kinaz ailesine aittir. Ligand bağlanmasıyla, EGFR diğer erbB aile üyeleriyle homodimerize veya heterodimerize olur ve fosfoinositid-3-kinaz (PI-3K)/AKT ve mitojen-aktif protein (MAP) kinaz sinyal yollarını başlatır. EGFR aracılı hücre sinyalinin tümör proliferasyonunda, angiogeneste, metastazda ve apoptozisin gerçekleşmemesinde majör rol oynadığı gösterilmiştir. Pankreas kanserleri örneklerinin anlamlı bir miktarında EGFR mutasyonlarının overekspresyonu olduğu görülmüştür. (Luedke ve ark., 2012).

Erlotinib, bir tirozin kinaz inhibitörüdür ve birçok kemoterapik ajan ile kombinasyonu çalışılmıştır (Tablo 2-3).

Bir monoklonal antikor olan Cetuksimab, fare antikor ve insan immünoglobulininden oluşmaktadır. EGFR reseptörünün hücre dışındaki epitopuna bağlanarak bu reseptöre ligand bağlanmasını engeller ve sonrasında reseptörün degradasyonuna yol açar (Luedke ve ark., 2012). Philip ve ark tarafından 745 hasta üzerinde yürütülen klinik çalışmada yalnızca gemitabin tedavisine karşın gemitabin ve cetuksimab kombinasyonu karşılaştırılmış ancak toplam sağkalımda anlamlı bir fark görülmemiştir (Philip ve ark., 2010).

Tablo 2-3: Tirozin kinaz inhibitörleri ile yapılan bazı klinik çalışmalar

Çalışma yapan	Yıl	Katılımcı sayısı	Faz	Tedavi	Cevap oranı	PFS (ay)	Total Sağkalım (ay)
National Cancer Institute of Canada Trials Group*	2007	569	3	GEM+Placebo	%8	3.55	5.9
				GEM+Erlotinib	%8.6	3.75	6.2
Boeck ve ark	2010	279	3	Kapesitabin+Erlotinib	%5	RE	6.9
				GEM+Erlotinib	%13	RE	6.6
Philip ve ark	2010	745	3	GEM	%14	3.0	6.3
				GEM+Cetuximab	%12	3.4	5.9

- Bu zamana kadar yalnızca küçük bir molekül olan epidermal büyüme faktörü inhibitörü erlotinibin gemcitabin ile kombinasyonu onaylanmıştır.

2.1.7.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü İnhibitörleri ile Tedavi

Anjiogenezis, arter, ven ve kapiller embriyonik vasküler ağların meydana gelen morfolojik olaylar ile genişlemesidir. Yeni kan damarların oluşumu yara iyileşmesi, organ rejenerasyonu ve kadınlarda ovülasyon, menstruasyon ve plasenta gelişimi gibi biyolojik olaylarda meydana gelmektedir. Ancak bu olay, tümör büyümesi, romatoid artrit, diyabetik retinopati ve psöriasis gibi çeşitli patolojik proseslerde önemli bir faktördür (Mousa ve Mousa, 2010). Anjiogenezis, kan damarlarının gelişimi için oluşan stimulan proanjiogenik faktörler ile inhibitör antianjiogenik faktörler arasındaki fizyolojik denge ile sıkı şekilde kontrol edilir ve farklı büyüme faktörleri ve onlarla ilişkili reseptör tirozin kinazlar tarafından düzenlenir (Costache ve ark., 2015).

Anjioblast, yani embriyonik kan damarlarının endotelyumuna farklılaşan mezenkimal hücre demektir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) protein ailesi ve reseptörleri ise anjioblast farklılaşması ve tube oluşmasında en önemli doku faktörüdür (Crivellato, Nico ve Ribatti, 2007). Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör yolağının pankreas kanseri oluşmasında ve büyümesinde önemli bir role sahip olduğu ve

pankreas kanseri vakalarının önemli bir kısmında overeksprese olduğu gösterilmiştir (Korc, 2003).

Bazı monoklonal antikorlar ise tümör büyümesini promote eden bu faktörlere bağlanarak etkisini göstermektedir.

Bevasizumab, VEGF'ü hedefleyen ilk anjiogenezis inhibitörüdür ve kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından 2004 yılında onaylanmıştır. VEGF'in bütün izoformlarına bağlanarak anjiogenezi, tümör büyümesini ve proliferasyonu inhibe eder (Shih ve Lindley, 2006).

Tablo 2-4: Bevasizumab ile yapılan bazı klinik çalışmalar

Çalışma yapan	Yıl	Katılımcı sayısı	Faz	Tedavi	Cevap oranı	PFS (ay)	Total Sağ kalım (ay)
Kindler ve ark	2010	602	3	GEM+Plasebo	%10	2.9	5.9
				GEM+Beva	%13	3.8	5.8
Van Cutsem ve ark	2009	301	3	GEM+Erlo+Plasebo	%8.6	3.6	6.0
				GEM+Erlo+Beva	%13.5	4.6	7.1

Erlo: Erlotinib

Beva: Bevasizumab

2.1.7.4. GEM + Nab-Paklitaksel Tedavisi

Gemsitabin ile albümine nanopartikülüne bağlı paklitaksel (nab-paklitaksel) kombinasyonu, metastatik pankreas kanseri tedavisi için onaylanan en güncel “ilk seçenek tedavi opsiyonu” dur. Çözünürlüğü oldukça düşük olan paklitakselin nanoteknoloji sayesinde tümöre salımı sağlanabilmekte böylece biyoyararlanımı artmaktadır. Nab-paklitaksel'in pankreas stromal hücrelerine hücre içi alımının sağlanabilmesi için spesifik albümin-bağlayıcı proteinler gerekmektedir (Teague, Lim ve Wang-Gillam, 2015). Salgılanan asidik ve sisteince zengin protein (SPARC)'in spesifik albümin bağlayıcı bir protein olduğu düşünülmektedir (Infante ve ark., 2007). Nab-paklitakselin albümin kısmının bu proteine bağlanarak hücre içine girdiği öne sürülmektedir (Teague, Lim ve Wang-Gillam, 2015).

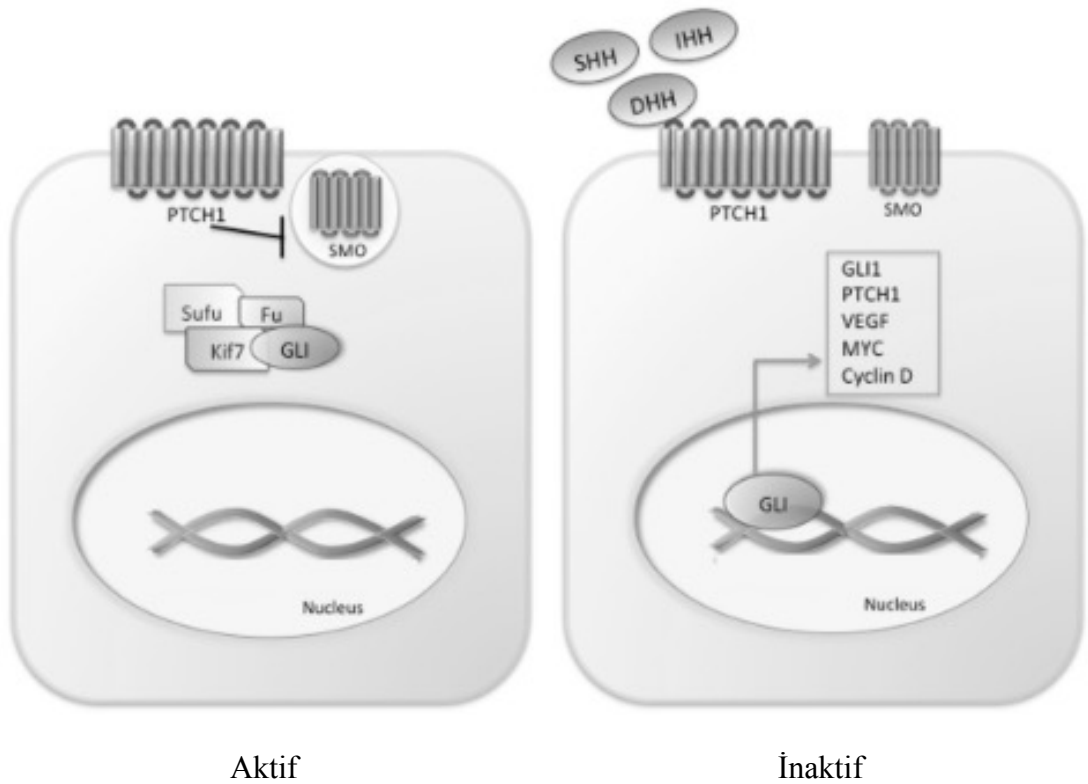
2.1.7.5. Hedgehog Yolağı Bileşenlerinin Hedeflenmesi

Tanımlanan ilk doğal Hh blokörü hayvanlarda gelişimsel anomaliye sebep olan Siklopamin'dir (Hanna ve Shevde, 2016). İlk olarak Beachy grubu Siklopamin'in Hh sinyali üzerine SMO'ya bağlanmasıyla inhibisyon edici etkisini ortaya çıkarmışlardır (Cooper, 1998). Fakat zayıf potensi sebebiyle KAAD-siklopamin gibi modifiye kimyasal türevlerinin sentezi gerekmiştir. SMO inhibisyonundan başka Gli proteinlerinin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonal aktiviteyi bloke eden GANT-58 ve GANT-61 gibi Hh inhibitörleri de temel araştırmalarda kullanılmak üzere tanımlanmıştır (Lauth ve ark., 2007). Bir monoklonal antikor olan 5E1 de SHH, IHH ve DHH'ın PTCH1 reseptörüne bağlanarak Hh yolağını inhibe etmektedir ve bu amaçla temel araştırmalar da kullanılmaktadır.

Klinik amaçlı kullanılmak üzere 2012 yılında FDA tarafından onaylanmış ilk Hh inhibitörü Vismodegib (Genentech)'dir ve Erivedge ticari ismiyle piyasada mevcuttur (Sandhiya ve ark., 2013). Bir diğer SMO antagonisti Erismodegib (Novartis) diğer ismiyle Sonidegib ve LDE-225 de bazal hücre karsinoma hastalarının tedavisi amacıyla FDA tarafından onaylanmıştır (Rimkus ve ark., 2016).

Farklı kanser türlerinin tedavisi için çeşitli Hh inhibitörleri son zamanlarda klinik çalışmalarda denenmiştir. Örneğin, Sonidegib ileri hepatoselüler karsinoması olan hastalarda, Paklitaksel ile kombinasyonu ise tekrarlayan overyum kanseri hastalarında denenmektedir (NCT02151864 ve NCT02195973 klinik çalışmaları). Yine bir başka ilaç Bortezomib (proteasome inhibitörü) multiple myeloma hastalarında denenmiştir. Dosetaksel ile kombinasyonu ise üçlü negatif meme kanseri hastalarında çalışılmaktadır. Bir başka SMO antagonisti Glasdegib bir diğer ismiyle PF-04449913 akut myeloid lökemi hastalarında test edilmektedir (Gutman ve ark., 2015). Hh inhibitörleri çok umut vadetmesine rağmen bazı klinik çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır. 2012 yılında Smo inhibitörü ile Saridegib ve Gempitabin kombinasyonunun pankreas kanseri hastalarında Faz II klinik çalışmalarını yapan Infinity Pharmaceuticals çalışmayı sonlandırmıştır. Çünkü bu kombinasyonla tedavi olan hastalar plasebo grubundan daha az sağ kalım göstermiştir. Bir başka klinik çalışmada metastatik pankreas kanseri hastaları üzerinde Vismodegib ve Gempitabin kombinasyonunu çalışılmıştır, fakat kombinasyon tedavisi ve yalnızca Gempitabin tedavisine göre Hh yolağı ekspresyonunda anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Metastatik kolorektal kanserinde hastalar Vismodegib,

Bevacizumab ve FOLFOX veya FOLFIRI (metastatik kolorektal kanseri için standart tedavi) ile tedavi uygulanmıştır fakat kombinasyon tedavisi hastaların sağ kalımına anlamlı bir katkı sağlamamıştır (Hanna ve Shevde, 2016). Hedgehog inhibitörleri etkili şekilde bazal hücre karsinomasını tedavi ederken, diğer tümör tiplerinin tedavisinde kullanımı ciddi risklere sahiptir. Bu sebeple hastalara klinik çalışma uygulanmadan önce Hh sinyal mekanizmaları her tümör tipi için spesifik olarak değerlendirilmelidir.



Şekil 2-2: Aktif ve inaktif Hedgehog sinyal mekanizması

Smo inhibitörleri

SMO, Hedgehog yolağı inhibitörlerinin geliştirilmesinde birincil hedef olarak belirlenmiştir. SMO inhibisyonu GLI transkripsiyon faktörlerinin downstream aktivasyonunu önleyerek kanser gelişimi ve progresyonu ile ilişkili genlerin baskılanmasına öncülük eder.

- **Siklopamin**

Siklopamin *V. californicum* dan izole edilmiş olan bir alkaloid olup SMO'ya kuvvetli bağlanma potansiyeli ile hedgehog sinyalini inhibe eder (Lee ve ark., 2014). Florosan Siklopamin türevleri kullanılarak yapılan bağlanma çalışmaları Siklopamin'in SMO'nun heptahelikal transmembran bölgesine bağlandığını göstermiştir (Chen ve ark., 2002). Pek çok fare ksenograft modelinde (insan ortotopik glioma, melonoma, kolon, pankreas ve prostat kanserleri) Siklopamin'in tümör büyümesi ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. İn vivo tümör büyümesini anlamlı derecede azaltmasına rağmen, kilo kaybı, dehidratasyon ve ölüm gibi güçlü yan etkilere sebep olduğu için siklopamin terapötik potansiyeline hiçbir zaman ulaşamamıştır (Kimura, Ng ve Curran, 2017).

- **GDC-0449 (Vismodegib/Erivedge)**

Vismodegib, Roche/Genentech/Curis tarafından yaratılan ikinci jenerasyon Siklopamin türevidir. GLI aktivasyonunu engellemek için doğrudan SMO'ya bağlanır. Ocak 2012 yılında Amerika Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından kanser tedavisi için ilk Hedgehog yolağı ilacı olarak onaylanmıştır. Günümüzde, metastatik bazal hücre karsinoması (BCC) veya cerrahi işlem veya radyasyon tedavisi için uygun aday olmayan tekrarlayan, lokal ileri BCC hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır (Sekulic, Migden ve Oro, 2012). Ayrıca monoterapi veya diğer kemoterapi ajanlarıyla kombinasyon halinde medulloblastoma, küçük hücre akciğer kanseri, metastatik pankreas kanseri, metastatik prostat kanseri, intrakranial meningioma, tekrarlayan glioblastoma ve akut miyeloid lösemi kanserleri üzerine klinik çalışmalar yürütülmektedir.

- **LDE-225 (Erismodegib/Sonidegib/Odomzo)**

Erismodegib, Novartis tarafından yaratılan oral kullanımı mümkün bir SMO antagonistidir. Hücre siklusu arresti (tutuklama-hapis) ve apoptozisi indükleyerek etkisini gösterir (Jalili ve ark., 2017). Glioblastoma, prostat kanseri ve renal hücre karsinoması gibi farklı kanser türlerinde invazif potansiyeli ve epitelyal-mezenkimal dönüşümü azaltmada etkili olduğu ve hem tümör epitel hücreleri hem de kanser kök hücreleri etkileyebildiği gösterilmiştir. Haziran 2015'te Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından cerrahi operasyon veya radyoterapi sonrasında hastalığı tekrarlayan lokal ileri bazal hücre karsinoması hastalarında veya cerrahi operasyon veya radyoterapi için uygun

olmayan hastaların tedavisi için onaylanmıştır. LDE-225 kanser hastalarının tedavisi için FDA'den onay alan ikinci Hedgehog inhibitörü olmuştur (Rimkus ve ark., 2016).

- **IPI-926 (Saridegib)**

Saridegib, Siklopamin'in ana yapısına kimyasal modifikasyon uygulanmasıyla oluşmuş bir moleküldür. Fare B837Tx medullablastoma allograftlarında Hedgehog sinyalini inhibe ederek tümör büyümesini engellemiştir. Gemsitabin ile birlikte verildiğinde ise artan anjiogenezis ile gemsitabinin tümöre ulaşımını artırmış ancak epitel tümör hücrelerine etki etmemiştir (Tremblay ve ark., 2009).

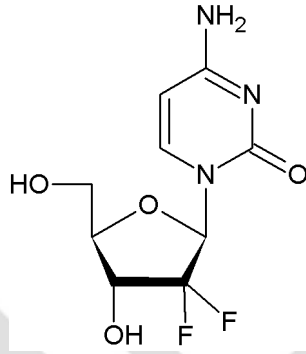
Tablo 2-5: Hedgehog inhibitörleri

Diğer SMO inhibitörleri
CUR61414
BMS-833923/XL139
PF-04449913 (Glasdegib)
PF-5274857
TAK-441
LY2940680 (Taladegib)
MRT-92
Jervine
GLI inhibitörleri
GANT türevleri
Arsenik Trioksit (ATO)
SHH inhibitörleri
RU-SKI 43
SHH Monoklonal Antikor 5E1

Bu tez çalışmasında bir antimetabolit olan Gemsitabin ve bir Hedgehog inhibitörü olan Vismodegib (GDC-0449) ilaçları kombinasyonu çalışılacaktır.

2.2. Çalışmada Kullanılan Etkin Maddeler

2.2.1. Gemsitabin



Şekil 2-3: Geminine'in moleküler yapısı

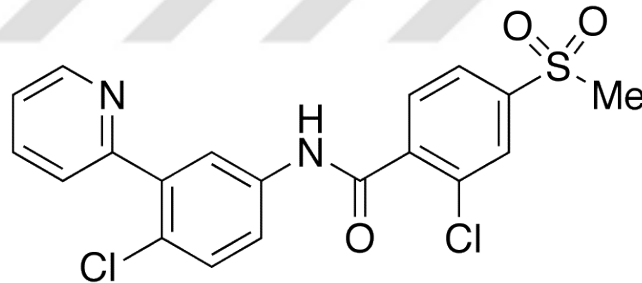
Geminine, 2-deoksi-2,2-diflorositidin, 263.2 g/mol ağırlığa sahiptir. Suda çözünürlüğü oldukça yüksektir. Metanolde çözünürlüğü azdır, etanol ve diğer polar organik çözücülerde ise hemen hemen çözünmez.

Geminine, lokal ve metastatik pankreas kanseri tedavisinde ilk sırada kullanılan en etkili kemoterapik ilaçlardan biridir. Antikanser aktivitesini DNA ve RNA'ya bağlanarak DNA sentezini inhibe etmekle gerçekleştirir. Geminine hücre döngüsünün S-fazına özgü deoksi-sitidin analogu bir antimetabolit olarak bilinmektedir. Etkinliğini gösterebilmesi için hücre içine alınması ve intraselüler fosforilasyona uğraması gerekmektedir (Mini, 2006). Human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) tarafından sodyum-bağımsız bir mekanizma ile hücre içine alınır ve deoksisitidin kinaz (dCK) tarafından monofosfat türevine (dFdCMP) ve sonrasında di- ve tri- fosfat türevlerine dönüştürülür (dFdCDP ve dFdCTP). Yapılan çalışmalarla geminine türevlerinin DNA'ya bağlanmasının hücre replikasyonunun önlenmesinde ve kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenmesinde önemli bir aşama olduğunu göstermiştir (Plukett ve ark., 1995). dFdCDP ribonükleotid redüktazı (RR) inhibe eder. RR ise DNA sentezi ve tamiri için gereken deoksiribonükleotidlerin üretimi için gerçekleştiren reaksiyonu katalize eden enzimdir. dFdCTP ise yanlış nükleosit gibi DNA'ya bağlanır, DNA polimerazı inhibe eder.

Gemcitabin farmakokinetik özellikleri sebebiyle bazı zorluklara sahiptir. Plazma sirkülasyon süresi oldukça kısadır. Kan, karaciğer, böbrek ve çeşitli tümör dokularında eksprese edilen deoksisitidin deaminaz (dCDA) enzimi tarafından inaktif ve çözünürlüğü daha fazla olan 2', 2'-difluorodeoksiüridin (dFdU) metabolitine dönüşür ve hızla renal ekstrasyona uğrayarak vücuttan atılır. Bu sebeple ilacın terapötik etkinlik gösterebilmesi için sık uygulanması gerekmekte ve bu da miyelosupresyon, karaciğer toksisitesi (hepatotoksiste), böbrek toksisitesi (renal toksiste) gibi çeşitli yan etkileri beraberinde getirmektedir (Mini, 2006).

2.2.2. Vismodegib (GDC-0449)

2-kloro-N-[4-kloro-3-piridin-2-yl-fenil]-4-metan-sülfonil benzamid diğer adıyla GDC-0449, 421.30 g/mol ağırlığa sahip SMO inhibitörüdür. İlk olarak 30 Ocak 2012'de Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından lokal ve metastatik bazal hücre karsinoması tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Vismodegib pH'ya bağımlı çözünürlük gösterir. pH 7'de 0.1 µg/mL çözünürlük gösterirken pH 1'de 0.99 mg/mL çözünürlüğe sahiptir (Felmer, 2012).



Şekil 2-4: Vismodegib (GDC-0449) molekül yapısı

Yapılan çalışmalar Sonic Hedgehog (SHH) sinyal yolağının pankreas kanserinde yeniden aktive olduğunu göstermiştir (Thayer ve ark., 2003). Bu sinyal yolağı tümör agresifliği, proliferasyonu ve invazyonunda aktif rol oynar. Bu sebeple SHH blokajı hastalığın ilerlemesinin ve metastatik yayılımının engellenmesinde önemli bir potansiyele sahiptir (Yauch ve ark., 2008).

SHH sinyal yolağı, sonik hedgehog, indian hedgehog veya desert hedgehog olarak da bilinen polipeptidin Patched reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Bu bağlanma Patched'in Smoothened üzerine olan inhibitör etkisini azaltır (Teglund ve Toftgard,

2010). Sonrasında, Smoothened hücrenin primer silium bölgesine yerleşir ve Smothened burada intraselüler pek çok basamağı aktive eder. Bütün bu olanlar sonucunda ise Gli ailesi transkripsiyon faktörü Gli2 aktivasyonu ve translokasyonu gerçekleşir (Scales ve de Sauvage, 2009). Gli2 çekirdeğe lokalize olur ve Gli1 gibi SHH hedef genlerinin transkripsiyonunu indükler (Nolan-Stevaux ve ark., 2009). Gli2, SHH sinyalinde kritik bir bileşendir ve inaktivasyonu SHH sinyalinin inhibisyonuna sebep olur. Gli transkripsiyon faktörleri çekirdekte hücrel proliferasyonu, sağ kalımı, kök hücreliği promote eden genleri aktive eder (Ingham, 2001).

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Konvansiyonel tedavinin kısıtlamaları

- Yeterli miktarın tümöral bölgeye ulaşamaması
- İlacın sağlıklı organ ve dokulara da ulaşması
- İmmün sistem depresyonu
- İlaçların kanda erken degradasyona uğraması
- Şiddetli yan etkiler

İlaç uygulama sonrasında meydana gelebilecek erken degradasyonu, normal hücrelerde ve dokularda gerçekleşebilecek istenmeyen yan etkileri engellemek, biyoyararlanımı ve patolojik bölgede birikecek ilaç fraksiyonunu artırmak için sentetik polimer, mikrokapsül, lipoprotein, lipozom, misel, niosom, lipid partiküller gibi çeşitli ilaç taşıyıcı ve hedeflendirme sistemleri geliştirilmiştir (Müller, 1991; Cohen ve Bernstein, 1996). Bu sistemler yavaşça biyobozunur, stimuli-reaktif veya çeşitli ligandların bağlanmasıyla hedeflendirilmiş olarak modifiye edilebilmektedir. İlaç taşıyıcılar kanda yeterli süre kalabilmelidir. Çünkü bu şekilde kanda gerekli olan terapötik düzey sağlanabilmektedir (Torchilin, 2006). Buna ek olarak tümör bölgesinde veya enflamasyonlu alanlardaki zayıf vaskülarizasyon olgusu olan artmış permeabilizasyon ve tutulum (EPR) etkisi ile yüksek molekül ağırlıklı ilaçların veya ilaç taşıyan mikropartiküller yavaşça patolojik bölgelerde birirmektedir (Maeda ve ark., 2000).

Küçük partikül boyutuna, yüksek yükleme kapasitesine, uzun sirkülasyon süresine sahip vücudun patolojik bölgelerinde birikecek biyoyumlu ve biyobozunur ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi önemlidir. Hidrofobik, suda az çözünen ilaçların

uygulanmasında bazı ciddi sorunlar görülmektedir. Öncelikle zayıf çözünürlük zayıf absorpsiyon ve biyoyararlanımla sonuçlanmaktadır. Bu durum özellikle oral uygulama sonrasında meydana gelmektedir (Lipinski ve ark., 2001). Bundan başka, suda çözünürlüğü düşük ilaçların intravenöz uygulama sonrasında kanda agregasyonu emboli gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir veya yüksek lokal ilaç konsantrasyonlarına sebep olarak lokal toksisiteye ve azalmış sistemik biyoyararlanıma sebep olabilmektedir (Fernandez ve ark., 2001). İlaçların zayıf çözünürlük problemini çözmek için formülasyonlarda bazı klinik olarak uygun organik çözücüler, Cremophor EL (polietoksil castor yağı) ve/veya belirli sürfaktanlar kullanılmaktadır. Eğer zayıf çözünen ilaç iyonize olabilen gruba sahipse tuz oluşturmak veya pH ayarlanması ile çözünmeyi kolaylaştırma bir başka yöntem olarak bilinmektedir (Kalepu ve Nekkanti, 2015).

Biyoyararlanımın artırılması için lipozom, mikroemülsiyon veya siklodekstrin kullanımı ise daha yeni yaklaşımlardandır. Fakat fazla miktarda solvan veya sürfaktan uygulamasını toksisiteye ve istenmeyen yan etkilere sebep olabilmektedir. Kosolvan veya sürfaktan kullanımının bir başka riski ise uygulama sonrası fizyolojik ortamda seyrelemeye uğramanın ardından meydana gelebilecek çökme tehlikesidir. Çünkü sürfaktanların kritik misel konsantrasyon değeri tipik olarak yüksektir ve bu değerin altında materyal çözünmesine yardımcı olamamaktadırlar. Lipozom ve siklodekstrinlerin kullanımı pek çok umut vaat eden sonuç vermesine rağmen ilaç yükleme kapasitelerinin az olması yeni arayışlara yol açmıştır (Torchilin, 2006).

2.4. Polimerik Miseller

Miseller boyutları 5-100 nm arasında kolloidal dispersiyonlardır. Belirli konsantrasyon ve sıcaklıkta amfifilik veya yüzey aktif maddelerin kendiliğinden oluşturduğu amfifilik kolloidal yapılardır (Dong ve Mumper, 2010). Düşük konsantrasyonlarda sulu bir ortamda bu tür amfifilik moleküller ayrı olarak yer alır. Fakat konsantrasyon yükseldikçe agregasyon meydana gelerek monomerik amfifillerden miseller yapılar ortaya çıkar. Bu konsantrasyon kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak adlandırılır (Gaucher ve ark., 2005). Amfifilik moleküllerin unimer veya agregat halinde bulunmaya başladıkları sıcaklık değeri ise kritik misel sıcaklığı olarak isimlendirilir (Kulthe ve ark., 2012). Misel oluşumuyla hidrofobik fragmentler sulu ortamdan uzaklaşır, sistemin serbest enerjisi düşer ve sulu ortamla yeniden hidrojen

bağları kurulmaya başlar (Kulthe ve ark., 2012). Oluşan misellerin çekirdek kısmında ise Van der Waals bağları oluşur. Amfifilik moleküllerin hidrofobik fragmentleri misel çekirdeğini, hidrofobik fragmentleri ise misel kabuk kısmını oluşturur. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında ise suda çözünürlüğü zayıf olan nonpolar ilaç molekülleri misel sisteminin çekirdek kısmında çözünür. Polar moleküller misel yüzeyinde adsorbe olabilirken orta derecede polarite gösteren moleküller ara pozisyonunda uzanırlar (Mu, Elbayoumi ve Torchilin, 2005; Sawant, Sawant ve Torchilin, 2008; Zhang, Tan ve Feng, 2012).

Son yıllarda düşük çözünürlüğe sahip ilaçların amfifilik kopolimerlerden hazırlanan miseller ile çözünürlüğünün sağlanması dikkat çekmektedir. Bu blok kopolimerlerin hidrofilik monomer ünitesi uzunluğu yaklaşık olarak hidrofobik monomer ünitesi uzunluğu kadardır. Eğer hidrofilik blok uzunluğu çok fazlaysa kopolimerler sulu ortamda unimerler halinde yani her biri ayrı bir molekül olacak şekilde dağılırlar. Uzun hidrofobik bloğa sahip olanlar ise çubuk veya lamellar şeklindeki misel olmayan morfolojiye sahip yapılar oluştururlar. Farklı hidrofobisiteye sahip monomer üniteleri birbirine konjuge olarak A-B tipi veya A-B-A tipi kopolimerleri meydana getirebilir. Konvansiyonel deterjanlardan oluşan misellere benzer şekilde polimerik miseller de hidrofilik zincirlerden oluşan kabuk kısmın hidrofobik blokların oluşturduğu çekirdek kısmı stabilize etmesiyle oluşur. Polimerik miseller düşük CMC değerine sahip konvansiyonel deterjanlardan oluşan misellere göre daha iyi stabilite göstermektedir. Çünkü bu amfifilik kopolimerlerin CMC değerleri 10^{-6} M kadar düşüktür (Kulthe ve ark., 2012). Bu değer Tween 80 gibi sürfaktanların CMC değeriyle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Farmasötik misellerin çekirdek kompartmanı yüksek yükleme kapasitesi gösterebilmeli, kontrollü salım sağlayabilmeli ve çekirdek oluşumunu sağlayan polimer bloğu ile ilaç molekülü arasında iyi bir uyum bulunmalıdır. Kabuk kısmı ise etkili sterik korumayı sağlar ve misel hidrofilitatesini, yükünü belirler; eğer herhangi bir reaktif gruba sahipse olası modifikasyonlar için kullanılabilir. Bütün bu temel özellikler misel taşıyıcıların farmakokinetiği, biyodağılımı, biyouyumluluğu, sürekliliğini, biyomakromoleküllerin yüzeye adsorpsiyonu, biyolojik yüzeylere adsorpsiyonu ve hedeflenebilirliği önemli biyolojik karakteristiklerini kontrol eder.

2.4.1. Misellere İlaç Yüklenmesi

Misellere ilaç yüklenmesi –çözündürülmesi- misel çekirdeğinden su moleküllerinin yer değiştirmesiyle çözünmüş ilacın misel çekirdeğinde birikmesi olarak tanımlanabilir.

Misellere ilaç çeşitli yollar ile yüklenebilir. Sıklıkla kullanılan yöntemler aşağıda verilmiştir (Rapoport, 2007).

2.4.1.1. Diyaliz:

Kopolimer ve yüklenecek etkin madde DMF ve ya DMSO gibi suda karışması mümkün bir organik çözücünde çözündürülür. Bir diyaliz tübüne yerleştirilir ve suya karşı diyaliz işlemi gerçekleştirilir. Bu durumda organik çözücü su ile yer değiştirir, aynı zamanda dış ortamda su belirli zaman aralıklarında yenilenir, böylece organik çözücü ile su yer değiştirmesinin devamlılığı sağlanır. Su içeri girdikçe hidrofobik blok ilacı iç bölgesine alacak şekilde misel oluşturur. Yarı geçirgen zar sayesinde oluşan miseller dışarı çıkamaz, ayrıca ortamdaki misellere yüklenmemiş serbest ilaç da dışarıya atılır.

2.4.1.2. Çözücü Buharlaştırma Metodu

İlaç ve polimer iyi bir organik çözücünde çözündürüldükten sonra organik çözücü rotavapor aracılığı ile uçurulur, böylece vial etrafında film oluşturulur. Sulu faz eklenerek voktekslenir ve miseller oluşur. Serbest ilaç santrifüj ile veya diyaliz ile uzaklaştırılır.

2.4.1.3. Su İçinde Yağ Emülsiyon Metodu

Polimer ve ilaç su ile karışmayacak organik bir çözücünde çözündürülür. Organik faz sulu faza eklenir, sonikasyon işlemi ile emülsiyon oluşturulur. Organik faz rotavaporda uçurulur.

2.4.1.4. Dondurarak Kurutma (liyofilizasyon) Metodu

Polimer ve ilaç liyofilizasyona uygun bir organik çözücünde çözülür. Çözelti su ile karıştırılır, liyofilize edilir ve sonradan sulu faz eklenerek yeniden oluşturulur.

2.4.2. Pasif Hedeflendirme ve Miseller İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kanda kalış süresinin uzunluğu nanopartiküler ilaç salım sistemlerinin pasif veya aktif hedeflendirilmesinde anahtar parametredir. İlaçlara ve ilaç taşıyıcıların çeşitli

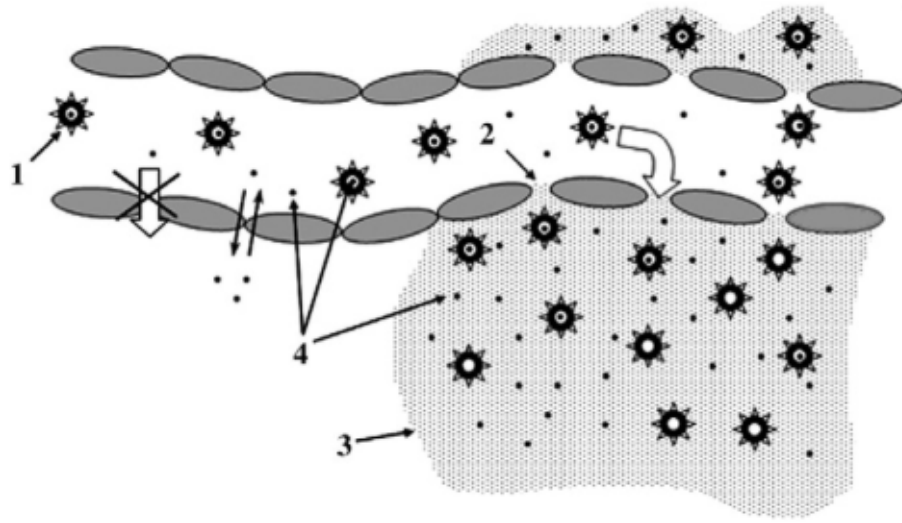
sentetik polimerlerle kimyasal modifikasyonu in vivo kalış süresini uzatmak için sık kullanılan bir yöntemdir. Bu alanda en popüler ve başarılı metot nanotaşıyıcıyı hidrofilik ve fleksibl polimerle kaplamaktır ve temelde poli(etilen glikol) kullanılmaktadır. Biyolojik boyutta nanopartiküllerin PEG ile kaplanması kan bileşenleri ile etkileşimlerini sterik olarak engellemektedir. Bu sayede ilaç taşıyıcı sistemin opsoninler ile etkileşimi engellenir ve RES tarafından yakalanması yavaşlar. PEG ile opsonizasyonun engellenmesi PEG'in yüzey yükünü kapaması, yüzey hidrofilisitesini artırması, polimer kaplı nanopartiküller ve kan bileşenleri arasındaki itici etkileşimi artırması ve partikül yüzeyinde polimerik bir tabaka oluşturması mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir (Torchilin, 2010). Nanopartiküler ilaç taşıyıcılara sterik koruyucu olarak oldukça az polimer denenmiştir ve araştırmalar çoğunlukla çeşitli avantajları sayesinde PEG üzerinde denenmiştir. Bu avantajlar aşağıda verilmiştir: (Jokerst ve ark., 2011)

- PEG sulu çözeltilerde oldukça iyi bir çözünürlük gösterir.
- Çok fazla sayıda su molekülüne bağlanabilir.
- Polimer zinciri yüksek fleksibilitateye sahiptir.
- Düşük toksisite, immünogenisite ve antijenisite gösterir.
- RES hücrelerinde birikimi olmaz.
- Modifiye edilmiş farmasötiklerin biyolojik özellikleri üzerinde minimum etki gösterir.

PEG biyobozunur değildir ve bu sebeple toksik metabolitler oluşturmaz. Öte yandan, molekül ağırlığı 40 kDa'dan küçük olan PEG molekülleri vücutta böbrekler tarafından ekskrete edilir. Farklı molekül ağırlığındaki PEG molekülleri ticari ürün olarak piyasada bulunmaktadır. İlaç ve ilaç taşıyıcı sistemelerin modifikasyonunda kullanılan PEG molekülleri ağırlığı genel olarak 1,000 ile 20,000 Da arasındadır. Yalnızca bir ucu reaktif olan PEG türevleri kullanılarak çapraz bağlanmış agregatlar ve heterojenik ürünlerin oluşumu engellebilir.

Artmış geçirgenlik ve retansiyon (EPR) etkisi ile miseller ve diğer farmasötik nanotaşıyıcılar hedef bölgelerde birikme sağlayabilmektedir. İlaç yüklü misellerin uzun süre sirkülasyonda kalabilmeleri EPR etkisi ile hedef bölgede birikimi kolaylaştırmaktadır (Gullotti ve Yeo, 2009). EPR etkisi ile polimerik misellerin solid tümörlere pasif hedeflendirilebileceği ilk olarak 1980'lerde Maeda ve ark. tarafından

yapılmıştır (Matsumura and Maeda, 1986). Solid tümörlerde yapılan patolojik, farmakolojik ve biyokimyasal çalışmalar bu tümörlerin hipervasküler, vasküler mimarisi tamamlanmamış, vasküler permeabilite faktörleri sekresyonu ile ekstrasvazasyon halinde ve olgunlaşmamış lenfatik kapiller içerdiğini göstermiştir. Tümör damarları yüksek oranda proliferatif endotel hücreleri, artmış kıvrımlılık, perisit eksikliği ve artmış basement membran oluşumuyla karakterizedir ve bu özellikler ile tümörün oksijen ve besin ihtiyacı karşılanmaktadır. Bu karakteristikler aynı zamanda tümör kan damarlarının neden makromoleküllere geçirgen olduğunu açıklamaktadır. Olgunlaşmamış lenfatik kapiller sebebiyle tümör lenfatik drenaj sistemi de etkili bir şekilde aktivite göstermemektedir. Bu sebeple makromoleküller seçici olarak tümör interstitiumunda uzun süre tutulmaktadır. Bu sebeple, yapılan çok sayıda çalışma EPR etkisinin makromoleküllerin ve nanopartiküllerin solid tümör bölgesinde pasif birikimini sağladığını göstermiştir. Bu sayede farmasötiklerin terapötik etkinliği artırılarak, olası yan etkiler azaltılabilmektedir. Çoğu insan tümöründe damarlanma por çapı 200 ile 600 nm arasında değişmektedir bu da pasif hedeflendirmeyi mümkün kılmaktadır. Tümör dokusundaki nitrik oksit, prostoglandinler, bradikinin ve temel fibroblast büyüme faktörleri ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi vasküler permeabiliteyi artıran genlerin overekspresyonu ile tümör mikrovasküleritesi hiperpermeabilitesi sağlanmaktadır. Fakat tümör damarlarının vasküleritesi gelişim süresince, tümör tipine göre ve tümörün anatomik konumuna göre farklılık gösterir. Polimerik nanopartiküllerin ekstrasvazasyonu da kullanılan polimerin fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir (Yin ve ark., 2014).



Şekil 2-5: Artmış permeabilite ve retansiyon etkisi. Uzun süre sirküle halinde polimerik miseller (1) zayıf patalojik vasküler (2) solid tümör (3) salınan serbest ilaç (4).

