

**D-ERYTHRO-MAPP VE NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONUNUN MEME
KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZ İLE İLİŞKİLİ ÖLÜM
YOLAKLARININ İN-VİTRO VE İN-VİVO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Hüseyin İZGÖRDÜ

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

(İkinci Danışman: Doç. Dr. Salih GENCER)

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2022

*Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 20DRP029 no.lu proje ve
Tübitak 118Z943 no.lu 1002-Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hüseyin İZGÖRDÜ'nün D-ERYTHRO-MAPP VE NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZ İLE İLİŞKİLİ ÖLÜM YOLAKLARININ İN-VİTRO VE İN-VİVO OLARAK ARAŞTIRILMASI başlıklı çalışması 01/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvan Adı Soyadı

İmza

Üye	: Prof. Dr. Muzaffer METİNTAŞ
Üye	: Prof. Dr. İlhami ÇELİK
Üye	: Prof. Dr. Sinem ILGIN
Üye	: Doç. Dr. Filiz ALANYALI
Üye	: Doç. Dr. Gökhan KUŞ

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

DANIşMAN ONAYI

Danişmanlığını yürüttüğüm Doktora ęrencisi Hüseyin İZGÖRDÜ, D-ERYTHRO-MAPP VE NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZ İLE İLİşKİLİ ÖLÜM YOLAKLARININ İN-VİTRO VE İN-VİVO OLARAK ARAşTIRILMASI başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımca incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Daniřmanı

Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

ÖZET

D-ERYTHRO-MAPP VE NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZ İLE İLİŞKİLİ ÖLÜM YOLAKLARININ İN-VİTRO VE İN-VİVO OLARAK ARAŞTIRILMASI

Hüseyin İZGÖRDÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2022

Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

(İkinci Danışman: Doç. Dr. Salih GENCER)

Meme kanseri hem kadınlarda hem de erkeklerde görülen ve ölüm oranı yüksek bir kanser türüdür. Meme kanserinin tedavisi için standart ilaçlar ve tedavi yaklaşımları geliştirilmesine rağmen başarılı tedaviyi gerçekleştiren bir ajan ve uygulaması henüz geliştirilememiştir. Seramidler hücre büyümesini baskılama, apoptozu tetikleme ve yaşlanmayı düzenleme gibi antiproliferatif yanıtlara aracılık etmektedir. Hücrelerdeki seramid seviyesine bağlı olarak hücreler ölüme veya sağkalıma yönlendirilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı bir seramidaz inhibitörü olan D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formülasyonunun meme kanserinde sitotoksik, antikanser ve antiproliferatif özelliklerinin *in-vitro* ve *in-vivo* olarak incelenmesidir. MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etki MTT testi ile, hücre ölüm yolları anneksin-V, hücre döngüsü ve mitokondri zar potansiyeli değişiklikleri ile belirlenmiştir. Konfokal mikroskopi ile morfolojik değişiklikler ve geçirimli elektron mikroskopi yöntemi ile de ince yapısal değişiklikler belirlenmiştir. MCF-7 hücreleri üzerindeki invazyon, koloni oluşturma ve yara iyileşme etkileri de incelenmiştir. Ayrıca gen ve protein ekspresyon seviyeleri üzerindeki değişiklikler de tespit edilerek, BALB/c farelerde meme kanseri modeli oluşturulmuş ve tümör dokusundaki D-e-MAPP ve KLN formülasyonunun etkileri immunhistokimyasal işaretleme ile, morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopi ve TEM mikroskopi ile görüntülenmiş ve western blot ile protein ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, D-erythro-MAPP, Katı lipid nanopartikül.

ABSTRACT

IN-VITRO AND IN-VIVO INVESTIGATION OF D-ERYTHRO-MAPP AND NANOPARTICLE FORMULATION OF APOPTOSIS-RELATED DEATH PATH IN BREAST CANCER CELLS

Hüseyin İZGÖRDÜ

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, July 2022

Supervisor: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

(Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Salih GENCER)

Breast cancer is a type of cancer that occurs in both men and women and has a high mortality rate. Although standard drugs and treatment approaches have been developed for the treatment of breast cancer, an agent that performs successful treatment and its application have not been developed yet. Ceramides mediate antiproliferative responses such as suppressing cell growth, triggering apoptosis and regulating senescence. Depending on the level of ceramide in the cells, the cells are directed to death or survival. The aim of this thesis study is to examine the cytotoxic, anticancer and antiproliferative properties of D-e-MAPP and D-e-MAPP SLN formulation, which are ceramidase inhibitors, in breast cancer in-vitro and in-vivo. The cytotoxic effect in MCF-7 cells was determined by the MTT test, cell death pathways were determined by annexin-V, cell cycle and mitochondrial membrane potential changes. Morphological changes were determined by confocal microscopy and fine structural changes were determined by transmission electron microscopy. Invasion, colony formation and wound healing effects on MCF-7 cells were also investigated. In addition, the changes on gene and protein expression levels were determined, a breast cancer model was established in BALB/c mice and the effects of D-e-MAPP and SLN formulation in tumor tissue were visualized by immunohistochemical marking, morphological changes were visualized by confocal microscopy and TEM microscopy, and protein expression levels were visualized by western blot examined.

Keywords: Breast cancer, D-erythro-MAPP, Solid lipid nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hem günlük yaşamda hem de bilimsel alandaki her konuda yakın ilgisini, önerilerini, desteklerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli düşünceleri ve bilgi birikimi ile yol gösterip her konuda bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU hocama,

Tez çalışmamı destekleyen ve gerçekleşmesini sağlayan, Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'ne ve Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu'na,

Doktora öğrenimim süresince YÖK 100/2000 Doktora Bursu ile bana destek olan Yüksek Öğretim Kurumuna ve TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB), 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu ile destek olan Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu'na,

Tanıştığımız andan itibaren hem hayata dair konularda hem de tüm laboratuvar çalışmalarımnda beni hiç yalnız bırakmayan destekleriyle hep yanımda hissettiğim bazen ablalık her zaman hocalık yapan Doç. Dr. Canan VEJSELOVA SEZER'e

Tez çalışmalarım sırasında RT-PCR deneylerini yapmamda yardımcı olan ve bu konuda desteğini esirgemeyen ikinci danışman hocam Doç. Dr. Salih GENCER'e

Öğrenim hayatım boyunca hep yanımda olan her zaman destekleriyle bana güç veren ve bu yolda yürümemdeki en büyük destekçim olan değerli eşim Öğretim Görevlisi Özge KAYGUSUZ İZGÖRDÜ' ye

Doğduğum günden itibaren okumam için ellerinden geleni yapan bu zorlu yolda varlıklarını eksik hissettirmeyen annem Dilek İZGÖRDÜ, babam Ömer Faruk İZGÖRDÜ ve desteğini hiç eksik hissetmediğim kardeşim Hasan İZGÖRDÜ' ye

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Hüseyin İZGÖRDÜ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Hüseyin İZGÖRDÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Meme Kanseri Tanımı ve Genel Özellikleri	6
2.2. Meme Kanseri'nin Moleküler Sınıflandırılması	7
2.3. Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması	9
2.4. Meme Kanseri Tedavi Stratejileri	10
2.4.1. Cerrahi tedavi uygulamaları	10
2.4.2. Radyoterapi tedavi uygulamaları	11
2.4.3. Kemoterapi tedavi uygulamaları	11
2.4.4. Hormonal tedavi uygulamaları	11
2.4.5. Biyolojik tedavi uygulamaları	12
2.5. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı	12
2.6. 4T1 Fare Meme Kanseri Hücre Hattı	13
2.7. Hücre Ölüm Mekanizmaları	13
2.7.1. Otofaji.....	13
2.7.2. Nekroz.....	14

2.7.3. Nekropitozis	14
2.7.4. Piroptosis.....	15
2.7.5. Paraptozis.....	15
2.7.6. Mitotik katastrof.....	15
2.7.7. Apoptoz.....	15
2.7.7.1. Mitokondriyal (İntrinsik) yolak.....	19
2.7.7.2. Hücre ölüm reseptör (Ekstrinsik) yolağı	20
2.7.7.3. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler.....	21
2.8. Sfingolipidler	23
2.8.1. Seramidler	25
2.8.2. Seramidlerin kanserle ilişkisi	26
2.8.3. Seramidaz inhibitörleri.....	26
2.8.4. D-erythro-MAPP (D-e-MAPP)	27
2.9. Sitotoksikite Testleri.....	27
2.9.1. MTT testi.....	28
2.10. Nanopartiküller	29
2.10.1. Katı lipid nanopartiküller (KLN)	30
2.10.2. Katı Lipid Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	32
2.10.2.1. Homojenizasyon yöntemi.....	32
2.10.2.2. Ultrasonikasyon yöntemi	33
2.10.2.3. Mikroemülsiyon yöntemi.....	33
2.10.2.4. Süperkritik akışkan teknolojisi.....	34
2.10.2.5. Çözücü emülsifikasyon-difüzyon yöntemi	34
2.10.2.6. Püskürtmeyle kurutma yöntemi	34
2.10.2.7. Solvent enjeksiyon yöntemi	34
2.10.3. Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	35
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. MCF-7 ve 4T1 hücreleri.....	37
3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri	37
3.2. Metod.....	38
3.2.1. Katı lipid nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu	38

3.2.1.1. Katı lipid nanopartikül sentezi	38
3.2.1.2. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü	38
3.2.1.3. Katı lipid nanopartiküllerin morfolojik incelenmesi.....	39
3.2.2. MCF-7 ve 4T1 Hücrelerinin Çoğaltılması.....	39
3.2.3. MTT sitotoksosite testi.....	39
3.2.4. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi ile belirlenmesi	40
3.2.5. Hücrelerdeki ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi.....	40
3.2.6. Akış sitometrisi yöntemi	41
3.2.6.1. Akış sitometrisinde anneksin V-FITC boyama tekniği ile apoptoz tayini	41
3.2.6.2. Akış sitometrisinde hücre döngüsü etkilerinin araştırılması	41
3.2.6.3. Akış sitometrisinde mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin incelenmesi.....	42
3.2.7. İn vitro etkin madde salımı.....	42
3.2.8. Real Time RT-PCR, gen ekspresyonu analizi.....	43
3.2.8.1. RNA izolasyonu basamağı.....	43
3.2.8.2. cDNA'ya Çevirme basamağı	44
3.2.8.3. RT2 Profiler PCR Array ile Apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	44
3.2.9. Hücre hatlarında invazyonun belirlenmesi.....	45
3.2.10. Soft ağar koloni deneyi.....	45
3.2.11. Yara iyileşmesi (Scratch testi)	46
3.2.12. Western Blotlama	46
3.2.13. İn-vivo Hayvan Deneyi.....	47
3.2.13.1. Meme kanseri oluşturma	48
3.2.13.2. Histolojik Çalışmalar.....	48
3.2.13.3. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi:.....	49
3.2.13.4. İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi	49
3.2.13.5. Histolojik skorlama-H-SCORE	50
3.2.13.6. Doku Örneklerinin Geçirimli Elektron Mikroskopik (TEM) Takibi.....	50

3.2.13.7. <i>Doku Örneklerinin Konfokal Mikroskopik Analizi</i>	51
3.2.14. İstatistiksel Analizler.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Katı Lipid Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyon Bulguları	52
4.2. MTT Kolorimetrik Testi ile D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin bulguları	53
4.3. D-e-MAPP ve Nano Partikül Formülasyonunun MCF-7 Hücrelerindeki Morfolojik Değişikliklerin Konfokal Mikroskopi Bulguları.....	55
4.4. D-e-MAPP ve Nano Partikül Formülasyonunun MCF-7 Hücrelerindeki İnce Yapısal Değişikliklerin TEM Mikroskopi Bulguları	56
4.5. Akış Sitometrisi Bulguları	57
4.5.1. D-e-MAPP ve Nano Partikül Formülasyonunun MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Ektisinin Akış Sitometrisinde Anneksin V-FITC Boyama Tekniği ile Apoptoz Tayini Bulguları	57
4.5.2. D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül Formülasyonunun Akış Sitometrisinde Hücre Döngüsü Etkilerinin Bulguları	59
4.5.3. D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül Formülasyonunun Akış Sitometrisinde Mitokondri Zar Potansiyeli Değişikliklerinin Bulguları.....	60
4.6. İn Vitro Etkin Madde Salımı Bulguları	61
4.7. Real Time RT ² Profiler PCR Array Gen Ekspresyonu Bulguları.....	63
4.8. Hücre Hatlarında İnvazyonun Belirlenmesi Bulguları	67
4.9. Soft agar koloni oluşum deneyi bulguları	68
4.10. Yara iyileşmesi (Scratch testi) testi bulguları.....	69
4.11. Western Blot Bulguları.....	70
4.12. <i>İn-vivo</i> Hayvan Deneyi Bulguları.....	73
4.12.1. İmmunhistokimyasal boyama bulguları	73
4.12.2. Konfokal Mikroskop ile Yapısal Değişikliklerinin Görüntülenmesi Bulguları	79
4.12.3. İnce Yapısal Değişikliklerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntülenmesi Bulguları	82

4.12.4. Western Blot Bulguları	82
5. TARTIŞMA	84
KAYNAKÇA	95
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. <i>Moleküler açıdan meme kanserinin alt tiplerinin sınıflandırılması</i> [32].....	9
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	37
Tablo 3.2. PCR mix karışımı.....	44
Tablo 3.3. Real Time PCR döngü aşamaları.....	45
Tablo 4.1. D-e-MAPP ve sentezlenen katı lipid nanopartikül formunun partikül boyutu ve polidispers indeks özellikleri.....	52
Tablo 4.2. Meme kanseri hücreleri üzerindeki D-erythro-MAPP ve KLN-D-e-MAPP uygulaması ile gerçekleştirilen MTT testi sonucundaki IC ₅₀ değerleri.	53
Tablo 4.3. 24 saat boyunca D-e-MAPP formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları.....	58
Tablo 4.4. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları.....	58
Tablo 4.5. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde hücre döngüsü dağılımı sonuçları.....	59
Tablo 4.6. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde hücre döngüsü dağılımı sonuçları.	60
Tablo 4.7. 24 saat boyunca D-e-MAPP formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları.	60
Tablo 4.8. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları.....	61
Tablo 4.9. RT ² Profiler PCR Array yönteminde kullanılan housekeeping/referans genlerinin analiz sonucu elde edilen verilerinin aritmetik ortalama değerleri.	64

Tablo 4.10. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunun uygulanmasıyla elde edilen yarık açıklıklarının Image J programı sonuçları.....	70
Tablo 4.11. Protein miktar tayini sonuçları.....	71



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri [3].	1
Şekil 2.1. Türkiye’de Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre 2018 yılı kadın ve erkek kanserleri [31].	6
Şekil 2.2. Apoptozis yolları. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar [102].	19
Şekil 2.3. Sfingolipid yolunun şematik diyagramı. Grosch vd., (2012) kaynağından modifiye edilerek kullanılmıştır [125].	25
Şekil 2.4. D-erythro-MAPP kimyasal yapı gösterimi [136].	27
Şekil 2.5. Katı bir lipid nanoparçacığının diyagramı (http-2)	32
Şekil 4.1. Yeni sentezlenen A) D-e-MAPP ve B) D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartiküllerin morfolojik yapısı.	52
Şekil 4.2. D-e-MAPP’ın MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık inhibisyon grafiği ve canlılık yüzdeleri. IC ₅₀ değerleri sırasıyla 4,4 µM, 18,8 µM ve 35,7 µM olduğu belirlenmiştir. (****<0.00001, *** <0.0001)	54
Şekil 4.3. D-e-MAPP-nanopartikül formunun MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık inhibisyon grafiği ve canlılık yüzdeleri. IC ₅₀ değerleri sırasıyla 15,6 µM, 13,9 µM ve 12,1 µM olduğu belirlenmiştir (****<0.000	54
Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP uygulaması ile gerçekleştirilen konfokal mikroskopi görüntüleri. A) MCF-7 kontrol grubu hücreleri; Ok-başı: çekirdek, Dikdörtgen: normal hücre yapısı. B), C) ve D) 24 saat boyunca D-e-MAPP IC ₅₀ konsantrasyonu uygulanmış olan MCF-7 hücreleri; Yıldız: Hücre iskeletinde delik oluşumu ve parçalanma Ok: İçi boşalmış hücreler, Daire: Membran tomurcuklanması	55
Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP Nanopartikül formunun uygulaması ile gerçekleştirilen konfokal mikroskopi görüntüleri. A) MCF-7 kontrol grubu hücreleri; Ok-başı: çekirdek, Yıldız: normal hücre yapısı. B), C) ve D) 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül partikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonu uygulanmış olan MCF-7 hücreleri; Yıldız: Hücre iskeletinde delik oluşumu ve parçalanma Ok: İçi boşalmış hücreler	56

Şekil 4.6. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin TEM görüntüleri. A) MCF-7 Kontrol hücreleri; Ok: normal hücre membranı, Yıldız: normal hücre iskeleti, B) ve C) D-e-MAP'ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri; Ok: normal hücre membranı, Yıldız: normal hücre iskeleti, B) ve C) D-e-MAP'ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, OK: membran tomurcuklanmaları. 56

Şekil 4.7. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin TEM görüntüleri. A) MCF-7 Kontrol hücreleri; Ok: normal hücre membranı, Yıldız: normal hücre iskeleti, B) ve C) D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, OK: membran tomurcuklanmaları, Yıldız: Hücre iskeletinde delikler, Ok-başı: kromatin yoğunlaşması. 57

Şekil 4.8. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları. (A) MCF-7 kontrol hücrelerinin %91,54 oranında canlı olduğu, hücrelerin %2,01'inin ise öldüğü tespit edilmiştir. Bu grupta erken apoptotik oran %4,72 iken geç apoptotik oranın %1,73 olduğu tespit edilmiştir. (B) 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin anneksin V aktivitesinin akış sitometrik test sonuçları. Bu grupta ölü hücrelerin %3,15 olduğu tespit edilmiştir, yine hücrelerin erken apoptotik oran %25,80 iken geç apoptotik oranın %11,05 olduğu tespit edilmiştir. 57

Şekil 4.9. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları. (A) MCF-7 kontrol hücrelerinin % 98,83 oranında canlı olduğu, hücrelerin % 1,17'sinin ise öldüğü tespit edilmiştir. Bu grupta erken apoptotik oran ve geç apoptotik oranın %0,00 olduğu tespit edilmiştir. (B) 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin anneksin V aktivitesinin akış sitometrik test sonuçları. Bu grupta ölü hücrelerin %5,41 olduğu tespit edilmiştir,

yine hücrelerin erken apoptotik oran %10,52 iken geç apoptotik oranın %12,23 olduğu tespit edilmiştir.	58
Şekil 4.10. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı. A) Kontrol hücreleri B) D-e-MAPP'ın IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, Mavi renk debris, yeşil renk S fazını, açık yeşil renk G2 / M fazını ve kırmızı renk G0 / G1 fazını göstermektedir.....	59
Şekil 4.11. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı. A) Kontrol hücreleri B) D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, Mavi renk debris, yeşil renk S fazını, açık yeşil renk G2 / M fazını ve kırmızı renk G0 / G1 fazını göstermektedir.....	59
Şekil 4.12. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları. A) Kontrol hücreleri, canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir. B) D-e-MAPP'ın IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, ölü hücrelerin oranı %82,35 olarak tespit edilmiştir.....	60
Şekil 4.13. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları. A) Kontrol hücreleri, canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir. B) D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC ₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, ölü hücrelerin oranı %84,60 olarak tespit edilmiştir.....	61
Şekil 4.14 D-e-MAPP'ın in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı absorbans grafiği. D-e-MAPP'ın in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı absorbans grafiği	62
Şekil 4.15. D-e-MAPP'ın in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı zaman grafiği.....	62
Şekil 4.16. D-e-MAPP Nanopartikülün in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı absorbans grafiği.....	62
Şekil 4.17. D-e-MAPP Nanopartikülün in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı zaman grafiği.....	63

Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulaması sonucu RT ² Profiler PCR Array sonuçları küme diyagramı. (Renk doygunluğu, numunelerde gen ekspresyonundaki farklılıkları temsil etmektedir).	65
Şekil 4.19. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP uygulaması sonucu RT ² Profiler PCR Array sonuçları sıcaklık haritası.	66
Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP uygulaması sonucu RT ² Profiler PCR Array sonuçları kat değişimleri.....	66
Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP KLN uygulaması sonucu RT ² Profiler PCR Array sonuçları sıcaklık haritası.....	66
Şekil 4.22. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP KLN uygulaması sonucu RT ² Profiler PCR Array sonuçları kat değişimleri.	67
Şekil 4.23. MCF-7 kontrol grubuna kıyasla D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül uygulanan MCF-7 hücrelerindeki invazyon düzeyleri	68
Şekil 4.24. MCF-7 kontrol grubuna kıyasla D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül uygulanan MCF-7 hücrelerindeki invazyon etkilerinin grafiği. (****<0,0001).....	68
Şekil 4.25. MCF-7 Hücreleri üzerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunun soft agar koloni oluşum sonuçları	69
Şekil 4.26. MCF-7 kontrol grubu hücrelerinin yara iyileşme sonuçları.	69
Şekil 4.27. D-e-MAPP uygulanan MCF-7 hücrelerinin yara iyileşme sonuçları.....	70
Şekil 4.28. D-e-MAPP KLN uygulanan MCF-7 hücrelerinin yara iyileşme sonuçları.....	70
Şekil 4.29. BSA proteini konsantrasyon grafiği	71
Şekil 4.30. Western blot deney sonucunda kontrol grubuna göre PARP1 proteinin değişimi.....	72
Şekil 4.31. Western blot deney sonucunda kontrol grubuna göre Act1 proteinin değişimi.....	72
Şekil 4.32. Western blot deney sonucunda kontrol grubuna göre Bcl-2 proteinin değişimi.....	72
Şekil 4.33. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. (▷ ;	

PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\otimes$; CerB2 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)	74
Şekil 4.34. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri	74
Şekil 4.35. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. ($\triangleright$; PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\otimes$; CerB2 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)	75
Şekil 4.36. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri	75
Şekil 4.37. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Boş KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. ($\triangleright$; PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\otimes$; CerB2 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)	76
Şekil 4.38. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Boş KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri	76
Şekil 4.39. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden DMSO uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. ($\triangleright$; PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\otimes$; CerB2 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)	77
Şekil 4.40. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden DMSO uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri	77
Şekil 4.41. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Serum fizyolojik uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. ($\triangleright$; PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)	78
Şekil 4.42. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Serum fizyolojik uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri	78

Şekil 4.43. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri. (****<0,0001).....	79
Şekil 4.44. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların Hematoksilen-Eosin ile boyama sonuçları. (A; D-e-MAPP uygulanmış, B: D-e-MAPP KLN uygulanmış, C: Boş KLN uygulanmış, D: DMSO uygulanmış grup, E: Serum fizyolojik uygulanmış grup)	79
Şekil 4.45. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; D-e-MAPP ile tedavi edilmiş grup. (Ok başı: kromatin yoğunlaşması ok: atnalı çekirdek oluşumu).....	80
Şekil 4.46. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; D-e-MAPP KLN uygulanmış. (Ok başı: kromatin yoğunlaşması ok: at nalı çekirdek oluşumu, halka: hücre iskeletinde parçalanma)	80
Şekil 4.47. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; Boş KLN uygulanmış. (Ok başı: hasar görmemiş hücre çekirdeği, ok: sağlam hücre iskeleti).....	81
Şekil 4.48. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; DMSO uygulanmış. (Ok başı: hasar görmemiş hücre çekirdeği, ok: sağlam hücre iskeleti).....	81
Şekil 4.49. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; serum fizyolojik uygulanmış. (Ok başı: hasar görmemiş hücre çekirdeği, ok: sağlam hücre iskeleti).....	81
Şekil 4.50. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların TEM mikroskopi görüntüleme sonuçları. A: D-e-MAPP ile tedavi edilmiş grup, B: D-e-MAPP KLN ile tedavi edilmiş grup, C: Boş KLN uygulanmış grup, D: DMSO uygulanmış grup, E: Serum Fizyolojik uygulanmış grup. (Yıldız: hücre iskeleti parçalanması, ok: kromatin yoğunlaşması).....	82

Şekil 4.51. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların	
Western blot deney sonuçları.....	83

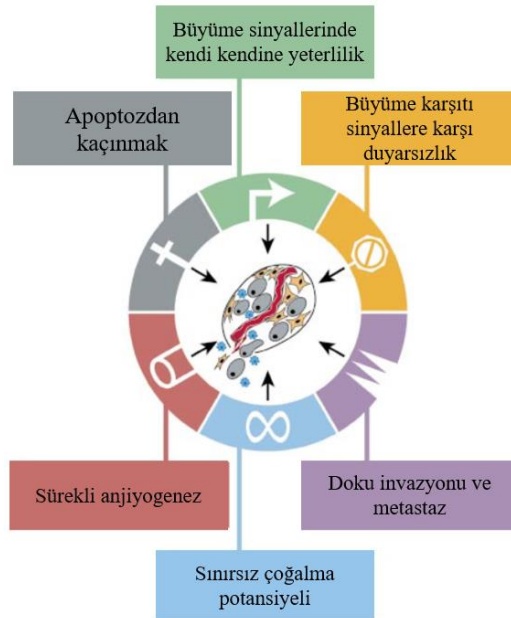


SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
4T1	: BALB/c suşunun meme bezi dokusundan türetilen bir göğüs kanseri hücre hattı
ATCC	: American Type Culture Collection
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
IC50	: İnhibitör Konsantrasyonu 50
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit sitotoksikite testi
FBS	: Fetal Bovine Serum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
μM	: Mikromolar
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
PI	: Propidyum İyodür
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
μL	: Mikrolitre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
BCL2	: BCL2-ilşkili X protein
TP53	: Tümör protein p53
PR	: Progesteron Reseptör
ER	: Östrojen reseptör
Cerb2	Onkogen

1. GİRİŞ

Kanser terimi Yunancada yengeç anlamına gelen “*karkinos*” kelimesinden Hipokrat tarafından türetilmiştir. Özellikle bu terimin seçilmiş olması tümörlerin uzantılarının yengeç bacaklarındaki dokunaçlara benzetilmiş olmasıdır. Kanser karmaşık bir hastalıktır ve 200'den fazla farklı tipi tanımlanmıştır [1]. Oldukça hızlı yayılış gösteren kanser hastalığı, mortalite bakımından kalp ve damar hastalıklarından sonra dünya genelinde ilk sırada gelmektedir. Dünyada her yıl 11 milyon kişi, Türkiye'de ise 150 bin kişi kansere yakalanmaktadır [2]. Malign tümörler de hücrelerin anormal büyümesi nedenli karmaşık kanser hastalığı grubudurlar. Maligniteye yol açan, hücre özellikleri ve biyolojik durumlar büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, sınırsız replikasyon potansiyeli, büyümeyi baskılayan sinyallerden kaçınma, programlanmış hücre ölümüne direnç (apoptoz), sürekli anjiyogenez, doku invazyonu ve metastaz şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 1.1). Bu özelliklerin altında yatan en önemli etken birden fazla ayırt edici işlevi destekleyen genetik çeşitliliğin üreticisi olan genom kararsızlığıdır [3,4]. Kanser genel olarak, hücrelerin bölünebilme yeteneklerini kaybetmeleri ile birlikte kontrolsüz bölünme ve çoğalma ile meydana gelen, genetik alt yapısı olan ve çevresel etmenlerin etkisi altında olan malign bir hastalık şeklinde tanımlanmaktadır. Kanser, aynı zamanda hem protein kodlayan hem de kodlamayan genlerin arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanabilen çok faktörlü ve çok aşamalı karmaşık bir hastalıktır [5-6].



Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri [3].

Kanser, her dakika büyüyen ve insan ırkı için küresel bir tehdide dönüşmeden önce önlenmesi gereken toplum sağlığı sorunlarından birisidir. Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yakındaki doku ve organlara yayılması ile karakterizedir. Sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalıp diğer dokulara göç edip lokalize olabilen kanser hücrelerine dönüşmesinde farklı faktörler kilit rol oynamaktadır. Bu faktörler tütün, mikro organizmalar, sağlıksız beslenme, genetik mutasyonlar, hormonal faktörler ve bağışıklık etmenleridir [7].

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra küresel olarak ikinci önde gelen ölüm nedenidir [8]. Birçok kanserde ölüm oranları düşmesine rağmen kanser vakalarının insidansı hala artmaktadır ve 2025 yılına kadar yılda 20 milyondan fazla yeni kanser vakası beklenmektedir [9]. Tüm maligniteler arasında akciğer kanseri, dünya çapında kanser insidansı ve mortalitesinde ilk sıradadır [10]. Akciğer, meme ve kolorektal kanser türleri dünya çapında en sık teşhis edilen kanserlerdir [10]. Kanser, invazyon ve metastaz yoluyla yayılma özelliğine sahip kontrolsüz hücre bölünmesi ile basitçe tanımlanabilmektedir. İstila, kanser hücrelerinin tümörün ortaya çıktığı yerin ötesinde doku ve organlara yayılmasıdır [11]. Metastaz, malign hücrelerin vücudun uzak bölgelerine göç etmesi ve burada kanserli hastaların çoğunun ölümüyle sonuçlanan yeni tümörlerin oluşması olarak tanımlanmaktadır [12]. İki tür tümör vardır: kötü huylu ve iyi huylu tümörler. Kötü huylu tümörlerin aksine, iyi huylu tümörlerde yayılma ve/veya istila özelliği bulunmamaktadır. İnsan kanserlerinin %90'ı deri, akciğer ve meme bezleri gibi epitel dokularından kaynaklanan malign karakterli karsinomlardır. Fibroblastlar ve osteoblastlar gibi epitelyal olmayan hücrelerden kaynaklanan sarkomlar daha düşük malignite sıklığına sahip kanserlerdir [13]. Kanser tek bir hastalık değildir, aslında Hannahan ve Weinberg (2011) tarafından detaylandırıldığı gibi sıklıkla gelişen farklı fenotipler sergileyen bir hastalıklar topluluğudur. Kanser hastalığının özellikleri ise hücre ölümüne direnç, metabolizmanın deregülasyonu, immün yıkımdan kaçınma, anjiyogenezi indüklemeye, proliferatif sinyalleme, aktivasyon invazyon ve daha fazla metastaz, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, sürekli bölünme ile ölümsüzlüktür [14]. Kanser oluşumu, mutasyonların birikmesi ve kontrolsüz hücre bölünmesini içeren çok aşamalı bir süreçtir ve bu süreçlerin gelişmesi uzun yıllar almaktadır. Normal hücrelerde onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve proliferasyon ve hayatta kalmanın uyarılmasını düzenleyen epigenetik değişiklikler gibi genetik değişikliklerin birikmesiyle başlamaktadır. Genetik faktörlerin dışında, kanser

gelişimi ile ilişkili farklı çevresel faktörler vardır. Vakaların çoğunda kanserler büyük ölçüde çevresel faktörlere ve sağlıksız yaşam tarzına (%90-95) maruz kalmanın bir sonucudur, oysa kalıtsal mutasyonlar ve hormonlar gibi genetik yatkınlığın %5-10 olduğu tahmin edilmektedir [15]. Epigenetik değişiklikler, çevre ve genom arasında bir köprü olarak düşünülebilir, hücre büyümesini ve farklılaşmasını etkileyen çeşitli genlerin ve proteinlerin aktivitesini düzenler ve böylece normal hücrelerin ileri derecede kötü huylu hücrelere dönüşmesinde rol oynamaktadır [16, 17]. Kanser tedavisindeki başlıca ilerlemeler arasında cerrahi, radyasyon, kemoterapi, hormon (endokrin) tedavisi, immünoterapi ve biyolojik olarak hedeflenen tedaviler yer almaktadır [18]. Belirli bir kanser tipine veya kanser alt tipine özgü moleküler yolları hedefleyerek, hedefe yönelik tedavilerin kemo ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilerden daha az toksik ve daha etkili tedavi sağladığı düşünülmüştür. Kanser birçok ayırt edici özelliğine müdahale edebilen hedefe yönelik ilaçların mevcudiyetine rağmen, dikkate değer bir inter- (hastaya özgü) ve intra-tümör heterojenliği (aynı kanser içinde) vardır. Bir bireyin biyolojisi ve moleküler genetiği hakkında daha derin bir bilgi gereksinimi sunmaktadır. Moleküler düzeyde, bilim adamları, kanser oluşumunu kontrol eden sinyal yollarında yer alan genler ve proteinler hakkında geniş bir bilgi yelpazesine sahiptir, ancak karmaşık yolların ve biyokimyasal etkileşimlerin anlaşılması, genel yanıtı bakmayı gerektirmektedir. Erken tanı ve tedavi, sağkalım oranlarını iyileştiren ve insidans oranlarını azaltan kanser tedavisi programlarının çoğunun mevcut hedefidir.

Tümorigenez, onkojenik mutasyonların hem doğrudan hem de dolaylı sonucu olarak hücre metabolizmasının yeniden programlanmasına bağlıdır. Kanser hücresi metabolizmasının ortak bir özelliği, sıklıkla besin açısından fakir bir ortamdan gerekli besinleri alma ve bu besinleri hem canlılığı sürdürmek hem de yeni biyokütle oluşturmak için kullanma yeteneğidir. Kanserle ilişkili metabolik yeniden programlamaya eşlik edebilen hücre içi ve hücre dışı metabolitlerdeki değişikliklerin gen ekspresyonu, hücre metabolizması ve tümör mikroçevresi üzerinde etkileri vardır. Kanserle ilişkili bilinen metabolik değişiklikler altı adet ayırt edici özellikte toplanmaktadır. Bunlar, (1) düzensiz glikoz ve amino asit alımı, (2) besin alım modlarının kullanımı, (3) glikoliz/TCA döngüsü ara ürünlerinin kullanımı biyosentez ve NADPH üretimi, (4) azot için artan talep, (5) metabolit güdümlü gen düzenlemesindeki değişiklikler ve (6) mikro çevre ile metabolik etkileşimlerdir. Birkaç tümör tipi bu altı özelliğin tümünü gösterirken, çoğu sadece birkaçını göstermektedir. Tek bir tümörün sahip olduğu spesifik işaretler,

nihayetinde daha iyi tümör sınıflandırmasına katkıda bulunabilmekte ve tedavinin yönlendirilmesine yardımcı olabilmektedir [19].

Kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanserdir ve akciğer kanserinden sonra kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada yaklaşık bir milyon kadına ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 200.000 kadına her yıl meme kanseri teşhisi konmaktadır. Ayrıca, Amerikan Kanser Derneği'ne göre, meme kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 40.000 ölümden sorumludur ve Dünya Meme Kanseri Konferansı'na göre dünyada yaklaşık 400.000 kişi bu hastalıktan ölmektedir. Prognoz ve sağkalım oranı, kanser tipine ve evrelemeye bağlı olarak değişmektedir. Vücudun diğer bölgelerine yayılmadan önce lokalize meme kanserine yakalanıldığında beş yıllık sağkalım oranı %97'nin üzerindedir. Hastalık lenf bezlerine yayıldığında bu oran yaklaşık %50'ye, uzak organ bölgelerine yayıldığında ise %20'nin altına düşmektedir [20].

Çoğunlukla memede ağrısız kitleler veya ağırlı kitleler ile fark edilir ancak daha az sıklıkta kendini gösteren semptomlarla ortaya çıkabilmektedir. Bu semptomlar; meme derisinde tahriş, kızarıklık ve pullanma, şişme, kalınlaşma, bozulma, hassasiyet, meme başı deformiteleri veya sürekli akıntı. Ağrı daha az görülen semptomdur ancak iyi huylu tiplerde ağırlı memeye neden olabilmektedir [7,21]. Meme kanseri genellikle süt kanallarının iç astarında veya onlara süt sağlayan lobüllerde başlamaktadır. Duktal karsinom olarak bilinen süt kanalında başlayan meme kanseri en sık görülen tiptir, lobüler karsinom olarak bilinen lobüllerden gelişen meme kanseri ise çok daha az yaygındır. Kötü huylu bir tümör vücudun diğer bölgelerine yayılabilme yeteneğindedir. Meme kanseri metastazlarının en sık görüldüğü yerler lenf düğümleri, akciğer, karaciğer, kemik ve beyindir [22].

Son yıllarda meme kanserinin erken tanı ve tedavisindeki gelişmeler ölüm oranında ciddi bir azalmaya neden olurken, bu gelişmeler hastalığın tamamen tedavi edilmesinde yetersiz kalmıştır. Örneğin erken teşhis ile meme kanserinden sağ kurtulan kadın sayısı artmış olsa da, metastatik meme karsinomu için kemoterapi tedavisi gören hastalarda terapiye cevap oranları hala % 50-60 civarındadır. Buna ilaveten hastaların sadece % 10-15'inde tam iyileşme görülmüştür. Bu düşük tedavi oranı tüm diğer etkenlerin yanı sıra hastalığın patofizyolojisindeki mekanizmayı anlamadaki yetersizlik ve tedavi için yeni ilaç ve yaklaşımların eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisi için

yeni terapötik stratejilerinin geliştirilmesi, kullanımı ve yeni anti kanser özellikli ilaçların geliştirilmesi kritik bir öneme sahiptir [23,24].

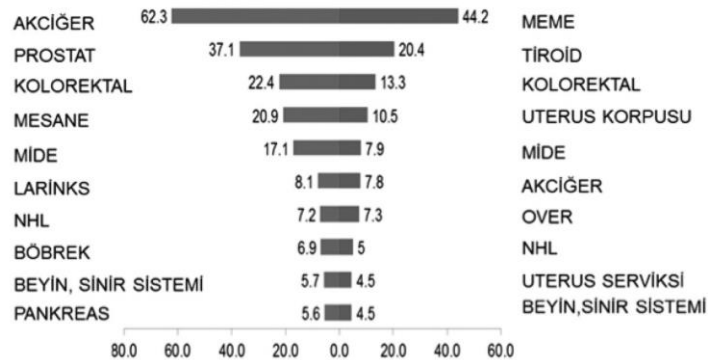
Kanser araştırmalarında sfingolipid metabolizması ve bunun kanser ile ilişkisi son zamanlarda birçok çalışmada yer almaya başlamıştır. Sfingolipidler, kanser hücresi sinyal iletim ağı içerisindeki sinyal işlevlerini kontrol ederek, büyüme, proliferasyon, göç, invazyon ve metastaz gibi çeşitli biyolojik işlemleri düzenlemektedirler. Seramid, sfingozin ve sfingozin-1-fosfat; hücre proliferasyonunu ve apoptozu kontrol etmekte görev alan sfingolipid metabolitleridir. Seramid ve sfingozin üretimi, kemoterapi, radyasyon veya oksidatif stres ile indüklenmektedir ve bu sfingolipidler hücre ölümüne, yaşlanmaya ve hücre döngüsünün durdurulmasına aracılık etmektedirler [25]. Seramidler DNA hasarına, strese, hipoksiye ve apoptotik moleküllerin indüksiyonuna yanıt olarak hücrede birikmektedirler [26]. Seramidazlar aracılığıyla üretilen seramid molekülü hücre proliferasyonunun negatif bir düzenleyicisi olarak görev yaparak apoptozu teşvik etmektedir [27]. Buna zıt olarak, sfingozin kinaz aracılığıyla üretilen sfingozin-1-fosfat (S1P), hücrenin büyümesi, hayatta kalması, hareketinin düzenlenmesi, apoptozu inhibe etme gibi faaliyetlerinin yanında invazyon, anjiyogenez, vasküler olgunlaşmasını da düzenlemektedir [27]. Sfingozin-1-fosfat (S1P), seramid bağımlı apoptozis mekanizmasının baskılayıcı etkenidir. Bu nedenle hücre içindeki seramid ve S1P seviyelerinin dengesi hücrenin yaşam ve ölümüyle yakından ilişkilidir. Bu sebeple seramidaz enziminin düzenlenmesi ile hücre içi seramid, sfingozin ve S1P oranlarının kontrolü, apoptozis mekanizmasında kilit rol oynamaktadır [28]. Seramidaz enzimleri, sfingozin üretmek için seramidi hidrolize eden ilaçlara ve radyasyona karşı dirençli olan anahtar enzimlerdir. Bu özelliklerinden dolayı, son yıllarda sfingolipid metabolizmasındaki bu merkezi enzimler kanser tedavisi stratejilerinin ve ilaçlarının geliştirilmesinde yeni hedefler olarak gösterilmektedir. Bu enzimlerin inhibitörleri, yeni antikanser ilacı olarak mükemmel potansiyele sahip olup literatürde belirtilmiştir [29]. Seramidin sentetik bir analogu olan D-erythro-MAPP (n-[(1S,2R)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl]tetradecanamide) insan promiyelositik lösemiden (HL-60) izole edilen alkali seramidaz (alkCDaz) seçici olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Ajanın IC₅₀ değeri 1-5 mM'dır ve konsantrasyona ve zaman bağımlı büyüme baskılaması ve bunun da G0 / G1 faz hücre döngüsünün durdurulmasına bağlı olarak meydana geldiği bildirilmiştir [30].

Bu tez kapsamında bir seramidaz inhibitörü olan D-erythro-MAPP ve yeni sentezlediğimiz katı lipid nanopartikül formunun (KLN) *in vitro* olarak meme kanseri hücrelerinde neden olabileceği anti kanser etkiler, hücre ölüm mekanizmaları, hücresel düzeyde ince yapısal ve morfolojik değişiklikler ile sitotoksik, antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Ayrıca D-erythro-MAPP ve KLN formunun apoptotik hücre ölüm mekanizmalarını tetikleyen genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, bu genlerin western blot yöntemi ile protein seviyelerinin araştırılması ve kanser metastazında invazyon ve koloni oluşumundaki rolleri belirlenmiştir. Bununla birlikte flow sitometride hücre döngüsü, Anneksin-V ve mitokondrial membran potansiyeli etkisinin sonuçları araştırılmıştır. *In vivo* olarak da BALB/C farelerde meme kanseri tümörü oluşturulup tümör dokusunda D-erythro-MAPP ve KLN formunun göstermiş olduğu hücresel düzeyde ince yapısal ve morfolojik değişiklikler ile protein düzeyindeki etkileri araştırılmış ve tümör ve dokularda histolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu tez çalışması ile belirttiğimiz veriler ile mevcut kemoterapi, immünoterapi ve radyasyon terapisi gibi çeşitli geleneksel kanser terapilerinin dışında anti kanser ilaç yüklü nanopartikül uygulaması kullanılan bir yaklaşımın, meme kanseri tedavisinde uygulanabilmesine yönelik bir ilaç ve ilaç geliştirme araştırmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri Tanımı ve Genel Özellikleri

Kadınlar arasında en çok görülen kanser çeşidi meme kanseridir. Kadınlarda meydana gelen tüm kanser türlerinin %33'ünden ve kanserle ilişkili ölümlerin ise %20'inden sorumludur. Ülkemizde kadın ve erkek kanserleri dağılımı Şekil 2.1'de görülmektedir [31]. Dünya sağlık örgütünün (WHO) sonuçlarına göre kadınlarda kanser nedenli ölüm nedenlerinin nerdeyse %15'inden meme kanseri sorumludur [32].



Şekil 2.1. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre 2018 yılı kadın ve erkek kanserleri [31].

