



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE PARP
İNİHİTÖRÜ YÜKLÜ KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN
İLAÇ DİRENÇ MEKANİZMALARININ AŞILMASINDAKİ
ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gamze GÜNEY ESKİLER

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER

BUAP(T)2015/1 - ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI





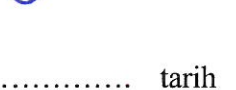
Doktora tezi olarak sunduğum

“Triple Negatif Meme Kanseri Tedavisinde PARP İnhibitörü Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin İlaç Direnç Mekanizmalarının Aşılmasındaki Rollerinin Araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

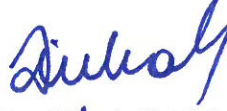

Gamze GÜNEY ESKİLER
03.04.2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Gamze GÜNEY ESKİLER tarafından hazırlanan **Triple Negatif Meme Kanseri Tedavisinde PARP İnhibitörü Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin İlaç Direnç Mekanizmalarının Aşılmasındaki Rollerinin Araştırılması** konulu Doktora tezi ...02../...05../2017...günü, 11.00...-13.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER	
Üye	Prof. Dr. Ünal EGELİ	
Üye	Prof. Dr. Tolga CAVAŞ	
Üye	Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK	
Üye	Doç. Dr. Didem TURGUT COŞAN	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

03/04/2017

Adı Soyadı: Gamze GÜNEY ESKİLER

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: Triple Negatif Meme Kanseri Tedavisinde PARP İnhibitörü Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin İlaç Direnç Mekanizmalarının Aşılmasındaki Rollerinin Araştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	XII
İNGİLİZCE ÖZET	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Meme Kanseri.....	6
2.2. Triple Negatif Meme kanseri	9
2.2.1. Epidemiyolojisi	9
2.2.2. TNMK'nin Klinik Özellikleri	10
2.2.3. Triple Negatif Meme Kanseri Alt Tipleri	11
2.2.4. TNMK Moleküler Profili.....	13
2.2.4.1. Bazal-Benzeri ve TNMK Arasındaki İlişki.....	13
2.2.4.2. <i>BRCA1/2</i> Mutasyonu ile TNMK Arasındaki İlişki	15
2.2.5. Mevcut Tedavi Yöntemleri.....	16
2.2.6. Yeni Terapötik Hedefli Tedaviler.....	18
2.2.6.1. EGFR İnhibitörleri	18
2.2.6.2. Anjiyogenez İnhibitörleri	19
2.2.6.3. Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	19
2.2.6.4. Histon Deasetilaz İnhibitörleri.....	19
2.2.6.5. mTOR İnhibitörleri	20
2.2.6.6. PARP İnhibitörleri.....	20
2.2.6.6.1. Sentetik Letalite.....	23
2.2.6.6.2. BMN 673 (Talozoparib).....	25
2.3. DNA Onarım Mekanizmaları	26
2.3.1. Baz Ekzisyon Onarımı (BER)	28
2.3.1.1. PARP	29
2.3.2. NER	34
2.3.3. Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)	35
2.3.4. Çift-Zincir Kırıklarının Tamiri	37
2.3.4.1. HR.....	38
2.3.4.1.1. HR ve <i>BRCA1/2</i> İlişkisi	39

2.3.4.2. NHEJ	42
2.4. PARP İnhibitörlerine Karşı İlaç Direncin Oluşmasına Neden Olan Moleküler Mekanizmalar	43
2.4.1. Artan HR Kapasitesi.....	44
2.4.2. NHEJ Kapasitesinde Değişim	46
2.4.3. PARP1 Aktivasyonunda Azalma	47
2.4.4. PARP İnhibitörlerinin İntraselüler Miktarında Azalma	48
2.4.4.1. P-glikoprotein	50
2.4.4.2. MRP (Çoklu İlaç Direnci İlişkili Protein).....	51
2.4.4.3. BCRP (Meme Kanseri Direnç Proteini).....	52
2.4.5. PARP inhibitörlerine direnç gelişmesinde epigenetik değişimlerim rolü .	53
2.4.5.1. Histon modifikasyonları	53
2.4.5.2. miRNA ekspresyonunda değişimler	54
2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	58
2.5.1. Kanser Tedavisinde Kemoterapinin Başarısız Olmasında Güncel Problemler	61
2.5.1.1. İlacın Biyodağılımı	61
2.5.1.2. Çoklu-İlaç Direnci (MDR).....	62
2.5.1.3. Retikuloendotelyal Sistem (RES).....	64
2.5.1.4. Antikanser İlaçların Hidrofobitesisi.....	64
2.5.2. Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler ile Tümörün Hedeflenmesi	65
2.5.2.1. Pasif Hedefleme	65
2.5.2.2. Aktif Hedefleme.....	67
2.5.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Çeşitleri.....	71
2.5.3.1. İnorganik Nanopartiküller	71
2.5.3.1.1. Seramik Nanopartiküller	72
2.5.3.1.2. Mezo-Gözenekli Silika Sistemler	72
2.5.3.1.3. Manyetik Nanopartiküller	73
2.5.3.2. Karbon Nanotüpler	74
2.5.3.3. Dendrimerler	76
2.5.3.4. Polimerik Miseller	77
2.5.3.5. Lipozomlar	78
2.5.3.6. Lipid-Temelli Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler	79
2.5.3.6.1. Katı Lipid Nanopartiküller (KLN).....	79
2.5.3.6.2. Nano Lipid Partiküller	79
2.5.3.6.3. Lipid- İlaç Bağlayıcı Nanopartiküller	80

2.5.3.6.4. Nanoemülsiyonlar	81
2.5.3.6.5. Lipid Nanokapsüller	81
2.5.4. Katı Lipid Nanopartiküller	81
2.5.4.1. KLN'lerin Üretim Yöntemleri	83
2.5.4.1.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon	83
2.5.4.1.1.1. Sıcak Homojenizasyon	84
2.5.4.1.1.2. Soğuk Homojenizasyon	84
2.5.4.1.2. Mikroemülsiyon Yöntemi	85
2.5.4.1.3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon Yöntemi	85
2.5.4.1.4. Süperkritik Akışkan Yöntemi	86
2.5.4.1.5. Yüksek Hızda Homojenizasyon veya Ultrasonikasyon	86
2.5.4.1.6. Püskürterek Kurutma	86
2.5.4.2. KLN'nin Karakterizasyonun Gerçekleştirilmesi	87
2.5.4.2.1. Partikül Boyutu	87
2.5.4.2.2. Zeta Potansiyel	89
2.5.4.2.3. İlaç Yükleme ve Enkapsülasyon Etkinliği	89
2.5.4.2.4. İlaç Salınımı	90
2.5.4.2.5. Yüzeysel Morfolojisi	92
2.5.4.2.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)	92
2.5.4.2.7. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)	93
2.5.4.2.8. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi	93
2.5.4.2.9. Yüzeysel özellikleri	94
2.5.4.3. Kanser tedavisinde KLN'nin Rolü	94
3. GEREÇ VE YÖNTEM	98
3.1. Gereç	98
3.1.1. Kullanılan cihazlar	98
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	99
3.2. Yöntem	102
3.2.1. Hücre kültürü	102
3.2.1.1. Hücre hatlarının temini	102
3.2.1.2. Hücrelerin Üretilmesi	102
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	102
3.2.1.4. Hücrelerin Stoklanması	103
3.2.1.5. Hücre Sayımı	103

3.2.2. BMN 673'ün Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	103
3.2.3. Dirençli Hücrelerin (HCC1937-R) Elde Edilmesi.....	104
3.2.4. BMN 673'ün Miktar Tayini	105
3.2.5. KLN Formülasyonun Üretilmesi ve Karakterizasyonu	106
3.2.5.1. BMN 673 Yüklenmiş KLN'in Üretilmesi.....	106
3.2.5.2. BMN 673 Yüklü KLN'in Karakterizasyonu.....	106
3.2.5.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü	106
3.2.5.2.2. Enkapsülasyon etkinliği (EE) ve etken madde yükleme kapasitesi... 107	
3.2.5.2.3. İlaç Salınım Profili	107
3.2.5.2.4. Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi	107
3.2.5.2.5. Fourier transform infrared spektrometresi (FTIR) analizi.....	108
3.2.5.2.6. NMR Analizi.....	108
3.2.6. WST-1 Analizi	108
3.2.7. Annexin V Analizi	109
3.2.8. Hücre Siklusu Analizi	110
3.2.9. DNA Hasarı Analizi	111
3.2.10. PARP Aktivasyon Analizi	111
3.2.11. Kolorimetrik PARP Proteini Analizi	112
3.2.12. Koloni Formasyon (Klonojenik) Analizi.....	113
3.2.13. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Analizi	114
3.2.14. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin P-gp ve/veya MRP1 Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	115
3.2.14.1. Kalsein Analizi.....	115
3.2.14.2. Rhodamin 123 Analizi	115
3.2.15. HCC1937 ve HCC1937-R Hücrelerinde BRCA1 c.5266dupC (5382insC) Validasyonu	116
3.2.15.1. DNA İzolasyonu.....	116
3.2.15.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	117
3.2.15.3. DNA dizi analizi.....	117
3.2.15.3.1. Pürifikasyon.....	117
3.2.15.3.2. Sekans Reaksiyonu.....	118
3.2.15.3.3. Etanol Presipitasyonu	118
3.2.16. Gen Ekspresyon Analizleri.....	119
3.2.16.1. RNA izolasyonu	119
3.2.16.2. cDNA Sentezi	119

3.2.16.3. mRNA Ekspresyon Analizi	120
3.2.17. miRNA Ekspresyon Analizleri.....	121
3.2.17.1. miRNA İzolasyonu	121
3.2.17.2. cDNA Sentezi	121
3.2.17.3. Ekspresyon Analizi.....	122
3.2.18. Western Blot Analizi	123
3.2.18.1. Protein İzolasyonu.....	123
3.2.18.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	123
3.2.18.3. Örneklerin Hazırlanması	123
3.2.18.4. Örneklerin Jele Yüklenmesi.....	124
3.2.18.5. Transfer İşlemi	124
3.2.18.6. Bloklama	124
3.2.18.7. Birincil Antikor ile İnkübasyon	124
3.2.18.8. İkincil Antikor ile İnkübasyon.....	125
3.2.18.9. Görüntüleme	125
3.2.19. İmmün Floresan Görüntüleme	125
3.2.19.1. Hücrelerin Hazırlanması	125
3.2.19.2. Permeabilizasyon	125
3.2.19.3. Bloklama	125
3.2.19.4. Birincil Antikor ile İnkübasyon	126
3.2.19.5. İkincil Antikor ile İnkübasyon.....	126
3.2.19.6. Görüntüleme	126
3.2.20. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi	126
3.2.21. İstatistiksel Değerlendirme.....	128
4. BULGULAR	129
4.1. BMN 673'ün Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	129
4.2. BMN 673'ün HCC1937-R Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	137
4.3. BMN 673'ün Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	162
4.4. BMN 673'ün Hücre Siklusu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi.....	172
4.5. BMN 673'ün DNA hasarı Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi.....	182
4.5. BMN 673'ün PARP Aktivasyonu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi.....	191
4.6. BMN 673'ün PARP Proteini Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	193
4.7. BMN 673'ün Hücrelerde Koloni Oluşumu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	194

4.8. BMN 673'ün Yara İyileşmesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi.....	200
4.9. BMN 673'ün Hücrelerde İntraselüler Kalsein Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	202
4.10. BMN 673'ün İntraselüler Rhodamin 123 Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	206
4.11. <i>BRCA1</i> geninde c.5266dupC (5382insC) Mutasyonunun Belirlenmesi....	213
4.12. BMN 673'ün HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi.....	214
4.13. BMN 673'ün HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genleri Hedefleyen miRNA'lar düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi	219
4.14. BMN 673'ün HR ve MDR Yolakları İle İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi	225
4.15. BMN 673'ün Miktar Tayininin Değerlendirilmesi	252
4.16. BMN 673 yüklü KLN'nin Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi	254
4.17. BMN 673 yüklü KLN'nin enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi	256
4.18. İlaç Salınımının Belirlenmesi	256
4.19. Yüzeysel Morfolojisinin SEM ile Görüntülenmesi.....	257
4.20. FT-IR Spektrumları.....	258
4.21. NMR Spektrumları	259
4.22. BMN 673 yüklü KLN'nin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	260
4.23. BMN 673-KLN'nin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	282
4.24. BMN 673-KLN'nin Hücre Siklusu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi.....	292
4.25. BMN 673-KLN'nin DNA Hasarı Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi.....	302
4.26. BMN 673-KLN'nin PARP Aktivasyonu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	311
4.27. BMN 673-KLN'nin PARP Proteini Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	312
4.28. BMN 673-KLN'nin Hücrelerde Koloni Oluşumu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	313
4.29. BMN 673-KLN'nin Yara İyileşmesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi	319
4.30. BMN 673-KLN'nin Hücrelerde Kalsein Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	321
4.31. BMN 673-KLN'nin intraselüler Rhodamin 123 Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	325
4.32. BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi.....	332
4.33. BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genleri Hedefleyen miRNA'lar Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi	336

4.34. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Yolakları ile İlişkili Proteinlerin Ekspresyonunda Etkisinin Belirlenmesi	342
4.35. BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Yolakları ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi.....	348
4.36. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin Hücrelerde Neden Olduğu İnce Yapısal Değişimlerin Belirlenmesi.....	375
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	387
6. KAYNAKÇA	427
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	454
8. TEŞEKKÜR	456
9. ÖZGEÇMİŞ.....	457



TÜRKÇE ÖZET

Triple Negatif Meme Kanseri Tedavisinde PARP İnhibitörü Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin İlaç Direnç Mekanizmalarının Aşılmasındaki Rollerinin Araştırılması

BRCA1/2 geninde mutasyon taşıyan ve/veya homolog rekombinasyon (HR) yolağının inaktif olduğu TNMK hastalarında, Poli-ADP riboz polimeraz (PARP) inhibitörleri sentetik letaliteye neden olduğu için yeni terapötik tedavi stratejisi olarak dikkat çekmektedir. Ancak PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenen farklı mekanizmalar, PARP inhibitörlerinin tedavi etkinliğinde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Katı lipid nanopartiküller (KLN) geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen lipid-temelli ilaç taşıyıcı sistemlerdir. KLN'lerin yüklenen etken maddenin kontrollü salınımını sağlayarak, anti-kanser ajanlarının kanser hücrelerinde terapötik etkinin artmasında, normal hücrelerde toksik etkinin azalmasında ve çoklu ilaç direncinin (MDR) aşılmasında potansiyel etkisi bilinmektedir.

Mevcut tez çalışmasında, bir PARP inhibitörü olan BMN 673'ün farmakolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve BMN 673'e karşı direnç gelişmesine neden olan HR ve MDR mekanizmalarının aşılması amacıyla BMN 673 yüklü KLN üretilerek karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. BMN 673-KLN'nin BMN 673 ile karşılaştırmalı olarak; HCC1937^{BRCA1-/-}, HCC1937-R (BMN 673'e karşı dirençli) TNMK ve MCF 10A kontrol epitelyal hücre hatlarında neden olduğu sitotoksik ve apoptotik etki ve ince yapısal değişimler belirlenmiştir. BMN 673-KLN'nin direnç mekanizmalarının aşılmasında terapötik etkisinin belirlenmesi için ise, HR ve MDR ile ilişkili genlerin mRNA ve protein düzeyinde ve bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki etkisi hem kantitatif hem de kalitatif olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak; KLN'nin BMN 673 için ideal bir ilaç taşıyıcı sistem olarak BMN 673'ün dezavantajlı özelliklerinin (büyük boyut, toksik etki vb.) indirgenmesinde ve BMN 673'e karşı direnç gelişmesine neden olan HR ve MDR mekanizmalarının aşılmasında potansiyel terapötik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Triple negatif meme kanseri (TNMK), PARP inhibitörleri, Katı Lipid Nanopartiküller (KLN), İlaç Direnç Mekanizmaları.

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of the Role of PARP Inhibitors Loaded Solid Lipid Nanoparticles on Overcoming Drug Resistance Mechanisms in Triple Negative Breast Cancer Treatment

Poly-ADP ribose polymerase (PARP) inhibitors have been draw attention as a novel therapeutic treatment strategy for TNBC patients who carrying mutations in the *BRCA1/2* genes and/or defective homologous recombination (HR) pathway due to leading to synthetic lethality. However, different mechanisms that have been implicated in the development of resistance to PARP inhibitors present a significant problem in the efficacy treatment of PARP inhibitors. Solid lipid nanoparticles (SLNs) are lipid-based drug delivery systems to overcome the disadvantages of traditional drug delivery systems. It is known that SLNs have a potential therapeutic effect in increasing the therapeutic effect of anti-cancer agents on cancer cells, reducing toxic effects in normal cells and overcoming multidrug resistance (MDR) by providing controlled release of active agent.

In the current thesis study, the characterization experiments were carried out by producing BMN 673-SLNs in order to develop pharmacological properties of BMN 673, a PARP inhibitor and to overcome the HR and MDR mechanisms causing the development of resistance to BMN 673. The cytotoxic and apoptotic effects and ultra-structural changes of BMN 673-SLNs compared with BMN 673 were determined on HCC1937^{BRCA1^{-/-}}, HCC1937-R (resistant to BMN 673) TNBC and MCF-10A control epithelial cell lines. In order to determine the therapeutic effect of BMN 673-SLN for overcoming the resistance mechanisms, the effect of mRNA and protein levels of genes related to HR and MDR mechanisms and the expression levels of miRNAs targeting these genes were analyzed both quantitatively and qualitatively.

In conclusion, it has been shown that SLNs as an ideal drug delivery system for BMN 673 have a potential therapeutic effect on reducing the disadvantages of BMN 673 (large size, toxic effect, etc.) and overcoming HR and MDR mechanisms causing the development of resistance to BMN 673.

Keywords: Triple negative breast cancer (TNBC), PARP inhibitors, Solid Lipid Nanoparticles (SLN), Drug resistance mechanisms.

1. GİRİŞ

Triple negatif meme kanseri (TNMK) tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sini oluşturmalarına rağmen, triple negatif (TN) tümörlerinin heterojen fenotipik yapısı ve agresif klinik seyri (ileri evre tanı, yüksek rekürrens riski ve uzak metastaz yapma potansiyeli) hastalarda sağ kalım süresinin diğer alt tiplere göre daha kısa olmasına neden olmaktadır. Ayrıca, TNMK'nın kötü prognozu (büyük tümör çapı, metastaz gelişimi ve bazal fenotip vb. özelliklere sahip olması) ve mevcut tedavilere dirençli olması, TNMK kaynaklı ölüm oranlarının oldukça yüksek olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, tedavinin oldukça sınırlı olduğu genellikle *BRCA1* geninde mutasyon taşıyan TNMK hastalarında, hastalığın prognozunu ve hastaların sağkalım süresini olumlu yönde etkileyebilecek, nüks ihtimalini azaltabilecek daha etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi için moleküler düzeyde spesifik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Irvin ve Carey 2008; Cleere 2010; Santana-Davila ve Perez 2010; Lehmann ve ark., 2011; Gelmon ve ark., 2012; Engebraaten ve ark., 2013; Guarneri ve ark., 2013; Schmadeka ve ark., 2014; Mayer ve ark., 2014; Lehmann ve ark., 2015; Nursal 2015; O'Reilly ve ark., 2015; Lehmann ve ark., 2016). Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda, TNMK'nın moleküler hedefleri tanımlanarak ön-klinik ve klinik denemelerde yeni hedefli terapötik tedavi stratejilerinin (EGFR, anjiyogenez, tirozin kinaz, histon deasetilaz, mTOR ve PARP inhibitörleri) geliştirilmesine odaklanılmaktadır (Arslan ve ark., 2009; Pal ve Mortimer 2009; Gelmon ve ark., 2012; Shastri ve Yardley 2013; Audeh 2014; Yadav ve ark., 2014; Tok ve Kocuyigit Kaymakcioglu 2015; Tomao ve ark., 2015).

Meme kanseri hastaları içerisinde *BRCA1* geninde germline mutasyon taşıyan hastaların genellikle 50 yaş öncesi tanı alan, kötü prognoza sahip ve %75'inin immünohistokimyasal olarak triple (-) ve bazal benzeri fenotip tümöre sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *BRCA1* mutasyonu taşımayan sporadik TNMK hastalarının %20'sinde *BRCA1*'in rol aldığı DNA'da çift zincir kırıklarının (dsDNA) tamirini sağlayan homolog rekombinasyon (HR) mekanizmasının farklı nedenlerden dolayı inaktif olduğu bilinmektedir (Podo ve ark., 2010; Santana-Davila ve Perez 2010; Audeh 2014; Burgess ve Puhalla 2014). Bu nedenle, DNA tamir yollarını hedefleyen DNA hasarı oluşturan ajanlara karşı kanser hücrelerini duyarlı hale getirmek, kanser tedavisindeki yeni terapötik bir yaklaşım olarak görülmektedir.

Sentetik letalite kavramı, TNMK tedavisinde özellikle *BRCA1* geninde mutasyon taşıyan ve/veya HR yolağının inaktif olduğu hastalarda yeni terapötik tedavi stratejisi olarak dikkat çekmektedir. *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan TNMK hücre hatlarında ve hastalarında veya sporadik TNMK hastalarında gerçekleştirilen ön-klinik ve klinik çalışmalarda, Poli (ADP Riboz) Polimeraz (PARP) inhibitörlerinin sentetik letaliteye neden olarak tedavide potansiyel terapötik etkilerinin belirlenmesi, yeni bir tedavi stratejisi olarak ön plana çıkmalarına neden olmuştur (Zaremba ve Curtin 2007; O'Shaughnessy 2010; Anders ve ark., 2010; Chan ve Giaccia 2011; Javle ve Curtin 2011; Burgess ve Puhalla 2014).

PARP, ökaryot hücrelerde bol miktarda bulunan, DNA'da tek zincir kırıklarının oluşması sonucu, nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (NAD⁺) substratını kullanarak oluşan tek zincir kırıklarını tanıyan ve kromatin ilişkili proteinlerin değişimine neden olan bir nükleer proteindir. PARP proteini DNA tamiri, hücre regülasyonu, bölünmesi ve hücre ölümü gibi farklı biyolojik yollarda görev almaktadır (Amé ve ark., 2004; Yelamos ve ark., 2011; Rodríguez ve ark., 2015). PARP inhibitörleri, DNA'da oluşan tek zincir kırıklarının tamirinde görev alan genellikle PARP1'in inhibisyonuna neden olarak, DNA'da çift zincir kırıklarının (dsDNA) oluşmasına yol açmaktadır. Özellikle *BRCA1/2* genlerinin inaktif olduğu kanser tiplerinde (kolon, prostat, over, meme, küçük hücreli akciğer), homolog rekombinasyon (HR) mekanizması çalışmadığı için, DNA'da oluşan dsDNA kırıkları tamir edilemez. Böylece hem baz-ekzisyon tamiri (BER) hem de HR eş zamanlı olarak inhibe edilerek, PARP inhibitörleri kanser hücrelerinde sentetik letaliteye sebep olmaktadır (Ashworth A 2008; Javle ve Curtin 2011; Plummer 2011; Audeh 2014; Sonnenblick ve ark., 2014a; Livraghi ve Garber 2015).

Günümüzde *BRCA1/2* ile ilişkili farklı kanser tiplerinde klinik faz denemeleri devam eden farklı PARP inhibitörleri (olaparib, iniparib, rucaparib, veliparib, talozoparib (BMN 673), MK-4827, CEP 9722 ve E7016) mevcuttur (Javle ve Curtin 2011; Audeh 2014; Burgess ve Puhalla 2014; Benafif ve Hall 2015; Livraghi ve Garber 2015). Ancak, özellikle TNMK tedavisinde klinik denemeleri devam eden olaparib ve iniparib gibi PARP inhibitörlerinde sürdürülebilir yanıtın elde edilememesi, hastaliksız sağ kalım süresinin kısa olması gibi olumsuz sonuçlardan dolayı (Gelmon ve ark., 2011; Ledermann ve ark., 2012; Mateo ve ark., 2013; Sinha 2014; Lord ve

ark., 2015), yeni nesil PARP inhibitörlerine (BMN 673, niraparib, rucaparib, veliparib) odaklanılmaktadır (de Bono ve ark., 2013; Sandhu ve ark., 2013; Sonnenblick ve ark., 2014a; Drew ve ark., 2016; LoRusso ve ark., 2016; Rodler ve ark., 2016). BMN 673, *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan meme kanseri tedavisinde Faz II/III çalışmaları devam eden ancak henüz FDA onayı almamış bir PARP inhibitörüdür. Literatürde gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, BMN 673'ün diğer PARP inhibitörlerine (olaparib, veliparib, rucaparib) göre PARP'ı ~100 kat daha yüksek seviyede yakalama kapasitesine sahip olduğu ve daha düşük konsantrasyonlarda (nM) daha yüksek sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği farklı kanser tiplerinde belirlenmiştir (Shen ve ark., 2013; Postel-Vinay ve ark., 2013; Koppensteiner ve ark., 2014; Murai ve ark., 2014; Herriott ve ark., 2015; Huang ve ark., 2015). Ayrıca, BMN 673'ün farklı kemoterapik ilaçlar (temozolomid, gemsitabin, sisplatin, oksaliplatin, karboplatin SN-38, doksorubisin, metotreksat everolimus ve KU-0063794) ile kombin tedavi olarak etkisinin farklı kanser tiplerinde (TNMK, lenfoma, pankreatik duktal adenokarsinom, osteosarkom, küçük hücreli akciğer kanser, pediatrik kanserler) belirlendiği çalışmalar da literatürde mevcuttur (Murai ve ark., 2014; Engert ve ark., 2014; Smith ve ark., 2015b; Andrei ve ark., 2015). Ancak, bazı çalışmalarda HR yolağı inaktif olan *BRCA1/2* genlerinde mutasyon taşıyan bazı kanser tiplerinin (*BRCA2*-eksik HCC2998 meme, U2OS osteosarkom ve bazı küçük hücreli akciğer kanser hücrelerinin) BMN 673'e karşı dirençli olduğu ve dirence neden olan mekanizmaların araştırılması gerektiği belirtilmiştir (Cardnell ve ark., 2013; Engert ve ark., 2014; Cardnell ve ark., 2016; Murai ve ark., 2016). Ayrıca, klinik faz II (ABRAZO) ve III (EMBRACA) çalışmaları devam eden BMN 673'ün faz I denemesinde, *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan hastalarda BMN 673'ün stabil plazma konsantrasyonunun elde edilemediği ve yorgunluk, kusma, anemi ve miyelosüpresyon gibi yan etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (de Bono ve ark., 2013; Sonnenblick ve ark., 2014a).

PARP inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinde tek tedavi veya diğer kemoterapik ilaçlarla birlikte kombin tedavi olarak potansiyel terapötik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda ilerlemeler devam etmesine rağmen, literatürde farklı mekanizmaların (artan HR kapasitesi, homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) kapasitesinde değişim, PARP1 aktivitesinde değişimler, PARP inhibitörlerinde intraselüler miktarında azalmasına neden olan çoklu ilaç direnci (MDR) ve epigenetik değişimler)

PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesine neden olduğu belirtilmiştir (Ashworth 2008; Edwards ve ark., 2008; Fojo ve Bates 2013; Johnson ve ark., 2013; Lord ve Ashworth 2013; Montoni ve ark., 2013; Nakagawa ve ark., 2015; Sedukhina ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016b). Bu nedenle, PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesine neden olan mekanizmaların aşılmasına yönelik yeni tedavi stratejilerin geliştirilmesi büyük önem kazanmaktadır.

Geleneksel ilaç formülasyonlarının sahip olduğu farmakolojik sınırlamaların (toksikite ve istenmeyen ilaç etkileşimlerinin) üstesinden gelinmesine ve kanser hücrelerinde farklı kemoterapik ajanlara karşı gelişen MDR'nin aşılmasına yönelik, 10-1000 nm arasında değişen boyuta sahip olan ve ilacın uygun zaman ve bölgede kontrollü salınımını sağlayan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, kanser tedavisinde yeni terapötik bir strateji olarak ön plana çıkmaktadır (Cho ve ark., 2008; Mitragotri ve ark., 2014; Sutradhar ve Amin 2014; Blanco ve ark., 2015; Huang ve ark., 2016; Piktel ve ark., 2016).

İlk olarak 1965 yılında lipid-temelli ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilen lipozomların kısa raf ömrü, düşük stabilite, düşük yükleme kapasitesi ve üretiminin maliyetli olması gibi dezavantajlarından dolayı, 1990 yılının başlarında, diğer ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarını birleştiren ve dezavantajlarını barındırmayan alternatif kolloidal lipid temelli terapötik bir ilaç taşıyıcı sistem olarak katı lipid nanopartiküller (KLN) geliştirilmiştir. KLN'lerin, küçük boyuta ve uzun süre kararlı yapıya sahip olma, kontrollü ilaç salınımı sağlama, geniş çapta üretilme ve organik çözücüye ihtiyaç duymadan hem hidrofobik hemde hidrofilik özelliklerle terapötik ajanları taşıyabilme gibi avantajlı özelliklerinden dolayı, kanser tedavisinde potansiyel terapötik etkisi dikkat çekmektedir (Müller, RH ve ark., 1995; Müller ve ark., 2000; Souto ve Müller 2007; Sanap 2014; Naseri ve ark., 2015; Geszke-Moritz ve Moritz 2016).

Farklı antikanser ajanlarının veya antikanser özelliğe sahip etken maddelerin KLN formülasyonlarının geliştirildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda; KLN'nin kanser hücrelerinde serbest etken maddelerin terapötik etkisinin artmasında ve normal hücrelerde neden olduğu toksik etkilerin azalmasında rol aldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, kanser tedavisinde lipid-temelli terapötik bir ilaç taşıyıcı sistem olarak KLN'nin potansiyel etkin role sahip olduğu belirtilmiştir (Harivardhan Reddy ve ark., 2005; Yuan ve ark., 2008; Mulik ve ark., 2010; Teskač ve Kristl 2010; Athawale ve

ark., 2014; Güney ve ark., 2014; Wang ve ark., 2014; Chen ve ark., 2016). Ayrıca, farklı anti-kanser ajanlarına (doksorubisin, paklitaksel, tamoksifen vb.) karşı direnç geliştirilen farklı kanser hücre hatlarında ve/veya ksenograft modellerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, KLN'nin etken maddenin kanser hücrelerinin intraselüler miktarında daha fazla birikmesini sağlayarak P-gp temelli MDR'nin aşılmasında terapötik etkisi tespit edilmiştir (Dong 2009; Kang ve ark., 2010; Miao ve ark., 2013; Kapse-Mistry ve ark., 2014; Baek ve Cho 2015; Liu ve ark., 2015; Eskiler ve ark., 2016; Peira ve ark., 2016; Cavaco ve ark., 2017).

TNMK tedavisinde BMN 673'ün farmokokinetik ve farmokodinamik özelliklerinin geliştirilerek sahip olduğu dezavantajların ortadan kaldırılması ve PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenen direnç mekanizmalarının aşılması amacıyla bu çalışmada; ilk kez bir ilaç taşıyıcı sistemin BMN 673 için üretilmesi ile BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle BMN 673'e karşı dirençli HCC1937 TNMK hücreleri geliştirildikten sonra, BMN 673 yüklü KLN üretilerek karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. BMN 673-KLN'nin BMN 673 ile karşılaştırmalı olarak terapötik etkisinin belirlenmesi için, HCC1937, BMN 673'e karşı dirençli HCC1937-R ve MCF-10A kontrol hücrelerinde hem sitotoksik hem de apoptotik etkisi ilk kez analiz edilmiştir. Ayrıca, PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenen HR ve MDR mekanizmalarının, hücrelerde BMN 673'e karşı direnç gelişmesindeki etkileri ve BMN 673-KLN'nin bu mekanizmaların ilgili hücrelerde aşılmasındaki potansiyel rolleri belirlenmiştir. Bu amaçla, HR ve MDR ile ilişkili genlerin mRNA ve protein düzeyinde ve bu genleri hedef aldığı bilinen miRNA'ların ekspresyon seviyesinde neden olduğu değişimler ilk kez analiz edilmiştir. Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında BMN 673'ün farmakolojik özelliklerinin geliştirilmesi, normal hücrelerde neden olduğu toksik etkinin azaltılması ve BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol alan mekanizmaların aşılması amacıyla üretilen KLN formülasyonu ile TNMK hastalarında henüz klinik faz denemeleri devam eden BMN 673'ün kullanılmasına yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri farklı klinik, morfolojik, histopatolojik ve prognostik özelliklere sahip ve tedaviye farklı yanıt gösteren heterojen bir hastalıktır (Britta Weigelt & Jorge S. Reis-Filho 2009; Gunes ve ark., 2012; Rivenbark ve ark., 2013; A.Eroglu 2014; Sharp ve Harper-wynne 2014; Sonnenblick ve ark., 2014b). Uluslararası Kanser Ajansı'nın (GLOBOCAN) 2012 yılı verilerine göre, meme kanseri dünya genelinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada ve kadınlar arasında ise en yaygın görülen buna bağlı olarak da kadınlarda en fazla ölüme neden olan kanser tipi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, 2008 yılı tahminlerinden bu yana meme kanseri insidansının %20'den fazla ve ölüm oranının %14 arttığı belirlenmiştir (Torre ve ark., 2015; Ferlay ve ark., 2015). Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın 2014 yılı istatistik verilerine göre, kadınlar arasında meme kanseri insidansının 2010 yılında %38.6 olduğu ve kadınlarda en sık görülen kanser tipi olduğu belirlenmiştir (Gültekin ve Boztaş 2014; Sağlık Bakanlığı 2014). Ayrıca, 2012 yılında meme kanseri hasta sayısının 51.990 olacağı tahmin edilmiştir (Ozmen 2008). Meme kanseri insidansı ülkeden ülkeye farklılık göstermekle birlikte, Amerikan Kanser Topluluğu'nun istatistik verilerine göre ise, 2016 yılında Amerika'da 246.660 yeni invaziv meme kanseri tanısı konulacağı ve 61.000 yeni in situ invaziv olmayan karsinoma gelişeceği ve 40.450 kadının ise meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (American Cancer Society 2016). Meme kanserine bağlı ölüm oranlarındaki artışa paralel olarak, meme kanserinin moleküler yapısının daha iyi anlaşılabilmesi ve bireysel hedefli tedavinin sağlanabilmesi amacıyla kapsamlı klinik denemeler ve akademik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Son dönemde moleküler biyoloji, patoloji ve genetikte moleküler analitik yöntemlerin özellikle mikroarray temelli genomik ve ekspresyon profillemeye çalışmalarının gerçekleştirilmesi ile meme kanserinin gelişiminde farklı genlerin ve sinyal yollarının prognoz ve tedaviye yanıtta farklı derecede rol aldığı ve bu yüzden meme kanserinin heterojen kompleks bir hastalık olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, meme kanserinde klinikle ilişkilendirilerek moleküler sınıflandırmanın, hastaya yönelik hedefli tedavinin gerçekleştirilmesinde ve hastanın tedaviye yanıtında oldukça büyük öneme sahip olduğu ifade edilmiştir (Weigelt ve Reis-Filho 2009; Weigelt ve ark.,

2010; Weigelt ve Reis-Filho 2010; Guiu ve ark., 2012; A.Eroglu 2014; Sonnenblick ve ark., 2014b; Eliyatkin ve ark., 2015).

İlk olarak 2000 yılında Perou ve ark. tarafından yapılan kapsamlı gen ekspresyon çalışması ile kullanılan meme kanserinde “Moleküler Sınıflama” terminolojisine göre, meme kanseri bugün için geçerli olan “Luminal A, Luminal B, insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) pozitif, bazal ve normal-benzeri” olmak üzere beş temel alt tipe ayrılmıştır (Perou ve ark., 2000). Bu alt tiplere ait temel özellikler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Meme kanserinin temel alt tipleri ve özellikleri (Britta Weigelt ve Jorge S. Reis-Filho 2009; Cleere 2010; Weigelt ve ark., 2010; Brady-west ve McGrowder 2011; Dai ve ark., 2015)

Moleküler alt-tipleri	İmmünohistokimyasal karakterizasyon			Diğer belirteçler	Prognoz	Görülme oranı
	ER	PR	HER2			
Luminal A	+	+	-		İyi	~%50
Luminal B	+	+	+/-		Orta	~ %20
HER2 (+)	-	-	+	SK5/6 +/- EGFR +/-	Kötü	% 10-15
Bazal-benzeri	-	-	-	SK5/6 + EGFR +	Kötü	% 15-20
Normal-benzeri	-/+	Bilinmiyor	-	SK5/6 + EGFR +	Kötü	~%6

ER: Östrojen reseptör, PR: Progesteron reseptör, HER2: İnsan epidermal büyüme reseptör 2, SK: Sitokeratin +/-: Bazen pozitif bazen negatif, -/+ : Nadiren pozitif

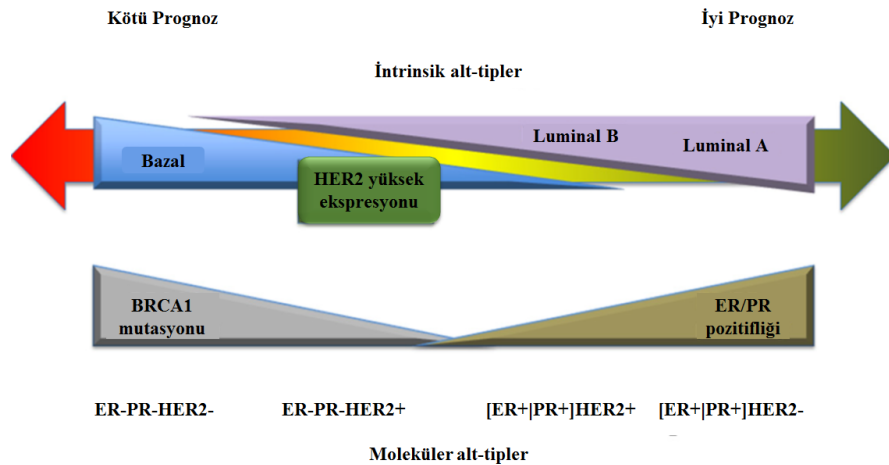
Ancak, daha sonra çok sayıda intrinsik genin (aynı tümörün tekrarlanan örneklerinden daha çok farklı tümörlerde ekspresyonu yüksek oranda farklılık gösteren) farklı hasta gruplarının dahil edildiği kapsamlı çalışmalarda, hiyerarşik kümeleme analizi ile meme kanserinin moleküler sınıflandırılmasına farklı alt grupların eklendiği görülmektedir (Perou ve ark., 2000; Sørlie ve ark., 2001; Sorlie ve ark., 2003; Sotiriou ve ark., 2003; Abd El-Rehim ve ark., 2005; Fan ve ark., 2006; Hu ve ark., 2006; Bernard ve ark., 2009; Gatzka ve ark., 2010; Lehmann ve ark., 2011; Curtis ve ark., 2012; Koboldt ve ark., 2012; Dai ve ark., 2014; Gnant ve ark., 2014). İlgili çalışmalar Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Meme kanserinin gen ekspresyon profili ve intrinsik alt-tiplerine dair çalışmaların listesi. (Dai ve ark., 2015).

Çalışma	Veri tipi	Meme kanseri alt tipleri						
		Luminal		HER2 yüksek- ekspresyonu	TNF		Normal- benzeri	IFN
		Luminal A	Luminal B		Bazal	Bazal olmayan		
Hu ve ark., (2000)	GEP	1	1	1	1		1	
Sørlie ve ark., (2001)	GEP	1	1	1	1		1	
Sørlie ve ark., (2003)	GEP	1	1	1	1		1	
Sotiriou ve ark., (2003)	GEP	3	1	2				
Abd El-Rehim ve ark., (2005)	TMA	1	1	1	1		1	
Fan ve ark., (2006)	GEP	1		1	1			
Hu ve ark. (2006)	GEP	1	1	1	1		1	1
Bernard ve ark. (2009)	GEP	1	1	1	1		1	
		2	5	2	3			
Gatza ve ark., (2010)	PATH	4						
				1				
Lehmann ve ark., (2011)	GEP				2	4		
		3	3	1	1			
Curtis ve ark., (2012)	INT	1						
				1				
TCGA. Nature (2012)	INT	1	1	1	1			
Dai, Chen ve Bai (2014)	INT	1	1	1	1			
Gnant ve ark., (2014)	GEP	1	1	1	1			

Her bir bloktaki sayı her bir alt tip için tanımlanan alt tip sayısını göstermektedir. TNF: TN fenotipinde tümör, GEP: Gen ekspresyon profili (Gen ekspresyon verileri kullanılmıştır), TMA: Doku mikro-array verileri (Protein ekspresyon verileri kullanılmıştır), PATH: Yolak (Alt tiplendinme yolaklara dayanmaktadır), INT: Bütünleştirici görünüm (Çoklu seviyeden birleştirilmiş veriler kullanılmıştır)

Meme kanserinin temelde 5 alt tipi; hastanın sağ kalım süresi, tümör yapısı ve klinik özellikler açısından önemli derecede farklılık göstermekle birlikte, özellikle bazal veya triple negatif fenotip meme kanseri, diğer alt tiplere oranla daha agresif ve sağ kalım süresinin daha kısa olmasından dolayı dikkat çekmektedir (Şekil 1) (Podo ve ark., 2010; Dai ve ark., 2015).



Şekil 1. Meme kanserinin intrinsik fenotipleri ile prognoz arasındaki ilişki (Dai ve ark., 2015).

2.2. Triple Negatif Meme kanseri

Triple negatif meme kanseri (TNMK), östrojen reseptörü (ER) (-), progesteron reseptörü (PR) (-) ve (HER2) (-) ile ilişkili genleri düşük eksprese etmesinden dolayı “triple negatif (TN)” olarak tanımlanan, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'si oluşturan, genellikle genç yaşta ortaya çıkan ve oldukça agresif klinik sürece/seyre sahip bazal-benzeri meme kanseri alt tipidir (Irvin ve Carey 2008; Pal ve Mortimer 2009; Ismail-khan ve Bui 2010; Podo ve ark., 2010; Schmadeka ve ark., 2014; Nursal 2015; Vici ve ark., 2015). Günümüzde klinik, biyolojik ve epidemiyolojik seviyede çalışmalar TN tümörün heterojen fenotipte ve kötü prognoza sahip olması, TNMK hastalarına özgü hedefli tedavinin eksikliğinden dolayı TNMK patolojisinin daha iyi anlaşılması ve bireysel yeni tedavilerin geliştirilmesine odaklanmaktadır (Pal ve Mortimer 2009; Santana-Davila ve Perez 2010; Brady-west ve McGrowder 2011). TNMK hastaları, tedavide kullanılan trastuzumab veya tamoksifen gibi tedavi yöntemlerine karşı dirençli olduklarından dolayı sadece kemoterapi ile tedavi edilmektedir (Irvin ve Carey 2008; Gluz ve ark., 2009; Cleere 2010). Dolayısıyla, TNMK tüm meme kanserleri içerisinde oldukça küçük bir orana sahip olmasına rağmen, TNMK kaynaklı ölüm oranının oldukça yüksek olması, tümörün agresif seyri ve bireysel hedefli tedavinin eksikliğinden dolayı bu grup hastalar oldukça dikkat çekmektedir (Gelmon ve ark., 2012; Guarneri ve ark., 2013; Elsamany ve Abdullah 2014; Mayer ve ark., 2014).

2.2.1. Epidemiyolojisi

Dünya genelinde genel olarak yılda 1 milyon kadın meme kanseri teşhisi almaktadır. Bu hastalar içinde 170.000 hastadan fazlası TNMK hastasıdır ve yaklaşık %75'i bazal benzeri alt tiptedir (Cleere 2010; Ismail-khan ve Bui 2010; Yadav ve ark., 2015). TNMK, en yaygın olarak özellikle premenopozal Afrika-Amerika kökenli kadınlarda görülmektedir. Carey ve ark. yaptıkları çalışmada, Afrika-Amerika etnik kökenli premenopozal kadınların %39'unun, post-menopozal kadınların %14'ünün ve Afrika-Amerika etnik kökenli olmayan aynı yaşta kadınlarda ise %16'sının meme kanseri bazal-benzeri alt tipine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, pre-menopozal dönemde olan özellikle belirli etnik kökene sahip kadınlarda tümörün TN fenotipte olma olasılığı ER(+)/HER2(+) veya ER(+)/HER2(-) olma ihtimaline göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Carey ve ark., 2006; Anders ve Carey 2008; Ismail-khan ve Bui

2010). Sonuç olarak, etnik kökene ve premenopozal döneme bağlı olarak TNMK insidansının farklı olması, TNMK’da herhangi bir genin ya da genlerin ve/veya bu genlerde meydana gelen mutasyonların etkili olup olmadığı yönünde çalışmaların odaklanmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmalarda, özellikle *BRCA1* mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarının ileri evre TNMK olma riskinin arttığı belirlenmiştir (Ismail-khan ve Bui 2010; Podo ve ark., 2010).

2.2.2. TNMK’nin Klinik Özellikleri

TN tümörler tipik olarak;

- ileri histolojik evreye,
- büyük tümör boyutuna,
- yüksek nükleer-sitoplazmik orana ve mitotik sayıya,
- yetersiz stromal içeriğe,
- merkezi nekroza,
- uzak metastaza,
- stromal lenfatik yanıt ve
- multiple apoptotik hücreye sahiptir.
- Ayrıca TN tümörler çoğunlukla aksiller lenf nodu pozitifdir (Dent ve ark., 2007; Irvin ve Carey 2008; Pal ve Mortimer 2009; Bosch ve ark., 2010; Chiorean ve ark., 2013; Engebraaten ve ark., 2013).

Tümör morfolojisine göre sınıflandırıldığında, yaklaşık %90’ını invaziv duktal karsinomadır. Ancak metaplastik, lobular, apokrin, tipik veya atipik medüller veya adenoid kistik karsinoma morfolojileri de daha düşük oranda gözlemlenmektedir (Engebraaten ve ark., 2013; Montagna ve ark., 2013).

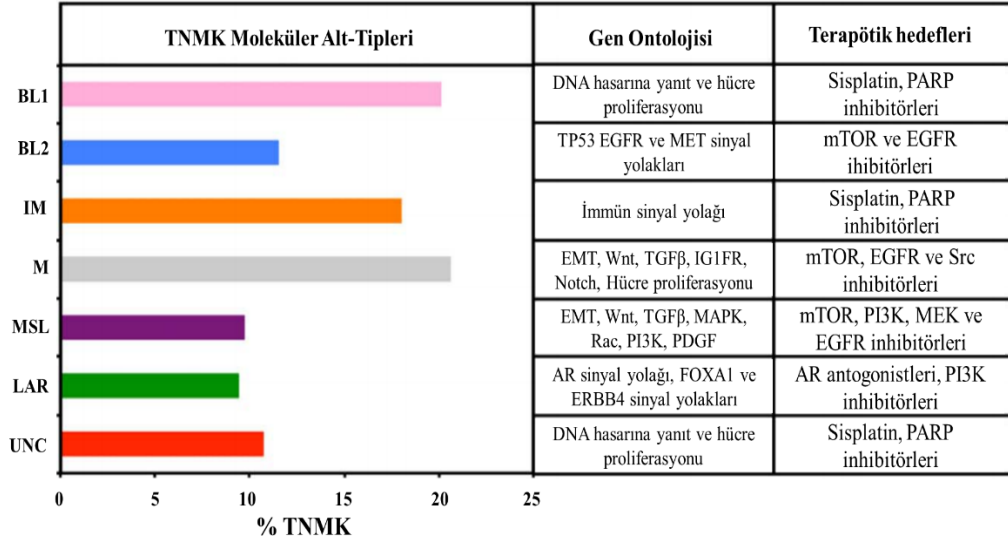
TNMK olmayan hastalar ile karşılaştırıldığında, TNMK hastalarında çoğunlukla beyin (%30) ve akciğer (%40) metastazı görülürken, karaciğer (%10) ve kemik (%20) metastazı daha az görülmektedir. Ancak lenf nodu invazyonu ile beyin metastazı görülme olasılığı HER-2 (+) (%4.8) hastalarda karşılaştırıldığında, TNMK 50 yaş altı hastalarda daha yüksektir (%20) (Gluz ve ark., 2009; Foulkes ve ark., 2010; Chiorean ve ark., 2013).

Ayrıca, TNMK hastalarında yüksek oranda lokal nüks belirlenmiştir. Tedavi başladıktan sonra, ilk 3-5 yıl içerisinde nüks görülme olasılığı oldukça yüksektir. Diağnozdan 5 yıl sonra, diğer meme kanseri alt tipleri ile karşılaştırıldığında nüks

riskinde azalma görülmektedir. 10 yıl sonra ise, ER(+) hastalar ile karşılaştırıldığında, TNMK hastalarında nüks riskinin iyice azaldığı ve hastanın prognozunun iyiye gittiği gözlemlenirken, ER(+) hastalarda nüks riski diagnozdan sonra 15 yıl devam etmektedir (Foulkes ve ark., 2010; Chiorean ve ark., 2013).

2.2.3. Triple Negatif Meme Kanseri Alt Tipleri

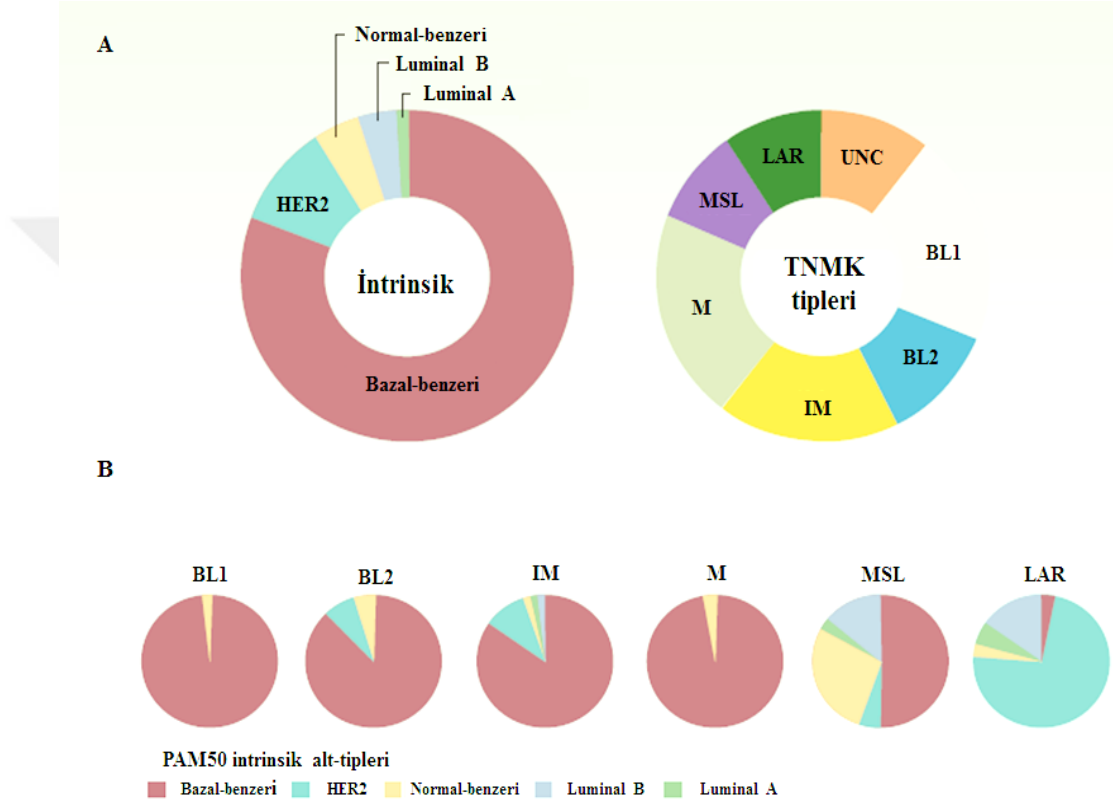
TNMK heterojen tümör tipine sahip olduğu için moleküler-hedefli tedavilerin geliştirebilmesinde TNMK'nın alt sınıflara ayrılması oldukça önem arz etmektedir. Lehmann ve ark. 21 meme kanseri veri setinden elde ettikleri 3.247 primer insan meme kanseri tümör dokusunda gerçekleştirdikleri gen ekspresyon profili çalışması ile 6 TN alt tipi tanımlamıştır (Lehmann ve ark., 2011). Bunlar; bazal-benzeri 1 (BL1), bazal-benzeri 2 (BL2), immünmodülatör (IM), mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre-benzeri (MSL), luminal androjen reseptörüdür (LAR). BL1 alt tipi hücre bölünmesi ve döngüsü ve DNA hasarına yanıt ile ilgili genlerin yüksek ekspresyonunu içerirken, BL2 alt tipi büyüme faktörü sinyal yolağı ve myoepitelyal belirteçlerce zengindir (Lehmann ve ark., 2011; Schmadeka ve ark., 2014). IM alt tipi sitokinler, temel immün sinyal transdüksiyon yolağında yer alan genler ve immün antijenlerden oluşmaktadır (Prat ve ark., 2013). M ve MSL alt tipi ise, hücre ölümü, farklılaşması ve büyümesinde rol alan genleri içerir. Hem M hem de MSL alt tiplerinde ise epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve büyüme faktörü yolağı ile ilişkili genlerin yüksek ekspresyonunu içerirken, MSL alt tipi hücre proliferasyonu ile ilgili genleri ve klaudin 3, 4 ve 7 gibi genlerin düşük ekspresyonunu içerir. Bu yüzden EMT ile ilişkilidir ve meme kök hücresinden köken aldıkları düşünülmektedir (Prat ve ark., 2010; Prat ve ark., 2013). LAR alt tipi ER(-) olmasına rağmen, luminal gen ekspresyonu ile karakterizedir ve steroid sentezi ve androjen/östrojen metabolizması gibi hormonal olarak düzenlenen yolaklarda yer alan genlerce zengindir. Androjen reseptörünün (AR) diğer alt tiplere göre LAR alt tipinde 9 kat daha fazla eksprese olduğu belirlenmiştir (Lehmann ve ark., 2011; Schmadeka ve ark., 2014; Lehmann ve ark., 2015; Yadav ve ark., 2015; Collignon J, Lousberg L, Schroeder H 2016). Her bir alt tipe ait özellikler Şekil 2 'de özetlenmiştir.



Şekil 2. Potansiyel terapötik hedeflerine göre kanser genom atlasında TNMK alt tiplerinin dağılımı, gen ontolojisi ve terapötik hedefleri. Her bir sütün ait olduğu TNMK alt tipinin TNMK içinde yüzde dilimini göstermektedir. BL1: Bazal- benzeri 1, BL2: Bazal-benzeri 2, IM: İmmünmodülatör, M: Mezenkimal, MSL: Mezenkimal kök hücre-benzeri, LAR: Luminal androjen reseptörü (LAR), UNC: Sınıflandırılmamış (Unclassified). PARP: Poli (ADP)-riboz polimeraz, TP63: Tümör protein 63, EGFR: epidermal büyüme faktör reseptörü, MET: Proto-onkogen reseptör tirozin kinaz, mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi, EMT: Epitelyal ve mezenkimal geçiş, Wnt: WNT proto-onkogen, TGFβ: Dönüştürücü büyüme faktörü β, IG1FR: İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü, MAPK: Mitojen-aktiviteli protein kinaz, Rac: Ras-ilişkili protein ailesi, PI3K: Fosfotidil inozitol 3-kinaz, PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü, MEK: Mitojen-aktiviteli protein kinaz, FOXA1: forkhead box, ERBB4: v-erb-a eritroblastik viral onkogen homoloğu 4, AR: Androjen reseptörü (Abramson ve ark., 2014).

TNMK intrinsik alt tiplere göre sınıflandırıldığında ise; BL1, BL2, IM ve M alt tipi çoğunlukla bazal-benzeri alt tipten oluşmasına rağmen, MSL normal-benzeri, LAR ise çoğunlukla luminal ve HER2 alt tipten oluşmaktadır. Ayrıca, son zamanlarda tanımlanan EMT belirteçleri, immün yanıt ve kanser kök hücre benzeri genlerce zengin düşük-klaudin “claudin-low” alt tipi, TNMK’nın M ve MSL alt tiplerinden oluşabileceği belirtilmiştir (Perou 2011; Lehmann ve ark., 2011; Schmadeka ve ark., 2014; Lehmann ve ark., 2015). Düşük-klaudin alt tipi adını özellikle klaudin 3,4 ve 7 genlerini düşük eksprese etmesinden dolayı almıştır. Klaudin proteini hücreler arası sıkı bağlantı bölgesinde görev yapan geniş bir gen ailesinin üyesidir ve sellüler adezyon, polarite ve glandüler farklılaşmayı düzenlemektedir. Öte yandan, klinik olarak düşük-klaudin meme tümörleri immunhistokimyasal olarak ER, PR ve HER-2 negatif olduğu için de TNMK’nın farklı bir alt tipi olarak düşünülebileceği belirtilmiştir (Prat ve ark., 2010; Perou 2011; Sabatier ve ark., 2014; Lehmann ve ark., 2015; Nursal 2015). TNMK alt tiplerinin intrinsik genlere göre sınıflandırılmasında kullanılan Pam50 testine dair veriler Şekil 3’de özetlenmiştir.

Ancak, Lehman ve ark. (2016) yaptıkları çalışmalarında ise, daha önce belirledikleri kendine özgü ontoloji sahip olan ve standart kemoterapiye verdikleri farklı yanıt göre 6 farklı TNMK moleküler alt tipini, IM ve MSL alt tipine ait tümörlerde de infiltrasyon ve lenfosit ve tümör ile ilişkili mezenkimal hücreler belirlendiği için, TNMK'yı BL1, BL2, M ve LAR olmak üzere 4 spesifik alt tipe ayırdığını belirtmişlerdir (Lehmann ve ark., 2016).



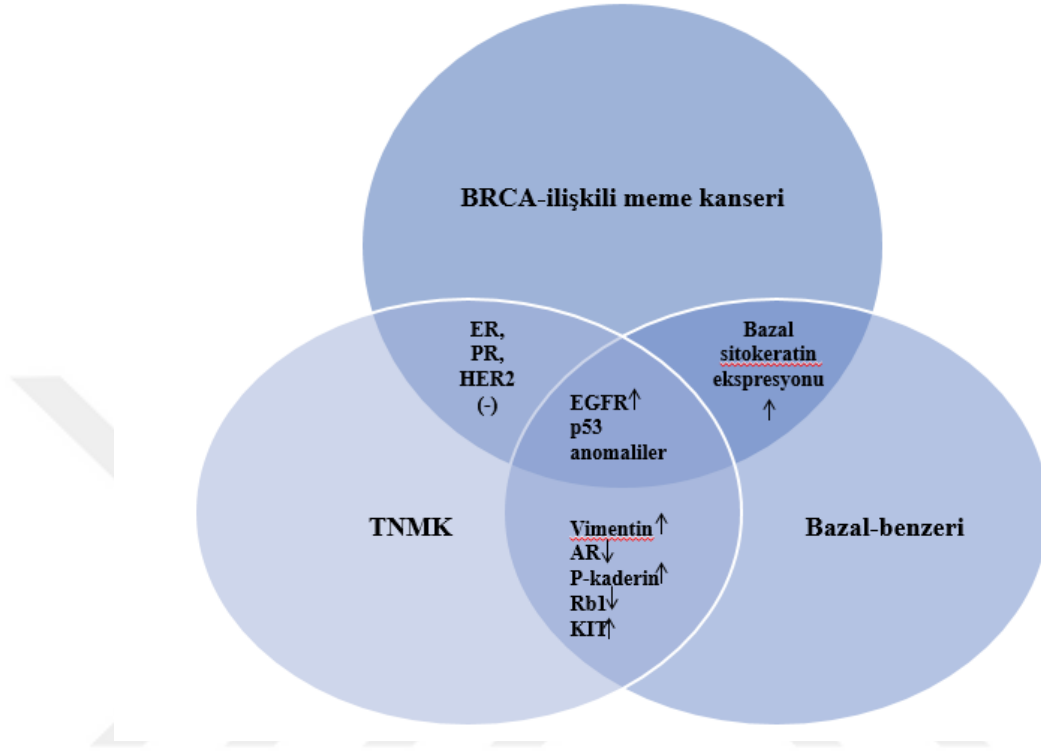
Şekil 3. Meme kanserinin alt tiplerinin sınıflandırılması için geliştirilen minimum 50 gen setinden oluşan Pam50 testi ile 14 farklı veri setinden alınan 374 TNMK hastasının gen ekspresyon profili ve her bir TNMK alt tipinin, intrinsik gen analizi ile meme kanserinin alt tiplerine göre dağılımı. (A) Meme kanseri ve TNMK alt tipleri, (B) Her bir TNMK alt tipinin intrinsik alt tiplerine göre sınıflandırılması (Bernard ve ark., 2009; Engebraaten ve ark., 2013; Mayer ve ark., 2014).

2.2.4. TNMK Moleküler Profili

2.2.4.1. Bazal-Benzeri ve TNMK Arasındaki İlişki

Bazal benzeri ve TNMK terimleri genellikle birbiri ile karıştırılmasına rağmen, aslında bu terimler sinonim değildir. Yaklaşık olarak TNMK'nın %40-80'nin bazal-benzeri olduğu ancak yaklaşık olarak %20-60'nın ise diğer intrinsik fenotipte (Luminal A, Luminal B, Luminal-HER2, HER2(+), klauidin) olabileceği belirtilmiştir. Öte yandan, bazal-benzeri alt tip tümörlerin çoğu TN'dir. Ancak TN ve bazal benzeri tümör

arasında %25-30 oranında bir fark gözlemlenmektedir (Irvin ve Carey 2008; Britta Weigelt & Jorge S. Reis-Filho 2009; Pal ve Mortimer 2009; Podo ve ark., 2010; Akshata Desai ve ark., 2012; Schmadeka ve ark., 2014) (Şekil 2).



Şekil 4. TNMK, bazal-benzeri ve BRCA-ilişkili meme kanserinin temel özellikleri (Carey ve ark., 2010).

Peoru ve ark. cDNA mikroarray analizi ile ilk olarak meme kanserinin moleküler sınıflandırmasını gerçekleştirdiklerinde çoğu TNMK'nin bazal-benzeri alt tipe olduğunu göstermiştir (Peoru ve ark., 2000). Meme kanserinin moleküler diağnozunun daha iyi anlaşılabilmesi için gerçekleştirilen birçok gen ekspresyon profili çalışmasında TNMK bazal-benzeri moleküler alt tipi olarak tanımlanmasına rağmen günümüzde çoğunlukla onkologlar tarafından TN fenotipi kullanılmaktadır.

TNMK genellikle ER(-), PR(-) ve HER-2(-) için klinik olarak kullanılan formalin ile fikse edilmiş ya da parafin gömülü dokularda immünolojik yöntem ile çalışılan, bu yüzden tümörün immuno-fenotipini yansıtmaktadır. Bazal benzeri terimi ise, cDNA mikroarray analizi ile tanımlanan ve tümörün moleküler fenotipini yansıtan bir terimdir. Bu yüzden, TNMK fenotipi immunokimyasal yöntem ile belirlenirken, bazal-benzeri için herhangi bir diağnostik kriter oluşturulmamıştır (Podo ve ark., 2010; Badve ve ark., 2011).

Bazal-benzeri tümörler genellikle ER(-), PR(-), HER2(-), sitokeratin 5/6 ve 17(+) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) (+)'dir. Bu özellikler Nielsen ve ark. tarafından bazal-benzeri meme kanseri tümörleri için "altın standart" olarak belirtilmiştir (Nielsen ve ark., 2004). Ancak TN tümörler genellikle ,ER(-), PR(-), HER2(-), sitokeratin 5/6 (-) ve EGFR(+)'dir (Irvin ve Carey 2008; Pal ve Mortimer 2009; Bosch ve ark., 2010; Chacón ve Costanzo 2010; Engebraaten ve ark., 2013). Aynı zamanda, bazal-benzeri karsinomlar her zaman HER2(-) değildir. Yapılan bir çalışmada, bazal benzeri tümörlerin %23'ünün HER2(+) olduğu bulunmuştur. Bu nedenle HER2(-), tüm bazal-benzeri karsinomalar için geçerli değildir (Ismail-Khan ve Bui 2010).

Ayrıca, TNMK ile bazal-benzer karsinomaların hepsi ileri histolojik evreye sahip değildir. Bu nedenle onkologlar tarafından TNMK teriminin potansiyel agresif meme kanseri grubu için daha dikkatli kullanılması gerekmektedir (Chacón ve Costanzo 2010; Ismail-Khan ve Bui 2010).

2.2.4.2. BRCA1/2 Mutasyonu ile TNMK Arasındaki İlişki

Meme kanseri hastaları içerisinde *BRCA1* mutasyonu taşıyan ile taşımayan hastalar karşılaştırıldığı zaman, *BRCA1* mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarının genç yaşta teşhis aldığı, ileri evrede sıklıkla bilateral meme kanseri oldukları ve kötü prognoza sahip oldukları görülmektedir. Bu yüzden, *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarında tümörün biyolojik ve moleküler karakteristik yapısının araştırılması oldukça önemlidir (Robson ve ark., 2004; Podo ve ark., 2010; Burgess ve Puhalla 2014). *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan bireylerde meme ve/veya over kanseri gelişme riski hastanın yaşı ve aile hikayesi gibi faktörlere göre değişmesine rağmen, genel olarak *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan bireylerde meme ve over kanseri gelişme riski sırasıyla %40-80 ve %11-40'dır ve bu genlerde mutasyon görülme olasılığı tüm meme kanseri vakaları içerisinde %5-10 oranındadır. Ancak Ashkenazi Jewish gibi bazı etnik gruplarda meme kanseri hastalarında *BRCA1* geninde mutasyon oranının %12 olduğu belirtilmiştir (King ve ark., 2003; Levy-Lahad ve Friedman 2007; Pal ve Mortimer 2009; Petrucelli, Nancie, Mary B. Daly 2013; Stevens ve ark., 2013).

BRCA1 ilişkili meme kanseri tümörlerinde sıklıkla belirlenen histopatolojik özellikler; yüksek mitotik sayı, ileri derecede nükleer polimorfizm ve az sayıda tubül yapıya sahip olmalarıdır. Gerçekleştirilen immunohistokimyasal ve moleküler analizler ile *BRCA1*

germline mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarının genellikle yaklaşık %75'nin TN fenotipe sahip olduğu ve tümör dokularında p53 proteinin genellikle pozitif eksprese olduğu belirlenmesine rağmen, *BRCA2* mutasyonu taşıyan hastalarda ise tümör dokuda herhangi bir protein ekspresyon seviyesinde önemli değişimin olmadığı belirlenmiştir. Öte yandan, *BRCA1* mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarının sadece %10'nu ER(+), %21'i PR(+) iken, *BRCA2* mutasyonu taşıyan hastaların %66'sı ER(+), %55-61 PR(+) ve %3'nün HER2(+) olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla özellikle *BRCA1* mutasyonu ile TNMK kanseri arasındaki ilişki araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Lakhani ve ark., 2005; Podo ve ark., 2010; Santana-Davila ve Perez 2010; Audeh 2014).

BRCA1 ilişkili meme kanseri tümörlerinin patolojisi incelendiğinde çoğunun bazal-benzeri tipte, TN fenotipte, sitokeratin 5, 14, 17 ve EGFR gibi bazal biyobelirteçleri pozitif eksprese ettiği tespit edilmiştir (Irvin ve Carey 2008; Peshkin ve ark., 2011). Ayrıca, *BRCA1* mutasyonu taşımayan sporadik TNMK hastalarının %20'sinde *BRCA1*'in rol aldığı DNA'da çift zincir kırıklarının tamirinde rol alan homolog rekombinasyon (HR) yolağının farklı nedenlerden (*BRCA1* metilasyonu ve/veya HR yolağında görev alan diğer genlerde meydana gelen değişimlerden (*RAD51* kaybı ve genomik kararsızlık vb.)) dolayı fonksiyonel olarak çalışmadığı tespit edilmiştir (Irvin ve Carey 2008; Chacón ve Costanzo 2010; Stevens ve ark., 2013; Abramson ve ark., 2014) Ayrıca, 50 yaş altı TNMK hastalarının %10-30'unun aile hikayesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle hem sporadik hem de kalıtsal bazal-benzeri meme kanserinde özellikle *BRCA1* ve HR yolağının önemli rol aldığı bilinmektedir (Irvin ve Carey 2008; Bosch ve ark., 2010; Peshkin ve ark., 2011).

2.2.5. Mevcut Tedavi Yöntemleri

TNMK hastalarının tedavisi, şu ana kadar TN tümörler için geliştirilen herhangi bir spesifik hedefli tedavi olmamasından, tümörün agresif davranışından ve hastaların kötü prognozundan dolayı günümüzde oldukça büyük bir sorun olmaktadır.

TNMK'da yeni moleküler hedefli tedavilerin geliştirilmesine dair çabalar devam etmesine rağmen, günümüzde yaygın olarak TNMK'nın lokal kontrolü için cerrahi yöntem kullanılmaktadır. Ancak, gerçekleştirilen bir meta-analizde, luminal alt tipler ile karşılaştırıldığında TN tümörlerde yüksek oranda lokal rekürrens görüldüğü için ameliyatın tipi, meme- koruyucu veya total mastektominin lokal ve lokoregional

rekürrenste önemli bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (Minami ve ark., 2011; Brouckaert ve ark., 2012; Schmadeka ve ark., 2014).

Mevcut sistemik kemoterapi olarak ise çoğunlukla üçüncü nesil adjuvan veya neoadjuvan kemoterapi rejimleri kullanılmaktadır. Bu bağlamda, TNMK hastaları antrasiklinler ve siklofosfamid temelli veya taksan ile kombin tedavi yöntemleri ile tedavi edilmektedir. Taksan ile kombin tedavi uygulanan TNMK hastalarında patolojik tam yanıt (pCR) ve hastaliksız sağ kalım oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur (De Giorgi ve ark., 2007; Gluz ve ark., 2009; Chacón ve Costanzo 2010; Isakoff 2010; Podo ve ark., 2010; Brady-west ve McGrowder 2011; Arnedos ve ark., 2012; Brouckaert ve ark., 2012; Ademuyiwa ve ark., 2013). Aslında, TN tümörlerin ER(+) ve/veya PR(+) hastalara göre neoadjuvan kemoterapiye karşı yüksek derecede kemosensitif ve yüksek pCR oranına sahip olmalarına rağmen, TNMK hastalarında rekürrens olmadan sağ kalım oranının düşük olduğu ve yaklaşık olarak %30'unda metastaz geliştiği belirlenmiştir. Ayrıca, neoadjuvan kemoterapiden sonra ilk 3 yılda hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım oranının TNMK olmayan hastalara göre oldukça düşük olduğu bilinmektedir (Griffiths ve Olin 2012; Guarneri ve ark., 2013; Schmadeka ve ark., 2014). M.D. Anderson Cancer Center tarafından gerçekleştirilen retrospektif bir çalışma da, 1985-2004 yılları arasında neoadjuvan kemoterapi alan I. ve II. evre meme kanseri hastalarının %23'ünün TNMK olduğu ve bu hastaların pCR oranının TNMK olmayan hastalara göre yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla %22-%11, p=0.034) (Liedtke ve ark., 2008; Gluz ve ark., 2009; Bosch ve ark., 2010; Cleere 2010; Brady-west ve McGrowder 2011; Gucalp ve Traina 2011). Bu yüzden TNMK hastalarında uygulanan kemoterapiye yüksek hassasiyet gösterenler, aslında TNMK hastalarının oldukça küçük bir kısmını oluşturduğu için bu sonuçlar TN paradoksunu ortaya çıkarmaktadır (Carey ve ark., 2007; Kassam ve ark., 2009; Isakoff 2010; Schmadeka ve ark., 2014).

Sporadik TNMK hastalarında ise uygulanan kemoterapiye yanıt heterojenite göstermektedir. Bu hastaların pCR oranı tek bir ajan için %12 iken, çoklu ajan için %27-65 arasında değişmektedir. TNMK hastalarında uygulanan kemoterapiye karşı pCR oranı oldukça büyük öneme sahip olduğu için, şu anda onkologlar tarafından tüm çabalar muhtemel ilacın ve dozunun belirlenmesine ve hastaya verilmiş zamanının

seçilmesine ayrılmaktadır (Rouzier ve ark., 2005; Carey ve ark., 2007; Liedtke ve ark., 2008; Ademuyiwa ve ark., 2013; Yadav ve ark., 2014).

Sonuç olarak, optimal sitotoksik tedavinin TNMK’da belirlenebilmesi için yeni ve bireysel hedefli tedavilerin geliştirilmesine ve geniş çaplı klinik deneme çalışmalarının gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.6. Yeni Terapötik Hedefli Tedaviler

Son dönemlerde “BRCAness” terimi, özellikle TNMK hastaları için yeni terapötik hedefli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde oldukça dikkat çeken bir terimdir (De Summa ve ark., 2013; Burgess ve Puhalla 2014). Bu terim, *BRCA1* mutasyonu taşıyan TNMK hastalarında *BRCA1*’de meydana gelen mutasyonlar sonucu ya da *BRCA1*’in görev aldığı HR mekanizmasında rol alan diğer proteinlerde meydana gelen değişimlerden dolayı bu hasarı hedef alan yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine yol açmıştır. Bu amaçla, TNMK hastalarında bireysel hedefli tedavinin geliştirilmesinde PARP inhibitörleri dikkat çekmektedir. Ayrıca, EGFR, tirozin kinaz, histon deasetilaz, mTOR inhibitörleri ve anti-anjiyojenik ilaçlar yeni terapötik hedefler içerisinde yer almaktadır (Tablo 3) (Pal ve Mortimer 2009; Cleere 2010; Podo ve ark., 2010; Bradyswest ve McGrowder 2011; Arnedos ve ark., 2012; Brouckaert ve ark., 2012; Duffy ve ark., 2012; Gelmon ve ark., 2012; Guarneri ve ark., 2013; Shastry ve Yardley 2013; Yadav ve ark., 2014; Tomao ve ark., 2015).

Tablo 3. TNMK tedavisinde araştırmaları devam eden yeni terapötik ajanlar (Cleere 2010).

Terapötik hedef	Ajanlar
DNA hasarı ve yanıtı	Platinyum ajanları, PARPinhibitörleri, trabectedin (DNA-bağlanma ajanı)
Mikrotübül inhibisyonu	Iksabepilon
Anti-anjiyogenez	Bevacizumab, sunitinib
EGFR-hedefli	Cetuximab, erlotinib
Src-hedefli	Dasatinib
mTOR hedefli	Temsirolimus, everolimus

2.2.6.1. EGFR İnhibitörleri

EGFR, TNMK’nin yaklaşık %60’ında ekprese olduğu bilinen erbB ailesine ait bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. EGFR’yi hedefleyen 2 temel sınıf ilaç geliştirilmiştir. İlk sınıfta yer alan ve IgG1 kimerik monoklonal antikor olarak geliştirilen Cetuximab EGFR’yi bloklayan bir ilaçtır. Diğer sınıfta ise, EGFR tirozin kinaz inhibitörü olarak gefinitib ve erlotinib yer almaktadır. Meme kanserinin tedavisinde EGFR inhibitörlerinin birçok sayıda klinik denemeleri devam etmesine

rağmen, sınırlı derece de aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu yüzden, EGFR inhibitörleri ile gerçekleştirilen klinik denemeler dışında TNMK tedavisinde bu inhibitörlerin kullanıma dair yetersiz veri bulunmaktadır (Arslan ve ark., 2009; Gluz ve ark., 2009; Pal ve Mortimer 2009; Brady-west ve McGrowder 2011; Crown ve ark., 2012; Guarneri ve ark., 2013; Schmadeka ve ark., 2014; Cetin ve Topcul 2014).

2.2.6.2. Anjiyogenez İnhibitörleri

Bevacizumab, vasküler endotelial büyüme faktörü-1 (VEGF-A) inhibe eden ve şu anda farklı kemoterapik ilaçlarla birlikte (paklitaksel, karboplatin ve sisplatin gibi) ileri ve erken evre TNMK faz II/III klinik denemeleri devam eden rekombinant monoklonal bir antikordur (Arslan ve ark., 2009; Pal ve Mortimer 2009; Brady-west ve McGrowder 2011; Gucalp ve Traina 2011; Crown ve ark., 2012; Guarneri ve ark., 2013; Schmadeka ve ark., 2014).

2.2.6.3. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Sunitinib, vasküler endotelial büyüme faktör reseptörünü (VEGFR), platelet-kaynaklı büyüme faktör reseptörünü (PDGFR), c-kit ve koloni uyarıcı faktör-1'i inhibe eden bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Şu anda, metastatik TNMK hastalarında faz II klinik denemeleri devam etmektedir.

TNMK tedavisinde diğer potansiyel bir hedef bazal-benzeri meme kanseri hastalarının %31'inde bulunan c-kit'tir. Imatinib, kronik myeloid lösemi tedavisinde kullanılan c-kit potansiyel inhibitörüdür. Ancak ileri evre meme kanseri tedavisinde herhangi bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Dasatinib ise, c-kit, src ve bcl kinazları inhibe eden diğer bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Özellikle, Src tirozin kinaz meme kanserinde yüksek ekspresye ve metastaz gelişimi ile ilişkili olduğundan dolayı TNMK hastalarında bir tedavi seçeneği olabilir. Şu anda faz II çalışmaları tamamlanmış ve sonuçların tamamlanması beklenmektedir (Arslan ve ark., 2009; Pal ve Mortimer 2009; Crown ve ark., 2012; Duffy ve ark., 2012; Guarneri ve ark., 2013; Hosford ve Miller 2014).

2.2.6.4. Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Histon deasetilaz DNA transkripsiyonu etkileyen bir enzimdir. HDAC inhibitörleri kanser hücrelerinin bölünmesini ve farklılaşmasını durdurarak kanser hücrelerinin apoptoza gitmesine neden olur. Ayrıca bu inhibitörler, ER ekspresyonunu restore

ettikleri için ER geninin susturulmasında önemli rol oynar. Faz I-II klinik denemelerinde kullanılan HDAC inhibitörlerine örnek olarak trichostatin A ve SK-7041 verilebilir. Bu inhibitörlerin meme kanserinde yolaklar ile ilişkilerine dair çalışmalar devam etmektedir (Arslan ve ark., 2009; Pal ve Mortimer 2009; Shastry ve Yardley 2013; Hosford ve Miller 2014).

2.2.6.5. mTOR İnhibitörleri

mTOR hücre döngüsü, proliferasyonu ve anjiyogenezde rol alan düzenleyici bir proteindir. mTOR, PI3K/Akt fonksiyonunda önemli bir kinaz olarak görev aldığından dolayı mTOR inhibisyonunun TNMK potansiyel terapötik bir hedef olacağı önem kazanmıştır. Klinik denemeleri devam eden 4 tane mTOR inhibitörü vardır. Bunlar; rapamisin, temsirolimus, everolimus ve deforolimus'tur. İleri veya metastatik meme kanseri hastalarında özellikle ER(+) post-menopozal kadınlarda mTOR inhibitörlerinin klinik denemelerinde olumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Bu yüzden, meme kanserinin farklı alt tiplerinin mTOR inhibitörlerine karşı daha hassas olabileceği düşünülmektedir. mTOR inhibitörleri ile doksetaksel, capecitabine, trastuzumab ve erlotinib gibi farklı ilaç kombinlerinin araştırıldığı klinik deneme çalışmaları devam etmektedir (Arslan ve ark., 2009; Pal ve Mortimer 2009; Crown ve ark., 2012; Hosford ve Miller 2014; Schmadeka ve ark., 2014).

2.2.6.6. PARP İnhibitörleri

DNA tamir yolaklarını hedefleyerek DNA hasarı oluşturan ajanlara karşı kanser hücrelerini duyarlı hale getirmek, kanser tedavisindeki yeni bir terapötik yaklaşım olarak görülmektedir. Nükleer bir enzim olan Poli(ADP riboz) polimeraz (PARP) ailesinin keşfedilmesi ve DNA tamir yolağındaki rolünün anlaşılması ile DNA tamir yolaklarına müdahale edebilen umut vadeci yeni bir antineoplastik ajan olarak PARP inhibitörlerinin gelişmesine yol açmıştır (Arslan ve ark., 2009; Gluz ve ark., 2009; Pal ve Mortimer 2009; Cleere 2010; Brady-west ve McGrowder 2011; Gucalp ve Traina 2011; Crown ve ark., 2012; De Summa ve ark., 2013; Guarneri ve ark., 2013; Cetin ve Topcul 2014; Tok ve Kocyigit Kaymakcioglu 2015).

PARP inhibitörlerinin çalışma mekanizması; özellikle *BRCA* ile ilişkili kanserlerde ve/veya sporadik TNMK'da HR yolağı çalışmadığı için, DNA'da tek zincir kırıklarının tamirinde görev alan baz ekzisyon onarımı (BER) yolağını hedef alarak

sentetik letaliteye neden olmasına dayanmaktadır (Javle ve Curtin 2011; Plummer 2011; Pierce ve ark., 2013; Audeh 2014; Cetin ve Topcul 2014; Livraghi ve Garber 2015).

Kanser tedavisinde PARP inhibitörlerinin kullanılabileceği ilk olarak 1980’de gündeme gelmiştir ve günümüzde *BRCA1/2* ile ilişkili kanser tiplerinde klinik faz araştırmaları devam eden farklı PARP inhibitörleri geliştirilmiştir. Bunlar; rucaparib (CO-338; AG014699, PF-0367338;oral/IV), iniparib (BSI-201), olaparib (AZD-2281; oral),veliparib (ABT-888; oral), MK-4827, BMN-673 (Talozoparib), CEP 9722 (oral) ve E7016 (GPI 21016, oral)’tır. PARP inhibitörlerinin klinik faz aşamaları Tablo 4’de gösterilmiştir (Javle ve Curtin 2011; Audeh 2014; Burgess ve Puhalla 2014; Benafif ve Hall 2015; Livraghi ve Garber 2015).

Tablo 4. PARP inhibitörlerinin klinik faz aşamaları (Erişim tarihi: 31.03.2017)

İlaç	Hasta popülasyonu	Faz Evresi	Uygulanan Çoklu Tedavi	Durumu*
Olaparib (AZD2281)	Tekrar eden TNMK veya ileri evre seröz over kanseri	1	PI3kinaz inhibitörü olan BKM120 veya BYL71	II
	Tekrar eden veya tedavisi zor kadın kanserleri (Servikal, over, meme, primer peritonel fallop tüpü, endometriyal kanser)	1	Karboplatin	I
	Meme ve over kanseri	1	Karboplatin	I
	Opere edilemeyen lokal ilerlemiş malign neoplazm, inflamatuvar meme kanseri, TNMK	1	Radyoterapi	II
	TNMK, ilerlemiş over kanseri	1	Karboplatin Paklitaxel Paklitaxel + Karboplatin	I
	İlerlemiş solid tümörler (over, meme, küçük hücreli akciğer, gastrik kanserler)	1/2	MEDI4736	II
	İlerlemiş solid tümörler ve ilerlemiş ve tekrar eden over, TNMK, akciğer, prostat ve kolorektal kanserler	1/2	Cediranib	II
	Tekrar eden endometriyal ve over kanseri	1/2	mTOR 1/2 inhibitörleri AZD2014 AZD5363	II
	Germline <i>BRCA</i> Mutasyonu taşıyan veya tekrar eden ileri evre over kanseri veya bilinen <i>BRCA</i> mutasyonu taşıyan TNMK	2		I
	<i>BRCA</i> 1/2 mutasyonu taşıyan ileri evre meme kanseri (ICEBERG 1)	2		I
	Metastatik veya cerrahi müdahale ile alınamayan solid tümörler	2	Cediranib Maleate	III
	İlerlemiş solid tümörler	2	Cediranib	I
	Genetik <i>BRCA1/2</i> Mutasyonu taşıyan over, meme, prostat, pankreas ve ileri tümörler	2		I
	Metastatik meme kanseri (SAFIR02_Breast)	2	AZD2014, AZD454 AZD5363, AZD8931, Selumetinib, Vandetanib, Bicalutamid, Antrasiklinler, Taksanlar, Siklofosamid, DNA enterkalatörleri, Metotreksat, Vinka alkaloidler, Platinyum temelli kemoterapiler, Bevacizumab, Mitomisin C, Eribulin	II

	<i>BRCA</i> 1/2 mutasyonu taşıyan metastatik meme kanseri (OlympiAD)	3	Hekimin seçimi kemoterapi ile birlikte	I
	İlerlemiş ve tekrar eden solid tümörler (Meme neoplazm, over kanseri, epitelyal, Ewing sarkoma, küçük hücreli akciğer, prostat, ve pankreas kanseri)	1		I
	Metastatik ilerlemiş solid tümörler veya tekrar eden over, fallop tüpü, primer periton veya TNMK	1	AT13387 HSP90 inhibitörü	VI
Talazoparib (BMN 673)	Patojenik <i>BRCA</i> mutasyonu taşıyan ilerlemiş solid tümörler (over, meme, ve primer periton kanseri)	1/2		II
	İlerlemiş kanserler	2	Talazoparib Tosilat	I
	Lokal ilerlemiş veya metastatik <i>BRCA</i> mutasyonu taşıyan meme kanseri (ABRAZO)	2		I
	Lokal ilerlemiş veya metastatik <i>BRCA</i> mutasyonu taşıyan meme kanseri (EMBRACA)	3		II
	İleri Solid Tümör	1	Irinotecan	IV
	Metastatik TNMK	2	Gemcitabin/Karboplatin	IV
	Beyin metastazi olan TNMK	2	Irinotecan	IV
	TNMK	2	Gemcitabin + Karboplatin	IV
İniparib (BSI-201)	TNMK (SOLTI NEOPARP)	2	Paklitaksel	I
	Metastatik TNMK	2	Gemcitabin/Karboplatin	IV
	Neadjuvan tedavi gören TNMK	2	Gemcitabin/Karboplatin	IV
	Meme kanseri	3	Gemcitabin + Karboplatin	V
	Metastatik TNMK	3	Gemcitabin/Karboplatin	IV
	Tekrar eden over, fallop tüpü veya primer periton kanseri veya metastatik meme kanseri	1	Lipozomal Doksorubisin hidroklorit	II
	Hemotolojik olmayan tümörler, metastatik melanoma, meme, over, primer periton, fallop tüpü, hepatoselüler kanserler	1	Temozolomid	IV
	Meme, over, kolon, akciğer, gastrik kanserler, solid tümörler	1	Karboplatin Paklitaksel FOLFIRI	I
	Meme kanseri	1	Radyasyon terapi	I
	Lokal ilerlemiş veya metastatik meme kanseri	1	Siklofosfamid	II
	HER2-negatif metastatik meme kanseri	1	Karboplatin	I
	Tekrar eden ve/veya metastatik meme kanseri	1	Sisplatin Vinorelbin tartrat	I
Veliparib ABT-888	Maling solid tümörler	1		I
	İlerlemiş solid tümöre sahip Japon bireyler	1		I
	Cerrahi müdahale ile çıkarılması mümkün olmayan veya metastatik solid tümörler	1	Lipozomal Irinotecan Ferumoxytol	III
	Lokal ilerlemiş veya metastatik solid tümörü olan tedavi gören hastalar	1	Karboplatin Paklitaksel	IV
	Cerrahi müdahale ile çıkarılması mümkün olmayan veya metastatik solid tümörler ve karaciğer veya böbrek fonksiyon bozukluğu	1	Karboplatin Paklitaksel	II
	İlerlemiş solid tümöre sahip tedavi gören hastalar	1	Karboplatin Paklitaksel	IV
	Evre III veya IV meme kanseri	2	Karboplatin	I
	<i>BRCA</i> mutasyonu ilişkili ve/veya evre IV TNMK	2	Sisplatin	III

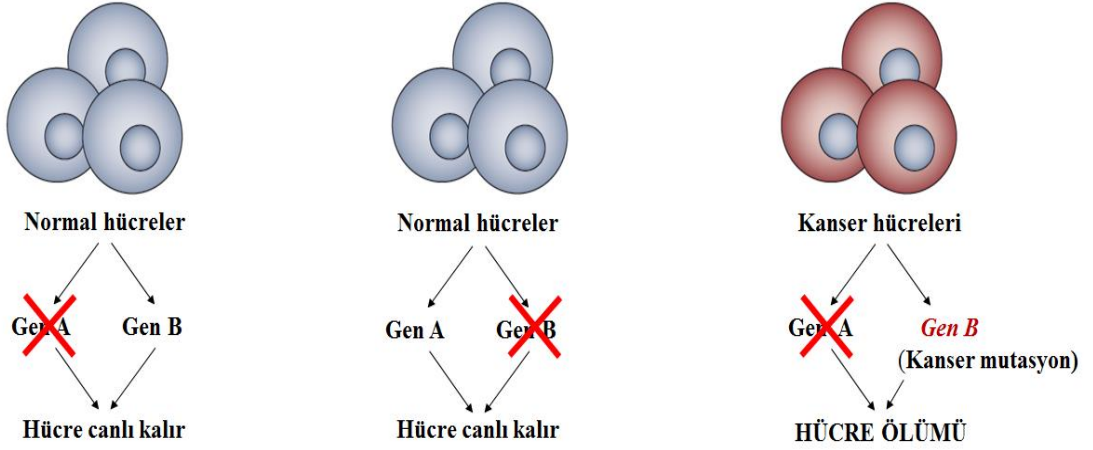
	Over, primer periton, seröz karsinoma, TNMK, fallop tüpü kanserleri	2	Siklofosamid	III
	Metastatik meme kanseri ve <i>BRCA1/2</i> meme kanseri	2	Temozolomid	I
	<i>BRCA1/2</i> mutasyonu taşıyan ve metastatik meme kanseri	2	Temozolomid Karboplatin Paklitaksel	I
	HER2-negatif metastatik veya lokal ilerlemiş cerrahi olarak çıkarılması mümkün olmayan <i>BRCA</i> ilişkili meme kanseri	3	Karboplatin+Paklitaksel	II
Rucaparib	<i>BRCA1/2</i> mutasyonu taşıyan TNMK	2	Sisplatin	I
	BRCAness Genomik imzası taşıyan metastatik meme kanseri (RUBY)	2		III
	Lokal ilerlemiş veya metastatik meme kanseri veya ilerlemiş over kanseri	2		IV
Niraparib	TNMK veya over kanseri (KEYNOTE-162)	1/2	Pembrolizumab	I
	Germline <i>BRCA1/2</i> mutasyonu taşıyan HER2 negatif meme kanseri hastaları (BRAVO)	3	Hekimin seçimi	II
E7449	İlerlemiş solid tümör (malign solid tümör, over, TNMK, ilerlemiş melanoma) veya B-hücre maligniteler	1/2	Temozolomid (TMZ) veya Karboplatin+Paklitaksel	I
	Meme kanseri	1/2	Karboplatin Eribulin	VI

*Durumu: I. Bu çalışma katılımcı alınmadan devam etmektedir; II. Bu çalışmaya şu anda katılımcı alınmaktadır; III. Bu çalışma henüz katılımcı alımı için açılmamıştır; IV. Bu çalışma tamamlanmıştır; V. Bu tedavi için genişletilmiş erişim artık kullanılabilir; VI. Bu çalışma kaydından önce geri çekilmiştir

2.2.6.6.1. Sentetik Letalite

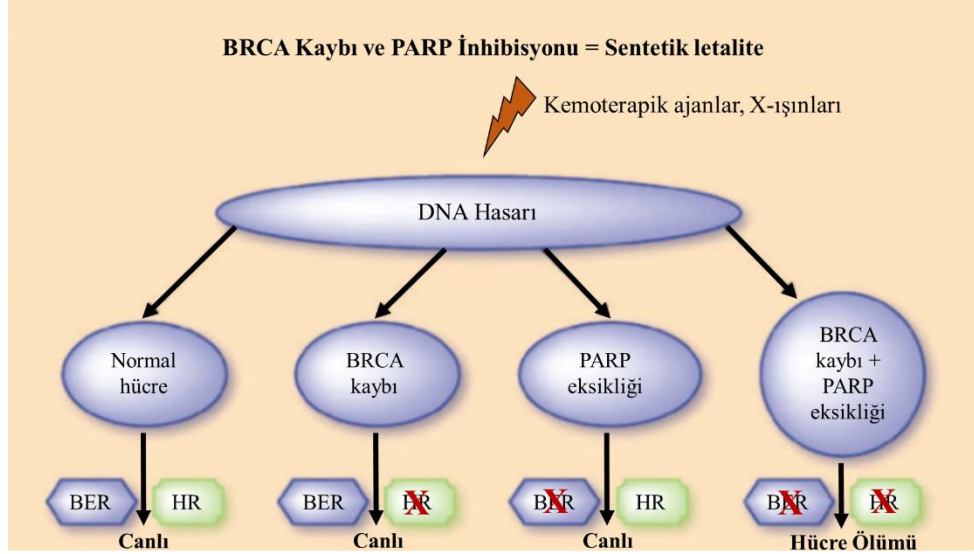
İlk olarak Calvin Bridges tarafından sentetik letalite, model organizma olarak kullanılan *Drosophila melanogaster*'de farklı gen kombinasyonlarının ölüme neden olduğunun farkedilmesi ile tanımlanmıştır. 1946 yılında ise Theodore Dobzhansky tarafından sentetik letalite, *Drosophila pseudoobscura*'da gözlemlenmiş ve aynı tipte genetik etkileşimler olarak tanımlanmıştır. 2005 yılında Kaelin ise, iki genden birinde meydana gelen mutasyon canlılık ile uyumlu iken ikisinde olan mutasyon hücre ölümüne neden oluyorsa bu iki genin sentetik letal olduğunu belirtmiştir (Kaelin 2005).

Sentetik letalite, iki veya daha fazla gende aynı anda mutasyon oluşması sonucu hücrenin ölümüne yol açan olay olarak tanımlanabilir (Şekil 5). Bu kavram *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan, kötü prognoza sahip, metastaz potansiyeli yüksek olan TNMK hastalarında PARP inhibitörlerinin tedavide etkin kullanımında önem kazanmaktadır (Anders ve ark., 2010; Chan ve Giaccia 2011; Javle ve Curtin 2011; Plummer 2011; Burgess ve Puhalla 2014).



Şekil 5. Sentetik letalite. Normal hücrede A ya da B geninden herhangi birinin kaybı diğer genin aktivasyonu ile telafi edilmesine rağmen, kanser hücrelerinde genlerden birinde mutasyon oluşması diğer genin ilaç inhibisyonu ile kaybının gerçekleşmesi tedaviye hassasiyet sağlar (Rehman ve ark., 2010).

DNA’da tek zincir kırığına yol açan alkilleyici ajanların hasarı ve oksidatif hasar normal koşullarda BER ile tamir edilir. BER yolunun bir PARP inhibitörü ile bloke edilmesi, tamir edilemeyen tek zincir kırıkları replikasyon çatalının çökmesini sağlayarak çift zincir kırıklarının oluşmasına yol açar. Meydana gelen çift zincir kırıklarının tamiri, *BRCA1/2* genlerinin görev yaptığı homolog rekombinasyon (HR) onarım mekanizması tarafından gerçekleştirilir. Bu yüzden *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan kanser hastalarında, DNA’da oluşan çift zincir kırıkları tamir edilemediğinden dolayı kanser hücrelerinin ölümüne yol açar. Böylece hem BER ve hem de HR eş zamanlı olarak inhibe edilerek PARP inhibitörleri sentetik letaliteye sebep olur (Şekil 6) ve kanser hücrelerinde PARP inhibitörlerine karşı hassasiyet gelişir (Arnaudeau ve ark., 2001; Hartman ve Ford 2002; Bryant ve ark., 2005; Helleday ve ark., 2005; Kaelin 2005; Helleday ve ark., 2008; Lord ve Ashworth 2008; Anders ve ark., 2010; Ström ve ark., 2011; Livraghi ve Garber 2015).



Şekil 6. PARP inhibitörlerinin uygulanması sonucu *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan ve/veya HR yolğunun inaktif olduğu olduğu kanser hastalarında sentetik letalite ile hücre ölümünün gerçekleşmesi (Anders ve ark., 2010).

2.2.6.6.2. BMN 673 (Talozaparib)

BMN 673, *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan TNMK tedavisinde Faz II/III deneyleri devam eden ancak henüz FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onayı almamış oral olarak uygulanan bir PARP inhibitörüdür. BMN 673 PARP proteinine bağlanarak PARP'ın katalitik aktivitesini inhibe eden ve böylece DNA'da tek zincir kırıklarının tamir edilmesini engelleyen bir inhibitördür. Günümüzde, BMN 673 ile ilgili yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar değerlendirildiğinde, BMN 673'ün farklı hücre hatlarında [SUM149, MX-1 (*BRCA1* defektif), Capan-1 (*BRCA2* defektif), MB-468 (*PTEN* defektif), LnCap (*PTEN* defektif), PC-3 (*PTEN* defektif), SW620, MDA-MB-231, MRC-5 vb.] etkisi diğer PARP inhibitörleri (olaparib, veliparib, rucaparib) ile karşılaştırıldığında 20-200 kat daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu ve bu nedenle potansiyel terapötik bir ajan olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Shen ve ark., 2013; Postel-Vinay ve ark., 2013; Murai ve ark., 2014; Qiu 2014; Andrei ve ark., 2015). Ayrıca, Cardnell ve ark. tarafından küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri ve ksenograft modelde tek ajan olarak BMN673'ün sisplatine benzer bir şekilde *in vitro* aktiviteye sahip olduğu ve PI3K/mTOR yolğında aktivasyonun ise BMN673'e karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenmiştir. Bu nedenle PI3K inhibitörleri ile diğer PARP inhibitörlerinde (olaparib, iniparib) gerçekleştirilen çalışmalarda olduğu gibi (İbrahim ve ark., 2012; Juvekar ve ark., 2012; Rehman ve ark., 2012) BMN 673'ün,

meme kanseri tedavisinde kombin tedavi olarak kullanımının terapötik bir yaklaşım olabileceği belirtilmiştir (Cardnell ve ark., 2013).

BMN 673'ün ilk yapılan klinik Faz I deneylerinde günlük 25-1100 µg BMN 673 alınımının *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan ve solid tümörü olan hastalarda BMN 673'ün tek ajan olarak kullanımında etkin sonuç alınabileceği belirlenmiştir. Ancak BMN 673'ün plazma konsantrasyonunun hastalara verilmesinden 1-2 saat sonra maksimum seviyeye ulaştığı ve daha sonra azaldığı için doz arttırılması gerektiği ve bu nedenle hastalara 28 gün boyunca BMN 673'ün 25-1000 µg günlük doz uygulanmasından iki hafta sonra stabil plazma konsantrasyonuna ulaşıldığı belirtilmiştir. Ayrıca, hastaların %20'sinde toksisite, yorgunluk, kusma, anemi ve miyelosüpresyon gibi yan etkiler gözlemlenmiştir. Ayrıca, lokal ilerlemiş veya metastaz gösteren patojenik *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarında BMN 673'ün etkinliğinin ve güvenilirliğinin araştırıldığı Faz II çalışması (ABRAZO çalışması) ve lokal ilerlemiş veya metastaz gösteren *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan meme kanseri hastaların da Faz III çalışması (EMBRACA çalışması) devam etmektedir (de Bono ve ark., 2013; Sonnenblick ve ark., 2014a).

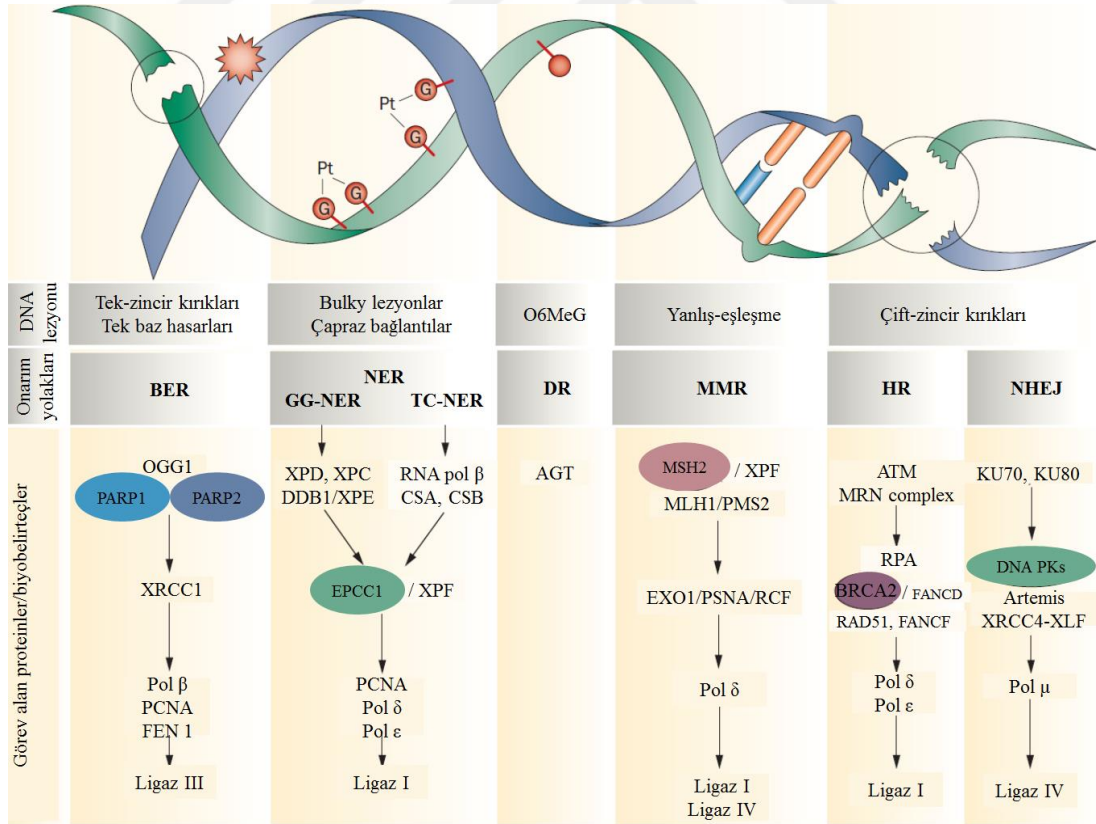
2.3. DNA Onarım Mekanizmaları

Genomik DNA, endojen veya ekzojen kaynaklı etkenler nedeniyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. DNA hasarına neden olan endojen ve ekzojen etmenler Tablo 5'de özetlenmiştir. Bu etkenler sonucunda DNA'da meydana gelen hasarlar tek baz değişimi (deaminasyon, depürinasyon, baz alkilasyonu, delesyon, insersiyon vs), tek veya çift zincir kırıklarının oluşması, aynı veya farklı DNA zincirleri arasında çapraz bağlanma gibi farklı şekillerde gerçekleşir. Meydana gelen hasarın yoğunluğuna ve tipine bağlı olarak, hücrede temel olarak 4 farklı yanıt oluşmaktadır. Bunlar; hücre döngüsünün durdurulması, gen ifadesinin değiştirilmesi, DNA tamir yolları ile hasarlı DNA onarımının gerçekleşmesi ve programlı hücre ölümünün uyarılmasıdır (Bilge Debeleç-Bütüner ve Kantarcı 2006; Hoeijmakers 2009; Onur ve ark., 2009; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015).

Tablo 5. DNA hasarına neden olan endojen ve ekzojen etkenler.

Endojen Etkenler	Ekzojen Etkenler
Yanlış baz eşleşmesi	Kimyasal ajanlar (afлотоксин, benzopren, kemoterapik ilaçlar, alkilleyci ajanlar, ağır metaller vb.)
İnsersiyon, delesyon	Fiziksel ajanlar (UV radyasyon, iyonize radyasyon vb.)
Baz kayıpları (depurinasyon/depirimidinasyon)	Virüsler
Replikasyon hataları	
Oksidatif hasar (Lipid peroksidasyon ürünleri, endojen alkilasyon ajanları, östrojen ve kolesterol metabolitleri ve reaktif karbonil türleri)	
Kimyasal değişimler (deaminasyon, metilasyon)	

Genomik bütünlüğü sürdürmek için memeli hücrelerinde 5 temel DNA onarım mekanizmasının görev yaptığı ve 130'dan fazla genin bu mekanizmalarda görev aldığı tahmin edilmektedir. Bu mekanizmalar; baz kesip-çıkarma (BER), nükleotid kesip-çıkarma (NER), yanlış eşleşme onarımı (MMR), homolog rekombinasyonel onarım (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) mekanizmalarının yer aldığı çift zincir kırıklarının onarımıdır (Şekil 7) (Sancar ve ark., 2004; Dexheimer 2013).



Şekil 7. DNA tamir mekanizmaları (Postel-Vinay ve ark., 2012).

2.3.1. Baz Ekzisyon Onarımı (BER)

Alkilasyon, deaminasyon, oksidasyon ve DNA replikasyon hatalarının sonucunda yanlış yerleşen hasarlı bazların onarımı BER ile gerçekleşmektedir. BER mekanizmasında DNA glikozilaz, AP endonükleaz ya da AP DNA liyaz, DNA polimeraz ve DNA ligazı içeren enzimler yer alır (Jacobs ve Schär 2012).

Bu mekanizma temel olarak;

1. Yanlış bazın uygun bir DNA N-glikozilaz tarafından, N-glikozidik bağın hidrolize edilmesi ile DNA bölgeleri olan bazik AP (Apürinik/ Apirimidinik) bölgesinin oluşması,
2. Hasarlı DNA'ya AP bölgesinin 5' ucuna doğru AP endonükleaz tarafından çentik atılması ve AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu oluşturulması,
3. AP bölgelerinin apürinik/apirimidinik endonükleaz 1 (APE1) tarafından kesilmesi ile 3'OH ve 5-deoksiriboz fosfat (5-dRP) ucu olan tek zincir kırıklarının oluşması ve AP bölgelerinin kesilip çıkarılarak uzaklaştırılması,
4. Son olarak, DNA polimeraz tarafından doğru nükleotidin yerleştirilmesi ve zincirin ligasyonu ile onarım tamamlanır (polimeraz- β). Bu aşamada, kısa yamalı (short-patch) BER (SP-BER) ve uzun-yamalı (long-patch) BER (LP-BER) olmak üzere iki ayrı alt yolak görev alır. SP-BER tek nükleotid değişimi gerçekleşirken, LP-BER 2-8 arası nükleotidin kesilip çıkarılmasında rol alır. SP-BER, tek nükleotidin DNA polimeraz β tarafından doldurulması ve DNA ligaz I veya DNA ligaz III ve XRCC1 kompleksi tarafından DNA uçlarının ligasyonunu kapsar. SP-BER yaklaşık olarak BER mekanizmasının %90'nını oluşturmaktadır. LP-BER ise, sadece 5' ile sonlanan lezyonlarda DNA polimeraz β ve/veya δ ve ϵ , Proliferatif Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA), replikasyon faktör C (RFC), FEN1 flap endonükleaz-1 (FEN1), ve DNA ligaz I gibi replikasyonda görev alan bazı proteinler ile hasarlı bölgenin uzaklaştırılmasını sağlar (Sancar ve ark., 2004; Fortini ve Dogliotti 2007; Hitomi ve ark., 2007; Caldecott 2008; Dexheimer 2013; Kurtoğlu ve Tekedere 2015).

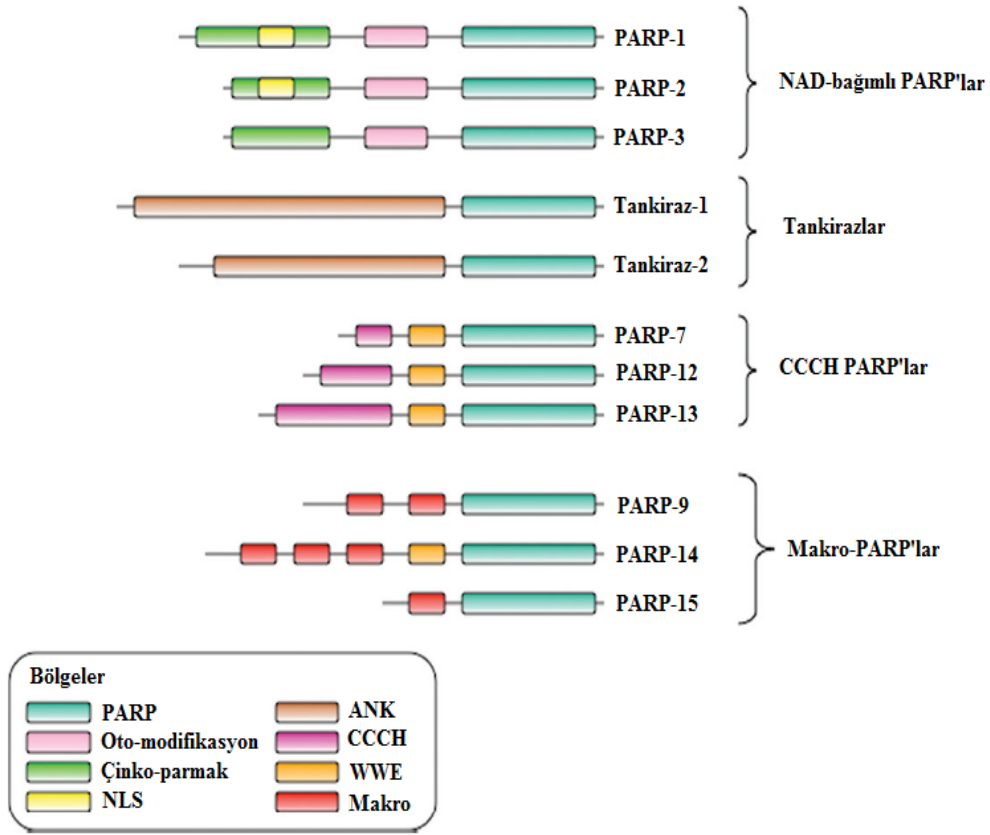
Günümüzde en az 12 tane DNA N-glikozilaz tanımlanmıştır. Ayrıca, DNA N-glikozilazlar AP liyaz aktivitesine sahiptir. Bu şekilde AP bölgesinin kırık kenarında

3'-fosfo- α , β -doymamış aldehit ve 5'-fosfat üreterek uygun nükleotidin yer alması için AP bölgelerini uzaklaştırır (Jacobs ve Schär 2012; Dexheimer 2013).

Bu faktörlere ek olarak, ikinci sınıf proteinler BER yolağında hızlandırıcı etkiye sahiptir. Bu proteinler içerisinde en önemlileri; X-ray repair cross-complementing (XRCC1) ve poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1)'dir. XRCC1 herhangi bir enzimatik aktiviteye sahip olmamasına rağmen, BER mekanizmasında yer alan bazı enzimatik bileşenlerin düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Örneğin, XRCC1 bazı DNA glikozilazlar, DNA polimeraz β , APE1, DNA ligaz III, polinükleotit kinaz 3'-fosfataz (PNKP), tirozil-DNA fosfodiesteraz 1 (Tdp1) ve APTX gibi BER proteinler ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir. PARP1, DNA tek zincir kırıklarının moleküler sensörü olarak davranan nükleer bir proteindir. DNA'da hedefine bağlandıktan sonra, PARP-1 poli ADP ribozilasyonu (PAR)'ı ve diğer protein substratlarını katalizler. PAR ise XRCC1 gibi tamir proteinlerinin hasarı tamir etmesine yardımcı olur. Ayrıca, PARP1'in XRCC ile etkileşimde olduğu bilinmektedir (Sancar ve ark., 2004; Fortini ve Dogliotti 2007; Dexheimer 2013; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015).

2.3.1.1. PARP

PARP, ökaryot hücrelerde bol miktarda bulunan, DNA'da tek zincir kırıklarının oluşması sonucu farklı hücresel proteinlerde glutamik asitin γ karboksi grubuna ADP-riboz unitlerini kovalent olarak bağlayan ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (NAD⁺) substrat olarak kullanarak oluşan tek zincir kırıklarını tanıyan ve kromatin ilişkili proteinlerin değişimine neden olan bir nükleer proteindir. PARP proteini DNA tamiri ve hücre ölümü gibi farklı biyolojik yollarda görev almaktadır. İlk olarak 1963 yılında tanımlanmış olan PARP proteini 18 üyeden oluşan geniş bir ailedir (Tablo 6) ve domain yapısına göre 4 alt gruba ayrılmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. PARP proteinlerinin 4 temel alt ailesinin yapısı ve özellikleri. Fonksiyonel bölgeler renkli gösterilmiştir. PARP bölgesi PAR-ilasyon aktivitesinden sorumludur. Oto-modifikasyon bölgesi ADP-riboz polimer tarafından modifiye edilen dizilerinden oluşur. Çinko-parmaklar DNA bağlanma bölgeleridir. NLS (Nükleer Lokalizasyon Alanı) sitoplazmadan nükleusa proteinlerin taşınmasında (import) rol alır. ANK (ankyrin) etkileşim modülleridir. CCCH RNA bağlanma bölgeleridir. WWE bölgesi protein-protein etkileşim motifleridir. Makro bölgeler ADP-riboz veya O-asetil-ADP-riboz bağlanma modülü olarak işlev görür (Rodríguez ve ark., 2015).

DNA-bağımlı PARP'ların (PARP-1, 2, 3) DNA bağlanma bölgesi, DNA'da meydana gelen lezyonlar tarafından aktive olur. PARP-1 ve PARP-2 tarafından düzenlenen poli-ADP ribozilasyon hasarlı bölge etrafında kromatinin gevşemesine ve DNA tamirinin hızlanmasına neden olduğu için DNA hasar sensörü ve sinyal iletici olarak görev almaktadır. Kanser tedavisinde PARP enzimleri üzerine çalışmalar özellikle PARP-1'e yoğunlaşmaktadır (Malanga ve Althaus 2005). PARP-1; DNA tamirinde, apoptozis, hücre regülasyonu, hücre bölünmesi, farklılaşma, transkripsiyonel regülasyon ve kromozom stabilizasyonunda önemli rol oynar. PARP-1, üç fonksiyonel bölgeden oluşmaktadır. Bu bölgeler; DNA'da meydana gelen lezyonu tanması için N-terminal DNA bağlanma bölgesi, otomodifikasyon bölgesi ve C-terminal katalitik NAD-bağlanma bölgesidir. DNA bağlanma bölgesi, DNA kırıkları ile etkileşime girmesi için 3 tane çinko-parmak motifi içerir. DNA bağlanma bölgesi, DNA'daki

lezyonu tanıdığı zaman, C-terminal katalitik bölgesinde yapısal değişime neden olur ve enzimatik aktiviteyi başlatır. PARP-1 hücrelerde ADP-ribozilasyonunun %90'ından fazlasını oluştururken, PARP-2 ise sadece PAR üretiminin %15'inden sorumludur ve henüz tam olarak rolü açıklanamamıştır. Ayrıca PARP-1 polimorfizmlerinin örneğin germ hücre tümörleri, meme, mesane, akciğer, gastrik ve prostat kanserlerinin gelişme riskini arttırdığı belirtilmiştir. Özellikle gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* deneylerde PARP-1 katalitik bölgesinde Val762Ala değişiminin over kanserinin klinik yanıtında etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. PARP-3 ise, hücre döngüsü boyunca kardeş sentriyolde konumlanan ve sentrozomun temel bileşeni olarak tanımlanmıştır (Yelamos ve ark., 2011; Morales ve ark., 2014). VPARP (PARP-4)'ın rolü henüz tam olarak açıklanamamasına rağmen, hücresel transport ve bazı hücre hatlarında çoklu-ilaç direnci (MDR) ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Tankiraz I ve II olarak adlandırılan PARP grubu, büyük ankyrin bölge tekrarları içerir ve protein-protein etkileşiminde görev alır. Tankiraz I ve II, TRF1, IRAP, Glut4, Grb14, TAB 182 ve NuMa gibi aynı grup proteinlerle etkileşime girerler. Bu yüzden Tankiraz I ve II telomer homeostazı, glukoz transportu ve insülin sinyali gibi vezikül trafiğinde rol aldığı belirlenmiştir. Tankiraz I ve II mitoz boyunca telomeraz, nükleer porlar ve golgi vezikülü gibi farklı hücre içi lokalizasyon göstermektedir. Ayrıca, Tankiraz II, Tankiraz I'den farklı olarak yüksek ekprese olduğu zaman mitokondriyal potansiyel aracılığı ile kaspaz bağımsız hücre ölümünü tetiklemektedir. Makro-PARP'lar (PARP-9, PARP-14 ve PARP-15) ise, transkripsiyon kofaktörü olarak immün yanıtta, kanser gelişiminde ve DNA hasarına yanıtta makro bölge katlanmaları ile karakterizedir ve proteinlerin lokalizasyonunu düzenler. CCCH-PARP proteinleri (PARP-7, PARP-12 VE PARP-13) ise, C-X₇-C-X₅-C-X₃-H tipte çinko parmak (CCCH), bir veya iki WWE bölgesi ve PARP bölgesi içeren proteinlerdir. TiPARP'ın (PARP-7) gerçek rolü ise henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak T- hücrelerinin fonksiyonunda ve 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) ile uyarıldığında tümör oluşumunda görev aldığı düşünülmektedir. PARP-12 ve PARP-13 immün sistemi uyarak hem konak proteinde hem viral mRNA'da anti-viral etkiye ve stress yanıtının düzenlenmesinde görev aldığı belirtilmiştir. PARP ailesi üyelerinin muhtemel biyolojik rollerinin araştırılması için gerçekleştirilen ileri çalışmalarda, katalitik bölgeleri farklı parmak çinko, SAP, Ankyrin, BRCT, Makro bölge ve SAM

gibi farklı adaptör bölgelerine sahip diğer tanımlanan PARP proteinlerinden farklı özellikte olan yeni PARP proteinleri bulunmuştur. Bu yüzden, PARP proteinlerinin diğer proteinlerle etkileşimde olduğu bölgelerin fonksiyonunun tanımlanması ile farklı sinyal yollarına katılan proteinlerin Poli-ADP ribozilasyon aktivitesindeki çeşitliliğin hedeflenmesi yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabilir (Amé ve ark., 2004).



Tablo 6. PARP ailesi üyeleri

PARP ailesi üyeleri	Alternatif ismi	Alt sınıfı	Boyut (aa)	Kromozom	Lokalizasyonu	Enzimatik aktivitesi	Temel fonksiyonel bölgeleri ve motifleri
PARP1		DNA-bağımlı	1014	1q41-42	Nükleus	P, B	WGR, çinko-parmak , BRCT
PARP2		DNA-bağımlı	583	1q41-42	Nükleus	P, B	DBD, WGR
PARP3		DNA- bağımlı	533	1q41-42	Nükleus Sentrezom	P	WGR
PARP4	vPARP		1724	13q11	Sitoplazma, Nükleus	P(p)	BRCT
PARP5A	Tankiraz 1, TNKS1	Tankiraz	1327	8p23.1	Nükleus, Sitoplazma	P,O	Ankyrin dizi tekrarları, SAM
PARP5B	Tankiraz 2, TNKS2	Tankiraz	1166	10q23.3	Nükleus, Sitoplazma	P,O	Ankyrin dizi tekrarları, SAM
PARP6			630	15q22.3	ND	M(p)	
PARP7	TIPARP	CCCH PARP	657	3q25.31	ND	M	Çinko-parmak, WWE
PARP8			854	5q11.2	ND	M(p)	
PARP9	BAL1	Makro PARP	854	3q21	Nükleus, Sitoplazma	M(p)	Makro-bölge
PARP10			1025	8q24.3	Nükleus, Sitoplazma	M	
PARP11			331	12p13.3	ND	M(p)	WWE
PARP12	ZC3HDC1	CCCH PARP	701	7q34	Nükleus	M(p)	Çinko-parmak, WWE
PARP13	ZC3HAV1, ZAP	CCCH PARP	902	7q34	Sitoplazma, (Nükleus)	M(p)	Çinko-parmak, WWE
PARP14	BAL2, COAST6	Makro PARP	1801	3q21.1	Nükleus, Sitoplazma	M	Makro-bölge, WWE
PARP15	BAL3	Makro PARP	678	3q21.1	Nükleus	M(p)	Makro-bölge
PARP16			322	15q22.2	Nükleus, RE membranları	M(p)	

Bilinen yada tahmin edilen enzimatik aktivite; M: Mono, O: Oligo veya P: Poli-ADP ribozilasyon, B: Dallanma (kollara ayrılma), p: Tahmin edilen.