Miseller boyutlarının küçük olması sebebiyle de tümör hedefine ilaç salımı bakımından avantaj sağlamaktadırlar. PEG-PE miselleri ile yapılan çalışmada misel formülasyonlarının uzun süre kanda kaldığı gösterilmiştir. PEG bloğunun molekül ağırlığına göre formülasyonun fare, sıçan ve tavşanlardaki yarı ömrü 1.2-2 saat olarak bulunmuştur. PEG bloğunun boyutunun artmasıyla misel sirkülasyon süresinin arttığı ve bunun sebebinin misellerin hidrofobik çekirdeğine opsonin penetrasyonuna karşı sterik korumanın daha etkili olduğu bulunmuştur (Lukyanov ve ark., 2002).

2.4.3. Kanser Tedavisinde Polimerik Misellerin Terapötik Uygulamaları

2.4.3.1. Pluronikler (Pluronics®)

Pluronikler, poloksamerler olarak da bilinen amfifilik, noniyonik blok kopolimerlerdir. A-B-A yapısında, hidrofobik propilen oksit (PO) fragmentleri ve hidrofilik etilen oksit (EO) dallarından oluşur. Poloksamerler merkezde hidrofobik çekirdeği oluşturan poli(propilen oksit) (PPO) ile ondan iki yana ayrılarak hidrofilik koronayı oluşturan iki hidrofilik poli (etilen oksit) (PEO) ten oluşur. Yapısı (PEO)_a-(PPO)_b-(PEO)_a şeklinde gösterilebilir (Rowe ve ark., 2006).

Stabilite problemleri ve agregat oluşturmaya eğilimli olmalarına rağmen çoklu ilaç direncine karşı önemli terapötik özellikleri ile antikanser ilaçların salımı için öne çıkan bir polimerdir (Biswas ve ark., 2016).

2.4.3.2. PEG-PLA

Poli (laktik) asit (PLA), Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından onaylı, biyobozunur bir polimerdir. PLA, zayıf hidrofiliktir ancak kopolimerizasyon ile hidrofilisitesi, degradasyon hızı, kristalizasyon ve stealth özelliği iyileşmiştir. PEG-PLA diblok kopolimeri su içinden kendiliğinden 10-100 nm boyutlarında miselleri oluşturur (Letchford ve Burt, 2007).

Klinik kullanımı onaylanan Genexol-PM paklitakselin mPEG-PLA miselleridir.

Gemsitabin stearyl grubu ile modifiye edilerek hidrofobik ön ilaç formu hazırlanarak (GemC18) PEG-PLA misellerine yüklenerek gemsitabine dirençli hücrelere uygulanmıştır. GemC18 yüklü miseller gemsitabine dirençli AsPC-1 hücrelerinin canlılığını etkili olarak azaltabilmişlerdir (Daman ve ark., 2014).

2.4.3.3. PEG-PCL

PEG ile poli (kaprolakton) (PEG-PCL), amfifilik poliester polimerlerin bir başka sınıfıdır ve antikanser ilaçların enkapsülasyonda yaygınca kullanılmaktadır. Sentezlenmesi kolay olan PEG-PCL amfifilik polimeri uygun biyouyumluluk, biyobozunurluk ve düşük toksisite sergilemektedir (Danafar, 2016).

2.4.3.4. PEG-lipid

PEG-lipid kopolimerleri diğer diblok kopolimerinde olduğu gibi hidrofilik PEG grubu ve hidrofobik kısım olarak hidrofobik polimer bloğu yerine lipidden oluşmaktadır. Lipidlerin açıl zincirleri misellerin hidrofobik çekirdeğini oluşturur ve bu bölgeye çözünürlüğü zayıf terapötik ajanların enkapsülasyonu gerçekleşir. En yaygın olarak kullanılan PEG-lipid miseli polietilen glikol-fosfatidiletanolamin (PEG-PE) miselleridir. Dispersiyon ve diyaliz metodlarıyla PEG-PE misellerine ilaç yüklemesi gerçekleştirilmektedir (Biswas ve ark., 2016).

PEG ve fosfatidiletanolamin gibi diaçil lipidlerinden oluşan misellerin hidrokarbon zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimler sayesinde stabiliteleri daha iyidir.

2.4.3.5. PEG-PLGA

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), geliştirilen başarılı biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerden biridir. Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından farmasötik formülasyonlarda ilaç salım sistemi olarak kullanımına onay verilmiştir. Fakat PLGA nanopartikülleri mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından hızla klirens uğramaktadır. Nanopartikülleri PEG gibi bir hidrofilik polimer ile kaplamak partiküller sterik olarak stabilize edilerek, MPS tarafından tanınmaları engellenebilir. Böylece uzayan yarı ömürle plazmada sirkülasyon süreleri uzayabilir.

PLGA'nın biyolojik sistemde hidrolize olmasıyla monomerler laktik asit ve glikolik asit metabolit olarak oluşur. Her iki monomer de kolaylıkla metabolize olabilen endojen moleküllerdir. Bu sebeple de minimum sistemik toksisite göstermektedir. PLGA polimerleri biyolojik sistemde birkaç aydan yıllara kadar bozunabilen farklı molekül ağırlıklarında ve bileşimde ticari olarak mevcuttur.

Opsonin proteinlerinin nanopartikül yüzeyine yapışmasını ve retikülo endotelial sistem hücreleri tarafından tanınmasının engellenmesi için nanopartiküller PEG, kitozan veya poloksamerler gibi hidrofilik polimerler kaplanmıştır. PEG kaplama en yaygın olarak kullanıldır ve mPEG-PLGA paklitaksel, doksorubisin ve kurkumin gibi oldukça potent antikanser ilaçlar için ilaç salım sistemi olarak kullanılmıştır.

2.4.3.6. PEG-poli(amino asit)

PEG-poli(amino asit) (PEG-PAA) blok kopolimer misellerinde hidrofobik çekirdeği polimerize amino asitler oluşturur. Bu kapsamda en çok kullanılan amino asitler lizin, aspartik asit, glutamik asit ve histidindir. Aminoasitleri hidrofobik çekirdek olarak kullanmanın avantajı biyobozunur ve biyouyumlu özellik göstermeleridir. Poli(amino asit) degradasyon ile doğal olarak meydana gelen aminoasitleri oluşturur. Bir diğer avantajı PAA'nın terminal aminoasit grupları sayesinde kolaylıkla fonksiyolize edilebilmesidir. PAA'daki fonksiyonel gruplar ilaç moleküllerinin hidrofobik çekirdeğe konjuge edilmesinde avantaj sağlar.

PAA'ya konjuge edilen hidrofilik grup genellikle PEG'dir. PEG, hidrofilik ve biyouyumlu bir polimerdir ve yüksek çözünürlüğü, zincir fleksibilitesi, immünojenik olmaması gibi avantajları ile farmasötik endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.4.3.7. Uyarıya Duyarlı Polimerik Miseller

- pH-hassas polimerik miseller

pH hassas amfifilik polimerler genellikle destabilizasyonlarını kolaylaştıracak iyonik bloktan veya tümör bölgesindeki düşük pH'da degradasyonlarını kolaylaştıracak asit labil bağdan oluşur. İyonik polimerler arasında, karboksilik asit grubu içeren anyonik polimerler en sıklıkla kullanılan pH-hassas polimerlerdir. Poli (akrilik asit) (PAA) ve poli (metakrilik asit) (PMA) polimerleri her bir monomer ünitesinde karboksilik asit grubu içerir ve iyonik polimerlere örnektir. Düşük pH da karboksilik asit grupları protonlanır ve polimer noniyonik olur. Bu durum sonucu oluşan noniyonik polimer, iyonik polimere göre daha hidrofobiktir. Polimer karakteristikteki bu değişiklik misel agregasyonunu başlatan hidrofobik/hidrofilik faz değişimine neden olur.

- Redüksiyon-hassas polimerik miseller

- Sıcaklık-hassas polimerik miseller

2.4.4. Misellerin Hücre İçi Akıbeti

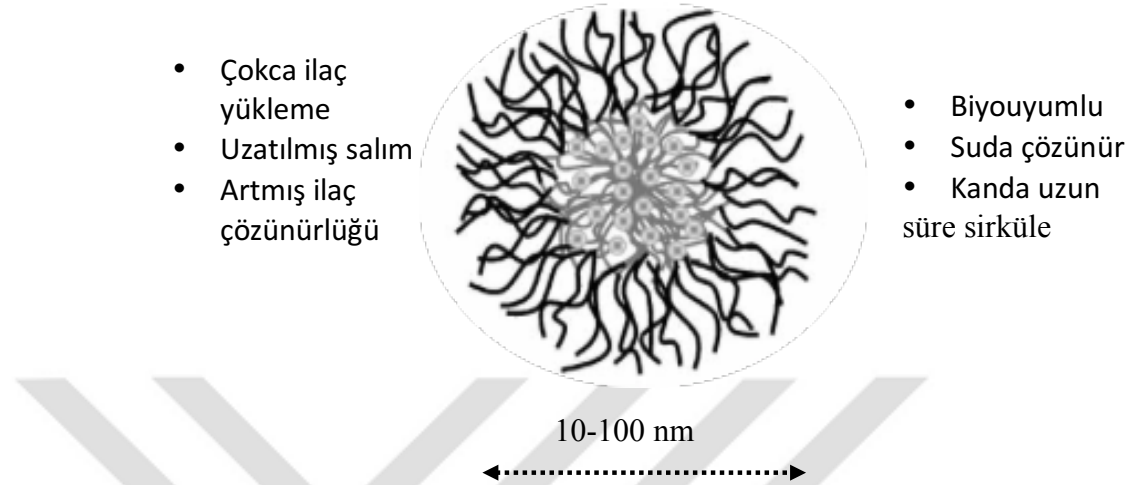
Çalışmalar misellerin internalizasyonunun temel olarak endositosis ile gerçekleştiğini göstermektedir fakat mekanistik detaylar için hala ayrıntılı inceleme gerekmektedir. Misellerin internalizasyonu zaman, enerji, sıcaklık ve konsantrasyona bağımlı bir süreçtir ve klatrin aracılı endositosis ile gerçekleşmektedir (Jhaveri ve Torchilin, 2014).

Miseller sistemler vücuda verildikten sonra ilaç miseller yapıdan salınarak serbest hale geçebilir ve hücre membranından difüzyon ile geçebilir. Yahut, miseller hücre dışı sıvıda bozulup ilacı saldıktan sonra, ilaç difüzyon ile hücre membranından geçebilir. Ya da miseller doğrudan hücre içine alınır, lizozoma geçerler. Buradan ya ilacı serbest halde sitoplazmaya difüze ederler ya da lizozomda misel yapısı parçalanır ve serbest ilaç sitoplazmaya geçer.

Unimerler, kullanılan blok kopolimer türleri ve çalışmalar için kullanılan hücre kültürü misellerin internalizasyonunu ve hücrelerle etkileşimini doğrudan etkilemektedir.

Pluronic miselleri bugüne kadar misel taşıyıcı sistemlerle ilgili yapılan çalışmalarda en çok kullanılan blok kopolimerlerdir. Pluronic blok kopolimerlerinin

hücrelerle etkileşimi P-gp ilaç efflux transporterlarının inhibisyonunu ve çoklu ilaç direncini eksprese eden hücrelerinde enerji eksilmesini içerir.



Şekil 2-6: Misel ilaç taşıyıcı sistem avantajları

2.5. Hücre Kültürü Yöntemleri

Hücre kültürünün temel tanımı hücrelerin bir hayvandan veya bitkiden alınarak uygun suni bir ortamda büyütülmesidir. Hücreler doğrudan bir dokudan alınarak kültüre etmeden önce enzimatik veya mekanik yolla da disagrage edilebilir. Yahut hücreler doğrudan bir hücre serisinden veya hücre zincirinden elde edilebilir.

Primer kültür, hücrelerin dokudan izole edildikten sonra uygun koşullarda proliferasyon sağlayarak tüm ortamda doyumluk sağladığındaki aşamasıdır. Bu aşamada hücreler pasajlanmalıdır, yeni bir büyüme ortamına aktarılmalı, besiyeri ile uygun koşullarda büyüme sağlanmalıdır.

Hücre hattı, ilk pasajlamadan sonra primer kültürler hücre hattı olarak isimlendirilir. Primer kültürlerden elde edilen hücre hatları belirli bir yaşam süresine sahiptir. Hücrelere pasaj uygulandıkça en fazla büyüme kapasitesine sahip olan hücreler galip gelir ve popülasyonda genotipik ve fenotipik tekdüzelik sağlanır.

Hücre zinciri, eğer bir hücre hattı subpopülasyonu klonlamayla yada başka bir metolla bir kültürden pozitif olarak seçilirse bu hücre hattı hücre zinciri olarak isimlendirilir.

2.5.1. Hücre Kültürü Yönteminin Avantajları

- Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit basıncı gibi fizikokimyasal koşulların canlı ortama göre daha iyi kontrol edilmesi,
- Homojen koşulların kontrol altına alınabilmesi
- İlaçların hücre permeabilitesi hızlı değerlendirilebilme imkanı
- İlaçların emilim mekanizmasının tanımlanabilmesi
- İlaç emilim artırma yöntemlerinin (ön ilaç, absorpsiyon artırıcı maddelerin kullanımı veya diğer farmasötik yaklaşımlar kullanılması) hızlı değendirilebilme imkanı
- İlaç veya polimerlerin sitotoksik özelliklerinin değerlendirilmesi
- Hayvan deneylerinde karşılaşılan yasal, ahlaki ve etik problemlerden kaçınılabilişmesi

2.5.2. Hücre Kültürü Yönteminin Sakıncaları

- Tecrübe gerektiriyor olması
- Kontaminasyona yatkınlık, bu sebeple aseptik şartlarda çalışılması ve sterilitenin sağlanması zorunluluğu
- Olası stabilite problemleri

2.5.3. Hücre Kültürü Kullanım Alanları

Hücre kültürü kullanım alanları şu şekilde sıralabilir (Khaw, 2001; Khaw, 1998; Shah, 2006).

- Hormonlar, sitokinler, enzimler, antikorlar ve aşılar gibi çeşitli terapötik ve profilaktik protein ürünlerinin üretimi
- Sitotoksikite değerlendirme çalışmaları
- Kök hücre çalışmaları
- İlaçların permeasyonunun ve metabolizmasının değerlendirilme çalışmaları
- Doku mühendisliği

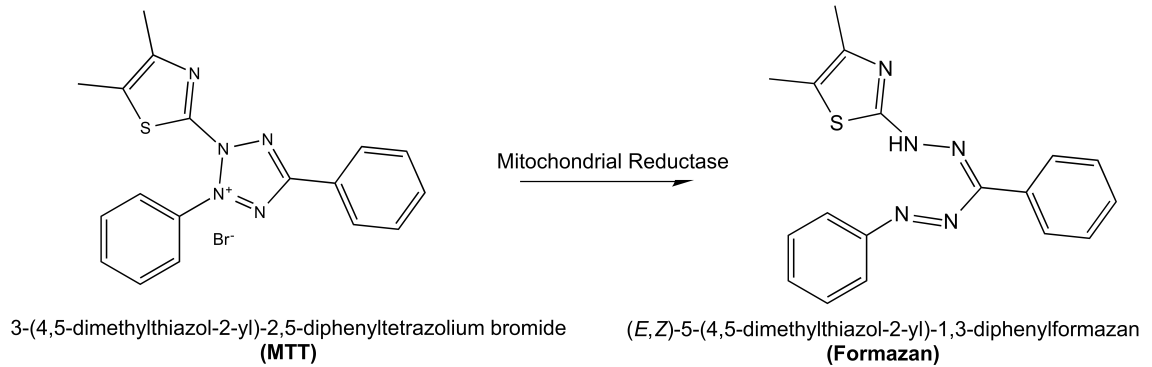
2.5.4. Hücre Canlılığı Değerlendirme Çalışmaları

2.5.4.1. Tetrazolium İndirgeme Deneyleri

Canlı hücrelerin dedekte edilebilmesi için çeşitli tetrazolium tuzları kullanılmaktadır. En sık kullanılan bileşikler MTT, MTS, XTT ve WST-1'dir. Bu bileşikler iki temel katagoriye ayrılır: 1) Pozitif yüklü ve ökaryotik canlı hücelere penetre olabilen MTT ve 2) MTS, XTT ve WST-1 gibi negatif yüklü ve doğrudan hücelere penetre olmayan bileşenlerdir. İkinci sınıf sıklıkla bir aracı elektron alıcı ile birlikte kullanılır. Bu elektron alıcı sayesinde sitoplazma veya plazma membranından elektronlar alınarak tetrazolyumun indirgenerek renkli formazan ürününe dönüşmesi sağlanmaktadır (Riss ve ark., 2013).

2.5.4.2. MTT Tetrazolium Deneyi Konsepti

MTT deneyi hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendirmek üzere yapılan kolorimetrik bir çalışmadır. NAD(P)H-bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri belirli koşullar altında mevcut canlı hücrelerin sayısını yansıtabilmektedir. Bu enzimler ise tetrazolium tuzu olan MTT'yi diğer ismiyle 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid'i indirgeyerek çözünmeyen ve mor renge sahip formazan bileşiğine dönüştürmektedir.



Şekil 2-7: MTT'nin mitokondriyal redüktaz enzimi ile formazan kristaline indirgenmesi

MTT çalışması, MTT bileşiği ışığa hassas olduğu için genellikle karanlık ortamda yürütülür. Formazan kristalleri oluştuktan sonra bu kristaller dimetil sülfoksit, asitli etanol çözeltisi veya hidroklorik asit içindeki sodyum dodesil sülfat gibi bir çözücünde çözünür ve renkli bir çözeltiye dönüşür. Bu renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometre

ile belirli bir dalgaboyunda ölçülerek kantitatif tayin sağlanabilir. Ölçümün yapılması gereken dalgaboyu ise genellikle 500-600 nm kadardır.

2.5.4.3. Hemositometre ile Hücre Sayımı

- Kullanmaya başlanmadan önce hemositometre alkol ile temizlenir.
- Hücre süspansiyonundan 500 µl alınır ve bir ependorfa aktarılır.
- Burdan 100 µl alınır ve üzerine 100 µl %0.4 Tripan mavisi eklenir ve hafifçe karıştırılır.
- Burdan 10 µl alınarak hemositometreye uygulanır ve mikroskopta gözlenir.
- Tripan mavisi ile boyanmamış hücreler (canlı hücreler) sayılır.
- 16 karelik herbir alan sayılır ve ortalaması alınır.
- 10^4 ile çarpılır.
- Yapılan seyreltmeye göre 100 ile çarpılır.

2.6. Protein Ekspresyonu Değerlendirmesi için Kullanılan Yöntemler

2.6.1. BCA Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein miktar tayini, protein saflaştırma, verim hesabı veya hedef proteinin spesifik aktivitesini veya potensini ölçmek amacıyla yapılmaktadır. Pek çok platform ve metod proteinlerin kantitatif analize için kullanılmaktadır. Bu analizler enzimatik/kimyasal ya da spektrofotometrik yöntemlere dayanmaktadır. Aşağıda tez çalışmamızda kullandığımız BCA yöntemiyle ilgili ayrıntılı bilgi verilecektir.

BCA (Bikinkoninik asit) 0.2- µg'dan 50 µg'a kadar proteinlerin analizine imkan tanıyan bir yöntemdir. BCA reaksiyonu Cu^+ iyonları ile yoğun mor renkli bir kompleks oluşturur. Bu reaksiyon protein ile alkali Cu^{2+} arasında gerçekleşir. Cu^{2+} 'nın indirgenmesinde rol alan kalıntılar sistein, sistin, triptofan, tirozin ve peptit bağlarıdır (Smith ve ark., 1985). Kimyasal reaksiyon yükselen sıcaklıkta farklı reaktivite gösteren fonksiyonel gruplar vesilesiyle sıcaklığa bağımlıdır. 60 °C'deki renk oluşumu 37 °C ile karşılaştırıldığında triptofan, tirozin ve peptit bağlarının reaktivitesinin yüksekliğinden

dolayı daha fazladır. Kullanılan belirteçlerin içeriği aşağıda verilmiştir; (Noble ve Bailey, 2009)

Belirteç A: 1 g sodyum bikarbonat, 2 g Na_2CO_3 , 0.16 g sodyum tartarat, 0.4 g NaOH ve 0.95 g NaHCO_3 100 ml içinde hazırlanır ve katı veya konsantre NaOH ile pH 11.25'e ayarlanır.

Belirteç B: 0.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 ml su içinde çözünür.

Çalışma çözeltisi A:B (100:2) olacak şekilde hazırlanır. Çözelti yeşil renktedir ve bir haftaya kadar stabil kalabilir.

2.6.2. Western Blot Yöntemi

Western Blotting yöntemi protein blotting veya immunoblotting ismiyle de bilinmektedir. DNA (Southern) veya RNA (Northern) blotting yöntemlerinden türemiş olan bir analitik tekniktir. Örnekteki proteinleri ayırtmak için SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılır. Elektroforez, yüklü partiküllerin elektrik alanı altında zıt elektrotlara doğru göç etmesi olgusudur. Elektroforetik mobilitesine göre proteinler yüküne, molekül boyutuna ve yapısına bağlı olarak ayrışır. Poliakrilamid jel, akrilamid ve çapraz bağlayıcı metilen bisakrilamid'in amonyum persulfat katalizatörü ile oluşmuş 3 boyutlu elek ağlardır. Poliakrilamid, nötral, sentetik, termostabil, transparan, güçlü, nispeten inert ve farklı por boyutlarında hazırlanabilen bir jeldir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında elektroforetik mobilite proteinlerin yükü ve molekül boyutuna değil temel olarak molekül ağırlığına bağlıdır. SDS, anyonik bir deterjandır, bir denatürasyon ve hidrotropi ajanı olarak molekül içindeki ve moleküller arasındaki hidrojen bağlarını kırarak proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarını bozmaktadır. Merkaptotanol ve ditiotreitol (DTT) gibi kuvvetli indirgeyici ajanlar sistein kalıntıları arasındaki disülfid bağlarını yok edebilmektedir. SDS ve indirgeyici ajanlar proteinleri linearize etmek ve onlara negatif yük kazandırmak amaçlı uygulanmaktadır. SDS'in bağlanması ile proteinler kıvrımsız (unfold) duruma geçerek çubuk şeklini almaktadır. Böylece proteinlerin şeklinin jeldeki ayrışmaya etkisi elimine edilmektedir.

Jel elektroforez işleminde farklı pH değerlerine sahip tampon sistemi uygulanmaktadır. Voltaj uygulandığında anyonlar (negatif yüklü moleküller) pozitif elektrota (anot) doğru göç ederler. Cl^- , yüksek mobiliteye sahip bir iyondur ve sistemde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu sebeple Cl^- iyonu öncülük eden iyon olarak

nitelendirilir. Glisinat ise düşük mobiliteye sahiptir ve düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu sebeple arka iyon olarak isimlendirilir. SDS-protein partikülleri Cl⁻ ve Gly⁻ arasında serbestçe hareket edemezler. Çünkü Cl⁻ ve glisin tamponları arasında voltaj düşer ve proteinler mikrometre boyutundaki ince tabaka jelin içine yığılabirler. Ünite başına daha fazla negatif yük taşıyan proteinler daha az negatif yük taşıyanlara göre daha hızlı hareket ederler. Bu düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerin yüksek molekül ağırlığına sahip olanlardan daha hızlı hareket etmesi anlamına gelmektedir.

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) boyutları 5 ile 2000 kDa arasındaki proteinleri ayırmada kullanılmaktadır. Poliakrilamid jelin tek düze bir por boyutu vardır. Por boyutu, jel hazırlanırken akrilamid ve bis-akrilamid tozu konsantrasyonu ayarlanması ile kontrol edilebilir. Genellikle jeller %5, %8, %10, %12 veya %15 oranlarında hazırlanır. Yüzde oranı proteinin boyutuna göre seçilmektedir. Protein molekül ağırlığı küçükse, yüzdesi daha yüksek olan bir jel kullanılmalıdır. Tampon sistemindeki değişiklikler de küçük boyutlu proteinlerin ayrıştırılmasında yardımcı olabilmektedir. Aşağıdaki tabloda protein molekül ağırlıkları ve kullanılması önerilen jel yüzdelere ilişkin bilgi verilmektedir;

Tablo 2-6: Protein molekül ağırlıkları ve kullanılması önerilen jel yüzdeleri

Molekül ağırlığı (kD)	Jel konsantrasyonu (%)
<10	15
10-30	12
30-100	10
100-500	8
>500	5

Elektroforez işleminden sonra proteinler jel yapısından nitroselüloz (NC) veya poliviniliden diflorid (PVDF) yapılmış membrana aktarılmalıdır. Herhangi bir öncül aktivasyona gerek kalmadan proteinler nitroselüloz membrana hidrofobik etkileşimlerle kombine olabilmektedirler. Nitroselüloz membranlar spesifik olmayan bağlanmalar da yapabilmektedir. Kullanımı kolay ve fiyat olarak uygundur. Fakat yıkama işlemlerini yaparken küçük protein moleküllerini de yok etmek mümkün olabilmektedir. PVDF

membranlar ise küçük protein moleküllerinin deteksiyonu için en iyi seçenektir. Yüksek duyarlılık, resolüsyon ve afinite göstermektedir.

Transfer için yarı-kuru veya ıslak transfer yöntemleri kullanılmaktadır. Yarı-kuru transfer, jel-membran-filtre sandviçinin filtreler arasına konularak transfer tamponu ile doldurulmasına dayanır. Transfer işlemi transfer tamponu ile oluşan iletim gücü vesilesiyle gerçekleşir. Elektrik doğrudan membran ve jele uygulandığı için transfer biraz vakit alır ve yüksek etkinlik gösterir. Islak transfer işleminde ise jel-membran-filtre sandviçi transfer tankına yerleştirilir ve transfer tamponunda vertikal konumda süspande edilir. Proteinler jelden membrana sandviçe paralel olan elektrot plakasından üretilen yüksek yoğunluktaki elektrik alanı ile transfer edilir.

Transfer işleminden sonra bloklama yapılmalıdır. Membrandaki reakte olmamış alanlar bloklanarak ileriki aşamalarda proteinlerin spesifik olmayan bağlanmalar yapmaları engellenmelidir. İnert bir protein veya iyonik olmayan deterjanlar kullanılarak bloklama işlemi gerçekleştirilmelidir. Bloklama tamponları reakte olmamış bütün alanları bloklamalıdır ve membrandaki hedef protein ile yer değiştirmemelidir. Bir başka deyişle, hedef proteinin epitopuna bağlanmamalı ve antikor veya diğer deteksiyon re ajanları ile çapraz etkileşime girmemelidir. BSA, yağsız süt tozu, kazein, jelatin ve Tween-20 sıklıkla kullanılan bloklama ajanlarıdır. TBS ve/veya PBS ise en sıklıkla kullanılan tamponlardır.

Primer antikor inkübasyonu işlemi bloklama işleminden sonra gerçekleştirilir. Hedef proteine spesifik primer antikor membran ile inkübe edilir ve primer antikor membrandaki hedef proteine bağlanır. Western blot işleminde primer antikor kullanılmadan önce valide edilmelidir. Kullanılacak primer antikoru n seçimi detekte edilecek antijene bağlıdır. Poliklonal ve monoklonal antikorlar western blot işleminde kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar tek spesifik antijenik epitopu tanır. Bu yüzden daha yüksek özgüllük gösterir, bu da düşük arkaplanın olmasına imkan tanır. Poliklonal antikorlar ise daha fazla epitop tanır ve sıklıkla daha yüksek afiniteye sahiptir. Monoklonal antikor sadece bir epitopa özgü olduğundan, eğer epitop hasara uğrarsa sonuçlar doğrudan etkileyecektir. Fakat poliklonal antikor kullanıldığında, birkaç epitop zarar görmüş olsa da sonuçlar stabil kalabilecektir.

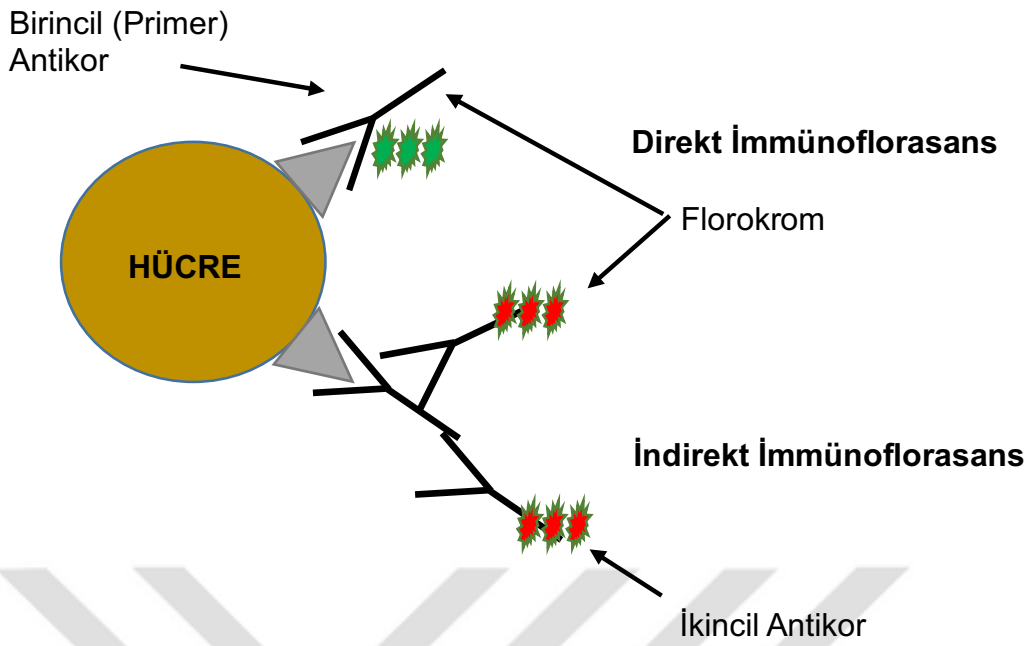
Sekonder antikor inkübasyonu, membran bağlanma gerçekleştirilmemiş primer antikoru n yıkama ile uzaklaştırılması sonrası gerçekleştirilir. Sekonder antikora bir enzim

veya florasan bir madde bağıdır. Membran sekonder antikora maruz bırakıldığında hedef protein ile etkileşime giren primer antikora bağlanır. Anti-fare ve anti-tavşan immunoglobulinleri en çok kullanılan sekonder antikorlardır. Keçi, anti-fare ve anti-tavşan poliklonal antikorlarını yetiştirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sebeple keçi anti-fare ve keçi anti-tavşan en yaygın kullanılan antikorlardır. Sekonder antikor seçimi primer antikorun yetiştirildiği hayvan türüne bağlıdır. Örneğin, eğer primer antikor bir fare monoklonal antikor ise, sekonder antikor anti-fare olmalıdır. Eğer primer antikor bir tavşan poliklonal antikor ise sekonder antikor anti-tavşan antikor olmalıdır (Anon, 2017).

2.6.3. İmmünohistokimya ve İmmünoflorasan Çalışmaları

İmmünoflorasan tekniği hem taze hem de sabitlenmiş örneklerle uygulanabilmektedir. Bu teknikte, antikorlar fluorescein izotiyosiyonat (FITC) veya tetrametil rodamin izotiyosiyonat (TRITC) gibi florasan boyalara kimyasal olarak konjugedir. Bu işaretli antikorlar direkt veya indirekt olarak ilgili antijene bağlanır ve bu sayede florasan teknikleri ile bu antijen detekte edilmiş olmaktadır. Florasan, akış sitometrisi veya array tarayıcı ile kantifiye edilebilir veya bir florasan mikroskop ya da konfokal mikroskop ile gözlemlenebilmektedir.

İmmünoflorasan işaretleme, direkt ve indirekt olmak üzere iki ana metoddan oluşmaktadır. Direkt immünoflorasans, daha az sıklıkta kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde araştırılan moleküle özgü antikor florasan boyaya kimyasal olarak konjuge haldedir. İndirekt immünoflorasans yönteminde ise moleküle özgü antikor bir diğer isimle primer antikor işaretlelenmemiştir. İkincil bir anti-immünoglobülin antikor bu ilk antikorun bir kısmına yöneliktir, florasan bir boya ile işaretlelenmiştir ve ikincil antikor olarak isimlendirilmektedir.



Şekil 2-8: Direkt ve indirekt immünoflorasans

Direkt immunoflorasan yöntemi avantajları

- İşaretleme süresi kısadır.
- İkili ya da üçlü işaretleme indirekt yönteme göre daha basittir.
- Tek bir türde birden çok antikor yetiştirildiği örneklerde bu yöntemi kullanmak gerekebilmektedir.

Dezavantajları

- Daha zayıf sinyal elde edilmektedir.
- Genellikle daha yüksek maliyettedir.
- Yöntemin esnekliği daha azdır.
- İşaretli konjugatlar bulunamadığında işlem zorlaşabilmektedir.

İndirekt immunoflorasan yöntemi avantajları

- Direkt immünoflorasan yöntemine göre çok daha iyi hassasiyeti vardır.
- Birden fazla sekonder antikor her bir primere bağlanabildiğinden sinyal amplifiliye olabilmektedir.

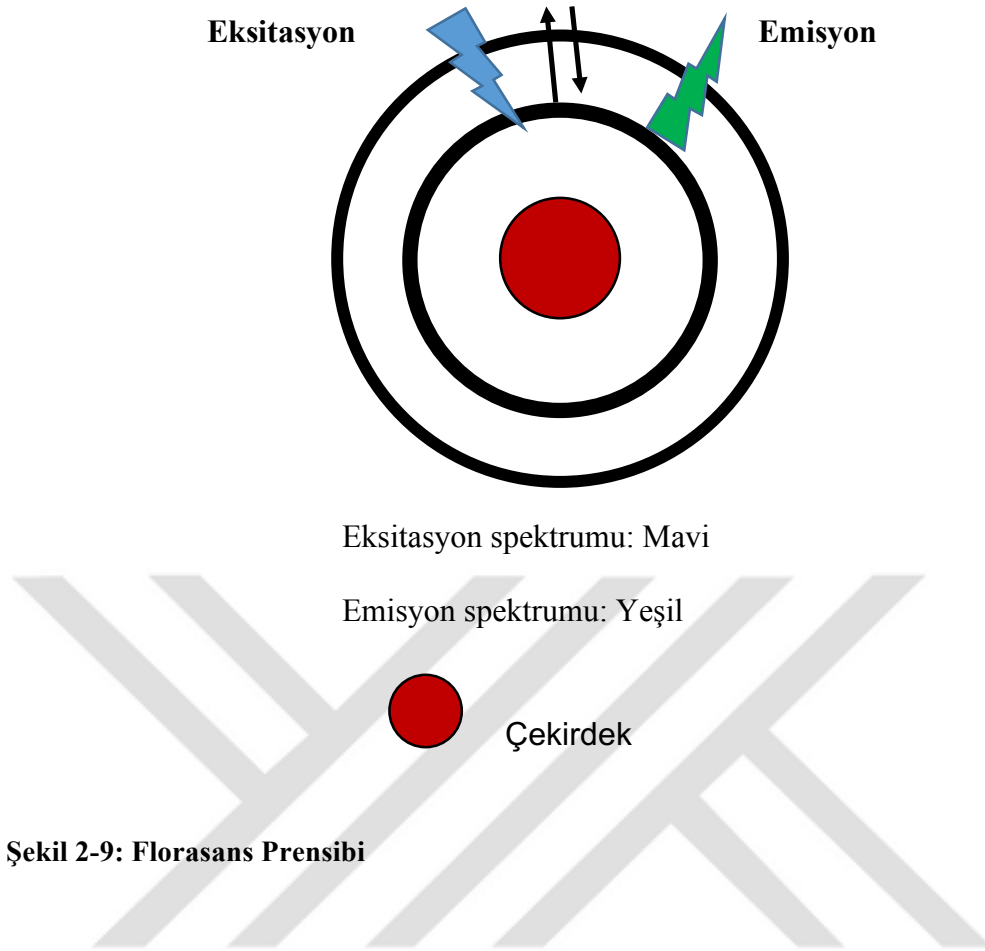
- Ticari olarak piyasada bulunan sekonder antikorlar nispeten daha ucuzdur, kalite kontrolleri yapılmaktadır ve pek çok renk seçeneği mevcuttur.

Dezavantajları

- Çapraz reaktivite potansiyeli söz konusudur.
- Birden fazla işaretleme yapılmak istendiğinde primer antikorların aynı türde yetiştirmiş olmaması gerekmektedir.
- Endojen immunoglobulin örnekleri yüksek arka plana sebep olabilmektedir.

2.6.3.1. Florasan Prensibi

Florasan ve fosforans, lüminasans tipleri olarak bilinmektedir. Lüminasanslı moleküller ışık absorbe ettiğinde, başka bir dalga boyunda ışık salarlar. Florasan ile, eksitasyon ışığının absorpsiyonundan hemen sonra ışığın emisyonu çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Florasan maddeler atomik yapıları sebebiyle dışarıya ışık vermektedirler. Atomun çekirdeğini çevreleyen yörüngelerin her biri belirli bir enerji düzeyinde dizilmiş elektronlar içermektedir. Bir elektron bir ışık fotonundan enerji absorbe ettiğinde, eksite olmuş hale geçer ve bir yüksek, daha az stabil olan enerji düzeyine zıplar. Fakat bu eksite hal uzun sürmez. Eksite hal yarı ömrü genellikle 10 saniyeden azdır. Elektron ufak bir enerjiyi ısı olarak kaybeder, geri kalan ekstra enerji ise foton formunda dışarı verilir. Salınan florasan absorbe edilen ışıktan daha düşük enerjiye sahiptir. Bu sebeple salınan ışığın dalga boyu eksitasyon ışığından daha uzundur (Robinson, Sturgis ve Kumar).



Şekil 2-9: Florasans Prensibi

İmmünohistokimya, monoklonal ve poliklonal antikorların kullanılması ile doku kesitlerinde spesifik antijenlerin varlığının tespiti amacıyla yapılan etkili bir patolojik tanı aracıdır. Spesifik tümör antijenlerinin belirli kanser türlerinde eksprese edilmesi ya da up-regüle olması sayesinde kanser tanısı konulmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

İmmünohistokimya çalışması için öncelikle biyopsi yapılması gerekmektedir. Bunun için ise mikrotom kullanılarak dokudan kesitler alınmaktadır ve bu doku kesitleri uygun antikorlar ile inkübe edilmektedir. Florasan boya, enzim, radyoaktif element veya kolloidal altın gibi bir belirteç sayesinde antikorun bağlandığı bölge florosan mikroskop ile gözlemlenebilmektedir (Kaliyappan ve ark., 2012).

2.6.3.2. İmmünoflorasan Yöntemi Protokolü

1. Lamlar 5' er dakikadan 4 kere %0.025 Triton X-100 içeren TBS ile yıkanır. %0.025 Triton X-100 yüzey gerilimini düşürerek, re ajanların tüm doku kesitini kaplamasını sağlar. Ayrıca Fc reseptörlerini çözerek, spesifik olmayan bağlanmayı azaltır.

2. %1 Bovin Serum Albumin ve %10 serum içeren TBS içinde 2 saat oda sıcaklığında bloklanır. Sekonder antikor dokudaki endojen immünoglobulinlerle çapraz reakte olabilmektedir. Dokuyu, sekonder antikorun yetiştirildiği türde normal serumda inkübe etmek bu durumu minimize etmeye yardım etmektedir. Ayrıca primer antikor kullanılmadan önce normal serum uygulanması Fc reseptörün primer ve sekonder antikora bağlanmasını elimine etmektedir. Bovin serum albümin kullanımı ise hidrofobik etkileşimlerle meydana gelebilecek spesifik olmayan bağlanmanın azalmasını sağlar.

3. Lamların üzerindeki sıvı akıtılır ve dokuların kenarı peçete ile kurulanır.

4. Primer antikor %1 Bovin Serum Albumin içeren TBS içinde seyreltilir. Primer antikor, çalışılan dokunun türünden farklı bir türde yetiştirilmiş olması gerekmektedir. Çünkü, örneğin eğer bir fare dokusu üzerine çalışılıyorsa ve farede yetiştirilmiş bir primer antikor kullanılıyorsa, sekonder antikor olarak kullanılacak anti-fare IgG fare dokusundaki endojen IgG' ye bağlanarak yüksek bir arkaplan oluşumuna neden olabilir.