Bu kanser türü meme dokusunun duktal ve lobular epitelinden meydana gelmektedir. İlerlemesi oldukça sessiz ve kendini belli etmediğinden teşhis ve tedavisinde oldukça dikkatli olunması gerekmektedir [32]. Meme kanserine yakalanan kadınların yaklaşık %35'lik kısmında metastaz oluşmakta ve bundan kaynaklı olarak ölüm görülmektedir. Meme kanseri için birçok risk faktörleri; **Değiştirilemeyen risk faktörleri**; meme kanseri öyküsü, dens meme yapısı, yaş, genetik faktörler, ırk, ailede kişisel meme kanseri, meme kanseri dışında kanser öyküsü, cinsiyet, benign meme hastalıkları, LKİS, boy, kemik dansitesi, intrauterin maruziyet, adet düzeni, preeklampsi, göğüs radyoterapisi, **Yaşam tarzı ile ilişkili olanlar** sosyoekonomik seviye, gebelik, doğum öyküsü, laktasyon, obezite, oral kontraseptif, hormon replasman tedavisi, alkol, egzersiz, fizik aktivite, **Tartışmalı risk faktörleri** östrojen metabolizması, abortus, yağlı beslenme, meme implantları, sigara, çevresel karsinogenler ve gece çalışması olarak tanımlanmıştır [31]. Meme kanserinde en büyük risk faktörüdür kadın cinsiyet faktörüdür ve erkeklere göre 100 kat daha sık görülür. Yaş etkeni göz önüne alındığında ise kadınların %72-75'i postmenopozal dönemde ve %28-30'u premenopozal dönemde meme kanserine yakalanmaktadır [33,34].

2.2. Meme Kanseri'nin Moleküler Sınıflandırılması

Meme kanseri, heterojen bir tümöre sahip olması sebebiyle histopatolojik, moleküler ve klinik özellikleri ile sınıflandırılır. Fakat geleneksel yöntemlerle patolojik ve histolojik sınıflandırma yapmak hem tedaviyi hem de prognozu zorlaştırmaktadır [35]. Meme kanserinin moleküler yönden subtipleri belirlenmiş ve elde edilen bilgilerin büyük kısmı son zamanlarda edinilmiş olmasına rağmen moleküler sınıflandırma için yeni bilgiler elde etmeye devam edilmektedir [36].

Bir kanser türüne isim konulurken köken aldığı dokuya göre adlandırılır. Bundan dolayı, memeden türeyen hücrelerin kontrolsüz çoğalma ve büyümesi sonucu meme kanseri oluşur [37]. Histopatologlar yaptıkları morfolojik deneyler sonucunda meme kanserinin heterojen bir yapıya sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu heterojen yapı ve moleküler profillemeye teknikleri ile tümör evresi, histolojik tipi, lenf nodlarına yayılma, östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) gibi belirteçlerin kullanılmasıyla sınıflandırılma yapılmıştır. Modern moleküler yöntemler ile DNA mikro analizleri sonucunda bu kanser gen ekspresyon profili vasıtasıyla, ER, PR, triple negatif ve HER2 şeklinde sınıflandırılmış ve sonuç olarak meme kanseri 5 alt birimi

tanımlanmıştır bunlar; luminal A tipi, HER2, luminal B tipi, bazal tip ve normal tip şeklindedir (Tablo 2.1) [38].

- Luminal A tipi olan meme karsinomu, hormon reseptör pozitif grubundaki tüm meme kanserleri içerisinde %60 oranındadır. Luminal A tipi tümörler iyi prognoz özelliği gösterdikleri için hormon tedavilerinde başarı elde edilmektedir. Bu meme kanseri tipi, insan epidermal büyüme faktör 2 (HER2)'si negatif, östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif olan bir alt türdür [39].
- Luminal B tipi tümör, hormon reseptör pozitif grubunda değerlendirilen başka bir meme kanser türüdür. HER2 pozitif veya negatif, ER ve/veya PR pozitif ve proliferasyonu yüksek olan bir meme kanseri alt tipidir. Genel olarak bakıldığında meme kanserleri içerisinde yaklaşık %20 oranında yer kaplamakta ve prognoz açısından ise orta düzey olarak değerlendirilmektedir. Luminal A tipine benzemesine rağmen daha fazla agresif, yayılcı ve kötü prognoz özelliği ile bilinmektedir [40,41].
- HER2, hormon reseptör negatif meme kanserleride ise ER ve PR ekspresyonu yok, HER2 ekspresyonu ve proliferasyon yüksektir. Bu türde ise luminal ve bazal ekspresyon düşüktür. Tüm meme kanseri hastalarının yaklaşık %15'ini bu tür oluşturur ve luminal meme kanseri tiplerine göre hastalık çabuk ilerler ve prognozu çok kötüdür. Fakat HER2 proteinini etkileyen ilaçlarla tedavi edildiklerinde başarı oranı yüksektir. HER-2 pozitif diğer meme karsinomlarına göre daha kötü prognoza sahip olmasının nedeni ise oldukça yüksek farklılaşma yeteneğinde ve hızlı bir şekilde lenf nodüllerine metastaz yapma eğiliminde olmasıdır. Tespit edilmesi patolojik çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Diğer alt tiplerden farklıdır ve aynı zamanda kötü prognoz yeteneği göstermektedir [42].
- Normal meme benzeri tümör tipleri luminal A ile aynı özellikte ER ve/veya PR pozitif, HER2 negatiftir. Prognoz açısından bu türler luminal A'ya göre daha kötüdür [43-45].
- Triple negatif/bazal benzeri tümör tipleri ER, PR ve HER2 negatif olan meme kanseri alt türüdür. Meme kanseri hastalarında BRCA1/BRCA2 genlerine sahip kadınlarda yüksek oranda görülür. Diğer tümör türleri gibi hormon tedavileri ile birlikte kemoterapi tedavisi görürler [43-45].

- Claudin-Low tipi tümörler, bu alt tür sıkı bağları ve epitel hücre-hücre adezyonu ile bilinir ve bu da claudin 3,4,7 ve E-cadherin genlerinin ekspresyon seviyelerinin düşük olmasından kaynaklanır. Meme kanserleri içinde %14 oranında görülmektedir [43-45].

Tablo 2.1. Moleküler açıdan meme kanserinin alt tiplerinin sınıflandırılması [32].

Moleküler Subtip	ER	PR	HER2	Özel Moleküler Özellikleri
Luminal A	+	+	-	BRCA2 mutasyonu
Luminal B	+	+	-	TP53 gen mutasyonu
Bazal benzeri	-	-	-	BRCA1 mutasyonu
HER-2	-	-	+	TP53 gen mutasyonu
Normal epitel benzeri	-	-	-	TP53 gen mutasyonu
Claudin low	-	-	-	Düşük E-cadherin seviyesi

2.3. Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması

Meme kanserinin meydana gelmesinde etkili olan etmenler kalıtsal veya çevresel olması fark etmeksizin aslında hücrenin genetiği ile ilişkili olduğu için, meme kanseri bir genetik hastalıktır [46]. Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki son gelişmeler ile, meme kanserine yatkınlığı olan bir çok gen tespit edilmiştir. Meme kanserinde özellikle p53, BRCA1 ve BRCA2 spesifik gen mutasyonları yatkınlık açısından tespit edilirken değerlendirilir. Hücre siklusunun kontrolü, DNA onarımında görev alan ve tümör baskılayıcı bir gen olan BRCA1’de meydana gelen mutasyonlar, meme kanseri oluşumunda BRCA2 gen mutasyonlarına göre daha baskındır [47,48].

BRCA1 ve BRCA2 genlerine ait mutasyonlara sahip aile fertlerinin daha yüksek riskte meme kanseri olduğu tespit edilmiştir. Kanser genetiğinde, tespit edilen bu mutasyonların varlığı kanserli hastaya ve ailesine olan yaklaşımı olumsuz etkilemektedir. Elde edilen bu bilgi sonucunda meme kanserinde erken tanı, korunmada ve tedavinin planlamasında genetik verilerin kullanılması literatürde kendine yer bulmuştur [49, 50]. Tümör baskılayıcı gen (p53) ve HER2/neu (onkogen) gibi genlerin çok miktarda ekspresyonu meme kanseri hücrelerinde bir çok moleküler değişikliklere neden olmaktadır. Bununla birlikte BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar meme kanserinde oldukça yaygın olarak görülmektedir. Meme gelişimindeki etkili olan östrojen, prolaktin gibi hormonların ve büyüme faktörlerinin meme kanseri oluşumunda kritik rollerinin olduğu tespit edilmiştir [48]. Meme kanserinin meydana gelmesinde

birçok tümör supresör genler, onkogenler ve DNA tamir genlerinin neden olduğu tespit edilmiştir. EGFR, HER-2/neu, Ras, c-Myc, Siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve inhibitörleri kanser oluşumunda rol alan onkogenlerdendir. Tümör supresör genlerden p53, ATM, PTEN, BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinin meme kanserine neden olduğu belirlenmiştir. Meme kanserlerinin meydana gelmesinin büyük çoğunluğu tesadüfi ve nadir olarak bilinirken, tüm olguların %5–10’unu kalıtsal nedenli ailesel meme kanseri sebebidir. BRCA genindeki mutasyonun keşfedilmesinden sonra BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinin tüm ailesel kanserlerin %45-50’sinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir [51,52].

2.4. Meme Kanseri Tedavi Stratejileri

Meme kanserinde tedavi şekli oldukça farklı ve çok sayıda olmasına rağmen hangi yöntemin kullanılacağına tespit edilmesinde en önemli etken kanserin hangi aşamada olduğudur. Bununla birlikte hastanın genel sağlık durumu, yaşı ve menapoz durumu tedavi şeklini belirlemede oldukça önemlidir [53]. Meme kanserinin tedavisinde cerrahi tedavi, radyoterapik tedavi, hormonal tedavi ve kemoterapik tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Bu tedavi yöntemlerinin yanında biyolojik yöntemler de kanser tedavisine temel tedavi yöntemlerine destek olarak uygulanmaktadır. Tedavide kullanılan bu yöntemlerin her birinin avantajı olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Kanser in kişiye özgü bir hastalık olması, tedaviye yanıtta her bir bireyde değişiklik göstermesi nedeniyle tek ve kesin bir tedaviden bahsetmek etmek neredeyse imkânsızdır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi tedavi yöntemleri tek başına uygulanabildiği gibi gerekli şartlarda önce cerrahi müdahale sonrasında da radyoterapi ve kemoterapi tedavi uygulanabilmektedir [54].

2.4.1. Cerrahi tedavi uygulamaları

Meme kanserinde tedavide uygulanan en yaygın yöntem cerrahi operasyondur. Cerrahi operasyon iki yolla uygulanır, ilki memenin alınmadığı yalnızca tümörün alındığı cerrahi operasyondur ve buna “bölgesel mastektomi” cerrahi yöntemi denir. İkincisi ise tüm meme dokusunun çıkarıldığı “total mastektomi” cerrahi yöntemidir. Bazı durumlarda kanserin yoğunluğuna ve tümörün invazyonun durumuna bağlı olarak hastanın koltuk altındaki lenf nodülleri de alınabilir ve bunada “modifiye radikal mastektomi” cerrahi yöntemi denir [55]. Son yıllarda rekonstrüktif cerrahi ile tüm memenin alındığı

durumlarda kişinin psikolojisi olumsuz etkilendiğinden alınan meme dokusu yerine yeni bir meme dokusu implantı yapılmaktadır [56].

2.4.2. Radyoterapi tedavi uygulamaları

Radyoterapi tedavisi kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarını engellemek ve en önemlisi bu hücreleri öldürmek maksadıyla yüksek enerjili ışınların (x-ışınları) kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Radyasyon tedavisi iki şekilde uygulanabilir bunlar, vücut dışından uygulanan “eksternal radyasyon” yöntemi diğeri ise “internal radyasyon” yöntemi direkt olarak tümörün içine radyoaktif ajan enjekte ederek uygulanan yöntemdir. Radyoterapide amaç sağlam dokulara zarar vermeden kanserli dokuyu yok etmektir. Ayrıca bu yöntem meme kanseri semptomlarına sahip ve merkezi sinir sistemine veya kemik dokusuna yayılmış olan kanser hücrelerini öldürmek için de uygulanabilmektedir [57].

2.4.3. Kemoterapi tedavi uygulamaları

Kanserde tümörün anti-kanser ilaç kullanarak tedavi edilmesi şekline kemoterapi denir [58]. Kanser hastalarında kemoterapi ameliyattan önce veya ameliyattan sonra olarak iki farklı şekilde uygulanır. Adjuvan kemoterapi olarak bilinen yöntem cerrahi müdahale sonrasında ortamda bulunabilecek kanserli hücreleri yok etmek amacı ile uygulanır [59]. Neo-adjuvan kemoterapi ise hastaya cerrahi işlem yapmadan önce verilir ve bunun amacında operasyon öncesi tümör boyutunu küçültmek ve hastalığı kontrol altına almaktır [60]. Cerrahi operasyon sonrasında verilen kemoterapi hastaların sağlıklı yaşam süresini olumlu yönde etkilediği ve bu sürenin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir [59]. Kemoterapi tedavisinden sağlanan başarı tümör boyutuna ve tümörün moleküler yapısına (ER/PR veya HER2 pozitifliği) gibi birçok etkene göre değişiklik gösterir [58]. Kemoterapide uygulanan ilaç dolaşım yoluyla tüm vücuda dağılabilir ve buda asıl amaç olan kanserli hücreleri yok etmenin yanında kanser olmayan hücrelerde zarar vererek olumsuz etkilere sebep olur.

2.4.4. Hormonal tedavi uygulamaları

Meme kanserinin hormonal tedavisinde amaç, kanserli hücreleri ve dolayısıyla dokuyu etkileyen hormonların salınımını azaltma, artırma veya bloke etme gibi aktivasyonlar engellemek amacıyla östrojen hormonunun yapımının (Hormon analogları ve aromataz inhibitörleri gibi) veya fonksiyonunun (antiöstrojenler) engellenmesidir. İlk kez 19. yüzyılda bir genel cerrah olan Beatson, ileri evre meme kanserli hastalarda

östrojenin önemini göstermiştir [61, 62]. Hormon reseptör pozitifliği tespit edilen hastalarda antiöstrojen ilaçlarla ya da östrojen sentezinin engellenmesiyle %70 oranında başarılı sonuçlara ulaşılabilir [63]. Meme kanserinde özellikle östrojen hormonu kanserli hücrelerinin çoğalmasını ve yayılımını arttırmaktadır. Bu hormonun etkisini azaltmak için kanserli dokuda hormon reseptörlerinin tespiti yapılmalı ve sentezin engellenmesi gerekmektedir [64].

2.4.5. Biyolojik tedavi uygulamaları

Kanser de biyolojik tedavi şekli, vücut savunma sistemlerinin harekete geçirilmesi esasına dayanan monoklonal antikorlar ve bazı spesifik aşılarda aracılığı ile uygulanan bir tedavi yöntemidir. Hücre çoğalması engelleyen çeşitli hücre sinyal yollarının inhibisyonlarını veya düzenlenmelerini sağlayan çeşitli moleküllerin kullanımı ve bu ajanlara yönelik olarak geliştirilen monoklonal antikorların kullanılmasını sağlayan çeşitli moleküllerin tedavi amaçlı hastalarda uygulanması günümüzde oldukça yaygınlaşmaya başlamıştır [65]. Meme kanseri tedavisi için kullanılan biyolojik tedavi ajanlarından bazıları kanabinoidler anjiyogenez inhibitörleri ile Bevacizumab, Ranibizumab, Thrombospondin, Thrombospondin, Talidomid gibi moleküllerdir. Ayrıca tirozin kinaz inhibitörleri olan Gefitinib, BIBW 2992, Lapatinib ve Neratinib ilaçlar da meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır [66].

2.5. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı

Hücre kültürü günümüzde birçok hastalıkta ve özellikle kanser alanındaki araştırmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültüründe tanımlanmış bir kanser hücre hattından hücreler çoğaltılarak üzerinde birçok *in-vitro* deneyler ve araştırmalar yapılmaktadır. George Gey tarafından 1951 yılında ilk kanser hücre hattı Baltimore laboratuvarında elde edilmiştir [67]. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı 69 yaşındaki Kafkas bir kadının meme dokusundan alınan adherent yapıdaki hücrelerdir. Oldukça yaygın olarak kullanılan meme adenokarsinomundan türevlendirilmiş bir epitel kanser hücre hattı olan MCF-7, başkalaşmış meme epitel dokusunun özelliklerine sahiptir [68]. MCF-7 hücrelerinin karakteristik özellikleri ise; ER+, PR+/- ve HER2-, plevral efüzyon, invaziv duktal karsinom (süt bezlerinde) ve hormonal tedaviye cevap verirken çoğunlukla kemoterapi tedavisine karşı duyarlıdır. Bu hücre hattı adherent hücre yapısında olmasından dolayı *in-vitro* kültür çalışmalarında kolaylıkla ve çoğunlukla kullanılabilir [69, 70]. MCF-7 hücreleri, 20-25 mikron hücre büyüklüğünde olan yapışık hücrelerdir [68].

2.6. 4T1 Fare Meme Kanser Hücre Hattı

Karmanos Kanseri Enstitüsü'nde Fred Miller ve arkadaşları tarafından fareden izole edilen 4T1 meme kanser hücre hattı metastatik özelliği yüksek bir kanser modelidir [71,72]. *In-vitro* hücre kültürü ortamında çoğaltılan 4T1 meme kanser hücre hattına ait hücrelerin, deney hayvanlarına verilerek oluşturulan *in-vivo* deneysel kanser modeli çalışmalarında gösterdiği metastaz özelliği ve yayıldığı dokular akciğer, karaciğer, beyin ve kemiktir [73]. Yapmış olduğu metastaz özelliğiyle, insan meme kanserinin de metastaz yaptığı organlara benzerlik göstermesi sebebiyle, 4T1 meme kanser hücre hattının deneysel çalışmalarda oldukça tercih edildiği bildirilmiştir [74].

2.7. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Canlılarda embriyo gelişiminde ve erişkin dokularının korunmasında kilit rol oynayan hücre ölüm mekanizmaları önemli bir fizyolojik olaydır. Yaşamın devam ettirilebilmesi için organizmada ölen hücre sayısı ile bölünen hücre sayısının dengede olması ve dokulardaki toplam hücre sayısının stabilitesinin bir dengede bulunması gerekir. Örneğin kemik iliğindeki sürekli yeni hücre üretime karşı insanlarda her gün 5×10^{10} kadar kan hücresi hücre ölümü şekilleri ile yok edilerek denge korunur. Bunun dışında programlanmış hücre ölümü savunma sistemi mekanizmasının bir parçası olarak hasara uğramış ya da tehlike potansiyeline sahip hücrelerin yok edilmesinden de sorumludur. DNA'da meydana gelecek bir hasar durumunda, programlanmış hücre ölümü devreye girer ve kansere neden olabilecek zararlı mutasyonlara sahip olan hücreleri tespit eder ve ardından yok eder [75]. Hücrede dejeneratif hastalıklar ile kanser gibi otoimmün hastalıklar proliferasyon ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması durumunda meydana gelmektedir [76, 77]. Bu denge mekanizmaları evrimsel süreç boyunca korunmuş ve çok iyi bir şekilde denetlenmiştir, hücre içinden ve dışından uyarıcılar ile başlatılabilen programlı hücre ölümü, birçok kontrol mekanizması ile düzenlenmektedir.

Hücre ölüm mekanizmaları ile ilgili çalışmalar son yıllarda oldukça artmıştır. Programlı hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz ve nekrozdan farklı olarak hücre ölüm şekilleri tanımlanmıştır. Bunlar, otofaji, nekroptozis, piroptozis, paraptozis ve mitotik katastroftur [78, 77].

2.7.1. Otofaji

Otofaji kelime anlamı olarak kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelen, hücre içi organellerin ve makro moleküllerin lizozomal enzim aktivitesi sonucunda

yıkılması durumudur. Evrimsel olarak korunmuş otofaji tüm ökaryotik canlılarda meydana gelen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Genel anlamda, otofaji hücresel strese yanıt olarak hücre kalite kontrolünü sağlamak için hayatta kalma mekanizması olarak bilinmektedir. Otofajide, otofagozom adı verilen bir yapı oluşur. Bu yapıda yıkılması planlanan protein veya organeller sitoplazma içinde oluşturulan ve preotofagozom olarak bilinen bir membran sistemiyle çevrelenir. Oluşturulan otofagozom, membranda yer alan spesifik reseptörler aracılığıyla lizozomlara taşınır ve lizozomal enzimler sayesinde içerik parçalanır. Bu işlem sırasında enerji ve yeni proteinlerin yapımı için ortama çıkan proteinler ham madde olarak kullanılabilir. Hücreler karşılaştıkları bir stres durumunda canlılıklarını koruyabilmek ve hayatta kalabilmek için otofajiyi kullanırlar. Bu nedenle kendi organel ve proteinlerini enerji üretebilmek için kullanabilirler. Özetle otofaji herhangi bir uyaran sonucunda ortaya çıkan metabolik streslere karşı adaptasyon yanıtı olmaktadır [79].

2.7.2. Nekroz

"Nekrotik hücre ölümü" veya "nekroz", morfolojik olarak hücre hacminde bir artış (onkoz), organellerin şişmesi, plazma zarı yırtılması ve ardından hücre içi içeriğin kaybı ile karakterize olarak bilinmektedir. Uzun bir süre boyunca nekroz, yalnızca kazara kontrolsüz bir hücre ölümü şekli olarak düşünülmüştür ancak nekrotik hücre ölümünün bir dizi sinyal iletim yolu ve katabolik mekanizma tarafından ince bir şekilde düzenlenebileceği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Örneğin, ölüm alanı reseptörleri (TNFR1, Fas/CD95 ve TRAIL-R) ve Toll benzeri reseptörlerin (TLR3 ve TLR4), özellikle kaspaz inhibitörlerinin varlığında nekrozu ortaya çıkardığı gösterilmiştir. TNFR1-, Fas/CD95-, TRAILR- ve TLR3-aracılı hücre ölümü görünüşte kinaz RIP1'e bağlıdır [80, 81]. Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücresel stres sonucu RIP1 ve RIP3 (Receptor interacting proteinler) aktive olur. RIP1 ve RIP3 mitokondriyonu ya direkt aktive eder ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile indirekt olarak etkileyip nekrozu indükler [82].

2.7.3. Nekropitozis

Nekropitozis, biyokimyasal ve morfolojik özellikleri ile nekroz, ancak reseptör aracılı yönüyle ile apoptoz ile benzerlik gösterir. Bu ölüm şekli, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR), Fas ligand aktivasyonu, viral-RNA ve DNA gibi uyarıcılar ile hücre ölümü başlatmaktadır. Fakat apoptozun tersine kaspaz bağımsız bir yol izler. Nekropitozis, hücre ölümü şekillerinden nekrotik ölüm şeklinin yeniden düzenlenmiş bir

formudur. Apoptozda meydana gelecek olan problemler sonucunda tümör nekroz faktör alfa (TNF α) tarafından hücreler uyarılarak aktive edilmektedir [83, 84].

2.7.4. Piroptosis

Bu hücre ölümünü tanımlamak amacıyla Yunan kökenli kelimeler olan, yangın veya ateş anlamına gelen “pyro” ve dökülme anlamına gelen “ptosis” kelimeleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal kaynaklı bir cevap olan inflamasyon esnasında meydana gelen programlı hücre ölümü türüdür. Piroptosis, kaspaz-1 bağımlı hücre ölüm şeklidir. Kaspaz-1 apoptotik hücre ölümünde görev almaz ve kaspaz-1 yokluğunda hücreye gelen çok sayıdaki apoptotik sinyal normal olarak cevaplanır. İnflamatuar sitokinlerden interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-18 (IL-18)’in aktif formlarına dönüşmeleri kaspaz-1 sayesinde olur. Virüs enfekte olduğunda makrofajlar kaspaz-1’i aktive eder ve bunun sonucunda inflammatuar sitokinleri uyararak hücre ölümünü başlatır. Yapılan birçok çalışmada kaspaz-1’e bağımlı hücre ölümünün immün sistem, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem olmak üzere birçok farklı biyolojik sistemde fizyolojik rolünün olduğu gösterilmiştir [84-86].

2.7.5. Parapoptosis

Parapoptosis, morfolojik olarak programlı hücre ölümü olarak kabul edilese de biyokimyasal olarak apoptozdan farklıdır. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (ILGF-1) gibi büyüme faktörlerine cevap olarak oluşmaktadır. Parapoptosis birçok hücrede büyüme faktörü olan ILGF-1 reseptör ile başlatır ve hücre içindeki mitojen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ailesinin üyelerinin de içinde bulunduğu sinyal yolları ile gelişir. Parapoptosisin durdurulması kaspaz inhibitörleri veya antiapoptotik Bcl-2 benzeri proteinlerin ekspresyon seviyelerinin artması ile olur. Bu hücre ölümünün karakteristik yapısı hücre içinde mitokondriyal şişmenin olması ve sitoplazmada çok sayıda büyük vakuollerin meydana gelmesi ile karakterizedir [84, 87].

2.7.6. Mitotik katastrof

Hücrede mitoz sırasında gerçekleşen hücre hasarı veya kontrol noktalarındaki (G1, S ve G2 kontrol noktalarında ve DNA hasarı) aksaklıklar sonucunda meydana gelen ölüm şeklidir. Hücre bölünmesi mitoz tamamlanmadan durdurulur ve kromozomlarda meydana gelen bozukluklar sonucunda hücre metafaz sırasında ölür [77,88]

2.7.7. Apoptoz

Ökaryotik organizmadaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürler. Yaşam süreleri hücreden hücreye değişmektedir. Apoptoz üç temel olayda

karşımıza çıkmaktadır: Gelişim sürecinde organizasyonun tamamlanması, homeostazisin sağlanması ve organizma bütünlüğüne tehdit oluşturan hücrelerin uzaklaştırılmasında. 'Apoptoz' ifadesi, hücre ölümünün belirli bir morfolojik yönünü tanımlamak için Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında kullanılmıştır. Apoptozda hücre şeklinin yuvarlak hale gelmesi, psödopodların geri çekilmesi, hücre hacminde azalma (piknoz), kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma (karyoreksis), plazma zarı kabarması görülür [89]. Apoptoz, gelişmiş organizmalarda meydana gelen programlı hücre ölüm mekanizması olarak tanımlanmaktadır. Programlı hücre ölümü olan apoptoz; hücrede DNA hasarının bulunması, virüsle enfekte olma durumu, hücrenin normal düzeninde meydana gelen kusurlar ve hasar olması durumlarında gerçekleşir. Ayrıca, apoptoz fizyolojik normal bir gelişim için gereklidir [90]. Kanserde apoptoz, hücrenin kontrolsüz çoğalması, hasarlı bir şekilde bölünmüş olan hücreler, kontrol mekanizmalarından kendini kurtaran hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve çok fazla metabolik sorunun tanımlanmasında önemli bir yer tutmaktadır. Normal doku ve organların homeostazisi sağlamak ve nekrotik olmayan hücreyi ölüme götüren süreç “apoptoz” veya “apoptozis” olarak tanımlanmaktadır [90].

Programlanmış hücre ölümünün bir biçimi olan apoptoz, bir hücrenin bir organizmadan düzenli olarak ayrılmasıyla sonuçlanan koordineli ve aşamalı bir biyokimyasal reaksiyonlar dizisidir. Bu normal biyolojik süreç, embriyogenez sırasında uygun organ gelişimi ve patojenlere maruz kalmaktan zarar gören veya onkogenik transformasyona uğrayan hücreler gibi anormal hücrelerin çıkarılması için gereklidir. Hücrenin hayatta kalması ve apoptoz arasındaki geçiş sıkı bir şekilde düzenlenir ve bir organizmanın gelişimi ve iyiliği için kritik öneme sahiptir. Örneğin, hücre ölümünü önleyen apoptotik yoldaki kusurlar, kanserde olduğu gibi gelişimsel anormalliklere veya düzensiz doku büyümesine yol açabilir. Buna karşılık, programlanmamış veya erken apoptoz, otoimmün, nörolojik ve kardiyovasküler bozukluklara katkıda bulunan fonksiyonel hücrelerin kaybına neden olabilir. Sonuç olarak, çeşitli hastalıkların gelişimini daha iyi anlamak ve potansiyel terapötik hedefleri keşfetmek için apoptotik sürecin manipülasyonu esastır [91].

Apoptozun uyarılması ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu, kaspaz aktivasyonu (sistein proteazları) ile sonuçlanır. Kaspazlar (sistein bağımlı, aspartat spesifik peptidazlar), protein substratları içinde benzersiz bir 4 amino asit dizisini tanıyan ve onları bir aspartat kalıntısından ayıran sistein proteazlarıdır. Kaspazlar, hücre sağkalımını veya ölümünü düzenlemenin yanı sıra iltihaplanma, çoğalma ve

farklılaşmada önemli bir rol oynar. Genellikle hücrelerde inflamatuvar ve başlatıcı kaspazlar, dimerizasyon altında aktive olan monomerler olarak bulunurlar [92-94]. Yürütücü kaspazlar, yapısal ve düzenleyici hücre proteinlerine saldırır, böylece bir kaspaz kaskadının başlamasına yol açar. Son olarak, kaspaz aktivitesi, homeostazın korunmasında yer alan çeşitli proteinlerin ve hücre bileşenlerinin onarılmasında veya hücre döngüsünün protein düzenleyicileri, yapısal proteinler, vb. olan çeşitli proteinlerin bozunmasıyla sonuçlanır. Efektör kaspazların ve bunun sonucunda aktive olan enzimler (endonükleazlar, jelsolin, vb.) çeşitli hücre içi hedefleri etkiler: intranükleer lamina bozulması, DNA bütünlüğünün bozulması, spesifik kromatin sıkışması, hücre iskeleti bileşenlerinin bozulması, mitokondri, Golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, vb. kaspazlar için bilinen hedeflerin sayısı sürekli artmaktadır. Kaspaz aracılı mekanizmaya ek olarak, apoptotik ölümden rol oynayan kaspazdan bağımsız bir yol vardır, burada flavoprotein AIF (apoptozis indükleyici faktör) ve endonükleaz G mitokondriden çıkar, çekirdeğe yer değiştirir ve nükleer DNA'yı büyük parçalara ayırır [95-97]. Bu hücre ölümü mekanizması sırasında gözlenen biyokimyasal ve morfolojik belirtiler apoptoza benzer. Apoptoz sırasında morfolojik değişiklikler, hücre içi bileşenlerin çeşitli derecelerde bozulması olarak kendini gösterir. Apoptozun son adımları sitoplazma yoğunlaşması, çekirdeklerin ve tüm hücrelerin parçalanması, ardından nükleer parçalar, Golgi aygıtının elemanları, mitokondri vb. içerebilen apoptotik cisimlerin oluşumudur. Apoptotik hücreler ve apoptotik cisimler, belirli sinyal ve adezyon moleküllerini açığa çıkararak komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tanınan ve böylece fagositoza katkıda bulunan yüzey molekülleridir [98]. Bu tür yüzey molekülleri arasında fosfatidilserin, lizofosfolipidler, vitronektin, trombospondin gibi moleküller vardır.

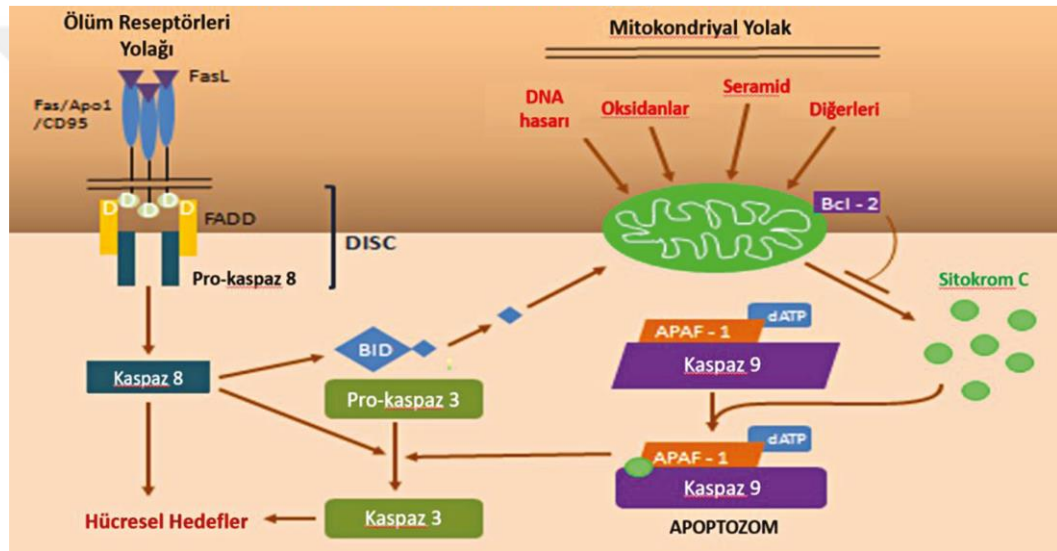
Fagositoz ayrıca, yutulmaya uygun olmayan hayati hücrelerin tanınması için gerekli olan ölmekte olan hücrelerin yüzeyinde CD31'in inaktive edilmesiyle de kolaylaştırılır. Apoptoz indüksiyonu için dış ve iç mekanizmalar vardır. Dış yolak, proapoptotik sinyal moleküllerinin yüzey reseptörleri ile etkileşimleri ve ardından sitozolik kaspaz kaskadı aktivasyonu aracılığıyla yönlendirilir. Hücre içi mekanizmada, mitokondri, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı gibi çeşitli organellerden salınan proapoptotik proteinlerin bir sonucu olarak veya proapoptotik proteinleri kodlayan genlerin indüklenmiş ekspresyonu nedeniyle sitozolde bir kaspaz kaskadı aktive olur [99].

Apoptoz meydana gelen hücreler, çeşitli morfolojik ve biyokimyasal özellikler göstermektedir. Bunlar;

- Hücre hacminde azalma: Hücre iskeletinin hücre membranında yeniden düzenlenmesi ile meydana gelir. Sitoplazmanın büzülmesi ve küçülmesi ile oluşur. Hücre içi organeller kümelenir [77].
- DNA fragmentasyonu: hücre çekirdeğinde meydana gelir ve geri dönüşümsüzdür. Bu olay nüklear endonükleazların Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağımlı aktivasyonlarının sonucunda oluşmaktadır. Bu enzimlerin aktivasyonu sonucunda DNA parçalanarak küçük nükleozomal fragmanlar oluşur. Daha sonra nüklear kromatin kümelenir ve nükleus ayrı fragmanlar şeklinde bölünür [77].
- Mitokondriyal fonksiyon kaybı: Mitokondri membran kanallarındaki geçirgenliğin değişimi sonucunda gerçekleşir. Mitokondrinin stabilitesi ve elektron taşıma zincir sistemi bozulur. Mitokondri membranından sitokrom-c gibi proteinler sitoplazma içine geçiş yapar ve kaspazların aktive olmasını sağlar. Kaspazlar sayesinde hücreyi apoptozdan koruyan proteinler inaktif olur ya da ortadan kaldırılır. Ayrıca apoptozu baskılayan regülatörleri de inaktif ederek hücre ölümünü başlatmaktadır. Apoptozun başlamasında oldukça önemli olan Sitokrom c'nin salınımı, Bcl-2 proteinlerinin kontrolündedir [77].
- Membran tomurcuklanması: Fosfatidilserin gibi moleküllerin plazma membranından sitoplazmanın dış yüzüne hareket etmesi sonucu plazma membranının bütünlüğü bozulur ve tomurcuklanma meydana gelir [77].
- Apoptotik cisimciklerin oluşumu: Hücrenin parçalanması ile sonuçlanan apoptozun son evresidir. Bu cisimcikler organeller ve nüklear materyalden meydana gelen sitoplazmik kabarcıklardır. Fagositik hücreler tarafından hızlı bir şekilde ortadan kaldırılırlar. Apoptotik cisimciklerin yok edilmesi o kadar hızlı ve etkindir ki enflamatuvar yanıt meydana gelmemektedir. Apoptoz, mitozdan yaklaşık 20 kat daha hızlı meydana gelmektedir [77].

Hücrede apoptozun meydana gelebilmesi için ilk olarak ilgili mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalin oluşması gerekmektedir. Beklenen bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir. Hücre içinden gelecek olan sinyaller, hücre içi DNA hasarı, Ca^{+2} seviyesinde artış, biyokimyasal dengesizlikler, hücre içinde pH düşüklüğü ve hücre siklus bozukluklarıdır. Hücre dışından gelecek olan sinyaller ise iskemi, toksinler, radyasyon,

çevresel büyüme faktörlerinin yetersizliği, yaşlanma sinyallerinin seviyesinin yetersizliği ve ölüm reseptörlerinin aktivasyonu gibi hücrenin dışardan maruz kalabileceği sinyallerdir. Apoptoz, hücreye içerden ya da dışardan gelen bu sinyallerin kaspaz sistemini aktive etmesi ile başlar. Kaspazlar, apoptozun gerçekleşmesi için gerekli olan temel moleküllerdir ve kaspazların aktivasyonu iki yolak ile aktive edilir. Bunlar mitokondriyal (intrinsik) ve hücre ölüm reseptör (ekstrensek) yolaklardır. Son zamanlarda endoplazmik retikulum aracılı apoptoz isimli üçüncü bir yoldan söz edilmektedir. Bu yolların aktivasyonları birbirinden farklı şekillerde gerçekleşse de sonunda ortak moleküllerin aktive olması ile hücreyi apoptoza götürürler [100,101]



Şekil 2.2. Apoptozis yolları. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar [102].

2.7.7.1. Mitokondriyal (İntrinsik) yolak

Mitokondri, çeşitli uyarıların neden olduğu apoptotik hücre ölümünde önemli bir rol oynar. Mitokondriyal membranların geçirgenliğinin artması nedeniyle sitokrom-c ve diğer bazı proteinlerin mitokondriden sitozole salınması, mitokondriye bağlı apoptozda önemli bir olaydır. Sitokrom c, ayrıca oligomerik proteinler Apaf1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve bazı prokaspaz 9 ve dATP moleküllerini içeren apoptozom oluşumu için bir platform olarak gereklidir [103, 104]. Aktivasyondan sonra, kaspaz 9, prokaspaz 9'un diğer moleküllerini düzenlemek için apoptozomdan ayrılır ve kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazları aktive eder. Bu tür proteinlerin ve çeşitli kaspazların aktivasyonu, apoptoz sırasında gözlenen tipik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açan protein substratlarının proteolitik parçalanmasıyla da sonuçlanır [105]. İntrinsik yolda apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2/Bax gen ailesi görev alır. Bu aşamada apoptozu

baskılayan ‘anti-apoptotik’ ve apoptozu indükleyen ‘pro-apoptotik’ proteinler görev alırlar. Bcl-2 proteinleri nükleer membran, endoplazmik retikulum ve dış mitokondriyal membran ile ilişkilendirilebilir [106]. Hücrenin apoptoza olan eğilimini proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin konsantrasyonlarının miktarı belirler, proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza yönelir, antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptozdan kaçınır. Proapoptotik proteinler Bak, Bax, Bad, Bid, BclXs, Bim, Puma ve Noxa’dır. Bu proteinler stoplazma sıvısında bulunurlar. Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu neden olurlar. Antiapoptotik proteinler ise Bcl-xL, Bcl-2 ve Mcl-1’dir. Bu proteinler de mitokondrinin dış membranında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında yer alırlar. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler [107-109]. İntrinsik sinyal yolağı birçok faktör ile kontrol edilir. Bunlardan en önemlisi de apoptoz inhibitör (IAP) protein ailesidir. IAP ailesi proteinleri kaspazlara (kaspaz-3, -7 ve -9’a) doğrudan bağlanarak aktivasyonlarını baskılar [110].

2.7.7.2. Hücre ölüm reseptör (Ekstrinsik) yolağı

Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine, FasL, TNF-alfa, TRAIL gibi sinyallerin bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan reseptör; prokaspaz ve adaptör moleküller ile birleşerek DISC (Death inducing signaling complex-Ölüme neden olan sinyal kompleksi) adı verilen yapıyı oluşturur. DISC oluşuktan sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8, aktif duruma geçer. Aktif kaspaz-8 2 farklı yolla kaspaz-3’ü aktive eder. Ya direkt kaspaz-8 kendisi kaspaz-3’ü aktive eder ya da Bid üzerinden dolaylı olarak intrinsik mekanizmada ilk olarak kaspaz-9’u daha sonra kaspaz-3’ü aktive eder. Ne şekilde olursa olsun aktive olan kaspaz-3 yine CAD (Kaspaz aktive edici DNaz) aktivasyonu ile DNA parçalanmasına sebep olur [107,109,111]. Son zamanlarda keşfedilen ekstrinsik yollardan biri de sfingolipid yoludur. Sfingolipidlerden sfingomyelin hücre zarı yapı taşlarından biridir. Sfingomyelinaz radyasyon, kemoterapi ve ölüm reseptörleri ile aktive olarak sfingomyelini seramid’e dönüştürür. Seramid ise seramidaz ile sfingozine dönüştürülür. Sfingozin de proapoptotiklerden Bid yapımını artırarak apoptozu tetikler [84]. Son yıllarda araştırılan endoplazmik retikulum aracılı yolda ise hücre içinde kalsiyum artışı ile endoplazmik retikulumun membranında bulunan kaspaz-12 aktive olur. Kaspaz-12’de kaspaz-9 üzerinden kaspaz yolunun aktivasyonunu sağlayarak apoptozu indükler [112].

2.7.7.3. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

- Hematoksilen-eozin boyama (HE): Bu yöntemde elde edile preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. HE özellikle hücre kültürü çalışmalarında ve doku boyamalarında oldukça fazla kullanılabilmektedir. HE boyamada, hematoksilen boyası hücrede kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre gözlemlenir. Görülen değişikliklerden bazıları; kromatinin kondanase olması, hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme ve nükleus zarının toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesidir [113, 114].
- Giemsa boyama: Bu boyama yönteminde de nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanımlanır. Giemsa boyama sonucunda sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmektedir fakat hematoksilen boyamayadan pek farkı yoktur [115].
- Floresan mikroskopi; floresan maddelerin Hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidine-2’-phenylindole”, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC “fluorescein isothiocyanate gibi boyaların kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Kullanılan bu floresan boyalar DNA’ya bağlanabilme özelliklerinden dolayı hücrenin kromatini boyayarak nükleusu görünür hale getirirler. Hücre kültürü çalışmalarında, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımının yapılmasında kullanılabılırler. Bu amaçla canlı ve ölü hücre ayrımı yapabilmek için, canlı hücreleri boyayabilen hoechst boyası ile sadece ölü hücreleri boyayabilen propidium iyodür beraber kullanılır.
- Elektronmikroskopi; Morfolojik değişikliklerin en doğru ve belirgin olarak gözleendiği yöntemdir. Bu mikroskopik yöntemle hücrelerde, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu, mitokondrinin durumu, sitoplazmik küçülme ve hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi detaylar da incelenebilmektedir [115].
- Faz kontrast mikroskopi; bu mikroskop ile sadece hücrelerin kültüründe hücreleri veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları flask tabanından ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar ve bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler. Bu yöntemde mitozaya giden hücreler de gözlenebilirler. Fakat bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karıştırıldıklarından dolayı faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) izlenebilir.