BAL: B-agresif lenfoma protein, COAST6: Transkripsiyonun sinyal iletilici ve aktivatör transkripsiyon-6, ND: Henüz belirlenmemiş, ZAP1: Çinko-parmak antiviral protein 1, ZC3HAV1: Çinko-parmak CCCH-tip antiviral protein 1, ZC3HDC1: Çinko-parmak CCCH bölge içeren protein 1, aa: Aminoasit

2.3.2. NER

NER mekanizması, UV ışığı etkisi sonucu oluşan siklobütan pirimidin dimerleri (CPD) ve 6-4 foto ürün lezyonları gibi pirimidin dimerlerinin ya da çoğunlukla mutajenik kimyasalların ve kemoterapötik ajanların (sisplatin vb.) oluşturduğu DNA eklentileri sonucunda oluşan çift zincir DNA'nın normal heliks yapısını bozan DNA lezyonlarının onarımında görev alan mekanizmadır.

NER, DNA lezyonunda yer alan farklı proteinler tarafından düzenlenir. Mekanik olarak BER mekanizmasına benzemesine rağmen, NER; 30'un üzerinde farklı proteini içeren daha kompleks çok aşamalı bir mekanizmasıdır. Bu aşamalar; DNA hasarının tanınması, lezyon etrafından DNA heliksinin açılması, DNA lezyonunun segmentlerinde kısa tek zincirlerin kesip çıkarılması, oluşan boşluğun DNA polimerazlar tarafından doldurulması ve ligasyondur. NER mekanizmasının önemi NER meydana gelen defektler Kseroderma pigmentasum, Cockayne sendromu (CS), Trikotiodistrofi (TTD) gibi bazı genetik olarak otozomal resesif hastalıklar grubu ile ilişkili olmasından kaynaklanmaktadır. Bu hastalıklar ekstra UV hassaslığı ile karakterizedir ve kanser gelişim geriliği, immunolojik kusurlar, nörolojik fonksiyon bozukluğu ve erken yaşlanma gibi bazı durumlarda gözlenebilir (Costa ve ark., 2003; Shuck ve ark., 2008; Sugawara 2010; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015).

NER mekanizması 2 temel alt yolağtan oluşur; Global genom NER (GG-NER) ve Transkripsiyon-kenetlenmiş NER (TC-NER). GG-NER tüm genom boyunca DNA lezyonlarını uzaklaştırmasına rağmen, TC-NER aktif bir şekilde transkribe olan genin kodlanan zincirinde yer alan lezyonların tamirinden sorumludur. Her iki yolağta da başlangıçta hasarın tanınma aşaması farklıdır. GG-NER'de temel hasar tanıma faktörü XPC/HR23B/CEN2 (XP komplementasyon grubu C/ Rad23 homolog B/ Centrin-2) protein kompleksidir. HR23B ve CEN2 aksesör proteinleri XPC'nin heliks yapısı bozulmuş DNA hasarına spesifik bağlanması ve affinitesinin de görevlidir. Hasarın tanınması için ayrıca, DDB1 ve DDB2 proteinlerini yer aldığı UV-DDB (UV-Damaged DNA Binding) kompleksi DNA'nın heliks yapısının bozulmasına neden olan lezyonların tanınmasını kolaylaştırır. TC-NER'de hasarın tanınması RNA polimeraz II'nin (RNAPII) DNA hasarı olan bölge ile karşılaştığı zaman başlar. Ardından, Cockayne sendromu A (CSA) ve Cockayne sendromu B (CSB) olan TC-NER spesifik proteinleri NER proteinlerinin lezyona ulaşması için RNAPII ile birlikte

hasarın tanınmasını ve RNAPII'nin stabilize edilmesini sağlar. CSB proteini RNAPII ile etkileşirken, CSA etkileşmez. Bu yüzden CSB'nin RNAPII'nin yer değiştirmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. CSA'nın fonksiyonu ise tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat CSA'nın TC-NER'in transkripsiyon işleminin uzama aşamasında rol aldığı gösterilmiştir (Costa ve ark., 2003; Sancar ve ark., 2004; Fousteri ve Mullenders 2008; Hanawalt ve Spivak 2008; Shuck ve ark., 2008; Dexheimer 2013).

Hasarın tanınmasından sonra, her iki yolakta da CSA ve CSB birçok alt birimin ve transkripsiyon faktörü TFIIH'ın hasarlı olan bölgeye gelmesine yardımcı olur. TFIIH kompleksi, 10 proteinden [XPB, XPD, p62, p52, p44, p34, p8 ve CDK-aktive eden (CAK) kompleks: MAT1, CDK7 ve Siklin H] meydana gelmektedir ve DNA sarmalının çözülmesinden sorumludur. Sonrasında, iki tane TFIIH ilişkili ATP bağımlı XPB ve XPD lezyonda yaklaşık 30 nükleotitde bir boşluk bırakarak DNA heliksinin asimetrik bir şekilde çözülmesinin sağlar. Başlangıçta, çözülme XPA'nın hasarlı bölgeye ulaşımına izin vererek hasarlı olmayan DNA'nın kesip çıkarma onarımına maruz kalmaması için ikinci bir kontrol mekanizması oluşturur. XPA'nın bağlanmasından sonra, DNA tek zinciri bağlanma proteini RPA (replikasyon proteini A) kesip çıkarma işlemini ve stabilizasyonu sağlar. RPA, hasarlı zincirin iki yönlü kesimi için gerekli olan endonükleazlardan XPG ve ERCC1-XPF dimerleri ile etkileşerek endonükleazların doğru konumlanmasını sağlar. Akabinde, XPG ve XPF/ERCC1 DNA'da hasarın 3' ve 5' pozisyonunda yaklaşık 30 nükleotitlik tek zincir fragmentlerinin çıkarılmasını sağlar. Ardından, DNA polimeraz δ or ϵ hasarsız olan zinciri kalıp olarak kullanarak boşluk olan kısım tekrardan doldurulur. Son olarak ligasyon, hücre döngüsünün S fazında iken DNA ligaz I ya da hücre döngüsünün diğer fazlarında DNA ligaz III α (LIG3 α)-XRCC1 kompleksi tarafından sağlanır ve NER süreci tamamlanır (Costa ve ark., 2003; Sancar ve ark., 2004; Kulaksız ve Sancar 2007; Fousteri ve Mullenders 2008; Hanawalt ve Spivak 2008; Shuck ve ark., 2008; Sugasawa 2010; Dexheimer 2013; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015).

2.3.3. Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)

MMR, DNA replikasyonu sırasında hatalı-okuma (proof-reading) aktivitesinden kaçan yanlış eşleşen bazların onarımında post-replikasyon süresince temel rol alan tamir mekanizmasıdır. Aynı zamanda, DNA replikasyonu ve rekombinasyonu

sırasında ortaya çıkan insersiyon/delesyon looplarının düzeltilmesinde de rol alır. MMR mekanizmasında meydana gelen hatalar hücre yapısını ve fonksiyonlarını etkileyerek kanser oluşumu veya dejeneratif hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. Örneğin, MMR defektif hücreler meydana gelen mikrosatellit instabiliteden (MSI) dolayı mutator fenotip özelliği göstermektedir. Ayrıca, MMR genlerinde meydana gelen metilasyon veya somatik mutasyonlar Lynch sendromu olarak bilinen [Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)] kansere neden olduğu bilinmektedir. Lynch Sendromu'nda MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 gibi MMR genlerinde gelişen germline mutasyon sonucu MSI meydana gelirken, sporadik kolorektal kanserlerde MLH1 geninin aşırı metilasyonu ile MMR gen aktivasyonunun kaybı ile gelişen MSI oluşmaktadır (Peltomaki 2001; Li 2008).

MMR mekanizması 3 temel aşamadan oluşmaktadır:

1. Tanımlama (Yanlış eşleşen bazların tanımlanması)
2. Kesip-Çıkarma (hata içeren zincirin degrade edilmesi ve boşlukların oluşumu ile sonuçlanması)
3. Tamir sentezi (DNA'nın yeniden sentezlenmesi ile boşluğun doldurulması)

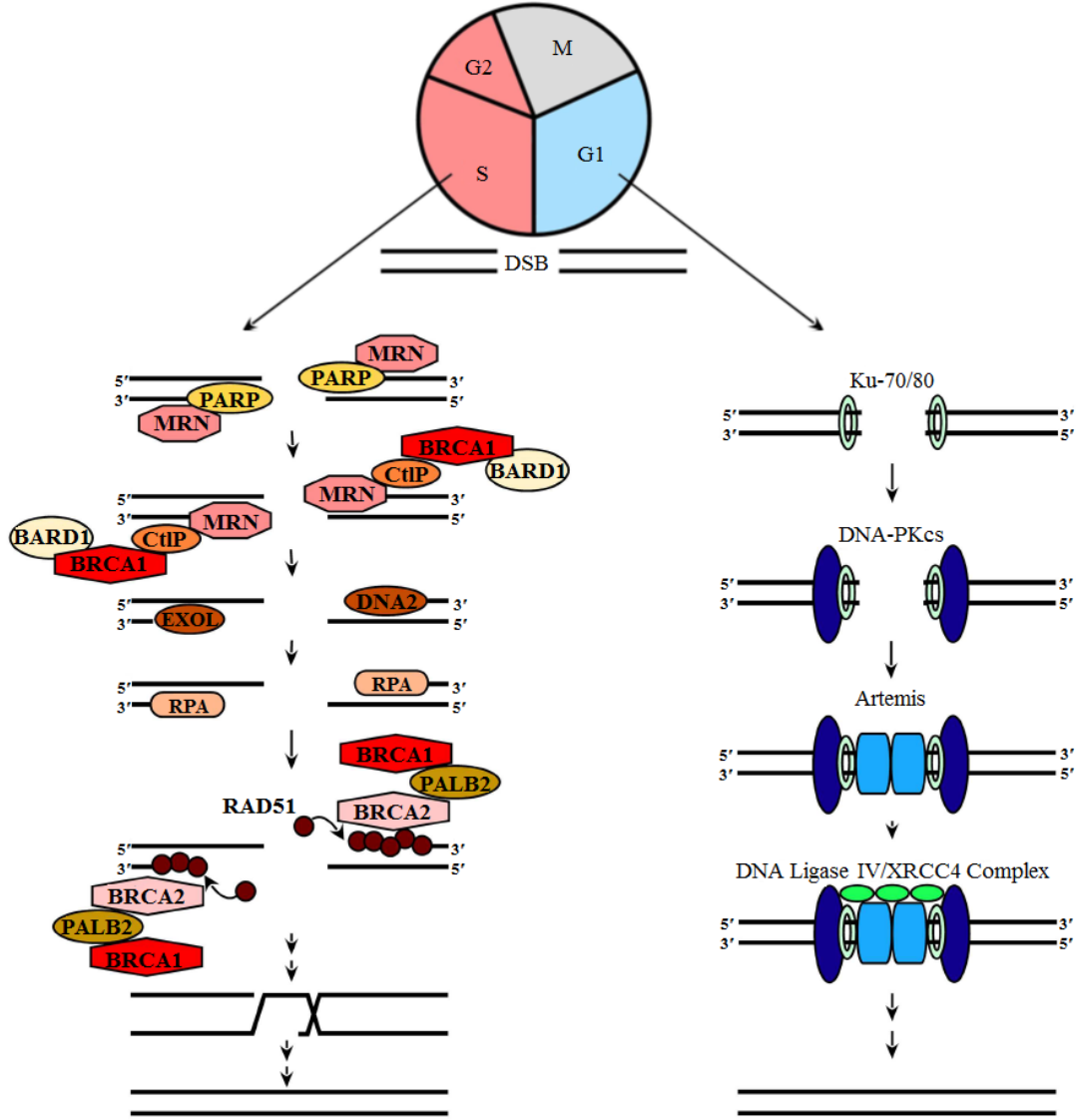
MMR süreci E.coli'den insana kadar yüksek derecede korunmuştur ve bu yüzden E.coli'de MMR proteinlerine homolojisine dayanarak MutS ve MutL olarak isimlendirilen iki önemli protein kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. MutS yanlış eşleşmesinin tanınmasından sorumlu iken, MutL, MutS kompleksi tarafından yanlış eşleşen bazların tanınmasında görevlidir. Memelilerde heterodimer olarak fonksiyon gören iki tane MutS proteini görev alır. MutS α olarak bilinen MSH2-MSH6 heterodimeri, yanlış baz eşleşmelerini ve küçük insersiyon/delesyon looplarını tanıırken, MutS β olarak bilinen MSH2-MSH3 heterodimeri büyük insersiyon/delesyon looplarını tanımaktadır. MutS-DNA kompleksinin oluşması, MMR için gerekli olan diğer proteinler ve yanlış eşleşme tanıma kompleksi arasındaki etkileşimi koordine eden MutL homolog (MLH) kompleksinin ATP bağımlı olarak ayrılması sağlar. Üç tane MutL aktivitesi tanımlanmıştır ve MutS gibi heterodimer olarak çalışmaktadır. MutL α olarak bilinen MLH1 ve MLH2 heterodimeri, insanda MutL aktivitesinin %90'ını oluşturmaktadır ve hem MutS α hem de MutS β tarafından başlatılan onarımı desteklemektedir. Diğer MutL heterodimerleri, MLH1/PMS2 (MutL β) ve

MLH1/MLH3 (MutL γ) MMR yolağında daha az rol almaktadır (Sancar ve ark., 2004; Modrich 2006; Li 2008; Dexheimer 2013).

Hasarın tanınmasından sonra, hata içeren zincirin degradasyonun da ATP bağımlı MutS-MutL-DNAheterodubleks kompleksi ekzonükleaz aktivitesinin gerçekleşmesini sağlar. İnsanda, yanlış eşleşen bazın kesip çıkarılması eksonükleaz 1 (Exo 1) tarafından gerçekleşir. Exo1'in yanlış eşleşen binlerce bazdan başlangıç noktasına ulaşmasını tek zincirde MutL α 'nın PCNA/replikasyon faktörü C (RFC) bağımlı endonükleaz aktivitesi tarafından gerçekleşir. Ayrıca, insan MMR'de, RPA, tamir sırasında Exo1'in aktivitesini kontrol ederek onun işlev kapasitesini azaltmakta ve tek zincir DNA'ya bağlanarak onu stabilize etmektedir. Exo1 tarafından bırakılan büyük boşluk DNA polimeraz δ , PCNA ve replikasyon proteini A (RPA) tarafından tekrardan doldurularak DNA ligaz I tarafından kalan kısmın birleştirilmesi ile MMR tamamlanır (Sancar ve ark., 2004; Modrich 2006; Li 2008; Dexheimer 2013; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015).

2.3.4. Çift-Zincir Kırıklarının Tamiri

DNA hasarının biyolojik olarak en tehlikeli olanı DNA'da çift zincir kırıklarının oluşmasıdır. Örneğin, tam olarak doğru onarımı gerçekleşmeyen çift zincir kırıkları, kanser ya da diğer genetik instabilite sendromlarının gelişimi ile ilişkili olan kromozomal aberasyon ve delesyonlara neden olur. Bu yüzden, çift zincir kırıklarının tamiri hem hücrenin hayatta kalmasında hem de genomik bütünlüğün sağlanmasından çok önemlidir. Memeli hücrelerinde DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının onarımında iki temel mekanizma yer alır (Şekil 9): HR ve NHEJ. HR, hatasız olan kardeş kromatit iplikçisini kalıp olarak kullandığı için onarımı büyük ölçüde hatasız olarak gerçekleştiren ve böylece genomik kararlılığı sağlayan bir mekanizmadır. NHEJ ise, çift zincir kırık uçları modifiye ederek ve doğrudan ligasyon yaparak kırıkların tamir edilmesini sağladığı için hata eğilimli bir mekanizmadır. Memeli hücrelerinde NHEJ hücre döngüsünün G1 fazında baskın olmasına rağmen, HR kardeş kromatite ihtiyaç duyduğu için geç-S ve G₂/M fazlarında görev yapmaktadır (van Gent ve ark., 2001; Sancar ve ark., 2004; Dexheimer 2013).



Şekil 9. DNA’da meydana gelen çift zincir kırıklarının (DSB) onarımında hücre döngüsünün farklı fazlarında görev alan (A) HR ve (B) NHEJ mekanizmaları (De Lorenzo ve ark., 2013)

2.3.4.1. HR

HR, DNA’da çift zincir kırıklarının onarımının yanı sıra replikasyon çatalının korunması, telomer bakımı ve mayoz I’de kromozom dağılımının korunmasında önemli olan bir mekanizmadır.

HR mekanizması 3 fazdan oluşmaktadır: pre-sinapsis, sinapsis ve post-sinapsis. Presinapsis boyunca çift zincir kırıkları etrafında DNA uçları 5’-3’ yönünde kesilerek 3’ uca sahip tek zincir kuyruklarının oluşması sağlanır. Heterodimerik MRN kompleksi (Mre11-Rad50- Nbs1) CtIP ile birlikte lezyonun etrafındaki DNA’ya bağlanarak 5’-3’ yönündeki ucun kırık etrafındaki DNA’yı keser ve böylece uzamış tek zincirli ipliklerin oluşmasından sorumludur. İkinci aşama olarak ise, BLM helikaz (Bloom

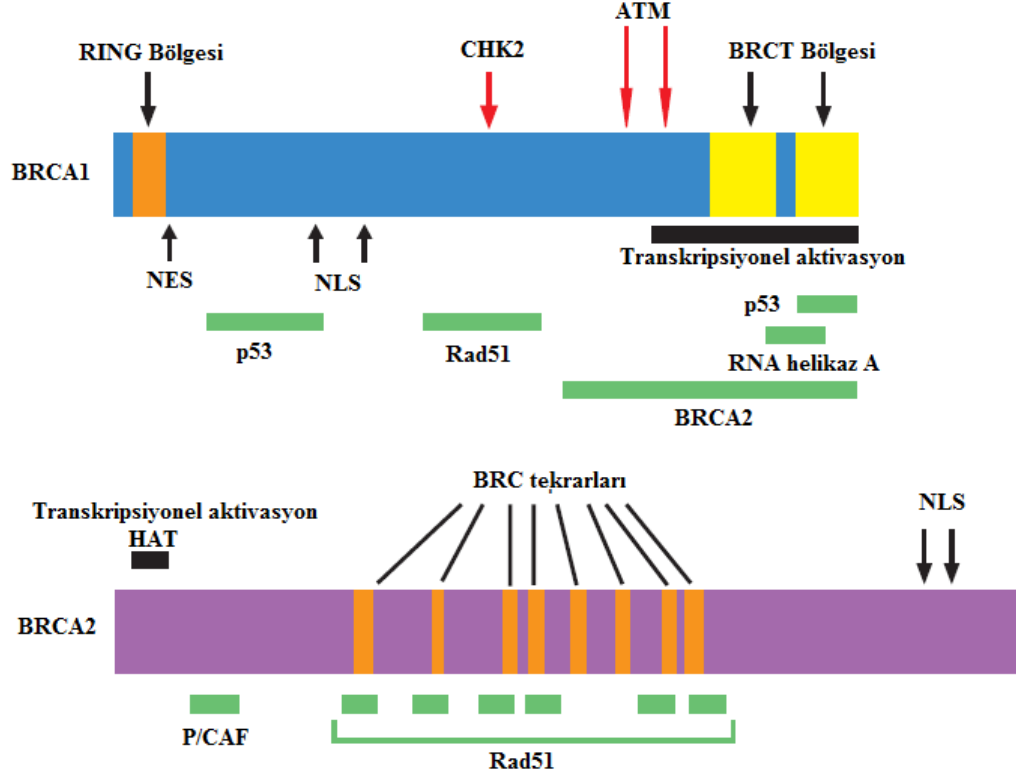
sendromu, REcQ helikaz-benzeri) ve Exo1 ekzonukleaz ile 5'-3' kesimi devam eder. Kesimin bitmesi sonucu, uzamış tek zincirli DNA ipliklerinin kuyruk kısmı, Rad51 rekombinazın bağlanmasına engel olan ikincil yapıların uzaklaştırılması için RPA tarafından sarılır. Sonrasında, Rad51, Rad53, BRCA2 ve Rad51 paralog olarak bilinen bir grup düzenleyici protein (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 VE XRCC3) hasarlı tek zincire bağlanır ve Rad51 kaplı tek zincirli DNA kuyrukları Rad51 nükleoprotein filamentleri olarak tanımlanır. Homolog DNA tanımlandıktan sonra, Rad51 sağlam homolog DNA bölgesini baskılayarak DNA zincir invazyon reaksiyonunu başlatır. Değişim ve invazyonu takiben, baskı gören zincirin 3' bitiş ucunda DNA polimeraz η tarafından DNA sentezi ve DNA ligaz I tarafından ligasyonun gerçekleşmesi sonucunda Holiday kavşağı olarak bilinen dört yol alan bağlantı yapısı meydana gelir. Bu rekombinasyon düzeni 3 yoldan birinin çözülmesi ile kararlı hale gelir ve bu ayrışma BLM-TopIII α kompleksi, GEN1/Yen1 veya Slx1/Slx4 tarafından simetrik ayrılma, veya yapısal spesifik endonukleaz Mus81/Eme1 tarafından asimetrik ayrılma ile çift zincir kırıklarının hatasız düzeltilmesi ile sonuçlanır (Sancar ve ark., 2004; Li ve Heyer 2008; Dexheimer 2013).

2.3.4.1.1. HR ve BRCA1/2 İlişkisi

HR mekanizmasında görev alan BRCA1/2, ATM, CHEK2, RAD51 ve Fanconi's anemia proteinleri içerisinde özellikle BRCA1 ve BRCA2 en önemli proteinlerdir. Ailesel meme kanserinin genetik temeli, *BRCA1* ve *BRCA2* olarak bilinen meme kanser genetik yatkınlık genlerinin klonlanmasıyla bulunmuştur. *BRCA1* geni ilk olarak 1994 yılında klonlanmış ve 17q21'de yer aldığı belirlenmiştir. BRCA1 proteini 1863 aminoasitten oluşan ve bölünen hücrelerin çoğunda eksprese olduğu bilinen bir proteindir. Hücrelerde, BRCA1 C- terminus (terminal) ucu, çoğu DNA onarımı proteininde tanımlanan BRCT bölgesi olarak bilinen aminoasit sekans motifi içerdiği için diğer DNA tamir proteinleri ile etkileşime girerek protein-protein etkileşiminde görev aldığını göstermektedir. N-terminus kısmı, halka-parmak bölge içeren bu kısım protein-protein etkileşimine izin veren ancak protein ubiquinasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (Wu ve ark., 2010). BRCA2 ise oldukça geniş bir protein olup 13q12-13 yer alan, 34 aminoasitten oluşan ve yaklaşık olarak kodlanan protein kısmının moleküler ağırlığı 385 kDA olan bir proteindir. BRCA2 oldukça geniş ekzon 11 ile

karakterizedir ve bu ekzon RAD51 proteininin etkileşime girmesi için gereken peptit motif kısmını kodlamaktadır (Şekil 10) (Yoshida ve Miki 2004).

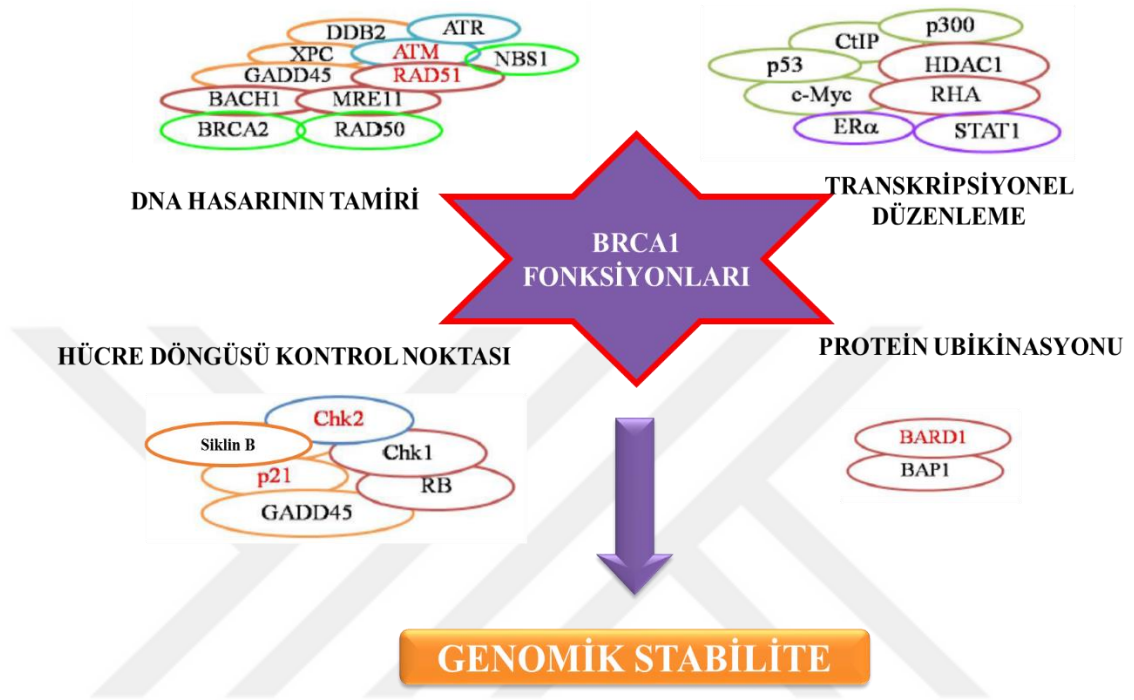
BRCA1/2 genlerindeki mutasyonlar ailesel herediter meme ve over kanserine yatkınlığın çoğunu oluşturmaktadır.



Şekil 10. BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin özellikleri. BRCA1, N-terminal RING bölgesi, Nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) ve iki C-terminal bölgesi içermektedir. Yeşil kısımlar etkileşimde olduğu proteinlere bağlanma bölgelerini göstermektedir. Kırmızı oklarla gösterilen kısımlar ise CHK2 veya ATM tarafından fosforillenen kısımlarıdır. BRCA2, BRC motiflerinin 8 tekrarını içermektedir. BRC tekrarlarından Rad51 ile doğrudan bağlandığı kısımlar yeşil ile gösterilmiştir (Yoshida ve Miki 2004).

BRCA1 farklı hücrel proteinlere bağlandığı *in vivo* olarak gösterilmiştir ve bu yüzden hücrel içeriğe göre çoklu fonksiyona sahip olduğu belirtilmiştir (Şekil 11). *In vitro* deneylerde ise, BRCA1 proteini eksik hücrelerde, HR mekanizması çalışmadığından dolayı radyasyona karşı hassasiyet olduğu ve BRCA1 protein kaybının HR sıklığını 5 kat azalttığı gösterilmiştir. BRCA1, DNA onarımında ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alır. DNA'da meydana gelen çift zincir kırıkları ATM, ATR ve CHK2 kinazlarını aktive eder ve bu kinazlar G1-S, S veya G2-M fazlarında BRCA1'in farklı kısımlarından fosforile olmasına neden olarak hücre döngüsünün durmasına sebep olur. BRCA1, BRCA1'in stabilitesini sağlayan BARD1 proteini ile kompleks bir yapı oluşturur. BRCA1-BARD1 kompleksi, DNA tamir

enzimlerinin hasarlı DNA bölgesine müdahale etmeleri için ubikinyasyon, RNA polimeraz II degradasyonu ve transkripsiyonun inhibisyonunda önemli rol alır (Yoshida ve Miki 2004; Ratanaphan 2012).



Şekil 11. BRCA1 proteininin rol aldığı temel mekanizmalar (DNA onarımı, transkripsiyonel aktivasyon, hücre döngüsünün düzenlenmesi, kromatin yeniden yapılanması ve protein ubikinyasyonu) (Ratanaphan 2012).

BRCA2 proteininin HR'de görev alan Rad51 proteini ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu protein HR temel reaksiyonu için oldukça önemlidir ve bu yüzden BRCA2 proteininin günümüzde bilinen fonksiyonu HR mekanizmasını kolaylaştırıcı rolüdür. BRCA2'nin Rad51 ile ilişkili olan kısa aminoasit sekansı HR mekanizmasının aktivitesinde azalmaya ve böylece radyasyon hassaslığında artışa neden olmaktadır. Rad51, BRCA2'nin BRC tekrarları olan 11. ekzon ile ilişkilidir. Bu bölgede, 8 tane BRC tekrarı bulunmaktadır ve BRC3 ve BRC4, Rad51 ile en güçlü etkileşime sahiptir. BRCA2 çift zincir kırıklarının tamirinde RAD51'in rekombinaz fonksiyonuna katılır. BRCA2, RAD51'in nükleusa ve hasarlı DNA bölgesine transportunda rol alır. RAD51'in yaklaşık %20'si hareketsiz fraksiyon olarak BRCA2'ye bağlıdır. %80'i ise hareketsiz oligomerleşmiş fraksiyon yada nispeten hareketli fraksiyon halinde bulunmaktadır. Ayrıca, BRCA2 bağlanma proteini olan DSS1, BRCA2 bağımlı

rekombinasyonun kontrolünde rol alır. DSS1'in, BRCA2 ve RAD51'in etkileşiminde ve BRCA2'nin doğru konformasyonunu sürdürmesinde rol aldığı bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan bireyler için DNA tamir mekanizması defektlerine hedefli tedavinin gerçekleştirilmesi iyi bir terapötik yaklaşım olarak öne sürülmektedir (Yoshida ve Miki 2004).

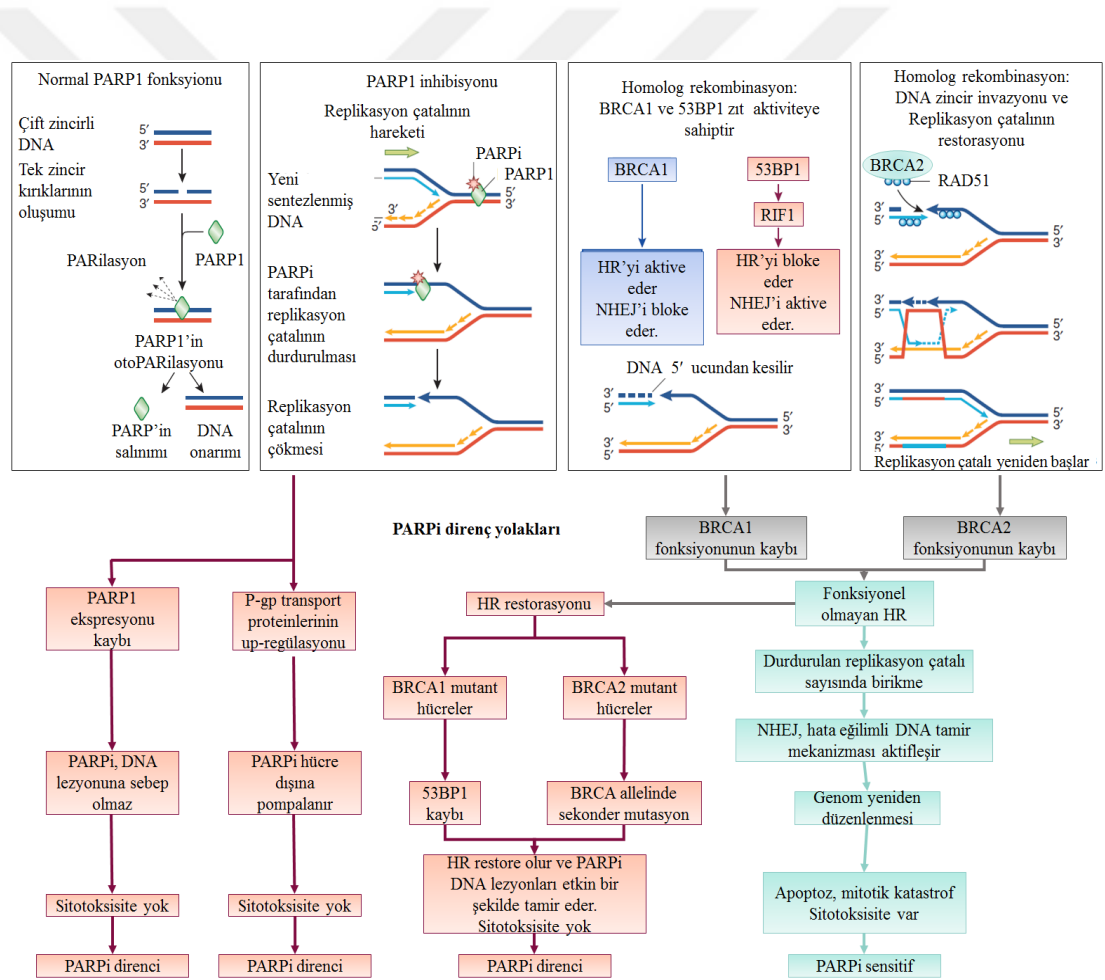
2.3.4.2. NHEJ

NHEJ, oldukça küçük bir seri temel faktör tarafından düzenlenen, hücre döngüsünden bağımsız olarak, bölünen ve bölünmeyen hücrelerde görülen ve döngünün en aktif fazı olan G₁'de görev alan bir mekanizmadır. NHEJ'in ilk aşaması, hasarın tanınması ve Ku70/80 heterodimerin çift zincir kırıklarının yakın ve uzak uçlarına bağlanmasına dayanır. DNA'ya bağlandıktan sonra Ku-DNA kompleksi, DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PKcs) katalitik alt ünitesini ile birleşerek protein kinaz aktivitesi gösteren DNA-PK holoenzimi olarak adlandırılan yapının oluşması sağlar. DNA-PKcs molekülü Ku proteinlerinin DNA'dan translokasyonunu indükleyerek ve DNA çift zincir kırıklarının uçları ile etkileşime girerek DNA uçlarını stabilize eder ve hizaya sokar. Her bir çift zincir kırık uçlarında konumlandırılmış iki DNA-PKcs arasındaki etkileşim, DNA-PKcs otofosforilasyonuna neden olan protein kinaz etkinliğini aktif hale getirir. Çoğu DNA tamir süreci gibi çift zincir kırıklarının tipi ve karmaşıklığına bağlı olarak DNA uçları ligasyondan önce modifikasyon gerektirir. Kaybolan nükleotitlerin tekrardan doldurulması Pol μ ve Pol λ tarafından gerçekleşir.

Çift zincir kırıkların kompleksliliği ve uçların doğasına bağlı olarak farklı NHEJ faktörleri sürece dahil edilir. Alternatif olarak, bir nükleaz olan Artemis, DNA-PKcs'den bağımsız olarak 5'-3' ekzonukleaz aktivitesi gösterir. Aynı zamanda DNA-PKcs fosforilasyonu için DNA-PKcs bağımlı olarak endonukleaz aktivitesine de sahiptir. Ayrıca, APE1, Tdp1 ve PNKP ve Exo1 ve WRN eksonukleazlar gibi bazı spesifik DNA lezyon BER enzimleri NHEJ'in sonlanma aşamasına katılır. Bu yüzden, bu enzimlerin NHEJ temelli tamirde nükleotitlerin kaybı veya kazanımında ya da yanlış eşleşmesinden rol aldıkları düşünülmektedir. Son aşama olarak DNA uçlarının ligasyonu XRCC4 ile bağlantılı olan DNA ligaz IV tarafından gerçekleştirilir. XLF (XRCC4-benzer faktör) de, XRCC4-DNA ligaz IV kompleksi ile ilişkili olarak DNA ligasyonunu destekler (Sancar ve ark., 2004; Li ve Heyer 2008; Lieber 2010; Dexheimer 2013).

2.4. PARP İnhibitörlerine Karşı İlaç Direncinin Oluşmasına Neden Olan Moleküler Mekanizmalar

Son klinik araştırmalarda farklı kanser tiplerinde PARP inhibitörlerinin tek tedavi yöntemi yada diğer kemoterapik ilaçlarla birlikte çoklu tedavi yöntemi olarak kullanımı dikkat çekmektedir. Ancak tedavide kullanılan PARP inhibitörleri, hücrelerin farklı onarım mekanizmalarını kullanabilmeleri nedeniyle, PARP inhibitörlerine dirençli kanser hücrelerinin gelişmesini sağlamaktadır. PARP inhibitörlerine direncin oluşumunda 4 temel mekanizma rol almaktadır (Şekil 12) (Ashworth 2008; Lord ve Ashworth 2008; Javle ve Curtin 2011; Barber ve ark., 2013; Lord ve Ashworth 2013).



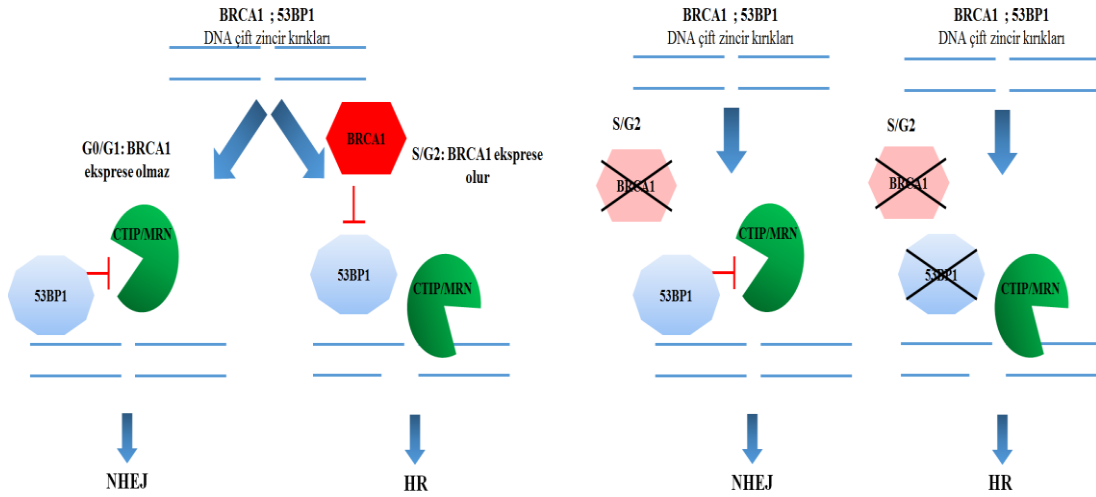
Şekil 12. PARP inhibitörlerinde (PARPi) dirence ve duyarlılığa neden olan moleküler mekanizmalar (Lord ve Ashworth 2008).

2.4.1. Artan HR Kapasitesi

Başlangıçta HR defekti olan kanser hücrelerinde PARP inhibitörleri tedavide başarılı olmasına rağmen, tedavi sonrasında HR'ın restore edilmesi sonucu PARP inhibitörlerine karşı direnç oluşmaktadır. HR'nin aktivitesinden artışa neden olan mekanizmalar;

- **BRCA'da meydana gelen geri mutasyon;** *BRCA1/2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar TNMK hastalarında HR yolağının inaktif olmasını sağladığı için hastaların PARP inhibitörlerine hassas olmasını sağlamaktadır. Ancak, özellikle *BRCA2*'de geninde meydana gelen geri mutasyonları over kanserinde inaktif genin okuma çerçevesini değiştirdiği için (ORF), HR mekanizması tekrardan aktifleşerek platinyum tuzları ve PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişimine neden olan temel mekanizmalardan biri olduğu belirtilmiştir (Lord ve Ashworth 2008; Montoni ve ark., 2013). Örneğin; Edwards ve ark. (2008) *BRCA2* geninde intragenik c.6174delT frameshift mutasyonu taşıyan CAPAN1 pankreas kanseri hücrelerinde bir PARP inhibitörü olarak KU0058948 sürekli maruziyetin dirençli klonlar gelişiminde rol aldığı ve dirençli hücrelerde *BRCA2*'nin açık okuma çerçevesini (ORF) restore ederek hücrelerde mRNA ekspresyonunun olduğu belirlenmiştir (Edwards ve ark., 2008). Elde edilen bu veriler, Sakai ve ark. (2008) tarafından *BRCA2*'de meydana gelen sekonder mutasyonlarının sisplatin karşı dirençli olan CAPAN1 ve HCC1428 hücrelerinin bir PARP inhibitörü olan AG14361'e karşı da dirençli olduklarının belirlenmesi ile desteklenmiştir (Sakai ve ark., 2008). Sakai ve ark.(2009) *BRCA2*'de meydana gelen sekonder mutasyonların over kanserinde platinyum ajanlara (sisplatin) ve PARP inhibitörlerine (AG14361) karşı direnç gelişmesinde rol aldığını belirlenmiştir (Sakai ve ark., 2009).
- **BRCA2 yüksek ekspresyonu;** *BRCA2* PARP1 aktivasyonunun negatif düzenleyicisidir. PARP inhibitörleri, PARP1 aktivitesinin baskılanmasına ve *BRCA2*'nin yüksek ekspresyonuna yol açar ve PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesine neden olur (Montoni ve ark., 2013).
- **BRCA defektif hücrelerde TP53BP1 kaybı ile ATM temelli HR'nin düzenlenmesi;** TP53BP1 DNA tamirine yanıtta ve kontrol noktasında temel

rol alan nüklear bir proteindir. BRCA1 ve TP53BP1, NHEJ ve HR mekanizmaları arasında dengeyi belirler (Şekil 13). Çünkü HR'de BRCA1 kaybı NHEJ tarafından tamirin artmasını sağlar. Ancak TP53BP1'in kaybı NHEJ'i baskılar ve ATM temelli HR'yi uyarır. Böylece hücreler PARP inhibitörlerine karşı dirençli hale gelir. BRCA1 defektif hücrelerde 53BP1 kaybı kısmen ATM bağımlı HR mekanizmasının çalışmasına olanak sağlar ve hücrelerde PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişir. Jaspers ve ark. (2013), BRCA1-eksik fare meme tümör modelinde 53BP1'in eksprese olmadığı ve dolayısıyla HR temelli DNA tamirinin restore olmasına neden olarak olaparibe karşı direnç gelişmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, HR restorasyonunun 53BP1 kaybı ile ilişkili olduğu, HR ile NHEJ mekanizmaları arasında dengenin sağlanmasında rol aldığı ve PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenmiştir (Jaspers ve ark., 2013). Hong ve ark.(2016), ATM-eksik meme tümörlerinde 53BP1 kaybının olaparibe karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenmiştir (Hong ve ark., 2016). Ayrıca ATM ekspresyonunun artması da PARP inhibitörlerine karşı direncin gelişmesinde etkilidir (Lord ve Ashworth 2008; Bunting ve ark., 2010; Oplustilova ve ark., 2012; Montoni ve ark., 2013; Bouwman ve Jonkers 2014; Sedukhina ve ark., 2015).



Şekil 13. HR’de görev alan *BRCA1* ile NHEJ’de görev alan *53BP1* arasındaki ilişki. **A)** Normal hücrede G0/G1 evresinde *BRCA1* ekspresyonu olmadığı için *53BP1* DSB tamirinde CtIP inaktive ederek NHEJ’in aktive olmasını sağlar. S ve G2 fazında ise *BRCA1* ekspresyonu olduğu için *53BP1*’i inhibe ederek HR temelli onarımı uyarır. **B)** *BRCA1*^{-/-} hücrelerde *53BP1*, CtIP fonksiyonunu inhibe ederek HR’yi baskılar ve NHEJ’in aktif olmasını sağlar. **C)** *BRCA1*^{-/-}; *53BP1*^{-/-} hücrelerde S fazında CtIP’i aktive olarak *53BP1* yokluğunda HR mekanizmasının aktive olmasını sağlar (Aly ve Ganesan 2011).

- **RAD51 aktivitesinin artması;** RAD51 HR’da temel görev alan bir proteindir. Bu yüzden RAD51 seviyesinin artması PARP inhibitörlerine karşı direncin artmasına yol açar. RAD51 seviyesi mir-96 ve Aurora-1 tarafından baskılanmasına rağmen, PTEN tarafından artırılır. Normalde, PTEN defektif hücreler PARP inhibitörlerine karşı hassastır. Ancak, mir-96 ve Aurora-1 seviyesinin azalması veya PTEN ekspresyonunda artış, RAD51 ekspresyonunu artırır ve PARP inhibitörlerine karşı direnci geliştirir (Wang ve Weaver 2011; Montoni ve ark., 2013).

2.4.2. NHEJ Kapasitesinde Değişim

HR defektif hücrelerde PARP inhibitörleri ile sağlanan sentetik letalitenin bir sebebi de PARP1 tarafından normalde baskılanan hata eğilimli NHEJ yolağının up-regülasyonudur. Bu yüzden NHEJ mekanizmasında yer alan KU80, Artemis, DNA-PK down regülasyonu veya inhibisyonu *BRCA2* defektif hücrelerde PARP inhibitörlerine karşı direnci gelişmesini sağlar. Normal NHEJ fonksiyonu ve NHEJ tarafından oluşan genomik instabilite *BRCA1/2* geri mutasyonuna neden olur ve HR kapasitesinin kısmen restorasyonuna sebep olarak PARP inhibitörlerine karşı direnci gelişmesini sağlar. Patel ve ark. (2011), veliparib uygulanan *BRCA2*-eksik over

kanseri hücrelerinde, PARP inhibisyonunun DNA-PK substratının fosforilasyonu ve dolayısıyla NHEJ aktivitesini arttırdığını ve böylece PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenmiştir (Patel ve ark., 2011). Bu yüzden hem artan hem azalan NHEJ kapasitesi direncin oluşmasına katkı sağlar (Chiarugi 2012; Montoni ve ark., 2013).

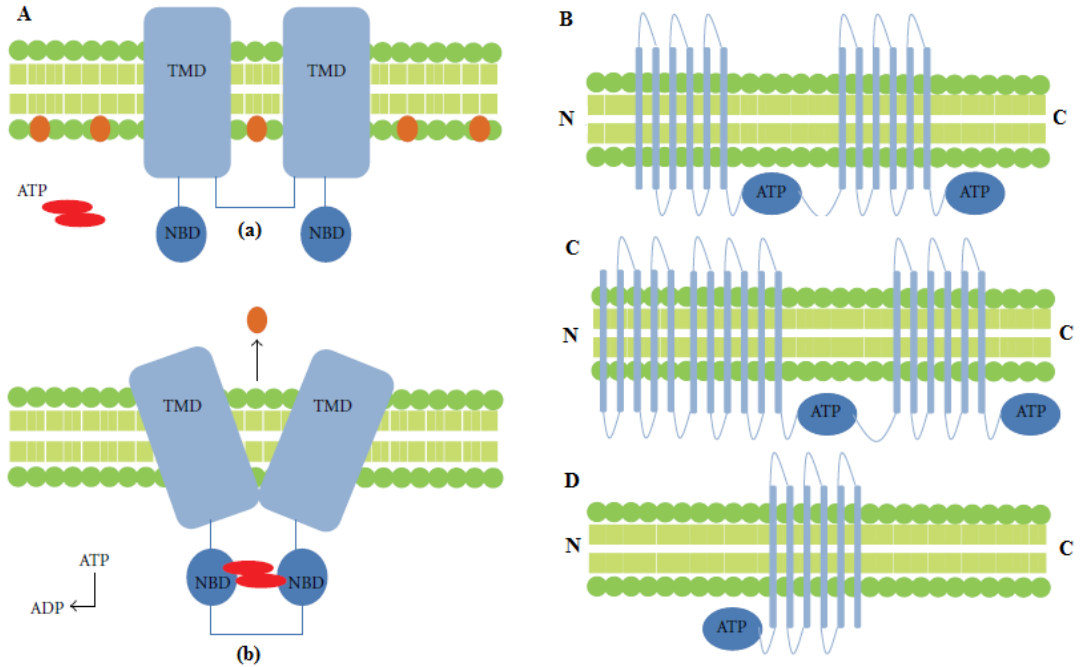
2.4.3. PARP1 Aktivasyonunda Azalma

PARP inhibitörlerinin kanser tedavisinde etki mekanizması PARP-1'i hedef alarak inhibe etmesine dayanır. PARP inhibitörleri uygulanan hücrelerde PARP1 DNA tek zincir kırıklarına bağlıdır ancak PAR formunda aktive değildir ve DNA tamirini başlatamaz. Bu yüzden, PARP1 seviyesinde azalma PARP inhibitörlerine karşı direncin oluşmasını sağlar. Örneğin, PARP1 ekspresyonunu baskılayan miR-210'un normal meme hücrelerinde ekspresyon seviyesi az iken, in situ duktal karsinomunun evresi ilerledikçe ekspresyon seviyesi artmaktadır. Bu yüzden miR-210 seviyesi doğrudan PARP1 seviyesindeki değişikliklerle ters orantılı olarak PARP inhibitörlerine karşı direncin oluşması ile ilişkilidir (Gottipati ve ark., 2010; Volinia ve ark., 2012).

PARP inhibitörlerinin etkinliği PARP-1'in katalitik aktivitesi ile de ilişkilidir. Bu yüzden PARP-1 aktivitesini azaltan herhangi bir faktör PARP inhibitörlerinin etkinliğinde değişime sebep olabilir. PARP-1 seviyesi normal olan kanser hücrelerine göre özellikle endojen PARilasyon seviyesi enzimatik olarak azalan hücrelerin PARP inhibitörlerine karşı daha direçli olduğu bilinmektedir. Bu yüzden, HR kusurlu tümör hücreleri yüksek PARilasyon aktivitesi gösterdikleri için PARP inhibitörlerine karşı daha hassastır. PARP-1'in katalitik aktivitesinin azalmasına neden olan küçük nükleotit polimorfizmleri (SNP) de PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol alır. Kanser hücrelerinde bazı PARP1 geninde V762/A veya M129/T ve E251/K SNP'lerin bir ölçü de olsa dirençle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ancak V762/A değişiminin PARP-1'in enzim aktivitesini azalttığı ya da enzim fonksiyonunda önemli bir etkiye sahip olduğuna dair genel bir sonuç yoktur. Bu yüzden SNP'lerin PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rollerine dair tahminde bulunmak zordur.

2.4.4. PARP İnhibitörlerinin İntraselüler Miktarında Azalma

PARP inhibitörlerine direncin oluşmasında etkisi olan son mekanizma, farklı biyokimyasal mekanizmaları içeren, tedaviye yanıtın ve özellikle metastaz gelişen kanser hastalarında yaşam süresinin azalmasında önemli bir etmen olan çoklu ilaç direnci (MDR; Multi-Drug Resistance)'dir. İlaç direncinin oluşmasında görev alan ATP-binding cassette (ABC) taşıyıcı ailesi hücre membranında lokalize olan, organizmada özellikle çeşitli ilaç ve ilaç metabolitlerinin taşınmasından sorumlu proteinlerden oluşmaktadır. Kanser hücrelerinde antineoplastik ilaçlara karşı ilaç direncinin gelişmesinde, membrana bağlı ABC taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler, kemoterapik ilaçların intraselüler konsantrasyonunun azalmasına sebep olarak uygulanan kemoterapinin başarısız olmasına yol açar ve MDR olarak tanımlanan hücresel sürecin gelişmesinde rol oynamaktadır (Tablo 7). P-glikoprotein [P-gp, MDR1 (ABCB1)], çoklu ilaç direnci bağlantılı proteinler [MRP1 (ABCC1) ve MRP2 (ABCC2)] ve meme kanseri direnç proteini (BCRP (ABCG2)) ABC taşıyıcı protein ailesinde yer alan temel ilaç efluks pompalarıdır (Şekil 14) (Szakacs ve ark., 2006; Liu 2009; Wind ve Holen 2011).



Şekil 14. A) ABC taşıyıcı ailesinin genel yapısı: (a) ABC taşıyıcı ailesi ikişer adet transmembran bölgesi (TMD) ve nükleotit bağlanma bölgesi (NBD) içerir. Turuncu kısımlar substrat moleküllerinin

hücre içinde yerini göstermektedir. Substrat molekülleri ATP'ye bağlandıktan sonra, NBD katılarak konformasyonel değişime neden olur. **(b)** Bu değişim substratın membran dışına çıkmasına neden olur. **B)** P-gp yapısı: P-gp 12 tane transmembran bölgesi ve 2 ATP bağlanma bölgesi içermektedir. Diğer MDR4, MRP4, MRP5 VE MRP7 benzer yapıdadır.

C) MRP1 yapısı: Yapısal olarak P-gp benzemektedir 2 tane ATP bağlanma bölgesi içerir. 12 transmembran bölgesine ek olarak, amino terminal ucunda ayrıca 5 tane daha transmembran bölge içerir. MRP2, MRP3 ve MRP6 benzer yapıdadır.

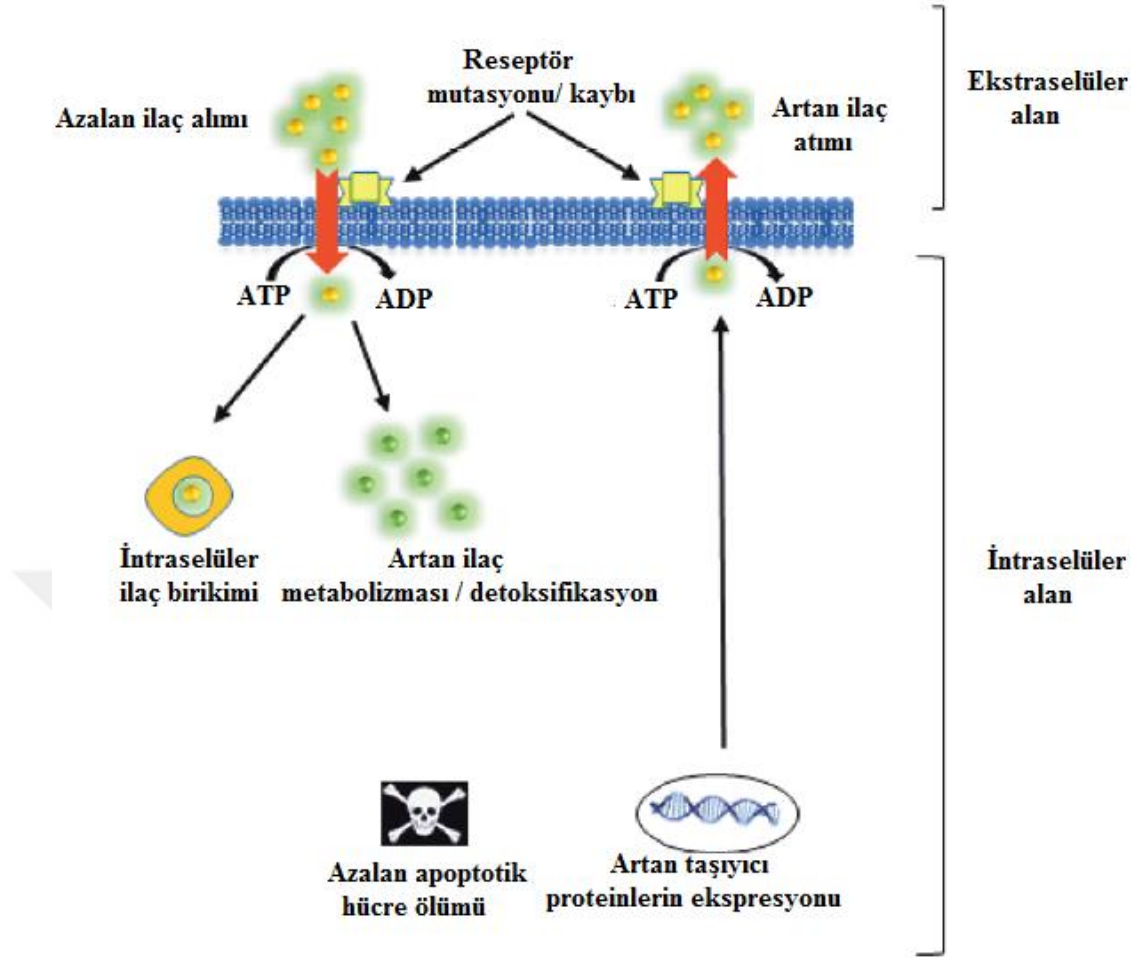
D) BCRP yapısı: 6 transmembran bölge ve 1 transmembran bölgenin amino ucunda 1 ATP bağlanma bölgesi içermektedir (Wind ve Holen 2011).

Tablo 7. P-gp ve diğer ABC taşıyıcılarının özellikleri ve taşıdıkları sitotoksik substratlar (Velingkar ve Dandekar 2010).

Yaygın ismi	Diğer adı	Sistematisi ismi	Kromozom lokasyonu	Sitotoksik substratları
P-gp	MDR1	ABCB1	7q21.1	Aktinomisin-D Bisantrene Daunorubisin Doksetaksel Doksorubisin Etopozid Mitoksantron Paklitaksel Tenipozit Topotekan Vinblastin Vinkristin vinorelbin
MRP1	--	ABCC1	16p13.1	Doksorubisin Epirubisin Etopozit Metotreksat Vinkristin vinorelbin
BCRP	MXR, ABC-P	ABCG2	4q21-4q22	Daunorubisin Doksorubisin Mitoksantron SN-38, Topotekan

Yapılan çalışmalarda bu proteinlerin ekspresyonunda meydana gelen değişimlerin PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenmiştir (Şekil 15). Örneğin, HCT116 kolon kanseri hücrelerinde P-gp inhibitörlerinin PARP inhibitörlerinin intraselüler miktarında azalmayı engellediği ve dirençli hücreleri ilaca karşı hassas hale getirdiği gösterilmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen bir *in vivo* çalışmada, P-gp knockout *BRCA1* defektif hücrelerde PARP inhibitörlerinin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Rottenberg ve ark tarafından ise murine modelde olaparibe karşı direnç geliştirilmesi sonucu tümörün P-gp inhibitörü taruquidar eklemesi sonucu ilaca karşı hassas hale geldiği belirlenmiştir (Montoni ve ark., 2013; Dufour ve ark., 2015).

Dufour ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada, bir PARP inhibitörü olan olaparib uygulanan SUM1315 TNMK hücrelerinde özellikle BCRP ve P-gp proteinlerinin ekspresyonunun arttığı ve direnç gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir (Dufour ve ark., 2015).



Şekil 15. ABC-taşıyıcı ailesi temelli gelişen ilaç direncinin moleküler mekanizması. Kanser hücrelerinde ilaç direnci hücre içine azalan ilaç alımı, artan ilaç alımı, artan intraselüler ilaç miktarı, artan ilaç inaktivasyonu veya aktivasyon eksikliği, ilacın hedefinde ekspresyon seviyesinde değişimler ve hücre ölümünün eksikliği gibi farklı mekanizmalar aracılığı ile gelişir (Karvar 2014).

2.4.4.1. P-glikoprotein (MDR1)

İlk olarak 1976 yılında, ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcı ailesinin ABCB alt ailesine ait olan, MDR1 geni tarafından kodlanan P-glikoprotein (P-gp), ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışan ve efluks pompası olarak işlevi gören bir membran proteindir. P-gp kanser hücrelerinde normalden fazla eksprese edilerek, yapısal olarak farklı pek çok ilacın hücre içerisine alınmasını engelleyerek antineoplastik ilaçların tümör hücrelerinden dışarı atımını sağlayarak intraselüler ilaç konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır (Dean ve ark., 2001; Dean 2002; Liu 2009; Vasiliou ve ark., 2009; Wind ve Holen 2011; Kara ve ark., 2013).

P-gp'nin substrat spesifitesinin yüksek olmasından dolayı tümör hücrelerinde P-gp substratı olan doksorubisin, daunorubisin, irinotekan, vinkristin, vinblastin,

metotreksat, etoposid, paklitaksel, dosetaksel, tamoksifen, mitoksantron gibi yapısal olarak bir çok farklı sitotoksik ilaca karşı çapraz direnç gelişmesinden rol oynadığı için bu fenomen çoklu ilaç direnci olarak adlandırılmıştır. Bu nedenle, kanser hastalarına kemoterapik tedavi uygulanmadan önce kişiye özgü tedavinin geliştirilebilmesi için tümörlü dokuda P-gp ekspresyon seviyesinin belirlenmesinin ve tedavi sonrasında P-gp ekspresyon seviyesinin yükselmesi durumunda hastanın dirençli olmadığı ilaçların yada tedavi yöntemlerin (immün terapi gibi) uygulanmasının kanser tedavisinde uygulanan tedaviden başarılı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir (Dean ve ark., 2001; Dean 2002; Liu 2009).

2.4.4.2. MRP (Çoklu İlaç Direnci İlişkili Protein)

İlk olarak 1992 yılında keşfedilen MRP proteini, ABC taşıyıcı ailesinin ABCC alt ailesine dahil olan ve ATP bağımlı taşıyıcı proteinlerin şimdiye kadar bilinen en büyük (190 kDa) bir membran proteindir. MRP, 13 proteinden oluşmaktadır ve bu proteinlerden dokuzu MRP ilişkili olduğu için MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8 ve MRP9 olarak isimlendirilmiştir. Diğer üçü ise kistik fibrozis transmembran kondüktans düzenleyici proteini (CFTR/ABCC7) ve sülfonilüre reseptörleridir (SUR1/ABCC8 ve SUR2/ABCC9) (Dean ve ark., 2001; Dean 2002; Liu 2009; Wind ve Holen 2011; Kara ve ark., 2013).

MRP'ler metotreksat gibi anyonik ilaçları ve asidik ligandlar ile konjuge olmuş glukronat, glutatyon, sulfat gibi ilaçları taşıyan organik anyonik taşıyıcılardır. MRP-1, MRP-2 ve MRP-3 doğal organik ilaçlara karşı direnç gelişmesinde etkili iken, MRP-4 nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rolü vardır. Özellikle glutatyon (GSH; γ -Glu-Cys-Gly) varlığında hidrofobik ve katyonik ilaçların çoğunun MRP tarafından taşındığı ve antrasiklinlere (doksorubisin, daunorubisin, epirubisin), mitoksantron, flutamid ve metotreksata gibi ilaçlara da direnç gelişmesinde rol aldığı belirtilmiştir. Ayrıca, MRP1 ve BCRP gibi bazı ABC taşıyıcıları tümör büyümesi, proliferasyonu ve metastatik potansiyeli kontrol eden farklı sinyal yollarının düzenleyici komponentleri ile görev yapan tirozin kinaz inhibitörleri gibi yeni hedeflenmiş antikanser ajanlarına karşı direnç gelişmesinde rol alır.

MRP proteinleri içerisinde özellikle MRP-1, MRP-2 ve MRP-3 proteinleri kanser ilaçlarına karşı direnç gelişmesinde etkin rollerinden dolayı dikkat çekmektedir. MRP-1 glutatyon aracılığı ile ya MRP-1'in bir substratı gibi ilaca bağlanabilir yada ilaçlar

MRP-1 tarafından glutasyon aracılıklı olarak hücrenin dışına atılarak intaselüler konsantrasyonun azalmasına neden olmaktadır. MRP-1'in aşırı ekspresyonu sonucu vinka alkaloidleri, epipodofilotoksinler, doksorubisin, mitoksantron, daunorubisin ve epirubisine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirtilmiştir. MRP-2, genellikle direnç mekanizmasında MRP-1 gibi rol oynamasına rağmen, MRP-2 aşırı ekspresyonunda gözlenen direnç MRP-1 aşırı ekspresyonunda asla gözlenmez. 1997 yılında keşfedilen MRP-3, MRP-1'in en fazla homologu (%58) olan proteindir. Organik anyonların taşınmasını sağlar. MRP-1 ve MRP-2'ye yapı olarak çok benzemesine rağmen, direnç mekanizmasında glutasyon aracılık etmez (Dean ve ark., 2001; Dean 2002; Liu 2009; Vasiliou ve ark., 2009).

2.4.4.3.BCRP (Meme Kanseri Direnç Proteini)

Meme kanseri direnç proteini (Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), ABC ailesinin ABCG alt ailesine ait olan, 72 kDa ağırlığındadır ve en son keşfedilen üyesidir. İlk olarak 1998 yılında Doyle ve ark. tarafından doksorubisine dirençli MCF7 meme kanseri hücre dizisinden (MCF-7/AdrVp) klonlanmıştır ve bu sebeple meme kanseri direnç proteini adını almıştır. BCRP; hidrofobik bileşikler, zayıf bazlar, organik anyonlar ve birçok endojen ve eksojen moleküllerin glukuronid, sülfat ve glutasyon konjugatları da dahil, geniş substrat seçiciliği yüksek olan bir taşıyıcı proteindir. BCRP ile P-gp ve MRP2 taşıyıcı proteinleri arasındaki substrat benzerliği oldukça fazladır (Dean ve ark., 2001; Dean 2002; Vasiliou ve ark., 2009; Wind ve Holen 2011; Kara ve ark., 2013).

BCRP, çok çeşitli ilaçları taşıyabilme kapasitesine sahiptir. Kansere tedavisinde etkin olarak kullanılan birçok kemoterapötik, BCRP tarafından etkili bir şekilde hücre dışına atılmaktadır. BCRP, özellikle tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilerek substratı olan kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen çoklu ilaç direncinden sorumludur. Etoposid, teniposid gibi epipodofilotoksinler, topotekan, irinotekan gibi kamptotesin türevleri ve irinotekanın aktif metaboliti SN-38, doksorubisin, daunorubisin, epirubisin gibi antrasiklinler, folat antagonisti metotreksat, imatinib, gefitinib vb. tirozin kinaz inhibitörleri gibi kansere tedavisinde kullanılan pek çok antineoplastik ilaç, BCRP tarafından etkin olarak taşınmaktadır. Antineoplastik ilaçların yanı sıra abakavir, asiklovir, zidovudin gibi antiviral ilaçlar, statinler, siprofloksazin, nitrofurantoin gibi antibiyotikler, kalsiyum kanal blokerleri, diklofenak, dipiridamol, gliburid gibi çok

sayıda ilaç BCRP substratıdır (Dean ve ark., 2001; Dean 2002; Liu 2009; Vasiliou ve ark., 2009). Son zamanlarda BCRP kaynaklı direncin aşılmasına yönelik olarak bazı inhibitörler geliştirilmiştir. Bunlar; fumitremorgin C (FTC), FTC analogu Ko143, akridon karboksamid GF120918, anti-HIV proteaz inhibitörlerinden nelfinavir ve ritonavir, tiozin kinaz inhibitörlerinden gefitinib ve imatinib sayılabilir. Bunlar içerisinde, FTC ve Ko143 BCRP için oldukça seçici inhibitörler olmasına rağmen, siklosporin A ve anti-HIV proteaz inhibitörleri ABC taşıyıcıları genel inhibitör olarak, GF120819 ise BCRP ve P-gp için potansiyel inhibitördür (Ni ve ark., 2010).

2.4.5. PARP inhibitörlerine direnç gelişmesinde epigenetik değişimlerin rolü

DNA hasarına yanıt kanser tedavisinde yeni terapötik stratejiler geliştirilmesinde potansiyel bir hedeftir. Çünkü normal hücreler DNA hasarını kontrol etmek için kontrol noktalarına ve DNA tamir yollarına sahip iken, kanser hücrelerinde bu mekanizma kısmi inaktiftir. Genomik kararsızlık kanser etiyolojisinin yaygın özelliklerinden biridir. Geri dönüşümlü olmaları ve DNA'nın baz dizisinde herhangi bir değişime neden olmamaları gibi özellikleriyle genetik değişimlerden ayrılan epigenetik değişimler (histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve miRNA ekspresyonundaki değişimler)'in genomik kararsızlığa neden olarak meme kanseri dahil birçok kanser tipinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli oldukları bilinmektedir (Lahtz ve Pfeifer 2011; Lovato ve ark., 2012).

2.4.5.1. Histon modifikasyonları

Ökaryotik hücrelerde kromatin, ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4 içeren ve 146 bp DNA'nın histonlar üzerine sarılmasıyla oluşan nükleozom denilen nükleoprotein yapıda bulunmaktadır. Kromatin dinamik bir yapıya sahip olduğu için replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve DNA hasarı onarımının gerçekleşmesi için DNA'nın ulaşılabilirliğinin düzenlenmesinde histon varyantlarının nükleozoma katılımı, post-transkripsiyonel modifikasyon, ATP bağımlı kromatin yeniden şekillenmesi ve histon şaperonları gibi farklı mekanizmalar rol almaktadır (Rossetto ve ark., 2010; Ha ve ark., 2014; Turinetto ve Giachino 2015).

DNA'da hasar oluştuktan sonra, tamir faktörlerinin DNA'ya ulaşabilmesi için kromatinin açık konuma gelmesi gerekir. DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarına yanıt ile ilişkili tüm kromatin modifikasyonları içerisinde ilk sırada H2AX

yer almaktadır. DNA'da çift zincir kırıkları meydana geldiğinde, COOH-terminal bölgesindeki serin 139 pozisyonundan fosfoinozitol 3 kinaz ailesi üyesi olan ATM, ATR ve DNA-PK kinaz tarafından fosforillenen γ -H2AX (fosforile H2AX), DNA onarım faktörlerinin kırık olan bölgeye ulaşmasını ve onarım mekanizmasının çalışmasını uyarmaktadır (Dinant ve ark., 2008; Rossetto ve ark., 2010; Khurana ve Oberdoerffer 2015; Turinetti ve Giachino 2015).

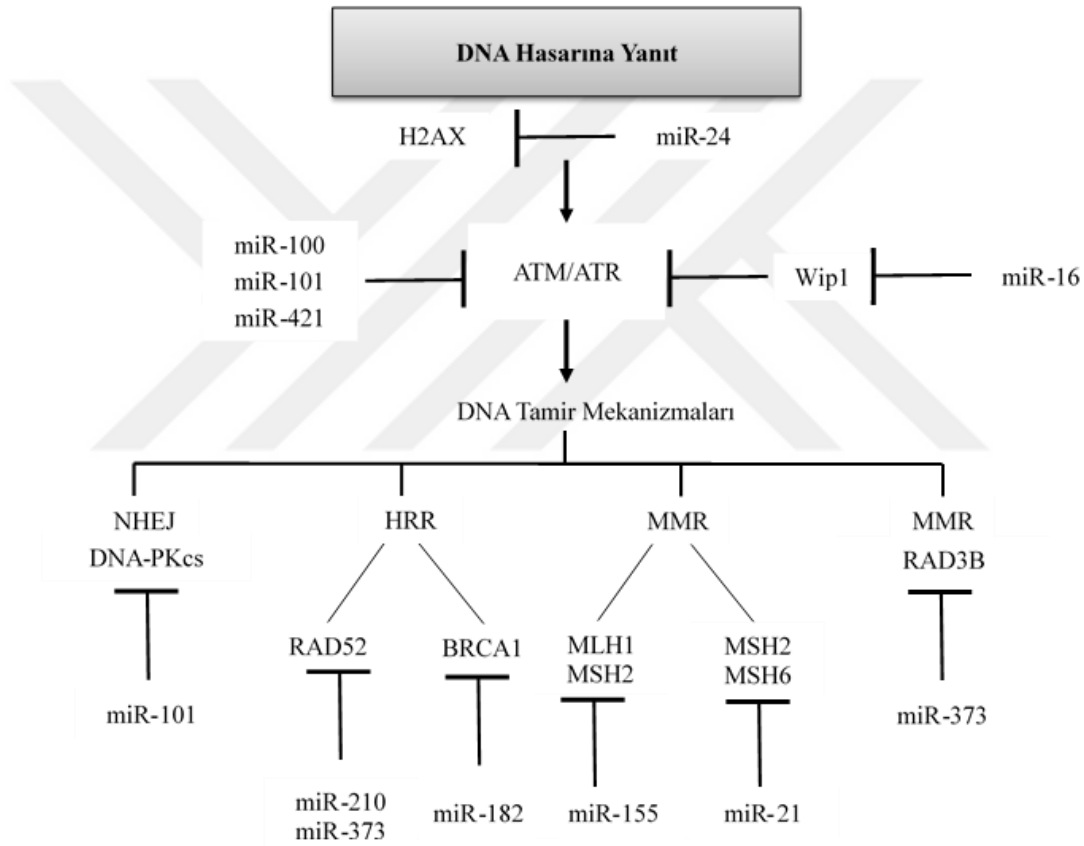
Aslında, DNA hasarına yanıt olarak oluşan histon modifikasyonları içerisinde histon fosforilasyonu, metilasyonu, asetilasyonu ve ubikuitinasyonu yer almaktadır. Ancak DNA'da oluşan çift zincir kırıklarının tanınması ve onarımında H2AX'in C-terminal ucu gerekli olduğundan dolayı H2AX'in serin 139 C-terminal kuyruğundan fosforilasyonu, farklı ilaçların neden olduğu çift zincir kırıklarının veya radyasyona maruziyet sonucu oluşan genotoksik etkinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların odak noktası haline gelmiştir (Dinant ve ark., 2008; Rossetto ve ark., 2010; Turinetti ve Giachino 2015). Bu nedenle PARP inhibitörlerinin kanser tedavisinde etkinliğinin tam olarak belirlenebilmesi için hem γ H2AX miktarının hemde PARP aktivitesinin belirlenmesi gereklidir. Ancak, tedavi uygulanmayan kanser hastalarının tümör biyopsi örneklerinde γ H2AX ve PARP'ın sistematik kullanımı tümöre ulaşılabilirlik, tümör hücrelerinin heterojen yapıda olması, hastaya verilen rahatsızlık, enfeksiyon riski gibi nedenlerden dolayı şu anda pek mümkün değildir. Fakat tedaviye yanıt olarak normal ve kanserli dokuda yeni klinik faz deneyleri devam eden ilaçların aktivasyonunun belirlenmesinde H2AX ve PARP gibi biyobelirteçler kullanılabilirse bu ilaçların kanser tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmasına büyük katkı sağlanabilir (Redon ve ark., 2010).

2.4.5.2. miRNA ekspresyonunda değişimler

miRNA'lar hücre proliferasyonu, apoptozis, farklılaşma ve hücre sinyal yolları gibi önemli hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde onkogen veya tümör süpressör olarak farklı yollarda görev alan 18-25 nükleotit uzunluğunda kodlanmayan kısa baz dizilimleridir (Donzelli ve ark., 2014; Tessitore ve ark., 2014). miRNA ekspresyon profili ile gerçekleştirilen çalışmalarda, aynı organa ait normal ve kanserli doku arasında ve/veya her bir kanser tipine özgü olarak miRNA ekspresyonunda spesifik değişimler belirlendiği için miRNA'ların kanser tedavisinde potansiyel terapötik yeni hedefler olarak kullanılabilirliği öngörülmektedir (Zheng ve ark., 2010; To 2013;

Donzelli ve ark., 2014). miRNA'lar DNA hasarının sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesinde, p53 gibi regülatör proteinlerin ve farklı DNA hasarı ve tamirinde anahtar rol oynayan proteinlerin ekspresyon seviyesinde değişikliklerine neden olduğu için miRNA ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişiminde dolaylı olarak rol aldığı belirlenmiştir (Hu ve Gatti 2011; Wan ve ark., 2011; Chen ve Che 2011; Tessitore ve ark., 2014).

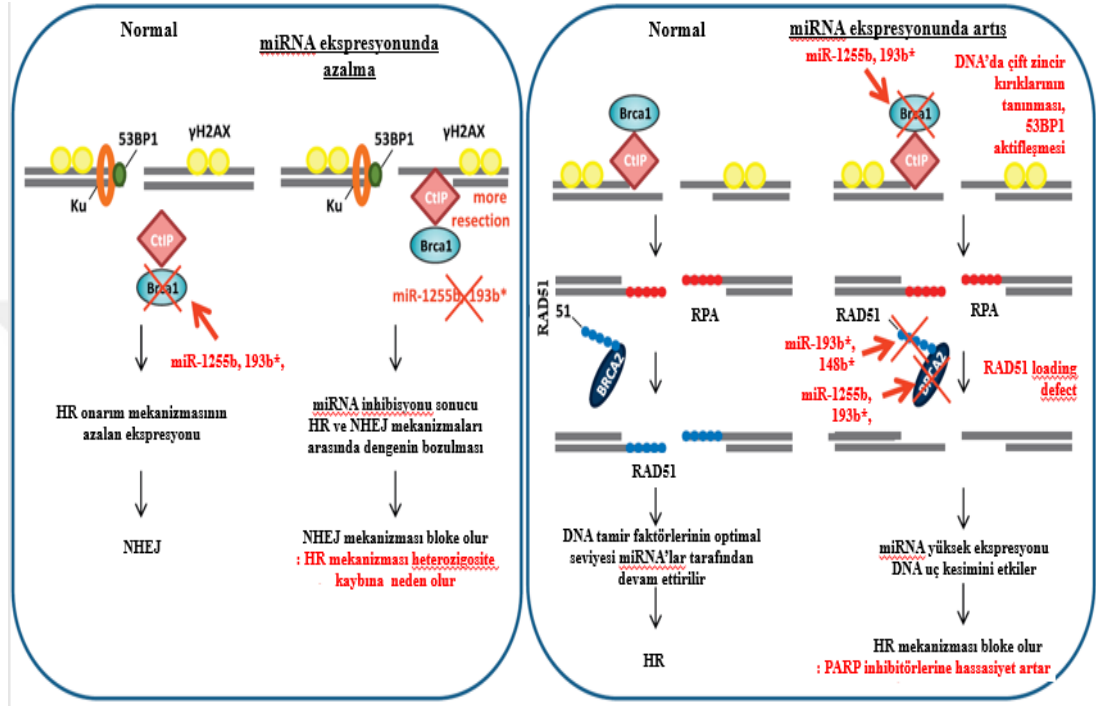
Günümüzde DNA hasarı ve onarımında yer alan genlerin ekspresyonunda artışa ya da azalışa neden olan bazı miRNA'lar ve hedef aldıkları genler Şekil 16'da özetlenmiştir.



Şekil 16. DNA onarım mekanizmalarının aktivasyonunu doğrudan düzenleyen miRNA'lar (Chen ve Che, 2011).

HR ve NHEJ yolağı ile ilişkili genlerin regülasyonunda görev alan miRNA'ların ekspresyon seviyesindeki meydana gelen değişiklikler DNA tamir mekanizmalarının hasarlı DNA onarımında farklılıklara neden olarak hücrelerde PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır (Lovato ve ark., 2012; Volinia ve ark., 2012). Choi ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-1255b, miR-193b ve miR-148b'nin BRCA1/2 ve RAD51 transkriptleri ile ilişkili olduğu ve bu genlerin

ekspresyonlarını düzenlediği gösterilmiştir (Şekil 17). Bu miRNA'ların ekspresyonlarındaki azalmanın hücrede özellikle G₁ fazında çift zincir kırıklarının tamir edilmesinde görev yapan BRCA1, BRCA2 ve RAD51'in ekspresyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir (Choi ve ark., 2014).



Şekil 17. Hücre döngüsü boyunca DNA'da oluşan çift zincir kırıklarının tamirinin miRNA-temelli düzenlenmesi. Çift zincir kırıklarının tamiri HR ve NHEJ arasındaki denge ile sağlanır. G₁ fazında 53BP1 ve Ku kompleksi kırılan DNA uçlarına bağlanır ve miR-1255 ve miR-193 *BRCA1*'in rol aldığı HR mekanizmasını baskılar. Ancak, bu miRNA'ların azalan ekspresyonu yada inhibisyonu çift zincir kırıklarının doğru tamir mekanizması tarafından tamir edilmesini engeller. *BRCA1*'in ektopik yüksek ekspresyonu CtIP-temelli G₁ hücrelerinde NHEJ mekanizmasını engeller. S fazında, çift zincir kırıkları HR mekanizması tarafından tamir edilir ve bu nedenle *BRCA1/2* ve *RAD51*'i hedefleyen miRNA'ların azalan ekspresyonu düzgün bir şekilde HR mekanizmasının aktive olmasını sağlar. *BRCA1/2* ve *RAD51* hedef alan miR-1255, miR-193b ve miR-148b'nin yüksek ekspresyonu S fazında HR'nin farklı aşamalarının gecikmesine ve bu nedenle hücrelerin PARP inhibitörlerine hassas hale gelmesine neden olur (Choi ve ark., 2014).

Choi ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmalarında ise miR-622'nin hücre döngüsü boyunca Ku kompleksi ile ters bir şekilde ilişkili olduğu ve NHEJ mekanizmasını baskılayarak S fazında çift zincir kırıklarının tamir edilmesinde HR mekanizmasına yardımcı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, miR-622 yüksek ekspresyonun platinyum ve PARP inhibitörü uygulanan *BRCA1* defektif yüksek evre over karsinomlarında kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Choi ve ark., 2016).

Neijenhuis ve ark. tarafından over karsinoma hücrelerinde miR-107 ve miR-222 DNA hasarına yanıtı düzenlediği ve RAD51 ekspresyonunu baskılayarak tümör hücrelerini olaparibe karşı hassas hale getirerek çift zincir kırıklarının HR tarafından tamir edilmesini engellediği belirlenmiştir (Neijenhuis ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada ise, miR-107'nin RAD51 ve RAD51D'yi hedefleyerek hücrede HR onarımını azalttığı ve hücrelerin PARP inhibitörlerine karşı hassas hale gelmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark., 2013).

Ayrıca, son yıllarda, ilaç duyarlılığı ve/veya dirençliliğinde miRNA'ların rolü de dikkat çekmektedir. Bazı miRNA'ların çoklu ilaç direncinin oluşmasında temel rol alan MDR1, MRP1 ve BCRP proteinlerinin ekspresyonunda değişime neden olarak farklı kanser türlerinde ilaca karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirtilmiştir (Tablo 8) (Allen ve Weiss 2010; Zheng ve ark., 2010; Li ve Yang 2013; To 2013; Donzelli ve ark., 2014; Gisel ve ark., 2014; Katayama ve ark., 2014a). Örneğin, Liang ve ark. tarafından miR-326'nın VP-16 dirençli hücre hattında MRP-1 ekspresyon seviyesi ile ters bir şekilde down-regüle olduğu ve bu nedenle MRP-1 ekspresyonun düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (Liang ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada ise, miR-328'in ABCG2 (BCRP) geninin 3-UTR bölgesini hedeflediği ve miR-328 seviyesinde artış ile BCRP protein miktarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Pan ve ark., 2009). Jiao ve ark. ise MX-dirençli hücrelerini parental MCF-7 hücreleri ile karşılaştırdıklarında, miR-181'in MX hücrelerinde önemli derecede down-regüle olduğu ve miR-181'in yüksek ekspresyonunun BCRP ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Jiao ve ark., 2013). Bao ve ark. tarafından ise, miR-298'in doksorubisin dirençli meme kanseri hücrelerinde azalan ekspresyonunun artan P-gp ekspresyonu ile ilişkili olduğu ve miR-298'in doğrudan P-gp ekspresyonunu düzenlediği ve metastatik meme kanserinde direnç ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Bao ve ark., 2012). Bu miRNA'lar dışında miR-451, miR-27a, miR-508-5p, miR-331-5p, miR-298 ve miR-145'in doğrudan MDR1 geninin 3'UTR bölgesi ile ilişkili olduğu ve P-gp ekspresyonunu baskıladığı bilinmektedir (Kovalchuk ve ark., 2008; Katayama ve ark., 2014a). ABC ailesi üyelerini hedef alan ve ilaç direnci gelişmesinde rol alan miRNA'lar Tablo 8'de özetlenmiştir.

Tablo 8. Kemoterapik ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol alan MDR taşıyıcıları düzenleyen miRNA'ların hedef aldıkları genler ve ekspresyon seviyesindeki değişimler (To, 2013; Donzelli ve ark., 2014).

Hedef aldıkları gen	miRNA	Ekspresyonunda değişim	Kanser tipi
P-gp	miR-27a, miR-451	Artış	Over
	miR -122	Azalış	Hepatoselüler karsinoma
	miR -296	Artış	Özofagus skuamoz hücre
	miR-298	Azalış	Meme
	miR-1253	Azalış	Meme
	Let-7g	Azalış	Over
MRP1	miR-326	Azalış	Meme
	miR-1291	Azalış	Pankreas
BCRP	miR-212, miR-328	Azalış	Lösemi, Meme, Kolorektal
	miR-328, miR-519c, miR-520h	Azalış	Meme, Akciğer, Kolon, Lösemi, Pankreas
	miR-181a	Azalış	Meme
	miR-487a	Azalış	Meme

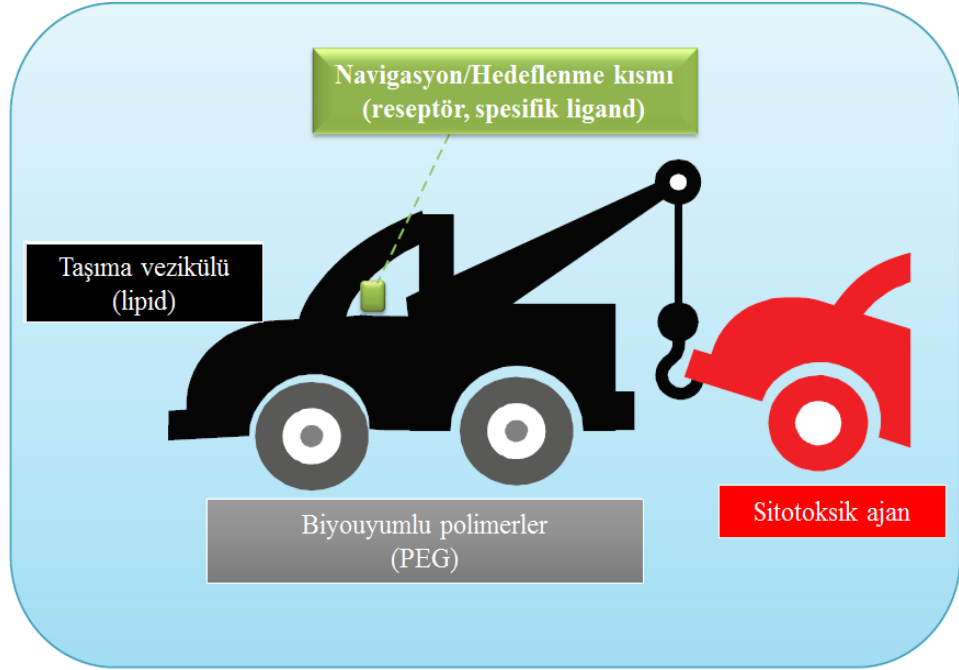
2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlk olarak 1959 yılında Richard Feynman tarafından atomların direkt kontrolü aracılığıyla bir sentezin olasılığından bahsettiği konuşması üzerine ilk kez 1974'te Norio Taniguchi tarafından kullanılan nanoteknoloji; maddenin atomik, moleküler ve supramoleküler seviyede kontrolünü sağlayan sistemlerin, araçların, maddelerin sentezini, tasarımını ve uygulanmasını sağlayan iletişim, mühendislik, robotik, matematik, fizik, kimya, biyoloji, eczacılık ve tıp gibi bilim dallarını kapsayan multidisipliner bir bilim dalıdır (Feynman 1960; Jain ve ark., 2010b; Safari ve Zarnegar 2014). Nanoteknolojinin daha genel tanımı ise sonradan, NNI (National Nanotechnology Initiative) tarafından en az bir boyutunun büyüklüğü 1-100 nm arasında olan maddenin kontrolü olarak tanımlanmıştır. 1970 yılların başından beri nanoteknolojinin özellikle tıp alanında kullanımı farklı hastalıkların tedavisinde (kanser, nörolojik hastalıklar, diyabet vb.) küçük boyuta sahip olmaları ve kullanılan ilacın terapötik etkinliğini arttırmalarından dolayı nanoboyuta sahip ilaç taşıyıcı sistemlerin gelişmesine ve önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Sahoo ve ark., 2008; Jain ve ark., 2010b; Qureshi ve ark., 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Park 2014; Safari ve Zarnegar, 2014)

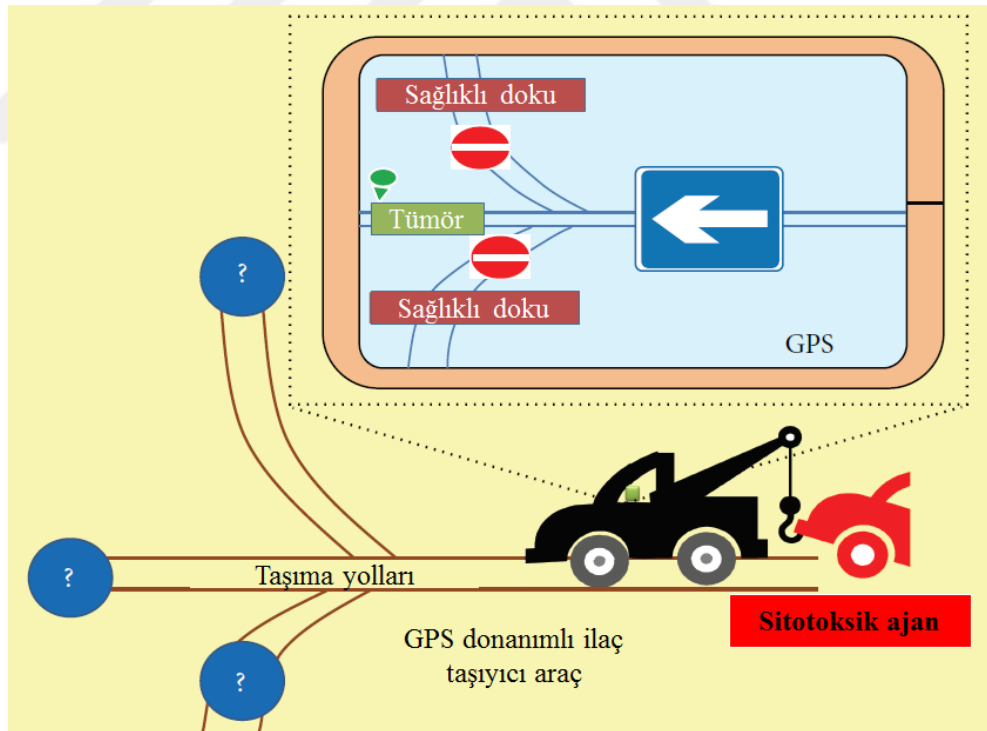
Günümüzde kullanılan geleneksel kemoterapik ajanlar, ilacın istenilen bölgeye taşınmasını sağlayamadığı için hem kanser hem normal hücrelerde etkili olarak neden oldukları toksik etkiden dolayı tedavi için optimal dozun belirlenememesine neden olmaktadır. Bu nedenle, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler normal hücrelere zarar vermeden kemoterapik ajanların seçici bir şekilde kanser hücrelerine hedeflenmesini

sağladığı için öne çıkan bir strateji olmuştur (Zahr ve Pishko 2009; Kakde ve ark., 2011; Qureshi ve ark., 2011; Sharma ve Singh 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Tzakos ve ark., 2013; Silva ve ark., 2014; Luque-Michel ve ark., 2017).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, 10-1000 nm arasında değişen boyuta sahip olan geleneksel ilaçların terapötik ve farmakolojik özelliklerini geliştirmek amacıyla dizayn edilen ve ilacın arzu edilen zaman ve bölgede kontrollü salınımını sağlayan ve nano boyutlu taşıyıcıları içeren sistemlerdir. Bu hedefli taşıyıcı sistemlerin amacı, ilacın istenilen miktarda hedefli hücre popülasyonlarına ya da hücre yüzey reseptörlerine hedeflenmesini sağlayan ve böylece ilacın düşük konsantrasyonda kullanımını sağlayarak diğer dokularda ilacın istenmeyen yan etkilerini minimuma indiren sistemlerdir. Ancak ilaç taşıyıcı sistemlerin tıp alanında kullanılabilmesi taşıyıcı sistemlerin herhangi bir immün yanıt veya negatif bir etki oluşturmadan biyouyumlu olmasına ve biyolojik sistemlere zarar vermeyecek şekilde herhangi bir toksik etkiye sahip olmamasına bağlıdır (Şekil 18,19) (Jain 2009; Singh ve W. 2009; Zahr ve Pishko 2009; Jain ve ark., 2010b; Kakde ve ark., 2011; Qureshi ve ark., 2011; Yadav ve ark., 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Caban ve ark., 2014; Silva ve ark., 2014). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin sahip olduğu avantajlar Tablo 9'da özetlenmiştir.



Şekil 18. Navigasyonlu ilaç taşıyıcı nanopartikülün mekanik analogu ve yapısı (Tzakos ve ark., 2013).



Şekil 19. Navigasyonlu ilaç taşıma. Navigasyonlu ilaç taşıma, istenilen hücresel lokasyona sitotoksik ajanın taşınmasını sağlayan programlanabilir navigasyon sistemi ile donatılmış ilaç taşıyıcı araç olarak tanımlanabilir. Navigasyon sistemi ile donatılmış ilaç taşıyıcı aracın eksikliğinde antikanser ajanları normal hücrelerde de etkili olarak, tümör dokusuna ilacın yeterli konsantrasyonunun ulaşmasına engel olur (Tzakos ve ark., 2013).

Tablo 9. Nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerin geleneksel ilaçlara göre sahip olduğu avantajlar (Sahoo ve ark., 2008; Singh ve W. 2009; Zahr ve Pishko 2009; Jain ve ark., 2010b; Qureshi ve ark., 2011; Singh ve ark., 2011; Yadav ve ark., 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Safari ve Zarnegar 2014)

İlacın farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerini geliştirirler.
İlacın istenilen bölgeye hedeflenmesini sağlarlar.
Kontrollü ve sürekli ilaç salınımını sağlarlar.
İlacın intraselüler alanda miktarını arttırabilirler.
İlaçların sistemik toksik ve yan etkilerini azaltabilir ve/veya ortadan kaldıracırlar.
Endüstriyel çapta üretimi ve klinik alanda uygulamaları kolaydır.
Yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptirler.
İlacın stabilitesini geliştirebilir ve yarı ömrünü uzatabilirler.
İnvaziv olmayan alım yollarının kullanımı enjeksiyon ile ilacın alım ihtiyacını elimine edebilir
Kan-beyin bariyeri gibi beyin hastalıklarının hedeflenmesinde farklı kimyasal modifikasyonlar ile bariyerleri aşabilirler.
Suda çözünmeyen veya sirkülasyon süresi az olan ilaçların taşınımını sağlarlar.
Karaciğer, dalak, akciğer, omurilik ve lenf gibi hedef organlara ulaşmak için hücre ve doku boşluğuna nüfuz edebilirler.

2.5.1. Kanser Tedavisinde Kemoterapinin Başarısız Olmasında Güncel Problemler

Kanser tedavisinde farklı yaklaşımlar olmasına rağmen, uygulanan genel terapötik yaklaşım kemoterapidir. İdeal kemoterapinin amacı, hedeflenen bölgede kontrollü olarak uzun süreli ve yeterli miktarda ilacın taşınmasını sağlarken normal hücrelerde elde edilen terapötik yanıtın engellenmesidir. Bu hedefe ulaşabilmek amacıyla, ilaç taşıyıcı sistemler yeterli miktarda ilacı taşıyan ve hücrenel veya hücrenel olmayan mekanizmalarda ilaç direnci gelişmesi gibi problemleri ortadan kaldıran ve ilacın biyodağılımını ve biyotransformasyonunu değiştiren sistemlerdir. Ayrıca, ilaç taşıyıcı sistemler ilacın uzatılmış sirkülasyonunu sağlayarak yeterli miktarda ilacın EPR etkisi aracılığı ile tümörde toplanmasını arttıran ve/veya aktif hedefleme ile tümör hücreleri tarafından seçici bir şekilde alınmasını sağlayan ve kontrollü ilaç salınımı ile ilacın farmakodinamik özelliklerini geliştiren sistemlerdir (Kakde ve ark., 2011; Sharma ve Singh 2011).

2.5.1.1. İlacın Biyodağılımı

Geleneksel antikanser ilaçların intavenöz alımı sonucunda bu ilaçlar tüm vücut boyunca kan dolaşımı aracılığı ile dağılır hem kanserli hem de kemik iliği, bağırsak, lenfoid dokular, süpermatogenik hücreler, fetüs ve saç folikülleri gibi hızlı bölünen normal hücreleri de etkiler. Bu tedaviler bu yüzden şiddetli yan etkilere, tedavinin tekrarına, ilacın biyodağılımının değişmesine ve kanser hücrelerinde çoklu ilaç direnci

(MDR) gelişmesine neden olur (Brigger ve ark., 2002; Shaji ve Jain 2010; Kakde ve ark., 2011; Chimmiri ve ark., 2012).

2.5.1.2. Çoklu-İlaç Direnci (MDR)

Kanser hücrelerinde başarılı kemoterapinin gerçekleşmesinde en büyük engel hücrenel veya hücrenel olmayan mekanizmalar ile kanser hücrelerinde ilaç direncinin gelişmesidir. Hücrenel olmayan direnç, tümör bölgelerine ilacın etkili bir şekilde ulaşımını azaltan tümör bölgesinin zayıf vaskülarize özelliğinden kaynaklanır ve böylece kanserli hücreler ilacın toksik etkisinden korunur. Tümörün asidik çevresi de temel ilaçlara karşı direnç gelişmesinde rol alır. Bu ilaçlar iyonize yapıda olduklarından dolayı hücrenel membrandan difüzyon olamazlar. Ayrıca, yüksek interstisyel basınç ve düşük mikrovasküler basınç bu moleküllerin ektravagasyonunu engeller yada geciktirir ve böylece ilaca karşı direnç gelişir. Hücrenel mekanizmaları ise plazma membranına bağlı özel proteinlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişimlerden dolayı kemoterapik ilaçların intraselüler konsantrasyonunun azalmasına sebep olan P-gp [MDR1 (ABCB1)], çoklu ilaç direnç proteinleri MRP1 (ABCC1) ve meme kanseri direnç proteini BCRP (ABCG2) ABC taşıyıcı protein ailesinde yer alan temel ilaç efluks pompalarından oluşmaktadır. Bu daha çok hücrelerde lipid çift katman aracılığı ile pasif difüzyon ile geçen ilaçlar için belirtilmektedir. Bu ilaçlar hücreye girdikten sonra, P-gp'e bağlanır ve P-gp ATP hidroliz enerjisini kullanarak bu bileşikleri hücrenin dışına atılmasını sağlar. P-gp inhibitörleri ile birlikte nanopartiküllere enkapsüle antikanser ilaçlarının birlikte alımı bu yüzden P-gp temelli MDR in aşılmasında bir strateji olarak öne sürülmektedir. Meme kanseri hastalarının %40-50'sinde yüksek ekspresyonu gösterdiği bilinen P-gp ekspresyonunun inhibe edilmesi MDR'nin geri döndürülmesinde ve kemoterapide başarının elde edilmesinde önem kazanmaktadır. Bu amaçla, P-gp inhibitörleri ile birlikte antikanser ilaçlarının kullanımı P-gp temelli MDR'nin aşılmasında potansiyel terapötik bir strateji olarak öne sürülmektedir. Bu nedenle, birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon P-gp inhibitörleri geliştirilmiştir (Shaji ve Jain 2010; Kakde ve ark., 2011; Huang ve ark., 2016; Xin ve ark., 2016).

➤ Birinci jenerasyon inhibitörler

Bu inhibitörler seçici olmayan, düşük ve zayıf bağlanma kapasitesine sahip, MDR etkisini terse çevirmek için yüksek dozda kullanımı gereken ve sonuçta hasta da toksik

etkiye neden olan inhibitörlerdir. P-gp substratdırlar ve rekabetçi inhibitör olarak hareket ederler. Bu inhibitörler: Verapamil, Trifluoperazine, Cyclosporine-A, Quinidine ve Reserpine, Vincristine, Yohimbine, Tamoxifen ve Toremifene'dir.

➤ **İkinci jenerasyon inhibitörler**

İlk jenerasyon inhibitörlerin yapısal modifikasyonu ile ikinci jenerasyon P-gp inhibitörleri geliştirilmiştir. Daha iyi farmakolojik profili ile azaltılmış toksisiteye sahip olmalarına rağmen kemoterapik ilaçlar ile beraber kullanımlarına dair başarılı sonuç elde edilen uygulamaları yoktur. Bu modülatörlere örnek Deksverapamil ve Deksnig verilebilir.

➤ **Üçüncü jenerasyon inhibitörler**

Bu moleküller ikinci nesil MDR modülatörlerini sınırlamalarını üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. İkinci jenerasyon inhibitörlerine göre daha spesifik bağlanma özelliğine sahip olan bu inhibitörler sitokrom p450 enzimleri tarafından metabolize olmadıkları için kemoterapik ilaçların farmokokinetiğini değiştirmezler. Bu inhibitörler; Tariquidar, Zosuquidar, Laniquidar, Elacridar, Mitotane, Annamycin ve R101933'dir. Bu bileşiklerin spesifik oldukları kanser tiplerine özgü ön klinik deneyleri yapılmaktadır (Palmeira ve ark., 2012; Amin 2013; Kapse-Mistry ve ark., 2014).

Ancak geliştirilen bu inhibitörlerin kemoterapik ilaçlar ile birlikte kullanılmasında bazı kısıtlamalar vardır;

- ✓ P-gp ekspresyonunun etkin bir şekilde azaltamadıkları için beraber kullanıldıkları kemoterapik ilaçların hücrenin dışına atılmasını sağladıklarından dolayı kemoterapik ilaç ve eş zamanlı P-gp inhibitörleri ile tedavi gören kanser hastaları yüksek seviyede kemoterapik ilaca maruz kalmaktadır.
- ✓ Kemoterapik ilaçların çoğu hidrofobik özellikte iken MDR inhibitörleri veya MDR ile ilişkili genler hidrofilik yapıdadır. Bu yüzden iki farklı özellikte maddenin tek nanopartiküle yüklenmesi nanopartiküllerin en önemli özelliği olan yüksek yükleme kapasitesini engellemektedir. Ayrıca etkin doz optimizasyonunu sağlamak için yüklenecek maddeler arasında moleküler oranı belirlemek ve kontrol etmek oldukça zordur

- ✓ Kanser hücreleri genellikle ilaca karşı hücreSEL direnç daha fazla gösterdikleri için P-gp inhibitörleri ile tümörde P-gp seviyesinde neden olunan değişikliklere muhtemelen normal hücrede P-gp fonksiyonunda değişiklikler de eşlik edebilir. Bu yüzden kanser hücrelerinde MDR'ye neden olan ABC taşıyıcılarının ekspresyon seviyelerinin spesifik düzenlenmesine ihtiyaç vardır (Velingkar ve Dandekar 2010; Chen ve Sikic 2012; Conde ve ark., 2013; Gao ve ark., 2014; Katayama ve ark., 2014b).

2.5.1.3. Retikuloendotelyal Sistem (RES)

İlk olarak Aschoff tarafından RES, sitoplazmalarında çeşitli maddeleri (hücre artıkları, yabancı cisimler, mikroorganizmalar) sindirme özelliği bulunan, bağ dokulardaki sabit ya da hareketli hücreler bütününden oluşan sistem olarak tanımlanmıştır. RES tarafından hızlı bir şekilde kanser terapötiklerinin kandan yok edilmesi kemoterapi de diğer bir problemi oluşturmaktadır. RES örneğın dalak gibi retiküler bağ dokularda lokalize olan monosit ve makrofajlardan oluşur. Bu hücreler fagositozdan ve hücreSEL debrinin, patojenlerin ve kan akışındaki yabancı maddelerin yok edilmesinden sorumludur. Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu, hidrofobisitesi, yüzey yükü ve sistemin bileşenleri taşıyıcı sistemin RES tarafından yok edilmesinde etkilidir. Bu problem taşıyıcı sistemlerin PEG-ilasyon ile modifikasyonu ile çözülebilir. Örneğın, sentetik polimer olan polietilen glikol (PEG) kaplı lipozomun kanda lipozomun yarı ömrünü önemli bir derecede arttırdığı bulunmuştur. Bu tekniğın diğer taşıyıcı sistemler içinde kullanılması ile RES tarafından nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin yok edilmesi önlenebilir (Kakde ve ark., 2011; Chimmiri ve ark., 2012).

2.5.1.4. Antikanser İlaçların Hidrofobisitesi

Çoğı antikanser ilaç hem kanser hem de normal hücrelerde neden olduğu toksik etkiden dolayı, oral formülasyonundan daha çok intravenöz formülasyonların geliştirilmesi gerekmektedir. İntravenöz formülasyonlar, ilacın normal hücrelerde etkisini minimuma indirmek için sürdürülebilir ilaç salınımı sağlamaktadır. İdeal intravenöz formülasyon için, diğer antikanser ilaçlarının çoğında nadiren görülen bir özellik olan ilacın sulu ortamda çözünebilir olmasıdır. Örneğın, paklitakselin adjuvan kullanımını engellemek için ve daha iyi dozaj formülasyonunun geliştirilmesi için birçok çaba sarfedilmektedir. Paklitaksel yüksek derecede hidrofobik yapıda olan ve

suda çözünürlüğü 0.5 mg/L'den daha az olan bir ilaçtır. Bu adjuvanın çözülmesinde Cremophor EL (polioksietillenmiş kastor yağ) ve dehidre alkol kullanılmaktadır. Bu nedenle hipersensitivik reaksiyonlar, nefrotoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, hiperlipidemi, anormal lipoproteinler, eritrosit toplanması ve periferik nöropati gibi ciddi yan etkilere yol açmaktadır (Kakde ve ark., 2011; Chimmiri ve ark., 2012).

2.5.2. Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler ile Tümörün Hedeflenmesi

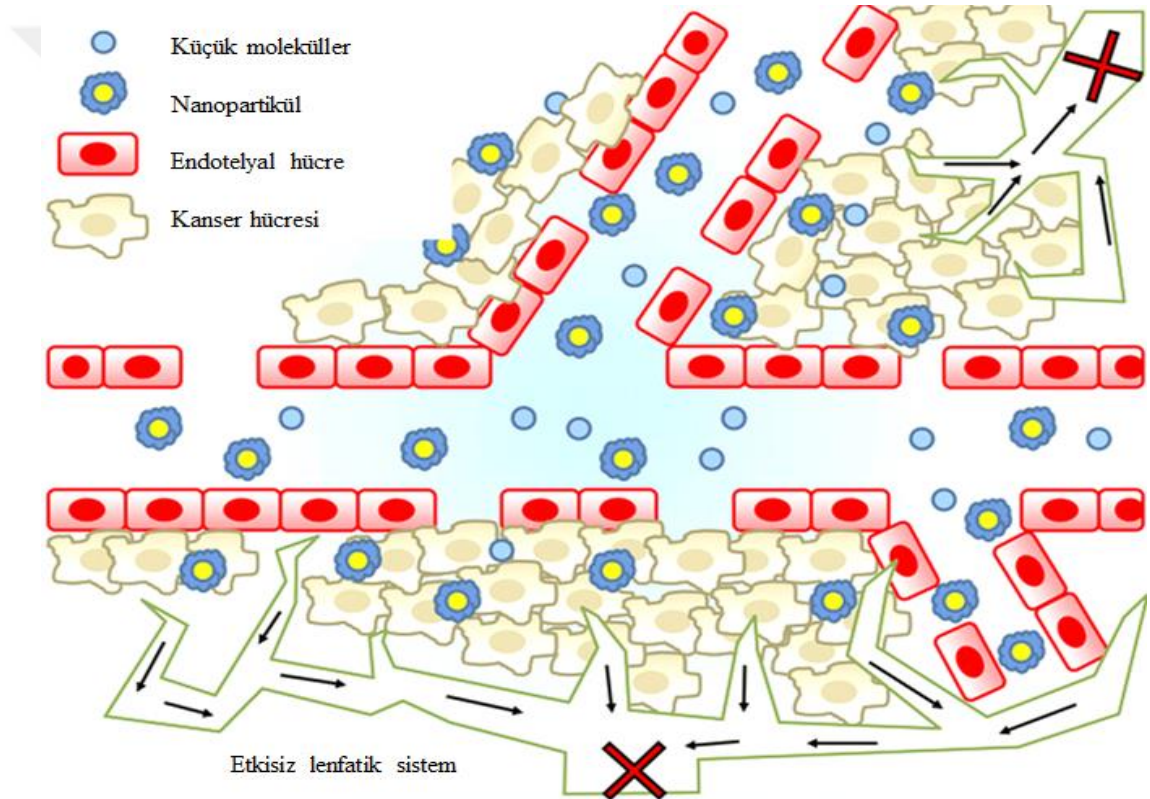
İstenilen dokuya nanopartiküller aracılığı ile ilacın hedeflendirilmesi iki yolla gerçekleşir.

2.5.2.1. Pasif Hedefleme

Pasif hedefleme, fizikokimyasal ve farmakolojik faktörlerden dolayı ilaç veya ilaç taşıyıcı sistemlerin hedeflenen hücre ve/veya dokuda toplanmasını sağlayan ve böylece ilacın spesifik olmayan dağılımını engelleyen genel bir mekanizmadır (Zahr ve Pishko 2009; Qureshi ve ark., 2011; Taurin ve ark., 2013; Bertrand ve ark., 2014; Yin ve ark., 2014; Danhier ve Pr at 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Tümörün büyümesi için gerekli olan besin ve oksijen kaynağını sağlamak için sitokinler ve diğer sinyal moleküllerinin salınımını sağlayarak tümöre yeni kan damarlarının oluşumunu sağlayan anjiyogenezi tetikler. Anjiyogenik tümör kan damarları çoğu normal dokuda bulunan sıkı kan damarlarının aksine yüksek oranda proliferen olan endotelyal hücreler, perisit eksikliği ve anormal bazal membran formasyonu anomalileri gibi özelliklere sahiptir ve bu düzensizliklerin sonucu olarak, yüksek seviyede vasküler geçirgenlikten dolayı tümör tipine, çevresine ve lokalizasyonuna bağlı olarak 200-2000 nm arasında porlu/gözenekli endotelyal hücreler dizininden oluşur. Böylece, ilaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküller damardan dışarıya geçerek tümör interstisyel (dokular arası) alanda toplanmasına neden olur. Ayrıca, artan vasküler geçirgenlik dışında tümör dokusunda fonksiyonel olmayan lenfatik sistem zayıf lenfatik dreneja neden olur. Bu nedenle tümör hücresinde nanopartiküller lenfatik sistem tarafından etkili bir şekilde uzaklaştırılmadığı için, nanopartiküllerin tümör dokuda normalden yaklaşık 10 kat daha fazla toplanmasını sağlar. Geleneksel tedavide bu etki ancak serbest ilacın 10 kat fazla doz uygulanması ile sağlanabilir. Sonuç olarak, bu iki faktör birlikte ilk olarak Matsuma ve Maeda tarafından keşfedilen ilaç veya nanopartiküllerin istenilen hücre

ve/veya dokuya pasif hedeflenmesinde büyük rol alan geçirgenlik ve retansiyon etkisi (EPR) olarak isimlendirilmiştir. EPR etkisi, nanopartiküllerin boyut ve yüzey özellikleri ile retiküloendotelial sistemden (RES) kaçmalarına ve kanda daha uzun süre kalarak tümör interstisyel alanda toplanmalarını sağlamaktadır (Şekil 20). Tümör ve tümör kan damarlarının aşırı anjiyogenezi, hipervaskülaritesi, düzensiz ve tutarsız kan akışı ve tümör interstisyumunda nanopartiküllerin toplanmasına neden olan yavaş venöz dönüşü gibi özellikleri pasif hedeflemede EPR etkisine katkıda bulunur (Bae ve Park 2011; Qureshi ve ark., 2011; Taurin ve ark., 2013; Bertrand ve ark., 2014; Yin ve ark., 2014; Danhier ve Pr at 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).



Şekil 20. Nanopartiküller ile tümörün pasif hedeflenmesi (Yingchoncharoen ve ark., 2016).

1987’de Jain, tümörün yapısından dolayı tümör interstisyel sıvı basıncının yüksek olması gerektiğini belirtmiştir ve günümüzde solid tümörlerin artan interstisyel sıvı basıncı sergiledikleri belirlenmiştir. Ancak, vasküler anomaliler nanopartiküllerin tümöral kan damarlarından tümör interstisyel alana geçişini güçlendirmesine rağmen, artan tümör interstisyel sıvı basıncı nanopartiküllerin tümöre transkapiller geçişine engel olmaktadır. Günümüzde, interstisyel sıvı basıncının tümörün merkezinde yüksek

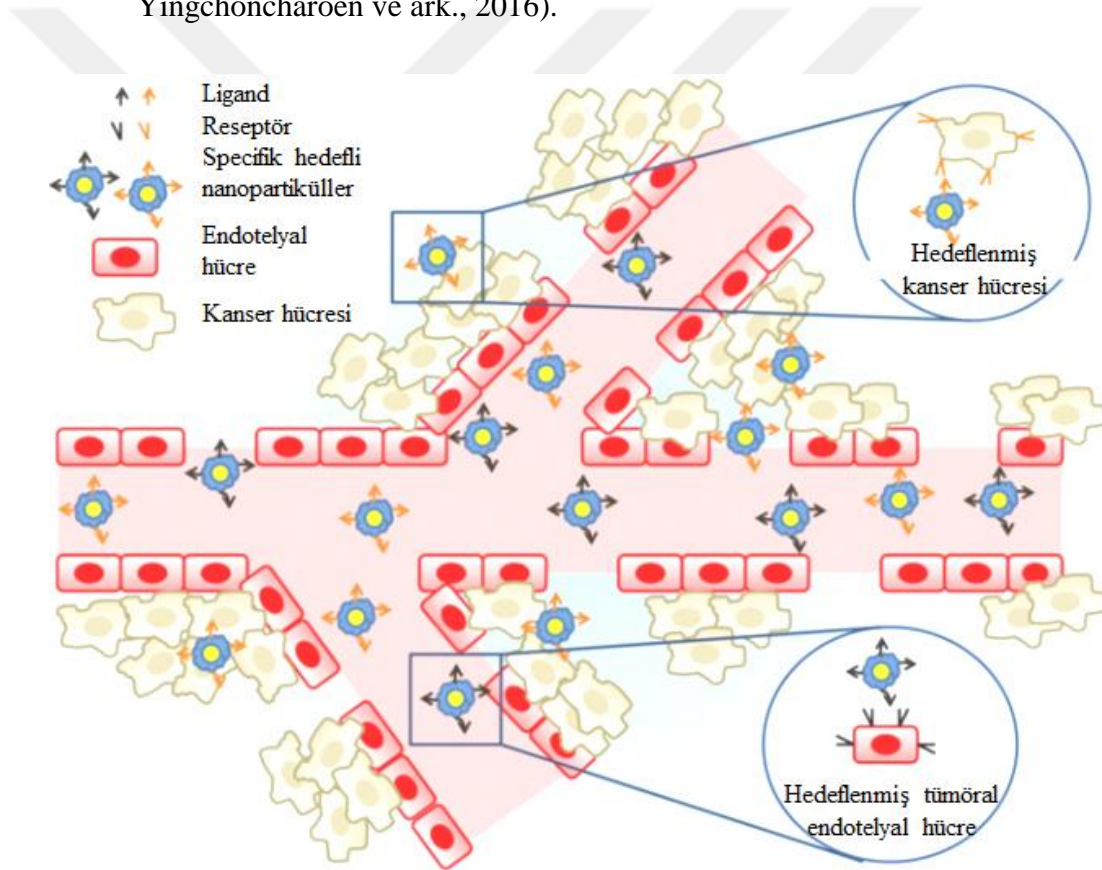
oranda olduğu ve periferde ise azaldığı düşünülmektedir. Bu nedenle interstisyel sıvı basınç gradiyenti tümörün merkez bölgesinden perifere doğru sıvının hareketine neden olarak tümöre nanopartiküllerin ulaşma yeteneğini azaltır. Ancak, 10 kDA'dan büyük boyuta sahip nanopartiküller artan interstisyel sıvı basıncından daha az etkilendiği ve başarılı bir şekilde tümörde toplandıkları gösterilmiştir. Bu nedenle nanopartiküllerin boyutu ve aynı zamanda nanopartiküller tümöre geçişini sağlayan yüksek mikrovasküler basınç önemlidir (Bae ve Park 2011; Yhee ve ark., 2013; Bertrand ve ark., 2014; Danhier ve Pr at 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Ayrıca, nanopartiküllerin boyutu, yüzey yükü ve PEG veya poli (etilen oksit) eklenmesi ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları, nanopartiküllerin yarı ömrü ve tümörün anjiyogenez derecesi pasif hedeflemenin etkinliğinde rol almaktadır. Örneğin, 200 nm boyuttan küçük ve düşük pozitif yüke sahip olan nanopartiküller seçici bir Şekilde nötral veya negatif yüklü nanopartiküllere göre daha uzun süre tümörde toplanabilirler. Ayrıca, nanopartiküllerin PEG veya poli(etilen oksit) gibi yüzey modifikasyonları opsonizasyonu azalttığı için nanopartiküllerin sirkülasyon zamanlarını arttırarak RES tarafından tanınmasını azalttığı belirtilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemlerin pasif bir Şekilde tümörde toplanması olarak bilinen pasif hedefleme tamamlandıktan sonra, aktif hedefleme süreci potansiyel olarak başlar (Bae ve Park 2011; Bertrand ve ark., 2014; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.2.2. Aktif Hedefleme

Aktif hedefleme, ilaç yada nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeyinde bulunan spesifik ligandlar sayesinde aktif, seçici, tanıma yeteneği yüksek olan ve özel hücrelerle etkileşebilen sistemlerin gelişmesini sağlayan hedefleme mekanizmasıdır (Şekil 21). Aktif hedeflemede dizayn edilen taşıyıcı sistem, hedefleme kısım olarak bir ligand veya antibodi, taşıyıcı olarak polimer veya lipid ve aktif terapötik ajandan oluşur (Zahr ve Pishko 2009; Bae ve Park 2011; Qureshi ve ark., 2011; Bertrand ve ark., 2014; Yingchoncharoen ve ark., 2016). Ancak, etkili bir taşıyıcı sistemin üretilmesi ve seçici bir Şekilde kanser hücrelerini hedefleyebilmesi için aktif hedeflemede özellikle hedeflenen kısım ile ilişkili bazı faktörler göz ardı edilmemelidir. Bu faktörler;

- Hüresel reseptör ve reseptörün ligandı kanser hücrelerinde yüksek derecede eksprese edilen ve normal hücrelerde eksprese edilmeyecek şekilde tümör-spesifik olmalıdır.
- Seçilecek reseptör tüm hedeflenen kanser hücrelerinin yüzeyinde homojen bir şekilde eksprese edilmelidir.
- Ligand reseptöre bağlandıktan sonra, ligand-reseptör kompleksi kan sirkülasyonunda serbest olmalıdır.
- Reseptör-ligand kompleksine bağlandıktan sonra, hedeflenen hücrede işlevsel olmalıdır. Bu faktörler aktif hedefleme için önemli faktörlerdir ve reseptörün ligandına hedeflenmesinde etkinliğini belirler (Bertrand ve ark., 2014; Yingchoncharoen ve ark., 2016).



Şekil 21. Nanopartiküllerle kanser hücrelerinin aktif hedeflenmesi. Aktif hedeflenme pasif hedeflenme tamamlandıktan sonra meydana gelir ve hastalıklı dokuda pasif bir şekilde toplanan nanopartiküllerden sonra oluşabilir. Aktif hedefleme ise, kanser hücrelerinin veya tümöral endotellerin hedeflenmesi ile gerçekleşebilir. Kanser hücrelerinin hedeflenmesi nanopartiküllerin bu hücrelere alımının artmasını sağlar. Bunun aksine; tümöral endotelin hedeflenmesi oksijen ve besin kaynaklarının dolaylı olarak yoksun olması sonucu kanser hücrelerinin ölmesine dayanır (Yingchoncharoen ve ark., 2016) .