5. Primer antikor ile doku 4 °C' de gece boyunca inkübe edilir. Gece boyunca tutulması düşük titrede antikor kullanılmasına imkan verir ve uzun süre inkübasyon olduğu için antikorun bağlanması için yeterli zaman sağlanır.

6. Ertesi gün %0.025 Triton X-100 içeren TBS ile her biri 5 dakikadan 4 kere yıkanır.

7. Florasan tetkik için; florofor-konjuge sekonder antikor %1 Bovin Serum Albumin içeren TBS ile seyreltilir.

8. 1 saat oda sıcaklığında örneklerle karanlıkta inkübe edilir.

9. TBS ile her biri 5 dakikadan 3 kere yıkanır.

10. Mounting medium her bir dokunun üzerine damlatılır ve bir lamel ile kapatılır.

11. Florasan mikroskop altında incelenir.
12. Horseradish peroksidaz (HPR) kullanılarak yapılan enzimatik metotta ise en başta dokudaki endojen peroksiadz bloklanmalıdır. Bunun için H_2O_2 kullanılır. H_2O_2 , endojen peroksidaz aktivesini baskılayarak, arkaplan boyanmasını azaltır. Öncelikle doku kesiti DAB solüsyonu ile rehidrate edilir. Bu sayede endojen peroksidaz içerip içermediği anlaşılır. Eğer kesit mikroskop altında kahverengi gözüküyorsa, bu boyanmanın azaltılması bloklama ile gerçekleştirilmelidir.
13. 1-6' ya kadar bütün basamaklar bu metotta da tekrarladır.
14. Lamlar % 0.3 H_2O_2 içeren TBS ile 15 dakika inkübe edilir.
15. Enzim konjuge edilmiş sekonder antikor %1 Bovin Serum Albumin içeren TBS içinde seyreltilir. 1 saat boyunca oda sıcaklığında lablardaki doku kesitleriyle inkübe edilir.
16. Musluk altında 5 dakika yıkanır.
17. Kontür boyama yapılır.
18. Dehidrate edilir, temizlenir ve mikroskop altında incelenir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler

Gemsitabin	Ark Pharma/ABD
Vismodegib	LC Laboratories/ABD
2,2-Bis(hidroksimetil)propiyonik asit	Sigma-Aldrich/ABD
Metoksi polietilen glikol (mPEG; Mn=5000, polidispersite indeksi (PDI)=1.03)	Sigma-Aldrich/ABD
1-(3-(dimetilamino)propil)-3-etilkarbonimid HCl (EDC)	Sigma-Aldrich/ABD
1-hidroksibenzotriazol (HOBt)	Sigma-Aldrich/ABD
1,8-diazabisiklon-dec-7-ene (DBU)	Sigma-Aldrich/ABD
Benzil bromid	Sigma-Aldrich/ABD
Asetonitril, HPLC için	Sigma-Aldrich/ABD
BCA Protein tayin kiti	Pierce/ABD
Mia PaCa-2 hücreleri	American Type Culture Collection (ATCC)/ABD
Dimetil sülfoksit, cell culture grade	Sigma-Aldrich/ABD
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 4.5 g/L glukoz, sodyum pirüvat, Stabil glutamin içeren	Life Technologies/ABD
Fetal dana serumu (FBS)	Life Technologies/ABD
Metanol, HPLC için	Sigma-Aldrich/ABD
Penisilin/Streptomisin	Life Technologies/ABD
Phosphate buffered saline (PBS)	Life Technologies/ABD
Pyrene	Sigma-Aldrich/ABD
Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich/ABD

Triton X-100	Sigma-Aldrich/ABD
Tetrahidrofuran	Sigma-Aldrich/ABD
Palladium on charcoal (Pd/C)	Sigma-Aldrich/ABD
NaOH	Sigma-Aldrich/ABD
Dialysis bag (MW cutoff 2000 Da)	Sigma-Aldrich/ABD
Kristal viyole	Sigma-Aldrich/ABD
%4-15 mini Protean poliakrilamid jel	BioRad/ABD
Poliviniliden florid (PVDF)	Life Technologies/ABD
Odyssey Blocking Buffer	Licor /ABD
Gli-1 (SC-20687)	SantaCruz Biotech/ABD
Bax (SC-6236)	SantaCruz Biotech/ABD
Total PARP (CS-9532S)	CellSignallingTech/ABD
β -aktin (SC-1616)	SantaCruz Biotech/ABD
Patched-1 (SC-6147)	SantaCruz Biotech/ABD
Tripsin-EDTA çözeltisi (%0.05-%0.02)	Sigma-Aldrich/ABD

3.2. Kullanılan Cihazlar

96 kuyucuklu steril plaka	Sigma-Aldrich/ABD
Desikatör	Scienceware
Enjektör ucu Filtre 0.2 μ m, steril	Merck Millipore
Enjektör ucu Filtre 0.45 μ m, steril	Merck Millipore
Hassas terazi	Mettler TOLEDO
Hemasitometre	Hausser Scientific
HPLC	Shimadzu
HPLC Kolonu	Inertsil ODS 3
HPLC Kolonu	Phenomenex Aqua C18
Hücre kültür kapları (flask, 25, 75 ve 100 cm ²)	ThermoFisher Scientific

Inverted mikroskop	Zeiss Axio TL/RL
Karbondioksit inkübatör	Sanyo
Liyofilizatör	Labconco
Mikropipet	Eppendorf
Mikropipet ucu	Fisher Scientific
Mikroplaka okuyucu	SpectraMax® M5e
Santrifüj, soğutmalı, değişken rotorlu	EppendorfCentrifuge 5424 R
pH metre	Sigma Aldrich
Prob sonikatör	Qsonica
Protein transfer	Invitrogen iBlot
Rotavapor	Heidolph
Ultrasonik banyo	Fisher Scientific
Vortex	Fisher Scientific
Zetasizer Nano Series	Zeta sizer Nano-ZS90

3.3. Çalışmalarda Kullanılacak Polimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.3.1. 2-metil-2-benziloksikarbonil-propilen karbonat (MBC) Sentezi

Gemsitabin salımını ve stabilitesini iyileştirmek üzere karboksilik pendant gruplarına sahip amfifilik polimerin sentez yolu aşağıda anlatılmıştır.

3.3.2. Reaksiyon Yöntemi:

Monomer MBC iki adımlı reaksiyon ile sentezlendi.

- 0.168 mol 2,2-bis(hidroksimetil)propiyonik asit ve 0.169 mol potasyum hidroksit karıştırıldı. (A).
- Isıtıcı 100 °C'ye ayarlandı.
- 0.202 mol benzil bromid ile 125 mL dimetilformamid içeren balon joje ısıtıcı üzerine yerleştirildi.
- 16 saat boyunca A ile reakte edildi.

- Basınç altında organik çözücü uzaklaştırıldı.
- Kalıntı etil asetat ile çözüldü.
- Su ile yıkandı.
- $MgSO_4$ üzerinde kurumaya bırakıldı.
- Sonrasında ham ürün eldesi için etil asetat uçuruldu.
- Ürün toluen ile tekrar tekrar kristalizasyona uğratarak saf benzil-2,2-bis(metilol)propiyonat elde edilmeye çalışıldı.
- İkinci aşamada 6:1 (h/h) oranında diklorometan-piridin karışımı hazırlandı.
- 0,05 mol 2,2-bis(metilol)-propiyonat bu karışımda çözüldürüldü (B).
- Kuru buz ve izopropil alkol ile $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ayarlandı.
- B bu soğuk ortamda donduruldu.
- 25 mmol trifosgen diklorometan içinde hazırlandı.
- $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleşmekte olan reaksiyona bu trifosgen 1 saat boyunca damla damla eklendi.
- Reaksiyon oda sıcaklığına alınır ve 2 saat daha devam etmesine izin verildi.
- 2 saat sonunda 75 mL doymuş NH_4Cl çözeltisi ile reaksiyon sonlandırıldı.
- Organik tabaka 3 kere 100 mL 1 M HCl ile yıkandı.
- 300 mL $NaHCO_3$ ile yıkandı.
- Na_2SO_4 ile kurutuldu.
- Organik tabaka basınç altında uzaklaştırılır ve saf MBC elde edildi.
- MBC etil asetatın tekrar kristallendirilerek daha saf hale getirildi.

3.3.3. PEG-MBC Sentezi

PEG-MBC halka açılım polimerizasyonu ile sentez edildi. Bunun için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- MBC ve mPEG 3 saat boyunca basınç altında DBU katalizi aracılığıyla reakte edildi.
- Elde edilen polimer kloroform içinde çözüldü.
- Hekzan-dietil eter karışımında çöktürülerek saflaştırıldı.
- 48 saat boyunca vakum altında tutularak kurutuldu.

3.3.4. PEG-MBC Hidrojenizasyonu

PEG-MBC'nin koruyucu benzil grupları hidrojenizasyon işlemi ile karboksil gruplarına aşağıdaki işlemler ile indirgendi.

- 1:1 (h/h) oranında 12 mL tetrahidrofuran ve metanol hazırlandı.
- Bu karışıma 200 mg palladyum karbon (Pd/C) eklendi (C).
- 1 g MBC C'ye eklendi.
- Bir balon içerisine hidrojen gazı hapsedildi.
- Düzenek ile bu reaksiyonun 18 saat boyunca hidrojen gazına maruz kalması sağlandı.
- 18 saat sonra siyah renkli reaksiyon çözeltisi filtre ve vakum yardımıyla süzüldü.
- Organik çözücü uzaklaştırılır ve vakum altında 48 saat bekletildi.
- Yapışkan sarımtırak-şeffaf renkte ürün elde edildi.

3.3.5. PEG-PCC' ye Gemsitabin ve Dodekanol Konjugasyonu

Karbonimid coupling kullanılarak PEG-PCC polimerinin karbonil gruplarına gemsitabin ve dodekanol aşağıdaki basamaklar uygulanmasıyla konjuge edildi.

- 300 mg PEG-PCC 5 mL DMF ile bir balon joje içinde çözündürüldü.
- İnert nitrojen gazı bir iğne yardımıyla kauçuk tıpadan reaksiyon ortamına verildi.

- 317 mg 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodimid HCl (EDC) tartıldı ve 1 mL DMF içinde çözüldü. Şırınga yardımıyla reaksiyona eklendi.
- 30 dakika sonra 1 ml DMF içinde çözündürülen 223 mg 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) şırınga yardımıyla sisteme eklendi.
- 2 saat sonra 72 mg Gemsitabin tartılır ve 1 ml DMF içinde çözülür. Şırınga ile reaksiyon ortamına aktarıldı.
- Hemen ardından 200 µl diisopropiletilamin reaksiyon ortamına eklendi.
- 1 saat sonra 195 mg dodekanol tartıldı ve 1 ml DMF içinde çözünürüldü. Şırınga ile reaksiyon ortamına aktarıldı.
- Hemen ardından 200 µl diisopropiletilamin reaksiyon ortamına eklendi.
- 48 saat boyunca reaksiyon devam ettirildi.

3.3.6. Saflaştırma İşlemi

48 saat sonunda balon joje alınır ve çöktürme işlemleri için saflaştırma gerçekleştirildi. Bunun için aşağıdaki basamaklar izlendi.

- 40 mL isopropil alkol -20 °C’de 2 saat bekletildikten sonra balon jojeden reaksiyon likidi damla damla isopropil alkole eklendi. Çökme gözlemlendi.
- İsopropile eklenmiş reaksiyon likidi -20 °C’de 1 gün boyunca bekletildi.
- Ertesi gün santrifüj -10 °C’ye ayarlanır ve 5000 rpm’de santrifüj edildi.
- Çökelti kloroformda çözündürüldü.
- -20 °C’de bekletilmiş bir başka 40 ml isopropil alkole damla damla eklendi. Çökme gözlemlendi.
- 1 gün boyunca -20 °C’de bekletildikten sonra ertesi gün aynı santrifüj işlemi uygulandı.
- Çökelti tekrar kloroformda çözündürüldü.
- 40 mL dietil eter -80 °C’de 2 saat bekletildi.
- Kloroformda çözülen önceki çözelti damla damla dietil etere eklendi.
- 1 gün boyunca -80 °C’de tutuldu.

- Ertesi gün tekrar santrifüj işlemi uygulanarak çökelti elde edildi.
- Çökelti 5 ml aseton içinde çözündürüldü.
- Molekül ağırlığı por boyutu 2000 Da olan diyaliz tübüne yerleştirildi. Kısaçaklarla iki ucundan sabitlendi.
- 500 ml büyük beher içine distile su eklendi. Diyaliz tübü suya daldırıldı ve gece boyunca karanlık ortamda dönmeye bırakıldı.
- Ertesi gün diyaliz tübü içindeki sıvı bir flokana alındı ve -80 °C’de 2 saat bekletildi.
- Dondurulmuş örnek liyofilizatöre yerleştirilerek 2 gün boyunca tutuldu.
- Elde edilen pamuksu toz örnek desikatör içinde saklandı.

3.3.7. PEG-PCC’ ye Dodekanol Konjugasyonu

Karbonimid coupling kullanılarak PEG-PCC polimerinin karbonil gruplarına yalnızca dodekanol konjuge edildi. Bu işlem için aşağıdaki basamaklar yapıldı.

- 300 mg PEG-PCC 5 ml DMF ile bir balon joje içinde çözündürüldü.
- İnert nitrojen gazı bir iğne yardımıyla kauçuk tıpadan reaksiyon ortamına verildi.
- 317 mg 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodimid HCl (EDC) tartıldı ve 1 mL DMF içinde çözündürüldü. Şırınga yardımıyla reaksiyona eklendi.
- 30 dakika sonra 1 ml DMF içinde çözündürülen 223 mg 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) şırınga yardımıyla sisteme eklenir.
- 1 saat sonra 187 mg dodekanol tartıldı ve 1 ml DMF içinde çözündürüldü. Şırınga ile reaksiyon ortamına aktarıldı.
- Hemen ardından 400 µl diisopropiletilamin reaksiyon ortamına eklendi.
- 48 saat boyunca reaksiyon devam ettirildi.

3.3.8. Saflaştırma İşlemi

48 saat sonunda balon joje alındı ve çöktürme işlemleri için saflaştırma gerçekleştirildi. Bunun için aşağıdaki basamaklar izlendi.

- 40 ml isopropil alkol -20 °C’de 2 saat bekletildikten sonra balon jodeden reaksiyon likidi damla damla isopropil alkole eklendi. Çökme gözlemlendi.
- İsopropile eklenmiş reaksiyon likidi -20 °C’de 1 gün boyunca bekletildi.
- Ertesi gün santrifüj -10 °C’ye ayarlanır ve 5000 rpm’de santrifüj edildi.
- Çökelti kloroformda çözündürüldü.
- -20 °C’de bekletilmiş bir başka 40 ml isopropil alkole damla damla eklendi. Çökme gözlemlendi.
- 1 gün boyunca -20 °C’de bekletildikten sonra ertesi gün aynı santrifüj işlemi uygulandı.
- Çökelti tekrar kloroformda çözündürüldü.
- 40 ml dietil eter -80 °C’de 2 saat bekletildi.
- Kloroformda çözülen önceki çözelti damla damla dietil etere eklendi.
- 1 gün boyunca -80 °C’de tutuldu.
- Ertesi gün tekrar santrifüj işlemi uygulanarak çökelti elde edildi.
- Çökelti kloroform içinde çözündürüldü.
- Kloroform rotavapor ile uzaklaştırıldı ve ürün desikatörde saklandı.

3.3.9. mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ve mPEG-b-PCC-g-DC Polimerlerinin Karakterizasyonları

¹H-NMR analizi en net karakterizasyon sağlayacak olan yöntem olduğundan dolayı ¹H-NMR ile doğrulama gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Bruker (500 MHz, T=25

C) NMR cihazı kullanılmıştır. Örneklerin NMR analizine hazırlanması için:

- 8'er mg her iki polimerden de tartıldı.
- 700 µl DMSO-d₆'da çözüldü.
- NMR tüplerine konuldu.

3.4. Analitik Miktar Tayini Yöntemleri

3.4.1. Gemsitabin Miktar Tayini Yöntemi

Gemsitabin'in hazırlanan formülasyondaki miktarı ve polimere konjuge miktarı ve in vitro salım şartlarındaki tayininin özgün, hassas, güvenilir, doğru ve kısa analiz sürelerinde yapılabilmesi için Tablo 3-1'de verilen HPLC metod koşulları kullanıldı.

Tablo 3-1: GEM miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi parametreleri

Mobil faz	Metanol:Sodyum asetat tamponu (20 mM, pH-5.5) (07:93)
Analitik kolon	Inertsil ODS 3 kolon 4.5 x 250 mm, 5 µ
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Akış hızı	1 ml/dak
Dedektör	UV 268 nm
Analiz sıcaklığı	25 °C
Analiz süresi	15 dak

3.4.2. Vismodegib için HPLC ile Miktar Tayini

Vismodegib'in tek başına, hazırlanan formülasyonlardaki miktarı ve in vitro salım koşullarındaki miktar tayininin özgün, hassas, güvenilir, doğru ve kısa analiz sürelerinde yapılabilmesi için Tablo 3-2' de verilen HPLC yöntemi kullanıldı.

Tablo 3-2: Vismodegib miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi parametreleri

Mobil faz	Asetonitril:Su (60:40)
Analitik kolon	Phenomenex Aqua C18 kolon 4.6 x 250 mm, 5 µ
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Akış hızı	1 ml/dak
Dedektör	UV 230 nm
Analiz sıcaklığı	25 °C
Analiz süresi	15 dak

3.4.3. Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyon Parametreleri

Analitik metod validasyonu, kullanılan miktar tayini yönteminin güvenilirliğini ve tekrar edilebilirliğini göstermek ayrıca bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması için yapılan bir uygulamadır (Chan, 2004). Gemsitabin ve Vismodegib Tablo 3-1 ve Tablo 3-2’ de verilen analitik tayin yöntemlerinin validasyonlarının yapılması için aşağıda verilen parametreler incelendi. Her bir parametre, her bir yöntem için açıklamasında verildiği şekilde araştırıldı.

3.4.3.1. Özgünlük (Seçicilik)

Analitik metod seçiciliği, analiz edilen etkin maddenin belirtilen koşullarda sisteme uygulandığında alınan cevabın, çalışmada kullanılacak diğer maddelerden kaynaklanan cevaplar ile girişim yapmamasıdır (Shah ve ark., 1991) . Bu parametrenin araştırılması için etkin maddeler birlikte ve tek tek HPLC sistemine enjekte edilmiş ve, alınan cevapların hem birbirleri ile hem de çalışmalar sırasında kullanılacak diğer maddeler ile (mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC, mPEG-b-PCC-g-DC) girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

3.4.3.2. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı deney bulgularının örnek içindeki madde konsantrasyonu ile orantılı olarak belirli bir aralıkta olmasıdır. Doğrusallık analizi yapılacak olan etkin maddeye ait cevap pik alanının, etkin maddenin kullanılan konsantrasyonları ile doğrudan orantılı olması olarak tanımlanabilir. Doğrusallık % 80 - % 120 oranındaki konsantrasyon uzunluğuna sahip beş ya da beşten fazla standarttan, üçten altıya kadar uygulama serisiyle sağlanır (USP31). Bu amaçla doğrusallık parametresinin sağlandığını göstermek için ilgili maddelerin uygun çözücude hazırlanmış olan belirli konsantrasyondaki ana stok çözeltilerinden hareketle, altı adet standart çözelti hazırlandı. Doğruluk parametresinin incelenmesi için de her bir konsantrasyon noktasında altı çözelti hazırlandı. Ana stoktan yapılan seyreltmelerde HPLC sisteminde kullanılacak olan mobil faz kullanıldı. Bu standart çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramlardaki maddeye ait cevap piklerinin alanı ile madde konsantrasyonu arasında regresyon analizi yapıldı.

Gemsitabin için kullanılan yöntemde çalışılan konsantrasyon sınırları 1-200 µg/ml'dir. Vismodegib için kullanılan yöntemde çalışılan konsantrasyon da 1-200 µg/ml'dir.

3.4.3.3. Kesinlik

Kesinlik bir yöntemin birbirini takip eden ölçümlerin birbirine yakınlığını göstermektedir. Bir değerin tekrarlanabilmesi ve bireysel analiz sonuçlarında yakın sonuçlar verebilmesidir. Standart deviasyon (sapma) ve varyasyon katsayısı ile ifade edilir. Kesinlik parametresi tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ayrılır. Orta kesinlik değerlendirmesi farklı cihazlarda, farklı kişilerin uzun süre yaptığı analiz sonuçlarını değerlendirir.

3.4.3.4. Tekrar Edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman aralığında sabit bir örnekte belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin kesinliği olarak tanımlanır (ICH Q2(R1) guideline).

Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin incelenmesi için stok çözeltilerden hareketle, kalibrasyon doğrusu üzerinde yer alan belirli konsantrasyonda bir standart

çözelti hazırlanır ve bu çözeltinin artarda altı kez HPLC ile analizi yapılır. Bu analizlerin sonucunda kalibrasyon doğrusu kullanılarak her bir analizdeki pik alanının karşılık geldiği konsantrasyon değeri bulunur. HPLC analizi ile bulunan konsantrasyon değerlerinin ($\mu\text{g/ml}$) ortalama, standart deviasyon (SD) ve rölatif standart sapma (RSD) hesaplanır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin gösterilebilmesi için RSD değerinin %2' den küçük olması gerekmektedir.

3.4.3.5. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik parametresinin incelenmesi için ise aynı stoktan hareketle yine kalibrasyon doğrusu üzerinde yer alan üç farklı konsantrasyon seçildi. Bu konsantrasyon noktalarının her biri için altı adet farklı standart çözelti hazırlandı ve her bir çözelti HPLC ile bir defa analiz edildi. Bu analizler sonucunda kalibrasyon doğrusu ile konsantrasyon hesaplanarak ortalama, SD ve RSD değerleri bulundu.

3.4.3.6. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlıklarıdır. Tez çalışmalarında kullanılan analitik yöntemlerin doğruluklarının gösterilmesi için üç farklı konsantrasyon seçilir ve her bir konsantrasyon değerinde üç adet standart çözelti hazırlanır (ICH Q2(R1) guideline). Doğruluk için kabul edilebilir değer, nominal değerden $\pm \%15$ ' den fazla sapmanın olmamasıdır (Shah ve ark., 1991) .

Miktar tayini için kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun araştırılması için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (Eşitlik 3.1):

$$\text{Doğruluk (\% ortalama bağıl hata)} = \frac{(X-Y)}{Y} \times 100 \text{ (Eşitlik 3.1.)}$$

X= Ölçülen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) Y= Hazırlanan konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)

3.5. Formülasyon Geliştirme

3.5.1. Boş Misellerin (etkin madde içermeyen) Hazırlanması

mPEG-b-PCC-g-DC polimeri kullanıldı ve yöntem olarak film hidrasyon yöntemi uygulandı.

mPEG-b-PCC-g-DC polimeri gerekli miktarda bir flakon içinde tartıldı. Kloroform içinde çözündürüldü. 5 dakika vorteks işlemine tabi tutulduktan sonra, azot gazı altında ya da rotavapor kullanılarak organik çözelti uçuruldu. Misel oluşumunda önemli faktörlerden biri organik çözücünün tamamıyla uçurulmasıdır. Bu sebeple oluşan film bir gece vakum altında bekletildi. Ertesi gün PBS (fosfat tamponu) ile film hidrate edildi ve vorteks kullanılarak şiddetli karıştırma uygulandı. Böylece etkin madde içermeyen misel dispersiyonları hazırlanmış oldu.

3.5.2. Gemsitabin Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

Gemsitabin polimere konjuge halde olduğundan HPLC ile yapılan analiz ile elde edilen gemsitabin yüklenme oranından istenilen gemsitabin miktarını içeren polimer bir flakon içinde tartıldı. Kloroform içinde çözündürüldü, vorteks uygulandı. Rotavapor ile organik çözücü uzaklaştırıldı. Bir gece vakum altında bekletildi. Ertesi gün PBS ile film hidrate edildi ve 5 dakika vorteks kullanılarak şiddetli karıştırma uygulandı. 10 dakika sonikasyon banyosuna tabi tutuldu. Oluşan misel dispersiyonu 0,2 µm filtreden süzüldü.

3.5.3. Vismodegib Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

Yüklenme etkinliğinin tayini için 3 farklı misel hazırlama yöntemi uygulandı. Bu yöntemler film hidrasyon metodu, nanopresipitasyon metodu ve emülsiyon/çözücü uzaklaştırma metodlarıdır.

Film hidrasyon metodu için vismodegib (GDC-449) kloroformdaki stok çözeltisinden (1 mg/ml) gerekli miktarda ilaç alındı ve gerekli miktarda tartılan mPEG-b-PCC-g-DC polimerine eklendi. Tamamen çözünmeyi sağlamak için bir miktar daha kloroform eklendi. Kısa süre vorteks uygulanarak çözünme işleminden emin olunduktan sonra rotavaporda çözücü uzaklaştırıldı ve oluşan film bir gece vakum altında tutuldu. Ertesi gün PBS ile film hidrate edildi, 5 dakika vorteks uygulandı. 10 dakika sonikasyon banyosu uygulandıktan sonra 2 dakika 30 amplitüt ile her 30 saniyede bir durarak prob sonikasyon uygulandı. Oluşan misel dispersiyonu 0,2 µm filtreden süzüldü. Vismodegib

miselleri dışarıdan yükleme ile oluşturulduğundan yani gemsitabin gibi polimere doğrudan konjuge olmadığından etkin maddenin hapsedilme etkinliğinin ve miseller çözünürleştirici etkinin araştırılabilmesi için polimer ağırlığının %2,5, 5 ve 10'u olmak üzere farklı yüzdelerdeki vismodegib yüklenmeye çalışıldı.

Nanopresipitasyon metoduna göre, polimer ve polimer miktarının %2,5, 5 ve 10'u kadar tartılan vismodegib 1 ml aseton içinde çözündürüldü, 5 dakika vorteks uygulandı. 1000 rpm'de karıştıran 5 ml saf su içine damla damla damlatıldı. Gece boyunca vialin kapağı açık şekilde karışım da bırakıldı. Asetonun tamamen uçtuğu koklanarak anlaşıldıktan sonra 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, enkapsüle olmamış ilaç uzaklaştırıldı. 0,22 µm filtreden süzöldü.

Emülsiyon/çözöcü uzaklaştırma metoduna göre polimer ve polimer miktarının %2,5, 5 ve 10'u kadar tartılan vismodegib 2 ml diklorometan içinde çözöndüröldü. %0.5 polivinil alkol (PVA) çözeltisinin içine damla damla damlatıldı. 2 dakika 30 amplitüt ile her 30 saniyede bir durarak prob sonikasyon uygulandı. Emülsiyon oluşumu sağlandıktan sonra rotavaporda organik çözöcü uzaklaştırıldı. 40,000 g'de 30 dakika boyunca ultasantüfüj ilemi gerçekleştirildikten sonra ependorf dibinde elde edilen beyaz pelletler üzerine saf su konarak resüsbande edildi ve ultrasantrifüj işlemleri tekrarlandı.

3.6. Hazırlanan Misel Formölasyonlarının Karakterizasyonları

3.6.1. Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Misel Oluşumunun Doğrulanması

Hazırlanan misellerin kritik misel konsantrasyonları Pyrene metodu ile bulundu (Aguiar ve ark., 2003). Buna göre pyren her bir flakonda 6×10^{-7} M (1 ml misel solösyonunda) olacak şekilde aseton içinde hazırlandı. Uygun miktarda flakonlara eklendi ve 1 gece karanlıkta flakon kapakları açık halde bekletilerek asetonun uçması sağlandı. 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan misellere seri seyreltme uygulanarak 0.0001-1 mg/ml'e kadar farklı konsantrasyonlarda miseller hazırlandı. Bu misel dispersiyonları asetonu uçan pyren flakonlarına eklendi ve bir gece boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta karışım da bırakıldı. Ertesi günü misel yapısı içine girmemiş pyren kristallerini uzaklaştırmak için dispersiyonlar 0,2 µm filtrelerden süzöldü. Her bir flakona 5 dakika vorteks uygulandı. Örneklere florasan spektrumları 339 nm

(eksitasyon) ve 390 nm (emisyön) değérlerinde okundu. Kritik misel konsantrasyonu florasan absorpsiyon şiddetindeki ani artışa karşılık gelen değér olarak kabul edildi.

3.6.2. Misellerin Partikül Büyüklüğü Ölçümleri

Hazırlanan misellerin partikül büyüklüklerinin ölçülmesinde Malvern NanoZS cihazı kullanılmıştır. Fosfat tamponu içinde hazırlanan misel dispersiyonları tek kullanımlık ölçüm küvetlerine konuldu ve partikül büyüklükleri ölçüldü.

3.6.3. GEM'in Polimere Yüklenme Etkinliğinin Araştırılması

Polimere GEM konjugasyonunun hesaplanması için alkali hidroliz deneyi yapıldı. Bunun için 20 mg polimer tartıldı. Yukarıda anlatılan film hidrasyon tekniği ile miseller 1 ml PBS içinde hazırlandı. 500 ml bu misel dispersiyonu üzerine 500 ml 1 N NaOH eklendi. 40 °C'de 1 saat karışma bırakıldı. 500 ml bu sistemden alınarak 1 N HCl ile nötrleştirildi ve HPLC'ye enjekte edildi. Metod olarak gemitabin HPLC analizinde kullanılan metod kullanıldı. Aşağıda verilen denklem ile polimere konjuge olmuş GEM yüzdesi hesaplandı (Eşitlik 3-2).

$$\text{Yüklenen ilaç (a/a \%)} = \frac{\text{Yüklenen ilacın ağırlığı}}{\text{Formülasyonunun toplam ağırlığı}} \times 100 \text{ (Eşitlik 3-2)}$$

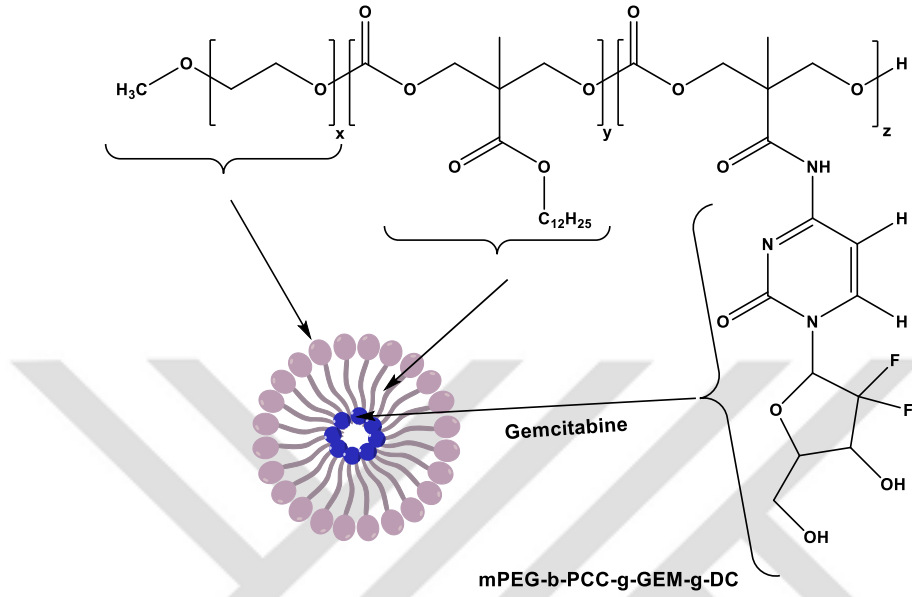
3.6.4. Vismodegib'in Misel Yapılarına Yükleme Etkinliği ve Miseller Çözünürlüğün Araştırılması

Vismodegib'in Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı gibi üç farklı yöntem ile hazırlanmasını takiben misel dispersiyonları 0,2 µm'lik filtrelerden süzüldü. Böylece misel yapıları içine hapsedilmeyen ve sulu tampon ortamında çöken etkin madde molekülleri ortamdan uzaklaştırıldı.

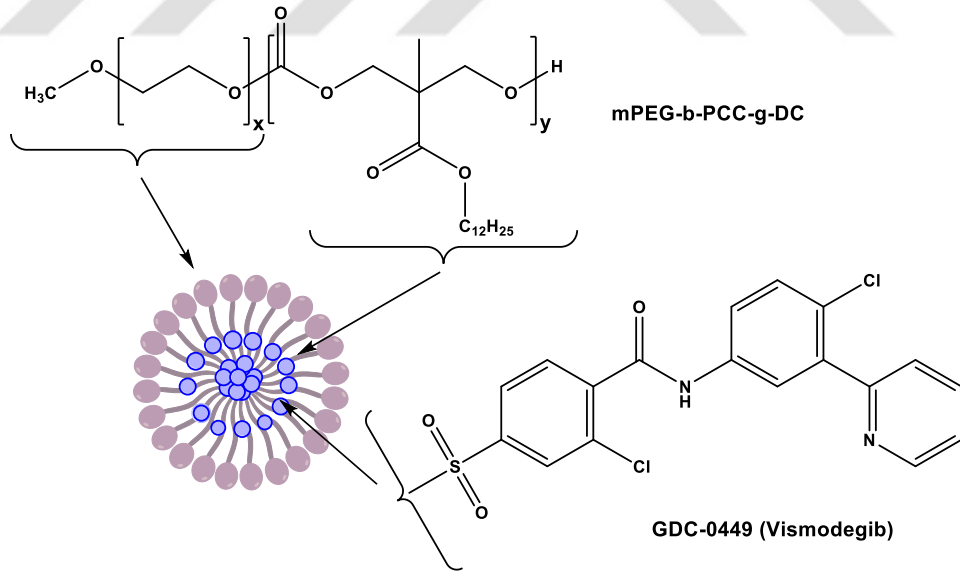
Elde edilen misel dispersiyonunun 200 µL bir ependorfa alındı. Üzerine 200 µL DCM eklendi. Ultrasonik banyoda 30 dakika tutuldu. Misellerin DCM organik çözücüsü ile bozularak, yüklenmiş vismodegibin DCM'de çözünmesi beklendi. DCM ve su birbirine karışmadığında 30 dakikalık sonikasyon işleminden sonra iki tabaka gözlemlendi. Alt kısımdaki DCM fazında çözünmüş vismodegib bulunmaktadır. Bu fazdan 100 µL alındı, rotavaporde organik çözücü uzaklaştırıldı. Asetonitril eklendi. 5 dakika vorteks uygulandıktan sonra HPLC'ye enjekte edildi. Yöntem olarak yukarıda verilen metod kullanıldı. Enkapsülasyon etkinliği ve yükleme etkinliği aşağıdaki denklem ile hesaplandı (Eşitlik 3-3 ve Eşitlik 3-4).

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Enkapsüle edilen ilaç ağırlığı}}{\text{Başlangıçta tartılan ilaç ağırlığı}} \times 100 \text{ (Eşitlik 3-3)}$$

$$\text{Yükleme Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Enkapsüle edilen ilaç ağırlığı}}{\text{Formülasyondaki total etkin madde ağırlığı}} \times 100 \text{ (Eşitlik 3-4)}$$



Şekil 3-1: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC miselleri



Şekil 3-2: mPEG-b-PCC-g-DC misellerine Vismodegib enkapsülasyonu

3.6.5. Misel Formülasyonlarından Gemsitabin ve Vismodegib'in In Vitro Salımı

3.6.5.1. Gemsitabin'in Çözünürlük Çalışması

Misel yapılarından in vitro GEM salımının değerlendirilmesi için öncelikle çözünürlük çalışması yapıldı. Bu çalışmada GEM'in PBS içindeki çözünürlüğü bulundu.

3.6.5.2. Vismodegib'in Çözünürlük Çalışması

In vitro salım deneylerinde sink koşulun sağlanabilmesi ve salınan ilacın çözünmesinin gerçekleşebilmesi için suda çözünürlüğü düşük olan vismodegib'in 5 farklı Tween 80 yüzdesi içeren pH 5.5 PBS ve pH 7.4 PBS içinde çözünürlüğü değerlendirildi. Bunun için 5 farklı Eppendorf tüpe %0.1, %0.5, %1, %1.5, %2 ve %5 oranlarında Tween 80 eklendi. Her bir tüpe çözünebilecek miktardan daha fazla vismodegib (GDC-0449) eklendi. 100 hızda, 72 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalama aletinde çalkalandı. Sonrasında 14,000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüj edildi. Süpernatanttan 0.1 g alındı ve 10 ml metanol eklendi, vaktekslendi. 10 ml metanol ile ikinci seyretme gerçekleştirildi. 1 ml'lik örnekler alındı ve 0.45 µm'lik filtrelerden süzülerek HPLC'de analizi yapıldı (Eşitlik 3-5).

$$C = \frac{AUC_s}{AUC_{st}} \times C_{st} \times 1000 \text{ (Eşitlik 3-5)}$$

C: Çözünebilir Vismodegib (GDC-0449) konsantrasyonu

AUC_s: Örneğe ait eğri altında kalan alan

AUC_{st}: Standarta ait eğri altında kalan alan

C_{st}: Standart konsantrasyonu (g/ml)

3.6.5.3. In Vitro Salım Deneyleri

GEM misel formülasyonları hazırlandıktan sonra 2.000 Da MWCO değerine sahip diyaliz tüp içine yerleştirildi. Salım ortamı olarak 8 mL PBS kullanıldı. Tümör ortamını ve kan ortamını taklit etmesi üzerine pH değeri 5.5 ve 7.4 olmak üzere iki ayrı salım ortamı hazırlandı. pH ayarlanması HCl ile yapıldı. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan 1 ml örnek alındı ve sink koşulların devamının sağlanması için örnek alımını takiben 1 ml taze ortam tekrar salım ortamına eklendi. Örnekler 0,2 µm filtrelerden

süzüldükten sonra HPLC ile analiz edildi ve ortama salınan GEM miktarı kümülatif olarak bulunarak grafiğe geçirildi. In vitro salım çalışmaları 3 kere tekrar edildi.

Vismodegib (GDC-0449) misel formülasyonları %2 Tween 80 içeren PBS içinde hazırlandı. 2.000 Da MWCO değerine sahip diyaliz tüp içine yerleştirildi. Salım ortamı olarak %2 Tween 80 içeren 8 mL PBS kullanıldı. Tümör ortamını ve kan ortamını taklit etmesi üzerine pH değeri 5.5 ve 7.4 olmak üzere iki ayrı salım ortamı hazırlandı. pH ayarlanması HCl ile yapıldı. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan 1 ml örnek alındı ve sink koşulların devamının sağlanması için örnek alımını takiben 1 ml taze ortam (%2 Tween 80 içeren) tekrar salım ortamına eklendi. Örnekler 0,2 µm filtrelerden süzöldükten sonra HPLC ile analiz edildi ve ortama salınan vismodegib miktarı kümülatif olarak bulunarak grafiğe geçirildi. In vitro salım çalışmaları 3 kere tekrar edildi.

- %2 Tween 80'in vismodegib misel stabilitesi üzerine etkisini değerlendirmek üzere 10 gün boyunca boyut ölçümü yapıldı.
- GEM miselleri ve Vismodegib misellerinin genel stabilitelerinin değerlendirilmesi için başlangıç, 15. Gün, 30. Gün, 60. Gün ve 90. Günlerde boyut ve ilaç miktarı analizi yapıldı.

3.7. In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

3.7.1. Kullanılan Hücre Hattı ve Hücre Kültür Koşulları

Tez çalışmasında formülasyonların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksitelerinin ve protein ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin saplanması amacıyla MIA PaCa-2 hücre hattı kullanıldı. MIA PaCa-2 hücreleri, pankreas tümör dokusu epitel hücreleridir. 1975 yılında 65 yaşındaki Kafkas kökenli pankreas kanseri hastasından izole edilmiştir.