- TUNEL yöntemi; Apoptoz sonucunda meydana gelen DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasında kullanılmaktadır [115-117]. Apoptotik parçalanma sonucu meydana gelen DNA uçları Klenow fragmenti veya DNA polimeraz kullanılarak işaretlenebilmektedir. Fakat terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme çok daha duyarlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Genel olarak elde edilen parafin kesitler, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak elde edilen in situ işaretleme ve enzimatik veya floresan görüntüleme sonucunda apoptotik hücreler diğerlerinden ayırt edilir. Bu yöntemde “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi denmektedir [117-119].
- M30 yöntemi; bu yöntemde apoptotik hücreler, kaspazların etkisiyle sitokeratin 18’in açığa çıkan antijenik bölgesinin immunohistokimyasal yöntemle boyanması sonucunda elde edilir. Bundan dolayı bu yöntem sadece sitokeratin 18’i eksprese eden dokularda kullanılabilir ve bu dokularda epitelyal kaynaklı dokulardır.
- Kaspaz-3 yöntemi; bu yöntem ile immunohistokimyasal boyama metoduyla sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 tespit edilebilir. Bu yöntemi kullanabilmek için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi veya çalışılan dokuda apoptoza neden olan etkenin kaspaz-3’ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekmektedir [114,120].
- Agaroz jel elektroforez yöntemi; Agaroz DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en çok kullanılan ortamlardan biridir. Genellikle %0.3 ile %2 agaroz konsantrasyonları moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak kullanılır. Agaroz jel elektroforezinde en çok 50 kb’a kadar olan nükleik asitler ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonu değiştirilerek jelde moleküllerin hareket ettiği porların çapı da ayarlanabilir. Böylece büyük DNA parçaları için düşük agaroz, küçük DNA parçaları için yüksek agaroz konsantrasyonları ayarlanarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrılması sağlanabilmektedir. Agaroz jellerde DNA parçalarını görüntülemek için floresan bir boya olan ethidium bromide kullanılır ve UV ışığı altında görüntülenir. Ethidium bromide DNA’nın iki zinciri arasına girer ve 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etki gösterir bunun sonucunda ise DNA’nın jelde görünür hale gelmesi sağlanmış olur [121].
- Western blotting; Western blotlama ya da immunoblotlama adı verilen bu yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli büyüklükteki bir proteini saptamak için

kullanılan temel bir yöntemdir. Bu yöntem istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikorun kullanılması sonucuna bağlıdır. Kullanılan bu antikor prob olarak ilgili proteinin bir karışımın içinden elde edilmesini sağlamaktadır. Western blot hücrede istenilen proteinin miktarını tayin etmede kullanılabilir [121]. Bu yöntem ile apoptoza özgü proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) tespit edilmesi mümkündür.

- Flow sitometri; Flow sitometre cihazının temel çalışma mantığı, lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizinin birleşmesinden oluşur. Flow sitometre cihazı ile hücreler, farklı moleküller ve parçacıklar farklı açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak tespit edilebilmektedir. Tespit edilmek istenen hücreler FITC, 13- phycoerithrin ve rhodamine-GG gibi özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla işaretlenebilmektedir [118]. Flow sitometri yardımıyla, apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteini floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak saptanabilmektedir. Klinikte apoptozun belirlenmesi açısından en sık kullanılan yöntemdir çünkü kolay uygulanabilir, kısa zamanda sonuç verir ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından oldukça kullanışlıdır.
- ELISA; ELISA testi, serolojik tanı yöntemlerinden biridir ve bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyonların tanısında ayrıca apoptozun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntem, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesinin ardından substratın eklenmesi sonucunda ortamda antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi prensibine dayanmaktadır. Çabuk sonuç veren ve oldukça duyarlı spesifik bir yöntemdir. Apoptozda meydana gelen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınması sonucunda DNA fragmentasyonunun oluşmasıdır [122]. ELISA ile hem hücre kültüründe hem de insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür [114,123]

2.8. Sfingolipidler

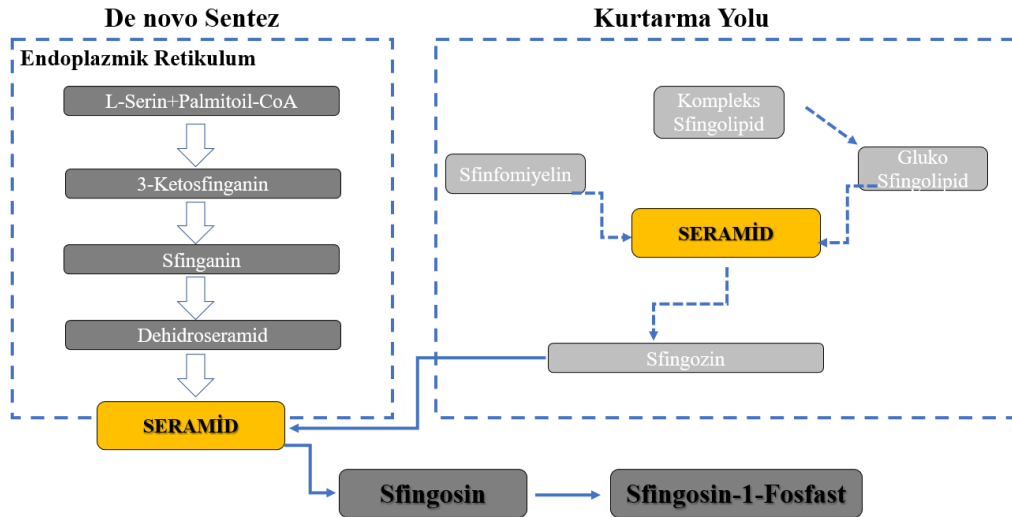
Sfingolipidler, ökaryotik hücre membranının esas bileşenlerindendir. Büyük bir lipit ailesini temsil eden sfingolipidler ilk kez 1884 yılında isimlendirilmişlerdir. Hücrede membran akışkanlığından ve yapısının korunmasından sorumludurlar aynı zamanda, normal doku ve hücre homeostazından da sorumludurlar. Sfingolipidler amfipatik

özellikteki moleküllerdir. Yapılarında hidrofobik ve hidrofilik parçalarda bulunmaktadır. Hidrofobik olan kısımları 18 karbon uzunluğundadır ve sfingoid baza bağlı bir yağ asidinden oluşur. Hidrofilik olan kısımda ise basit sfingolipidlerde sadece hidroksil grubunu bulundururken, daha kompleks sfingolipidlerde ise şeker, fosfat ve alkol yapıda moleküllerden meydana gelmektedir [124].

Sfingolipidler, membran çift tabakalı lipid yapısının elemanıdır ve membranın akışkanlığını düzenleyen membran lipidleri ailesinin üyesidirler. Sfingolipidlerden seramid, sfingozin-1-fosfat, sfingozin ve glukozilseramid, kanser patogenezi ve terapisinde apoptozu tetikleme, hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu, yaşlanma ya da inflamasyon gibi farklı açılardan fonksiyon gösteren biyoefektör moleküllerdir ve tümör süpresör lipidler olarak adlandırılmaktadırlar. Seramid, sfingozin ve sfingozin-1-fosfat; hücre proliferasyonunu ve apoptozu kontrol etmekte görev alan sfingolipid metabolitleridir. Seramid ve sfingozin üretimi, kemoterapi, radyasyon veya oksidatif stres ile indüklenmektedir ve bu sfingolipidler hücre ölümüne, yaşlanmasına ve hücre döngüsü durdurulmasına aracılık etmektedirler [25]. Seramidler DNA hasarına, strese, hipoksiye ve apoptotik moleküllerin indüksiyonuna yanıt olarak hücrede birirmektedirler [26]. Seramidazlar aracılığıyla üretilen seramid molekülü hücre proliferasyonunun negatif bir düzenleyicisi olarak görev yaparak apoptozu teşvik etmektedir [27]. Buna zıt olarak, sfingozin kinaz aracılığıyla üretilen sfingozin-1-fosfat (S1P), hücrenin büyümesi, hayatta kalması, hareketinin düzenlenmesi, apoptozu inhibe etme gibi faaliyetlerinin yanında invazyon, anjiyogenez, vasküler olgunlaşmasını da düzenlemektedir [27]. Sfingozin-1-fosfat (S1P), seramid bağımlı apoptozis mekanizmasının baskılayıcı etkenidir. Bu nedenle hücre içindeki seramid ve S1P seviyelerinin dengesi hücrenin yaşam ve ölümüyle yakından ilişkilidir. Bu sebeple seramidaz enziminin düzenlenmesi ile hücre içi seramid, sfingozin ve S1P oranlarının kontrolü, apoptozis mekanizmasında kilit rol oynamaktadır [28]. Seramidaz enzimleri, sfingosin üretmek için seramidi hidrolize eden ilaçlara ve radyasyona karşı dirençli olan anahtar enzimlerdir. Bu özelliklerinden dolayı, son yıllarda sfingolipid metabolizmasındaki bu merkezi enzimler kanser tedavisi stratejilerinin ve ilaçlarının geliştirilmesinde yeni hedefler olarak gösterilmektedir. Bu enzimlerin inhibitörleri, yeni antikanser ilacı olarak geliştirme konusunda mükemmel potansiyele sahip olarak literatürde belirtilmiştir [29].

2.8.1. Seramidler

Seramidler, uzunluğu C-14 – C-26 arasında değişen yağ asit zincirine bağlanmış bir amid olan sfingozinden oluşan en temel sfingolipidlerdir. Seramidler, sfingomiyelin, seramid-1-fosfat ve glukozilseramid gibi hidrofilik baş grubundan oluşan kompleks sfingolipidlerin metabolik ve yapısal öncüsüdür. Endojen (iç) seramid seviyeleri, bütünleşmiş ve kompleks metabolik yollarla kontrol edilmektedir. Bu yollardan her biri birçok özel enzimler ile katalizlenmektedir. Endojen seramid, sfingomiyelinin hidrolize edip seramid oluşturan sfingomiyelinazların aktivasyonuna ilaveten *de novo* yolk ile de oluşabilmektedir. *De novo* yolkta, serin ve palmitoil KoA serin palmitoil transferaz ile 3-ketosfinganin'e dönüştürülmektedir (Şekil 2.3). Seramidler, apoptoz, büyümenin durdurulması, yaşlanma, farklılaşma, bağışıklık tepkisine aracılık etme ve hücre döngüsü durdurulması gibi hayati süreçlerde sinyal molekülü olarak önemli rolleri olan bir sfingolipiddir. Yapısal olarak seramidler, çeşitli uzunluk, doymuşluk ve hidroksilasyona sahip bir yağlı asit zincirinden oluşur ve bu zincir, bir amid bağlantısı vasıtasıyla bir sfingoid bazın amino grubuyla sınırlandırılmıştır. Dahası, sfingomiyelin, serebrosidler, gangliosidler gibi kompleks sfingolipidlerin hidrofobik omurgası, seramidlerden oluşur. Yağ asit zincirinin uzunluğu açısından, seramidler 2 ila 28 karbon arasındadır. C-16 ila C-24 seramidleri memeli hücrelerinde en bol miktarda bulunur. Bu yağ asitleri genellikle doymuş ya da tekli doymamış olup C-2 konumunda (hidroksi yağlı asit) ya da terminal C atomunda (hidroksi yağ asidi) bir hidroksil grubu içerebilir. Seramidler doğadaki en hidrofobik lipidlerdir, çünkü sitosolde çözelti içinde hiçbir seramid yoktur [125-127].



Şekil 2.3. Sfingolipid yolunun şematik diyagramı. Grosch vd., (2012) kaynağından modifiye edilerek kullanılmıştır [125].

2.8.2. Seramidlerin kanserle ilişkisi

Endojen seramidlerin yükseltilmesi kanser hücrelerinin büyümesini regüle etmek için etkili bir metod olarak gösterilmektedir. Daunorubicin, kamptothecin, fludarabine, etoposide ve gemcitabine gibi kemoterapötikler seramid oluşumunu de novo yoldan veya sfingozin miyelinazları aktive ederek arttırmaktadır. Buna alternatif olarak, endojen seramid seviyesini arttırmak için seramid enzimlerini hedeflemek farklı kanser hücrelerinde antiproliferatif cevapların artmasına yol açmaktadır. Buna ilaveten, kemoterapötik ajan gemcitabine ve sfingomiyelini kombinlemek in vivo ortamda örneğin pankreatik tümör büyümesini sinerjistik olarak inhibe etmiştir. Kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemek için yeni yaygın bir yaklaşım da ekzojen seramid analoglarının ya da taklitlerinin terapötik ajanlar olarak kullanılmasıdır. Bu seramidlerin tasarlanması ve taşınması ile ilgili birçok gelişme vardır. Örneğin, farklı zincirlere sahip piridinium seramidler sentezlenmiştir. Bunların özelliği sudaki çözünürlüklerinin artırılmış olması hücre membranından permeabilitelerinin artırılmış olmasıdır [128-133]. Bu yapılardaki piridinyum halkasının pozitif yükü bu seramid analoglarının genellikle mitokondri içine bir kısmında kanser hücresinin çekirdeğine hedeflenebilmesi ve birikimini sağlamaktadır. Bu çalışmalar, kanser hücrelerinin içindeki subselüler yapıların (özellikle mitokondrilerin) genel olarak negatif yüklü olduğunu belirtmektedir [134]. Bu sebeple, piridinyum seramidler normal hücrelere minimum toksisite ile kanser hücrelerine hedeflenebilmek için tercih edilebilirler [134].

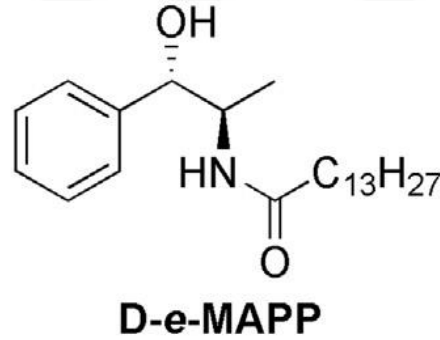
2.8.3. Seramidaz inhibitörleri

Seramidazlar (N-asilsfingozin deasilaz), seramidi serbest sfingoid baza ve yağ asidine hidroliz eden moleküllerdir. Sfingozin ve sfingozin-1-fosfatın (S1P) fosforile edilmiş ürünü olan seramid hücre ölümünü indükleyebildiğinden, hücre proliferasyonunun ve hayatta kalma sinyallerinin kuvvetli bir indükleyicisidir. Seramidazlar, biyoaktif sfingolipidlerin miktarlarının düzenlenmesinde anahtar bir rol oynamaktadır. Seramid, Sfingozin ve S1P; hücre proliferasyonuna, farklılaşmaya, apoptozise, adezyona ve migrasyona aracılık eden biyoaktif lipitlerdir. Kanser tedavisi zor bir hastalık olduğu kanıtlanmıştır ve çok az etkili ilaç mevcuttur. Yeni, etkili, seçici ve daha az toksik antikanser ajanların tanımlanması, tıbbi kimyada önemli ve zorlu bir hedef olmaya devam etmektedir. Sfingolipid (SPL) metabolizması, çeşitli hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde kilit rol oynayan zengin bir biyoaktif molekül ağı sağlamaktadır. Seramid, kanser hücresi büyümesi ve apoptozun anahtar bir modülatörü

olarak ortaya çıkmıştır. Seramid ve S1P'nin hücre büyümesi ve hücre ölümünü düzenlemedeki rolleri nedeniyle, bunların metabolik ve sinyal yolları antikanser tedavisi için potansiyel hedefler olarak ortaya çıkmıştır. Endojen seramidi artırmak için birçok yaklaşım araştırılmıştır ve birkaçı umut verici görünmektedir [25, 30, 128-134].

2.8.4. D-erythro-MAPP (D-e-MAPP)

D-erythro-MAPP (N-[(1S,2R)-1-Hidroksi-1-Fenilpropan-2 Yl]Tetradekanamit) seramidin sentetik bir analogudur ve spesifik bir alkalın seramidaz inhibitörüdür (Şekil 2.4). Moleküler formülü $C_{23}H_{39}NO_2$ ve molekül ağırlığı 361.6 g/mol şeklindedir. D-e-MAPP, stereospesifik olarak alkalın seramidaz'ı inhibe eder [http-1]. Hem *in vitro* hem de HL-60 hücrelerinde alkalın seraminidazı seçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyon, seramidin sfingosine parçalanmaması nedeniyle tedavi edilen hücrelerde endojen seramid seviyesinde 3 kattan fazla artışa neden olduğu tespit edilmiştir. D-erythro-MAPP hücre içi seramid seviyelerini artırarak, G0/G1 fazında hücre döngüsü durmasını indükler ve zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde HL-60 promiyelositik lösemi hücrelerinin büyümesini engellediği tespit edilmiştir [135].



Şekil 2.4. D-erythro-MAPP kimyasal yapı gösterimi [136]

2.9. Sitotoksikite Testleri

Kimyasal, biyolojik ve fiziksel faktörler hücreleri farklı derecelerde etkileyerek sitotoksikiteye neden olabilir. Bir bileşiğin biyolojik karakteristiğini anlamak için toksik veya toksik olmayan etkilerini belirlemek esastır. *In vitro* sitotoksikite deneyleri (hücre canlılığı deneyleri), genellikle olası ilaç adaylarını değerlendirmek veya bazı bileşiklerin sitotoksik profillerini araştırmak için kullanılan hücre kültürü tabanlı ölçüm yöntemleridir. Bu yöntemlerle birçok bileşiği kısa sürede değerlendirmek ve daha sonraki hayvan deneyleri için gerekli temel bilgileri elde etmek mümkündür. Farklı mekanizmalara ve çeşitli hassasiyetlere sahip kolorimetrik, enzimatik, lüminometrik

prensiplere vb. dayalı birçok hücre canlılığı tahlil yöntemi mevcuttur. MTT, MTS, XTT, WST, LDH enzim tahlili, alamar mavi yöntemi, ATP biyoluminesan testi gibi birçok yöntem bulunmaktadır [137]. Sitotoksik analizler ile bilinmeyen terapötik ve toksik etkilere neden olabilecek bir ajanın özellikleri araştırılır ve bu analizlerin bulguları gelecekteki kanser modelleri ve klinik deneyler için ön verileri oluşturmaktadır. Bu nedenle sitotoksikite çalışmalarından elde edilen verilerin doğruluğu ve güvenilirliği son derece değerlidir [137]. Hücreler sitotoksik bir ajana maruz kaldıklarında apoptoz, otofaji ve nekroz nedeniyle ölebilir veya sitostaz nedeniyle proliferatif özelliklerini kaybedebilirler [138]. Hücre bazlı sitotoksikite çalışmaları, test edilen bir ajanın sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında genel bilgi sağlar [139]. Hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için boyama, kolorimetrik, luminometrik ve enzimatik yöntemleri kullanan çeşitli testler vardır [140-142]. Kolorimetrik yöntemlerin temel prensibi, çoğalmış hücrelerin ve tetrazolyumun artan mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinden oluşan suda çözünmeyen formazan kristallerinin (mor) spektrofotometrik ölçümüne dayanır [139]. Tetrazolyum halkası mitokondriyal dehidrojenaz ve redüktaz tarafından parçalanabilir ve bu nedenle sadece canlı hücreler tarafından bir renk reaksiyonu başlatılabilir [143]. Canlılığını yitirmiş hücrelerde herhangi bir renk oluşmaz [139]. Tetrazolium tuzu bazlı testler (örn., MTT, MTS, XTT ve WST-1), kanser araştırmalarında hücre proliferasyonunu ve canlılığını değerlendirmek için en sık kullanılan testlerdir [144].

2.9.1. MTT testi

Mossman (1983) tarafından geliştirilen MTT bileşikler, ökaryotik hücre zarından kolaylıkla difüze olabilir ve formazan kristallerine indirgenir. Canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olan formazan miktarı, çoklu plak okuyucu ile 570 nm absorbansta optik yoğunluk ile ölçülmektedir [145]. MTT reaktifi (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür), dört nitrojen atomu içeren pozitif yüklü bir dördütlü tetrazol halka çekirdeğinden oluşan bir mono-tetrazolyum tuzudur. İki fenil parçası ve bir tiyazolil halkası içeren üç aromatik halka içerir. MTT'nin azalması, çekirdek tetrazol halkasının bozulmasına ve formazan adı verilen mor-mavi suda çözünmeyen bir molekülün oluşmasına neden olur. MTT reaktifi, muhtemelen pozitif yükü ve lipofilik yapısı nedeniyle canlı hücrelerin mitokondriyal iç zarının yanı sıra hücre zarından da geçebilir ve metabolik olarak aktif hücreler tarafından formazana indirgenir [144,146]. MTT yöntemi tipik olarak hücrelerin MTT ile inkübasyonundan birkaç saat sonra gerçekleştirilir. Üretilen suda çözünmeyen formazan daha sonra Dimetil sülfoksit

(DMSO) gibi bir çözücü ile çözülür. Daha sonra, homojenleştirilmiş MTT-formazan çözeltisinin absorbans ve diğer mekanizmalarla ışık iletiminin azalması, MTT'den türetilen formazanın en fazla absorbe ettiği bir dalga boyunda (yaklaşık 570 nm) optik yoğunluğu (OD) açısından bir mikropilaka okuyucu tarafından ölçülür. Ölçülen OD değerlerinin, formazan konsantrasyonunun ve dolayısıyla MTT'nin hücre içi azalmasının bir temsili olduğu varsayılır. Bu, hücre proliferasyonunu/canlılığını, ilaç sitotoksitesini ve hücrelerin mitokondriyal/metabolik aktivitesini ölçmek için ortak bir araç olarak yaklaşık kırk yıldır MTT testinin uygulanmasının temeli olmuştur [147].

2.10. Nanopartiküller

Nanoteknolojinin, bilimin çeşitli alanlarında nanoyapıları ve nanofazları uygulayarak biyolojik ve fiziksel bilimlerin önündeki engelleri aştığı gösterilmiştir [148]. Özellikle nanotıp ve nano bazlı ilaç dağıtım sistemlerinde, bu tür parçacıklara büyük ilgi gösterilmiştir [149, 150]. Nanomalzemeler, biyosensörlerden, mikroakışkanlardan, ilaç dağıtımından ve mikroyarray testlerinden doku mühendisliğine kadar nanotıp sınırlarını etkileyen, boyutları 1 ile 100 nm arasında değişen bir malzeme olarak iyi tanımlanabilir [151-153]. Nanoparçacıklar atomik veya moleküler düzeyde tasarlanmış malzemeler içerdiğinden genellikle küçük boyutlu nanokürelerdir [154]. Bu nedenle insan vücudunda daha büyük malzemelere göre daha serbest hareket edebilirler. Nano ölçekli parçacıklar benzersiz yapısal, kimyasal, mekanik, manyetik, elektriksel ve biyolojik özellikler sergilerler [155]. Nanotıp, tıbbi biyoloji ve hastalık önleme ve iyileştirmede nanobilim bilgi ve tekniklerinin kullanımını uygulayan gelişmekte olan bir alandır. Nanorobotlar, tanı, iletim ve duyuşal amaçlar için nanosensörler ve canlı hücrelerdeki malzemeleri harekete geçirme gibi nanoboyutlu malzemelerin kullanımını içerirler. Örneğin, kanser teşhisinin hem tedavi hem de görüntüleme yöntemlerini birleştiren nanoparçacık tabanlı bir yöntem geliştirilmiştir [156]. İlk nesil nanoparçacık bazlı terapi, şu anda FDA onaylı olan lipozomlar ve miseller gibi lipid sistemlerini kapsamaktadır [157]. Bu lipozomlar ve miseller, altın veya manyetik nanopartiküller gibi inorganik nanopartiküller içerebilir [158]. Bu özellikler, ilaç dağıtımı, görüntüleme ve terapötik işlevler üzerinde durularak inorganik nanoparçacıkların kullanımında bir artışa izin verir. Nanoilaçlar, absorptif endositozun tipik alım mekanizmalarını sergiledikleri için daha yüksek oral biyoyararlanım gösterirler [158].

Nanopartiküller (NP), boyutları 10 ila 1000 nm arasında değişen nano varlıklar olarak kabul edilmektedirler. Aslında, daha küçük boyutları nedeniyle, çok daha yüksek

özgül yüzey alanı sunarlar, çünkü bir parçacığın toplam yüzey alanı, çapıyla ters orantılıdır. Ayrıca, boyuttaki bu küçülme daha kolay bir yönetim sağlar. Nitekim, NP'ler parenteral uygulama için daha uygundur. Ek olarak, nanoyapıların farelerin mide-bağırsak dokusuna alım etkinliğinin, 1-10 µm aralığındaki partiküllerden 15-250 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, NP'ler, temel hücresel işlevleri kontrol eden varlıklarla aynı aralıkta boyutlara sahiptir [159-164]

Bir ilaç molekülünün belirli organ bölgelerine hedeflenen teslimi, farmasötik bilimlerdeki en zorlu araştırma alanlarından biridir. Lipozomlar, miseller ve nanopartiküller gibi koloidal dağıtım sistemleri geliştirerek, ilaç dağıtımını iyileştirmek için yeni sınırlar açıldı. Nanopartiküller, özel özellikleri küçük partikül boyutu, geniş yüzey alanı ve yüzey özelliklerini değiştirme kabiliyeti ile diğer dağıtım sistemlerine kıyasla çok sayıda avantaja sahiptir [165]. Nanopartiküller, aktif prensiplerin (ilaç veya biyolojik olarak aktif materyal) çözündüğü, tutulduğu ve/veya aktif prensibin adsorbe edildiği veya eklendiği 10 ila 1000 nm (1.0 µm) arasında değişen katı koloidal partiküllerdir [166]. Son yıllarda, küçük moleküler ağırlıklı ilaçların yanı sıra proteinler, peptitler veya genler gibi makromoleküllerin hücrelere ve dokulara verilmesi için uygun bir araç sunduğu ve bunları enzimatik bozulmaya karşı koruduğu için, ilaç dağıtımını için nanoteknoloji geliştirmek için önemli çabalar sarf edilmiştir [167]. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak avantajları biyolojik olarak parçalanabilmeleri, toksik olmamaları ve daha kararlı oldukları için daha uzun süre saklanabilmeleridir [166]. On yıldan beri katı lipid nanoparçacıklarının (KLN) lipid emülsiyonları, lipozomlar ve polimerik nanoparçacıklar gibi koloidal ilaç dağıtım sistemlerine alternatif ilaç dağıtım sistemi olarak kullanılması için denemeler yapılmaktadır. KLN, farklı koloidal taşıyıcıların avantajlarını birleştirir ve bazı dezavantajlarını da ortadan kaldırır. KLN, ilaçların biyoyararlanımını iyileştirmek için kullanılabilir, örn. siklosporin A [168] ve kamptotesin gibi lipofilik ilaçların sürekli salınımını elde etmek için [169].

2.10.1. Katı lipid nanopartiküller (KLN)

Katı lipid nanopartiküller (KLN), katı lipidlerden (yani oda sıcaklığında ve ayrıca vücut sıcaklığında katı olan lipidler) yapılmış ve yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edilmiş parçacıklardır. Tanım olarak, lipidler yüksek oranda saflaştırılmış trigliseritler, kompleks gliserid karışımları ve hatta mumlar olabilir. İlk çalışmalarda 1993 ve 1996 yıllarında yapılmış olup, KLN'nin farklı üretim yöntemlerini içermektedir. Parenteral uygulama ile ilgili olarak KLN'nin ana özellikleri, mükemmel fiziksel stabilite, dahil

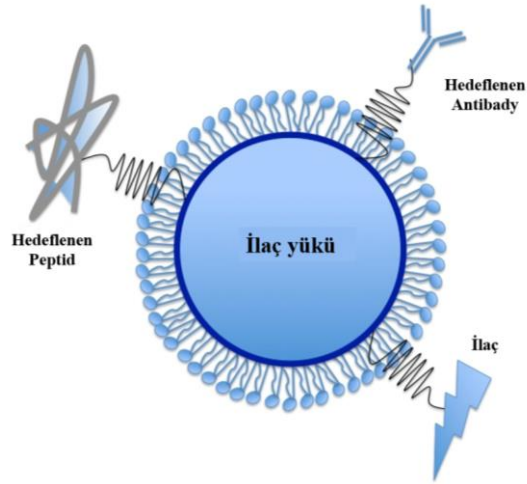
edilen kararsız ilaçların bozulmadan korunması, dahil etme modeline bağılı olarak kontrollü ilaç salınımı (hızlı veya sürekli), iyi tolere edilebilirlik ve bölgeye özgü hedeflemedir. Yetersiz yükleme kapasitesi, depolama sırasında polimorfik geçiş sonrası ilaç atılımı ve dispersiyonların nispeten yüksek su içeriğı (%70-99.9) gibi potansiyel dezavantajlar da gözlenmiştir. Geleneksel KLN'nin ilaç yükleme kapasitesi, ilacın lipid eriyik içindeki çözünürlüğü, lipid matrisinin yapısı ile sınırlıdır. Lipid matrisi özellikle benzer moleküllerden (yani tristearin veya tripalmitin) oluşuyorsa, birkaç kusuru olan mükemmel bir kristal oluşur. Dahil edilen ilaçlar yağ asidi zincirleri arasında, lipid katmanları arasında ve ayrıca kristal kusurlarında yer aldığından, yüksek düzeyde düzenli bir kristal kafes, büyük miktarlarda ilacı barındıramaz. Bu nedenle, daha yüksek ilaç yüklemesi için daha karmaşık lipidlerin (mono-, di-, trigliseritler, farklı zincir uzunlukları) kullanılması daha mantıklıdır. Yüksek derecede düzenli lipid parçacıklarına geçiş, aynı zamanda ilaç atılmasının nedenidir [170,171].

KLN'nin Avantajları;

- Akut ve kronik toksisite tehlikesini azaltan biyolojik olarak parçalanabilen fizyolojik lipidlerin kullanımı ve üretim yöntemlerinde organik çözücülerden kaçınılması [171],
- Suda az çözünür moleküllerin iyileştirilmiş biyoyararlanımı [172],
- İlaçların bölgeye özel teslimi, dermal uygulama yoluyla deriye geliştirilmiş ilaç penetrasyonu,
- Büyütme imkanı,
- Kimyasal olarak kararsız ajanların bağırsaktaki bozulmadan ve hassas moleküllerin dış ortamdan korunması,
- KLN'ler, lipozomlara kıyasla daha iyi stabiliteye sahip olmaları,
- Kararsız dahil edilmiş bileşiğin hapsedilmiş biyoaktif ve kimyasal üretiminin biyoyararlanımını arttırmaları,
- Yüksek konsantrasyonda fonksiyonel bileşik elde edilebilmesi,
- Liyofilizasyonun mümkün olmasıdır [173, 174].

KLN'nin Dezavantajları

- Zayıf ilaç yükleme kapasitesi,
- Depolama sırasında polimerik geçişten sonra ilaç atılması
- Dispersiyonların nispeten yüksek su içeriğı (%70-99.9) [173, 174]



Şekil 2.5. Katı bir lipid nanoparçacığının diyagramı (http-2)

2.10.2. Katı Lipid Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

2.10.2.1. Homojenizasyon yöntemi

Katı lipid nanoemülsiyonlarının üretimi için kullanılan bu yöntem oldukça güvenilirdir. Sıvıyı yüksek basınçla (100-2000 bar) birkaç mikron aralığındaki dar bir boşluktan iten yüksek basınçlı homojenleştirmeyi içerir. Akışkan, 1000 km/saatın üzerinde çok yüksek viskozitede çok kısa bir mesafeye hızlanır. Çok yüksek kesme gerilimi ve kavitasyon kuvvetleri parçacıkları mikron altı aralığına kadar bozar. Bu yöntem temelde iki genel yaklaşım ile yapılır bunlar, sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyondur.

- **Sıcak homojenizasyon** genellikle lipidin erime noktasının üzerindeki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. İlaç yüklü lipid eriyiğinin ve sulu emülsiyonlaştırıcı fazın (aynı sıcaklık) bir ön emülsiyonu, yüksek parçalama karıştırma cihazı ile elde edilir. Nihai ürün, sıcak emülsiyondur ve bu emülsiyonun soğutulması, lipidin kristalleşmesine ve KLN'lerin oluşumuna yol açar. Lipid fazının düşük viskozitesi nedeniyle daha yüksek işlem sıcaklıklarında daha küçük partikül boyutları elde edilir. Ancak yüksek sıcaklık, ilacın ve taşıyıcının bozunma hızına yol açar. Homojenizasyon sıcaklığının veya döngü sayısının artırılması, genellikle parçacıkların yüksek kinetik enerjisinden dolayı parçacık boyutunun artmasıyla sonuçlanır. Genellikle 500-1500 bar basınçta 3-5 homojenizasyon döngüsü kullanılır [170,175].

- **Soğuk homojenizasyon**, sıcaklığa bağlı bozunma problemlerinin, ilacın sulu faza kaybının ve sıcak homojenizasyon yöntemiyle ilişkili bölümlemenin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Nanoemülsiyonun kristalizasyon aşamasının karmaşıklığından dolayı lipidin öngörülemeyen polimerik geçişleri, birkaç modifikasyon ve/veya süper soğutulmuş eriyiklerle sonuçlanır. Burada ilaç erimiş lipide dahil edilir ve lipid eriyiği kuru buz veya sıvı nitrojen kullanılarak hızla soğutulur. Katı malzeme bir harç değirmeni tarafından öğütülür. Hazırlanan lipid mikropartikülleri daha sonra oda sıcaklığında veya altında soğuk bir emülgatör solüsyonunda dağıtılır. Homojenizasyon sırasında lipidin katı halini sağlamak için sıcaklık etkin bir şekilde düzenlenmelidir. Bununla birlikte, sıcak homojenleştirme ile karşılaştırıldığında, daha büyük parçacık boyutları ve daha geniş bir boyut dağılımı, soğuk homojenleştirme numunelerinin tipik özelliğidir [176].

2.10.2.2. Ultrasonikasyon yöntemi

Ultrasonikasyon veya yüksek hızlı homojenizasyon, KLN'lerin üretimi için başka bir yöntemdir. Bu yöntemin avantajı, kullanılan ekipmanın laboratuvar ölçeğinde yaygın olarak bulunmasıdır. Bununla birlikte, bu yöntem, mikrometre aralığına kadar değişen daha geniş boyut dağılımı gibi sorunlardan muzdariptir. Potansiyel metal kontaminasyonları, depolama üzerine partikül büyümesi gibi fiziksel kararsızlıklar bu teknikle ilişkili diğer dezavantajlardır [177]

2.10.2.3. Mikroemülsiyon yöntemi

Gasco ve arkadaşları (1997), mikroemülsiyonların seyreltmesine dayalı olarak KLN'ler geliştirdiler. Bunlar, tipik olarak stearik asit gibi düşük erime noktalı bir yağ asidi, bir emülgatör (örn. örneğin bütanol, sodyum monooktilfosfat) ve sudur. Sıcak mikroemülsiyon, karıştırma altında soğuk suda (2-3°C) dağıtılır [178]. Sıcak mikroemülsiyonun soğuk suya tipik hacim oranları 1:25 ila 1:50 aralığındadır. Seyreltme işlemi, mikroemülsiyonun bileşimi tarafından kritik bir şekilde belirlenir. KLN dispersiyonu, granülasyon işlemiyle tabletler ve peletler gibi katı ürünlere aktarmak için granülasyon sıvısı olarak kullanılabilir, ancak partikül içeriğinin düşük olması durumunda çok fazla suyun çıkarılması gerekir. Nanopartiküller sadece sulu faza (aseton) çok hızlı dağılan solventlerle üretilirken, daha büyük partikül boyutları daha lipofilik solventlerle elde edilebilmektedir [179].

2.10.2.4. Süperkritik akışkan teknolojisi

Bu yöntem KLN'lerin üretimi için uygulanan yeni bir tekniktir [180]. Bir akışkan, basıncı ve sıcaklığı ilgili kritik değerlerini aştığında süper kritik olarak adlandırılır. Sıvının bileşikleri çözme yeteneği artar. Bu teknoloji, süperkritik çözeltilerin (RESS) hızlı genişlemesi, gazla doymuş çözeltilerden (PGSS) parçacıklar, aerosol çözücü özütleme çözücüsü (ASES), emülsiyonların süper kritik sıvı özütlenmesi (SFEE) gibi nanoparçacık üretimi için çeşitli işlemlerden oluşur. Bu tekniğin avantajları, süspansiyonlar yerine kuru toz olarak elde edilen partiküller olan solventlerin kullanılmasından kaçınmayı içerir, hafif basınç ve sıcaklık koşulları gerektirir. Karbondioksit çözeltilisi, bu yöntem için bir çözücü olarak iyi bir seçimdir [181].

2.10.2.5. Çözücü emülsifikasyon-difüzyon yöntemi

KLN'ler ayrıca solvent emülsiyonlaştırma-difüzyon tekniği ile üretilir. Ortalama partikül boyutu, organik fazdaki lipid konsantrasyonuna ve kullanılan emülgatöre bağlıdır. Bu teknikle ortalama 30-100 nm çapında parçacıklar elde edilebilir. Bu tekniğin en önemli avantajı, hazırlama sırasında ısıdan kaçınmasıdır. Burada, lipid matrisi suyla karışmayan organik çözücü içinde çözülür, ardından sulu bir fazda emülsifikasyon yapılır. Çözücü, indirgenmiş basınç altında buharlaştırılarak lipidin sulu ortamda çökeltilmesiyle oluşturulan nanoparçacıkların dağılmasıyla sonuçlanır [182, 183].

2.10.2.6. Püskürtmeyle kurutma yöntemi

Sulu bir KLN dispersiyonunu bir ilaç ürününe dönüştürmek için liyofilizasyona alternatif bir tekniktir. Bu, liyofilizasyondan daha uygun maliyetli bir yöntemdir ve erime noktası $>70^{\circ}\text{C}$ olan lipidin kullanılmasıyla yapılabilir. Bu yöntem, yüksek sıcaklık kesme kuvvetleri ve partikülün kısmen erimesi nedeniyle partikül agregasyonuna neden olur. Freitas ve Mullera'ya (1998) göre en iyi sonuçlar, suda trehaloz çözeltilisinde %1'lik KLN konsantrasyonu veya etanol-su karışımlarında %10 trehaloz (10/90 v/v) ile elde edildi [184].

2.10.2.7. Solvent enjeksiyon yöntemi

Burada katı lipid, suyla karışabilen bir çözücü içinde çözülür. Lipid çözücü karışımı, sürfaktanlı veya sürfaktansız karıştırılan sulu faza enjekte edilir. Son olarak, dispersiyon fazla lipidi çıkarmak için süzülür. Sulu faz içindeki emülsiyon, enjeksiyon bölgesinde lipid damlacıkları üretmeye ve solvent difüzyonu tamamlanana kadar KLN'leri stabilize etmeye yardımcı olur [185]. Mishra vd., (2010), deri altı yoldan

aşılama için Hepatit B yüzey antijeninin verilmesi için Solvent enjeksiyon yöntemini kullanarak KLN'leri hazırlamış ve değerlendirmiştir [186].

2.10.3. Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Biyofiziksel özelliklerin biyolojik aktiviteyi, biyolojik dağılımı ve toksisiteyi etkilediği bilindiğinden, morfolojik özellikler gibi partikül özelliklerinin kantitatif analizi çok bilgilendirici olabilmektedir. Katmanlılık, boyut, şekil ve polidispersite gibi nanoparçacık özelliklerini değerlendirmek için sıklıkla çeşitli teknikler kullanılır [187]. Kalite kontrolü için katı lipid nanoparçacıklarının yeterli ve uygun karakterizasyonu gereklidir. Bununla birlikte, katı lipid nanopartiküllerinin karakterizasyonu, partiküllerin kolloidal boyutu ve dağıtım sisteminin karmaşıklığı ve dinamik doğası nedeniyle ciddi bir zorluktur. Lipid nanopartiküller için değerlendirilmesi gereken önemli parametreler şunlardır; partikül boyutu, boyut dağılım kinetiği (zeta potansiyeli), kristallik derecesi ve lipid modifikasyonu (polimorfizm), ek kolloidal yapıların (misel, lipozom, süper soğutulmuş eriyikler, ilaç nanopartikülleri) bir arada bulunması ve dağıtım süreçlerinin zaman ölçeği, ilaç içeriği (kapsülleme verimliliği ve yükleme kapasitesi), in vitro ilaç salımı ve yüzey morfolojisi. Parçacık boyutu ve boyut dağılımı, dinamik ışık saçılımı (DLS), statik ışık saçılımı (SLS), transmisyon elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu olarak da bilinen foton korelasyon spektroskopisi (PCS) kullanılarak incelenebilir. (AFM), taramalı tünelleme mikroskopisi (STM), donma kırılma elektron mikroskobu (FFEM) veya kriyoelektron mikroskobu (Cryo-EM). Bu mikroskopi teknikleri, nanoparçacıkların morfolojisini incelemek için de kullanılır. Görüntüleme teknikleri arasında AFM, nanoparçacıklar üzerinde boyut, şekil ve yüzey morfolojik bilgilerini elde etmek için yaygın olarak uygulanmaktadır. 0.01 nm'ye kadar yüzey detaylarını çözebilir ve numunenin kontrastlı ve üç boyutlu bir görüntüsünü üretebilir. X ışını kırınımı ve diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz, nanoparçacıklardaki kristal durum ve polimorfik değişiklikler hakkında bilgi verir. Konfokal lazer tarama mikroskobu (KLTM), nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimi hakkında bilgi verir. Nükleer manyetik rezonans (NMR), nanoparçacıkların hem boyutunu hem de niteliksel yapısını belirlemek için kullanılabilir. Kimyasal kaymanın sağladığı seçicilik, nanoparçacık içindeki bileşenlerin fizikokimyasal durumu hakkında bilgi sağlamak için moleküler hareketliliğe duyarlılığı tamamlar. Lipid nanoparçacıkları için önemli bir karakterizasyon tekniği, katı hal özelliklerinin belirlenmesidir. Bu, lipid nanoparçacıklarına veya lipid matrisine dahil

edilen ilacın fizikokimyasal özelliklerindeki olası değişiklikleri saptamak için çok önemlidir. Parçacıkların kristal ham maddelerden üretilmesine rağmen, emülgatörlerin mevcudiyeti, hazırlama yöntemi ve karşılaşılan yüksek basınç (örneğin HPH), dökme malzemelere kıyasla matris bileşenlerinin kristalliklerinde değişikliklere neden olabileceği kanıtlanmıştır. Bu, sıvı, amorf veya sadece kısmen kristalize metastabil sistemlere yol açabilir [188]. Polimorfik dönüşümler, aktif ve yardımcı maddelerde kimyasal ve fiziksel değişikliklere (örn. şekil, çözünürlük, erime noktası) neden olabilir. Lipid nanoparçacıklarının katı hal analizi genellikle: X-ray kırınımı, sıcak aşama mikroskopisi, Raman spektroskopisi ve Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi [189].



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. MCF-7 ve 4T1 hücreleri

American Type Culture Collection'dan (ATCC) MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı elde edilmiştir. American Type Culture Collection kodu HTB-22 olan MCF-7 hücreleri, ATCC'nin mevcut protokolü doğrultusunda çoğaltılarak -196°C'de sıvı azot tankında stoklanmıştır.