Ligand-reseptör kompleksinin hücrede internalizasyonu genellikle reseptör aracılı endositozda rol alan kaveolin-1 veya klatrin gibi proteinler aracılığı ile gerçekleşir. Internalizasyon sürecinde plazma membranı ligand-reseptör kompleksini saran endositik bir vezikül oluşturur ve böylece vezikülün erken endozomla birleşmesini sağlayarak hücre sitoplazmasına girmesini sağlar. Erken endozom olgunlaştıkça, vakuolar ATPaz pompaları endozomdan H⁺ iyonlarının uzaklaşmasını sağlayarak endozomal pH'nın 5'e düşmesini sağlar. Böylece, erken endozomda artan asidite birçok reseptör konformasyonunun değişmesine neden olur ve ilişkili ligandın salınımı sağlar. Bu noktada reseptör ve ligandı plazma membranına yeniden kullanılmak üzere geri döner ya da reseptör-ligand kombinasyonuna bağlı geç endozomun lizozomal degradasyonu için endolitik yolağa devam eder. Örneğin, düşük yoğunlukta lipoprotein kompleksi olan transferrin reseptörü ve ligandı ve folat reseptörü plazma membranına yeniden kullanılmak üzere geri dönerken, düşük yoğunlukta lipoprotein EGFR ve ligandı ve α -2-makroglobulinin multiveziküler yapılara taşınarak ve lizozomal degradasyon için olgunlaştığı bilinmektedir (Bae ve Park 2011; Bertrand ve ark., 2014; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Aktif hedeflemede, ilacın kimyasal özellikleri, net iyonik yükü, log *P* değeri ve reseptör-ligand kompleksinin plazma membranına yeniden kullanılmak üzere geri dönmesi gibi faktörler hedeflenen ilacın etkili bir şekilde taşınmasını belirler. Ancak, kanser hücrelerine ilacın spesifik bir şekilde taşınmasını sağlayan aktif hedefleme önemli bir strateji olmasına rağmen, ligand-reseptör kompleksinin hücrede internalizasyon yolağında son varış noktasının tam olarak neresi olduğu hala bilinmemektedir ve bu yüzden bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır (Bertrand ve ark., 2014; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Aktif hedefleme ile nanopartiküller kanser hücrelerine ve tümöral endoteliuma doğrudan hedeflenebilirler.

❖ Kanser hücrelerinin hedeflenmesi

Kanser hücrelerinin hedeflenmesindeki temel amaç nanopartiküllerin kanser hücrelerinde alınımını arttırmaktır. Bu stratejide, nanopartiküllerin etkisini arttıran tümörde toplanmasını arttırmaktan ziyade hücrel internalizasyonunu arttırmaya dayanır ve kanser hücrelerinin oksijen ve besin kaynağını kesmek için tümör vaskülaritesinin bloklanması yerine enkapsüle ilacın salınımı sağlayarak kanser

hücrelerin doğrudan ölmesine neden olur. Bu kapsamda kullanılan reseptörler içerisinde en çok kullanılanları transferrin reseptörü, folat reseptörü, hücre yüzey glikoproteinleri, EGFR ve ssDNA ve RNA aptamerleridir (Yingchoncharoen ve ark., 2016).

❖ **Tümöral endotelyumun hedeflenmesi**

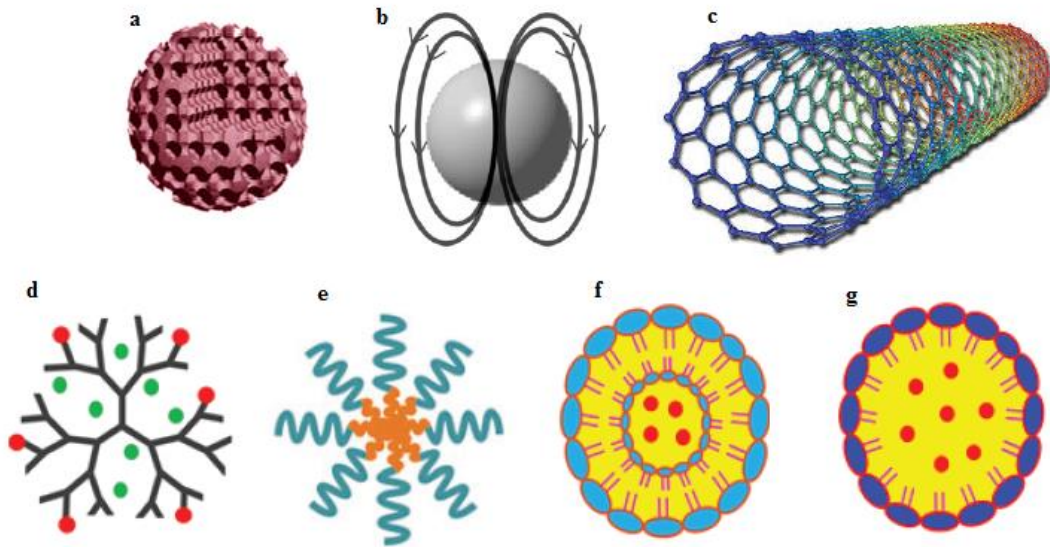
1971’de Judah Folkman’ın “tümör hücrelerinin büyümesi yeni kan damarları oluşumunun engellenmesi ile baskılanılabilir” önerisi tümör endotelial hücrelerinin aktif bir şekilde hedeflenmesinde nanotıpın gelişmesine yol açmıştır. Doğrudan kanser hücrelerinin hedeflenmesi yerine tümöral endotelyumun hedeflenmesi, kanser hücrelerinin oksijen ve besin kaynaklarının tükenmesine yol açarak ölmelerine neden olur. Bu stratejide, ligand hedefli nanopartiküller besini sağlayan kan damarlarının engelleyerek anjiyogenik kan damarlarının ölmesine neden olur. Tümöre kan sağlayan damarların inhibe edilmesi, tümörün boyutunun ve metastatik kapasitesinin azalmasını sağlar. Bu strateji ile hipovasküler tümörde yetersiz miktardaki ilaç konsantrasyonu problemlerinin bazıları çözülebilir:

- Sirküle nanopartiküllere kanser hücrelerinin tümöral interstitial matriksinde lokalize olmalarına göre tümör vasküler iletişimi ile ulaşmak daha kolaydır.
- Nanopartiküllerin ekstrasvasyonu hedeflenen bölgeye ulaşması için gerekli değildir.
- Ligandın reseptöre bağlanması intravenöz enjeksiyondan sonra gerçekleşmesi mümkündür.
- Endotelial hücreler kanser hücrelerinden genetik olarak daha kararlı olduğu için endotelial hücrelerde ilaç direnci oluşum riskini azaltır.
- Bir endotelial hücrenin ölümü yaklaşık 100 neoplastik hücrenin ölümüne yol açmaktadır. Ancak, hedeflenen kanser hücrelerinin öldürülmesi, ulaşılan ve ulaşılamayan tümör hücrelerin doğrudan ölümü gerçekleştiğinde etkili olabilir.
- Tümör vasküler endotelyumun hedeflenmesi; tümöre nanopartiküllerin derinlemesine nüfuz etmesine gerek kalmadan terapötik etki gösterebilir, tümör interstitial hipertansiyonundan büyük ölçüde etkilenmez ve perfüze veya vaskülerize kan damarlarına gerek duymaz.
- Çoğu endotelial hücre belirteci birçok tümör tipinde eksprese olur ve bu yüzden geniş uygulama alanına sahiptir (Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Bu kapsamda, VEGF ve reseptörü olan VEGFR-1, VEGFR-2, $\alpha_v\beta_3$ integrin; vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1) ve matriks metalloproteinazlar (MMP) potansiyel aday olarak görülmektedir (Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Çeşitleri

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden inorganik ve organik maddelerin kullanımına bağlı olarak, istenilen özellikte sistemin seçilmesini sağlayan farklı çeşitleri bulunmaktadır (Şekil 22). Ayrıca nanosüspansiyonlar, nanokristaller, polimer-protein konjugatları, polimer-ilaç konjugatları, nanojeller de ilaç taşıyıcı sistem çeşitleri olarak mevcuttur (Jain ve ark., 2010b).



Şekil 22. Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin çeşitleri. a) Silika nanopartikül, b) Manyetik nanopartikül, c) Karbon nano tüp, d) Dendrimer, e) Polimerik misel, f) Lipozom ve g) Katı lipid nanopartikül (Ojea-Jiménez ve ark., 2012; Mo ve ark., 2014; Agrahari ve ark., 2016).

2.5.3.1. İnorganik Nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller metal oksit veya en az bir boyutu nanometre olan metallik bileşiklerden oluşmaktadır. İnorganik nanopartiküller, yeni ve farklı kimyasal, fiziksel, biyolojik özellikler sahip olduklarından ve küçük boyutlarından dolayı ilgi çekmektedir. Ancak, inorganik nanopartiküllerin üretilmesinde tek bir tip üretim yöntemi olmadığı ve üretim teknikleri açısından farklı araştırma enstitüleri ve laboratuvarlar arasında önemli derecede farklılıklar olduğundan dolayı bazı sorunlar vardır. Ayrıca, inorganik nanopartiküller nanotıp alanında çok dikkat çekmesine

rağmen, uzun süreli doku hasarı, toksisite, immünojenisite, karsinogenesiz ve inflamasyon gibi etkileri ile ilişkili endişeler vardır. Bu nedenle, inorganik nanopartiküllerin yan etkilerini optimize etmek için üretilmeden önce stabilitesinin, sirkülasyon zamanının ve hücrede lokalizasyonunun ayarlanması gereklidir (Caban ve ark., 2014; Safari ve Zarnegar 2014).

2.5.3.1.1. Seramik Nanopartiküller

İnorganik seramik nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımı özellikle biyomakromoleküler terapötikler için yeni bir alandır. Seramik nanopartiküller, oldukça düşük boyuta (50 nm'den az) sahip olmalarından ve gözenekli yapıya sahip olmalarından dolayı, ilaç taşıyıcı sistem olarak önem kazanmaktadır. Küçük boyuta sahip ilaç taşıyıcı sistemlerin RES tarafından farkedilip yok edilmesi daha büyük boyuta sahip olan nanopartiküllere göre daha zordur. Ayrıca, seramik nanopartiküller değişen pH'da gözenek yapılarında herhangi bir değişim göstermezler ve bu nedenle sıcaklık, pH gibi dış değişimler tarafından uyarılan denatürasyondan biyomakromolekülleri koruyabilirler. Seramik nanopartiküllerin yüzeyleri monoklonal antikor gibi spesifik ligandlarla konjuge edilebilir. Ayrıca silika nanopartiküller viral olmayan vektör olarak gen transferi çalışmaları da yapılmaktadır (Sahoo ve ark., 2008; Jain ve ark., 2010b; Baeza 2014).

2.5.3.1.2. Mezo-Gözenekli Silika Sistemler

Son yıllarda, mezo-gözenekli solidlerin sentezi ve uygulamaları eşsiz yapılarından, geniş por boyutlarından ve yüzey alanlarından dolayı dikkat çekmektedir. Mezogözenekli yapılar kararlı bir yapıya sahip oldukları ve yüzey özelliklerinden dolayı, farmasötik ilaçların, proteinlerin ve diğer biyogenik moleküllerin enkapsülasyonu için ideal maddelerdir. Mezo-gözenekli silika sistemlerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 10'da özetlenmiştir. M41S, SBA, MSU ve HMS günümüzde ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan mezo-gözenekli maddelere örnek verilebilir ancak bu maddelerin biyoyuyumluluğu güçlü değildir. Mezo-gözenekli maddelerin biyoyuyumluluğu fosforlu maddeler veya hidroksiapatit gibi aktif bileşenler ile modifikasyon ile artırılabilir (Hoffmann ve ark., 2006; Wilczewska ve ark., 2012; Kwon ve ark., 2013; Safari ve Zarnegar 2014).

Mezo-gözenekli yapılar mikrokürelerin aksine gen transfeksiyonu ve intraselüler ilaç taşınması için avantajlı özelliklerinden dolayı kullanımını dikkat çekmektedir ve bu nedenle mezo-gözenekli silika nanopartiküller geliştirilmiştir. Mezo-gözenekli silika nanopartiküller, 50-300 nm arasında değişen partikül boyutuna sahip, ısı, pH, mekanik stres ve hidrolizis uyarımlı degradasyona diğer polimer temelli ilaç taşıyıcılara göre daha stabil olan, genellikle 2-6 nm arasında değişen gözenek boyutuna sahip iç ve dış yüzeye sahip olan nanopartiküllerdir. Ayrıca, mezo-gözenekli silika nanopartiküller, geniş yüzey alanı ($>900 \text{ m}^2/\text{g}$) ve gözenek yapısına ($>0.9 \text{ cm}^3/\text{g}$) sahip oldukları için ilaç yükleme kapasiteleri yüksektir (Hoffmann ve ark., 2006; Sahoo ve ark., 2008; Wilczewska ve ark., 2012; Kwon ve ark., 2013; Safari ve Zarnegar 2014).

Tablo 10. Mezo-gözenekli silika nanopartiküllerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar

Avantajları	Dezavantajları
Toksik değildir.	Metabolik değişimlere neden olarak melanoma gelişiminde rol alabilirler.
Biyoyumlu ve biyobozunurlardır. Geniş yüzey alanı sahiptirler ve etkin maddenin gözenekli yapıda homojen dağılımını sağlarlar.	Kırmızı kan hücrelerinin membranında bulunan fosfolipidlerin yüzeyi ile yüzeylerinde yoğun bir şekilde bulunan silanol gruplarından dolayı etkileşime girerler ve böylece hemoliz gerçekleşir.
Yüzey yükü kontrol edilebilir.	

2.5.3.1.3. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller, özellikle dış manyetik alanın etkisiyle kolayca üretilebilen, kanser hücrelerine aktif ve pasif hedeflenebilen, MRI ile kolayca görüntülenebilen, hedeflenen doku tarafından kolayca alınabilen ve bu nedenle optimal doz ile etkili terapötik tedavi sağlayabilen potansiyel terapötik taşıyıcı sistemlerdir. Ancak çoğu zaman manyetik nanopartiküllerin kullanımında nanopartiküllerin uygun olmayan bazı özelliklerinden veya yetersiz magnet sisteminden dolayı bazı problemler ile karşılaşmaktadır. Manyetik nanopartiküllerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 11’de özetlenmiştir. Manyetik nanopartiküllerin dizaynında seçilecek metalin manyetik özelliği, boyutu, manyetik alanın gücü, ilaç yükleme kapasitesi, hedef dokunun yeri ve kanın akış hızı göz önünde bulundurulmalıdır (Indira ve Lakshmi 2010; Jain ve ark., 2010b; Wilczewska ve ark., 2012; Lalge ve Rathi 2014; Safari ve Zarnegar 2014).

Manyetik nanopartiküller kobalt, nikel, mangan, demir ve bu metallerin oksit formlarından oluşmaktadır. Ancak manyetik nanopartiküllerin tıp alanında kullanılması kullanılacak metalin seçimini kısıtlamaktadır. Günümüzde, FDA

tarafından sadece demir oksit manyetik nanopartiküller onaylanmıştır. Demir oksit, kalp, dalak ve karaciğerde normalde bulunan ve bu nedenle biyoyumlu ve fizyolojik konsantrasyonda toksik olmayan bir metaldir (Indira ve Lakshmi 2010; Wilczewska ve ark., 2012; Lalge ve Rathi 2014).

Tablo 11. Manyetik nanopartiküllerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar

Avantajları	Dezavantajları
Tedavi tamamlandıktan sonra uzaklaştırılabilirler	Uzun süre kullanımında degrede oldukları için terapinin etkinliğini azaltırlar.
Dış manyetik alan aracılığı ile hedeflenen dokuda doğrudan yüksek miktarda bulunma yetenekleri vardır.	Küçük boyuta sahip oldukları için kontrolsüz bir şekilde hedeflenen bölgede bulunurlar ve böylece toksik hücrel etki sergileyebilirler
Partikül agregasyonunu azaltırlar ve sürdürülebilir ilaç salınımı sağlarlar.	.
Biyoyumlu maddelerdir ve bu nedenle yüksek performansa sahiptirler.	

Manyetik nanopartiküllere ilaç, kovalent bağlar, elektrostatik etkileşim, adsorbsiyon veya enkapsülasyon süreci ile bağlanabilir. Manyetik nanopartiküllerle ilacın hedeflenmesi partikül boyutuna ve yüzey kimyasına bağlı olarak aktif veya pasif hedeflenme ile gerçekleşir. Manyetik nanopartiküller vücuda alım yoluna bağlı olarak ekstraselüler bileşenler ile ve/veya makrofajlar, endotelial hücreler, deri epitelyumu ve solunum veya sindirim sistemlerinin hücre membranı ile etkileşime girebilirler. Ancak manyetik nanopartiküller hızlı bir şekilde plazma proteinleri tarafından opsonize edilerek RES'in makrofajları tarafından kanda ortadan kaldırılırlar (Indira ve Lakshmi 2010; Wilczewska ve ark., 2012; Lalge ve Rathi 2014).

2.5.3.2. Karbon Nanotüpler

Karbon ilaç taşıyıcı sistemler nanotüp ve nanohorn şeklinde kullanılmaktadır. Karbon nanotüpler tek veya çoklu grafit katmanından oluşan, eşsiz yüzey alanı, elektronik ve termal iletken yapıları ile karakterizedir. Karbon nanotüplerin biyoyumluluğu yüzeyine PAMAM dendrimerlerin kovalent bağlanması, amfilik iki bloklu kopolimerlerin ve/veya PEG katmanının yüzeye ya da hyaluronik asit matriksine disperse olması gibi kimyasal modifikasyonların eklenmesi ile geliştirilebilir. Mekanik güçlerinden dolayı, tek karbon nanotüpler polimerik ve polimerik olmayan diğer nanotaşıyıcıların özelliklerini geliştirmektedir (Jain ve ark., 2010b; Wilczewska ve ark., 2012; Eatemadi ve ark., 2014; Safari ve Zarnegar 2014). Karbon nanotüplerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 12'de özetlenmiştir.

Karbon temelli taşıyıcılara ilacın immobilizasyonu 3 şekilde gerçekleşir;

1. İlacın karbon nanotüpe enkapsülasyonunun sağlanması,
2. Nanotüpler arasındaki alana veya karbon nanotüpün yüzeyine ilacın kimyasal adsorbsiyonunun gerçekleştirilmesi ve
3. Fonksiyonel karbon nanotüpe aktif ajanın eklenmesi ile sağlanır.

Bu metotlar içerisinde ilacın enkapsülasyonunu, ilacın hücreye ulaşması esnasında ilacı degradasyondan koruduğu ve spesifik durumda salınımını sağladığı için daha avantajlıdır (Wilczewska ve ark., 2012; Eatemadi ve ark., 2014; Safari ve Zarnegar 2014).

Karbon nanotüpten ilaç salınımı elektriksel yada kimyasal olarak kontrol edilebilir. İlacın istenmeyen salınımının engellenmesi için karbon nanotüpün açık ucu polipirol film ile kapatılır. Ayrıca folik asit, EGFR gibi spesifik ligandların eklenmesi karbon nanotüplerin seçiciliğinin artmasına neden olur (Wilczewska ve ark., 2012; Eatemadi ve ark., 2014).

Tablo 12. Karbon nanotüplerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar

Avantajları	Dezavantajları
Oldukça küçük boyuta sahiptirler.	Çalışma mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır.
Sıcaklık değişimlerine dirençlidirler.	Oldukça küçük boyuta sahip olduklarından dolayı çalışmak zordur.
	Yeni bir teknoloji olduğu için pahalıdır.

Nanohornlar, karbon nanotüplere benzer özellikte olan tek duvar nanotüpleridir. Oluşum süreçleri metal katalizator gerektirmez ve bu yüzden düşük maliyette ve yüksek saflıkta üretimleri kolaydır. İlacın immobilizasyonu ya ilacın duvar yapısına adsorbsiyonu ile yada ilacın nanohorn ile presipitasyonuna dayanır (Jain ve ark., 2010b; Wilczewska ve ark., 2012).

Karbon maddelerin toksisitesi ise geometrik yapısına bağlıdır ve genellikle çap oranının uzunluğuna ve grafit maddesinin toksik etkisinden kaynaklanabilir. Ayrıca, metal kalıntısı ve amorf karbonlar gibi bazı safsızlıklar hücrelerde ROS seviyesinin artmasına neden olarak oksidatif stresi uyarır. Son çalışmalarda da karbon nanotüpler ile asbestin karsinojenik özellikler açısından benzediği belirtilmiştir (Wilczewska ve ark., 2012).

2.5.3.3. Dendrimerler

Dendrimerler boyutu ve yapısı iyi tanımlanmış eşsiz polimerlerdir. Dendritik yapı glikojen, amilopektin ve proteoglikan gibi tüm biyolojik sistemlerde gözlemlenebilen yapılardan bir tanesidir (Jain ve ark., 2010b; Tripathy ve Das 2013; Kesharwani ve ark., 2014; Safari ve Zarnegar 2014). Dendrimerlerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 13’de özetlenmiştir.

Dendrimerin yapısı linear polimerlerin aksine bir çekirdek, dendron ve yüzey aktif gruplardan oluşur. Tek atom veya moleküllerden oluşan çekirdek yapısına dendronlar bağlanır. Dendronlar (dendrimer kolları) çekirdek ile ilişkili monomer moleküllerdir. Dendrimerlerin biyouyumluluğu ve fizikokimyasal özellikleri ise yüzey fonksiyonel grupları tarafından belirlenir. Çekirdeğin, kullanılan monomerin ve yüzey fonksiyonel grupların seçimi dendrimerlerin medikal uygulamalar için kullanılabilirliğini belirler. Dendrimerin sitotoksitesi çekirdeğin maddesine ve dendrimer yüzeyinin yapısına bağlıdır. Biyolojik aktif bileşikler, dendrimerin içyapısına enkapsüle edilerek ya da kimyasal veya fiziksel olarak dendrimer yüzeyine adsorbe edilerek taşınabilir (Jain ve ark., 2010b; Kakde ve ark., 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Tripathy ve Das 2013; Kesharwani ve ark., 2014; Safari ve Zarnegar 2014).

Tablo 13. Dendrimerlerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar

Avantajları	Dezavantajları
Linear polimer yerine müdahale edilebilir monodispers moleküler yapıya sahiptirler.	Üç boyutlu yapıları ve özellikle kol kısımlarının ikincil yapısal motiflerinin dizaynı tam olarak anlayamamıştır.
Küçük boyutlarından dolayı vücutta sirküle olarak biyolojik bariyerleri aşabilirler.	Parenteral hariç diğer alım yolları için uygun değildir.
Spesifik bölgeye farklı modifikasyonlar ile hedeflenebilirler.	Farklı hücrelerle spesifik olmayan etkileşimlerinden dolayı toksik etki gösterebilirler.
Terminal uç grupları pozitif, negatif ve nötr yüke sahiptir.	

Dendrimerlere ilacın yüklenmesi enkapsülasyon veya kimyasal ekleme ile gerçekleşir. İlaç kararsız, toksik ve zayıf çözünürlüğe sahip ise ilacın enkapsülasyon tercih edilirken kimyasal ekleme ile kovalent bağlar sayesinde ilacın miktarının kontrol edilmesi sağlanır. Her iki metod dendrimer yüzeyini folik asit veya EGFR gibi hedefleme ajanlarının eklenmesi ile güçlendirilebilir. Dendrimerlerin yüzeyine örneğin folik asit, antibodiler, siklik hedefli peptitler, PEG gibi spesifik ligandların eklenmesi dendrimerlerin yüzey aktivitesini ve biyolojik ve fiziksel özelliklerini geliştirmektedir (Wilczewska ve ark., 2012; Tripathy ve Das 2013; Kesharwani ve ark., 2014; Safari ve Zarnegar 2014).

PAMAM biyomedikal uygulamalarda kullanılan bir dendrimerdir. PAMAM dendrimerlere metotreksat, doksorubisin, 5-FU ve ibuprofen, piroksikam veya indometazin gibi anti inflamatuvar ilaçlar yüklendiği bilinmektedir (Sahoo ve ark., 2008; Jain ve ark., 2010b; Wilczewska ve ark., 2012; Kesharwani ve ark., 2014; Safari ve Zarnegar 2014).

2.5.3.4. Polimerik Miseller

E-kaprolakton, poliakrilamid, poliakrilat gibi sentetik polimerlerden veya albümin, DNA, kitosan ve jelatin gibi doğal polimerlerden oluşan 10-100 nm arasında değişen boyuta sahip küresel taşıyıcı sistemlerdir. *In vivo* davranışları temel alındığında, poli (L-Lactid) ve poli glikolit (PGA) gibi biyo bozunur yapıda olan ve poliüretan gibi biyobozunur yapıda olmayan polimerik miseller olarak sınıflandırılırlar (Jones ve Leroux 1999; Jain ve ark., 2010b; Yokoyama 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Safari ve Zarnegar 2014; Cho ve ark., 2015; Luque-Michel ve ark., 2017). Polimerik misellerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 14'de özetlenmiştir.

Polimerik miseller opsonizasyon gibi immunolojik etkileşimleri azaltmak ve yüzey kimyasal grupları ile etkileşimini sağlayan intermoleküler etkileşimler sağlamak için genellikle iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ile kaplanırlar. Polimerik misellere ilaç yüklenmesi ya ilacın miselin yüzeyine hareketsiz olarak polimerizasyon reaksiyonundan sonra eklenmesi ile ya da polimerik misel yapısına ilacın enkapsülasyonu polimerizasyon sürecinde katılması ile sağlanabilir. Polimerik miselden ilacın salınımı desorpsiyon, difüzyon veya hedef dokuda nanopartikül erozyonu ile gerçekleşir (Qureshi ve ark., 2011; Yokoyama 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Safari ve Zarnegar 2014; Cho ve ark., 2015; Luque-Michel ve ark., 2017).

Lipozomlar ile karşılaştırıldığında, polimerik miseller daha küçük boyuta sahip olduklarından dolayı vücutta kısa sirkülasyon zamanına sahiptir. Ancak küçük boyutları sayesinde EPR etkisinden dolayı tümör hücrelerine daha kolay ulaşırlar (Jain ve ark., 2010b).

Tablo 14. Polimerik misellerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar (Yokoyama, 2011)

Avantajları	Dezavantajları
10-100 nm arasında değişen küçük boyuta sahip kararlı yapılarıdır.	Üretiminde polimer sentezi zor bir işlemdir.
Yüksek ilaç yüklenme kapasitesine ve sürdürülebilir ilaç salınımına sahiptirler.	Herhangi bir polimere ilaç inkorporasyonu için geliştirilmiş genel bir üretim yöntemleri yoktur.
Özellikle hidrofobik ilaçlar için yüksek suda çözünürlük sağlarlar.	Geniş endüstriyel çapta üretilemezler.
Düşük toksisite sergilerler.	Düşük metabolik süreçlerinden ve normal ilaçtan daha uzun süre etkili oldukları için toksik yan etkiye neden olabilirler.
Farklı kimyasal modifikasyonlar ile istenilen hücreye hedeflenebilirler.	Sadece bazı polimerik miseller FDA tarafından onaylanmıştır ve bu nedenle klinikte uygulamaları sınırlıdır.
Enkapüle edilen ilacı degradasyondan ve metabolizmadan korunması sağlarlar.	

2.5.3.5. Lipozomlar

İlk taşıyıcı sistem olarak 1965 yılında keşfedilen lipozomlar, fosfolipidler ve steroidlerden (kolesterol gibi) oluşan, çift katmanlı, 80-300 nm arasında boyuta sahip ve küresel yapıda olan nano/mikro partiküler veya kolloidal taşıyıcı sistemlerdir. Lipozomlar, ilaçların çözünülebilirliğini, *in vitro* ve *in vivo* aktivitesini arttırarak ve ilacın zararlı yan etkilerini azaltarak ilacın farmakokinetik özellikleri geliştirirler. Ayrıca, lipozomun çift katmanlı yapısı hem hidrofilik hem de hidrofobik moleküllerin taşınmasını olanak sağlar (Jain ve ark., 2010b; Wilczewska ve ark., 2012; Akbarzadeh ve ark., 2013; Perche ve Torchilin 2013; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

İlacın lipozomdan salınımı lipozomun yapısına, pH, osmotik gradiyente ve çevresine bağlı olarak değişir. Lipozomların hücre ile etkileşimi adsorbsiyon, füzyon, endositozis ve lipid transferi ile gerçekleşir Lipozom formülasyonu olan antikanser ilaçlar, nörotransmitterler (serotonin), antibiyotikler, anti-inflamatuvar, antiheumatic birçok ilaç vardır (Qureshi ve ark., 2011; Akbarzadeh ve ark., 2013).

Ayrıca lipozomların spesifik proteinler, antijenler gibi ligandlar veya diğer biyolojik maddeler ile modifikasyonu yapılarak özel dokuya ilacın seçici bir şekilde hedeflenmesini sağlayan çoklu lipozomlar son zamanlarda dikkat çekmektedir. Katyonik lipozomlar ise gen taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadırlar (Jain ve ark., 2010b; Qureshi ve ark., 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Akbarzadeh ve ark., 2013). Lipozomların sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 15’de özetlenmiştir.

Tablo 15. Lipozomun sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar

Avantajları	Dezavantajları
İlacın biyodağılımında değişiklikler sağlayarak ilacın terapötik etkinliğini artırırlar.	Üretim maliyetleri yüksektir
Enkapsüle ilacın kontrollü ilaç salınımı sağlayarak ilacın kararlılığını artırırlar.	Enkapsüle ilacın yada molekülün dışarı sızmasına yada füzyonuna neden olabilirler.
Biyoyuyumlu, biyobozunur yapıya sahiptirler ve toksik ve immunojen etki göstermezler.	Bazen fosfolipid yapıda oldukları için degradasyona uğrarlar.
Enkapsüle ilacın toksisitesinde azalmaya neden olurlar.	Kimyasal ve fiziksel instabilitesinden dolayı kısa yarı ömre sahiptirler.
Pasif ve aktif hedefleme ile tümör dokusunda hedeflenebilirler.	Düşük çözünürlüğe ve sınırlı enkapsülasyon etkinliğine sahiptirler.
Genel olarak gen taşınmasında ve diagnostik görüntüleme için kullanılırlar.	Sterilizasyon problemleri vardır.

2.5.3.6. Lipid-Temelli Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler

Lipid-temelli nano yapılar vücutta degradasyona neden olan koşullarda, içerdikleri farmasötik ilaçları degradasyondan korudukları ve özellikle suda çözünmeyen ilaçları pasif ve aktif hedefleme ile istenilen bölgeye taşınmasını sağladıkları için uzun yıllardır ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Katı lipid nanopartiküller (KLN), nano-lipid partiküller (NLP) ve lipid-ilac bağlayıcı nanopartiküller ilacı dermal, peroral, parenteral, oküler, pulmoner ve rektal taşıyan, solid lipid matrikse dayanan oda sıcaklığında solid lipid formunda olan taşıyıcı sistemlerdir.

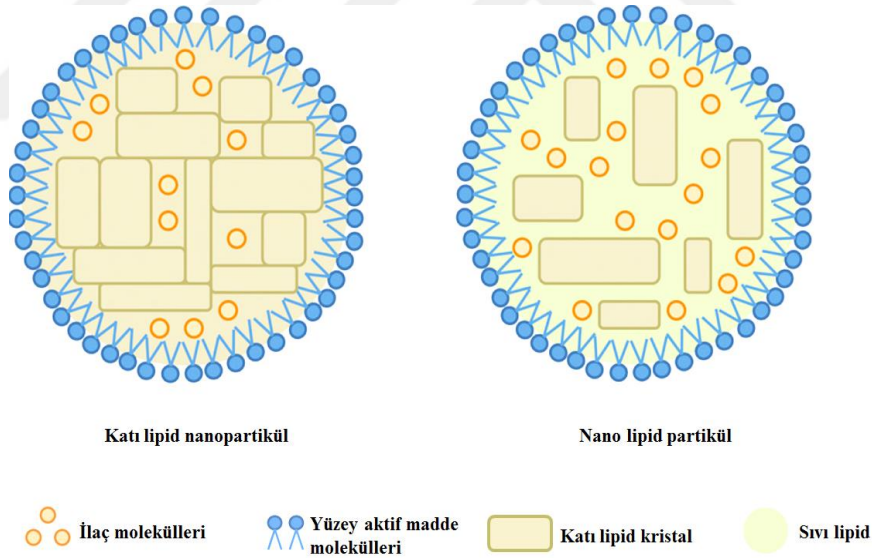
2.5.3.6.1. Katı Lipid Nanopartiküller (KLN)

Katı lipid nanopartiküller (KLN) 50-1000 nm arasında boyuta sahip olan oda sıcaklığında katı lipidden oluşan ve farklı yüzey aktif maddeler ile stabilize edilen partiküllerdir. KLN'lerin avantajları arasında özellikle, küçük boyuta sahip olmaları, hazırlanma aşamasında herhangi bir organik çözücüye ihtiyaç duyulmaması, ilacı degradasyondan koruması ve kontrollü ilaç salınımı sağlamaları sayılabilir. KLN'ler parenteral ilaç alınımını sağlayan partiküler sistemlerdir. Ayrıca kozmetik alanında da uygulamaya sahiptir. Ancak KLN matriksinin kristal yapıya geçme eğiliminden dolayı düşük yükleme kapasitesi, saklama sürecinde enkapsüle ilacın dışarı salınması ve yüksek oranda su içermesi gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Souto ve Müller 2007; Thassu ve ark., 2007; Sahoo ve ark., 2008; Shaji ve Jain 2010; Jain ve ark., 2010b; Kakde ve ark., 2011; Wilczewska ve ark., 2012; Estanqueiro ve ark., 2015; Naseri ve ark., 2015; Attama ve Umeyor 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.3.6.2. Nano Lipid Partiküller

KLN ve lipid- ilaç bağlayıcı nanopartiküllerin sahip olduğu bazı dezavantajların ortadan kaldırılması amacı ile ikinci jenerasyon olarak katı ile sıvı lipidlerin

karıştırılması ile oluşan nano lipid partiküller (NLP) geliştirilmiştir. KLN'ler ile karşılaştırıldığında, aktif etkin madde için gerekli alanın oluşmasını sağlayan, eşsiz matriks yapısına sahip ve bu nedenle yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip ve ilacın saklama sırasınca salınımı engelleyen yapılardır (Şekil 23). Farklı yöntemler ile üretilebilirler ancak NLP'nin elde edilmesinde en iyi yöntem yüksek basınçlı homojenizasyondur. Genel olarak NLP'lerin 3 farklı tipi bulunmaktadır: hatalı/kusurlu tip (matriks nanoyapıda genel hatalar enkapsüle edilecek moleküller için boş alanların oluşmasını sağlar), çoklu tip (ilaç yağda çözünür ve etrafını saran solid lipid ilacın degradasyonu korur) ve amorf tip (kristallenmesinin neden olduğu ilaç atılımını/salınımı engeller). Antifungal ve steroid olmayan anti-enflamatuar ajanların topikal taşınmasında kullanılırlar. Ayrıca kozmetik alanda dermal uygulamalar için de kullanılmaktadır (Souto ve Müller 2007; Üner ve Yener 2007; Mukherjee ve ark., 2009; Jain ve ark., 2010b; Wilczewska ve ark., 2012; Estanqueiro ve ark., 2015; Naseri ve ark., 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).



Şekil 23. KLN ve NLP morfolojik yapılarının karşılaştırılması (Yingchoncharoen ve ark., 2016)

2.5.3.6.3. Lipid- İlaç Bağlayıcı Nanopartiküller

KLN'nin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla, özellikle hidrofilik ilaçların taşınmasını için geliştirilen ve %33-%85 arasında ilaç yükleme kapasitesine sahip nanopartiküllerdir. Ancak, Mehnert ve ark. lipid yapısının nanopartiküle bağlı olduğunu ve KLN ve diğer lipid temelli nanopartiküller taşıyıcılar diğer geleneksel

nanoemülsiyonlar ile karşılaştırıldığında inkorporasyon oranı açısından herhangi bir avantaja sahip olmadığını belirtmişlerdir (Mukherjee ve ark., 2009; Jain ve ark., 2010b; Chimmiri ve ark., 2012; Wilczewska ve ark., 2012; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.3.6.4. Nanoemülsiyonlar

Nanoemülsiyonlar ortalama 50-1000 nm arasında değişen damla çapına sahip, nanoboyutta bir sıvının diğer sıvı içerisinde disperse olması ile oluşan su içinde yağ emülsiyonları olarak tanımlanabilir. Genellikle, ortalama bir damlanın boyutu 100-500 nm arasındadır. Nanoemülsiyonlar, büyük ölçekli emülsiyonlara göre saydam veya yarı saydam yapıda, krem olmadan önce zamanı arttırmak için stabil kalabilen ve küçük boyutlarından dolayı geniş yüzey alanına sahip olan emülsiyon sistemlerdir (Jain ve ark., 2010b).

2.5.3.6.5. Lipid Nanokapsüller

Bu sistemler lipozomlar ile nanoemülsiyon partiküller arasında bir geçiş olarak düşünülmektedir. Lipid nanokapsüllerin dış duvarı geleneksel nanoemülsiyon partiküllerine göre daha incedir bu daha fazla kontrollü ilaç salınımı yapmasını sağlar. Lipid nanokapsüller hidrofilik ve lipofilik yüzey aktif madde ile çevrili yağsı bir çekirdek içeren sıvı yapılardır. Farklı antikanser ilaçları, terapötik moleküller ve farklı antibodiler ile konjuge edilmesi sonucu kan-beyin bariyerini geçebilen radyonüklidlerin taşınmasında kullanılmaktadır. Nanokapsüllerin yapısı, sert ve gergin aktif membran tarafından yağsı çekirdek yapılarının çevrelenmesinden dolayı polimerik nanokapsüller ile lipozomlar arasında hibrit bir yapıdır ve bu nedenle lipoprotein benzeri bir yapıya sahiptirler. Boyutları 100 nm'nin altında ayarlanabilir (Jain ve ark., 2010b; Wilczewska ve ark., 2012).

2.5.4. Katı Lipid Nanopartiküller

Katı lipid nanopartiküller (KLN) lipozomlara, emülsiyonlara ve polimerik nanopartiküllere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak geliştirilen, 50-1000 nm arasında boyuta sahip, oda sıcaklığında katı lipid ve yüzey aktif maddeden oluşan, küresel yapıda potansiyel terapötik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Katı lipid dispers faz olarak kullanılırken, yüzey aktif maddeler ise emülgatör olarak kullanılırlar. KLN'nin oluşumunda yer alan lipidler %0.1 ile % 30 arasında sulu ortamda disperse olan ve

genellikle yüksek derecede pürifiye yapıda olan yağ asitleri, steroidler ve kompleks gliserit karışımlarından (monogliseritler, digliseritler ve trigliseritler) oluşmaktadır. Yüzey aktif maddeler ise %0.5 ile %5 arası konsantrasyonda KLN'nin kararlı yapısını arttırmak için kullanılmaktadır. Bu nedenle, lipid ve yüzey aktif maddenin doğru seçimi KLN'nin fizokimyasal özelliklerini, partikül boyutu, yüzey özellikleri, saklama sürecinde formülasyonun kararlılığını ve ilaç yükleme kapasitesi gibi özellikleri belirlemektedir. KLN'lerin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar Tablo 16'da özetlenmiştir. Üretilme yönteminin seçimine bağlı olarak, KLN'ler hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçlar için kullanılabilir. Lipozomlar ile karşılaştırıldığında, ilaç stabilitesi, uzatılmış ilaç salınımı ve üretiminde organik çözücüler kullanılmadığı için polimerik taşıyıcılardan daha güvenli nanopartiküllerdir. Endüstriyel çapta üretimlerinde herhangi bir problem yoktur. Ancak katı lipidin kristal yapısından kaynaklanan tahmin edilemeyen katılaşma eğilimleri ve düşük enkapsülasyon yetenekleri bilinen dezavantajlarıdır (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Mäder ve Mehnert 2005; Numanoglu ve Tarımcı 2006; Mukherjee ve ark., 2009; Kathe ve ark., 2014; Svilenov ve Tzachev 2014).

Tablo 16. KLN'nin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar (Mehnert ve Mäder 2001)

Avantajları	Dezavantajları
Uzun süre kararlı yapıda, kontrollü ilaç salınımı sağlayan ve aktif ve pasif hedefleme ile istenilen dokuya hedeflenebilirler.	Özellikle hidrofilik ilaçlar için düşük yükleme kapasiteleri vardır.
İlaç ya da bileşiğin toksik ve akut etkisini azaltırlar.	Saklama süresince ilacın degradasyonuna neden olabilirler.
Enkapsüle edilen ilacın veya bileşiğin biyoyararlanımını arttırlar.	Yüksek su içeriğine sahiptirler.
Enkapsüle ilacı kimyasal bozunmadan korurlar.	
Geniş çapta üretimleri kolaydır	Bazen enkapsüle ettikleri ilacın patlama salınımını yapmasına neden olurlar.

KLN'ler farklı özelliklerinden dolayı ilacın parenteral, dermal, pulmoner ve topikal taşınmasında kullanılmaktadır. KLN'ler ile taşıdıkları anti-kanser ilaçların toksik yan etkisinin azalttıkları ve böylece tedavinin etkisinin artması sağladıkları için potansiyel terapötik sistemler olarak görülmektedir. Ayrıca, gen transferinde, kozmetik ve yiyecek endüstrisinde potansiyel kullanıma sahiptirler. Ancak, KLN'ler ile ilişkili bahsedilen dezavantajlar ve sınırlamalardan dolayı, KLN'ler ile ilişkili ürün sayısı oldukça sınırlıdır (Müller ve ark., 2000; Wolfgang ve Mäder 2001; Numanoglu ve Tarımcı 2006; Üner ve Yener 2007; Kathe ve ark., 2014).

2.5.4.1. KLN'lerin Üretim Yöntemleri

KLN'lerin üretilmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; yüksek basınçlı homojenizasyon, çözücü emülsifikasyon-evaporasyon, süperkritik akışkan, mikroemülsiyon, yüksek hızda homojenizasyon veya ultrasonikasyon ve püskürterek kurutma yöntemleri ile KLN'ler üretilmektedir (Şekil 24).



Şekil 24. KLN'nin üretim yöntemlerinin çeşitleri.

2.5.4.1.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon

Yüksek Basınçlı Homojenizasyon (YBH) teknolojisi KLN'nin üretiminde kullanılan temel yöntemlerden biridir. Diğer yöntemlerin aksine, YBH KLN'in geniş çapta üretilmesine olanak sağlar. YBH yöntemi ise sıcak ve soğuk homojenizasyon olmak üzere 2 farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de öncelikle farmasötik bileşiklerin yağda çözünmesi veya disperse olması sağlanır. Yüksek basınç (100-2000 bar) homojenizatördeki sıvının dar boşluğa hareketini sağlar. Ortalama partikül boyutu sub-mikron boyuttadır. Homojenizasyon ile geniş çapta üretimin sağlanması, organik çözücü kullanılmadan KLN üretilmesi, ürün stabilitesinin artmasında ve yüklenen ilacın KLN'ye enkapsülasyonunun artmasında rol alır. Ancak, spesifik yüksek basınç ve sıcaklık koşulları bu uygulamada bazı kısıtlamalara neden olmaktadır (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Mäder ve Mehnert 2005; Numanoglu ve Tarımcı 2006; Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Naseri ve ark., 2015; Attama ve Umeyor 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.4.1.1.1. Sıcak Homojenizasyon

Sıcak homojenizasyonda, homojenizasyon lipidin erime noktasının üstündeki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Eriyen lipide yüklenmek istenen ilaç, sıcak ve sulu ortama yüzey aktif maddenin de eklenmesi ile ultraturaks aracılığıyla disperse edilir ve böylece ön-emülsiyon elde edilir. Elde edilen ön emülsiyonun homojenizatörden geçirildikten sonra oda sıcaklığında soğuması sağlanarak KLN elde edilir. Yüksek sıcaklıkta azalan vizkoziteden dolayı, partikül boyutu daha küçük olur. Ancak, ilacın sıcaklık-bağımlı degradasyonu, homojenizasyon süresince sulu faza ilacın penetrasyonu ve elde edilen nanoemülsiyonun kristallenme aşaması temel karşılaşılan problemlerdir.

Lipid fazın düşük vizkozitesinden dolayı yüksek sıcaklıkta küçük boyutta nanopartiküllerin elde edilmesini sağlar. Ancak, yüksek sıcaklık taşıyıcının ve ilacın degradasyonuna neden olabilir. Genel olarak 3-5 homojenizasyon siklusu 500-1500 barda yapılır (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Mäder ve Mehnert 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Naseri ve ark., 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.4.1.1.2. Soğuk Homojenizasyon

Soğuk homojenizasyon sıcak homojenizasyonda karşılaşılan problemlerin çözülmesi amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. Sıcak homojenizasyon yönteminde uygulandığı gibi soğuk homojenizasyonda da öncelikle ilacın eriyen lipid içerisinde çözünmesi sağlanır ancak daha sonra hızlıca kuru buz veya sıvı nitrojende soğutulur böylece katı lipid mikropartiküller elde edilir. Elde edilen mikropartiküllerin yüzey aktif madde çözeltisinde disperse edilerek oda sıcaklığında homojenizasyonu sağlanır. Soğuk homojenizasyon ile elde edilen ön-süspansiyonunda ortalama nanopartiküllerin boyutu 50-100 nm arasındadır. Ancak sıcak homojenizasyon ile karşılaştırıldığında, daha büyük partikül boyutu ve daha dar boyut dağılımına sahiptir (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Mäder ve Mehnert 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Naseri ve ark., 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.4.1.2. Mikroemülsiyon Yöntemi

KLN üretiminde mikroemülsiyon yönteminin kullanımı ilk olarak Gasco ve ark. tarafından tanımlanmıştır (1993). Oda sıcaklığında katı durumda lipid ile mikroemülsiyon elde etmek için süreç sıcaklığı lipidin erime sıcaklığının yukarısında olmalıdır. Lipidler (yağ asitleri ve/veya trigliserit) eridikten sonra su, emülgatör ve yardımcı emülgatör lipidin olduğu sıcaklığa ısıtılarak karışım haline getirilir ve ılık sıcaklıkta karıştırılır ve şeffaf termodinamik olarak stabil kompleks elde edilir. Emülgatör olarak en yaygın polisorbata 20, 60 ve lesitin kullanılır. Yardımcı emülgatör olarak genellikle alkol kullanılır. Teknik olarak, lipid partiküllerinin suda presipitasyonu kompleksin dilüsyonu ile eşittir ve bu nedenle KLN dispersiyonunda katı maddenin azalmasına yol açar. Dilüsyon sürecinden dolayı, ulaşılabilir lipid içeriği yüksek basınçlı homojenizasyon ile elde edilen formülasyondan daha düşüktür (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Mäder ve Mehnert 2005; Numanoglu ve Tarımcı 2006; Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Attama ve Umeyor 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Şeffaf karışım (lipid, emülgatör, yardımcı emülgatör ve su) genellikle 65-70°C'de elde edilir. Sıcak mikroemülsiyon soğuk su ile disperse edilir ve sıcak mikroemülsiyon ile soğuk su oranı genellikle 1:25 ile 1:50 oranındadır. Dilüsyon süreci mikroemülsiyonun bileşimi tarafından belirlenir (Mukherjee ve ark., 2009).

2.5.4.1.3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon Yöntemi

Çözücü emülsifikasyon- evaporasyon yönteminde, lipidin ve hidrofobik etkin maddelerin su ile karışmayan organik çözücüde (tolüen, kloroform vb.) çözünmesi sağlanır, böylece sulu fazda yüzey aktif madde içeren emülsiyon elde edilir. Elde edilen emülsiyondan çözücünün uzaklaştırılması için ise azalan basınçta evaporasyon kullanılır. Evaporasyon, nanopartiküllerin sulu fazda disperse olmasını sağlar. Bu yöntemin en önemli avantajı KLN üretilmesinde ısı uygulamasına gerek duyulmamasıdır ve bu nedenle yüksek sıcaklıkta bozulan etkin maddeler için uygun bir yöntemdir. Ayrıca, soğuk homojenizasyonun aksine, bu yöntemde herhangi bir termal stres yoktur ancak organik çözücü kullanılması gereklidir. Elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu, kullanılan katı lipide ve yüzey aktif maddeye göre değişmektedir (Mäder ve Mehnert 2005; Numanoglu ve Tarımcı 2006; Mukherjee ve

ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Naseri ve ark., 2015; Attama ve Umeyor 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.4.1.4. Süperkritik Akışkan Yöntemi

Süperkritik akışkan yöntemi KLN'lerin üretilmesi için kullanılan oldukça yeni bir yöntemdir. Bu yöntemde karbon dioksit (CO₂) gibi süperkritik sıvı kullanılarak lipid/su emülsiyonundan çözücünün ekstrakte edilmesi sağlanır. Bu yöntemin en önemli avantajları, KLN üretiminde herhangi bir çözücünün kullanılmaması ve elde edilen nanopartiküllerin diğer yöntemlerde elde edilen nanosüspansiyon yerine kuru toz halinde olmasıdır. CO₂ süperkritik sıvı olarak iyi bir seçenek olmasına rağmen, çoğu ilacın CO₂'de çözünmemesi bu yöntemi kısıtlamaktadır (Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Naseri ve ark., 2015).

2.5.4.1.5. Yüksek Hızda Homojenizasyon veya Ultrasonikasyon

Yüksek hızda homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemleri genel olarak her laboratuvarında kullanılabilen ve uygulaması kolay olan genel yöntemlerdir. KLN üretiminde kullanılan yüzey aktif madde sayesinde lipid sulu fazda disperse edilir ancak yüksek hızda homojenizasyon yönteminde aşırı miktarda yüzey aktif madde kullanımı büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bu yöntemin diğer dezavantajı ise elde edilen partiküllerin boyutunun mikrometre boyutuna kadar değişen çok geniş bir boyuta sahip olmasıdır ve bu nedenle saklama esnasında instabiliteye neden olur. Ultrasonikasyon yönteminin dezavantajı ise metal kontaminasyonu ve fiziksel instabiliteye neden olmasıdır. Daha kararlı yapıda KLN üretilmesi için her iki yöntemin bir arada kullanılması önerilmektedir (Numanoglu ve Tarımcı 2006; Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Naseri ve ark., 2015).

2.5.4.1.6. Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma yöntemi liyofilizasyon yönteminin yerine geliştirilen ve sulu fazda farmesötik bileşiklerin KLN dispersiyonlarının elde edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Püskürterek kurutma, liyofilizasyona göre daha ucuz bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntemde kullanılan yüksek sıcaklık ve yöntemin çalkalama gücü partiküllerin

agregasyonuna neden olur (Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2010; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014; Naseri ve ark., 2015; Attama ve Umeyor 2015).

2.5.4.2. KLN'nin Karakterizasyonun Gerçekleştirilmesi

KLN'in karakterizasyonunun gerçekleştirilmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak partiküllerin koloidal boyutu ve taşıyıcı sistemlerin dinamik ve karmaşık yapısından dolayı bazı problemlere yol açmaktadır. Ancak bu yöntemler içerisinde nanopartiküllerin karakterizasyonunu tek başına belirleyebilen tek bir yöntem yoktur. Bu nedenle, üretilen formülasyonun hakkında gerekli bilginin elde edilmesi, zaman ve analizin maliyet gibi sınırlamalarının dengelenmesi için nanopartiküllerin karakterizasyonunda farklı yöntemler seçilmektedir (Nekkanti ve ark., 2012). Genel olarak, partikül boyutu, zeta potansiyel, kristallenme derecesi, lipid modifikasyonu, *in vitro* ilaç salınımı, yüzey morfolojisi ve ilaç içeriğinin ve dağılım sürecinde zaman skalasıdır.

2.5.4.2.1. Partikül Boyutu

Nanopartiküllerin en önemli karakteristik özelliği partikül boyutu ve boyut dağılımlarıdır. Çünkü partiküllerin stabilitesi, *in vivo* dağılımı, toksisitesi, hedeflenme yetenekleri, ilaç yükleme kapasiteleri, ilaç salınım özelliklerinde doğrudan etkilidir.

Nanopartiküller mikropartiküllerden daha küçük boyuta sahip oldukları için daha fazla hücreye nüfuz edebilirler ve hücresel ve intraselüler hedefler için geniş aralıkta kullanım fırsatı sunarlar. Küçük partiküller daha büyük yüzey alanına sahip oldukları için daha hızlı ilaç salınımı sağlarlar. Ancak, daha büyük partiküller her bir partiküle daha fazla ilaç kapsüle ettikleri için daha yavaş ilaç salınımı sağlar. Bu nedenle, nanopartiküllerin ilaç salınım hızları boyutlarının ayarlanması ile sağlanabilir (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Bunjes 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Svilenov ve Tzachev 2014).

Partikül boyut dağılımının ölçülmesinde foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırınımı (LD) ve coulter counter yöntemi kullanılmaktadır. Ancak, coulter counter yöntemi ile küçük boyuta sahip nanopartiküllerin değerlendirilmesindeki zorluklar nedeniyle, KLN'lerin partikül büyüklüğü ölçümünde nadiren kullanılmaktadır. PCS özellikle 1 nm ile 3 mikrometre arasında nanopartiküllerin ölçülmesinde iyi bir teknik

olmasına rağmen, LD metodu ile 1 nm ile 1000 mikrometre arasında boyutta çalışma imkanı sunar. Bu nedenle LD metodu PCS'den daha etkili ve kullanışlı bir yöntemdir (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Bunjes 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Kathe ve ark., 2014; Svilenov ve Tzachev 2014).

➤ **Spektroskopi**

Nanosüspansiyonlar genellikle submikron partiküllerden oluştuğu için, partikül boyutunun dağılımını belirlemek amacıyla kullanılan en uygun teknik foton korelasyon spektroskopisidir (PCS). Foton korelasyon spektroskopisi olarak da bilinen dinamik ışık saçılması disperse olan medyumda (su gibi) düşük vizkositede difüze olan partiküllerden saçılan lazer ışığının zamanla değişiminin ölçülmesidir. PCS saçılan ışığın toplam yoğunluktan daha ziyade saçılan ışığın hızındaki dalgalanmaları analiz etmektedir. Elde edilen verilere Stokes-Einstein denklemi uygulanarak ortalama partikül boyutu hesaplanır (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Bunjes 2005; Nekkanti ve ark., 2012).

Ayrıca, nanopartiküllerin parçacık büyüklüğü dağılımı olarak bilinen polidisperslik indisi (PDI) değeri 0 ise üretilen nanopartiküllerin monodispers yapıya sahip olduğu, 0.10-0.20 arasında değere sahip ise dar dağılıma sahip olduğu ve 0.5'den büyük değere sahip ise nanopartiküllerin çok geniş dağılıma (polidispers) sahip olduğunu göstermektedir (Mukherjee ve ark., 2009; Svilenov ve Tzachev 2014).

➤ **Lazer difraktometre**

Lazer difraktometre (LD) 1980'ler civarında geliştirilen ve birçok laboratuvarında rutin olarak kullanılan oldukça hızlı bir cihazdır. LD, PCS tarafından mümkün olmayan mikropartiküllerin miktarının belirlenmesinde de kullanılır. LD, lazer ışını ile nanopartiküller tarafından üretilen fraunhofer kırınımını analiz eder. 6.3 µm'den küçük boyuta sahip partiküller için Mie teorisi doğru partikül dağılımının elde edilmesinde kullanılır. Ancak, Mie teorisi partiküllerin gerçek refraktif indisi ve partiküllerin görüntülenme refraktif indisi hakkında bilgi edinilmesini gerektirir. Ancak, çoğu farmasötik maddelerin refraktif indisi bilinmemektedir. Ancak, LD basit bir teknik olduğu için nanosüspansiyonların karakterizasyonu için tercih edilen bir yöntemdir (Müller ve ark., 2000; Mehnert ve Mäder 2001; Bunjes 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Nekkanti ve ark., 2012).

2.5.4.2.2. Zeta Potansiyel

Zeta potansiyel (ZP) kolloidal süspansiyon veya emülsiyonun kararlılığının kontrolünde ve tahmin edilmesinde kullanılan ve partiküller arasında elektrostatik itme veya çekim gücünün ölçülmesine dayanarak partikül yüzey yükünün belirlenmesinde önemli bir parametredir. Nanopartiküllerin yüzey yükünün yani ZP'nin ölçülmesi, KLN'nin saklama süresince kararlılık ve agregasyon durumu ve yüzey morfolojisi ile ilgili değişimlerin belirlenmesinde rol alır. Bu nedenle, ZP genellikle ürün kararlılık ve yüzey adsorbsiyon çalışmalarında kullanılır. Eğer nanopartiküller sistemler yüksek yüzey yüküne sahip ise, yüksek ZP değeri ölçülür. Ancak, düşük ZP değeri ölçülürse, bu değer partiküllerin elektriksel itme güçleri azaldığı için agregasyon oluşturduğunu göstermektedir (Müller ve ark., 2000; Bunjes 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Parhi ve Suresh 2012; Kathe ve ark., 2014; Svilenov ve Tzachev 2014).

Genel olarak, nanopartiküller ZP değeri -60 mV'dan az ise mükemmel, -30 mV'dan az ise iyi elektrostatik kararlılığa sahiptir. Yüksek ZP değerine sahip partiküller arasında itme gücü yüksek olduğu için doğal agregasyon oluşumu eğilimi ortadan kalkar ve böylece daha kararlı bir yapı oluştururlar. -5 ile -15 mV arasında ZP değerine sahip nanopartiküller sınırlı topaklanma bölgesinde iken, -5 ile 3 mV arasında ZP değerine sahip nanopartiküller maksimum agregasyon oluşturma eğilimine sahiptir. Ayrıca, kolloidal sistemler içerisinde sterik stabilizatör içerenler ZP değerleri 0 mV olmasına rağmen uzun süre kararlılık göstermektedir. Partikül boyutu, şekli, moleküler ağırlığı, pH, yüzey aktif maddeler, su safsızlıkları ve suyun iletkenliği ZP değerini etkileyen çeşitli faktörlerdir (Garud ve ark., 2012; Parhi ve Suresh 2012; Svilenov ve Tzachev 2014).

2.5.4.2.3. İlaç Yükleme ve Enkapsülasyon Etkinliği

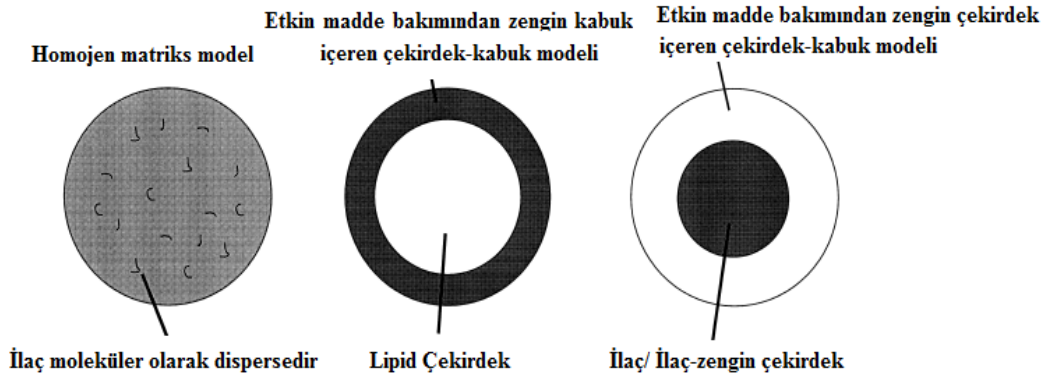
İlaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliği başarılı nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin etkinliğinin belirlenmesinde ve hazırlama sürecinin optimize edilmesinde rol alan temel parametrelerdir. İlaç yükleme, nanopartikülün toplam bileşimi içerisinde ilaç miktarının oranıdır. Enkapsülasyon etkinliği ise nanopartikülün çekirdek kısmına hapsedilen ilacın miktarıdır. KLN'ye ilacın yükleme ve enkapsülasyon etkinliğini ilacın matrikste çözünübilirliğine, moleküler ağırlığına ve ilaç ile matriks arasında etkileşime, lipidin polimorfik formuna (α ve β formu) ve katı lipid matriksin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle KLN'ye etkili ilaç yüklenmesin ilaç

molekülünün özelliği ile ilişkilidir. KLN'ler genel olarak seçilen ilacın hidrofilik veya hidrofobik özellikte olmasına bağlı olarak değişen ilaç yükleme kapasitesine sahiptir. Ancak yüklenecek etkin maddenin özelliğine göre katı lipid matriksin lipid fazının seçimi ile yüksek ilaç yükleme kapasitesine ulaşılabilir. Ayrıca, enkapsülasyon etkinliği KLN'nin katı lipid çekirdek yapısından dolayı geliştirilebilir. KLN'nin ilaç yükleme kapasitesi ve serbest ve enkapsüle olan ilacın miktarı UV spektroskopi veya HPLC ile analiz edilebilir. Daha hızlı ve kolay bir yöntem olduğu için UV spektroskopi tercih edilmektedir (Müller ve ark., 2000; Judefind ve M. de Villiers 2009; Parhi ve Suresh 2010; Parhi ve Suresh 2012; Kathe ve ark., 2014; Svilenov ve Tzachev 2014; Attama ve Umeyor 2015; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

2.5.4.2.4. İlaç Salınımı

KLN'nin ilaç salınımı, KLN'nin hazırlanma yöntemine, ilacın çözünürlüğüne ve ilaç/lipid oranına bağlı olarak gerçekleşir. İlaç KLN'nin genel olarak kor kısmına, kabuk kısmına veya matriks boyunca moleküler olarak dağılarak yüklenir. KLN'ye ilacın inkorporasyonunu tanımlayan temel üç model vardır (Müller ve ark., 2000; Numanoglu ve Tarımcı 2006; Souto ve Müller 2007; Parhi ve Suresh 2010; Abbasalipourkabir 2011; Naseri ve ark., 2015).

1. Homojen matriks model (Katı çözelti modeli)
2. Etkin madde bakımından zengin kabuk içeren çekirdek-kabuk modeli
3. Etkin madde bakımından zengin çekirdek içeren çekirdek-kabuk modeli (Şekil 25).



Şekil 25. İlaç salınım modelleri (Müller ve ark., 2000)

Homojen matriks modelinde, genellikle soğuk veya sıcak homojenizasyon veya etkin maddenin çözünmesi için yüzey aktif madde kullanımı olmayan üretim yöntemleri ile elde edilen KLN'e yüksek derecede hidrofobik ilaçların yüklenmesi sonucu ilaç amorf şekilde veya moleküler olarak disperse olmuş şekilde bulunur. Bu model özellikle soğuk homojenizasyonda etkin maddenin eriyen lipidde disperse olmasından sonra yüksek basınçlı homojenizasyonun mekanik gücü sonucunda nanopartikülün moleküler formunda kırılmalar meydana gelir ve böylece homojen matriks model oluşur (Numanoglu ve Tarımcı 2006; Parhi ve Suresh 2010; Singhal ve ark., 2011).

Etkin madde bakımından zengin kabuk içeren çekirdek-kabuk modelinde, KLN üretim sürecinde etkin madde sulu faza dahil edilir ve soğumasından sonra ilk olarak lipid presipite edilir. Böylece faz ayrımından dolayı etkin maddece serbest lipid çekirdek oluşur. Bu nedenle etkin maddenin kalan sıvı-lipid faza tekrardan katılımı ile etkin madde konsantrasyonu kabuk kısmının dışında yavaşça artarak etkin madde bakımından zengin kabuk oluşmasına neden olur. Su fazına geçen etkin maddenin miktarı etkin maddenin sulu fazda çözünürlüğü artıkça artmaktadır. Su fazında sıcaklığın artışı ve artan yüzey aktif madde konsantrasyonu nedeniyle etkin maddenin su fazındaki çözünürlüğü sürekli azalır. Bu da, etkin maddenin lipid faza geri dönmesine (repartisyonuna) neden olur ve böylece etkin madde bakımından zengin kabuk içeren çekirdek-kabuk modeli oluşur. Bu modelde, çoğu ilaç kabuğun dışında mevcut olduğundan dolayı ilaç bir patlama etkisi ile salınır (Numanoglu ve Tarımcı 2006; Souto ve Müller 2007; Parhi ve Suresh 2010; Singhal ve ark., 2011).

Etkin madde bakımından zengin çekirdek içeren çekirdek-kabuk modelinde ise eğer ilaç eriyen lipidde veya doyumluk çözünürlüğüne yakın bir şekilde eridiği zaman etkin madde bakımından zengin çekirdek içeren model elde edilmektedir. Bu modelde, sıcak homojenizasyon ile elde edilen nanoemülsiyon soğutulurken eriyen lipidde etkin maddenin yüksek derece doyumluğuna ve lipid presipitasyonundan önce etkin madde presipitasyonuna neden olmaktadır. Daha fazla soğutma sonucunda etkin madde bakımından zengin çekirdeği bir membran gibi çevreleyen lipid rekristalize olmaktadır ve böylece artan difüzyonel mesafe ve çevreleyen katı lipid kabuk nedeniyle etkin maddenin sürekli salınımı gerçekleşir (Numanoglu ve Tarımcı 2006; Parhi ve Suresh 2010; Singhal ve ark., 2011).

İlacın KLN'de yerleşimi, ilacın in vitro ve in vivo degradesyondan korunmasında ve ilacın kimyasal kararlılığında etkilidir. KLN'den ilaç salınımı partikül boyutuna, partikül şekline, lipid matrikse, yüzey aktif madde konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır. Genel olarak, KLN sahip oldukları küçük boyuttan ve küresel şeklinden dolayı uzun süre kontrollü ilaç salınımı sağlamaktadır. İlaç salınımı çalışmaları genellikle UV-Visible spektrofotometre veya HPLC ile gerçekleştirilir (Müller ve ark., 2000; Mukherjee ve ark., 2009).

2.5.4.2.5. Yüzey Morfolojisi

Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin partikül boyutlarının ve yüzey morfolojilerinin belirlenmesinde mikroskop temelli yöntemlerden faydalanılmaktadır. Mikroskop temelli yöntem içerisinde optikal ışık mikroskop, taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirmeli elektron mikroskobu (TEM), ve atomik kuvve/güç mikroskoptan (AFM) faydalanılmaktadır. Kullanılacak mikroskop çalışılan partikülün boyutundaki değişimlere, mikroskobun ihtiyaç duyulan magnifikasyon ve rezolüsyon özelliklerine göre seçilmektedir. Ayrıca, gerçekleştirilecek analizin maliyeti, preparat hazırlama süreci ve görüntü analizini etkilemektedir. En uygun maliyete sahip ve kolayca uygulanabilir yöntem optik mikroskoptur ancak sınırlı magnifikasyona ve rezolüsyona sahiptir. Nanopartiküllerin yüzeyi SEM ile karakterize edilebilir çünkü SEM nanopartiküllerin yüzeyinden saçılan elektronları analiz etmektedir. Nanopartiküllerin iç katmanları ise, TEM ile analiz edilebilir. Bu yöntemler örneğin ısıtılması ve preparat hazırlamadaki zorluklardan dolayı bazı dezavantajlara sahiptir (Müller ve ark., 2000; Bunjes 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Nekkanti ve ark., 2012; Kathe ve ark., 2014; Svilenov ve Tzachev 2014).

2.5.4.2.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) nanopartiküllerin camlaşma sıcaklığının, erime noktasının ve ilişkili entalpi değerinin ölçülmesi ile kristallenme derecesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, koloidal dispersiyonlarda lipid ve yüzey aktif madde gibi bileşenler arasında etkileşimlerin belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntem, X-ışını denilen ultraviyole ışıktan daha kuvvetli fakat Gamma ışınından daha zayıf enerjili ışın kullanan X ışını toz diferaksiyonu (XRPD) ile birlikte KLN'nin

matriks yapısında çoklu fazların ve lipid ile ilacın etkileşiminin belirlenmesinde kullanılır. X-Işınları Difraksiyonu (XRD) KLN yapısındaki lipide meydana gelen boşlukların ölçülmesi ve özellikle etkin madde içeriğinin lipidin kristal özelliğine etkisinin belirlenmesinde rol alır. Bu yöntemin avantajı KLN üretildikten sonra örnekler örneğin herhangi bir çözücü eklenmeden kimyasal çevrede neden olan değişimler olmaksızın kendi yapısında ölçüm alınmasını sağlar. Ancak hassasiyet eksikliği ve uzun ölçüm zamanı XRD yönteminin dezavantajıdır (Müller ve ark., 2000; Bunjes 2005; Mukherjee ve ark., 2009; Garud ve ark., 2012; Nekkanti ve ark., 2012; Svilenov ve Tzachev 2014).

2.5.4.2.7. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

NMR diğer analitik teknikler ile karşılaştırıldığında özellikle hassas partiküler sistemlerin karakterizasyonu için uzun süreli çalışma imkanı sunan, homojen olmayan bir komplekste her bir bileşenin moleküler değişkenliği, partikülün matriksindeki faz geçişleri ve kimyasal yapısı hakkında bilgi sağlayan ve herhangi bir örnek hazırlama prosedürü içermeyen bir yöntemdir. Ayrıca, nanopartikül içerisinde bulunan etkin maddenin fizikokimyasal durumu hakkında bilgi edinilmesini sağlar (Müller ve ark., 2000; Mukherjee ve ark., 2009; Zhang ve Yan 2010; Garud ve ark., 2012; Tataurova 2014; Sarker ve ark., 2015).

2.5.4.2.8. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi

FT-IR spektroskopisi genellikle nanopartiküller geniş yüzey alanına sahip olduğu için nanopartiküllerin yüzey adsorban yapısı, nanopartiküllerin bileşenleri (lipid, yüzey aktif madde ve etkin madde) arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi ve nanopartiküle bağlanan fonksiyonel grupların tanımlanmasında kullanılan yöntemlerden biridir. Ayrıca maddenin sıvı fazdan katı faza geçişinde meydana gelen değişimler FT-IR ile analiz edilebilir. Örneğin, maddenin sıvı fazdan katı faza geçerken maddeye ait bandın genişliğinde azalış maddenin kristallenmedeki artışını göstermektedir. Oldukça kolay ve kısa zamanda uygulanan bir yöntemdir. Ancak analizin çevresel koşullardan etkilenmesi, elde edile spektrumun yorumlanması ve su içeriği fazla olan maddelerin analizinde spesifik dalga boyunda bandlardaki değişimlere nedeniyle bazı sınırlamalara sahiptir (Zhang ve Yan 2010; Radu ve ark., 2012).

2.5.4.2.9. Yüzey özellikleri

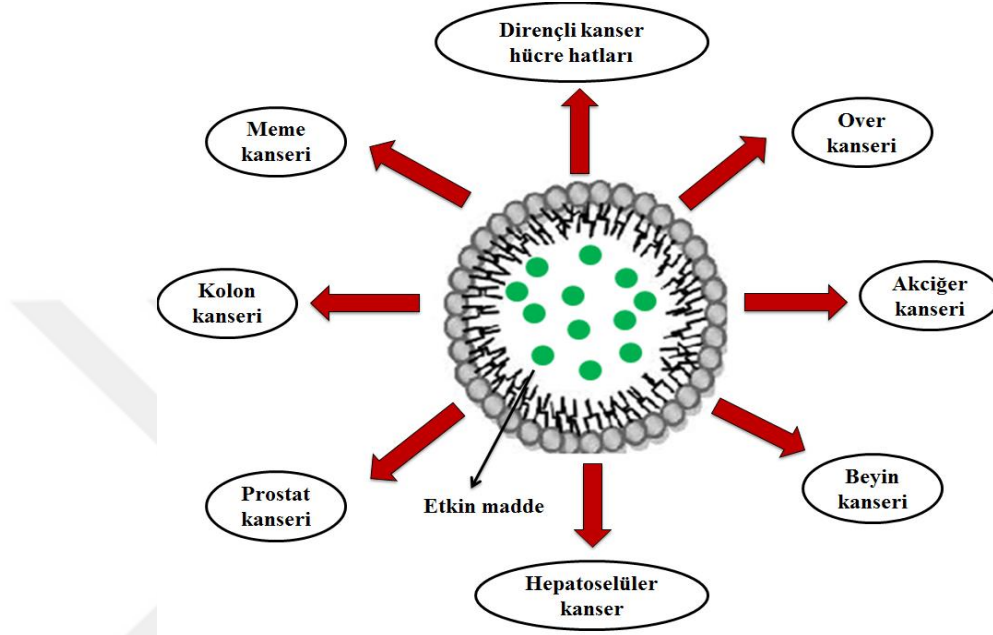
Nanopartiküllerin *in vivo* dağılımı hidrofobisite özellikleri ile belirlenebilir. Mononükleer fagosit sistem nanopartikülleri opsonize ederek kan akışından temizlenmesini sağlar. Opsonizasyonun minimuma indirilebilmesi ve nanopartiküllerin kanda daha uzun süre sirküle kalabilmesi nanopartiküllerin ilaç hedeflenmesindeki başarısını belirler. Bu yüzden, nanopartiküllerin yüzeyinin hidrofilik polimer/yüzey aktif madde veya biyobozunur kopolimerler (PEG gibi) ile kaplanması daha kullanışlı ve başarılı ilaç sistemlerin gelişmesinde rol oynar (Müller ve ark., 2000).

2.5.4.3. Kanser tedavisinde KLN'nin Rolü

Kanser tedavisinde kullanılan terapötik etkiye sahip farklı moleküllerin ve kemoterapik ilaçların hedeflenen doku ve/veya organlara taşınmasında görev alan KLN'ler kanser biyolojisi alanında dikkat çekmektedir. KLN'ler, kontrollü ilaç salınımı sağladıkları ve taşıdıkları etkin maddenin normal hücrelerde toksik etkisini azalttıkları için günümüzde etkin kanser tedavisinin uygulanmasında bazı dezavantajların ortadan kaldırılması sağlayabilmektedirler. Ayrıca, KLN'ler farklı fizikokimyasal özellikler ile taşıdıkları ilacın kararlılığını arttırarak, EPR etkisi ile istenilen hücrede ilacın terapötik etkisini arttıran ve ilacın farmakokinetik özelliklerini geliştiren nanopartiküler taşıyıcı sistemlerdir (Mukherjee ve ark., 2009; Shaji ve Jain 2010; Dineshkumar ve ark., 2012; Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Farklı üretim yöntemlerinin kullanılması ile elde edilen farklı etkin madde içeren (kolesteril bütirat, zanavimir, 5-FU, doksetaksel, paklitaksel, metotreksat, mitoksantron, kurkumin, tamoksifen, tamoksifen sitrat, kamptotesin, etopozit, doksorubisin ve topotekan vb.) KLN'nin karakterizasyon çalışmalarının (partikül boyutu, zeta potansiyel, ilaç yükleme kapasitesi, ilaç salımı, etkin madde-yüzey aktif madde ve lipid etkileşimlerinin) gerçekleştirildiği ve elde edilen formülasyonların farklı kanser hücre hatlarında (meme, akciğer, melanoma, over, kolorektal, glioma, prostat vb.) sitotoksik ve/veya apoptotik etkisinin belirlendiği *in vitro* çalışmalar literatürde mevcuttur (Şekil 26). Bu çalışmalar sonucunda KLN'lerin enkapsüle edilen ilacın terapötik etkisini arttırarak normal hücrelerde toksik etkisini azalttığı belirlenmiştir (Serpe ve ark., 2004; Harivardhan Reddy ve ark., 2005; Lu ve ark., 2006; Lee ve ark., 2007; Al Haj ve ark., 2008; Brioschi ve ark., 2008; Yuan ve ark., 2008;

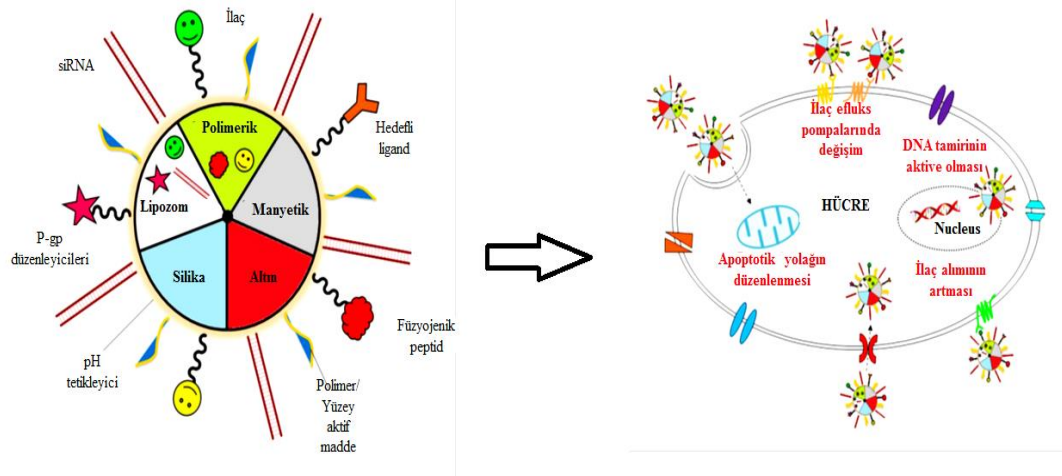
Xu ve ark., 2009; Shaji ve Jain 2010; Souza ve ark., 2011; Chimmiri ve ark., 2012; Dineshkumar ve ark., 2012; Videira ve ark., 2012; Minelli ve ark., 2013; Mussi ve ark., 2013; Sun ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013; Athawale ve ark., 2014; Naguib ve ark., 2014; Patel ve ark., 2014; Yuan ve ark., 2014; Yingchoncharoen ve ark., 2016).



Şekil 26. KLN'nin terapötik etkisinin belirlendiği in vitro çalışmalarda kullanılan kanser tipleri

Kanser hücrelerinde sonradan gelişen MDR'nin aşılmasında ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımına dair son yıllarda yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır (Conde ve ark., 2013) (Şekil 27). Bu çalışmalar içerisinde KLN'e 10-hydroxycamptothecin, doksorubisin, idarubicin, paklitaksel ve doksetaksel gibi kemoterapik ilaçlar yüklenerek bu ilaç yüklü KLN formülasyonlarının P-gp yüksek ekspresyonu gösteren dirençli kanser hücrelerinde etkisi incelenmiştir. Kemoterapik ilaç yüklü KLN'nin kanser hücrelerinde ilacın sitotoksik etkisini, uygulanan kemoterapik ilaca göre daha fazla arttırdığı ve ilacın kanser hücrelerinin intraselüler miktarında daha fazla birikmesini sağlayarak P-gp temeli MDR'nin aşılmasında etkin rol aldığı belirlenmiştir (Wong ve ark., 2006; Dong 2009; Ma ve ark., 2009; Subedi ve ark., 2009; Kang ve ark., 2010; Siddiqui ve ark., 2010; Baek ve ark., 2012; Dineshkumar ve ark., 2012; Martins ve ark., 2012; Siddiqui ve ark., 2012; Miao ve ark., 2013; Prasad ve ark., 2013; Tran ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015; Huang ve ark., 2016). KLN'nin

çoklu ilaç direncinin aşılmasındaki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar Tablo 17’de özetlenmiştir.



Şekil 27. MDR'nin aşılmasında nanoteknolojinin rolü. Lipozomlar, polimerik, manyetik, silika ve altın nanopartiküller ilaç eflüksununun artması, apoptotik yolağın ve DNA tamirinin aktive olması ve metabolizma ile MDR mekanizmasının aşılmasında potansiyel role sahiptir (Conde ve ark., 2013).

Tablo 17. KLN'nin çoklu ilaç direncinin aşılmasındaki rollerinin araştırılması

Etkin madde	Hücre hattı	Üretim yöntemi	Kaynaklar
Doksorubisin	MCF7/ADR (Doksorubisin dirençli MCF7 hücre hattı)	Çözücü Emülsifikasyon- Evaporasyon Yöntemi	Kang ve ark. (2010)
	MCF7 MCF7/ADR NCI/ADR-RES (Doksorubisin dirençli insan over karsinoma)	Çözücü Emülsifikasyon- Evaporasyon Yöntemi	Subedi ve ark. (2010)
Doksorubisin ve Paklitaksel	OVCAR-8 (İnsan over karsinoma hücre hattı) MDA-MB435/ LCC6 /MDR1	Sıcak lipid/su mikroemülsiyon	Dong ve ark. (2009)
	MCF7 MCF7/ADR SKOV3 SKOV3-TR30	Çözücü Difüzyon Yöntemi	Miao ve ark. (2013)
GG918 (Elacridar) ve Doksorubisin	MDA-MB 435/LCC6 (İnsan meme kanseri hücre hattı) MDA-MB 435/ LCC6/ MDR1	Ultrasonikasyon	Wong ve ark. (2006)
Idarubicin ve Doksorubisin	P388 P388/ADR (Doksorubisin dirençli lösemi hücre hattı) HCT-15	Birlikte Çöktürme Yöntemi	Ma ve ark. (2009)
Doksorubisin ve Mitomisin C Paklitaksel ve Verapamil	MDA-MB 435/LCC6 MDA-MB 435/LCC6/MDR1 MCF7/ADR	Polimer Lipid Hibrid Nanopartikül (Sonikasyon yöntemi) Sıcak Sonikasyon Yöntemi	Prasad ve ark. (2013) Jong-Suep Baek ve Cheong-Weon Cho (2015)
Antisens Gluzilseramid Sentaz Oligonükleotid (MBO-asGCS)	NCI/ADR-RES (Doksorubisin dirençli insan over kanser hücre hattı)	Mikroemülsiyon Yöntemi ve Ultrasonik Homojenizasyon	Siddiqui ve ark. (2010)
Doksorubisin ve MBO-asGCS	NCI/ADR-RES	Birlikte Çöktürme Yöntemi (Birlikte-presipitasyon)	Siddiqui ve ark. (2012)
10 – hidroksikamptotesin (HCPT)	HepG2 HepG2/HCPT (HCPT dirençli hepatoselüler karsinoma)	Çözücü Emülsifikasyon- Difüzyon Yöntemi	Liu ve ark. (2015)

Ayrıca, gen tedavide etkili ve güvenli bir nanopartiküler taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliğinden dolayı DNA, plazmit DNA, siRNA ve miRNA gibi nükleik asit/peptit bileşenleri içeren KLN formülasyonlarının etkisinin araştırıldığı farklı çalışmalar literatür de mevcuttur (Badrealam ve Owais; Choi ve ark., 2008; Jain ve ark., 2010a; Lobovkina ve ark., 2011; Piao ve ark., 2012; Shi ve ark., 2012; Yu ve ark., 2012; Creixell ve Peppas 2012; Lee ve ark., 2014; Shi ve ark., 2014; Ying ve Campbell 2014). Sonuç olarak, hücrelere nüfuz etme kapasitesi, hedeflenen genin aktivitesinin artırılması veya susturulmasında kontrollü salınım sağlamasından dolayı özellikle katyonik KLN formülasyonlarının etkili bir gen taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Badrealam ve Owais; Kaur ve Slavcev 2013; Dolatabadi ve ark., 2015).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- 150°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- 80°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- 80°C derin dondurucu (Nüve, Türkiye)
- 20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- 20°C derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- Buzdolabı (Samsung, Türkiye)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Danimarka)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- Çalkalayıcı İnkubatör (JSR, Kore)
- Thermo-Shaker (Biosan, Letonya)
- Orbital Shaker (Clever Scientific, Birleşik Krallık)
- Hassas Terazi (A&D Company, Japonya)
- Hassas Terazi (Radwag, ABD)
- Buz Makinası (Scotsman, ABD)
- UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD)
- Thermal Cycler (Biorad, Kaliforniya, ABD)
- Profilex PCR sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Yatay Elektroforez (Biorad, Kaliforniya, ABD)
- UV Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmat, Almanya)
- Ultra-Turrax T-18 (IKA, Almanya)
- Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere)
- UV-Vis Spektrofotometre (160A, Shimadzu, Japonya)
- SEM (JEOL JSM 5600 LV, Japonya)
- FTIR spektrometre (Bruker, ABD)
- NMR (JEOL EZC 500 R, Japonya)

Qubit 2.0 Flurometer (Invitrogen, ABD)
Class II Laminar Flow Steril Kabin (Labogene, Danimarka)
CO₂ İnkübatör (Panasonic, Japonya)
Işık Mikroskop (Olympus, Japonya)
İnverted Mikroskop (Euromex, Hollanda)
ELISA Okuyucu (Tecan, İsviçre)
Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
Thermo Scientific Fluroscan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific, ABD)
EVOS Flois Cell İmaging Station (Thermo Fisher Scientific, ABD)
GenomeLab TM Gexo Genetic Analysis Sistem (Beckman Coulter, ABD)
Light Cyler (LC) 480 II (Roche, İsviçre)
StepOnePlus™ System Real Time- PCR (Applied Biosystems, ABD)
C- Digit (LI-COR, ABD)
TEM (JEOL, Japonya)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tween 80 (Amresco, ABD)
Gliserol monostearat (GMS) (Santa Cruz, ABD)
d6-DMSO (EMD Milipore, Almanya)
Potasyum bromür (Fluka, ABD)
Agaroz (Lonza, İsviçre)
Ethidium bromid (Amresco, ABD)
Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, ABD)
Kloroform (Sigma Aldrich, ABD)
HCl (Sigma Aldrich, ABD)
Etanol (Sigma Aldrich, ABD)
Methanol (Sigma Aldrich, ABD)
Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
Glutaraldehit (Sigma Aldrich, ABD)
TritonX-100 (VWR International, ABD)
Tripkan blue (Thermo Fisher Scientific, ABD)
QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Almanya)
DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

HS Prime Premix (GeNet Bio, Kore)
PCR primerleri (Sentromer, Türkiye)
E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek, ABD)
GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter, ABD)
GenomeLab™ Separation Buffer (Beckman Coulter, ABD)
Mineral Oil (Beckman Coulter, ABD)
BMN 673 (Selleck Chemicals, ABD)
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, ABD)
Trypsin/EDTA (%0.25), fenol red (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
PBS (Phosphate Buffered Saline) Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)
Penicillin-Streptomycin Solution (Biological Industries, ABD)
WST-1 kiti (Biovision, ABD)
Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya)
Muse™ Cell Cycle Kiti (Merck Millipore, Almanya)
Muse™ Multi-Color DNA Damage Kiti (Merck Millipore, Almanya)
HT Universal Kolorimetrik PARP kiti (Trevigen, ABD)
Cleaved PARP-1 In-Cell ELISA Kiti (Abcam, Birleşik Krallık)
Klonojenik analiz kiti (BioPioneer, ABD)
CytoSelect™ 24-well Wound Healing kiti (Cell Biolabs, ABD)
EZViable™ Calcein AM Cell Viability Assay Kiti (Fluorometrik) (Biovision, ABD)
Rhodamin 123 (Sigma Aldrich, ABD)
E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, ABD)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD)
TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
E.Z.N.A.® miRNA Kit (Omega Bio-tek, ABD)
miRCURY LNA™ Universal RT microRNA Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon, Danimarka)

miRCURY LNA™ Universal RT PCR primer mix (Exiqon, Danimarka)
ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon, Danimarka)
Pierce® IP Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen, ABD)
TGS tamponu (Bio-Rad, ABD)
TG tamponu (Bio-Rad, ABD)
Tween 20 (Bio-Rad, ABD)
TBS (Bio-Rad, ABD)
BSA (Sigma Aldrich, ABD)
5 X Protein Loading Buffer (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Reducing Agents (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Ponceau S solüsyonu (Sigma Aldrich, ABD)
Non-fat dry milk (Cell Signaling Technology (CST), ABD)
4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels (Bio-Rad, ABD)
Color coded Prestained protein marker, kDa (Cell Signaling Technology (CST), ABD)
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0.45µm (Bio-Rad, ABD)
Primer antibodiler (Abcam, Birleşik Krallık)
Sekonder antibodiler (Abcam, Birleşik Krallık)
Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad, ABD)
Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Normal Goat Serum (Cell Signaling Technology (CST), ABD)
DAPI (Sigma Aldrich, ABD)
Prolong® Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. Hücre hatlarının temini

İnsan *BRCA1* 5382insC mutasyonu taşıyan triple negatif meme kanseri hücre hattı (HCC1937) ve insan meme epitel hücre hattı (MCF-10A) American Type Culture Collection (ATCC, ABD)'den uygun koşullarda temin edildi ve -150°C'de saklandı.

3.2.1.2. Hücrelerin Üretilmesi

-150 °C'de saklanan hücreler, 37°C su banyosunda çözüldükten sonra 25 cm²'lik filtreli hücre kültür flasklarına aktarıldı. HCC1937 (*BRCA1* mutant) hücreleri sodyum bikarbonat ve L-glutamin içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) besiyerine % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal bovine serum (FBS), 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek hazırlanmış besiyerinde kültüre edildi. MCF-10A hücreleri ise DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerine 100 mg/ml EGF, 1 mg/ml hidrokortizon, 10 mg/ml insülin, % 10 ısı ile inaktive edilmiş FBS, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek hazırlanmış besiyerinde kültüre edildi. Uygun besiyerine alınan tüm hücreler 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde üretildi.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinin üretildiği flasklarda %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, flask içindeki besiyerleri bir pipet yardımıyla uzaklaştırılarak hücrelerin yüzeylerinin hafifçe steril fostat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanması sağlandı. Daha sonra hücrelerin yapıştıkları flask yüzeyinden kaldırılabilmesi için, her bir flaskın boyutuna uygun olarak 1X Tripsin/EDTA (%0.25 trypsin/ 1mM EDTA) solüsyonu konularak 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde 3-5 dakika bekletildi. Tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek amacıyla süspansiyon haldeki hücrelere tripsin hacminin 2 katı kadar besiyeri eklenerek hücreler 15 ml hacimli falkon tüp içerisine alındı. Sonrasında falkon tüpler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atıldı. Hücre pelletleri üzerine taze besiyeri eklenerek hücreler besiyeri ile süspansiyon edildi ve hücre miktarına göre flasklara

bölündü. Pasajlanan hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde kültüre edildi.

3.2.1.4. Hücrelerin Stoklanması

Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılan hücreler santrifüj edildikten sonra hücre pelletleri üzerine 1 ml taze besiyeri eklenerek hücreler thoma lamı ile sayıldı. Her bir kriyo tüp (vial) için 900 µL hücre besiyeri konulup, 30 dk kuru buz üzerinde bekletildi. Sonrasında her bir kriyo tüpe 100 µL DMSO eklenerek kriyo tüpler -20 °C'ye kaldırıldı. 3-4 saat sonra vialler -150°C'lik derin dondurucuya yerleştirilerek, stoklama işlemi tamamlandı.

3.2.1.5. Hücre Sayımı

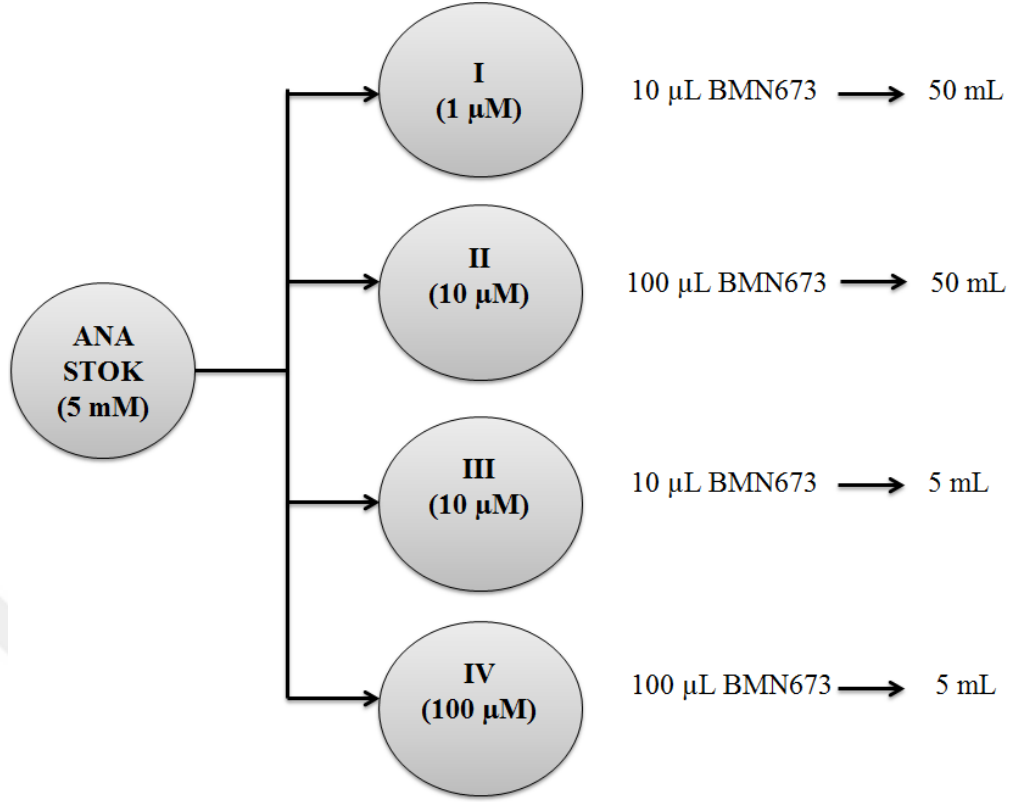
Santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti üzerine 1 ml besiyeri konularak sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl ependorf tüpe konuldu ve üzerine 90 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Bu karışım thoma lamı üzerine konularak 16 büyük karenin her birinde olan 25 küçük karenin üst ve sağ taraflarındaki kare çizgilerine teğet veya çizgileri kesen hücreler sayıldı. Sayım en az 3 kez tekrarlandı ve elde edilen sayıların ortalaması alınarak toplam hücre sayısı aşağıdaki formül ile belirlendi. Böylece 1 ml besiyerinde kaç milyon hücre olduğu hesaplandı.

Toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10.000 x dilüsyon faktörü

3.2.2. BMN 673'ün Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

BMN 673 (50 mg) Selleck Chemicals (ABD) firmasından temin edildi. Deneylerde kullanılmak üzere 10 mg BMN673 tartılarak 5.25 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü ve 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilerek 100 µl'lik stoklar halinde hazırlanarak - 80°C'de saklandı. Her deney için taze stok kullanıldı.

Literatürde gerçekleştirilen araştırmalarda BMN 673'ün konsantrasyonu 0.01 nM-100 nM aralığında çalışılmıştır ve 10 nM BMN 673 konsantrasyonun hücrelerde % 50'den fazla ölüme yol açtığı ve 100 nM konsantrasyonda neredeyse hücrelerde tamamen ölüme neden olduğu belirtilmiştir (Shen ve ark., 2013; Cardnell ve ark., 2013; Postel-Vinay ve ark., 2013; Murai ve ark., 2014). Bu kapsamda BMN 673'ün hücrelerdeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin belirlenmesi için 4 farklı stok solüsyonu hazırlandı (Şekil 28).

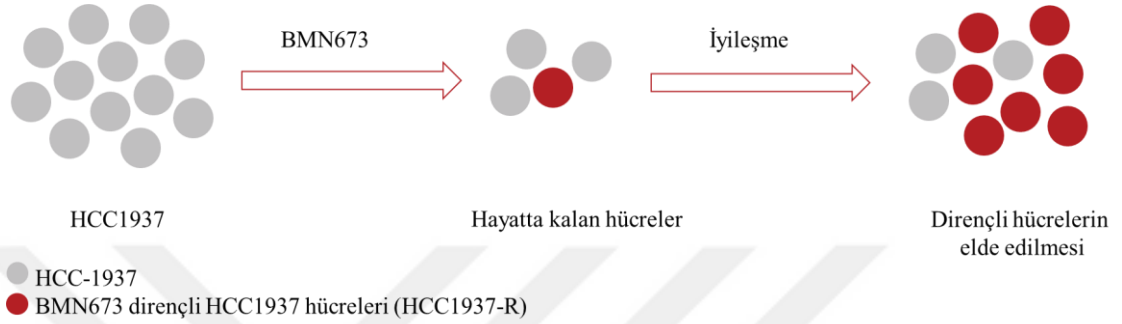


Şekil 28. BMN 673'ün besiyeri ile dilüe edilerek stok solüsyonlarının hazırlanması.

3.2.3. Dirençli Hücrelerin (HCC1937-R) Elde Edilmesi

HCC1937 hücrelerine 6 ay boyunca düzenli olarak BMN 673 (Selleck Chemicals, ABD) uygulanması sonucu BMN673'e karşı dirençli HCC1937 hücreleri (HCC1937-R) elde edilmiştir. HCC1937-R hücrelerinin elde edilebilmesi için, öncelikle literatürde belirlenen BMN 673 IC₅₀ konsantrasyonu 0.57 nM değeri dikkate alınarak, 4 farklı konsantrasyon (0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 nM) seçildi ve hücrelere uygulanmaya başlandı. Ancak, ilerleyen süreçte BMN673'ün düşük konsantrasyonlarında (nM) dahi potansiyel terapötik sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ve 0.05, 0.1, 0.5 nM konsantrasyonlarında dahi hücrelerde ölüm oranı yüksek olduğundan ve bu konsantrasyonlarda direnç kazanmasının mümkün olmadığından dolayı, minimum konsantrasyon olan 0.01 nM uygulaması ile hücrelere direnç kazandırılmaya devam edildi. Sonuç olarak, HCC1937 hücrelerine 6 ay boyunca 0.01 nM BMN673 uygulanarak HCC1937-R hücreleri elde edildi ve her ayın sonunda hücrelerde WST-1 canlılık analizi gerçekleştirilerek direnç kazanma katsayıları hesaplandı. Ayrıca, her ayın sonunda hücrelerin morfolojik yapıları inverted mikroskop ile görüntülendi. Bu süreçte hücrelere doz verildikten 3-4 gün sonra hücrelerin besiyeri değiştirilerek

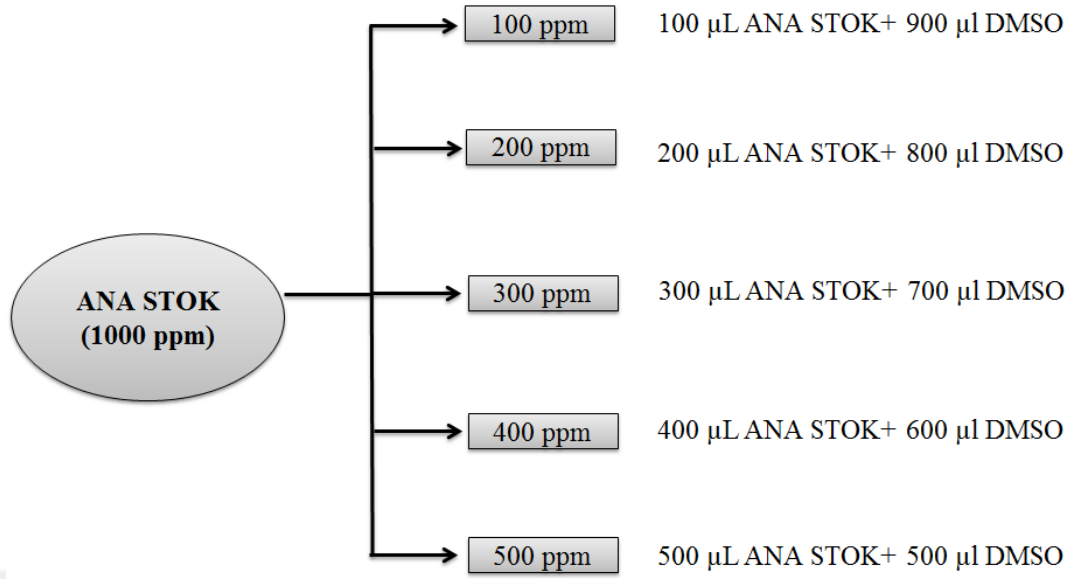
iyileşmelerine izin vermek için 1-2 gün besiyeri ile inkübe edilip sonra, doz uygulamasına devam edildi. Direnç gelişmesi ile ilgili uygulanacak yöntem Gottipati ve ark., 2010 ve Jonhson ve ark., 2013 makalelerinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Gottipati ve ark., 2010; Johnson ve ark., 2013). Dirençli hücrelerin elde edilmesinde uygulanan protokol Şekil 29’da gösterilmiştir (Ayers ve Nasti 2012).



Şekil 29. BMN 673 dirençli HCC1937 hücrelerinin elde edilmesi (Ayers ve Nasti 2012).

3.2.4. BMN 673’ün Miktar Tayini

BMN 673’ün kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için 10 mg BMN 673, 10 ml DMSO’da çözülmesiyle hazırlanan ana stok solüsyondan (1000 ppm) 5 farklı standart çözelti hazırlandı (Şekil 30). Öncelikle hazırlanan ana stok solüsyon, BMN 673’ün λ_{max} değerinin belirlenmesi için UV spektrofotometrede (Shimadzu, Japonya) 200-800 nm absorbans aralığında tarandı. BMN 673’ün absorbans değeri belirlendikten sonra hazırlanan 5 farklı standart çözelti (100, 200, 300, 400 ve 500 ppm) UV spektrofotometre’de, (Shimadzu, Japonya) analiz edilerek seçilen konsantrasyon aralığında artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artan pik alanının arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı değerlendirildi. Her bir konsantrasyona denk gelen pik alanı bulunarak kalibrasyon doğru denklemi hesaplandı. Her bir nokta için en az 3 değer ortalama kullanıldı ve her ölçüm 3 defa tekrarlandı. Ayrıca, analiz edilen standart çözeltilerin ortalama, standart hata (SH) ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanarak elde edilen sonuçlar ile yöntemin kesinliği ve kullanılan analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığının gösterilmesi amacıyla % geri kazanım değerlerinin hesaplanması ile de yöntemin doğruluğu belirlendi.



Şekil 30. BMN 673'ün 5 farklı standart çözeltisinin hazırlanması

3.2.5. KLN Formülasyonunun Üretilmesi ve Karakterizasyonu

3.2.5.1. BMN 673 Yüklü KLN'in Üretilmesi

BMN 673 yüklü KLN (BMN 673-KLN) ve boş KLN formülasyonu Müller ve ark. tarafından geliştirilen sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılarak üretildi (Müller, RH ve ark., 1995; Müller ve ark., 2000). BMN673 yüklü KLN formülasyonunun üretilmesi için, lipid olarak %2,5 gliserol monostearat (GMS), etken madde olarak %5 BMN 673 ve yüzey aktif madde olarak ise, %2 oranında Tween 80 kullanıldı. Öncelikle lipidin 80°C erimesi sağlandıktan sonra, BMN 673 erimiş lipide eklenerek lipid içerisinde maddenin erimesi sağlandı. Daha sonra, 80°C ısıtılan Tween 80 yavaş yavaş erimiş lipid-etken madde karışımına ilave edilerek ultraturaks aracılığı ile 20.500 rpm'de 10 dk karıştırıldı. Böylece BMN 673 yüklü KLN elde edildi. Aynı deney protokolü etken madde olan BMN 673 eklenmeden boş KLN için de gerçekleştirildi. Elde edilen formülasyonların küçük cam viallere aktarılarak oda sıcaklığında soğuması beklendi ve deneylerde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.2.5.2. BMN 673 Yüklü KLN'in Karakterizasyonu

3.2.5.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

BMN 673, BMN 673-KLN ve boş KLN'lerin partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri 3 farklı sıcaklıkta (4°C, 25°C ve 40°C) Zetasizer Nano Series (Nano-ZS)

(Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirildi. Her formülasyon için ard arda üç ölçüm yapıldı. Analiz gerçekleştirilmeden önce, ultra-saf suyun uyumsuz saçılmasını engellemek amacıyla 50 µS NaCl kullanılarak ultra-distile su ile hazırlanan iletken saf su ile örnekler dilüe edildi ve cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlandı. Partikül boyutunun dağılımının ölçülmesi için polidispersite indeksi (PDI) değeri, her bir örnek için alınan 3 analizin ortalamasının hesaplanarak elde edildi. Zeta potansiyel ise Helmholtz-Smoluchowski deklemini kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.2.2. Enkapsülasyon etkinliği (EE) ve etken madde yükleme kapasitesi

Etken madde yüklü KLN'ler 14000 rpm +4°C'de 30 dk boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantdaki etken madde miktarı UV spektrofotometre 305 nm'de ölçüm yapıldı ve aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\% EE = \frac{\text{Toplam ilaç miktarı} - \text{Serbest ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \times 100$$

$$\% \text{ İlaç yükleme kapasitesi} = \frac{\text{Toplam ilaç miktarı} - \text{Serbest ilaç miktarı}}{\text{Nanopartikülün kütlesi} \times 100}$$

3.2.5.2.3. İlaç Salınım Profili

İlaç salınımı, USP XXXI, NF26 (2008) palet metodu kullanılarak 37°C'de, 75 rpm'de 900 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH 6.8) disolüsyon ortamında 2.5 mg BMN 673 ve 2.5 mg BMN 673 KLN formülasyonu için gerçekleştirildi. Çözünme ortamından (1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 gün) 1 mL'lik örnek alınarak santrifüj edildikten sonra salınan ilaç miktarı 305 nm absorbansta UV spektrofotometre ile analiz edildi. Alınan örnek hacmi kadar ortam sıvısı her seferinde tekrardan disolüsyon ortamına eklendi ve her bir analiz 3 kez tekrarlandı.

3.2.5.2.4. Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilen BMN 673 KLN ve boş KLN'lerin yüzey özellikleri ve şekilleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL JSM 5600 LV,

Japan) ile 20 kV'de incelendi. BMN 673 KLN ve boş KLN PBS'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve silikon plaka üzerine yerleştirilerek bir gece oda sıcaklığında desikatörde kurutuldu. Ertesi gün, SEM analizi için örnekler argon atmosfer altında altın paladyum bileşiği ile kaplanarak SEM ile incelendi.

3.2.5.2.5. Fourier transform infrared spektrometresi (FT-IR) analizi

Liyofilizatörde 18 saat (gece boyunca) kurutulan BMN 673-KLN ve boş KLN formülasyonlarından 1 mg tartıldı ve basınca maruz bırakılmadan önce 100 mg önceden kurutulmuş potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak 2 saat kurutuldu. Formülasyonlar yaklaşık 2000 bar basınçta 6 dakika bekletilerek katı diskler elde edildi. Bu disklerin FTIR spektrumları 4000-400 cm^{-1} aralığında 2 cm^{-1} spektral çözünürlükte Bruker Optics IFS66v/s FTIR (ABD) spektrometre de analiz edildi.

3.2.5.2.6. NMR Analizi

Tüm NMR analizleri 500 MHz, 11,7 tesla manyetik alan gücüne sahip JEOL EZC 500 R (JEOL, Japonya) cihazında gerçekleştirildi. 100 mg BMN 673 ve BMN 673-KLN 800 μl d_6 -DMSO çözücüsü içerisinde çözüldükten sonra 5 mm'lik NMR tüplerine aktarıldı ve proton (^1H) analizleri gerçekleştirildi. Tüm analizler oda sıcaklığında ilgili cihazlarda single pulse kullanılarak d1:2 sn ve NS:16 olacak şekilde ayarlanarak gerçekleştirildi.

3.2.6. WST-1 Analizi

BMN 673 kanser tedavisinde diğer PARP inhibitörlerine göre tek etkin ajan olarak potansiyel bir PARP inhibitörü olmasına rağmen, uzun sürede etki ettiği bilinmemektedir. Bu nedenle, literatürde hücrelerde yapılacak olan deneylerin 6-12 gün aralığında çalışılması gerektiğini belirtilmiştir (Shen ve ark., 2013; Cardnell ve ark., 2013; Murai ve ark., 2014). Ancak, hücrelerin proliferasyon hızlarındaki farklılıklardan ve uzun süren deneyler gerçekleştirileceğinden dolayı hücrelerde BMN 673'ün sitotoksik etkisi belirlenmeden önce her bir kuyuya ekilmesi gereken hücre miktarı optimize edilmiştir. Shen ve ark. 2013 yılında çalışmalarında farklı PARP inhibitörlerinin (olaparib, rucaparib ve BMN 673) her bir kuyuya 500-3000 hücre ekilerek 10-14 gün boyunca sitotoksik etkisi araştırılmıştır (Shen ve ark., 2013). Bu amaçla; HCC1937, HCC1937-R ve MCF10A hücreleri her bir kuyuda 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 hücre ekilerek optimum hücre konsantrasyonu belirlendi. Sonuç olarak

HCC1937 ve HCC1937-R hücreleri için her bir kuyuya 1000 ve 2000 hücre, MCF-10A hücreleri için ise her bir kuyuya 500 ve 1000 hücre konsantrasyonunun uygun olduğu belirlendi.

WST-1, spektrofotometrik olarak hücre proliferasyonunun ve canlılık miktarının ölçülmesinde kullanılan radyoaktif olmayan bir reaktiftir. BMN 673, BMN 673-KLN ve boş KLN'lerin HCC1937, HCC1937-R ve MCF10A hücrelerinde sitotoksik etkinin belirlenmesi için, WST-1 kit protokolüne göre hücreler öncelikle 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına her bir kuyucuğa 500-2000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra 0.01-100 nM konsantrasyonda BMN 673, boş KLN ve BMN 673 yüklü KLN'ler ile hücreler 6, 8, 10 ve 12 gün boyunca inkübe edildi. Belirlenen deney günlerinde her bir kuyuya 10 µl WST-1 (Biovision, ABD) boyası eklenip 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları 37°C'de ve %5 CO₂ inkübatörde 30-60 dk inkübe edildi ve ölçümler 460-520 nm referans dalga boyu aralığında Elisa Reader'da (Tecan, İsviçre) gerçekleştirildi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 canlı kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi. Her test 3'er defa olmak üzere tekrar edildi. Ayrıca HCC-1937-R hücrelerinde BMN673'e karşı gelişen ilaç direnci oranının belirlenmesi için aynı deney protokolü uygulanarak hücrelerde her ayın sonunda direnç oranı hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması}}{\text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}} \times 100$$

$$\text{Direnç oranı} = \frac{\text{Her bir konsantrasyonda HCC1937-R hücrelerinin \% canlılığı}}{\text{Her bir konsantrasyonda HCC1937 hücrelerinin \% canlılığı}}$$

3.2.7. Annexin V Analizi

WST-1 deney sonucuna göre belirlenen 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde apoptotik etkisinin belirlenmesi için, apoptozis mekanizmasının tetiklenmesi ile hücre dış yüzeyine hareket eden fosfatidilserine karşı yüksek affiniteyi değerlendiren Muse® Annexin V & Dead Cell Kit ile analizler gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyulu plakalara her bir

kuyuya 1×10^5 /ml olacak şekilde ekildikten sonra belirlenen konsantrasyonlarda BMN 673 ve BMN 673-KLN ile minimum (6 gün) ve maksimum (12 gün) süre boyunca inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda hücreler santrifüjlenip, 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra 100 µL hücre süspansiyonuna 100 µL Annexin V Dead boyası eklenerek hücreler 1 saat içinde Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edildi. Tüm deneyler 3'er kez tekrar edildi.

3.2.8. Hücre Siklusu Analizi

Hücre döngüsünün düzenlenmesi genetik hasarın kontrol edilmesinde ve kontrolsüz hücre bölünmesinin engellenmesinde önemlidir. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde hasarlar kanser hücrelerinin karakteristik özelliğidir. Bu nedenle hücre döngüsü analizi, antikanser ilaçların hücre bölünme mekanizmaları üzerinde etkisinin anlaşılmasında önemlidir. Muse™ Cell Cycle Kiti, propidium iyodür (PI) ve RNAaz A içeren reaktif bir karışımdır. PI, RNAaz varlığında DNA içeriğinde farklılıklara dayanarak hücre siklusunun farklı fazlarında hücrelerin ayrılmasını sağlar. G0/G1 fazında her bir kromozomdan 2 kopya vardır. Siklus başladığında, kromozal DNA sentezlenir (S fazı). PI'ın floresans yoğunluğunda artış tüm kromozal DNA 2 katına çıkana kadar devam eder (G2/M fazı). Bu evrede, G2/M hücreleri floresansı, G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunda yoğunluğun 2 katıdır. G2/M fazının sonunda hücreler 2'ye bölünür. Muse™ Cell Cycle Kiti PI-temelli boyama ile DNA içeriğinde farklılıkların ve her bir döngüde (G0/G1, S, ve G2/M) hücre miktarının yüzdesinin belirlenmesini sağlar.

BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin doza ve zamana bağlı olarak hücre siklusu üzerinde etkisini belirlemek için her bir kuyuya 5×10^5 /ml olacak şekilde hücreler ekildikten sonra belirlenen konsantrasyonlardaki (0.01, 0.1, 1 ve 10 nM) BMN 673 ve BMN 673-KLN ile 6 gün ve 12 gün boyunca inkübe edildi. 6 gün ve 12 gün sonunda, hücreler santrifüjlenerek 2 kez PBS ile yıkandı ve her bir hücre grubuna %70'lik 1 mL etil alkol eklenerek hücreler 2-3 saat -20°C 'de fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler santrifüjlenerek süpernatant kısmı atıldı. Hücre pelletlerine 200 µL Muse™ Cell Cycle Reagent eklenerek Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edildi. Tüm deneyler 3'er kez tekrar edildi.

3.2.9. DNA Hasarı Analizi

DNA'da çift zincir kırıkları meydana geldiğinde;

- I. Hücre döngüsü kontrol noktaları aktifleşir.
- II. Hücreler apoptotik ölüme gider.
- III. DNA tamir mekanizmaları, oluşan kırıkların tamir edilmesini sağlar.

Histon H2AX fosforilasyonu hücre döngüsü kontrol noktalarının aktivasyonunda ve DNA'da oluşan çift zincir kırıklarının tamirinde önemlidir. DNA'da hasar meydana geldiğinde, H2AX histonu ATM tarafından Ser139'dan hızlı bir şekilde Ser1981'in fosforilasyonu ile aktive olan ATM tarafından fosforile edilir ve DNA hasarı olan bölgede fosforile H2AX (γ -H2AX) odaklarının oluşmasını sağlar. ATM iyonize radyasyona maruziyet sonucu DNA'da oluşan çift zincir kırıklarına yanıtta temel düzenleyicidir. Ancak fosfoinozitol-3 kinaz üyeleri olan DNA-bağımlı kinaz (DNA-PK) ve ATR'de DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının tanınmasında rol alır. Bu nedenle, BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin doza ve zamana bağlı olarak HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde DNA hasarı üzerinde etkisinin belirlenmesi için eş zamanlı olarak H2AX ve ATM'nin aktivasyonunun ölçülmesine olanak sağlayan Muse™ Multi-Color DNA Damage Kiti ile analizler gerçekleştirildi.

Kit protokolüne göre, 6 kuyulu plakaların her birine 2×10^5 /mL hücre ekildikten 24 saat sonra hücreler 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN ile inkübe edildi. 6. ve 12. gün sonunda, hücreler santrifüjlendikten sonra 1 kez PBS ile yıkandı ve kit protokolüne göre fiksasyon ve permeabilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen hücre pelletleri 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında anti-fosfo-Histon H2A.X (Ser139) ve anti-fosfo-ATM (Ser1981) antibodileri ile boyanarak Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edildi. Tüm deneyler 3'er kez tekrar edildi.

3.2.10. PARP Aktivasyon Analizi

BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin PARP üzerinde *in vitro* enzimatik aktivitesinin belirlenmesi için histon proteinlerine biyotinlenmiş-PARP kaplı kuyucukları içeren HT Universal Kolorimetrik PARP kiti (Trevigen, ABD) kullanıldı. Bu analiz, PARP inhibitörlerinin konsantrasyon aralığının araştırılmasında ve IC₅₀ değerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Kit içeriğinde olan 3-aminobenzamid (3-AB, PARP-1 inhibitörü) ise pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Kit protokolüne göre, histon kaplı kuyucukların rehidrasyonu için 50 µl of 1× PARP tamponu ile 30 dk inkübe edildikten sonra, 3-AB 1X PARP tamponu ile dilüe edilerek standart eğrinin elde edilmesi için uygulandı. Aynı zamanda, 0.01-100 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN 1X PARP tamponunda dilüe edilerek kuyucuklara uygulandıktan sonra her bir kuyuya 0.5 unit PARP enzimi uygulanarak 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, her bir kuyuya 25 µl 1× PARP karışımı (1X PARP tamponunda 25 µL 10X PARP karışımı ve 25 µL 10X aktif DNA) eklenerek 60 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında, kuyucuklar 2 kez 200 µL 1X PBS + 0.1% Triton X-100 yıkandı ve 50 µL 1X Strep-HRP her bir kuyuya eklenerek oda sıcaklığında 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyu 1X PBS + 0.1% Triton X-100 ile yıkandıktan sonra 50 µL önceden ısıtılmış TACS-Sapphire kolorimetrik substrat eklenerek karanlıkta 15 dakika inkübe edildi ve reaksiyonun sonlanması için her bir kuyuya 50 µL 0.2 M HCl eklendi. 450 nm absorbansta 96 kuyucuklu plaka Elisa Reader'da (Tecan, İsviçre) okutularak BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin PARP aktivitesi 3-AB standart eğrisine göre normalize edildi. Her bir deney 3'er kez tekrar edildi.

3.2.11. Kolorimetrik PARP Proteini Analizi

Poli-ADP ribozilasyon aracılığı ile PARP, hücresel tamir, tanskripsiyon, DNA replikasyonu ve protein degradasyonu gibi hücresel homeostazın düzenlenmesinde sorumludur. DNA hasarına yanıtta ise, PARP aktivitesinin artışı programlı hücre ölümünün aktivasyonuna neden olur. Apoptoz süresince PARP'ın, Asp214 ve Gly215'den kaspaz-3 aktivasyonu ile kırılması sonucu, DNA bağlanma bölgesi içeren 24 kDa N-terminal fragmenti ve katalitik bölgenin bulunduğu 89 kDa C-terminal fragmenti oluşur. Bu nedenle, 89 kDa PARP fragmentinin varlığı veya oluşumu apoptozda önemli bir belirteç olarak düşünülmektedir. Bu amaçla, Cleaved PARP-1 In-Cell ELISA Kiti (Abcam, Birleşik Krallık) ile hücrelerde PARP-1 proteinin 89 kDa fragmentinin kantitatif seviyesi analiz edildi.

96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyuya HCC1937 ve HCC1937-R hücreleri için 2000 hücre ve MCF-10A hücreleri için 1000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra, hücreler BMN 673 ve BMN 673-KLN ile belirlenen konsantrasyonlarda (0.01-10 nM) 12 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücreler %4 paraformaldehit ile 15 dk oda sıcaklığında fikse edildi, hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve 1X permeabilizasyon

tamponu ile 2 saat boyunca permeabilize edildi. Sonrasında hücreler bloklanarak primer anti-rabbit(cleaved) PARP antikoruna ile 1 gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün hücreler 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra HRP konjuge-sekonder antikor ile 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, her bir kuyuya TMB stop solüsyonu eklenerek 450 nm absorbansta PARP-1 primer antikorunun arka planı ölçüldü. TMB solüsyonu hücrelerden uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 3 kez PBS ile yıkandı ve Janus Green boyası ile boyandı. Boyanın uzaklaştırılması için hücreler 5 kez distile su ile yıkandıktan sonra 0.5 M HCl her bir kuyuya eklenerek 10 dk inkübe edildi ve 595 nm absorbansta PARP-1 aktivasyonu ölçüldü. Tüm deneyler 3'er kez tekrar edildi.