Hücre hattının büyütülmesinde kullanılan hücre kültürü ortamı aşağıda verilmiştir.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

%10 FBS (h/h) (Fetal Bovin Serum)

50 U/mL Penisilin

50 g/mL Streptomisin

2 mM L-Glutamin

Hücreler bu ortamlar kullanılarak 25, 75 ya da 150 cm²' lik yüzey alanına sahip T25, T75 ya da T150 hücre kültürü kaplarında, 37 °C' de %5 CO₂ içeren inkübatörlerde büyütüldü. Konfluent hale geldiklerinde yani kabın yüzeyinin %80'ini kapladıklarında pasajlama yapıldı.

Hücrelerin kaplanan yüzeylerinin kaldırılarak pasajlanabilmeleri için öncelikle flask tabanına yapışarak konfluent hale gelen hücreler PBS ile yıkandı. %0,005 Tripsin ve %0,002 EDTA içeren çözelti uygulandı ve inkübatörde hücreler kap yüzeyinden ayrılana kadar bekletildi. Bu süre yaklaşık 5 dakikadır. Hücreler kabın yüzeyinden ayrıldıktan sonra ortamdaki tripsin ve EDTA'yı inaktive etmek için, besiyeri eklendi ve santrifüj tüplerine konularak santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve santrifüj tüpünün dibindeki hücre pelleti gerekli miktarda besiyeri ile süspande edildi ve hücreler hücre kültürü flasklarına aktarıldı veya plakalara konularak gerekli deneyler yapılmak üzere inkübatöre kaldırıldı.

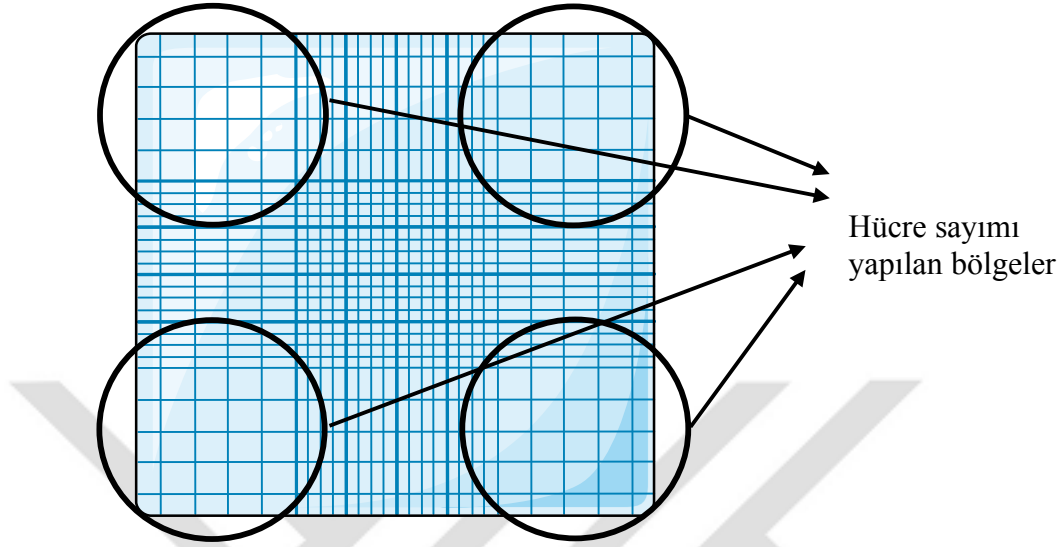
3.7.2. Formülasyonların ve Kombinasyonlarının Sitotoksitelerinin Araştırılması

Tripsinasyon işlemi uygulanan hücreler hemasitometre ile sayılır. Hemasitometre ile hücre sayımı rasyoneli Bölüm 2.5.4.3 de anlatılmıştır. Sitotoksite araştırmak üzere 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna 5,000 hücre/100 µl olacak şekilde ekim yapıldı. Sonrasında her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri eklendi ve hücreler bir gün boyunca plakaların tabanına tutunmaları için inkübatörde tutuldu. Bu süre sonunda kuyucuklardaki ortam atıldı. PBS içinde hazırlanan misel formülasyonları (GEM miselleri ve Vismodegib miselleri ve kombinasyonları) kullanılan ortam içerisinde istenilen konstrasyonlarda seyreltilerek hazırlandı ve toplamda 200 µl hacimde kuyucuklara uygulandı.

Hücreler formülasyonlarla 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edildikten sonra canlılık MTT yöntemi ile tayin edildi.

MTT (Metil Tiazol Tetrazolyum Bromür) PBS içinde 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Her bir kuyucuğa 25 µl hacimde eklendi. Plak alüminyum folyoya sarılarak 4 saat inkübatörde tutuldu. İnkübasyonu takiben plaka santrifüj edildi (1,000 rpm, 2 dakika). Üzerine 100 µl DMSO eklendi. Yarım saat çalkalayıcıda tutuldu. Bu sürenin sonunda plakalar alındı ve mikroparka okuyucuda 570 nm'de kuyucuklarken çözeltilerin absorbanları okundu.

Sonuçlar değerlendirilirken kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek karşılaştırmalı olarak grafiğe geçirildi.



Şekil 3-3: Hemasitometre ile hücre sayısı tayini

3.7.3. Formülasyon Uygulanması ile Hücrelerdeki Protein Ekspresyonundaki Değişikliklerin Western Blot Analizi ile Kontrolü

Formülasyonların MIA PaCa-2 hücre hattı protein ekspresyonda meydana getirdiği değişikliğin araştırılması için Western Blot yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200,000 hücre ekildi. 1 gün hücrelerin tutunması sağlandıktan sonra ertesi gün formülasyonlar uygulandı. 3 günlük tedavi sonunda formülasyon içeren besiyeri uzaklaştırıldı. 4°C’de soğutulmuş PBS ile kuyucuklar yıkandı. Her bir kuyucuğa 150 µl RIPA tamponu ve 2 µl proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Bu işlem 4°C’de gerçekleştirildi. Pipet ucu ile kuyucuk iyice kazındı ve bir ependorfa aktarılarak buz üstüne konuldu. Kullanılan RIPA tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli bileşimi aşağıda verilmiştir.

RIPA Tamponu

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM sodyum klorür

%1 NP-40

%0,5 sodyum deoksikolat

%0,1 sodyum dodesil sülfat

Proteaz İnhibitör Kokteyli

AEBSF [4-(2-Aminoetil) benzensülfonil florid hidroklorür]

Aprotinin

Bestatin hidroklorür

E-64

EDTA

Leupeptin hemisülfat tuzu

Buz üstündeki örnekler 30 dakika boyunca çalkayıcıda tutularak acitasyon uygulandı. Yine 4°C’de 15,000 rpm de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı ve hemen o an kullanılmayacaksa -80 °C’de saklandı.

Analiz yapılacak örnekler içindeki total protein miktarının bilinmesi önemlidir. Çünkü ancak bu sayede eşit miktarda protein analiz edilerek ekspresyondaki değişiklik objektif olarak araştırılabilir. Ayrıca jele uygulanacak olan volümün bir sınırı vardır. Bu sebeple protein miktarı hesaplanmalı ve uygulanacak hacim de iyi hesaplanmalıdır.

BCA kiti ile protein analizi için öncelikle bir albümin kullanılarak bir standart eğri çizilmelidir. Bunun için 2 mg/ml konsantrasyondaki 1 ml’lik albümin ampulünden bir seri değişik konsantrasyonlarda örnekler hazırlandı. Örnekler aşağıdaki gibidir.

Tablo 3-3: Protein tayini için referans standartların hazırlanması

Vial	Seyreltme hacmi (μ l)	BSA kaynağından alınan hacim (μ l)	Final BSA Kons. (μ g/ml)
A	0	Stoktan 300	2000
B	125	Stoktan 375	1500
C	325	Stoktan 325	1000
D	175	B'den 175	750
E	325	C'den 325	500
F	325	E'den 325	250
G	325	F'den 325	125
H	400	G'den 100	25
I	400	0	0

Standartlar hazırlandıktan sonra çalışma ajanı hazırlandı. Bunun için 50 kısım reagent A'dan 1 kısım ise reagent B'den alındı ve karıştırıldı. Yukarıda A'dan I'ya kadar verilen örneklerden 25 μ l alındı, 96 kuyucuklu plakaya konuldu ve üzerine 200 μ l çalışma çözeltisi eklendi. Alüminyum folyo ile kaplanan plaka 30 dakika 37 °C'de çalkalandı. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Mikroplaka okuyucuda 562 nm'de okutuldu. Okunan değerlerden standart eğri hazırlandı.

Santrifüj edilen protein örnekleri de aynı işleme tabi tutuldu. Yani her bir örnekten 25 μ l alındı, 96 kuyucuklu plakaya konuldu ve üzerine 200 μ l çalışma çözeltisi eklendi. Alüminyum folyo ile kaplanan plaka 30 dakika 37 °C'de çalkalandı. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Mikroplaka okuyucuda 562 nm'de okutuldu. Absorbans değeri standart eğri denkleminde konularak o örnekteki protein konsantrasyonu hesaplandı. Her bir protein örneğinden 40 μ g almak üzere hacim hesaplandı. En büyük hacim üzerinden eklenmesi gereken Laemmli tamponu (4X) hacmi hesaplandı. Şöyle ki, her bir örnek eşit hacimde laemmli içermelidir. Bunun için en fazla hacim alınan protein örneğinin hacmi 4'e bölünerek eklenmesi gereken Laemmli tamponu hacmi hesaplandı. Her bir protein lizatına bu hacimde Laemmli tamponu eklenildikten sonra total volümü eşit tutmak için PBS kullanıldı. Eperdorflar dikkatlice vortekslendi ve 5 dakika 95 °C'de kaynatıldı. %4-15 mini Protean poliakrilamid jeli kuyucuklarına uygulandı. 100 V ile 90 dakika akım uygulandı. Ayırım boyunca voltaj sabit tutuldu. Jel kuyucuklarından birine molekül

ağırlığı standartı uygulandı ve o da akıma tabi tutuldu. Jelde ayrıışan proteinler iBlot jel transfer sistemi ile poliviniliden floride membranlara transfer edildi. Transfer sonrasında proteinleri içeren membran Odyssey bloklayıcı çözeltisi ile 1 saat süresince blokladı. Aynı bloklayıcı çözeltisi içinde antikor seyreltmesi yapıldı. Spesifik antikorlar için yapılan seyreltmeler Tablo 3-4 te gösterilmiştir.

Tablo 3-4: Western Blot analizinde kullanılan primer antikorlar, katalog numaraları, kaynakları ve seyreltme oranları

Antikor	Kat. Numarası	Kaynağı	Seyreltme Oranı
Gli-1	SC-20687	Tavşan-Poliklonal	1:1000
Bax	SC-6236	Tavşan-Poliklonal	1:1000
Total PARP	CS-9532S	Tavşan-Poliklonal	1:1000
Patched-1	SC-6147	Tavşan-Poliklonal	1:1000
β-aktin	SC-1616	Keçi-Poliklonal	1:1000

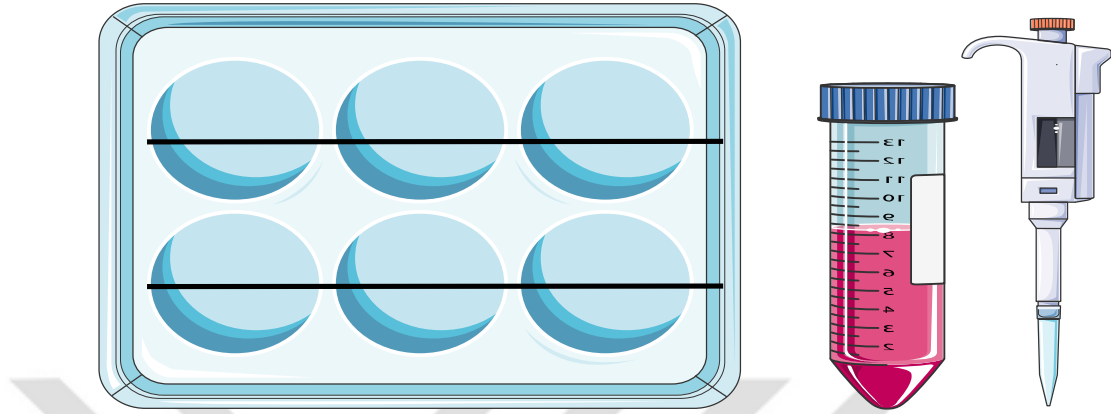
Bloklama sonrası membranlar doğrudan primer antikor çözeltisi ile 4 °C’de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün 4 kere her biri 5 dakika olmak üzere TBS-T tamponu ile yıkandı. Primer antikoru üretildiği türe özgü sekonder antikor 1:10,000 oranında bloklayıcı tamponunda seyreltildi ve membran ile 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda membran 4 kere her biri 5 dakika olmak üzere TBS-T tamponu ile yıkandı. Sekonder antikora konjuge florasan sayesinde görüntüleme yapıldı.

3.7.4. İnvazyon, Migrasyon ve Koloni oluşumu Araştırılması

Transwell membran filtre insertleri kullanılarak formülasyonların hücre invazyonuna etkileri saptandı. Bu membran filtreler 8 µm çaplı porlar içerir. Membranın üzerine 100 µl matrigel eklendi. Matrigel burda jelleşerek bir matriks bazal membran teşkil eder. Matrigel içine veya diğer odacığa ancak invazif özelliği olan hücreler geçebilmektedir (Şekil 4-19).

Migrasyon deneyi için 6 kuyucuklu plakanın altına her bir kuyucuğu ikiye bölecek şekilde düz çizgi çizildi. Her bir kuyucuğa 100,000 hücre ekildi. Ertesi gün 10 µl’lık pipet ile çizgilerin üzerinden gidildi. Böylece her bir kuyucukta eşit aralıkta bir açıklık yaratıldı. Kontrol grubuna hiçbir formülasyon uygulanmaması suretiyle diğer kuyucuklara formülasyonlar uygulandı. Başlangıçtaki, 24 saat tedavi süreci sonundaki ve

48 saat tedavi süreci sonunda mikroskop ile yaratılan açıklığa göç etmiş hücreler sayıldı. Kontrol grubu %100 migrasyona uğramış kabul edilerek grafik hazırlandı (Şekil 4-20).

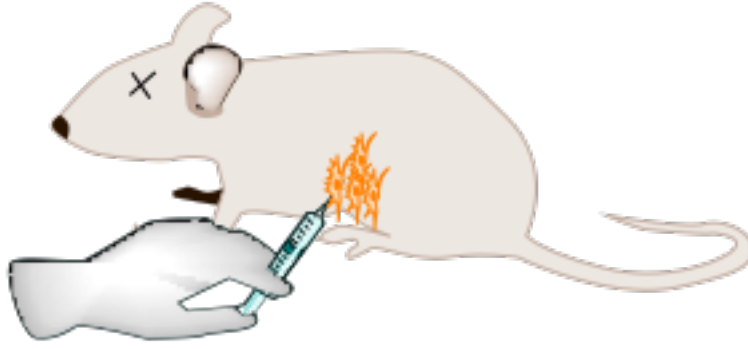


Şekil 3-4: Migrasyon deneyi dizaynı

Koloni oluşumun araştırılması için 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 250 hücre ekildi. Formülasyonlar uygulandı. Kontrol grubuna hiçbir şey uygulanmadı. 10 gün sonra kuyucuklar PBS ile yıkandı. 10 dakika metanol ile inkübe edildi. Sonraki 10 dakika formaldehit ile inkübe edildi. Son 10 dakika ise Kristal Violet ile inkübe edildi. Kristal violet %2 lik etanol içinde %0.2 oranda bulunur. Renklenen koloniler sayıldı. Kontrol grubundaki koloni sayısı %100 kabul edilerek, tedavi grupları ile karşılaştırıldı ve grafiğe geçirildi (Şekil 4-21).

3.8. İn Vivo Çalışmalar

Hayvan deneyleri Amerika Birleşik Devletleri University Of Nebraska Medical Center'da yürütüldü. Bunun için Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) komitesinden hayvan deneylerinin etik kurallara uygun yürütülmesi için protokol onayı alındı. Tez çalışmasında 8-10 haftalık erkek atimik nude fareler kullanıldı. Hayvanlarda subkütan tümör oluşturmak üzere her birinin sağ karın bölgesine 3×10^6 MIA PaCa-2 hücresi 100 μ l PBS içinde iken 100 μ l Matrigel bazal matriks ile karıştırılarak subkütan olarak enjekte edildi.



Şekil 3-5: Subkütan yol ile MIA PaCa-2 hücresi enjeksiyonu

Hayvanlarda tümör oluşumu günlük olarak gözlemlendi. Vernier kaliper ile ölçüm yapıldı. Tümör boyutları $200-300 \text{ mm}^3$ e ulaştınca hayvanlar rastgele her grupta 6 fare olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Bu gruplar:

- Boş misellerin uygulandığı kontrol grubu (n=6)
- GEM misellerinin uygulandığı grup (n=6)
- Vismodegib (GDC-0449) misellerinin uygulandığı grup (n=6)
- Kombinasyon tedavisinin (GEM + GDC-0449 miselleri 50:50) uygulandığı grup (n=6)

Formülasyonlar intratümoral yol ile haftada 3 kere olmak üzere 2 hafta uygulandı. Dozlamalar GEM miselleri için 40 mg/kg GEM ekuavalan, GDC-0449 miselleri için 10 mg/kg GDC-0449 ekuavalan, kombinasyon tedavisi için ise 40 mg/kg GEM ekuavalan ve 10 mg/kg GDC-0449 ekuavalan olarak belirlendi. Tümör boyutu iki günde bir ölçüldü. Farelerin vücut ağırlıklarındaki değişimde 2 günde bir ölçüldü. Tedavi sonlandıktan 2 gün sonra hayvanlara etik kurallara uygun olarak ötenazi edildi. Tümör dokuları çıkarılarak tartıldı. Boyutlarındaki değişimin görsel olarak kanıtını sağlamak üzere fotoğrafları çekildi. İleri analizler için -80°C 'de donduruldu.

3.8.1. Histokimya ve İmmünoflorasan Çalışmaları

3.8.1.1. Gli-1 ve Aktif Caspase-3 İmmünoflorasan İşaretlemesi

Her bir tedavi grubunun tümörü ve kontrol grubu tümöründen küçük parçalar makas ile kesildi ve OCT bileşiği ile küvetler içine yerleştirildi. Kuru buz üzerinde kısa süre bekletilerek OCT bileşiğinin donması sağlandı. Sonrasında ileriki analizler için bu küvetler -80 °C’de saklandı. Tümörlerden 4 µm kesitler alındı. Proteinlerin ekspresyonundaki değişimlerin in vivo araştırılması için bazı antikorlar kullanılarak immünoflorasan çalışmaları yapıldı. Bunun için aşağıdaki yol izlenmiştir.

- -80 °C’den çıkarılan tümör kesitlerini içeren lamalar 30 dakika 4 °C’de tutuldu.
- 5 dakika boyunca lam ısıtıcı üzerinde tutuldu.
- -20 °C’de soğutulan aseton içinde 30 dakika tutularak fikse edildi.
- PBS ile 3’er kere yıkandı.
- Permeabilizasyon için TBS + 0.025% Triton X- 100 ile 5’er dakikadan 2 kere yıkandı.
- %10 keçi serumu ve %1 BSA içerek TBS ile 2 saat oda sıcaklığında bloklandı.
- Optimize edilen seyretme oranlarında hazırlanan primer antikor solüsyonları ile gece boyunca 4 °C’de inkübe edildi.
- Ertesi gün TBS + 0.025% Triton X- 100 ile 5’er dakikadan 2 kere yıkandı.
- Anti-tavşan IR boyası konjuge olan sekonder antikor solüsyonu ile inkübe edildi.
- Lamlar florasan mikroskop ile gözlemlendi.

Primer antikor seyreltme oranı olarak Gli-1 (SC-20687) ve Aktif Caspase-3 (SC-1225) için 1:50 oran kullanıldı.

Doku morfolojisini incelemek üzere 4 µm kalınlığındaki kesimler hematoksilin ve eosin (H&E) ile işaretlendi ve kör analiz yapıldı.

3.8.1.2. Hematoksilin ve Eosin (H&E) Boyama Yöntemi

Kullanılacak Çözeltilerin ve Reagentların Hazırlanması

%1 Hidroklorik asit içeren Etanol

- 1 ml Hidroklorik asit ve 50 mL %70 etil alkol karıştırıldı.

%0.2 Amonyum hidroksit çözeltisi

- 2 ml amonyum hidroksit 1000 ml distile su ile karıştırıldı.

Doymuş Lityum karbonat çözeltisi

- 1.54 g lityum karbonat 100 ml distile suda çözündürüldü.

Eosin stok çözeltisi

- 1 g Eosin Y 100 ml distile suda çözündürüldü.

Floksin stok çözeltisi

- 1 g floksin B 100 ml distile suda çözündürüldü.

Eosin-Floksin B çalışma çözeltisi

- 100 ml eosin stok çözeltisi, 10 ml floksin stok çözeltisi, 780 ml %95 etil alkol 4 mL glacial asetik asit karıştırıldı.

Hematoksilin çözeltisi

- 100 g potasyum 1000 ml distile suda sıcakta çözündürüldü. 50 ml %10 alkolik hematoksilin çözeltisi eklendi, 1 dakika kaynatıldı. Isı kapatıldı. 2.5 g merkürük oksit eklendi. Çözelt koyu mor renk alana kadar ısıtıldı. Soğuk su banyosunda soğutuldu ve 20 ml glacial asetik asit eklendi ve kullanmadan önce filtreden geçirildi.

Kesitler deparafinize edildi. Her biri 10 dakika olmak üzere iki kere ksilen değiltirildi. %95 alkol ile 2 dakika bekletildi ve %70 alkolde 2 dakika bekletildi. Distile su ile dikkatlice yıkandı. 8 dakika Harris hematoksilin çözeltisi ile işaretlendi. 30 saniye %1 asit içeren alkolde bekletildi. 1 dakika musluk altında tutuldu. %0,2 amonyum hidroksit çözeltisinde 1 dakika kadar bekletildi. 5 dakika musluk altında tutuldu. 10 kere %95 alkole daldırıldı. Eosin-Floksin B çalışma çözeltisi ile 1 dakika kadar tutuldu. Herbiri 5 dakikadan 2 kere %95 alkol değiştirildi. Ksilen mounting ortamıyla işaretlendi. Çekirdek mavi renk, sitoplazma ise pembe renk aldı.

3.8.1.3. Ki-67 ve ZEB-1 İşaretleme

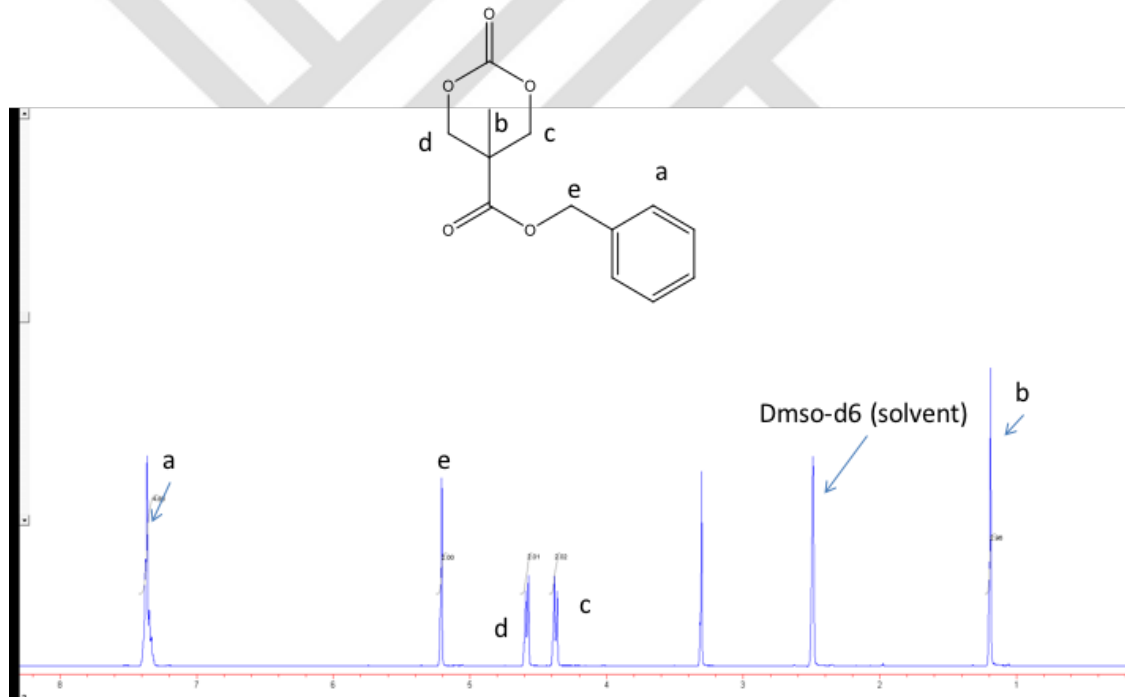
Hücre proliferasyon belirteci Ki-67 (ab-15580) 1:50 oranında seyreltilerek lamlara uygulandı. Epitel-mezenkimal aktivatörü ZEB-1 (sc-25388) 1:150 oranında seyreltilerek lamlara uygulandı. Anti-tavşan horse radish peroxidase (HRP) konjuge sekonder antikor 1:500 oranında %2 BSA içeren PBS içinde seyreltildi ve 45 dakika oda sıcaklığında lamlarla inkübe edildi. Lamlar mikroskop altında incelendi.



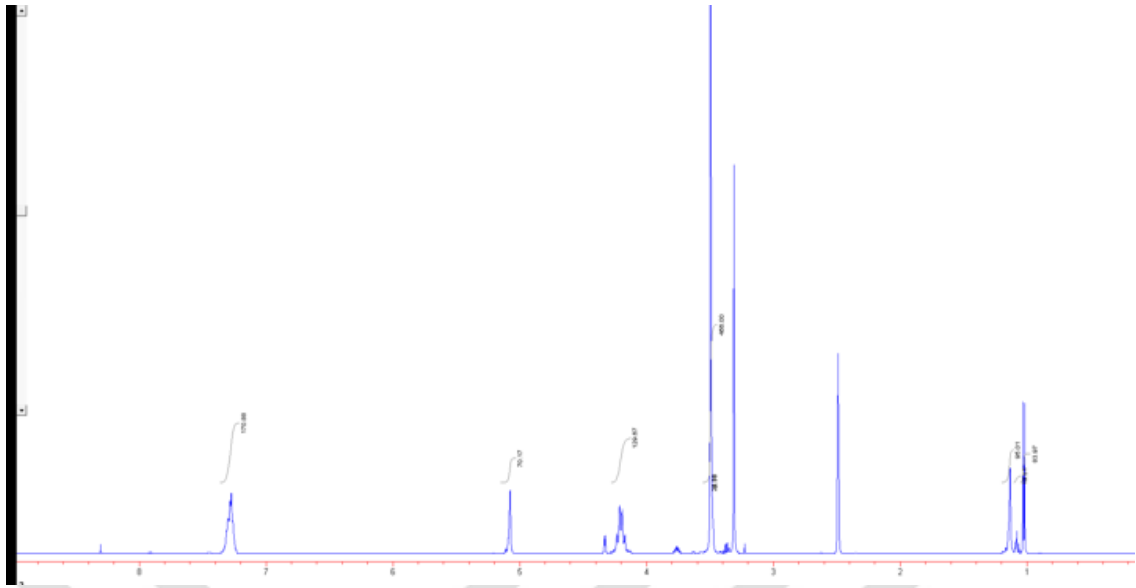
4. BULGULAR

4.1. MBC, PEG-MBC ve PEG-PCC Bileşiklerinin Karakterizasyonları

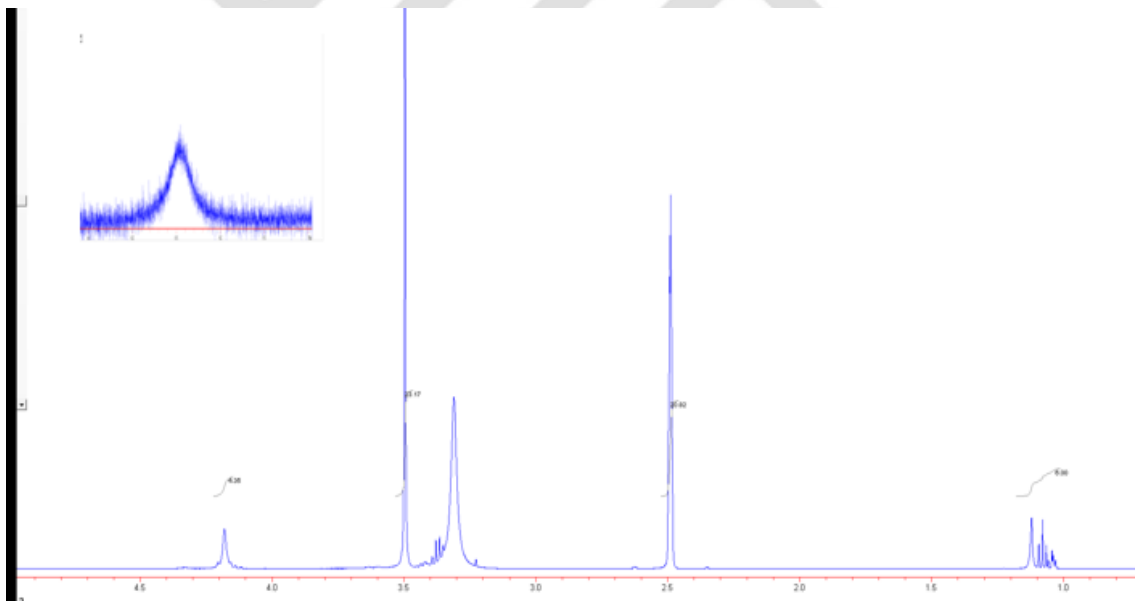
Bölüm 3.3 de verilen yönteme göre MBC, PEG-MBC ve PEG-PCC bileşiklerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez ardından gerçekleştirilen ^1H -NMR karakterizasyonu ile elde edilen spektrumlar MBC için Şekil 4-1 de, PEG-MBC için Şekil 4-2 de ve PEG-PCC için ise Şekil 4-3 te verilmektedir. Bu spektrumlara göre PEG' in $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ piki 3.5 ppm'de, PCC'nin $-\text{CH}_2-$ piki ise 4.2 ppm' de gelmiştir. Hidrojenizasyon prosesi ile benzil grubunun 7.3 ppm' de gözüken piki 13 ppm' e kaymıştır. Yapılan hesaba göre mPEG-PCC' nin ortalama molekül ağırlığı 10,196 Da olarak bulunmuştur ve 24 PCC ünitesi içermektedir. Bu değerler mPEG ve PCC ünitelere ait protonların integrasyonu alınarak bulunmuştur.



Şekil 4-1: MBC ^1H -NMR spekturumu



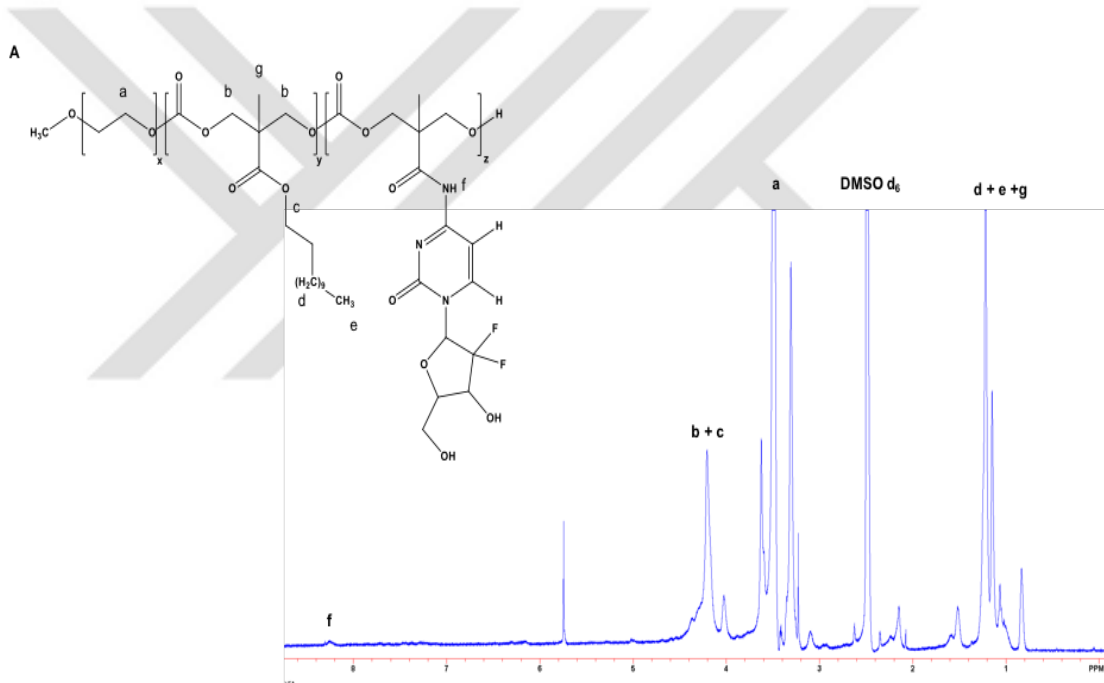
Şekil 4-2: PEG-MBC ^1H -NMR spekturumu



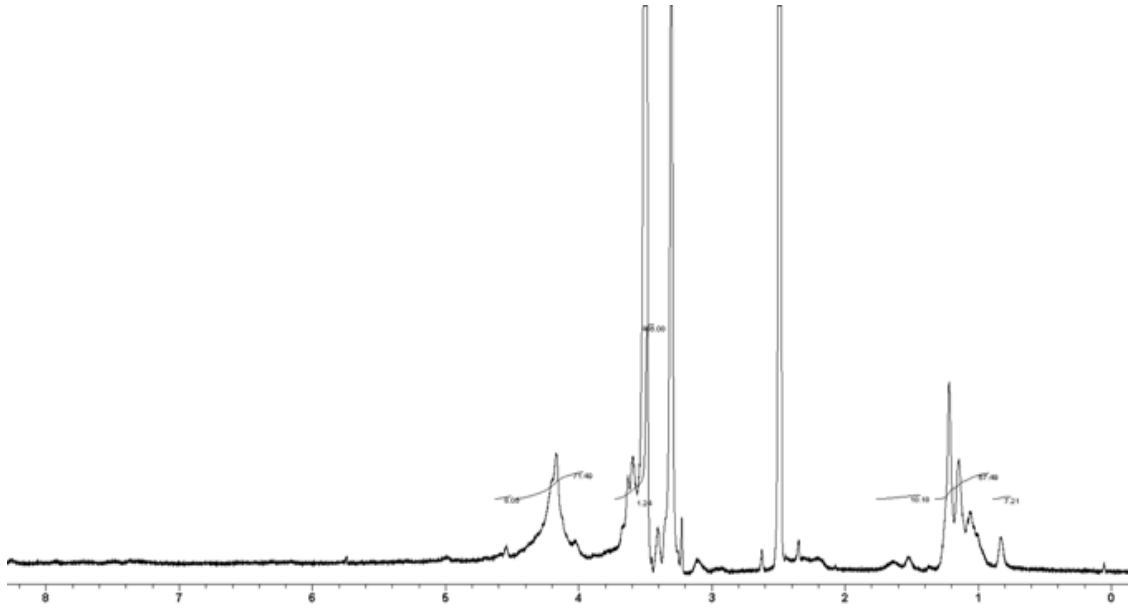
Şekil 4-3: PEG-PCC ^1H -NMR spekturumu

4.2. mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ve mPEG-b-PCC-g-DC Polimerlerinin Karakterizasyonları

Bölüm 3.3.5 ve Bölüm 3.3.7 de belirtilen yönteme göre gerçekleştirilen konjugasyon sonucu elde edilen mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ve mPEG-b-PCC-g-DC polimerlerine ait ^1H -NMR kromatogramları Şekil 4-4' te ve Şekil 4-5' te verilmiştir. Buna göre konjugasyondan sonra 8.4 ppm'de $-\text{NHCO}-$ 'ya ait bir hidrojen, 6.1 ppm'de $-\text{CH}'$ a ait bir hidrojen, 3.4-3.8 arasında PEG ünitesine ait $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ piki, 4.2-4.6 arasında PCC'ye ait $-\text{CH}_2$ piki, 1-1.5 arasında PCC ünitesinden $-\text{CH}_3$ ve dodekanol ünitesinden $-\text{CH}_2$ pikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4-4: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ^1H -NMR spekturumu

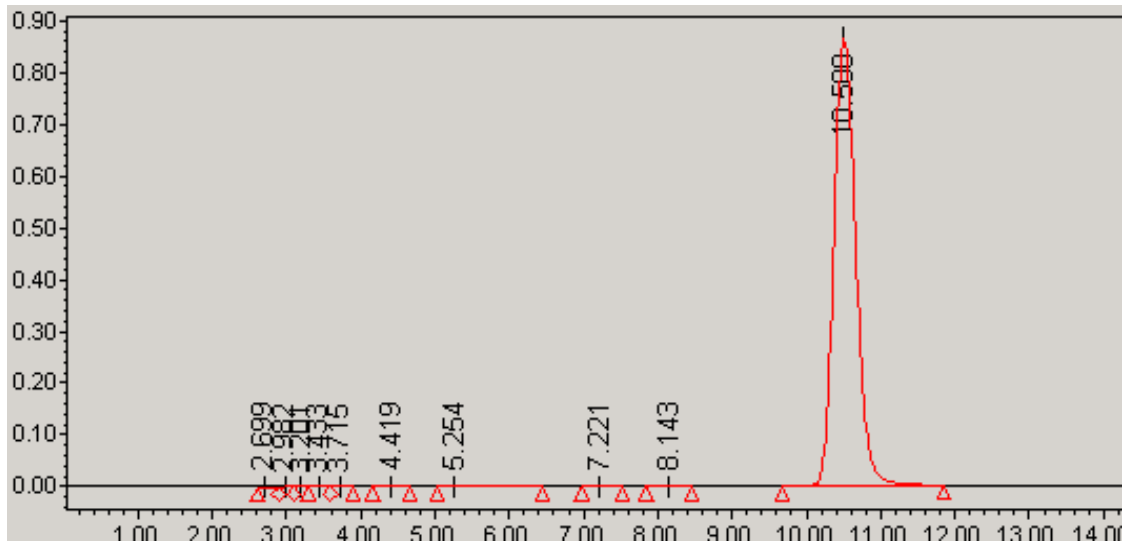


Şekil 4-5: mPEG-b-PCC-g-DC ^1H -NMR spekturumu

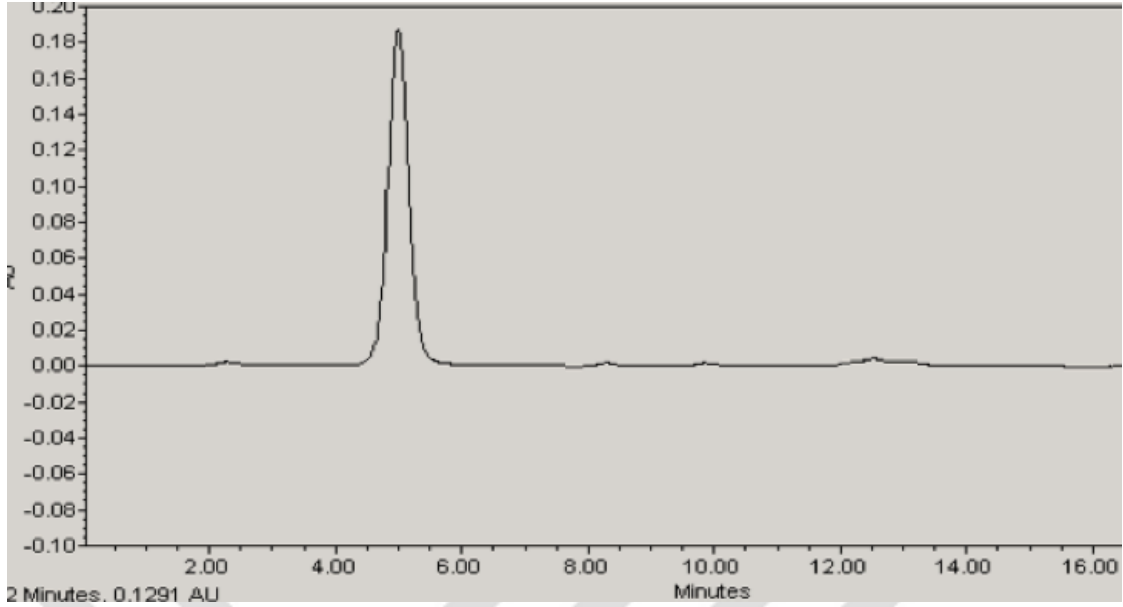
4.3. Analitik Miktar Tayini Yöntemleri

Bölüm 3.4.1 de verilen şartlar uygulanarak gempitabinin 1-200 $\mu\text{g/mL}$ konstrasyonları sisteme verilerek gempitabin standart eğrisi hazırlanmıştır.