American Type Culture Collection'dan (ATCC) 4T1 fare meme kanseri hücre hattı alınmıştır. ATCC stok numarası CRL-2539 olan 4T1 hücreleri ATCC'nin protokolü göz önüne alınarak çoğaltılmış ve -196°C'de sıvı azot tankında stoklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Dimetil sülfoksit (DMSO),	Akt1 (B-1): sc-5298 (Santa Cruz),
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür)	GAPDH (6C5): sc-32233 (Santa Cruz),
Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)	Bcl-2 (C-2): sc-7382 (Santa Cruz),
Fetal Bovine Serum (FBS)	β -Actin (C4): sc-47778 (Santa Cruz),
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin)	PARP-1 (B-10): sc-74470 (Santa Cruz),
Trypsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Trypsin/EDTA)	Kryotüp
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma)	Selülöz membran diyaliz tüpü (Sigma-Aldrich)
Osmium tetroksit	Steril falkon tüpler (15 ve 50 mL) (TPP, İsviçre)
Glutaraldehit	Yuvarlak lamel (Biolab)

Tablo 3.1. (Devam) Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Propilen oksit	Steril tek kullanımlık filtreler (0,22 mikron çapında)
Uranil asetat	Bakır grid (EMS)
Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science)	Enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde),
96, 12 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP, İsviçre)	Pastör pipetler
25 ve 75 cm ² 'lik flask (TPP, İsviçre)	The Muse™ MitoPotential Kit (BD, Pharmingen, USA)
Cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde)	The Muse™ Cell Cycle Kit (BD, Pharmingen, USA)
The Muse™ Annexin V apoptosis detection kit (BD, Pharmingen, USA)	RT2 First Strand Kit; RT2 Profiler PCR Arrays (Qiagen)
Araldit	

3.2. Metod

3.2.1. Katı lipid nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu

3.2.1.1. Katı lipid nanopartikül sentezi

D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartikülleri (KLN) sentezlemek için sıcak homojenizasyon metodu uygulanmıştır. Katı lipid nanopartiküllerin elde edilmesi için %3 lipit (compritol), %5 D-e-MAPP ve %1 oranında Tween-80 maddeleri karıştırılarak kullanılmıştır. İlk olarak lipidin 80°C'de erimesi sağlanarak, D-e-MAPP ve sonrasında Tween-80 eklenerek ultraturaks ile 20.500 rpm'de 60 saniye karıştırılarak D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonuna ulaşılmıştır. Boş katı lipid nanopartiküllerin elde edilmesinde aynı yöntem kullanılmıştır fakat D-e-MAPP eklenmemiştir. Elde edilen karışımlar soğutulduktan sonra ve 0.25µm'lik filtrelerden geçirilip sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir [170, 190].

3.2.1.2. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü

Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılarak D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartikülün zeta potansiyel ve elektriksel

iletkenlik ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sırasında katı lipid nanopartiküller sodyumklorür ile iletkenliği $50\mu\text{S}$ 'ye ayarlanmıştır daha sonra distile suda seyreltilerek süspanse edildikten sonra küvete konularak cihaz okuma bölgesine yerleştirilmiştir. Ölçümler yapılırken cihazın sıcaklığı 25°C ve ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde düzenlenmiştir. Her ölçüm üç tekrar olacak şekilde yapılmış ve elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır [170, 191]

3.2.1.3. Katı lipid nanopartiküllerin morfolojik incelenmesi

Elde edilen katı lipid nanopartiküllerin yüzey morfolojisini incelemek amacıyla D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü KLN taramalı elektron mikroskobu kullanılarak (SEM) boyutlarının ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçüm sırasında D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü KLN'den birer damla alınarak karbon bant yapıştırılan örnek tutucu (Stub)'lara damlatılmıştır. Daha sonra desikatörde kuruması amacıyla bekletilmiştir. Örnekler kuruduktan sonra 1 dakika boyunca altın ile kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra SEM (Zeiss UltraPlus) örnek aparatına yerleştirilip morfolojik yapıları ve boyutları görüntülenmiştir [191].

3.2.2. MCF-7 ve 4T1 Hücrelerinin Çoğaltılması

MCF-7 ve 4T1 hücreleri stok halinde olduğu sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra hücre içeriği eritilip %10 serum (Fetal Bovine Serum/FBS) içeren RPMI-1640 besi yeri eklenen falkon tüp içerisine alınmıştır ve 1200 rpm' da 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler yeni besi yeri ortamındaki kültür flasklarına alınmıştır ve 37°C 'de, %5 CO_2 ve uygun nem standartlarına sahip etüvde inkübe edilmiştir. Bu yöntemle çoğalması sağlanan hücreler 7. pasajdan sonra deneylerde kullanıma hazır hale gelmiştir. Deneylerde kullanılan kanser hücrelerinin flask tabanını %85 oranında kaplamış olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.3. MTT sitotoksosite testi

İnsan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri MTT sitotoksosite testi için 96 kuyucuklu plakalara, her kuyuya 5×10^3 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. 96'lı plakalara ekilen hücreler 37°C 'de ve %5 karbondioksitli etüvde kuyulara yapışmaları için inkübasyona bırakılmıştır. Tez kapsamında kullanılan D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü KLN formülasyonu 3.125-100 μM konsantrasyon aralığında seri dilüsyon yapılarak 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara MTT boyası (5mg/mL) 20 μL olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra 37°C 'de 4 saat daha

inkübasyon süresi beklenmiştir. İnkübasyon sonucunda plakada bulunan her kuyucuk içerisindeki sıvı kısım boşaltılarak 200 µL DMSO ilave edilip ELx808-IU (Bio-Tek, USA) plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü KLN formülasyonu uygulanmayan hücreler kabul edilmiştir. Canlılık değerleri hesaplanırken her doz için kontrol grubuna göre hesaplama yapılmıştır. Uygulanan D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü katı lipid nano partiküllerin MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki IC₅₀ konsantrasyonu elde edilen canlılık değerleri kullanılarak GraphPad 8.0 programı ile hesaplanmıştır. Aynı işlem boş nano partiküller ile de tekrar edilmiştir [192].

3.2.4. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi ile belirlenmesi

D-e-MAPP, D-e-MAPP yüklü KLN formülasyonunun MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopi yöntemi ile incelenmiştir. Konfokal mikroskopta incelenmek üzere MCF-7 hücrelerinin hazırlık aşamasında ilk olarak kuyu başına 3x10⁵ hücre yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalarda inkübasyon yapılmış olan hücreler D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü KLN formülasyonunun IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat süresince bekletilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda besi yeri atılmış, hücreler PBS ile yıkanarak glutaraldehitte fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon sonrasında tekrar PBS ile yıkanan hücreler falloidin ve akridin oranj boyaları ile boyanmıştır. Boyama işlemi yapılan hücrelerde meydana gelen morfolojik farklılıklar konfokal mikroskopta (Leica TCS-SP5 II) Leica Confocal Software Version 2.00 yazılımı ile görüntüleme yapılmıştır [193].

3.2.5. Hücrelerdeki ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi

Geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü KLN formülasyonunun MCF-7 hücreleri üzerindeki ince yapısal değişiklikleri incelemek amacıyla 1x10⁶/mL hacmindeki MCF-7 hücreleri her grup için 3 tekrarlı şekilde flasklara ekilerek, 24 saat boyunca CO₂'li etüv içerisinde inkübe edilmiştir. MTT testi sonucunda elde edilen IC₅₀ konsantrasyonları MCF-7 ekilen flasklara uygulanarak 24 saat etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda MCF-7 hücreleri doku takibine alındıktan sonra 18 saat boyunca +4°C'de glutaraldehit içinde fiksasyon işlemi yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda tampon ile yıkanan hücrelere osmiyum tetraoksit ile ikincil fiksasyon uygulaması yapılmıştır. Daha sonra hücreler %50, %70,

%90, %96 ve absölüt etil alkol ile alkol serisinde dehidrasyon işlemi yapılmıştır. Dehidrasyonu yapılan hücreler propilen oksit ile şeffaflaştırılıp ve resine alıştırılmıştır. Daha sonra resin ile bloklanıp, 60°C’de etüvde 48 saat süresince polimerizasyonu yapılmıştır. Traşlanmaya hazır hale getirilen bloklardan 80-100 nm’lik ince kesitler halinde elde edilmiştir. Elde edilen kesitler bakır gridlere alınıp, kurşun sitrat ve uranil asetatla boyandıktan sonra TEM’de 120 KV’de (Biotwin FEI, USA) görüntüleri elde edilmiştir [194].

3.2.6. Akış sitometrisi yöntemi

3.2.6.1. Akış sitometrisinde aneksin V-FITC boyama tekniği ile apoptoz tayini

Flow sitometrisinde aneksin-V FITC deneyi için ilk olarak MCF-7 hücreleri 6 kuyucuklu plaklarda her kuyuda 5×10^5 hücre yoğunluğunda ekilmiştir ve 24 saat süresince, 37°C’de, %5 karbon dioksitli etüv içerisinde çoğaltılmıştır. 24 saatlik süre neticesinde MCF-7 hücreleri D-e-MAPP, D-e-MAPP yüklü KLN ve boş KLN formunun IC₅₀ değerleri ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda hücreler tripsinize edilerek kaldırılıp, 2 defa PBS ile santrifüjlenip yıkanması sağlanmıştır. Hücreler yıkandıktan sonra 1 mL içerisindeki sayısı hesaplanmıştır. Akış sitometri tüpüne 100 µL hücre örneği ve 100 µL aneksin eklenip oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika bekletildikten sonra hücre analiz cihazında (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) analiz edilmiştir.

3.2.6.2. Akış sitometrisinde hücre döngüsü etkilerinin araştırılması

Tez kapsamında kullanılan MCF-7 hücrelerine (5×10^5) D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartiküllerin IC₅₀ konsantrasyonları 24 saat boyunca uygulanmıştır. Uygulama yapılan MCF-7 hücreleri tüplerde ayrı ayrı toplandıktan sonra 1300 rpm’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantı atılmıştır. Tripsinli tampon solüsyonundan 250 µL her tüp üzerine ilave edilerek hafifçe karıştırılıp ortam sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda her tüpe RNaz tamponu 200µL eklenmiştir, ortam sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu yapılmıştır. Her tüpe 200µL PI boya solüsyonundan ilave edilerek karıştırılması sağlanıp ve +4°C karanlık ortamda ve buz üzerinde 10 dakika inkübasyon işlemi yapılmıştır. Hücre örnekleri akış sitometri (Muse™ Cell Analyzer (Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında okuma yapılmadan önce 50 µm lik filtreden geçirilmiştir ve analiz edilmiştir.

3.2.6.3. Akış sitometrisinde mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin incelenmesi

Mitokondri, hücresel enerji dengesini koruyan önemli bir organeldir. Mitokondri serbest radikallerin birincil üretim yeridir ve apoptoz gibi hücre ölüm süreçlerinin de kilit düzenleyicilerini içermektedir. Mitokondriyal membran potansiyel değişiklikleri apoptoz, nekroz ve kaspazdan bağımsız hücre ölüm süreçlerinde rol oynamaktadır. Mitokondri zar potansiyeli ölçme deneyi Muse™ MitoPotential Kit prosedürüne göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır;

Çalışılan yöntemle göre MitoPotential Boyası 1:1000'i 1X Test Tamponu ile seyreltilerek Muse™ MitoPotential çalışma solüsyonunu hazırlanmıştır. Muse™ MitoPotential solüsyonu ile inkübasyon için tüm deney gruplarına ait hücreler tripsin ile kaldırılıp santrifüjlenip ve besiyeri ile süspanse edildikten sonra deneye hazır hale gelmiştir. Hücre örneğinden alınan 100 µL süspanسیون üzerine 95 µL Muse™ MitoPotential çalışma solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra 20 dk 37°C de inkübasyon edilmiştir. İnkübasyondan sonra Muse™ 7-AAD solüsyonundan 5 µL eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilen hücre örnekleri karıştırarak Muse™ Cell Analyzer cihazında mitokondriyal membran potansiyeli analiz programında analiz edilmiştir.

3.2.7. İn vitro etkin madde salımı

Tez çalışması boyunca deneylerde kullanılan seramidaz inhibitörü D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun in vitro şartlarda salım deneyi diyaliz membran yöntemi ile yapılmıştır. Kullanılan moleküller diyaliz membranlarına (Dialysis tubing cellulose membrane, avg. flat width 10 mm (0.4 in.), MWCO: 14000 Da, Sigma-Aldrich, USA) yerleştirilmiş ve pH 5.5 çözünme ortamına konulmuştur. Örnekler su banyosuna yerleştirilmiş ve ortam sıcaklığı 37°C'de sabit tutulmuştur. Deney boyunca ölçüm yapmak için belirli zaman sürelerinde 2 mL örnek alınmıştır. ELISA okuyucuda (HTX Synergy, BioTek, USA) alınan örnekler belirlenen dalga boyunda analiz edilmiştir. Ölçümlere başlamadan önce kullanılan D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun dalga boyunu tespit etmek için spektrofotometrede 100-900 nm dalga boyunda geniş bir aralıkta okuma yapılarak bu maddelerin dalga boyları tespit edilmiştir. Daha sonra hesaplamaları yapabilmek için $y=mx+n$ ve R^2 değerini verecek olan doğru grafiği elde edilmiştir. Bu grafiği bulmak için başlangıç konsatrasyonundan başlayarak yarıya seyreltme yoluyla her seyreltmede ölçüm alınarak denklem elde edilerek grafik oluşturulmuştur. Deney için pH 5.5 tampon çözeltisi hazırlanmıştır ve kullanılacak olan

membran 1 gece önceden %70'lik alkolde bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra 18 cm boyutunda membran kesilerek alt kısmında bağlanmış ve sızdırmaz hale geldiğinden emin olunduktan sonra içine 2 ml deney çözeltisinden eklenmiştir ve ağzı kapatılmıştır. Hazırlanan membran pH:5.5 olan tampon içerisine konularak +37°C'lik su banyosuna alınmıştır. İlk olarak 0.saat ölçümü spektrofotometre cihazında yapılmıştır. Daha sonra belirli aralıklarla tampondan örnek alınarak ölçüm yapılmıştır. Ölçüm için alınan miktar tekrar ilave edilerek tampon miktarı sabit tutulmuştur. Daha sonra okunan absorbans değerleri $y=mx+n$ formülünde x yerine konur ve her ölçüm saati için salınım miktarı bulunur [195].

3.2.8. Real Time RT-PCR, gen ekspresyonu analizi

3.2.8.1. RNA izolasyonu basamağı

RNA isolation NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) kiti ile yapılmıştır. Şu basamakları içerir; ilk olarak D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun IC₅₀ değerleri uygulanan MCF-7 hücreleri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler flask ortamından 5×10^6 yoğunlukta olacak şekilde toplanmış santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet kısımları ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler buz üzerinde yapılmıştır. Hücre liziz basamağı bu işlemde kitin içinden çıkan RA1 solüsyonundan 3500 µl üzerine 35 µl Betamerkapto etanol eklenir ve bu karışımdan her örneğin pelleti üzerine 350 µl eklenmiştir. Bu işlemde pellet jel kıvamına gelene kadar pipetaj yapılmıştır. Daha sonra 11.000 g de 1dk +4°C'de santrifüj işlemi yapılır santrifüj sonunda üst kısımda ki tüp atılmıştır. Her tüpe 350 µl %70 lik etanol eklenmiş ve örnekler kitin içinden çıkan mavi renkli tüplere aktarılır. Sonra 30 sn 11.000 g de santrifüj işlemi yapılır ve bu basamaktan sonra hep alttaki sıvı kısmı atılır üstte kalan tüple devam edilmiştir. Her tüpe 350µl kitin içinden çıkan MDB solüsyonundan eklenir ve 1 dk 11.000 g de santrifüj işlemi yapılmıştır. Her tüpe 95µl rDNase eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra attaki sıvı atılır her örnek üzerine RAW2 solüsyonundan 200µl eklenir 30 sn 11.000 g de santrifüj işlemi yapılmıştır. Sonra attaki sıvı atılır her örnek üzerine RAW3 solüsyonundan 600 µl eklenir 30 sn 11.000 g de santrifüj işlemi yapılmıştır ve işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Son basamakta her örneğe 45 µl RNase-free dH₂O eklenir ve 11.000 g de 5dk santrifüj işlemi yapılmıştır. En sonunda altta kalan sıvı RNA olarak elde edilmiştir. Elde edilen RNA'lar agaroz jelde kontrol edilerek örnekler etiketlenip RNA -80°C kaldırılır.

3.2.8.2. cDNA'ya Çevirme basamağı

Bu aşamada High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™) Kit kullanılmıştır. Deney süreci boyunca buz üzerinde çalışılmıştır. İlk olarak elde edilen RNA'lar agaroz jelde kontrol edilmiştir. Daha sonra kitin prosedürüne göre aşağıdaki 1 ve 2 numaralı karışımlar hazırlanmıştır.

1. 5µl RNA

2µl Buffer GE

3µl Nucleas-Free Water

Toplam 10µl olacak ve tüpte baloncuk olmayacak ve tüpler 42 °C'de 8 dk bekletilir.

2. 4µl 5x Buffer BC3

1µl Control P2

2µl Reverse Mix Enzim

3µl Nucleas-Free Water

Toplam 10µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Daha sonra 1 ve 2 de hazırlanan karışım birleştirilmiş ve 37°C'de 60 dk 95°C'de 5 dk olacak şekilde döngü hazırlanarak PCR cihazında RNA'lar cDNA dönüştürülmüştür. PCR dan sonra her örnek üzerine 91ul dH₂O eklenerek -20 °C kaldırılmıştır.

3.2.8.3. RT2 Profiler PCR Array ile Apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Hücrelerden izole edilen RNA'lar ters transkripsiyon ile cDNA'ya çevrilmiş ve cDNA'lar Real-Time PCR için kalıp olarak kullanılmıştır. RT² Profiler PCR Array (96-Well Format and 384-Well [4 x 96] Format, QIAGEN) kiti kullanılarak Real-time PCR gerçekleştirilmiştir.

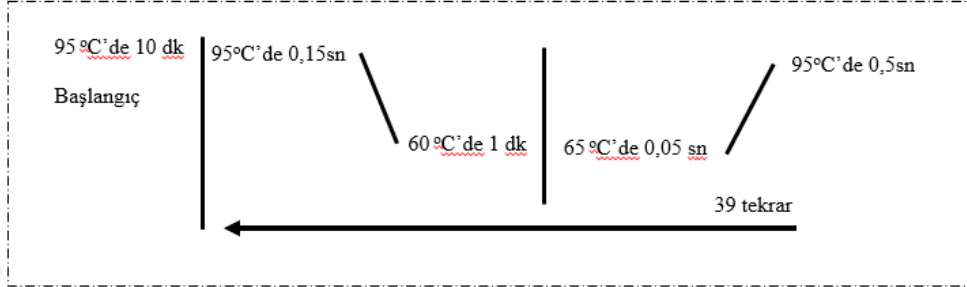
Real-time PCR için;

Tablo 3.2. PCR mix karışımı

2X RT² SYBR Green Mix	1350 µl
cDNA	102 µl
Nucleas-Free Water	1248 µl
Toplam	2700 µl

Toplam hacim kuyu başına 21 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı 96'lık well plakaya yerleştirilmiştir. 96'lık well plaka üzeri seal ile kapatılmıştır. Daha sonra plate cihaza yerleştirilerek aşağıdaki protokole göre reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra cihazda export menüsünden veriler pc ye kaydedilmiştir.

Tablo 3.3. Real Time PCR döngü aşamaları.



3.2.9. Hücre hatlarında invazyonun belirlenmesi

D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun MCF-7 hücreleri üzerindeki invazyon analizleri Corning Transwell plateler (Corning) kullanılarak yapılmıştır. Transwell chamberların membranı 75 µl, matrijel (2 mg/ml, Sigma) ile kaplanarak ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. RPMI (%10 FBS) büyüme ortamında büyütülen MCF-7 hücreleri tripsin ile toplandıktan sonra, FBS içermeyen RPMI içerisinde 1×10^6 /ml hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Matrijel ile kaplı transwell chamber sisteminin üst kısmına (chamber) her hücre hattı için 200 µl hücre süspansiyonu, alt kısmına (chamber) ise 600 µl %10 FBS içeren RPMI büyüme ortamı eklenmiştir. Kontrol grubu için üst kısma sadece 200 µl hücre süspansiyonu alt kısma ise 600 µl %10 FBS içeren RPMI büyüme ortamı eklenerek her hücre hattı için bir kontrol sistemi hazırlanmıştır. Transwell chamber sistemleri 24 saat karbondioksit inkübatöründe (37°C, %5 CO₂) inkübe edilmiştir. Daha sonra chamber'in üst kısmında invazyon olmayan hücreler ve matrijel bir pamuk kürdan yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Membranın alt kısmında invazyon yapan hücreler PBS ile yıkanıp %4'lük paraformaldehid ile fikse edilmiştir. Daha sonra giemsa ile 1 dakika boyanmıştır. Mikroskop altında invazyon yapan hücrelerin sayısını bulmak için membran üzerinde 8 farklı alan (200x) sayılmış ve invazyon oranı hesaplanmıştır [196].

3.2.10. Soft ağar koloni deneyi

Koloni formasyon deneyi için 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen MCF-7 hücreleri D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun uygulanmasının ardından 15 gün boyunca %5 CO₂ içeren nemli 37°C'de inkübe edilmiştir. Her 3 günde bir besiyeri

değiştirilmiş ve mikroskop altında incelenmiştir. Her bir koloninin minimum 50 hücreye ulaşması ve birbirlerine yakın temasta bulunmamaları göz önünde bulundurularak deney 15. gününde durdurulmuştur. Hücrelerin bulunduğu ortamdaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Akabinde kristal violet ile oda sıcaklığında inkübe edilerek hücrelerin boyanması sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra kuyucuklar distile su ile dikkatli bir şekilde yıkanıp koloniler mikroskop altında sayılmıştır. Minimum 50 hücreden oluşan gruplar koloni olarak kabul edilmiştir [197].

3.2.11. Yara iyileşmesi (Scratch testi)

MCF-7 hücrelerinin göçü, bir yara iyileşme yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntemde %10 FBS içeren RPMI içindeki MCF-7 hücreleri (1×10^6 hücre/ mL), altı kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna ekilmiş ve 37°C ve %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. MCF-7 hücreleri kuyucukta tam tabaka oluşturduktan sonra, D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formu uygulanmıştır. Daha sonra steril bir pipet ucu ile yatay olarak her bir kuyucukta bir çizik oluşturulmuştur. Hücresel artıklar, PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sonrasında yara oluşturulan kısım, mikroskopta incelenerek 0. saat olarak görüntüsü kaydedilmiştir. Oluşturulan yaranın 6., 12. ve 24. saat değişimleri ışık mikroskopunda incelenerek görüntülenmiştir [198]

3.2.12. Western Blotlama

Protein izolasyonu süresince buz kalıpları üzerinde çalışmıştır. Tamamen yüzeyi kaplamış olan hücrelerden oluşan flasklar ilk önce 10 ml soğuk 1X-DPBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Sonra DPBS uzaklaştırılmış ve her flaska 500 µl RIPA buffer + 1 µl (1mM) PMSF inhibitörü eklenmiştir. Sonra flaskın içindeki tüm hücreler tamamen kazıma işlemi yapılarak alınmış ve bir ependörfe aktarılmıştır. Daha sonra ependorf yaklaşık 1 dk vortex yapıldıktan sonra buz içinde 5 dk bekletilmiştir ve bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. Vortex işleminden sonra ependorflar 14.000 RPM'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sona süpernatant bir ependorfa alınmış ve proteinler elde edilmiştir. Deney anından kullanımı kolay olması için elde edilen tüm proteinleri 100er ml olacak şekilde alikotlar halinde bölerek -80°C saklanmıştır. Elde edilen proteinlerin tayin işlemi Bradford Reagent kitine göre yapılmıştır.

Western blot için 2 adet %12,5'luk SDS jel kullanılmıştır. Jellere örnekler yüklenmeden önce üzerlerine yürütme tamponu eklenip 120V 15 dk yürütme işlemi

yapılmıştır. Tüm örnekler laemmli buffer eklenerek 95°C de 10 dk denetüre edildikten sonra 2 jele de eşit miktarda yüklenmiştir. SDS jel üzerine yürütme tamponu eklenerek örnekler önce 70V da 10 dk ardından 100-120 V arasında jel bitene kadar yürütülmüştür. Daha sonra jellerden bir tanesi kontrol amaçlı olarak coomassie brilliant blue ile 10 dk boyanmış ve destaining buffer ile yıkanmıştır. Bu işlem western blot öncesi kontrol amaçlı yapılmıştır. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi için Semi-dry yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde Jelin yürütmesinin bitmesine 10 dk kalak blotlama kağıtları transfer buffer içine alınıp ıslatılmıştır. PVDF membran önce metanolde (%100'lük) 5 dk sonra transfer bufferde 5 dk ıslatılmıştır. Daha sonra Jel yürütme işlemi bittikten sonra saf su içine alınmıştır. Sonra en altta 3 adet blot kağıdı onların üstünde PVDF membran onunda üstünde Jel en üstte de 3 adet blot kâğıdı olacak şekilde sıralama yapılmış ve blotlama cihazında ve 60 dk 100V da blotlama işlemi yapılmıştır. Transfer işlemi sonrasında PVDF membran ponceau S boyası ile boyanmış ve transferin sağlıklı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Transfer işleminin ardından PVDF membran %5 lik süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır. Bloklamadan sonra PVDF membran primer antikör olan His-tag antikörüne konmuş ve 14-16 saat +40C de rototorda inkübe edilmiştir. Daha sonra membran TBS-T bufferla 10 ar dakika 3 set yıkanmış ve sekonder antikora konulmuştur. Burada da oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra tekrar membran TBS-T bufferla 10 ar dakika 3 set yıkanmıştır. Son olarak membran TBS ile 1 kez yıkanmış ve görüntüleme için ECL ile 2 dk karanlıkta muamele edilip görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. İn-vivo Hayvan Deneyi

Bu çalışmada, 20-25 gram 6-8 haftalık 50 adet BALB/C ırkı dişi fareler kullanılmıştır. Deney öncesinde hayvanlar, standart pelet yem ve musluk suyu ile beslenerek, kontrollü laboratuvar şartlarında muhafaza edilmişlerdir. Rastgele seçilmiş olan hayvanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen hayvanlar, deney süresince 12;12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2 C°) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneye başlanmadan önce hayvanların ortam koşullarına adaptasyonu sağlanması için 1 hafta beklenmiştir. Bu adaptasyon süreci boyunca tüm fareler polikarbonat şeffaf kafeslerde standart yem ve çeşme suyu ile beslenmiştir [199-201]. Daha sonra hayvanlar gruplara ayrılmıştır;

Gruplar:

1. Grup: D-e-MAPP Grubu (100 mg/kg intraperitoneal)
2. Grup: D-e-MAPP KLN Grubu (100 mg/kg intraperitoneal)
3. Grup: Boş KLN Grubu (100 mg/kg intraperitoneal)
4. Negatif Kontrol Grubu (DMSO verilen)
5. Grup: Pozitif Kontrol Grubu (Serum Fizyolojik verilen) [202,203]

3.2.13.1. Meme kanseri oluşturma

Kanser oluşturma: Her fareye 1×10^6 4T1 meme kanseri hücresi 100 μ l içerisinde 4. meme çifti yağ dokusundan verilmiştir. Yaklaşık 9. Gün sonunda tümör çapı 100 mm³ olduğu zaman deneye başlanmıştır [204-206].

Tümör çapı ölçümü: Kumpas haftada 2 kez ile ölçüm yapılmıştır. $(axb^2)/2$ formülü kullanılacaktır. a: uzunluk b: genişlik. Tümör çapı 200 mm³ geçtiği zaman servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir [204-206].

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Histolojik çalışmalar için doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisine alınmıştır. Western blot için dokudan örnek alınıp protein izolasyonu yapılmıştır [204-206].

3.2.13.2. Histolojik Çalışmalar

Örneklerinin Parafin Takibi ve Kesit Alma

Bu aşamanın basamakları şöyledir;

- Doku Tesbiti,
- %10 formaldehid (nötral-tamponlanmış),
- Doku Takibi
- Doku Gömme (Bloklama)
- Doku Kesimi (Mikrotom Cihazı)
- Deparaffinize İşlemi (Cihaz_Manuel)
- Boyama Tekniği (Biopsi) (Hematoxilen Eozin)
- Monte Etme (Kapama İşlemi) aşamalarıdır.

Doku Gömme (Bloklama); Bu aşamada amaç farelerden alınan dokuların mikrotom cihazının blok tutucu yuvasında kesit alınabilecek hale getirilmesidir. Bunun

için ilk olarak metal gömme kalıbına parafin döküldükten sonra dokular bir pens yardımıyla kalıba yerleştirilmiştir. Kalıplar soğuk odaya alınmıştır. Kalıp içindeki dokuların tabana eşit olarak yapışmaları sağlanmıştır. Daha sonra blok kaseti konduktan sonra kasetin deliklerini geçinceye kadar parafin ilave edilmiştir.

Doku Kesimi (Mikrotom Cihazı); Blok kaseti Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına takılmıştır. Doku bütünlüğüne ulaşabilmek için dokunun ön yüzü tıraşlanmıştır. Alınan kesitlerin kalınlığı 5 mikrom kalınlığında olmuştur. Bir fırça yardımıyla su banyosuna kesitler alındıktan sonra suda açılan kesitler lama aktarılmıştır.

Son olarak lamdaki doku üzerine entellan damlatılmıştır. Lam lamel ile kapatılmış ve daimi preparat haline getirilmiştir.

3.2.13.3. Hematoksilen-Eosin Boyama Yöntemi:

Deney gruplarından alınan doku kesitleri 60°C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra 15 dakika ksilolde bekletilerek parafinden arındırılmaları sağlanmıştır. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %90, %70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen’de 2 dakika boyanmış ve 4 dakika boyunca akar suda yıkanmıştır. Daha sonra %1 Amonyak-Su karışımına batırılıp tekrar 2 dakika akar suda yıkandıktan sonra lamlar 2 dakika Eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 4 dakika ksilolde bekletilip entellan ile kapatılmıştır.

3.2.13.4. İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemi

Elde edilen dokulardan 3µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 15 dakika ksilolde bekletilerek deparafinizasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirilen lamlar Rehydrate (%100, %96, %80, %70) edilmiştir. Ortamdaki alkolü uzaklaştırmak amacıyla iki kez 1’er dakika distile su ile muamele edilmiştir. Antigen maskesini kaldırmak için 1/50 dilue EnVision FLEX Target Retrieval Solution High Ph (GV804 Dako) PT Modülü (A80400012 LabVision) uygulanmıştır. IHC Boyama cihazında rack yuvalarına lamlar coverplate ile birlikte takılmıştır. PBS ile 7 dakika yıkama yapılmış ve 10 dakika %3’lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile etkin bırakılan dokular endojenperoksidaz aktivitesi bloke olması sağlanmıştır. PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika Protein Bloke edilmiştir. (TA-125-PBQ ThermoScientific). Antibodyler ile inkube edildikten sonra PBS ile 5 dakika

yıkama yapılmıştır. AmplifierQuanto (TL-125-QPB ThermoScientific) ile 20 dakika bekletilmiştir. HRP PolymerQuanto (TL-125-QPH ThermoScientific) 30 dakika bekletilmiştir. Her aşamada PBS ile yıkama yapılmıştır. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB Chromogen (TA-125-HAThermoScientific) ile boyama yapılmıştır. Zemin boyaması için 1 dakika süreyle Hematoksilen (HHS32Sigma) uygulanmıştır. Distile su ile 4 dakika yıkandıktan sonra lamalar alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96, %100), 4 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılmıştır.

3.2.13.5. Histolojik skorlama-H-SCORE

Kesitlerdeki immün pozitif boyanmalar ışık mikroskobu altında 200X büyütmede iki kişi tarafından değerlendirilmiştir. Boyanma yoğunluklarına göre;

- 0 (boyanma yok),
- 1 + (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma),
- 2 ++ (orta şiddetli boyanma)
- 3 +++ (yoğun boyanma)

Değerleri verilerek aşağıdaki formülde hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

H-SCORE=3 x Yoğun boyanan hücre yüzdesi + 2 x Orta şiddette boyanan hücre yüzdesi + 1 x Zayıf şiddette boyanan hücre yüzdesi + 0 x Boyanmayan hücre yüzdesi. (Diğer bir ifadeyle H-SCORE = $\sum \cdot P_i (i + 1)$, i=yoğunluk skoru, P_i =ilgili hücre yüzdesi). Elde edilen skorların ortalaması alınmış ve istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir [207, 208].

3.2.13.6. Doku Örneklerinin Geçirimli Elektron Mikroskopik (TEM) Takibi

Dokularda Geçirimli Elektron Mikroskopik görüntüleme için şu basamaklar gerçekleştirilir;

1. Fiksatif Hazırlama: İlk olarak fiksatif hazırlanmıştır bunun için Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 karıştırılarak, tampon solüsyonu hazırlanmıştır. İncelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler tespit içerisinde 6-24 saat arasında +4 °C’de fikse edilmiştir.
2. Yıkama: Hücrelerden fiksatif uzaklaştırmak amacıyla hücreler tampon çözeltisi ile 3 defa 15 dakika boyunca yıkanmıştır.
3. İkinci Tespit (Osmium Tetraoksit): Bu aşamada yıkanmış hücreler %1’lik OSO_4 içerisine alındıktan rotatorda 2 saat süreyle döndürülmüştür. Hücrelerin fikse

edilmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda tampon ile 3 defa 15 dakika boyunca yıkanmıştır.

4. Dehidratasyon: Etil alkol ile muamele edilmiştir.
5. Şeffaflandırma: Bu basamakta Propilenoksitte 2 kez 30 dakika boyunca tutulmuştur daha sonra Resin+ propilenoksit (1/1) karışımında 2 saat süreyle rotatorda döndürülmüştür.
6. Bloklama: Taze olarak hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapılmıştır. 48 saat boyunca 60 °C’de polimerizasyon işlemi yapılmıştır.
7. Resin Solüsyonunun Hazırlanması: Araldit CY212 20 ml, DDSA 20ml, BDMA 0,6 ml, Dibütilfitalat 1 ml kimyasalları karıştırılarak hazırlanmıştır.
8. Kesitlerin Boyanması: Uranil asetat boyası hazırlanmıştır
9. Kurşun Sitrat Boyasının Hazırlanması: Kurşun Sitrat boyası hazırlanmıştır;

A karışımı ve B karışımı hazırlanmıştır; B karışımı üzerine 0,5ml A karışımı eklenip, kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır. (ph 12-13 arasında olmalıdır). Temiz bir şişeye alındıktan sonra karanlıkta ve +4°C’ de saklanmıştır. Boyanan kesitler geçirimli elektron mikroskopunda incelenip, fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.13.7. Doku Örneklerinin Konfokal Mikroskopik Analizi

Elde edilen dokular 37 °C’de 24 saat süresince bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda PBS ile yıkanan dokular, 15 dakika boyunca oda sıcaklığında %2 gluteraldehid ile fikse edilmiştir. Fikse edilen dokular PBS ile yıkandıktan sonra phalloidin ve akridin oranji ile boyanmıştır. Doku üzerindeki yapısal değişiklikler Leica TCS- SP5 II konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiş ve software (Leica Confocal Software Version 2.00) kullanılmıştır.

3.2.14. İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında yapılan deneylerden elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde belirtilmiştir. GraphPad 8.3 programı kullanılarak verilerin anlamlılıkları ve grafikleri elde edilmiştir. Deney gruplarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılırken kontrol gruplarında elde edilen verilere göre hesaplamalar yapılmıştır. RT-PCR için sonuçlar $\Delta\Delta CT$ metodu ile bilgisayar programında tek yönlü varyans analizi kullanılarak belirlenmiştir. Web tabanlı Qiagen firmasının “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan, analizler kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

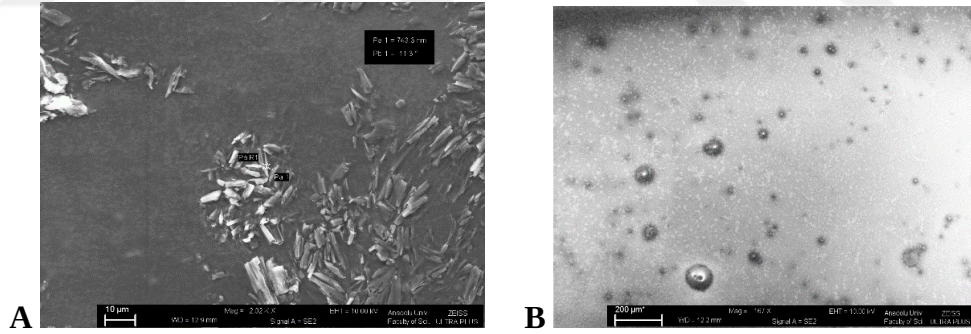
4. BULGULAR

4.1. Katı Lipid Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyon Bulguları

Tez kapsamında sentezlenen D-e-MAPP katı lipid nanoformülasyonun karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve mevcut literatürde yer almakta olan katı lipid nanopartikül formların özelliklerine sahip olduğu ve başarılı bir şekilde sentezlendiği ortaya konulmuştur. Nanopartiküllerin karakterizasyonu ile ilgili elde edilen veriler Tablo 4.1’de, morfolojik özellikleri de Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. D-e-MAPP ve sentezlenen katı lipid nanopartikül formunun partikül boyutu ve polidispers indeks özellikleri.

Formülasyon	Partikül Boyutu [Ortalama (SD)] (n=3) (nm)	Polidispers indeks (PI) [Ortalama (SD)] (n=3)
D-e-MAPP	876,2	0,701
D-e-MAPP- Nanopartikül Formu	14,85	0,432



Şekil 4.1. Yeni sentezlenen A) D-e-MAPP ve B) D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartiküllerin morfolojik yapısı.

Tez çalışmamda elde ettiğimiz karakterizasyon sonuçlarından yola çıkıldığında D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartiküllerin stabil, yuvarlak şekilli, D-e-MAPP molekülünün karakterizasyonuna göre yaklaşık 62 kat daha küçük boyutlu partiküller olduğu bununla birlikte katı lipid nanopartikül formülasyon özelliklerini taşıdıkları ortaya konulmaktadır.

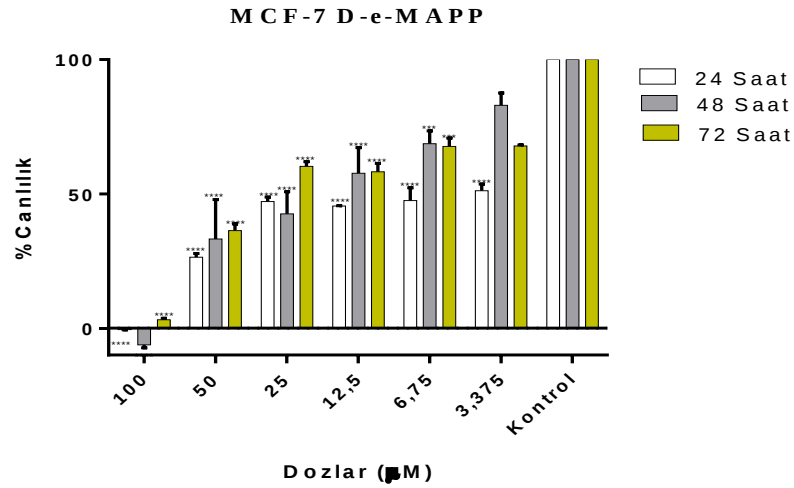
4.2. MTT Kolorimetrik Testi ile D-e-MAPP ve D-e-MAPP yüklü katı lipid nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin bulguları

Bu tez çalışmasının ilk amacı olan katı lipid nano partikül sentezini gerçekleştirdikten sonra elde ettiğimiz nano partiküllerin ve D-erythro-MAPP maddesinin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini tespit etmek için MTT sitotoksikite testi gerçekleştirilmiştir. Tez araştırmamız doğrultusunda MTT sitotoksikite testi ile kullandığımız hücreler üzerindeki büyümeyi baskılayıcı konsantrasyonlar IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

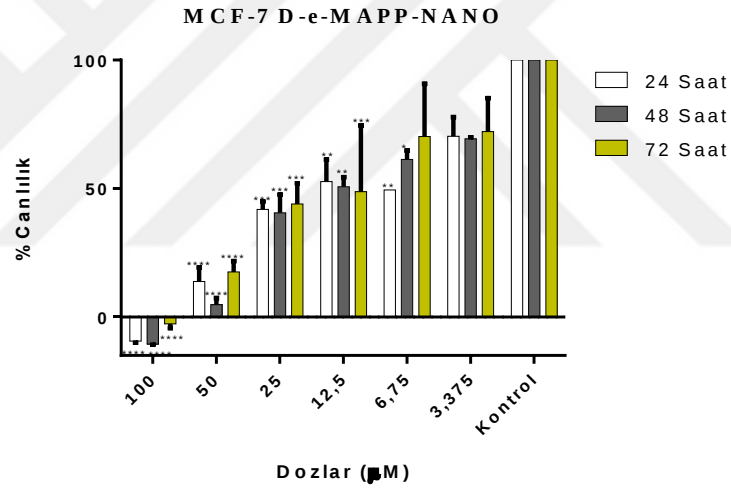
Tablo 4.2. Meme kanseri hücreleri üzerindeki D-erythro-MAPP ve KLN-D-e-MAPP uygulaması ile gerçekleştirilen MTT testi sonucundaki IC_{50} değerleri.

Uygulama süresi	D-e-MAPP IC_{50} Değeri	D-e-MAPP- KLN IC_{50} Değeri
24 saat	4,48 μ M	15,65 μ M
48 saat	18,84 μ M	13,98 μ M
72 saat	35,73 μ M	12,18 μ M

D-e-MAPP ve nanopartikül formunun meme kanseri hücrelerine uygulanması sonrasında kanser hücrelerinin canlılığının doza bağlı olarak düştüğünü gözlemlenmiştir. Hücrelere uygulanan madde konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir. D-e-MAPP ve nanopartikül formülasyonunun 24 saat süreyle uygulandığı MCF-7 hücrelerinin MTT testi sonucunda elde edilen absorbanslardan hesaplanan canlılık değerlerinin oluşturduğu inhibisyon grafiği Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. D-e-MAPP'ın MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık inhibisyon grafiği ve canlılık yüzdeleri. IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,4 µM, 18,8 µM ve 35,7 µM olduğu belirlenmiştir. (****<0.00001, ***<0.0001)

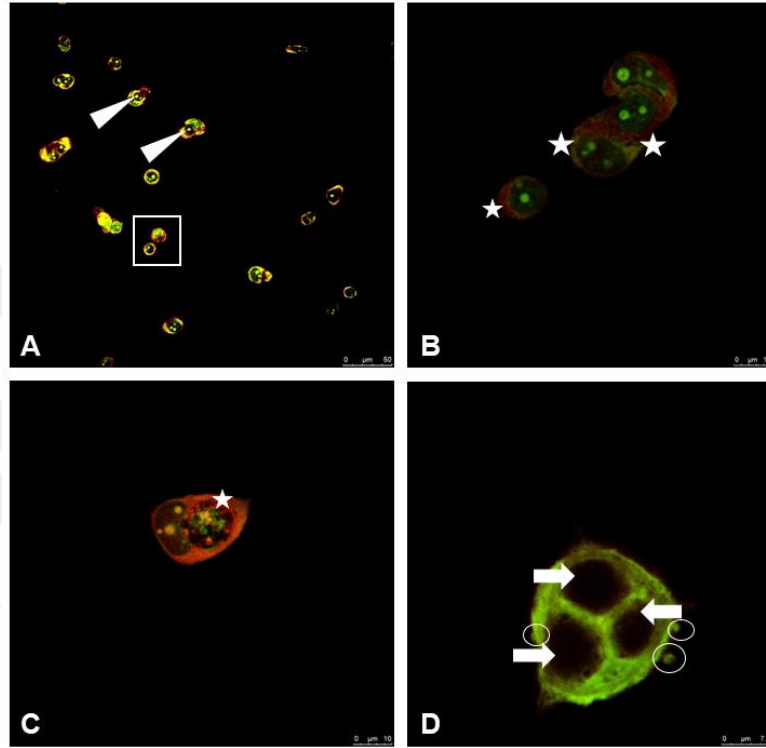


Şekil 4.3. D-e-MAPP-nanopartikül formunun MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık inhibisyon grafiği ve canlılık yüzdeleri. IC₅₀ değerleri sırasıyla 15,6 µM, 13,9 µM ve 12,1 µM olduğu belirlenmiştir (****<0.000)

MCF-7 hücreleri üzerine uygulanan D-e-MAPP'ın 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,4 µM, 18,8 µM ve 35,7 µM olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda D-e-MAPP-nanopartikül formunun MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık IC₅₀ değerleri sırasıyla 15,6 µM, 13,9 µM ve 12,1 µM olduğu belirlenmiştir.