3.2.12. Koloni Formasyon (Klonojenik) Analizi

Klonojenik analiz, farklı sitotoksik ya da kemoterapik ajanların hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Rafehi ve ark., 2011; Crowley ve ark., 2016). Kolonilerin boyanması için klonojenik analiz kiti (BioPioneer, ABD) kullanıldı. Hücreler proliferasyon hızlarına göre 6 kuyulu plakalara HCC1937 ve HCC1937-R hücreleri için her bir kuyuya 1×10^4 , MCF-10A hücreleri için ise 1×10^2 olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN ile 10-14 gün boyunca %5 CO₂ inkübatörde 37 °C'de her 3 günde bir besiyeri değiştirilerek inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, her bir plakadan besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1 mL fiksasyon tamponunda 15 dk boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonrasında 1 mL boyama solüsyonu ile 45 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücreler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyudaki koloni sayısı inverted mikroskop (Euromex, Hollanda) kullanılarak sayıldı ve görüntülendi. Her deney 3'er kez tekrar edildi. BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanmayan her bir hücre grubu negatif kontrol olarak kullanıldı. Tek bir hücreden 50 veya daha fazla hücre miktarı 1 koloni olarak sayılarak hücrelerin ekildikleri kuyuları kaplama verimliliği ve canlılık fraksiyonu aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Kaplama verimliliği} = \frac{\text{Oluşan koloni sayısı}}{\text{Ekilen hücre sayısı}} \times 100$$

$$\text{Canlılık oranı} = \frac{\text{Doz uygulanan grupların kaplama verimliliği}}{\text{Kontrol grubu kaplama verimliliği}} \times 100$$

3.2.13. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Analizi

Yara iyileşme analizi hücre polarizasyonu, doku matriks yeniden yapılanması veya farklı kültür koşullarında farklı hücrelerin migrasyon ve proliferasyon hızlarının tahmin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (Liang ve ark., 2007). Bu analizde temel olarak tek katmanlı hücrelerin kültüre edilmesinden sonra, yara alanının oluşturulması ve bu alanın kapanmasının mikroskopik olarak görüntülenmesine dayanır. İyileşme birkaç saatten birkaç güne kadar hücre tipine, koşullarına ve yara alanının yüzey alanına göre değişmektedir. Bu nedenle, CytoSelect™ 24-well Wound Healing kiti (Cell Biolabs, ABD) kullanıldı.

Öncelikle 6 kuyulu plakaların her birine 1×10^5 hücre ekildikten 24 saat sonra hücreler 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN673-KLN ile 6 gün boyunca inkübe edildi. 6. günün sonunda hücreler tripsinlenerek 6 kuyulu plakalardan kaldırıldı ve yara iyileşme çıkıntısı içeren 24 kuyucuklu plakaların her bir kuyusuna ekildi. Hücrelerin 24 kuyucuklu plakada tek katmanlı yapıda kuyuları kaplaması beklendikten sonra (24-48 saat), 0.9 mm yara boşluğunun elde edilmesi için çıkıntılar plakadan kaldırıldı ve hücreler belirlenen konsantrasyonlarda BMN 673 ve BMN 673-KLN ile tekrar 72 saat boyunca inkübe edildi. 72 saat sonunda her bir kuyu inverted mikroskop (Euromex, Hollanda) ile görüntülendi.

3.2.14. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin P-gp ve/veya MRP1 Aktivitesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

3.2.14.1. Kalsein Analizi

Kalsein asetoksilmetil ester (Kalsein-AM) lipofilik özellikte floresans olmayan P-gp ve/veya MRP1 substratı olan bir bileşiktir ve bu nedenle çoklu ilaç direnci gelişimin belirlenmesinde kullanılan ilgili boya, ilaç eflüks pompalarının aktivitesindeki değişim nedeniyle intraselüler alanda biriken kalsein miktarının analizi için kullanılmaktadır. Normal hücrelerde, kalsein-AM pasif difüzyonla hücre içine girdiği zaman esterazlar tarafından ester bağlarının kırılması sonucunda sitoplazma da floresans özellikte kalseine hidrolize olur. Ancak, P-gp ve/veya MRP1 yüksek eksprese olan hücrelerde kalsein-AM kalseine dönüşmeden önce hücreden dışarı atılmaktadır. BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF10A hücrelerinde intraselüler alanda kalsein miktarının ölçülmesi için EZViable™ Calcein AM Cell Viability Assay Kiti (Fluorometrik) (Biovision, ABD) kullanıldı.

Kit protokolüne göre, 96 kuyucuklu plakaların her birine WST-1 analizinde de gerçekleştirildiği gibi HCC1937 ve HCC1937-R hücreleri için 1000 ve 2000 hücre, MCF-10A hücreleri için ise 500 ve 1000 hücre olacak şekilde hücreler ekildikten 24 saat sonra 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN ile muamele edilerek 6 gün ve 12 gün boyunca inkübe edildi. 6. gün ve 12. gün sonunda hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 1:500 oranında Kalsein AM solüsyonu Kalsein dilüsyon tamponu ile dilüe edildikten sonra 100 µL Kalsein AM solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 485-530 nm absorbans aralığında Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında biriken kalsein miktarı analiz edildi.

3.2.14.2. Rhodamin 123 Analizi

BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerindeki P-gp ve/veya MRP1 aktivitesi Rhodamin 123 (Rho-123) analizi (Sigma Aldrich, ABD) ile belirlendi. Rho-123, P-gp ve/veya MRP1 substratıdır ve hücreler tarafından Rho-123 alınımında azalış ya da artış ABC ilaç taşıyıcı ailesinin üyelerinin fonksiyonunun artmasını ya da baskılanmasını göstermektedir. Hücreler 6-kuyulu plakalara ekildikten 24 saat sonra, hücrelere 6 gün ve 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve

10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulandı. 6. ve 12. günün sonunda, 2.5 µM Rho-123 ile hücreler 37°C’de 60 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, her bir kuyu 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra, 400 µL %1 Triton X-100 içeren PBS ile hücreler 6 kuyulu plakalardan kaldırıldı. Elde edilen hücre lizatı 4°C’de 13.000 rpm’de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra, Rho-123 miktarı her bir hücre grubuna ait süpernatant kısmından 100’er µl 96- kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna eklenerek Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL cihazında (Thermo Fisher Scientific, ABD) 520 nm emisyon ve 485 nm eksitasyon dalga boyunda analiz edildi. Toplam protein konsantrasyonu BCA Protein analiz kiti (Pierce, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile ölçüldü. BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde intraselüler Rho-123 miktarı toplam protein konsantrasyonuna göre normalize edilerek hesaplandı. Tüm deneyler 3’er kez tekrar edildi ve 3 deney sonucunun ortalaması alındı.

Ayrıca, Rho-123 metabolik olarak aktif mitokondride lokalize olan floresans bir boya olduğu için 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC-1937-R ve MCF-10A hücreleri, PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra her bir kuyuya 5 µg/ml Rho-123 eklenerek 37°C’de 30 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkandıktan sonra EVOS FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile görüntülendi.

3.2.15. HCC1937 ve HCC1937-R Hücrelerinde BRCA1 c.5266dupC (5382insC) Validasyonu

3.2.15.1. DNA İzolasyonu

HCC1937 ve HCC1937-R hücreleri santrifüjlendikten sonra 5×10^6 hücre miktarı olacak şekilde thoma lamında sayıldı ve DNA izolasyonu için QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Kit protokolüne göre, hücre lizatı üzerine 20 µL proteinaz K eklendikten sonra 1 dk vorteks yapıldı ve 200 µL ALK solüsyonu eklenerek 56°C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, elde edilen karışım filtreli tüpe aktarılarak 8000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre üzerine 700 µL AW1 solüsyonu ile eklenerek 8000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Daha sonra 700 µL AW2 solüsyonu eklenerek 8000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemlerinden sonra, filtreli tüpler 1.5 mL’lik ependorfalara alınarak üzerlerine 100 µL

dH₂O eklenerek 5 dk beklendi ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve kalitesi 260/280 nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında ölçüm yapılarak belirlendi.

3.2.15.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde *BRCA1* geninin 19. ekzonunun çoğaltılması için Tablo 18'de belirtilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) reaksiyonunun hazırlanmasından sonra belirtilen PCR koşullarında amplifiye edildi (Tablo 19). Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 120 V 30 dk yürütülerek UV görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Almanya) ile görüntülendi.

Tablo 18. PCR reaksiyonunun hazırlanması

PCR Reaksiyonu	
HS Prime Premix	12.5 µl
F primer (10 pmol/µl)	1.25 µl
R primer (10 pmol/µl)	1.25 µl
DNA (50 ng/µl)	3 µl
Distile su	7 µl
Toplam hacim	25 µl

Tablo 19. PCR reaksiyonu koşulları

PCR koşulları	
94°C'de 2 dk	} 40 döngü
94°C'de 30 sn	
60°C'de 30 sn	
72°C'de 30 sn	
72°C'de 7 dk	
4°C'de ∞	

3.2.15.3. DNA dizi analizi

3.2.15.3.1. Pürifikasyon

HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinin *BRCA1* geninin 19. ekzonuna ait PCR ürünleri E.Z.N.A.® Cycle Pure Kiti (Omega Bio-tek, ABD) kullanılarak pürifiye edildi. PCR ürünlerinin üzerlerine 1:1 oranında Membrane Binding Solution eklendi ve pipetaj yapılarak karışım filtrelili kolona aktarıldı ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra filtrelili kolona 700 µl Membrane Wash Solution eklenerek 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolonlar yıkandı.

Bu işlem 2 kez tekrar edildi. Yıkama işlemlerinin sonrasında, kolonlar temiz 1.5 mL ependorf tüplere aktarılarak 35 µl dH₂O kolonun filtrelili kısmına eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, ependorf tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek pürifikasyon ürünleri elde edildi. Pürifikasyon işleminden sonra örnekler %2'lik agaroz jelde 120 V 30 dk yürütüldü ve UV görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Almanya) kullanılarak görüntülendi.

3.2.15.3.2. Sekans Reaksiyonu

Elde edilen pürifiye PCR ürünlerinde GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kiti (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak sekans reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 20) ve Tablo 21'de belirtilen PCR koşullarında ürünler amplifiye edildi.

Tablo 20. Sekans reaksiyonunun hazırlanması

Sekans Reaksiyonu	
DTCS Quick Start Master Mix	8 µl
F primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
R primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
Pürifiye DNA (50 ng/µl)	0.5-10 µl
Distile su	0-9.5 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 21. Sekans reaksiyonu koşulları

PCR koşulları	
96°C'de 2 dk	} 30 döngü
96°C'de 20 sn	
50°C'de 20 sn	
60°C'de 4 dk	
4°C'de ∞	

3.2.15.3.3. Etanol Presipitasyonu

Sekans reaksiyonu ile elde edilen PCR ürünlerine 2 µl Na-EDTA, 2 µl Na-Asetat ve 1 µl Glikojen eklendikten sonra 60 µl %100'lük soğuk EtOH (etanol) eklenerek 14.000 rpm'de 15 dk -4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri üzerine 200 µl %70'lik soğuk etanol eklendi ve -4°C'de 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi ve sonuncu alkol uzaklaştırmasından sonra örnekler 37°C'de 2 saat bekletilerek alkolün uçması

sağlandı. İnkübasyon sonunda, örneklerin üzerine 40 µl SLS (Beckman Coulter, ABD) eklenerek örnekler Beckman Sample Plate'e yüklendi ve üzerine 1 damla mineral yağ (Beckman Coulter, ABD) damlatılarak ve 96 kuyucuklu plaka sekans cihazına (Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System) yüklendi. Örneklerin DNA dizi analizleri ileri ve geri olmak üzere iki yönlü olarak gerçekleştirildi.

3.2.16. Gen Ekspresyon Analizleri

3.2.16.1. RNA izolasyonu

BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde RNA izolasyonu gerçekleştirmek için 25 cm²'lik flaskların her birine 1x10⁶ hücre olacak şekilde hücreler ekildikten 24 saat sonra 6 gün ve 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN ile inkübe edildi. 6 ve 12. günün sonunda hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkandı ve E.Z.N.A.® Total RNA Kit I kullanılarak hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Kit protokolüne göre, hücre pelletlerine 200 µl TRK lizis tamponu eklendikten sonra 1 dakika vorteks yapıldı ve üzerlerine 1 ml %70'lik alkol eklenip pipetlenerek karışım HiBind® RNA kolonlarına aktarıldı. 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra kolonlara 500µl RNA Wash buffer I eklendi ve 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, 500µl RNA Wash buffer II her bir kolona eklendi ve aynı hızda santrifüj edildi. Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra kolonların kuruması için 13.000 x g'de 2 dk boş santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar 1.5 ml yeni ependorflara aktarılarak filtre kısımlarının üzerine 35 µl DEPC su eklendi ve 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, 13.000 x g'de 2 dk santrifüj edilerek total RNA elde edildi. Elde edilen RNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları 280/260 nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) ölçüldü ve RNA'lar -80°C de saklandı.

3.2.16.2. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezlemek amacıyla High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Kit protokolüne göre 2X RT master karışımı soğuk blok üzerinde hazırlandıktan sonra (Tablo 22), 10 µl RNA (2 µg) her bir PCR tüpüne eklenerek pipetaj yapıldı ve 25°C'de 10 dk, 37°C'de

2 saat ve 85°C’de 5 dk inkübe edildikten sonra cDNA’lar elde edildi. Deneyler gerçekleştirilene kadar cDNA’lar -20°C’de saklandı.

Tablo 22. Total RNA’dan cDNA sentezlemek amacıyla hazırlanan PCR karışımı

RT Master karışımı	
10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µL
10X RT Random Primers	2.0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/µL	1.0 µL
Nuclease-free H ₂ O	4.2 µL
Toplam hacim	10.0 µL

3.2.16.3. mRNA Ekspresyon Analizi

HR yolağı ile ilişkili H2AFX (Hs00266783_s1), PARP1 (Hs00242302_m1), RAD51 (Hs00947967_m1) ve BRCA1 (Hs01556193_m1) genlerinin ve MDR ile ilişkili MDR1 (ABCB1, P_gp) (Hs00184500_m1), BCRP (ABCG2) (Hs01053790_m1) ve MRP1 (ABCC1) (Hs01561502_m1) genlerinin mRNA ekspresyon analizleri için TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Kontrol olarak Actin-beta (Hs99999903_m1) kullanıldı. Tablo 23 ve 24’de belirtilen koşullarda RT-PCR karışımı ve PCR koşulları gerçekleştirildi. RT-PCR analizi Step One Plus™ Real-Time PCR sisteminde (Applied Biosystems, ABD) analiz edildi. Elde edilen veriler “RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5.” (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) web tabanlı programda $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile değerlendirildi.

Tablo 23. mRNA ekspresyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması

	20 µl reaksiyon hacmi	
	1 reaksiyon	(n=4)
20X TaqMan® Gen Expression Assay	1 µl	5 µl
2X TaqMan® Gen Expression Master Mix	10 µl	50 µl
cDNA (1-100 ng)	4 µl	20 µl
RNase-free water	5 µl	25 µl

Tablo 24. mRNA ekspresyonu için RT-PCR koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz Aktivasyonu / Denatürasyon	50	2 dk
	95	10 dk
Amplifikasyon (40 döngü)	95	15 sn
	60	1 saat

3.2.17. miRNA Ekspresyon Analizleri

3.2.17.1. miRNA İzolasyonu

HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde miRNA izolasyonu gerçekleştirmek için, 75 cm²'lik flaskların her birine 1x10⁷ hücre olacak şekilde hücreler ekildikten 24 saat sonra, 6 gün ve 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkandı ve E.Z.N.A.® miRNA Kit (Omega Bio-tek, ABD) kullanılarak hücrelerden miRNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Kit protokolüne göre, hücrelerin lizis edilmesi için 1 mL RNA-Solv® Reagent eklenerek oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 200 µl kloroform eklenerek 10 dk buz üzerinde bekletildi ve 4°C'de 12.000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan üst fazın %80'i yeni ependorf tüpe aktarıldı ve geniş büyüklükteki RNA'ların (>200 nt) uzaklaştırılması için 330 µl ethanol eklenerek HiBind® RNA mini kolonlara aktarılarak oda sıcaklığında 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında miRNA izolasyonu için kolondan süzülen süpernatant kısımlara 650 µl etanol eklenerek karışım HiBind® Micro RNA kolonlarına aktarıldı ve 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Yıkama aşaması için her bir kolona 500 µl Wash Buffer II eklendi ve 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşama 2 kez tekrar edildi. Son olarak kolonun kuruması için ≥12,000 x g'de 2 dk santrifüj edildi ve kolonlar yeni 1.5 ml'lik ependorfalara aktarılarak üzerine 20 µl DEPC su eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen miRNA'ların optik dansiteleri ve konsantrasyonları 280/260 nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) spektrofotometrede ölçüldü ve -80°C de saklandı.

3.2.17.2. cDNA Sentezi

miRNA'dan cDNA sentezlemek için miRCURY LNATM Universal RT microRNA Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon, Danimarka) kullanıldı. Kit protokolüne göre RT reaksiyonu Tablo 25'de belirtilen koşullarda soğuk blok üzerinde hazırlandıktan sonra 42°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk ve 4°C'de inkübe edildikten sonra

cDNA'lar elde edildi. cDNA'lar 1:50 -1:500 oranında nuclease free water ile dilüe edildikten sonra -20°C'de saklandı.

Tablo 25. miRNA ekspresyonu için RT-PCR karışımının hazırlanması

RT-PCR karışımı	
5x Reaction buffer	4.0 µL
Nuclease-free water	9.0 µL
Enzyme mix	1.0 µL
Synthetic RNA spike	2.0 µL
miRNA	4.0 µL
Toplam hacim	20.0 µL

3.2.17.3. Ekspresyon Analizi

HR yolağı ile ilişkili genleri hedef aldığı bilinen hsa-miR-107, hsa-miR-193b-5p ve hsa-miR-1255b-5p ve MDR ile ilişkili genleri hedef aldığı bilinen hsa-miR-298, hsa-miR-326, hsa-miR-328 ve hsa-miR-451a ekspresyon analizleri için miRCURY LNATM Universal RT-PCR primer mix (Exiqon, Danimarka) kullanıldı. Kontrol olarak RNU1A1 ve SNORD44 kullanıldı. Tablo 26 ve 27'de belirtilen koşullarda RT-PCR karışımı ve PCR koşulları gerçekleştirildi. RT-PCR analizi Light Cycler (LC) 480 II (Roche, İsviçre) sisteminde analiz edildi.

Elde edilen veriler "RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5." (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) web tabanlı programda $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile değerlendirildi.

Tablo 26. miRNA ekspresyonu için RT-PCR reaksiyonunun hazırlanması

1 reaksiyon	
ExiLENT SYBR® Green master mix, 2.5ml	5 µl
PCR primer mix	1 µl
Dilüe cDNA	4 µl
Toplam hacim	10 µl

Tablo 27. miRNA ekspresyonu için RT-PCR koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz Aktivasyonu/ Denatürasyon	95	10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	95	10 sn
	60	1 dk
Erime eğrisi analizi	95	1 dk
	65	2 dk
	95	30 sn
	2	∞

3.2.18. Western Blot Analizi

3.2.18.1. Protein İzolasyonu

12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinden protein izolasyonunu gerçekleştirmek için Pierce® IP Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Bu amaçla, 25 cm² flasklara 1x10⁶ olacak şekilde hücre grupları ekildikten sonra, 12 gün boyunca belirlenen konsantrasyonlarda BMN 673 ve BMN 673-KLN ile inkübe edildi. 12. günün sonunda hücre kültürü gruplarından besi ortamı aspire edildikten sonra, soğutulmuş PBS ile yıkandı ve üzerine 500-1000 µl soğuk lizis tamponu eklendikten sonra buzda 5 dk bekletildi. Hücre lizati 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktararak 4°C'de 13.000 x g 'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım 50 µL olacak şekilde alikotlanarak -80°C'de deneyler gerçekleştirilen kadar saklandı.

3.2.18.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için Qubit® Protein Assay Kiti (İnvitrogen, ABD) kullanılarak Qubit®2.0 Fluorometer (İnvitrogen, ABD) cihazında analiz edildi. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları belirlenmeden önce ilk olarak, Qubit® Protein Assay Kiti içerisinde bulunan dilüe BSA standartları 1X buffer ile her bir örneğe 10µl boya eklendikten sonra 15 dk karanlıkta inkübe edildi. Örnekler Qubit®2.0 Fluorometer cihazında okutularak standart eğri grafiği (protein konsantrasyonu-absorbans grafiği) elde edildi. Aynı kit protokolü hücre gruplarından izole edilen proteinler içinde uygulanarak her bir grubun protein konsantrasyonu belirlendi.

3.2.18.3. Örneklerin Hazırlanması

BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinden elde edilen proteinler, 4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels (Bio-Rad, ABD) yüklenmesi için her bir kuyuya 30 µg protein olacak şekilde her bir grubun protein konsantrasyonu hesaplandıktan sonra üzerlerine 7 µl 5X protein loading buffer eklendi ve dH₂O ile toplam hacim 45 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 100°C'de 10 dk bekletildikten sonra 1 dk buza alındı ve jele yüklenmek için hazır hale getirildi.

3.2.18.4. Örneklerin Jele Yüklenmesi

Mini-PROTEAN® cihazında yüklemeye uygun büyüklükteki %4-15 TGX Stain-Free™ Protein jelleri (Bio-Rad, ABD) elektroforez tankına yerleştirildi. 1X TGS tamponu elektroforez tankına eklendikten sonra jelin tarağı çıkarıldı ve kuyucuklar enjektör ve pastör pipeti yardımıyla iyice temizlendi. İlk kuyuya 7 µl Color coded Prestained protein marker, kDa (Cell Signaling Technology (CST), ABD) yüklendikten sonra, diğer kuyulara toplam 45 µl olacak şekilde hazırlanan örnekler yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 100 V'ta yaklaşık 2 saat boyunca yürütüldü.

3.2.18.5. Transfer İşlemi

Transfer işleminin gerçekleşmesi için bir gece önceden 1X TG tamponu hazırlandı ve 4°C'de soğutuldu. Elektroforez tamamlandıktan sonra 2 adet patch (bez), 2 adet filtre kağıdı ve 1 membran 1X TG tamponu ile ıslatıldı. Elektroforez tankından çıkarılan jel açıldıktan sonra patch-filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-patch olacak şekilde sandviç hazırlandı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Bu aşamalar sırasında jel ve membran arasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. 1X TG tamponu içeren elektroforez tankı buz içerisine alındı ve 250mA'de 2 saat yürütülerek jelden membrana doğru protein transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer sonrasında membran üzerine Ponceau S solüsyonu (Sigma Aldrich) eklenerek 1 dk çalkalandı ve transfer işleminin başarısı kontrol edildi. Proteinler membranda görüntüledikten sonra önce dH₂O ve sonrasında hazırlanan %0.1 Tween 20 içeren 1X TBS (100 µL TBS+ 900 µl dH₂O) tamponu ile membran yıkanarak bloklama işlemine hazırlandı.

3.2.18.6. Bloklama

Transfer sonrası membran oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5'lik süt tozu veya BSA içeren TTBS çözeltisi (bloklama çözeltisi) içinde çalkalayıcıda inkübe edildi. Bu süre sonunda membran 3 kez TTBS tamponu ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.2.18.7. Birincil Antikor ile İnkübasyon

Membran, farklı oranlarda bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş HR ve MDR yolağı ile ilişkili mouse anti-γH2AX (ab26350, 1:500), rabbit anti-PARP (ab32138, 1:1000), mouse anti-BRCA1 (ab16781, 1:500), mouse anti-RAD51 (ab1837, 1:500), mouse anti-MDR1 (ab3083, 1:100), mouse anti-BCRP (ab130244, 1:250), mouse anti-MRP1

(ab24102, 1:100) ve mouse anti-beta-Actin (ab8226, 1:2000) birincil antikorlar ile 4°C'de bir gece boyunca çalkalayıcıda (25 rpm) inkübe edildi. Bu süre sonunda membran 3 kez TTBS tamponu ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.2.18.8. İkincil Antikor ile İnkübasyon

Membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab6789, 1:2000) ve Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721, 1:2000) ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda membran 3 kez TTBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.2.18.9. Görüntüleme

İşaretlenen proteinlerin görüntülenmesi için membran 1:1 oranında hazırlanan Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad, ABD) ile 5 dk inkübe edildi ve C-Digit (LI-COR, ABD) cihazında görüntülendi ve belirlenen proteinlerin ekspresyon seviyelerinde kat değişimleri analiz edildi.

3.2.19. İmmün Floresan Görüntüleme

3.2.19.1. Hücrelerin Hazırlanması

HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücreleri önceden UV altında steril edilen her bir lamele 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildikten sonra, hücrelere 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulandı. 12 gün sonunda hücreler %4 paraformaldehit ile 15 dk boyunca oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler PBS ile 3 kez 5 dk boyunca yıkandı.

3.2.19.2. Permeabilizasyon

Fikse olan hücreler %0.1 Triton X-100 içeren PBS ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra 3 kez PBS ile hızlı bir şekilde yıkandı.

3.2.19.3. Bloklama

Fikse olan hücreler %1 BSA ve %5 keçi serumu içeren PBS ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak (25 rpm) bloklandı. Bu süre sonunda hücreler 3 kez PBS ile 5 dk boyunca yıkandı.

3.2.19.4. Birincil Antikor ile İnkübasyon

Hücreler, farklı oranlarda bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş HR ve MDR yolağı ile ilişkili mouse anti- γ H2AX (ab26350, 1:250), rabbit anti-PARP (ab32138, 1:200), mouse anti-BRCA1 (ab16781, 1:200), mouse anti-RAD51 (ab1837, 1:10), mouse anti-MDR1 (ab3083, 1:20), mouse anti-BCRP (ab130244, 1:200), mouse anti-MRP1 (ab24102, 1:50) ve f mouse anti-beta-actin (ab8226, 1:200) birincil antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak (25 rpm) inkübe edildi. Dilüsyon oranı her antikor için ayrı olarak belirlendi. Bu süre sonunda membran 3 kez PBS tamponu ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.2.19.5. İkincil Antikor ile İnkübasyon

Membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş “Goat Anti-Mouse IgG H&L” (Alexa Fluor® 488) (ab150117, 1:1000) ve “Goat Anti-Rabbit IgG H&L” (Alexa Fluor® 488) (ab150081, 1:1000) ikincil antikor ile oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda membran 3 kez PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkandı.

3.2.19.6. Görüntüleme

Yıkanan lameller 1-3 dk boyunca hazırlanan DAPI boyası (1:1000) (Sigma Aldrich) ile inkübe edildi ve ardından 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı. Her bir lam üzerine 1 damla Prolong® Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, ABD) damlatıldı ve lameller lamaların üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Hazırlanan preparatların 2-3 saat kuruması beklendikten sonra EVOS Flouid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, ABD) sisteminde görüntülendi.

3.2.20. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi

BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, her bir flaska 1×10^7 olacak şekilde HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücreleri ekildikten 24 saat sonra, 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN ile 12 gün boyunca hücreler inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak hücrelerin TEM'de (JEOL, Japonya) incelenmesi için takip protokolüne geçildi.

Takip Protokolü

1. **Fiksasyon:** Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 karıştırılarak hazırlanan gluteraldehit tamponunda incelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler 4-24 saat arasında $+4^\circ\text{C}$ 'de fikse edildi.
2. **Yıkama:** Fikse olmuş hücrelerden fiksatifi uzaklaştırmak için hücreler tampon çözeltisi ile yıkandı (3x15 dk.).
3. **İkinci Tespit (Osmium Tetroksit):** Yıkanan hücreler % 1'lik OSO_4 içerisinde alınarak $+4^\circ\text{C}$ 'de 1-2 saat boyunca fikse olmaları sağlandıktan sonra tampon ile 3x15 dk. yıkanarak fiksatif uzaklaştırıldı.
4. **Agara gömme:** %2-4 oranında hazırlanan agar karışımına hücre pelletleri gömülerek hücrelerin doku benzeri yapı alması sağlandı.
5. **Dehidratasyon:** Farklı dilüsyonda hazırlanan etil alkol serileri ile (%50-100) hücrelerden suyun uzaklaştırılması sağlandı.
 - % 50 Alkol 15 dk.x2 $+4^\circ\text{C}$
 - % 70 Alkol 15 dk.x2 $+4^\circ\text{C}$
 - % 90 Alkol 15 dk.x2 $+4^\circ\text{C}$
 - % 96 Alkol 30 dk.x2 $+4^\circ\text{C}$
 - Absolu Alkol 30 dk.x1 $+4^\circ\text{C}$
 - Absolu Alkol 30 dk.x1 $+25^\circ\text{C}$
6. **Şeffaflandırma:** Öncelikle hücreler, propilenoksit (30 dk.x2) ile sonrasında 1:1 oranında resin + propilen oksit (1:1) karışımında 1 saat boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de rotatörde bekletildi.
7. **Bloklama:** Taze hazırlanmış resine hücrelere gömülerek polimerizasyon için 48 saat boyunca 60°C 'de bekletildi ve hücre blokları elde edildi.
8. **Kesitlerin Boyanması:** Elde edilen bloklardan tam ince kesit alındıktan sonra, uranil asetat boyası ile gridler 45-60 dk. bekletildikten sonra distile su ile yıkanarak fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı.
9. **Kurşun Sitrat Boyasının Hazırlanması:** Son aşamada gridler kurşun sitrat ile karanlıkta boyanarak TEM'de (JEOL, Japonya) incelenmeye alındı.

3.2.21. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm istatistiksel analizler için GraphPad Prism 6.0 ve SPSS (20.0) programları kullanıldı. Verilere ait tanımlayıcı istatistikler sayı, yüzde, ortalama ve standart sapma olarak verildi ve gruplar arası farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile araştırıldı. Farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için Posthoc Tukey testinden yararlanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. mRNA ve miRNA ekspresyon seviyeleri ve kat değişimleri web tabanlı “RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5.” programından yararlanılarak bağımsız t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

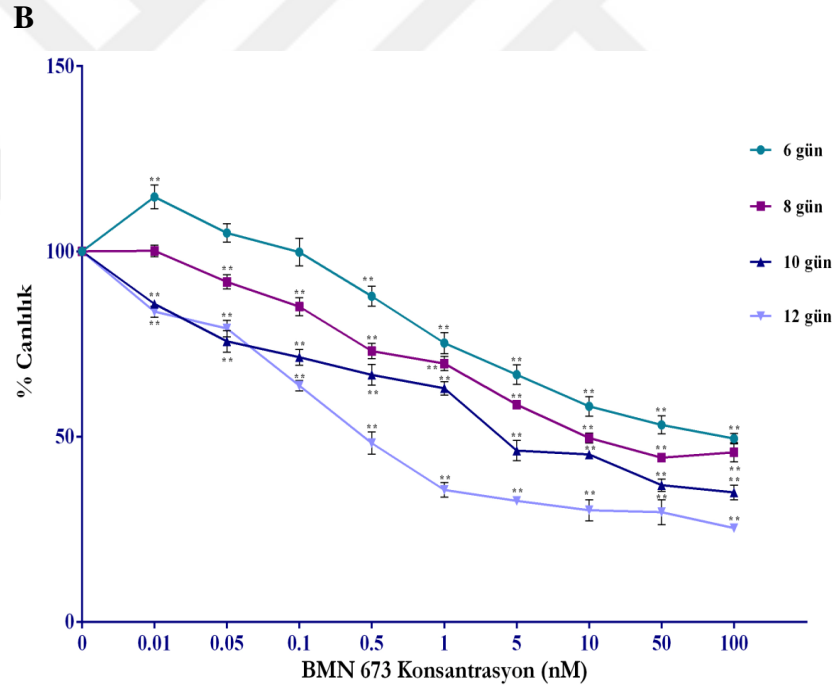
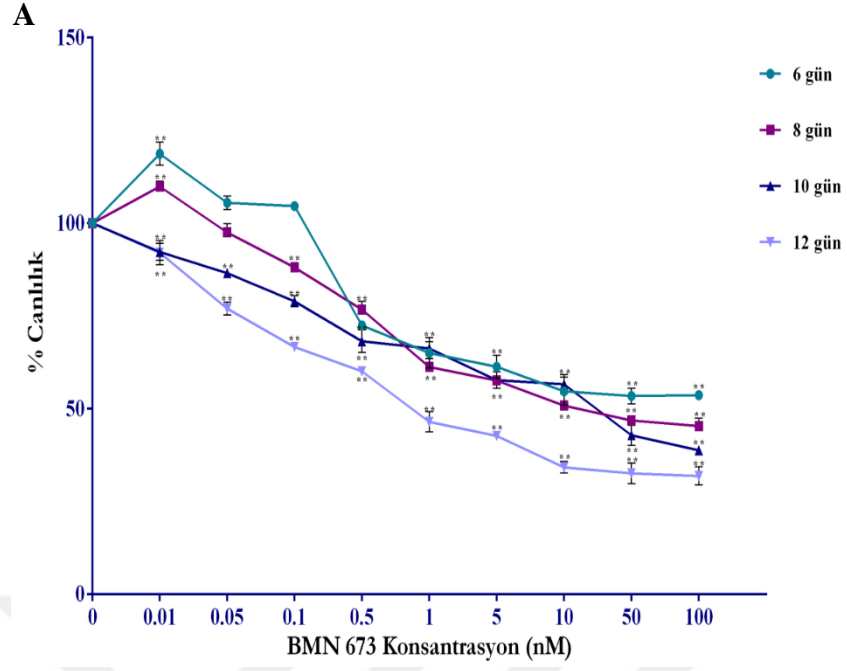


4. BULGULAR

4.1. BMN 673'ün Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673'ün HCC1937 ve MCF-10A hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi hem doza hemde zamana bağlı olarak WST-1 analizi ile değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 31 ve 32'de sunuldu.

HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 96'lı plakaların her bir kuyu başına 1000 (Şekil 31_(A)) ve 2000 hücre (Şekil 31_(B)) ekilen deneyde, 6. günde minimum doz (0.01 nM) uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %118.7 ve %114.7 iken, maksimum doz (100 nM) uygulandığında canlılık oranlarının sırasıyla %53.7 ve %49.5'e düştüğü belirlendi ($p < 0.01$). 6 gün boyunca 0.01-100 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde canlılık düzeyleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($F_{(9, 20)}=321.592$; $F_{(9, 20)}=246.985$, $p < 0.01$) (Tablo 28). 12. günde ise, 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde canlılık oranları 1000 ve 2000 hücre için sırasıyla %88.7 ve %82.4 iken, 100 nM BMN 673 uygulandığında canlılık oranlarının sırasıyla %31.8 ve %25.3'e düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($F_{(9, 20)}= 457.465$; $F_{(9, 20)}= 503.313$, $p < 0.01$). HCC1937 hücrelerinde uygulanan BMN 673'ün doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 29'da özetlendi. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün IC_{50} konsantrasyonu 1000 ve 2000 hücre sayısı için sırasıyla 0.88 ± 0.09 nM ve 0.47 ± 0.08 nM olarak hesaplandı.



Şekil 31. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

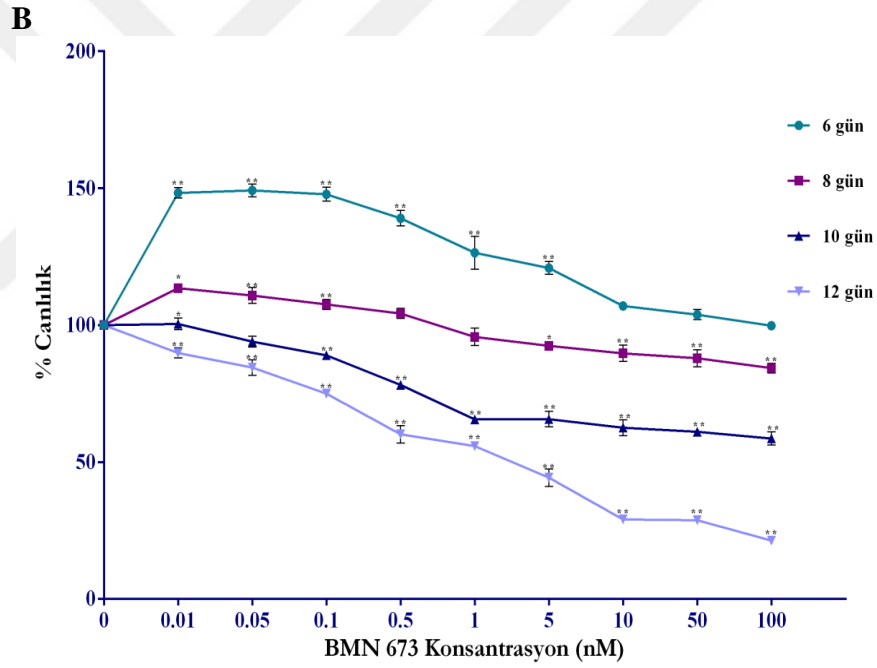
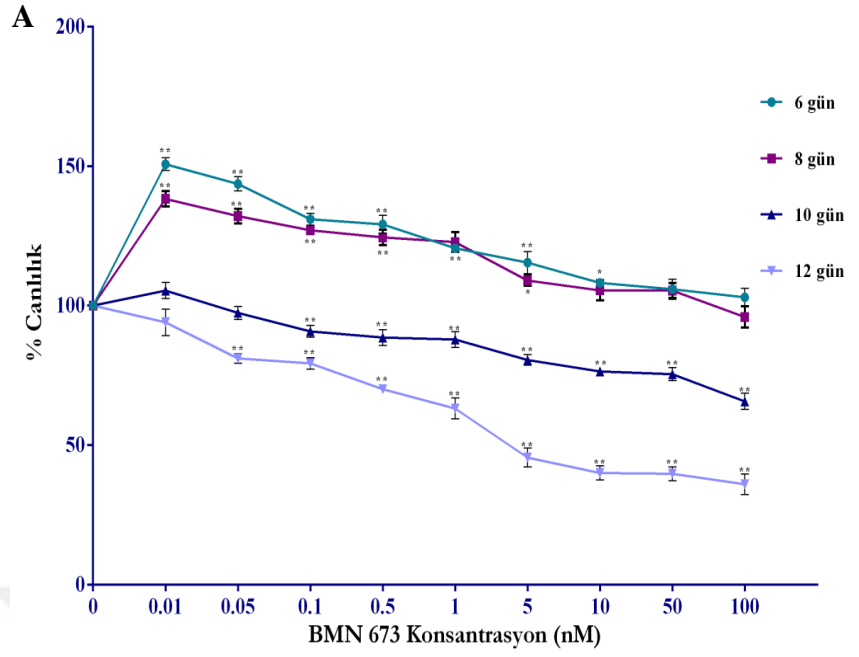
Tablo 28. BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplam	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	17433.751	9	1937.083	321.592	.000
		Grup içi	120.469	20	6.023		
		Toplam	17554.219	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	15738.763	9	1748.751	668.513	.000
		Grup içi	52.318	20	2.616		
		Toplam	15791.080	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	11388.875	9	1265.431	311.322	.000
		Grup içi	81.294	20	4.065		
		Toplam	11470.169	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	16871.971	9	1874.663	457.465	.000
		Grup içi	81.959	20	4.098		
		Toplam	16953.930	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	15008.014	9	1667.557	246.985	.000
		Grup içi	135.033	20	6.752		
		Toplam	15143.047	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	12827.028	9	1425.225	460.320	.000
		Grup içi	61.923	20	3.096		
		Toplam	12888.951	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	12600.702	9	1400.078	345.298	.000
		Grup içi	81.094	20	4.055		
		Toplam	12681.796	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	19586.261	9	2176.251	503.313	.000
		Grup içi	86.477	20	4.324		
		Toplam	19672.738	29			

Tablo 29. BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE				
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	
6. GÜN	0.01	118.70	3.08	-18.70106	.000	114.74	3.19	-14.74899	.000	
	0.05	105.48	1.84	-5.48547	.224	105.01	2.47	-5.01388	.395	
	0.1	104.61	1.17	-4.61143	.429	99.82	3.74	.17111	1.000	
	0.5	72.44	1.02	27.55314	.000	87.93	2.70	12.06667	.000	
	1	65.04	4.05	34.95885	.000	75.26	2.84	24.73282	.000	
	5	61.28	3.07	38.71168	.000	66.76	2.66	33.23390	.000	
	10	54.72	3.75	45.27263	.000	58.18	2.62	41.81385	.000	
	50	53.42	2.11	46.57302	.000	53.17	2.41	46.82455	.000	
	100	53.66	.63	46.33874	.000	49.48	1.37	50.51638	.000	
8. GÜN	0.01	109.87	1.39	-9.87201	.000	100.16	1.59	-.16097	1.000	
	0.05	97.50	2.36	2.49907	.674	91.81	1.90	8.18987	.000	
	0.1	88.09	1.12	11.90720	.000	85.10	2.44	14.89867	.000	
	0.5	76.69	2.20	23.30667	.000	73.13	2.05	26.86686	.000	
	1	61.22	2.24	38.77667	.000	69.76	1.90	30.23192	.000	
	5	57.57	.81	42.42333	.000	58.67	1.16	41.32333	.000	
	10	50.80	1.22	49.20000	.000	49.66	1.36	50.33667	.000	
	50	46.84	1.00	53.15667	.000	44.32	.87	55.67667	.000	
	100	45.36	2.07	54.64000	.000	45.80	2.63	54.19333	.000	
10. GÜN	0.01	92.27	2.24	7.72690	.004	85.85	1.05	14.14667	.000	
	0.05	86.52	.93	13.47819	.000	75.74	2.92	24.25373	.000	
	0.1	78.92	1.48	21.07315	.000	71.43	2.14	28.56333	.000	
	0.5	68.19	3.07	31.80428	.000	66.71	2.82	33.28314	.000	
	1	66.25	1.79	33.74171	.000	63.06	1.80	36.93333	.000	
	5	57.68	2.21	42.31812	.000	46.25	2.72	53.74987	.000	
	10	56.57	2.53	43.42369	.000	45.20	1.01	54.79831	.000	
	50	42.82	2.69	57.17678	.000	36.93	1.64	63.06902	.000	
	100	38.79	1.13	61.21000	.000	34.96	1.97	65.03627	.000	
12. GÜN	0.01	92.03	3.26	7.96295	.003	83.76	1.52	16.24000	.000	
	0.05	76.97	1.68	23.03000	.000	79.19	2.17	20.80699	.000	
	0.1	66.65	.76	33.34652	.000	63.80	1.41	36.19667	.000	
	0.5	60.08	1.22	39.91007	.000	48.28	3.01	51.71961	.000	
	1	46.43	2.71	53.56253	.000	35.65	2.00	64.34408	.000	
	5	42.67	1.24	57.32290	.000	32.66	.72	67.33189	.000	
	10	34.21	1.54	65.78939	.000	30.15	2.84	69.84464	.000	
	50	32.56	2.80	67.43811	.000	29.61	3.34	70.38108	.000	
	100	31.88	2.49	68.11669	.000	25.32	1.10	74.67667	.000	

BMN 673'ün MCF-10A kontrol hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendiğinde ise, kuyu başına 500 (Şekil 32_(A)) ve 1000 hücre (Şekil 32_(B)) ekilen deneyde, 6.günde 0.01 nM BMN673 uygulanan hücrelerde canlılık oranı sırasıyla %150.7 ve %151.6 ulaşmış iken, 100 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde canlılık oranlarının sırasıyla %103 ve %100.1'e düşerek canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($F_{(9, 20)} = 132.789$; $F_{(9, 20)} = 183.303$, $p < 0.01$) (Tablo 30). 12. günde ise, minimum dozda (0.01 nM) 500 ve 1000 hücre için canlılık oranları sırasıyla %94.0 ve %89.9 iken, maksimum dozda canlılık oranları sırasıyla %36 ve %21.4'e düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($F_{(9, 20)} = 200.742$; $F_{(9, 20)} = 597.465$, $p < 0.01$) (Tablo 30). MCF-10A hücrelerinde uygulanan BMN 673'ün doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 31'de özetlendi. Özellikle 1 nM BMN 673 uygulanmasından itibaren MCF-10A hücrelerinde canlılığın önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p < 0.01$). 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün IC_{50} konsantrasyonu 500 ve 1000 hücre için sırasıyla 3.99 ± 0.74 ve 3.11 ± 0.46 nM olarak hesaplandı.



Şekil 32. Her bir kuyu için (A) 500 ve (B) 1000 hücre olacak şekilde ekilen MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Tablo 30. BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
500 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	8245.939	9	916.215		
		Grup içi	137.995	20	6.900	132.789	.000
		Toplam	8383.935	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	5778.106	9	642.012		
		Grup içi	148.856	20	7.443	86.260	.000
		Toplam	5926.962	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	4120.539	9	457.838		
		Grup içi	108.369	20	5.418	84.496	.000
		Toplam	4228.909	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	15113.510	9	1679.279		
		Grup içi	167.307	20	8.365	200.742	.000
		Toplam	15280.817	29			
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	11672.991	9	1296.999		
		Grup içi	141.514	20	7.076	183.303	.000
		Toplam	11814.506	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	2790.053	9	310.006		
		Grup içi	99.195	20	4.960	62.504	.000
		Toplam	2889.248	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	7709.832	9	856.648		
		Grup içi	79.232	20	3.962	216.237	.000
		Toplam	7789.065	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	20976.130	9	2330.681		
		Grup içi	78.019	20	3.901	597.465	.000
		Toplam	21054.149	29			

Tablo 31. BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE				2000 HÜCRE				
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P
6. GÜN	0.01	150.72	2.22	-50.72373	.000	148.31	1.95	-48.31744	.000
	0.05	143.62	2.54	-43.62375	.000	149.22	2.33	-49.22812	.000
	0.1	130.95	2.13	-30.95512	.000	147.80	2.55	-47.80411	.000
	0.5	129.16	3.14	-29.16844	.000	139.03	2.83	-39.03971	.000
	1	120.58	1.38	-20.58972	.000	126.43	5.97	-26.43682	.000
	5	115.46	3.96	-15.46059	.000	120.91	2.29	-20.91396	.000
	10	108.18	1.58	-8.18498	.028	107.00	.51	-7.00851	.093
	50	105.87	3.56	-5.87801	.223	103.86	1.81	-3.86674	.739
	100	103.01	3.19	-3.01928	.911	99.80	1.54	.19582	1.000
	8. GÜN	0.01	138.29	2.79	-38.29139	.000	113.50	1.32	-13.50649
0.05		132.08	2.59	-32.08807	.000	110.85	2.91	-10.85807	.000
0.1		127.01	1.35	-27.01383	.000	107.57	1.80	-7.57737	.013
0.5		124.48	2.77	-24.48233	.000	104.29	1.78	-4.29684	.395
1		122.80	3.56	-22.80036	.000	95.74	3.19	4.25228	.408
5		108.98	1.77	-8.98037	.018	92.44	.95	7.56000	.014
10		105.49	3.55	-5.49525	.341	89.75	2.97	10.24778	.001
50		105.41	2.71	-5.41448	.359	87.91	3.13	12.08060	.000
100		95.92	3.80	4.07858	.710	84.31	1.77	15.68720	.000
10. GÜN		0.01	105.44	2.94	-5.44152	.181	100.48	2.13	-.48377
	0.05	97.39	2.32	2.60190	.923	94.04	1.99	5.95570	.039
	0.1	90.74	2.12	9.25191	.003	89.00	1.55	10.99561	.000
	0.5	88.56	2.80	11.43333	.000	78.17	1.34	21.82166	.000
	1	87.84	2.86	12.15285	.000	65.59	1.46	34.40392	.000
	5	80.51	1.90	19.48944	.000	65.72	2.83	34.27742	.000
	10	76.43	1.60	23.56939	.000	62.55	2.93	37.44650	.000
	50	75.47	2.31	24.52718	.000	61.10	1.52	38.89642	.000
	100	65.72	2.83	34.27742	.000	58.62	2.38	41.37521	.000
	12. GÜN	0.01	94.00	4.71	5.99090	.307	89.88	1.89	10.11341
0.05		81.08	1.71	18.91639	.000	84.53	2.82	15.46747	.000
0.1		79.30	2.05	20.69686	.000	75.04	1.29	24.95644	.000
0.5		70.04	1.57	29.95375	.000	60.16	3.17	39.83446	.000
1		63.17	3.76	36.82172	.000	55.87	1.56	44.12878	.000
5		45.57	3.39	54.42701	.000	44.32	3.12	55.67986	.000
10		40.06	2.59	59.93419	.000	29.07	.95	70.92858	.000
50		39.73	2.48	60.26229	.000	28.82	1.41	71.17801	.000
100		35.98	3.61	64.01830	.000	21.38	.767	78.61328	.000

Sonuç olarak; BMN 673, HCC1937 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik aktiviteye sahip olmasına rağmen, kontrol grubu olan MCF-10A hücrelerinde de doza ve zamana bağlı olarak artan toksik etkiye sahiptir ($p < 0.01$).

4.2. BMN 673'ün HCC1937-R Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

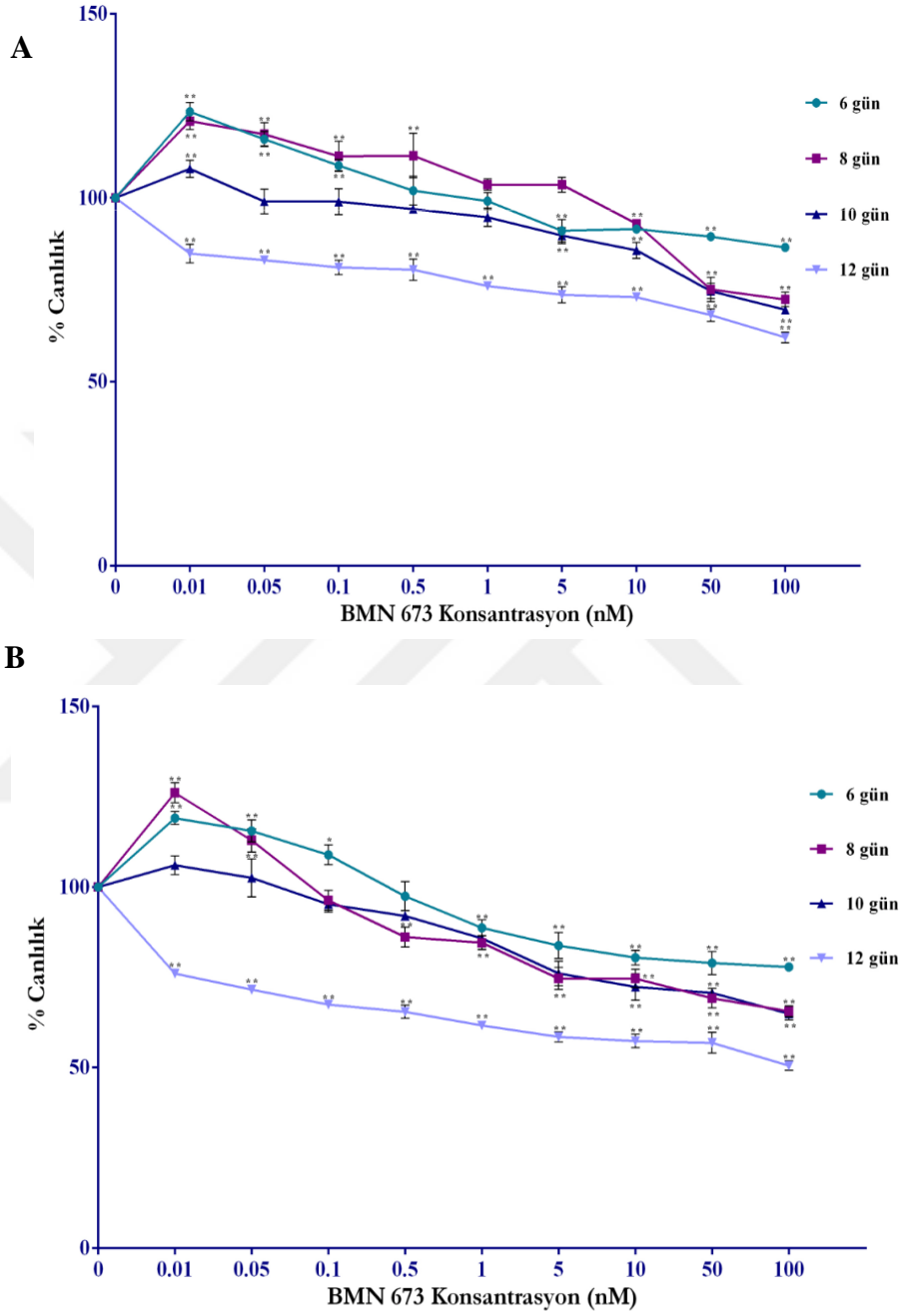
HCC1937-R hücrelerinin elde edilmesi için, HCC1937 hücrelerine düzenli olarak 0.01 nM BMN 673 uygulanarak, her ayın sonunda hücrelere 0.01-100 nM BMN 673 uygulandıktan 12 gün sonra hücrelerde BMN 673'e karşı gelişen direnç katsayıları hesaplandı (Tablo 32).

Tablo 32. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda BMN 673'e karşı her ayın sonunda gelişen direnç katsayıları.

	BMN 673 Konsantrasyon (nM)	Direnç derecesi (-kat)					
		1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay
(A) 1000 hücre	0.01	-	1.0	1.2	1.3	1.3	2.4
	0.1	1.2	1.3	1.5	1.5	1.6	1.7
	1	1.6	1.8	1.9	2.0	2.0	2.3
	10	2.0	2.2	2.3	2.3	2.5	2.7
	100	2.0	2.0	2.1	2.2	2.3	2.5
(B) 2000 hücre	0.01	-	1.2	1.3	1.3	1.3	1.4
	0.1	1.0	1.4	1.6	1.6	1.6	1.3
	1	1.7	2.4	2.3	2.4	2.6	2.7
	10	1.9	2.4	2.4	2.5	2.8	2.9
	100	2	2.1	2.4	2.7	2.9	3.1

1. ayın sonunda BMN 673'ün HCC1937-R hücreleri üzerinde etkisi değerlendirildiğinde; 1000 (Şekil 33_(A)) ve 2000 hücre (Şekil 33_(B)) olacak şekilde ekilen ve 6 gün boyunca 0.01 nM BMN673 uygulanan HCC1937-R canlılık oranı sırasıyla %124.4 ve %120.4 iken, maksimum doz (100 nM) uygulandığında canlılık oranlarının sırasıyla %86.5 ve %77.8'e düştüğü belirlendi ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($F_{(9, 20)}= 97.777$; $F_{(9, 20)}= 103.410$, $p<0.01$) (Tablo 33). 12. Günde ise, 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %84.9 ve %76.0 belirlenmesine rağmen, 100 nM BMN 673 uygulandığında canlılığın sırasıyla %62.0 ve %52.5'e düştüğü ve bu değişimin canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($F_{(9, 20)}= 102.310$; $F_{(9, 20)}= 264.107$, $p<0.01$) (Tablo 33). Ayrıca, 6 gün boyunca 10 nM BMN 673'e maruz kalan HCC1937-R hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %90.8 ve %80.4 iken, 12 günün sonunda canlılık oranlarının sırasıyla %72.9 ve %59.0'a azaldığı belirlendi. HCC1937-R hücrelerinde uygulanan BMN 673'ün doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 34'de özetlendi. Sonuç olarak, HCC1937-R hücrelerinde 1. ayın sonunda 12 gün boyunca uygulanan 10 ve 100 nM BMN 673'e

karşı, 1000 hücre için sırasıyla 2.13- ve 1.95-kat ve 2000 hücre için sırasıyla 1.94- ve 2.01- kat direnç geliştiği tespit edildi.



Şekil 33. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde 1. ayın sonunda BMN 673'ün sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

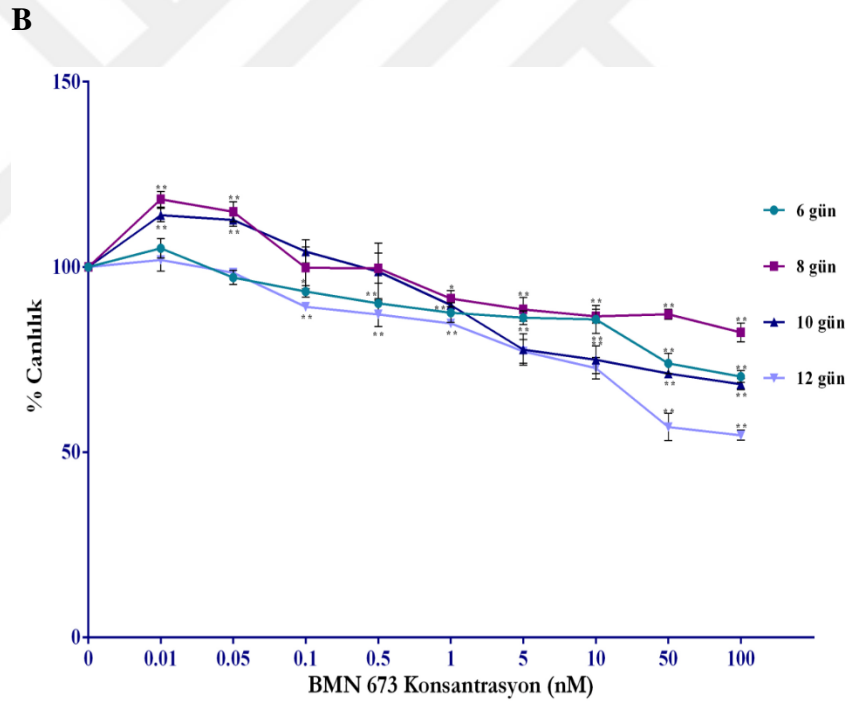
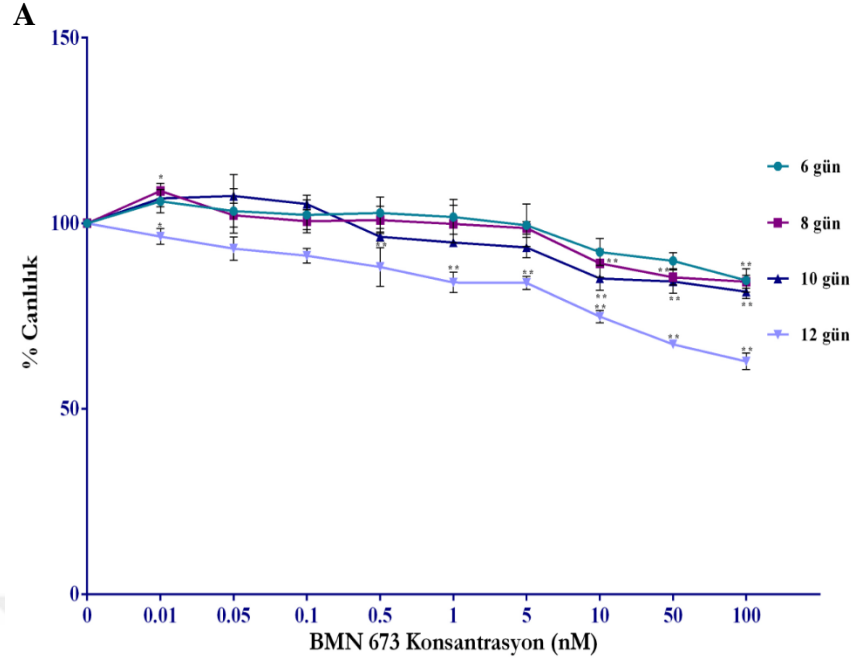
Tablo 33. 1 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	3968.758	9	440.973		
		Grup içi	90.199	20	4.510	97.777	.000
		Toplam	4058.957	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	7335.583	9	815.065		
		Grup içi	179.003	20	8.950	91.067	.000
		Toplam	7514.586	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	3876.273	9	430.697		
		Grup içi	100.499	20	5.025	85.711	.000
		Toplam	3976.772	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	2911.924	9	323.547		
		Grup içi	63.248	20	3.162	102.310	.000
		Toplam	2975.172	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	6468.485	9	718.721		
		Grup içi	139.005	20	6.950	103.410	.000
		Toplam	6607.489	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	10508.067	9	1167.563		
		Grup içi	123.732	20	6.187	188.724	.000
		Toplam	10631.799	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	5866.628	9	651.848		
		Grup içi	155.826	20	7.791	83.664	.000
		Toplam	6022.454	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	5280.821	9	586.758		
		Grup içi	44.433	20	2.222	264.107	.000
		Toplam	5325.254	29			

Tablo 34. 1 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE				2000 HÜCRE				
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p
6. GÜN	0.01	123.40	2.44	-23.40150	.000	119.05	1.80	-19.05981	.000
	0.05	115.96	2.07	-15.96065	.000	115.51	3.01	-15.51636	.000
	0.1	108.77	1.62	-8.77530	.002	108.90	2.75	-8.90666	.014
	0.5	101.95	3.90	-1.95984	.975	97.46	4.06	2.53128	.968
	1	99.10	2.29	.89228	1.000	88.69	2.16	11.30958	.001
	5	91.08	2.99	8.91961	.002	83.75	3.60	16.24899	.000
	10	91.54	1.17	8.46000	.003	80.43	2.01	19.56553	.000
	50	89.44	.70	10.55333	.000	78.93	3.19	21.06310	.000
	100	86.49	.91	13.50667	.000	77.81	1.01	22.18667	.000
	8. GÜN	0.01	120.83	2.29	-20.83855	.000	126.09	2.72	-26.09099
0.05		117.30	3.14	-17.30301	.000	112.91	3.22	-12.91416	.000
0.1		111.31	4.02	-11.31618	.005	96.29	2.74	3.70158	.715
0.5		111.43	6.04	-11.43716	.004	86.16	2.76	13.83186	.000
1		103.59	1.52	-3.59685	.888	84.55	1.84	15.44513	.000
5		103.56	2.02	-3.56203	.893	74.67	3.06	25.32211	.000
10		92.97	.38	7.02524	.177	74.65	2.55	25.34735	.000
50		75.07	3.33	24.92187	.000	69.17	2.69	30.82234	.000
100		72.36	1.98	27.63667	.000	65.56	1.50	34.43333	.000
10. GÜN		0.01	107.87	2.34	-7.87238	.010	106.04	2.60	-6.04965
	0.05	99.00	3.37	.99487	1.000	102.53	5.27	-2.53174	.978
	0.1	98.95	3.48	1.04867	1.000	95.24	2.22	4.75988	.554
	0.5	96.93	.78	3.06307	.797	91.99	.24	8.00730	.053
	1	94.71	2.48	5.28708	.173	85.77	3.13	14.22469	.000
	5	89.75	2.14	10.24015	.001	76.08	3.39	23.91590	.000
	10	85.75	2.16	14.24200	.000	72.29	3.68	27.70025	.000
	50	74.66	2.07	25.33685	.000	70.66	.63	29.33560	.000
	100	69.56	.87	30.43333	.000	64.91	1.71	35.09000	.000
	12. GÜN	0.01	84.84	2.55	15.15417	.000	76.02	1.01	23.97349
0.05		83.06	1.16	16.93051	.000	71.58	1.01	28.41667	.000
0.1		81.11	1.96	18.88975	.000	67.46	.96	32.54000	.000
0.5		80.45	2.85	19.54764	.000	65.44	1.79	34.55694	.000
1		76.04	.78	23.95138	.000	61.66	.77	38.33147	.000
5		73.63	2.17	26.36229	.000	58.47	1.40	41.52979	.000
10		72.97	1.16	27.02895	.000	57.30	1.85	42.69273	.000
50		68.14	1.69	31.85673	.000	56.86	2.86	43.13078	.000
100		62.07	1.47	37.92667	.000	50.55	1.33	49.44760	.000

İki ay boyunca 0.01 nM BMN673'e maruz kalan HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisi incelendiğinde, 1000 (Şekil 34_(A)) ve 2000 hücre (Şekil 34_(B)) olacak şekilde ekilen ve 6 gün boyunca 0.01 nM BMN673'e uygulanan HCC1937-R hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %106.0 ve %105.0 iken, 100 nM BMN 673 uygulandığında canlılık oranları sırasıyla %84.6 ve %70.4 olarak analiz edildi ve canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($F(9, 20)= 8.808$; $F(9, 20)= 72.039$, $p<0.01$) (Tablo 35). 12. Günün sonunda ise, 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %96.5 ve %101.9 olarak belirlenmesine rağmen, 100 nM BMN 673 uygulandığında bu oranların sırasıyla %62.8 ve %54.5'e düştüğü ve canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu analiz edildi ($F(9, 20)= 70.932$; $F(9, 20)= 153.010$, $p<0.01$) (Tablo 35). Ayrıca, 10 nM BMN 673 uygulandıktan 6 gün sonra hücrelerin canlılık oranları sırasıyla %92.3 ve %85.8 iken, 12 günün sonunda canlılık oranlarının sırasıyla %74.9 ve %72.7 düştüğü belirlendi. HCC1937-R hücrelerinde uygulanan BMN 673'ün doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 36'da özetlendi. Sonuç olarak, iki ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde 12 günün sonunda 0.01, 10 ve 100 nM BMN 673'e karşı 1000 hücre için sırasıyla 1.0-, 2.19- ve 2.0- kat, 2000 hücre için 1.2-, 2.4- ve 2.1- kat direnç geliştiği belirlendi.



Şekil 34. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde 2. ayın sonunda BMN 673'ün sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

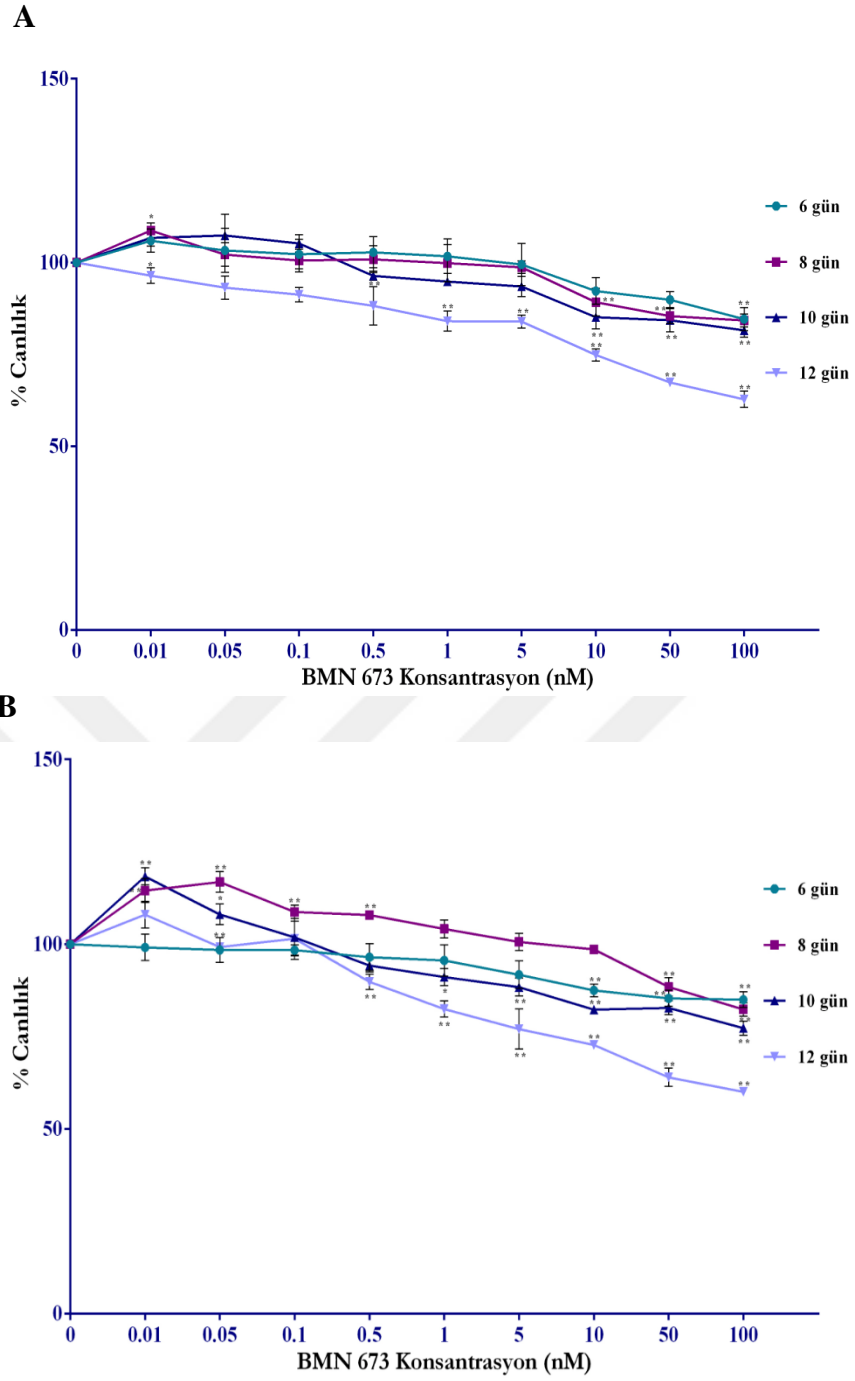
Tablo 35. 2 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1291.084	9	143.454	8.808	.000
		Grup içi	325.730	20	16.286		
		Toplam	1616.814	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1708.285	9	189.809	21.572	.000
		Grup içi	175.976	20	8.799		
		Toplam	1884.261	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	2442.311	9	271.368	35.951	.000
		Grup içi	150.964	20	7.548		
		Toplam	2593.275	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	4127.723	9	458.636	70.932	.000
		Grup içi	129.318	20	6.466		
		Toplam	4257.041	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	3170.126	9	352.236	72.039	.000
		Grup içi	97.790	20	4.889		
		Toplam	3267.916	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	3943.053	9	438.117	50.539	.000
		Grup içi	173.377	20	8.669		
		Toplam	4116.430	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	7972.164	9	885.796	77.546	.000
		Grup içi	228.458	20	11.423		
		Toplam	8200.622	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	7731.565	9	859.063	153.010	.000
		Grup içi	112.289	20	5.614		
		Toplam	7843.854	29			

Tablo 36. 2 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE			
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P
6. GÜN	0.01	105.95	3.13	-5.95395	.724	105.04	2.63	-5.04961	.203
	0.05	103.32	6.04	-3.32160	.988	97.15	1.88	2.84261	.845
	0.1	102.28	4.00	-2.28538	.999	93.40	1.54	6.59326	.040
	0.5	102.80	4.26	-2.80283	.996	90.18	1.21	9.81132	.001
	1	101.69	4.68	-1.69558	1.000	87.66	2.64	12.33837	.000
	5	99.49	5.72	.50826	1.000	86.30	1.87	13.69916	.000
	10	92.26	3.60	7.73253	.404	85.82	3.74	14.17237	.000
	50	89.89	2.20	10.10759	.125	73.96	2.71	26.03084	.000
	100	84.60	3.12	15.39418	.004	70.40	1.60	22.18667	.000
	8. GÜN	0.01	108.70	2.09	-8.70871	.045	118.25	2.12	-18.25678
0.05		102.16	3.20	-2.16153	.995	114.88	2.69	-14.88892	.000
0.1		100.56	3.11	-.56209	1.000	99.79	5.63	.20150	1.000
0.5		100.86	3.67	-.86153	1.000	99.63	4.10	.36527	1.000
1		99.84	5.04	.15798	1.000	91.45	2.15	8.54368	.049
5		98.71	1.71	1.28103	1.000	88.55	3.17	11.44755	.004
10		89.21	3.79	10.78469	.007	86.68	1.82	13.31831	.001
50		85.41	2.03	14.58285	.000	87.21	1.38	12.78081	.001
100		84.22	1.79	15.77912	.000	82.35	2.53	17.65002	.000
10. GÜN		0.01	106.69	2.25	-6.69743	.146	113.99	1.83	-13.99539
	0.05	107.39	5.70	-7.39362	.081	112.70	1.74	-12.70480	.005
	0.1	105.18	2.33	-5.18525	.423	104.19	3.14	-4.19075	.869
	0.5	96.36	1.24	3.63719	.823	98.73	7.71	1.26363	1.000
	1	94.83	.65	5.16673	.428	89.71	1.76	10.28226	.034
	5	93.47	2.73	6.52670	.167	77.66	4.23	22.33214	.000
	10	85.10	3.11	14.89715	.000	74.93	3.73	25.06963	.000
	50	84.29	3.13	15.70217	.000	71.21	1.10	28.78122	.000
	100	81.56	1.85	18.44002	.000	68.32	1.48	35.09000	.000
	12. GÜN	0.01	96.45	2.16	3.54772	.779	101.91	3.03	-1.91145
0.05		93.16	3.12	6.83366	.082	98.46	.94	1.53657	.998
0.1		91.25	1.94	8.74636	.012	89.25	.74	10.74567	.001
0.5		88.19	5.24	11.80382	.000	87.21	3.30	12.78853	.000
1		84.06	2.72	15.93856	.000	84.75	.71	15.24822	.000
5		83.92	1.78	16.07301	.000	77.20	3.23	22.79727	.000
10		74.83	1.61	25.16666	.000	72.70	2.89	27.29933	.000
50		67.36	.92	32.63033	.000	56.79	3.66	43.20940	.000
100		62.77	2.19	37.22295	.000	54.53	1.33	45.46114	.000

Üç ay boyunca BMN 673'e maruz kalan HCC-1937 hücrelerinde BMN 673'e karşı gelişen direncin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen WST-1 analizi sonucunda, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan 1000 (Şekil 35_(A)) ve 2000 hücre (Şekil 35_(B)) olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %106.4 ve %99.1 iken, maksimum dozda bu oranların sırasıyla %85.1 ve %85.0'e düşerek canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlendi ($F(9, 20)= 30.598$; $F(9, 20)= 12.678$, $p<0.01$) (Tablo 37). 12. günün sonunda ise 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %105.7 ve %107.8 iken, 100 nM BMN 673 uygulandığında bu oranların sırasıyla %68.8 ve %60.0'a azaldığı ve canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı ($F(9, 20)= 86.512$; $F(9, 20)= 103.832$, $p<0.01$) (Tablo 37). Ayrıca, 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde 6. günün sonunda canlılık oranı sırasıyla %93.2 ve %87.4 olarak belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda bu oranların sırasıyla %78.0 ve %72.8'e düştüğü belirlendi. HCC1937-R hücrelerinde uygulanan BMN 673'ün doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 38'de özetlendi. Sonuç olarak, 3 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde 12. günün sonunda 0.01, 10 ve 100 nM BMN673'e karşı 1000 hücre için sırasıyla 1.2-, 2.3- ve 2.1-kat, 2000 hücre için sırasıyla 1.3-, 2.4-ve 2.4- kat direnç geliştiği belirlendi.



Şekil 35. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde 3. ayın sonunda BMN 673'ün sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

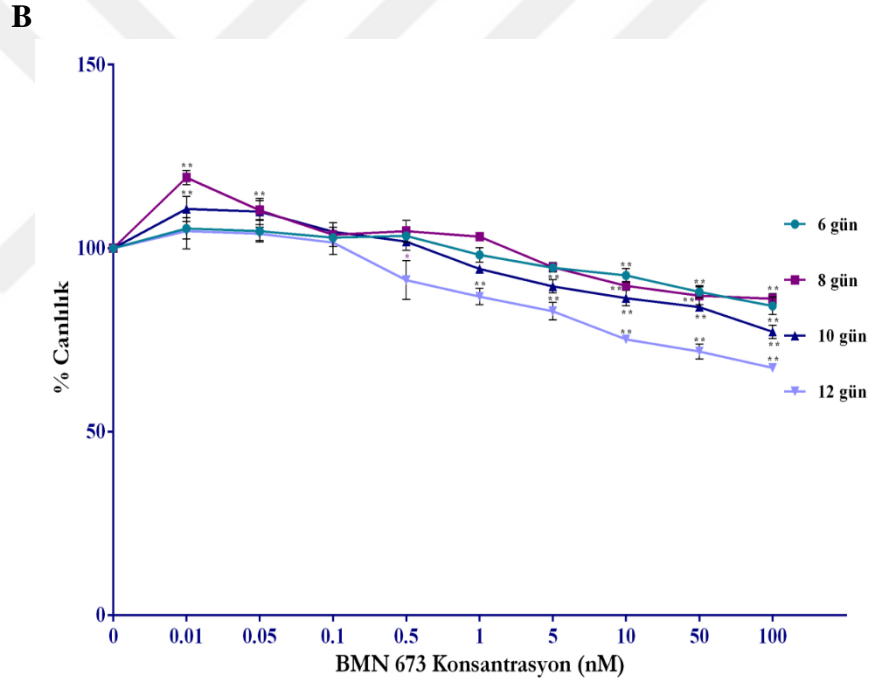
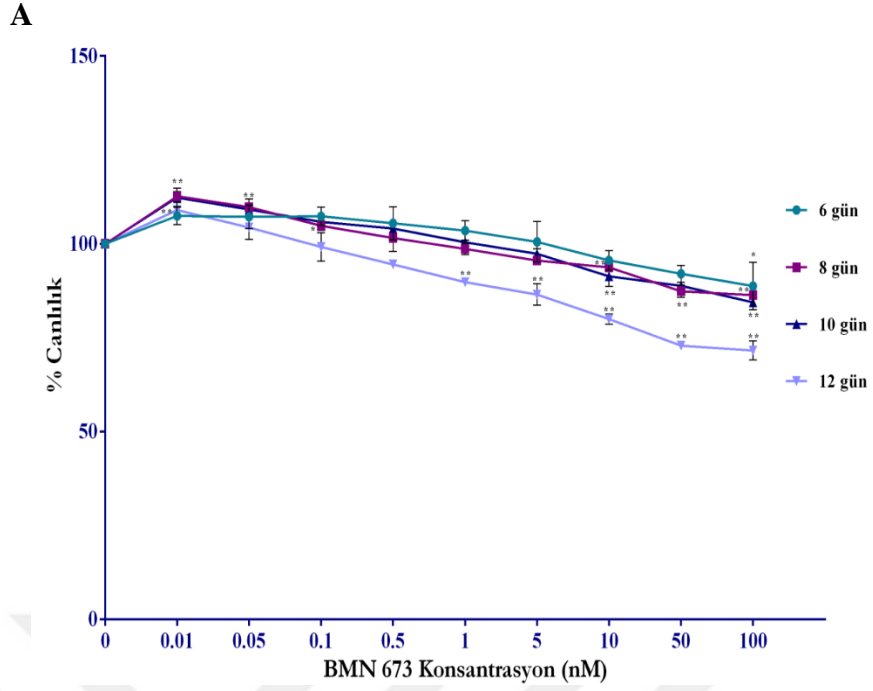
Tablo 37. 3 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1452.235	9	161.359		
		Grup içi	105.472	20	5.274	30.598	.000
		Toplam	1557.707	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	996.114	9	110.679		
		Grup içi	220.560	20	11.028	10.036	.000
		Toplam	1216.674	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	1142.082	9	126.898		
		Grup içi	105.150	20	5.257	24.137	.000
		Toplam	1247.232	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	5053.208	9	561.468		
		Grup içi	129.801	20	6.490	86.512	.000
		Toplam	5183.009	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	940.899	9	104.544		
		Grup içi	164.923	20	8.246	12.678	.000
		Toplam	1105.821	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	3146.217	9	349.580		
		Grup içi	86.663	20	4.333	80.676	.000
		Toplam	3232.880	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	4408.996	9	489.888		
		Grup içi	143.844	20	7.192	68.114	.000
		Toplam	4552.840	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	7608.876	9	845.431		
		Grup içi	162.846	20	8.142	103.832	.000
		Toplam	7771.722	29			

Tablo 38. 3 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE			
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P
6. GÜN	0.01	106.45	3.16	-6.45725	.061	99.12	3.53	.87046	1.000
	0.05	106.31	1.09	-6.31146	.071	98.42	3.31	1.57977	.999
	0.1	106.54	3.45	-6.54861	.055	98.39	1.41	1.60152	.999
	0.5	102.34	3.16	-2.34011	.954	96.49	3.59	3.50787	.879
	1	101.80	2.02	-1.80257	.991	95.60	4.24	4.39255	.685
	5	95.35	1.62	4.64089	.337	91.71	3.70	8.28060	.051
	10	93.18	1.02	6.81894	.041	87.47	1.69	12.52908	.001
	50	91.33	2.31	8.66568	.005	85.32	2.18	14.67093	.000
	100	85.13	2.53	14.86993	.000	84.98	2.14	15.01243	.000
	8. GÜN	0.01	103.40	1.29	-3.40016	.953	114.52	3.25	-14.52515
0.05		102.35	2.33	-2.35557	.996	116.81	2.78	-16.81336	.000
0.1		101.79	4.30	-1.79976	.999	108.71	1.80	-8.71114	.002
0.5		101.47	3.63	-1.47483	1.000	107.90	.62	-7.90779	.005
1		96.67	2.96	3.32320	.959	104.13	2.42	-4.13593	.358
5		95.22	2.51	4.77367	.750	100.60	2.35	-.60118	1.000
10		95.38	3.79	4.61228	.783	98.59	.81	1.40452	.997
50		91.92	5.10	8.07764	.147	88.44	2.44	11.55513	.000
100		83.61	3.97	16.38083	.000	82.32	1.80	17.67375	.000
10. GÜN		0.01	104.44	1.81	-4.44763	.388	118.32	2.34	-18.32990
	0.05	102.94	1.44	-2.94639	.846	108.04	2.78	-8.04877	.038
	0.1	98.55	3.69	1.44900	.998	101.85	5.99	-1.85880	.997
	0.5	93.61	2.64	6.38133	.065	94.21	1.68	5.78666	.261
	1	93.94	3.11	6.05524	.092	91.09	2.34	8.90378	.017
	5	91.29	.72	8.70133	.005	88.39	2.46	11.60138	.001
	10	89.50	1.87	10.49491	.001	82.28	1.11	17.71740	.000
	50	87.36	2.80	12.63716	.000	82.73	1.85	17.26236	.000
	100	85.72	2.21	14.28001	.000	77.25	1.92	35.09000	.000
	12. GÜN	0.01	105.68	1.67	-5.68546	.225	107.97	3.59	-7.97146
0.05		105.69	1.95	-5.69733	.223	99.22	.66	.77136	1.000
0.1		100.05	4.07	-.05020	1.000	101.48	4.67	-1.48946	1.000
0.5		99.06	3.28	.93508	1.000	89.81	2.07	10.18038	.009
1		88.32	2.94	11.67718	.001	82.43	2.15	17.56043	.000
5		82.96	.33	17.03907	.000	77.02	5.41	22.97133	.000
10		77.93	3.72	22.06858	.000	72.71	1.19	27.28416	.000
50		73.83	1.51	26.16707	.000	63.96	2.50	36.03380	.000
100		68.78	2.42	31.21184	.000	60.00	.43	39.99549	.000

3. ayın sonunda BMN 673'e karşı gelişen direnç kat sayılarının belirlenmesinden sonra hücrelerde BMN 673'e karşı daha yüksek oranda direncin elde edilmesi amacıyla hücrelere 0.01 nM BMN 673 uygulanmaya devam edilerek her ayın sonunda direnç katsayıları hesaplandı. 4. Ayın sonunda 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde 0.01, 10 ve 100 nM BMN 673'e karşı 1000 hücre için sırasıyla 1.2-, 1.7- ve 2.2- kat, 2000 hücre için sırasıyla 1.3-, 2.5- ve 2.7- kat direnç geliştiği belirlendi. 4 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelere ait canlılık grafikleri (Şekil 36) ve uygulanan BMN 673 doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel analiz sonuçları ve canlılık düzeyleri açısından farklılıklar Tablo 39 ve 40'da özetlendi. 5 ayın sonunda ise HCC1937-R hücrelerinde 12. Günün sonunda 0.01, 10 ve 100 nM BMN 673'e karşı 1000 hücre için sırasıyla 1.3-, 2.5- ve 2.3-kat, 2000 hücre için sırasıyla 1.3-, 2.8- ve 2.9- kat direnç geliştiği belirlendi. 5 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelere ait canlılık grafikleri (Şekil 37) ve uygulanan BMN 673'ün doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel analiz sonuçları ve canlılık düzeyleri açısından farklılıklar Tablo 41 ve 42'de özetlendi.



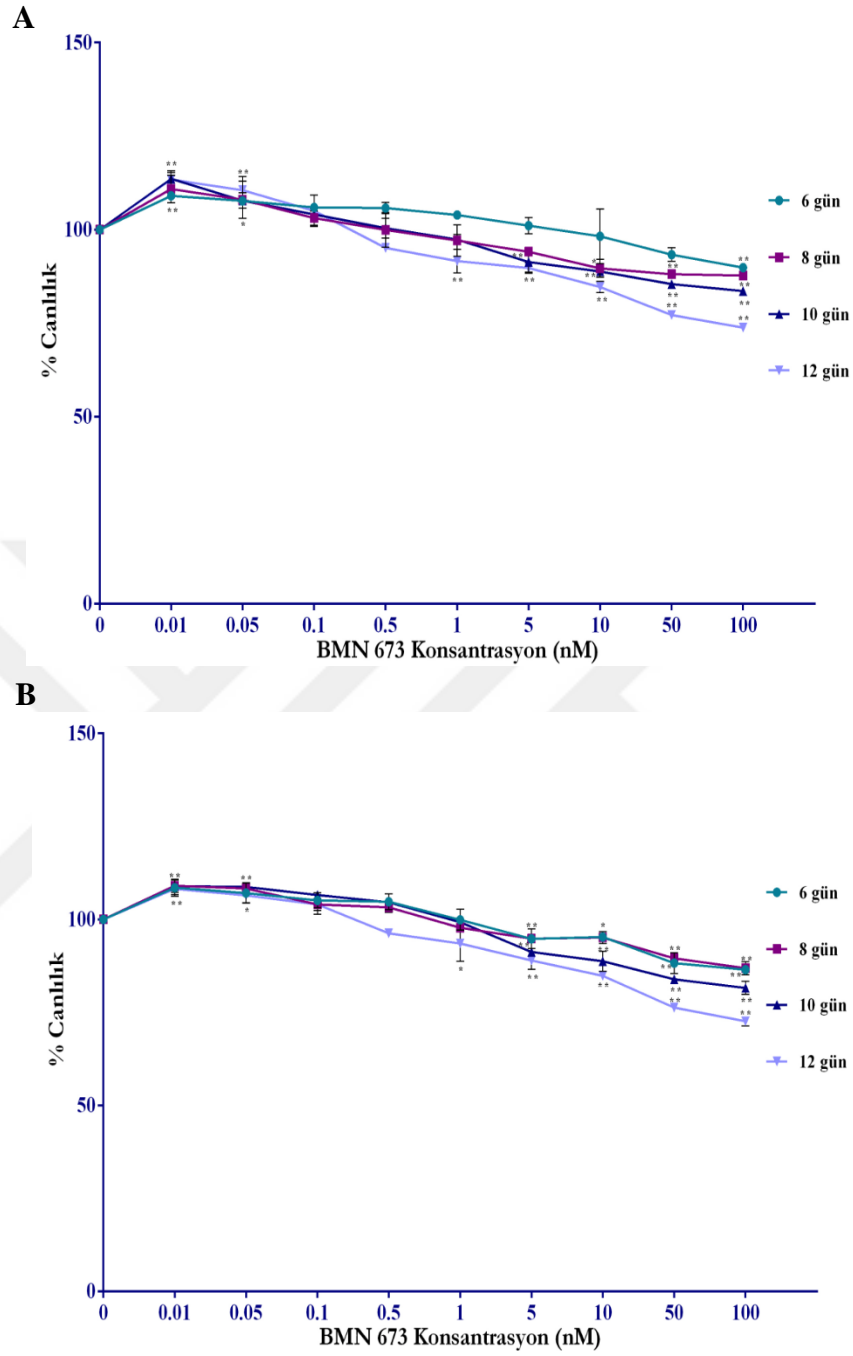
Şekil 36. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde 4. ayın sonunda BMN 673'ün sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Tablo 39. 4 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1218.052	9	135.339		
		Grup içi	254.182	20	12.709	10.649	.000
		Toplam	1472.234	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	2037.736	9	226.415		
		Grup içi	56.300	20	2.815	80.431	.000
		Toplam	2094.036	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	2194.123	9	243.791		
		Grup içi	58.209	20	2.910	83.765	.000
		Toplam	2252.331	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	4528.424	9	503.158		
		Grup içi	94.490	20	4.725	106.499	.000
		Toplam	4622.914	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1434.394	9	159.377		
		Grup içi	69.937	20	3.497	45.577	.000
		Toplam	1504.332	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	3032.356	9	336.928		
		Grup içi	81.682	20	4.084	82.498	.000
		Toplam	3114.037	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	3503.938	9	389.326		
		Grup içi	86.863	20	4.343	89.642	.000
		Toplam	3590.800	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	5236.223	9	581.803		
		Grup içi	163.183	20	8.159	71.307	.000
		Toplam	5399.407	29			

Tablo 40. 4 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE				
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	
6. GÜN	0.01	107.41	2.28	-7.41670	.302	105.35	2.89	-5.35633	.053	
	0.05	107.16	3.06	-7.16257	.344	104.64	2.94	-4.64568	.131	
	0.1	107.33	2.41	-7.33426	.315	102.89	.58	-2.89954	.670	
	0.5	105.46	4.43	-5.46171	.683	103.36	1.07	-3.36949	.483	
	1	103.50	2.58	-3.50350	.963	98.16	1.99	1.83514	.964	
	5	100.50	5.38	-.50521	1.000	94.68	.82	5.31925	.056	
	10	95.58	2.60	4.41647	.870	92.61	1.79	7.38536	.003	
	50	92.03	2.23	7.97003	.224	88.08	1.66	11.92000	.000	
	100	88.75	6.28	11.24872	.026	84.28	2.41	15.71290	.000	
	8. GÜN	0.01	112.66	1.24	-12.66084	.000	119.23	1.89	-19.23742	.000
0.05		109.75	2.16	-9.75897	.000	110.36	2.62	-10.36141	.000	
0.1		104.78	1.28	-4.78775	.055	103.67	3.23	-3.67683	.471	
0.5		101.56	3.61	-1.56950	.973	104.64	2.96	-4.64265	.197	
1		98.63	1.47	1.36322	.989	103.13	1.17	-3.13597	.669	
5		95.52	1.12	4.47020	.087	94.81	1.27	5.18798	.109	
10		93.75	.62	6.24667	.006	89.76	.68	10.23096	.000	
50		87.36	1.64	12.63527	.000	87.04	2.41	12.95428	.000	
100		86.32	.80	13.67693	.000	86.24	1.33	13.75333	.000	
10. GÜN		0.01	112.32	2.51	-12.32221	.000	110.69	3.41	-10.69347	.000
	0.05	109.14	.68	-9.14976	.000	109.98	3.54	-9.98667	.000	
	0.1	105.84	.98	-5.84765	.013	104.50	1.23	-4.50373	.259	
	0.5	104.06	1.52	-4.06257	.165	101.82	2.46	-1.82310	.982	
	1	100.38	2.66	-.38411	1.000	94.33	.65	5.66667	.076	
	5	97.33	1.36	2.66742	.660	89.58	1.79	10.41274	.000	
	10	91.36	2.73	8.63599	.000	86.36	2.12	13.63878	.000	
	50	88.81	1.20	11.18055	.000	83.96	.39	16.03335	.000	
	100	84.43	1.06	15.56333	.000	77.21	1.83	22.78450	.000	
	12. GÜN	0.01	108.97	1.99	-8.97015	.002	104.65	4.84	-4.65350	.611
0.05		104.35	3.22	-4.35300	.348	103.92	1.78	-3.92217	.793	
0.1		99.14	3.76	.85731	1.000	101.55	3.26	-1.55163	.999	
0.5		94.52	.92	5.47667	.121	91.30	5.26	8.69047	.034	
1		89.79	.95	10.20471	.000	86.82	2.26	13.17820	.001	
5		86.48	2.83	13.51887	.000	82.79	2.38	17.20055	.000	
10		79.94	1.30	20.05099	.000	75.15	.79	24.84655	.000	
50		72.85	.78	27.14067	.000	71.83	1.99	28.16278	.000	
100		71.60	2.57	28.39034	.000	67.40	1.05	32.59667	.000	



Şekil 37. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde 5. ayın sonunda BMN 673'ün sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

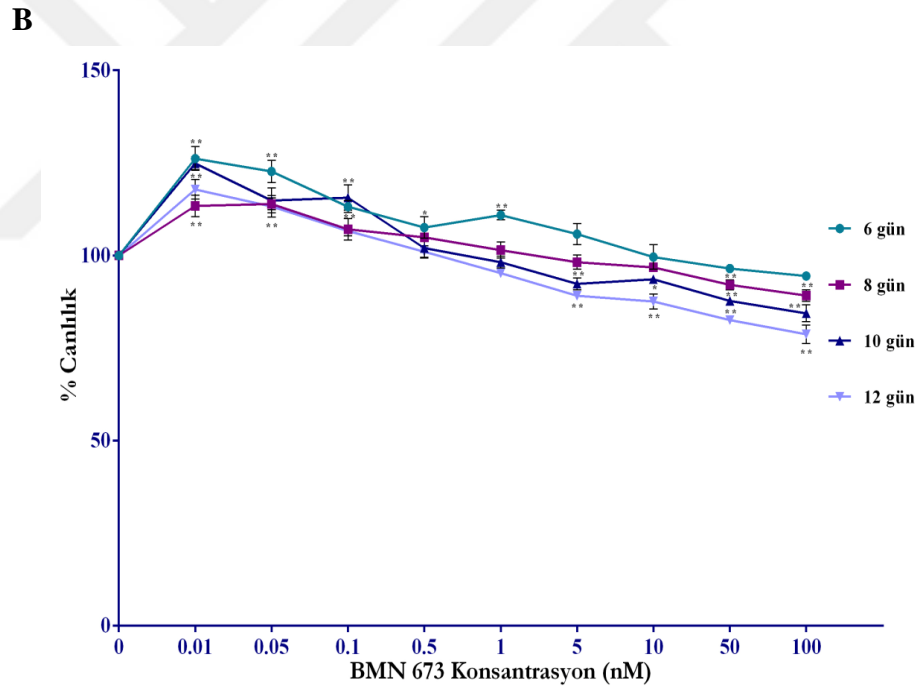
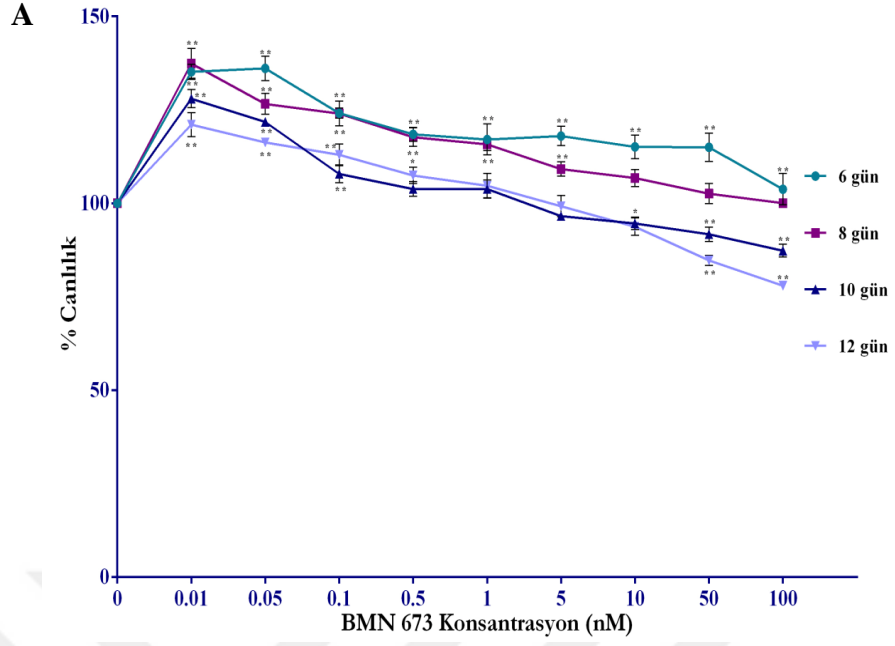
Tablo 41. 5 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1062.667	9	118.074	17.850	.000
		Grup içi	132.293	20	6.615		
		Toplam	1194.959	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1763.907	9	195.990	21.951	.000
		Grup içi	178.571	20	8.929		
		Toplam	1942.478	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	2619.253	9	291.028	94.163	.000
		Grup içi	61.814	20	3.091		
		Toplam	2681.067	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	4825.820	9	536.202	105.253	.000
		Grup içi	101.888	20	5.094		
		Toplam	4927.708	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1597.363	9	177.485	45.366	.000
		Grup içi	78.246	20	3.912		
		Toplam	1675.609	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1507.032	9	167.448	76.189	.000
		Grup içi	43.956	20	2.198		
		Toplam	1550.987	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	2859.708	9	317.745	192.536	.000
		Grup içi	33.006	20	1.650		
		Toplam	2892.714	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	4120.905	9	457.878	101.256	.000
		Grup içi	90.439	20	4.522		
		Toplam	4211.345	29			

Tablo 42. 5 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE				2000 HÜCRE				
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P
6. GÜN	0.01	109.05	.52	-9.05140	.010	108.52	2.30	-8.52247	.001
	0.05	107.67	.74	-7.67951	.039	107.08	2.64	-7.08689	.008
	0.1	105.94	1.15	-5.94679	.191	105.12	2.01	-5.12072	.103
	0.5	105.76	1.54	-5.76261	.221	104.73	2.09	-4.73261	.161
	1	103.91	.30	-3.91455	.691	99.89	2.76	.10681	1.000
	5	101.07	2.19	-1.07504	1.000	94.77	1.13	5.22649	.091
	10	98.24	7.28	1.75789	.997	95.29	1.01	4.70811	.165
	50	93.33	1.83	6.66565	.103	88.24	2.78	11.75375	.000
	100	89.85	.49	10.14122	.003	86.47	.81	13.53000	.000
	8. GÜN	0.01	110.84	3.70	-10.84458	.007	109.06	.88	-9.06095
0.05		108.01	4.97	-8.01701	.083	108.32	1.56	-8.32154	.000
0.1		103.07	1.90	-3.07056	.952	104.01	1.63	-4.01727	.078
0.5		99.92	4.62	.07339	1.000	103.26	1.34	-3.26457	.239
1		97.06	4.18	2.93181	.964	97.77	.76	2.22754	.705
5		94.10	1.13	5.89671	.366	94.80	2.66	5.19316	.010
10		89.63	2.37	10.36601	.011	95.10	1.58	4.89819	.017
50		88.09	1.10	11.90647	.003	89.55	.95	10.44667	.000
100		87.74	.24	12.26000	.002	86.89	1.76	13.10333	.000
10. GÜN		0.01	113.58	2.17	-13.58964	.000	108.91	1.60	-8.91955
	0.05	107.75	2.09	-7.75073	.001	108.75	.73	-8.75698	.000
	0.1	104.06	1.52	-4.06257	.191	106.54	.79	-6.54729	.000
	0.5	100.38	2.66	-3.8411	1.000	104.61	.98	-4.61635	.008
	1	97.33	1.36	2.66742	.694	99.27	.90	.72973	.999
	5	91.36	2.73	8.63599	.000	91.23	.51	8.76085	.000
	10	88.81	1.20	11.18055	.000	88.75	2.70	11.24697	.000
	50	85.45	.95	14.54333	.000	83.87	.54	16.12333	.000
	100	83.56	.80	16.43333	.000	81.58	1.74	18.41013	.000
	12. GÜN	0.01	113.36	1.88	-13.36975	.000	108.23	1.59	-8.23808
0.05		110.52	3.64	-10.52650	.000	106.47	2.10	-6.47631	.034
0.1		105.00	4.17	-5.00791	.231	104.03	2.62	-4.03062	.417
0.5		95.10	1.17	4.89550	.255	96.25	.58	3.75000	.511
1		91.59	3.13	8.40365	.006	93.52	4.77	6.47211	.034
5		89.76	1.40	10.23195	.001	88.95	2.35	11.04669	.000
10		84.67	1.51	15.32352	.000	84.81	.95	15.18772	.000
50		77.16	.81	22.83394	.000	76.30	.59	23.69932	.000
100		73.80	.72	26.19918	.000	72.59	1.22	27.40022	.000

6. ayın sonunda HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin belirlenmesi için, 1000 (Şekil 38_(A)) ve 2000 hücre (Şekil 38_(B)) olacak şekilde ekilen ve 6 gün boyunca 0.01 nM BMN673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %135.2 ve %126.2 iken, 100 nM BMN 673 uygulandığında bu oranlar sırasıyla %103.8 ve %94.5 olarak belirlendi ve canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($F(9, 20)= 46.957$; $F(9, 20)= 64.408$, $p<0.01$) (Tablo 43). 12 gün sonunda ise, 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %121.0 ve %117.9 olarak belirlenmesine rağmen, 100 nM BMN 673 uygulandığında ise canlılık oranlarının sırasıyla %78.0 ve %78.7'e düştüğü ve canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı ($F(9, 20)= 111.475$; $F(9, 20)= 159.496$, $p<0.01$) (Tablo 43). Ayrıca 6 gün boyunca 10 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %115.1 ve %100.0 olarak belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda bu oranların %94.0 ve %88.0'a düştüğü analiz edildi. HCC1937-R hücrelerinde uygulanan BMN 673'ün doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 44'de özetlendi. Sonuç olarak, 6 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde 12 günün sonunda 0.01, 10 ve 100 nM BMN 673'e karşı 1000 hücre için sırasıyla 1.4-, 2.8- ve 2.5- kat, 2000 hücre için sırasıyla 1.4-, 3.0- ve 3.1-kat direç geliştiği belirlendi. Böylece HCC1937-R hücrelerinin elde edilmesinde, HCC1937 hücrelerinin BMN673'e maruz kalma süresi arttıkça hücrelerde gelişen ilaç direnci oranının anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0.01$).



Şekil 38. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde 6. ayın sonunda BMN 673'ün sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

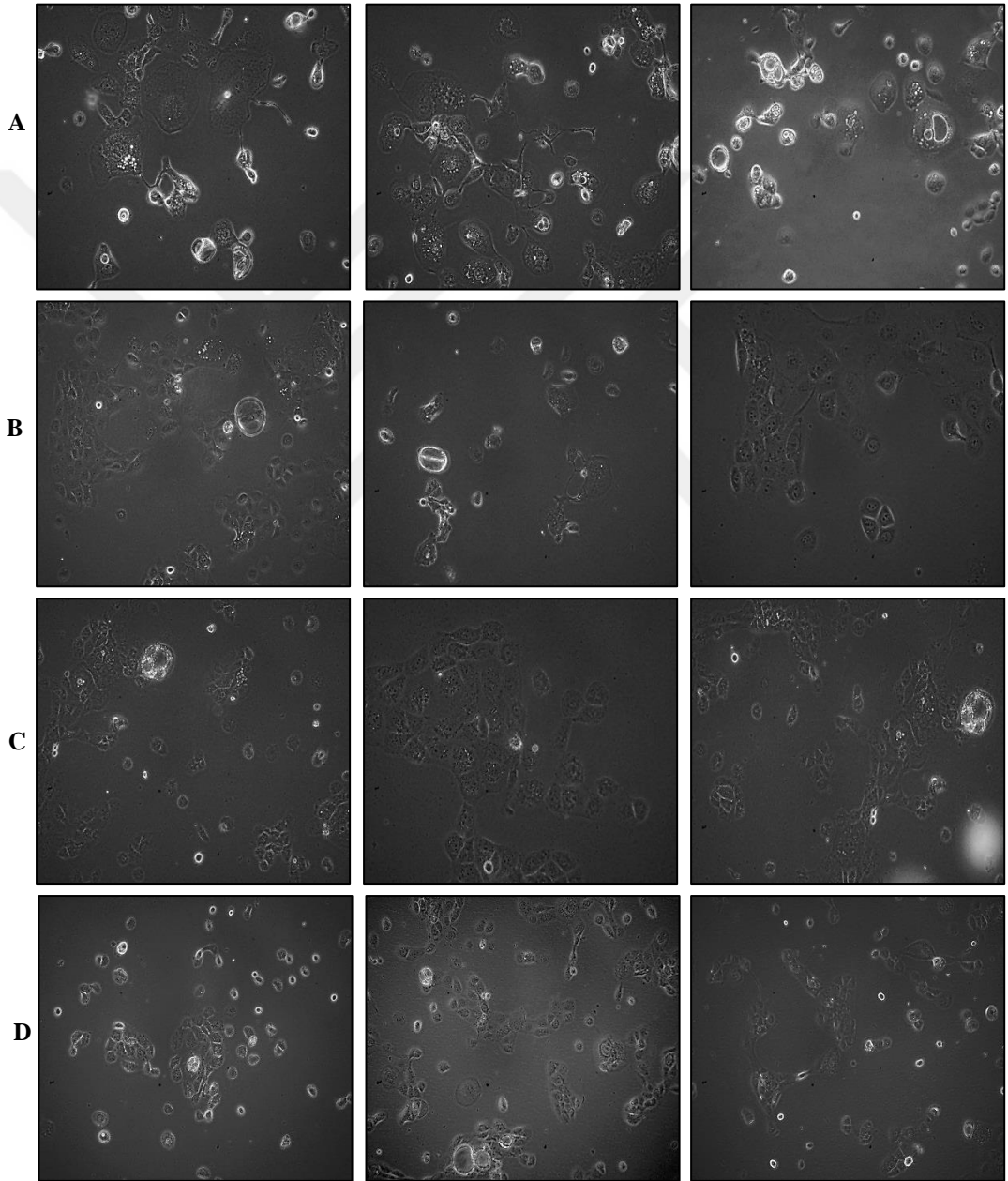
Tablo 43. 6 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

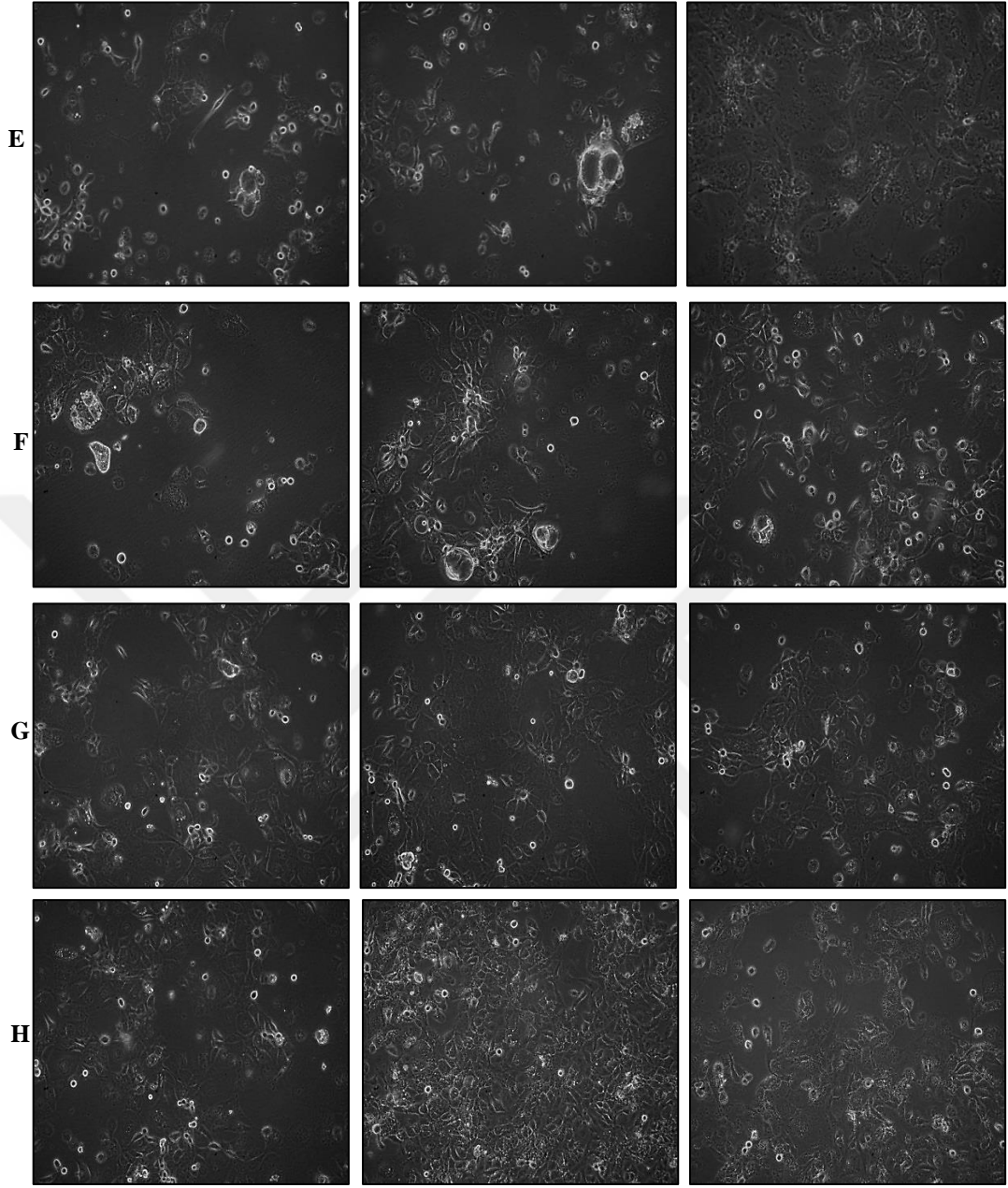
		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	3608.206	9	400.912	46.957	.000
		Grup içi	170.759	20	8.538		
		Toplam	3778.965	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	4262.122	9	473.569	77.516	.000
		Grup içi	122.186	20	6.109		
		Toplam	4384.309	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	4476.394	9	497.377	153.120	.000
		Grup içi	64.966	20	3.248		
		Toplam	4541.359	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	5044.415	9	560.491	111.475	.000
		Grup içi	100.559	20	5.028		
		Toplam	5144.974	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	3112.936	9	345.882	64.408	.000
		Grup içi	107.404	20	5.370		
		Toplam	3220.340	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1845.522	9	205.058	60.355	.000
		Grup içi	67.951	20	3.398		
		Toplam	1913.473	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	4706.283	9	522.920	116.338	.000
		Grup içi	89.897	20	4.495		
		Toplam	4796.179	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	4537.053	9	504.117	159.496	.000
		Grup içi	63.214	20	3.161		
		Toplam	4600.266	29			

Tablo 44. 6 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE				2000 HÜCRE				
	Kosantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P
6. GÜN	0.01	135.16	1.99	-35.16131	.000	126.18	3.21	-26.18161	.000
	0.05	136.08	3.24	-36.08320	.000	122.70	2.99	-22.70437	.000
	0.1	124.11	1.36	-24.11370	.000	113.20	1.64	-13.20893	.000
	0.5	118.44	1.86	-18.44286	.000	107.56	2.93	-7.56881	.019
	1	117.08	4.15	-17.08349	.000	110.88	1.29	-10.88891	.000
	5	118.01	2.54	-18.01458	.000	105.77	2.87	-5.77337	.129
	10	115.10	3.16	-15.10552	.000	99.59	3.29	.40298	1.000
	50	114.97	3.78	-14.97243	.000	96.45	1.04	3.54264	.686
	100	103.78	4.17	-3.78633	.839	94.45	1.07	5.54217	.161
	8. GÜN	0.01	137.39	3.98	-37.39937	.000	113.39	2.87	-13.39428
0.05		126.60	2.83	-26.60823	.000	113.91	1.57	-13.91797	.000
0.1		123.99	3.32	-23.99248	.000	107.07	2.92	-7.07074	.004
0.5		117.69	2.45	-17.69921	.000	104.88	.97	-4.88778	.089
1		115.75	1.64	-15.75941	.000	101.45	2.19	-1.45145	.991
5		109.15	1.90	-9.15909	.006	98.18	1.93	1.81969	.962
10		106.74	2.30	-6.74674	.074	96.77	.95	3.22333	.522
50		102.58	2.70	-2.58590	.947	92.05	1.30	7.94904	.001
100		100.02	1.07	-.02667	1.000	89.15	1.59	10.84793	.000
10. GÜN		0.01	127.99	2.44	-27.99044	.000	124.88	1.73	-24.88741
	0.05	121.75	.90	-21.75528	.000	114.85	3.37	-14.85300	.000
	0.1	107.87	2.40	-7.87878	.001	115.64	3.45	-15.64152	.000
	0.5	103.84	1.95	-3.84047	.275	102.03	2.74	-2.03240	.968
	1	103.83	2.38	-3.83111	.278	98.18	1.59	1.81822	.984
	5	96.56	1.06	3.43333	.411	92.32	1.57	7.67056	.008
	10	94.63	1.66	5.36394	.040	93.55	.54	6.44775	.034
	50	91.70	1.88	8.29213	.001	87.72	.84	12.27667	.000
	100	87.32	1.70	12.67955	.000	84.37	2.23	15.62015	.000
	12. GÜN	0.01	121.03	3.18	-21.03544	.000	117.84	2.63	-17.84960
0.05		116.30	.65	-16.30000	.000	113.22	2.91	-13.22820	.000
0.1		112.95	2.86	-12.95294	.000	106.61	1.34	-6.61742	.006
0.5		107.44	2.14	-7.44944	.017	101.04	1.55	-1.04381	.999
1		104.68	3.28	-4.68180	.298	95.20	.80	4.79065	.081
5		99.22	2.82	.77183	1.000	89.15	.72	10.85000	.000
10		93.75	2.36	6.24931	.065	87.55	2.01	12.44035	.000
50		84.70	1.37	15.29350	.000	82.57	.74	17.42175	.000
100		77.93	.79	22.07000	.000	78.70	2.48	21.29980	.000

HCC1937-R hücrelerinin elde edilmesi sürecinde 6 ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinin genel morfolojik yapıları her ayın sonunda inverted mikroskop ile görüntülendi (Şekil 39). BMN 673'ün ilk uygulanmasından itibaren 1. aya kadar BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı az miktarda hücre olduğu görüntülendi. Ancak, özellikle 3. aydan itibaren hücrelerin proliferasyon hızlarının arttığı ve HCC1937 parental hücrelerine göre daha yuvarlak morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi.





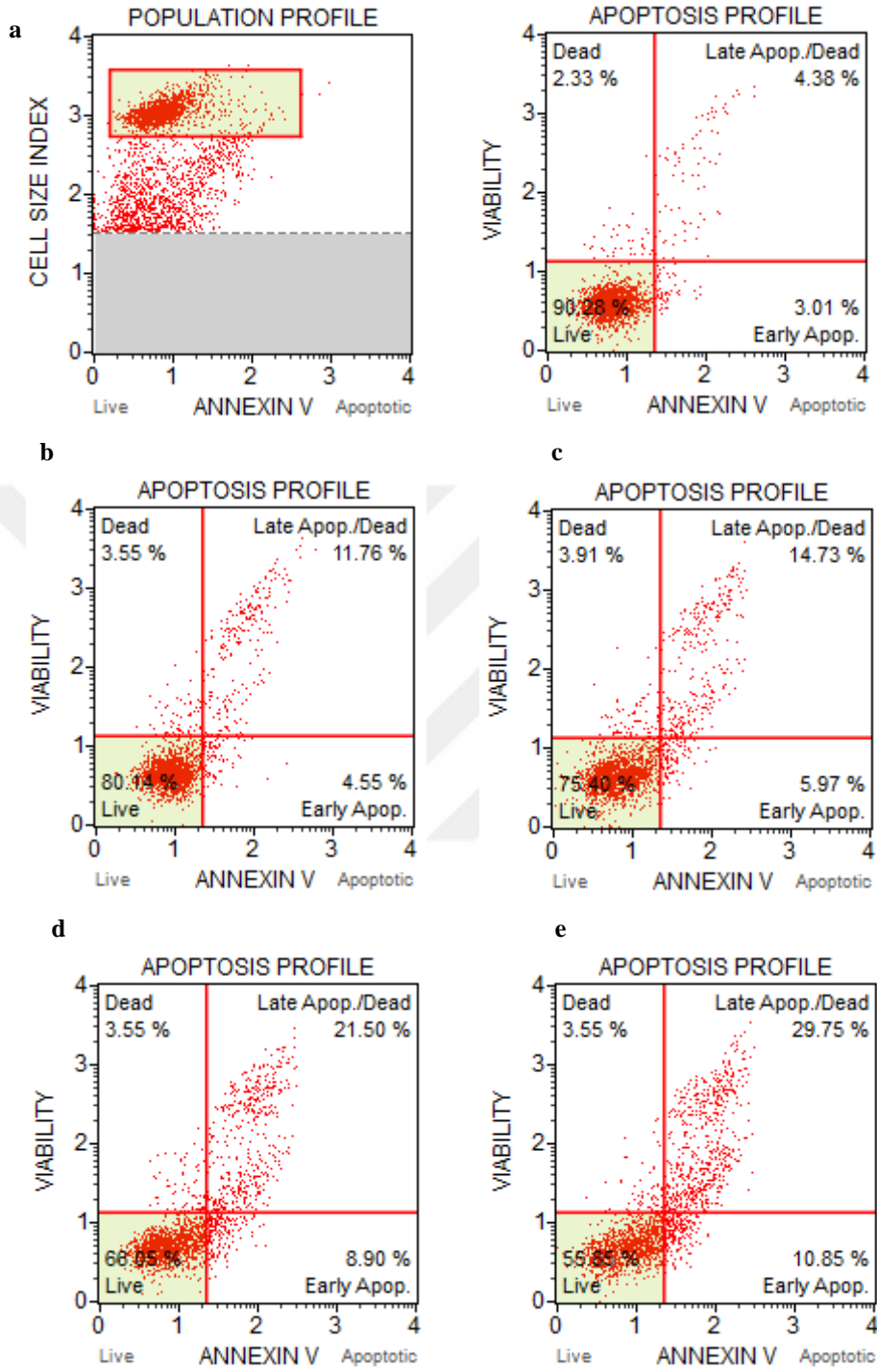
Şekil 39. HCC1937-R hücrelerinin genel morfolojik yapısının inverted mikroskop görüntüleri. HCC1937 hücrelerine BMN 673 uygulandıktan sonra (A)7. gün, (B) 15. Gün, (C) 1. ay, (D) 2. Ay, (E) 3. Ay, (F) 4. Ay, (G) 5. Ay, (H) 6. Ay görüntüleri.