Bölüm 3.4.2 de verilen şartlar uygulanarak vismodegibin 1-200 $\mu\text{g/mL}$ konstrasyonları sisteme verilerek vismodegib (GDC-0449) standart eğrisi hazırlanmıştır.



Şekil 4-6: GEM standart çözeltisinin örnek kromatogramı



Şekil 4-7: Vismodegib (GDC-0449) standart çözeltisinin örnek kromatogramı

Bölüm 3.4.3 de verilen yöntemlere göre incelenen validasyon parametreleri ile bulgular aşağıda verilmiştir.

4.3.1. Özgünlük (Seçicilik)

Kullanılan yöntemin etkin madde GEM'i özgün bir şekilde tayin edip etmediğinin araştırılması için hidroliz deneyi sonucunda polimere ait piklerde gemsitabine ait piklerin çakışmadığı görülmüştür. Kullanılan analitik yöntem gemsitabini özgün bir şekilde ve yeterli hassasiyetle tayin edebilmiştir.

Vismodegib (GDC-0449) tayinin de kullanılan analitik yöntem de etkin maddeyi özgü bir şekilde ve yeterli hassasiyetle tayin edebilmiştir. Salım çalışmasında kullanılan Tween 80 ile piklerin çakışmadığı gösterilmiştir.

4.3.2. Doğrusallık

Gemsitabin stok çözeltisinden ve vismodegib stok çözeltisinden hazırlanan standart çözeltilerin sisteme enjekte edilmesiyle elde edilen piklerin alanlarından kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Kalibrasyon denkleminin regresyon katsayısı değeri (R^2) 1'e yakın bir değer olması GEM konsantrasyonu ve vismodegib konsantrasyonu ile pik alanları arasındaki ilişkinin çalışan konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu

göstermektedir. R^2 değeri GEM için hazırlanan kalibrasyon eğrisi için 0,9999; Vismodegib için hazırlanan kalibrasyon eğrisi için 0,9999 bulunmuştur

4.3.3. Kesinlik

Tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirliğin incelendiği kesinlik parametresine ait sonuçlar ve yorumlar aşağıda verilmiştir.

4.3.3.1. Tekrar Edilebilirlik

Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermek için yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir. % RSD değeri %2'den düşük bulunmuştur. Bu sonuç doğrultusunda analitik yöntemin tekrar edilebilir olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-1: GEM için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1	51540,67	65,05	0,1
20	836896,2	1789,45	0,2
100	4268284	11467,91	0,3

Tablo 4-2: Vismodegib (GDC-0449) için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1	64373,83	168,51	0,3
20	1455792,17	9811,90	0,7
100	7214079,33	12148,52	0,2

4.3.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Yöntemin tekrar elde edilebilirliği göstermek için çalışılan gemitabine ve vismodegibe ait 1, 20 ve 100 µg/ml' lik konsantrasyonlara ait sonuçlar Tablo 4-3 de verilmiştir.

Tablo 4-3: GEM için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)

1 µg/ml

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1. gün	51527,67	68,15	0,1
2. gün	51525,67	52,16	0,1
3. gün	51522,17	48,88	0,1

20 µg/ml

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1. gün	837304,83	1581,82	0,2
2. gün	837627,17	1185,05	0,1
3. gün	837702	925,57	0,1

100 µg/ml

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1. gün	4273693,33	6582,74	0,2
2. gün	4275547,83	6392,13	0,1
3. gün	4274837,50	6520,07	0,2

Tablo 4-4: Vismodegib (GDC-0449) için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)

1 µg/ml

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1. gün	64264,5	426,03	0,7
2. gün	64275,33	529,89	0,8
3. gün	64299,67	509,17	0,8

20 µg/ml

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1. gün	1451158,67	5979,65	0,4
2. gün	1447861,5	6458,01	0,4
3. gün	1447827,33	4493,81	0,3

100 µg/ml

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama AUC	SD	%RSD
1. gün	7208915,33	47424,58	0,7
2. gün	7213671,83	48634,15	0,7
3. gün	7239773,5	55028,72	0,8

Tablo 4-3 ve Tablo 4-4 de verilen %RSD değerlerinin kabul sınırı olan %2' den küçük olması Gemsitabin ve Vismodegib analitik yöntemlerinin kesinliğini kanıtlamaktadır.

4.3.4. Doğruluk

Deneylerden elde edilen sonuçların standart sapma ve ortalama bağıl hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4-5: GEM için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen doğruluk sonuçları (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	AUC	Bulunan konsantrasyon	Geri elde (%)
1	51217	0,99	99
1	51358	1	100
1	51612	1,01	101
ORTALAMA			100
SS			1
% RSD			1

Konsantrasyon (µg/ml)	AUC	Bulunan konsantrasyon	Geri elde (%)
20	834565	19,6	98
20	839023	19,7	98,5
20	837702	19,7	98,5
ORTALAMA			98,3
SS			0,3
% RSD			0,3

Konsantrasyon (µg/ml)	AUC	Bulunan konsantrasyon	Geri elde (%)
100	4269147	101,06	101,1
100		101,45	101
100	4285924	100,86	101
ORTALAMA	4260890		101
SS			0,06
% RSD			0,1

Tablo 4-6: GDC-0449 için kullanılan HPLC yönteminde elde edilen doğruluk sonuçları

Konsantrasyon (µg/ml)	AUC	Bulunan konsantrasyon	Geri elde (%)
1	63816	1,19	119
1	64250	1,20	120
1	64526	1,20	120
ORTALAMA			119,7
SS			0,6
% RSD			0,5

Konsantrasyon (µg/ml)	AUC	Bulunan konsantrasyon	Geri elde (%)
20	1459970	20,48	102,1
20	1451125	20,35	101,75
20	1449991	20,34	101,7
ORTALAMA			101,85
SS			0,22
% RSD			0,2

Konsantrasyon (µg/ml)	AUC	Bulunan konsantrasyon	Geri elde (%)
100	7215772	99,97	99,97
100	7198854	99,73	99,73
100	7199333	99,74	99,74
ORTALAMA			99,81
SS			0,14
% RSD			0,1

Tabloda verilen değerler %15' in üzerinde bir sapma bulunmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar gemitabin ve vismodegib analizinde kullanılan analitik yöntemlerin doğruluğunu kanıtlamaktadır.

4.4. Etkin Madde İçermeyen Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

Öncelikle sentezlenen PEG-PCC polimeri ile misel oluşturulmaya çalışılmıştır. Fakat CMC değerinin ve boyutların yüksek olması sebebiyle polimere lipid grubu konjugasyonu yaklaşımı ile dodekanol konjuge edilmiştir.

Etkin madde içermeyen mPEG-b-PCC-g-DC miselleri oluşturmada film hidrasyon tekniği kullanılmıştır. Polimer filmi oluşturulduktan sonra bir gece vakum altında bekletilerek fosfat tamponu ile hidrate edilerek hazırlanan formülasyonlar şeffaf, saydam ve renksiz misel dispersiyonları oluşturmuşlardır. Boyut 20.21 ± 2.18 nm PDI: 0.08 bulunmuştur.

4.5. Etkin Madde İçeren Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı

4.5.1. GEM Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı

Gemsitabin mPEG-b-PCC-g-DC polimerine konjuge halde olduğundan misel hazırlamanın tek ve etkin yolu film hidrasyon metodudur. Bölüm 3.5.2 de verilen yöntem esasında da belirtildiği şekilde hazırlanan miseller oldukça şeffaf, saydam, renksiz bir dispersiyon oluşturmuşlardır. Hazırlama süresince hiçbir sorun ile karşılaşılmamıştır. Oldukça şeffaf bir dispersiyonunun hazırlanabilmesi konjugasyon sonrası final polimerin saflığı ile ilgilidir. İki defa izopropil alkol ve sonrasında dieterleter ile yapılan çöktürme işleminden sonra uygulanan diyaliz yöntemi ile konjuge olmamış etkin madde veya polimere ait kirliliklerden tamamen arınma sağlanabilmiştir. Fakat yine de formülasyon hazırlanması akabinde gerçekleştirdiğimiz 0,2 µm filtreden süzme işlemi yöntem stardizasyonu sebebiyle burda da uygulanmıştır.

4.5.2. Vismodegib (GDC-0449) İçeren Misel Formülasyonlarının Hazırlanışı

Vismodegib içeren misel formülasyonlarının hazırlanmasında Bölüm 3.5.3 de verilen üç farklı yöntem kullanılmıştır. Üç farklı yükleme oranı (polimer ağırlığının %2.5, %5 ve %10' u kadar) bu yöntemlerle denenmiş en etkili sonucu veren yöntem ve yükleme oranı biyolojik deneylerde kullanılmak üzere misellerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Tablo 4-7 de farklı yöntemlerle ve farklı yükleme oranlarında hazırlanan vismodegib formülasyonlarına ait yükleme etkinliği ve boyut değerleri verilmiştir.

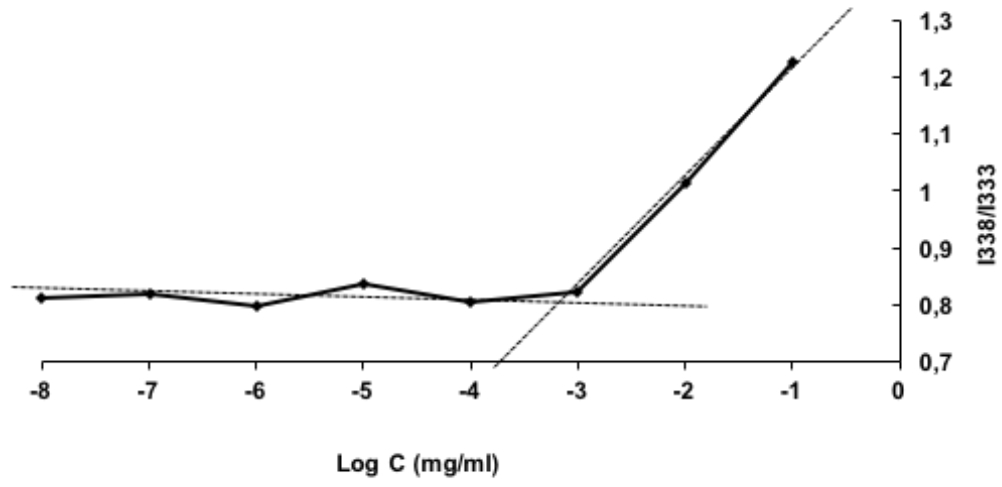
Tablo 4-7: Farklı yöntemlerle ve farklı yükleme oranlarında hazırlanan vismodegib formülasyonlarına ait yükleme etkinliği ve boyut değerleri (n=6)

Formülasyon	Hazırlama Yöntemi	Yükleme Oranı	Yükleme Etkinliği $\pm$ SD	Boyut $\pm$ SD (PDI) (nm)
F1	Film Hidrasyon	% 2.5	2.45 $\pm$ 0.05	35.17 $\pm$ 3.06 (0.14)
F2	Film Hidrasyon	% 5	4.91 $\pm$ 0.07	35.83 $\pm$ 1,6 (0.12)
F3	Film Hidrasyon	% 10	8.92 $\pm$ 0.1	43.33 $\pm$ 4.13 (0.11)
F4	Nanopresipitasyon	% 2.5	1.35 $\pm$ 0.06	54.67 $\pm$ 1.03 (0.17)
F5	Nanopresipitasyon	% 5	2.12 $\pm$ 0.09	59.33 $\pm$ 1.51 (0.17)
F6	Nanopresipitasyon	% 10	4.6 $\pm$ 0.05	65.5 $\pm$ 1.38 (0.15)
F7	Y/S Emülsifikasyon	% 2.5	1.47 $\pm$ 0.05	63.17 $\pm$ 3.06 (0.22)
F8	Y/S Emülsifikasyon	% 5	2.66 $\pm$ 0.08	60.17 $\pm$ 3.43 (0.28)
F9	Y/S Emülsifikasyon	% 10	4.98 $\pm$ 0.04	66.33 $\pm$ 2.25 (0.3)

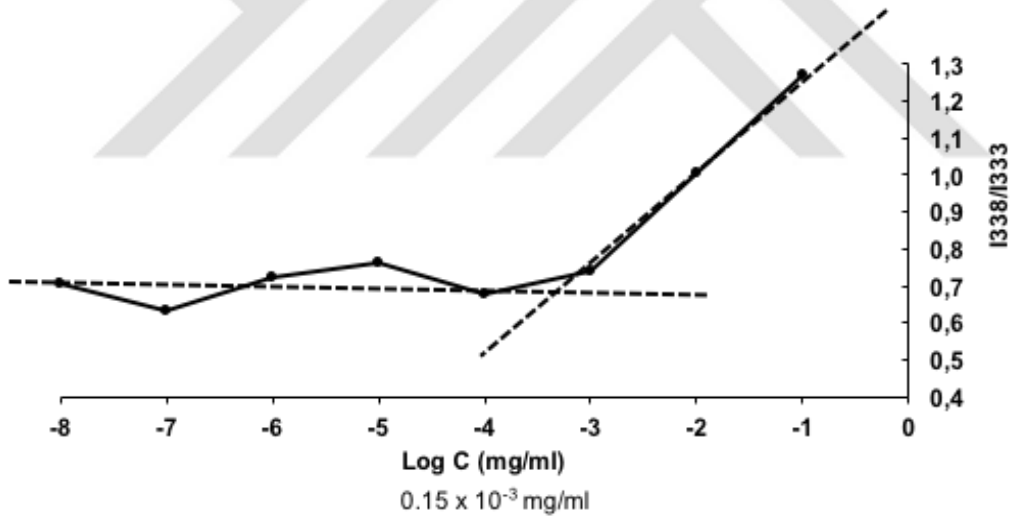
4.6. Hazırlanan Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonları

4.6.1. Kritik Misel Konsantrasyonlarının Tayini

Pyren metoduyla mPEG-b-PCC-g-DC'nin ve GEM ve DC konjugasyonu sonucu elde edilen mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC'nin kritik misel konsantrasyonları araştırılmıştır. Bu amaçla 10^{-1} - 10^{-8} mg/ml konsantrasyonları arasında hazırlanan formülasyonlara yapılan piren metodu analizi sonucu mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC'nin kritik misel konsantrasyonu 0.2×10^{-3} mg/ml, mPEG-b-PCC-g-DC'nin kritik misel konsantrasyonu 0.15×10^{-3} mg/ml bulunmuştur.



$0,2 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$



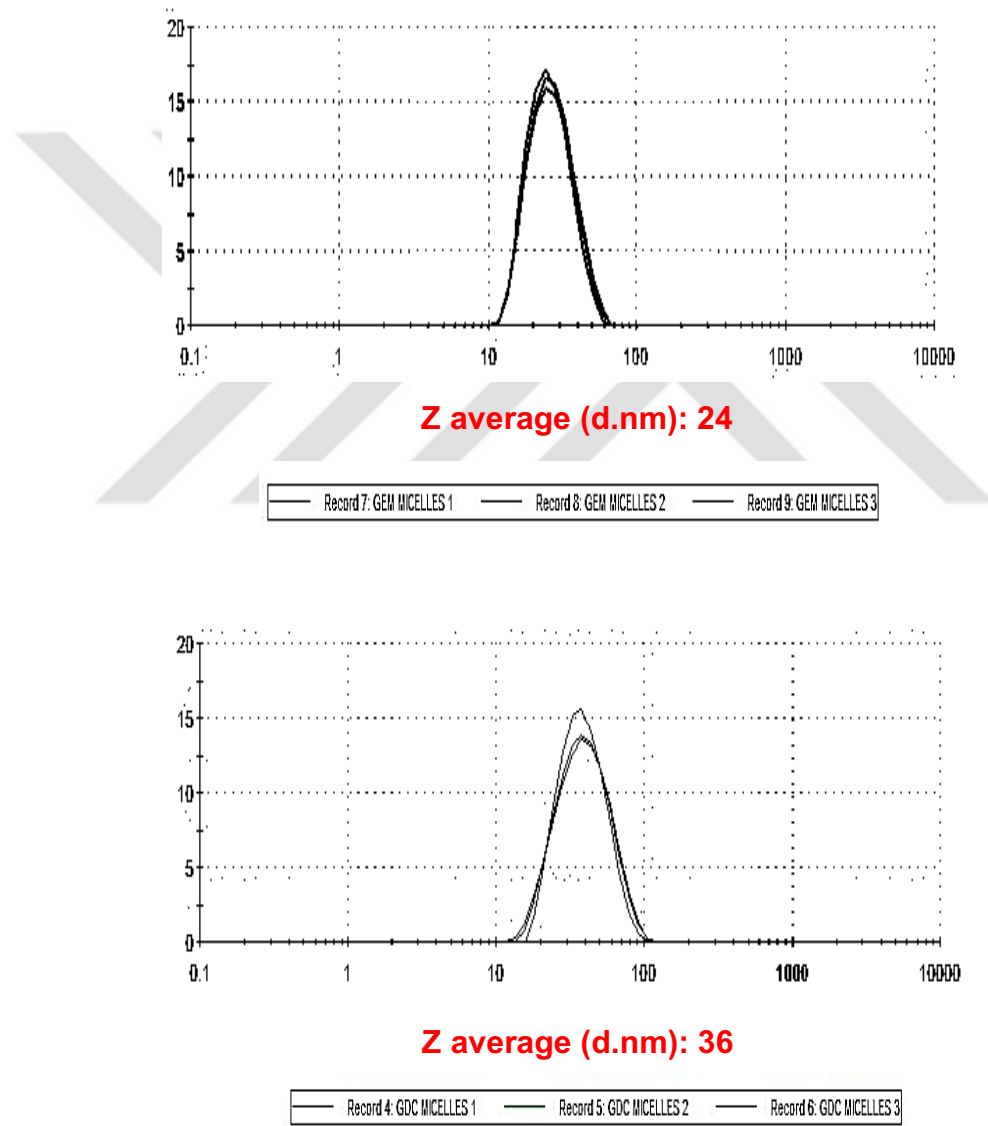
$0,15 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$

Şekil 4-8: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC ve mPEG-b-PCC-g-DC'nin kritik misel konsantrasyonu hesaplaması

4.6.2. Misellerin Partikül Büyüklüğü Ölçümleri

GEM misellerinin ve 3 farklı yükleme oranı kullanılarak yine üç farklı yöntem ile hazırlanan vismodegib misellerinin partikül boyutları ölçülmüştür. GEM miselleri ortalama $24 \pm 1,15$ nm boyuta sahip olarak bulunmuştur.

3 farklı yöntemle farklı yükleme oranları ile hazırlanan vismodegib (GDC-0449) misellerinin boyutları ise Tablo 4-7' de verilmiştir.



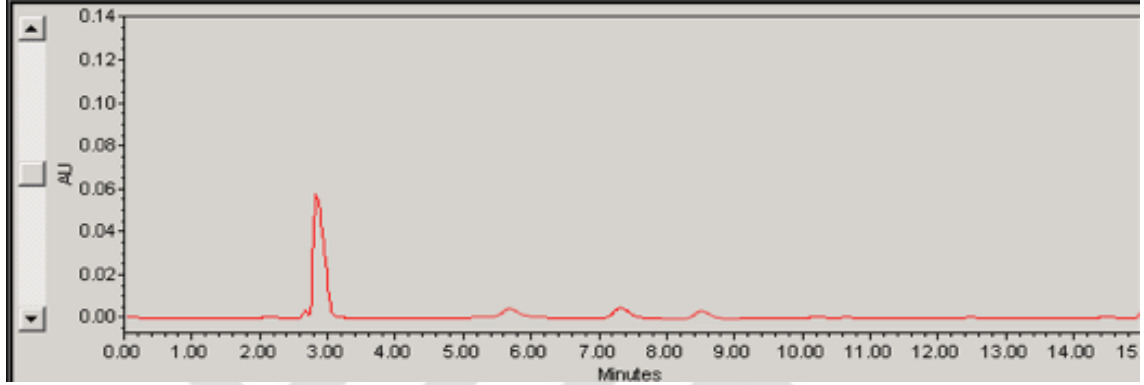
Şekil 4-9: mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC miselleri ve vismodegib enkapsüle mPEG-b-PCC-g-DC miselleri boyutları

4.6.3. GEM Yükleme Etkinliği ve Miseller Çözünürlüğünün Araştırılması

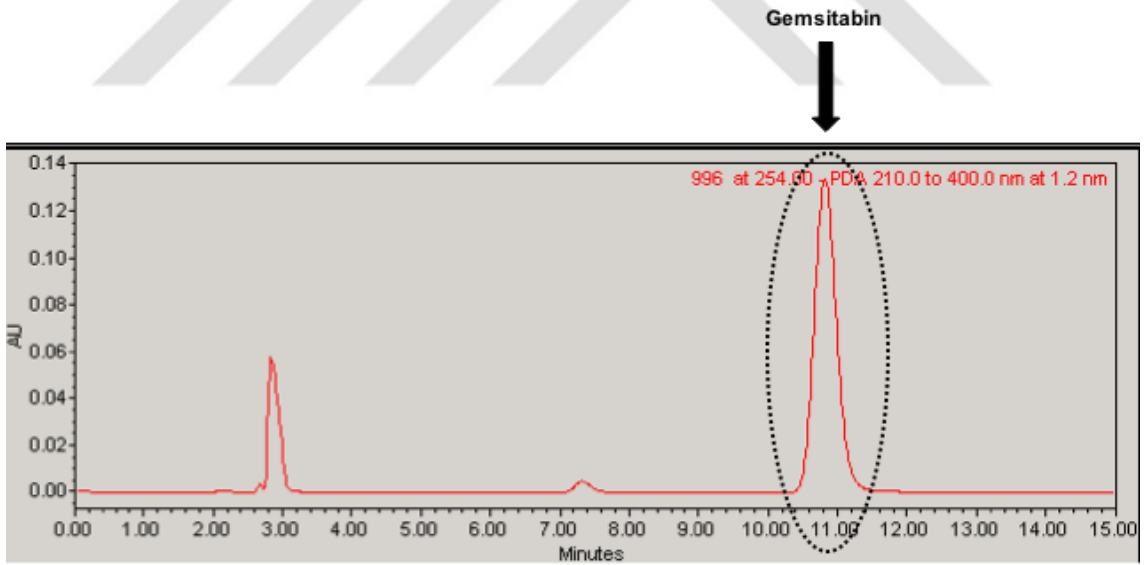
Alkali hidroliz yöntemi uygulanarak hidroliz edilen amid bağı sayesinde açığa çıkan toplam konjuge olmuş GEM miktarı HPLC yöntemi ile tayin edilmiş ve yüklenme etkinliği yüzde olarak hesaplanmıştır.

Buna göre gemsitabin yükleme oranı % 14 bulunmuştur.

(A)



(B)



Şekil 4-10: Alkali hidroliz yöntemi uygulanmadan misel formülasyonunun HPLC kromatogramı (A)

Alkali hidroliz yöntemi uygulanan misel formülasyonundan GEM açığa çıkması ile HPLC kromatogramında görülen GEM piki (B)

4.6.4. Vismodegib (GDC-0449) Yükleme Etkinliği ve Miseller Çözünürlüğünün Araştırılması

Vismodegib'in enkapsüle edildiği misel formülasyonlarının hazırlanışında kullanılan yöntem ve formülasyon kodları Tablo 4-7 de verilmiştir.

4.6.5. Stabilité Değerlendirmesi

Tablo 4-8: GEM misellerinin zaman ile boyut ve GEM yüzdesi değişimi (n=6)

Zaman (gün)	Boyut (nm) $\pm$ SD	PDI $\pm$ SD	%GEM miktarı $\pm$ SD
0	36,37 $\pm$ 1,12	0,105 $\pm$ 0,003	100,12 $\pm$ 0,182
15	37,27 $\pm$ 0,46	0,111 $\pm$ 0,003	100,64 $\pm$ 0,574
30	37,12 $\pm$ 0,79	0,125 $\pm$ 0,004	99,95 $\pm$ 1,249
60	39,02 $\pm$ 0,41	0,118 $\pm$ 0,011	99,81 $\pm$ 1,458
90	39,29 $\pm$ 0,65	0,115 $\pm$ 0,008	100,29 $\pm$ 1,543

Tablo 4-9: Vismodegib (GDC-0449) misellerin zaman ile boyut Vismodegib yüzdesi değişimi (n=6)

Zaman (gün)	Boyut (nm) $\pm$ SD	PDI $\pm$ SD	%GEM miktarı $\pm$ SD
0	24,40 $\pm$ 0,16	0,104 $\pm$ 0,004	99,11 $\pm$ 0,097
15	25,06 $\pm$ 0,14	0,106 $\pm$ 0,003	100,27 $\pm$ 1,257
30	25,39 $\pm$ 0,84	0,112 $\pm$ 0,002	98,44 $\pm$ 2,715
60	28,43 $\pm$ 0,16	0,152 $\pm$ 0,004	99,38 $\pm$ 3,694
90	29,30 $\pm$ 0,09	0,162 $\pm$ 0,006	100,2 $\pm$ 2,147

4.6.6. Misel Formülasyonlarından GEM ve Vismodegib (GDC-0449) Salımı

4.6.6.1. GEM Çözünürlük Çalışması

GEM suda oldukça etkili şekilde çözünabilmektedir. Bu sebeple çözünürlük çalışması için sürfaktan kullanımına gerek kalmamıştır. PBS içinde GEM çözünürlüğü 24,88 $\pm$ 0,12 mg/ml olarak bulunmuştur.

4.6.6.2. Vismodegib Çözünürlük Çalışması

Suda çözünürlüğü oldukça düşük olan Vismodegib'in çözünürlüğünü artırmak için Tween 80 kullanılmıştır. Kullanılacak Tween 80 oranı yapılan optimizasyon çalışmasıyla %2 olarak bulunmuştur. Bunun için farklı konsantrasyonlardaki Tween 80 çözeltileri kullanılan vismodegib çözünürlüğü tayin edilmiştir. Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçların grafiği aşağıda verilmiştir (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: pH 7.4 farklı yüzdelerde Tween 80 içeren PBS'de vismodegib çözünürlüğü (n=6)

% Tween 80	Çözünürlük (µg/ml)	%RSD
0,1	1	1,70
0,5	13,5	1,80
1	42	1,80
1,5	105,82	1,75
2	398,75	1,52
5	756	1,16

Tablo 4-11: pH 5.5 farklı yüzdelerde Tween 80 içeren PBS'de vismodegib çözünürlüğü (n=6)

% Tween 80	Çözünürlük (µg/ml)	%RSD
0,1	7,22	1,83
0,5	22	1,67
1	75	1,21
1,5	186	1,70
2	522	1,32
5	993	1,18

4.6.6.3. Tween 80'in Misel Stabilitesi Üzerine Etkisi

Tween 80'in misel stabilitesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi için polimer filmleri farklı oranlarda Tween 80 çözeltileriyle hidrate edilmiş ve partikül boyutu ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerin sonuçları aşağıda verilmiştir.

Tablo 4-12: Tween 80 oranının misel stabilitesi üzerine etkisi (n=6)

% Tween 80	Boyut (nm) $\pm$ SD	PDI $\pm$ SD
0,1	34.16 $\pm$ 1,6	0.147 $\pm$ 0.015
0,5	34.78 $\pm$ 1,2	0.151 $\pm$ 0.012
1	35.44 $\pm$ 0.9	0.147 $\pm$ 0.033
1,5	36.17 $\pm$ 1,2	0.142 $\pm$ 0.038
2	36.45 $\pm$ 1,7	0.163 $\pm$ 0.046
5	34.29 $\pm$ 3.6	0.327 $\pm$ 0.112

Bütün sonuçlara göz önüne alınarak vismodegib in in vitro salım çalışmalarında uygun Tween 80 oranı %2 olarak bulunmuştur.

% 2 Tween 80 içeren PBS içinde hazırlanan misellerin 10 gün boyunca boyut ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4-12’de verilmiştir.

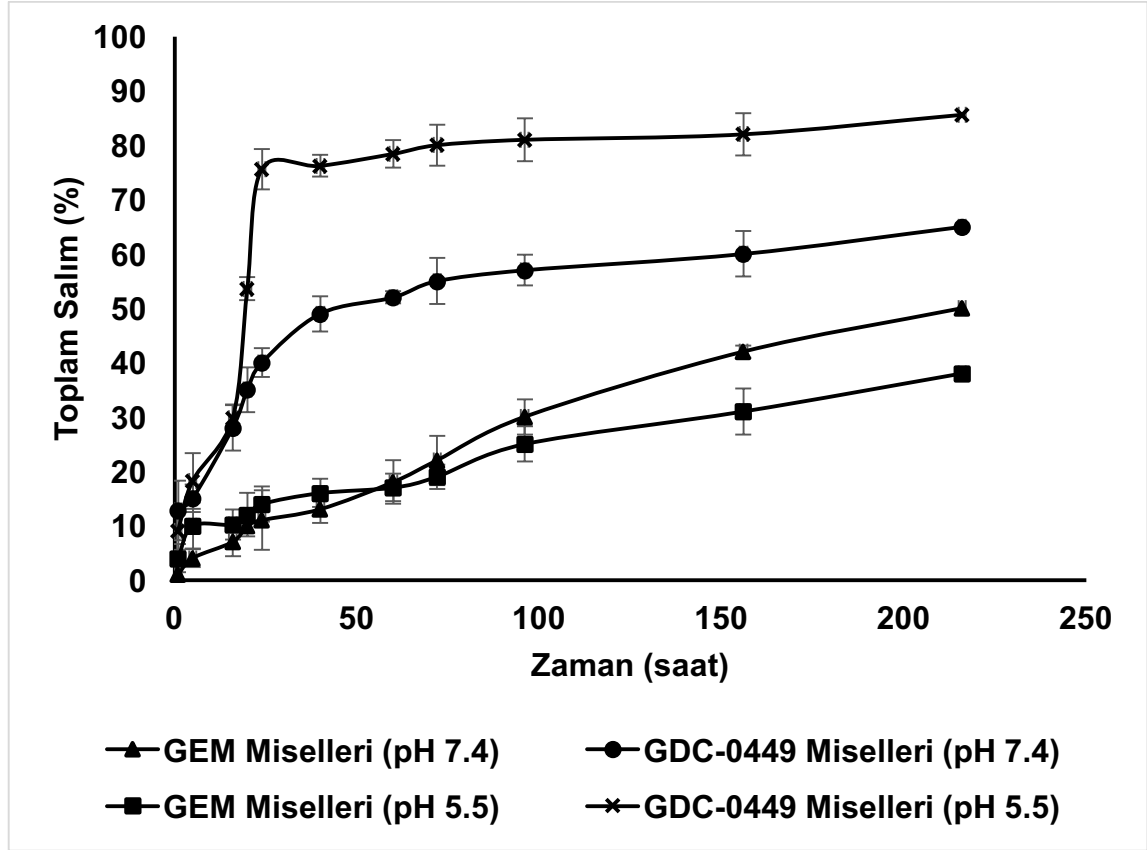
Tablo 4-13: % 2 Tween 80 içeren PBS içinde hazırlanan misellerin 10 gün boyunca boyut ölçümü (n=6)

Zaman (gün)	Boyut (nm) $\pm$ SD	PDI $\pm$ SD
1	34.16 $\pm$ 1,6	0.147 $\pm$ 0.015
2	34.66 $\pm$ 1,6	0.155 $\pm$ 0.010
3	36.33 $\pm$ 0.8	0.145 $\pm$ 0.019
4	36.5 $\pm$ 0.5	0.158 $\pm$ 0.038
5	37.83 $\pm$ 0.7	0.138 $\pm$ 0.022
6	35.5 $\pm$ 2.5	0.122 $\pm$ 0.012
7	36.17 $\pm$ 2.32	0.148 $\pm$ 0.026
8	36.5 $\pm$ 1.87	0.152 $\pm$ 0.028
9	37.5 $\pm$ 1.38	0.183 $\pm$ 0.010
10	36.67 $\pm$ 2.66	0.172 $\pm$ 0.015

4.6.6.4. In Vitro Salım Deneyleri

Salım ortamı olarak iki farklı pH değerinde (5.5 ve 7.4) fosfat tampon seçilmiştir. pH 5.5 tümör ortamının asiditesini ve 7.4 ise kan ortamının pH’sını taklit etmek amacıyla seçilmiştir. Kümülatif GEM ve Vismodegib salımı Şekil 4-11’de gösterilmiştir. Buna

göre polimere konjuge olan GEM'in salımı enkapsüle olmuş vismodegib'e göre yavaştır. Vismodegib miselleri pH 5.5' te pH 7.4' e göre daha hızlı bir salım profili sergilemiştir. GEM misellerinden pH 5.5'te pH 7.4' e göre daha yavaş bir salım gerçekleşmiştir.

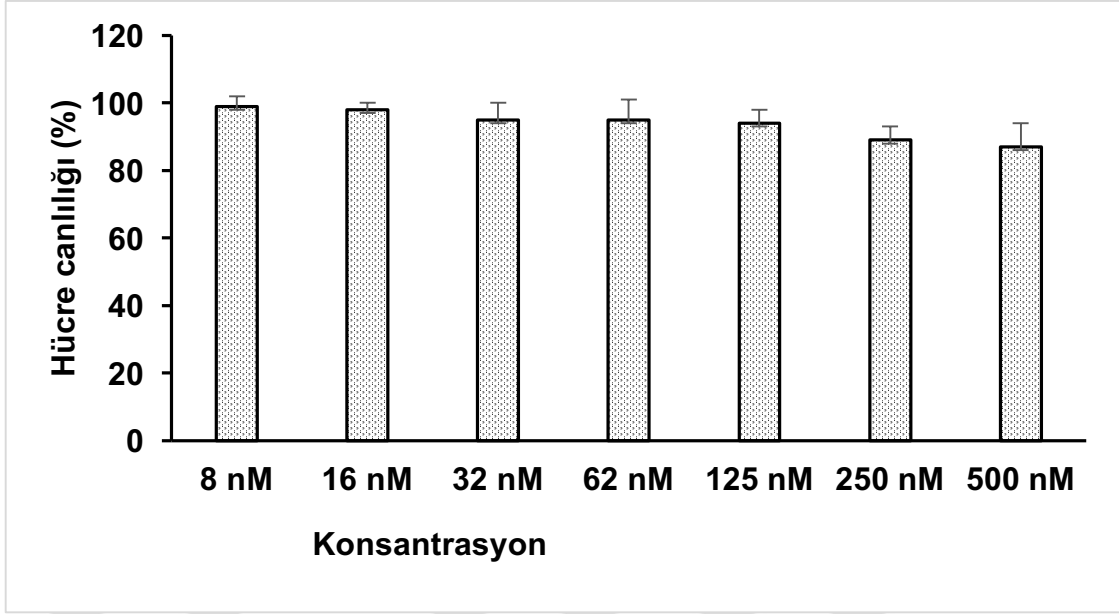


Şekil 4-11: GEMsitrabin ve Vismodegib (GDC-0449) misellerinin pH 5.5 ve pH 7.4 in vitro salım profilleri (n=3)

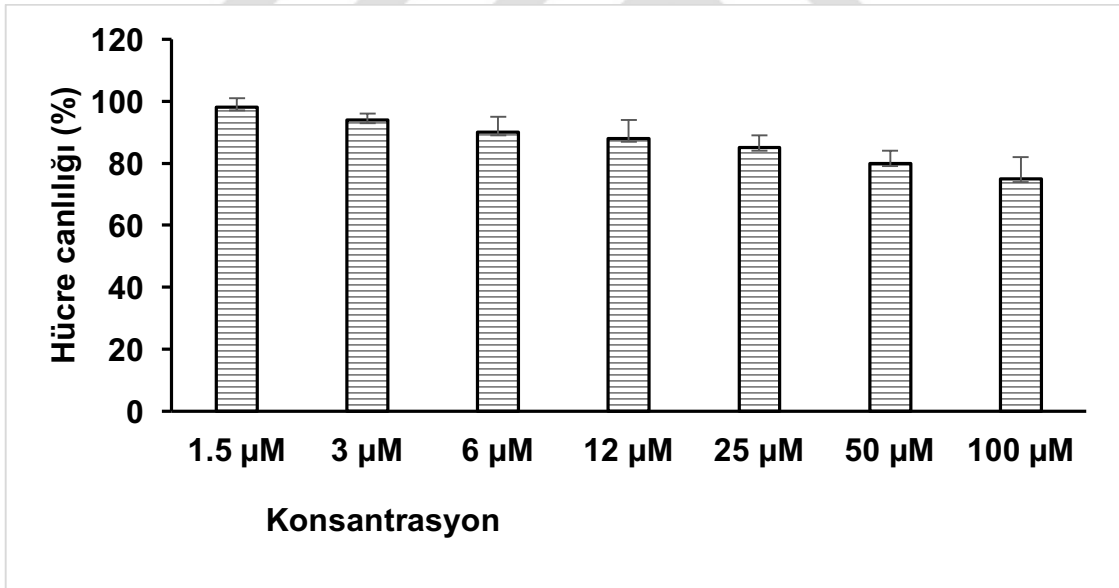
4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.7.1. Formülasyonların Sitotoksitelerinin Araştırılması

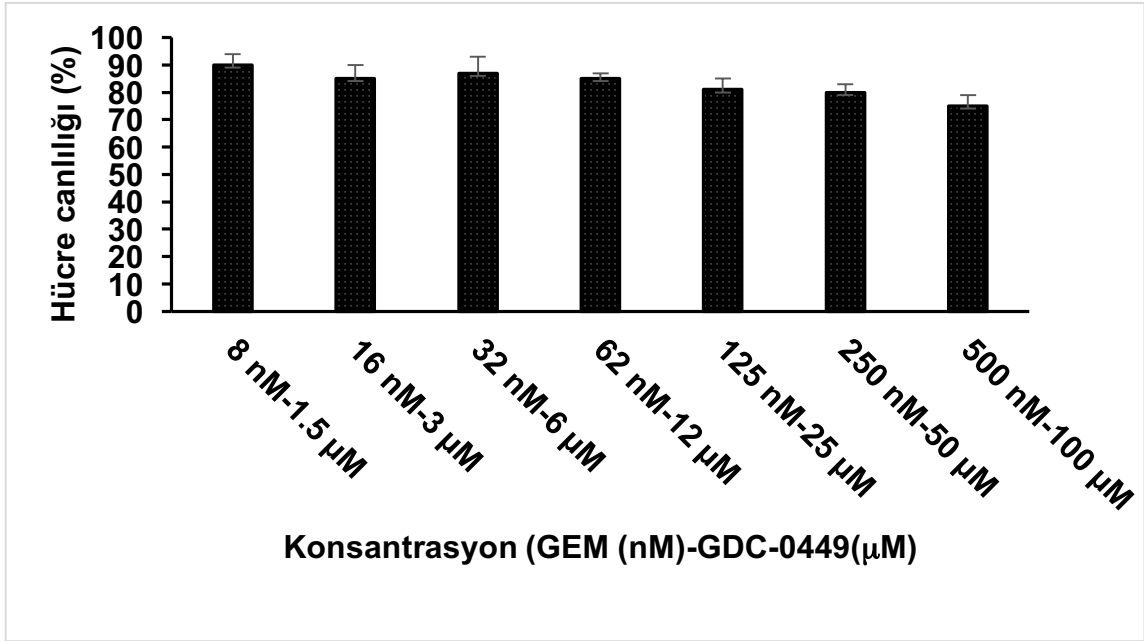
Sitotoksite değerlendirmek için MIA PaCa-2 hücre hattı seçilmiştir. Bu hücre hattının seçilmesinin sebebi diğer pankreas kanseri hücre hatlarına göre daha agresif mezankimal hücre özelliği taşımasıdır. GEM misellerinin, vismodegib misellerinin ve farklı oranlarda kombinasyonlarının boş misellerle inkübe edilen kontrol grubuna göre 24 saatlik 48 saatlik ve 72 saatlik maruziyet sonucu gösterdikleri toksisiteler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