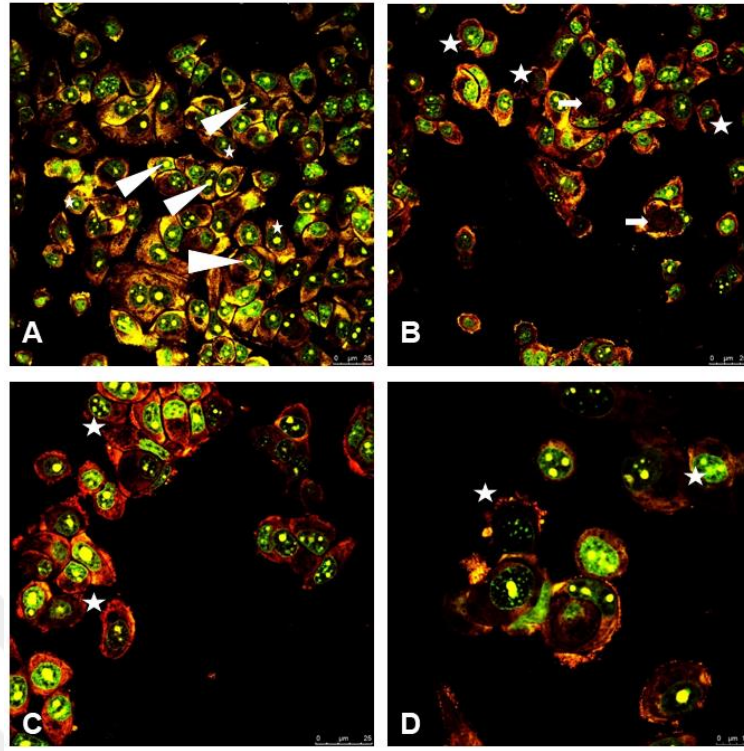
4.3. D-e-MAPP ve Nano Partikül Formülasyonunun MCF-7 Hücrelerindeki Morfolojik Değişikliklerin Konfokal Mikroskopi Bulguları

Konfokal mikroskopide akridin oranj ve falloidin ile ikili boyama sonucunda D-e-MAPP'ın MCF-7 hücrelerinin morfolojik yapısında meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. D-e-MAPP uygulanmış MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskobik görüntüleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP uygulaması ile gerçekleştirilen konfokal mikroskopi görüntüleri. A) MCF-7 kontrol grubu hücreleri; Ok-başı: çekirdek, Dikdörtgen: normal hücre yapısı. B), C) ve D) 24 saat boyunca D-e-MAPP IC₅₀ konsantrasyonu uygulanmış olan MCF-7 hücreleri; Yıldız: Hücre iskeletinde delik oluşumu ve parçalanma Ok: İçi boşalmış hücreler, Daire: Membran tomurcuklanması.

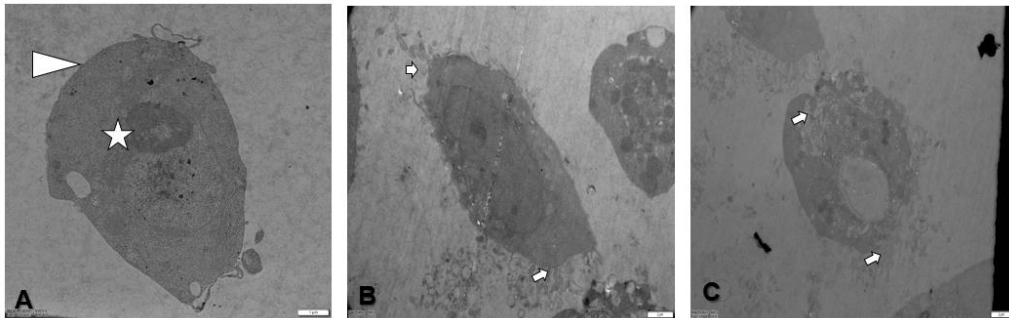
Konfokal mikroskopide akridin oranj ve falloidin ile ikili boyama sonucunda D-e-MAPP Nanopartikül formunun MCF-7 hücrelerinin morfolojik yapısında meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. D-e-MAPP uygulanmış Nanopartikül formunun MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskobik görüntüleri Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP Nanopartikül formunun uygulaması ile gerçekleştirilen konfokal mikroskopi görüntüleri. A) MCF-7 kontrol grubu hücreleri; Ok-başı: çekirdek, Yıldız: normal hücre yapısı. B), C) ve D) 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül partikül formunun IC_{50} konsantrasyonu uygulanmış olan MCF-7 hücreleri; Yıldız: Hücre iskeletinde delik oluşumu ve parçalanma Ok: İçi boşalmış hücreler.

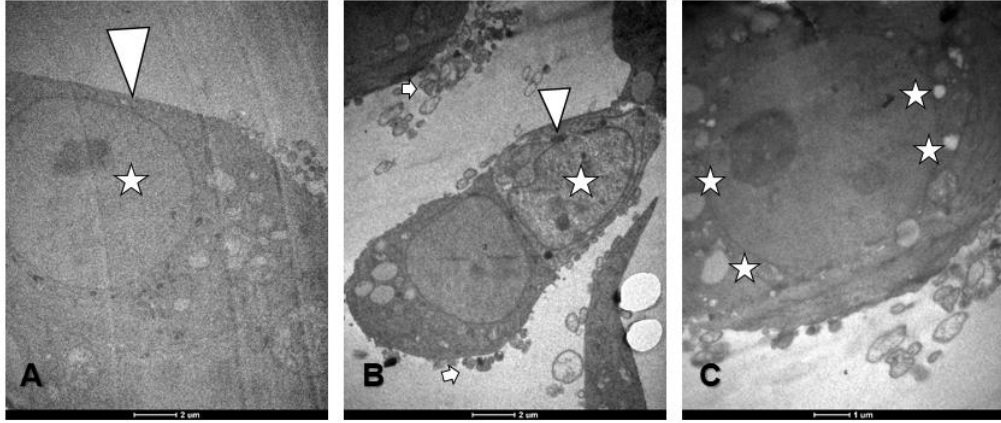
4.4. D-e-MAPP ve Nano Partikül Formülasyonunun MCF-7 Hücrelerindeki İnce Yapısal Değişikliklerin TEM Mikroskopi Bulguları

MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP katı lipid nanopartiküllerinin MTT testi sonucunda elde edilen IC_{50} değeri 24 saat boyunca uygulanmış ve MCF-7 hücrelerinin ince yapısında meydana gelebilecek olan değişikliklerin, organel ve çekirdek yapısındaki değişiklikler ile birlikte geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) tespit edilmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.6. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin TEM görüntüleri. A) MCF-7 Kontrol hücreleri; Ok: normal hücre membranı, Yıldız: normal hücre

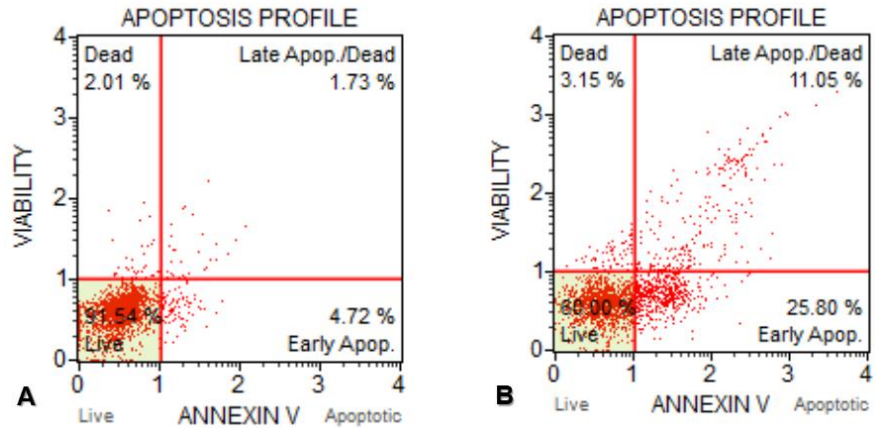
iskeleti, B) ve C) D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri; Ok: normal hücre membranı, Yıldız: normal hücre iskeleti, B) ve C) D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, OK: membran tomurcuklanmaları.



Şekil 4.7. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin TEM görüntüleri. A) MCF-7 Kontrol hücreleri; Ok: normal hücre membranı, Yıldız: normal hücre iskeleti, B) ve C) D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, OK: membran tomurcuklanmaları, Yıldız: Hücre iskeletinde delikler, Ok-başı: kromatin yoğunlaşması.

4.5. Akış Sitometrisi Bulguları

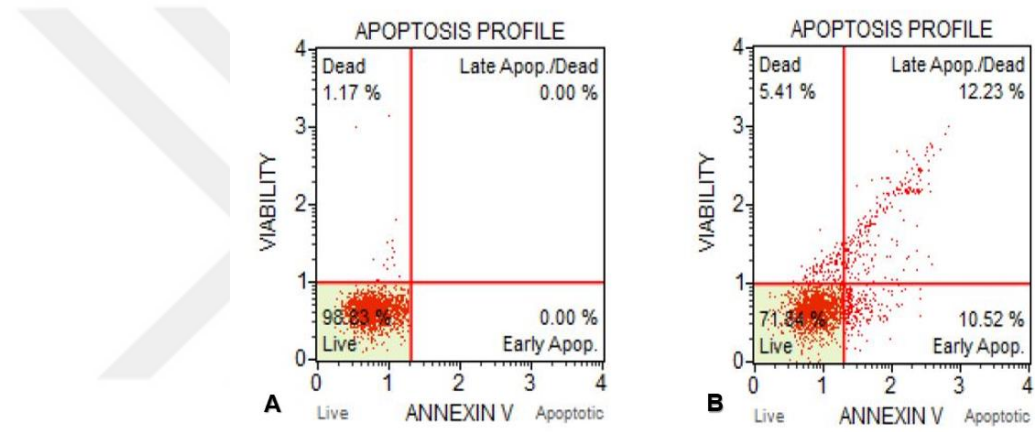
4.5.1. D-e-MAPP ve Nano Partikül Formülasyonunun MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Ektisinin Akış Sitometrisinde Anneksin V-FITC Boyama Tekniği ile Apoptoz Tayini Bulguları



Şekil 4.8. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları. (A) MCF-7 kontrol hücrelerinin %91,54 oranında canlı olduğu, hücrelerin %2,01'inin ise öldüğü tespit edilmiştir. Bu grupta erken apoptotik oran %4,72 iken geç apoptotik oranın %1,73 olduğu tespit edilmiştir. (B) 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin anneksin V aktivitesinin akış sitometrik test sonuçları. Bu grupta ölü hücrelerin %3,15 olduğu tespit edilmiştir, yine hücrelerin erken apoptotik oran %25,80 iken geç apoptotik oranın %11,05 olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. 24 saat boyunca D-e-MAPP formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları.

	Canlı hücreler (%)	Erken Apoptotik (%)	Geç Apoptotik (%)	Ölü Hücreler (%)
MCF-7	91,54	4,72	1,73	2,01
Kontrol				
D-e-MAPP	60	25,80	11,05	3,15

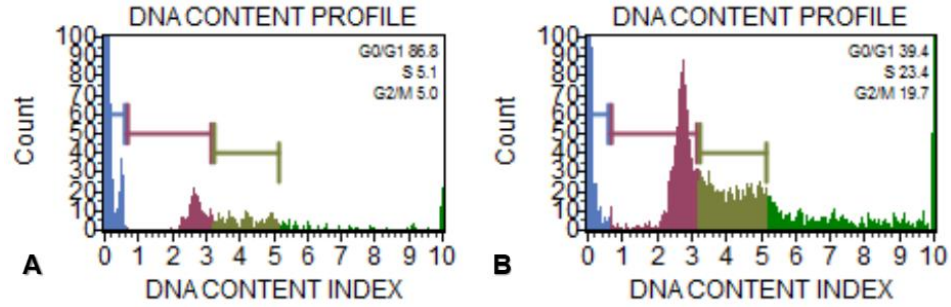


Şekil 4.9. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları. (A) MCF-7 kontrol hücrelerinin % 98,83 oranında canlı olduğu, hücrelerin % 1,17'sinin ise öldüğü tespit edilmiştir. Bu grupta erken apoptotik oran ve geç apoptotik oranın %0,00 olduğu tespit edilmiştir. (B) 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin anneksin V aktivitesinin akış sitometrik test sonuçları. Bu grupta ölü hücrelerin %5,41 olduğu tespit edilmiştir, yine hücrelerin erken apoptotik oran %10,52 iken geç apoptotik oranın %12,23 olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde Annexin-V test sonuçları.

	Canlı hücreler (%)	Erken Apoptotik (%)	Geç Apoptotik (%)	Ölü Hücreler (%)
MCF-7 Kontrol	98,83	0,00	0,00	1,17
D-e-MAPP	71,84	10,52	12,23	5,41
Nanopartikül				

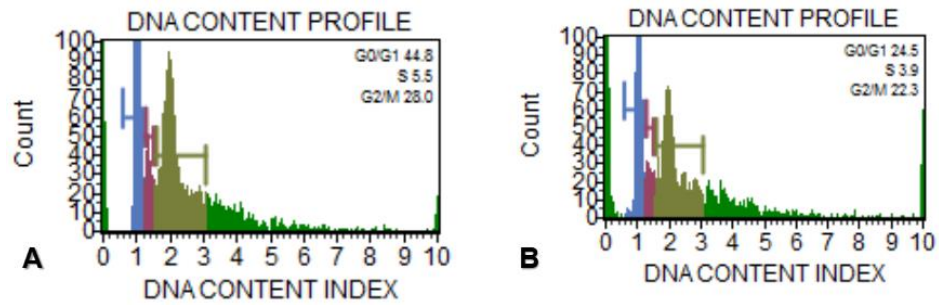
4.5.2. D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül Formülasyonunun Akış Sitometrisinde Hücre Döngüsü Etkilerinin Bulguları



Şekil 4.10. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı. A) Kontrol hücreleri B) D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, Mavi renk debris, yeşil renk S fazını, açık yeşil renk G2 / M fazını ve kırmızı renk G0 / G1 fazını göstermektedir.

Tablo 4.5.24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde hücre döngüsü dağılımı sonuçları.

	G0 / G1 (%)	G2 / M (%)	S (%)
MCF-7 Kontrol	86,8	5,0	5,1
D-e-MAPP	39,4	19,7	23,4

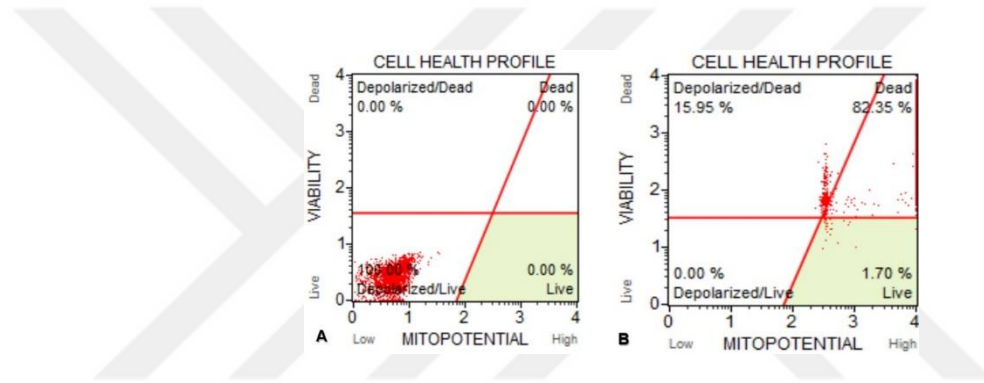


Şekil 4.11. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı. A) Kontrol hücreleri B) D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, Mavi renk debris, yeşil renk S fazını, açık yeşil renk G2 / M fazını ve kırmızı renk G0 / G1 fazını göstermektedir.

Tablo 4.6. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde hücre döngüsü dağılımı sonuçları.

	G0/G1 (%)	G2 / M (%)	S (%)
MCF-7 Kontrol	44,8	28,0	5,5
D-e-MAPP Nanopartikül	24,5	22,3	3,9

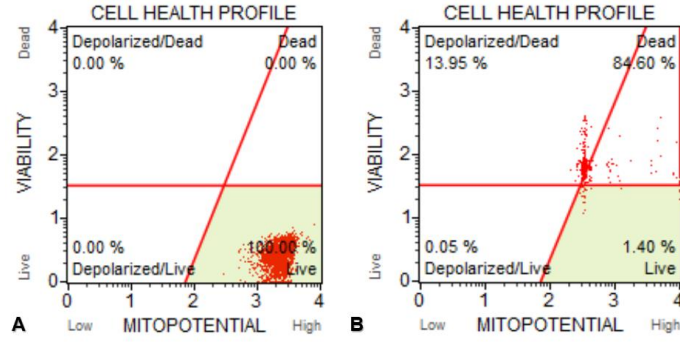
4.5.3. D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül Formülasyonunun Akış Sitometrisinde Mitokondri Zar Potansiyeli Değişikliklerinin Bulguları



Şekil 4.12. 24 saat boyunca D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları. A) Kontrol hücreleri, canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir. B) D-e-MAPP'ın IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, ölü hücrelerin oranı %82,35 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.7. 24 saat boyunca D-e-MAPP formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları.

	Depolariz /Canlı Hücreler (%)	Canlı Hücreler (%)	Depolarize /Ölü Hücreler (%)	Ölü Hücreler (%)
MCF-7 Kontrol	100,00	0,00	0,00	0,00
D-e MAPP	0,00	1,70	15,95	82,35



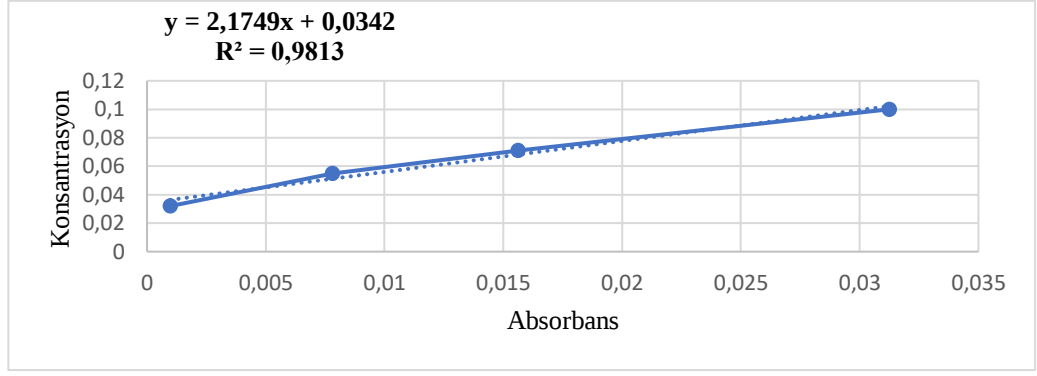
Şekil 4.13. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları. A) Kontrol hücreleri, canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir. B) D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücreleri, ölü hücrelerin oranı %84,60 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC_{50} konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçları.

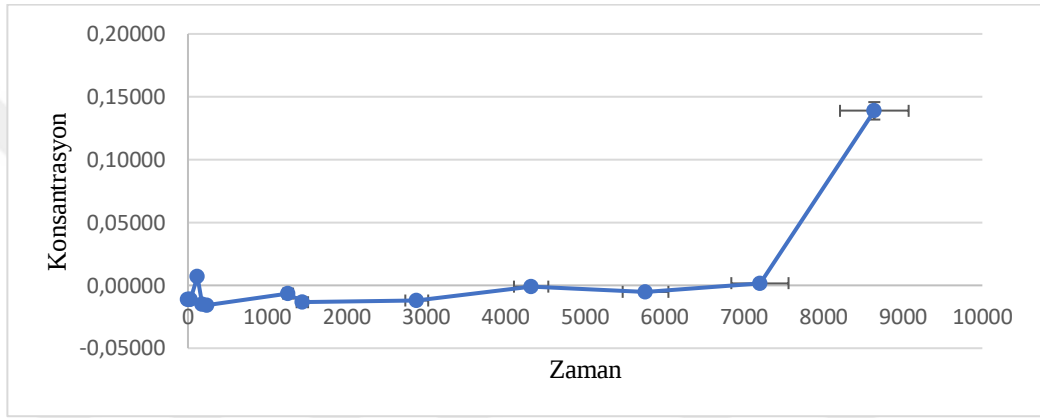
	Depolarize/Canlı Hücreler (%)	Canlı Hücreler (%)	Depolarize/Ölü Hücreler (%)	Ölü Hücreler (%)
MCF-7	0,00	100,00	0,00	0,00
Kontrol				
D-e-MAPP	0,05	1,40	13,95	84,60
Nanopartikül				

4.6. İn Vitro Etkin Madde Salımı Bulguları

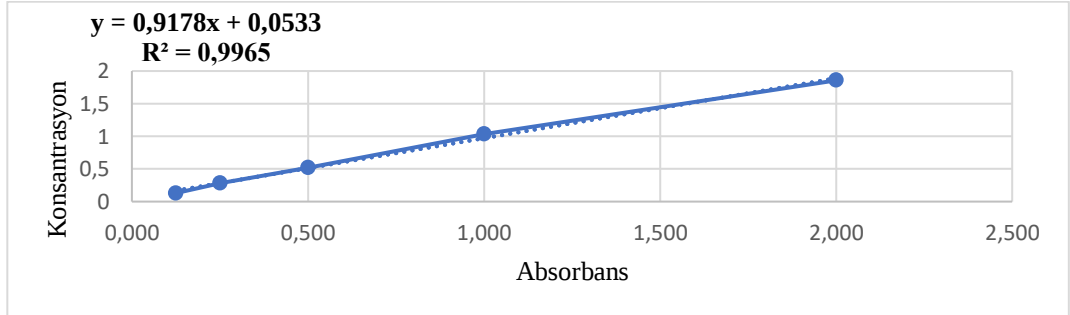
Tez kapsamında kullanılan seramidaz inhibitörü molekül ve onun katı lipid nanopartikül formunun ilaç salım deneyi sonucuna göre D-e-MAPP'ın %50'si ilk 120 dakika içerisinde salmıştır. Devamında düzenli ve standart bir salım devam etmiş ve salım profilinde belirgin bir fark görülmemiştir. 24. Saate bakıldığında ilaç salımının %68 olduğu görülürken, 144 saat sonunda ilaç salımının %99'a ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 20-21). D-e-MAPP Nanopartikül formunun ise, ilk 15 dakika içerisinde %51'sinin salındığı, sonrasında salım hızı azaldığı 4. saat sonunda tekrar salınım yaptıktan sonra 24. saate ve 96. saatlerde salınım yaparak düzenli bir salım profili göstermekle birlikte 24. saatte % 91'e çıktığı ve 96. saatte %97,62'ye ulaştığı görülmüştür. Bu sonuçlar bize kullanılan nanopartikül yöntemi ile istenilen ilaç etken maddesinin kontrollü salınımının yapılabilmesine olanak sağlamaktadır (Şekil 4.15 ve Şekil 4.17).



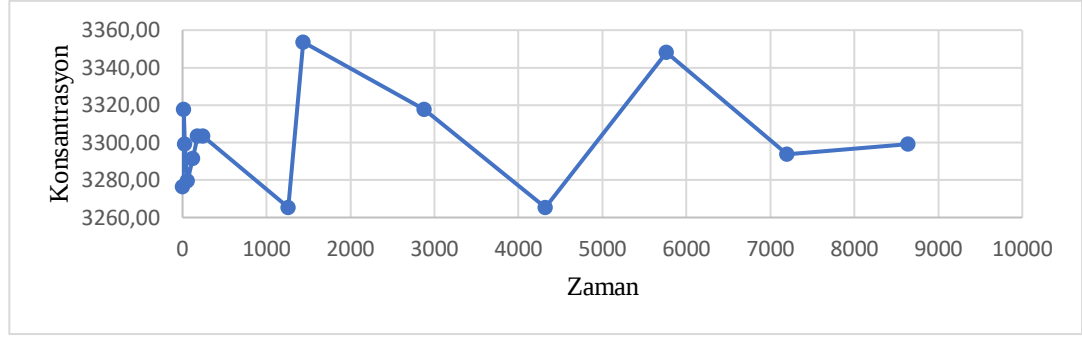
Şekil 4.14 D-e-MAPP'ın in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı absorbans grafiği. D-e-MAPP'ın in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı absorbans grafiği



Şekil 4.15. D-e-MAPP'ın in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı zaman grafiği.



Şekil 4.16. D-e-MAPP Nanopartikülün in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı absorbans grafiği.



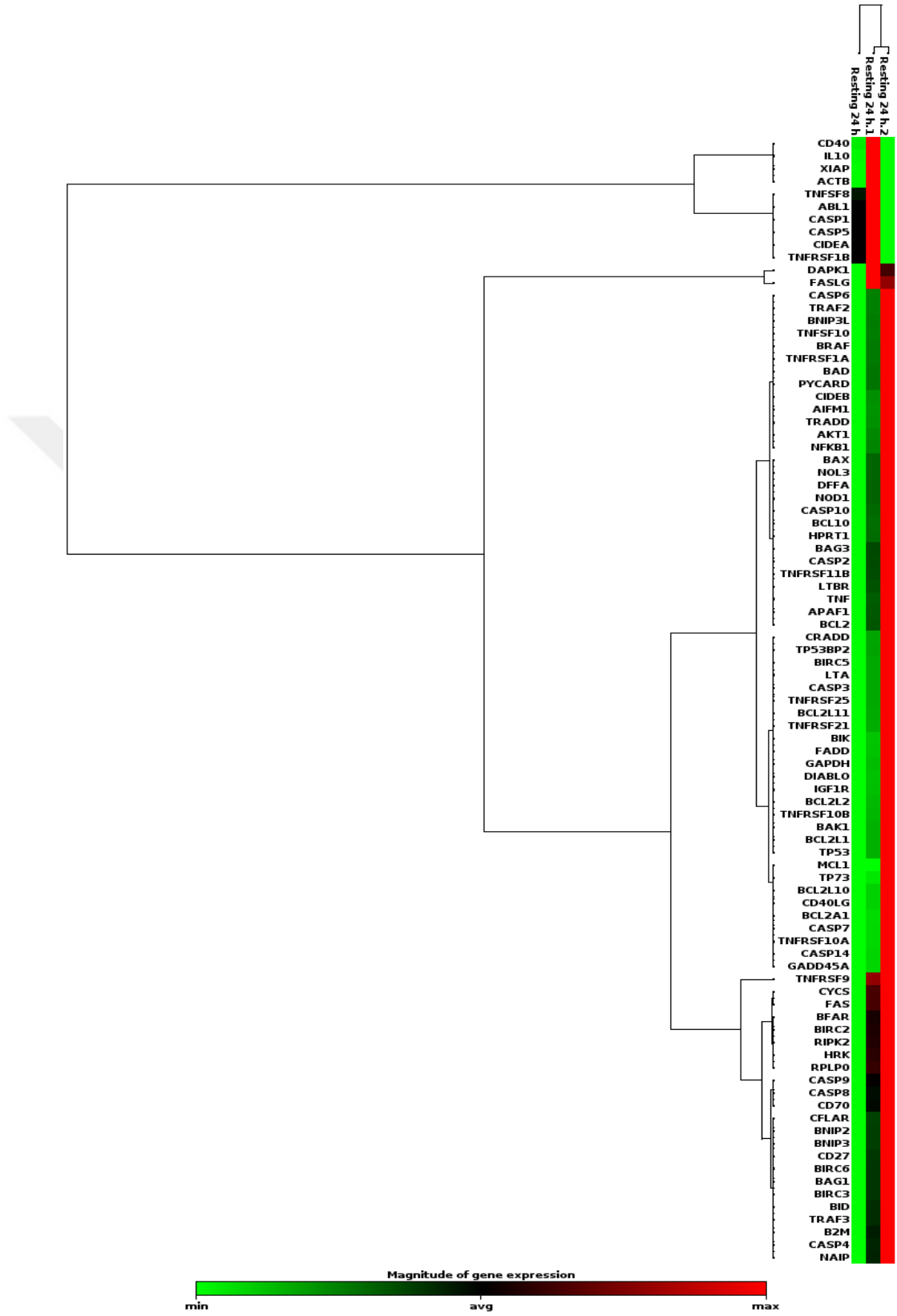
Şekil 4.17. D-e-MAPP Nanopartikülün in-vitro ilaç salım deneyi konsantrasyona bağlı zaman grafiği.

4.7. Real Time RT² Profiler PCR Array Gen Ekspresyonu Bulguları

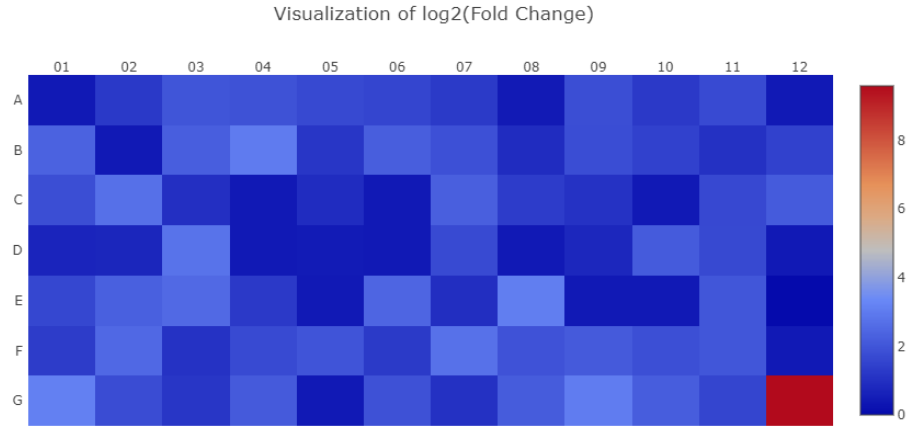
RT-PCR (Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu); hücrelerden izole edilen RNA'nın Revers transkriptaz enzimi sayesinde komplementer cDNA dönüştürülmesi sonucunda, gen ekspresyon seviyelerinin ölçülebildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle sayesinde az miktarda RNA ile oluşan mesajlar tespit edilebilir ve ekspresyon miktarı tespit edilebilir. Oluşan RT-PCR ürünleri klonlama da vektör olarak kullanılabildiği gibi, bu ürünlerden cDNA kütüphaneleri oluşturulabilir ayrıca bunlar daha sonra gen kütüphaneleri olarak değerlendirilir. Tez kapsamında meme kanseri hücrelerine uygulanan D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül Formülasyonunun bu hücreler üzerindeki tetiklenebilecek olan hücre ölüm yollarının belirlenebilmesi için hedeflenen programlanmış hücre yollarından apoptoz ile ilgili 84 adet genin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Bu işlem için ilk olarak D-e-MAPP ve D-e-MAPP katı lipid nanopartiküllerin uygulandığı MCF-7 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen RNA'lar cDNA çevrilmiştir. Daha sonra RT² Profiler PCR Array yöntemi ile toplam 96 gen ve bunlardan 12 si kontrol olmak üzere 84 adet genin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Tablo 4.9. *RT² Profiler PCR Array yönteminde kullanılan housekeeping/referans genlerinin analiz sonucu elde edilen verilerinin aritmetik ortalama değerleri.*

Referans Genleri (Housekeeping)	Deney Grupları			Aritmetik Ortalamalar
	MCF-7 Kontrol	D-e-MAPP	D-e-MAPP Nanopartikül	
B2M (Beta-2-mikroglobulin)	23,04	21,78	19,94	21,58
GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz)	26,19	22,32	18,47	22,32
HPRT1 (Hipoksantin fosforibosiltransferaz 1)	25,25	24,07	21,71	23,67
RPLP0 (Ribozomal protein, büyük, P0)	17,55	16,49	15,02	16,35



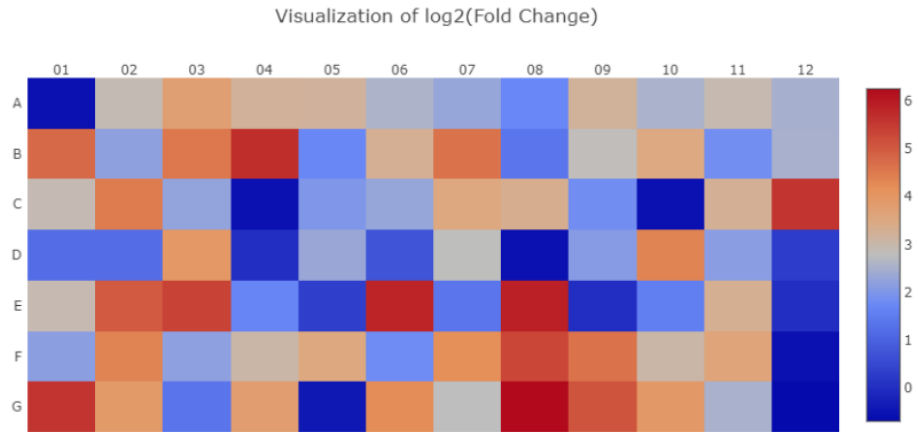
Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulaması sonucu RT^2 Profiler PCR Array sonuçları küme diyagramı. (Renk doygunluğu, numunelerde gen ekspresyonundaki farklılıkları temsil etmektedir).



Şekil 4.19. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP uygulaması sonucu RT² Profiler PCR Array sonuçları sıcaklık haritası.

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1 1.32 C	AIFM1 2.36	AKT1 3.91	APAF1 3.73 A	BAD 3.17	BAG1 2.95	BAG3 2.40	BAK1 1.34	BAX 3.48	BCL10 2.38	BCL2 3.24	BCL2A1 1.32 C
B	BCL2L1 5.04 A	BCL2L10 1.32 C	BCL2L11 4.69 A	BCL2L2 7.94 A	BFAR 2.23	BID 4.63	BIK 3.63	BIRC2 1.88	BIRC3 3.40	BIRC5 2.75	BIRC6 2.03	BNIP2 2.75
C	BNIP3 3.46	BNIP3L 6.51	BRAF 1.98	CASP1 1.32 C	CASP10 1.86	CASP14 1.32 C	CASP2 4.76	CASP3 2.51 A	CASP4 2.09	CASP5 1.32 C	CASP6 3.13	CASP7 4.40 A
D	CASP8 1.62	CASP9 1.66	CD27 6.81	CD40 1.32 C	CD40LG 1.36	CD70 1.32 C	CFLAR 3.22	CIDEA 1.32 C	CIDEB 1.71	CRADD 4.39	CYC5 3.15 A	DAPK1 1.32 C
E	DFFA 3.04	DIABLO 4.79	FADD 5.74 A	FAS 2.38	FASLG 1.32 C	GADD45A 5.32	HRK 1.93	IGF1R 8.31	IL10 1.32 C	ITA 1.32 C	ITBR 4.01	MCL1 1.00
F	NAIP 2.49	NFKB1 5.62 A	NOD1 2.09	NOL3 3.21	PYCARD 3.88	RIPK2 2.40	TNF 6.59	TNFRSF10A 3.77	TNFRSF10B 4.32 A	TNFRSF11B 3.56	TNFRSF1A 4.00	TNFRSF1B 1.32 C
G	TNFRSF21 8.65 A	TNFRSF25 3.36	TNFRSF9 2.22	TNFSF10 4.31	TNFSF8 1.32 C	TP53 3.69	TP53BP2 2.04	TP73 4.49	TRADD 8.13	TRAF2 4.60	TRAF3 2.97	XIAP 766.30 A

Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP uygulaması sonucu RT² Profiler PCR Array sonuçları kat değişimleri.



Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP KLN uygulaması sonucu RT² Profiler PCR Array sonuçları sıcaklık haritası.

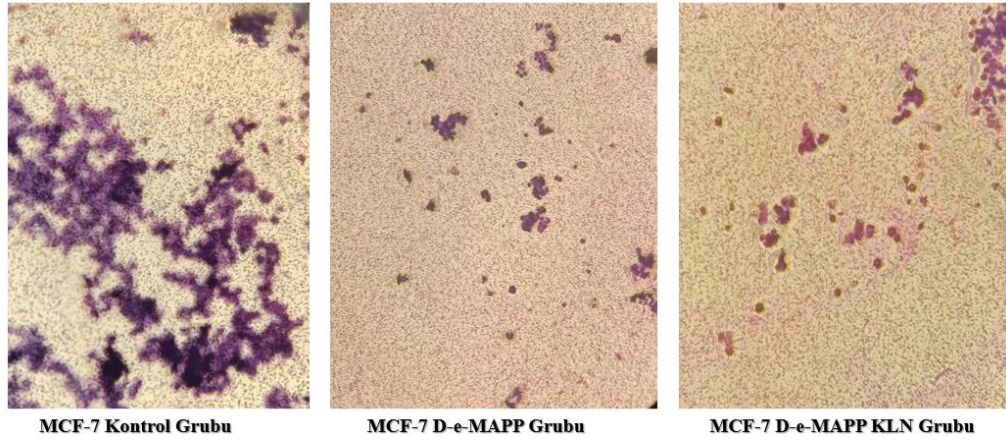
Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1 -1.47 C	AJFM1 7.48	AKT1 13.71	APAF1 9.31 A	BAD 9.09	BAG1 5.93	BAG3 4.91	BAK1 3.25	BAX 9.13	BCL10 5.83	BCL2 7.78	BCL2A1 5.60
B	BCL2L1 27.67 A	BCL2L10 4.56	BCL2L11 23.65 A	BCL2L2 51.88 A	BFAR 3.27	BID 9.75	BIK 24.76 A	BIRC2 2.58	BIRC3 7.07	BIRC5 11.38	BIRC6 3.58	BNIP2 5.65
C	BNIP3 7.51	BNIP3L 22.48	BRAF 4.74	CASP1 -1.47 C	CASP10 3.97 A	CASP14 4.91	CASP2 11.63	CASP3 10.09 A	CASP4 3.53 A	CASP5 -1.47 C	CASP6 9.62	CASP7 48.79 A
D	CASP8 2.30	CASP9 2.29	CD27 15.82	CD40 -1.01	CD40LG 5.04	CD70 1.65	CFLAR 6.91	CIDEA -1.47 C	CIDEB 4.24	CRADD 20.58 A	CYC5 4.36 A	DAPK1 1.20
E	DFFA 7.64	DIABLO 32.39	FADD 41.86 A	FAS 3.16	FASLG 1.25	GADD45A 57.39 A	HRK 2.60	IGF1R 60.46	IL10 -1.00	LTA 2.91	LTBR 9.90	MCL1 1.00
F	NAIP 4.43	NFKB1 20.58 A	NOD1 4.53 A	NOL3 8.30	PYCARD 11.58	RIPK2 3.48	TNF 18.42 A	TNFRSF10A 39.50 A	TNFRSF10B 25.16 A	TNFRSF11B 8.31	TNFRSF1A 12.55	TNFRSF1B -1.47 C
G	TNFRSF21 48.77 A	TNFRSF25 15.19	TNFRSF9 2.55	TNFSF10 14.14	TNFSF8 -1.36	TP53 18.83	TP53BP2 6.84	TP73 76.18 A	TRADD 34.37 A	TRAF2 15.55	TRAF3 5.74	XIAP -1.62

Şekil 4.22. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP KLN uygulaması sonucu RT² Profiler PCR Array sonuçları kat değişimleri.

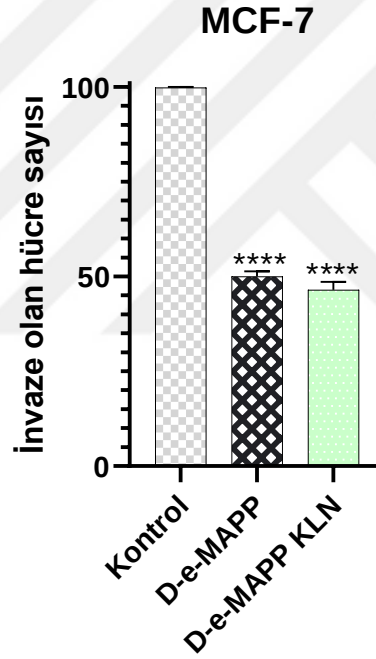
Tez çalışmasında MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulanan D-e-Mapp ve D-e-Mapp Nanopartikül Formülasyonunun bu hücreler üzerindeki tetiklenebilecek olan hücre ölüm yollarının belirlenebilmesi için hedeflenen programlanmış hücre yollarından apoptoz ile ilgili 84 adet genin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MCF-7 kontrol grubuna kıyasla D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulanan hücrelerindeki ilgili genlerin kat değişimleri ifadesi grafikler ile gösterilmiştir (Şekil 4.20 ve-4.22). Elde edilen sonuçlara göre AKT1, BAX, BCL2 ,BCL2L1, BIK, BNIP3L, CASP2, CASP3,CASP7, CD27, NFKB1, TNF, TNFRSF21 ve TP53 genlerinde her iki grupta da yüksek oranda ekspresyon seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir.

4.8. Hücre Hatlarında İnvazyonun Belirlenmesi Bulguları

Tez kapsamında kullanılan seramidaz inhibitörü ve yeni sentezlenen katı lipid nanopartikül formunun MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde invazyon düzeylerine olan etkileri trans-well matrigel invasion chamber yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulanan MCF-7 hücre hattında hücrelerin invazyon düzeyleri kullanılan kontrol grubuna göre, önemli düzeyde azalma göstermiştir (Şekil 4.23). ImageJ programı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre invaze olmuş ortalama hücre sayıları $\pm$ standart sapmalar göz önünde bulundurularak değerlendirilmiş ve grafik hazırlanmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. MCF-7 kontrol grubuna kıyasla D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül uygulanan MCF-7 hücrelerindeki invazyon düzeyleri

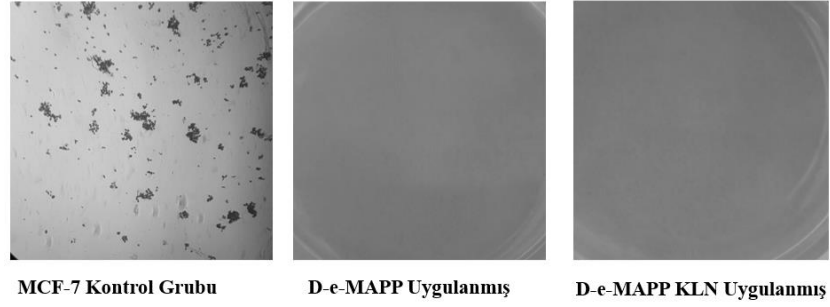


Şekil 4.24. MCF-7 kontrol grubuna kıyasla D-e-MAPP ve D-e-MAPP Nanopartikül uygulanan MCF-7 hücrelerindeki invazyon etkilerinin grafiği. (****<0,0001)

4.9. Soft agar koloni oluşum deneyi bulguları

Tez kapsamında kullanılan seramidaz inhibitörü ve yeni sentezlenen katı lipid nanopartikül formunun MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulanarak koloni oluşumu incelenmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında zamana ve doza bağlı olarak koloni oluşumunun azaldığı hatta neredeyse

tamamen engellediği saptanmıştır. Bu bulgular D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN'nin MCF-7 hücrelerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.25).