4.3. BMN 673'ün Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

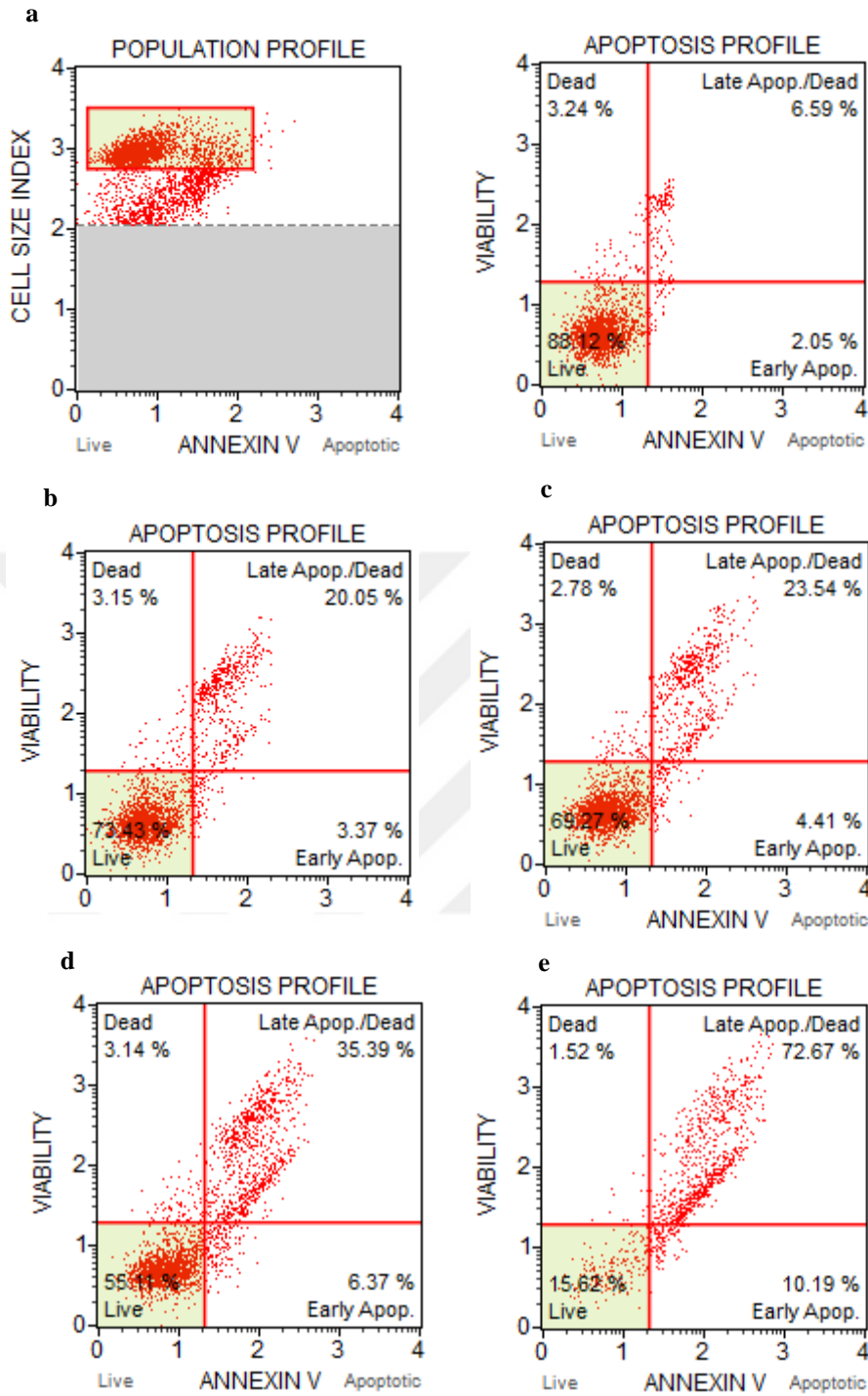
BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi için, WST-1 analizinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda minimum (6.gün) ve maksimum (12.gün) zaman dilimlerinde 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673'ün apoptotik etkisi değerlendirildi. WST-1 deneylerinde maksimum doz olarak 100 nM çalışılmasına rağmen, BMN 673'ün literatürde oldukça düşük konsantrasyonlarda (nM) bile diğer PARP inhibitörlerine göre daha etkili olması, IC₅₀ değerinin 0.57 nM olarak belirlenmesi ve 10 nM konsantrasyondan itibaren HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisinde benzer sonuçlar elde edilmesinden dolayı maksimum doz olarak 10 nM seçildi.

BMN 673'ün HCC1937 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi incelendiğinde, genel olarak zamana ve doza bağlı olarak erken ve geç apoptoz yüzdelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi (p<0.01). Ancak BMN 673'ün HCC1937-R hücrelerinde apoptotik etkisi değerlendirildiğinde, HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığı zaman bu hücrelerde daha az oranda apoptotik ölüm belirlendi.

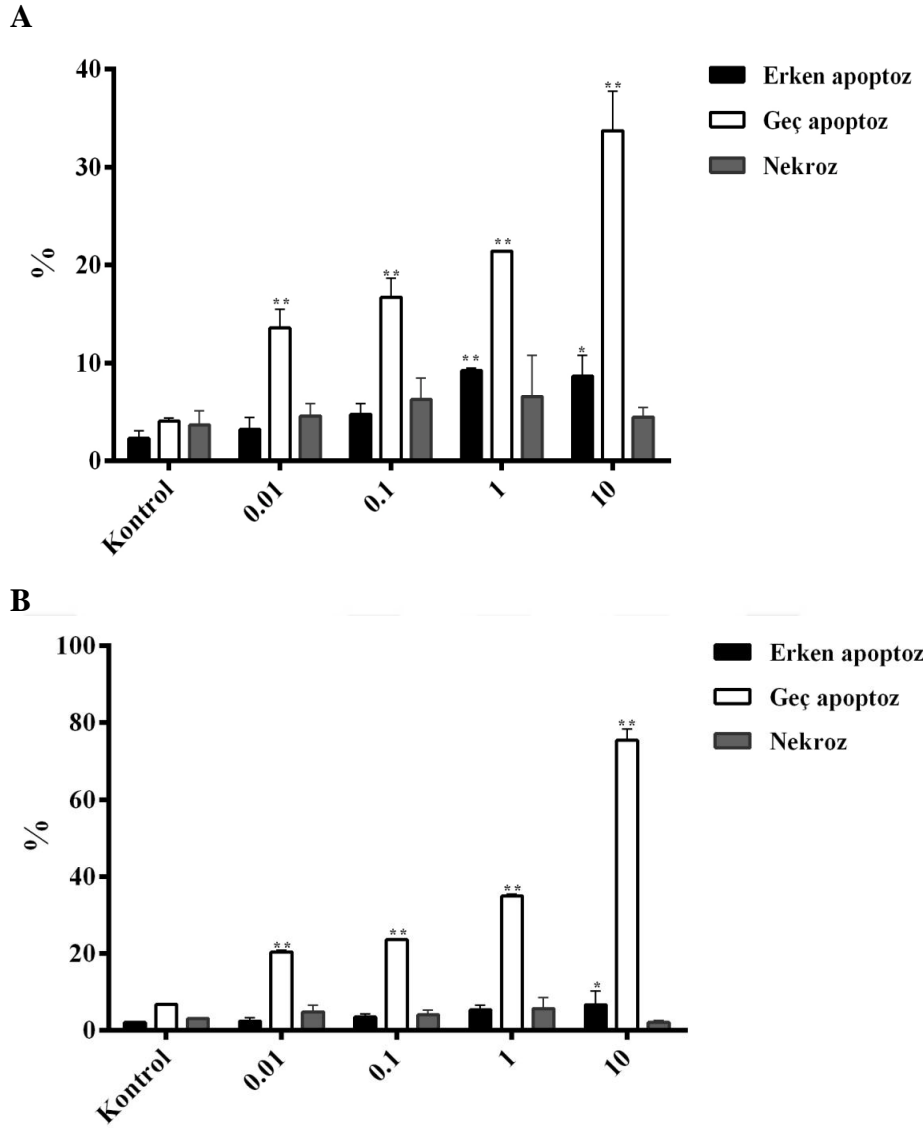
HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün apoptotik etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla %4.55 ve %11.76 iken, 10 nM BMN 673 uygulandığında bu oranlar sırasıyla %10.85 ve %29.75 olarak belirlendi (Şekil 40). 12. günün sonunda ise, kontrol ile karşılaştırıldığında 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla %3.37 ve %20.05 olarak belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında bu oranlar sırasıyla %10.19 ve %72.67 olarak analiz edildi (Şekil 41). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ölümleri açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 42'de özetlendi.



Şekil 40. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.

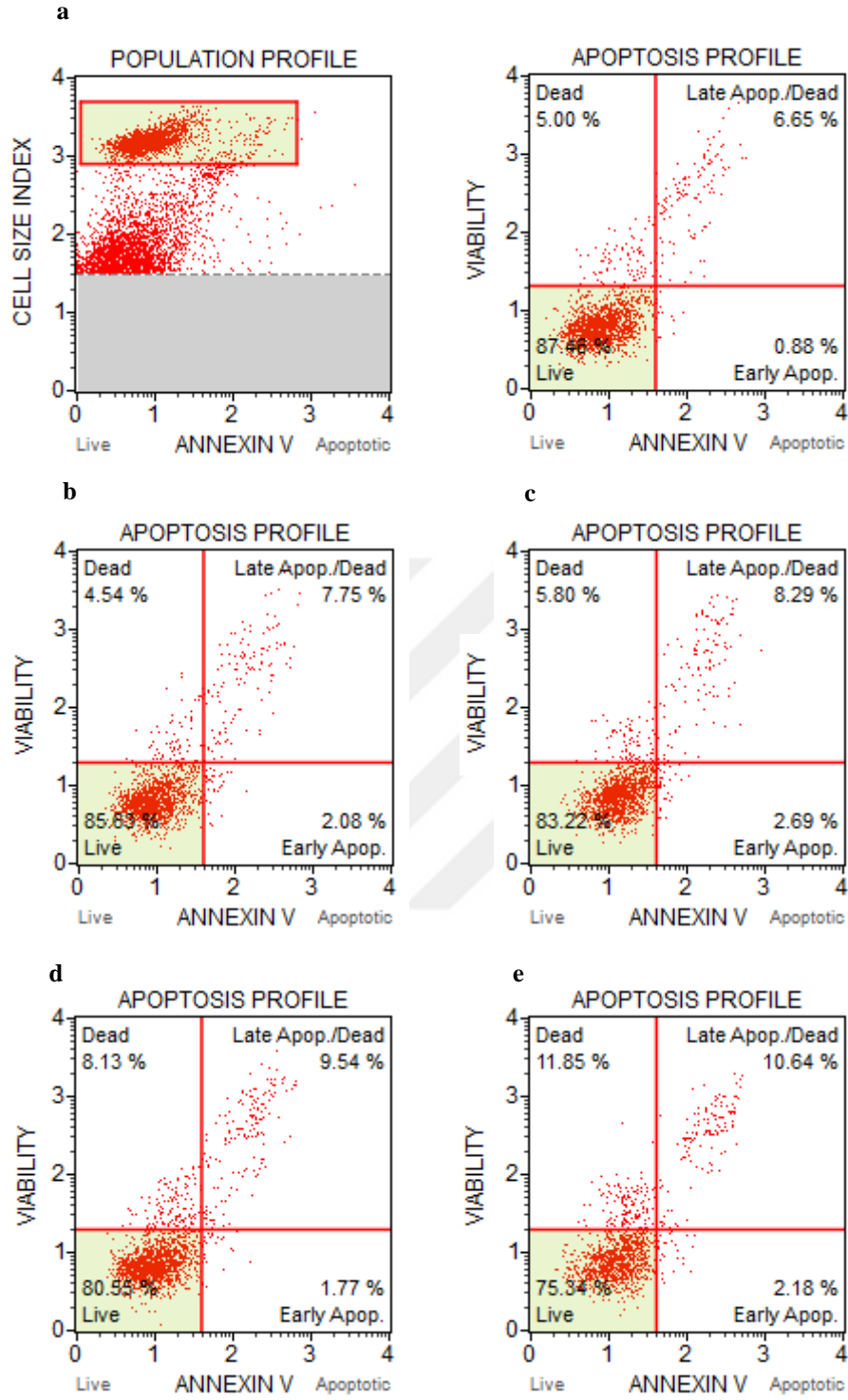


Şekil 41. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.

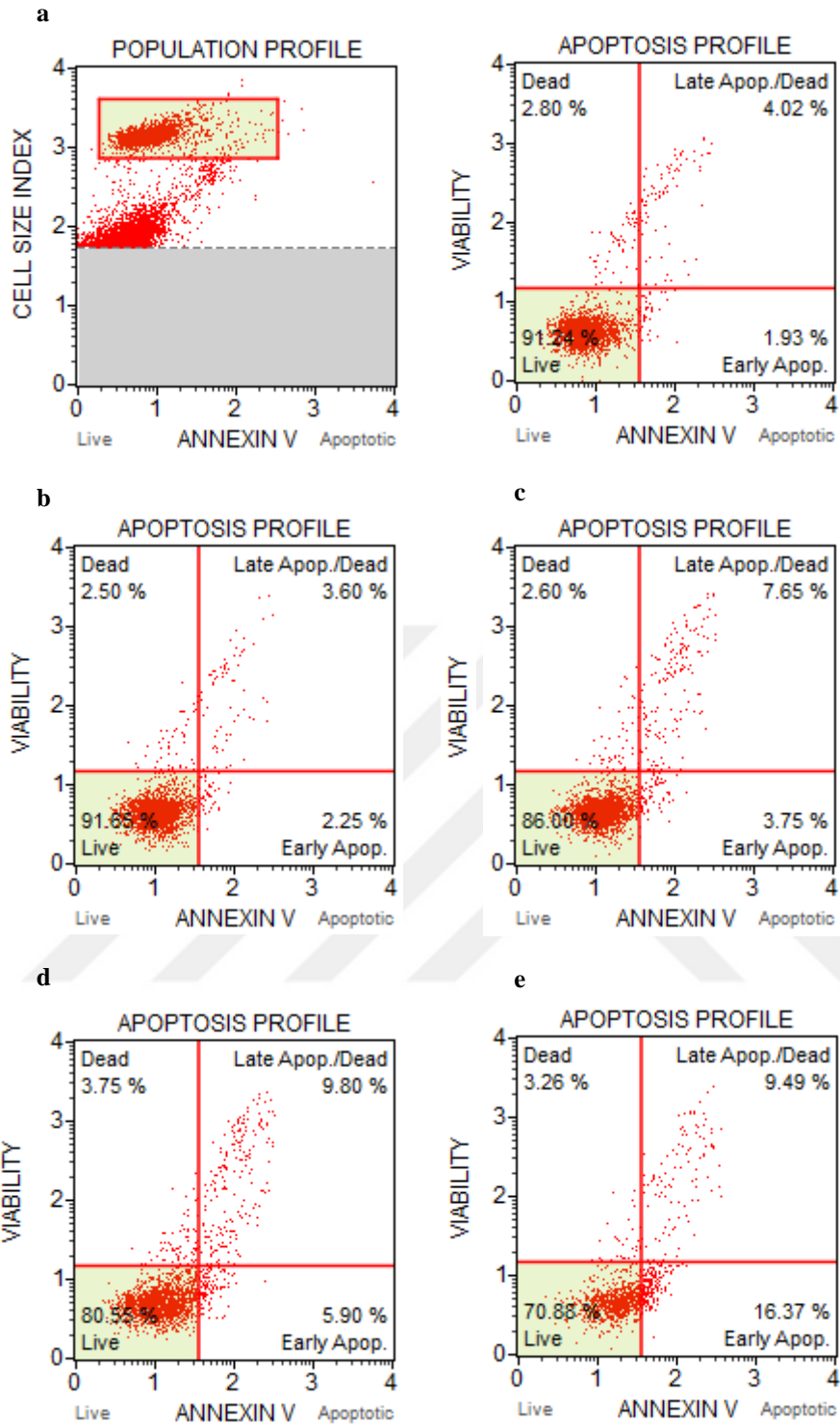


Şekil 42. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

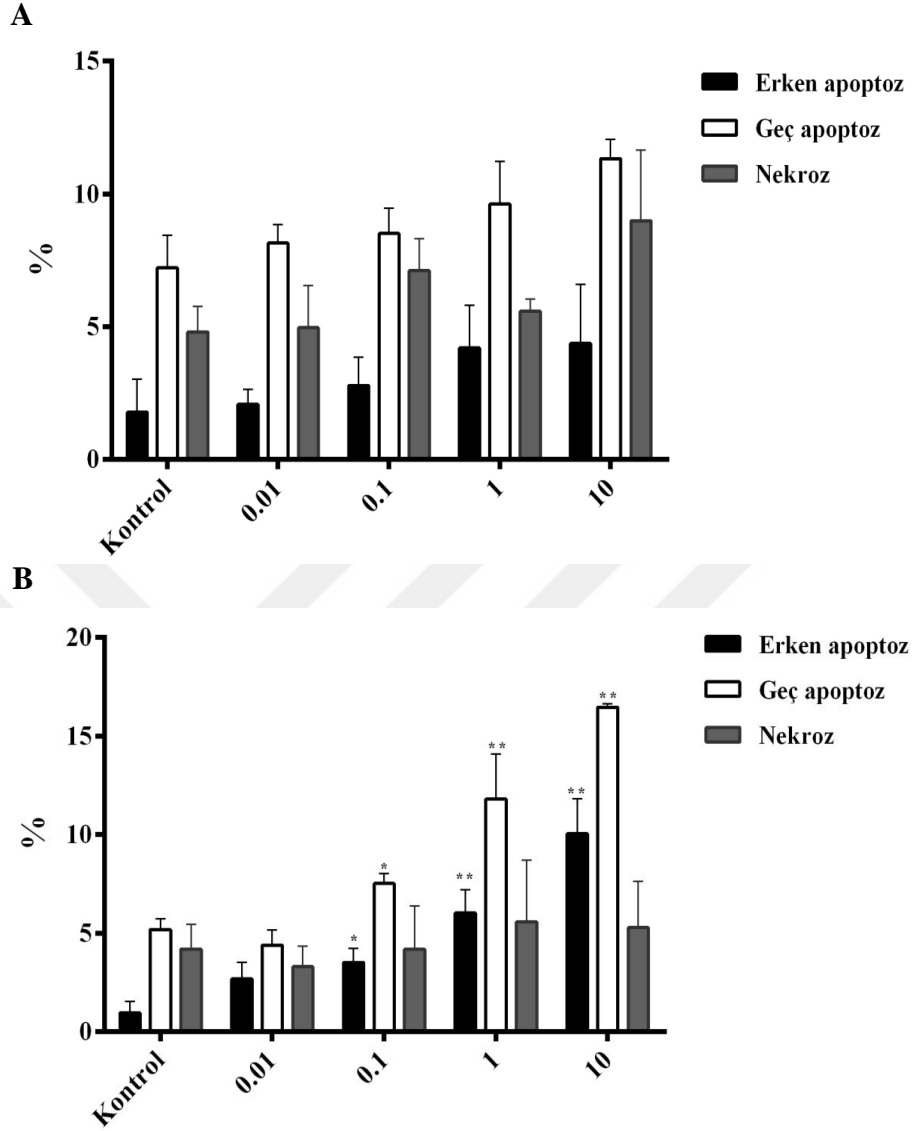
6 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün apoptotik etkisi incelenerek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla %2.08 ve %7.75 iken, 10 nM BMN 673 uygulandığında ise bu oranların sırasıyla %2.18 ve %10.64 olduğu belirlendi (Şekil 43). 12. günün sonunda ise, 0.01 nM BMN 673'e maruz kalan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla %2.25 ve %3.60 belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında ise bu oranlar sırasıyla %16.37 ve %9.49 olarak tespit edildi (Şekil 44). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ölümleri açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 45'de özetlendi.



Şekil 43. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



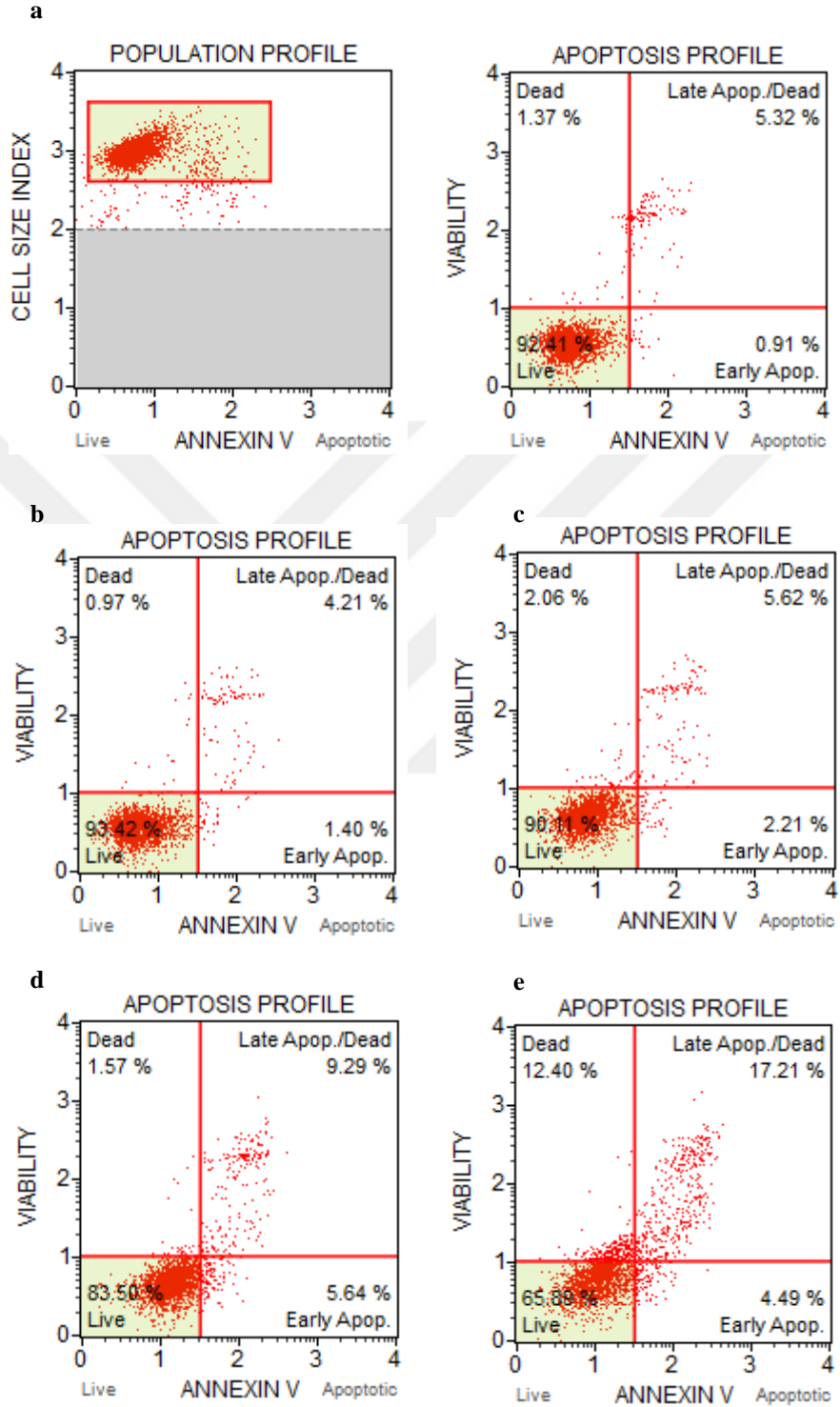
Şekil 44. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



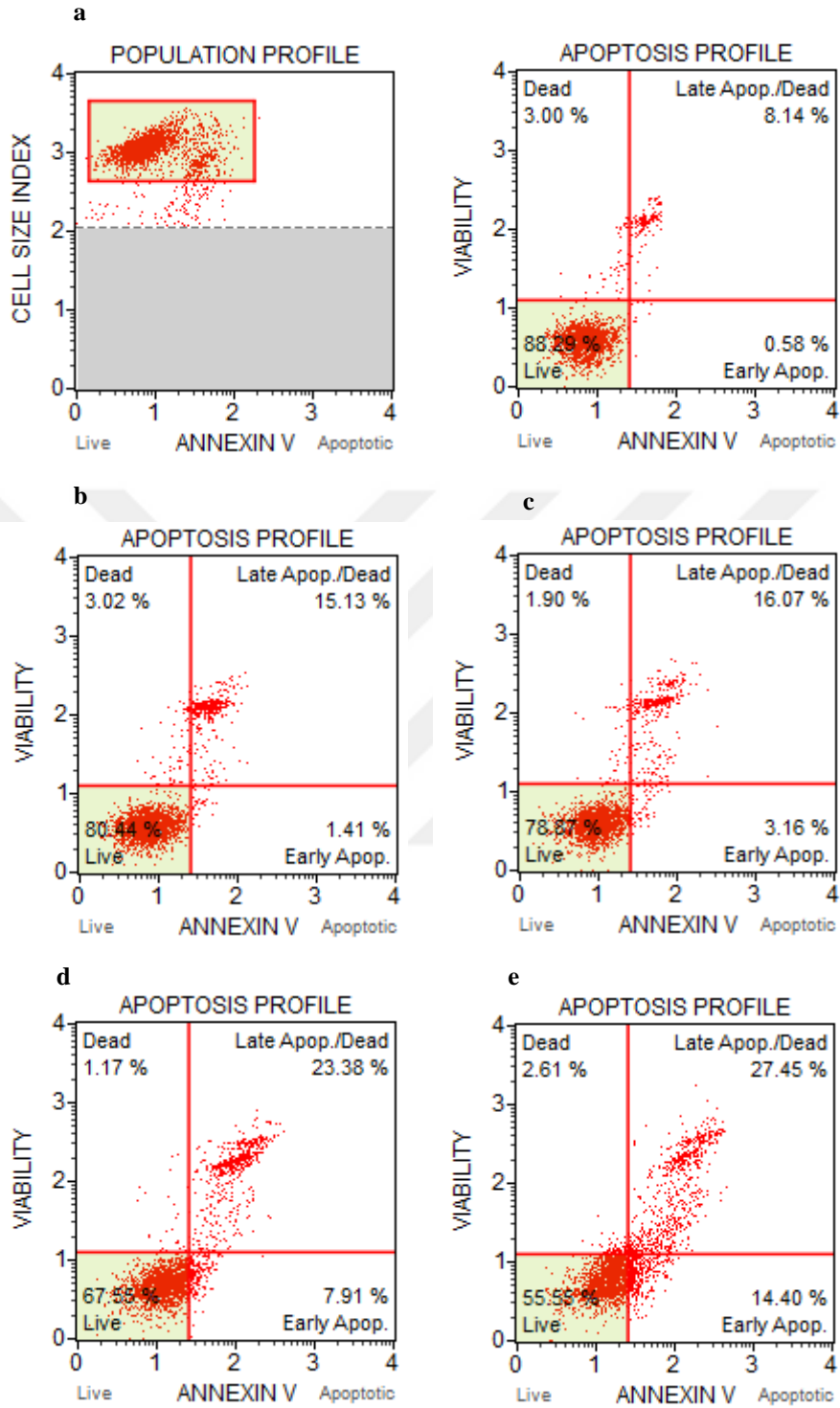
Şekil 45. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

MCF-10A hücreleri üzerinde BMN 673'ün apoptotik etkisine değerlendirildiğinde ise; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla %1.40 ve %4.21 iken, 10 nM BMN673 uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %4.49 ve %17.21 olarak belirlendi (Şekil 46). 12. günde ise 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %1.41 ve %15.3 saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %14.40 ve %27.45 olarak tespit edildi (Şekil 47). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan MCF-10A

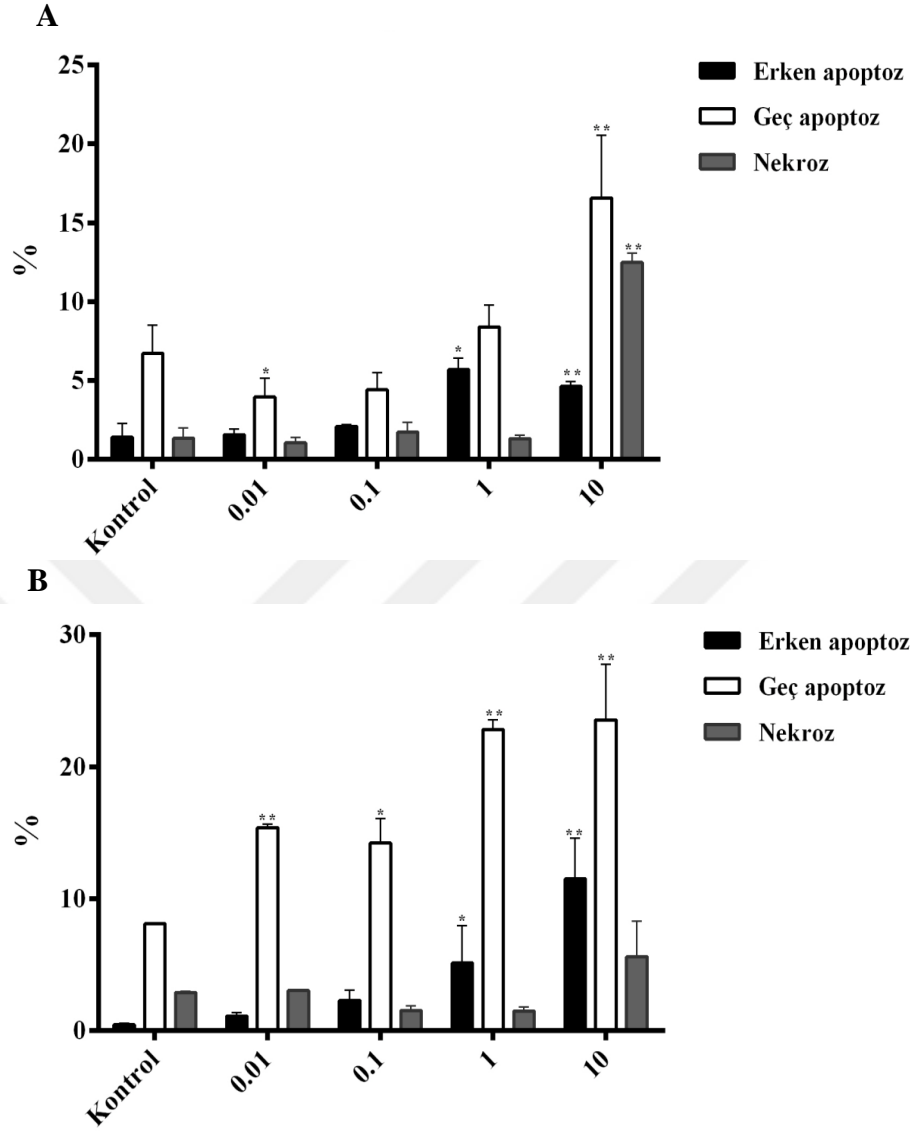
hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ölümleri açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 48’de özetlendi.



Şekil 46. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



Şekil 47. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



Şekil 48. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673 uygulanan MCF10A hücrelerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

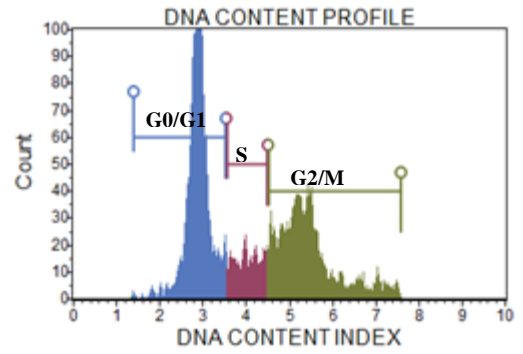
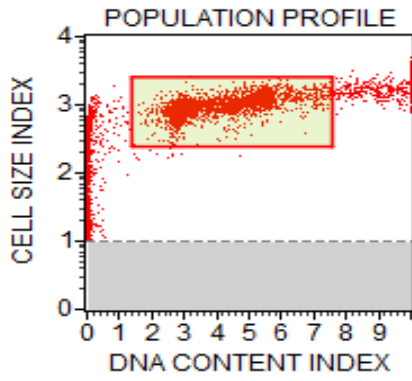
Sonuç olarak, elde edilen bulgular WST-1 analizinden elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. BMN 673, hem HCC1937 hem de MCF-10A kontrol hücrelerinde apoptotik ölüme neden olmaktadır. Ancak, HCC1937-R hücrelerinde kazanılan dirence bağlı olarak hücrelerde apoptotik ölüm HCC1937 hücrelerine göre oldukça az oranda olduğu belirlenmiştir.

4.4. BMN 673'ün Hücre Siklusu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

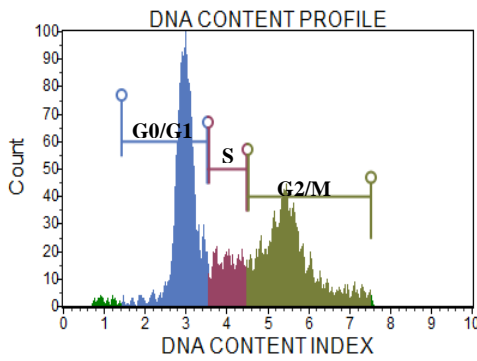
BMN 673'ün HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde hücre siklusu evreleri üzerinde etkisi incelendiğinde, uygulanan doz ve zamana bağlı olarak etkisinin değiştiği gözlemlendi. Hücrelerin BMN 673'e maruz kalma süreleri ve BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu arttıkça, hücrelerde G0/G1 fazında azalış ve G2/M fazında artış belirlendi. Ancak HCC1937-R hücreleri BMN 673'e karşı dirençli olduğundan dolayı hücre siklusu evrelerindeki değişim oranları HCC1937 parental hücrelerine göre daha az oranda olduğu analiz edildi.

HCC1937 hücrelerinde kontrol grubunda G0/G1 fazında hücre miktarı %44.8 iken, 6 gün boyunca 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde G0/G1 fazındaki hücre miktarının sırasıyla %41.5'e ve %35.1'e düştüğü belirlendi. G0/G1 fazında azalmaya paralel olarak, 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%41.9) G2/M fazında hücre miktarının sırasıyla %42.3'e ve %45.4'e arttığı belirlendi (Şekil 49). 12 günün sonunda ise, G0/G1 fazı kontrol grubunda %50.3 belirlenmesine rağmen, 0.01 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %42.8 ve %23.9'a azaldığı belirlendi. G2/M fazında hücre miktarı ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%39.0), 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %40 ve %49.3'e arttığı analiz edildi (Şekil 50). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarı açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 51'de özetlendi.

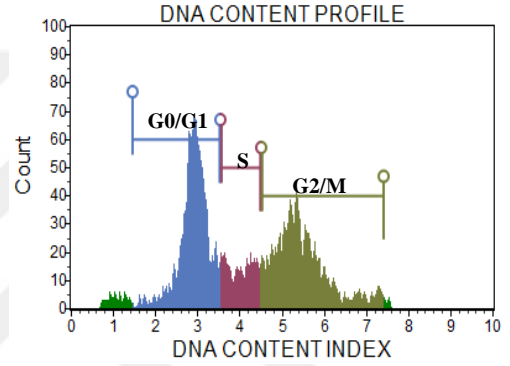
a



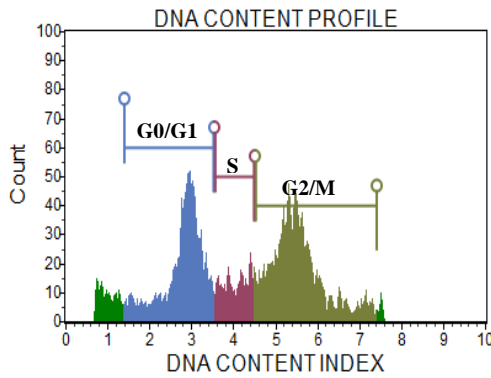
b



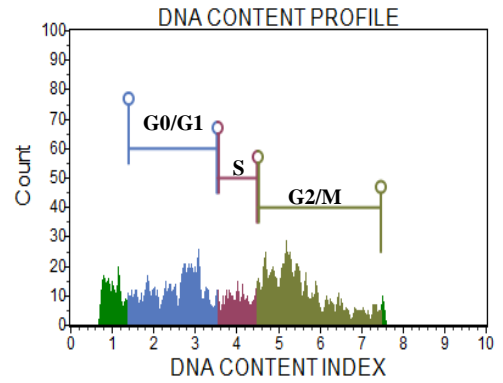
c



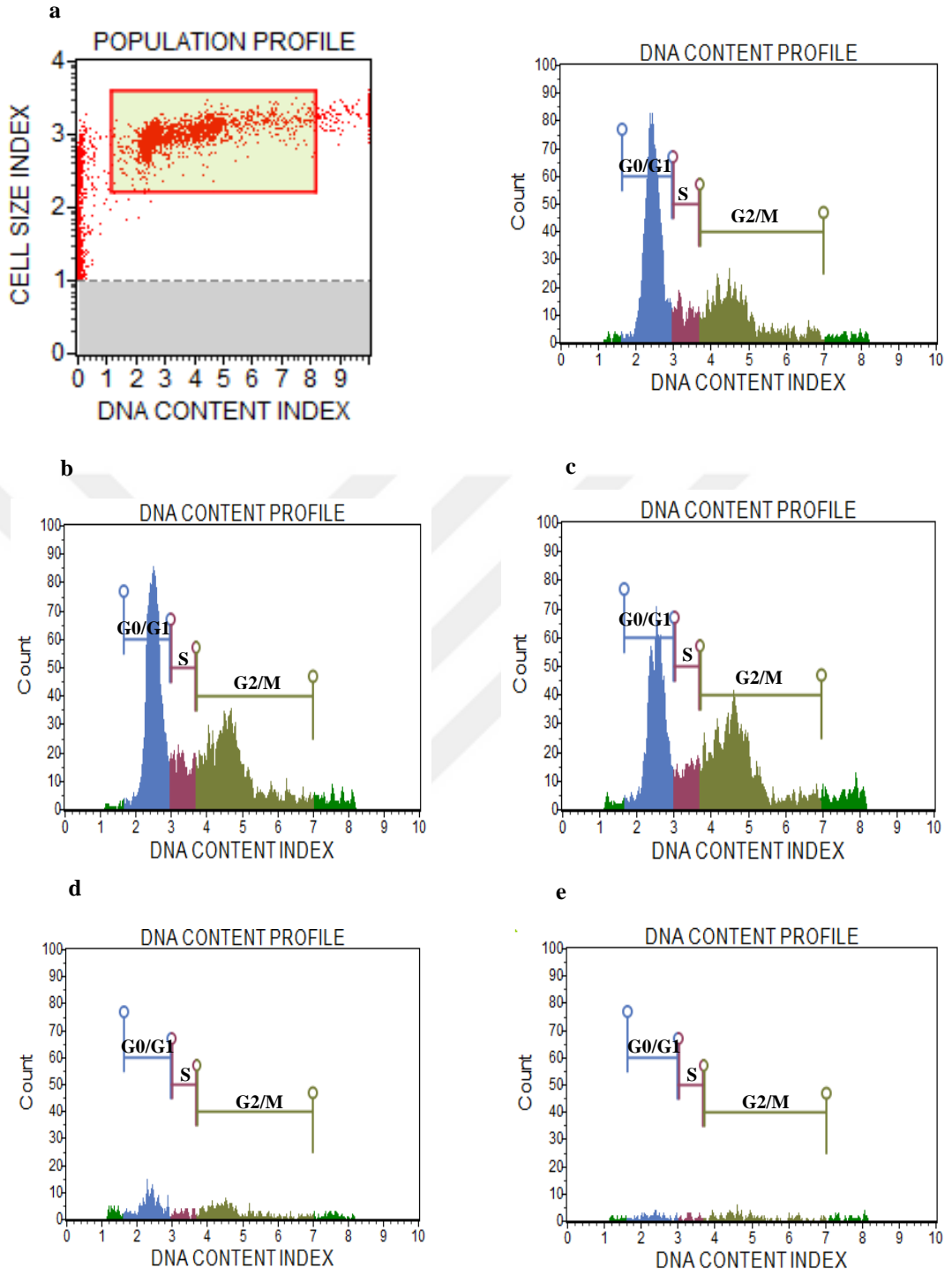
d



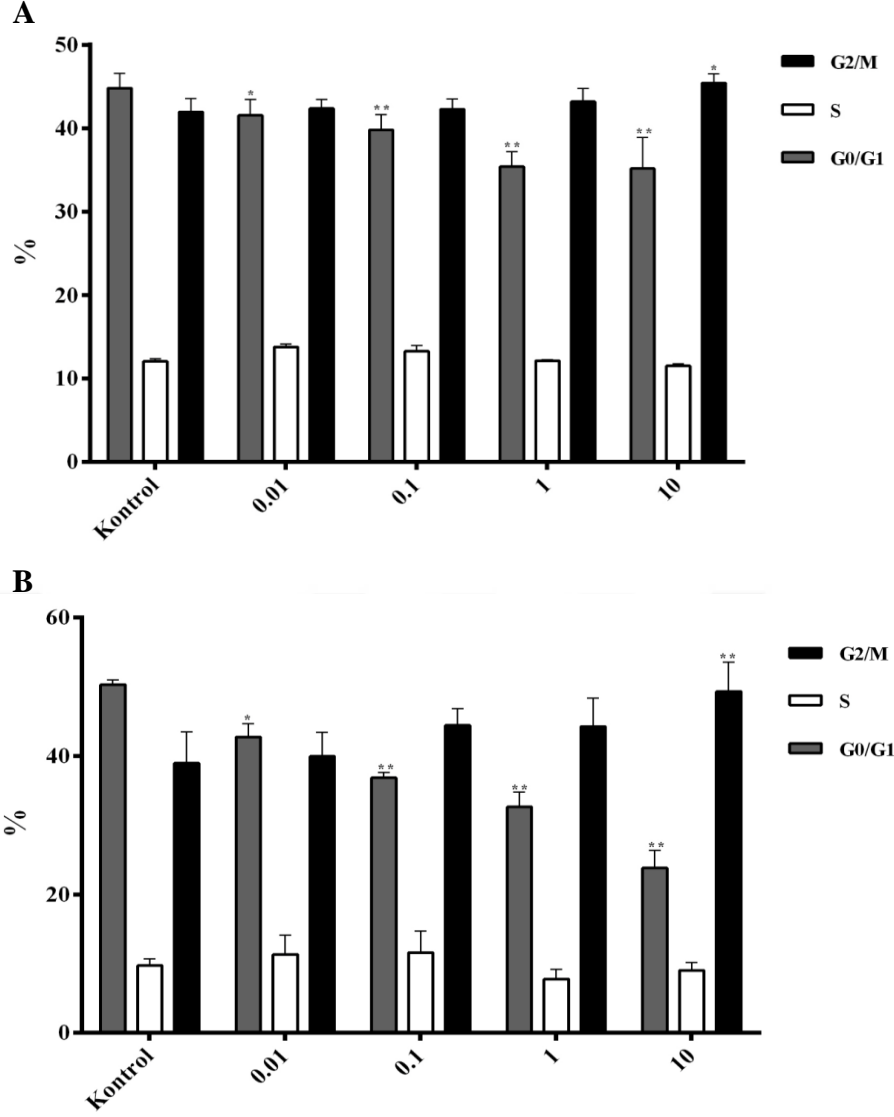
e



Şekil 49. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



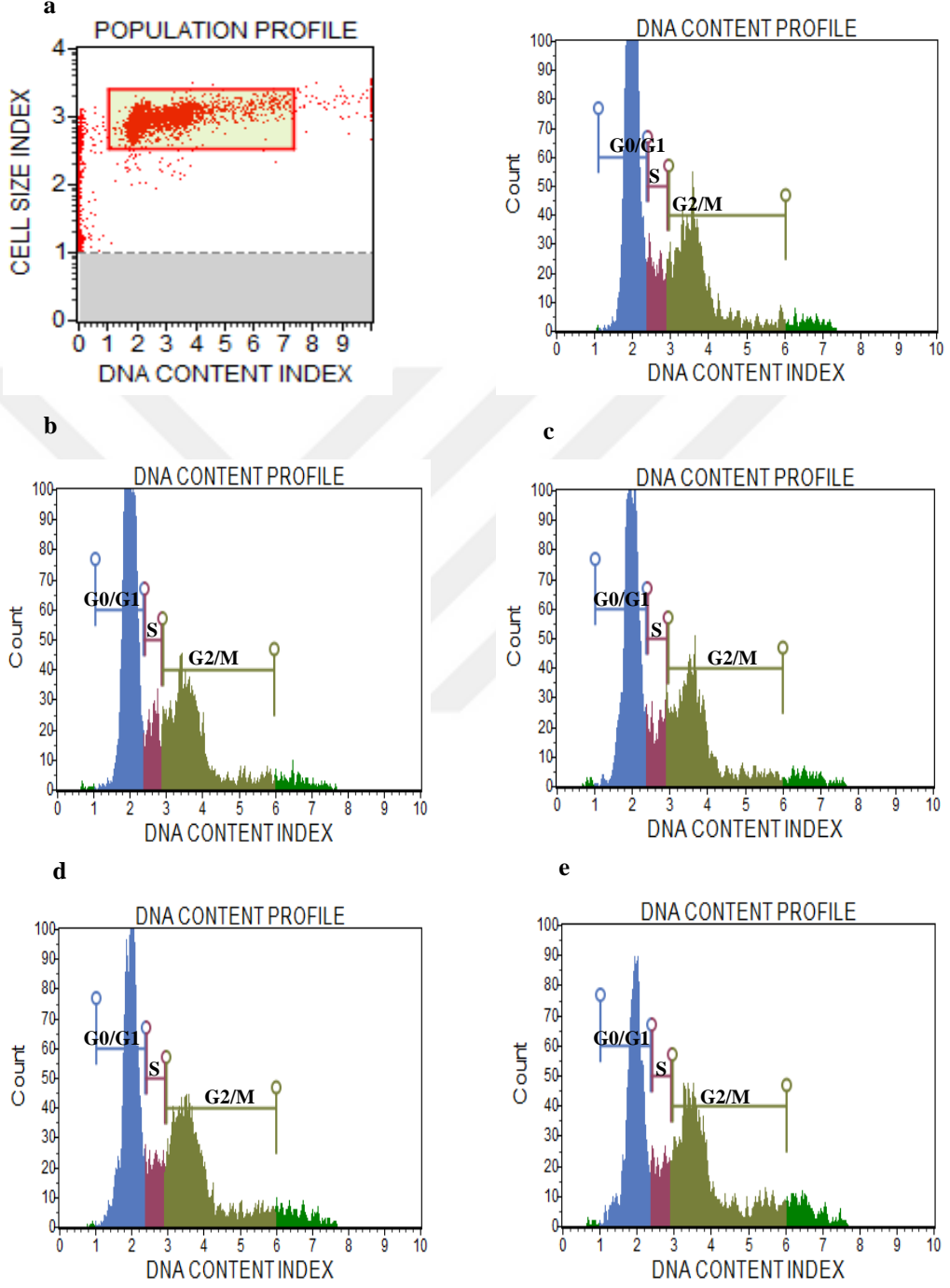
Şekil 50. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



Şekil 51. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarında değişimler (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

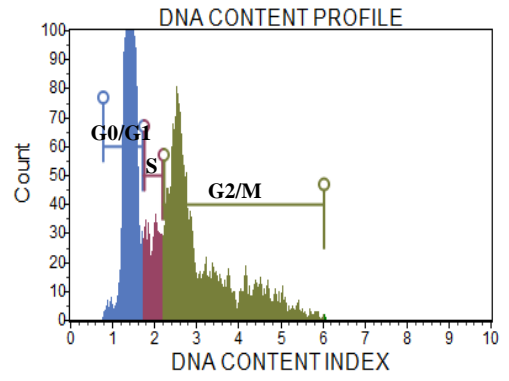
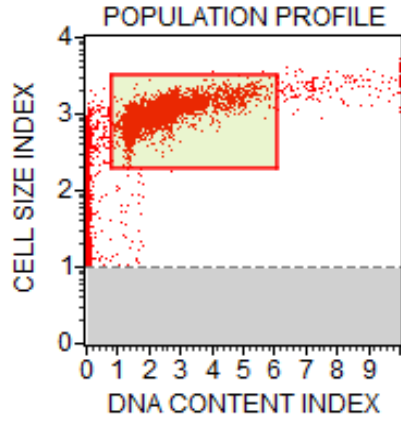
HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün hücre siklusu üzerinde etkisi incelendiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde G0/G1 fazında hücre miktarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%51.1) sırasıyla %49 ve %38.0'e azalırken, G2/M fazında hücre miktarının kontrol ile karşılaştırıldığında (%33.2) sırasıyla %34.0 ve %42.0'a arttığı belirlendi (Şekil 52). 12. günün sonunda ise, G0/G1 fazında hücre miktarı kontrol grubunda %45.9 olarak belirlenmesine rağmen, 0.01 nM ve 10 nM uygulanan hücrelerde sırasıyla %44.1 ve %29.3 olarak analiz edildi. G2/M fazında hücre miktarı ise kontrol grubunda %40.5 iken, 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %42.3 ve %52.0'ye arttığı belirlendi (Şekil 53). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673

uygulanan HCC1937-R hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarı açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 54’de özetlendi.

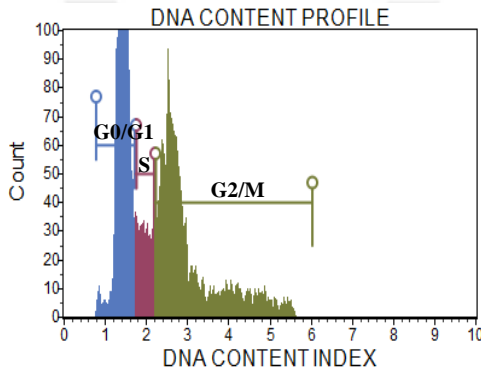


Şekil 52. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.

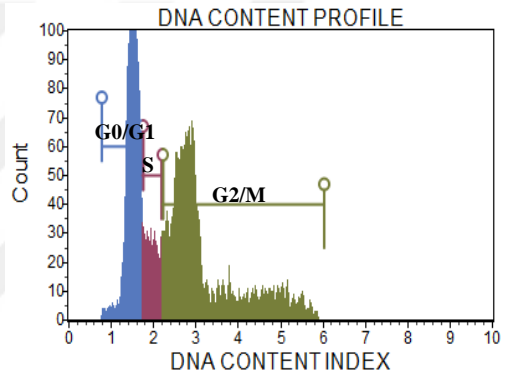
a



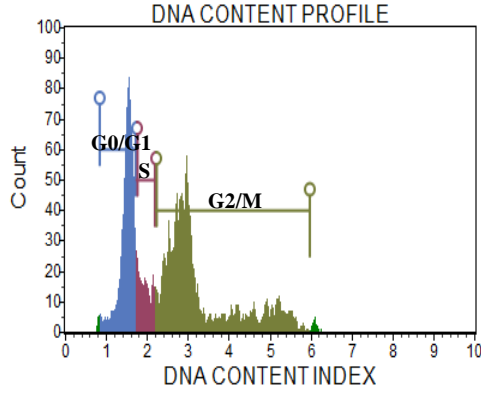
b



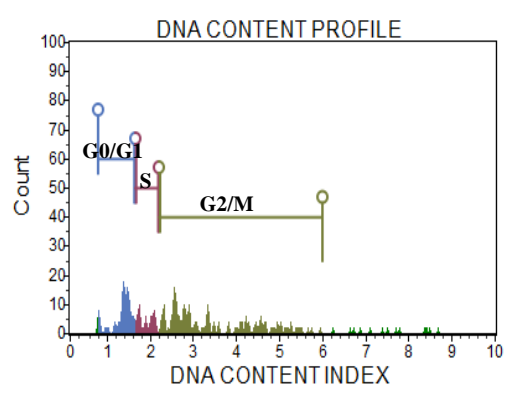
c



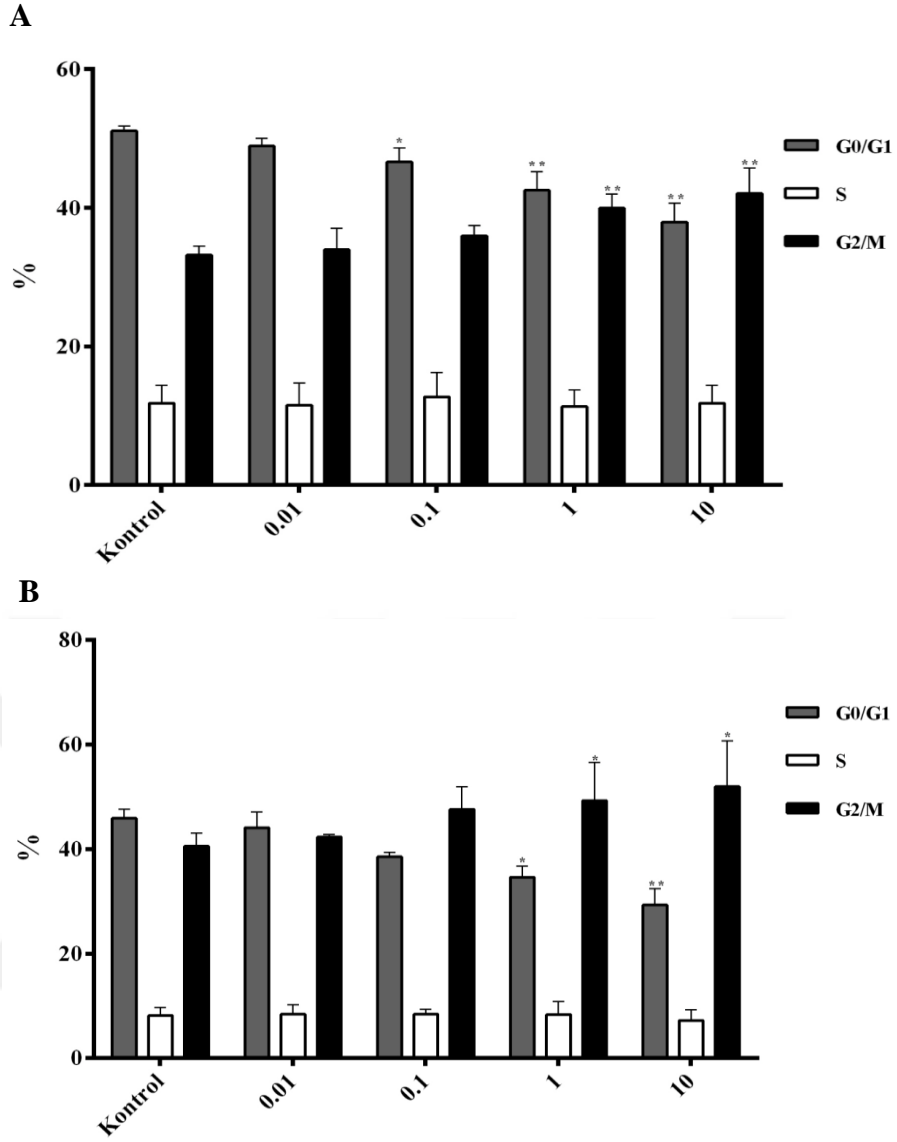
d



e



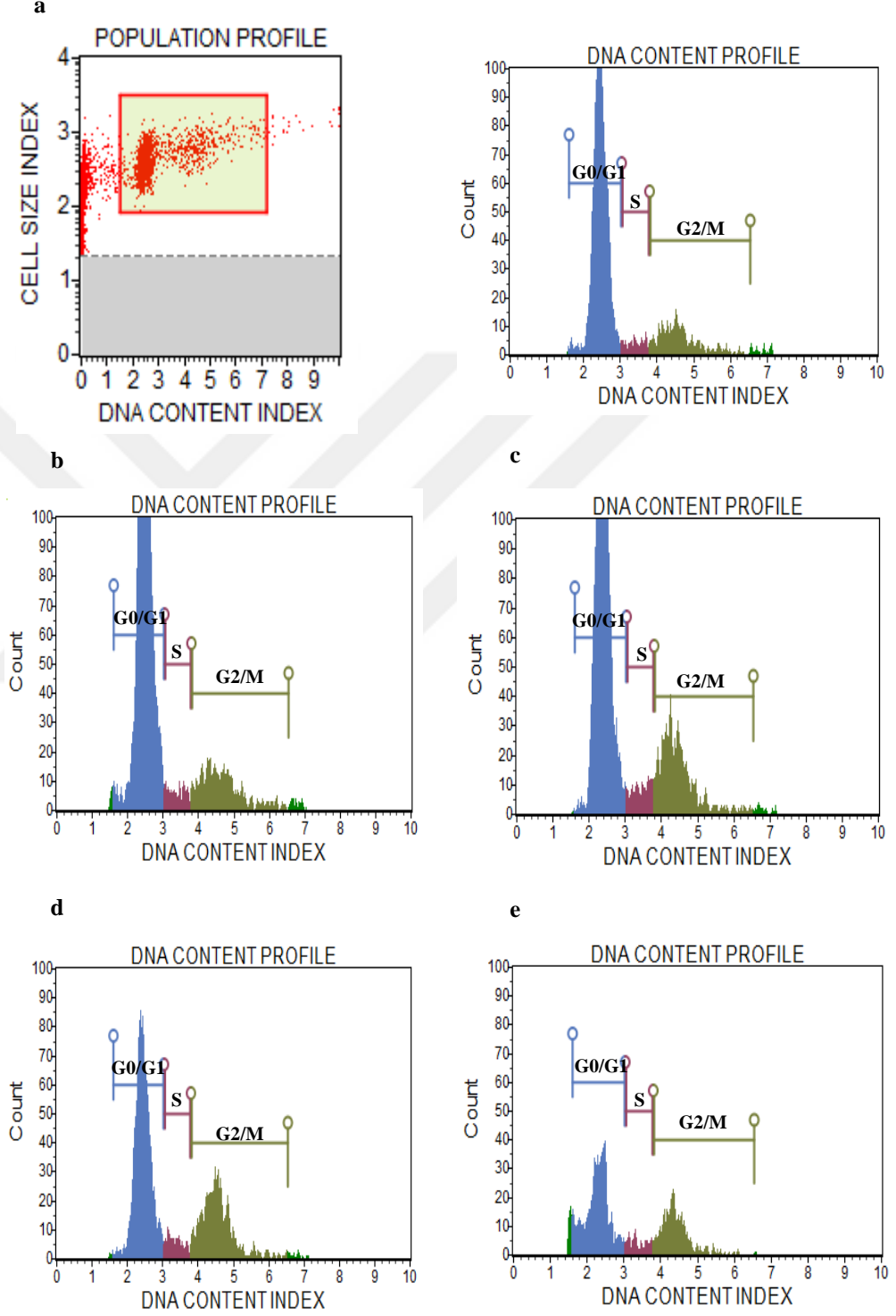
Şekil 53. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



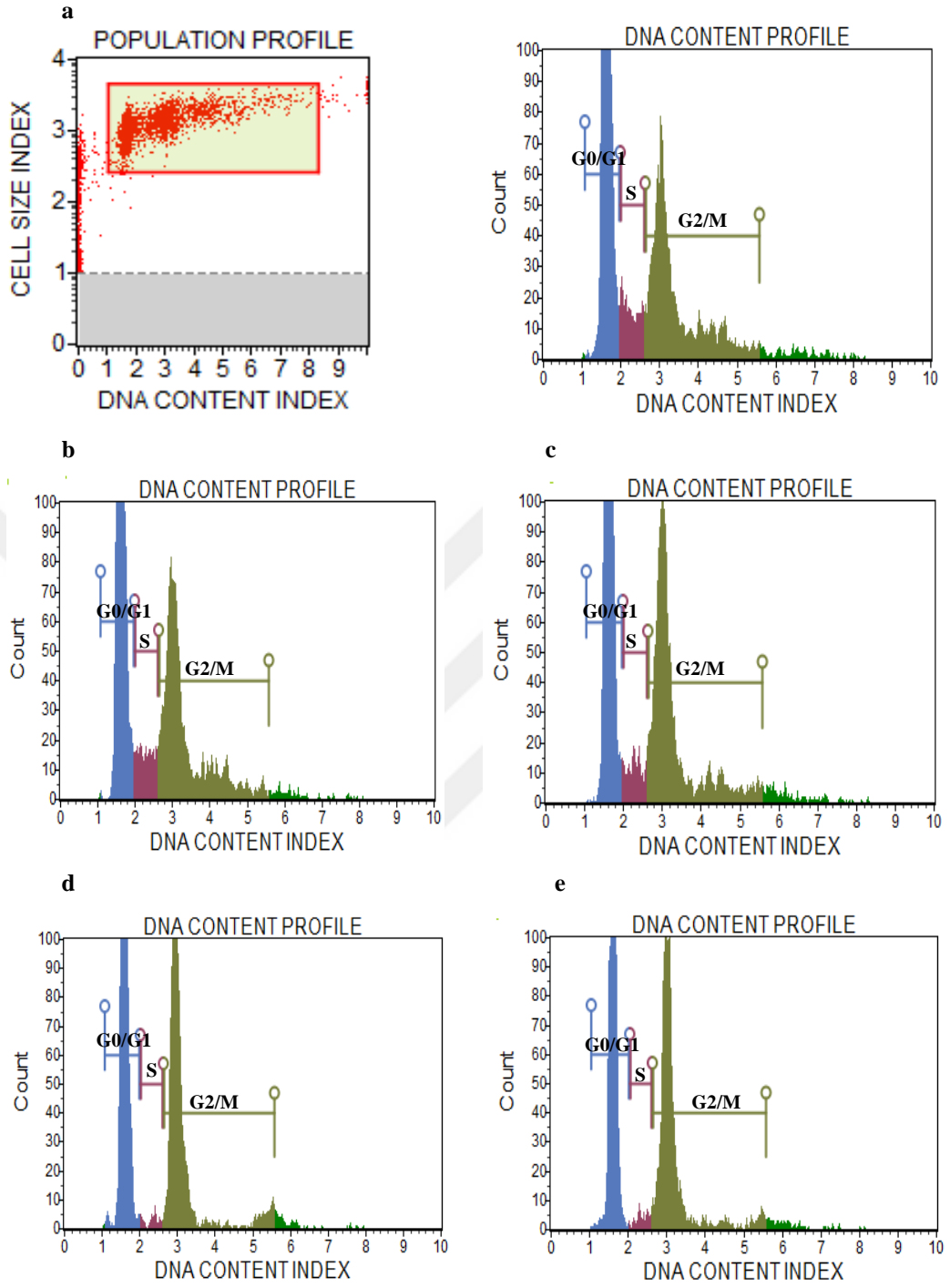
Şekil 54. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarında değişimler (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün etkisi incelendiğinde ise, kontrol grubunda G0/G1 fazında hücre miktarı %80.4 iken, 6 gün boyunca 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %76.5 ve %60.1 olarak analiz edildi. G2/M fazının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%14.0), 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %17 ve %33.3'e arttığı belirlendi (Şekil 55). 12. günün sonunda ise, kontrol grubunda G0/G1 fazında hücre miktarı %70.3 olarak belirlenmesine rağmen, 0.01 nM ve 10 nM BMN uygulanan hücrelerde sırasıyla %68.5 ve %55'e azaldığı tespit edildi. G2/M fazında hücre miktarının ise kontrol grubunda %21.6 iken, 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %24 ve %39.7'e arttığı analiz edildi (Şekil 56). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673

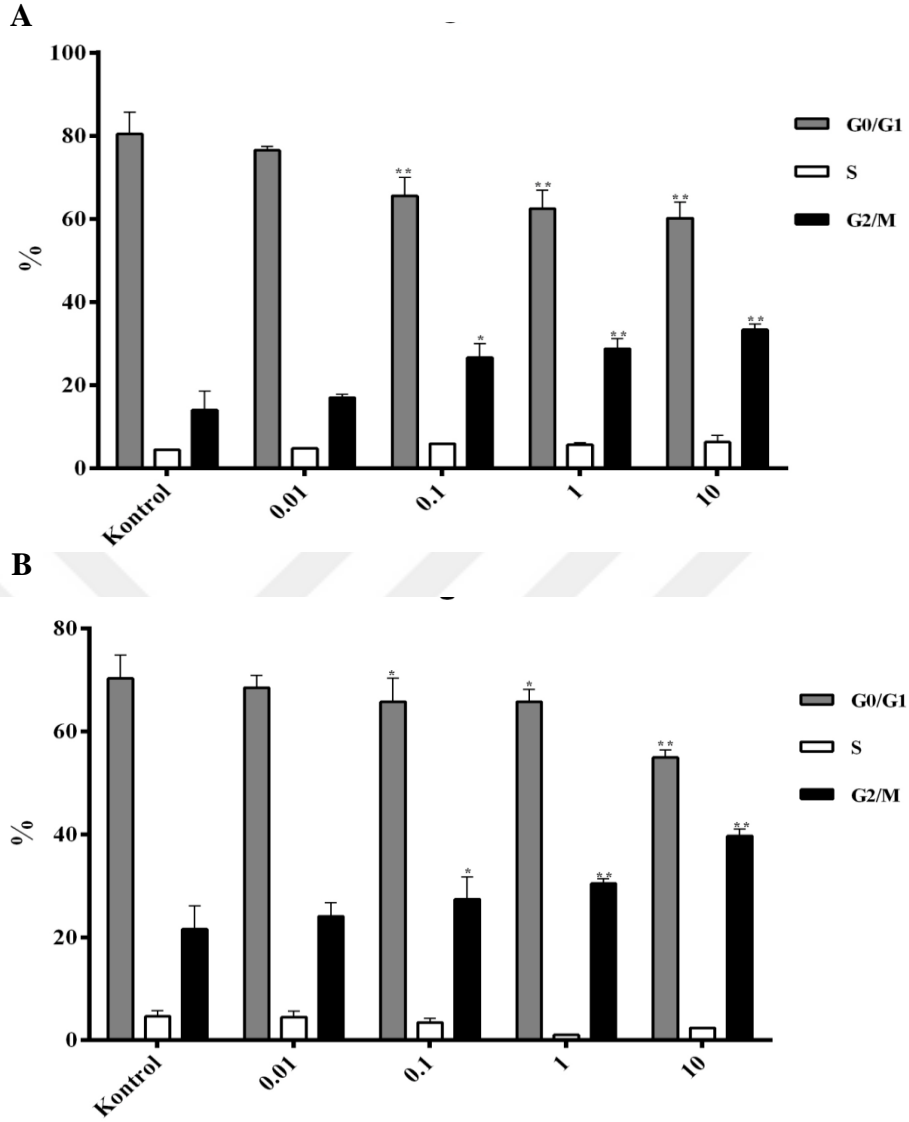
uygulanan MCF-10A hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarı açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 57’de özetlendi.



Şekil 55. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde, hücre döngüsü evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



Şekil 56. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde, hücre döngüsü evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



Şekil 57. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarında değişimler (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Sonuç olarak, BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde G0/G1 evresinde doza ve zamana bağlı anlamlı bir şekilde azalma belirlenmesine rağmen, G2/M fazında hücre miktarında artış analiz edildi.

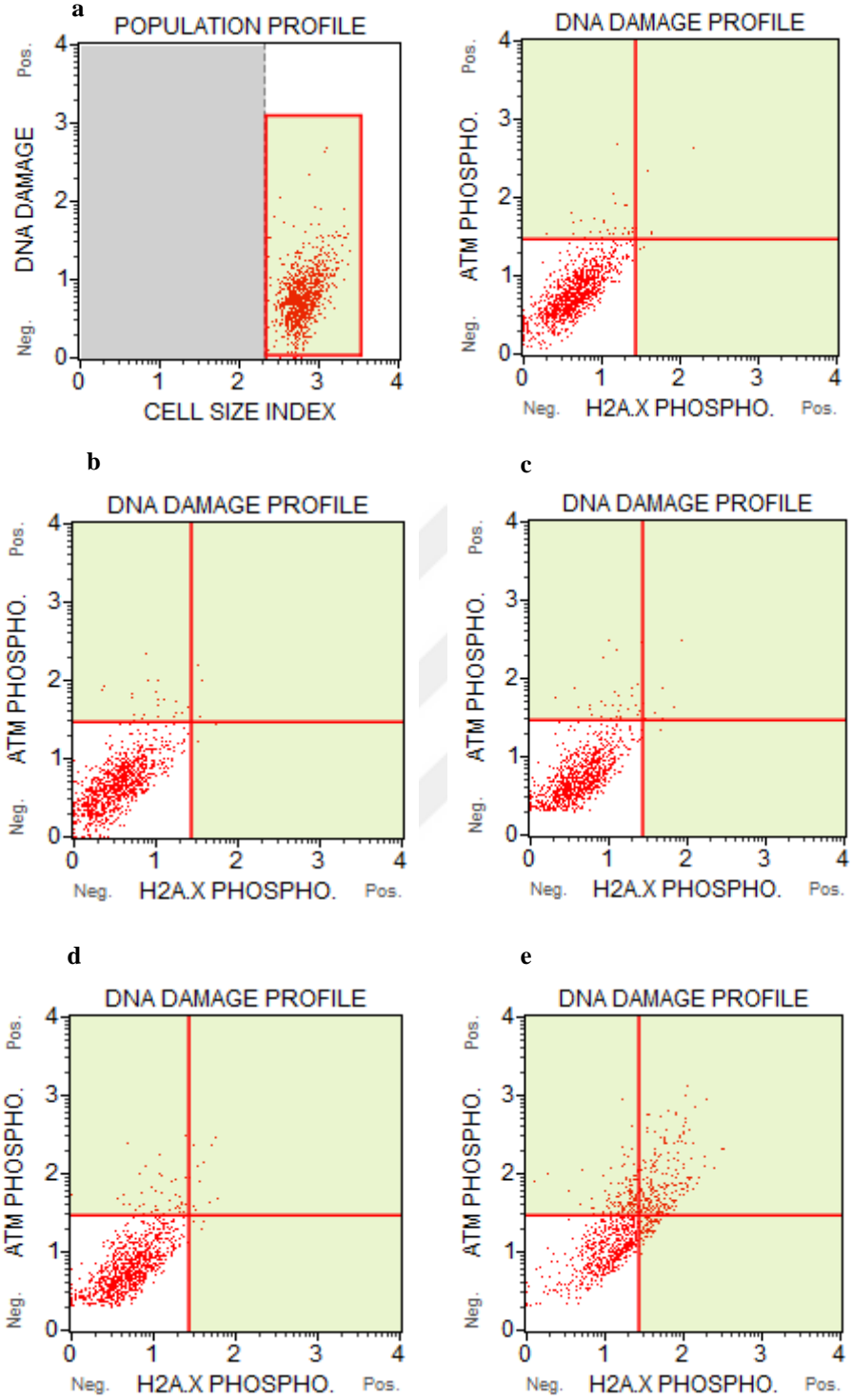
4.5. BMN 673'ün DNA Hasarı Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde neden olduğu DNA hasarının belirlenebilmesi için eş zamanlı olarak fosforile ATM ve H2AX aktivasyonu analiz edildi.

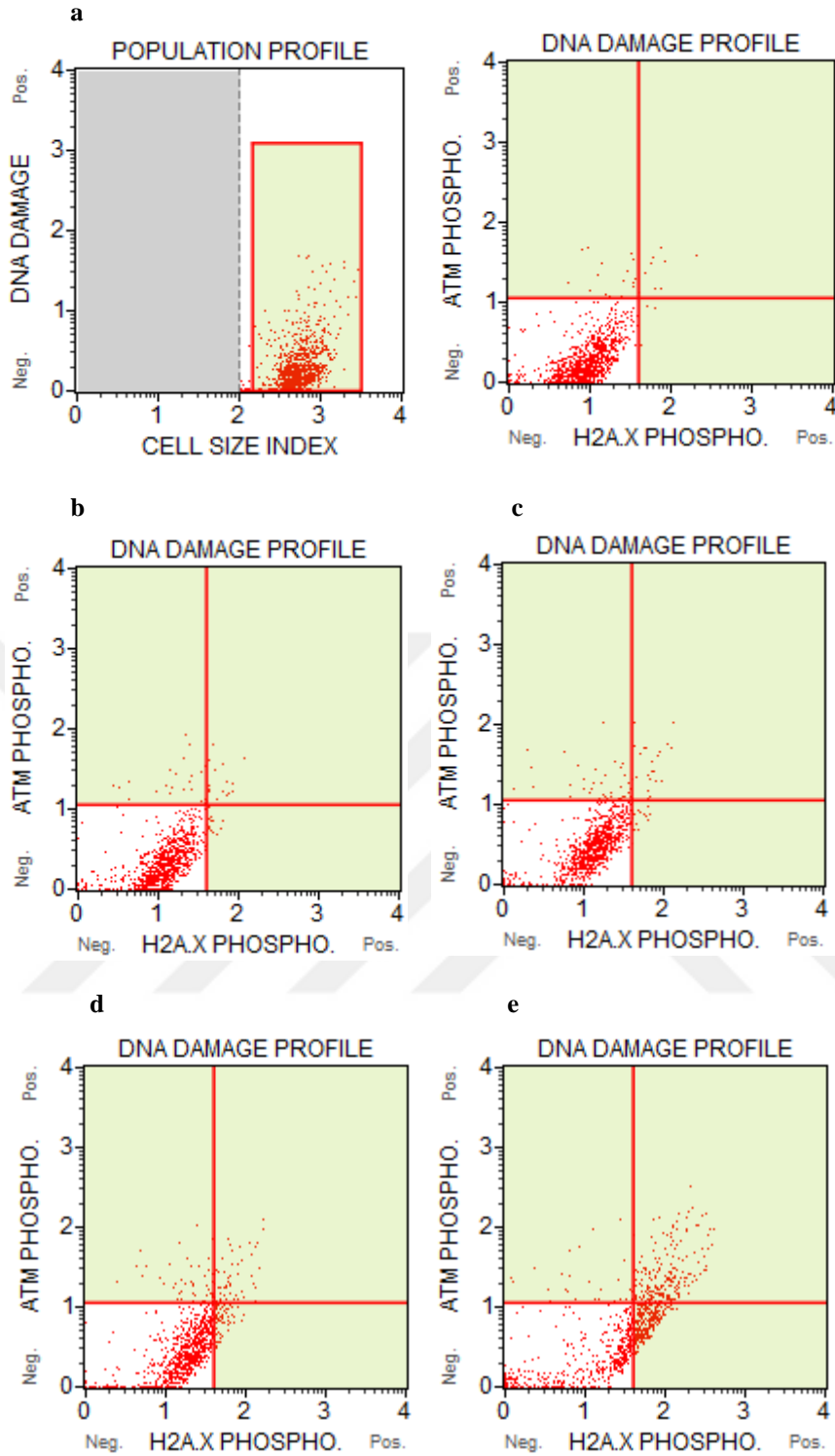
6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fosforile ATM (p-ATM), fosforile H2AX (p-H2AX) ve DNA çift zincir kırığı (dsDNA) miktarı sırasıyla %2.74, %0.23 ve %0.34 iken, 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %13.59, %8.65 ve %23.27 olarak belirlendi (Şekil 58). 12 günün sonunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %2.23, %1.32 ve %1.72 olarak belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %2.87, %27.60 ve %22.51 olarak analiz edildi (Şekil 59). Farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak canlı hücre, p-ATM, p-H2AX, dsDNA ve toplam DNA hasarı miktarı Tablo 45'de özetlendi.

Tablo 45. 6 ve 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde DNA hasarına ait veriler

	Kontrol		0.01		0.1		1		10	
	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g
Negatif (LL)	%96.57	%96.92	%96.69	%94.73	%95.58	%91.57	%93.84	%83.47	%54.48	%47.03
pATM (UL)	%2.68	%1.75	%2.74	%2.23	%3.53	%3.76	%4.54	%4.44	%13.59	%2.87
dsDNA (UR)	%0.54	%1.03	%0.34	%1.72	%0.66	%2.54	%1.30	%5.37	%23.27	%22.51
pH2A.X (LR)	%0.21	%0.31	%0.23	%1.32	%0.22	%2.13	%0.32	%6.71	%8.65	%27.60
Toplam DNA hasarı (UL+ UR+ LR)	%3.43	%3.08	%3.31	%5.27	%4.42	%8.43	%6.16	%16.53	%45.52	%52.97



Şekil 58. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



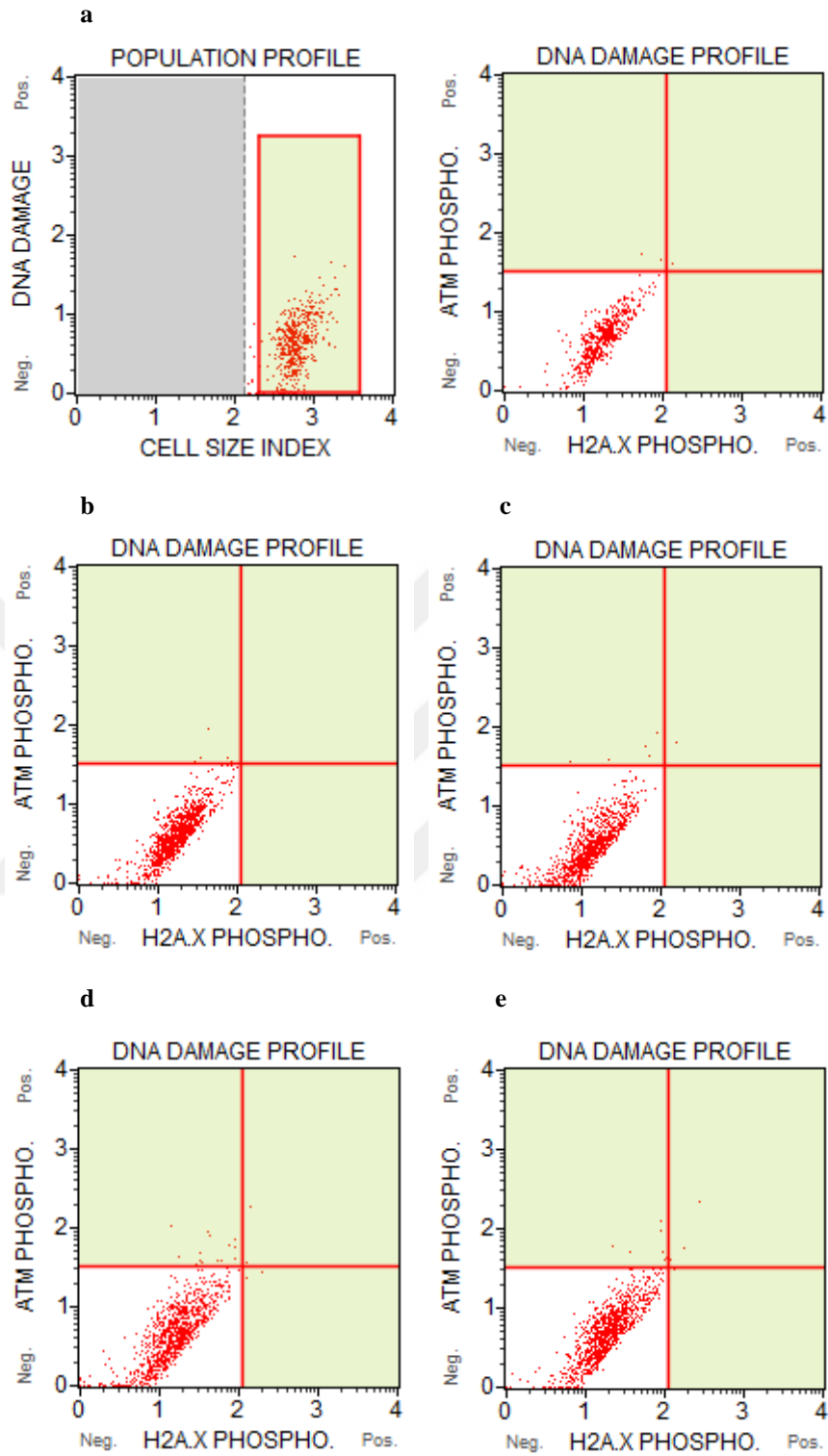
Şekil 59. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün neden olduğu DNA hasarı üzerinde etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak incelendiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %0.61, %0.0

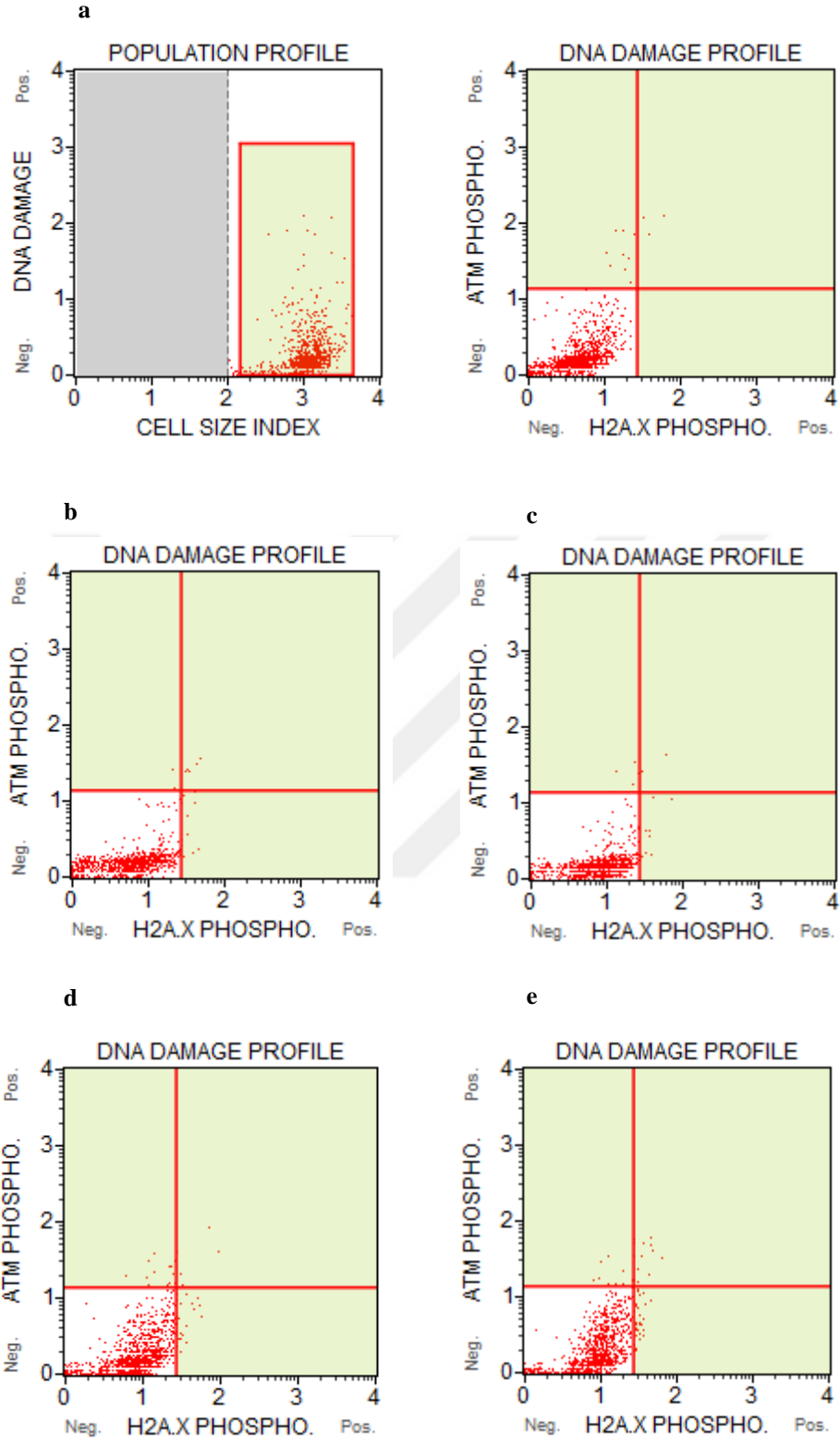
ve %0.0 iken, 10 nM BMN 673 uygulandığında bu oranlar sırasıyla % 1.54, %0.21 ve %0.21 olarak belirlendi (Şekil 60). 12 günün sonunda ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %0.50, %1.00 ve %0.20 belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %0.90, %3.20 ve %1.30 olarak analiz edildi (Şekil 61). Farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde kontrol ile karşılaştırmalı olarak canlı hücre, p-ATM, p-H2AX, dsDNA ve toplam DNA hasarı miktarı Tablo 46’da özetlendi.

Tablo 46. 6 ve 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde DNA hasarına ait veriler

	Kontrol		0.01		0.1		1		10	
	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g
Negatif (LL)	%99.41	%98.40	%99.39	%98.30	%99.19	%97.90	%98.78	%95.70	%98.05	%94.59
pATM (UL)	%0.40	%1.20	%0.61	%0.50	%0.71	%0.60	%0.71	%1.40	%1.54	%0.90
dsDNA (UR)	%0.20	%0.40	%0.00	%0.20	%0.10	%0.50	%0.31	%0.40	%0.21	%1.30
pH2A.X (LR)	%0	%0.00	%0.00	%1.00	%0.00	%1.00	%0.20	%2.50	%0.21	%3.20
Toplam DNA hasarı (UL+UR+LR)	%0.59	%1.60	%0.61	%1.70	%0.81	%2.10	%1.22	%4.30	%1.95	%5.41



Şekil 60. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM

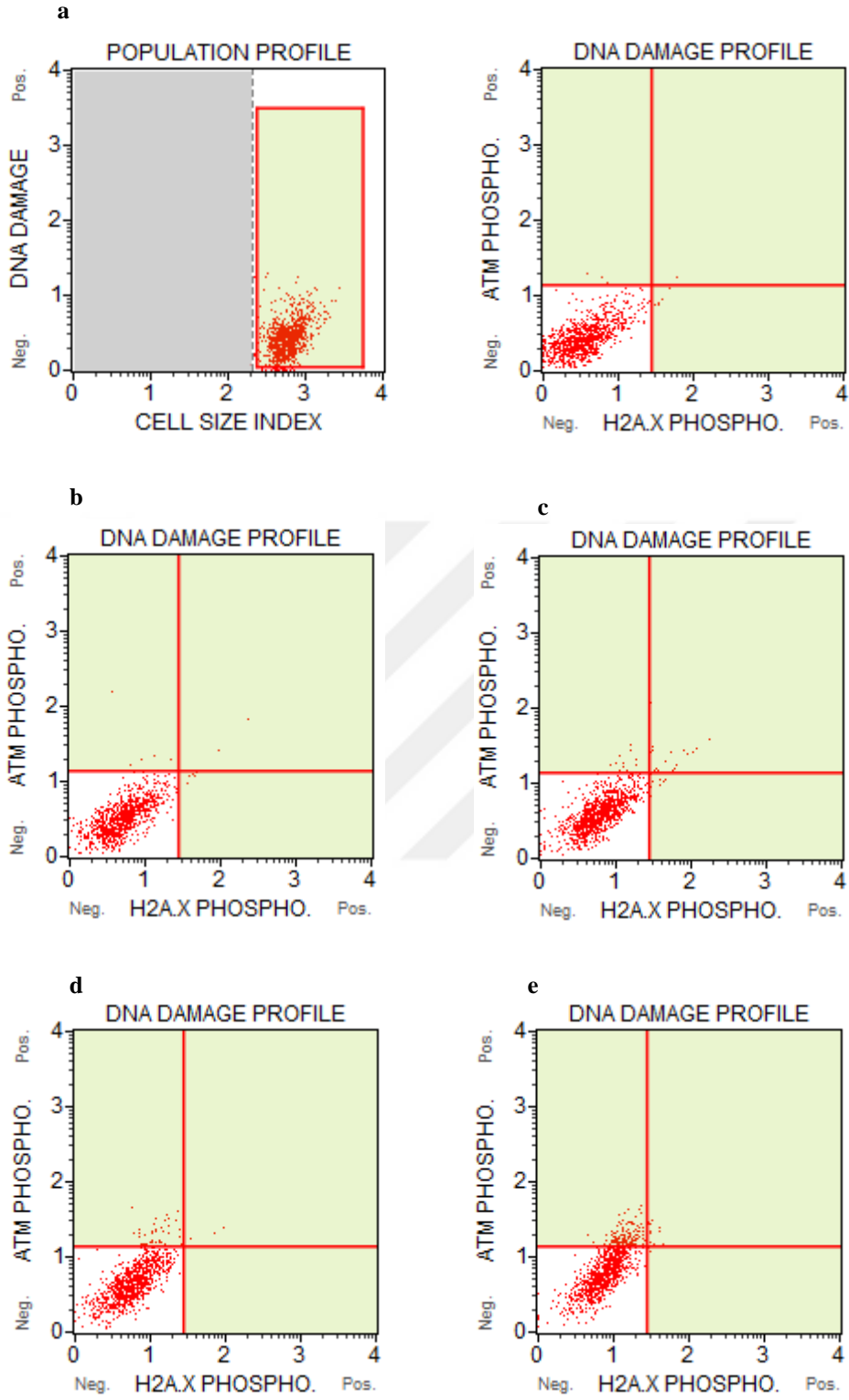


Şekil 61. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM

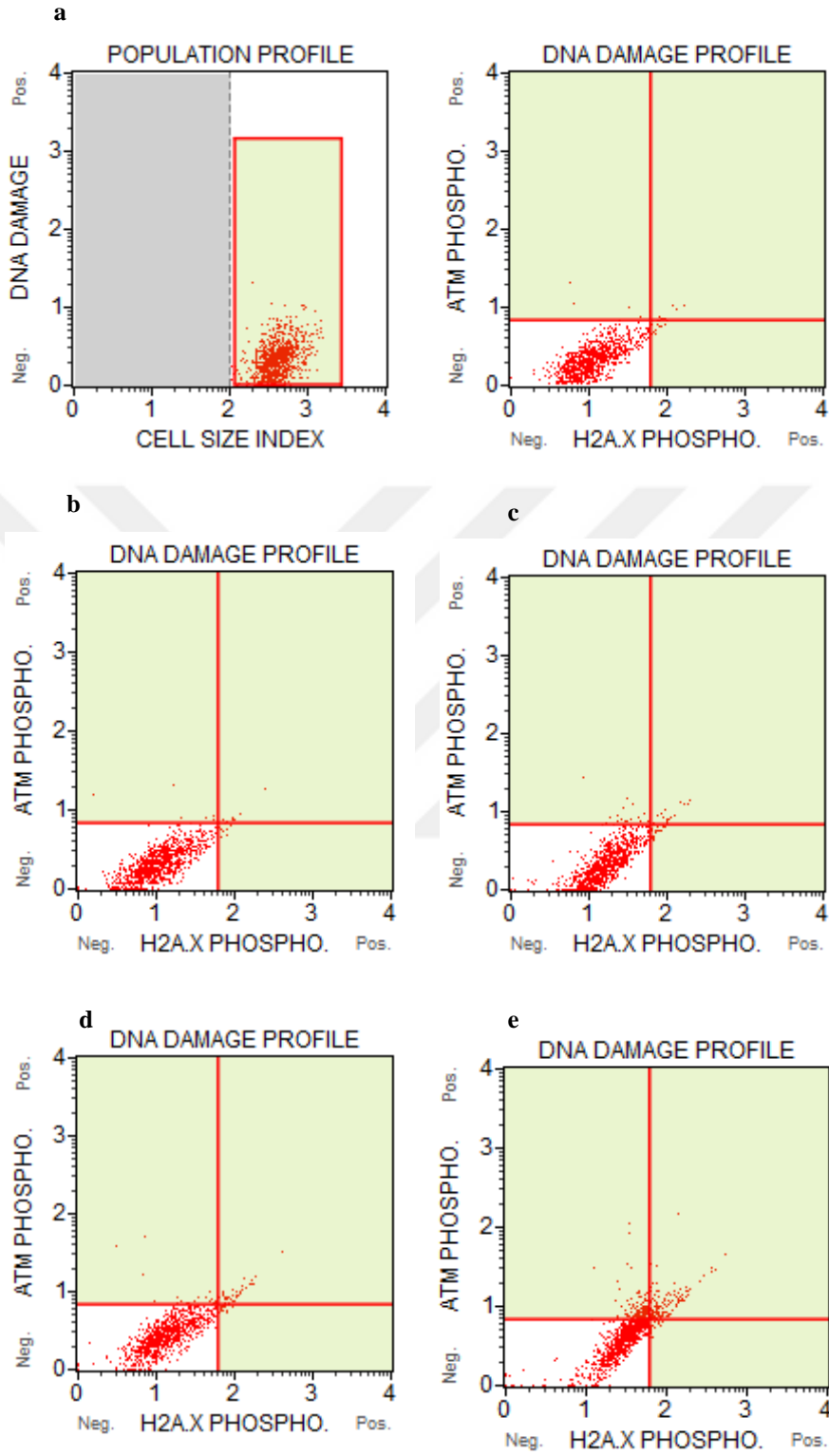
MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün neden olduğu DNA hasarı üzerinde etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak incelendiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %0.62, %0.52 ve %0.21 iken, 10 nM BMN 673 uygulandığında bu oranlar sırasıyla %14.85, %0.31 ve %1.12 olarak belirlendi (Şekil 62). 12 günün sonunda ise, 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde p-ATM , p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %0.70, %0.80 ve %0.80 olarak belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %12.32, %2.00 ve %13.03 olarak analiz edildi (Şekil 63). Farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde kontrol ile karşılaştırılmalı olarak canlı hücre, p-ATM, p-H2AX, dsDNA ve toplam DNA hasarı miktarı Tablo 47'de özetlendi.

Tablo 47. 6 ve 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde DNA hasarına ait veriler

	Kontrol		0.01		0.1		1		10	
	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g
Negatif (LL)	%99.06	%96.79	%98.66	%97.69	%95.44	%94.78	%95.45	%92.56	%83.72	%72.65
pATM (UL)	%0.31	%0.75	%0.62	%0.70	%1.32	%1.60	%4.25	%2.11	%14.85	%12.32
dsDNA (UR)	%0.10	%0.85	%0.21	%0.80	%2.03	%1.60	%0.30	%3.62	%1.12	%13.03
pH2A.X (LR)	%0.52	%1.60	%0.52	%0.80	%1.22	%2.01	%0.00	%1.71	%0.31	%2.00
Toplam DNA hasarı (UL+UR+LR)	%0.94	%3.21	%1.34	%2.31	%4.56	%5.22	%4.55	%7.44	%16.28	%27.35



Şekil 62. 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



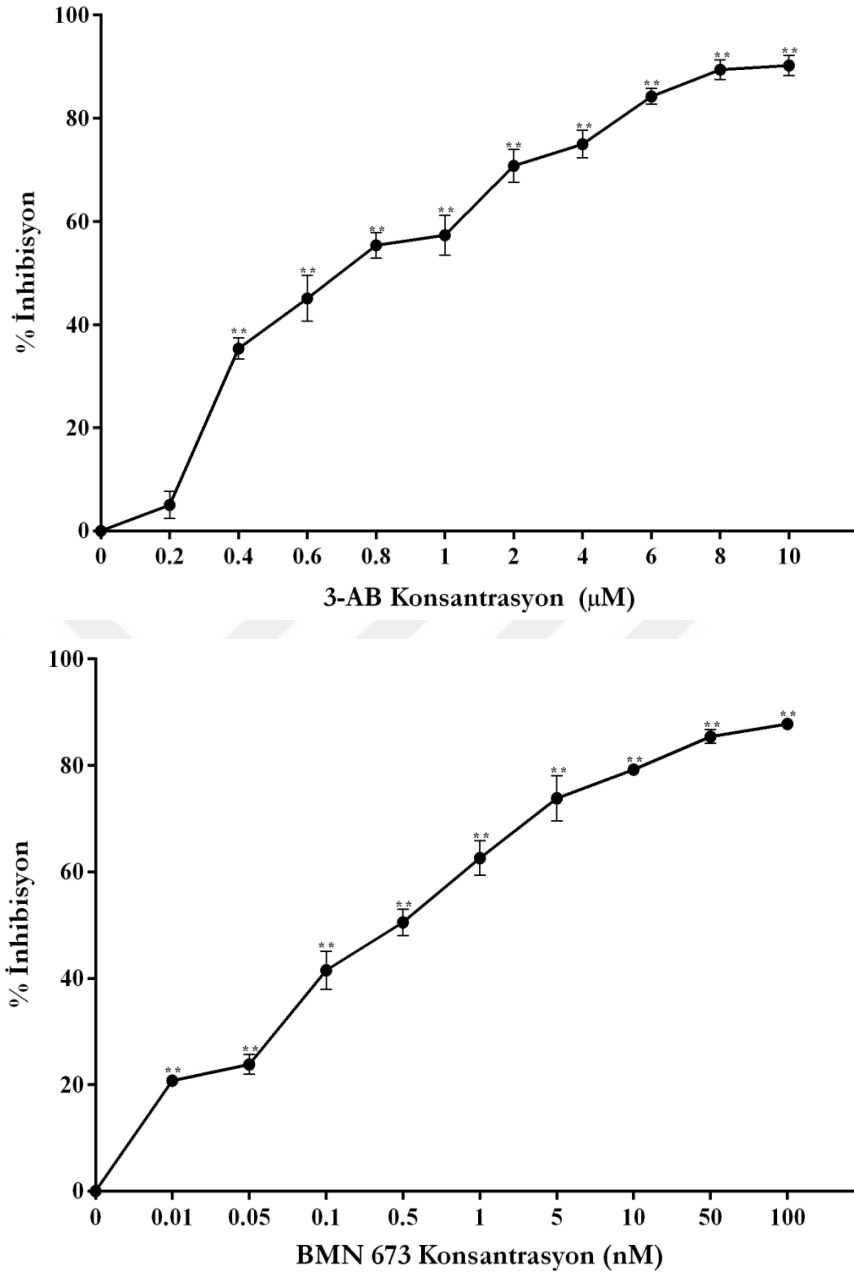
Şekil 63. 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM

Sonuç olarak, 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde pATM miktarında artış belirlenirken, 12. günün sonunda ise hücrelerde dsDNA miktarında artış analiz edildi. Ancak 12 günün sonunda BMN 673, HCC1937 hücrelerinde p-H2AX miktarında artışa neden olurken, MCF-10A hücrelerinde p-H2AX miktarında bir artış belirlenmedi. Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün herhangi bir DNA hasarına neden olmadığı analiz edildi.

4.5. BMN 673'ün PARP Aktivasyonu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673'ün PARP aktivasyonu üzerinde etkisi incelendiğinde, uygulanan BMN 673'ün konsantrasyonu arttıkça PARP aktivasyonunda da doza bağlı olarak anlamlı bir azalış belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak 0.2-10 µM konsantrasyon aralığında çalışılan 3-AB'nin PARP aktivasyonu üzerinde etkisi incelendiğinde, 0.2 µM 3-AB'nin PARP aktivasyonunda %5.0 inhibisyona neden olurken, 0.8 µM 3-AB uygulanmasından itibaren %50'nin üstünde PARP aktivasyonunda inhibisyon belirlendi. 10 µM 3-AB'nin ise PARP aktivasyonunda %90.3 oranında inhibisyona neden olduğu analiz edildi ($p < 0.01$, Şekil 64).

0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 nM BMN 673'ün PARP aktivasyonu üzerinde inhibisyon etkisi incelendiğinde ise sırasıyla %20.8, %41.5, %62.7, %79.2 ve %87.8 oranları belirlendi ($p < 0.01$, Şekil 64) ve elde edilen verilere göre BMN 673'ün IC_{50} konsantrasyonu 0.44 ± 0.04 nM olarak hesaplandı. Sonuç olarak, BMN 673 kontrol olarak kullanılan 3-AB ile karşılaştırıldığında, oldukça düşük konsantrasyonlarda bile PARP aktivasyonunu anlamlı derecede inhibe ettiği gözlemlenmiştir.



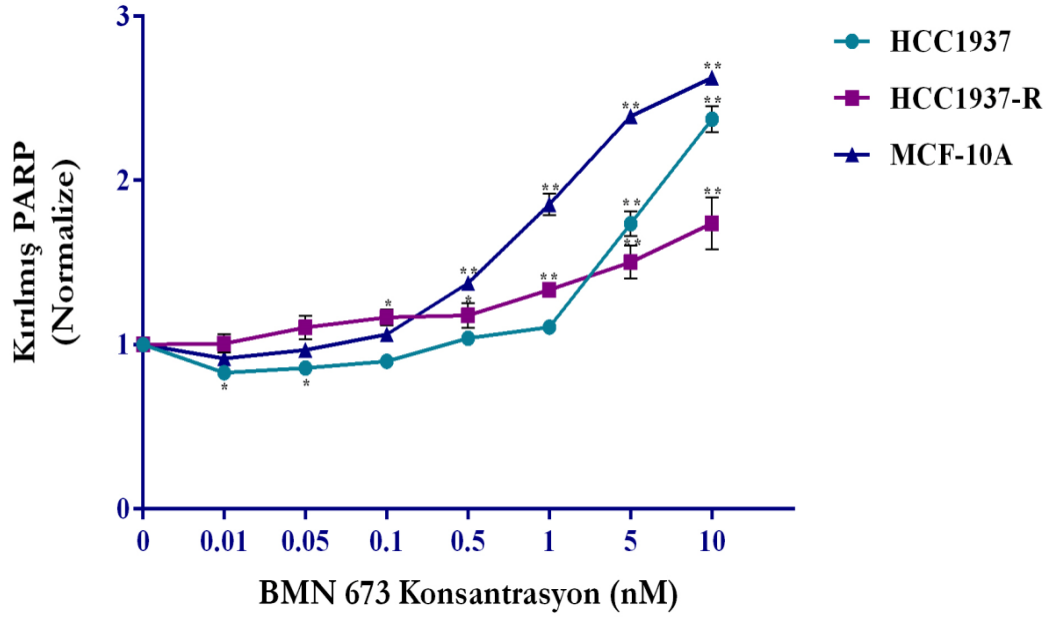
Şekil 64. 3-AB ve BMN 673'ün PARP aktivasyonu üzerinde inhibisyon etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

4.6. BMN 673'ün PARP Proteinini Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Belirlenen konsantrasyonlarda (0.01-10 nM) BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde PARP proteinin 89 kDa fragmentinin kantitatif seviyesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analiz sonucunda hücrelerde normalize edilen kırılmış PARP seviyesinin doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Ancak HCC1937-R hücrelerinin kazandığı dirençten dolayı 89 kDa PARP proteinin seviyesindeki artış miktarı, HCC1937 hücrelerine göre daha az miktarda tespit edilmiştir.

HCC1937 hücrelerinde normalize kırılmış PARP miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (1.0-kat), 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla 0.82-, 0.90-, 1.11- ve 2.37-kat değişiklik belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde sırasıyla 1.0-, 1.16-, 1.33- ve 1.74- kat değiştiği analiz edildi ($p < 0.01$, Şekil 65). MCF-10A hücrelerinde ise normalize kırılmış PARP miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (1.0-kat), 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla 0.92-, 1.06-, 1.85- ve 2.63-kat değiştiği belirlendi ($p < 0.01$, Şekil 65).

Sonuç olarak, BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde PARP proteinin 89 kDa fragmentinin kantitatif miktarında artış analiz edilmiştir. HCC1937-R hücrelerinde normalize kırılmış PARP miktarındaki değişimin HCC1937 hücrelerinde göre daha az oranda olduğu belirlenmiştir. MCF-10A hücrelerinde ise BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı özellikle yüksek konsantrasyonlarda normalize kırılmış PARP miktarı anlamlı derece de arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar hücrelerde BMN 673'ün apoptoz üzerinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Annexin V-PI sonuçları ile paralellik göstermektedir.

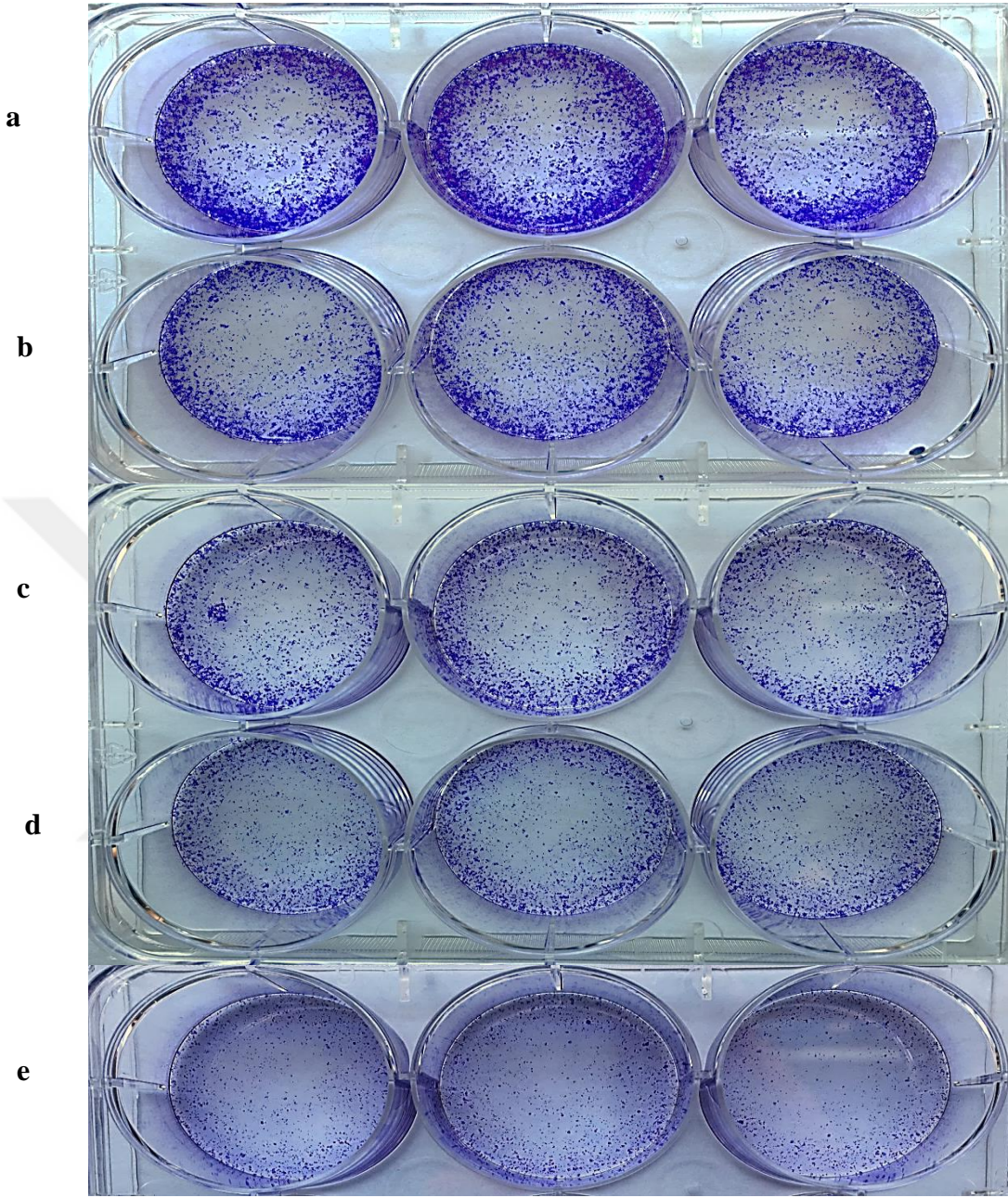


Şekil 65. HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün 89 kDA PARP fragmenti üzerinde kantitatif etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

4.7. BMN 673'ün Hücrelerde Koloni Oluşumu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerinde etkisi incelendiğinde, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde koloni sayısında doza bağlı olarak azalış belirlenmesine rağmen, HCC1937-R hücrelerinde koloni sayısı HCC1937 hücrelerine göre daha fazla sayıda belirlendi.

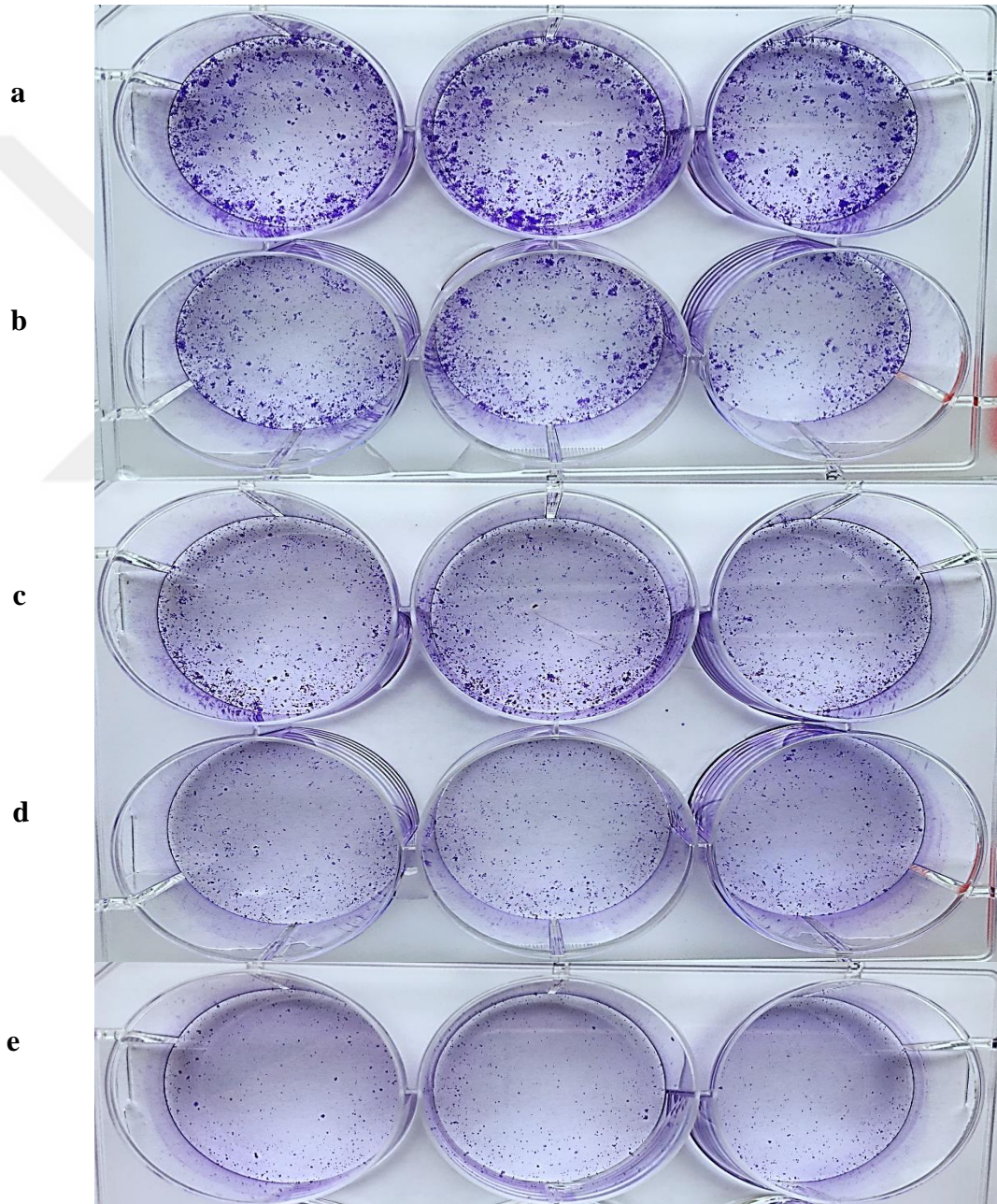
HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün etkisi incelendiğinde, hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 66). HCC1937 kontrol grubunda ortalama koloni sayısı 442 iken 0.01, 0.1 ve 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde ortalama koloni sayısı sırasıyla 380, 249, 194 ve 44 olarak sayıldı (p<0.01, Şekil 69). 6 kuyulu plakada her bir kuyuya ekilen HCC1937 hücrelerinde kontrol grubunda ortalama kaplama verimliliği %44.2±0.75 belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde ortalama kaplama verimliliği sırasıyla %38.0±0.50, %24.9±0.70, %19.4±0.58 ve %4.4±0.36 olarak hesaplandı. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %86±0.44, %56.3±1.36, %43.9±0.62 ve %10.0±0.77'a azaldığı belirlendi (Tablo 48).



Şekil 66. BMN 673'ün HCC1937 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde üzerindeki etkisi (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM ve (e) 10 nM

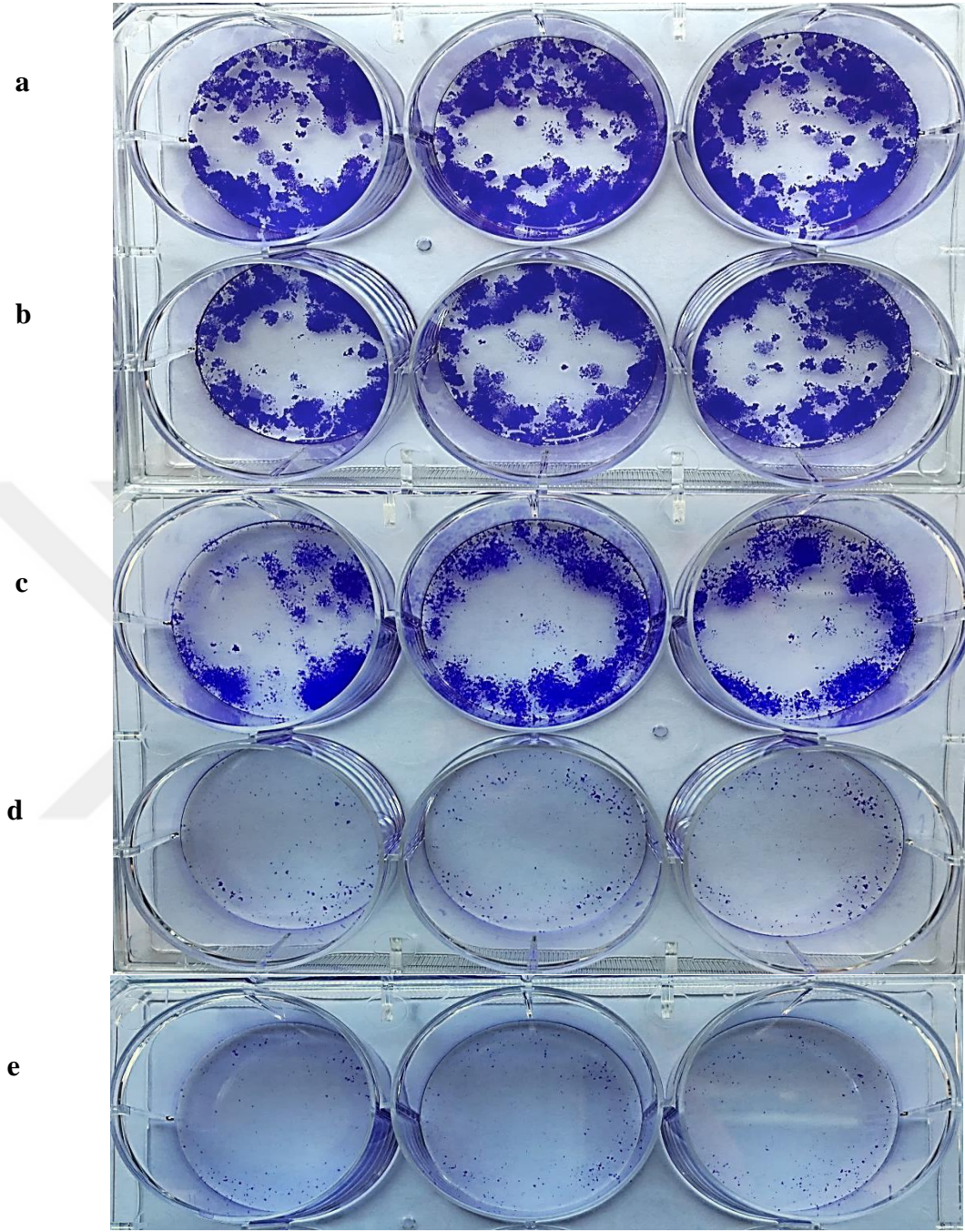
HCC1937-R hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerinde BMN 673'ün etkisi incelendiğinde koloni sayısının doza bağlı olarak azaldığı görülmeye rağmen, HCC1937 hücrelerine göre daha fazla sayıda koloni sayıldı (Şekil 67). HCC1937-R hücrelerinde kontrol grubunda ortalama koloni sayısı 228 iken, 0.01, 0.1 ve 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde ortalama koloni sayısı sırasıyla 240, 169, 107 ve

53 olarak sayıldı ($p < 0.01$, Şekil 69). 6 kuyulu plakada her bir kuyuya ekilen HCC1937-R hücrelerinde kontrol grubunda ortalama kaplama verimliliği $\%22.8 \pm 0.59$ olarak belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde ortalama kaplama verimliliği sırasıyla $\%24.0 \pm 0.56$, $\%16.9 \pm 0.56$, $\%10.7 \pm 0.58$ ve $\%5.3 \pm 0.57$ olarak hesaplandı. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla $\%105.2 \pm 0.57$, $\%74.1 \pm 1.84$, $\%47.0 \pm 3.70$ ve $\%23.2 \pm 1.92$ 'ye azaldığı belirlendi (Tablo 48).

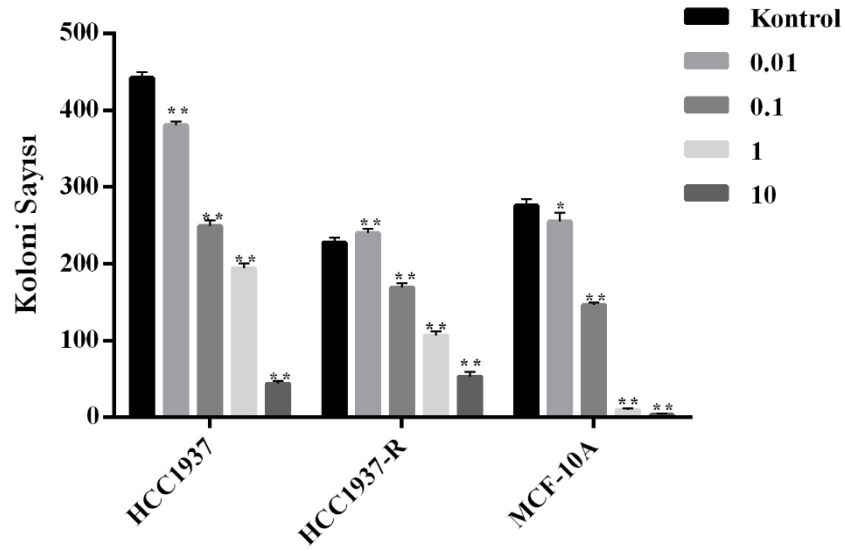


Şekil 67. BMN 673'ün HCC1937-R hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde üzerindeki etkisi (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM ve (e) 10 nM

MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün etkisine araştırıldığında ise, BMN 673'ün hücrelerde toksik etkisinden dolayı doza bağlı olarak koloni sayısında azalma görülmüştür ($p<0.01$, Şekil 68). MCF-10A kontrol grubunda ortalama koloni sayısı 276 iken, 0.01, 0.1 ve 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde ortalama koloni sayısı sırasıyla 255, 147, 10 ve 4 olarak sayıldı (Şekil 69). 6 kuyulu plakada her bir kuyuya ekilen MCF-10A hücrelerinde kontrol grubunda ortalama kaplama verimliliği $\%276\pm7.93$ olarak belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde ortalama kaplama verimliliği sırasıyla $\%255\pm11.79$, $\%147\pm2.64$, $\%100\pm2.08$ ve $\%40\pm1.15$ olarak hesaplandı. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde canlılık oranlarının sırasıyla $\%92.3\pm2.50$, $\%53.0\pm0.73$, $\%4.0\pm0.84$ ve $\%2.0\pm0.45$ 'ye azaldığı belirlendi (Tablo 48).



Şekil 68. BMN 673'ün MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde üzerindeki etkisi (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM ve (e) 10 nM



Şekil 69. BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza bağlı olarak koloni sayısında değişim (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Tablo 48. BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkisi.

Hücre	Doz (nM)	Ekilen hücre sayısı	Koloni sayısı (n=3)			Ortalama koloni sayısı	S.S	Kaplama verimliliği (%)	Canlılık oranı (%)
HCC1937	Kontrol	1000	450	435	441	442	7.6	44.2	100
	0.01	1000	385	375	381	380	5.0	38.0	86
	0.1	1000	256	250	242	249	7.0	24.9	56.3
	1	1000	201	190	192	194	5.9	19.4	43.9
	10	1000	47	45	40	44	3.6	4.4	10.0
HCC1937-R	Kontrol	1000	221	230	232	228	5.9	22.8	100.0
	0.01	1000	234	241	245	240	5.6	24.0	105.2
	0.1	1000	164	175	168	169	5.6	16.9	74.1
	1	1000	113	102	105	107	5.7	10.7	47.0
	10	1000	47	55	58	53	5.7	5.3	23.2
MCF-10A	Kontrol	100	270	285	273	276	7.94	276	100
	0.01	100	242	265	258	255	11.7	255	92.3
	0.1	100	146	150	145	147	2.7	147	53
	1	100	12	8	9	10	2.0	100	4
	10	100	5	3	3	4	1.1	40	2

Sonuç olarak, BMN 673, HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza bağlı olarak koloni sayısında azalmaya neden olmasına rağmen, HCC1937-R hücrelerinin canlılık oranı ve koloni sayısında azalış miktarının HCC1937 hücrelerine göre daha az oranda olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, yüksek konsantrasyonlarda BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı MCF-10A hücrelerinde canlılık oranı ve koloni sayısında önemli derecede azalmaya neden olduğu görüntülenmiştir.