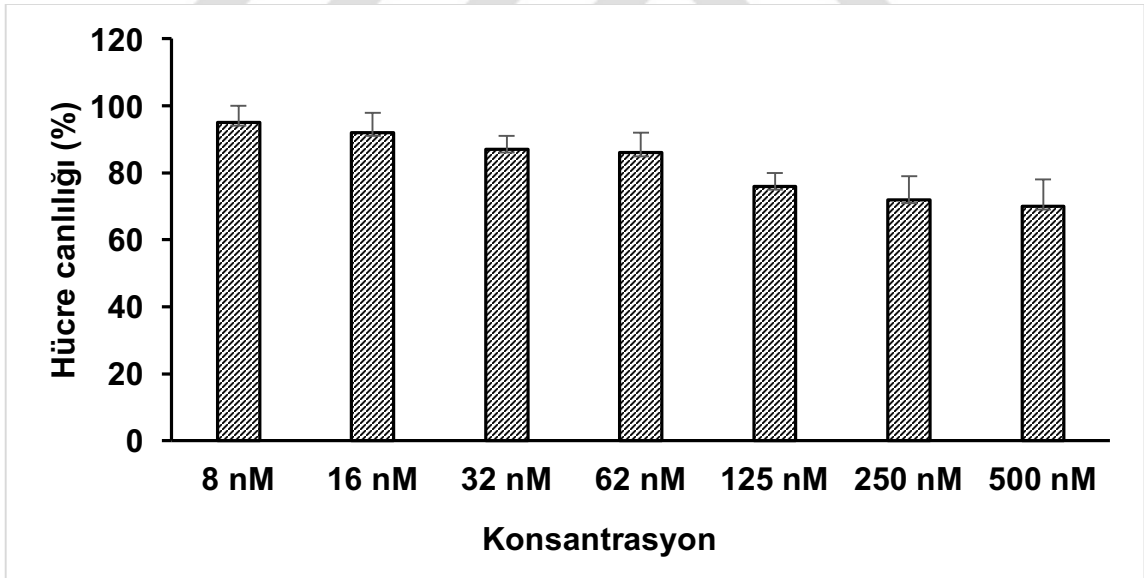
Şekil 4-12: Gemsitabin miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 24 saat sonra canlılık değerlendirmesi (n=3)



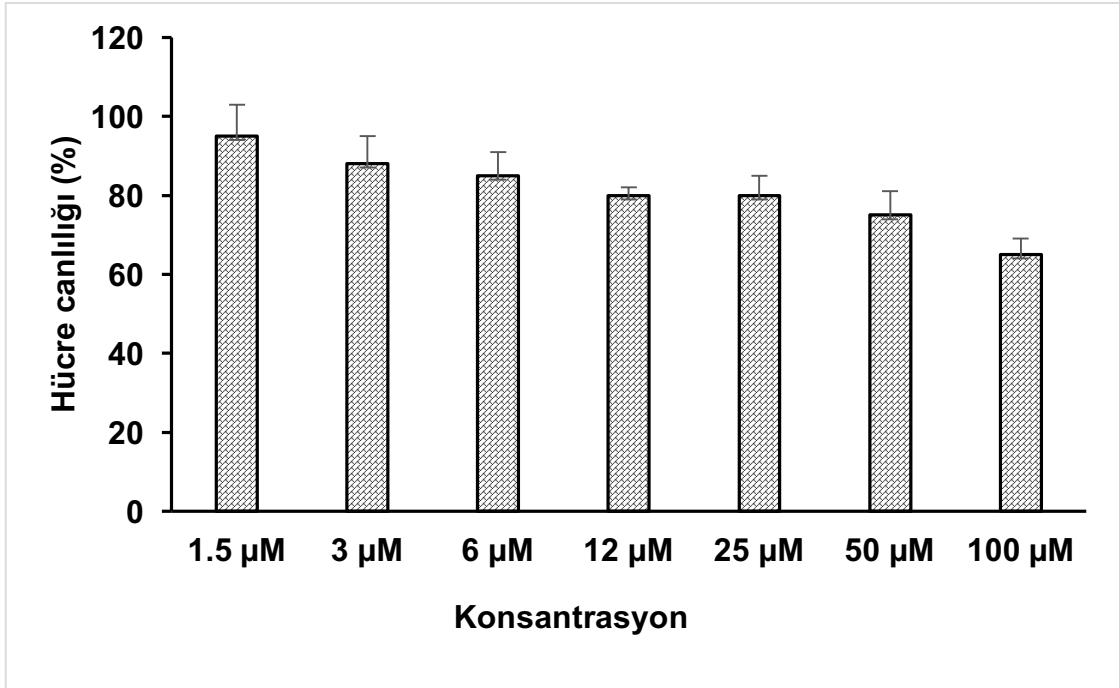
Şekil 4-13: Vismodegib (GDC-0449) miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 24 saat sonra canlılık değerlendirmesi (n=3)



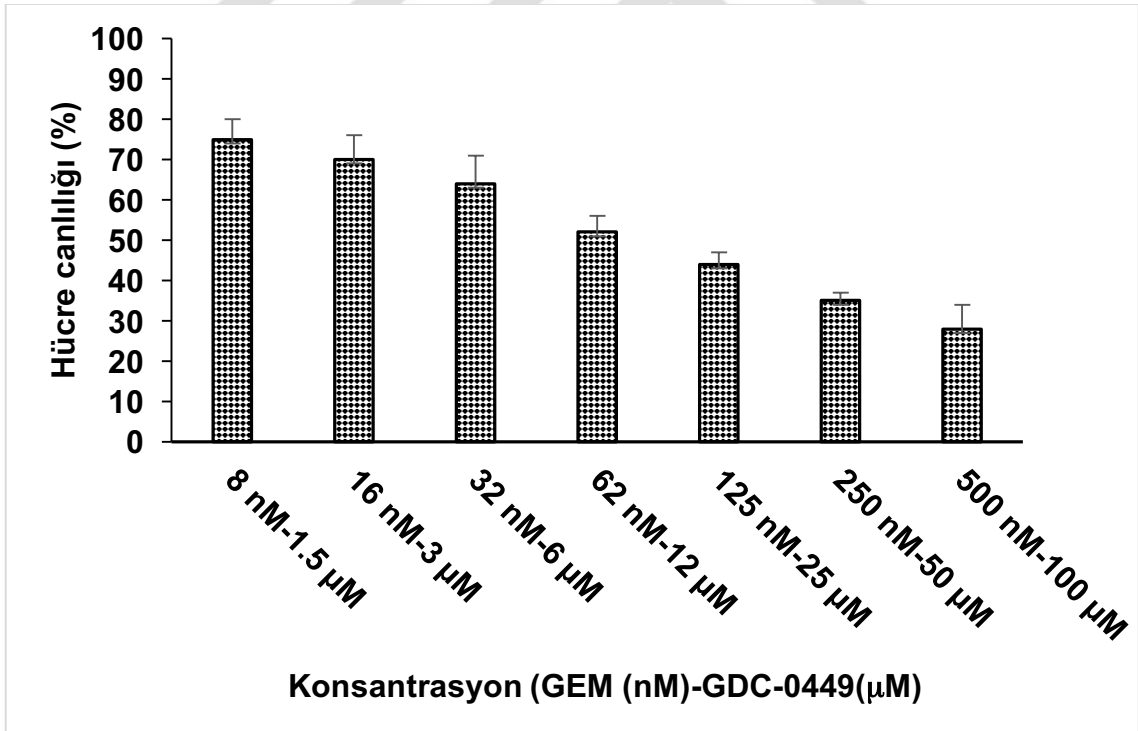
Şekil 4-14: Kombinasyon miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 24 saat sonra canlılık değerlendirmesi (n=3)



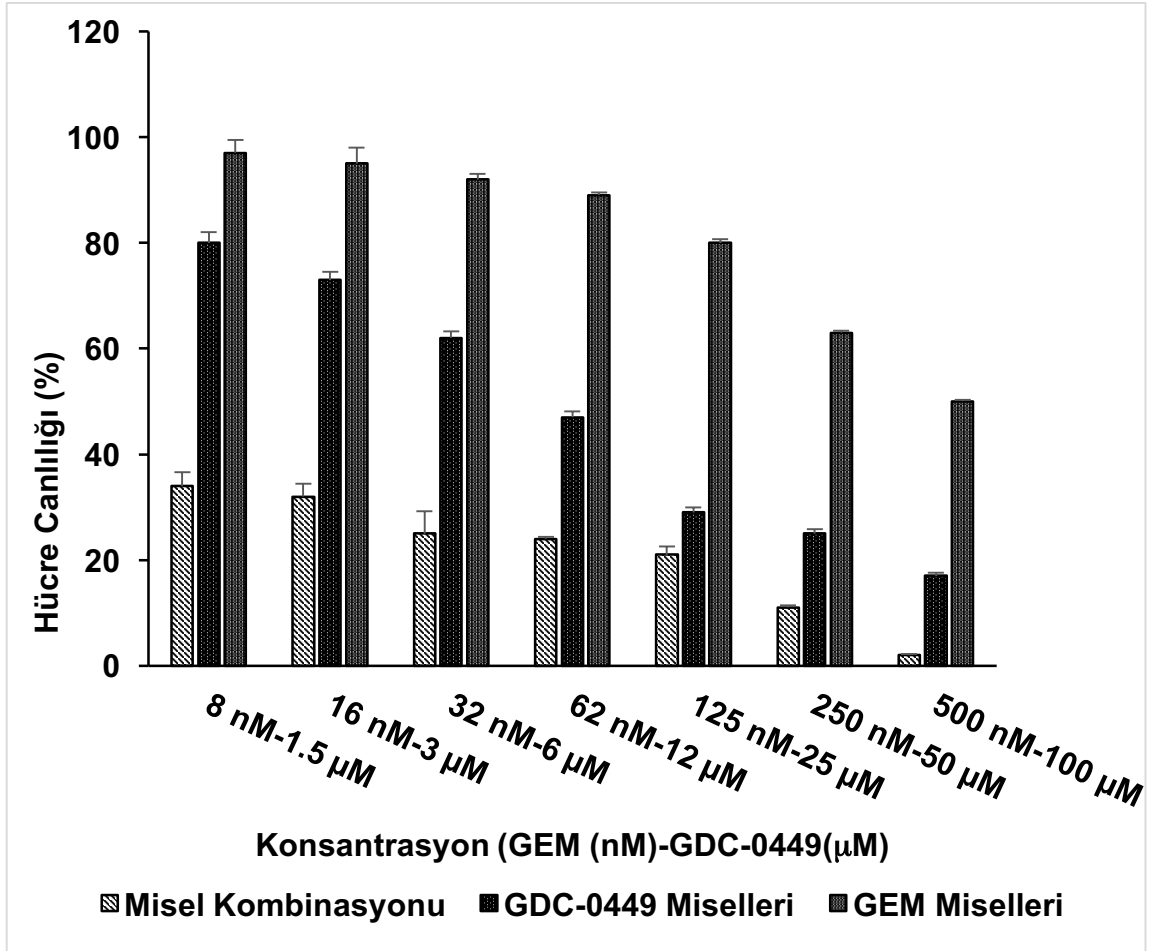
Şekil 4-15: Gempitabin miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 48 saat sonra canlılık değerlendirmesi (n=3)



Şekil 4-16: Vismodegib (GDC-0449) miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 48 saat sonra canlılık değerlendirmesi (n=3)



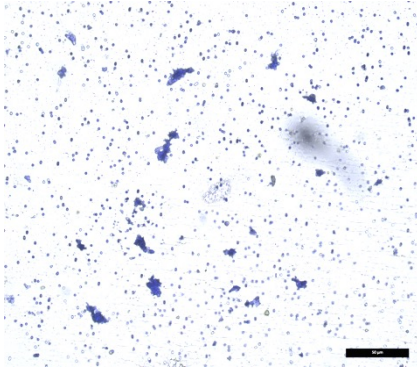
Şekil 4-17: Kombinasyon miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 48 saat sonra canlılık değerlendirmesi (n=3)



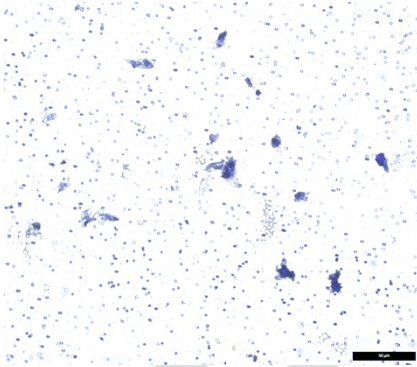
Şekil 4-18: Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde 72 saat sonra canlılık değerlendirmesi (n=3)

Kontrol grubunda hücrelere herhangi bir formülasyon uygulanmamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mPEG-b-PCC-g-DC polimeri ile hazırlanan boş misellerin toksisite göstermediği görülmüştür.

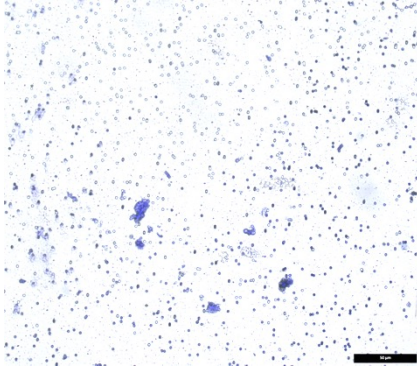
4.7.2. İnvazyon, Migrasyon ve Koloni Oluşumu Araştırılması



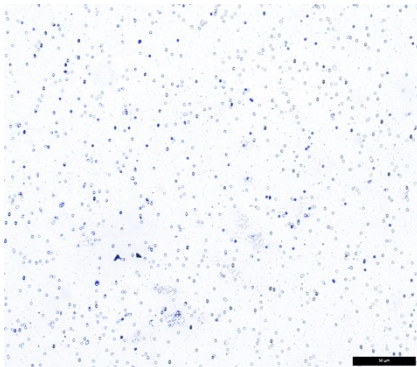
Kontrol grubu



GEM miselleri

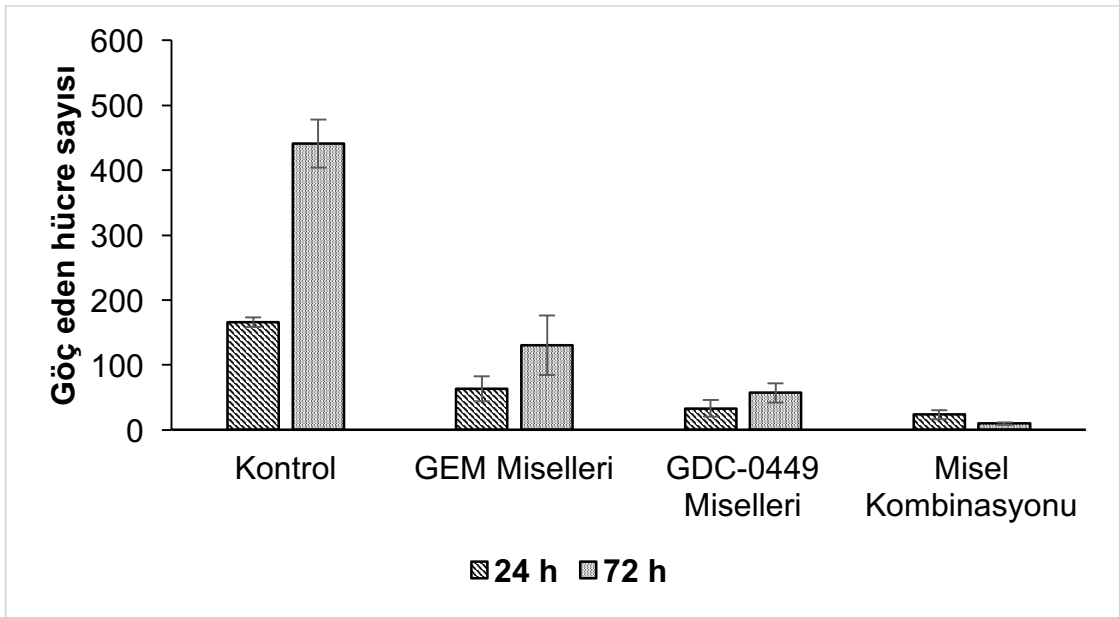
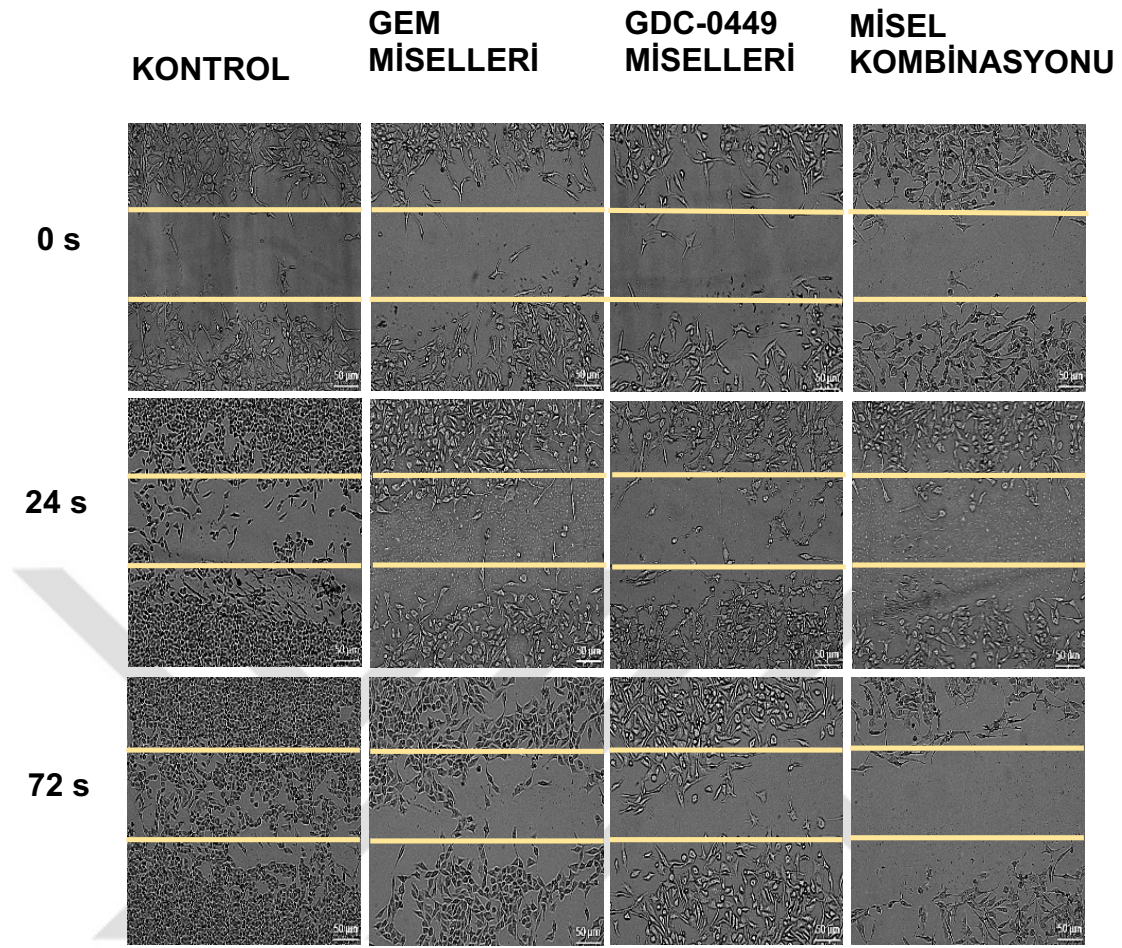


Vismodegib miselleri

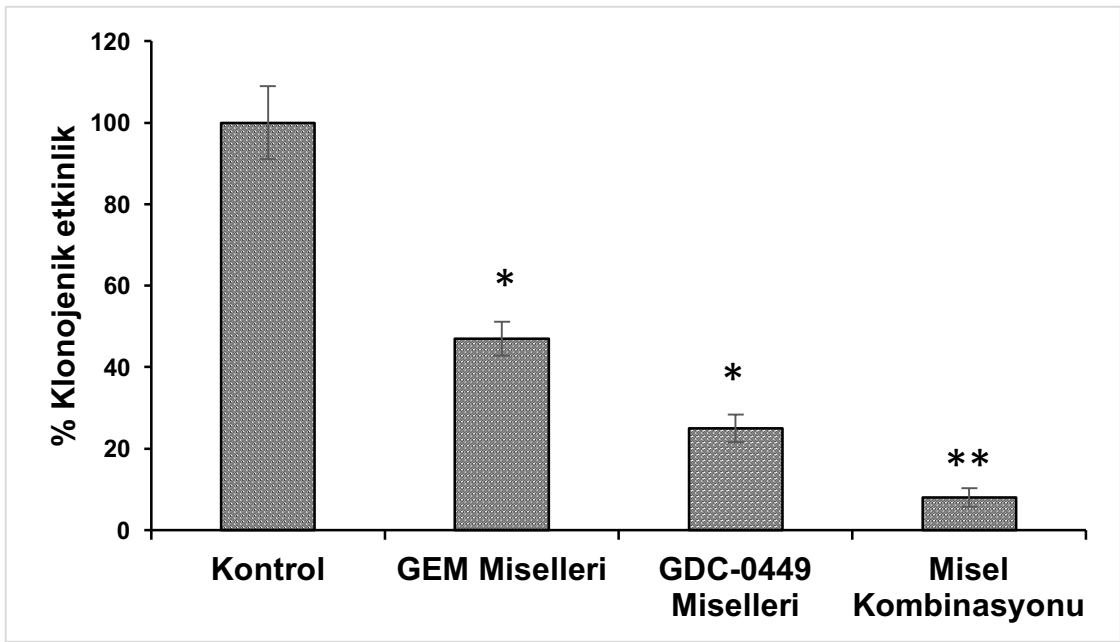
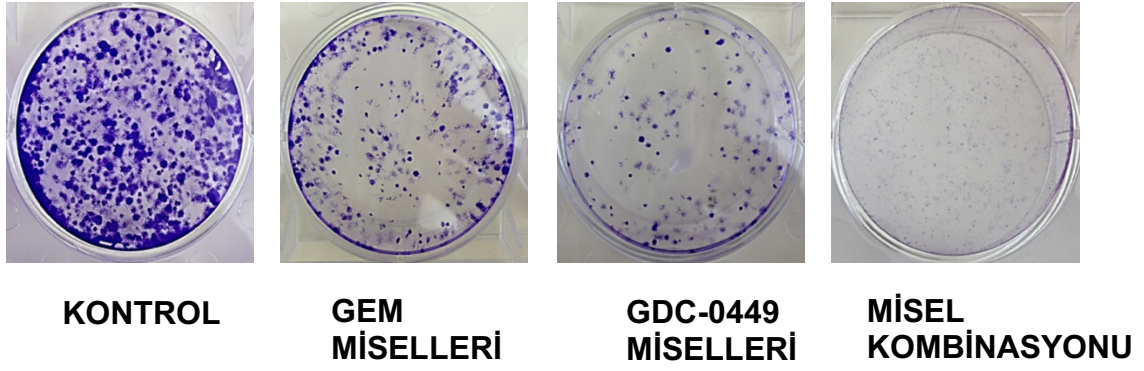


Kombinasyon miselleri

Şekil 4-19: İnvazyon değerlendirilmesi



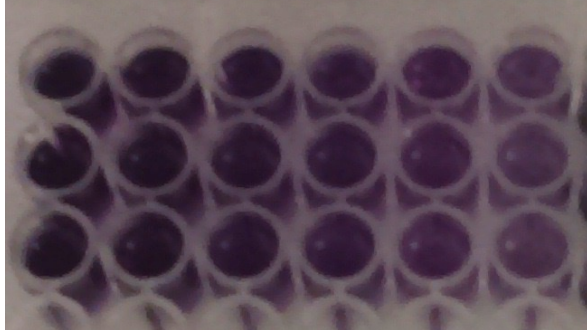
Şekil 4-20: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinin 24 saat ve 72 saat sonra migrasyonlarının değerlendirilmesi (n=3)



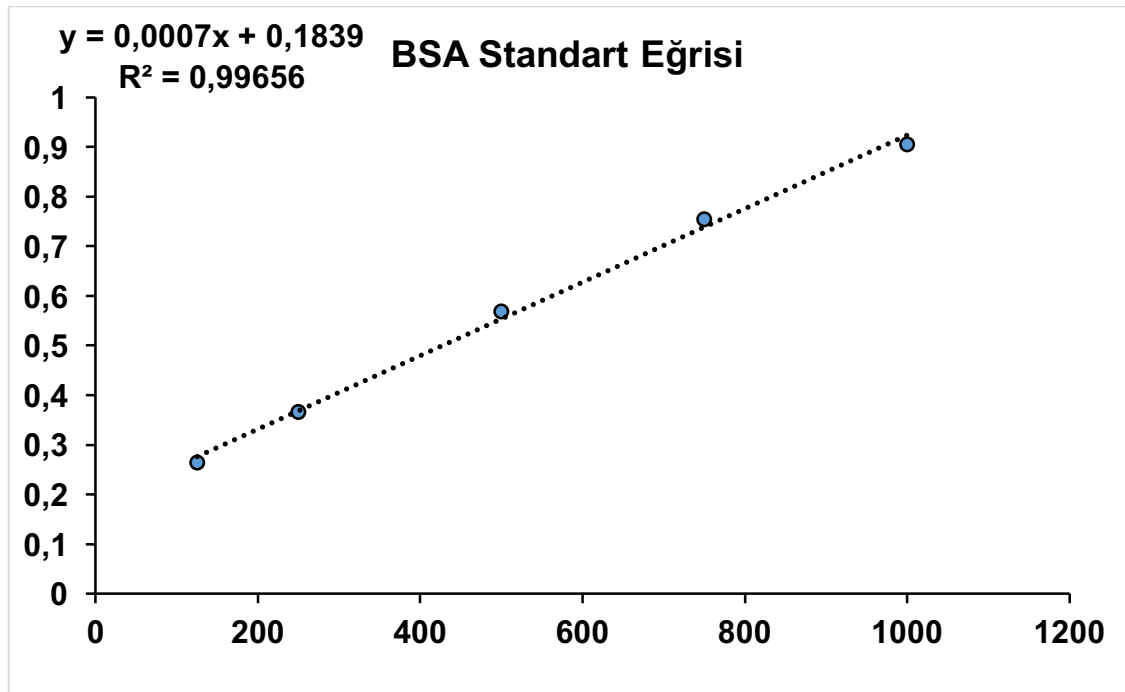
Şekil 4-21: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinin 24 saat ve 72 saat sonra koloni oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi

$*p < 0.01$; $**p < 0.001$
($n=3$)

(A)

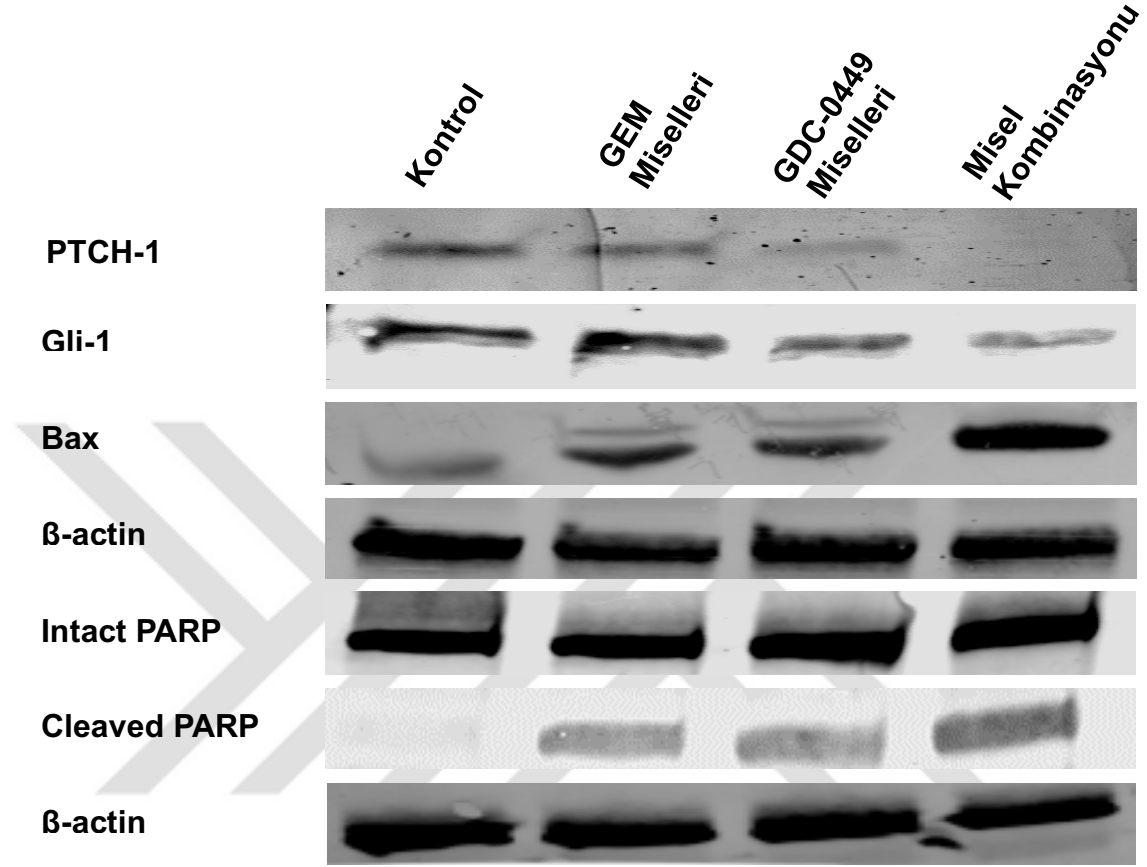


(B)



Şekil 4-22: BSA Deneyi ile Protein Konsantrasyonu Belirlenmesi. Renk oluşumu (A), BSA standart eğrisi (B)

4.7.3. Formülasyon Uygulanması ile Hücrelerdeki Protein Ekspresyonundaki Değişikliklerin Western Blot Analizi ile Kontrolü



Şekil 4-23: 72 saat boyunca Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile inkübe edilen MIA PaCa-2 hücrelerindeki protein ekspresyonunun Wester Blot analizi ile değerlendirilmesi

72 saatlik formülasyon inkübasyonu sonucu misel kombinasyonunun tek uygulanan misellere göre Hedgehog sinyalini daha etkili inhibe ettiği PTCH-1 ve Gli-1 ekspresyonlarındaki değişiklikler ile doğrulanmıştır. Çünkü fizyolojik koşullarda Hh ligandının reseptörü transmembran PTCH-1'e bağlanmasıyla Smo inaktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu durumda Gli-1 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu meydana gelmektedir. GDC-0449 potent bir Smo inhibitörü olarak Smo reseptörüne bağlanarak indirekt yolla Gli-1 aktivasyonunu inhibe etmektedir.

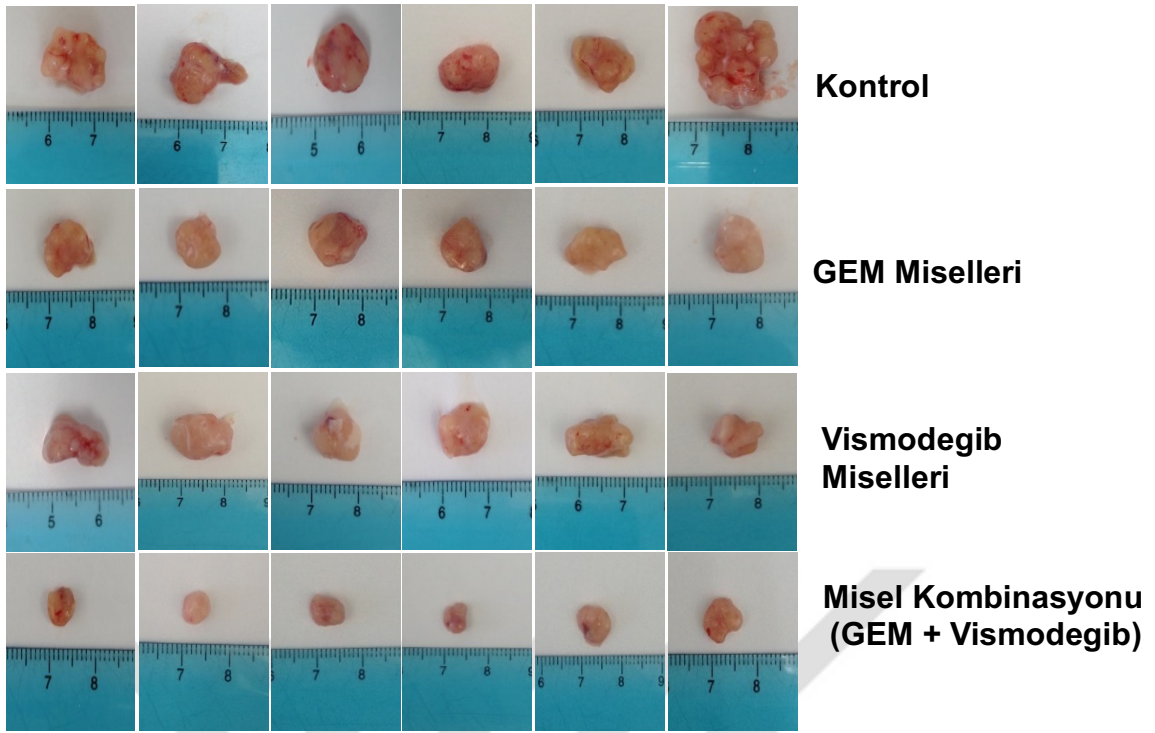
Apoptozis, normal hücrelerde homeostazi sağlanmasında anahtar rol oynamaktadır. Hücresel küçülme, DNA fragmentasyonu, hücre yüzeyinde çıkıntı oluşumu ve moleküler düzeylerdeki değişiklikler apoptozis sırasında meydana gelen

olaylardır. Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1; kromatinsel çekirdek enzimi) zarar görmüş DNA'yı stabilize ve tamir eder aynı zamanda transkripsiyonel düzenleme sağlar. Hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde PARP-1 aktif hale gelir ve hücredeki düzeyinde artış meydana gelir. Hasar görmüş DNA'yı tamir eder. Apoptoz meydana geldiğinde ise PARP-1 kaspaz-3 tarafından iki fragmente ayrılır. Bunlar 89 kDa olan aktif kısım ve 24 kDa olan DNA bağlanma bölümüdür. Western Blot çalışmasıyla MIA PaCa-2 hücrelerinin formülasyonlarla 72 saatlik inkübasyonu sonucu, tekli ilaç formülasyonlarına göre kombinasyon misellerinin daha fazla PARP-1 bölünmesi sağladığı doğrulanmıştır.

Apoptozis sinyal yolağındaki bir diğer önemli protein Bax'tır. Bax, proapoptotik protein olarak bilinir ve apoptotik uyarıya cevaben hücre ölümünü hızlandırır. Western Blot çalışmasıyla misel kombinasyonunun tekli ilaç formülasyonlarına göre Bax ekspresyonunu daha etkili şekilde artırdığı doğrulanmıştır.

4.8. In vivo Çalışmalar

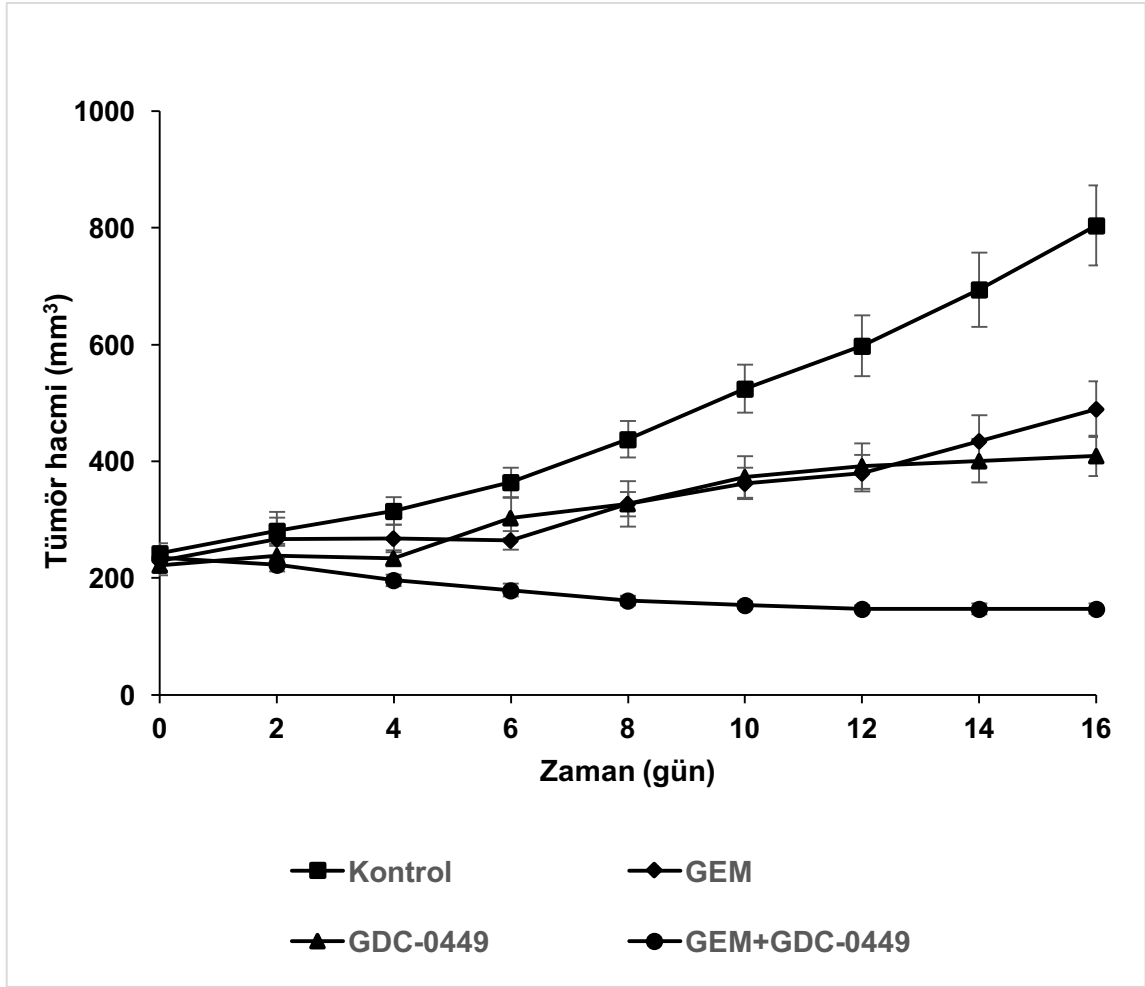
GEM miselleri, vismodegib (GDC-0449) miselleri, kombinasyon miselleri ve kontrol grubu (boş miseller)' in in vivo etkinliği atimik nude farelerde MIA PaCa-2 hücre hattı ile oluşturulan subkütan tümör modeli üzerinde değerlendirilmiştir. 100 µl PBS içinde 3×10^6 MIA PaCa-2 hücresi ve 100 µl Matrigel soğuk ortamda karıştırılarak subkütan yol ile atimik nude farelerin sağ yan karın bölgesine enjekte edilmiştir. 3 hafta sonra 200-300 mm³'e ulaşan tümörlere intratümoral yol ile formülasyonlar uygulanmıştır. Kontrol grubu için 200 µl mPEG-b-PCC-g-DC boş miselleri, 40 mg/kg dozda 200 µl GEM miselleri, 10 mg/kg dozda 200 µl Vismodegib (GDC-0449) miselleri ekuavalan dozları içeren 200 µl misel kombinasyonu iki hafta boyunca haftada 3 kez uygulanmıştır. 16. gün ise hayvanlar ötanazi edilmiştir. Tümörler çıkarılarak tedavi etkinliğinin görsel değerlendirmesi için fotoğrafları çekilmiştir.