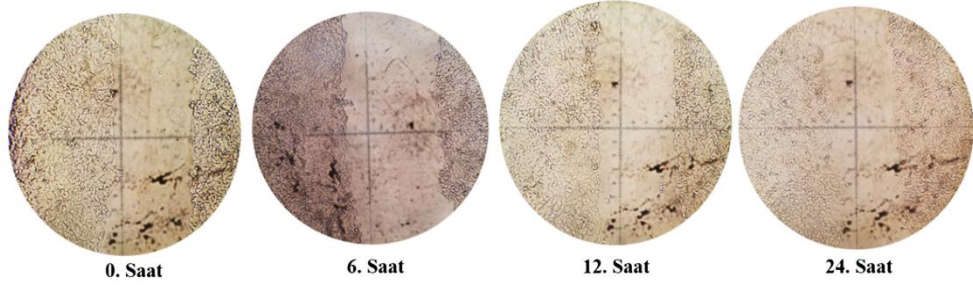
Şekil 4.25. MCF-7 Hücreleri üzerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunun soft ağar koloni oluşum sonuçları

4.10. Yara iyileşmesi (Scratch testi) testi bulguları

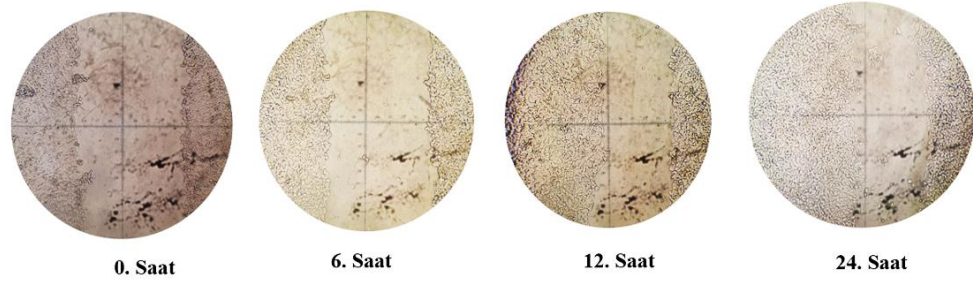
Tez kapsamında kullanılan seramidaz inhibitörü ve yeni sentezlenen katı lipid nanopartikül formunun MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde etkilerinden yara iyileşme testi “scratch assay” olarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulanan gruplar da kontrol grubuna kıyasla açılan yarığın kapanma süresinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu hücrelerde 24 saat sonunda açılan yarığın nerdeyse tamamının kapandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.26. MCF-7 kontrol grubu hücrelerinin yara iyileşme sonuçları.



Şekil 4.27. D-e-MAPP uygulanan MCF-7 hücrelerinin yara iyileşme sonuçları.



Şekil 4.28. D-e-MAPP KLN uygulanan MCF-7 hücrelerinin yara iyileşme sonuçları.

MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunun uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Image J programı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda ise açılan yarıkların kapanma oranlarının D-e-MAPP için %13,4 D-e-MAPP KLN için %13,8 iken kontrol grubunda %89,1 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.10).

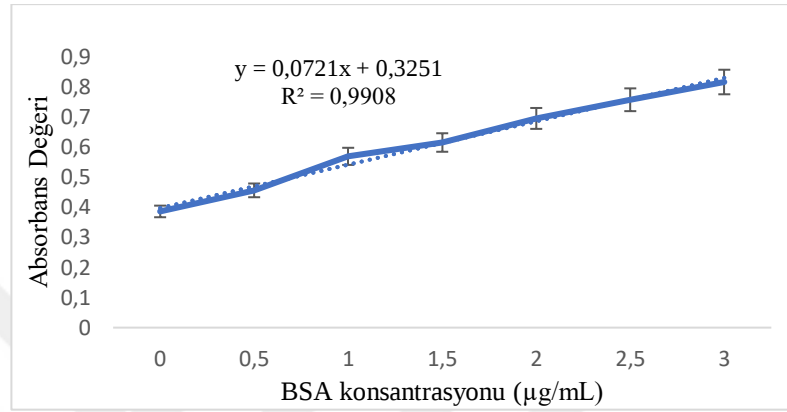
Tablo 4.10. MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunun uygulanmasıyla elde edilen yara açıklıklarının Image J programı sonuçları

	MCF-7	D-e-MAPP	D-e-MAPP
	Kontrol (pxl)	(pxl)	KLN (pxl)
0.Saat	188	175	181
6.Saat	102	169	176
12.Saat	59	161	170
24.Saat	19	153	159

4.11. Western Blot Bulguları

Bradford yöntemi bir solüsyon içindeki protein konsantrasyonunu ölçmeyi sağlayan çok hızlı ve verimli bir test yöntemidir. Genellikle 595 nm dalga boyuna sahip ‘coomassie brilliant blue’ dan oluşur ve solüsyon içindeki protein miktarına göre gittikçe koyulaşan bir mavi renk verir. Genel anlamda coomassie brilliant blue, solüsyonlar

içerisindeki proteinlere bağlanarak 595 nm dalga boylu mavi renge dönüştür. Tez kapsamında elde ettiğimiz proteinlerin tayini bu yöntemle yapılmıştır. İlk olarak miktarı bilinen BSA (Bovine Serum Albumin) proteini ile bir $y=ax+b$ grafiği çizilmiştir (Şekil 4.29) ve grafikte y değeri okunan örnek değeridir x de aranan protein miktarıdır. Formülden istenilen örneğin protein miktarı belirlenmiştir.

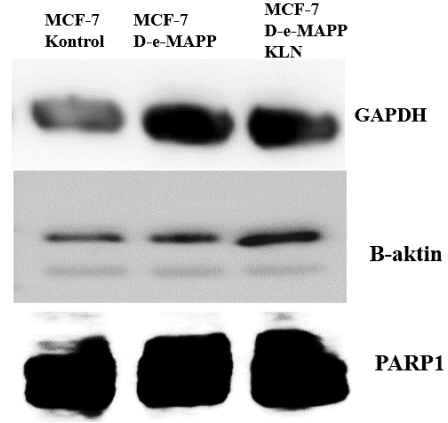


Şekil 4.29. BSA proteini konsantrasyon grafiği

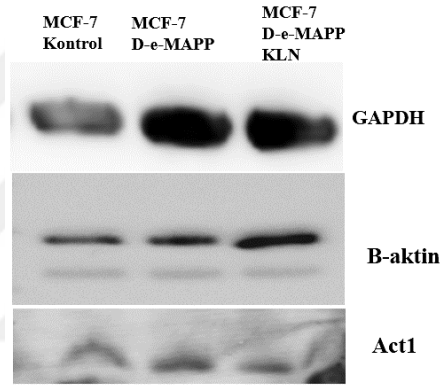
Tablo 4.11. Protein miktar tayini sonuçları

Deney Grubu	Protein (stok)	ug	ug / ml (Stok)
D-e-MAPP MCF-7		24,88	113,09
D-e-MAPP Nano MCF-7		24,00	109,10
D-e-MAPP MCF-7		23,59	107,21
Kontrol			

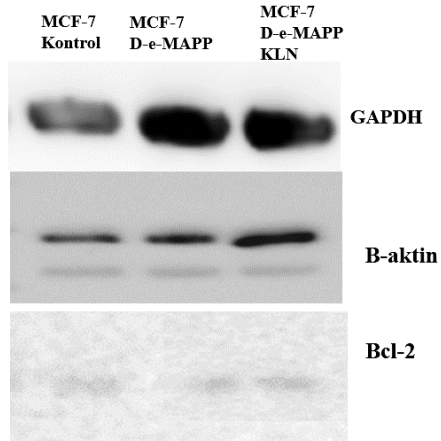
Western blot yöntemi ile MCF-7 hücrelerinde, D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formu kontrol grubu ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Deney grupları arasında, apoptoz ile ilgili olarak Act1, Bcl-2, ve Parp-1 proteinlerinin ekspresyonlarının değişimleri incelenmiştir. House-keeping olarak β -aktin ve GAPDH (Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz) proteinleri kullanılmıştır. Parp-1, Bcl-2 ve Act1 proteinlerinin ekspresyonu incelendiğinde, D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN grubunda kontrole göre artış görülmüştür (Şekil 4.30, 4.31 ve 4.32).



Şekil 4.30. *Western blot deney sonucunda kontrol grubuna göre PARP1 proteinin değişimi.*



Şekil 4.31. *Western blot deney sonucunda kontrol grubuna göre Act1 proteinin değişimi.*

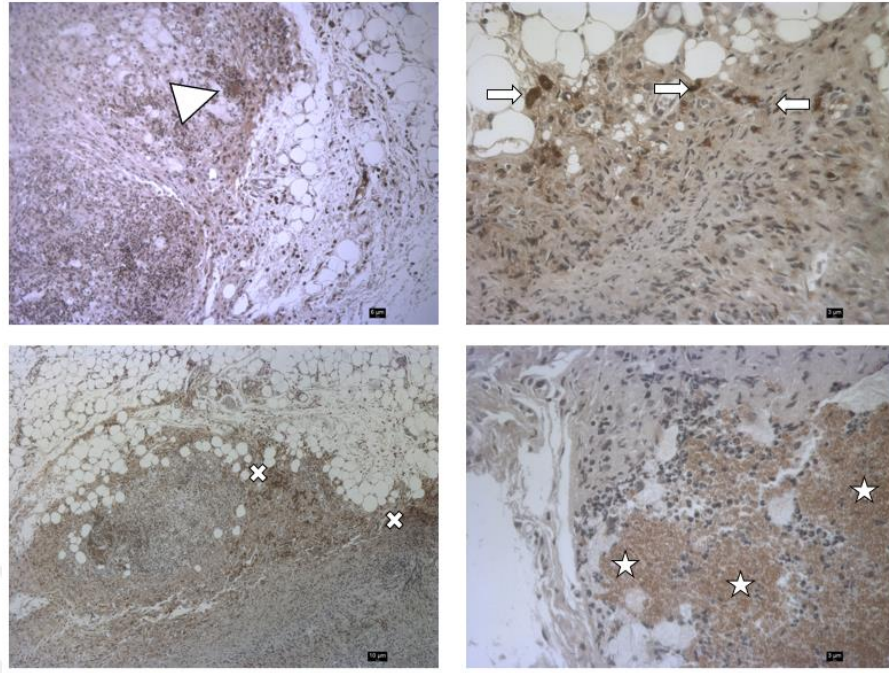


Şekil 4.32. *Western blot deney sonucunda kontrol grubuna göre Bcl-2 proteinin değişimi.*

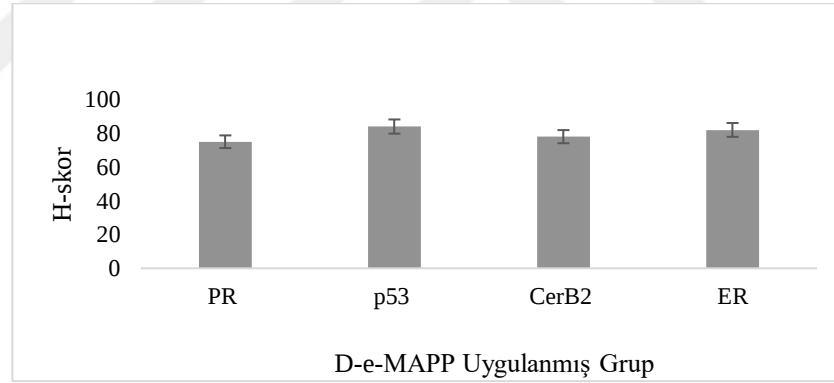
4.12. *İn-vivo* Hayvan Deneyi Bulguları

4.12.1. İmmunhistokimyasal boyama bulguları

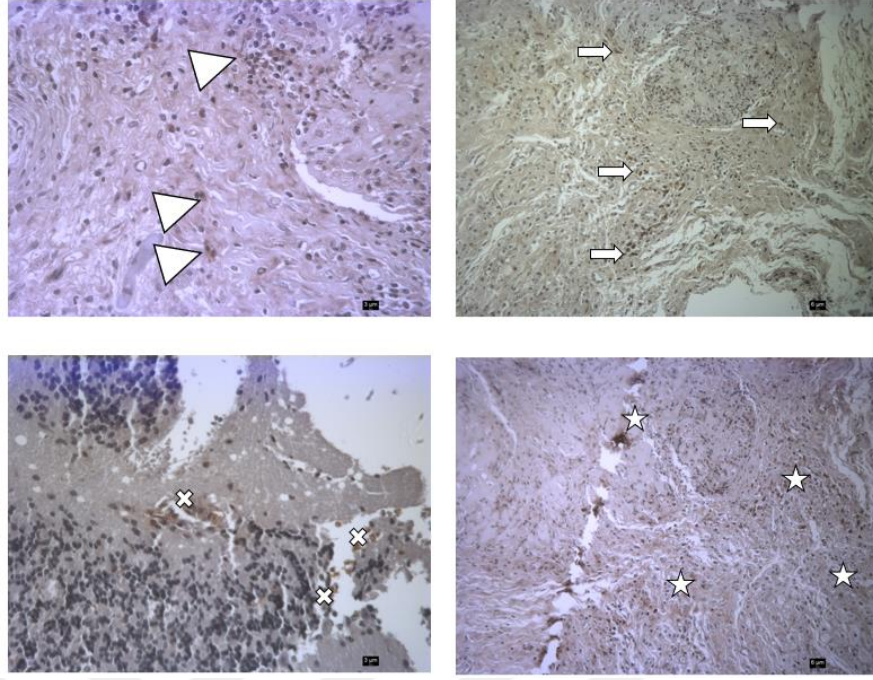
Tez kapsamında farelerden elde edilen meme tümör dokuları, tümör supresör geni p53, Östrojen reseptör ER, progesteron reseptör PR ve CerB2 onkogeni antijenlerinin ışık mikroskopik düzeyinde hücrelerdeki yerleşimi ve yoğunluğu immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir. Morfolojik bulgular, histolojik skorlama (H-skor) yöntemi ile semikantitatif verilere dönüştürülerek, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığı analiz edilmiştir. H-skor, tümör dokularda yer alan 100 çekirdeğin boyanma şiddeti değerlendirilerek gerçekleştirildi. Veriler 0 (boyanma yok), 1 + (zayıf, fakat tespit edilebilir boyanma), 2 ++ (orta şiddetli boyanma), 3 +++ (yoğun boyanma) şeklinde değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak kabul edilen Serum fizyolojik grubunda immünohistokimyasal boyama sonuçlarına baktığımızda D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN ile tedavi edilen gruplara göre tümör supresör geni p53, Östrojen reseptör ER, progesteron reseptör PR ve CerB2 onkogeni antijenlerinin boyanmalarının daha az olduğu ve bazı bölgelerde çok az sayıda pozitif boyamaların olduğu tespit edilmiştir. Özellikle p53 antijenin boyanma yoğunluğuna ve istatistiksel sonuçlarına baktığımız zaman deney gruplarında daha yüksek sayıda olduğu ve boyanmamanın tümör dokunun her yerinde olduğu tespit edilmiştir. Tüm deney grupları değerlendirildiğinde H-skor sonuçlarına göre PR, p53, Cerb2 ve ER antijenlerinin boyanma sonuçlarının D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN gruplarının istatistiksel olarak da anlamlı şekilde sonuç verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.43). Elde edilen sonuçlara göre tümör supresör geni p53 boyanmasının tedavi edilen gruplarda anlamlı şekilde pozitif sonuç vermesi bu hücrelerde kanser oluşumunun engellenmesinin uygulama yaptığımız D-e-MAPP seramidaz inhibitörü aracılı olduğunu göstermiştir.



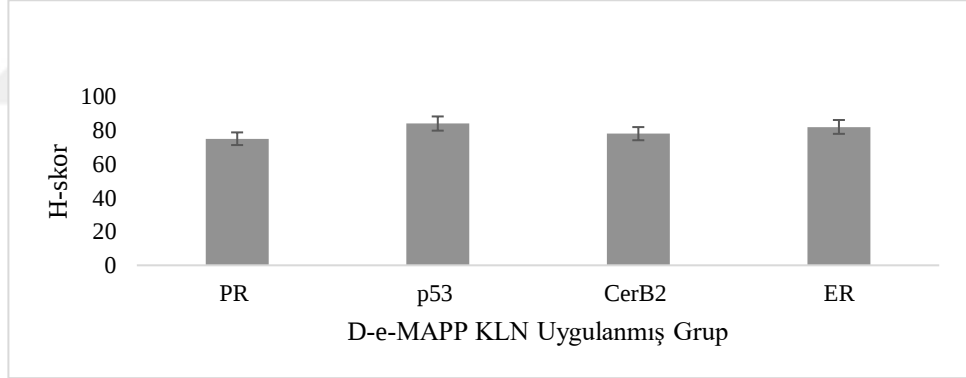
Şekil 4.33. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. ($\blacktriangleright$; PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\times$; CerB2 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)



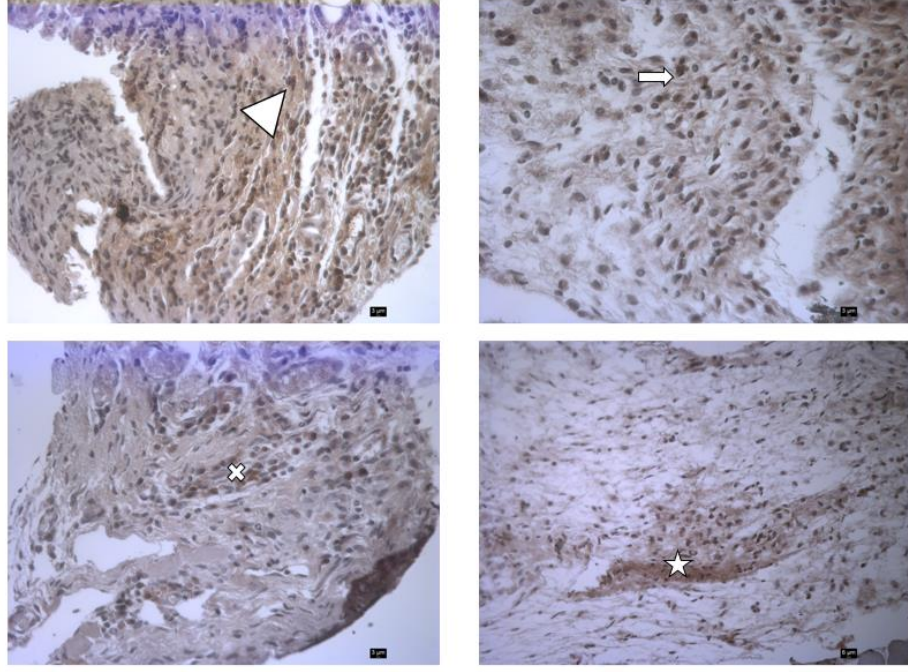
Şekil 4.34. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri



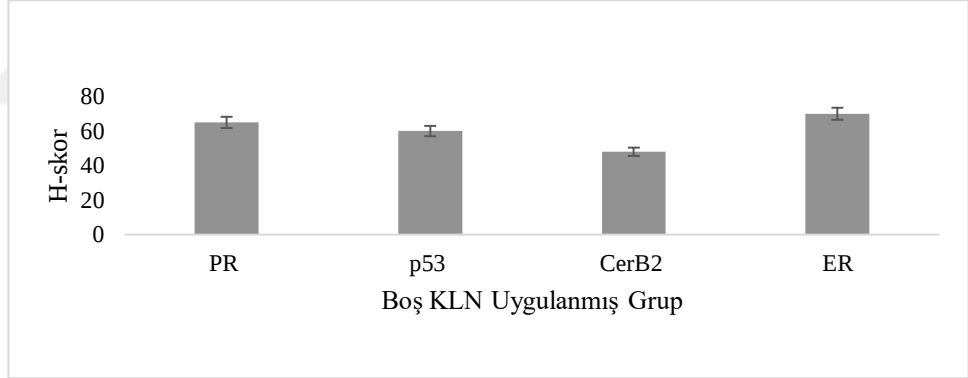
Şekil 4.35. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. (▷; PR pozitif boyanmış, ⇒; p53 pozitif boyanmış,⊗; CerB2 pozitif boyanmış, ☆ ; ER pozitif boyanmış)



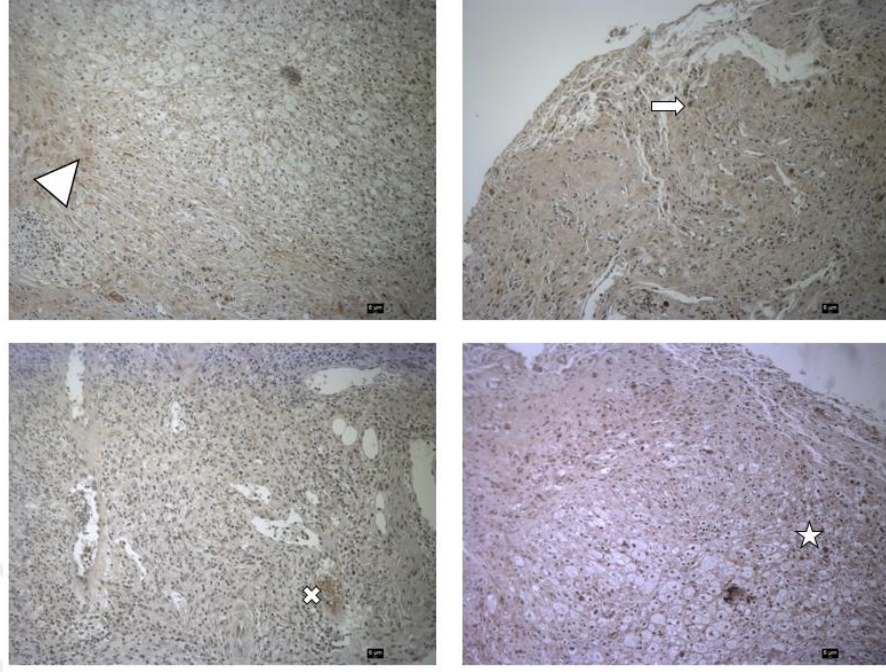
Şekil 4.36. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden D-e-MAPP KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri



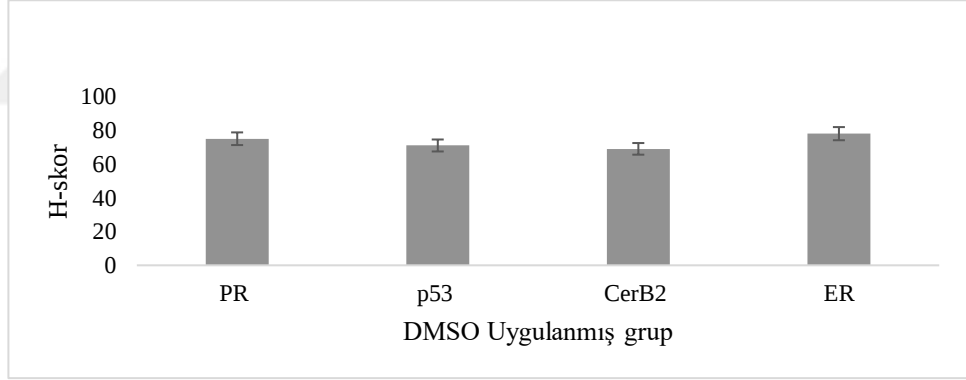
Şekil 4.37. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Boş KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. ($\triangle$; PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\times$; CerB2 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)



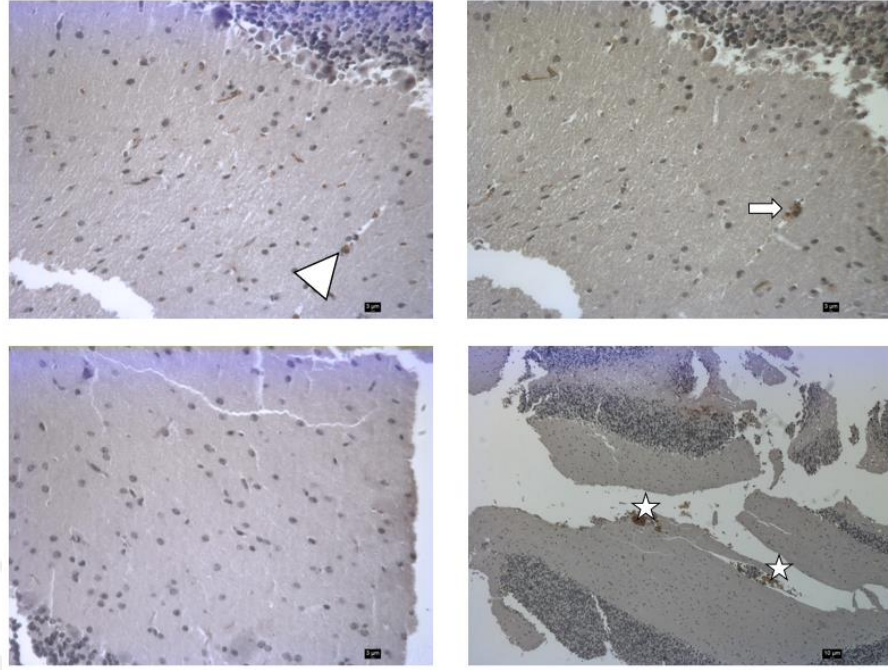
Şekil 4.38. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Boş KLN uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri



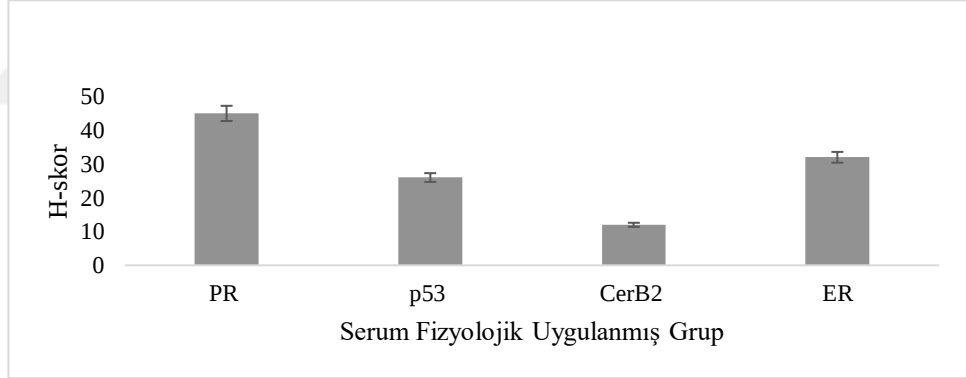
Şekil 4.39. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden DMSO uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. ($\triangle$; PR pozitif boyanmış, $\Rightarrow$; p53 pozitif boyanmış, $\times$; CerB2 pozitif boyanmış, $\star$; ER pozitif boyanmış)



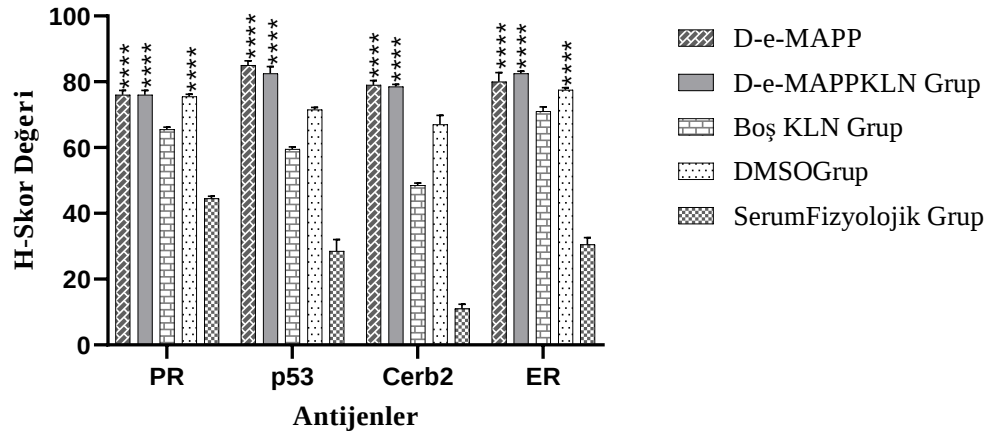
Şekil 4.40. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden DMSO uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri



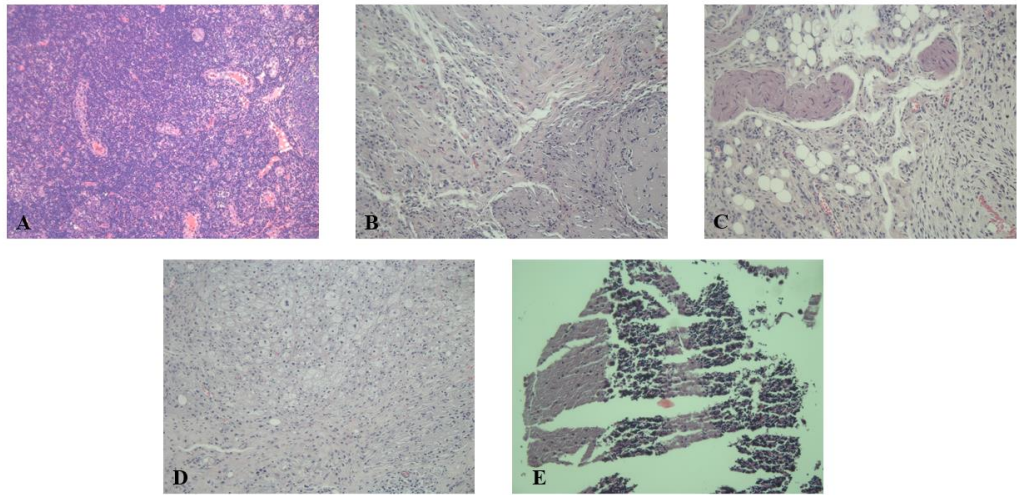
Şekil 4.41. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Serum fizyolojik uygulanmış olanların tümör dokusunun ışık mikroskopundaki görüntüleri. (▷; PR pozitif boyanmış, ⇨; p53 pozitif boyanmış, ☆; ER pozitif boyanmış)



Şekil 4.42. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden Serum fizyolojik uygulanmış olanların tümör dokusunun immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri



Şekil 4.43. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokularının immunhistokimyasal boyama sonucu H-skor değerleri. (****<0,0001)

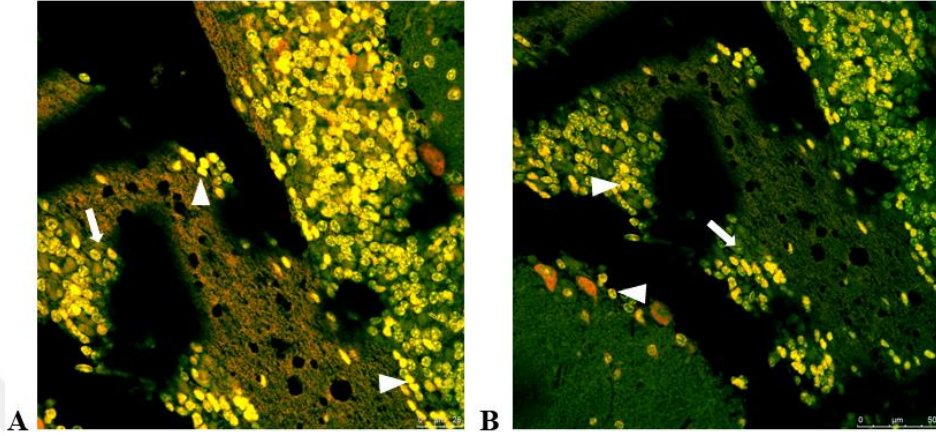


Şekil 4.44. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokularının Hematoksilen-Eosin ile boyama sonuçları. (A; D-e-MAPP uygulanmış, B: D-e-MAPP KLN uygulanmış, C: Boş KLN uygulanmış, D: DMSO uygulanmış grup, E: Serum fizyolojik uygulanmış grup)

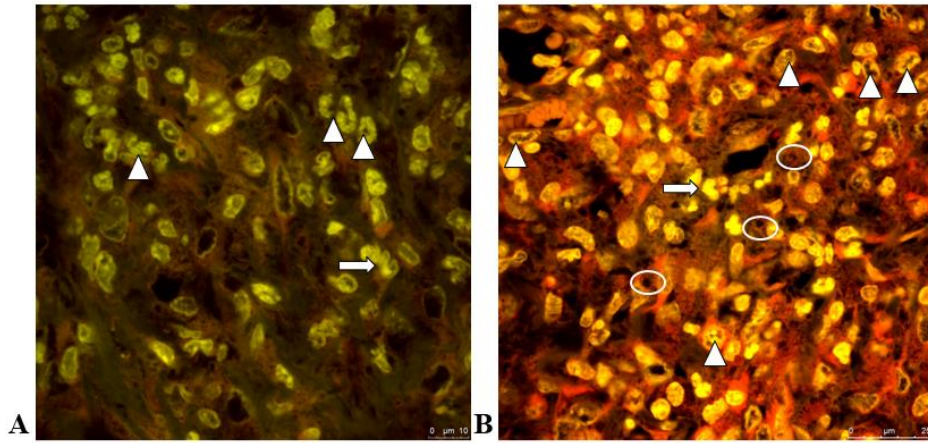
4.12.2. Konfokal Mikroskop ile Yapısal Değişikliklerinin Görüntülenmesi Bulguları

BALB/c farelere ait meme tümör dokularından alınan kesitler akradin oranj ve falloidin ile ikili boyama yapıldıktan sonra konfokal mikroskopide ayrıntılı olarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN ile tedavi edilen gruplarda hücre yapısına bakıldığında kromatin yoğunlaşması, at nalı çekirdek oluşumu ve hücre iskeletinde parçalanma şeklinde apoptoz belirteçleri görülmüştür. D-e-MAPP verilen grupta kontrol grubuna göre dokuda hücreler arası boşluklar nispeten artmış, dokuda hafif büzüşme ve gevşemeler görülmüştür (Şekil 4.45). D-e-MAPP KLN verilen grupta hücreler incelendiğinde kontrol grubuna göre hücrelerde büzüşme ve gevşemelerin olduğu, hücreler arasında boşlukların arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.46). Bununla

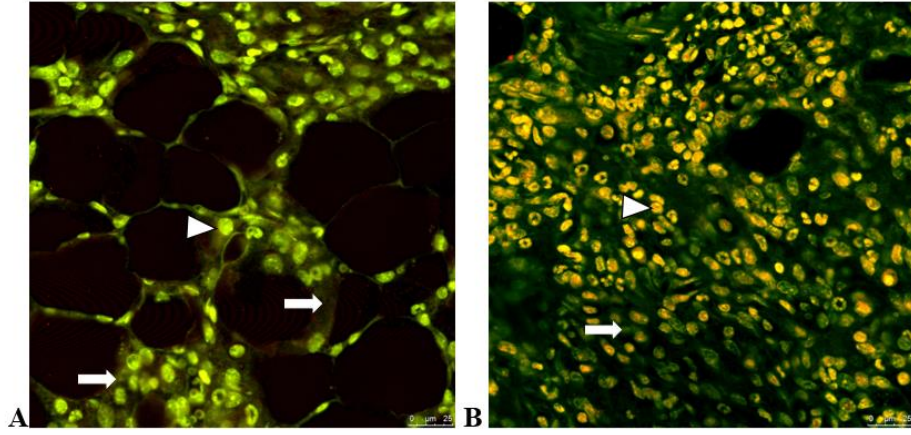
beraber kontrol grupları olarak kabul ettiğimiz DMSO ve Serum fizyolojik uygulanan gruplarda ise doku genel durumu normal değerlendirilmiş hücre çekirdek ve iskeletlerinde hasar veya değişiklik görülmemiş ve anlamlı derecede saptanmamıştır (Şekil 4.48 ve 4.49).



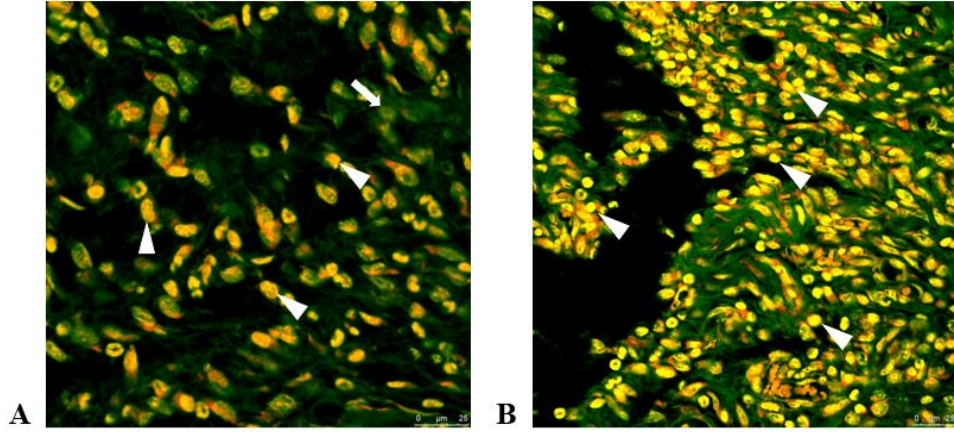
Şekil 4.45. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; D-e-MAPP ile tedavi edilmiş grup. (Ok başı: kromatin yoğunlaşması ok: atnalı çekirdek oluşumu)



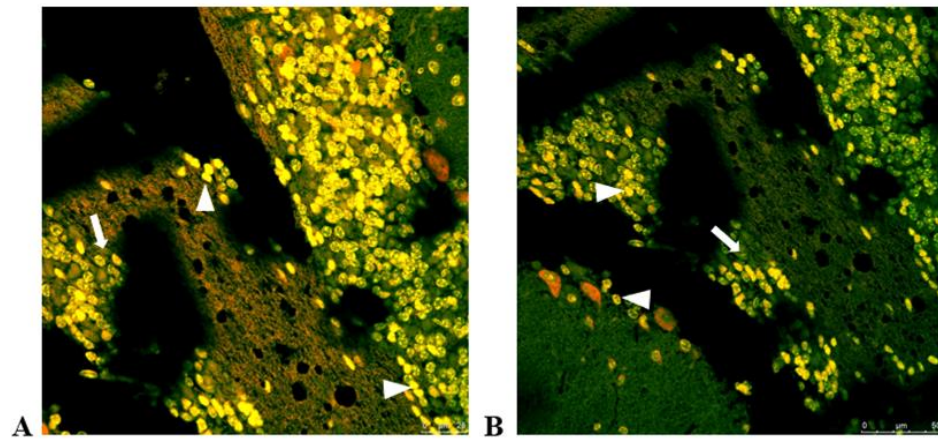
Şekil 4.46. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; D-e-MAPP KLN uygulanmış. (Ok başı: kromatin yoğunlaşması ok: at nalı çekirdek oluşumu, halka: hücre iskeletinde parçalanma)



Şekil 4.47. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; Boş KLN uygulanmış. (Ok başı: hasar görmemiş hücre çekirdeği, ok: sağlam hücre iskeleti)



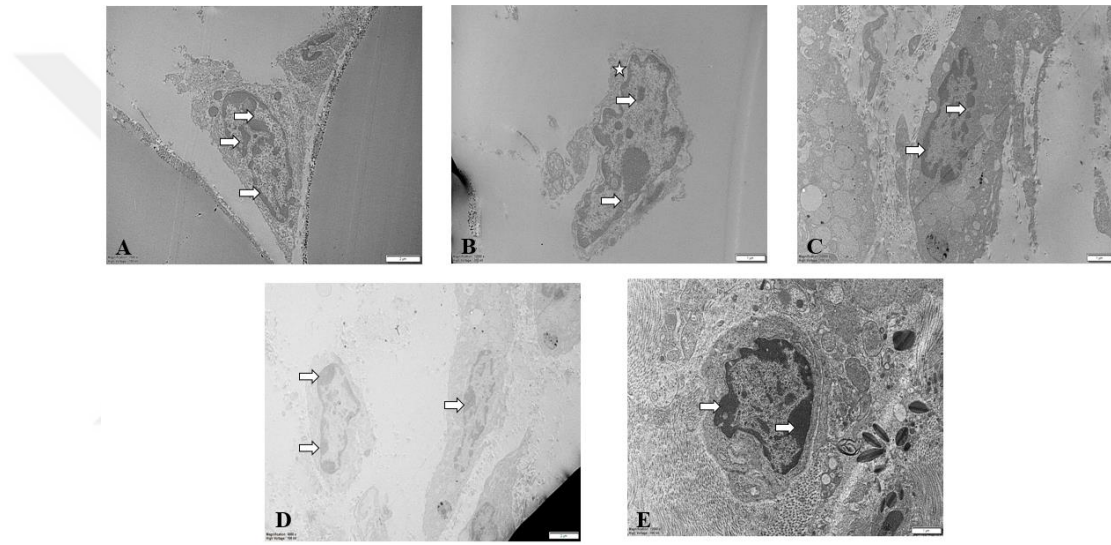
Şekil 4.48. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; DMSO uygulanmış. (Ok başı: hasar görmemiş hücre çekirdeği, ok: sağlam hücre iskeleti)



Şekil 4.49. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların konfokal mikroskopi görüntüleme sonuçları. A-B; serum fizyolojik uygulanmış. (Ok başı: hasar görmemiş hücre çekirdeği, ok: sağlam hücre iskeleti)

4.12.3. İnce Yapısal Değişikliklerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntülenmesi Bulguları

BALB/c farelere ait meme tümör dokularından alınan kesitler ince yapısal değişiklikleri incelemek amacıyla TEM mikroskopisinde ayrıntılı olarak incelenmiştir (Şekil 4.50). Genel olarak dokulara baktığımızda kontrol grubuna ait DMSO ve Serum fizyolojik gruplarında kanser dokusu özellikleri görülmüştür fakat uygulama yaptığımız D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunda ise daha çok apoptoz belirtilerine rastlanmıştır bu belirtiler ileri seviye tespih tanesi kromatin yoğunlaşması, hücre iskeletinde delik oluşumu, çekirdek ve hücre büzüşmesi ve dokularda gevşemeler şeklindedir.



Şekil 4.50. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların TEM mikroskopi görüntüleme sonuçları. A: D-e-MAPP ile tedavi edilmiş grup, B: D-e-MAPP KLN ile tedavi edilmiş grup, C: Boş KLN uygulanmış grup, D: DMSO uygulanmış grup, E: Serum Fizyolojik uygulanmış grup. (Yıldız: hücre iskeleti parçalanması, ok: kromatin yoğunlaşması)

4.12.4. Western Blot Bulguları

Tez kapsamında yapılan *in vivo* deneyleri sonucunda meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokulardan protein izolasyonu yapılmıştır. Western blot yöntemi sonucunda Parp-1 proteinin ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol proteini olan GAPDH'a göre D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN ile tedavi edilen grupta ekspresyon seviyesi serum fizyolojik grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. Meme tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokuların Western blot deney sonuçları.

5. TARTIŞMA

Kanser, günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere önemli sağlık sorunları arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Kanser oluşumuna neden olan faktörlerin nitel ve nicel artışının yanı sıra tanı olanaklarının gelişmesi ile paralel bir artış gösteren vaka sayıları, konuyla ilgili kişi ve kuruluşların kanserle daha fazla ilgilenmesi sonucuna yol açmıştır. Bu sebeplerden dolayı kanser tedavisinde son yıllarda birçok yeni ilaç geliştirilmesine rağmen kanser tedavisinde kanserli hücrelerin bu ilaçlara direnç geliştirmesi ve kullanılan ilaçların yeterli olmaması yeni tedavi yaklaşımlarına ve ilaçlara ihtiyacın sürekli hale gelmesine neden olmuştur [209]. Meme kanseri kadınlarda ve erkeklerde görülen bir kanser türüdür. Bu kanser daha çok kadınlarda görülürken erkeklerde görülme sıklığı daha düşüktür. Meme kanseri akciğer kanserinden sonra kadınlarda en sık görülen kanser çeşidi olup kanser sebepli ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde meme kanseri %24,1'lik bir oran ile kadınlarda görülen tüm kanser olguları içinde en üst sıradadır [210]. Meme kanseri nedenli ölüm oranını azaltmak için, yenilikçi tedavi stratejileri geliştirmek, bu kanser türünün biyolojisini anlamak, yeni terapötik stratejiler ve anti kanser özellikli ilaçların geliştirilmesi son derece önem kazanmıştır [211-213].

Meme kanseri için cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve patolojik ve klinik sonuçlara dayanan yeni hedefe yönelik tedavi gibi farklı tedavi seçenekleri mevcuttur. Meme kanserinin cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren geleneksel tedavisi yöntemleri anksiyete, depresyon, yaşam kalitesinin düşmesi, kusma, ağrı, uyku bozukluğu gibi birçok yan etki içermektedir [214, 215]. Bu nedenle, kanseri yenmek için yeni tedavi stratejileri geliştirilmektedir. Bu noktada hedefe yönelik tedavi, kanserin tedavisinin yönetilmesi, tedaviye bağlı yan etkilerin azaltılması, daha spesifik ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan ajan moleküller yüksek oranda toksik özellik göstermektedir. Bu kanserin tedavisinde en çok kullanılan moleküller Doksorubisin ve Paklitakseldir. Kemoterapide kullanılan doksorubisin çok fazla yan etkisi olan bir ajandır. En önemli yan etkisi uzun süre sonunda doza bağımlı olarak meydana gelen kronik kardiyomiyopatidir. Bunun yanında hastalarda lokal toksisite, saç dökülmesi, mukozit, kemik iliği supresyonu ve nefrotoksisite gibi sorunlar oldukça sık görülen yan etkileridir [216]. Klinikte kullanılan ilk molekül olan Paklitaksel taksan türevi bir maddedir. Bu maddenin kullanılmasıyla oluşan yan etkiler ise Nötropeni, aşırı dispne duyarlılık, ürtiker, mukozal hipotansiyon,

nörotoksisite iltihabı, periferik nöropati, mide bulantısı, kusma, diyare, alopesi (saç dökülmesi), karaciğer fonksiyonlarında artış, miyopati, pulmoner yağ embolisi gibi etkilerdir [216].

Kanser tedavisinde kemoterapideki olumlu gelişmeler, ölüm riskini ve hastalığın tekrar etmesini önemli oranda azaltmış olsa da, meme kanserinin yeniden ortaya çıkması klinikte önemli bir problem oluşturmaktadır. Bundan dolayı, meme kanseri hastalığının üstesinden gelmek için tedavisinde kullanılabilecek yeni moleköl adaylarının ve potansiyel ilaçların bulunmasına ihtiyaç vardır [217].

Kanserin gelişimi ve yayılımının karmaşık mekanizmalara sahip olması, invazif olması, agresif büyüme ve durdurulamaması gibi nedenlerden dolayı klasik tedavilerden cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi yöntemler çoğu zaman dirençli tümörlere karşı yeterince etkili olamamaktadır. Bu nedenden dolayı, kanser tedavisinde yeni antikanser stratejileri oldukça önemli bir yere sahiptir. Kanser kontrol mekanizmasında görevli olan genlerin daha iyi anlaşılması, bu hastalığın tedavisinde yeni stratejiler sağlamaktadır. Birçok kanser türünde düzgün çalışmayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler kanserin başlangıcında ve büyümesinde önemli bir role sahiptir. Gen tedavisi ve bu sistemi kontrol altında tutan kanser hücrelerini apoptoza yönlendiren genlerin tespit edilmesi ile bu hastalığı kaynağında tedavi etmek ve yok etmek umut verici bir stratejidir [218].

Kanser hastalığına karşı geliştirilen etkin tedavi şekillerinden nanotüpler, kuantum noktaları, polimerler, lipidler, gözenekli silika ve miseller gibi farklı nanoparçacık veya nanotaşıyıcılar kullanılmaktadırlar. Bu taşıyıcıların hepsi şekil, büyüklük, yük, yüzey, ilaç yükleme ve salma kapasitesi gibi birçok fizikokimyasal karakterizasyon açısından farklı özelliklere sahiptirler. En önemlisi de bu taşıyıcı sistemlere DOX, sisplatin ve 5-fluorourasil gibi antikanser ajanlar yüklenerek yeni moleküller elde edilebilir [219]. Lipofilikliğin artışına bağlı olarak ilaç moleküllerinin ve taşıyıcı sistemlerin membran geçirgenliğini arttırdığı bilinmektedir [220]. Hedeflenen etkin maddenin katı lipit nanopartiköl formuna dönüştürülmesi ile yapısındaki yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddelerin, hedeflenen etkin maddenin dokulara ve hücrelere geçişini kolaylaştırdığı bilinmektedir [221-223]. Son yıllarda daha etkili yeni nesil katı lipid nanopartiköl (KLN) formları geliştirilmiştir. Bunlar nano yapılandırılmış lipid taşıyıcılar (Nano Lipid Carrier, NLC) ve lipit-lipit ilaç konjugatları (Lipid-Drug Conjugate, LDC) olarak tanımlanmıştır. Bunların en karakterize özellikleri katı ve sıvı lipitlerin

karışımlarından oluşan bir çekirdek halinde olmalarıdır. Oluşan karışım sonucunda oluşan matris, katı lipitten daha düşük bir erime sıcaklığına sahip olmasına rağmen vücut sıcaklığında katı haldedir. KLN'ler, daha fazla etkin madde yükleme ve ilacın sistemden kaçışını engelleme gibi özelliklere sahiptirler [224].

Tez çalışmamda antikanser ilacı olma potansiyeli yüksek olarak görülen D-e-MAPP ve onun katı lipid nanopartikül formunun insan meme kanseri hücreleri MCF-7 üzerinde neden olduğu sitotoksik, ince yapısal değişiklikler ve hücre ölüm yolları araştırılmıştır. Bu çalışmada D-e-MAPP ve onun katı lipid nanopartikül formunun (KLN) ilaç olma yolundaki hedeflerini insan meme kanseri hücre hattında *in vitro* olarak ve hayvan deneylerinde *in vivo* olarak çalışmıştır. İlk olarak bir seramidaz inhibitörü olan D-e-MAPP'ın etkinliğini arttırmak ve hücre içine giriş miktarını daha da artırabilmek için onun katı lipid nanopartikül formu sentezlenmiş ve elde ettiğimiz yeni partikülün nanopartikül karakterizasyon analizleri sonuçları KLN- D-e-MAPP partikül boyutunun normal D-e-MAPP partiküllerinden yaklaşık 62 kat daha küçük olduğunu göstermiştir (Tablo 4.1). Bununla birlikte, SEM mikroskopi bulgularımız zeta boyutu analizi ölçüm sonuçlarımızı desteklemiştir (Şekil 4.1). Ek olarak, nanopartiküllerin şekillerinin morfolojik anlamda küresel ve pürüzsüz olduğu gözlemlenmiştir.

İn vitro etkin madde salımı deneyi sonuçlarına göre seramidaz inhibitörü molekülü olan D-e-MAPP' %50'sini ilk 120 dakika içerisinde salmıştır. Devamında düzenli ve standart bir salım devam etmiş ve salım profilinde belirgin bir fark görülmemiştir. 24. Saate bakıldığında ilaç salımının % 68 olduğu görülürken, 144 saat sonunda ilaç salımının %99'a ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15 ve 4.17). Bu sonuçlara göre D-e-MAPP yaklaşık 6. gün sonunda tüm maddeyi ortama bırakmıştır. D-e-MAPP Nanopartikül formunun ise, ilk 15 dakika içerisinde %51'sinin salındığı, sonrasında salım hızı azaldığı 4. saat sonunda tekrar salınım yaptıktan sonra 24. saate ve 96. saatlerde salınım yaparak düzenli bir salım profili göstermekle birlikte 24. saatte % 91'e çıktığı ve 96. saatte %97,62'ye ulaştığı görülmüştür. Nanopartikül formunun normal forma göre tüm maddeyi salma durumu 4. günün sonunda olmuştur. Bu sonuçlar bize kullanılan nanopartikül yöntemi ile istenilen ilaç etken maddesinin kontrollü salınımının yapılabilmesine olanak sağladığını ve nano boyutta olan partiküllerin normalden daha hızlı olarak nerdeyse 2 gün daha erken şekilde tüm madde salınımını gerçekleştirdiğini göstermiştir.

Yapılan birçok çalışma incelendiğinde NOE, Ceranib-2, B13, LCL-464 ve karmofur gibi seramidaz inhibitörlerinin akciğer, kolon, prostat, glioma ve melanom

kanserlerinde apoptozu indüklediğini bildirmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan seramidaz inhibitörlerinin MTT test sonuçlarına bakıldığında IC₅₀ değerleri, NOE'nin kemik kanserindeki değeri 61 µM [225], Ceranib-2'nin akciğer kanser hatlarında A549 için 22 µM ve H460 için 8 µM [226] ayrıca fare embriyonik fibroblast hücreleri (NIH/3T3 normal hücre dizisi) ve sıçan embriyonik fibroblast hücreleri (5RP7 kanser hücre dizisi) için IC₅₀ değerleri sırasıyla 3 µM ve 5 µM olarak tespit edilmiştir [227]. Karmofurun HCT116 kolon kanseri hücre hattındaki IC₅₀ değeri ise 8 µM olarak tespit edilmiştir [228]. B13'ün, insan melanomada ve HaCat keratinositlerinde IC₅₀'si 10 µM olarak tespit edilmiştir [229, 230]. Zdzislaw vd. 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında MCF-7 hücrelerinde D-e-MAPP'ın etkinliğini 48 saat sonunda IC₅₀ değerini 30µM olarak bulmuşlardır [231]. Yapılan başka bir çalışmada D-e-MAPP'ın HL-60 insan promiyelositik lösemiden izole edilen alkCDazı seçici olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Ajanın IC₅₀ değeri 1-5 mM'dır ve konsantrasyona ve zaman bağımlı büyüme baskıladığı bildirilmiştir [135]. Choi vd. (2003) yaptıkları bir çalışmada nötral seramidaz ekspresyonunun mezengial hücrelerde yüksek seviyede ifade edildiğini göstermiştir. Araştırmacılar D-e-MAPP ile gerçekleştirilen nötral seramidaz inhibisyonunun kültürlenmiş mezangial hücrelerde ve fare ince bağırsağının belirli bölgelerindeki hücrelerde seramid seviyesini attırdığını ve buna bağlı olarak da apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini ifade etmişlerdir [232]. Tez kapsamında tüm deneylerde kullanmak amacıyla katı lipid nano partikül sentezini gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde ettiğimiz D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun insan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini tespit etmek amacıyla MTT sitotoksisite testi gerçekleştirilmiştir. MTT sitotoksisite testi ile MCF-7 hücreleri üzerindeki büyümeyi baskılayıcı konsantrasyonlar (IC₅₀ değerleri) belirlenmiştir (Tablo 4.2). MCF-7 hücreleri üzerine uygulanan D-e-MAPP'ın 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,4 µM, 18,8 µM ve 35,7 µM olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda D-e-MAPP-nanopartikül formunun MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandığı canlılık IC₅₀ değerleri sırasıyla 15,6 µM, 13,9 µM ve 12,1 µM olduğu belirlenmiştir. Elde edilen IC₅₀ sonuçları yapılan literatür çalışmaları ile paralel sonuçlar vermiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).

D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun insan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerindeki potansiyel antikanser etkisi hücre morfolojisinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi konfokal mikroskopi ile gerçekleştirilmiştir. Hiçbir muamele

yapılmayan kontrol gurubu MCF-7 hücreleri ve D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun IC₅₀ değeri ile maruz bırakılan hücreler karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4 ve 4.5). Şekil 4.4 A) da MCF-7 kontrol grubu hücrelerinde normal çekirdek ve normal hücre yapısı görülürken B), C) ve D) 24 saat boyunca D-e-MAPP IC₅₀ konsantrasyonu uygulanmış olan MCF-7 hücrelerinde hücre iskeletinde delik oluşumu ve parçalanma, İçi boşalmış hücreler ve membran tomurcuklanması gibi yapılar görülmüştür. Şekil 4.5’de A) MCF-7 kontrol grubu hücrelerinde normal çekirdek yapısı, normal hücre yapısı görülürken B), C) ve D) 24 saat boyunca D-e-MAPP nanopartikül partikül formunun IC₅₀ konsantrasyonu uygulanmış olan MCF-7 hücrelerinde hücre iskeletinde delik oluşumu ve parçalanma ve içi boşalmış hücreler görülmektedir. Elde edilen bulgular potansiyel antik kanser ajanının uygulandığı hücrelerde apoptotik ölüm şeklinin bariz şekilde görüldüğü belirlenmiş ve molekülün apoptotik ölümü tetiklediği belirlenmiştir. Tez çalışmamda MCF-7 hücrelerinde meydana gelmesi beklenen ince yapısal değişiklikler geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) değerlendirilmiştir. Kontrol gurubu MCF-7 hücreleri ve D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartikül formunun IC₅₀ değeri ile maruz bırakılan hücreler karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6 ve 4.7). MCF-7 Kontrol hücrelerinde normal hücre membranı ve normal hücre iskeleti görülürken D-e-MAPP’ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde membran tomurcuklanmaları görülmüştür. D-e-MAPP nanopartikül formunun IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 kontrol hücrelerinde normal hücre membranı ve normal hücre iskeleti görülürken D-e-MAPP nanopartikül formunun IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde membran tomurcuklanmaları, hücre iskeletinde delikler ve kromatin yoğunlaşması görülmektedir. Elde ettiğimiz bu değişiklikler ile hücre zarının aktivitesinin arttığı ve tomurcuklanmalar yaptığı görülmektedir. Dolayısıyla D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartiküllerinin daha çok çekirdek ve hücre membranı üzerinde etkili olduğunu aynı zamanda da çekirdek büzüşmesine neden olduğu için kromatin yoğunlaşmasında da etkili olarak hücreyi apoptoz ile ölüme götürdüğü belirlenmiştir.

D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartiküllerinin MCF-7 hücrelerindeki apoptoz tetikleyici etkisi erken ve geç apoptoz ayırımında kullanılan bir boyama yöntemi olan Anneksin-V analizi ile gerçekleştirilmiştir. MCF-7 kontrol hücrelerinin %91,54 oranında canlı olduğu, hücrelerin %2,01’inin ise öldüğü tespit edilmiştir. Bu grupta erken apoptotik oran %4,72 iken geç apoptotik oranın %1,73 olduğu tespit edilmiştir. 24 saat boyunca D-e-MAPP’ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde ölü hücrelerin

%3,15 olduğu tespit edilmiştir, yine hücrelerin erken apoptotik oran %25,80 iken geç apoptotik oranın %11,05 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Toplam orana baktığımızda kontrol grubunda canlı hücrelerin oranı %91,54 iken deney grubunda %60,00 oranındadır ve deney grubunda ölüm oranı %40 şeklinde bulunmuştur (Tablo 4.3). 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun MCF-7 kontrol hücrelerinin %98,83 oranında canlı olduğu, hücrelerin %1,17'sinin ise öldüğü tespit edilmiştir. Bu grupta erken apoptotik oran ve geç apoptotik oranın %0,00 olduğu tespit edilmiştir. 24 saat boyunca D-e-MAPP Nanopartikül formunun IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde ölü hücrelerin %5,41 olduğu tespit edilmiştir, yine hücrelerin erken apoptotik oran %10,52 iken geç apoptotik oranın %12,23 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Toplam orana baktığımızda kontrol grubunda canlı hücrelerin oranı %98,83 iken deney grubunda %71 oranındadır ve deney grubunda ölüm oranı %30 şeklinde bulunmuştur (Tablo 4.4). D-e-MAPP ve D-e-MAPP nanopartiküllerinin MCF-7 hücrelerindeki hücre döngüsü dağılımı sırasıyla G1, S ve G2 evreleri değerleri olarak elde edilmiştir. D-e-MAPP kontrol grubu hücrelerinde G1'de %86,8, S'de %5,1 ve G2 evresinde %5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10). 24 saat boyunca D-e-MAPP IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelerde G1'de %39,4, S'de %23,4 ve G2 evresinde %19,7 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.5). 24 saat boyunca D-e-MAPP nanopartiküllerinin IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelerde G1'de %24,5, S'de %3,9 ve G2 evresinde %22,3 olarak tespit edilirken kontrol grubunda G1'de %44,8, S'de %5,5 ve G2 evresinde %28 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Elde edilen bu sonuçlara bakıldığında hücre döngüsündeki G1 evresinde her iki durumda da kontrol grubuna göre deney grubunda azalma görülmüştür bunun yanı sıra S ve M evrelerindeki hücre popülasyonunun yüzdesini kontrol grubu hücrelerindeki göre azaldığı görülmektedir (Tablo 4.6). Bu durum hücre döngüsünde yavaşlama ve proliferasyonun yavaşlaması anlamını taşımaktadır. Tez çalışmamda D-e-MAPP'ın 24 saat boyunca MCF-7 hücrelerindeki mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin sonuçlarına göre kontrol hücrelerinde canlılık oranı %99,67 olarak tespit edilmiş ve D-e-MAPP'ın IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde canlı hücreler %17,65 iken ölü hücrelerin oranı %82,35 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12). 24 saat boyunca D-e-MAPP nanopartiküllerinin kontrol hücrelerinde canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiş ve D-e-MAPP nanopartiküllerinin IC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde

canlı hücreler %15,40 iken ölü hücrelerin oranı %84,60 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN Formülasyonunun MCF-7 hücreler üzerindeki tetiklenebilecek olan hücre ölüm yollarının belirlenebilmesi için RT² Profiler PCR Array yöntemi ile toplam 96 gen ve bunlardan 12 si kontrol olmak üzere 84 adet genin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında D-e-MAPP uygulanan grupta AKT1 3.91, BAX 3.48, BCL2 3.24, BCL2L1 5.04, BIK 3.63, BNIP3L 6.51, CASP2 4.76, CASP3 2.51, CASP7 4.40, CD27 6.81, NFKB1 5.62, TNF 6.59, TNFRSF21 8.65, TP53 3.69 kat daha fazla ekspre olduğu tespit edilirken D-e-MAPP KLN uygulanan grupta ise AKT1 13.71, BAX 9.13, BCL2 7.78, BCL2L1 27.67, BCL2L11 23.65, BCL2L2 51.88, BIK 24.76, BIRC5 11.38, BNIP3L 22.48, CASP2 11.63, CASP3 10.69, CASP7 48.79, CD27 15.82, CRADD 20.58, DIABLO 32.39, FADD 41.86, GADD45A 57.39, IGF1R 60.46, NFKB1 20.58, PYCARD 11.58, TNF 18.42, TNFRSF10A 39.50, TNFRSF21 48.74, TP53 18.63 ve TP73 76.18 genleri D-e-MAPP uygulanan gruba kıyasla daha fazla ekspresyon göstermişlerdir. Bunlar dışında kalan genler referans genlere (Housekeeping) oranlara daha az sentezlenmişlerdir (Şekil 4.20 ve 4.22).

İnvazyonun belirlenmesi için yapılan çalışmada seramidaz inhibitörü D-e-MAPP ve yeni sentezlenen D-e-MAPP katı lipid nanopartikül formunun MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde invazyon düzeylerine olan etkileri trans-well matrigel invasion chamber yöntemi kullanılarak yapılmıştır. D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulanan MCF-7 hücre hattında hücrelerin invazyon düzeyleri uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre, önemli düzeyde azalma göstermiştir (Şekil 4.23). ImageJ programı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır. Elde edilen verilere göre kontrol grubuna kıyasla tedavi edilen gruptaki hücrelerin invaze olmaları istatistiksel olarak da daha az bulunmuştur (Şekil 4.24). Kanserde büyük bir problem olan hücrelerin başka dokulara invaze olmaları bu sayede azaltılarak tedavinin etkinliğinin artırılmış olması sağlanmıştır. MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulanarak hücrelerin koloni oluşumu incelenmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında zamana ve doza bağlı olarak koloni oluşumunun azaldığı hatta neredeyse tamamen engellediği saptanmıştır. Bu bulgular D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN'nin MCF-7 hücrelerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.25). Meme kanseri MCF-

7 hücrelerin yara açıklığını kapatma deneyi ise “scratch assay” olarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN uygulanan gruplar da kontrol grubuna kıyasla açılan yarığın kapanma süresinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu hücrelerde 24 saat sonunda açılan yarığın neredeyse tamamının kapandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26, 4.27 ve 4.28). MCF-7 hücrelerine D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunun uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Image J programı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda ise açılan yarıkların kapanma oranlarının D-e-MAPP için %13,4 D-e-MAPP KLN için %13,8 iken kontrol grubunda %89,1 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.10). Bu sonuçlar bize kanserli hücrelerin yara açıklığını kısa sürede kapatırken seramidaz inhibitörü olan D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN’nin ortamda bulunması ile bu açıklık gerek apoptozun etkisiyle gerekse hücrelerin tamamen ölmesi ile kapanmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar bize kanserli hücrelerin hem göç yoluyla hem de invaze olma şekliyle başka dokulara metastaz yapmasının önüne geçilebileceğini göstermiştir.

Hücrede meydana gelen DNA hasarı, onarım mekanizmasının kapasitesi aştığı zaman onkogenik sürecin başlamaması için hücre apoptoza yönlendirilir. Bu apoptotik yolda p53 proteini hem intrinsek yolda hem de ekstrinsek yolda önemli bir rol üstlenmektedir [233,234]. P53’ün apoptozdaki etkisi, mitokondri membran geçirgenliğini denetleyen, Bcl-2 protein ailesini aktive ederek olur. Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik üyeleri, mitokondri membranından sitoplazmaya sitokrom-c salınımını aktive eder ve bu sayede kaspazlar oluşur. P53 yokluğunda ise apoptotik süreç başlamaz ve hücrede DNA hasarı olmasına rağmen apoptozun gerçekleşmemesi kanser hücrelerinin tedavilere direnç göstermesine sebep olur. Kanser, hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki homeostatik dengenin bozulması olarak kabul edilebilir. Anti-apoptotik genlerin ve pro-apoptotik genlerin dengesiz ekspresyonu, kanserin özelliği olan kontrolsüz hücre bölünmesine neden olabilir. Bcl-2 ekspresyonu küçük hücreli akciğer kanserinde sık görülür ve bir çalışmada vakaların %76’sını oluşturduğu tespit edilmiştir [235]. Meme kanseri hücre hattı (MCF-7) yapısında meydana gelen bir hasarın onarılması için DNA tamir mekanizması ve bu mekanizmada etkin rol oynayan PARP’lar (Poli ADP-riboz Polimeraz) büyük önem taşımaktadır. Kanserli bir hücrenin programlı ölüm yoluna (apoptoz) sürüklenebilmesi için söz konusu tamirde görevli PARP’ların inhibisyonuna yani PARP İnhibitör (PARPi) ajanlarına ihtiyaç duyulmaktadır [236]. Western blot yöntemi ile MCF-7 hücrelerinde, D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN formunun neden

olduğu apoptozis ile ilgili proteinlerin ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Deney grupları arasında, apoptoz ile ilgili olarak Act1, bcl-2, ve Parp-1 proteinlerinin ekspresyonlarının değişimleri incelenmiştir. House-keeping olarak β -aktin ve GAPDH (Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz) proteinleri kullanılmıştır. Parp-1, Bcl-2 ve Act1 proteinlerinin ekspresyonu incelendiğinde, D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN grubunda kontrole göre artış görülmüştür (Şekil 4.30, 4.31 ve 4.32).

Meme kanseri hastaları arasında sağ kalım sürelerinin farklılık göstermesi, patolojik alt tiplerin olması [237], tümör boyutları [238, 239] ve benzeri çeşitli klinik belirtilerle ilişkilidir. Colombo J ve ark. yaptıkları çalışmada ksenograft fare modelinde inflamasyon ilişkili molekül olan Nf κ B üzerinden melatoninin inflamasyona ve proliferasyona olan etkilerini incelemişler ve sonuç olarak melatoninin hayvanların tümör boyutlarında bir azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir [240]. Başka bir çalışmada, MCF-7 ve T47D hücrelerinin proliferasyonu üzerine melatoninin olası etkileri incelendiğinde, bisfenol A (BPA)'nın etkisiyle ortaya çıkan proliferasyonun melatoninle azaldığı gösterilmektedir [241].

Kanserli hücreler hasarlı DNA'ya sahip olmalarına rağmen normal hücreler gibi bölünme sürecindeki kontrol moleküllerinden etkilenmeden bölünmeye devam ettiği bilinmektedir. p53 genlerinde meydana gelen mutasyonlarının kanserdeki rolü ve önemi birçok çalışmada vurgulanmıştır. Yapılan birçok çalışmada mutant TP53 molekülünün apoptozdaki görevi ve apoptozdan kaçış mekanizması aydınlatılarak tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalması kontrol altına alınabileceği düşünülmektedir. Mutant hala gelmiş olan p53 proteininin kanser oluşumu, kanser gelişimi, invazyon ve metastaz süreçlerindeki mekanizmalarını ve kanser hücrelerinin apoptotik süreçten kaçışında rol aldığı bilinmektedir [242]. Bu protein bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür; hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını kontrol altında tutar (örneğin çok hızlı çoğalmasını engeller). Tez kapsamında tümör oluşturup sonra tedavi edilen farelerden elde edilen meme tümör dokuları, tümör süpresör geni p53, Östrojen reseptör ER, progesteron reseptör PR ve CerB2 onkogeni antijenlerinin ışık mikroskopik düzeyinde hücrelerdeki yerleşimi ve yoğunluğu immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak kabul edilen Serum fizyolojik grubunda immünohistokimyasal boyama sonuçlarına baktığımızda D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN ile tedavi edilen gruplara göre tümör süpresör geni p53, Östrojen reseptör ER, progesteron reseptör PR ve CerB2 onkogeni

antijenlerinin boyanmalarının daha az olduğu ve bazı bölgelerde çok az sayıda pozitif boyamaların olduğu tespit edilmiştir. Özellikle p53 antijenin boyanma yoğunluğuna ve istatistiksel sonuçlarına baktığımız zaman deney gruplarında daha yüksek sayıda olduğu ve boyanmamanın tümör dokunun her yerinde olduğu tespit edilmiştir. Tüm deney grupları değerlendirildiğinde H-skor sonuçlarına göre PR, p53, Cerb2 ve ER antijenlerinin boyanma sonuçlarının D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN gruplarının istatistiksel olarak da anlamlı şekilde sonuç verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.43). Elde edilen sonuçlara göre tümör süpresör geni p53 boyanmasının tedavi edilen gruplarda anlamlı şekilde pozitif sonuç vermesi bu hücrelerde kanser oluşumunun engellenmesinin uygulama yaptığımız D-e-MAPP seramidaz inhibitörü aracılı olduğunu göstermiştir.

Tümör oluşturulup tedavi edilen BALB/c farelere ait meme tümör dokularından alınan kesitler yapısal olarak konfokal mikroskopide ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara baktığımızda kontrol grubu olarak kabul ettiğimiz Serum fizyolojik uygulanan grupta doku genel durumu normal değerlendirilmiş hücre çekirdek ve iskeletlerinde hasar veya değişiklik görülmemiş. İstatistiksel olarak tüm preparatlar incelendiğinde ise kontrol grubundaki hasar ve değişiklikler anlamlı olarak saptanmamıştır (Şekil 4.49). D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN ile tedavi edilen gruplarda ise hücre yapısına bakıldığında kromatin yoğunlaşması, at nalı çekirdek oluşumu ve hücre iskeletinde parçalanma şeklinde apoptoz belirteçleri görülmüştür. D-e-MAPP verilen grupta kontrol grubuna göre dokuda hücreler arası boşluklar nispeten artmış, dokuda hafif büzüşme ve gevşemeler görülmüştür (Şekil 4.45). D-e-MAPP KLN verilen grupta hücreler incelendiğinde kontrol grubuna göre hücrelerde büzüşme ve gevşemelerin olduğu, hücreler arasında boşlukların arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.46). Bu sonuçlar bize kanserli hücreler *in vitro* da olsa *in vivo* da olsa bizim kullandığımız seramidaz inhibitörü aracılığı ile apoptoza yöneldiği hücrelerin öldüğünü göstermiştir. Tümör oluşturulup tedavi edilen BALB/c farelere ait meme tümör dokularından alınan kesitler ince yapısal değişiklikleri incelemek amacıyla TEM mikroskopisinde ayrıntılı olarak incelenmiştir (Şekil 4.50). Genel olarak dokulara baktığımızda kontrol grubuna ait Serum fizyolojik grubunda kanser dokusu özellikleri görülmüştür fakat uygulama yaptığımız D-e-MAPP ve KLN formunda ise daha çok apoptoz belirtilerine rastlanmıştır bu belirtiler ileri seviye tespiti tanesi kromatin yoğunlaşması, hücre iskeletinde delik oluşumu, çekirdek ve hücre büzüşmesi ve dokularda gevşemeler şeklindedir. Hücrelerin ince yapısal analizleri de apoptoz belirtileri olduğunu kanıtlamış ve seramidaz inhibitörü olan

D-e-MAPP'ın hem kendisinin hem de KLN formunun meme kanseri tedavisinde potansiyel bir ajan olduğunu göstermiştir. Meme kanseri tümörü oluşturulmuş farelerden elde edilen tümör dokulardan protein izolasyonu yapılmıştır. Western blot yöntemi sonucunda Parp-1 proteinin ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol proteini olan GAPDH'a göre D-e-MAPP ve D-e-MAPP KLN ile tedavi edilen grupta ekspresyon seviyesi serum fizyolojik grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 4.51).

Günümüzde artan kanser vakaları ve tam olarak tedavi yollarının bulunamaması, alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması ve elde edilecek yeni tedavi yaklaşımları oldukça ilgi çekmeye başlamıştır. Mevcut kullanılan tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması ve yan etkiler göstermesi birçok bilim insanını da yeni araştırmalar konusunda teşvik etmektedir. Kanser ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda sfingolipid metabolizmasının kanser ile ilişkisi ortaya konulmuştur ve sfingolipid metabolizmasının temel molekülü olan seramid ile yapılan çalışmalar oldukça popüler hale gelmiştir. Bu proje ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde D-e-MAPP'ın ve D-e-MAPP nanopartikül formülasyonunun meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri ile ilgili daha fazla bilgi literatüre dahil edilmiş olup ve elde ettiğimiz verilerin meme kanseri tedavisi için daha ileri düzeydeki çalışmalara bir kaynak ve taban oluşturacağı düşüncesindeyiz. Bu tez çalışması ile belirttiğimiz hedeflerin gerçekleşmesi ile mevcut kemoterapi, immünoterapi ve radyasyon terapisi gibi çeşitli geleneksel kanser terapilerinin dışında anti kanser ilaç yüklü nanopartikül uygulaması kullanılan bir yaklaşımın, meme kanseri tedavisinde uygulanabilmesine yönelik araştırma sonuçlarının bir sonraki hedef çalışmalarına katkı sağlayacağı kanısındayız.

KAYNAKÇA

- [1].Giampazolias, E. and Tait, S.W. (2016). Mitochondria and the hallmarks of cancer. *The FEBS journal.*;283(5):803-14. doi: 10.1111/febs.13603.
- [2].Tunçer, Sinem. (2007). Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. *Yeni Sentezlenmiş Işığa Duyarlı Maddeler (Fotosensitayzırlar) Kullanarak Uygulanan Fotodinamik Terapinin Serviks Epitelyal Karsinoma ve Mezotelyoma Hücrelerine Etkisi*. Gebze: T.C. Gebze Yüksek Teknoloji Üniversitesi, T.C. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimler Enstitüsü
- [3].Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (1): 57–70.
- [4].Pourianazar, N. T. (2016). Yayınlanmamış Doktora Lisans Tezi. *Targeted Delivery of Cpg-Oligodeoxynucleotide To Breast Cancer Cells By Poly-Amidoamine Dendrimer-Modified Magnetic Nanoparticles*. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü,
- [5].Calin, G., Dumitru, C., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai. K. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:15524-15529.
- [6]. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balikesir Saglik Bil Dergisi* (5), Sayı:3
- [7].American Cancer Society. (2016). Cancer Facts & Figures. Atlanta: American Cancer Society.
- [8]. Fitzmaurice, C., Dicker, C., Pain, D., Hamavid, A., Moradi-Lakeh, H. M. (2013). The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA oncology*. 2015;1(4):505-27. *JAMA Oncol*. 2015;1(4):505-527.
- [9].Ferlay, J., Soerjomataram. I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M. (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-86.
- [10]. Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal. A. (2012). Global cancer statistics, *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
- [11]. Carey, S.P., D'Alfonso, T.M., Shin, S.J., Reinhart-King, C.A. (2013). Mechanobiology of tumor invasion: engineering meets oncology. *Critical reviews in oncology/hematology*. 83(2):170-83.

- [12]. Mierke, C.T. (2013). Physical break-down of the classical view on cancer cell invasion and metastasis. *European journal of cell biology*.;92(3):89-104.
- [13]. Weinberg, R.A. (2007). Is metastasis predetermined? *Molecular oncology*. 2007;1(3):263-4.
- [14]. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*.;144(5):646-74.
- [15]. Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.*, 25(9):2097-116.
- [16]. Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*.10(8):789-99.
- [17]. Baylin, S.B., Jones, P.A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 8(9). doi: 10.1101/cshperspect.a019505.
- [18]. Gatenby, R.A. (2009). A change of strategy in the war on cancer. *Nature*, ;459(7246):508-9.
- [19]. Natalya, N., Pavlova, and Craig, B. T. (2015). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cancer Biology and Genetics Program*, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA
- [20]. Giordano, S.H., D.S. Cohen and A.U. Buzdar, (2004).Breast carcinoma in men: a population-based study, *Cancer* (101), 1 pp. 51-57.
- [21]. Santen, R. J. (2000). Benign Breast Disease in Women, in Endotext, L. J. De Groot Eds. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- [22]. Grobmyer, S. R., Zhou, G., Gutwein, L. G., Iwakuma, N., Sharma, P., and Hochwald, S. N. (2012). Nanoparticle Delivery for Metastatic Breast Cancer. Maturitas, Nanotechnology: From fundamental concepts to clinical applications for healthy aging A special joint publication with Nanomedicine: *Nanotechnology, Biology and Medicine*, 73 (1): 19–26.
- [23]. Akar, U., Chaves-Reyez, A., Barria, M., Tari, A., Sanguino, A., Kondo Y., Kondo, S., Arun, B., Lopez-Berestein, G., Ozpolat, B. (2008). Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells, *Autophagy* 4:5, 669-679.

- [24]. Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Dizbay, S. S., Tükün, A., Yalçın, B. (2011). Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu", *The Journal of Breast Health*, Vol: 7, No: 2.
- [25]. Ogretmen, B. (2017). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy", *Nature Reviews, Cancer*, Volume 18, 33.
- [26]. Hannun, Y. A. (1996). Functions of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress, *SCIENCE*, VOL. 274
- [27]. Kim, R. H., Takabea, K., Milstienb, S., Spiegelb. S. (2009). Export and functions of sphingosine-1-phosphate, *Biochim Biophys Acta*. July ; 1791(7): 692–696.
- [28]. Cuvillier, O. (2002). Sphingosine in apoptosis signalin, *Biochimica et Biophysica Acta* 1585,153– 162.
- [29]. Draper, J. M., Xia, Z., Smith, R. A., Zhuang, Y., Wang, W., Smith, C. D. (2011). Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Ceramidase, *Mol Cancer Ther.*; 10(11): 2052–2061.
- [30]. Bielawska, A., Greenberg M. S., Perry D., Jayade S., Shayman J. A, McKay C., and Hannun Y. A. (1996). (1S,2R)-D-erythro-2-(N-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an Inhibitor of Ceramidase, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 271, No. 21, pp. 12646–12654.
- [31]. Özçelik, M. F, (2018). Türk Cerrahi Derneği Yeterlilik (Board) Okulu Ders Notları, *Türk Cerrahi Derneği Yayınları*-Nisan, ISBN: 978-605-85624-5-
- [32]. Göktepe Ö., (2019). Yayımlanmış Doktora Tezi. *Ganoderma Lucidum'un Mda-Mb-231 ve Mcf-7 insan Meme Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Çoğalması Üzerine Etkisinin incelenmesi*, Erciyes, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- [33]. Değerli, Ü. (1998). Meme Kanseri., *Genel Cerrahi*. 6. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 288-296.
- [34]. Özısık, Y. ve Baltalı, E. (2004). Meme kanseri. Ü. Yasavul (Ed.). *Hacettepe iç Hastalıkları Kitabı* içinde 1426-1435. (2. Baskı) Ankara;Semih Ofset.
- [35]. Weigelt, B. and Reis-Filho, J.S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol.*; 6:718-730
- [36]. Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktas, S., Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*, 2015; 11: 59-66.

- [37]. Khuwaja, G.A., AbuRezq, A.N. (2004). Bimodal breast cancer classification system. *Pattern Analysis and application.*; 7:235–242.
- [38]. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747-752.
- [39]. Ünçel, M., Aköz, G., Yıldırım, Z., Pişkin, G., Değirmenc, M., Solakoğlu, D., Ayaz, D., Akbulut, G., Diniz G. (2015). Evaluation of clinicopathological features of breast cancer according to molecular subtypes, *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*, 25(3):151-156
- [40]. Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology*, 23(2), S60-S64.
- [41]. Malhotra G. K., Zhao X., Band H., & Band V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955-960.
- [42]. Moynihan, F. (2008). Is ‘basal-like’ carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology*, 75(2), 119-131.
- [43]. Yixiao, F., Mia, S., Shifeng, H., Chengfu, Y., Zongyue, Z., Zhang, L., Xiaojuan, J., Wei, L., Huang, B. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signalling pathways, genomics and molecular pathogenesis, *Genes Dis.* 5,2.
- [44]. Gautam, K., Malhotra, Xiangshan, Z., Hamid, B., Vimla B. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 15;10(10):955-60.
- [45]. Kay, D., Dvorkin-Gheva, A., Robin M., Ying, W., Hassell, J., Gregory R., Pond, Mark Levin, Tim Whelan, Anita L. Bane, Claudin-Low Breast Cancer; *Clinical & Pathological Characteristics*, doi.org/10.1371/journal.pone.0168669
- [46]. Khalique, L.R., Ayhan, A., Weale, M.E., Jacobs, I.J., Ramus, S.J., Gayther, S.A. (2007). Genetic intratumour heterogeneity in epithelial ovarian cancer and its implications for molecular diagnosis of tumours. *J Pathology*, 211(3): 286-295.

- [47]. Balabas, A., Skasko, E., Nowakowska, D., Niwinska, A., Blecharz, P. (2010). Novel germline mutations in BRCA2 gene among breast and breast-ovarian cancer families from Poland. *Fam Cancer*, 9(3): 267-274.
- [48]. Mirza, S., Sharma, G., Prasad, C.P., Parshad, R., Srivastava, A., Gupta, S.D., Ralhan, R. (2007). Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ER alpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci*, 81(4): 280-287.
- [49]. Polyak, K. (2002). Breast cancer gene discovery. *Expert Rev Mol Med*, 4: 1-18.
- [50]. Anderson, D.E. (1971). Some characteristics of familial breast cancer. *Cancer*, 28: 1500-1504.
- [51]. Akdeniz-Ödemiş, D., Tunçer, Ş.B., Çelik, B., Avşar, M., Yazici, H. (2017). The Comparison Of Whole Genome Mirna Expression Levels In BRCA-1 Mutation Carriers", *6.International Congress Of Molecular Medicine*, *molecular Medicine, İstanbul, Türkiye, 22-25 Mayıs 2017*:283.
- [52]. Baskan, S., A.K., Arıbal, E., Özaydın, N., Balcı, P., Yavuz, E. (2012). Meme Kanseri Tarama ve Tanı (İstanbul Meme Kanseri Konsensus Konferansı 2010), *Meme Sağlığı Dergisi*, 8: 100-25.
- [53]. Hwang, E.S., Lichtensztajn, D.Y., Gomez, S.L., Fowble, B., Clarke, C.A. (2013). Survival after lumpectomy and mastectomy for early stage invasive breast cancer: the effect of age and hormone receptor status. *Cancer*, 119: 1402-1411.
- [54]. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balikesir Saglik Bil Dergisi* (5), Sayı:3
- [55]. Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Morgolose, R.G., Deutsch, M., Fisher, E.R., Jeong, J.H., Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*, 347(16): 1233-1241.
- [56]. Edmond, S.N., Shelby, R.A., Kimmick, G.G., Marcom, P.K., Peppercorn, J.M., Keefe, F.J. (2013). Symptom communication in breast cancer: relationships of holding back and self-efficacy for communication to symptoms and adjustment. *J Psychosoc Oncol*, 31(6): 698-711.
- [57]. Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., Clarke, M., Cutter, D., Davies, C., Ewertz, M. (2011). Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence

- and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 378(9804), 1707-1716.
- [58]. Carey, L.A., Dees, E.C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D.T., Collichio, F., Ollila, D.W., Sartor, C.I., Graham, M.L., Perou, C.M. (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancersubtypes. *Clin Cancer Res*, 13(8): 2329-2334.
- [59]. Pritchard, K.I., Shepherd, L.E., O'Malley, F.P., Andrulis, I.L., Tu, D., Bramvvel, V.H., Levine, M.N. (2006). National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of Breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 354(20): 2103-2111.
- [60]. Micog, J.S., Van der Hage, J.A., Van de Velde, C.J. (2007). Preoperative chemoteraphy for woman with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2: CD005002.
- [61]. Harinhand-Herdt, S., Zelnak, A., O'Regan. R. (2009). Endocrine Therapy for Breast Cancer.In:Bland KI, Copeland III EM,eds. *The Breast. Comprehensive Management of Benign and Malignant Disease. 4th ed Saunders-Elsevier; Philadelphia*, pp.1263-85.
- [62]. Beatson, G. (1896). On the treatment of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment,with illustrative cases. *Lancet*; II:105-7.
- [63]. Cinieri S, Orlando L, Fedele P, Cusmai A, D'Amico M, Rizzo P. (2007). Adjuvant strategies in breast cancer: new prospectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gailen International Expert Consensus Conference. *Ann Oncol*, 6: 63- 65.
- [64]. Goldhar, A.S., Vonderhaar, B.K., Trott, J.F., Hovey, R.C. (2005). Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Mol Cell Endocrinol*, 232(1-2): 9-19.
- [65]. Travis, L.B., Demark, W.W., Allan, J.M., Wood, M.E., Ng. A.K. (2013). Aetiology, genetics and prevention of secondary neoplasms in adult cancer survivors, *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 10,(5), 289–301.
- [66]. Uras, C. (2006). Erken Evre Meme Kanseri Cerrahi Tedavi. *Meme Kanseri Sempozyum Dizisi*. 53:93-97.
- [67]. Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*, 12: 264-265.

- [68]. Ourique, F., Kwiecinski, M.R., Felipe, K.B., Correia, J.F., Farias, M.S., Castro, L.S., Grinevicius, V.M., Valderrama J, Rios D, Benites J, Calderon PB, Pedrosa RC, (2015). DNA damage and inhibition of akt pathway in mcf-7 cells and ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 495305.
- [69]. Liu, Y., Wang. R., Zhang. L., Jianhua. L., Lou, K., Shi. B. (2017). The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett*, 13(6): 4685-4690.
- [70]. Lokerse, W.J.M., Bolkestein, M., Dalm, S.U., Eggermont, A.M.M., de Jong, M., Grüll, H., Koning, G.A. (2017). Comparing the therapeutic potential of thermosensitive liposomes and hyperthermia in two distinct subtypes of breast cancer. *J Control Release*, 258: 34-42.
- [71]. Miller, F.R., Miller, B.E., Heppner, G.H. (1983). Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis*. 3(1):22-31.
- [72]. Miller, F.R. (1983). Tumor subpopulation interactions in metastasis. *Invasion Metastasis*, 3(4):234-242.
- [73]. Dalaklioglu, S., Tasatargil, A., Kale, S., Tanriover, G., Dilmac, S., Erin. N. (2013). Metastatic breast carcinoma induces vascular endothelial dysfunction in Balb-c mice: Role of the tumor necrosis factor- α and NADPH oxidase. *Vascul Pharmacol*.59(3-4):103-11.
- [74]. Tao, K., Fang, M., Alroy, J., Sahagian, G.G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*. Aug 9;8:228.
- [75]. Cooper, G.M. and Hausman, R.E. (2006). *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, 3.Baskı, Meral Sakızlı ve Nese Atabey, izmir Tıp Kitabevi, İzmir. 579.
- [76]. Mak, T. (2003). Apoptosis: this death that makes life live. *Biol Blood Marrow Transplant*, 9: 483-488.
- [77]. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2014). Histoloji Konun Anlatımı ve Atlas. Baris Baykal, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 996.
- [78]. Bortner, C.D. and Cidlowski, J.A. Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014; 369(1638): 1-9.
- [79]. Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. (2009). Cell death. *N Engl J Med*, 361(16): 1570-1583.

- [80]. Festjens, N., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. (2006). A well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*, 1757:1371–1387.
- [81]. Golstein, P., Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32:37–43.
- [82]. Hengartner, M.O., Ellis, R.E. and Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499,
- [83]. Ofengeim, D. and Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 727–736.
- [84]. Ross, M.H., Pawlina, W. (2011). Histology a text and atlas. (6th edition). London: Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins. p.93-97.
- [85]. Savitskaya, M. A., and Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 80(11), 1393-1405.
- [86]. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 16 (1): 3-11.
- [87]. Broker, L.E., Kruyt. F.A., Giaccone, G. (2015). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, 11 (9): 3155-3162.
- [88]. Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer. G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825–2837.
- [89]. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 4: 239-257.
- [90]. Noy, N. (2010). Between Death and Survival: Retinoic Acid in Regulation of Apoptosis. *Annual Review of Nutrition*, 30: 201-217.
- [91]. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516.
- [92]. Sakamaki, K., and Satou, Y. (2009). Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J. Fish Biol.*, 74, 727-753.
- [93]. McLuskey, K., and Mottram, J. C. (2015). Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. *Biochem. J.*, 466, 219-232.

- [94]. Boehm, D., Mazurier, C., Giarratana, M. C., Darghouth, D., Faussat, A. M., Harmand, L., and Douay, L. (2013). Caspase3 is involved in the signaling in erythroid differentiation by targeting late progenitors. *PLoS One*, 8, e62303.
- [95]. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.*, 22, 526539.
- [96]. Creagh, E. M. (2014). Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signaling pathways. *Trends Immunol.*, 35, 631640.
- [97]. Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Hengartner, M., Abrams, J. M., Tavernarakis, N., Penninger, J., Madeo, F., and Kroemer, G. (2008). No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ.*, 15, 11131123.
- [98]. Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G., and Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.*, 14, 166180.
- [99]. Savitskaya, M. A. and Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of Apoptosis *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 80, No. 11, pp. 13931405.
- [100]. Van Cruchten, S. and Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*, 2002; 31: 214-223
- [101]. Gupta, S., Agrawal, A., Agrawal, S., Su, H., Gollapudi, S. (2006). A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing*, 3:5-13.
- [102]. Celepli, S., Bigat İ., Celepli P., Karagin P. H. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji* 24/3
- [103]. Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999). An APAF1–cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase9. *J. Biol. Chem.*, 274, 1154911556.
- [104]. Scorrano, L. (2009). Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41, 18751883.
- [105]. Renault, T. T., and Manon, S. (2011). Bax: addressed to kill, *Biochimie*, 93, 13791391.
- [106]. Lithgow, T., Van Driel, R., Bertram, J. F., and Strasser, A. (1994). The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the

- endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane, *Cell Growth Differ.*, 5, 411-417.
- [107]. Adams, J.M., Cory, S. (2001). Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci*, 26:61-6.
- [108]. Adrain, C., Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26:390-7.
- [109]. Spierings, D.C., de Vries, E.G., Vellenga, E. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem*, 52(6): 821-831.
- [110]. Salvesen, G.S. and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(6): 401–410.
- [111]. Curtin, J.F., Cotter, T.G. (2003). Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal*, 15:983-92.
- [112]. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.*, 7:880-885.
- [113]. Mountz, J.D., Zhou, T. (2001). Apoptosis and autoimmunity (in) *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions. WJ Kopman, Lippincott-Williams&Wilkins.*
- [114]. Ulukaya, E. (2003). Apoptozis Ders Notları. Erişim: [<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf>] Erişim tarihi: 04.05.2007.
- [115]. Yılmaz, İ. (2005). Uzmanlık Tezi. *Erişkin ratlarda deneysel varikosele oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi*, İstanbul, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği,
- [116]. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119: 493-501
- [117]. Kressel, M., Groscurth, P. (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.*, 278: 549–56.
- [118]. Aral, H. (1996). Apoptotik hücrelerin tanınma yöntemleri. *Sendrom*, 38-42.
- [119]. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4): 495–516.

- [120]. Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C., (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115.
- [121]. Bardakçı, F., Yenidünya, A. F. (2007). Moleküler biyoloji teknikleri 1:Nükleik asit analiz teknikleri (in) Moleküler Biyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), 519-553, Nobel Yayın, Ankara.
- [122]. Salgame, P., Varadhachary, A. S., Primiano, L. L., Fincke, J. E., Muller, S., Monestier, M. (1997). An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3): 680–681.
- [123]. Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C., (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3: 115.
- [124]. Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C. and Hannun Y. A. (2017). Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in Biological Regulation*, 63: p. 122-131.
- [125]. Grosch, S., Schiffmann, S., Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research*, 51:50–62.
- [126]. Sheridan, M. and Ogretmen B. (2021). The Role of Ceramide Metabolism and Signaling in the Regulation of Mitophagy and Cancer Therapy. *Cancers*, 13, 2475.
- [127]. Pherez-Farah, A., del Carmen López-Sánchez, R., Villela-Martínez Rocío Ortiz-López, L.M. Beltrán, B. E. and Ascención Hernández-Hernández, J. (2022). Sphingolipids and Lymphomas: A Double-Edged Sword. *Cancers*, 14, 2051. <https://doi.org/10.3390/cancers14092051>
- [128]. Novgorodov, S.A., Szulc, Z.M., Luberto, C., Jones, J.A., Bielawski, J., Bielawska, A., Hannun, Y.A., Obeid, L.M. (2005). Positively charged ceramide is a potent inducer of mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*, 280:16096.
- [129]. Rossi, M.J., Sundararaj, K., Koybasi. S., Phillips. M.S., Szulc, Z.M, Bielawska, A, Day, T.A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Ogretmen, B. (2005). *Otolaryngol Head Neck Surg*,132:55.
- [130]. Dindo, D., Dahm, F., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Graf, R., Clavien, P.A. (2006). Cationic long-chain ceramide LCL-30 induces cell death by mitochondrial targeting in SW403 cells. *Mol Cancer Ther*,5:1520.

- [131]. Senkal, C.E., Ponnusamy, S., Rossi, M.J., Sundararaj, K., Szulc, Z., Bielawski, J., Bielawska, A., Meyer, M., Cobanoglu, B., Koybasi, S., Sinha, D., Day, T.A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Ogretmen, B. (2006). Potent antitumor activity of a novel cationic pyridinium-ceramide alone or in combination with gemcitabine against human head and neck squamous cell carcinomas in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 317:1188.
- [132]. Szulc, Z.M., Bielawski, J., Gracz, H., Gustilo, M., Mayroo, N., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., Bielawska, A. (2006). Tailoring structure-function and targeting properties of ceramides by site-specific cationization. *Bioorg Med Chem*, 14:7083.
- [133]. Dindo, D., Dahm, F., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Graf, R., Clavien, P.A. (2006). Therapeutic implications of bioactive sphingolipids: A focus on colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*, 5:1520.
- [134]. Josephine, S., Modica-Napolitano, June, R., (2001). Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49 63–70
- [135]. Bielawska, A., Greenberg, M. S., Perry, D., Jayade, S., Shayman, J. A, McKay, C., and Hannun, Y. A. (1996). (1S,2R)-D-erythro-2-(N-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an Inhibitor of Ceramidase, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 271, No. 21, pp. 12646–12654.
- [136]. Saied, E.M., Arenza, C. (2016) Inhibitors of Ceramidases. *Chemistry and Physics of Lipids* 197,60–68
- [137]. Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 6(1): 112-118.
- [138]. Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*. 16(8): 1093-1107.
- [139]. Riss, T.L., Moravec, R.A., O'brien, M.A., Hawkins, E.M., Niles, A. (2006). Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis. In *“Handbook Of Assay Development In Drug Discovery”*, Ed; Minor LK, CRC Press. 2006; 385-405.
- [140]. Crouch, S.P.M., Kozlowski, R., Slater, K.J., Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*; 160 (1): 81-88.

- [141]. Fan, F., Wood, K.V. (2007). Bioluminescent assays for highthroughput screening. *Assay Drug Dev Techn.* 5(1): 127-136.
- [142]. Longo-Sorbello, G.S.A., Saydam, G., Banerjee, D., Bertino, J.R. (2006). Cytotoxicity and cell growth assays. In “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Ed; Celis JE, Elseiver Academic Press, *Burlington*. 315-325.
- [143]. Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
- [144]. Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005, 11, 127–152.
- [145]. Taşkın, A., Ulusall, H., Taşkın, S., Tarakçıoğlu, M. (2020). Tetrazolium-Based Cytotoxicity Tests May Not Always Reflect Accurate Results, *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* (Journal of Harran University Medical Faculty)17(1):6-12. DOI: 10.35440/hutfd.600652
- [146]. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55–63.
- [147]. Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., Blázquez-Castro, (2018). A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*, 120, 159–167.
- [148]. Liu, Z., Tabakman, S., Welsher, K., Dai, H. (2009). Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.*2:85–120.
- [149]. Orive, G., Gascon, A.R., Hernández, R.M., Domínguez-Gil, A., Pedraz, J.L. (2004). Techniques: new approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *Trends Pharmacol Sci.*25:382–7.
- [150]. Razzacki, S.Z., Thwar, P.K., Yang, M., Ugaz, V.M., Burns, M.A. (2004). Integrated microsystems for controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*56:185–98.
- [151]. Arayne, M.S., Sultana, N., Qureshi, F. (2007). Nanoparticles in delivery of cardiovascular drugs. *Pak J Pharm Sci.* 2007;20:340–8.

- [152]. Patra, J.K., Baek, K-H. (2014). Green nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. *J Nanomater.*2014:219.
- [153]. Joseph, R.R., Venkatraman, S.S. (2017). Drug delivery to the eye: what benefits do nanocarriers offer. *Nanomedicine.*12:683–702.
- [154]. Rudramurthy, G.R., Swamy, M.K., Sinniah, U.R., Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*,21:836.
- [155]. Lam, P-L, Wong, W-Y., Bian, Z., Chui, C-H., Gambari, R. (2017). Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. *Nanomedicine.*12:357–85.
- [156]. Haba, Y., Kojima, C., Harada, A., Ura, T., Horinaka, H., Kono, K. (2007). Preparation of poly (ethylene glycol)-modified poly (amido amine) dendrimers encapsulating gold nanoparticles and their heat-generating ability. *Langmuir.*23:5243–6.
- [157]. Shi, X., Sun, K., Baker, J.R. (2008). Spontaneous formation of functionalized dendrimer- stabilized gold nanoparticles. *J Phys Chem C.*112:8251–8.
- [158]. Park, S-H., Oh, S-G., Mun, J-Y., Han, S-S. (2006). Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. *Coll Surf B.*48:112–8.
- [159]. Grislain, L., Couvreur, P., Lenaerts, V., Roland, M., Deprez-Decampeneere, D., Speiser, P. (1983). Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int. J. Pharm.*15(3):335-345.
- [160]. Dubernet, C., Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*54(Supplement):631-651.
- [161]. Muller, R., Maaben, S., Weyhers, H., Mehnert, W. (1992). Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with Poloxamine 908 and Poloxamer 407. *J. Drug Target.*4(3):161-170.
- [162]. Lamprecht, A., Ubrich, N., Yamamoto, H., Afer, U., Takeuchi, H. (2001). Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*299(2):775-781.
- [163]. Subia, B., Kundu, S. (2013). Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin-albumin nanoparticles as carriers. *Nanotechnology*, 24(3):035103.

- [164]. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L., Farokhzad, O. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 5(4):505-515.
- [165]. Kreuter, J. (1991). Peroral administration of nanoparticles. *Adv Drug Del Rev*, 7: 71-86.
- [166]. Chowdary, K.P.R., Rao, A.S. (1997). Nanoparticles as drug carriers. *Indian Drugs* 34(10): 549-56.
- [167]. Rao, G.C.S., Kumar, S.M., Mathivanan, N., Rao, M.E.B. (2004). Advances in nanoparticulate drug delivery systems. *Indian Drugs* 41(7): 389-95.
- [168]. Muller, R.H., Runge, S.A., Ravelli, V., Thünemann, A.F., Mehnert, W., Souto, E.B. (2008). Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur J Pharm Biopharm.* 68(3): 535-544
- [169]. Yang, S., Zhu, J., Lu, Y., Liang, B., Yang, C., (1999). Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. *Pharm Res* ,16(5): 751-757.
- [170]. Mehnert, W., Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47,165–196
- [171]. Rupenagunta, A., Somasundaram, I., Ravichandiram, V., Kausalya, J., Senthilnathan, B. (2011). Solid lipid nanoparticles- A versatile carrier system. *J Pharm Res.* 4(7): 2069-2075.
- [172]. Fahr, A. and Liu, X. (2007). Drug delivery strategies for poorly water soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 4(4): 403-416. [DOI]
- [173]. Schwarz, C., Mehnert, W. (1997). Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm*, 157(2):171–179
- [174]. Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J., Müller, R. (1994). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J Control Rel* 30(1):83–96
- [175]. Jennings, V., Lippacher, A., Gohla, S. (2002). Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *J Microencapsul* 19(1):1–10
- [176]. Ekambaram, P., Abdul Hassan Sathali, A., Priyanka, K. (2012). Solid Lipid Nanoparticles: A Review. *Sci Revs Chem Commun* 2(1): 80-102

- [177]. Elldem, T., Speiser, P., Hineal, A. (1991). Optimization of spray-dried and congealed lipid microparticles and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm Res* 8: 47-54
- [178]. Waghmare, A.S., Grampurohit, N.D., Gadhave, M.V., Gaikwad, D.D., Jadhav, S.I. (2012). Solid lipid nanoparticles: A promising drug delivery System. *IRJP* 3(4): 100-107.
- [179]. De Labouret, A., Thioune, O., Fesii, H., Devissaguet, J.P., Puiseieux, F. (1995). Application of an original process for obtaining colloidal dispersion of some coating polymers. Preparation, Characterization, industrial scaling up. *Drug Develop Ind Pharm* 21: 229-41 [DOI]
- [180]. Cavalli, R., Marengo, E., Rodriguez, L., Gasco, M.R. (1996). Effects of some experimental factors on the production process of solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 42(2): 110-115
- [181]. Chen, H., Chang, X., Du, D., Liu, W., Liu, J., Weng, T., Yang, Y., Xu, H., Yang, X. (2006). Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J Control Release* 110(2): 296-306.
- [182]. Muller, R.H., Mäder, K., Gohla, S.H. (2000). Solid Lipid Nanoparticles For Controlled Drug Delivery- A Review of the State of the art. *Eur J Pharm Bio Pharm* 50(1): 161-177.
- [183]. Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O. (2003). Preparation of Solid Lipid Nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 257: 153-160
- [184]. Freitas, C., Mullera, R.H. (1998). Spray drying of solid lipid nanoparticles (SLNTM). *Eur J Pharm Biopharm* 46(2): 145-151
- [185]. Schubert, M.A., Muller-Goymann, C.C. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles— evaluation of the method and process parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 55(1): 125-131
- [186]. Mishra, H., Mishra, D., Mishra, P.K., Nahar, M., Dubey, V., Jain, D.K. (2010). Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of Hepatitis B surface antigen for vaccination using subcutaneous route. *J Pharm Pharmaceut Sci* 13(4): 495-509.

- [187]. Attama, A., Reichl, S., Müller-Goymann, C. (2008). Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int J Pharm* 355(1–2):307–313
- [188]. Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M.H. (1997). Physicochemical Characterization of Lipid Nanoparticles and Evaluation of their Drug Loading Capacity and Sustained Release. *J. Control. Rel.*48: 223-236.
- [189]. Anthony, A., Attama, Mumuni A.M. and Philip, F. (2012) Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development, *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*,108-143
- [190]. Madkhali, O. A. (2022) Perspectives and Prospective on Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Molecules* 2022, 27, 1543.
- [191]. Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, S.A. (2003). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, suppl. 1, 131-S155.
- [192]. Vejselova, D., Kutlu, H.M., Kuş G., Kabadere, S., Uyar, R. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of ceranib-2 offering potential for a new antineoplastic agent in the treatment of cancer cells. *Turk J Biol*, 38: 916-921
- [193]. Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., Takata, K. (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 45 (1), 49–53.
- [194]. Glauert, A.M. and Lewis, P.R. (1998). Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. *Princeton University Press*, New Jersey, ISBN: 0-691-00749-2 (Cloth) , ISBN: 0-691-00900-7 (pbk).
- [195]. Girgin, B. (2017). Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. *Melatonin yüklü aljinat/gam arabik kürelerin üretimi ve ilaç salım özelliklerinin araştırılması* Aydın, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
- [196]. Gencer, S., Oleinik, N., Kim, J., Selvam, S. P., Palma, R. D. Dany, M. R., Can, E., Philip, H., Ogretmen, B. (2017). TGF- β receptor I/II trafficking and signaling at primary cilia are inhibited by ceramide to attenuate cell migration and tumor metastasis, *Sci. Signal.* 10, eaam7464
- [197]. Ağca, C.A., Kırıcı, M., Can, A., Yumak, Y. (2019). The Effect of 5-Fluorouracil and Resveratrol Combination on Apoptosis in A549 Human Lung Cancer Cell Line. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 21(3):359-368.

- [198]. Çınar, İ. (2020). Gossypin'in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Hidrojen Peroksit Hasarına Karşı Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi Evaluation of Protective Effects of Gossypin against Hydrogen Peroxide Damage in L929 Fibroblast Cells. *Kafkas J Med Sci*; 10(1):15–23
- [199]. Watanabe, M., Yamaguchi, K., Chijiwa, K., Tanaka, M. (2001). FR167653 Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research*. 101: 146-151.
- [200]. Furuta, K., Kakita, A., Takahashi, T., Tomiya, T., Fujiwara, K. (2000). Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. *Hepatology Research*. 17: 223-236.
- [201]. Ehrenfried, J.A., Ko. T.C., Thompson. E.A., Evers, B.M. (1997). Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery*. 122 (5): 927-935.
- [202]. Gezginci-Oktayoglu, S., Tunali, S., Yanardag, R., Bolkent. S. (2008). Effects of Z-FA.FMK on D-galactosamine/tumor necrosis factor- α induced kidney injury and oxidative stress in mice. *Mol Cell Biochem* 309: 9-20.
- [203]. Cengiz, M., Ayhancı, A., Kutlu, H.M., Musmul, A. (2016). Potential therapeutic effects of silymarin and silymarin-loaded solid lipid nanoparticles on experimental kidney damage in BALB/c mice: biochemical and histopathological evaluation, *Turk J Biol* 40: 807-814
- [204]. Aktay, G., Deliorman, D., Ergun, E., Ergun, F., Yesilada, E. and Çevik, C. (2000). Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 121.
- [205]. Sanz, N., Fernandez, C.D, Simon, L.F, Alvarez A. and Cascales, M. (1998). Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1384, 66-78, p.
- [206]. Theocharis, S.E, Margeli, A.P, Skaltsas, S.D, Spiliopoulou, C.A. and Koutselini, S. (2001). Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study, *Toxicology* 161, 129-138, p.
- [207]. Yuksel, B., Kilic, S., Lortlar, N., Tasdemir, N., Sertyel, S., Bardakci, Y. (2014). Environmental Tobacco Smoke Exposure during Intrauterine Period, Promotes Caspase Dependent and Independent DNA Fragmentation in Sertoli-Germ Cells. *ISRN Obstet Gynecol*.170124.

- [208]. Bayram, Ş., Ersoy, O., Çerkezayabekir, A., Sapmaz-Metin, M., Karaca, T., Kızılay Özfidan, G., (2020). Fukoidanın Diyabetik Sıçan Testis Dokularındaki PCNA, INSL3, JNK, TGF- β 1, IL-1 β ve Akt İfadelerine Etkisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 46 (3) 277-284,
- [209]. Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2006). Hücre: Moleküler Yaklaşım, (çev. Sakızlı, M., Atabey, N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, Üçüncü Baskı, 714 s
- [210]. Aslan, F.E., Gürkan, A. (2007). Kadınlarda Meme Kanseri Risk Düzeyi, *Meme Sağlığı Dergisi*,3:2
- [211]. Akar, U., Chaves-Reyez, A., Barria, M., Tari, A., Sanguino, A., Kondo, Y., Kondo, S., Arun B., Lopez-Berestein, G., and Ozpolat, B. (2008). Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells", *Autophagy* 4:5, 669-679
- [212]. Moro, K., Kawaguchi, T., Tsuchida, J., Gabriel, E., Qi, Q., Yan, L., Wakai, T., Takabe, K., Nagahashi, M. (2018). Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. *Oncotarget*, 9(28): 19874–19890.
- [213]. Koçak, S., Çelik, L., Özbaş S., Dizbay Sak S., Tükün A., Yalçın B. (2011). Meme Kanseri Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi Ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu. *The Journal of Breast Health*. Vol: 7, No: 2.
- [214]. Satija, A., Bhatnagar, S. (2017). Complementary Therapies for Symptom Management in Cancer Patients. *Indian J Palliat Care*.23(4):468-79.
- [215]. Park, J.W., Hong, K., Kirpotin, D.B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J. (2002). Anti- HER2 Immunoliposomes. Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery.8(4):1172-81.
- [216]. Tola, H.T. (2008). Yayımlanmış Tıpta Uzmanlık Tezi. *Doktorubisin İle Oluşturulan DeneySEL Kardiyotoksisite Üzerine N- Asetilsisteinin Biyokimyasal Ve Histopatolojik Düzeylerdeki Koruyucu Etkilerinin Araştırılması*, Isparta, T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı.
- [217]. Zhang, A., Sheng, Y. ve Zou, M., (2017). Antiproliferative activity of Alisol B in MDAMB-231 cells is mediated by apoptosis, dysregulation of mitochondrial functions, cell cycle arrest and generation of reactive oxygen species, *Biomed Pharmacother*, 87, 110-117.

- [218]. Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., Benoit, J.P. (2008) Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*.29:3477-3496.
- [219]. ULU G. T. (2019). Yayınlanmış Yüksek lisans Tezi. *Determination of Therapeutic Effects of Multifunctional Micelle-Based Nanocarriers On Breast Cancer Cells*, İzmir, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
- [220]. Van De Waterbeemd, H., Smith, D. A., Beaumont, K., and Walker, D. K. (2001). Propertybased design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(9), 1313-1333.
- [221]. Chavan, S. S., Ingle, S. G., and Vavia, P. R. (2013). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticle-based nasal spray of budesonide. *Drug Delivery and Translational Research*, 3(5), 402-408.
- [222]. Chirio, D., Gallarate, M., Peira, E., Battaglia, L., Muntoni, E., Riganti, C., and Schiffer, D. (2014). Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(3), 746-758.
- [223]. Liu, Z., Zhang, X., Wu, H., Li, J., Shu, L., Liu, R., and Li, N. (2011). Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles of baicalin for ocular drug delivery system in vitro and in vivo. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(4), 475-481.
- [224]. Gastaldi, L., Battaglia, L., Peira, E., Chirio, D., Muntoni, E., Solazzi, I., and Dosio, F. (2014). Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), 433-444.
- [225]. İzgördü, H., Vejselova Sezer, C., Bayçelebi, K., Baloğlu, M., Kutlu, H.M. (2022). Cytotoxic Impact of N-Oleoyl ethanolamine on Bone Cancer Cells, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 22, 1119-1123.
- [226]. Yildiz-Ozer M., Oztopcu-Vatan, P., Kus, G. (2018). The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non small cell lung cancer cells in vitro. *Cytotechnology*, 70:387–396

- [227]. Vejselova, D., Kutlu, H.M., Kuş G., Kabadere, S., Uyar, R. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of ceranib-2 offering potential for a new antineoplastic agent in the treatment of cancer cells. *Turk J Biol*, 38: 916-921
- [228]. Danışman-Kalındemirtaş F., (2022). Cytotoxic and Apoptotic Effects of Carmofur and Vitamin C Combination on HCT116 Colon Cancer Cells. *Experimed*; 12(1): 6-11
- [229]. Raisova, M., Goltz, G., Bektas, M., Bielawska, A., Riebeling, C., Hossini, A.M., Eberle, J., Hannun, Y.A., Orfanos, C.E., Geilen, C.C. (2002). Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Letters* 516:47-52.
- [230]. Bielawska, A., Bielawski, J., Szulc, Z.M., Mayroo, N, Liu X, Bai A, Elojeimy S, Rembiesa B, Pierce J, Norris JS, Hannun, Y.A. (2008). Novel analogs of D-e-MAPP and B13. Part 2: signature effects on bioactive sphingolipids. *Bioorg Med Chem*;16:1032-1045.
- [231]. Zdzislaw, M., Szulc, N.M., AiPing, B., Bielawski, J., Xiang, L, James S, Yusuf A, Alicja, B. (2008). Novel analogs of D-ef-MAPP and B13. Part 1: synthesis and evaluation as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem* 16:1015–1031
- [232]. Choi, M.S., Anderson. M.A., Zhang, Z., Zimonjic, D.B., Popescu, N., Mukherjee, A.B. (2003). Neutral ceramidase gene: role in regulating ceramide-induced apoptosis. *Gene*, 315:113-122
- [233]. Zörnig, M., Hueber, A., Baum W, Evan G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*,; 1551(2): 31-37.
- [234]. Dumont, P, Leu, J.J., Della Pietra, A.C., George, D.L., Murphy, M. (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*, 33(3): 357-365.
- [235]. Kaiser, Ü., Şili, M., Haag, U., Neumann, K., Kreipe, H., Kogan, E., Havemann, K. (1996). Küçük hücreli akciğer kanserinde bcl-2 - proteinin ifadesi. *Akciğer Kanseri*. 15 (1): 31-40.
- [236]. Yıldırım, A., (2021). Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. *Olaparib-Paclitaxel Kombinasyonunun Parp1/2 İnhibitör Dirençli Mcf7 Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Biyogöstergeler Üzerine Etkisi*, Bingöl, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,

- [237]. Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C., Voduc, D., Speers, C. H., Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*, 28(20), 3271-3277.
- [238]. Marinelli, B., Espinet-Col, C., Ulaner, G. A., McArthur, H. L., Gonen, M., Jochelson, M., & Weber, W. A. (2016). Prognostic value of FDG PET/CT-based metabolic tumor volumes in metastatic triple negative breast cancer patients. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 6(2), 120-127.
- [239]. Wang, X. X., Jiang, Y. Z., Li, J. J., Song, C. G., & Shao, Z. M. (2016). Effect of nodal status on clinical outcomes of triple-negative breast cancer: a population-based study using the SEER 18 database. *Oncotarget*, 7(29), 46636-46645. doi:10.18632/oncotarget.9432
- [240]. Colombo, J., Jardim-Perassi, B. V., Ferreira, J. P. S., Braga, C. Z., Sonehara, N. M., Junior, R. P., Zuccari, D. (2018). Melatonin Differentially Modulates NF-small ka, CyrillicB Expression in Breast and Liver Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*, 18(12), 1688-1694.
- [241]. Wang, T., Liu, B., Guan, Y., Gong, M., Zhang, W., Pan, J., Ye, L. (2018). Melatonin inhibits the proliferation of breast cancer cells induced by bisphenol A via targeting estrogen receptor-related pathways. *Thorac Cancer*, 9(3), 368-375.
- [242]. Gülsar, M.G., Özdemir, H.N. Çeviker, K., Bağcı, Ö., Tatar, B., Yazkan, R., Erdemoğlu, E. (2016). Tümöröenezde P53 Geni ve Genetik Tedavi Yaklaşımları. *Journal of Engineering Sciences and Design* 4(2), 133-135.
- http-1 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-erythro-MAPP> (Erişim tarihi: 25.05.2022)
- http-2 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SolidLipidNanoparticle.jpg> (Erişim tarihi 26.05.2022)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hüseyin İZGÖRDÜ

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2018-2019 Tezsiz Yüksek Lisans – Üsküdar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İş Sağlığı ve Güvenliği Anabilim Dalı, İş Sağlığı ve Güvenliği Tezsiz Yüksek Lisans
- 2017- 2022 Doktora – Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı
- 2012 – 2014 Yüksek Lisans- Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı
- 2008 – 2012 Lisans- Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
- 2004-2007 Lise- Şanlıurfa Anadolu Lisesi

Ulusal ve Uluslararası Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

- Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Vejselova Sezer, Emre Çömlekçi, Hatice Mehtap Kutlu, Gökhan KUŞ, “A 5-Fluorouracil Derivative: Carmofur as a New Potent Agent for Inhibition of Human Prostate and Breast Cancer Cell Lines” Iran J Sci Technol Trans Sci, <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01227-9>
- Hüseyin İZGÖRDÜ*, Canan Vejselova Sezer, Kadir Bayçelebi, Murat Baloğlu, Hatice Mehtap Kutlu, “Cytotoxic Impacts of N-Oleylethanolamine in Bone Cancer Cells”, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2022, 22, 1119-1123, 10.2174/1871520621666210617091138
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Vejselova Sezer, Emre Çömlekçi, Hatice Mehtap Kutlu, “Characteristics of apoptosis induction in human breast cancer cells treated with a ceramidase inhibitör”, Cytotechnology, doi.org/10.1007/s10616-020-00436-1.
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Vejselova Sezer, Emre Çömlekçi, Hatice Mehtap Kutlu, “Ellajik Asidin İnsan Akciğer Kanseri Üzerine

Antiproliferatif Etkinliklerinin İn Vitro Araştırılması”, BŞEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6 (2), 397-403, 2019

- Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Veyselova Sezer, Emre Çömlekçi, Hatice Mehtap Kutlu, “Investigation of D-e-MAPP-derived Cytotoxicity on Human Prostate Cancer Cells” , BŞEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6. Cilt - Prof. Dr. Fuat SEZGİN Bilim, Yılı Özel Sayısı, 204-212, 2019, BSEU Journal of Science, DOI: 10.35193/bseufbd.597942
- Yakup ŞENYÜZ, Kemal DİNDAR, Mehmet GÜLMEZ, Hüseyin İZGÖRDÜ “A Preliminary Study on The Fauna of Dung Beetle (Scarabaeidae, Coleoptera) At Horzum Village of ŞANLIURFA” DPÜ-Fen-Bilimleri Enstitüsü Dergisi 39. Sayı, Aralık 2017
- Yakup ŞENYÜZ, Kemal DİNDAR, Mehmet GÜLMEZ, Hüseyin İZGÖRDÜ, "Bursa Aphodiinae (Coleoptera, Scarabaeidae) Türleri Üzerine Bir Değerlendirme"- DPÜ-Fen- Bilimleri Enstitüsü Dergisi 32. Sayı

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler:

- Hüseyin İZGÖRDÜ, Hatice Mehtap Kutlu, Canan Veyselova Sezer, Abdul Hafiz Majeedy, “İnsan Hepatokarsinoma Hücrelerinde Seramidaz İnhibisyonuna Bağlı Hücre Ölüm Yollarının Araştırılması”, 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi, Online, 17-19 Mart 2022
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Hatice Mehtap Kutlu, Canan Veyselova Sezer, Nesil Ertorun “Proapoptotic And Cytotoxic Effects Of Virkon-S Disinfectant On Epithelioma Papillosum Cyprini (*Cyprinus Carpio*, L., 1758) Cells” INTERNATIONAL SIIRT CONFERENCE ON SCIENTIFIC RESEARCH, November 5-7, 2021 / Siirt University
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Hatice Mehtap Kutlu, Canan Veyselova Sezer, “Cytotoxicity assessment of D-erythro-MAPP and nanoparticle formulation in breast cancer cells”, Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi, İstanbul-Online 16-18.09.2021
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Hatice Mehtap Kutlu, Emre Çömlekçi, Canan Veyselova Sezer, “A Study on Inducing Cytotoxicity Cell Death on Human Osteosarcoma Cells by N-Oleoyl ethanolamine Application, 9th

International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Kars-Online, 06-08.12.2020

- Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Vejselova Sezer, Emre Çömlekçi, Hatice Mehtap Kutlu, “İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde D-Erythro-Mapp’ın Antikanser Özelliklerinin Araştırılması”, 1st INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CANCER RESEARCH CONGRESS, Sözlü Sunum, 18-22 September, 2019, Diyarbakır
- Emre Çömlekçi, Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Vejselova Sezer, O. Tansel Korkmaz, Hatice Mehtap Kutlu, “Bir seramidaz inhibitörü olan N-Oleoyethanolamine bileşiğinin A549 ve Beas-2B hücreleri üzerindeki sitotoksik ve morfolojik değişimlerinin araştırılması”, 1st INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CANCER RESEARCH CONGRESS, Sözlü Sunum, 18-22 September, 2019, Diyarbakır
- Canan Vejselova Sezer, Hatice Mehtap Kutlu, Hüseyin İZGÖRDÜ, Emre Çömlekçi, “A ceramidase inhibitor-nanoparticle formulation cause cell death an cytotoxicity on human breast cancer cells”, 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019) 28-29 June 2019, Ankara
- Emre Çömlekçi, Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Vejselova Sezer, Hatice Mehtap Kutlu, “Evaluation of the cytotoxicity of D-erythro-MAPP nanoparticle formulation on human lung cancer”, 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019) 28-29 June 2019, Ankara
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Vejselova Sezer, Emre Çömlekçi, Hatice Mehtap Kutlu, “Investigation of anti-cancer of D-erythro-MAPP in human prostate cancer cells”, 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019) 28-29 June 2019, Ankara
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Hatice Mehtap Kutlu, Emre Çömlekçi, Canan Vejselova Sezer, “Karmofurun prostat kanseri hücrelerine karşı antikanser özelliklerinin araştırılması”, 7. Multidisipliner Kanser Araştırma & 1. Temel Onkoloji Kongresi, Uluslararası Katılımlı, 11-14 Ekim 2018, Seferihisar, İzmir

Uluslar-Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

- Hüseyin İZGÖRDÜ, Hatice Mehtap Kutlu, Emre Çömlekçi, Canan Veyselova Sezer, “INHIBITION OF LUNG CANCER CELLS WITH A CERAMIDASE INHIBITOR, 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Kars-Online, 06-08.12.2020
- Hatice Mehtap Kutlu, Emre Çömlekçi, Hüseyin İZGÖRDÜ, Canan Veyselova Sezer, Gökhan Kuş, “Evaluation the Cytotoxic Effect of Carmofur on Mcf-7 Human Breast Cancer Cell Line”,– 25. Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Amsterdam-2018
- Tuba YAĞCI, Hüseyin İZGÖRDÜ, Eda ŞEN, “Bioaccumulation of Heavy Metals and Effect on Chromosomal Fractures in Subterranean Mammals (Rodentia:Spalacidae)”, ISEEP-2017 VIII. International Symposium on Ecology and Environmental problems-Ekim 2017.
- Tuba YAĞCI, Hüseyin İZGÖRDÜ, Eda ŞEN, “Bilecik ilindeki *Nannospalax xanthodon* (Satunin, 1898) türüne ait bireylerde Kromozomal Polimorfizmin Belirlenmesi” 12. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Muğla, 2015
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Yakup Şenyüz, Hasan Ari, Ferhat Altunsoy, Osman Sert, “Adli Açıdan Önemli Olan Sarcophagidae (Diptera) Faunasının 3 Aylık Aktivitesinin Kütahya ilinde Belirlenmesi” 22. Ulusal Biyoloji Kongresi- 2014 Haziran
- Hasan Ari, Hüseyin İZGÖRDÜ, Mehmet Gülmez, Kemal Dindar, Yakup Şenyüz- İçel, Tarsus “Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae) Faunası Türleri Üzerine Bir Çalışma”, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi- Ekoloji 2013 Sempozyumu (2-4 Mayıs)
- Kemal Dindar, Mehmet Gülmez, Hüseyin İZGÖRDÜ, Yakup Şenyüz, “Eskişehir Çevresi Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae) Faunasına katkılar”, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi- Ekoloji 2013 Sempozyumu (2-4 Mayıs)

- Mehmet Gülmez, Hüseyin İZGÖRDÜ, Kemal Dindar, Yakup Şenyüz, “Bursa Aphodiinae (Coleoptera, Scarabaeidae) Türleri Üzerine Bir Değerlendirme” Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi- Ekoloji 2013 Sempozyumu (2-4 Mayıs)
- Hüseyin İZGÖRDÜ, Mehmet Gülmez, Kemal Dindar, Yakup Şenyüz, “Şanlıurfa Scarabaeidae (Coleoptera) Faunası Üzerine Ön Çalışmalar” Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi- Ekoloji 2013 Sempozyumu (2-4 Mayıs)

Burslar:

- TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB), 2211 C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu. 2019-2022.
- Yükseköğretim Kurulu, 100/2000 YÖK Doktora Bursu, (Öncelikli Alan: Nanobiyoteknolojik Gülümlü İlaçlar) 2018-2022.
- 1002- TÜBİTAK- Hızlı Destek Programı, Doktora Bursiyeri (Proje: Meme Kanseri Hücrelerinde D-erythro-MAPP ve Nanopartikül Formülasyonunun Neden Olduğu Hücre Ölüm Mekanizmalarının Araştırılması). Şubat 2019-Şubat 2020.

Katılan Etkinlikler:

- 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği, **Biyolojik Verilerin İstatistiksel Analizi Kursu**, Online 19 Mart 2022
- 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği, **LC-MS/MS Proteomiks Kursu**, Online 19 Mart 2022
- 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği, **Organoid Modeller Kursu**, Online 19 Mart 2022
- 24 Ağustos 2020- **Uygulamalı Mikroskopi ve Görüntü Analizi Kursu**, Maia Sağlık Danışmanlık, Hacettepe Üniversitesi-Ankara
- 16 Mart 2019- **CRISPR/Cas9 Gen Düzenleme Çalıştay**, Eskişehir Teknik Üniversitesi-Eskişehir
- 26 Şubat 1 Mart 2019- **Hücre Kültürü ve Sonrası Araştırma Yöntemleri Kursu**- Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, -Ankara

- 13-14 Haziran 2019- **Lipid Araştırmalarında Kanser ve Lipidomiks Çalıştayı**, Eskişehir Teknik Üniversitesi-Eskişehir
- 17 Mayıs 2019- **Tübitak Destekli 3. Lipit Araştırmaları Çalıştayı**, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- 11-14 Ekim 2018- **Hücre Ölümü / Sitotoksikite Çalıştayı**, 7. Multidisiplinler Kanser Araştırma & 1. Temel Onkoloji Kongresi, İZMİR
- 03-04 Mayıs 2018 - **Leica Electron Microscope Sample Preparation of Biological Materials**- Acıbadem Mehmet Aydınlar Üniversitesi-İstanbul
- 08-09 Şubat 2018 - **Kantitatif Real Time PCR Uygulamaları Kursu** - Ankara Üniversitesi-Biyoteknoloji Enstitüsü-Ankara
- 11-22 Eylül 2017 - **10. Uygulamalı Hücre Kültürü ve Moleküler Biyoloji Araştırma Kursu**- Atlas Biyoteknoloji Laboratuvarı-Ankara
- 15-24 Şubat 2016 – **Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası**- Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi- Ankara
- 01-10 Temmuz 2014 - **Uygurliklar Vadisinde Ekoloji Temelli Doğa Eğitimi**- Adnan Menderes Üniv. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-Aydın
- 01-06 Temmuz 2013 - **2. Taksonomi Yaz Okulu** (Moleküler Yöntemler ve Yeni Yaklaşımların Kesişme Noktası)- Ege Üniv. Fen-Fakültesi Biyoloji Bölümü- İzmir
- 15.03.2009 **Eğitim Sertifikası** (ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi) - Genç Danışmanlık Merkezi - Kütahya
- 08.03.2009 **Eğitim Sertifikası** (ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi) - Genç Danışmanlık Merkezi – Kütahya

Projeler:

- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “Hypericum perforatum Katı Lipit Nanopartikül Yüklü Tip-1 Kollajen Hidrojel Tabanlı Biyomalzeme Geliştirilmesi”, Bütçe: 39.936,78 TL, **Araştırmacı**, Ocak-2022-devam ediyor.
- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “Katı Lipit Nanopartikül Formunda Kollajen Tip-1 Sentezi

ve Karakterizasyonu”, Bütçe: 39.656,00 TL, **Araştırmacı**, Ocak-2022-devam ediyor.

- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “Makrofaj Hücrelerinde Ceranip-2 İnhibitörünün Etkisinin TEM Mikroskopisi ile İncelenmesi”, Bütçe: 9.739,80TL, **Araştırmacı**, Nisan-2021-devam ediyor.
- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “İnsan Hepatosit Karsinoma Hücrelerinde Seramidaz İnhibisyonu Nedenli Sitotoksitenin Araştırılması”, Bütçe: 7.500 TL, **Araştırmacı**, Nisan-2021-devam ediyor.
- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “Virkon-S’in Sazan (Cyprinus carpio L., 1758) Epiteyoma Papillosum Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif, Sitotoksik ve Proapoptotik Etkilerinin Araştırılması” Bütçe: 39.943,52 TL, **Araştırmacı**, Ekim-2021-devam ediyor.
- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “Akciğer kanserinde seramid metabolizması ile TERT translokasyonunun ilişkisinin araştırılması” Bütçe: 19.116,00 TL, **Araştırmacı**, Ekim-2021-devam ediyor.
- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “Telomeraz Ekspresyonunun siRNA Aracılı Susturulması ile Seramidaz İnhibitörü (Seranib-2) Nedenli Hücre Ölüm Yollarının Araştırılması” Bütçe: 19.998,94 TL, **Araştırmacı**, Ekim-2021-devam ediyor.
- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP)** “Seraidaz inhibitörü olan Seranib-2’nin Akciğer Kanseri Hücrelerinde Apoptotik Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerindeki Etkileri” Bütçe: 39.973,50 TL, **Araştırmacı**, Ekim-2021-devam ediyor.
- **Tübitak-1002 Projesi** “Meme Kanseri Hücrelerinde D-erythro-MAPP ve Nanopartikül Formülasyonunun Neden Olduğu Hücre Ölüm Mekanizmalarının Araştırılması”, **Doktora Öğrencisi-Bursiyer**, Sonuçlandı (Doktora Tez Projesi)

- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP), “Seramidaz İnhibitörlerinin Akciğer Kanseri Üzerindeki Morfolojik Etkileri”- Araştırmacı, Sonuçlandı.**
- **Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (BAP), D-Erythro-Mapp ve Nanopartikül Formülasyonunun Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz ile İlişkili Ölüm Yolaklarının İn-Vivo Olarak Araştırılması, Araştırmacı, 2020-devam ediyor. (Doktora Tez Projesi)**

Üyelikler:

- Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD)
- Avrupa Kanser Araştırma Derneği (EACR)
- Türk Elektron Mikroskopi Derneği (TEMD)

Ödüller:

- **“Genç Araştırmacı Bursu”- 7. Multidisipliner Kanser Araştırma & 1. Temel Onkoloji Kongresi, Uluslararası Katılımlı, 11-14 Ekim 2018**