4.8. BMN 673'ün Yara İyileşmesi Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

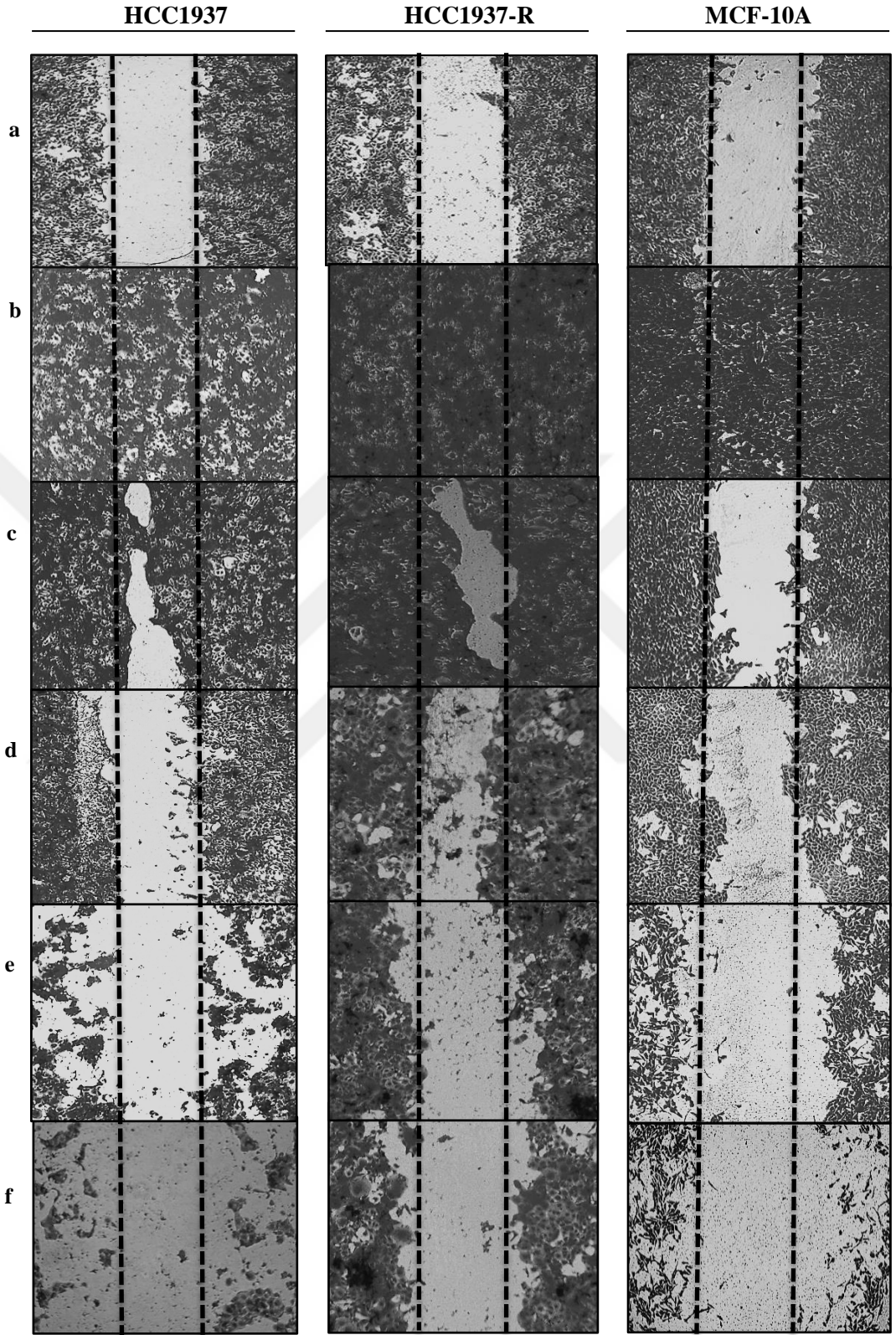
BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinin migrasyon yetenekleri üzerinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen yara analizi sonucunda, her bir deney grubunda yara iyileşme alanı elde edildikten 72 saat sonra kontrol gruplarında tamamen yara alanının kapanmasına rağmen, BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon yeteneklerinde azalışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, HCC1937R hücrelerinde yara iyileşme alanındaki artışın HCC1937 hücrelerine göre daha az oranda olduğu belirlenmiştir (Şekil 70).

HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon hızının azaldığı ve hücrelerin ölümüne bağlı olarak migrasyon mesafe (yara iyileşme) alanının arttığı görülmüştür.

HCC1937-R hücrelerinde belirlenen konsantrasyonlarda BMN 673 uygulandıktan 72 saat sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon hızının azaldığı belirlenmesine rağmen, HCC1937 hücreleri ile karşılaştırıldığında migrasyon mesafe (yara iyileşme) alanındaki artışın daha az olduğu ve hücrelerin migrasyon yeteneklerinin daha fazla olduğu gözlemlendi.

MCF-10A hücrelerinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerde iyileşme alanının arttığı ve hücre migrasyon hızının azaldığı belirlendi.

Sonuç olarak, BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon hızında azalmaya ve migrasyon mesafesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerin doza bağlı olarak migrasyon yeteneklerinde değişimler diğer deneylerde elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

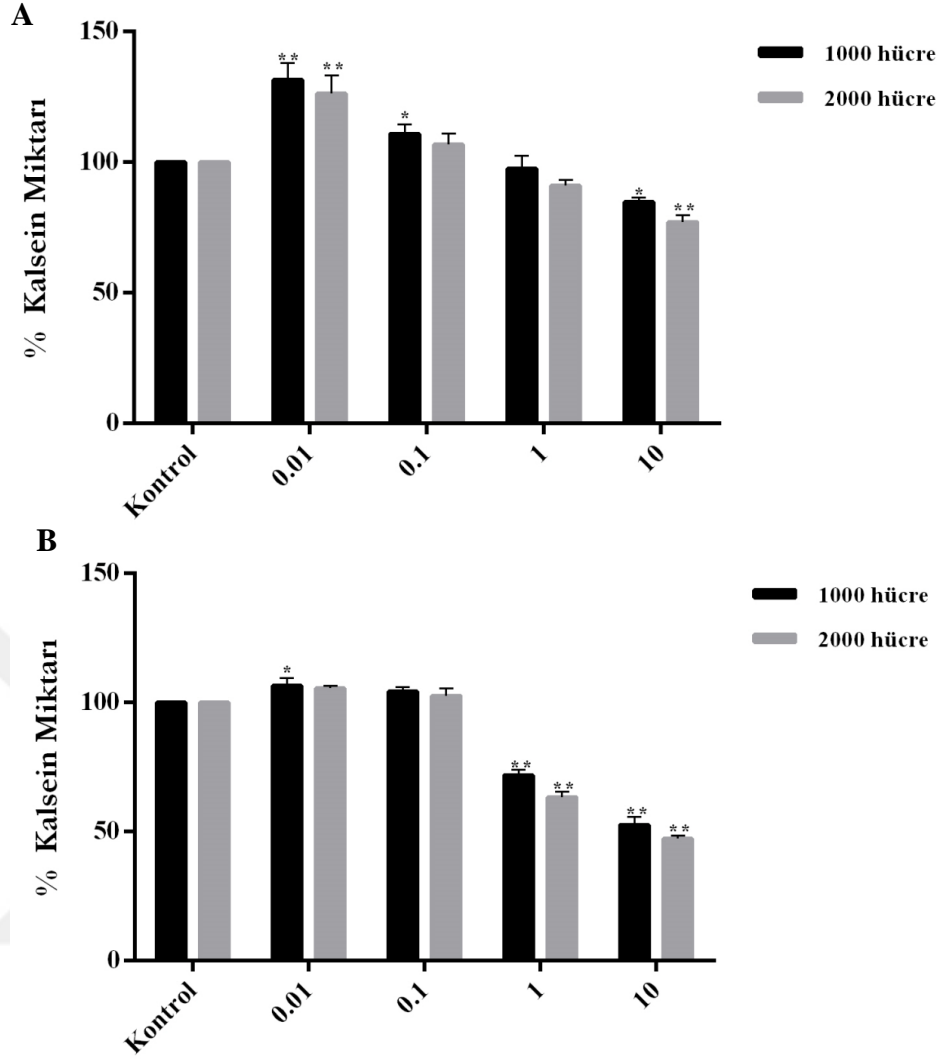


Şekil 70. BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde yara iyileşmesi üzerindeki etkisi (a) Yara iyileşme alanı, (b) Kontrol, (c) 0.01 nM, (d) 0.1 nM, (e) 1 nM, (f) 10 nM

4.9. BMN 673'ün Hücrelerdeki İntraselüler Kalsein Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler alanda kalsein birikme miktarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analiz sonucunda, hücrelerde doza bağlı olarak intraselüler kalsein miktarında azalma belirlenmiştir. Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinde intraselüler kalsein miktarı HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığında, BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncine ve artan ABC taşıyıcı ailesinin üyelerinin (P-gp ve MRP1) aktivitelerine bağlı olarak yaklaşık %50 oranında intraselüler kalsein miktarında azalma belirlenmiştir.

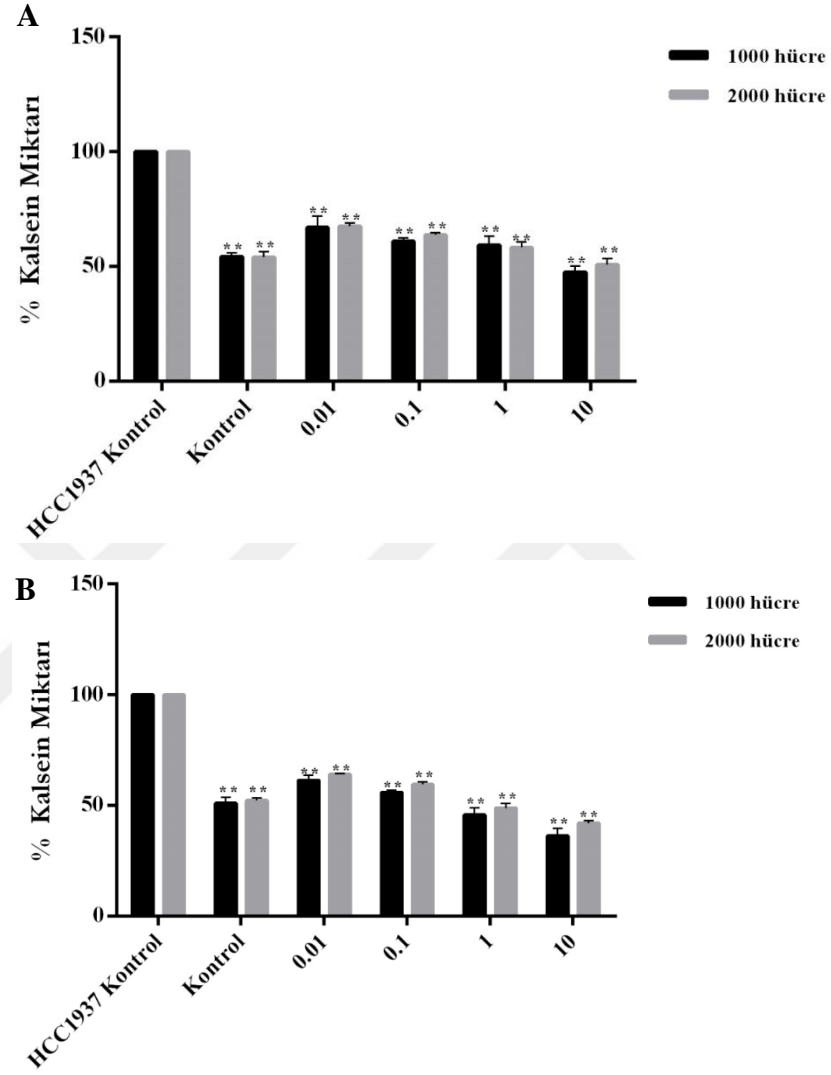
HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler kalsein miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, 96'lı plakaların her bir kuyu başına 1000 ve 2000 hücre ekilen deneyde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde 1000 hücre için sırasıyla %131.6, %110.9, %97.5 ve %84.8 iken, 2000 hücre için sırasıyla %126.3, %106.8, %91.0 ve %77.2 olarak belirlendi ($p<0.01$). 12. günün sonunda ise, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde 1000 hücre için sırasıyla %106.5, %104.2, %72.0 ve %52.7 belirlenmesine rağmen, 2000 hücre için sırasıyla %105.6, %102.7, %63.5 ve %47.3 olarak analiz edildi (Şekil 71, $p<0.01$).



Şekil 71. HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler kalsin miktarındaki (A) 6. gün ve (B) 12. günde etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$).

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler kalsin miktarı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 96'lı plakaların her bir kuyu başına 1000 ve 2000 hücre ekilen deneyde, HCC1937 parental kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1000 hücre için kontrol grubunda %54.3 iken, 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %67.0, %61.0, %59.4 ve %47.6 olarak analiz edildi. 2000 hücre için ise kontrol grubunda intraselüler kalsin miktarı % 54.0 iken, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %67.6, %63.8, %58.4 ve %50.8 olarak belirlendi ($p<0.01$). 12. günün sonunda ise, 1000 hücre için kontrol grubunda intraselüler kalsin miktarı %51.2 iken, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %61.5, %55.9, %46.0 ve %36.4 olarak tespit edildi.

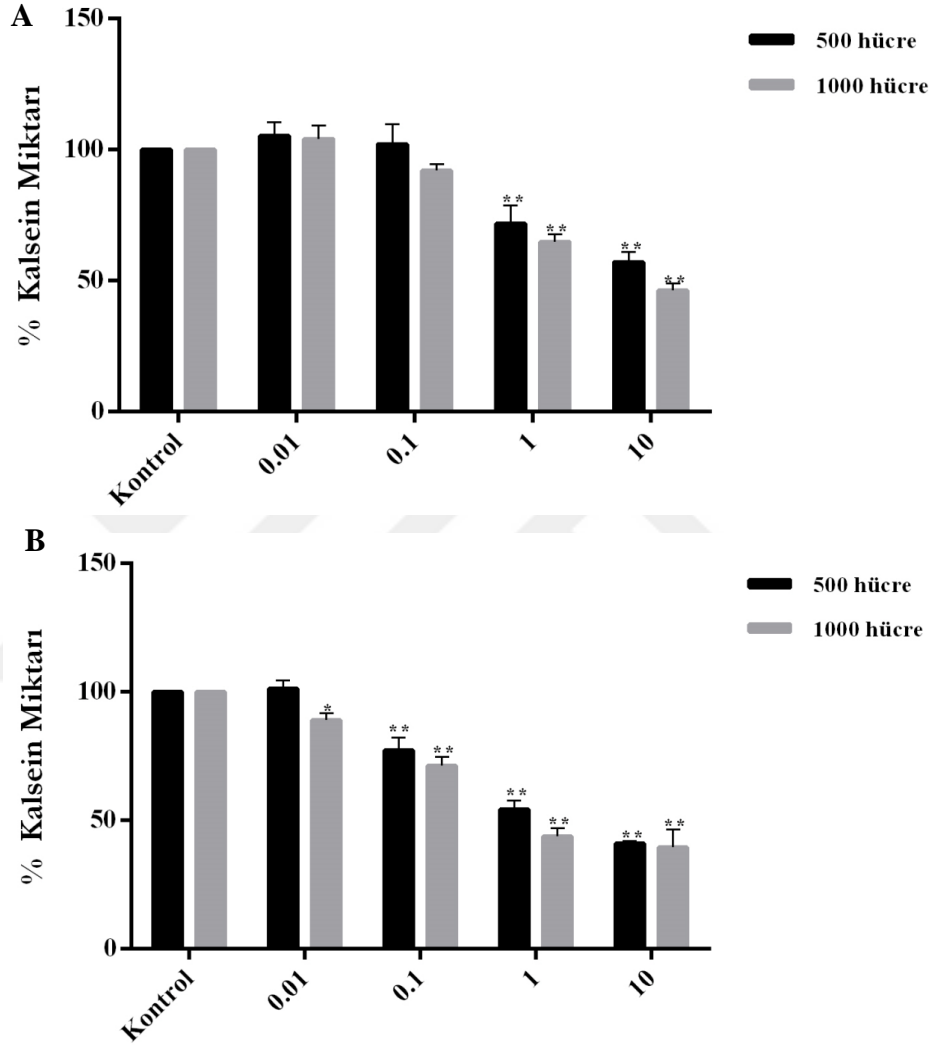
2000 hücre için ise kontrol grubunda intraselüler kalsein miktarı %52.4 belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %64.3, %59.6, %48.9 ve %42.0 olarak analiz edildi ($p < 0.01$, Şekil 72).



Şekil 72. HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler kalsein miktarındaki etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler kalsein miktarı üzerine etkisi incelendiğinde ise, 96'lı plakaların her bir kuyu başına 500 ve 1000 hücre ekilen deneyde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde 500 hücre için intraselüler kalsein miktarı sırasıyla %105.3, %102.1, %71.8 ve %57.1 belirlenmesine rağmen, 1000 hücre için sırasıyla %104.1, %92.0, %65.0 ve %46.3 olarak analiz edildi ($p < 0.01$). 12. günün sonunda

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde intraselüler kalsein miktarı 500 hücre için sırasıyla %101.4, %77.4, %54.4 ve %41.0 iken, 1000 hücre için sırasıyla %89.0, %71.3, %43.8 ve %39.5 olarak belirlendi (Şekil 73, $p < 0.01$).



Şekil 73. MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler kalsein miktarındaki etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

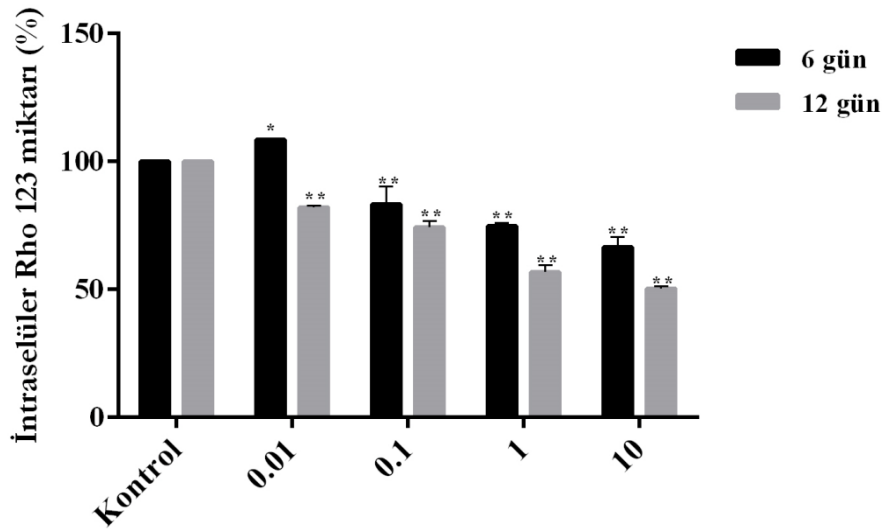
Sonuç olarak, HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisine paralel bir şekilde doza bağlı olarak kalsein miktarı da anlamlı bir şekilde azalmıştır. HCC1937-R hücrelerinde ise hücrelerin BMN 673'e karşı kazandığı dirence bağlı olarak kontrol grubunda kalsein miktarı yaklaşık %50 civarında iken, uygulanan doza bağlı olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0.01$). BMN

673'ün uygulanan konsantrasyonu arttıkça intraselüler kalsein miktarının azalması hücrelerde P-gp veya MRP1 aktivasyonunda potansiyel artışı göstermektedir.

4.10. BMN 673'ün İntraselüler Rhodamin 123 Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler Rhodamin 123 (Rho 123) miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, artan zamana ve doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde intraselüler Rho 123 miktarında azalma belirlenmiştir. Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinde intraselüler Rho123 miktarı HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığında artan ABC taşıyıcı ailesinin üyelerinin (P-gp ve MRP1) aktivitesine bağlı olarak yaklaşık %50 civarında analiz edilmiştir.

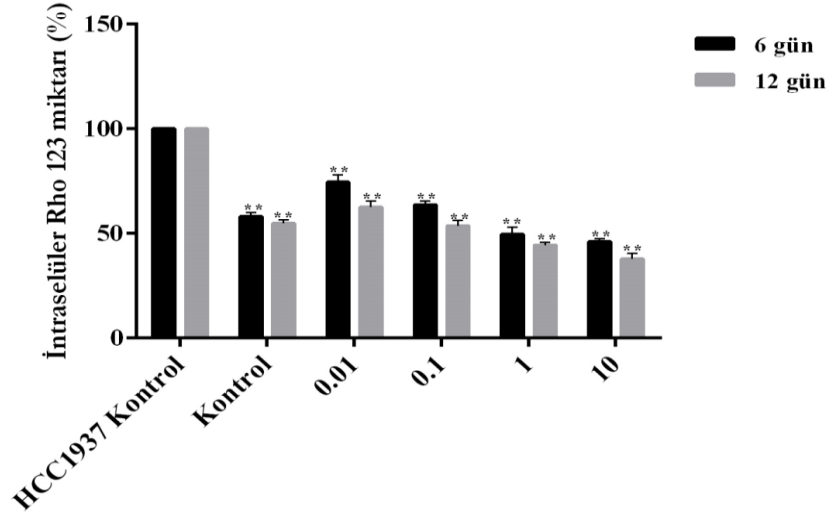
HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler Rho 123 miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde intraselüler Rho 123 miktarı sırasıyla %108.6, %83.3, %74.8 ve %66.7 iken, 12. günün sonunda sırasıyla %82.2, %74.3, %56.9 ve %50.5 olarak belirlendi ($p < 0.01$, Şekil 74).



Şekil 74. HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler Rho 123 miktarındaki etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

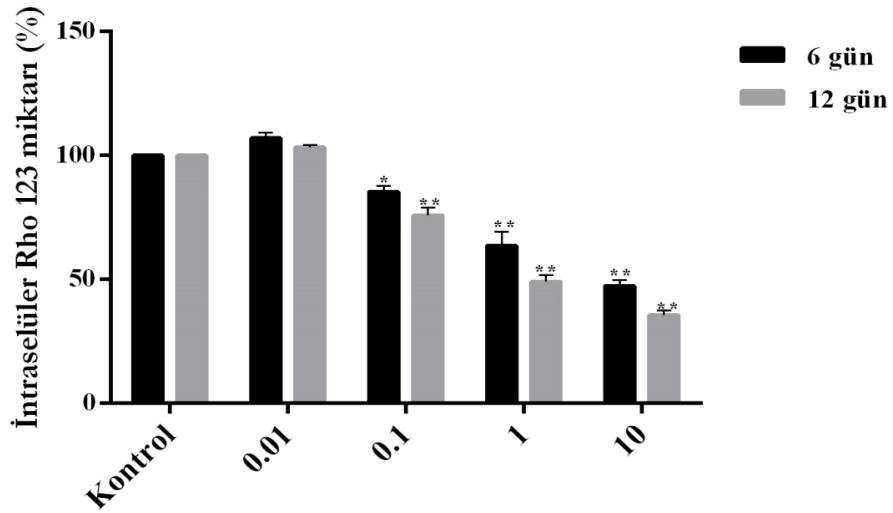
HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler Rho 123 miktarı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, HCC1937-R kontrol grubunda intraselüler Rho 123 miktarı HCC1937 parental kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %58.0 iken, 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde intraselüler Rho 123 miktarı

sırasıyla %74.6, %63.7, %49.6 ve %46.0 olarak analiz edildi ($p<0.01$). 12. günün sonunda ise, kontrol grubunda intraselüler Rho 123 miktarı %54.9 iken, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %62.6, %53.7, %44.4 ve %38.0 olarak belirlendi ($p<0.01$, Şekil 75).



Şekil 75. HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler Rho 123 miktarındaki etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$).

MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler Rho 123 miktarı üzerine etkisi incelendiğinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde intraselüler Rho 123 miktarı sırasıyla %107.1, %85.4, %63.7 ve %47.5 olarak belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda sırasıyla %103.3, %76.0, %49.2 ve %35.7 olarak analiz edildi ($p<0.01$, Şekil 76).



Şekil 76. MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün intraselüler Rho 123 miktarındaki etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Sonuç olarak, BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF10A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak intraselüler Rho123 miktarında anlamlı bir azalış belirlenmiştir. Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e karşı gelişen ilaç direnci ve artan P-gp ve/veya MRP1 aktivitesine bağlı olarak intraselüler Rho 123 miktarının floresans yoğunluğunda HCC1937 parental hücrelerine göre önemli derecede azalma belirlenmiştir (p<0.01).

BMN 673'ün intraselüler Rho 123 miktarında etkisinin valide edilmesi amacıyla, metabolik olarak aktif mitokondriye bağlanan ve mitokondriyel transmembran potansiyeli ile ilişkili floresans özellikte Rho 123 ile HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücreleri boyanarak görüntülendi (Şekil 77-79). Mitokondride bütünlüğün bozulması, mitokondriyel membran potansiyelinin kaybı veya geçirgen por kanallarının açılması sonucunda mitokondriden Rho 123 sitozole salınmaktadır. Ayrıca, apoptoz sürecinde meydana gelen erken değişimlerden bir tanesi mitokondrinin transmembran potansiyelinin değişmesidir. Hücrelerde mitokondriyel membran potansiyelinin kaybolması sitokrom c gibi bazı apoptogenik faktörlerin salınımına ve kaspazların aktivasyonuna neden olarak hücrelerin apoptoza gitmesinde rol alır.

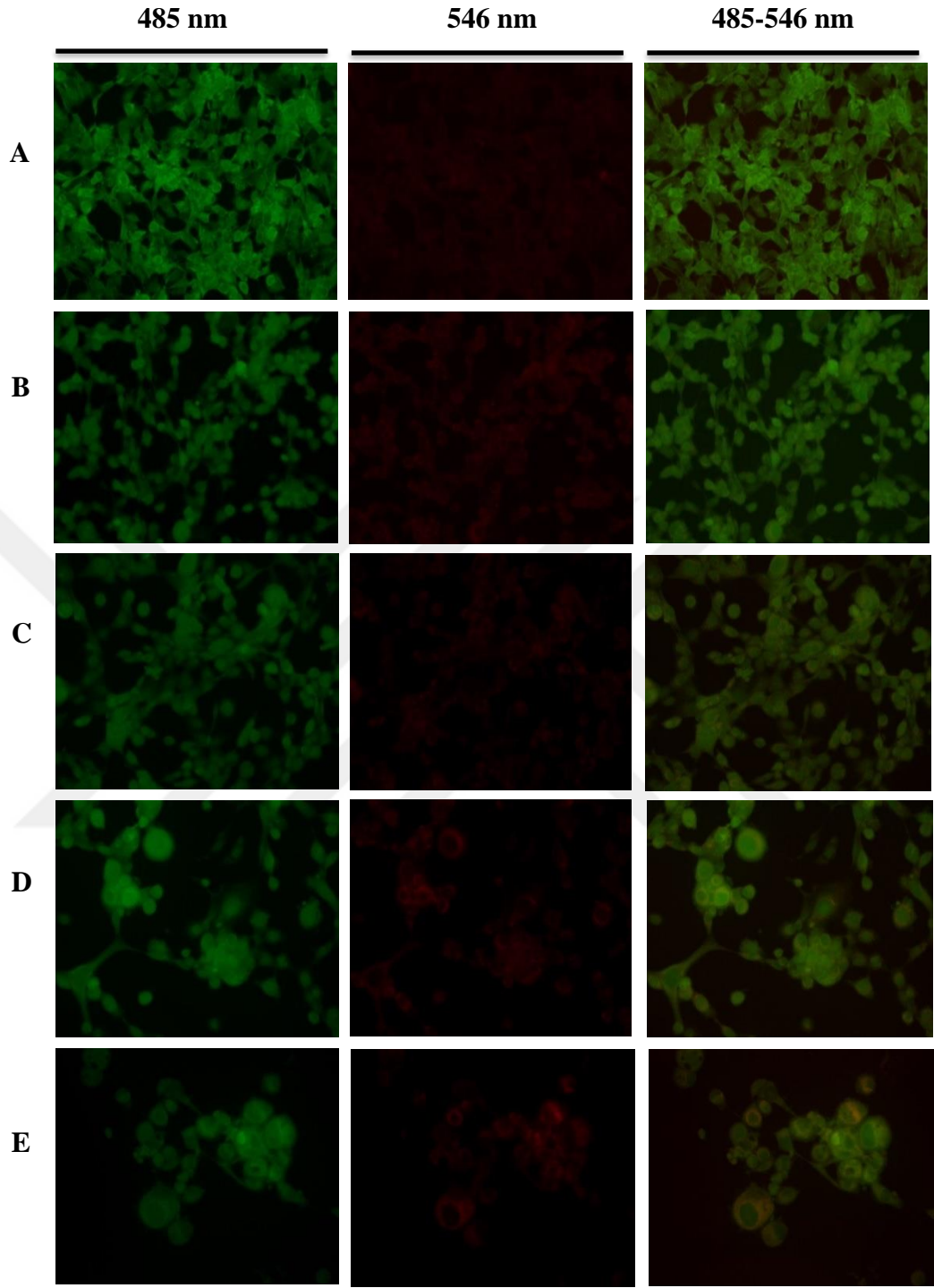
12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde Rho 123'ün floresans yoğunluğu değerlendirildiğinde, mitokondrielerde meydana gelen hasarlardan dolayı doza bağlı olarak Rho123

miktarının sitozolde arttığı ve dolayısıyla hücrelerin apoptotik ölüme uğradığı gözlemlendi. Özellikle 1 nM BMN 673 uygulanmasından itibaren hücrelerde apoptotik ölümün daha fazla olduğu görüntülendi.

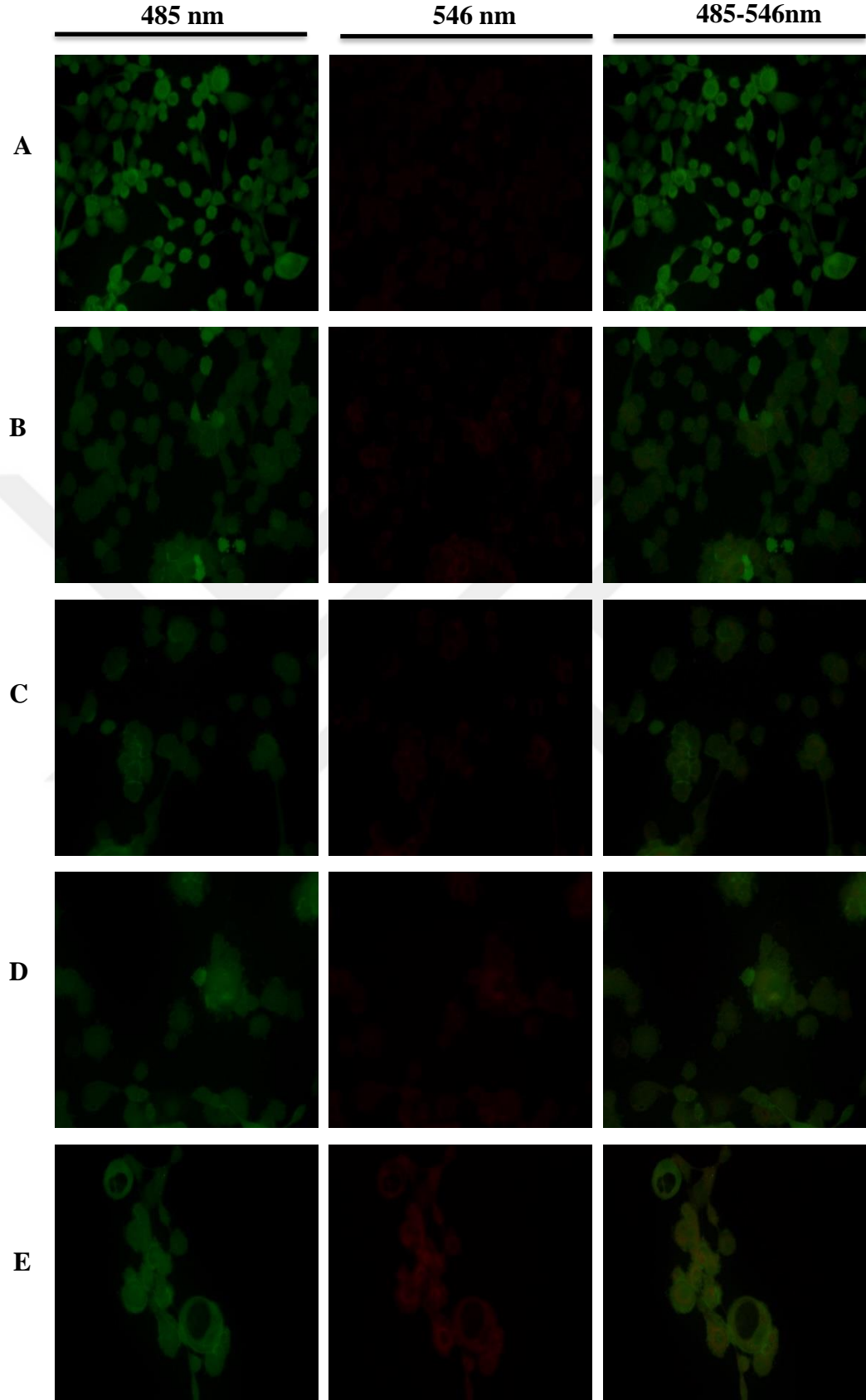
HCC1937 hücrelerinde uygulanan BMN 673'ün konsantrasyonu arttıkça sitozolde artan Rho 123 miktarına bağlı olarak hücreler arası bağlantılarda kopmalar, hücrelerde meydana gelen boşluklar, hücrenin morfolojik yapısında değişimler ve apoptotik cisimcikler görüntülendi (Şekil 77).

Ancak, HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e karşı gelişen ilaç direnci ve artan P-gp ve/veya MRP1 aktivitesinden dolayı sitozolde Rho 123 floresans miktarının HCC1937 parental hücrelerine göre daha az miktarda olduğu ancak uygulanan doz arttıkça hücrelerde gerçekleşen ölüme paralel olarak sitozolde daha fazla miktarda Rho 123 görüntülendi (Şekil 78).

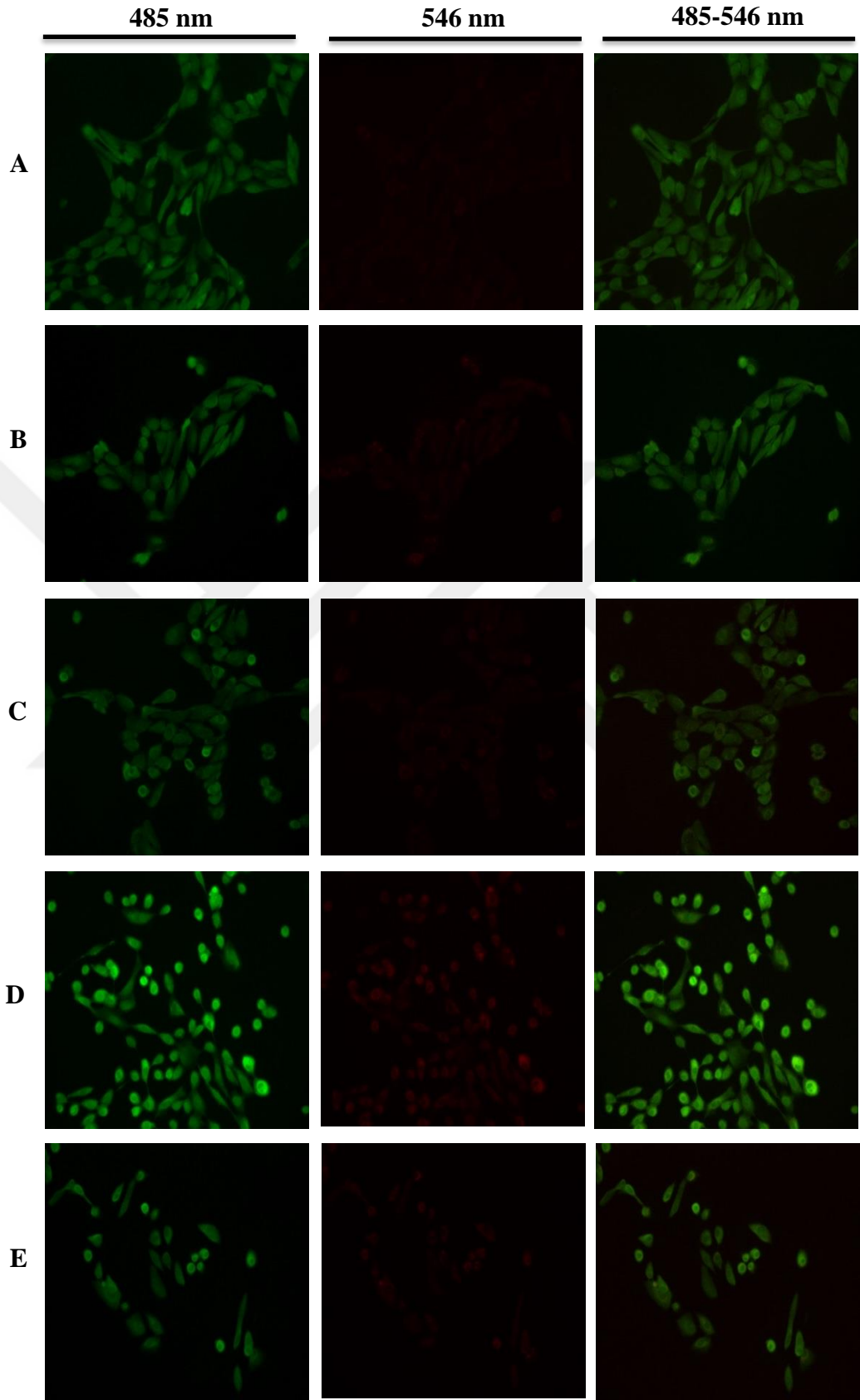
MCF-10A hücrelerinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uygulanan BMN 673'ün konsantrasyonu arttıkça BMN 673'ün sitotoksik etkisinden dolayı hücrelerin morfolojik yapısında değişimler (hücreler arası bağlantılarda kopma ve daha yuvarlak yapıda hücreler) ve sitozolde Rho 123 miktarında artış görüntülendi (Şekil 79).



Şekil 77. BMN 673'ün HCC1937 hücrelerinde sitozolde Rho 123 miktarı üzerinde etkisi. (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM.



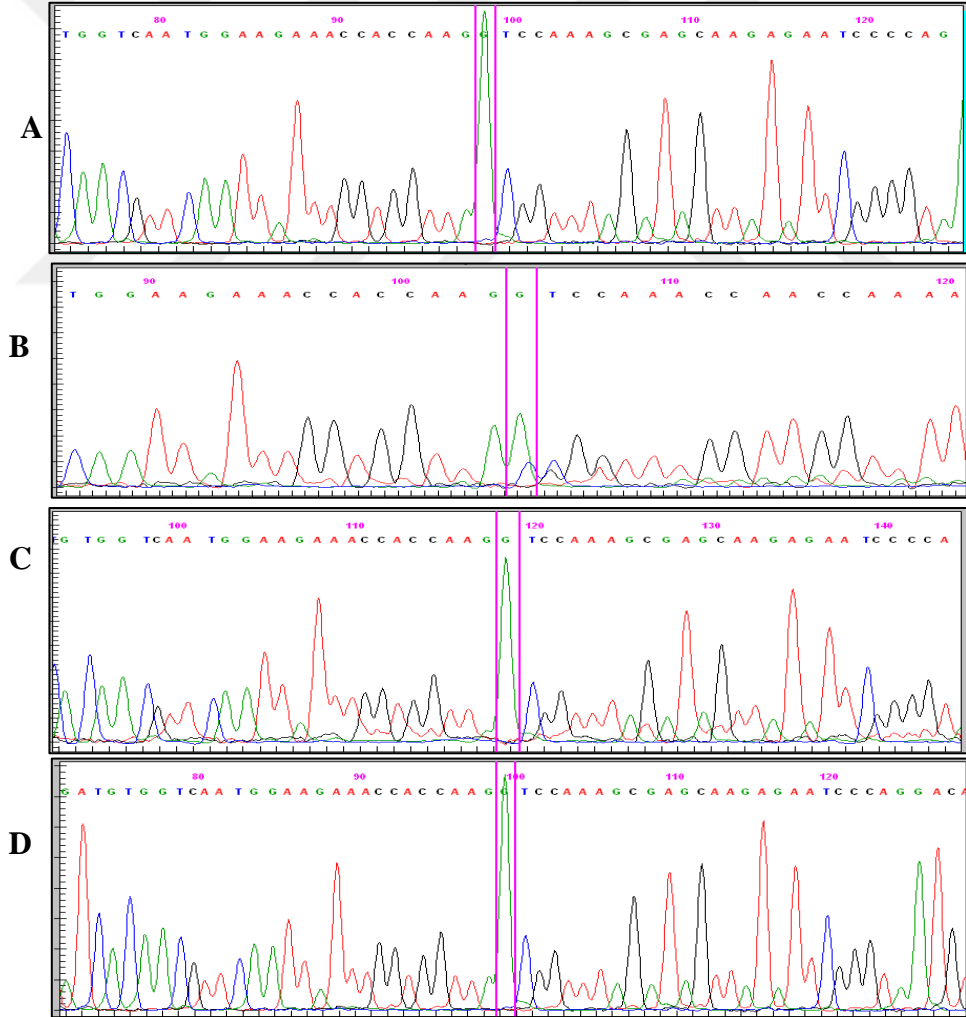
Şekil 78. BMN 673'ün HCC1937-R hücrelerinde sitozolde Rho 123 miktarı üzerinde etkisi. (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM.



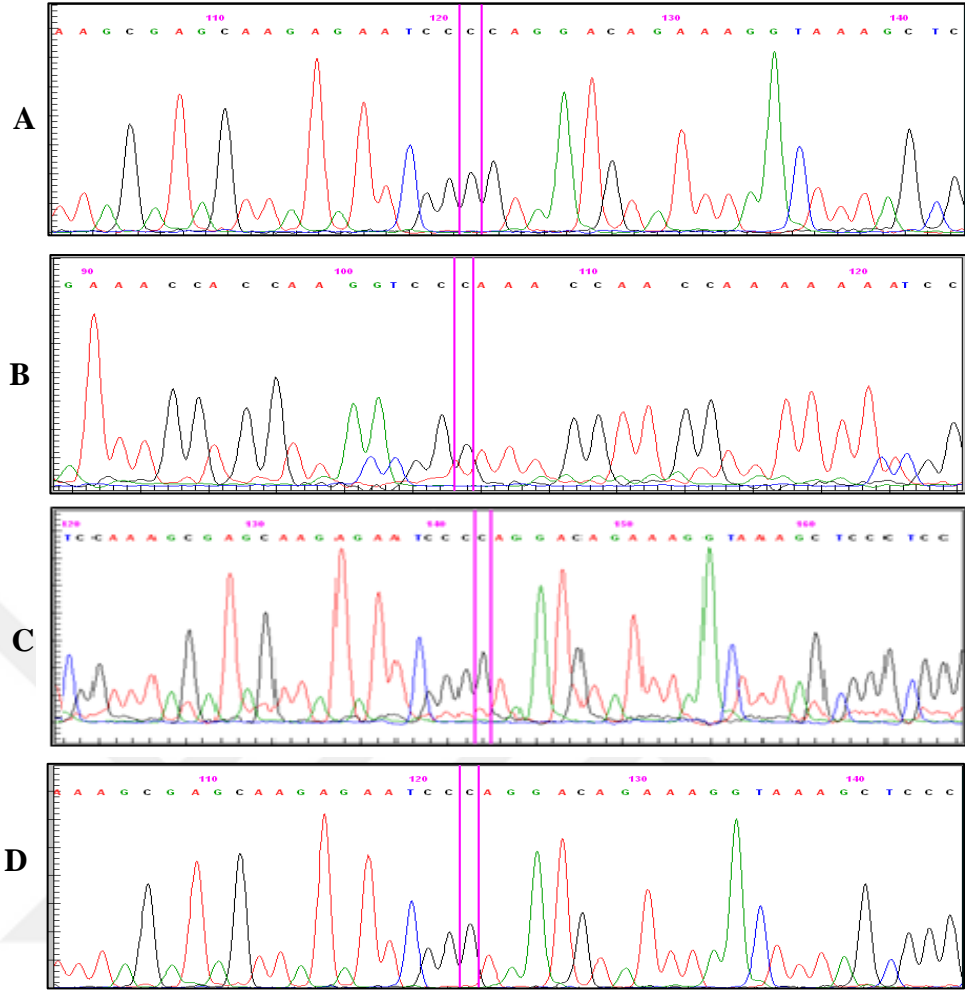
Şekil 79. BMN 673'ün MCF-10A hücrelerinde sitozolde Rho 123 miktarı üzerinde etkisi. (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM.

4.11. *BRCA1* geninde c.5266dupC (5382insC) mutasyonunun belirlenmesi

3 ve 6 ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R ve HCC1937 hücrelerinde MCF-10A kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak c.5266dupC mutasyonunun valide edilmesi amacıyla gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonucunda, 3 ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde c.5243delG (p.Gly1748ValfsTer17) (rs80357676) mutasyonu belirlendi (Şekil 80). Ancak, 6 ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R ve HCC1937 hücrelerinde sadece homozigot c.5266dupC (p.Gln1756ProfsTer74) (rs397507247) mutasyonu tespit edildi (Şekil 81). Sonuç olarak, düzenli olarak BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673 uygulanma zamanı arttıkça DNA’da meydana gelen hasarda azalma olduğu ve böylece hücrelerin daha dirençli hale geldiği belirlenmiştir.



Şekil 80. c.5243delG mutasyonunun DNA dizi analizi ile belirlenmesi, (A) HCC1937, (B) 3 ay, (C) 6 ay süresince BMN 673 karşı direnç geliştirilen HCC1937-R ve (D) MCF-10A hücrelerine ait histogram görüntüleri.



Şekil 81. c.5266dupC (5382insC) mutasyonunun DNA dizi analizi ile belirlenmesi, (A) HCC1937, (B) 3 ay, (C) 6 ay süresince BMN 673 karşı direnç geliştirilen HCC1937-R ve (D) MCF-10A hücrelerine ait histogram görüntüleri

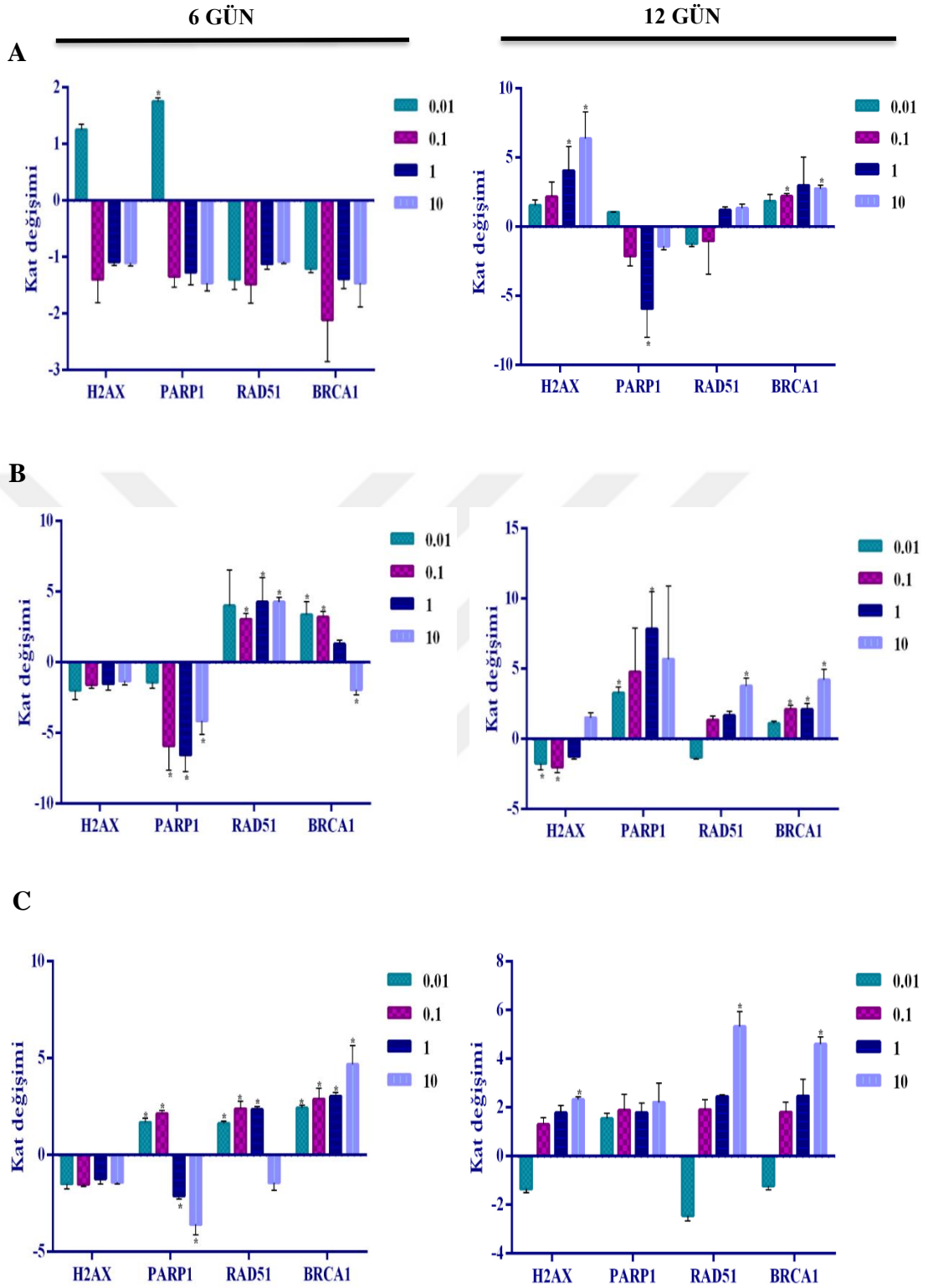
4.12. BMN 673'ün HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR yolağı ile ilişkili H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1, MDR ile ilişkili, MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinde mRNA ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen bulgular Şekil 82 ve 83'de sunuldu. HCC1937 hücrelerinde HR yolağında görev alan H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde BMN 673'ün etkisi değerlendirildiğinde doza ve zamana bağlı olarak genlerin ifade düzeylerinin değiştiği belirlendi. 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1.25, 1.76 (p=0.04), -1.39 ve -1.20 kat

değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -1.10, -1.45, -1.00 ve -1.42 kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 1.52, 1.05, -1.19 ve 1.81 kat değişimi saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 6.18 (p=0.009), -1.40, 1.32 ve 2.75 (p=0.004) kat değişim belirlendi (Şekil 82).

HCC1937-R hücrelerinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması sonucunda H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.97, -1.40, 4.00 ve 3.38 (p=0.012) kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -1.32, -4.15 (p=0.001), 4.28 (p=0.000) ve -1.94 (p=0.005) kat değişim tespit edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla -1.75 (p=0.032), 3.28 (p=0.005), -1.30 ve 1.11 kat değişim saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 1.52, 5.69, 3.77 (p=0.003) ve 4.20 (p=0.003) kat artış belirlendi (Şekil 82).

MCF-10A hücrelerinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması sonucunda H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.49, 1.69 (p=0.025), 1.65 (p=0.017) ve 2.43 (p=0.000) kat değişim analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -1.41 (p=0.007), -3.59, -1.43 ve 4.68 (p=0.003) kat değişim belirlendi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla -1.35, 1.54, -2.44 ve -1.22 kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 2.32 (p=0.018), 2.22, 5.33 (p=0.003) ve 4.60 (p=0.000) kat artış analiz edildi (Şekil 82).

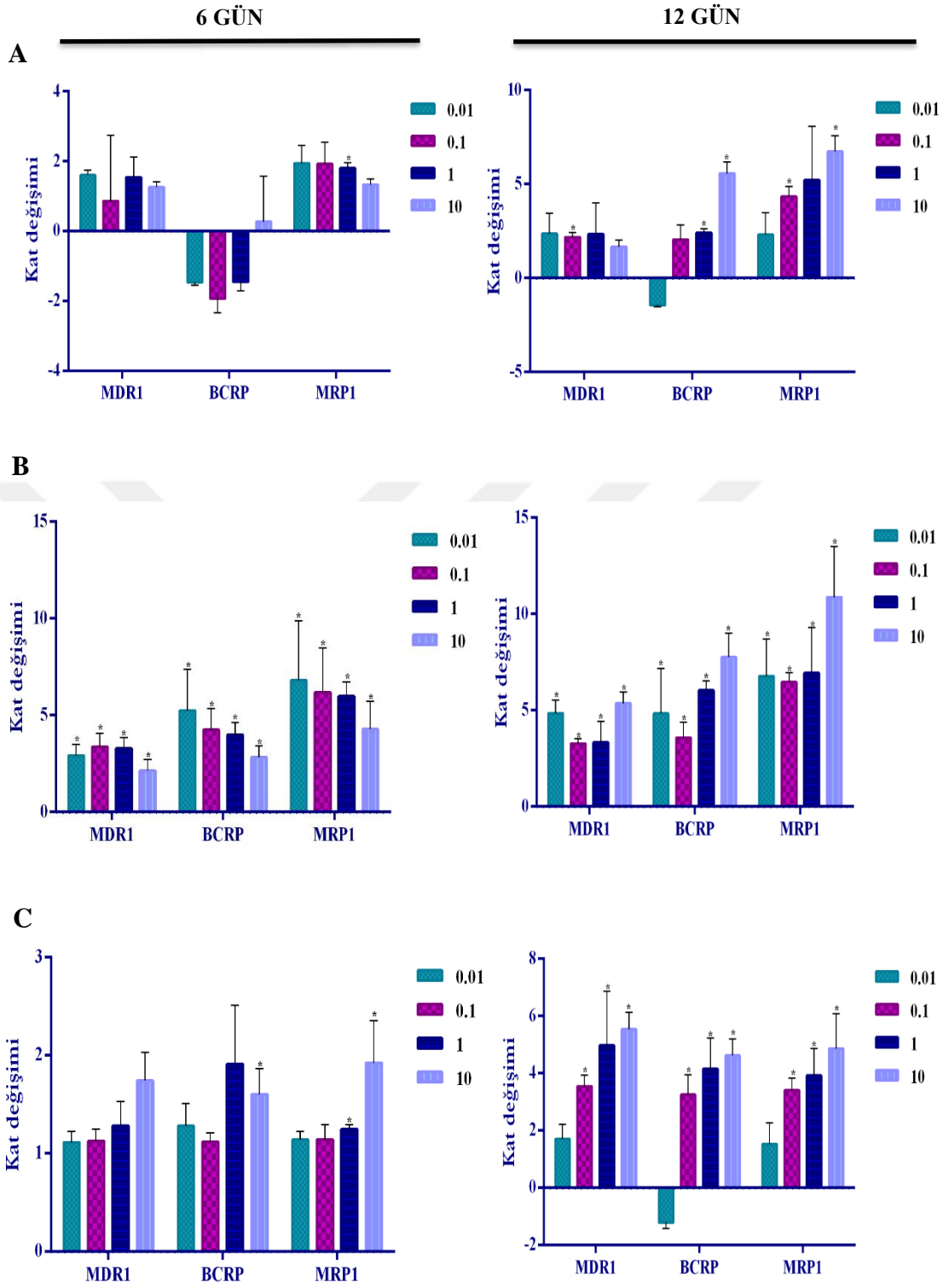


Şekil 82. (A) HCC1937, (B) HCC1937-R ve (C) MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün 6. gün ve 12. günde HR yoluyla ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi (* $p < 0.05$; $n=3$).

HCC1937 hücrelerinde MDR yolağında görev alan MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde BMN 673'ün etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1.60, -1.46 ve 1.94 kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 1.26, 0.27, ve 1.33 kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 2.36, -1.43 ve 2.30 kat değişim saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 1.67, 5.56 (p=0.000) ve 6.73 (p=0.000) kat değişim belirlendi (Şekil 83).

HCC1937-R hücrelerinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması sonucunda, MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 2.92 (p=0.005), 5.24 (p=0.027) ve 6.80 (p=0.030) kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 2.15 (p=0.028), 2.83 (p=0.007), ve 4.29 (p=0.016) kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 4.84 (p=0.001), 4.82 (p=0.04) ve 6.77 (p=0.006) kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 5.37 (p=0.000), 7.76 (p=0.000) ve 10.87 (p=0.003) kat artış analiz edildi (Şekil 83).

MCF-10A hücrelerinde MDR yolağında görev alan MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde BMN 673'ün etkisi incelendiğinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1.11, 1.28 ve 1.14 kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 1.74, 1.60 (p=0.03) ve 1.92 (p=0.023) kat artış analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 1.70, -1.20 ve 1.53 kat artış analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla 5.55 (p=0.000), 4.62 (p=0.001) ve 4.86 (p=0.013) kat artış belirlendi (Şekil 89).



Şekil 83. (A) HCC1937, (B) HCC1937-R ve (C) MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün 6. gün ve 12. günde MDR yolu ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi (* $p < 0.05$; $n = 3$).

Sonuç olarak, BMN673'ün konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça HCC1937 hücrelerinde HR yolağında görev alan H2AX'in ekspresyon seviyesinde artma belirlenmesine rağmen ($p<0.05$), PARP1'in ekspresyon seviyesinde azalma analiz edilmiştir. Ayrıca, RAD51 ve BRCA1'in mRNA düzeyinde artışa neden olmuştur ($p<0.05$). Ayrıca, MDR ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinde özellikle 12 gün boyunca BMN 673 uygulanması sonucunda doza bağlı olarak artış belirlenmiştir.

HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinden dolayı MDR yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak doza bağlı anlamlı artış belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, HR yolağı ile ilişkili olan RAD51'in ekspresyon seviyesinde azalma olmasına rağmen ($p<0.05$), H2AX, PARP1, ve BRCA1'in mRNA düzeyinde doza bağlı artış analiz edilmiştir.

MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı uygulanan doza ve zamana bağlı olarak HR ve MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde artış belirlenmiştir.

4.13. BMN 673'ün HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genleri Hedefleyen miRNA'lar Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

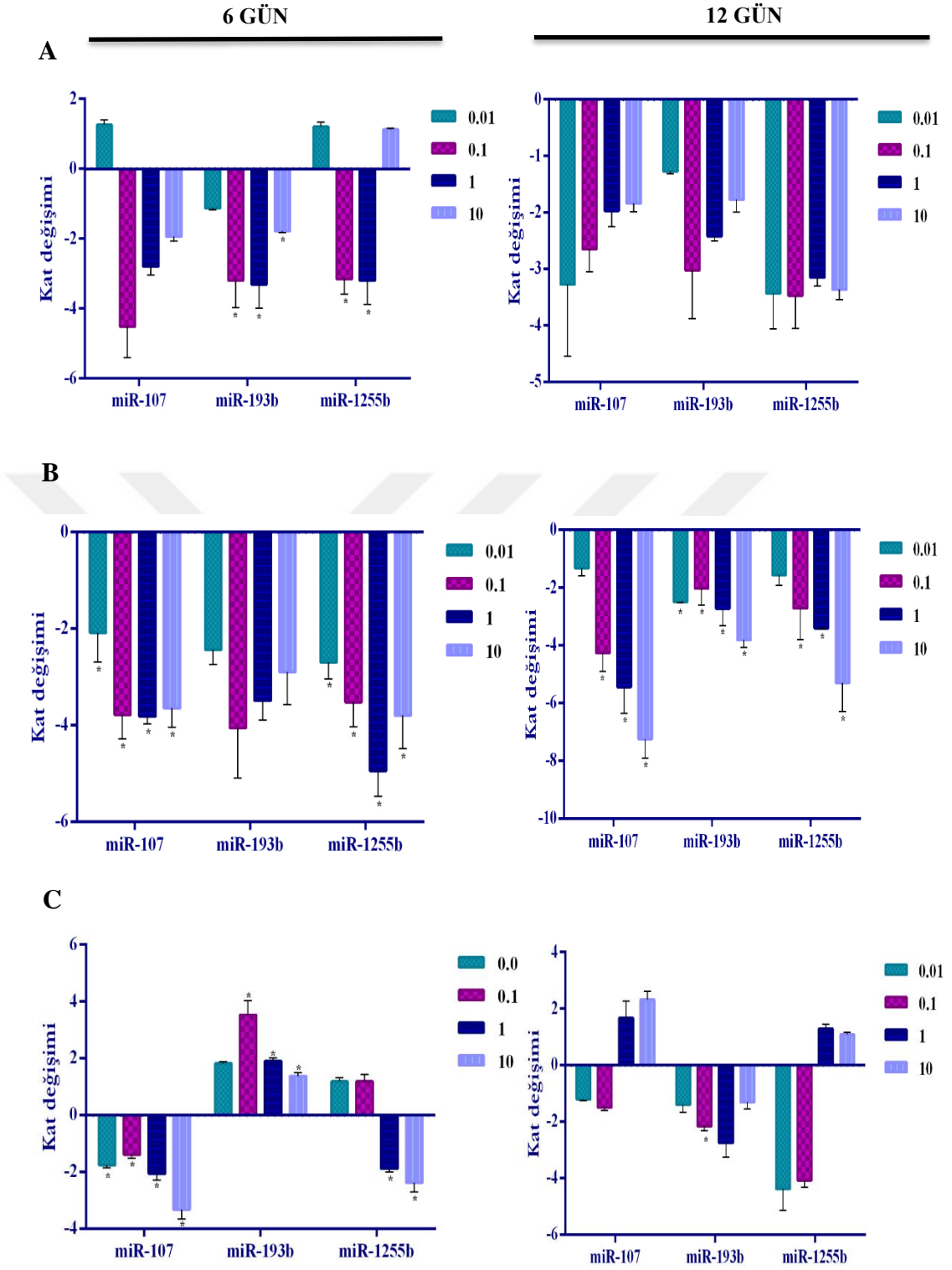
BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde RAD51 ve BRCA1 genlerini hedef aldığı bilinen miR-107, miR-193b ve miR-1255b ve MDR1, BCRP ve MRP1 genlerini hedef aldığı bilinen miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Şekil 84 ve 85'te sunuldu.

HCC1937 hücrelerinde miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde BMN 673'ün etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla 1.25 , -1.13 ve 1.21 kat değişimi belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -1.94, -1.78 ($p=0.047$) ve 1.12 kat değişimi analiz edildi. 12. gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde ise miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesi sırasıyla -3.27, -1.27 ve -3.42 olarak analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında ise sırasıyla -1.84, -1.76 ve -3.36 kat değişimleri belirlendi (Şekil 84).

HCC1937-R hücrelerinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması sonucunda miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde sırasıyla -2.08 ($p=0.047$), -2.44 ve -2.68 ($p=0.030$) kat değişimi belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673

uygulandığında sırasıyla -3.64 (p=0.009), -2.89 ve -3.80 (p=0.019) kat değişimi analiz edildi. 12. gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise, miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesi sırasıyla -1.33, -2.50 (p=0.034) ve -1.56 kat değişimleri analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -7.23 (p=0.009), -3.80 (p=0.008) ve -5.29 (p= 0.000) kat değişimleri belirlendi (Şekil 84).

MCF-10A hücrelerinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması sonucunda miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.75 (p=0.000), 1.82 ve 1.19 kat değişimi belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -3.32 (p=0.000), 1.38 (p=0.004) ve -2.36 (p=0.000) kat değişimleri analiz edildi. 12. gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesi sırasıyla -1.21, -1.39 ve -4.37 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında ise sırasıyla 2.32 (p=0.040), -1.30 ve 1.09 kat değişimleri belirlendi (Şekil 84).

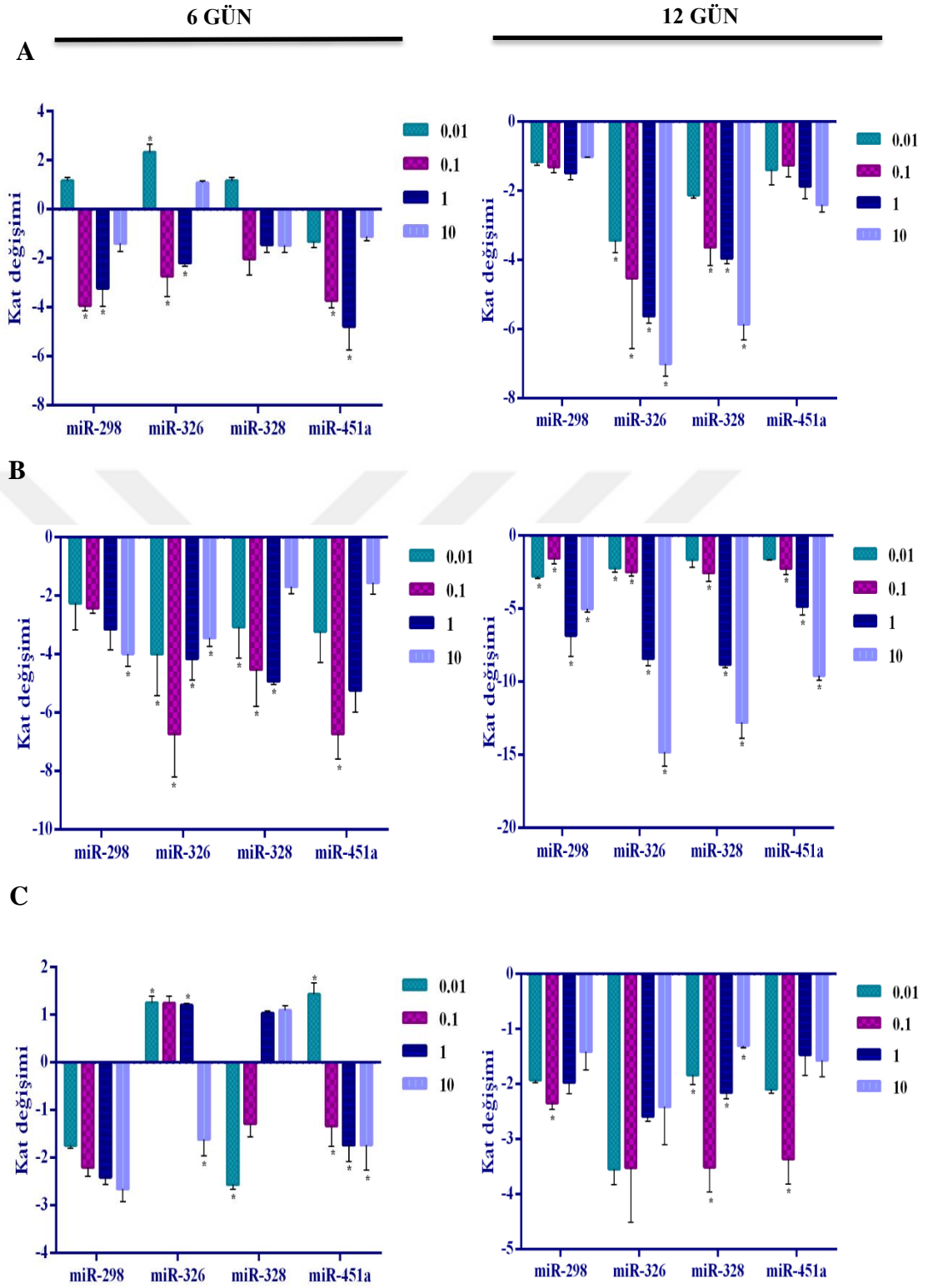


Şekil 84. (A) HCC1937, (B) HCC1937-R ve (C) MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün 6. gün ve 12. günde HR yolu ile ilişkili miRNA seviyesinde etkisi (* $p < 0.05$; $n=3$).

HCC1937 hücrelerinde ABC taşıyıcı ailesi üyelerinden MDR1, BCRP ve MRP1 hedef aldığı bilinen miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde BMN 673'ün etkisi incelendiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla 1.17, 2.33 (p=0.007), 1.17 ve -1.31 kat değişimi belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -1.40, 1.08, -1.48 ve -1.11 kat değişimleri analiz edildi. 12. gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde ise, miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesi sırasıyla -1.17, -3.43 (p=0.016), -2.12 ve -1.38 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -1.00, -7.00 (p=0.008), -5.86 (p=0.031) ve -2.40 kat değişimleri belirlendi (Şekil 85).

HCC1937-R hücrelerinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması sonucunda miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde sırasıyla -2.26,-3.99 (p=0.015), -3.07 (p=0.026) ve -3.22 kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -3.99 (p=0.037), -3.44 (p=0.015), -1.69 ve -1.55 kat değişimi analiz edildi. 12. gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise, miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesi 0.01 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -2.80 (p=0.000), -2.23 (p=0.035), -1.65 ve -1.59 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -5.00 (p=0.000), -14.82 (p=0.006), -12.79 (p=0.000) ve -9.57 (p=0.003) kat değişimleri belirlendi (Şekil 85).

MCF-10A hücrelerinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması sonucunda miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.75 (p=0.000), 1.26 (p=0.030), -2.57 (p=0.003) ve 1.43 kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında ise sırasıyla -2.66 (p=0.000), -1.61 (p=0.020), 1.10 ve -1.73 kat değişimi analiz edildi. 12. gün boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesi sırasıyla -1.93, -3.55, -1.84 (p=0.037) ve -2.09 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında sırasıyla -1.41, -2.42, -1.30 ve -1.57 kat değişimleri belirlendi (Şekil 85).



Şekil 85. (A) HCC1937, (B) HCC1937-R ve (C) MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün 6. gün ve 12. günde MDR yoluyla ilişkili miRNA seviyesinde etkisi (* $p < 0.05$; $n=3$).

Sonuç olarak, HCC1937 hücrelerinde HR ile ilişkili olan genleri hedef alan miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyelerinin BMN 673'ün uygulanan dozuna ve zamanına bağlı olarak azalması ve RAD51 ve BRCA1 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyesinin artması, HR temelli DNA tamir mekanizmasının doza bağlı aktivitesinde artışı göstermektedir. Ayrıca, MDR ile ilişkili genleri hedef alan miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyelerinin BMN 673'ün uygulanan dozuna ve zamanına bağlı olarak azalması, ilaç direnci ile ilişkili MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin aktivitesinin arttığını göstermektedir.

HCC1937-R hücrelerinde HR ile ilişkili genleri hedef alan miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde BMN 673'ün uygulanan dozuna ve zamana bağlı azalış ($p<0.05$) ve hedef aldıkları RAD51 ve BRCA1 genlerinin aktivasyonunda artış ($p<0.05$) hücrelerde HR yolunun aktif olduğunu göstermektedir. Ayrıca, BMN 673'e karşı gelişen ilaç direnci dolayısıyla MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde artışa paralel olarak MDR yolu ile ilişkili miRNA'ların ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmiştir ($p<0.05$). Ancak, belirgin azalış miktarı özellikle sırasıyla MRP ve BCRP'yi hedef aldığı bilinen miR-326 ve miR-328 ekspresyon seviyesinde gözlemlenmiştir ($p<0.05$).

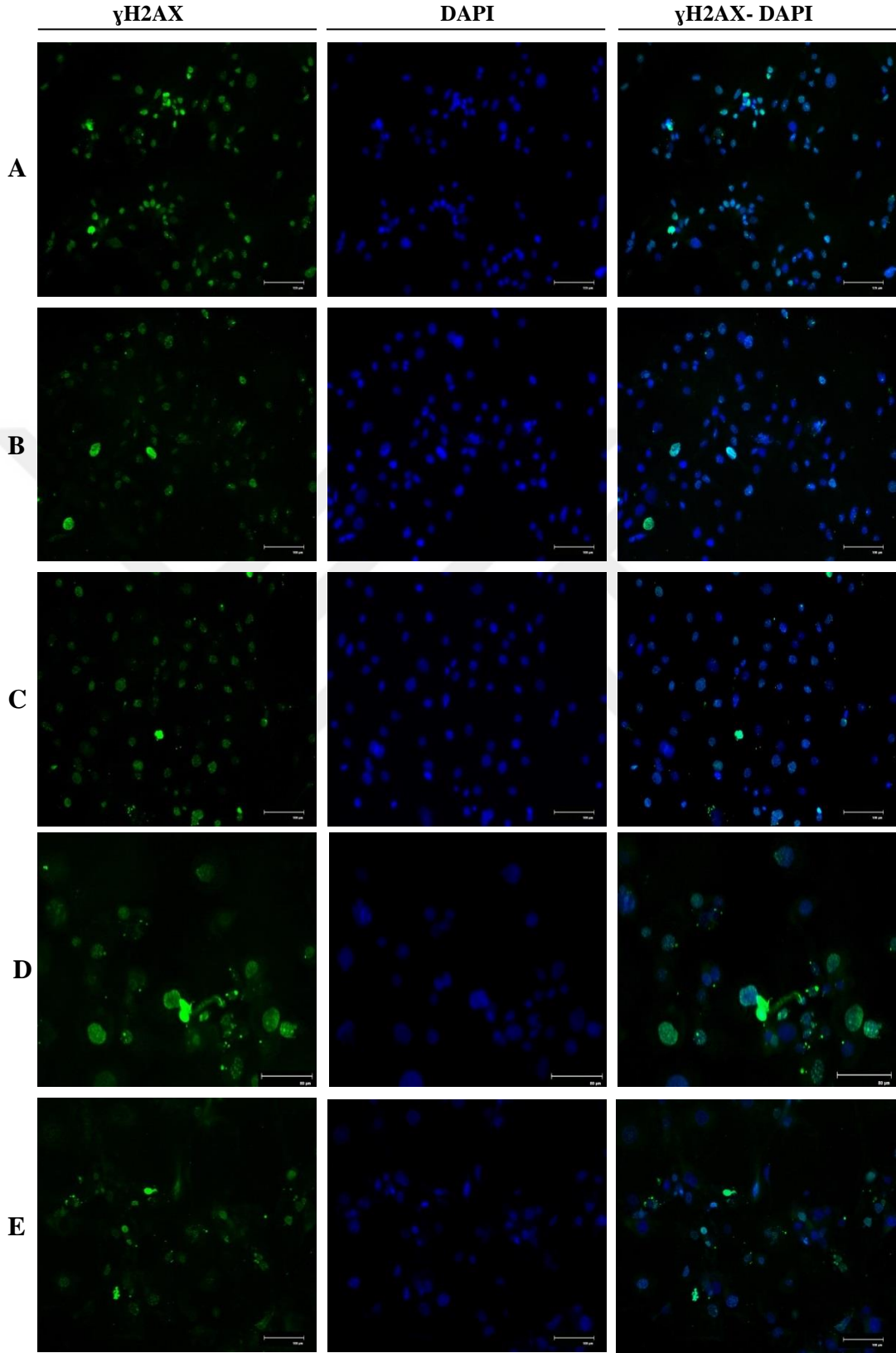
MCF-10A hücrelerinde ise, 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan hücrelerde artan konsantrasyona bağlı olarak HR ile ilişkili miRNA'ların ekspresyon seviyesinde azalma belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda miR-107 ve miR-1255b ekspresyonlarında artış ve miR-193b ekspresyonunda azalış analiz edilmiştir. Sonuç olarak, HR temelli DNA tamirinde *RAD51* ve *BRCA1* genlerini hedef alan miR-193b'nin daha etkin rol aldığı göstermektedir. Ayrıca, BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak MDR ile ilişkili genleri hedef alan miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde azalış ve MDR1, BCRP ve MRP1 ekspresyonunda artış, hücrelerde MDR ile ilişkili genlerin BMN 673'e karşı aktivitesini göstermektedir. Ancak, özellikle miR-326 ve miR-328 ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmiştir.

4.14. BMN 673'ün HR ve MDR Yolakları ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi

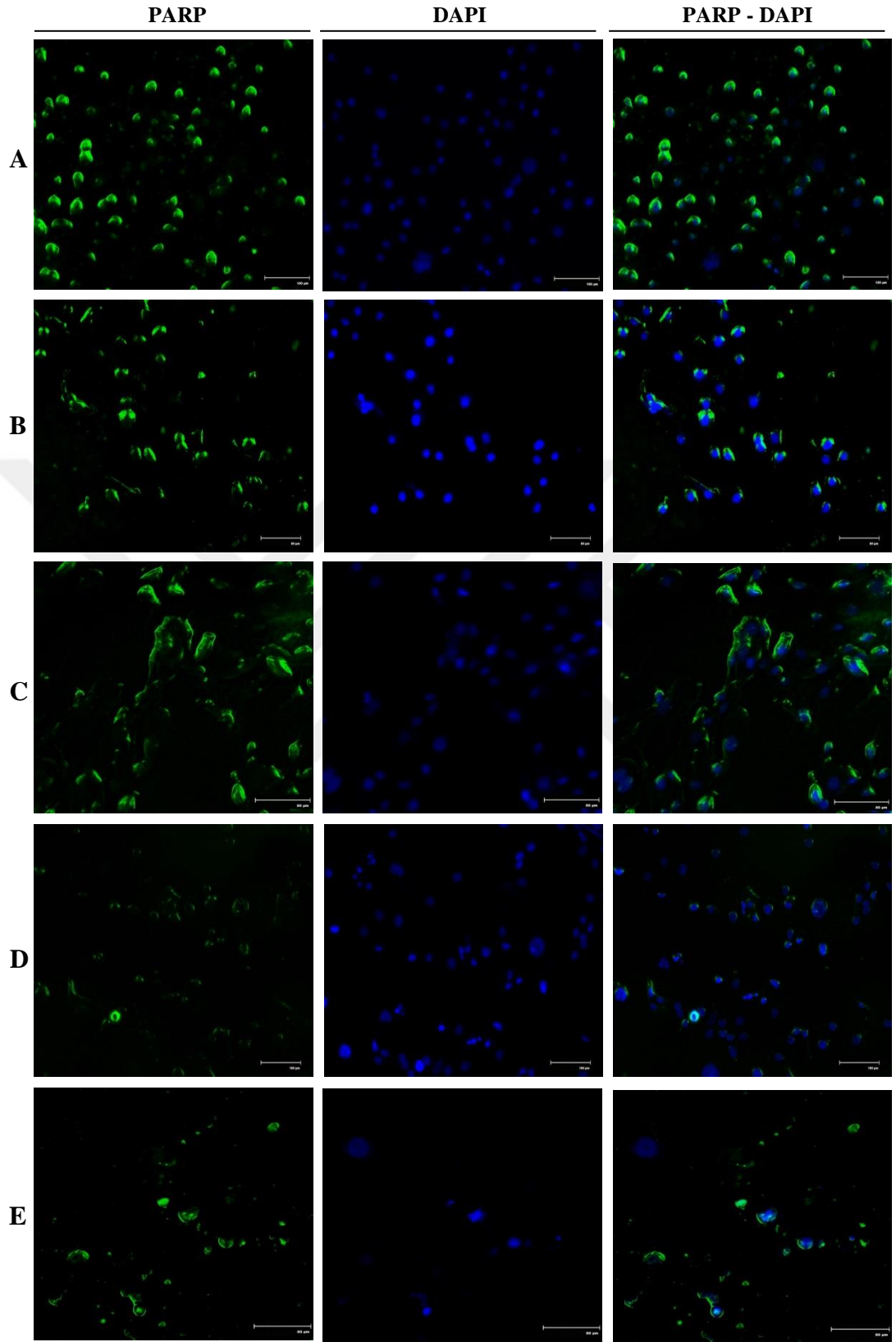
BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR ile ilişkili γ H2AX, PARP, RAD51 ve BRCA1 ve MDR ile ilişkili MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları referans protein beta-actin ile normalize edilerek elde edilen bulgular Şekil 86-109'da sunuldu.

HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak HR ile ilişkili olan γ H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları üzerine etkisi incelendiğinde, 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde artan doza bağlı olarak nükleusta γ H2AX ekspresyonu belirlenmesine rağmen (Şekil 86), nüklear PARP ekspresyonunda azalış (Şekil 87) ve nüklear RAD51 ekspresyonunda artış olduğu görüntülendi (Şekil 88). Ancak, HCC1937 hücrelerinde BRCA1'in nüklear ekspresyonu belirlenmemesine rağmen, BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerde BRCA1 ekspresyonunda artış olduğu görüntülendi (Şekil 89).

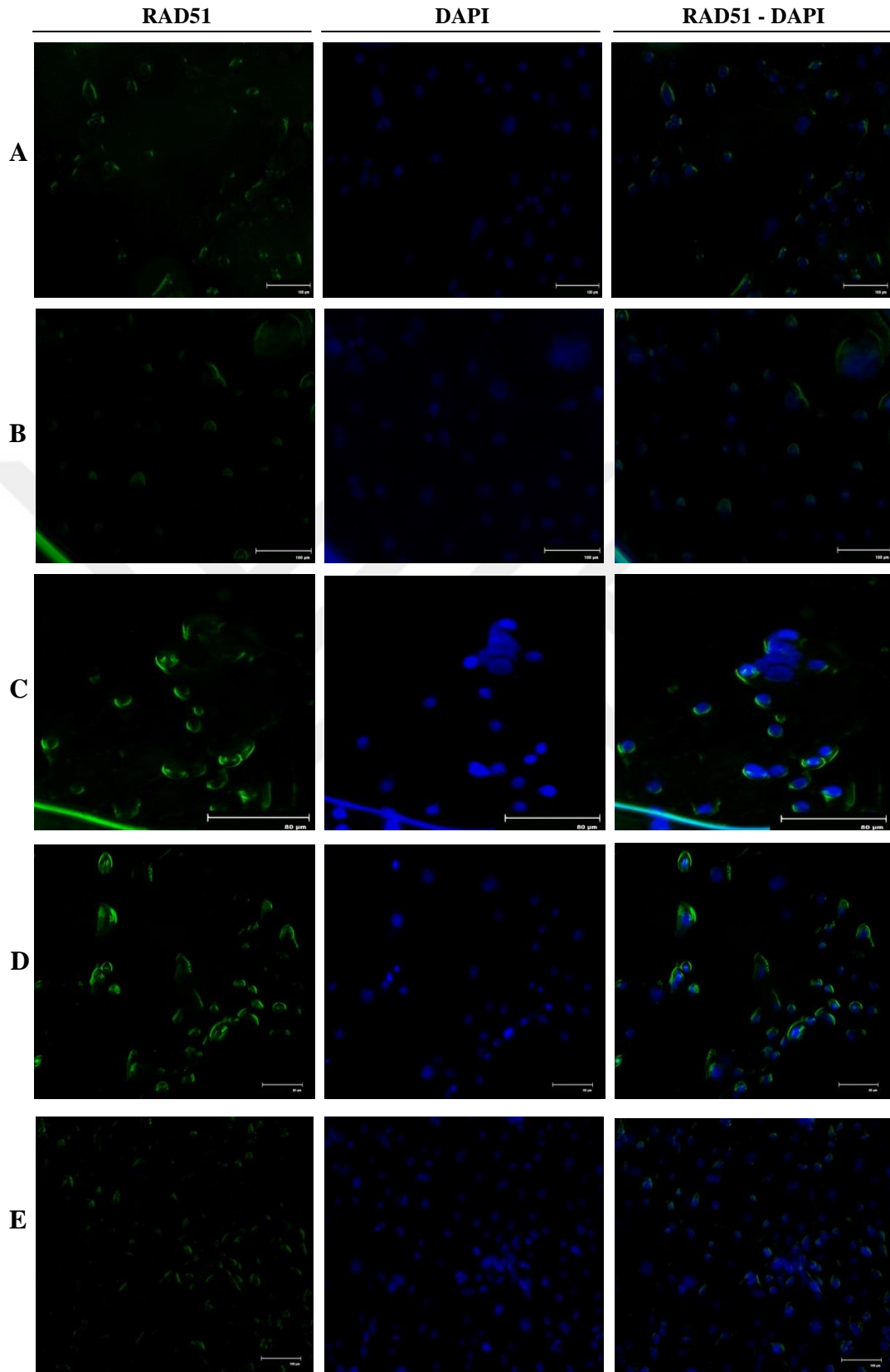
HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin lokalizasyonları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde, uygulanan BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDR1'in özellikle hücre membranındaki ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen (Şekil 90), BCRP ve MRP1'in hücre membranı ve sitozolde ekspresyonunda artış görüntülendi (Şekil 91, 92). HCC1937 hücrelerinin genel morfolojik yapısı beta-actin immünüfloresans boyaması ile görüntülendi (Şekil 93).



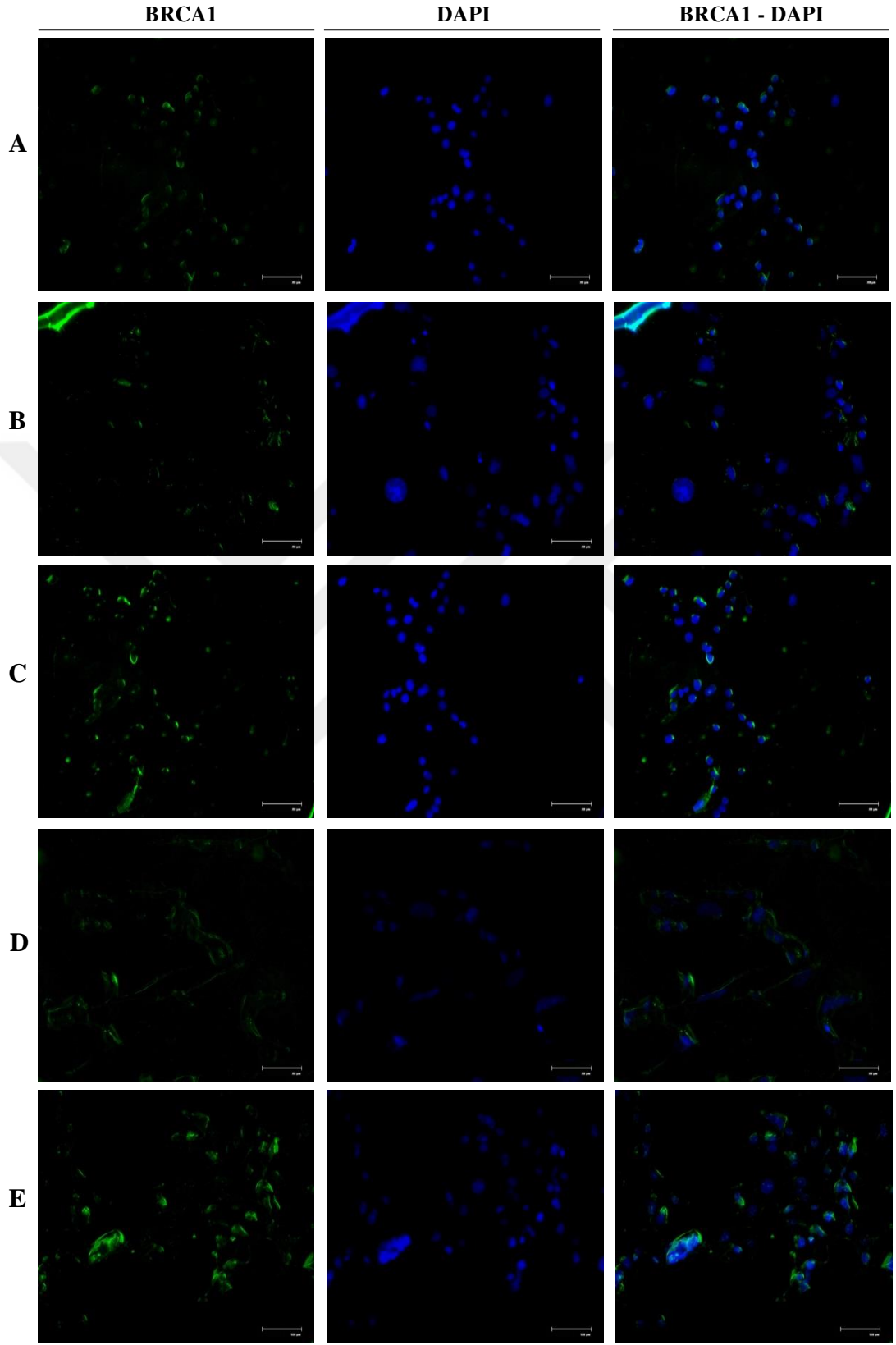
Şekil 86. HCC1937 hücrelerinde γ H2AX ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673.



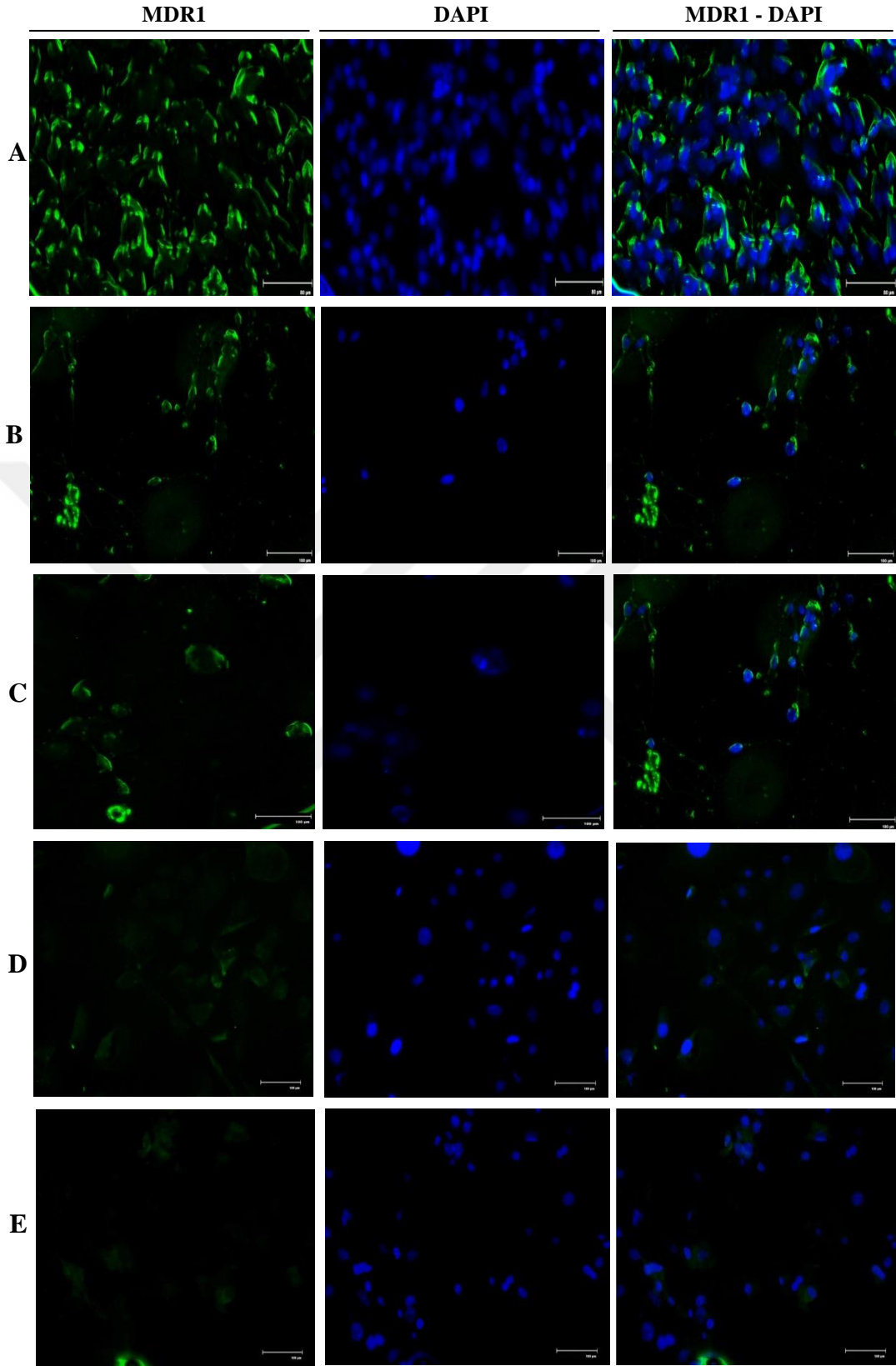
Şekil 87. HCC1937 hücrelerinde PARP ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673.



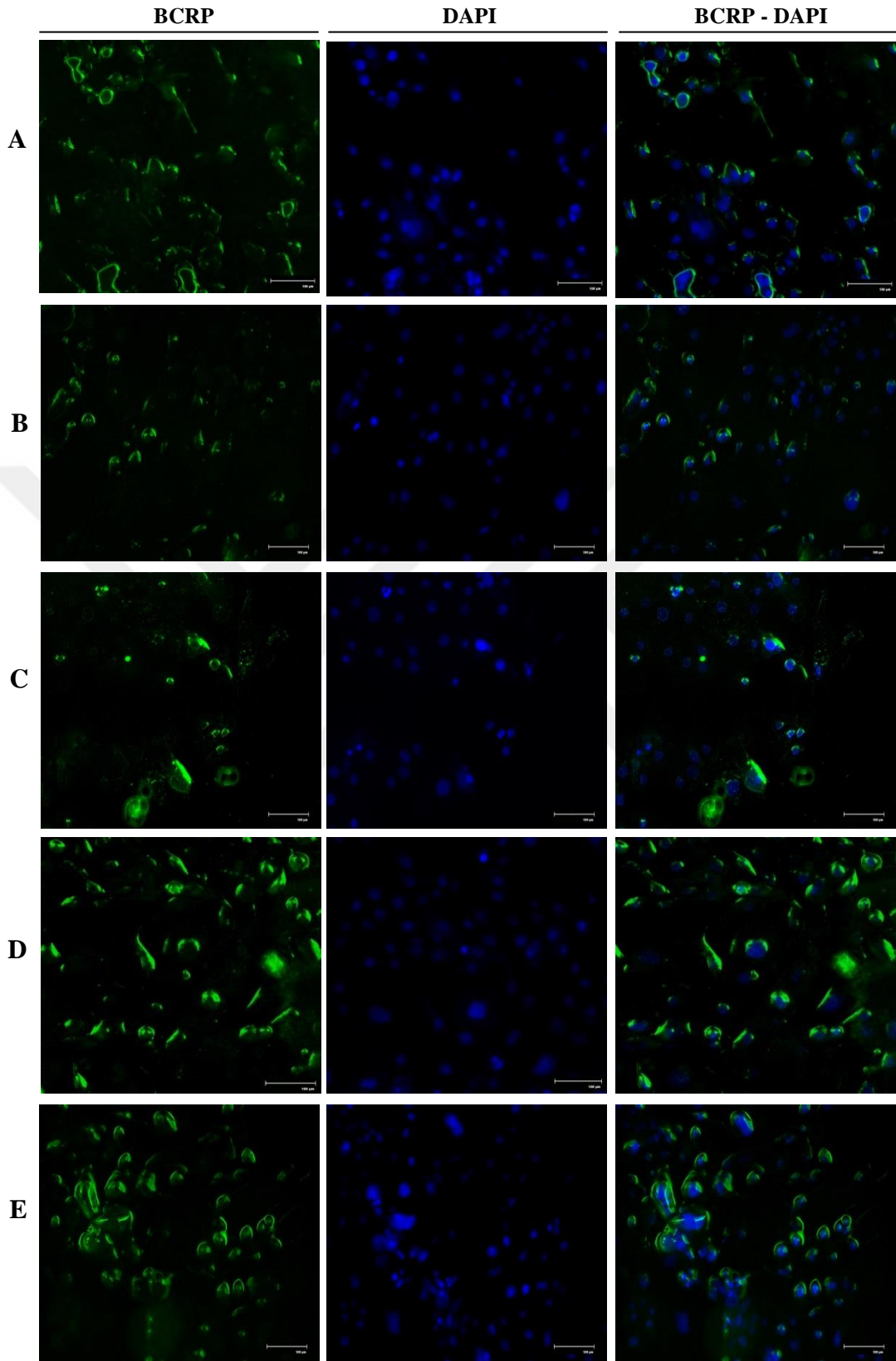
Şekil 88. HCC1937 hücrelerinde RAD51 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673.



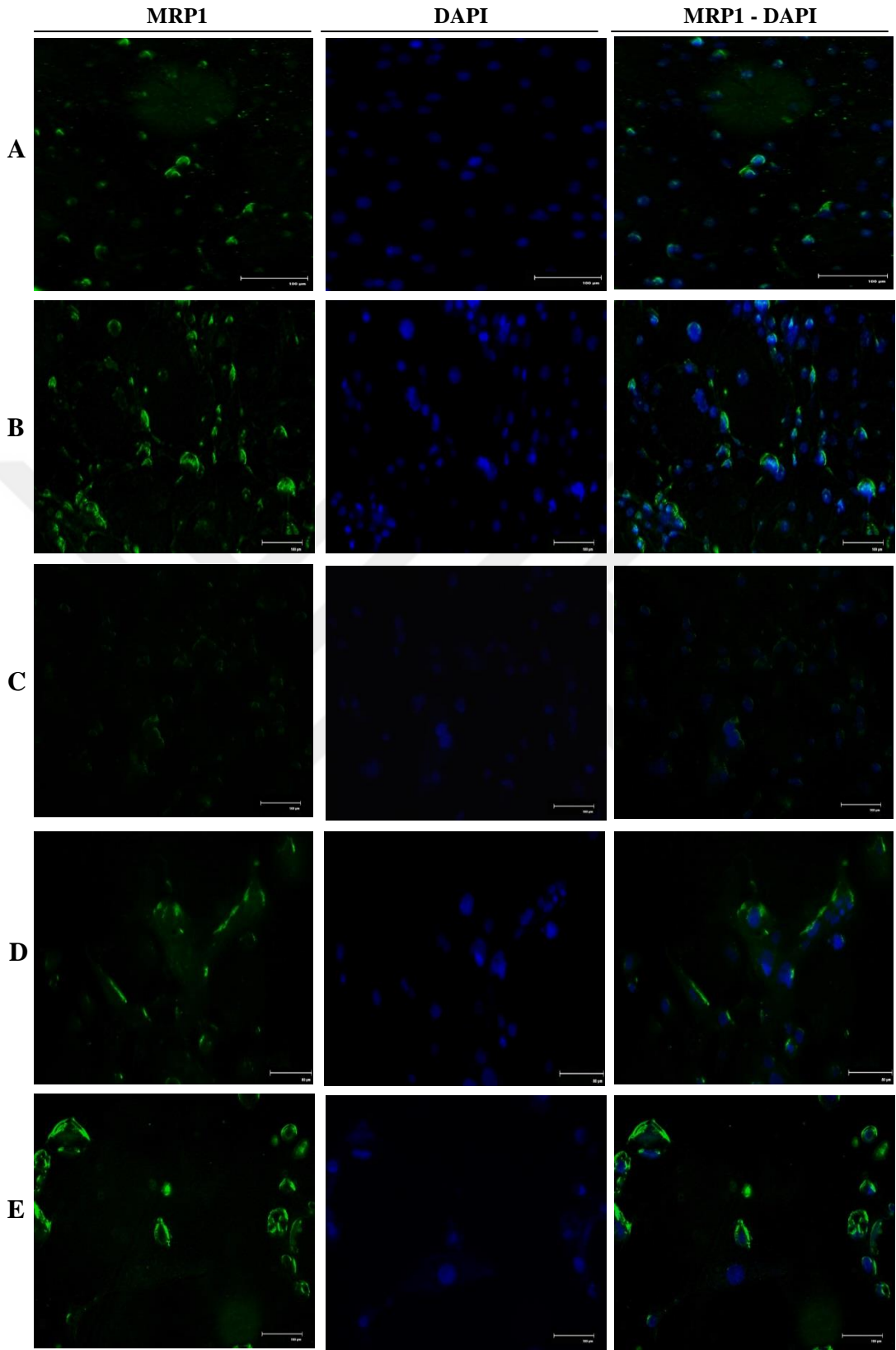
Şekil 89. HCC1937 hücrelerinde BRCA1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



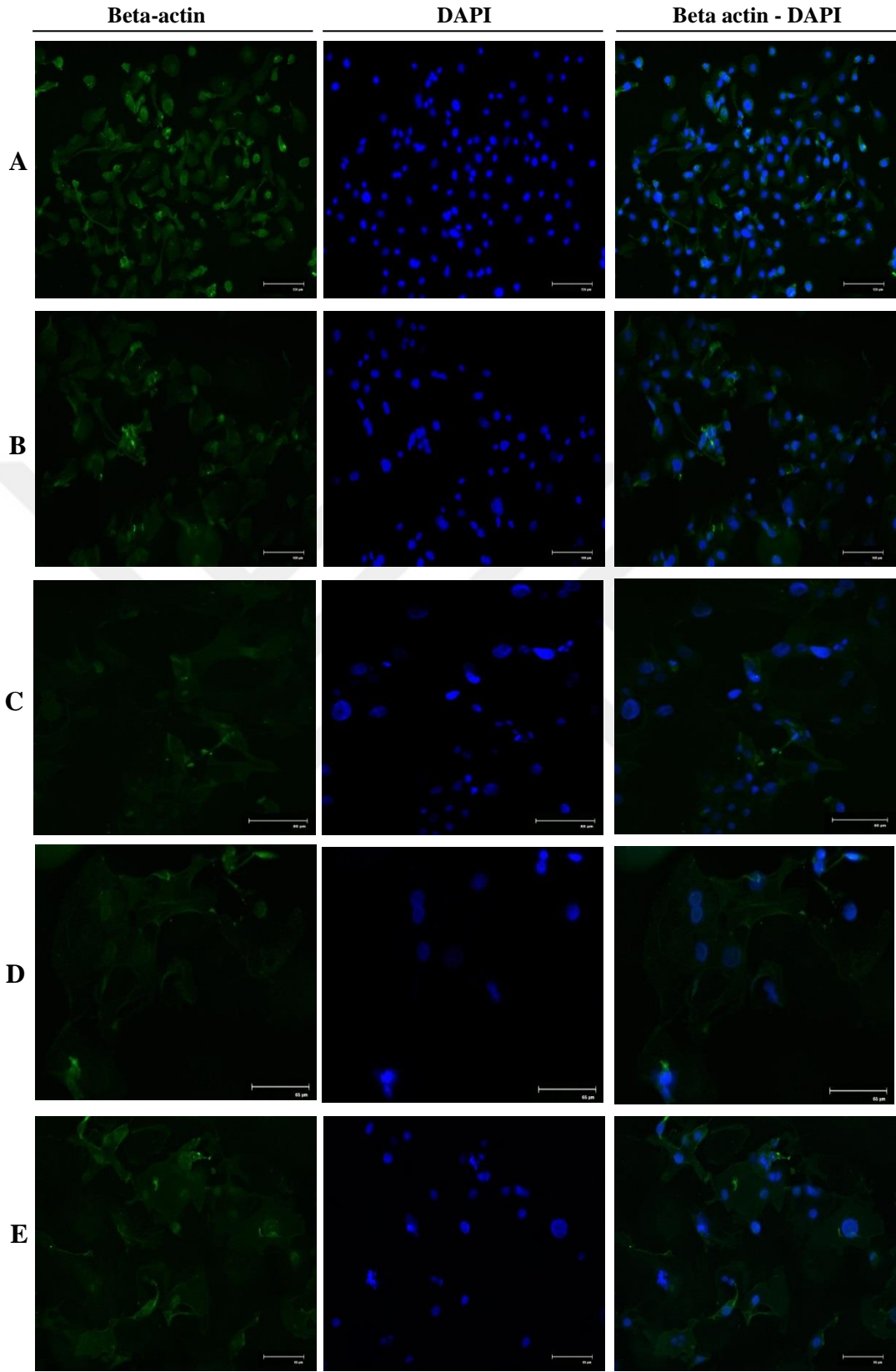
Şekil 90. HCC1937 hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



Şekil 91. HCC1937 hücrelerinde BCRP ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



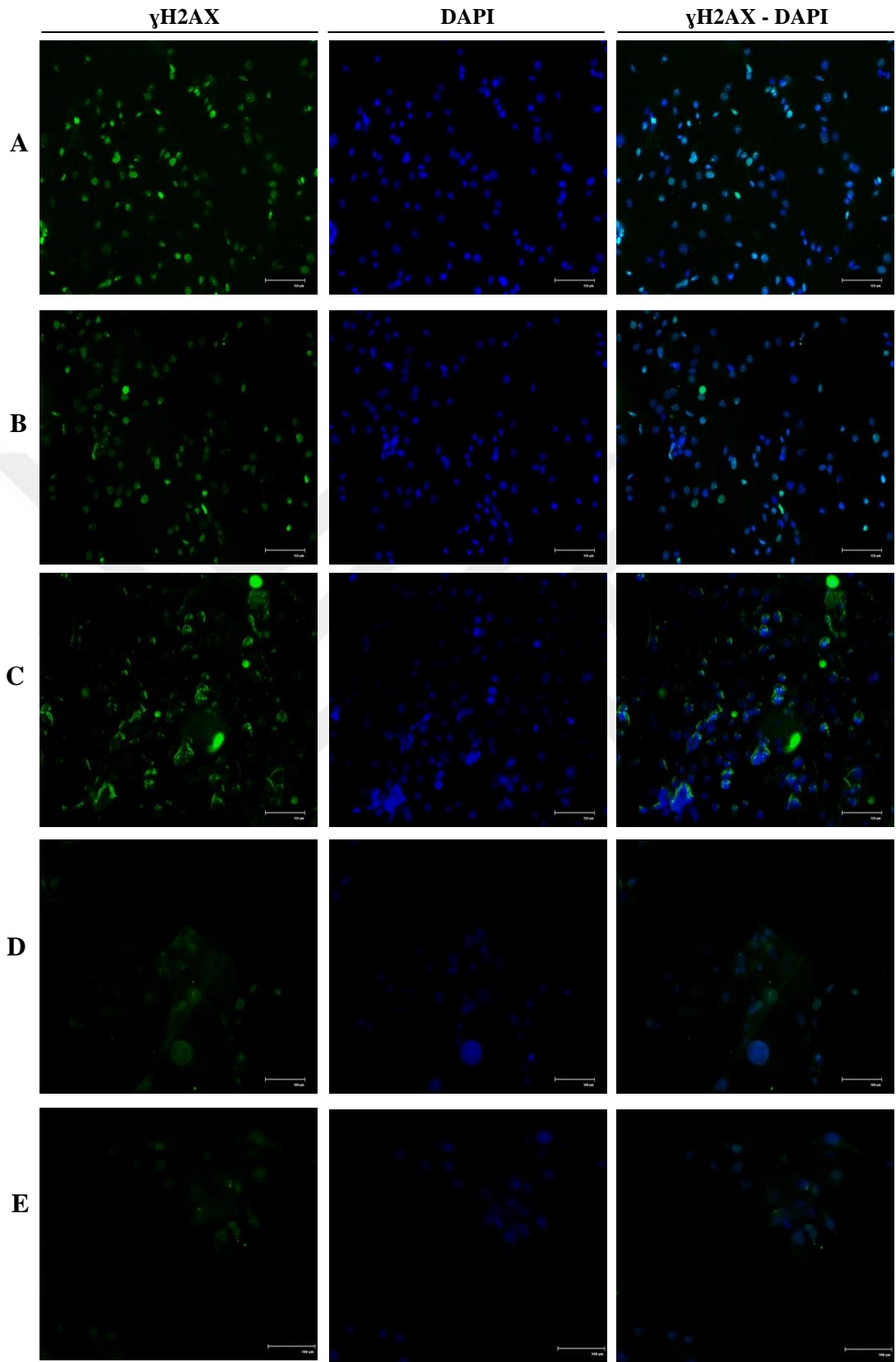
Şekil 92. HCC1937 hücrelerinde MRP1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



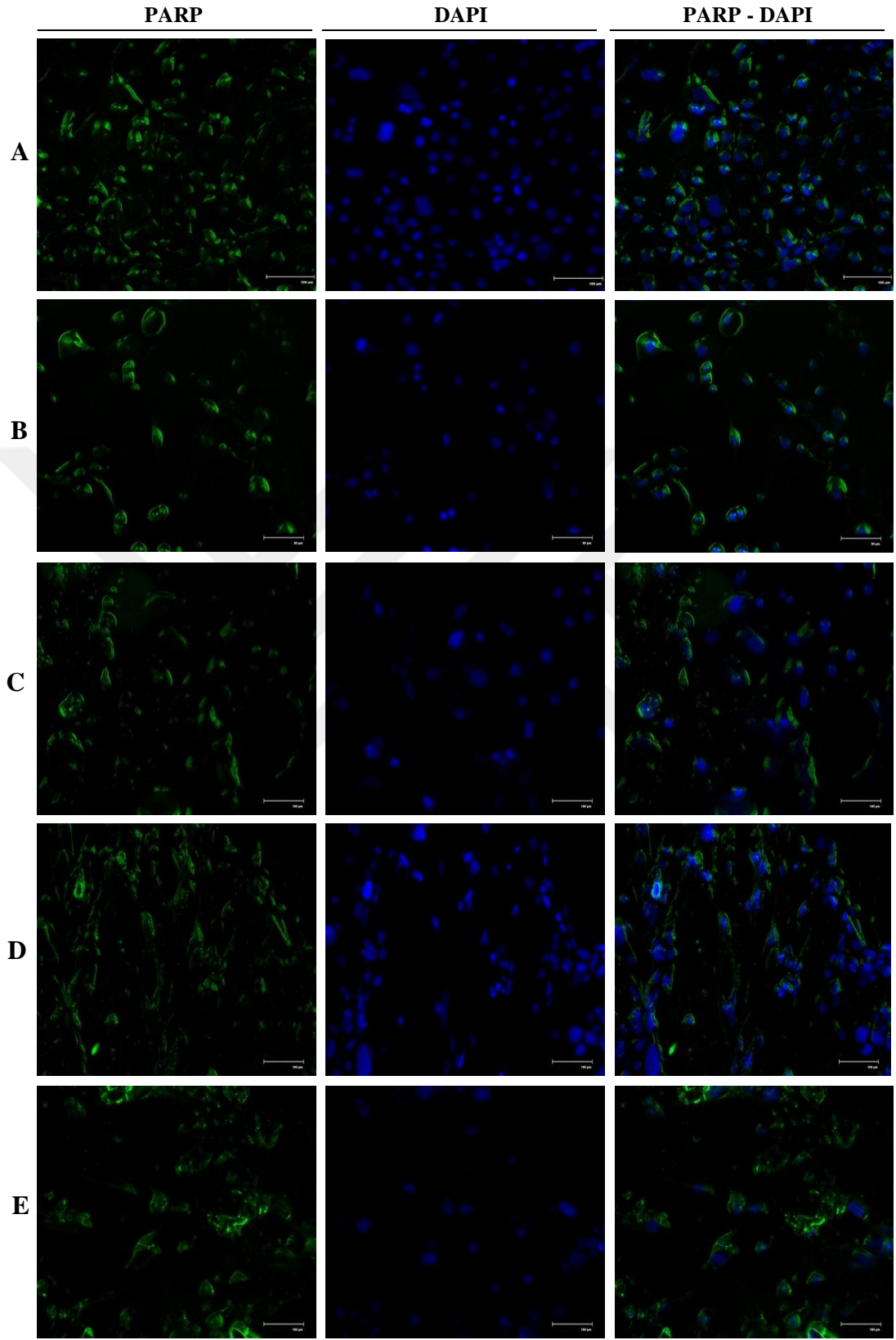
Şekil 93. HCC1937 hücrelerinde beta-aktin ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak HR ile ilişkili olan γ H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları üzerinde etkisi incelendiğinde, 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanması sonucunda artan doza bağlı olarak nükleusta γ H2AX ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen (Şekil 94), nüklear PARP ekspresyonunun kontrol grubu ile benzer bir düzeyde olduğu (Şekil 95) ve nüklear RAD51 ekspresyonunun HCC1937 hücrelerine göre anlamlı derecede arttığı görüldü (Şekil 96). Ayrıca, BRCA1'in nüklear ekspresyonunun HCC1937-R hücrelerinin BMN 673'e kazandığı dirence bağlı olarak arttığı ancak BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak BRCA1'in ekspresyonunda azalma olduğu görüldü (Şekil 97).

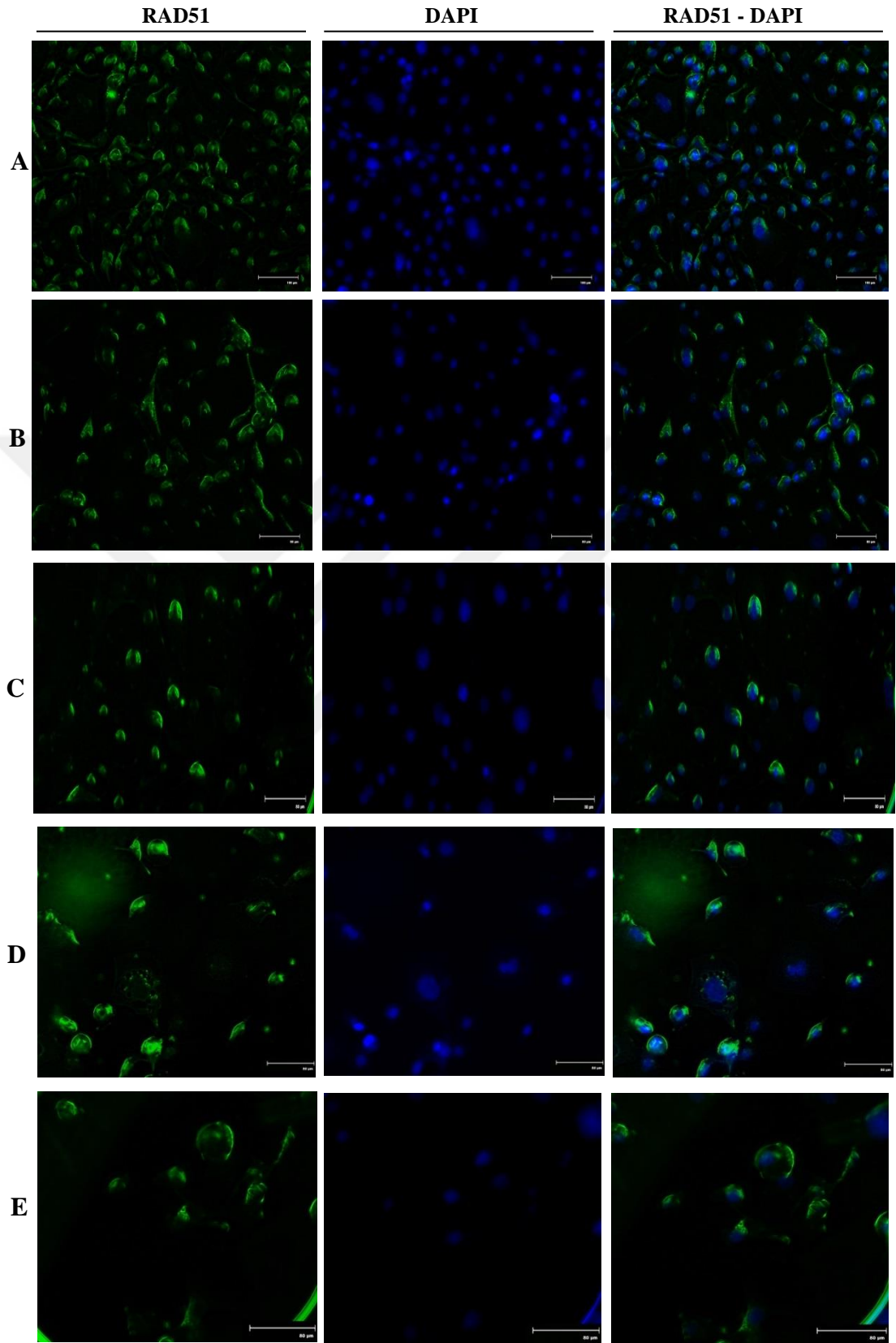
HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin lokalizasyonları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDR1'in ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen (Şekil 98), BCRP'nin hücre membranı ve sitozoldeki ekspresyonunda 1 nM BMN 673 konsantrasyonuna kadar azalış görüldümesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında BCRP'in ekspresyonunda artış görüldü (Şekil 99). Ayrıca, BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak MRP'in hücre membranı ve sitozoldeki ekspresyonunda artış görüldü (Şekil 100). BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinin genel morfolojik yapısı kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak beta-actin immünüfloresans boyaması ile görüldü (Şekil 101).