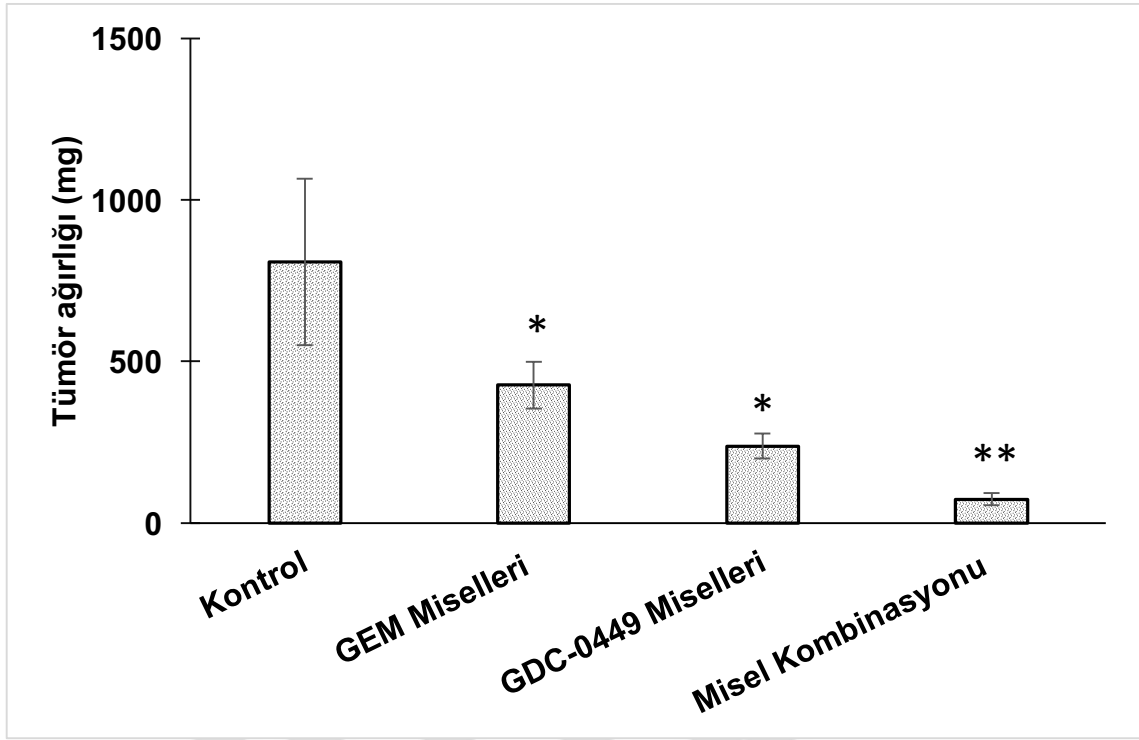
Şekil 4-24: 16 günlük tedavi sonucu çıkarılan tümörler (n=6)

Yalnızca GEM miselleri ve Vismodegib miselleri ile tedavi tümör boyutunda kontrol grubuna göre küçülme sağlamıştır. Fakat misel kombinasyonu ile tedavi ile tümör boyutunda anlamlı derecede küçülme mümkün olmuştur. Kontrol grubunda ortalama tümör boyutu 804 mm^3 iken kombinasyon tedavisi ile ortalama 68.4 mm^3 boyut elde sağlanmıştır.

İki günde bir yapılan tümör ölçümleri grafiğe geçirilerek tedavinin tümör boyutuna etkisi değerlendirilmiştir.



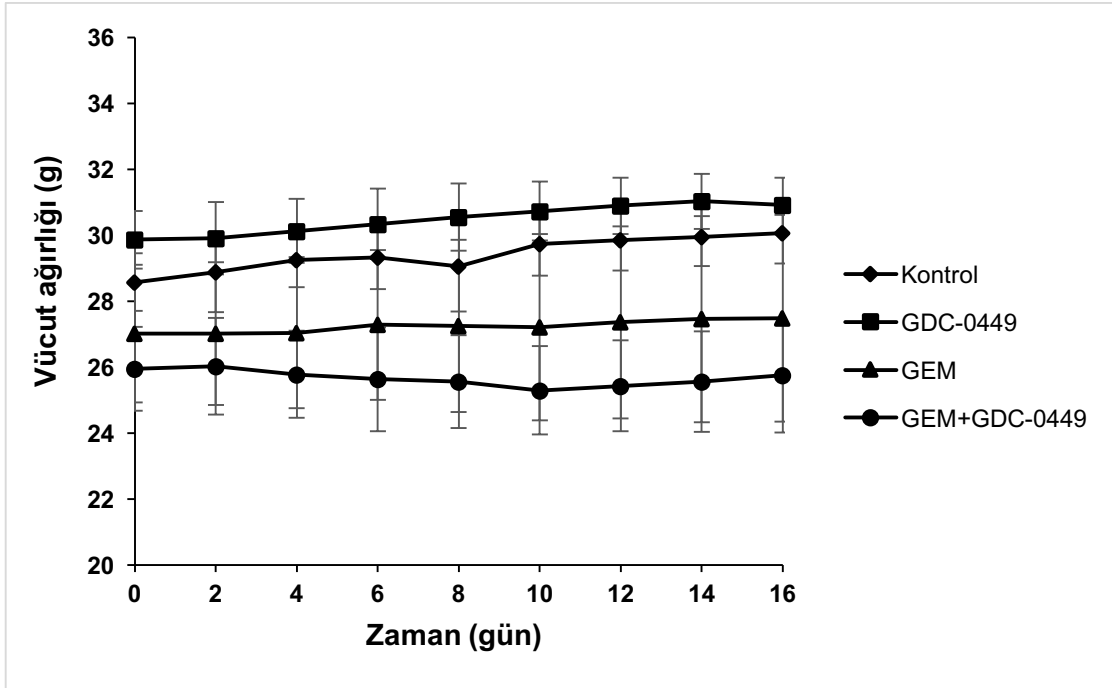
Şekil 4-25: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile tedavi edilen farelerin tedavi süresince tümör hacmi ölçümleri (n=6)



Şekil 4-26: Kontrol, Gensitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile tedavi edilen farelerden 16 gün sonunda izole edilen tümörlerin ağırlıklık ölçümleri (n=6)

$*p < 0.01$; $**p < 0.001$

(n=3)



Şekil 4-27: Kontrol, Gemsitabin miselleri, Vismodegib (GDC-0449) miselleri ve kombinasyon miselleri ile tedavi edilen farelerin tedavi süresince vücut ağırlıkları ölçümü (n=6)

4.8.1. İmmünoflorasan ve İmmünohistokimya Çalışmaları

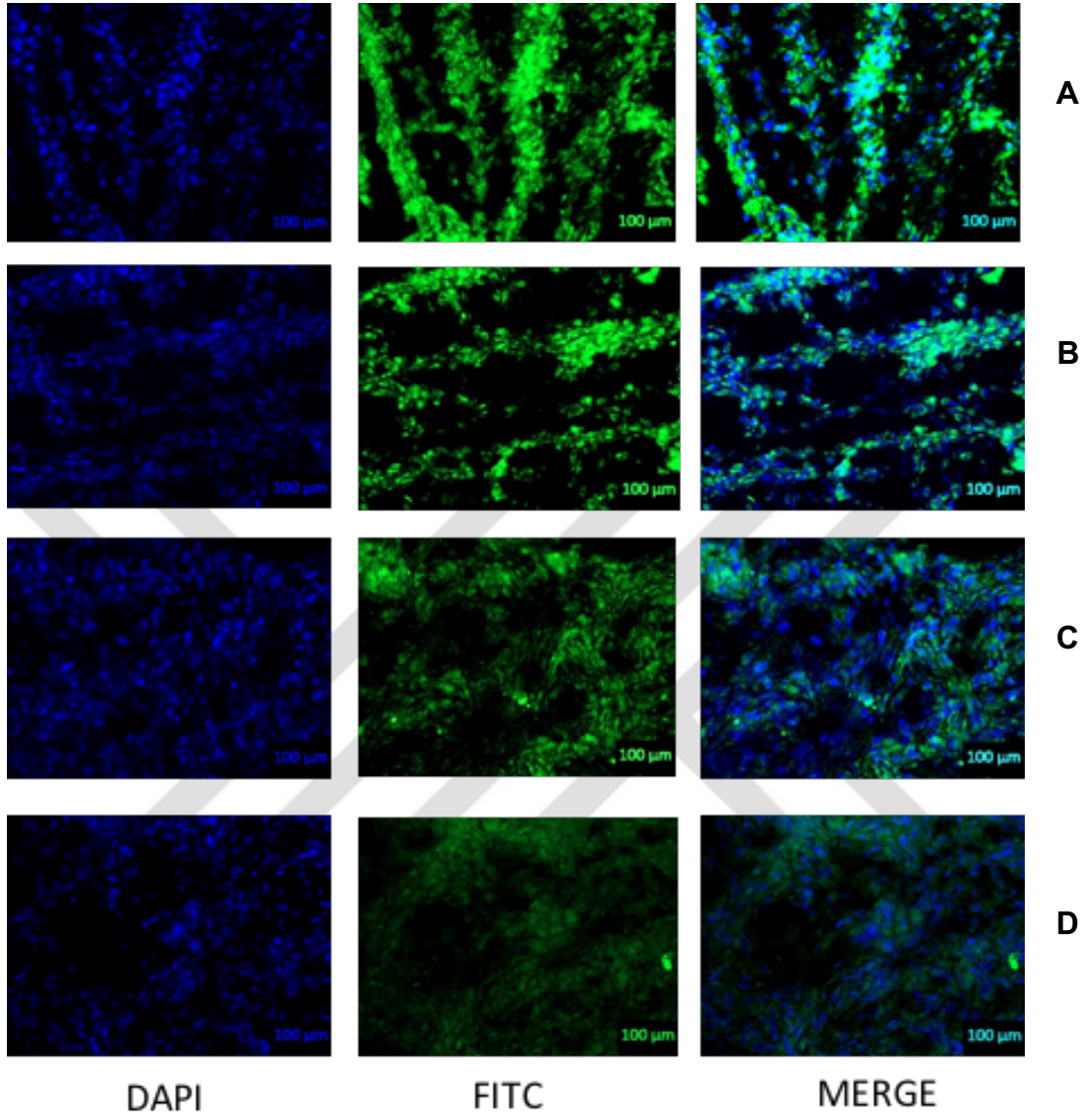
İmmünoflorasan ve immünohistokimya analizleri kombinasyon tedavisinin diğer tedavilere göre etkililiğini açığa çıkarmak amacıyla yapılmıştır. İmmünoflorasan analiz ile Gli-1 ekspresyonundaki değişiklik gözlenmiştir. Farklı formülasyonlarla tedavi edilen farelerden tedavi süreci sonucunda çıkarılan tümörlerden elde edilen kesitlere uygulanan immünoflorasan analizi sonucu kontrol grubunda diğer gruplara göre daha fazla florasan gözlemlenmesi, kontrol grubunda Gli-1 ekspresyonunun daha fazla olduğunu göstermektedir. GEM miselleri ile tedavi ile kontrol grubuna yakın Gli-1 florasanı göstermiştir. Vismodegib (GDC-0449) miselleri ile tedavi edilen tümörlerden elde edilen kesitlerde Gli-1 florasanında azalma gözlemlenmiştir. Kombinasyon tedavisi ile ise florasan da anlamlı derecede azalma görülmüştür. Bu durum in vivo koşullarda da kombinasyon misellerinin tekli misel formülasyonlarına ve kontrol grubuna göre etkili şekilde Hedgehog yolağını inhibe ettiğini ve Gli-1 ekspresyonunu baskıladığını kanıtlamaktadır.

Aktif kaspaz-3 sinyali incelemek üzere yapılan immünoflorasan çalışmasında da kontrol grubunun oldukça az florasan gösterdiği görülmektedir. Bu durum kontrol grubunda olağan apoptozisin gerçekleştiğini göstermektedir. GEM miselleri ve Vismodegib miselleri gruplarında ise florasanda artış gözükmemektedir. Bunun durum formülasyonların apoptozisi tetiklemesine dayalıdır. Kombinasyon tedavisinde ise diğer gruplara oranla daha fazla florasan gözlenmektedir. Bu durum da kombinasyon tedavisinin daha çok apoptozis sağladığını söyleyebiliriz.

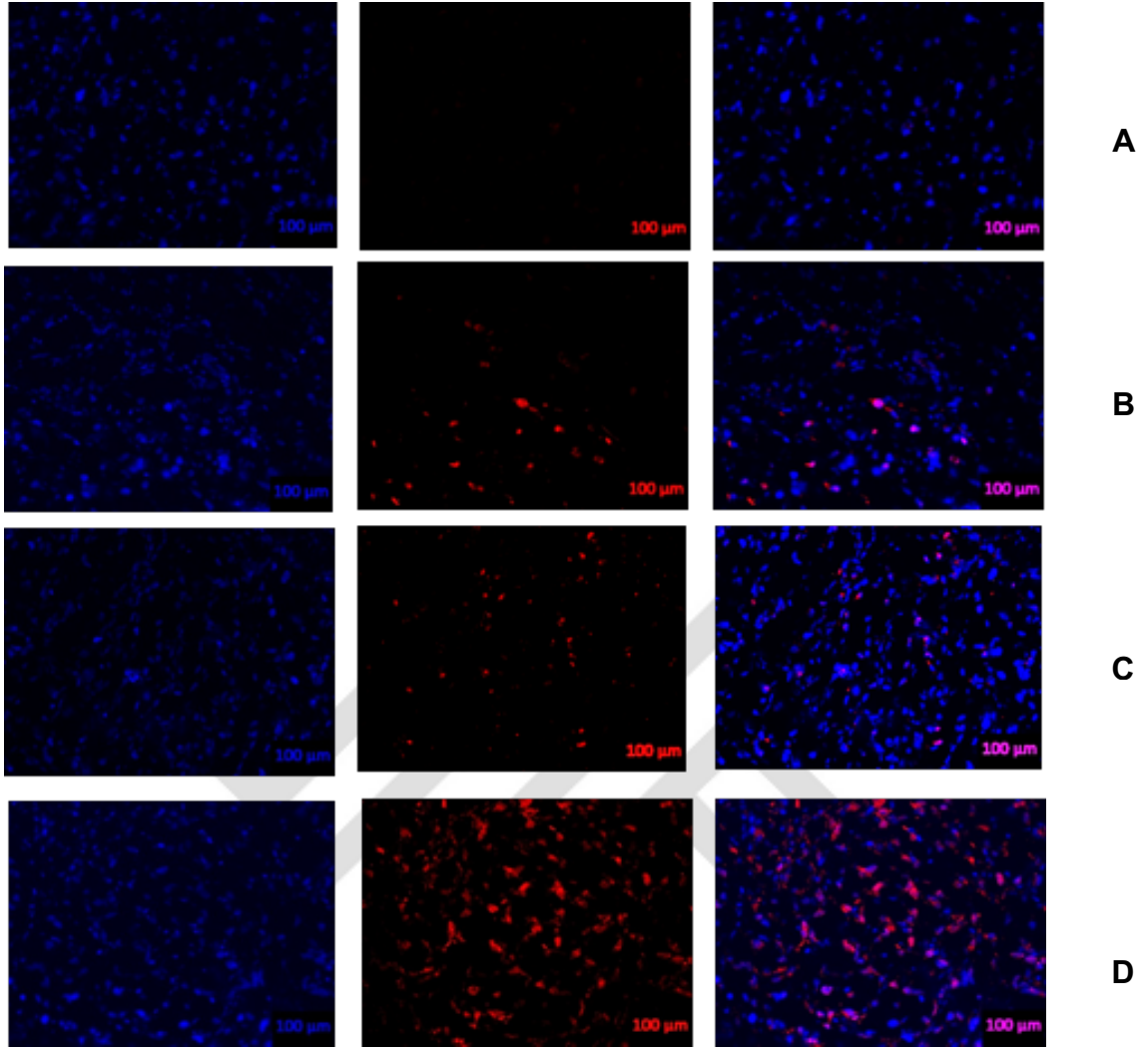
ZEB-1 ekspresyonu araştırmak üzere yapılan histokimya çalışmasında ZEB-1 ekspresyonun kontrol grubunda oldukça agresif olduğu gözlemlenmektedir. GEM miselleri ile tedavi edilen gruptaki ZEB-1 ekspresyonu hemen hemen kontrol grubuyla aynı durumdadır. Vismodegib miselleri ile tedavi grubunda ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Kombinasyon misellerinde ise ZEB-1 ekspresyonunda diğer gruplara nazaran ciddi bir azalma görülmüştür.

Proliferasyon belirteci Ki-67 proteinin araştırıldığı histokimya çalışmasında kontrol grubunda yüksek düzeyde Ki-67 protein ekspresyonu gözlemlenmiştir. GEM miselleri, Vismodegib miselleri ve kombinasyon miselleri ile tedavide ise bu proteinin ekspresyonunda anlamlı bir düşüş görülmüştür.

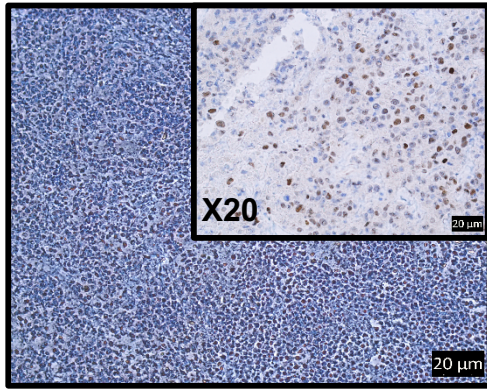
H&E boyama ile yapılan morfolojik incelemede ise kontrol grubunda sıkı epitel hücre kitleleri gözükürken, kombinasyon tedavisinde zayıf epitel agregatları gözlemlenmiştir.



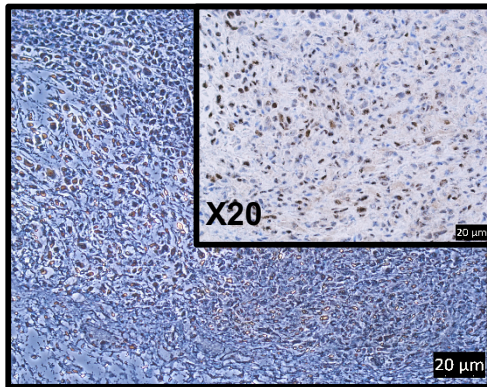
Şekil 4-28: Gli-1 ekspresyonu değerlendirmesi için immünohistoflorasans işaretleme
Kontrol grubu (A), GEM miselleri ile tedavi (B), Vismodegib miselleri ile tedavi
(C), Kombinasyon tedavisi (D)



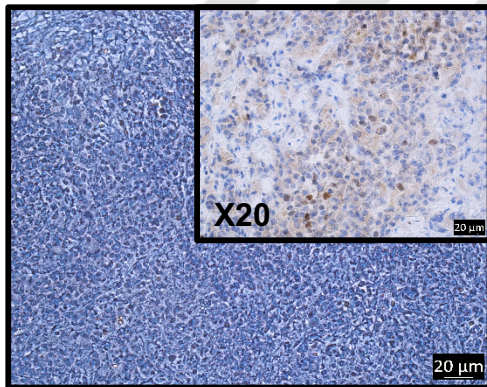
Şekil 4-29: Active Caspase-3 ekspresyonu değerlendirmesi için immünohistoflorasans işaretleme. Kontrol grubu (A), GEM miselleri ile tedavi (B), Vismodegib miselleri ile tedavi (C), Kombinasyon tedavisi



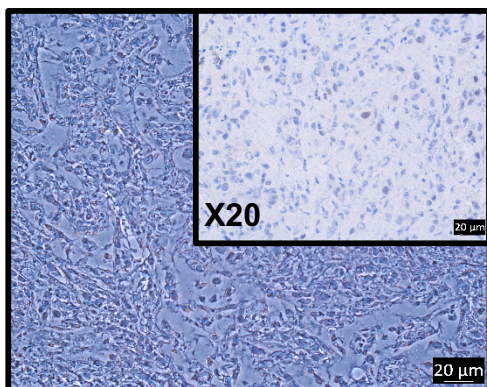
Kontrol grubu



GEM miselleri ile tedavi

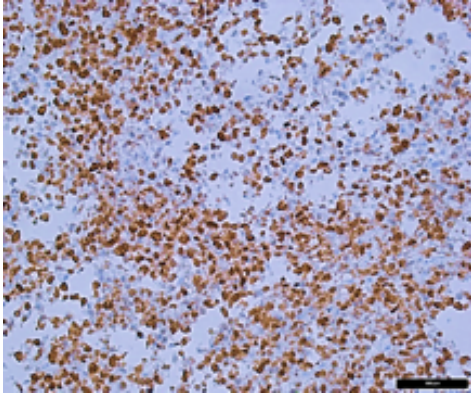


Vismodegib miselleri ile tedavi

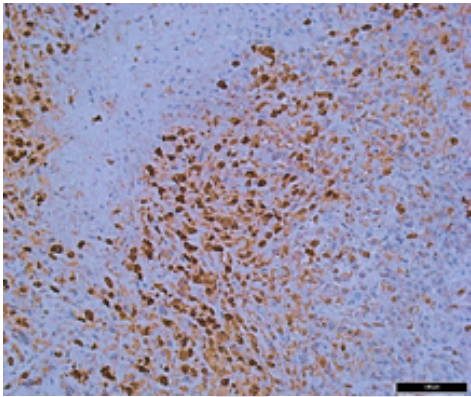


Kombinasyon tedavisi

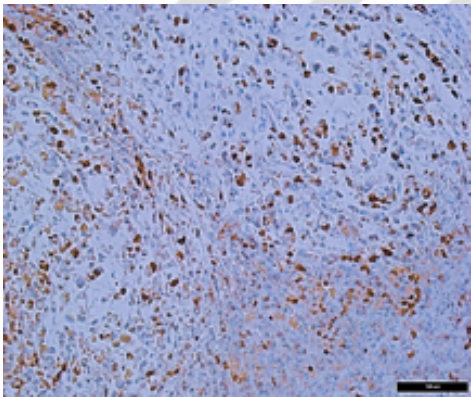
Şekil 4-30: ZEB-1 işaretleme



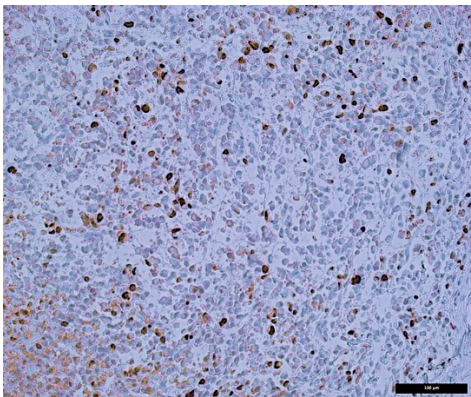
Kontrol grubu



GEM miselleri ile tedavi

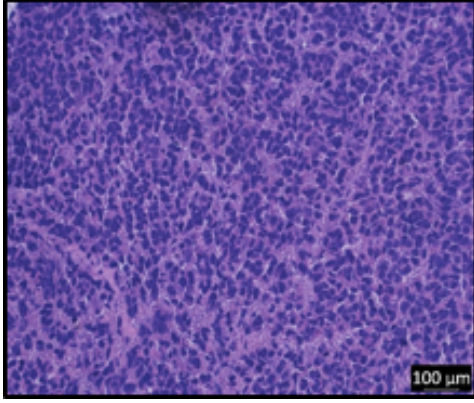


Vismodegib miselleri ile tedavi

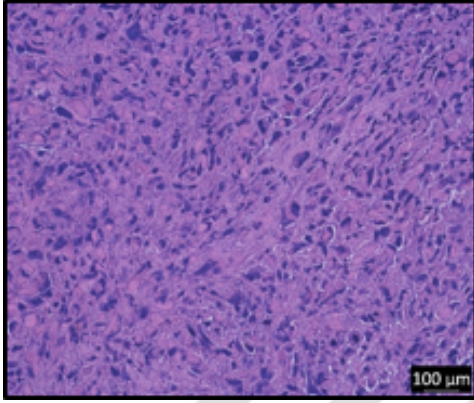


Kombinasyon tedavisi

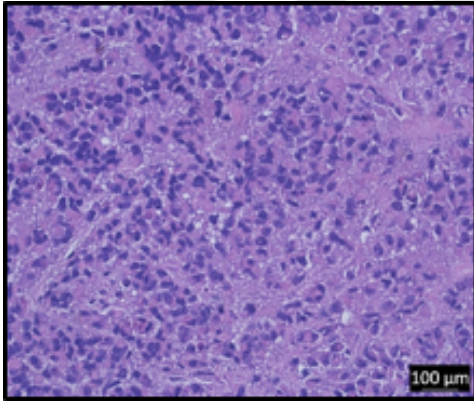
Şekil 4-31: KI-67 İşaretleme



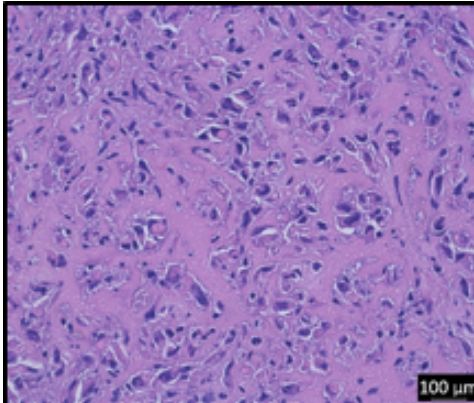
Kontrol grubu



GEM miselleri ile tedavi



Vismodegib miselleri ile tedavi



Kombinasyon tedavisi

Şekil 4-32: Hematoxylin and Eosin (H&E) İşaretleme

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri tedavisi tümör mikroçevresinin kompleks olması ve hastalığa hakim olan pek çok sinyal yolağının varlığı sebebiyle oldukça zorlayıcıdır. Bu yüzden hastalığın tedavisinde kullanılan pek çok ilaç başarılı sonuç verememiştir. Her bir biyokimyasal yolağın mekanizmasını anlamak pankreas kanserinin patolojisini kontrol etmede etkili olabilmektedir. Pankreas kanseri hastalarının yaşam süresini ve kalitesini artırmak için pek çok girişim yapılmaktadır. Hastalığın invazyon, progresyon ve metastazından sorumlu kilit oyuncuların çapraz etkileşiminin araştırılması ile tedavideki çıkmazların giderilebileceği umulmaktadır. Bu bağlamda, Hedgehog sinyal yolağı EMD ile olan ilişkisi ile altı çizilerek bahsedilmesi gereken bir sinyal mekanizmasıdır. Hedgehog yolağının fizyolojik fonksiyonu bozulduğunda Gli-1 ve Gli-2 gibi transkripsiyon faktörlerinin overekspresyonu gerçekleşmektedir. Siklopamin, vismodegib (GDC-0449), erismodegib ve saridegib (IPI-926) gibi antagonistler ile bu yolağın inhibisyonu pek çok çalışma ile umut vadeden sonuçlar göstermiştir (Kleger, Perkhofer ve Seufferlein, 2014; Kelleher, 2010).

Tekli ilaç tedavisinin başarısızlığına karşı kombinasyon tedavisi yaklaşımı birden çok faktörü hedefleyebilmesiyle önemli bir seçenek oluşturmaktadır. Yapılan güncel bir çalışmada GDC-0449 ile dosetakselin sinerjistik etki ile insan pankreas kanser hücrelerini inhibe ettiği, Hh sinyalinin baskılanması ile dosetakselin antikarsinojenik etkisinde artış meydana geldiği gösterilmiştir (Mimeault ve ark., 2015). FOLFIRINOX (5-fluorourasil, irinotekan, oksaliptin ve leucovorin)' in yalnızca GEM tedavisine göre anlamlı derecede efektif olduğu bildirilmiştir (Mohammed ve ark., 2014). Yine, GEM ve Hh inhibitörü kombinasyonu hastalığın ilerlemesini durdurması ve optimal kazançlar sağlanması bakımından araştırılmıştır (Feldmann ve ark., 2007). Olive ve ark. IPI-926 kullanılarak Hh yolağının inhibe edilmesi ile KPC farelerde oluşturulan pankreas kanserine GEM salımının arttığını göstermişlerdir (Olive ve ark., 2009).

GEM' i amfifilik polimer mPEG-b-PCC-g-DC' e konjuge ederek mPEG-b-PCC-g-GEM-g-DC oluşturulması kendinden oluşan miseller hazırlanması ile ilacın aşırı hidrofilikliği dengelenmiş, hızlı plazma metabolizması azaltılmış, uzatılmış GEM salımı sağlanarak artmış antitümör etkinlik elde edilebilmiştir.

Vismodegib (GDC-0449) oldukça hidrofobik bir ilaçtır, suda çözünürlüğü 0.1 g/ml olarak belirlenmiştir. mPEG-b-PCC-g-DC misellerine enkapsüle edilmesi ile çözünürlüğü $2450 \pm 50 \mu\text{g/ml}$ ’ye çıkarılabilmektedir.

Tez çalışmasında GEM ve Vismodegib (GDC-0449)’in miselleri hazırlanarak kombine etme yaklaşımına gidilmiş ve sinerjistik etki araştırılmıştır. Çalışmanın amacı bu kombinasyonun tekli misel formülasyonlarına göre etkinliğinin karşılaştırılmasıdır. Bu iki ilacın kombinasyonu pilot bir klinik çalışma ile test edilmiştir. GEM 1000 mg/m^2 dozda intravenöz yol ile, Vismodegib ise 150 mg dozda oral yol ile metastatik pankreas adenokarsinomasına sahip 25 hastaya uygulanmıştır (Kim ve ark., 2014). Bu çalışma sonucu kombinasyon tedavisinin tekli tedaviye göre hastaların toplam sağ kalım süresini uzatmada anlamlı bir etki göstermediği bulunmuştur. Fakat metastatik ortamda kombinasyon tedavisinin başarısız olmasının daha derin araştırılması gerekmektedir. Infinity Pharmaceuticals tarafından yapılan bir başka klinik çalışmada GEM ve saridegib kombinasyon tedavisinin hastalığı ilerlettiği, GEM mono terapisine göre avantajlı olmadığı gösterilmiştir (Catenacci ve ark., 2015). Kombinasyon tedavisinin yüksek dozları sebebiyle meydana gelen ilaç toksisitesi ilaç salımı modifikasyonlarına ihtiyaç olduğunu doğrulamaktadır.

Tez çalışmasında GEM ve Vismodegib’ in tümör bölgesine etkili şekilde salımının sağlanması için formülasyon yaklaşımına girilmiş ve bu sayede uzatılmış salım sağlanarak, toksisite azaltılmış ve düşük dozlarda dahi etkinlik artırılabilmiştir. Tez çalışmasında formülasyonlar fiziksel olarak birbirine karıştırıldığında enkapsüle olmuş vismodegib’in %80’ inin konjuge olan GEM’ in ise %19’ unun uzatılmış şekilde ile in vitro koşullarda salındığı gösterilmiştir. Vismodegib’ in iki farklı pH değerindeki salım profili ilacın asidik koşullardaki çözünürlük farkına dayalıdır. Vismodegib’in çözünürlüğü pH’ ya bağlıdır. pH 7’ de $0.1 \mu\text{g/ml}$, pH 1.0’ de ise çözünürlük $0.99 \mu\text{g/ml}$ kadardır. Vismodegib (GDC-0449), polimere konjuge olmadığı için nötral koşullara göre daha hızlı bir salım görülmesi normal bulunmuştur.

MIA PaCa-2 hücre serisinin yüksek düzeyde Hh ligandları ve mezenkimal markerlar eksprese ettiği bilinmektedir (Wellner ve ark., 2009). Bu sebeple tez çalışmasında formülasyonların in vitro ve in vivo etkinliklerinin değerlendirilmesinde bu hücre serisi kullanılmıştır. Bulgular sonucunda, GEM miselleri ve Vismodegib (GDC-0449) miselleri kombine edildiğinde sitotoksik etki tekli formülasyonlara göre daha güçlü

olduğu görülmüştür. MIA PaCa-2 hücrelerinde serbest GEM IC50 değeri 7.6 nM, serbest Vismodegib IC50 değeri 6.3 μ M olarak bulunmuştur. GEM misellerinin IC50 değeri 500 nM, Vismodegib misellerinin IC50 değeri 10.7 μ M olarak bulunurken, 5 nm GEM ve 1 μ M Vismodegib içeren misel kombinasyonu %50 canlılık göstermiştir.

Apoptozis, normal hücrelerde homeostazi sağlanmasında anahtar rol oynamaktadır. Hücresel küçülme, DNA fragmentasyonu, hücre yüzeyinde çıkıntı oluşumu ve moleküler düzeylerdeki değişiklikler apoptozis sırasında meydana gelen olaylardır. Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1; kromatinsel çekirdek enzimi) zarar görmüş DNA'yı stabilize ve tamir eder aynı zamanda transkripsiyonel düzenleme sağlar. Hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde PARP-1 aktif hale gelir ve hücredeki düzeyinde artış meydana gelir. Hasar görmüş DNA'yı tamir eder. Apoptoz meydana geldiğinde ise PARP-1 kaspaz-3 tarafından iki fragmente ayrılır. Bunlar 89 kDa olan aktif kısım ve 24 kDa olan DNA bağlanma bölümüdür. Western Blot çalışmasıyla MIA PaCa-2 hücrelerinin formülasyonlarla 72 saatlik inkübasyonu sonucu, tekli ilaç formülasyonlarına göre kombinasyon misellerinin daha fazla PARP-1 bölünmesi sağladığı doğrulanmıştır. Mazumdar ve ark. Sonic hedgehog (SHH)' un kolon kanseri hücre serilerinde PARP kesilmesini ve kaspaz-3 deaktivasyonunu inhibe ettiğini ve böylece de hücresel proliferasyonu kontrol ettiğini bildirmişlerdir (Mazumdar ve ark., 2010). Singh ve ark. yaptıkları çalışma ile Mazumdar ve ark.'ın çalışmasını desteklemişlerdir. Bu çalışmada Vismodegib (GDC-0449)' in Hh inhibitörü olarak pankreas kanseri kök hücreleri üzerindeki rolünü araştırmışlardır (Singh ve ark., 2011). 10 μ M Vismodegib (GDC-0449)'ın etkili bir şekilde PARP bölünmesini artırdığı gösterilmiştir. Tez çalışmasında sonuçlarında da Hh inhibitörü, PARP ve apoptozis arasındaki etkileşimler uyumlu bulunmuştur. Apoptozis sinyal yolağının bir başka bileşeni olan Bax ise proapoptotik bir protein olarak bilinmektedir ve apoptotik uyarıma karşı hücre ölümünü hızlandırmaktadır (Hill ve ark., 2013). Tez çalışmasında, misel kombinasyonu MIA PaCa-2 hücreleriyle inkübe edildiğinde, tekli misel formülasyonlarına göre daha fazla Bax ekspresyonunda artış sağladığı görülmüştür. Fizyolojik koşullar altında, transmembran protein PTCH-1, Smo proteinini inhibe etmektedir. Hh ligandının PTCH-1 reseptörüne bağlanmasıyla Smo inaktivasyonu baskılanır ve Gli-1 transkripsiyon faktörleri aktive olur. Vismodegib (GDC-0449), potent bir Smo inhibitörüdür ve Gli-1'ı indirekt olarak inaktive eder (Yauch ve ark., 2009). Bu

durum neticesinde PTCH-1'in fonksiyonunu kaybetmesi ile bu membran proteini downregüle olur. Tez çalışmasında MIA PaCa-2 hücrelerini 72 saat formülasyonlarla inhibe ederek PTCH-1 ve Gli-1 ekspresyon düzeylerini ölçerek, misel kombinasyonunun tekli formülasyonlara göre PTCH-1 ve Gli-1 ekspresyonunu daha etkili inhibe ettiği bulunmuştur.

Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT), epitel hücrelerin polaritelerini ve hücre-hücre adeziv hallerinin kaybolması ve bunun sonucu olarak migrasyon, invazyon gibi mezankimal karakteristikler kazanması halidir ve bu durum pankreatik duktal adenokarsinomanın oldukça agresif bir hal kazanmasına sebep olmaktadır (Kalluri ve Weinberg, 2009). Bu yüzden, bu tez çalışmasında, Hh yolağı inhibisyonunun MIA PaCa-2 hücrelerinin invazyon, migrasyon ve koloni oluşum potansiyelleri üzerine etkisi değerlendirilmiştir. 48 saat sonra, kontrol grubu, GEM miselleri grubu ve Vismodegib (GDC-0449) grubuyla inkübe edilmiş hücreler migrasyon deneyi için kazanmış alana göç edebilmişken, misel kombinasyonu ile inkübe edilmiş hücrelerde diğer gruplara nazaran hemen hemen göç görülmemiştir. Bu hücreler migrasyon özelliklerini kombinasyon miselleri etkisi ile yitirmişlerdir. Klonojenik deneyde ise hücrelerin uzun dönem sağkalımları ve koloni oluşturma potansiyelleri değerlendirilmiştir. İnkübasyondan 10 gün sonra, misel kombinasyonları ile tedavi edilmiş MIA PaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri diğer gruplara göre ciddi anlamda az bulunmuştur.

Formülasyonların in vivo etkinlikleri atimik nude fareler üzerinde değerlendirilmiştir. Bu farelere MIA PaCa-2 hücreleri subkütan yol ile implante edilerek ektopik tümör oluşumu sağlanmıştır. Farelerin kombinasyon miselleri ile tedavisi tümör büyüme hızı ve tümör ağırlığında diğer tedavi gruplarına ve kontrol grubuna nazaran anlamlı bir düşüş sağlamıştır. Kontrol grubunda Ki-67 ekspresyonu diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. GEM miselleri ve Vismodegib miselleri gruplarında daha düşük Ki-67 ekspresyonu gözlemlenirken, en düşük ekspresyon kombinasyon miselleri ile elde edilmiştir. Tümör örneklerinin morfolojik incelemeleri H&E boyama ile yapılmıştır. Sonuçlar, kontrol grubunda oldukça baskın bir epitel hücre kütlesi görülürken, misel kombinasyonu grubunda gevşek epitel hücre agregatları ve aralarda yüksek orandaki mezenkimal hücreler görülmüştür. İmmüno floresans çalışması ile pankreas kanseri doku örneklerindeki tümör stromal hücrelerindeki Gli-1 ekspresyonu araştırılmıştır. Yalnızca GEM miselleri ile tedavi Gli-1 ekspresyonunda bir değişiklik

meydana getirmemiştir. Bu sonuç yapılan in vitro çalışma ile de uygunluk göstermiştir. Kombinasyon misel tedavisi alan farelerden elde edilen tümör örneklerinde ise Gli-1 ekspresyonu downregüle olmuştur. ZEB-1 proteini EMT aktivasyonu ve metastaz promosyonu ile bağlantılıdır (Spaderna ve ark., 2008). Kombinasyon miselleri ile tedavinin ZEB-1 ekspresyonunu düşürüp düşüremeyeceğini analiz etmek için immünohistokimya çalışması yapılmıştır. Misel kombinasyonu, GEM miselleri ile tedaviye göre oldukça güçlü şekilde ZEB-1 ekspresyonunu baskılamıştır. Yalnızca GEM miselleri ile tedavi edilen grup kontrol grubuna yakın bir ZEB-1 ekspresyonu profili göstermiştir. Bu durum önceden yapılan çok önemli bir çalışma ile uyum göstermektedir (Shah ve ark., 2007). Misel kombinasyonu tedavi edilen farelerden elde edilen tümör örneklerinde aktif kaspaz-3 sinyali düzeylerinin yüksek, Ki-67 düzeyinin ise düşük olduğu gözlemlenmiştir. Tek başına Hh sinyalini hedeflemek tümör büyümesini engellemede yetersiz kalarak, Hh silinmesinden sonra dahi agresif tümör büyümesinin devam ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rhim ve ark., 2014; Kim ve ark., 2014; Lee ve ark., 2014). Tümör promosyonunun tümör stromasına bağlı artmış anjiogenezle doza bağlı ilişkisi önceki çalışmada gösterilmiştir (Mathew ve ark., 2014). Bu sebeple tez çalışmasında tümör dokularının morfolojileri incelenmiştir. Kombinasyon miselleri ile tedavi edilen grupta gevşek epitel hücre grupları görülürken, kontrol grubunda tümör kütlelerinde yoğun hücreler gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, GEM ve Vismodegib (GDC-0449) içeren misel kombinasyonunun MIA PaCa-2 ksenograft tümör büyümesini anlamlı derecede inhibe ettiğini, apoptozisi indüklediğini ve EMD'yi baskıladığını göstermektedir. Gempitabin ve Vismodegib' in doza bağımlı şekilde salımı ile sinerjistik etkisi elde edilerek tümör regresyonu sağlanabileceği gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abba, M., Patil, N., Leupold, J. ve Allgayer, H. (2016). MicroRNA Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Medicine*, **5(1)**, p.8.
- Abidi, A. (2014). Hedgehog signaling pathway: A novel target for cancer therapy: Vismodegib, a promising therapeutic option in treatment of basal cell carcinomas. *Indian Journal of Pharmacology*, **46(1)**, p.3.
- Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J. ve Carnero Ruiz, C. (2003). On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*, **258(1)**, pp.116-122.
- Anon, (2017). [online] Available at: (<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/western-blot-principle>) [Accessed 9 Apr. 2017].
- Apte, M., Haber, P., Darby, S., Rodgers, S., McCaughan, G., Korsten, M., Pirola, R. ve Wilson, J. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*, **44(4)**, pp.534-541.
- Arslan, A. (2010). Anthropometric Measures, Body Mass Index, and Pancreatic Cancer. *Archives of Internal Medicine*, **170(9)**, p.791.
- Bai, Y., Bai, Y., Dong, J., Li, Q., Jin, Y., Chen, B. ve Zhou, M. (2016). Hedgehog Signaling in Pancreatic Fibrosis and Cancer. *Medicine*, **95(10)**, p.e2996.
- Biswas, S., Kumari, P., Lakhani, P.M., Ghosh, B. (2016). Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* **83** 184–202.
- Bosetti, C., Rosato, V., Li, D., Silverman, D., Petersen, G., Bracci, P., Neale, R., Muscat, J., Anderson, K., Gallinger, S., Olson, S., Miller, A., Bas Bueno-de-Mesquita, H., Scelo, G., Janout, V., Holcatova, I., Laggiou, P., Serraino, D., Lucenteforte, E., Fabianova, E., Ghadirian, P., Baghurst, P., Zatonski, W., Foretova, L., Fontham, E., Bamlet, W., Holly, E., Negri, E., Hassan, M., Prizment, A., Cotterchio, M., Cleary, S., Kurtz, R., Maisonneuve, P., Trichopoulos, D., Polesel, J., Duell, E., Boffetta, P. ve La Vecchia, C. (2014). Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Annals of Oncology*, **25(10)**, pp.2065-2072.
- Cartwright, T., Cohn, A., Varkey, J., Chen, Y., Szatrowski, T., Cox, J. ve Schulz, J. (2002). Phase II Study of Oral Capecitabine in Patients With Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **20(1)**, pp.160-164.

- Castellanos, E., Berlin, J. ve Cardin, D. (2011). Current Treatment Options for Pancreatic Carcinoma. *Current Oncology Reports*, **13(3)**, pp.195-205.
- Castellanos, J. ve Merchant, N. (2013). Intensity of Follow-up after Pancreatic Cancer Resection. *Annals of Surgical Oncology*, **21(3)**, pp.747-751.
- Catenacci, D., Junttila, M., Karrison, T., Bahary, N., Horiba, M., Nattam, S., Marsh, R., Wallace, J., Kozloff, M., Rajdev, L., Cohen, D., Wade, J., Sleckman, B., Lenz, H., Stiff, P., Kumar, P., Xu, P., Henderson, L., Takebe, N., Salgia, R., Wang, X., Stadler, W., de Sauvage, F. ve Kindler, H. (2015). Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **33(36)**, pp.4284-4292.
- Chan, C.C. (2004). Analytical method validation and instrument performance verification. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons.
- Chen, J. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & Development*, **16(21)**, pp.2743-2748.
- Chen, J., Taipale, J., Young, K., Maiti, T. ve Beachy, P. (2002). Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99(22)**, pp.14071-14076.
- Chitkara, D., Mittal, A., Behrman, S., Kumar, N. ve Mahato, R. (2013). Self-Assembling, Amphiphilic Polymer–Gemcitabine Conjugate Shows Enhanced Antitumor Efficacy Against Human Pancreatic Adenocarcinoma. *Bioconjugate Chemistry*, **24(7)**, pp.1161-1173.
- Cheol Kim, S., Hoon Kim, Y., Min Park, K. ve Ju Lee, Y. (2012). Pancreatic Cancer Surgery: The State of the Art. *Current Drug Targets*, **13(6)**, pp.764-771.
- Chuong, M. D., Boggs, D. H., Patel, K. N. ve Regine, W. F. (2014). Adjuvant chemoradiation for pancreatic cancer: what does the evidence tell us? *Journal of Gastrointestinal Oncology*, **5(3)**, 166–177. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2014.025>
- Cohen, S. and Bernstein, H. (1996). Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. Marcel Dekker, New York.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel,

- P., Montoto-Grillot, C. ve Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, **364(19)**, pp.1817-1825.
- Cooper, M. (1998). Teratogen-Mediated Inhibition of Target Tissue Response to Shh Signaling. *Science*, **280(5369)**, pp.1603-1607.
- Costache, M., Ioana, M., Iordache, S., Ene, D., Costache, C. ve Săftoiu, A. (2015). VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature. *Romanian Journal Of Internal Medicine*, **53(3)**, pp. 199-208.
- Crivellato, E., Nico, B. ve Ribatti, D. (2007). Contribution of endothelial cells to organogenesis: a modern reappraisal of an old Aristotelian concept. *Journal of Anatomy*, **211(4)**: 415–427
- Daman, Z., Ostad, S., Amini, M., Gilani, K., 2014. Preparation, optimization and in vitro characterization of stearyl-gemcitabine polymeric micelles: a comparison with its self-assembled nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **468 (1–2)**, pp. 142–151 (Jul 1).
- Danafar, H. (2016). MPEG-PCL copolymeric nanoparticles in drug delivery systems. *Cogent Medicine*, **3(1)**.
- Dangi-Garimella, S., Krantz, S.B., Shields, M.A., ve ark. Epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer progression. In: Grippo PJ, Munshi HG, editors. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network; 2012. Chapter 5.
- De Herreros, A., Peiró, S., Nassour, M. ve Savagner, P. (2010). Snail Family Regulation and Epithelial Mesenchymal Transitions in Breast Cancer Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **15(2)**, pp.135-147.
- Diop-Frimpong, B., Chauhan, V., Krane, S., Boucher, Y. ve Jain, R. (2011). Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108(7)**, pp.2909-2914.
- Dong, X. ve Mumper, R. (2010). Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. *Nanomedicine*, **5(4)**, pp.597-615.
- Ewald, B., Sampath, D. ve Plunkett, W. (2008). Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene*, **27(50)**, pp.6522-6537.
- Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A., Gabrielson, K., Matsui, W. ve

- Maitra, A. (2007). Blockade of Hedgehog Signaling Inhibits Pancreatic Cancer Invasion and Metastases: A New Paradigm for Combination Therapy in Solid Cancers. *Cancer Research*, **67(5)**, pp.2187-2196.
- Felmer, C. (2012). Vismodegib (Erivedge) for advanced basal cell carcinoma. *P T*, **37**, pp. 670–677.
- Fernandez, A., Van derpoorten, K., Dasnois, L., Lebtahi, K., Dubois, V., Lobl, T., Gangwar, S., Oliyai, C., Lewis, E., Shochat, D. ve Trouet, A. (2001). N-Succinyl-(β -alanyl-l-leucyl-l-alanyl-l-leucyl)doxorubicin: An Extracellularly Tumor-Activated Prodrug Devoid of Intravenous Acute Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **44(22)**, pp.3750-3753.
- Furukawa, T. (2015). Impacts of Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology*, **5**:23.
- Gaucher, G., Dufresne, M., Sant, V., Kang, N., Maysinger, D. ve Leroux, J. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **109(1-3)**, pp.169-188.
- Gu, D. ve ark. (2016) Deciphering the role of hedgehog signaling in pancreatic cancer. *J Biomed Res*, **30(5)**: pp. 353–360.
- Gullotti, E. ve Yeo, Y. (2009). Extracellularly Activated Nanocarriers: A New Paradigm of Tumor Targeted Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, **6(4)**, pp.1041-1051.
- Gupta, S., Takebe, N. ve LoRusso, P. (2010). Review: Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, **2(4)**, pp.237-250.
- Gutman, J., Denoncourt, E., Schatz, D., Smith, C. ve Pollyea, D. (2015). A Phase 2 Study of the Hedgehog Pathway Smoothened Inhibitor PF-04449913 to Reduce Relapse in High Risk Acute Leukemia and MDS Patients Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **21(2)**, p.S286.
- Hanna, A. ve Shevde, L. (2016). Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Molecular Cancer*, **15**(1).
- Hill, R., Rabb, M., Madureira, P., Clements, D., Gujar, S., Waisman, D., Giacomantonio, C. ve Lee, P. (2013). Gemcitabine-mediated tumour regression and p53-dependent gene expression: implications for colon and pancreatic cancer therapy. *Cell Death and Disease*, **4(9)**, p.e791.
- Hruban, R., Goggins, M., Parsons, J. ve Kern, S. (2000). Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* **(6) (8)** pp.2969-2972

- Hruban, R., Canto, M., Goggins, M., Schulick, R. ve Klein, A. (2010). Update on Familial Pancreatic Cancer. *Advances in Surgery*, **44(1)**, pp.293-311.
- ICH Q2(R1) guideline-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (Rapor No). (2005). INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.
- Infante, J., Matsubayashi, H., Sato, N., Tonascia, J., Klein, A., Riall, T., Yeo, C., Iacobuzio-Donahue, C. ve Goggins, M. (2007). Peritumoral Fibroblast SPARC Expression and Patient Outcome With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, **25(3)**, pp.319-325.
- Ingham, P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, **15(23)**, pp.3059-3087.
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P. ve Lowenfels, A. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, **393(4)**, pp.535-545.
- Jalili, A., Mertz, K., Romanov, J., Wagner, C., Kalthoff, F., Stuetz, A., Pathria, G., Gschaidner, M., Stingl, G. and Wagner, S. (2013). NVP-LDE225, a Potent and Selective SMOOTHENED Antagonist Reduces Melanoma Growth In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. **30; 8(7)**, e69064.
- Jhaveri, A. and Torchilin, V. (2014). Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology*, **5:77**.
- Jiang, J. ve Hui, C. (2008). Hedgehog Signaling in Development and Cancer. *Developmental Cell*, **15(6)**, pp.801-812.
- Jiang, J., Liu, C., Cheng, H., Lu, Y., Qin, Y., Xu, Y., Xu, J., Long, J., Liu, L., Ni, Q. ve Yu, X. (2015). Epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer: Is it a clinically significant factor?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **1855(1)**, pp.43-49.
- Johnson, R., Nguyen, M., Padalecki, S., Grubbs, B., Merkel, A., Oyajobi, B., Matrisian, L., Mundy, G. ve Sterling, J. (2010). TGF- Promotion of Gli2-Induced Expression of Parathyroid Hormone-Related Protein, an Important Osteolytic Factor in Bone Metastasis, Is Independent of Canonical Hedgehog Signaling. *Cancer Research*, **71(3)**, pp.822-831.

- Jokerst, J., Lobovkina, T., Zare, R. and Gambhir, S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging ve therapy. *Nanomedicine*, **6(4)**, pp.715-728.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D., Lin, J., Leary, R., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S., Fu, B., Lin, M., Calhoun, E., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Smith, D., Hidalgo, M., Leach, S., Klein, A., Jaffee, E., Goggins, M., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C., Eshleman, J., Kern, S., Hruban, R., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. ve Kinzler, K. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science*, **321(5897)**, pp.1801-1806.
- Kaiser, M. (1985). Pancreatic Cancer. *Archives of Surgery*, **120(8)**, p.899.
- Kalepu, S. ve Nekkanti, V. (2015). Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **5(5)**, pp.442-453.
- Kaliyappan, K., Palanisamy, M., Duraiyan, J. ve Govindarajan, R. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, **4(6)**, p.307.
- Kalluri, R. ve Weinberg, R. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, **119(6)**, pp.1420-1428.
- Kamisawa, T., Wood, L., Itoi, T. ve Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *The Lancet*, **388(10039)**, pp.73-85.
- Karanikas, M., Esemipidis, A., Chasan, Z., Deftereou, T., Antonopoulou, M., Bozali, F., Amarantidis, K. ve Man, Y. (2016). Pancreatic Cancer from Molecular Pathways to Treatment Opinion. *Journal of Cancer*, **7(10)**, pp.1328-1339.
- Kelleher, F. (2010). Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, **32(4)**, pp.445-451.
- Khaw, B.A., daSilva, J., Vural, I., Narula, J., Torchilin, V.P. (2001) Intracytoplasmic gene delivery for in vitro transfection with cytoskeleton-specific immunoliposomes. *Journal of Controlled Release*, **75 (1-2)**, 199-210.
- Khaw, B.A., Narula, J., Vural, I., Torchilin, V.P. (1998) Cytoskeleton- specific immunoliposomes: sealing of hypoxic cells and intracellular delivery of DNA. *International journal of pharmaceuticals*, **162 (1-2)**, 71- 76.
- Kim, E., Sahai, V., Abel, E., Griffith, K., Greenson, J., Takebe, N., Khan, G., Blau, J., Craig, R., Balis, U., Zalupski, M. ve Simeone, D. (2014). Pilot Clinical Trial of Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449 (Vismodegib) in Combination with

- Gemcitabine in Patients with Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, **20(23)**, pp.5937-5945.
- Kimura, H., Ng, J. and Curran, T. (2008). Transient Inhibition of the Hedgehog Pathway in Young Mice Causes Permanent Defects in Bone Structure. *Cancer Cell*, **13(3)**, pp.249-60.
- Kleger, A., Perkhofer, L. ve Seufferlein, T. (2014). Smarter drugs emerging in pancreatic cancer therapy. *Annals of Oncology*, **25(7)**, pp.1260-1270.
- Klein, A. (2004). Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Research*, **64(7)**, pp.2634-2638.
- Koprowski, H., Herlyn, M., Steplewski, Z. ve Sears, H. (1981). Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science*, **212(4490)**, pp.53-55.
- Korc, M. (2003). Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, **2(1)**, p.8.
- Kulthe, S., Choudhari, Y., Inamdar, N. ve Mourya, V. (2012). Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. *Designed Monomers and Polymers*, **15(5)**, pp.465-521.
- Lamouille, S., Xu, J. ve Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15(3)**, pp.178-196.
- Lauth, M., Bergstrom, A., Shimokawa, T. ve Toftgard, R. (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104(20)**, pp.8455-8460.
- Lee, H., Chung, M., Park, J., Bang, S., Park, S., Kim, H., Noh, M., Lee, S., Kim, Y., Kim, H., Kim, C., Lee, D., Cho, K., Cho, C., Moon, J., Kim, D., Kang, D., Cheon, Y., Choi, H., Kim, T., Kim, J., Moon, J., Shin, H. ve Song, S. (2017). A randomized, multicenter, phase III study of gemcitabine combined with capecitabine versus gemcitabine alone as first-line chemotherapy for advanced pancreatic cancer in South Korea. *Medicine*, **96(1)**, p.e5702.
- Lee, J., Dedhar, S., Kalluri, R. ve Thompson, E. (2006). The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, **172(7)**, pp.973-981.
- Lee, J., Perera, R., Wang, H., Wu, D., Liu, X., Han, S., Fitamant, J., Jones, P., Ghanta, K., Kawano, S., Nagle, J., Deshpande, V., Boucher, Y., Kato, T., Chen, J., Willmann, J., Bardeesy, N. ve Beachy, P. (2014). Stromal response to Hedgehog signaling

- restrains pancreatic cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111(30)**, pp.E3091-E3100.
- Lee, S., Welch, K., Panter, K., Gardner, D., Garrossian, M. ve Chang, C. (2014). Cyclopamine: From Cyclops Lambs to Cancer Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62(30)**, pp.7355-7362.
- Letchford, K., Burt, H., 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65 (3)**, 259–269.
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B. ve Feeney, P. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), pp.3-26.
- Luedke, E., Cristina Jaime-Ramirez, A., Bhawe, N. ve Carson, W. (2012). Monoclonal Antibody Therapy of Pancreatic Cancer With Cetuximab. *Journal of Immunotherapy*, **35(5)**, pp.367-373.
- Lukyanov, A.N., Gao, Z., Mazzola, L., Torchilin, V.P. (2002). Polyethylene glycol-diacyl lipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice. *Pharm. Res.* **19**, pp. 1424–1429.
- Lum, L. (2004). The Hedgehog Response Network: Sensors, Switches, and Routers. *Science*, **304(5678)**, pp.1755-1759.
- Luo, G., Long, J., Zhang, B., Liu, C., Xu, J., Ni, Q. ve Yu, X. (2012). Stroma and pancreatic ductal adenocarcinoma: An interaction loop. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **1826(1)**, pp.170-178.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. ve Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, **65(1-2)**, pp.271-284.
- Maitra, A. ve Hruban, R. (2008). Pancreatic Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **3(1)**, pp.157-188.
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Rosso, T., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C. ve Negri, E. (2016). European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Annals of Oncology*, **27(4)**, pp.725-731.
- Mathew, E., Zhang, Y., Holtz, A., Kane, K., Song, J., Allen, B. ve Pasca di Magliano, M. (2014). Dosage-Dependent Regulation of Pancreatic Cancer Growth and Angiogenesis by Hedgehog Signaling. *Cell Reports*, **9(2)**, pp.484-494.

- Matsumura, Y. ve Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy – mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**, pp. 6387–6392.
- Mazumdar, T., DeVecchio, J., Shi, T., Jones, J., Agyeman, A. ve Houghton, J. (2010). Hedgehog Signaling Drives Cellular Survival in Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Research*, **71(3)**, pp.1092-1102.
- Mimeault, M., Rachagani, S., Muniyan, S., Seshacharyulu, P., Johansson, S., Datta, K., Lin, M. ve Batra, S. (2015). Inhibition of hedgehog signaling improves the anti-carcinogenic effects of docetaxel in prostate cancer. *Oncotarget*, **6(6)**, pp.3887-3903.
- Mini, E. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, **17(5)**, pp.v7-v12.
- Mohammed, S., Van Buren, G., Fisher, W.E. (2014). Pancreatic cancer: advances in treatment. *World J Gastroenterol.* **20**, pp. 9354–9360.
- Morris, J., Wang, S. ve Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer*, **10(10)**, pp.683-695.
- Mousa, S. ve Mousa, S. (2010). Current Status of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition in Age-Related Macular Degeneration. *BioDrugs*, **24(3)**, pp.183-194.
- Mu, L., Elbayoumi, T. ve Torchilin, V. (2005). Mixed micelles made of poly(ethylene glycol)–phosphatidylethanolamine conjugate and d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate as pharmaceutical nanocarriers for camptothecin. *International Journal of Pharmaceutics*, **306(1-2)**, pp.142-149.
- Muller, P. ve Vousden, K. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, **15(1)**, pp.2-8.
- Müller, R. (1991). Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting. 1st ed. Stuttgart
- Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Friess H. ve ark. (2004). A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, **351(7)**, pp.726-726.
- Neoptolemos, J., Stocken, D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., Moore, M., Gallinger, S., Mariette, C., Wente, M., Izbicki, J., Friess, H., Lerch, M., Dervenis, C., Oláh, A., Butturini, G., Doi, R., Lind, P., Smith, D., Valle, J., Palmer, D., Buckels, J., Thompson, J., McKay, C., Rawcliffe, C., Büchler, M. ve

- European Study Group for Pancreatic Cancer, f. (2010). Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection. *JAMA*, **304(10)**, p.1073.
- Noble, J. ve Bailey, M. (2009). Chapter 8 Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, pp.73-95.
- Nolan-Stevaux, O., Lau, J., Truitt, M., Chu, G., Hebrok, M., Fernandez-Zapico, M. ve Hanahan, D. (2009). GLI1 is regulated through Smoothed-muscle-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes & Development*, **23(1)**, pp.24-36.
- Oberstein, P. ve Olive, K. (2013). Pancreatic cancer: why is it so hard to treat?. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, **6(4)**, pp.321-337.
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zülke, C., Fahlke, J., Arning, M., Sinn, M., Hinke, A. ve Riess, H. (2013). Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine and Long-term Outcomes Among Patients With Resected Pancreatic Cancer. *JAMA*, **310(14)**, p.1473.
- Olive, K., Jacobetz, M., Davidson, C., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M., Caldwell, M., Allard, D., Frese, K., DeNicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W., Chang, A., Dhara, M., Wang, L., Ruckert, F., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Izeradjene, K., Hingorani, S., Huang, P., Davies, S., Plunkett, W., Egorin, M., Hruban, R., Whitebread, N., McGovern, K., Adams, J., Iacobuzio-Donahue, C., Griffiths, J. ve Tuveson, D. (2009). Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science*, **324(5933)**, pp.1457-1461.
- O'Neil, B. ve McLeod, H. (2006). Thymidine Phosphorylase and Capecitabine: A Predictive Marker for Therapy Selection?. *Journal of Clinical Oncology*, **24(25)**, pp.4051-4053.
- Pasca di Magliano, M. ve Hebrok, M. (2010). Hedgehog Signaling Pathways in Pancreatic Cancer Pathogenesis. *Pancreatic Cancer*, pp.403-418.
- Paul Robinson, J., Sturgis, J. ve Kumar, G. Chapter 10 Immunofluorescence, IHC Staining Methods, 5th Edition year p.61-65.
- Payne, S., Maher, M., Tran, N., Van De Hey, D., Foley, T., Yueh, A., Leystra, A., Pasch, C., Jeffrey, J., Clipson, L., Matkowskyj, K. ve Deming, D. (2015). PIK3CA mutations

can initiate pancreatic tumorigenesis and are targetable with PI3K inhibitors. *Oncogenesis*, **4(10)**, p.e169.

- Philip, P., Benedetti, J., Corless, C., Wong, R., O'Reilly, E., Flynn, P., Rowland, K., Atkins, J., Mirtsching, B., Rivkin, S., Khorana, A., Goldman, B., Fenoglio-Preiser, C., Abbruzzese, J. ve Blanke, C. (2010). Phase III Study Comparing Gemcitabine Plus Cetuximab Versus Gemcitabine in Patients With Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: Southwest Oncology Group–Directed Intergroup Trial S0205. *Journal of Clinical Oncology*, **28(22)**, pp.3605-3610.
- Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y.Z. ve ark. (1995). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol*; **22 (4-11)**: 3–10.
- Pili, B., Reddy, L., Bourgaux, C., Lepêtre-Mouelhi, S., Desmaële, D. ve Couvreur, P. (2010). Liposomal squalenoyl-gemcitabine: formulation, characterization and anticancer activity evaluation. *Nanoscale*, **2(8)**, p.1521.
- Rahib, L., Smith, B., Aizenberg, R., Rosenzweig, A., Fleshman, J. ve Matrisian, L. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, **74(11)**, pp.2913-2921.
- Raimondi, S., Lowenfels, A., Morselli-Labate, A., Maisonneuve, P. ve Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **24(3)**, pp.349-358.
- Rapoport, N. (2007). Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Progress in Polymer Science*, **32(8-9)**, pp.962-990.
- Reddy, L. ve Couvreur, P. (2008). Novel Approaches to Deliver Gemcitabine to Cancers. *Current Pharmaceutical Design*, **14(11)**, pp.1124-1137.
- Regine, W., Winter, K., Abrams, R., Safran, H., Hoffman, J., Konski, A., Benson, A., Macdonald, J., Rich, T. ve Willett, C. (2011). Fluorouracil-based Chemoradiation with Either Gemcitabine or Fluorouracil Chemotherapy after Resection of Pancreatic Adenocarcinoma: 5-Year Analysis of the U.S. Intergroup/RTOG 9704 Phase III Trial. *Annals of Surgical Oncology*, **18(5)**, pp.1319-1326.
- Rhim, A., Oberstein, P., Thomas, D., Mirek, E., Palermo, C., Sastra, S., Dekleva, E., Saunders, T., Becerra, C., Tattersall, I., Westphalen, C., Kitajewski, J., Fernandez-Barrena, M., Fernandez-Zapico, M., Iacobuzio-Donahue, C., Olive, K. ve Stanger, B.

- (2014). Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, **25(6)**, pp.735-747.
- Rimkus, T., Carpenter, R., Qasem, S., Chan, M. ve Lo, H. (2016). Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers*, **8(2)**, p.22.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L. ve ark. (2013). Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K. ve ark. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Owen, S.C., Association, A.P., 2006. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, London.
- Sandhiya, S., Melvin, G., Kumar, S. ve Dkhar, S. (2013). The dawn of hedgehog inhibitors: Vismodegib. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, **4(1)**, p.4.
- Sawant, R., Sawant, R. ve Torchilin, V. (2008). Mixed PEG–PE/vitamin E tumor-targeted immunomicelles as carriers for poorly soluble anti-cancer drugs: Improved drug solubilization and enhanced in vitro cytotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70(1)**, pp.51-57.
- Scales, S. ve de Sauvage, F. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, **30(6)**, pp.303-312.
- Sekulic, A., Migden, M.R., Oro, A.E. ve ark.(2012). Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Eng J Med.*, **366(23)**, 2171–2179.
- Serrano-Gomez, S., Maziveyi, M. and Alahari, S. (2016). Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular Cancer*, **15(18)**.
- Shah, A., Summy, J., Zhang, J., Park, S., Parikh, N. ve Gallick, G. (2007). Development and Characterization of Gemcitabine-Resistant Pancreatic Tumor Cells. *Annals of Surgical Oncology*, **14(12)**, pp.3629-3637.
- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T., Misra, A. (2006) Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog*, **22 (1)**, 186-198.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A. ve diğerleri. (1991) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and

- pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **16 (4)**, 249-255.
- Shih, T. ve Lindley, C. (2006). Bevacizumab: An angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clinical Therapeutics*, **28(11)**, pp.1779-1802.
- Siegel, R., Miller, K. ve Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. CA: A *Cancer Journal for Clinicians*, **65(1)**, pp.5-29.
- Singh, B., Fu, J., Srivastava, R. ve Shankar, S. (2011). Hedgehog Signaling Antagonist GDC-0449 (Vismodegib) Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics: Molecular Mechanisms. *PLoS ONE*, **6(11)**, p.e27306.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. ve Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150(1)**, pp.76-85.
- Spaderna, S., Schmalhofer, O., Wahlbuhl, M., Dimmler, A., Bauer, K., Sultan, A., Hlubek, F., Jung, A., Strand, D., Eger, A., Kirchner, T., Behrens, J. ve Brabletz, T. (2008). The Transcriptional Repressor ZEB1 Promotes Metastasis and Loss of Cell Polarity in Cancer. *Cancer Research*, **68(2)**, pp.537-544.
- Stern, R. (2004). Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*, **83(7)**, pp.317-325.
- Teague, A., Lim, K. ve Wang-Gillam, A. (2015). Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, **7(2)**, pp.68-84.
- Teglund, S. ve Toftgård, R. (2010). Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **1805(2)**, pp.181-208.
- Thayer, S., di Magliano, M., Heiser, P., Nielsen, C., Roberts, D., Lauwers, G., Qi, Y., Gysin, S., Castillo, C., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. ve Hebros, M. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, **425(6960)**, pp.851-856.
- Thiery, J., Acloque, H., Huang, R. ve Nieto, M. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, **139(5)**, pp.871-890.
- Torchilin, V. (2006). Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research*, **24(1)**, pp.1-16.

- Torchilin, V. P. (2010). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handb. Exp. Pharmacol.* **197**, 3–53.
- Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. ve Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, **65(2)**, pp.87-108.
- Tremblay, M., Lescarbeau, A., Grogan, M., Tan, E., Lin, G., Austad, B., Yu, L., Behnke, M., Nair, S., Hagel, M., White, K., Conley, J., Manna, J., Alvarez-Diez, T., Hoyt, J., Woodward, C., Sydor, J., Pink, M., MacDougall, J., Campbell, M., Cushing, J., Ferguson, J., Curtis, M., McGovern, K., Read, M., Palombella, V., Adams, J. ve Castro, A. (2009). Discovery of a Potent and Orally Active Hedgehog Pathway Antagonist (IPI-926). *Journal of Medicinal Chemistry*, **52(14)**, pp.4400-4418.
- USP31-Validation of Compendial Procedures. (2007). USP31 (2008)-NF26 (c. 1, s. 683-687). Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention
- Van Laethem, J., Hammel, P., Mornex, F., Azria, D., Van Tienhoven, G., Vergauwe, P., Peeters, M., Polus, M., Praet, M., Mauer, M., Collette, L., Budach, V., Lutz, M., Van Cutsem, E. ve Haustermans, K. (2010). Adjuvant Gemcitabine Alone Versus Gemcitabine-Based Chemoradiotherapy After Curative Resection for Pancreatic Cancer: A Randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/GERCOR Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*, **28(29)**, pp.4450-4456.
- Vandana, M. ve Sahoo, S. (2010). Long circulation and cytotoxicity of PEGylated gemcitabine and its potential for the treatment of pancreatic cancer. *Biomaterials*, **31(35)**, pp.9340-9356.
- Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J. ve Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **367(2)**, pp.235-241.
- Von Hoff, D.D., Ervin, T.J., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J.R. ve ark. (2012) Randomized phase III study of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with metastatic adenocarcinoma of the pancreas (MPACT). *J Clin Oncol*, **34**: abstract LBA148.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A., Ali, S., Abbruzzese, J., Gallick, G. ve Sarkar, F. (2009). Acquisition of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype of Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells Is Linked with Activation of the Notch Signaling Pathway. *Cancer Research*, **69(6)**, pp.2400-2407.

- Wang, F., Ma, L., Zhang, Z., Liu, X., Gao, H., Zhuang, Y., Yang, P., Kornmann, M., Tian, X. ve Yang, Y. (2016). Hedgehog Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *Journal of Cancer*, **7(4)**, pp.408-417.
- Wasan, H., Springett, G., Chodkiewicz, C., Wong, R., Maurel, J., Barone, C., Rosbrook, B., Ricart, A., Kim, S. ve Spano, J. (2009). CA 19-9 as a biomarker in advanced pancreatic cancer patients randomised to gemcitabine plus axitinib or gemcitabine alone. *British Journal of Cancer*, **101(7)**, pp.1162-1167.
- Whatcott, C.J., Posner, R.G., Von Hoff, D.D. ve ark. (2012). Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. In: Grippo PJ, Munshi HG, editors. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network; Chapter 8.
- Wolfgang, C., Herman, J., Laheru, D., Klein, A., Erdek, M., Fishman, E. ve Hruban, R. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **63(5)**, pp.318-348.
- Yauch, R., Dijkgraaf, G., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C., Tang, T., Bazan, J., Kan, Z., Seshagiri, S., Hann, C., Gould, S., Low, J., Rudin, C. ve de Sauvage, F. (2009). Smoothed Mutation Confers Resistance to a Hedgehog Pathway Inhibitor in Medulloblastoma. *Science*, **326(5952)**, pp.572-574.
- Yauch, R., Gould, S., Scales, S., Tang, T., Tian, H., Ahn, C., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J., Rubin, L. ve de Sauvage, F. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, **455(7211)**, pp.406-410.
- Yin, H., Liao, L., Fang, J. (2014) Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting: The Concept, Application and Prospect. *JSM Clin Oncol Res* **2(1)**: 1010.
- Yoon, J., Gallant, M., Lamm, M., Iannaccone, S., Vieux, K., Proytcheva, M., Hyjek, E., Iannaccone, P. ve Walterhouse, D. (2013). Noncanonical Regulation of the Hedgehog Mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt Lymphoma. *Molecular Cancer Research*, **11(6)**, pp.604-615.
- Zhang, Z., Tan, S. ve Feng, S. (2012). Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery. *Biomaterials*, **33(19)**, pp.4889-4906.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



Nebraska's Health Science Center

Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)
Office of Regulatory Affairs (ORA)

Protocol #: 13-033-07-FC

Title: Polymeric Nanomedicines for Treatment of Pancreatic Cancer

Primary: Ram Mahato

Contact: Vaibhav Mundra, Mr

Secondary: Pankaj Singh, PhD

Research Personnel: Saud Almawash, Deepak Chitkara, Rinku Dutta, Melek Karaca, Krishna Kattel, Virender Kumar, Timothy Martin, Anupama Mittal, Goutam Mondal, Vaibhav Mundra, Mr, Yang Peng, Vinee Purohit, PhD, Surendra Shukla, Ruinan Yang, Miss

Dear Dr. Mahato:

Thank you for submitting your Request for Change dated 04/28/2015. After careful consideration by Designated Member Review (DMR), the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) (utilizing review criteria based on principles outlined in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition) recommended your project, as changed, for approval. As part of the final review process, a harm/benefit analysis was conducted weighing the potential adverse effects of the study against the potential benefits that are likely to accrue as a result of the research. It was determined that the benefits outweigh, or balance, the harms and the proposal is in compliance with the Public Health Service (PHS) Policy on the Human Care and Use of Laboratory Animals, USDA Regulations (where applicable), the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and UNMC/UNO IACUC Animal Welfare Assurance, Guidelines and Policies. This letter constitutes official notification of the approval and release of your project with the requested change. All previously approved documents, including previous Requests for Change, are no longer valid; this latest version is now the only approved document and you are only authorized to perform procedures outlined in this version of the protocol.

Please be advised that there may be additional training requirements before you are authorized to have contact with animals and/or access to the animal facilities. IACUC approval does not constitute completion of all required training nor provide authorization for contact with animals or access to animal facilities. CM can be reached at 9-4034 to assist you with the additional training requirements.

The Committee wishes to remind you that, under the provisions of the Animal Welfare Assurance (A3294-01) from UNMC/UNO to the Public Health Service (PHS), the principal investigator or project director is directly responsible for keeping the IACUC informed of any proposed changes involving the care and/or use of animals. In addition, continuing review is required. Please notify the IACUC in writing if the protocol is completed during the approval period.

Best wishes for continued success in your research efforts.

William G. Chaney, Ph.D.
Executive Chair, IACUC
987830 Nebraska Medical Center
Omaha, NE 68198-7830
Phone: [402-559-6657](tel:402-559-6657)
Fax: [402-559-3300](tel:402-559-3300)
email: iacucora@unmc.edu



INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)
 987830 Nebraska Medical Center
 Omaha, NE 68198-7830
 402/559-8046
 Fax 402/559-3300
 IACUCORA@unmc.edu

IACUC APPLICATION FOR FACULTY ANIMAL RESEARCH

SECTION I

1. SUBMISSION REQUIREMENTS

What to Submit: This application is to be completed if you are a faculty member at UNMC or UNO proposing to use animals in research on either campus. If you need to breed animals as part of the experimental design of the research (i.e. need to generate pregnant females for fetal tissue or need to perform experimental research on suckling pups, etc) then complete this form and complete and attach Addendum A-Protocol Specific Breeding.

How to Submit: The IACUC recommends you submit the entire application by email to iacucora@unmc.edu. Alternatively, if you submit a hard copy, provide one (1) original and one (1) copy.

Deadline: Items that qualify for Full Committee Review must be submitted by the last business day of the month to be considered for review the following month. Items that qualify for weekly Designated Member Review must be submitted by Monday of each week. Type of review, Full Committee or Designated Member, is determined by the IACUC Administration based on regulatory requirements relative to the content of the submission.

2. APPLICATION DATA

Title of Protocol: Polymeric nanomedicines for treatment of pancreatic cancer
 Status: New Submission ☐ 3 Year De novo Review of IACUC Protocol #: _____
 Starting Date: 01/09/2014 Projected Completion Date: 05/31/2016
 Principal Investigator: Dr. Ram I Mahato
 Email: ram.mahato@unmc.edu Phone: 402-559-5422
 Department/College: College of Pharmacy Address: 986025 Nebraska Medical center
 Campus Zip Code: 68198-6025

3. FUNDING SOURCE Check the appropriate spaces and/or provide the information requested.

PHS ☐ Nebraska State Grant Funds (LB506) ☐
 NSF ☐ Departmental/Internal Funds ☐
 Other External Funds ☐ Specify: Kosten Foundation

4. STATUS OF GRANT APPLICATION

Application submitted on: Funded Application to be submitted on:
 Not applicable: ☒ Unusual deadline or considerations:

5. CERTIFICATION OF PRINCIPAL INVESTIGATOR

1. I am thoroughly familiar with the literature in the field of research proposed in this application, and I have determined that the research must be conducted on living animals.
2. I will abide by the requirements of the PHS Policy on Humane Care and Use of Live Vertebrate Animals, applicable Animal Welfare Act regulations and USDA Animal Care Policies, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and all UNMC/UNO IACUC policies, guidelines, and procedures.
3. I will conduct this study in full accordance with the protocol approved by the IACUC.
4. I will ensure that all listed study personnel will carefully review this protocol after it has been approved by the IACUC and before undertaking any procedure on live vertebrate animals. A copy of the approved IACUC protocol and all approved changes will be maintained and available to all study personnel.
5. I will supervise all experiments involving live animals. I will ensure that all listed study personnel are qualified or will be trained as necessary in proper procedures, including animal handling, anesthesia, surgery, post-procedural management, and euthanasia. I understand that I must maintain documentation of all procedure specific training for personnel involved in this protocol.
6. I will ensure that individuals not listed in this application will not conduct study related procedures on animals. When new personnel need to become involved in my studies, I will request approval from the IACUC before they are involved in animal studies.
7. I will ensure that all study personnel will participate in the UNMC or UNO Occupational Health and Safety Program and will be trained as required in order to minimize occupational health and safety risks.
8. I will ensure that all cell lines, tumor lines and other biological products have been appropriately tested to minimize the introduction of infectious agents into the animal colonies.
9. I will ensure that all study personnel follow appropriate husbandry procedures to minimize the possibility of transmission of infectious disease in my animal colony.
10. I understand that the health status of animals at UNMC is monitored via quarantine and sentinel animal programs. No animals may be brought on campus without participation in the program.
11. I understand that Comparative Medicine (CM) veterinary staff have been/will be consulted as needed in the planning phase as well as during the study.
12. I will ensure that appropriate, accurate, and timely clinical records are maintained on USDA regulated animals under my care.
13. I recognize that if I can not be contacted promptly and animals in this project show evidence of illness or pain, emergency care, including euthanasia, may be administered at the discretion of the veterinary staff.
14. This application accurately reflects all animal use and care requirements as described in all applicable funding application(s) which will be used to support this research.
15. I understand that any deviation or modification from this IACUC Protocol including but not limited to use of additional animals, addition or altering of procedures, alteration of standard housing, must be approved by the IACUC prior to initiation. I will request in writing and receive written approval from the IACUC for any modification to this protocol prior to its implementation. A copy of the current approved protocol that has incorporated all approved changes will be maintained and available to all study personnel.
16. If I leave the University during my study approval period, I will either terminate my study by submitting a written request to the IACUC or transfer my study to another eligible PI by submission of a request for change to the IACUC.
17. I certify that I will promptly notify the IACUC regarding any unexpected study results that impact animal welfare. Any unanticipated pain or distress, morbidity, or mortality will be reported to the attending veterinarian.
18. If I have approval to breed animals on this protocol, I agree to keep accurate records of the number of animals produced and their ultimate disposition. I understand that this information must be reported annually to the CM/IACUC office.
19. If a source of weaned animals for my experiments is from an approved Breeding Colony Protocol, I understand that all animals must be properly transferred to this research protocol through the on-line CMMS system at rs.unmc.edu.

My signature below or electronic submission of this application indicates I have read the assurances listed above and certify that I will conduct the project in full accordance with them.



____04/23/2015____

Principal Investigator Signature

Date

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ