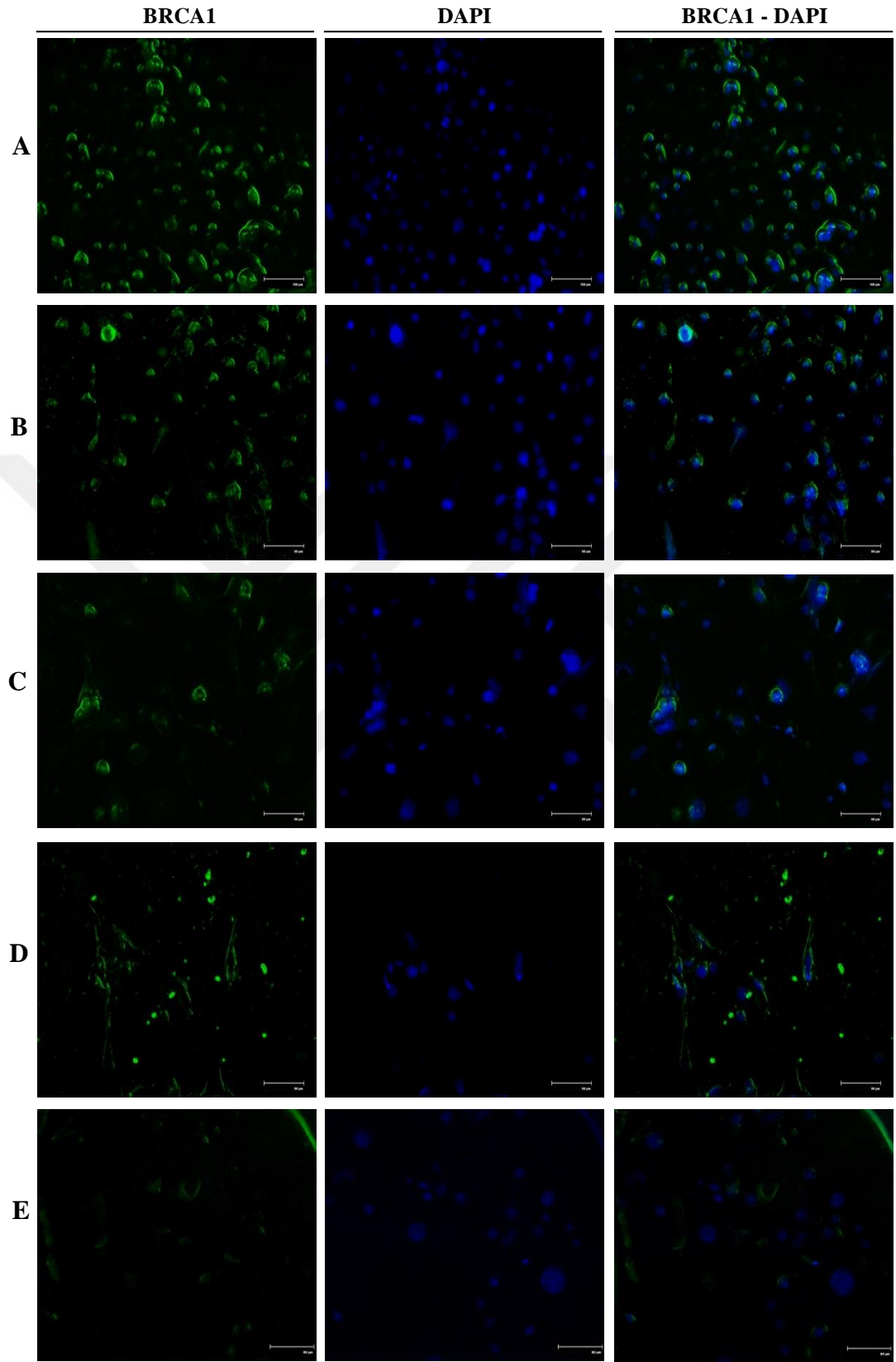
Şekil 94. HCC1937-R hücrelerinde γ H2AX ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



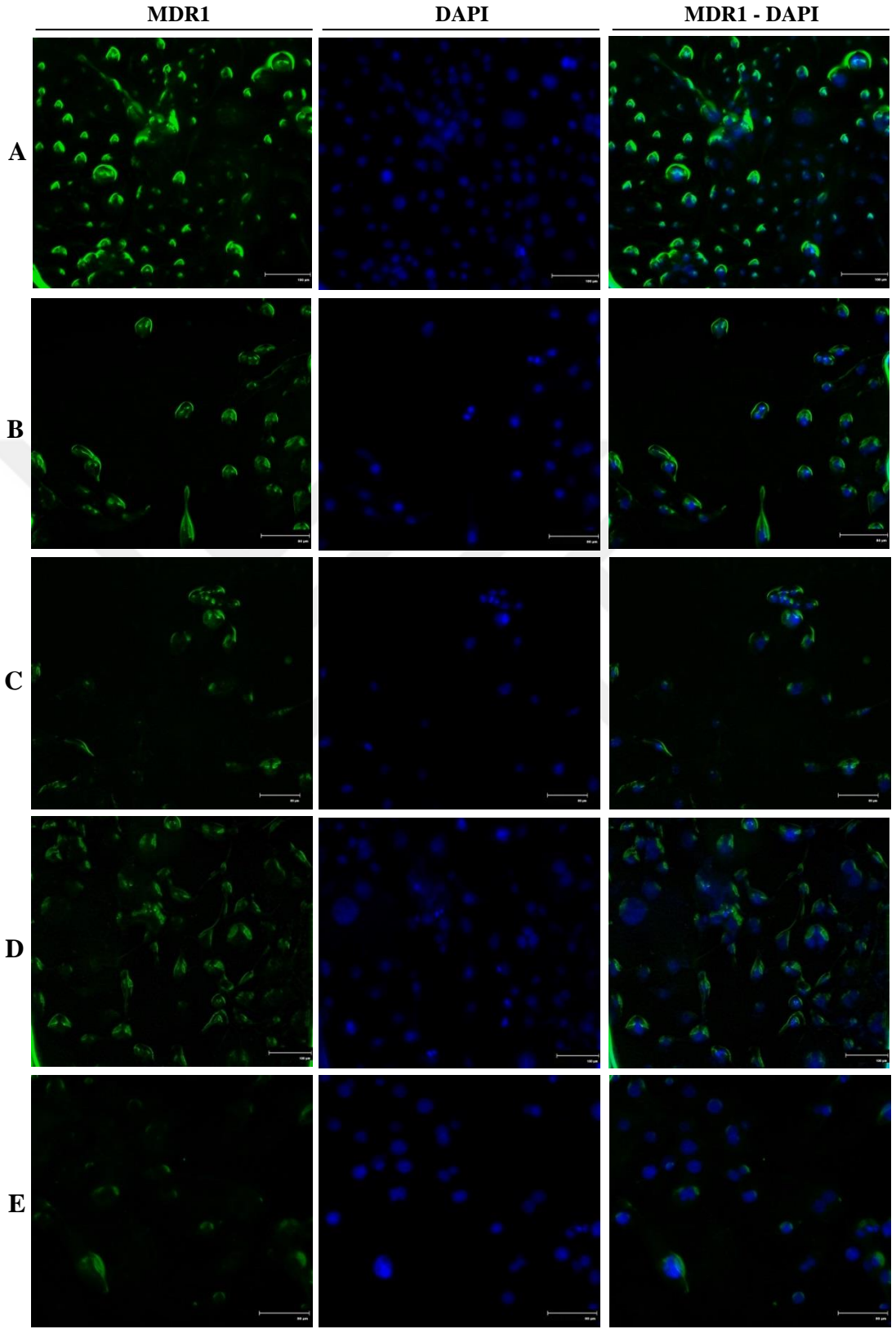
Şekil 95. HCC1937-R hücrelerinde PARP ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



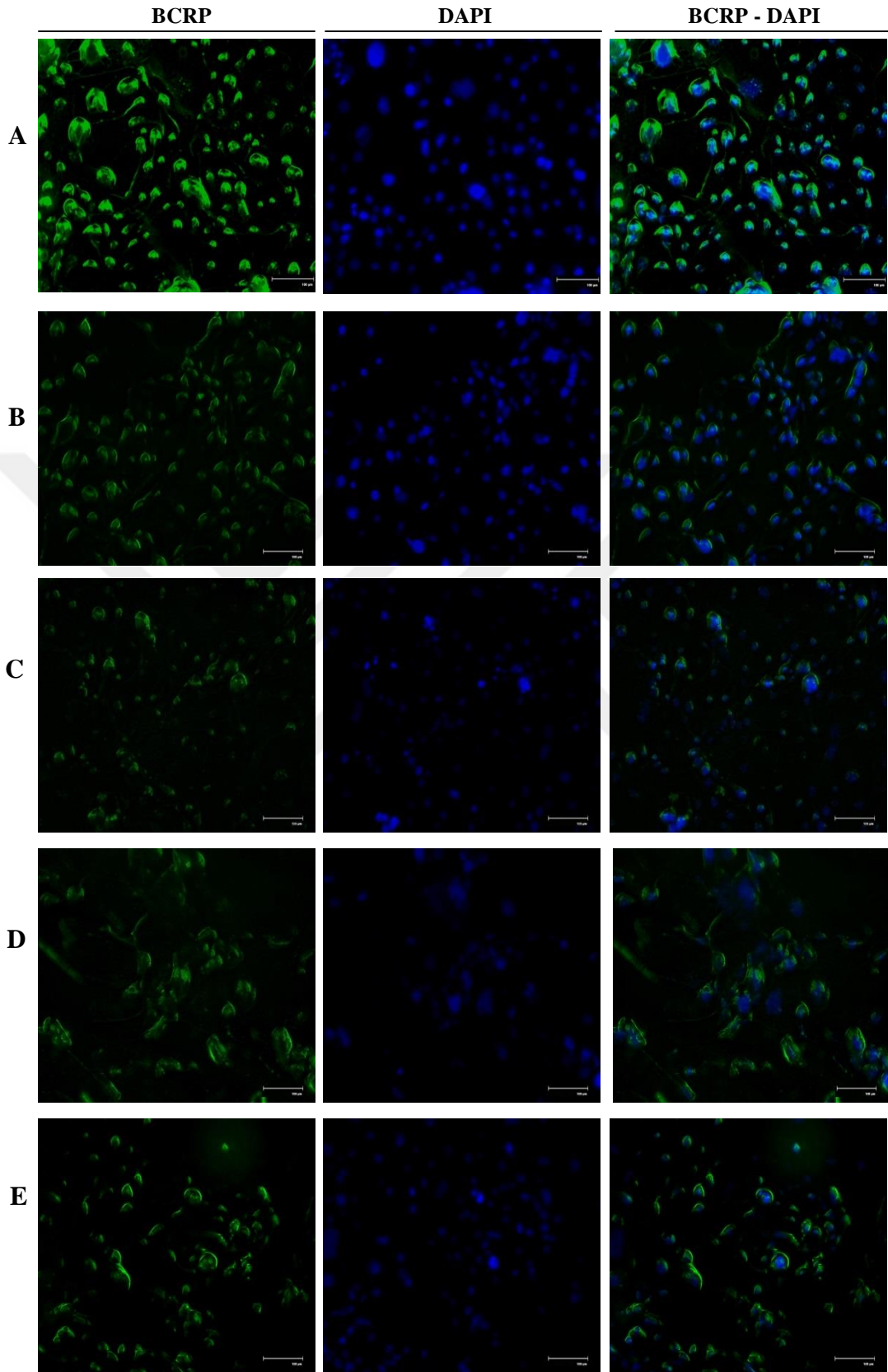
Şekil 96. HCC1937-R hücrelerinde RAD51 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



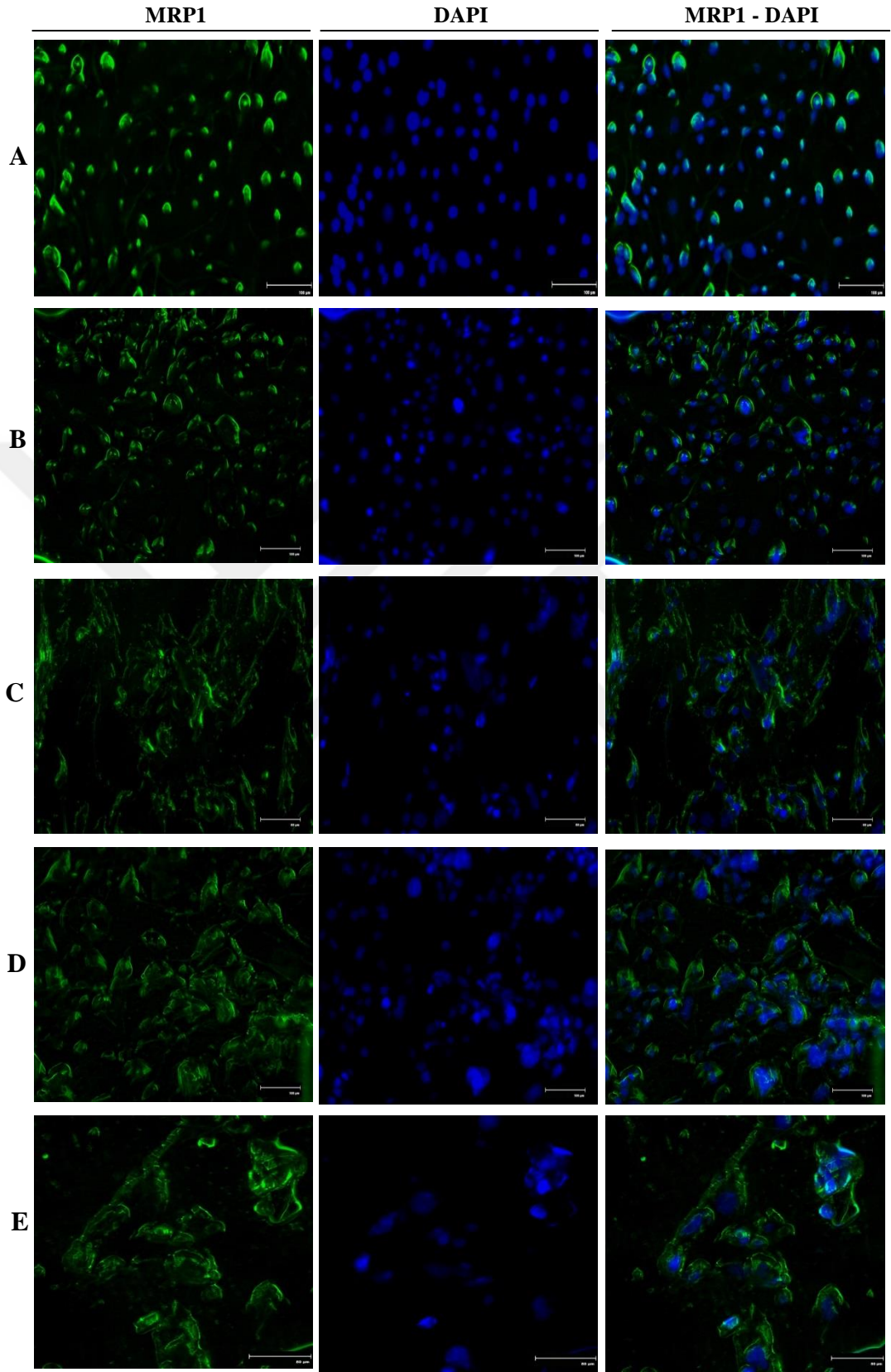
Şekil 97. HCC1937-R hücrelerinde BRCA1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



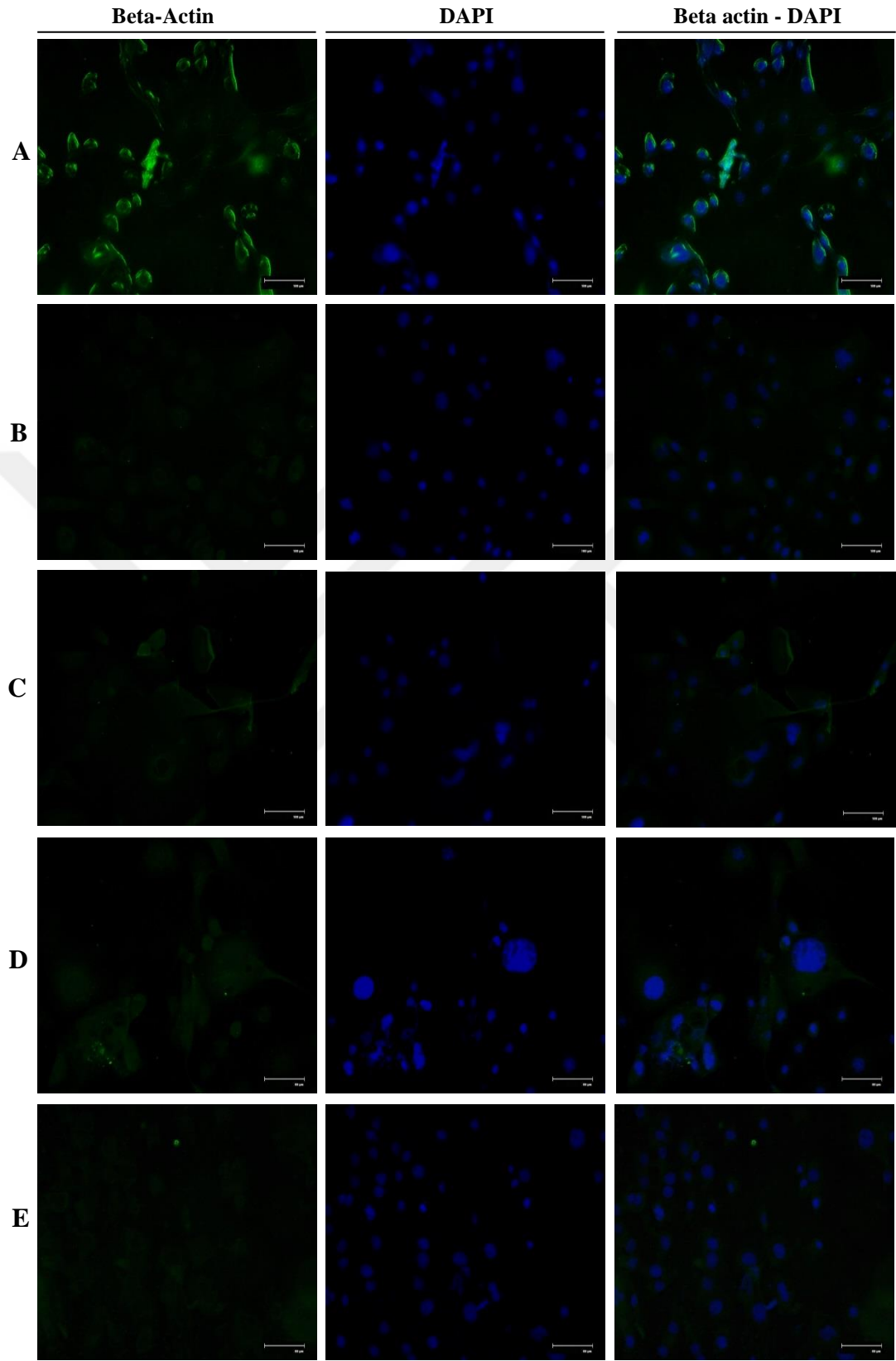
Şekil 98. HCC1937-R hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



Şekil 99. HCC1937-R hücrelerinde BCRP ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



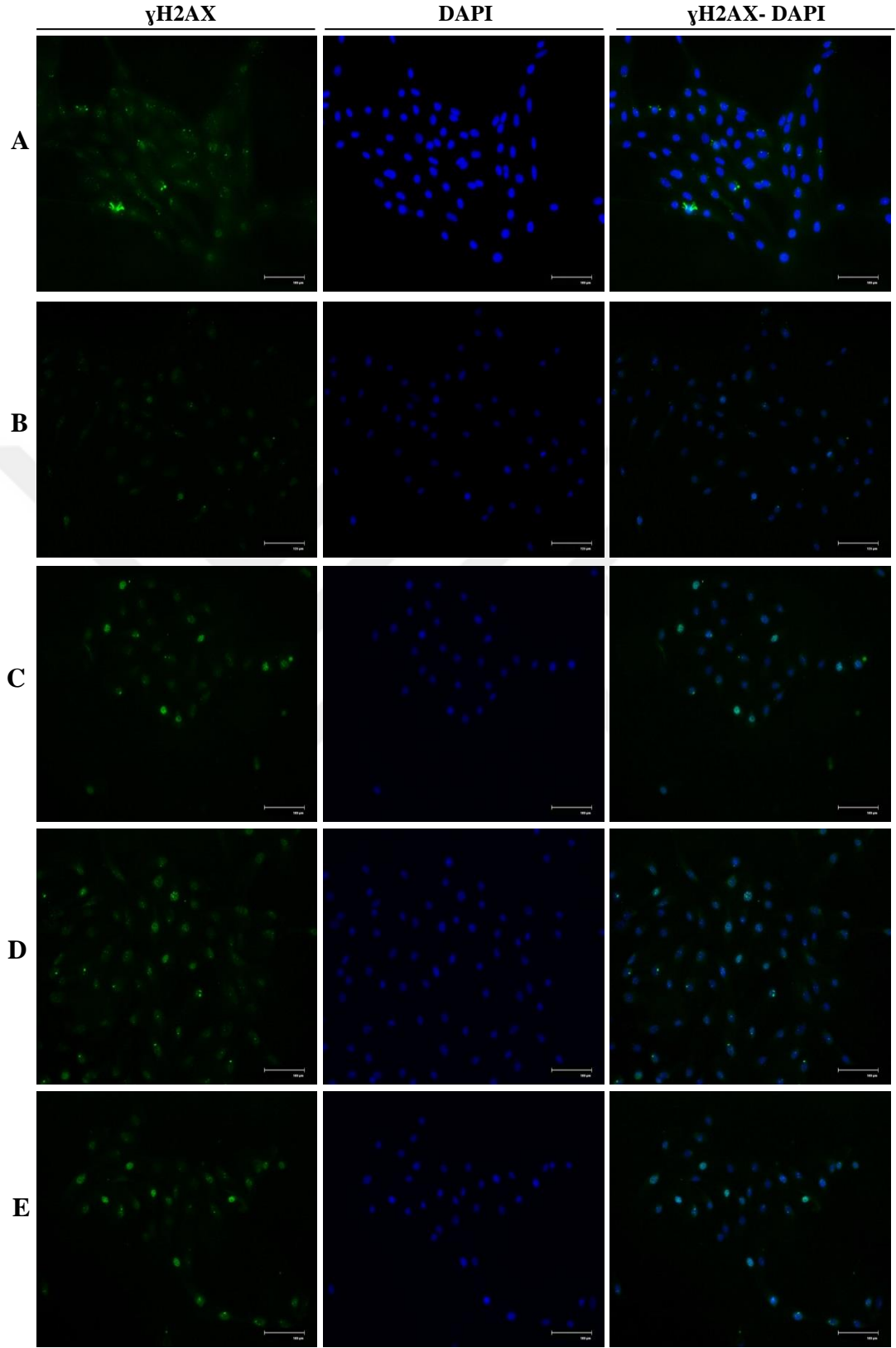
Şekil 100. HCC1937-R hücrelerinde MRP1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



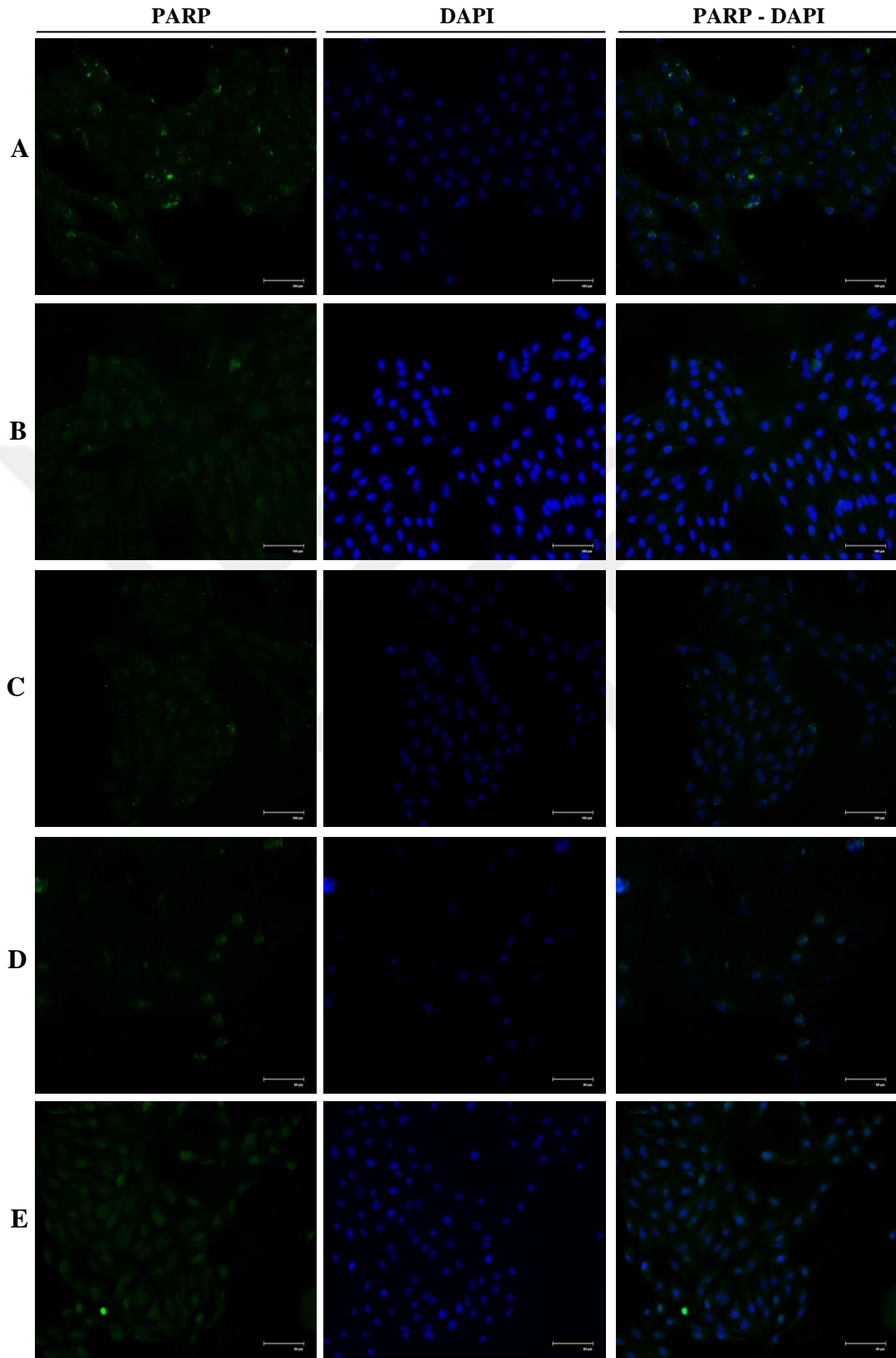
Şekil 101. HCC1937-R hücrelerinde beta-actin ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673

MCF-10A hücrelerinde ise BMN 673'ün kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak HR ile ilişkili olan γ H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün artan konsantrasyonuna rağmen nükleusta γ H2AX ekspresyonu herhangi bir değişim görüntülenmedi (Şekil 102). Ancak, nüklear PARP ekspresyonunda azalış (Şekil 103) ve nüklear RAD51 ekspresyonda belirgin düzeyde artış görüntüledi (Şekil 104). Ayrıca, BRCA1'in nüklear ekspresyonunun BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ancak 10 nM BMN 673 uygulandığında ise BRCA1'in ekspresyonunda azalma olduğu görüntüledi (Şekil 105).

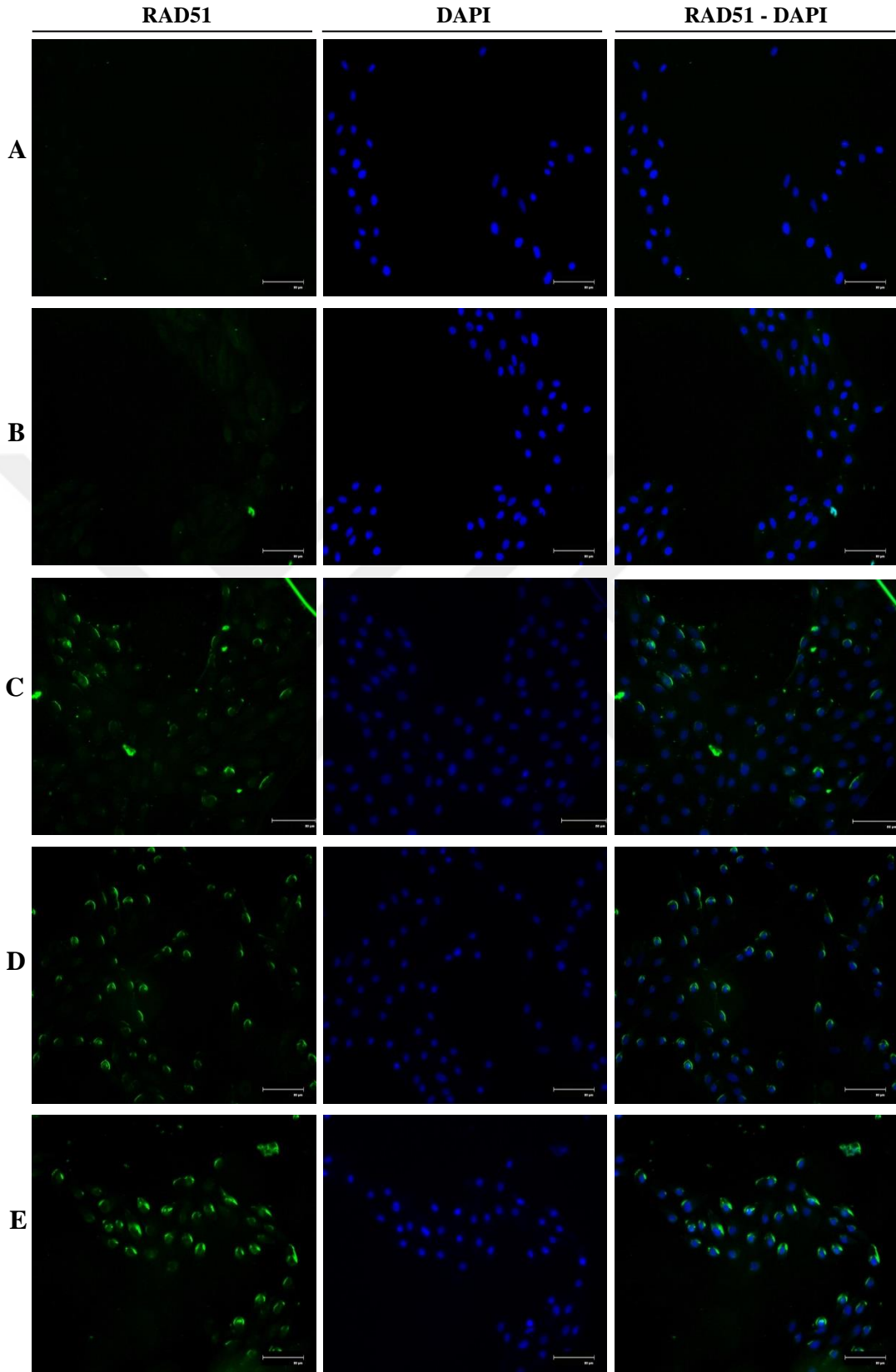
MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin lokalizasyonları üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise, 1 nM BMN 673 konsantrasyonuna kadar MCF-10A hücrelerinde MDR1'in hücre membranı ve sitozoldeki ekspresyon seviyesinde belirgin düzeyde bir artış belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulandığında MDR1'in ekspresyonunda azalış görüntüledi (Şekil 106). Ayrıca, BCRP'nin hücre membranı ve sitozoldeki ekspresyonunda 0.1 nM BMN 673 konsantrasyonuna kadar azalış görüntülenmesine rağmen, 1 nM BMN 673 konsantrasyonundan itibaren BCRP'in ekspresyonunda belirgin düzeyde bir artış görüntüledi (Şekil 107). MRP1'in hücre membranı ve sitozoldeki ekspresyonu ise, BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı görüntüledi (Şekil 108). BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinin genel morfolojik yapısı kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak beta-actin immünofloresans boyaması ile görüntüledi ve BMN 673'ün konsantrasyonu arttıkça MCF-10A hücrelerinin genel yapısında deformasyonlar ve hücre içinde boşluk oluşumları gözlemlendi (Şekil 109).



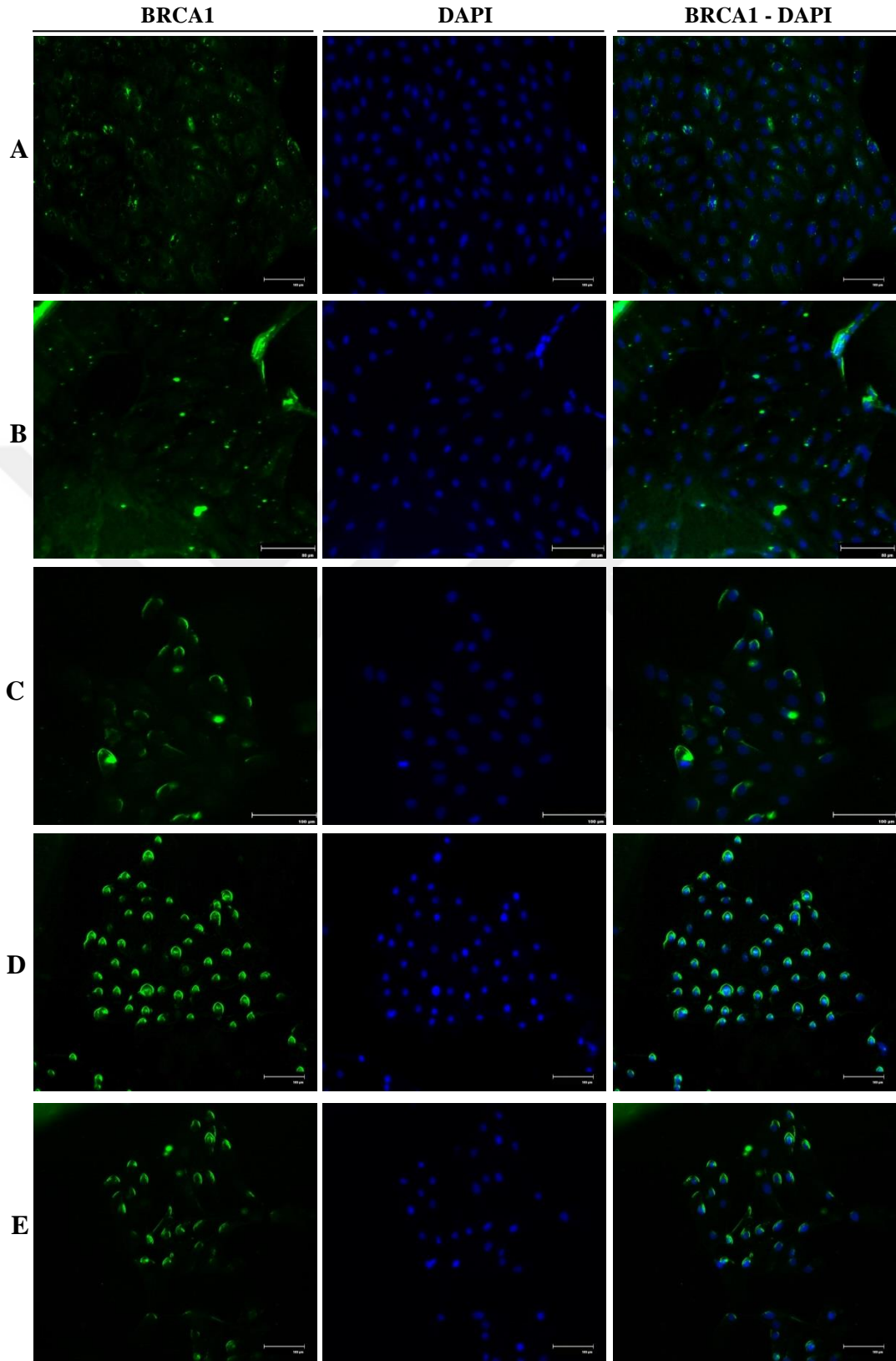
Şekil 102. MCF-10A hücrelerinde γ H2AX ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



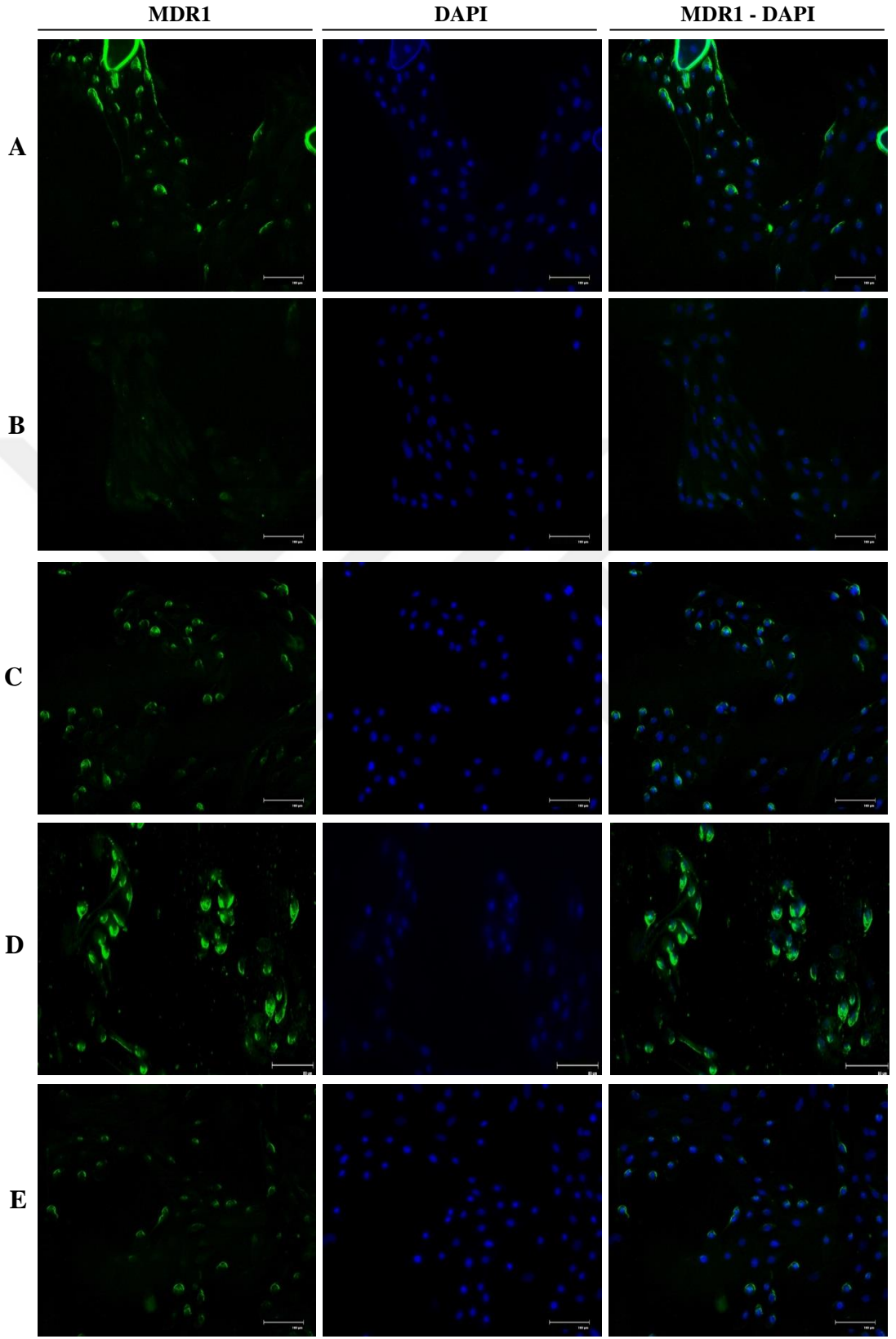
Şekil 103. MCF-10A hücrelerinde PARP ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



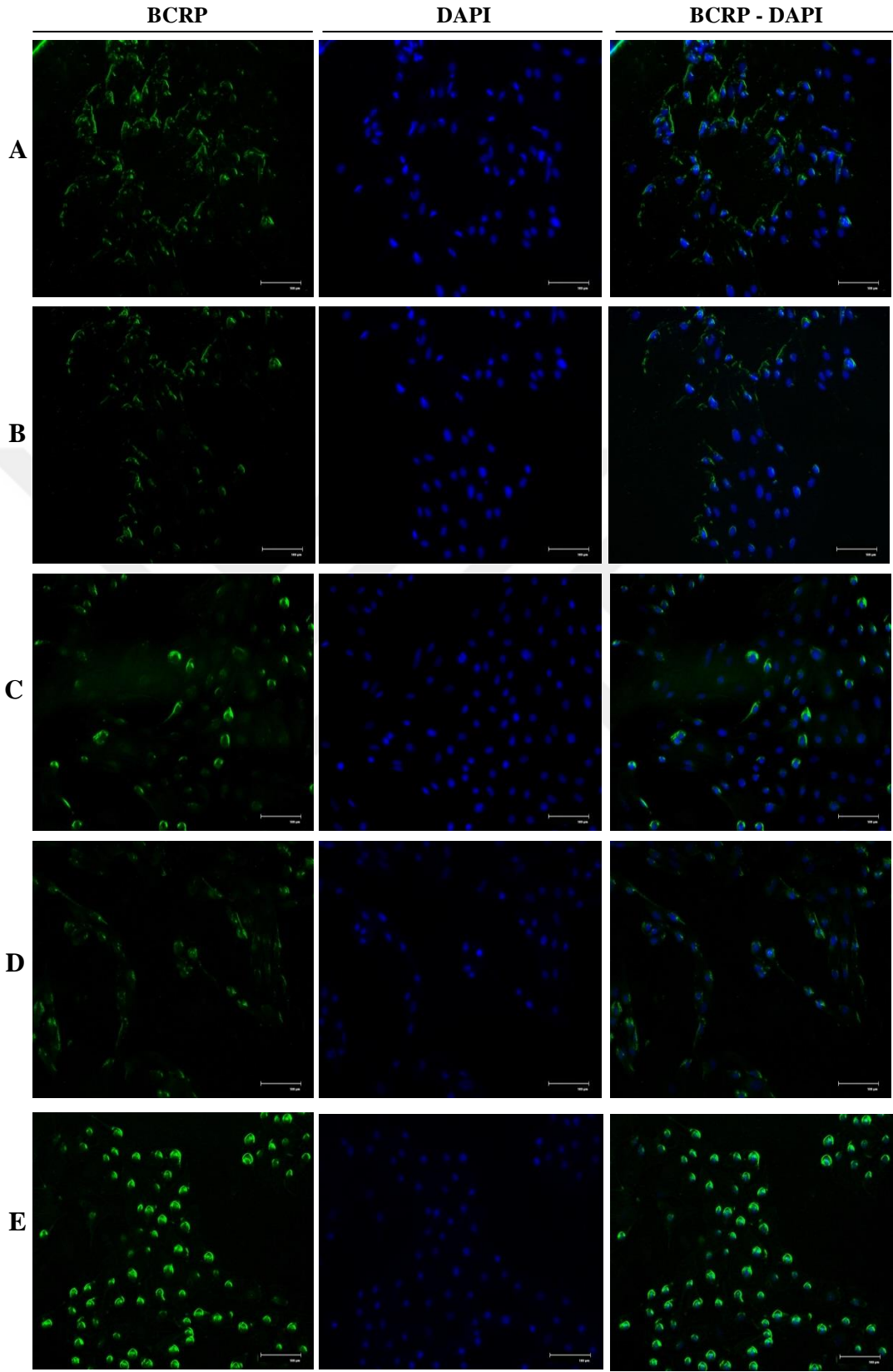
Şekil 104. MCF-10A hücrelerinde RAD51 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



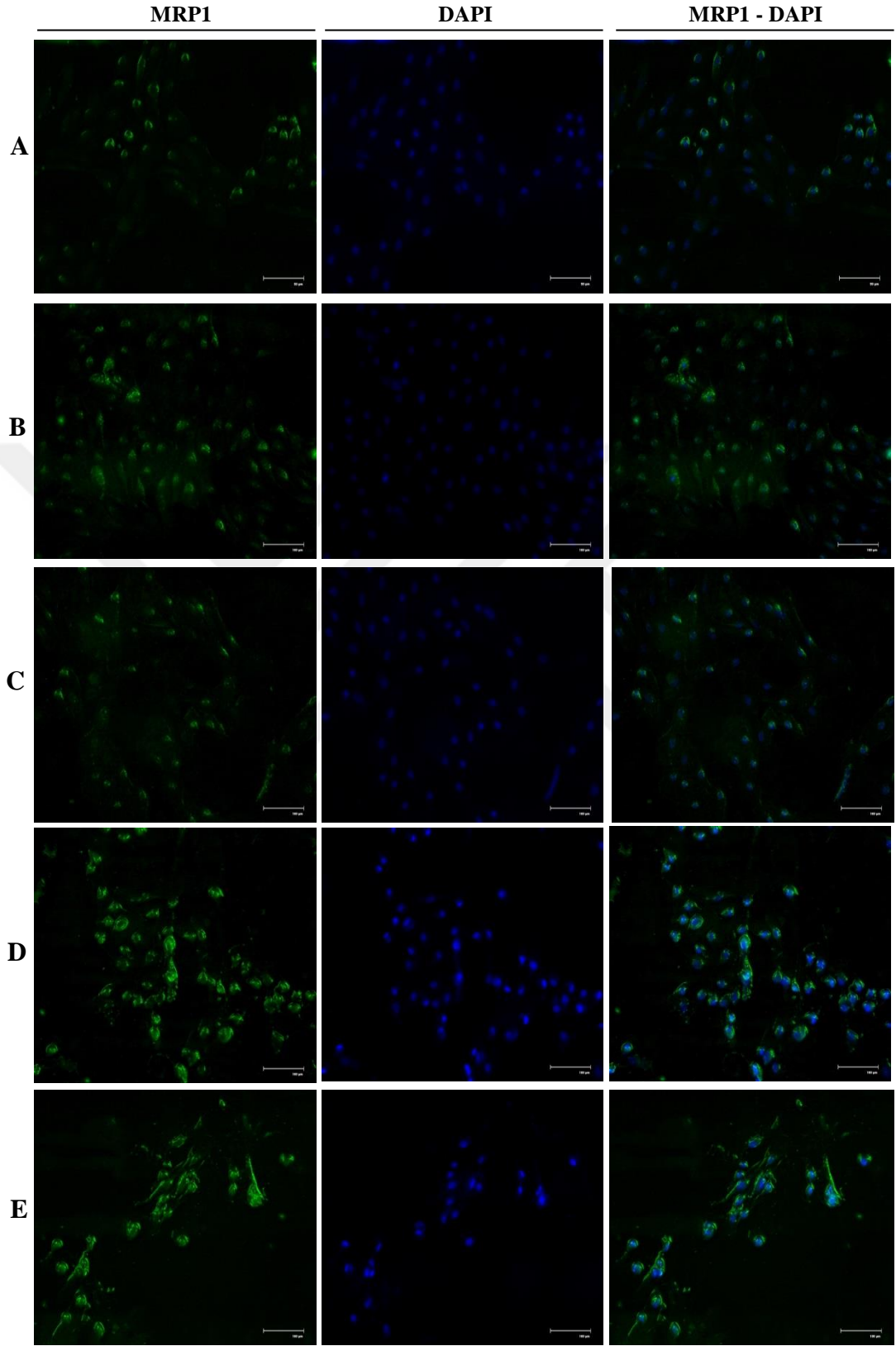
Şekil 105. MCF-10A hücrelerinde BRCA1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



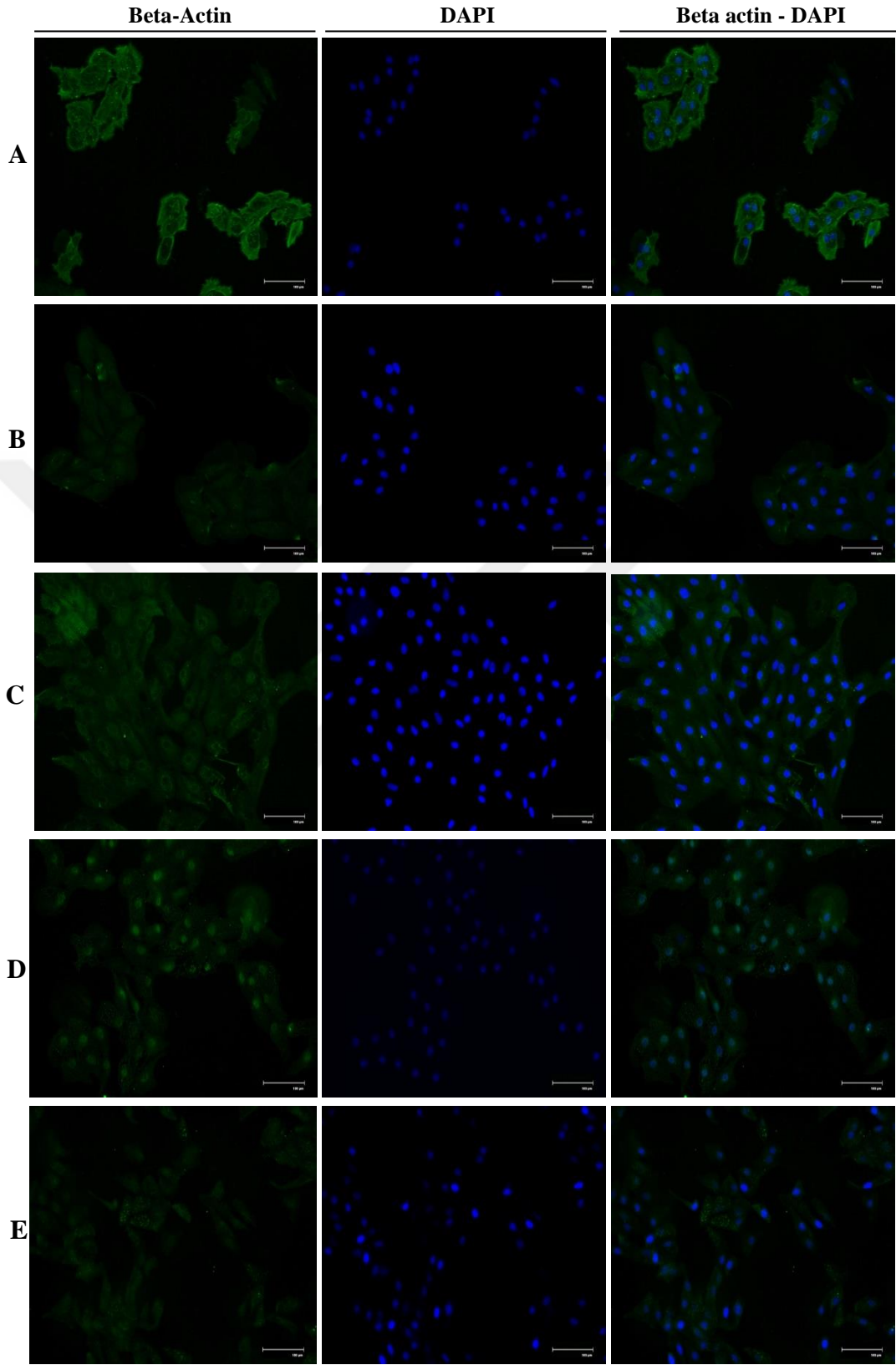
Şekil 106. MCF-10A hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



Şekil 107. MCF-10A hücrelerinde BCRP ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



Şekil 108. MCF-10A hücrelerinde MRP1 ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673



Şekil 109. MCF-10A hücrelerinde beta-actin ekspresyonunun immunofloresans analizi (A) Kontrol, (B) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM BMN 673

Sonuç olarak, HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak BMN 673'ün sitotoksik ve apoptotik etkisinden dolayı nüklear PARP ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen, hücrelerin ilaca karşı direnç geliştirmesinden dolayı nüklear RAD51 ve BRCA1 ekspresyonunda artış belirlenmiştir. Ayrıca, MDR ile ilişkili olan özellikle BCRP ve MRP1'in hücre membranı ve sitozolde ekspresyon miktarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış görüntülenmiştir.

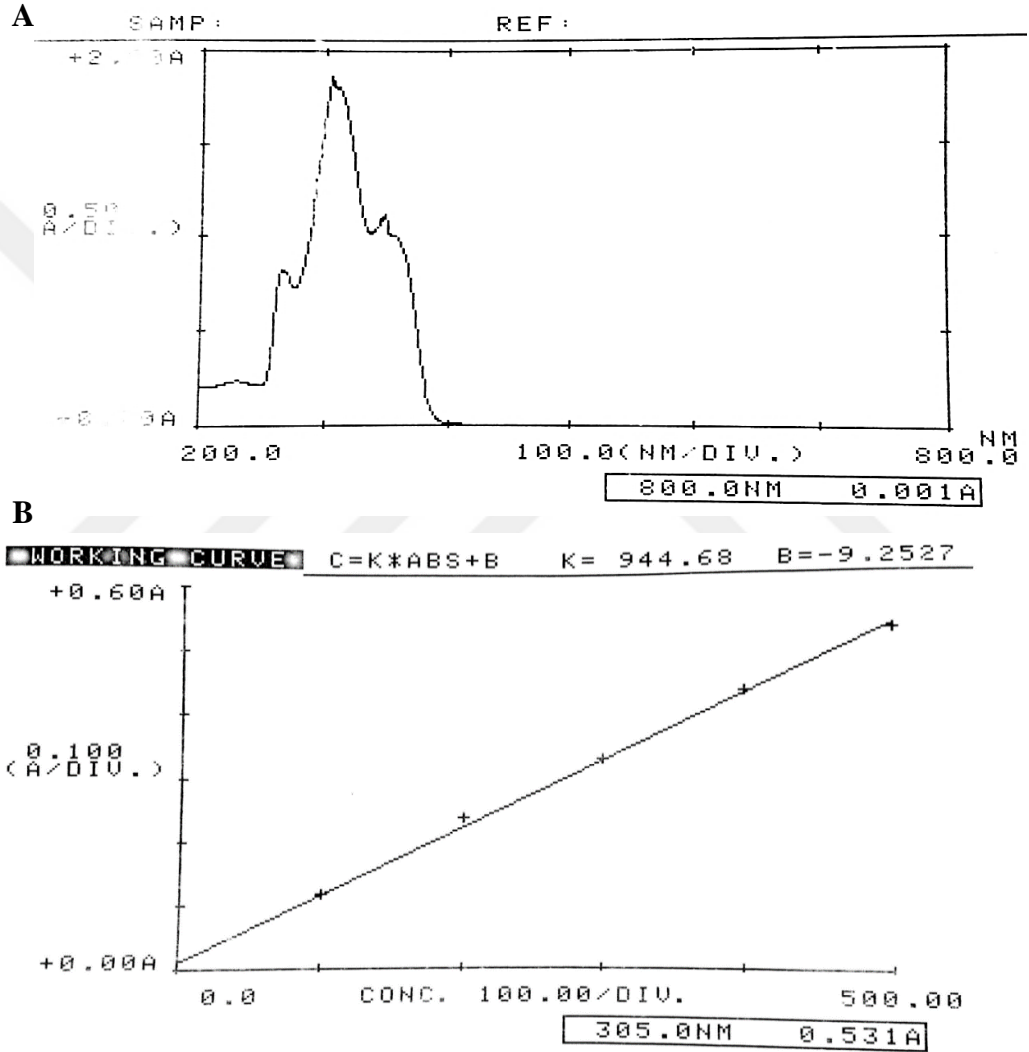
6 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise BMN 673'e karşı kazanılan ilaç direncinden dolayı HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığında MDR ile ilişkili olan genlerin hücre membranı ve sitozolde ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığı görüntülenmiştir. Ayrıca, HR yolağı ile ilişkili olan nüklear BRCA1 ekspresyonunda da artış gözlemlenmiştir. Ancak BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu arttıkça, BRCA1, γ H2AX ve MDR1'in ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen, RAD51, BCRP ve MRP1 ekspresyonunda artış görüntülenmiştir.

MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı nüklear PARP ekspresyonunda azalış belirlenmesine rağmen, RAD51 ve BRCA1 ekspresyonunda artış görüntülenmiştir. Ayrıca, MDR ile ilişkili proteinlerin hücre membranı ve sitozolde ekspresyonlarının BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

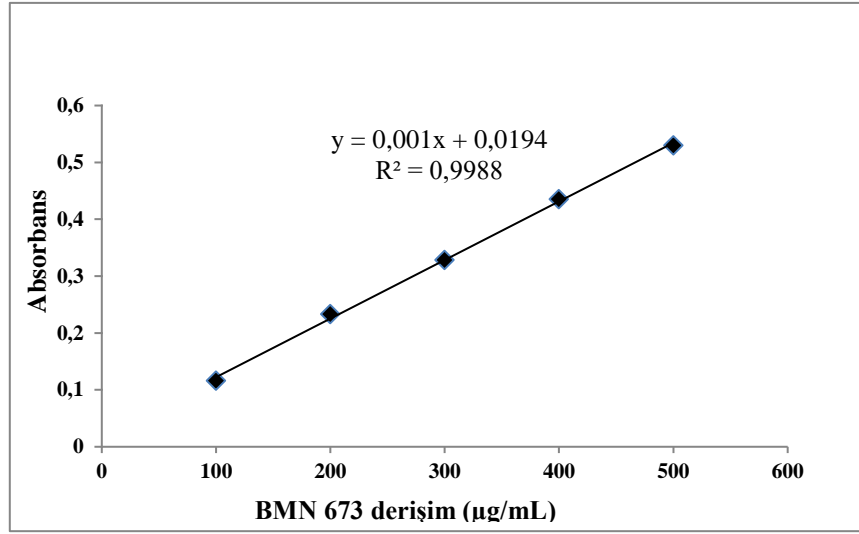
4.15 BMN 673'ün Miktar Tayininin Değerlendirilmesi

BMN 673'ün miktar tayininin yapılması için UV spektrofotometrede hazırlanan ana stok çözeltisinin λ_{max} değeri 305 nm olarak belirlendikten sonra (Şekil 120), BMN 673'ün hazırlanan ana stok çözeltisinden hareketle 5 farklı derişimde elde edilen çözeltiler (100-500 ppm) UV spektroskopide analiz edilerek, BMN 673'ün doğrusallık eğrisi elde edildi (Şekil 110) ve doğru denklemi $y = 0,001x + 0,0194$ fonksiyonun tanımlayıcılık katsayısı da 0.9988 bulundu (n=6) (Şekil 111). Kalibrasyon derişimleri ölçümü hedeflenen nanopartikül formülasyonlarındaki BMN 673'ün içeriğine göre belirlenmiştir. Ayrıca, BMN 673'ün hazırlanan 5 farklı konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerleri kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen % geri kazanım değerleri belirlendi. Yöntemin yüzde geri kazanım değerleri %93'den büyük bulunması yöntemin doğruluk derecesini göstermektedir. BSS <%2 olarak bulunduğu

için yöntemin kesinlik sonuçları belirlendi (Tablo 49). Saptama sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) değerleri ise, $LOD= 19.262$ $LOQ=64.205$ olarak hesaplandı. Sonuç olarak, kullanılan analitik yöntemin 100-500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında doğrusallığı, doğruluğu ve kesinliği belirlenmiştir ve hesaplanan yöntemin LOD ve LOQ değerleri BMN 673'ün miktar tayini ve BMN 673-KLN'in salınım özellikleri için yeterlidir.



Şekil 110. BMN 673'ün miktar tayini. (A) BMN 673'ün UV spektrofotometrede λ_{max} değerinin belirlenmesi ve (B) Hazırlanan 5 farklı çözeltinin (100-500 ppm) UV spektroskopide analiz edilmesi sonucunda elde edilen doğrusallık eğrisi.



Şekil 111. BMN 673'ün doğrusallık eğrisi (100-500 µg/mL)

Tablo 49. BMN 673'ün BSS ve % geri kazanım değerlerinin verilmesi

Konsantrasyon (µg/mL) (n=3)	Ölçülen konsantrasyon (µg/mL) (n=3)	SH*	BSS*	%Geri kazanım**
100	94.11	1.48	1.58	93.79
200	205.11	2.44	1.19	102.56
300	303.17	3.40	1.12	101.06
400	403.82	2.44	0.60	100.96
500	502.53	2.57	0.51	100.50

*Kesinlik **Doğruluk SH=Standart hata BSS= Bağıl Standart Sapma

4.16. BMN 673 yüklü KLN'nin Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

BMN673, BMN673 yüklü KLN ve boş KLN'nin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri 3 farklı sıcaklıkta (4, 25 ve 40°C) 90°'lik açı ile değerlendirilerek elde edilen bulgular Tablo 50 ve 51'de sunuldu. BMN 673'ün partikül boyutu 4°C, 25°C ve 40°C'de sırasıyla 1652 nm, 1865 nm ve 2647 nm olarak ölçülmesine rağmen, BMN 673 yüklü KLN'nin boyutu sırasıyla 219.5 nm, 184.3 nm ve 354.4 nm olarak saptandı. Boş KLN'nin partikül boyutu ise, 4°C, 25 °C ve 40°C için sırasıyla 203.7 nm, 176.8 nm ve 343.9 nm olarak belirlendi. Ayrıca, BMN 673'ün polidispersite indeksi 4°C, 25°C ve 40°C için sırasıyla 0.324, 0.432 ve 0.320 ölçülmesine rağmen, BMN 673 yüklü KLN'nin sırasıyla 0.436, 0.312 ve 0.298 olarak analiz edildi. Boş KLN'nin ise 4°C, 25 °C ve 40 °C için sırasıyla 0.386, 0.452 ve 0.263 olarak belirlendi (Tablo 50).

Tablo 50. BMN 673, BMN 673-KLN ve boş KLN'ye ait partikül boyutu ve polidispersite indeksi değerleri.

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm)		Polidispersite İndeksi (PDI)	
	Ortalama (n=3)	S.S.	Ortalama (n=3)	S.S.
BMN 673	4°C	1652	2.46	0.324
	25°C	1865	1.06	0.432
	40°C	2647	1.84	0.320
BMN 673 yüklü KLN	4°C	219.5	1.45	0.436
	25°C	184.3	0.63	0.312
	40°C	354.4	0.47	0.298
Boş KLN	4°C	203.7	2.56	0.386
	25°C	176.8	2.94	0.452
	40°C	343.9	1.75	0.263

BMN 673 ve BMN 673 yüklü KLN'nin zeta potansiyel değerleri incelendiğinde ise, BMN 673'ün zeta potansiyel değerleri 4°C, 25 °C ve 40°C'de sırasıyla -18.6, -17.4 ve -10.6 mV olarak belirlenmesine rağmen, BMN 673-KLN için sırasıyla -28.4, -39 ve -21.4 mV olarak analiz edildi. Boş KLN'nin zeta potansiyel değerleri ise, 4°C, 25 °C ve 40°C için sırasıyla -29.6, -39.6 ve -21.4 mV olarak belirlendi (Tablo 51).

Tablo 51. BMN 673, BMN 673-KLN ve boş KLN'ye ait zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Zeta Potansiyel (mV)			İletkenlik (mS.cm ⁻¹)			
	Ortalama (n=3)	%BSS	SH	Ortalama (n=3)	%BSS	SH	
BMN 673	4°C	-18.6	2.04	0.45	0.03	0,52	0.0001
	25°C	-17.4	1.26	0.84	0.07	0,96	0.0006
	40°C	-10.6	1.65	0.42	0.04	1,25	0.0004
BMN 673 yüklü KLN	4°C	-28.4	2.52	0.96	0.03	1.97	0.0004
	25°C	-39.0	2.61	0.30	0.02	1.85	0.0009
	40°C	-21.4	1.03	0.47	0.04	1.63	0.0007
Boş KLN	4°C	-29.6	2.21	0.64	0.09	1.63	0.0003
	25°C	-39.6	1.36	0.32	0.05	0.54	0.0006
	40°C	-21.4	0.94	0.45	0.06	1.20	0.0006

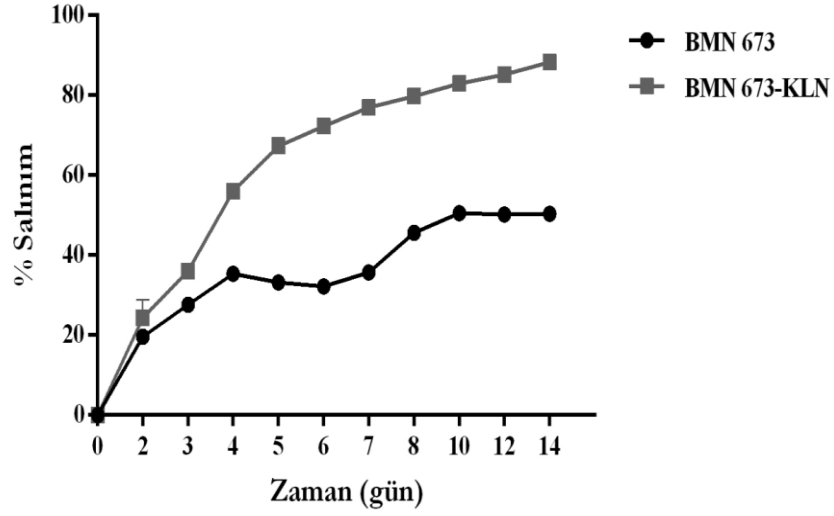
Sonuç olarak, 3 farklı sıcaklıkta partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilen BMN 673 ve BMN 673 yüklü KLN'nin en kararlı yapıda oldukları sıcaklığın 4°C olduğu ve KLN formülasyonunun BMN 673'ün partikül boyutunu önemli derecede azaltarak homojen bir dağılıma sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, BMN 673-KLN'nin, BMN 673'e göre daha düşük zeta potansiyel değerine sahip olmasından dolayı daha kararlı bir yapı sergilediği analiz edilmiştir. BMN 673 yüklü KLN, BMN 673'e göre hem boyut olarak daha küçük hem de zeta potansiyel değerlerinden dolayı daha kararlı bir yapıda olduğu belirlenmiştir.

4.17. BMN 673 yüklü KLN'nin Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

BMN 673 yüklü KLN'nin enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi yöntem kısmında verilen formüle göre hesaplandığında, sırasıyla %83-86 ve %45-47.5 olarak belirlendi. Sonuç olarak, sıcak homojenizasyon tekniği ile üretilen KLN formülasyonunun BMN 673 için başarılı bir şekilde üretildiği, yüksek enkapsülasyon ve ilaç yükleme kapasitesine sahip olduğu ve KLN'nin bu avantajlı özelliklerinden dolayı BMN 673'ü kontrollü salınım yapma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.18. İlaç Salınımının Belirlenmesi

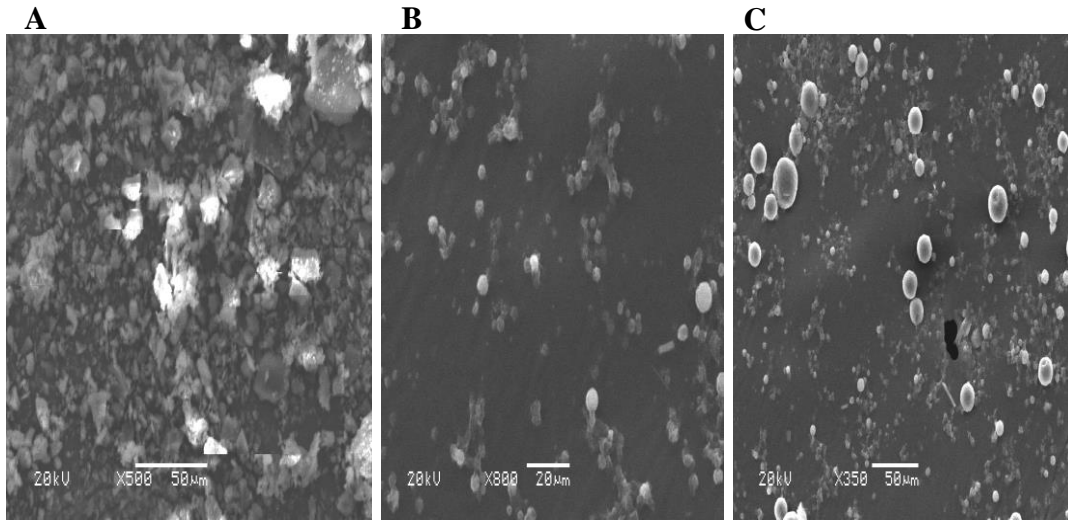
Belirlenen zaman aralıklarının sonunda UV spektroskopide ortama salınan BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin miktarı BMN 673'ün kalibrasyon doğru denkleminin kullanılması ile hesaplanarak elde edilen değerler % olarak Şekil 112'de sunuldu. BMN 673'ün 2. günde %19.6'sının salındığı belirlenmesine rağmen, 10. günden itibaren %50 civarında ortama salındığı belirlendi. BMN 673-KLN'nin ise 2. günde %24.3 salınım yaptığı analiz edilmesine rağmen, 4. günde ani salınım yaparak bu süreden itibaren kontrollü ilaç salınımı sağladığı ve 14. günde %88.3 oranında BMN 673'ü ortama saldığı analiz edildi (Şekil 112). Sonuç olarak, 14 günde BMN 673-KLN'nin yaklaşık %90 salınım olmasına rağmen, BMN 673'ün %50 civarında miktarının bu sürede salındığı belirlenmiştir. BMN 673-KLN'nin özellikle 4. günden itibaren ani salınımını sürdürülebilir salınım takip ettiği ve bu nedenle, KLN formülasyonu BMN 673'ün kontrollü ilaç salınımı sağlayarak BMN 673'ün salım süresinin kısalttığı belirlenmiştir (Şekil 112).



Şekil 112. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin zamana bağlı salım grafiği (pH 6,8, 37°C).

4.19. Yüzey morfolojisinin SEM ile görüntülenmesi

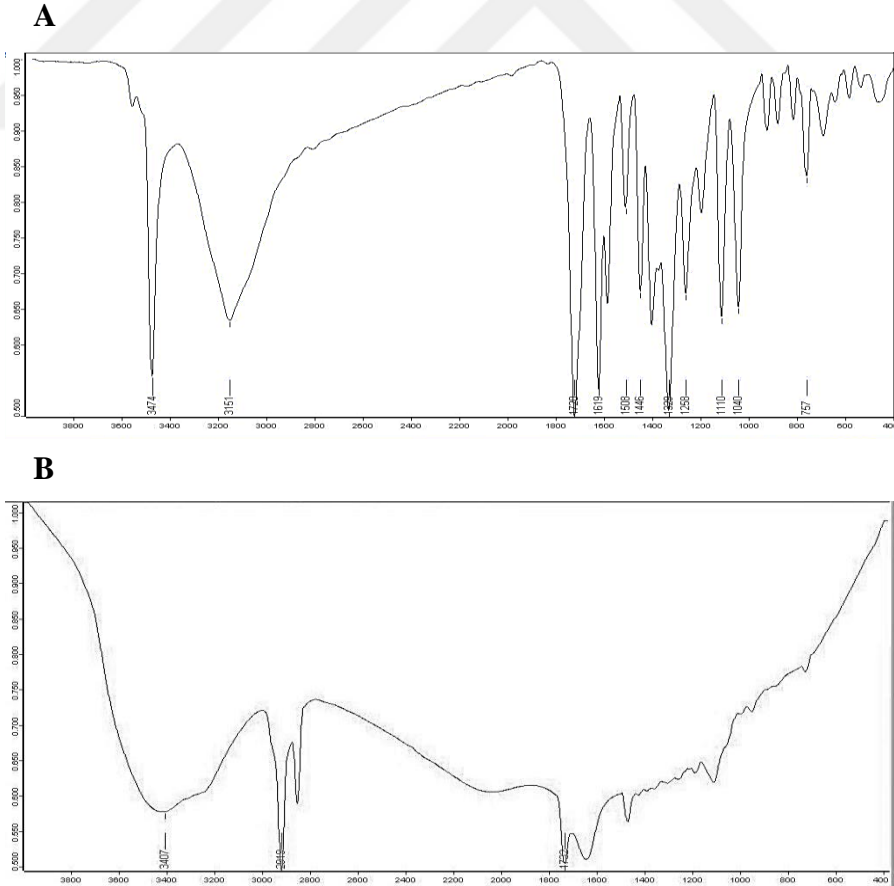
BMN 673, BMN 673-KLN ve boş KLN'nin yüzey morfolojilerinin SEM analizi ile incelenmesi sonucunda, BMN 673 köşeli bir yapıda görüntülenmesine rağmen, BMN 673-KLN ve boş KLN'nin yuvarlak bir yapıda olduğu ve boş KLN'nin BMN 673-KLN'ye göre daha küresel bir şekle ve daha büyük boyuta sahip olduğu görüntülendi (Şekil 113). Sonuç olarak, BMN 673'ün köşeli yapısının gözlemlenmemesi ve KLN formülasyonunun yuvarlak yapısı sayesinde BMN 673'ün partikül boyutunun azaldığı görüntülenmiştir ve bu nedenle BMN 673, BMN 673-KLN ve boş KLN için Nano Zeta Sizer ile elde edilen veriler SEM analizi ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 113. SEM görüntüleri (A) BMN 673, (B) BMN 673-KLN ve (C) boş KLN

4.20. FT-IR Spektrumları

BMN 673 ve BMN 673-KLN'ye ait FT-IR spektrumları Şekil 114'de sunuldu. BMN 673-KLN'nin yapısında lipid olarak kullanılan GMS ve yardımcı yüzey etken madde olarak kullanılan Tween 80'nin BMN 673'ü kaplamasından dolayı, BMN 673-KLN'nin FT-IR spekturumunda BMN 673'ün kimyasal yapısında karakteristik yapıda olan N-H ve C-H piklerinin bazılarının kaybolduğu analiz edildi (Şekil 114). Ancak, FT-IR analizleri için BMN 673-KLN liyofilize edilmesine rağmen, KLN formülasyonunun sıvı fazda olmasından dolayı spektrumda belirlenen yayvan OH pikinin suya ait olduğu belirlendi. Sonuç olarak, BMN 673'ün karakteristik yapısında bulunan N-H ve C-H piklerinin BMN 673-KLN'de bulunmaması, KLN formülasyonunun BMN 673'ü lipid yapısının içinde hapsettiğini göstermektedir. Ayrıca, BMN 673'ün sahip olduğu karakteristik piklerinin dışında herhangi bir pikin BMN 673-KLN spektrumunda gözlemlenmemesi, lipid ve etken madde arasında herhangi bir uyumsuzluğun olmadığını göstermektedir.



Şekil 114. FT-IR spektrumları (A) BMN 673 ve (B) BMN 673-KLN

4.21. NMR Spektrumları

KLN formülasyonunda kullanılan etken madde ile lipid arasındaki herhangi bir fiziksel veya kimyasal etkileşimin veya türünün belirlenmesi amacıyla NMR analizi gerçekleştirilerek, BMN 673 ve BMN 673-KLN'ye ait elde edilen NMR spektrumları Şekil 115'te sunuldu.

BMN 673-KLN'nin NMR spektrumu BMN 673'ün spektrumu ile karşılaştırıldığında incelenen bağlara ait piklerde önemli bir kayma gözlemlenmedi. Ayrıca, BMN 673'ün NMR spektrumunda belirlenen pikler, KLN formülasyonunda lipid olarak kullanılan GMS'nin BMN 673'ü elektronegatif bölgelerinden dolayı tamamen hapsedmesinden dolayı gözlemlenmedi. Ayrıca, BMN 673-KLN'nin proton süresi üzerinden durulma süresi ölçümü yapıldığında BMN 673'ün proton atomlarının milisaniye (ms) mertebesinde azaldığı belirlendi. Bu nedenle, BMN 673'ün N-H bölgelerine ve dolaylı olarak proton atomları üzerine kullanılan lipidin ve yardımcı yüzey aktif maddenin bağlandığı ve bu bağlanma sonucunda da atomların durulma sürelerinde bir değişiklik meydana getirdiği gözlemlendi. Sonuç olarak, elde edilen KLN formülasyonunda herhangi bir agregat ürünü oluşmadığı için kararlı bir yapıya sahip olduğu ve lipid ile etken madde arasında herhangi bir uyumsuzluk olmadığı için BMN 673'ün GMS ile bağlanarak lipid yapıya hapsediği belirlenmiştir.



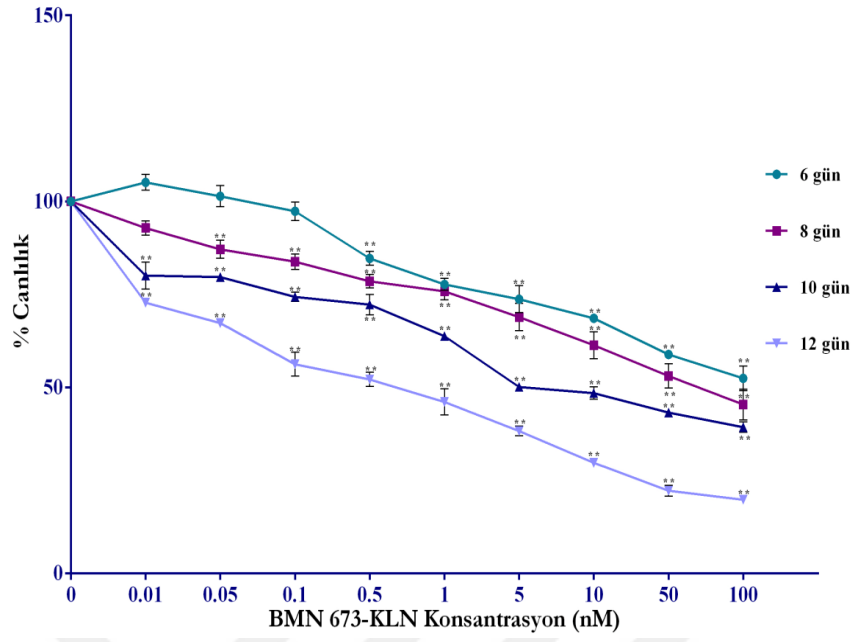
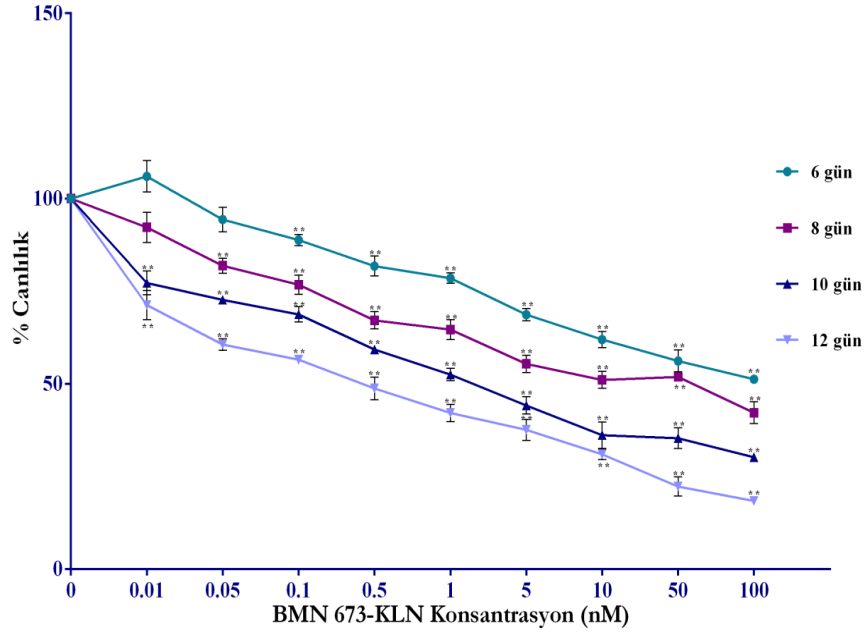
Şekil 115. ¹H NMR spektrumları. (A) BMN 673 ve (B) BMN 673-KLN.

4.22. BMN 673 yüklü KLN'nin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN ve boş KLN formülasyonlarının HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi hem doza hem de zamana bağlı olarak WST-1 analizi ile değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 116-118'de sunuldu.

BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde 6 güne kadar herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemesine rağmen, BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde 3. günden itibaren yüksek konsantrasyonlarda (10, 50 ve 100 nM) canlılık oranlarında azalma (%74.4, %53.2 ve %49.7) saptanmıştır. Ayrıca 3. günden itibaren yüksek konsantrasyonlarda (10, 50 ve 100 nM) HCC1937-R hücrelerinde de canlılık oranlarının azalma olduğu (%85.0, %83.2 ve %79.8) ve bu nedenle, BMN 673-KLN'nin ilaç direncinin aşılmasında etkili olduğu belirlendi. Ancak ilacın etkin dozunun ve IC₅₀ değerinin düşük konsantrasyonlarda sağlanabilmesi ve minimum dozda daha fazla etkinin elde edilebilmesi amacıyla deneyler, BMN 673 için yapılan deneylere paralel olarak 6, 8, 10 ve 12. günlerde gerçekleştirildi.

HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde; 96'lı plakaların her bir kuyu başına 1000 (Şekil 116_(A)) ve 2000 hücre (Şekil 116_(B)) ekilen deneyde, 6. günde minimum doz (0.01 nM) uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %105.1 ve %106.0 iken, maksimum doz (100 nM) uygulandığında canlılık oranlarının sırasıyla %52.5 ve %56.2'ye düştüğü belirlendi (p<0.01). 6 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı (F_(9, 20)= 210.118; F_(9, 20)= 185.112, p<0.01) (Tablo 52). 12. günde ise, 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde canlılık oranları 1000 ve 2000 hücre için sırasıyla %72.8 ve %71.3 iken, 100 nM BMN 673 uygulandığında canlılık oranlarının sırasıyla %19.8 ve %18.4'e düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu analiz edildi (F_(9, 20)= 559.697; F_(9, 20)= 354.440, p<0.01). HCC1937 hücrelerinde uygulanan BMN 673-KLN'nin doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 53'de özetlendi. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde, BMN 673-KLN'nin IC₅₀ konsantrasyonu 1000 ve 2000 hücre için sırasıyla 0.70±0.03 ve 0.40±0.04 nM olarak hesaplandı ve BMN 673-KLN'nin IC₅₀ konsantrasyonunun BMN 673'e göre daha düşük olduğu belirlendi.

A**B**

Şekil 116. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

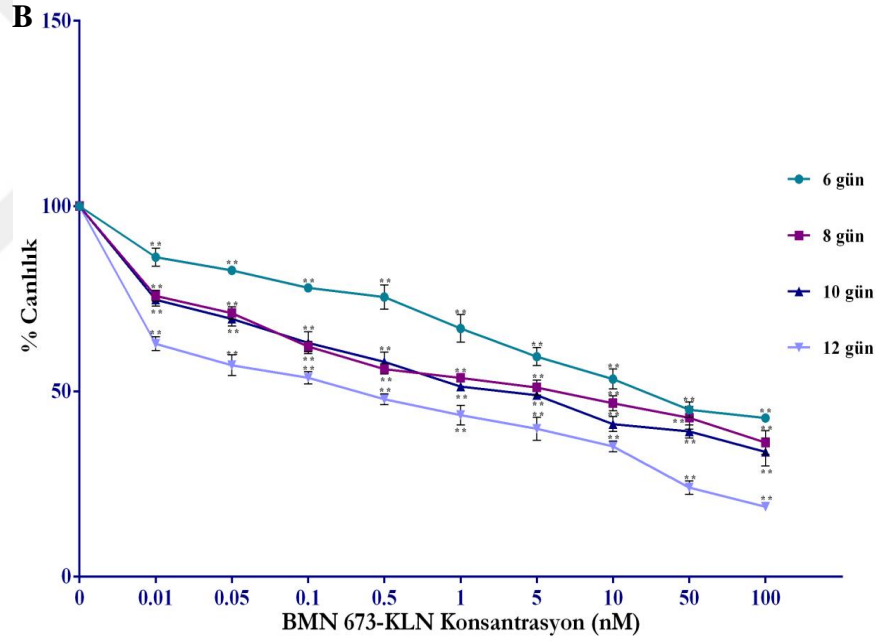
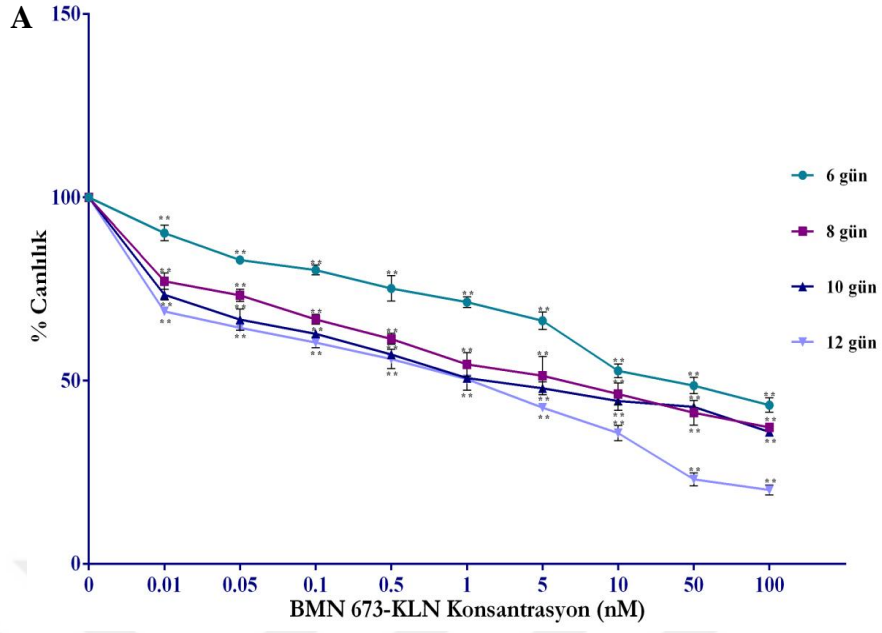
Tablo 52. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	9458.362	9	1050.929		
		Grup içi	100.032	20	5.002	210.118	.000
		Toplam	9558.394	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	8280.808	9	920.090		
		Grup içi	152.912	20	7.646	120.342	.000
		Toplam	8433.720	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	10304.253	9	1144.917		
		Grup içi	61.131	20	3.057	374.581	.000
		Toplam	10365.384	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	16824.099	9	1869.344		
		Grup içi	66.798	20	3.340	559.697	.000
		Toplam	16890.897	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	9591.257	9	1065.695		
		Grup içi	115.140	20	5.757	185.112	.000
		Toplam	9706.397	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	9791.042	9	1087.894		
		Grup içi	119.571	20	5.979	181.966	.000
		Toplam	9910.613	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	13354.261	9	1483.807		
		Grup içi	91.082	20	4.554	325.819	.000
		Toplam	13445.342	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	16327.129	9	1814.125		
		Grup içi	102.366	20	5.118	354.440	.000
		Toplam	16429.495	29			

Tablo 53. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE			
	Konsantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p
6. GÜN	0.01	105.12	2.09	-5.12824	.199	105.99	4.25	-5.99925	.127
	0.05	101.38	2.84	-1.38319	.999	94.34	3.31	5.65475	.174
	0.1	97.34	2.50	2.65472	.895	88.82	1.49	11.17044	.000
	0.5	84.70	1.81	15.29936	.000	81.76	2.67	18.23163	.000
	1	77.69	1.61	22.30123	.000	78.53	1.41	21.46102	.000
	5	73.68	3.62	26.31096	.000	68.68	1.65	31.31594	.000
	10	68.56	1.00	31.43955	.000	61.97	2.17	38.02661	.000
	50	58.87	.55	41.12210	.000	56.19	2.99	43.80829	.000
	100	52.46	3.30	47.53929	.000	51.22	.78	48.77060	.000
8. GÜN	0.01	92.82	1.91	7.17486	.102	92.24	4.07	7.75732	.024
	0.05	87.12	2.40	12.87776	.000	81.86	2.01	18.13734	.000
	0.1	83.77	2.02	16.22217	.000	76.75	2.58	23.24479	.000
	0.5	78.54	1.85	21.45578	.000	67.13	2.30	32.86352	.000
	1	75.80	2.25	24.19332	.000	64.62	2.69	35.37337	.000
	5	68.89	3.66	31.10422	.000	55.37	2.31	44.62636	.000
	10	61.32	3.64	38.67517	.000	51.05	2.24	48.94665	.000
	50	53.07	3.23	46.92925	.000	51.89	.91	48.10764	.000
	100	45.39	4.15	54.60074	.000	42.19	2.92	57.80572	.000
10. GÜN	0.01	80.05	3.60	19.94656	.000	77.22	3.22	22.77553	.000
	0.05	79.65	.92	20.34884	.000	72.67	.56	27.33000	.000
	0.1	74.31	1.23	25.69004	.000	68.75	2.09	31.24500	.000
	0.5	72.25	2.71	27.74841	.000	59.25	1.18	40.74285	.000
	1	63.74	1.13	36.25206	.000	52.51	1.65	47.48219	.000
	5	50.12	.87	49.87667	.000	44.18	2.29	55.81958	.000
	10	48.47	1.64	51.52102	.000	36.11	3.61	63.88402	.000
	50	43.24	1.03	56.76000	.000	35.31	2.79	64.68614	.000
	100	39.30	1.40	60.69121	.000	30.21	.34	69.78818	.000
12. GÜN	0.01	72.76	.70	27.23446	.000	71.26	3.94	28.73889	.000
	0.05	67.30	.67	32.69309	.000	60.62	1.53	39.37756	.000
	0.1	56.19	3.20	43.80071	.000	56.50	1.05	43.49188	.000
	0.5	52.14	1.92	47.85130	.000	48.77	3.05	51.22253	.000
	1	46.07	3.54	53.92132	.000	42.13	2.32	57.86945	.000
	5	38.26	1.30	61.73747	.000	37.57	2.80	62.42654	.000
	10	29.73	1.17	70.26478	.000	30.97	1.38	69.02916	.000
	50	22.22	1.47	77.77667	.000	22.28	2.56	77.71214	.000
	100	19.77	.84	80.23000	.000	18.37	1.00	81.63000	.000

BMN 673'e karşı direnç kazanan HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin sitotoksik etkisi incelendiğinde, 96'lı plakaların her bir kuyu başına başına 1000 (Şekil 117(A)) ve 2000 hücre (Şekil 117(B)) ekilen deneyde, 6. günde minimum doz (0.01 nM) uygulanan hücrelerde canlılık oranı sırasıyla, %90.3 ve %86.3 olarak belirlenmesine rağmen, 100 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde canlılık oranının %43.4 ve %45 düştüğü ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($F_{(9, 20)}= 259.568$; $F_{(9, 20)}= 212.477$, $p<0.01$) (Tablo 54). 12. günde ise, minimum dozda canlılık oranlarının 1000 ve 2000 hücre için sırasıyla %69.0 ve %62.9 iken, maksimum dozda ise bu oranlarının %20.2 ve %19.0'e düşerek canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($F(9, 20)= 536.772$; $F(9, 20)= 398.897$, $p<0.01$). HCC1937-R hücrelerinde uygulanan BMN 673-KLN'nin doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 55'de özetlendi. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673-KLN'nin IC_{50} konsantrasyonu 1000 ve 2000 hücre için sırasıyla 1.07 ± 0.30 ve 0.45 ± 0.03 nM olarak hesaplandı. Ancak BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde maksimum konsantrasyonda bile hücrelerde canlılık oranı %50'ye düşmediği için KLN formülasyonunun BMN 673'e karşı gelişen direncin aşılmasında potansiyel sitotoksik etkisi belirlendi.



Şekil 117. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

Tablo 54. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

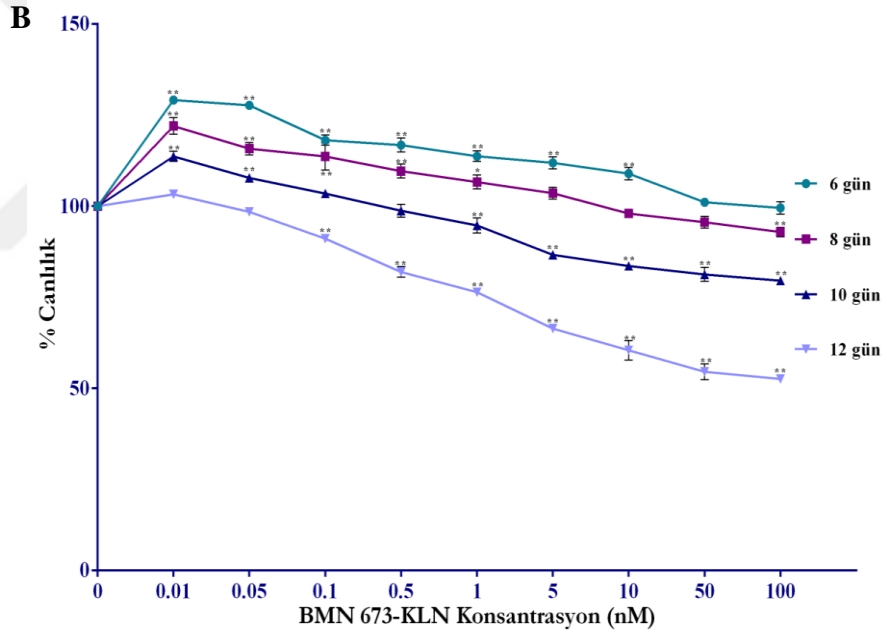
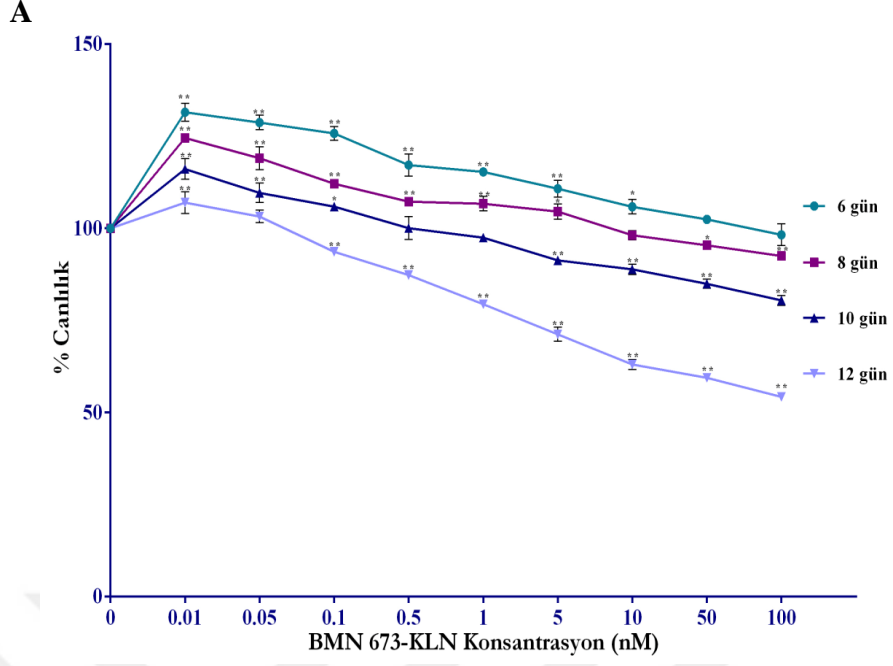
		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	9230.196	9	1025.577		
		Grup içi	79.022	20	3.951	259.568	.000
		Toplam	9309.218	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	9803.019	9	1089.224		
		Grup içi	139.900	20	6.995	155.715	.000
		Toplam	9942.919	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	9450.901	9	1050.100		
		Grup içi	48.821	20	2.441	430.184	.000
		Toplam	9499.722	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	15099.447	9	1677.716		
		Grup içi	62.511	20	3.126	536.772	.000
		Toplam	15161.958	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	9496.342	9	1055.149		
		Grup içi	99.319	20	4.966	212.477	.000
		Toplam	9595.660	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	9444.367	9	1049.374		
		Grup içi	73.795	20	3.690	284.404	.000
		Toplam	9518.162	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	10680.799	9	1186.755		
		Grup içi	90.399	20	4.520	262.559	.000
		Toplam	10771.198	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	14137.893	9	1570.877		
		Grup içi	78.761	20	3.938	398.897	.000
		Toplam	14216.654	29			

Tablo 55. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE			
	Konsantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p
6. GÜN	0.01	90.26	2.10	9.73384	.000	86.2263	2.43171	13.77373	.000
	0.05	82.93	1.15	17.06986	.000	82.6783	.57971	17.32171	.000
	0.1	80.18	1.31	19.81197	.000	77.9303	.80556	22.06973	.000
	0.5	75.15	3.47	24.84292	.000	75.4806	3.26119	24.51944	.000
	1	71.41	1.44	28.58422	.000	67.0057	3.69067	32.99431	.000
	5	66.33	2.33	33.66509	.000	59.3985	2.40618	40.60148	.000
	10	52.67	1.85	47.32566	.000	53.3401	2.69500	46.65986	.000
	50	48.66	2.24	51.33084	.000	45.0601	2.03982	54.93988	.000
	100	43.35	1.98	56.64388	.000	42.8400	1.13635	57.16000	.000
8. GÜN	0.01	77.12	2.21	22.87958	.000	75.7675	1.43996	24.23248	.000
	0.05	73.28	1.66	26.71045	.000	71.1444	1.67480	28.85560	.000
	0.1	66.71	1.35	33.28461	.000	62.1013	1.41289	37.89866	.000
	0.5	61.39	1.50	38.60117	.000	56.0345	1.36281	43.96552	.000
	1	54.43	3.22	45.56408	.000	53.6284	.71939	46.37161	.000
	5	51.35	5.23	48.64397	.000	51.0237	2.01265	48.97627	.000
	10	46.40	2.99	53.59008	.000	46.7786	2.03533	53.22144	.000
	50	41.23	3.33	58.76016	.000	42.8633	3.02863	57.13672	.000
	100	37.26	.54	62.73983	.000	36.1771	3.20655	63.82295	.000
10. GÜN	0.01	73.46	1.48	26.53307	.000	74.7457	1.72151	25.25433	.000
	0.05	66.66	2.92	33.33917	.000	69.5478	1.87679	30.45219	.000
	0.1	62.77	.89	37.22556	.000	63.0942	2.95611	36.90584	.000
	0.5	57.12	1.06	42.87258	.000	57.9579	2.60366	42.04214	.000
	1	50.73	1.10	49.26254	.000	51.3200	1.00732	48.68000	.000
	5	47.92	1.77	52.07991	.000	48.9697	.90631	51.03025	.000
	10	44.45	2.53	55.54166	.000	41.1561	1.99914	58.84388	.000
	50	42.86	.76	57.13152	.000	39.1810	1.73454	60.81896	.000
	100	36.04	.55	63.96000	.000	33.6582	3.78876	66.34176	.000
12. GÜN	0.01	68.92	1.16	31.08000	.000	62.8514	1.89388	37.14862	.000
	0.05	64.43	1.03	35.56333	.000	57.0613	2.82083	42.93873	.000
	0.1	60.42	1.42	39.57333	.000	53.6833	1.64537	46.31667	.000
	0.5	55.90	2.64	44.09174	.000	47.8745	1.44696	52.12553	.000
	1	50.40	3.03	49.59512	.000	43.5687	2.65136	56.43130	.000
	5	42.65	1.11	57.34743	.000	39.9002	3.09703	60.09976	.000
	10	35.70	2.10	64.29149	.000	35.1524	1.43430	64.84761	.000
	50	23.10	1.75	76.89527	.000	24.0272	1.78296	75.97283	.000
	100	20.18	1.36	79.81112	.000	18.8533	1.08546	81.14667	.000

BMN 673 yüklü KLN'nin MCF-10A kontrol hücrelerinde sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde ise, HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde belirlenen etkinin aksine 6. güne kadar herhangi bir sitotoksik etki saptanmamıştır. 6.günden itibaren

gerçekleştirilen deneylerde, 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan ve her kuyu başına 500 (Şekil 118_(A)) ve 1000 hücre (Şekil 118_(B)) olacak şekilde ekilen deneyde, MCF-10A hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla %131.5 ve %129.0 iken, 100 nM BMN 673-KLN uygulandığında canlılık oranları sırasıyla %98.3 ve %99.5 olarak belirlendi ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu analiz edildi ($F_{(9, 20)} = 107.444$; $F_{(9, 20)} = 191.487$, $p < 0.01$) (Tablo 56). 12. günde ise, 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde canlılık oranları 500 ve 1000 hücre için sırasıyla %107.0 ve %103.0'a ulaşırken, 100 nM BMN 673-KLN uygulandığında bu oranların sırasıyla %54.3 ve %52.6'e düşerek canlılık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($F_{(9, 20)} = 511.586$; $F_{(9, 20)} = 572.995$, $p < 0.01$). MCF-10A hücrelerinde uygulanan BMN 673-KLN'nin doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 57'de özetlendi. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde, BMN 673-KLN'nin IC₅₀ konsantrasyonu 500 ve 1000 hücre için sırasıyla 142.0 ± 5.10 ve 129.4 ± 6.37 nM olarak hesaplandı ve BMN 673-KLN'nin IC₅₀ konsantrasyonunun BMN 673'e göre daha yüksek olduğu belirlendi.



Şekil 118. Her bir kuyu için (A) 500 ve (B) 1000 hücre olacak şekilde ekilen MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

Tablo 56. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
500 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	3974.383	9	441.598	107.444	.000
		Grup içi	82.201	20	4.110		
		Toplam	4056.584	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	2845.754	9	316.195	142.443	.000
		Grup içi	44.396	20	2.220		
		Toplam	2890.150	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	3413.302	9	379.256	120.829	.000
		Grup içi	62.775	20	3.139		
		Toplam	3476.078	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	9957.379	9	1106.375	511.586	.000
		Grup içi	43.253	20	2.163		
		Toplam	10000.632	29			
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	3078.182	9	342.020	191.487	.000
		Grup içi	35.723	20	1.786		
		Toplam	3113.904	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	2426.015	9	269.557	73.013	.000
		Grup içi	73.838	20	3.692		
		Toplam	2499.852	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	3745.372	9	416.152	247.817	.000
		Grup içi	33.585	20	1.679		
		Toplam	3778.958	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	10091.974	9	1121.330	572.995	.000
		Grup içi	39.139	20	1.957		
		Toplam	10131.113	29			

Tablo 57. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

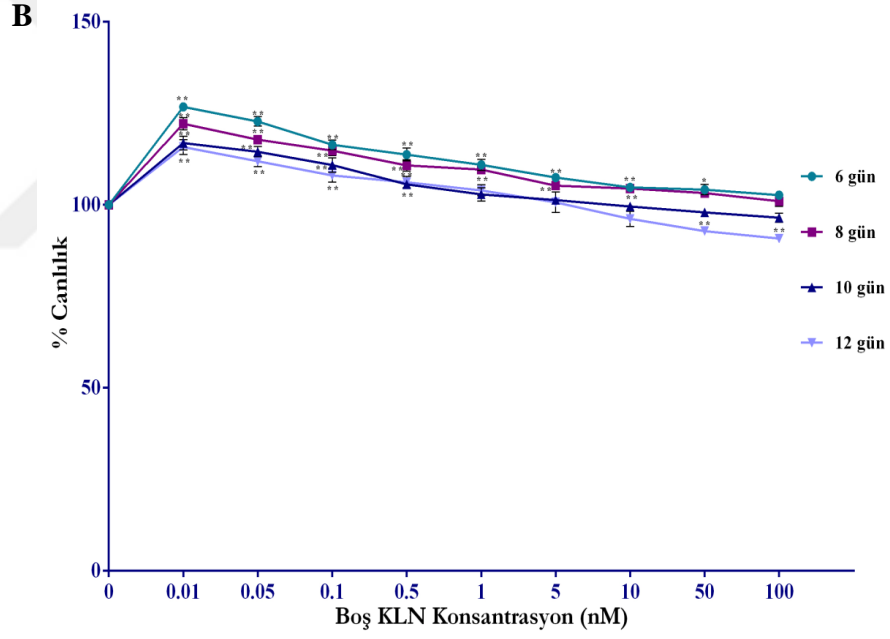
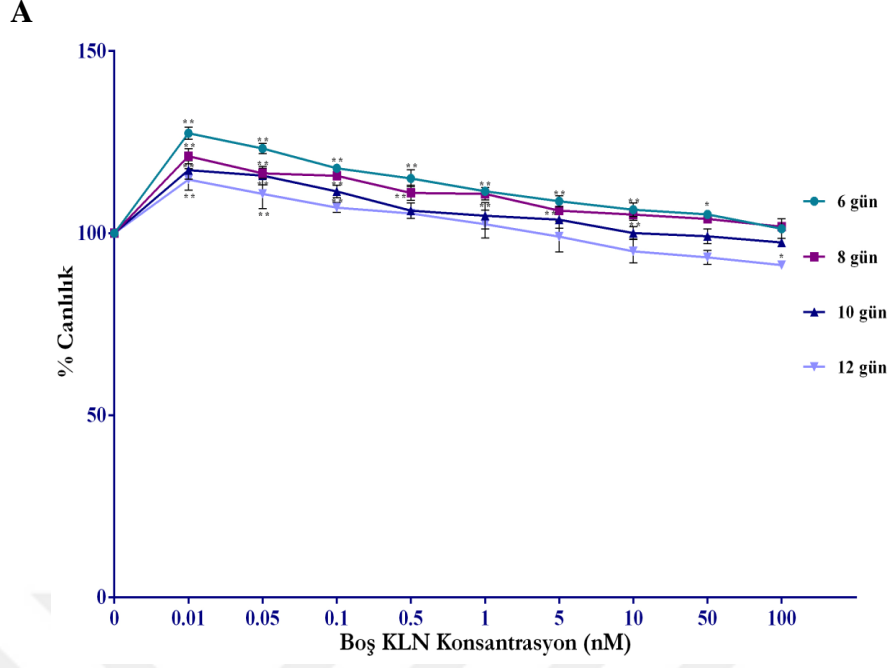
	500 HÜCRE					1000 HÜCRE			
	Konsantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	p
6. GÜN	0.01	131.48	2.43	-31.48393	.000	129.13	.84	-29.13324	.000
	0.05	128.70	1.98	-28.70602	.000	127.66	.84	-27.66437	.000
	0.1	125.75	1.84	-25.75979	.000	118.12	1.37	-18.12024	.000
	0.5	117.16	3.01	-17.16371	.000	116.77	1.93	-16.77931	.000
	1	115.30	.85	-15.30749	.000	113.71	1.41	-13.71725	.000
	5	110.75	2.29	-10.75497	.000	111.88	1.63	-11.88207	.000
	10	105.86	1.96	-5.86039	.050	108.92	1.72	-8.92503	.000
	50	102.43	.42	-2.43680	.888	101.09	.35	-1.09941	.988
	100	98.24	2.93	1.75338	.984	99.49	1.73	.50008	1.000
8. GÜN	0.01	124.54	.61	-24.54235	.000	121.98	2.28	-21.98676	.000
	0.05	119.02	3.13	-19.02419	.000	115.75	1.70	-15.75261	.000
	0.1	112.11	.82	-12.11646	.000	113.63	3.70	-13.63194	.000
	0.5	107.21	.86	-7.21821	.000	109.63	1.88	-9.63038	.000
	1	106.65	1.95	-6.65752	.001	106.63	1.89	-6.63810	.012
	5	104.52	2.10	-4.52262	.035	103.55	1.60	-3.55871	.447
	10	98.13	1.23	1.86920	.862	97.98	.90	2.01486	.946
	50	95.36	.51	4.63466	.029	95.57	1.64	4.42772	.194
	100	92.48	.70	7.51320	.000	92.89	1.32	7.10593	.006
10. GÜN	0.01	116.10	2.83	-16.10364	.000	113.67	1.38	-13.67083	.000
	0.05	109.62	2.62	-9.62972	.000	107.74	.96	-7.74219	.000
	0.1	105.87	.17	-5.87436	.017	103.48	.96	-3.48000	.082
	0.5	100.06	3.06	-.06133	1.000	98.72	1.78	1.27591	.963
	1	97.45	.67	2.54270	.752	94.71	2.07	5.28455	.002
	5	91.31	1.10	8.68333	.000	86.64	.58	13.35540	.000
	10	88.85	1.40	11.14274	.000	83.56	.92	16.43163	.000
	50	84.93	1.26	15.06040	.000	81.28	1.86	18.71834	.000
	100	80.44	1.34	19.55624	.000	79.57	.92	20.42667	.000
12. GÜN	0.01	106.95	2.94	-6.95071	.000	103.25	.93	-3.25513	.185
	0.05	103.21	1.69	-3.21771	.246	98.44	.71	1.55285	.926
	0.1	93.60	.48	6.39667	.001	91.08	.97	8.91290	.000
	0.5	87.29	1.14	12.70920	.000	81.93	1.42	18.06281	.000
	1	79.38	.99	20.61618	.000	76.38	1.08	23.61667	.000
	5	71.23	1.89	28.76288	.000	66.41	1.15	33.58333	.000
	10	63.05	1.34	36.94085	.000	60.47	2.68	39.53002	.000
	50	59.41	.96	40.58294	.000	54.56	2.16	45.43732	.000
	100	54.27	1.11	45.72333	.000	52.57	.90	47.42729	.000

Sonuç olarak, HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN, hem doza hem de zamana bağlı olarak anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.01$). BMN 673-KLN'nin, HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik terapötik etkisini

arttırarak BMN 673'e göre daha etkili olduğu ve aynı zamanda MCF-10A kontrol hücrelerinde BMN 673'ün toksik etkisini azalttığı tespit edildi. Ayrıca, 6 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanması ile elde edilen HCC1937-R hücrelerinde de, BMN 673-KLN formülasyonunun BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkiye sahip olduğu belirlendi.

BMN 673 yüklü KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde etkisi belirlenmesine paralel olarak aynı zamanda saptanan etkinin KLN formülasyonunun bileşenlerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi amacıyla üretilen BMN 673 içermeyen boş KLN formülasyonunun HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 119-121'de sunuldu.

HCC1937 hücrelerinde boş KLN'nin etkisi incelendiğinde, 6 gün boyunca 100 nM boş KLN uygulanan ve her kuyu başına 1000 (Şekil 119_(A)) ve 2000 (Şekil 119_(B)) hücre olacak şekilde ekilen deneyde, hücrelerin canlılık oranları sırasıyla %101.3 ve %102.7 iken, 12. günün sonunda bu oranlar sırasıyla %91.3 ve %90.8 olarak saptandı ve bu değişimlerin istatistiksel olarak 6. gün ($F(9, 20) = 100.413$; $F(9, 20) = 163.156$, $p < 0.01$) ve 12. günde ($F(9, 20) = 23.461$; $F(9, 20) = 69.620$, $p < 0.01$) anlamlı olduğu analiz edildi (Tablo 58). HCC1937 hücrelerinde uygulanan boş KLN'nin doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 59'da özetlendi.



Şekil 119. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937 hücrelerinde boş KLN'nin sitotoksik etkisi (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Tablo 58. Boş KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

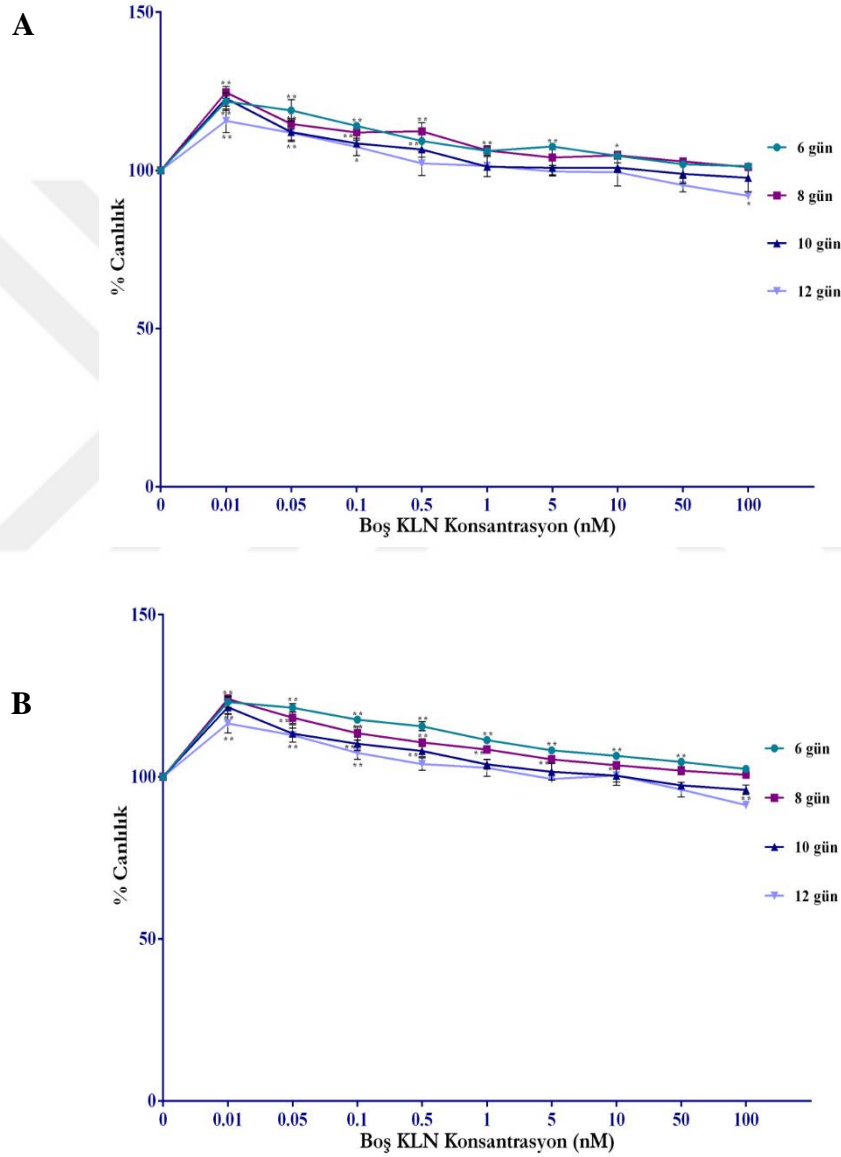
		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	2271.364	9	252.374	100.413	.000
		Grup içi	50.267	20	2.513		
		Toplam	2321.631	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1312.759	9	145.862	77.714	.000
		Grup içi	37.538	20	1.877		
		Toplam	1350.297	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	1352.785	9	150.309	32.258	.000
		Grup içi	93.193	20	4.660		
		Toplam	1445.978	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	1586.209	9	176.245	23.461	.000
		Grup içi	150.245	20	7.512		
		Toplam	1736.454	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	2135.743	9	237.305	163.156	.000
		Grup içi	29.089	20	1.454		
		Toplam	2164.832	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1500.089	9	166.677	117.357	.000
		Grup içi	28.405	20	1.420		
		Toplam	1528.494	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	1380.646	9	153.405	88.300	.000
		Grup içi	34.746	20	1.737		
		Toplam	1415.392	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	1774.104	9	197.123	69.620	.000
		Grup içi	56.628	20	2.831		
		Toplam	1830.732	29			

Tablo 59. Boş KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE				
	Konsantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	
6. GÜN	0.01	127.46	1.65	-27.46427	.000	126.73	.96	-26.73333	.000	
	0.05	123.28	1.38	-23.28089	.000	122.74	1.30	-22.74770	.000	
	0.1	117.86	.35	-17.86661	.000	116.38	1.26	-16.38000	.000	
	0.5	115.06	2.29	-15.06193	.000	113.72	1.72	-13.72434	.000	
	1	111.53	1.00	-11.53333	.000	110.88	1.46	-10.88333	.000	
	5	108.76	1.52	-8.76807	.000	107.43	.84	-7.43333	.000	
	10	106.43	1.82	-6.43374	.002	104.76	1.11	-4.76041	.003	
	50	105.15	1.03	-5.15770	.020	104.13	1.41	-4.13025	.013	
	100	101.25	2.70	-1.25413	.991	102.62	1.10	-2.62294	.252	
	8. GÜN	0.01	121.14	2.09	-21.14412	.000	122.12	1.68	-22.12000	.000
0.05		116.42	1.33	-16.42951	.000	117.77	1.03	-17.77392	.000	
0.1		115.78	.97	-15.78526	.000	114.80	1.41	-14.80318	.000	
0.5		111.08	2.06	-11.08073	.000	110.74	1.53	-10.74333	.000	
1		110.83	1.70	-10.83105	.000	109.61	1.12	-9.61439	.000	
5		106.22	1.04	-6.22013	.001	105.22	1.15	-5.22251	.001	
10		105.09	1.56	-5.09720	.006	104.44	1.04	-4.44740	.006	
50		103.90	.87	-3.90000	.056	103.22	.35	-3.22000	.079	
100		101.80	.38	-1.80667	.826	100.96	1.45	-9.6667	.989	
10. GÜN		0.01	117.33	2.50	-17.33711	.000	116.86	1.84	-16.86285	.000
	0.05	115.80	2.49	-15.80587	.000	114.49	1.40	-14.49135	.000	
	0.1	111.47	1.67	-11.47572	.000	110.83	2.00	-10.83443	.000	
	0.5	106.18	2.13	-6.18000	.054	105.55	1.12	-5.55667	.002	
	1	104.78	3.64	-4.78022	.233	102.83	1.81	-2.83893	.263	
	5	103.71	2.37	-3.71150	.544	101.30	.96	-1.30333	.962	
	10	100.06	1.69	-.06784	1.000	99.50	.81	-.49399	1.000	
	50	99.14	2.04	.85667	1.000	97.91	.47	2.08667	.646	
	100	97.46	.85	2.53983	.899	96.44	1.25	3.55058	.081	
	12. GÜN	0.01	114.73	2.94	-14.73373	.000	115.75	2.01	-15.75248	.000
0.05		110.82	4.08	-10.82408	.003	111.87	1.46	-11.87137	.000	
0.1		107.02	1.35	-7.02667	.110	108.02	1.83	-8.02667	.000	
0.5		105.43	1.10	-5.43000	.361	106.16	1.53	-6.16333	.007	
1		102.47	3.84	-2.47213	.978	103.91	1.51	-3.91185	.186	
5		99.03	4.22	-.96183	1.000	100.66	2.81	-.66875	1.000	
10		95.01	3.18	4.98223	.472	96.14	2.08	3.85557	.199	
50		93.34	1.87	6.65631	.149	92.78	1.07	7.21048	.001	
100		91.27	.56	8.72772	.024	90.76	.82	9.23833	.000	

HCC1937-R hücrelerinde boş KLN'nin etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 100 nM boş KLN uygulanan ve her kuyu başına 1000 (Şekil 120_(A)) ve 2000 hücre (Şekil 120_(B)) olacak şekilde ekilen deneyde, hücrelerde canlılık oranları sırasıyla %101.4 ve

%102.5 olarak belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda canlılık oranları sırasıyla %92 ve %92.2 analiz edildi ($p<0.01$) ve belirlenen değişimlerin istatistiksel olarak 6. günde ($F(9, 20)= 71.243$; $F(9, 20)= 176.149$, $p<0.01$) ve 12. günde ($F(9, 20)= 22.290$; $F(9, 20)= 38.064$, $p<0.01$) anlamlı olduğu tespit edildi (Tablo 60). HCC1937-R hücrelerinde uygulanan boş KLN'nin doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 61'de özetlendi.



Şekil 120. Her bir kuyu için (A) 1000 ve (B) 2000 hücre olacak şekilde ekilen HCC1937-R hücrelerinde boş KLN'nin sitotoksik etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$)

Tablo 60. Boş KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

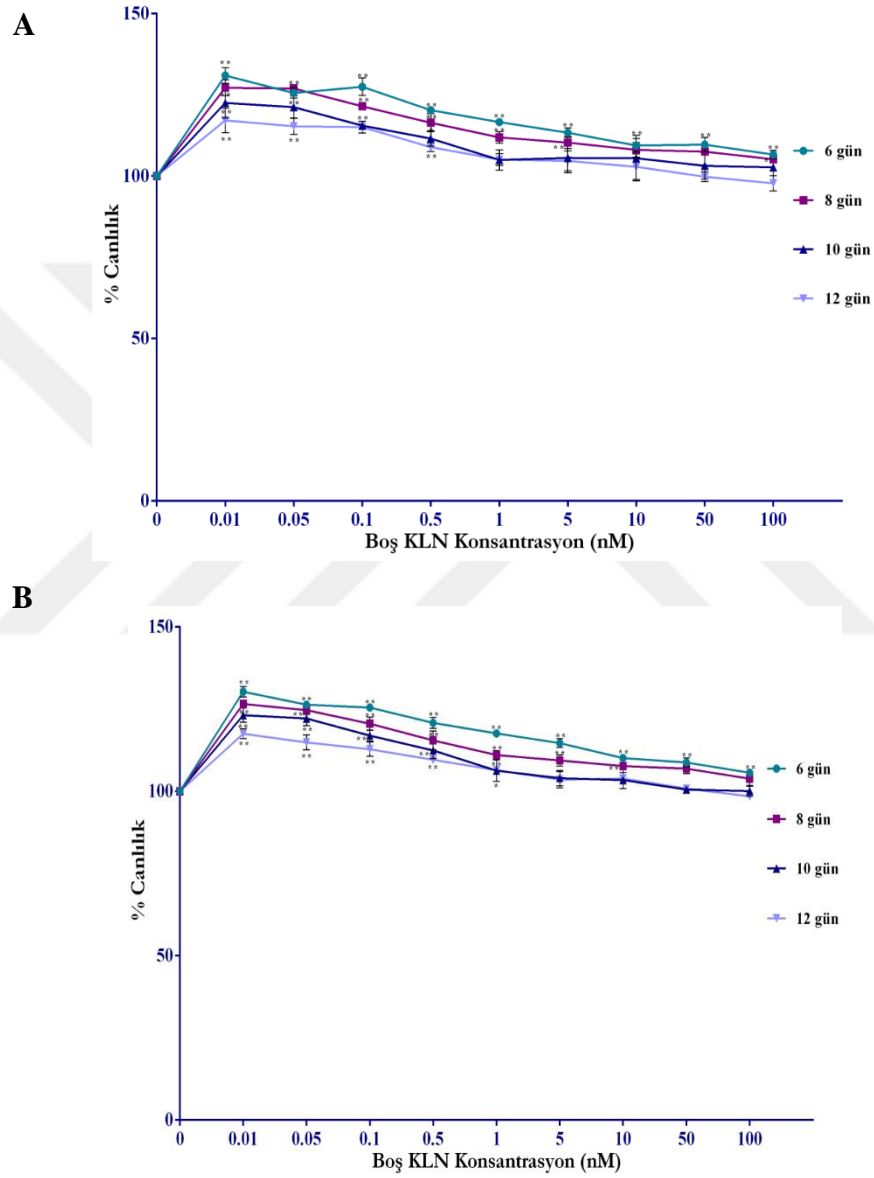
		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1514.654	9	168.295	71.243	.000
		Grup içi	47.245	20	2.362		
		Toplam	1561.899	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1575.308	9	175.034	59.854	.000
		Grup içi	58.487	20	2.924		
		Toplam	1633.795	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	1638.675	9	182.075	28.138	.000
		Grup içi	129.416	20	6.471		
		Toplam	1768.091	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	1416.327	9	157.370	22.290	.000
		Grup içi	141.201	20	7.060		
		Toplam	1557.528	29			
2000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	1742.606	9	193.623	176.149	.000
		Grup içi	21.984	20	1.099		
		Toplam	1764.590	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	1725.603	9	191.734	133.383	.000
		Grup içi	28.749	20	1.437		
		Toplam	1754.352	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	1727.168	9	191.908	55.094	.000
		Grup içi	69.666	20	3.483		
		Toplam	1796.833	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	1540.066	9	171.118	38.064	.000
		Grup içi	89.910	20	4.496		
		Toplam	1629.977	29			

Tablo 61. Boş KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

	1000 HÜCRE					2000 HÜCRE				
	Konsantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	
6. GÜN	0.01	121.75	2.75	-21.75628	.000	123.08	1.68	-23.08902	.000	
	0.05	118.95	3.45	-18.95990	.000	121.29	1.31	-21.29242	.000	
	0.1	114.07	.71	-14.07104	.000	117.63	1.03	-17.63333	.000	
	0.5	109.31	.47	-9.31667	.000	115.54	1.40	-15.54959	.000	
	1	106.13	.87	-6.13333	.003	111.31	.56	-11.31667	.000	
	5	107.53	.65	-7.53053	.000	108.17	.50	-8.17000	.000	
	10	104.61	.88	-4.61858	.038	106.43	1.01	-6.43465	.000	
	50	101.95	1.14	-1.95316	.853	104.61	.88	-4.61858	.001	
100	101.33	.18	-1.33271	.983	102.43	1.00	-2.43000	.189		
8. GÜN	0.01	124.65	1.84	-24.65108	.000	123.98	1.31	-23.98333	.000	
	0.05	114.70	1.54	-14.70718	.000	118.23	1.71	-18.23333	.000	
	0.1	111.99	2.41	-11.99936	.000	113.43	2.10	-13.43333	.000	
	0.5	112.36	2.67	-12.36268	.000	110.57	1.23	-10.57329	.000	
	1	106.29	1.52	-6.29138	.006	108.45	.52	-8.45000	.000	
	5	104.06	2.44	-4.06015	.167	105.36	.97	-5.36813	.001	
	10	104.75	1.26	-4.75781	.065	103.55	.83	-3.55968	.041	
	50	102.81	.33	-2.81667	.598	101.91	1.22	-1.91667	.634	
100	101.02	.68	-1.02000	.999	100.60	.56	-.60000	1.000		
10. GÜN	0.01	122.77	2.50	-22.77748	.000	121.44	2.21	-21.44024	.000	
	0.05	112.10	2.53	-12.10564	.000	113.34	2.70	-13.34466	.000	
	0.1	108.51	1.03	-8.51000	.016	110.20	2.06	-10.20000	.000	
	0.5	106.63	2.43	-6.63385	.099	107.94	1.73	-7.94480	.001	
	1	101.18	3.14	-1.18406	1.000	103.83	1.46	-3.83956	.316	
	5	100.80	2.18	-.80469	1.000	101.53	2.52	-1.53514	.988	
	10	100.88	1.52	-.88333	1.000	100.33	1.96	-.33000	1.000	
	50	98.91	2.99	1.08672	1.000	97.347	.91	2.65278	.761	
100	97.68	4.36	2.31950	.977	95.95	1.45	4.04137	.257		
12. GÜN	0.01	115.64	3.68	-15.64387	.000	116.43	3.00	-16.43685	.000	
	0.05	111.89	2.76	-11.89078	.001	112.88	2.16	-12.88951	.000	
	0.1	107.41	2.69	-7.41831	.064	107.41	2.06	-7.41425	.010	
	0.5	102.21	3.81	-2.21986	.987	103.91	1.94	-3.91896	.450	
	1	101.43	1.17	-1.43333	.999	102.76	2.66	-2.76667	.834	
	5	99.66	1.40	-.33333	1.000	99.33	.85	.66667	1.000	
	10	99.44	4.36	.55269	1.000	100.43	3.09	-.43110	1.000	
	50	95.31	2.12	4.68838	.510	96.04	2.19	3.95667	.438	
100	91.98	.81	8.01122	.037	91.28	.99	8.71356	.002		

MCF-10A hücrelerinde boş KLN'nin etkisi incelendiğinde ise, 6 gün boyunca 100 nM boş KLN uygulanan hücrelerde canlılık oranı 500 (Şekil 121_(A)) ve 1000 hücre (Şekil 121_(B)) için sırasıyla %106.7 ve %105.7 olarak saptanmasına rağmen, 12. günün

sonunda bu oranlar sırasıyla %97.8 ve %98.4 olarak belirlendi ve bu değişimlerin istatistiksel olarak 6. günde ($F(9, 20)= 96.535$; $F(9, 20)= 227.386$, $p<0.01$) ve 12. günde ($F(9, 20)= 24.485$; $F(9, 20)= 41.759$, $p<0.01$) anlamlı olduğu tespit edildi (Tablo 62). MCF-10A hücrelerinde boş KLN'nin doz grupları ile kontrol grubu arasındaki istatistiksel farklılıklar Tablo 63'de özetlendi.



Şekil 121. Her bir kuyu için (A) 500 ve (B) 1000 hücre olacak şekilde ekilen MCF-10A hücrelerinde boş KLN'nin sitotoksik etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$).

Tablo 62. Boş KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde doza bağlı farklılık analizi

		Kareler Toplamı	Sd	Ortalama Kareler	F	p	
500 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	2691.766	9	299.085	96.535	.000
		Grup içi	61.964	20	3.098		
		Toplam	2753.731	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	2308.176	9	256.464	88.294	.000
		Grup içi	58.093	20	2.905		
		Toplam	2366.270	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	1723.617	9	191.513	13.448	.000
		Grup içi	284.816	20	14.241		
		Toplam	2008.434	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	1351.819	9	150.202	24.485	.000
		Grup içi	122.688	20	6.134		
		Toplam	1474.507	29			
1000 HÜCRE	6. GÜN	Gruplar arası	2630.783	9	292.309	227.386	.000
		Grup içi	25.710	20	1.286		
		Toplam	2656.494	29			
	8. GÜN	Gruplar arası	2152.129	9	239.125	78.299	.000
		Grup içi	61.080	20	3.054		
		Toplam	2213.208	29			
	10. GÜN	Gruplar arası	2228.675	9	247.631	62.596	.000
		Grup içi	79.120	20	3.956		
		Toplam	2307.795	29			
	12. GÜN	Gruplar arası	1180.415	9	131.157	41.759	.000
		Grup içi	62.817	20	3.141		
		Toplam	1243.231	29			

Tablo 63. Boş KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde doza bağlı çoklu karşılaştırmalar

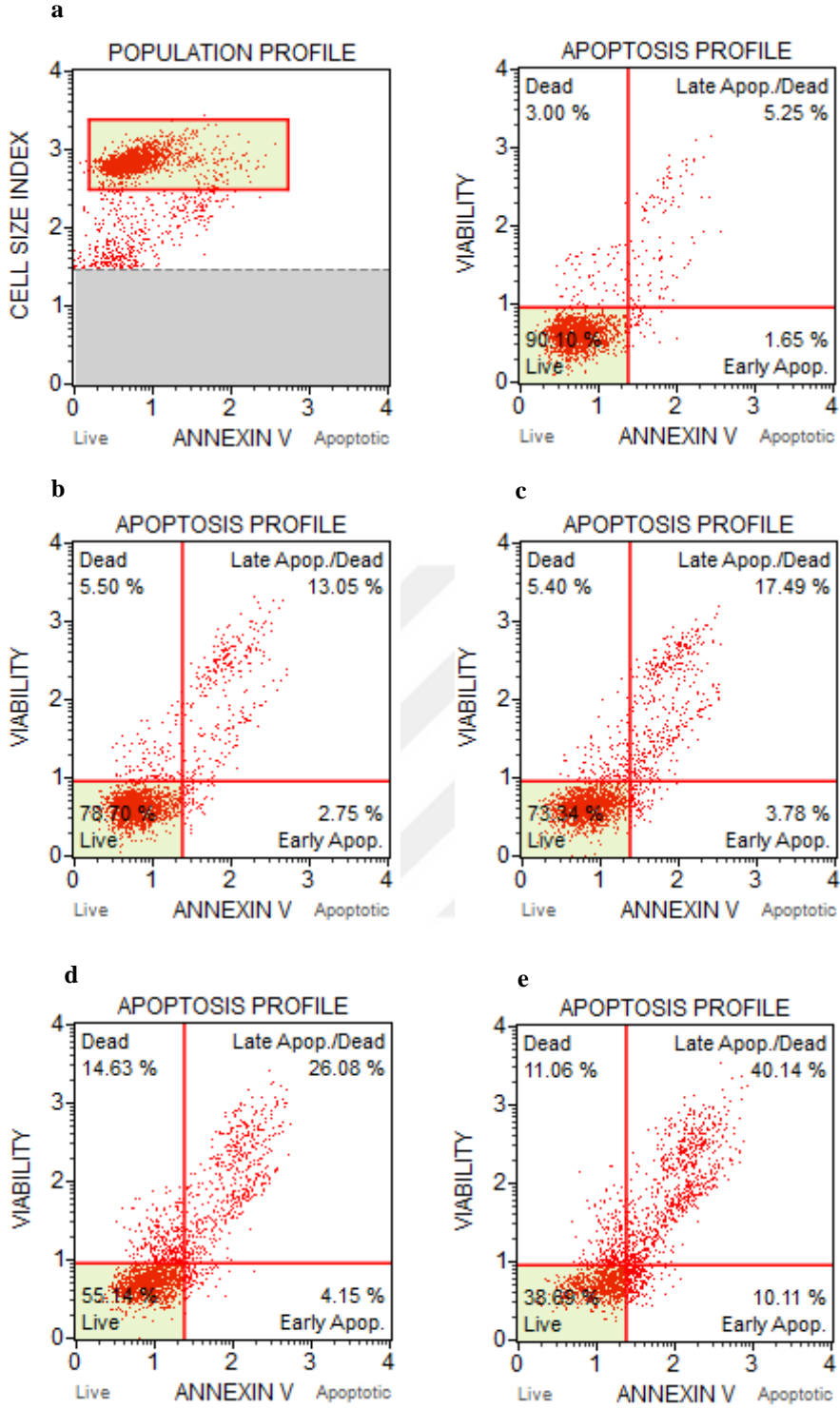
	500 HÜCRE					1000 HÜCRE			
	Konsantrasyon (nM)	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P	\bar{X}	SS	\bar{X} Fark (Kontrol-Doz)	P
6. GÜN	0.01	130.91	2.35	-30.91035	.000	130.23	1.59	-30.23667	.000
	0.05	125.54	1.62	-25.54901	.000	126.31	.57	-26.31000	.000
	0.1	127.44	2.68	-27.44722	.000	125.44	1.00	-25.44333	.000
	0.5	120.30	1.10	-20.30000	.000	120.78	1.65	-20.78333	.000
	1	116.60	1.15	-16.60667	.000	117.60	1.00	-17.60667	.000
	5	113.36	1.36	-13.36580	.000	114.63	1.33	-14.63862	.000
	10	109.41	2.14	-9.41974	.000	110.05	.43	-10.05667	.000
	50	109.68	2.23	-9.68177	.000	108.74	1.36	-8.74496	.000
	100	106.63	1.26	-6.63525	.005	105.63	1.17	-5.63039	.000
	8. GÜN	0.01	127.14	2.42	-27.14714	.000	126.55	.96	-26.55333
0.05		126.95	1.18	-26.95086	.000	124.68	1.32	-24.68612	.000
0.1		121.48	1.05	-21.48000	.000	120.51	2.02	-20.51000	.000
0.5		116.40	2.78	-16.40359	.000	115.44	2.88	-15.44641	.000
1		111.90	1.77	-11.90205	.000	110.98	1.34	-10.98855	.000
5		110.27	1.82	-10.27463	.000	109.35	1.72	-9.35438	.000
10		108.04	2.23	-8.04364	.000	107.63	2.01	-7.63346	.001
50		107.51	1.01	-7.51667	.001	106.88	1.52	-6.88667	.003
100		105.17	.64	-5.17333	.035	103.84	2.07	-3.84000	.241
10. GÜN		0.01	122.48	4.65	-22.48504	.000	123.10	2.16	-23.10921
	0.05	121.17	3.36	-21.17976	.000	122.11	2.14	-22.11565	.000
	0.1	115.52	1.13	-15.52000	.002	116.93	1.64	-16.93333	.000
	0.5	111.53	2.35	-11.53586	.033	112.41	2.54	-12.41355	.000
	1	104.94	3.13	-4.94784	.831	106.25	3.27	-6.25140	.026
	5	105.58	4.56	-5.58376	.721	103.95	2.34	-3.95158	.358
	10	105.48	6.97	-5.48929	.739	103.42	1.10	-3.42000	.544
	50	103.12	4.09	-3.12823	.988	100.51	1.15	-.51667	1.000
	100	102.66	2.56	-2.66333	.996	100.04	1.50	-.04333	1.000
	12. GÜN	0.01	117.09	3.80	-17.09803	.000	117.50	1.53	-17.50497
0.05		115.29	2.52	-15.29331	.000	114.82	2.27	-14.82231	.000
0.1		115.06	1.81	-15.06986	.000	112.76	2.18	-12.76661	.000
0.5		108.87	1.31	-8.87333	.008	109.54	.75	-9.54000	.000
1		105.08	1.81	-5.08667	.318	106.42	1.06	-6.42000	.007
5		104.66	3.02	-4.66169	.427	103.52	2.48	-3.52280	.357
10		102.85	3.90	-2.85325	.910	103.88	3.04	-3.88065	.245
50		99.80	1.53	-.19706	1.000	100.82	.71	-.82566	1.000
100		97.76	2.33	2.23727	.978	98.42	1.20	1.57128	.981

Sonuç olarak,boş KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirlendi.

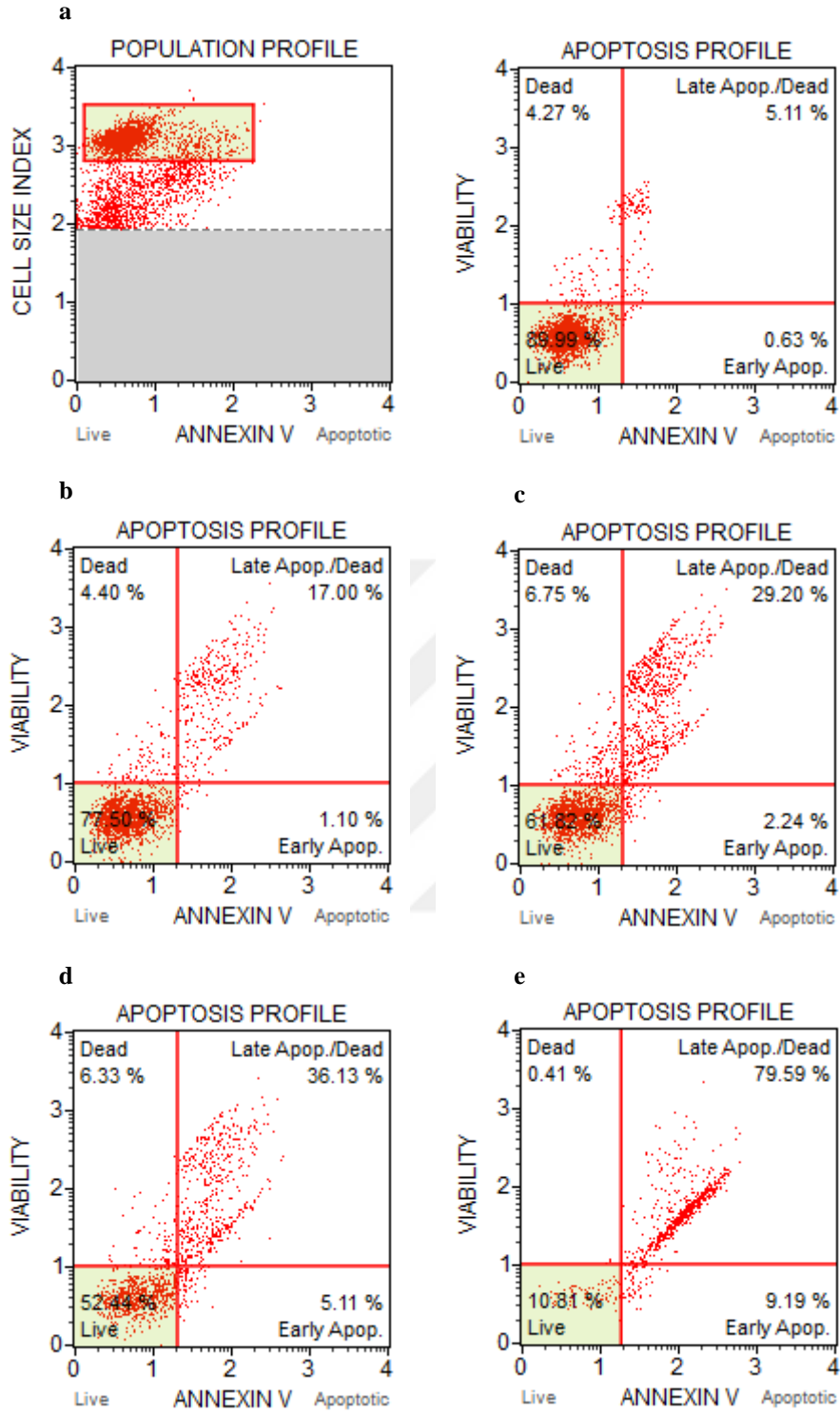
4.23. BMN 673-KLN'nin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673 için gerçekleştirilen deneylere paralel olması amacıyla BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesinde minimum (6.gün) ve maksimum (12.gün) zaman dilimlerinde 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM konsantrasyonlarında BMN 673-KLN'nin apoptotik etkisi değerlendirildi.

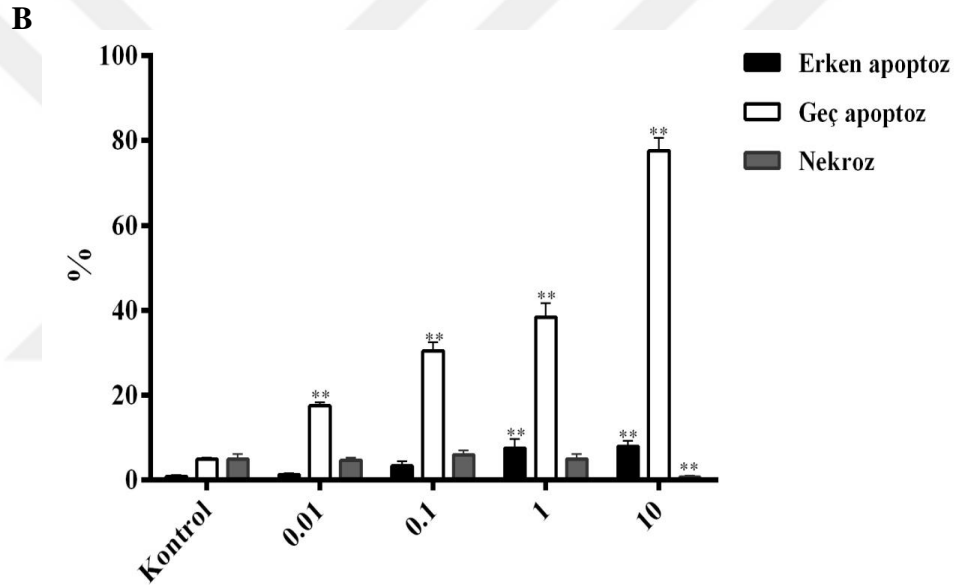
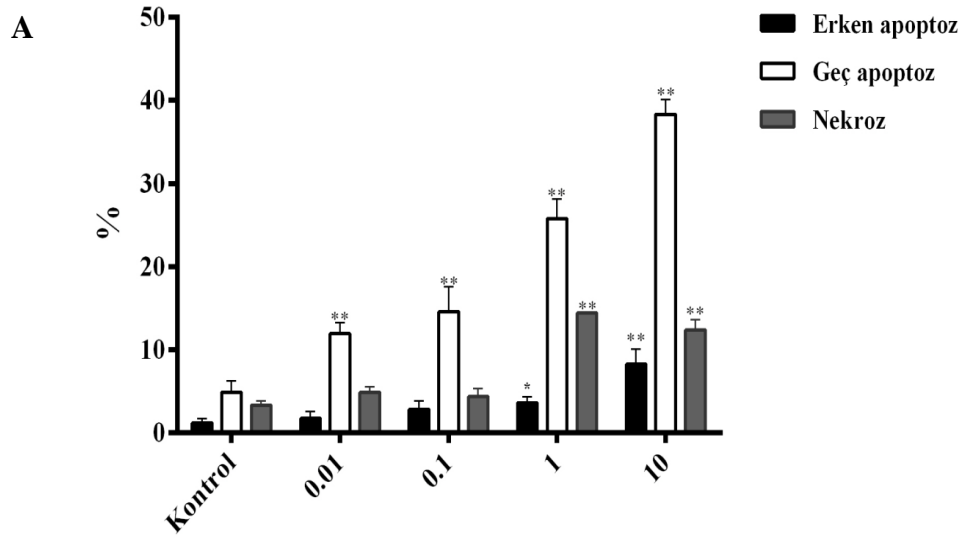
BMN 673-KLN'nin HCC1937 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi incelendiğinde, genel olarak zamana ve doza bağlı olarak erken ve geç apoptoz oranının arttığı belirlendi. Ancak, BMN 673-KLN'nin, BMN 673'e göre daha fazla apoptotik ölüme neden olduğu analiz edildi. Aynı zamanda, HCC1937-R hücrelerindedeki apoptotik ölüme neden olarak hücrelerin canlılık oranlarında doza ve zamana bağlı azalma saptandı. Ancak, MCF-10A hücrelerinde BMN 673 ile karşılaştırıldığında daha az apoptotik ölüme neden olduğu belirlendi. 6. günde 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %2.75 ve %13.05 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %10.11 ve %40.14 olarak belirlendi (Şekil 122). 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ise erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %1.10 ve %17.0 belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında bu oranlar sırasıyla %9.19 ve %79.59 olarak analiz edildi (Şekil 123). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ölümleri açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 124'de özetlendi.



Şekil 122. 6 gün BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



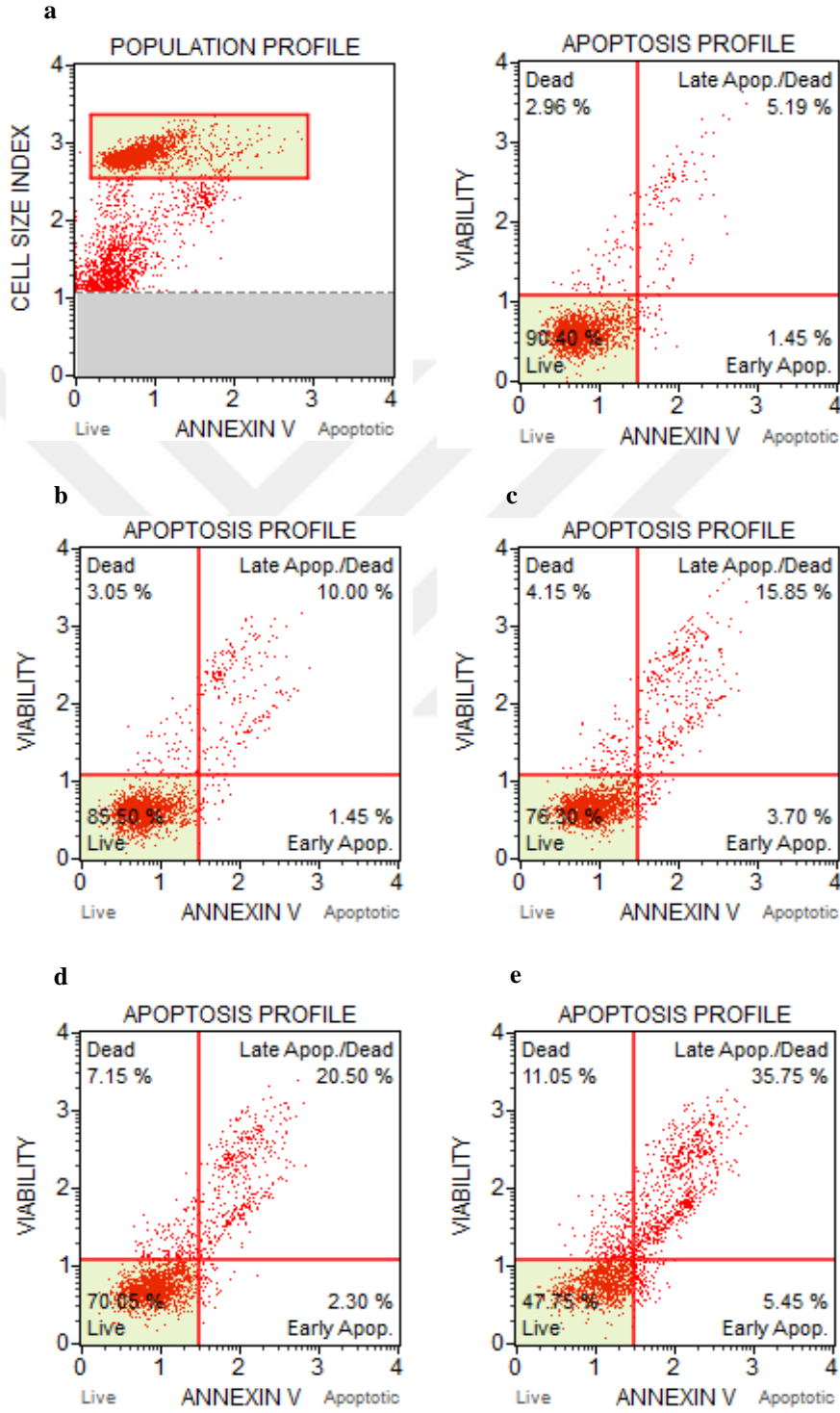
Şekil 123. 12 gün BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



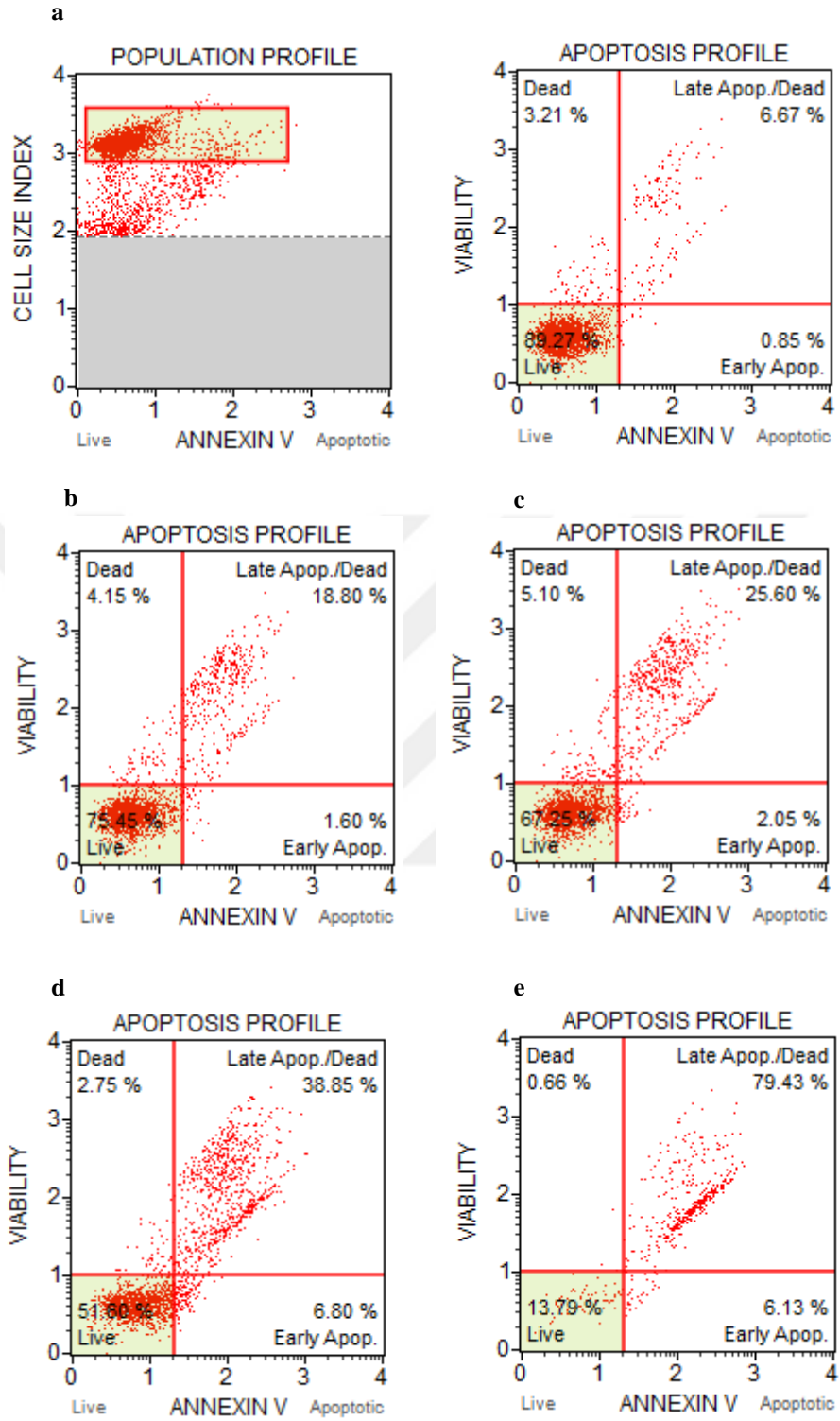
Şekil 124. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$)

HCC1937-R hücreleri üzerinde BMN 673-KLN'nin apoptotik etkisi analiz edildiğinde, 6. günde 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %1.45 ve %10.0 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %5.45 ve %35.75 olarak belirlendi (Şekil 125). 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ise erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %1.60 ve %18.80 belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %6.13 ve %79.43 olarak tespit edildi (Şekil 126). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda

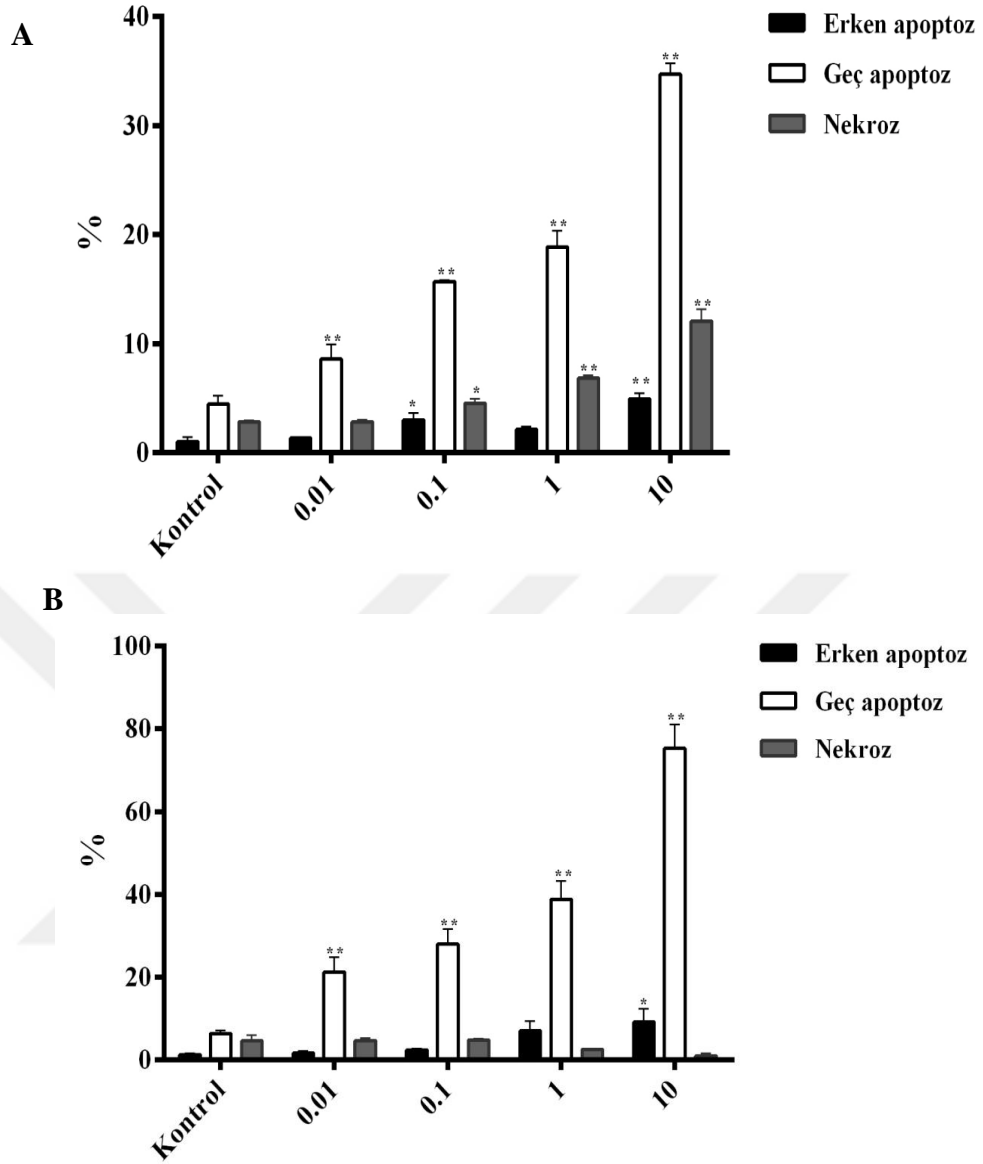
BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ölümleri açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 127’de özetlendi.



Şekil 125. 6 gün BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



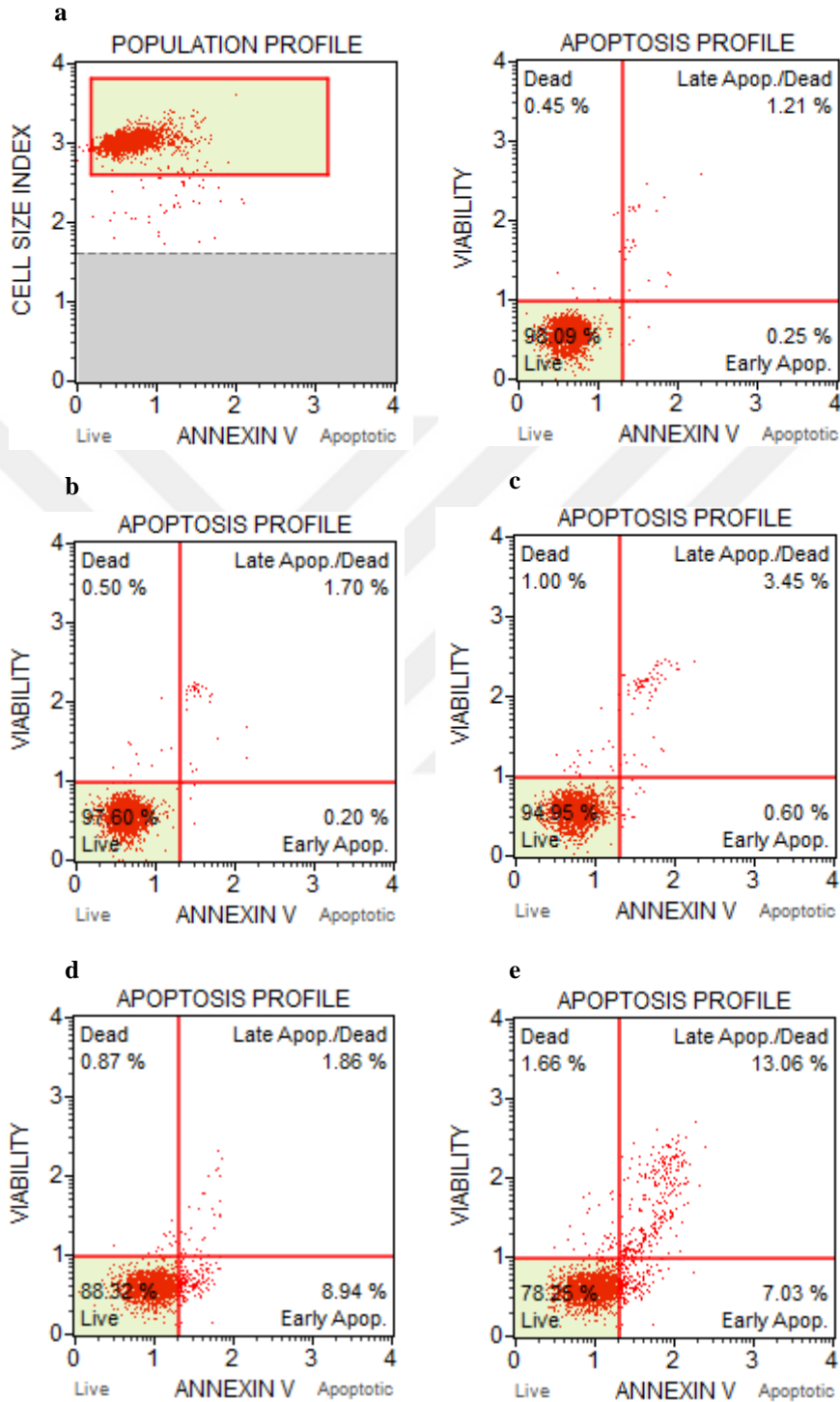
Şekil 126. 12 gün BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



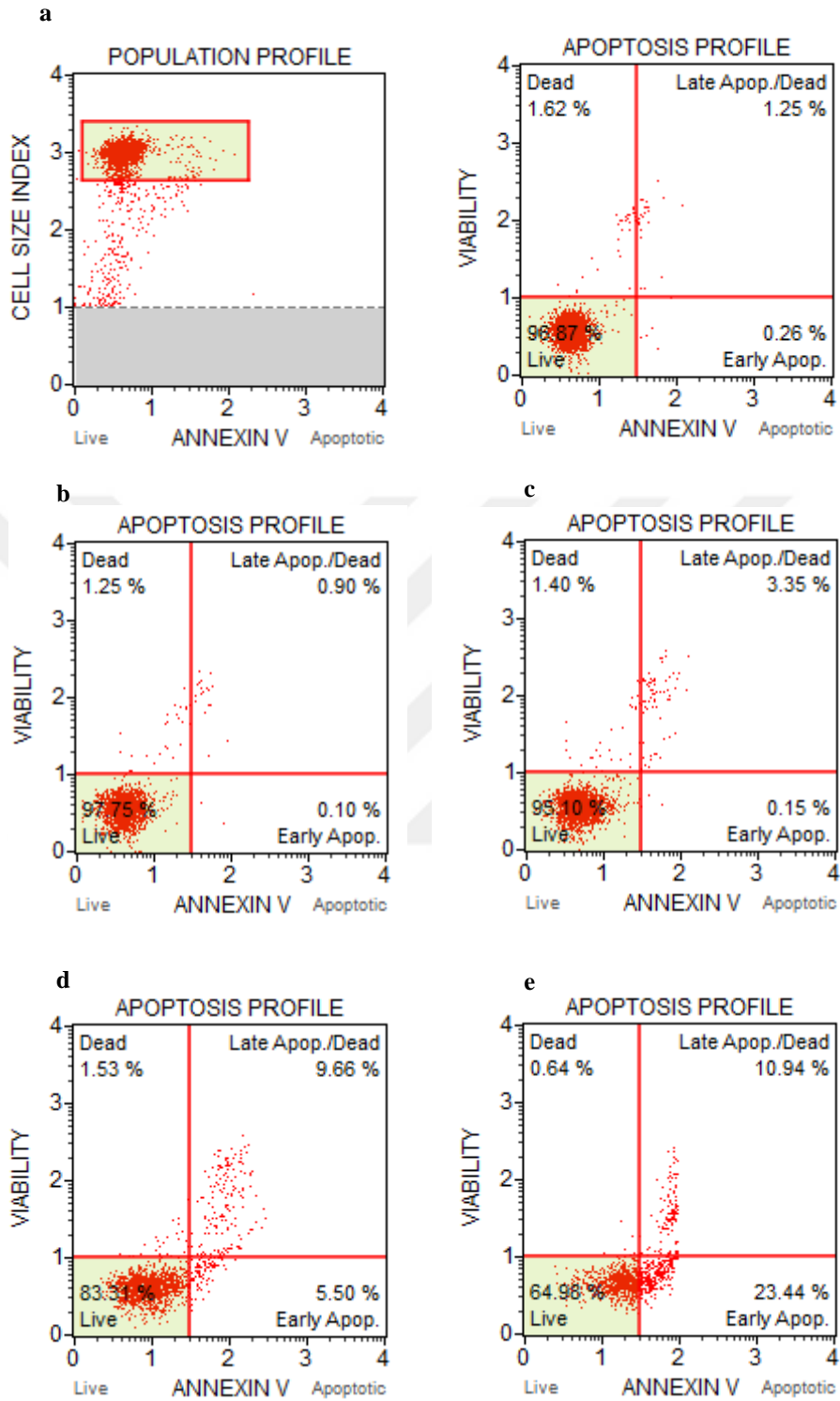
Şekil 127. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$)

MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin apoptotik etkisi incelendiğinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %0.20 ve %1.70 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %7.03 ve %13.06 olarak belirlendi (Şekil 128). 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ise, erken ve geç apoptoz oranları sırasıyla %0.10 ve %0.90 belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %23.44 ve %10.94 olarak saptandı (Şekil 129). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinin

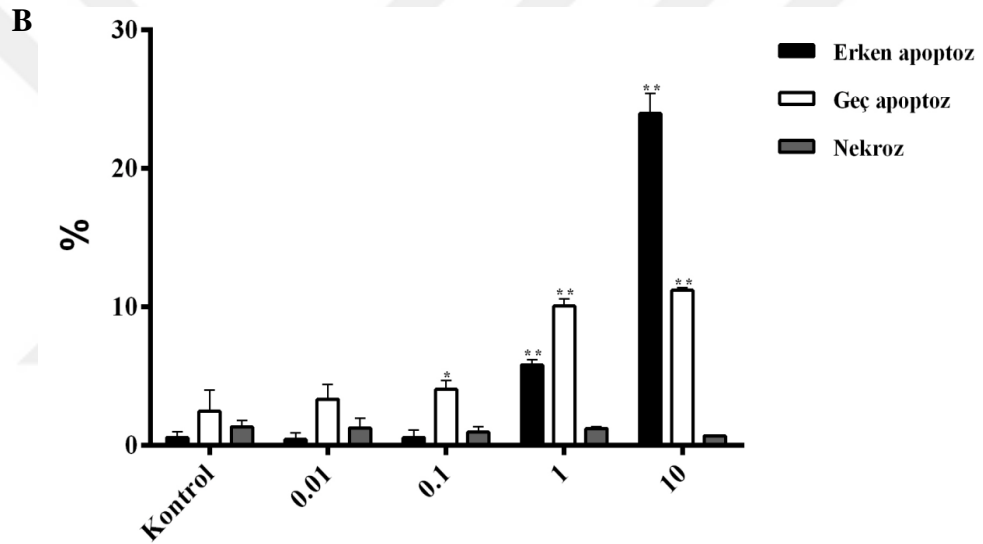
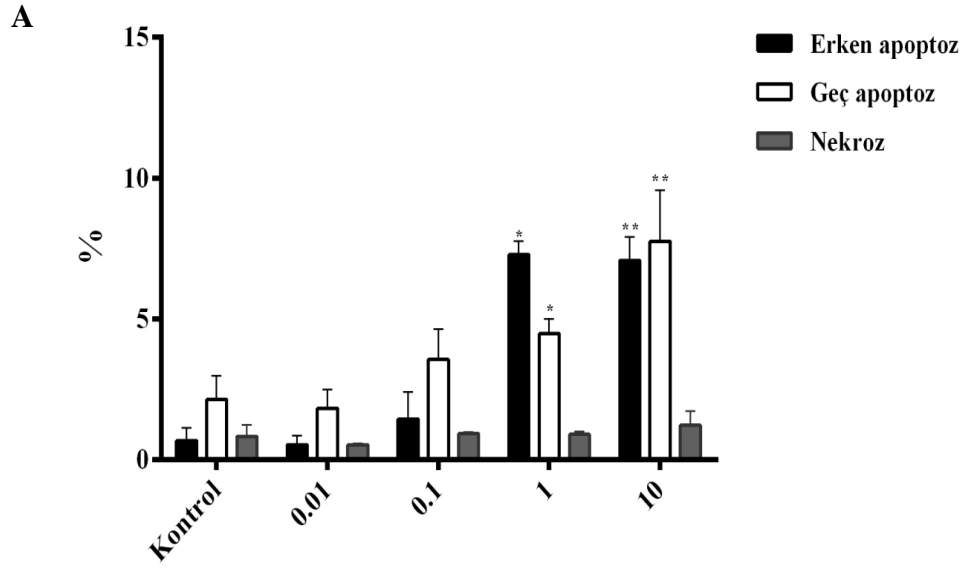
erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ölümleri açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 130'da özetlendi.



Şekil 128. 6 gün BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



Şekil 129. 12 gün BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde Annexin V-PI sonuçları (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



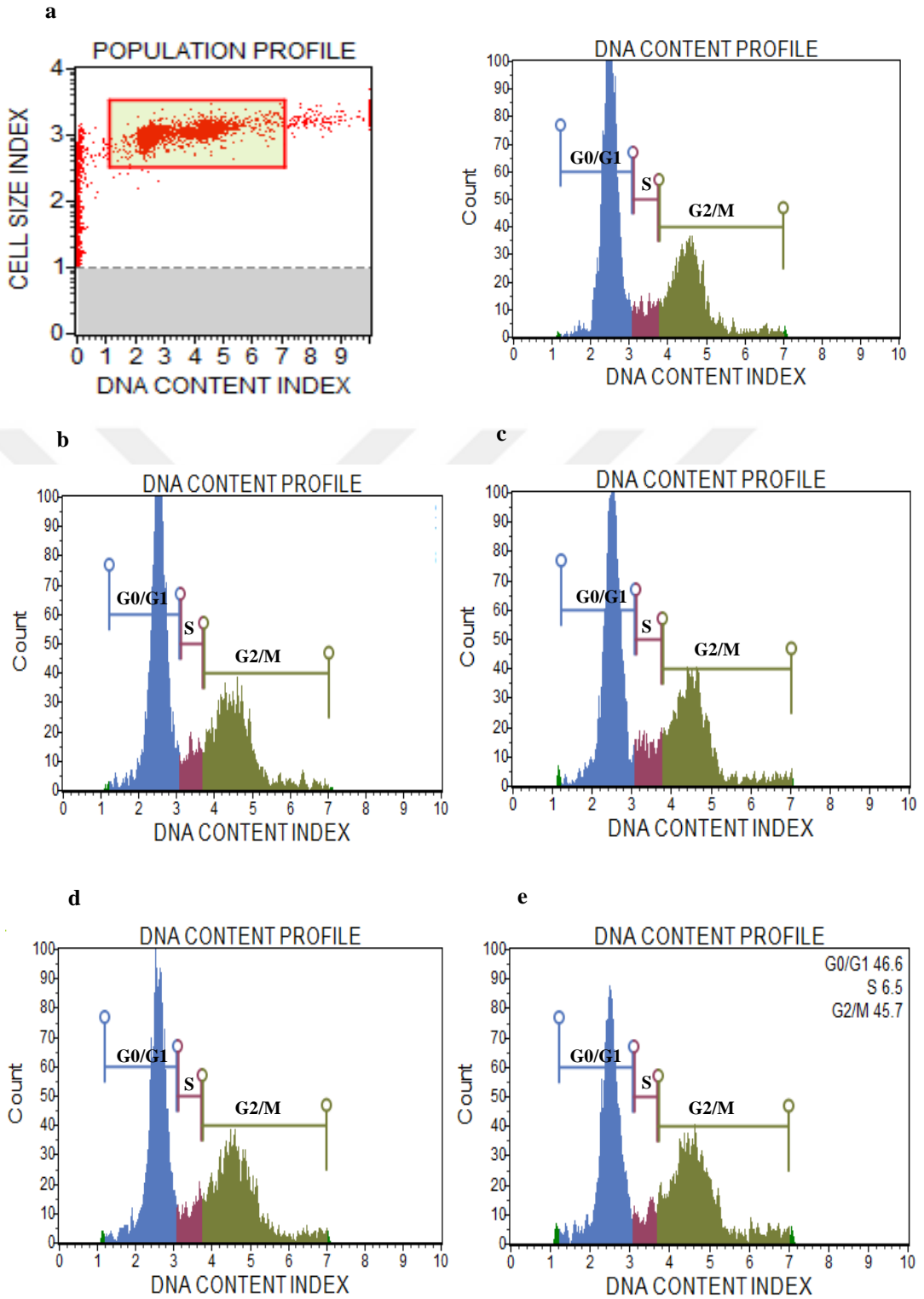
Şekil 130. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$)

Sonuç olarak, BMN 673 yüklü KLN'nin MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün toksik etkisini azaltarak, HCC1937 hücrelerinde daha fazla apoptotik ölüme neden olduğu belirlendi. Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncin aşılmasını sağlayarak minimum dozda bile apoptotik ölüme yol açtığı saptandı.

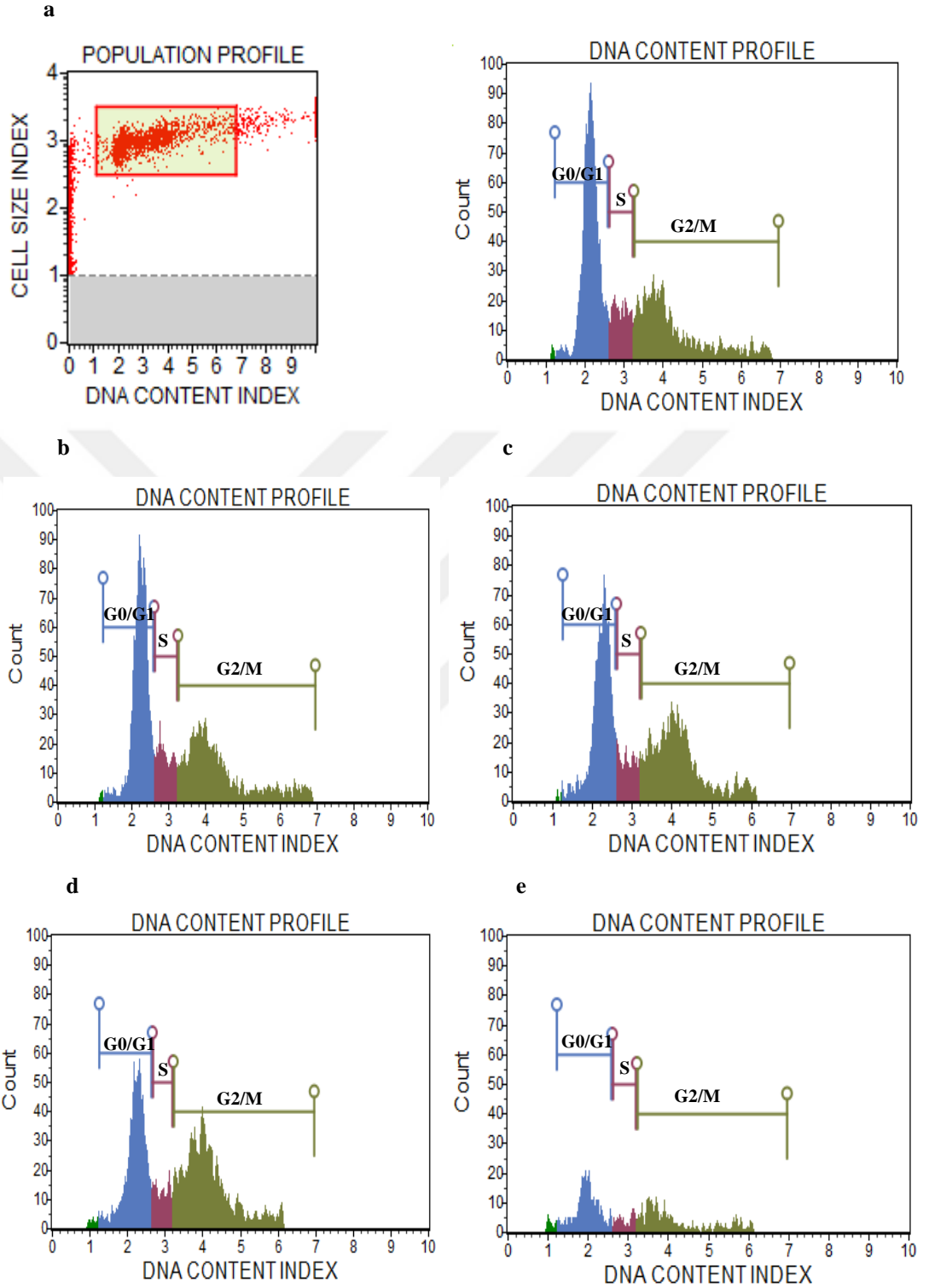
4.24. BMN 673-KLN'nin Hücre Siklusu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF10A hücrelerinde hücre siklusu evreleri üzerinde etkisi incelendiğinde, uygulanan doz ve zamana bağlı olarak anlamlı değiştiği gözlemlendi. Hücrelerin BMN 673-KLN'ye maruz kalma süreleri ve BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerde G0/G1 fazında azalış ve G2/M fazında artış belirlendi.

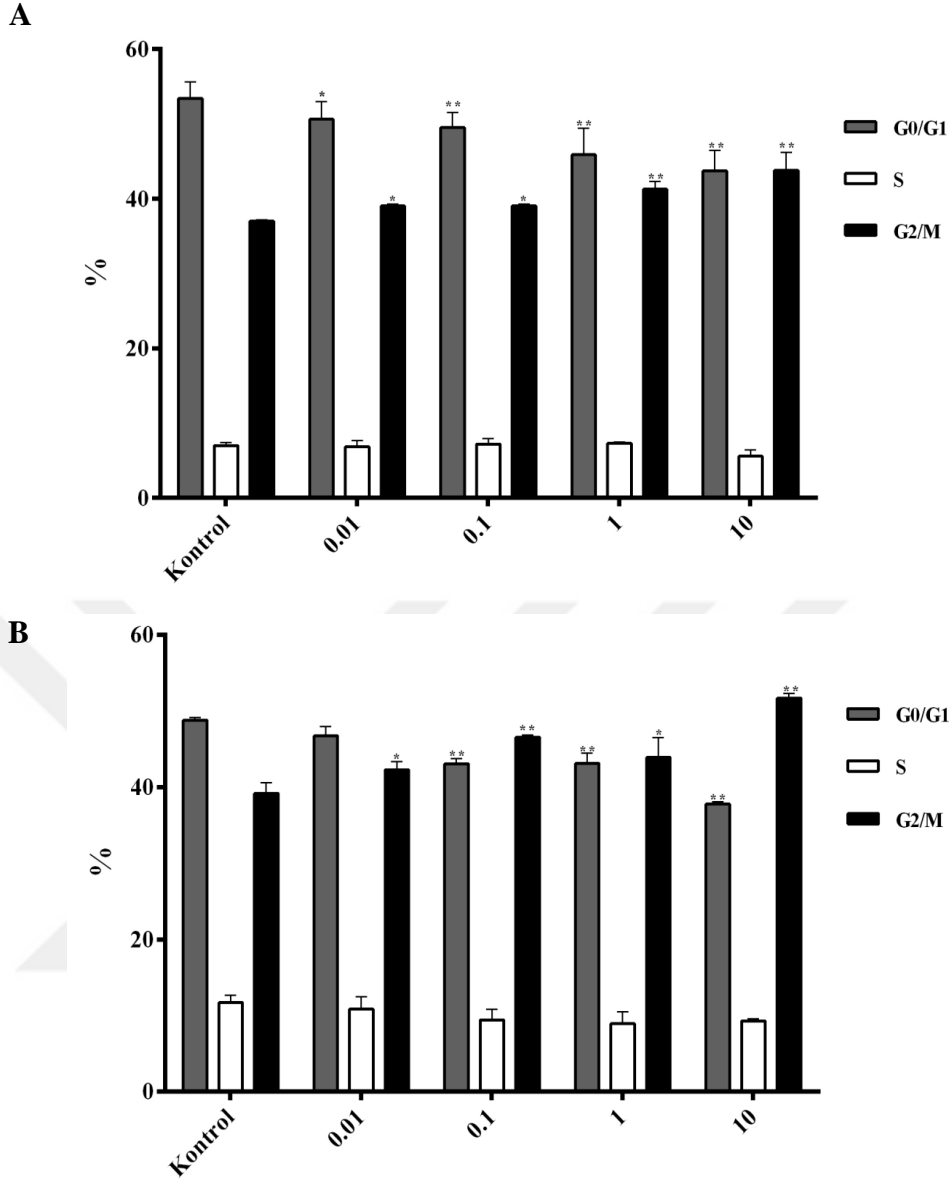
HCC1937 hücrelerinde kontrol grubunda G0/G1 fazında hücre miktarı %53.4 iken, 6 gün boyunca 0.01 nM ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde G0/G1 fazındaki hücre miktarının sırasıyla %50.7 ve %43.8'e düştüğü belirlendi. G0/G1 fazında azalmaya paralel olarak, 0.01 nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%37.0), G2/M fazında hücre miktarının sırasıyla %39.0'e ve %43.8'e arttığı bulundu (Şekil 131). 12 gün sonunda ise, G0/G1 fazında hücre miktarı kontrol grubunda %48.8 iken, 0.01 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %46.7 ve %37.8'a azaldığı analiz edildi. G2/M fazında hücre miktarı ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%39.2), 0.01 nM ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %42.3 ve %51.7'e yükseldiği belirlendi (Şekil 132). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarı açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 133'de özetlendi.



Şekil 131. 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



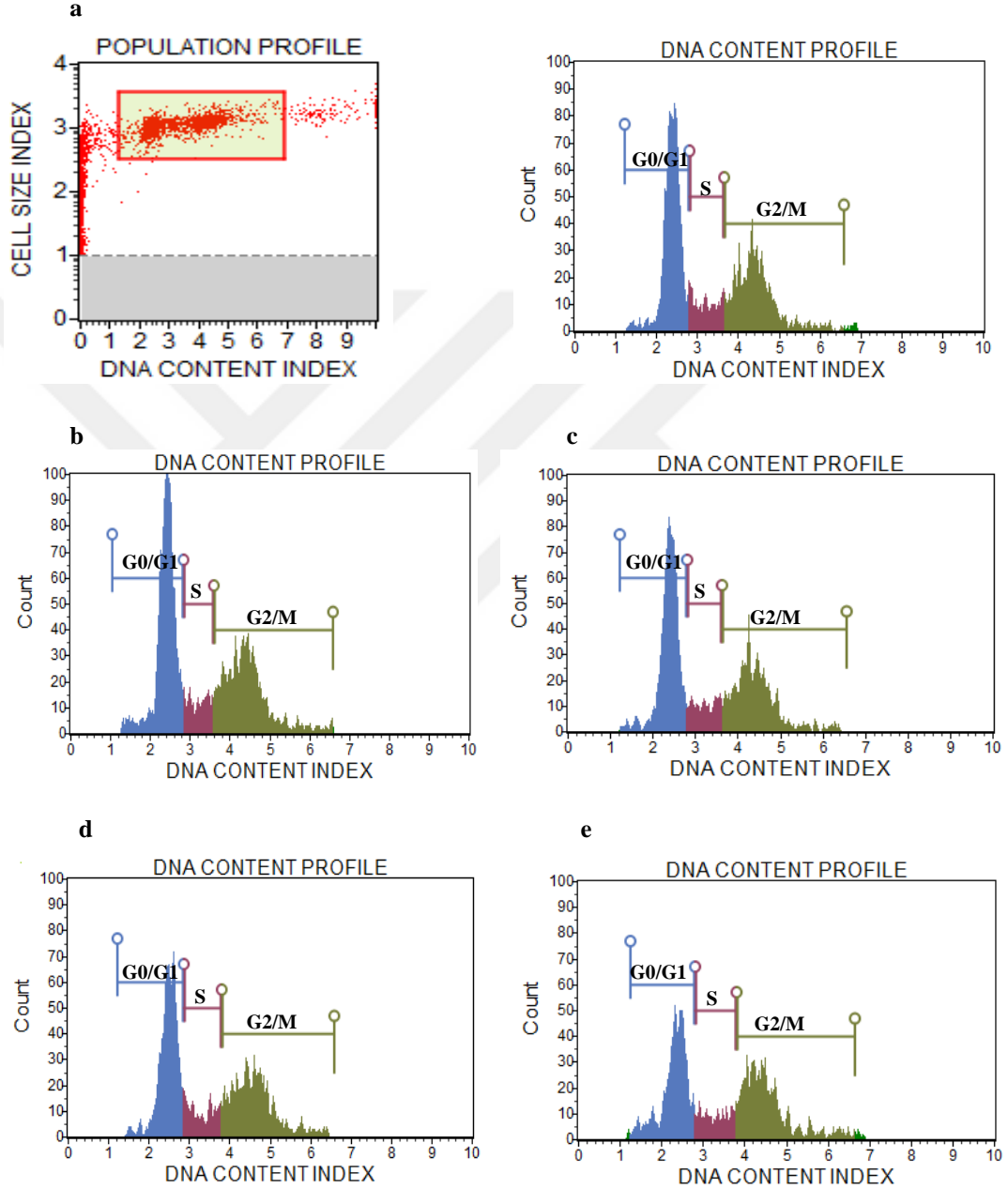
Şekil 132. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



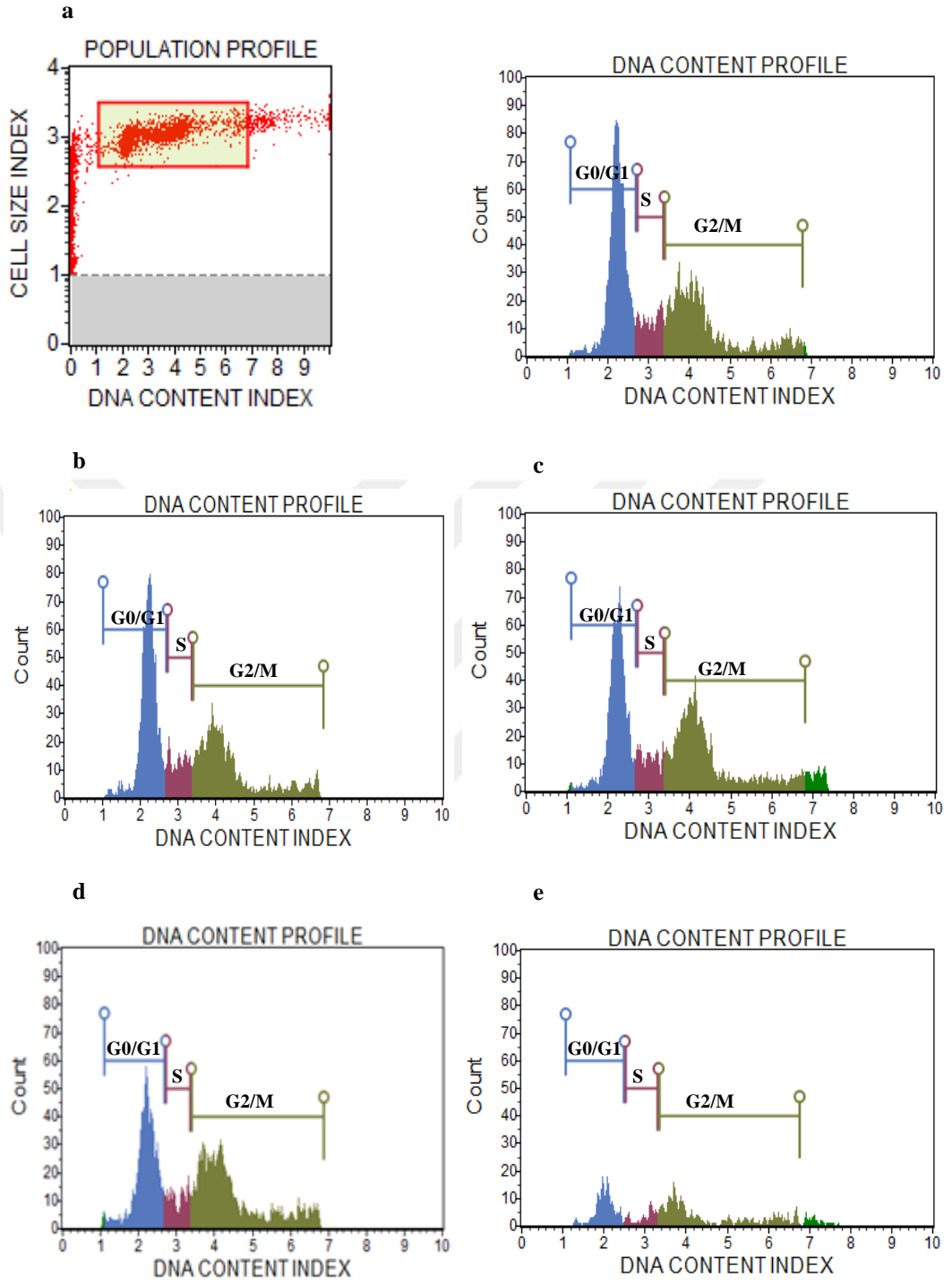
Şekil 133. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarında değişimler (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin hücre siklusunu üzerinde etkisi incelendiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM ve 10 nM BMN 673'e maruz kalan hücrelerde G0/G1 fazında hücre miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%47.1), sırasıyla %47.9 ve %38.9 olarak belirlenmesine rağmen, G2/M fazında hücre miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%38.2) sırasıyla %36.1 ve %41.0'a yükseldiği analiz edildi (Şekil 134). 12. günün sonunda ise, G0/G1 fazında hücre miktarı kontrol grubunda %45.4 iken, 0.01 nM ve 10 nM uygulanan hücrelerde %44.0 ve %39.8 olarak analiz edildi. G2/M fazında hücre miktarı ise kontrol grubunda %39.7 iken, 0.01

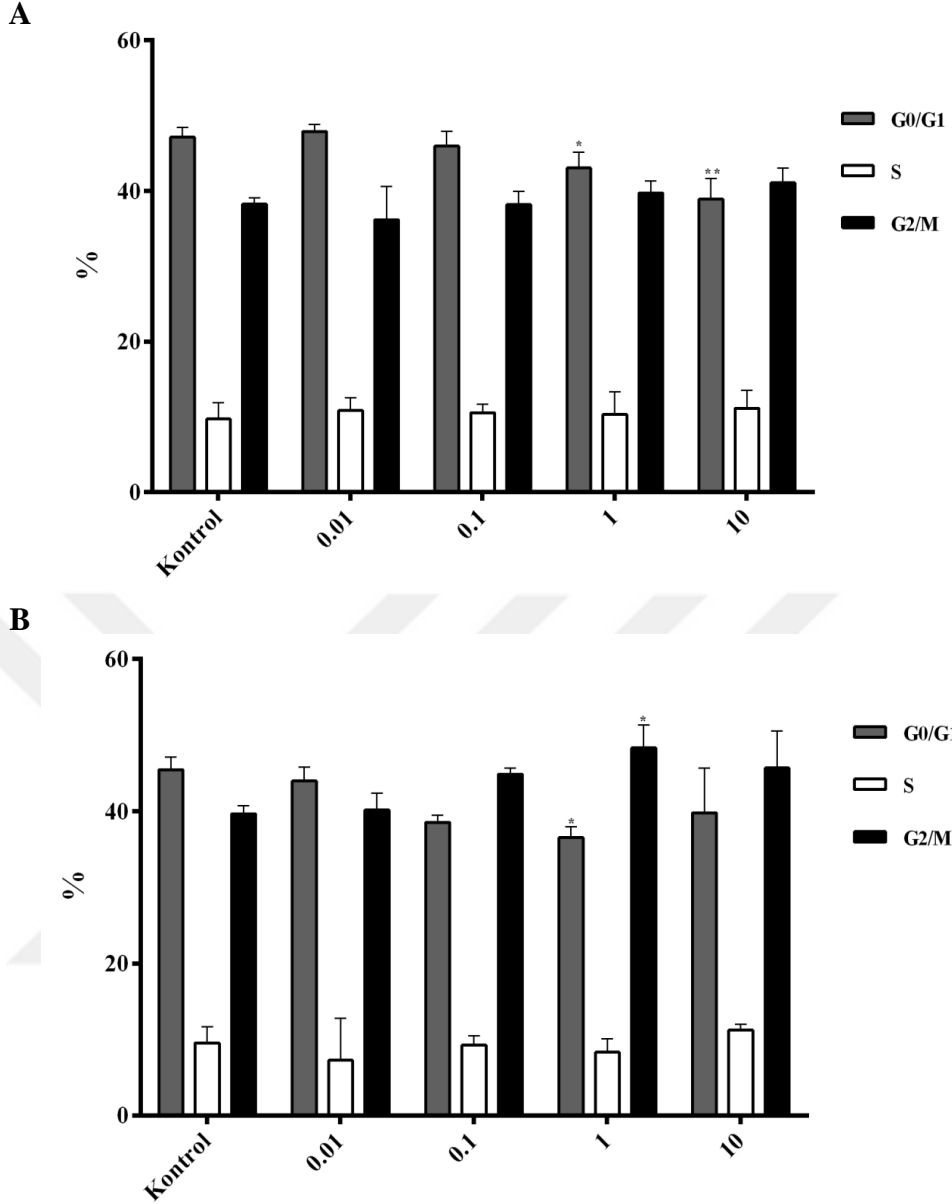
nM ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde sırasıyla %40.2 ve %45.7'ye arttığı tespit edildi (Şekil 135). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarı açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 136'da özetlendi.



Şekil 134. 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, hücre siklus evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



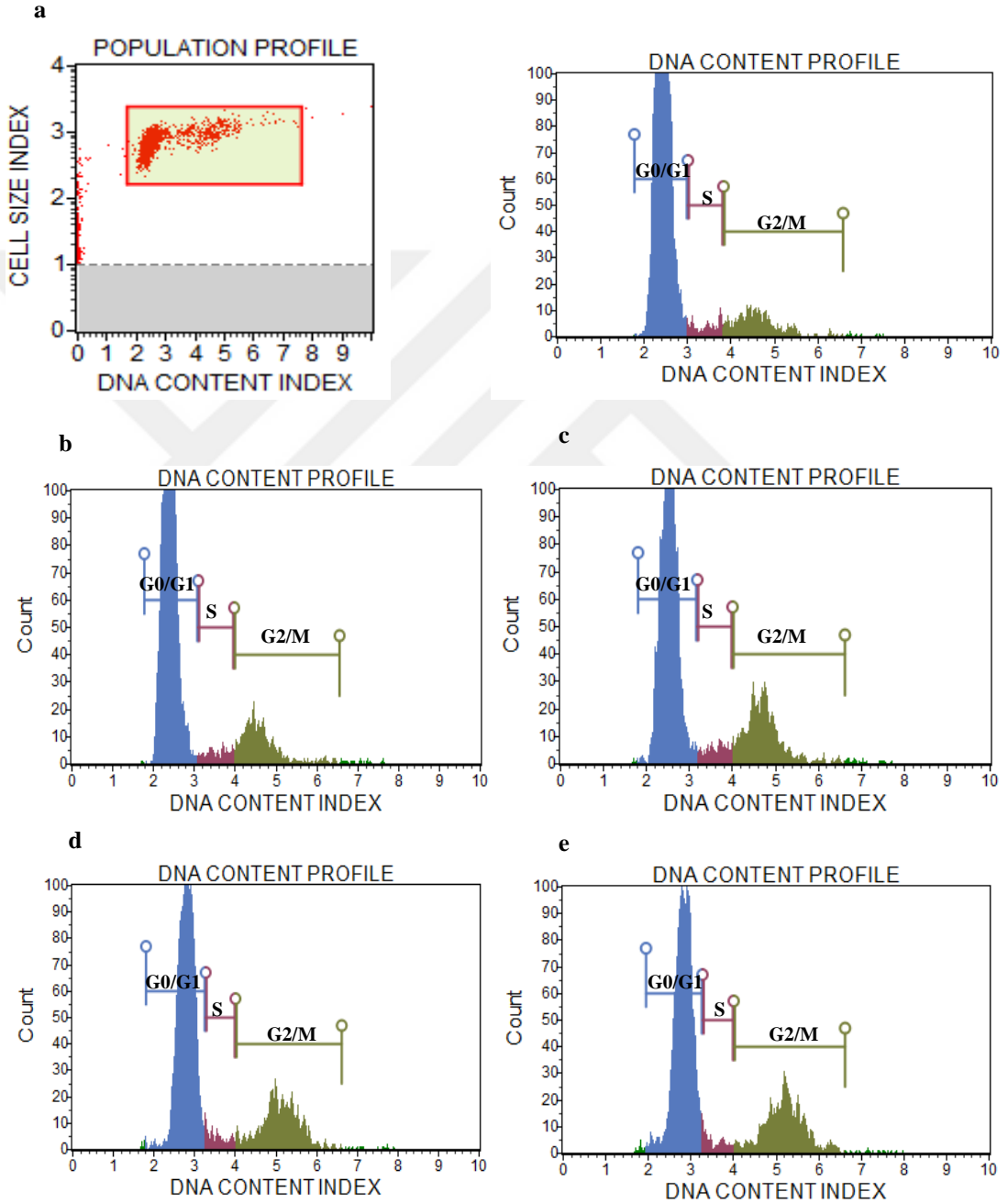
Şekil 135. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



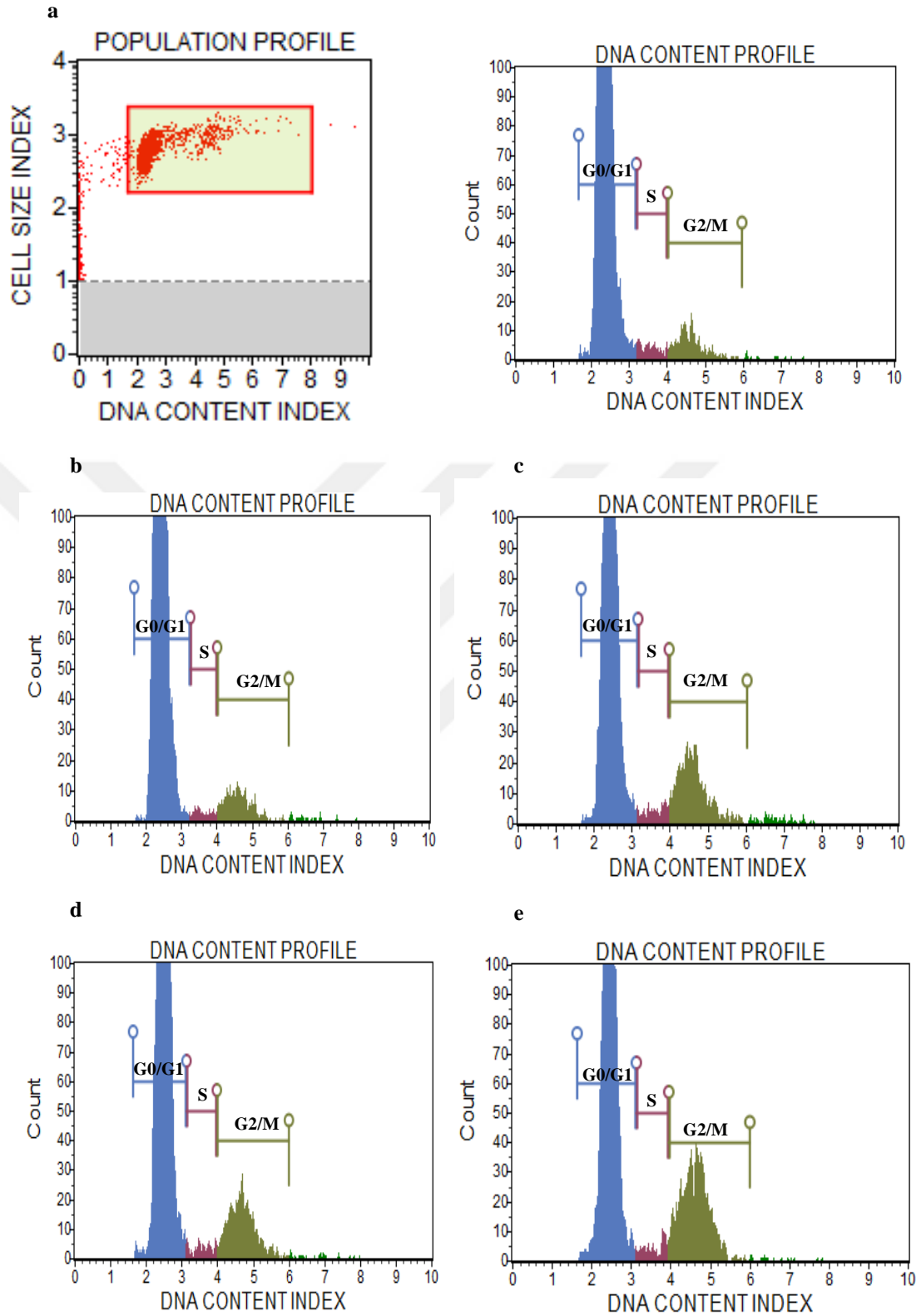
Şekil 136. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarında değişimler (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

MCF-10A hücrelerinde BMN673-KLN'nin etkisi incelendiğinde ise, kontrol grubunda G0/G1 fazında hücre miktarı %84.5 iken, 6 gün boyunca 0.01 nM ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %78.0 ve %63.9 olarak analiz edildi. G2/M fazında hücre miktarı ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (%10.9), 0.01 nM ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %15.9 ve %28.7'e arttığı belirlendi (Şekil 137). 12. günün sonunda ise, kontrol grubunda G0/G1 fazında hücre miktarı %86.6 belirlenmesine rağmen, 0.01 nM ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %85.9 ve %68.7'e azaldığı tespit edildi. G2/M fazında hücre

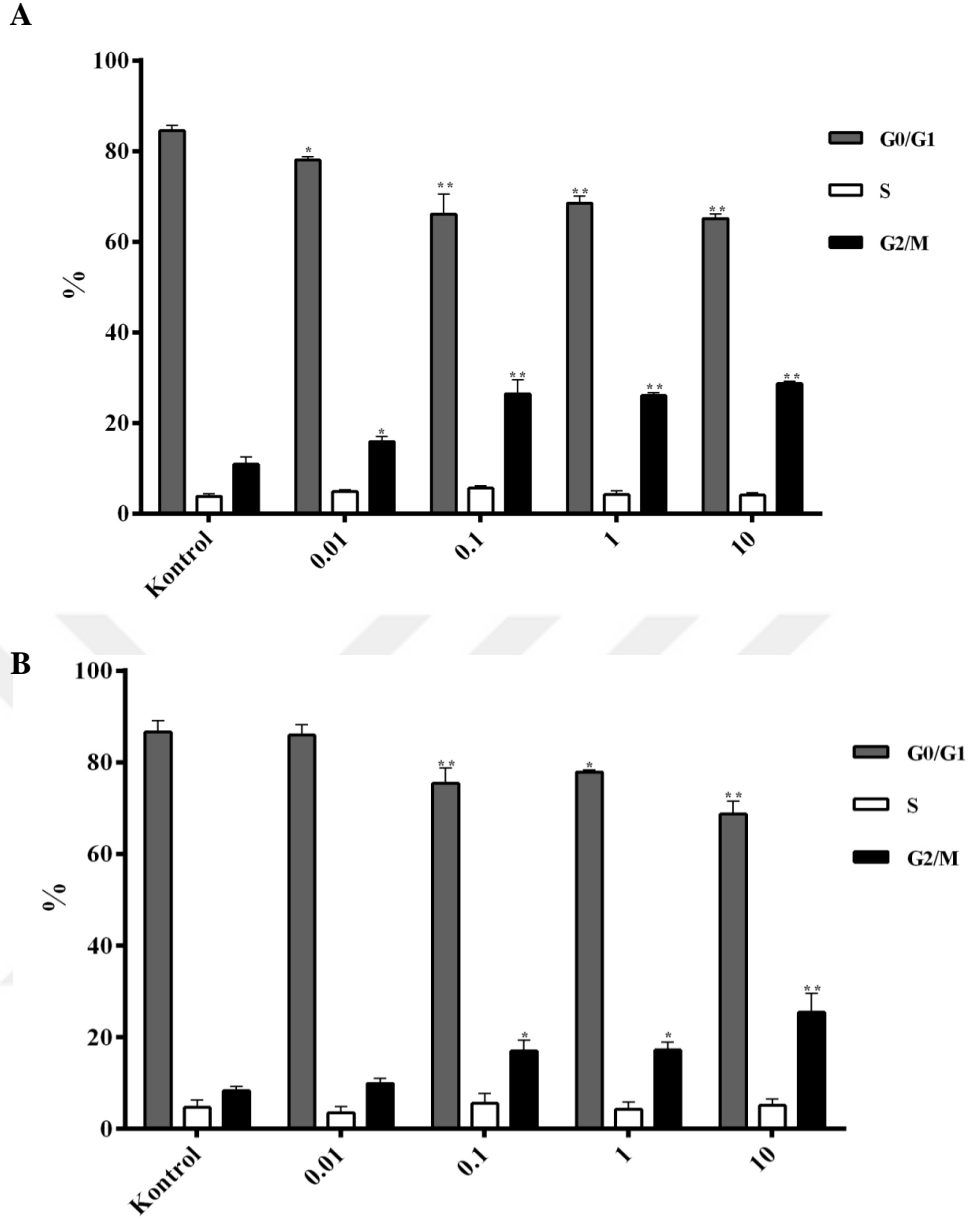
miktarı ise, kontrol grubunda %8.3 iken, 0.01 nM ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %9.9 ve %25.5 olarak analiz edildi (Şekil 138). 6 ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarı açısından istatistiksel farklılıklar Şekil 139’da özetlendi.



Şekil 137. 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde, hücre siklusu evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



Şekil 138. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde, hücre siklus evrelerine ait histogramlar, (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



Şekil 139. 6 gün (A) ve 12 gün (B) boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde G0/G1, S ve G2/M fazında hücre miktarında değişimler (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerde G0/G1 fazında doza ve zamana bağlı paralel olarak anlamlı azalma saptanırken, G2/M fazında anlamlı artış belirlendi. Ancak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde G2/M fazında hücre miktarının BMN 673 uygulanan hücrelere göre daha az oranda olduğu belirlendi. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, G2/M fazında hücre miktarındaki artış BMN 673 uygulanan hücrelere göre KLN formülasyonunun BMN 673'ün toksik etkisini azaltmasından dolayı daha az olduğu analiz edildi.

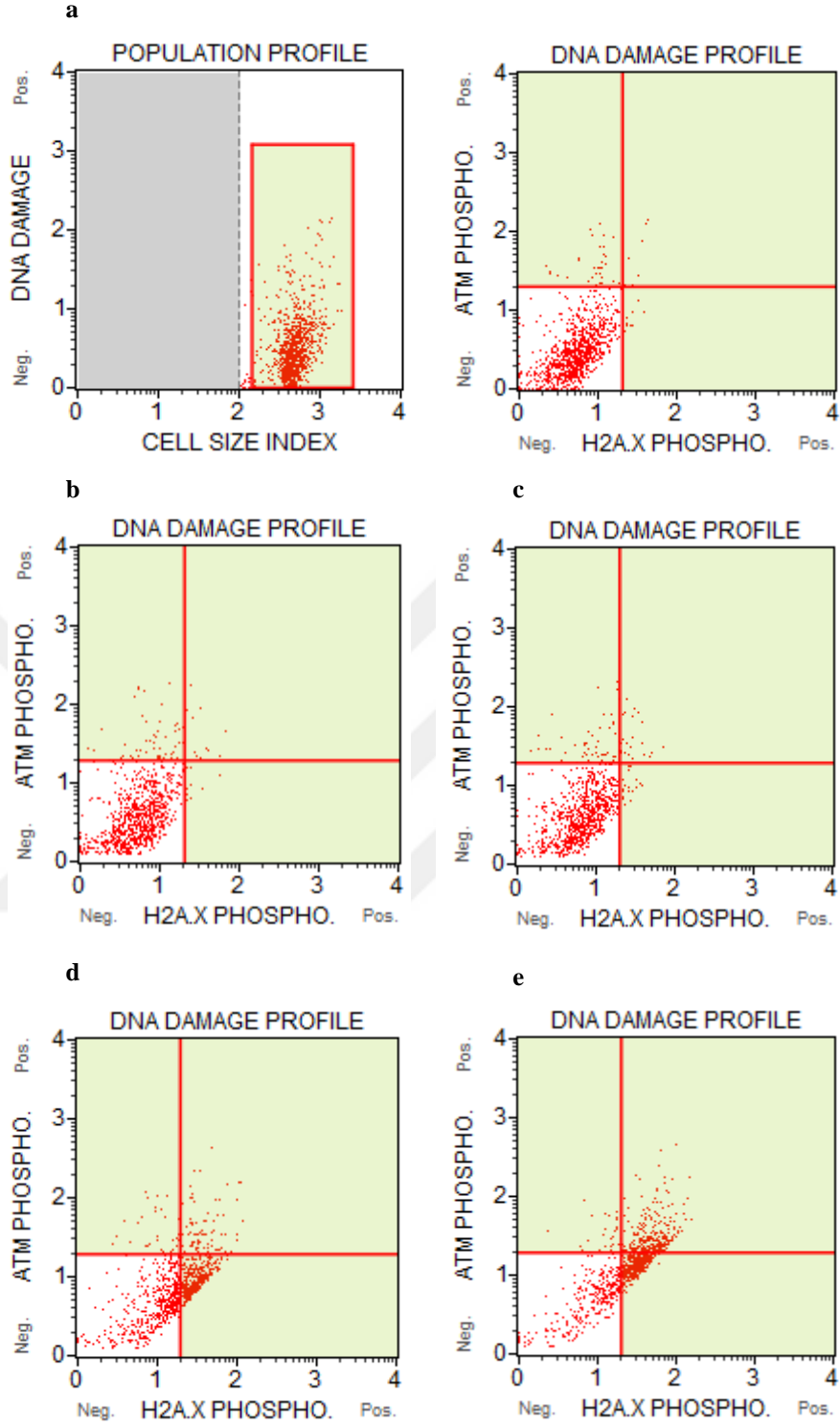
4.25. BMN 673-KLN'nin DNA Hasarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF10A hücrelerinden neden olduğu DNA hasarının belirlenebilmesi için eş zamanlı olarak fosforile ATM ve H2AX aktivasyonu ile saptandı.

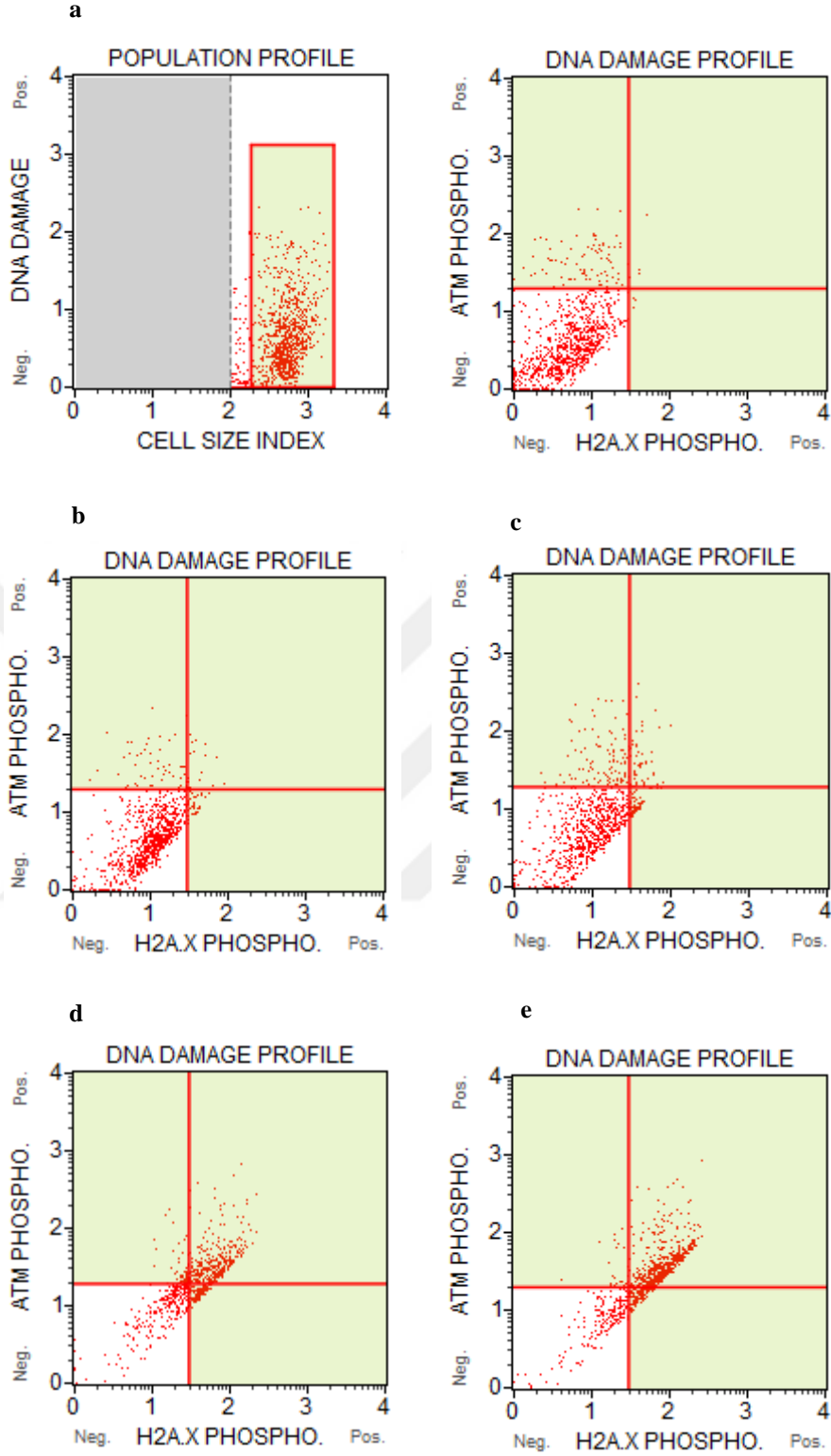
6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde fosforile ATM (p-ATM), fosforile H2AX (p-H2AX) ve DNA çift zincir kırığı (dsDNA) miktarı sırasıyla %5.62, %1.12 ve %1.35 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %3.02, %36.68 ve %29.45 olarak belirlendi (Şekil 140). 12. günün sonunda ise, 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %6.19, %4.01 ve %1.83 olarak belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %2.58, %16.51 ve %59.95 olarak analiz edildi (Şekil 141). Farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak canlı hücre, p-ATM, p-H2AX, dsDNA ve toplam DNA hasarı miktarı Tablo 64'de özetlendi.

Tablo 64. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde DNA hasarına ait veriler

	Kontrol		0.01		0.1		1		10	
	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g
Negatif (LL)	%94.66	%89.77	%91.90	%87.97	%89.37	%75.20	%50.22	%33.69	%30.85	%20.96
pATM (UL)	%3.39	%9.46	%5.62	%6.19	%5.77	%12.57	%3.55	%7.22	%3.02	%2.58
dsDNA (UR)	%0.92	%0.44	%1.35	%1.83	%2.49	%5.70	%8.60	%45.59	%29.45	%59.95
pH2A.X (LR)	%1.03	%0.33	%1.12	%4.01	%2.38	%6.52	%37.63	%13.50	%36.68	%16.51
Toplam DNA hasarı (UL+UR+LR)	%5.34	%10.23	%8.10	%12.03	%10.63	%24.80	%49.78	%66.31	%69.15	%79.04



Şekil 140. 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM

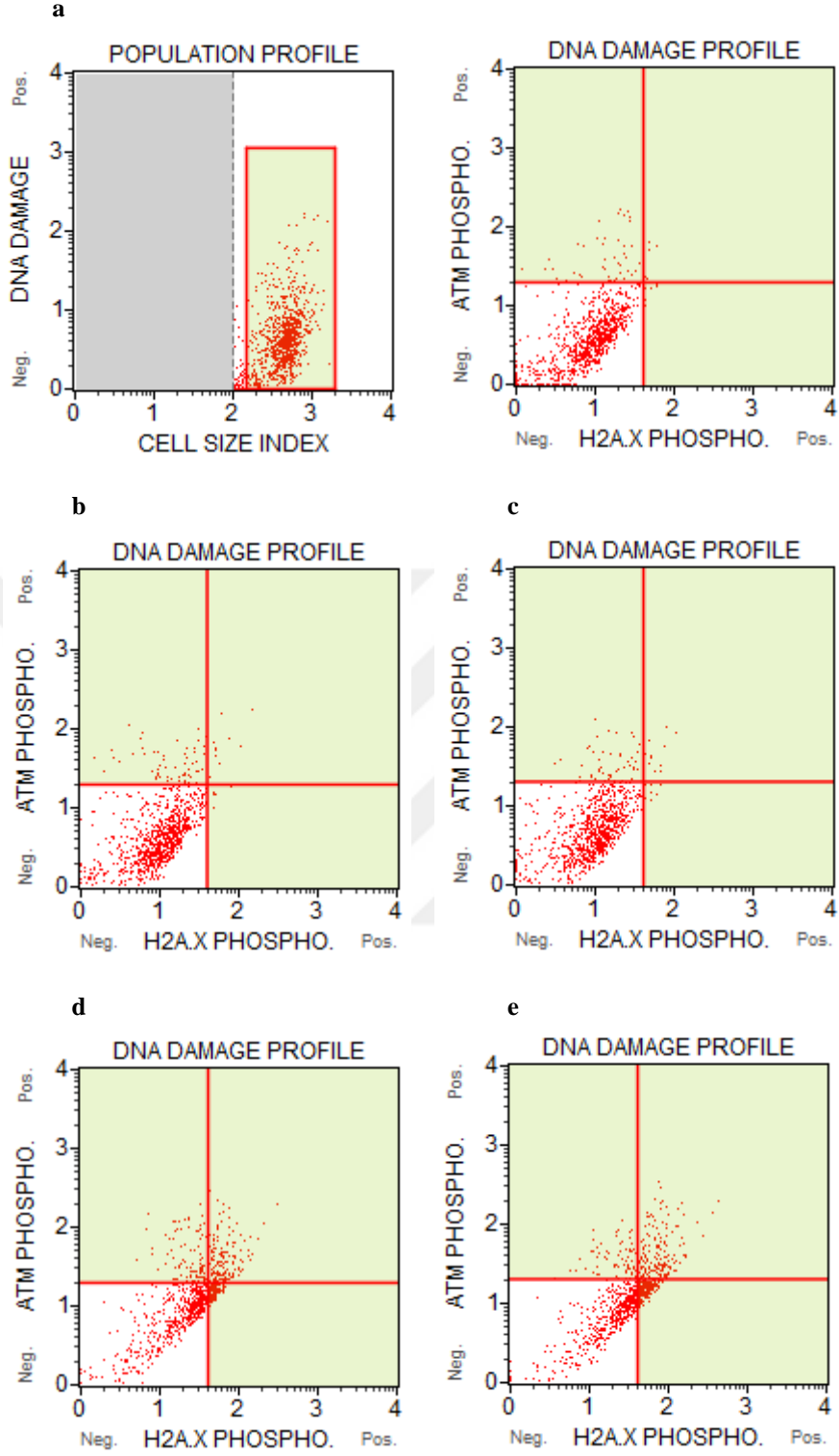


Şekil 141. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM

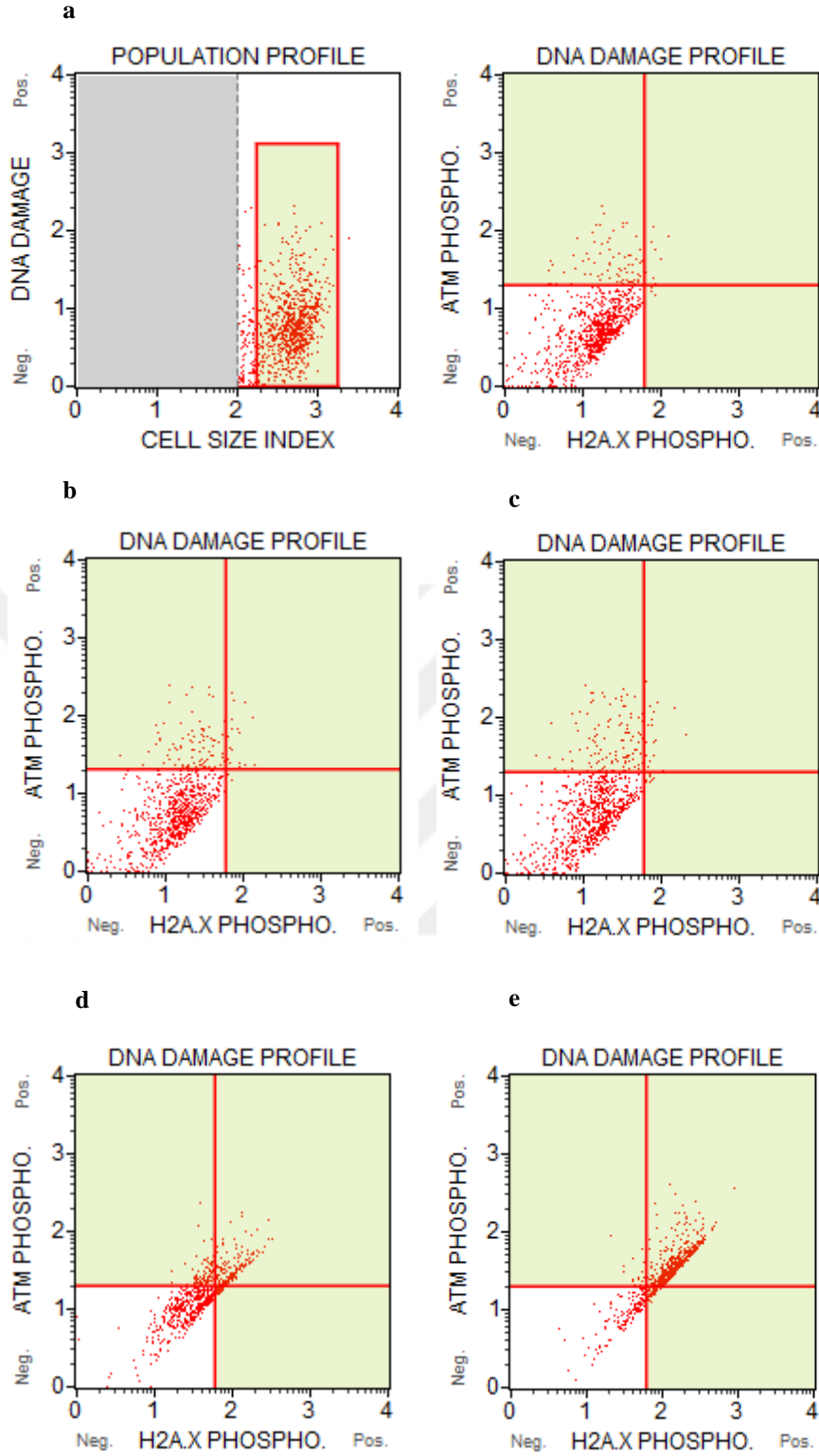
HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin DNA hasarı üzerinde etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak incelendiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %6.94, %0.77 ve %1.10 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %8.65, %19.80 ve %20.48 olarak belirlendi (Şekil 142). 12. günün sonunda ise 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %10.84, %0.47 ve %2.0 belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %2.24, %9.09 ve %71.23 olarak analiz edildi (Şekil 143). Farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde kontrol ile karşılaştırılmalı olarak canlı hücre, p-ATM, p-H2AX, dsDNA ve toplam DNA hasarı miktarı Tablo 65'de özetlendi.

Tablo 65. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde DNA hasarına ait veriler

	Kontrol		0.01		0.1		1		10	
	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g
Negative (LL)	%93.71	%90.25	%91.19	%86.69	%91.83	%83.45	%57.67	%57.11	%51.08	%17.43
pATM (UL)	%4.99	%8.37	%6.94	%10.84	%6.07	%13.47	%10.98	%11.85	%8.65	%2.24
dsDNA (UR)	%0.54	%0.92	%1.10	%2.00	%1.21	%2.05	%17.62	%23.69	%20.48	%71.23
pH2A.X (LR)	%0.76	%0.46	%0.77	%0.47	%0.88	%1.03	%13.73	%7.36	%19.80	%9.09
Toplam DNA Hasarı (UL+UR+LR)	%6.29	%9.75	%8.81	%13.31	%8.17	%16.55	%42.33	%42.89	%48.92	%82.57



Şekil 142. 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.



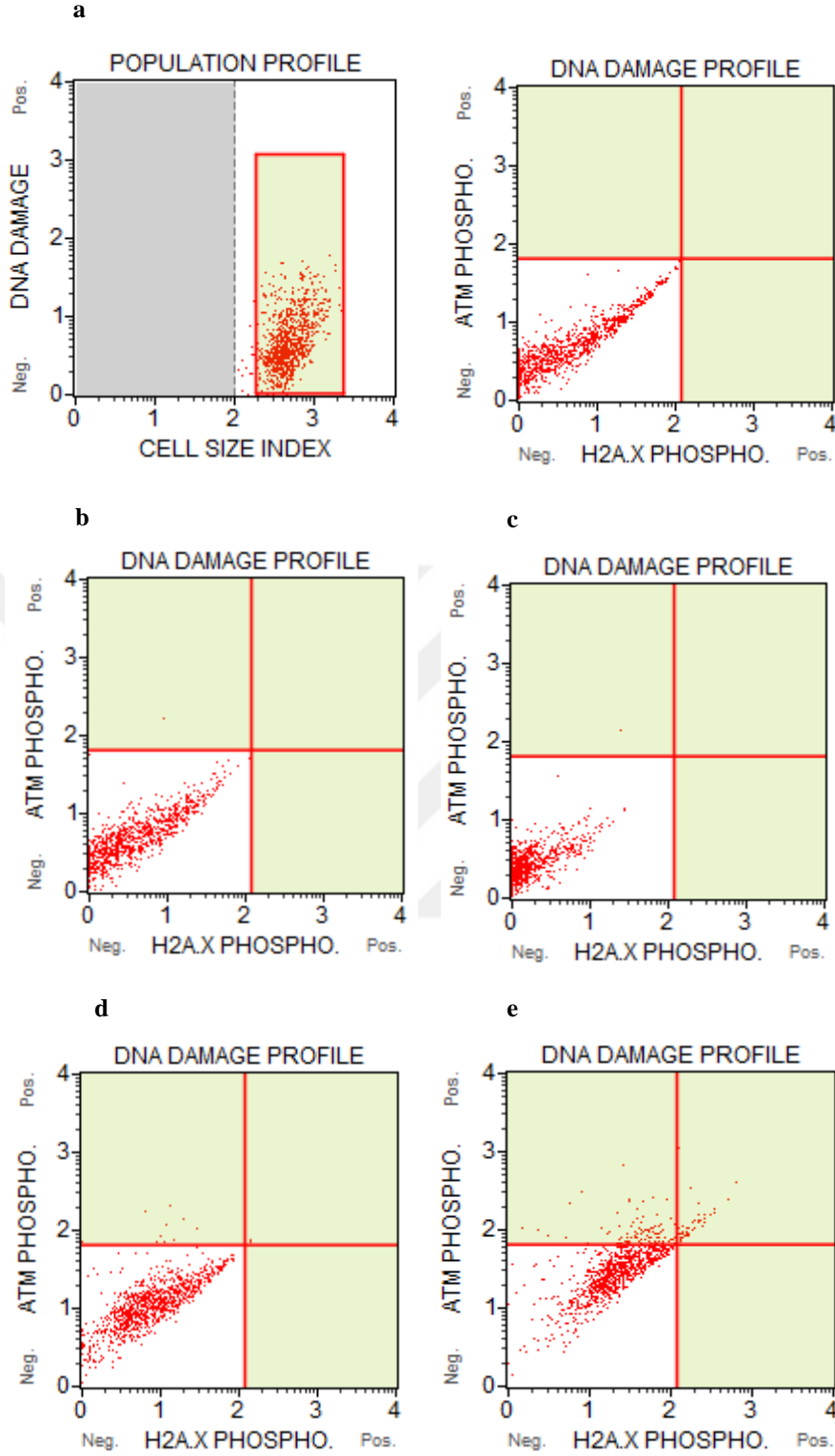
Şekil 143. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM

MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin DNA hasarı üzerinde etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak incelendiğinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN

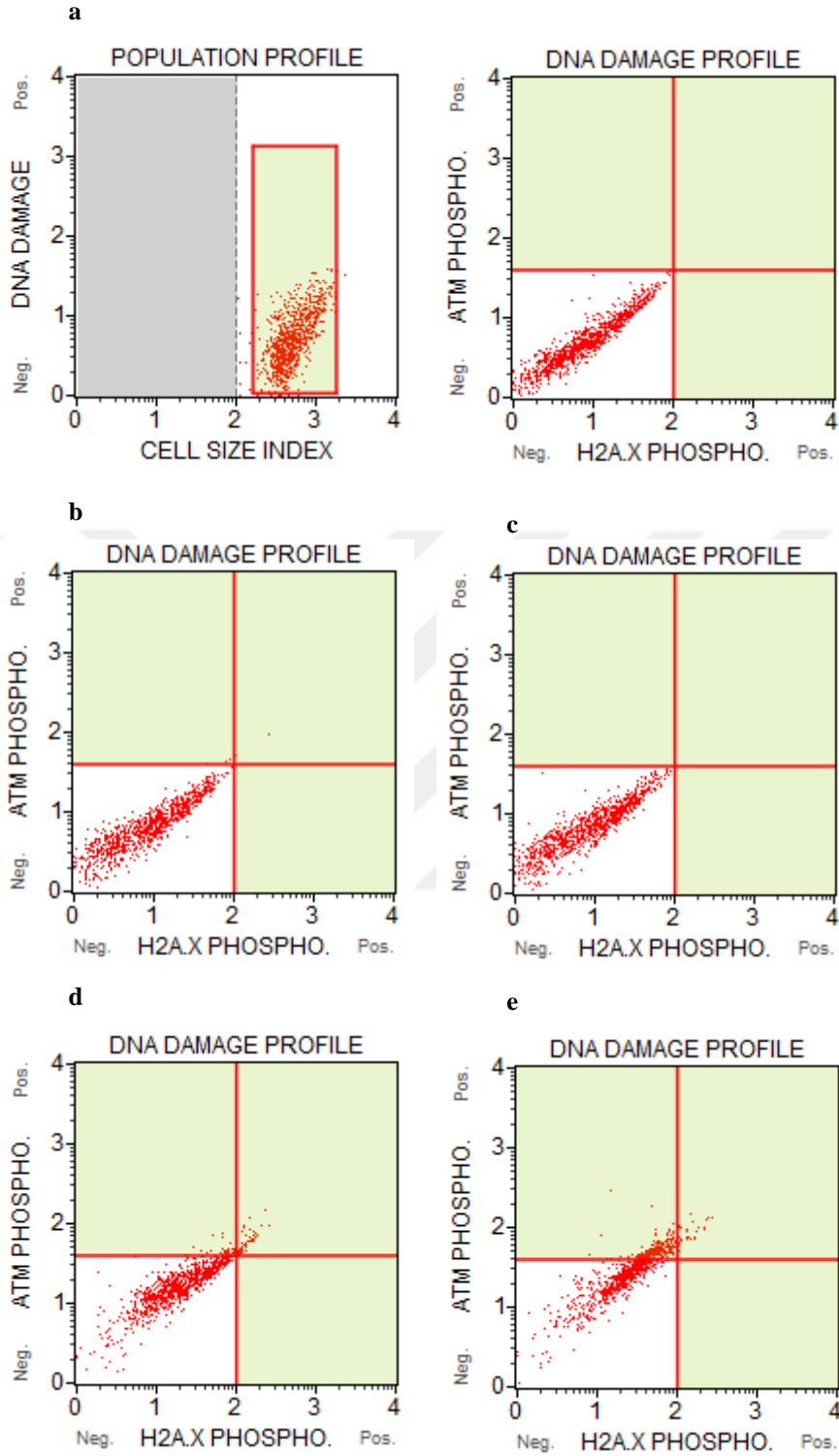
uygulanan MCF-10A hücrelerinde, p-ATM miktarı %0.10 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde p-ATM , p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %11.33, %0.10 ve %4.51 olarak belirlendi (Şekil 144). 12. günün sonunda ise 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde p-ATM , p-H2AX ve dsDNA miktarı sırasıyla %0.31, %0.0 ve %0.31 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde bu oranlar sırasıyla %26.14, %0.0 ve %3.42 olarak analiz edildi (Şekil 145). Farklı konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde kontrol ile karşılaştırmalı olarak canlı hücre, p-ATM, p-H2AX, dsDNA ve toplam DNA hasarı miktarı Tablo 66’da özetlendi.

Tablo 66. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde DNA hasarına ait veriler

	Kontrol		0.01		0.1		1		10	
	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g	6 g	12 g
Negatif (LL)	%100.00	%99.90	%99.90	%99.38	%99.90	%100.00	%98.57	%90.62	%84.05	%70.44
pATM (UL)	%0.00	%0.00	%0.10	%0.31	%0.10	%0.00	%1.12	%4.18	%11.33	%26.14
dsDNA (UR)	%0.00	%0.00	%0.00	%0.31	%0.00	%0.00	%0.20	%5.20	%4.51	%3.42
pH2A.X (LR)	%0.00	%0.10	%0.00	%0.00	%0.00	%0.00	%0.10	%0.00	%0.10	%0.00
Toplam DNA hasarı (UL+UR+LR)	%0.00	%0.10	%0.10	%0.62	%0.10	%0.00	%1.43	%9.38	%15.95	%29.56



Şekil 144. 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM



Şekil 145. 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde, DNA hasarına ait histogramlar (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM, (e) 10 nM.

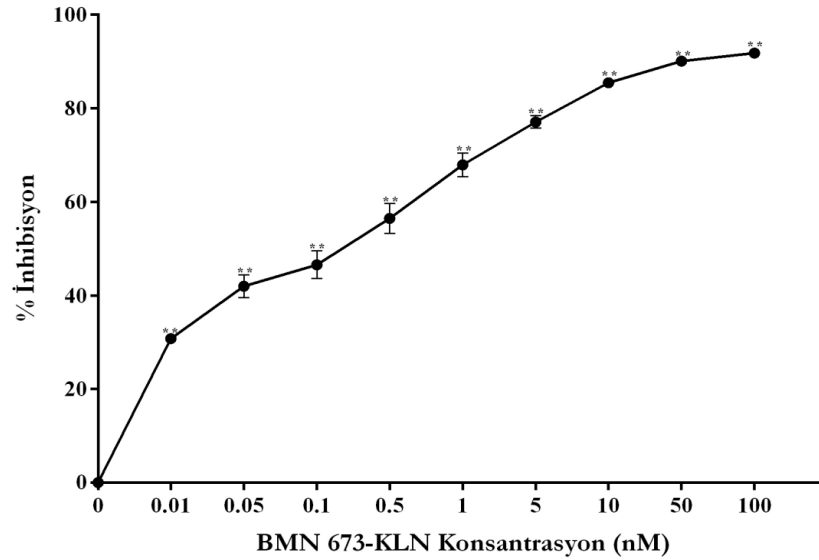
Sonuç olarak, 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde p-H2AX ve dsDNA miktarlarında BMN 673'e göre daha fazla oranda artış belirlenirken,

12. günün sonunda ise, hücrelerde dsDNA miktarında artış, ancak 1 nM BMN 673-KLN konsantrasyonundan itibaren p-H2AX miktarında azalış analiz edildi. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, özellikle dsDNA miktarında BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin kırılmasından dolayı doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir artış belirlendi. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, özellikle p-ATM miktarında artış belirlenmesine rağmen, BMN 673 uygulanan hücrelere göre dsDNA miktarında azalış tespit edildi.

4.26. BMN 673-KLN'nin PARP Aktivasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin PARP aktivasyonu üzerinde etkisi incelendiği zaman, uygulanan BMN 673-KLN'nin konsantrasyonu arttıkça PARP aktivasyonunda da doza bağlı olarak anlamlı bir azalış belirlenmiştir ($p < 0.01$).

0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 nM BMN 673-KLN'nin PARP aktivasyonu üzerinde inhibisyon etkisi incelendiğinde sırasıyla %30.8, %46.6, %67.9, %85.5 ve %91.8 olarak belirlendi ($p < 0.01$, Şekil 146) ve elde edilen verilere göre BMN 673-KLN'nin IC_{50} konsantrasyonu 0.24 ± 0.02 nM olarak hesaplandı. Sonuç olarak, BMN 673-KLN'nin BMN 673'e göre daha fazla oranda PARP aktivasyonunu anlamlı derecede inhibe ettiği ($p < 0.01$) ve BMN 673'e göre IC_{50} konsantrasyonunun daha düşük belirlenmiştir.



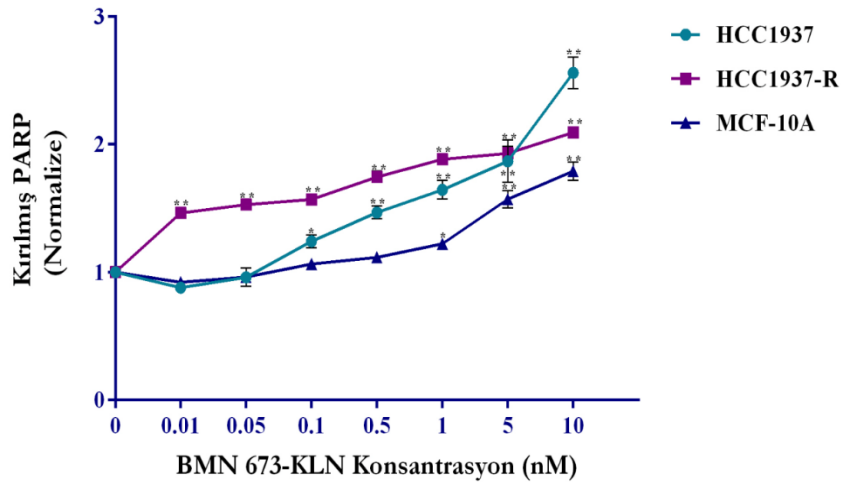
Şekil 146. BMN 673-KLN'nin PARP aktivasyonu üzerinde inhibisyon etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n=3$)

4.27. BMN 673-KLN'nin PARP Proteini Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Belirlenen konsantrasyonlarda (0.01-10 nM) BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde hücrelerde normalize edilen 89 kDa kırılmış PARP fragmentinin kantitatif seviyesinin doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir.

HCC1937 hücrelerinde normalize kırılmış PARP miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (1.0-kat), 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla 0.88-, 1.24-, 1.65- ve 2.56-kat değişiklik belirlenmesine rağmen, HCC1937-R hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (1.0-kat), sırasıyla 1.47-, 1.57-, 1.88- ve 2.09- kat değiştiği analiz edildi ($p<0.01$, Şekil 157). MCF-10A hücrelerinde ise normalize kırılmış PARP miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (1.0-kat), 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla 0.92-, 1.05-, 1.23- ve 1.80-kat değiştiği belirlendi ($p<0.01$, Şekil 147).

Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde, 89 kDa kırılmış PARP fragmentinin kantitatif miktarında BMN 673'e göre daha fazla miktarda doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673'ün toksik etkisinden azalmasından dolayı normalize kırılmış PARP miktarındaki değişim BMN 673'e göre daha az miktarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar hücrelerde BMN 673-KLN'nin apoptoz üzerinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Annexin V-PI sonuçları ile paralellik göstermektedir.

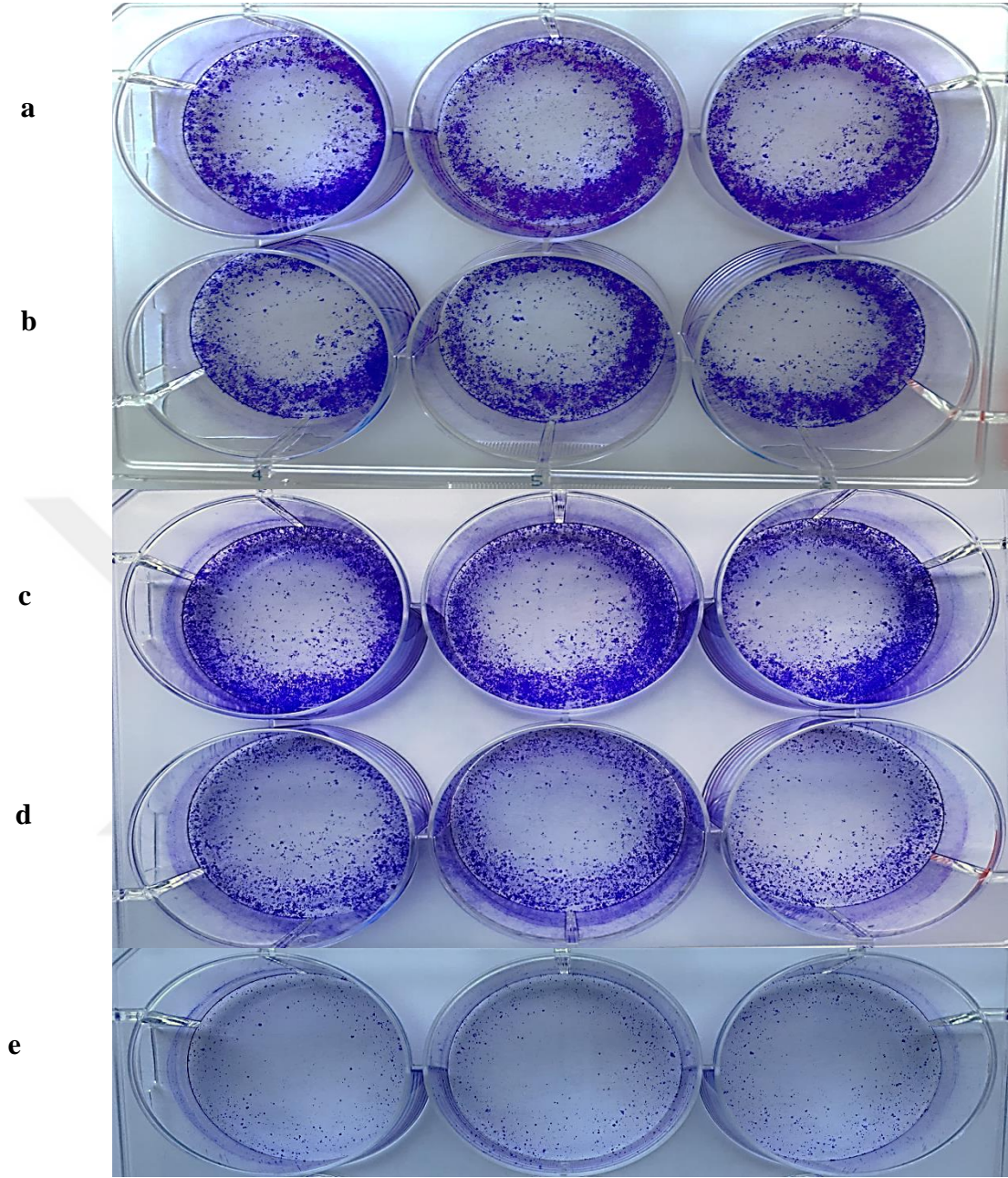


Şekil 147. HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin 89 kDa PARP fragmenti üzerinde kantitatif etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; n=3).

4.28. BMN 673-KLN'nin Hücrelerde Koloni Oluşumu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerinde etkisi incelendiğinde, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hücrelerde koloni sayısında doza bağlı olarak anlamlı bir azalış belirlendi ($p<0.01$).

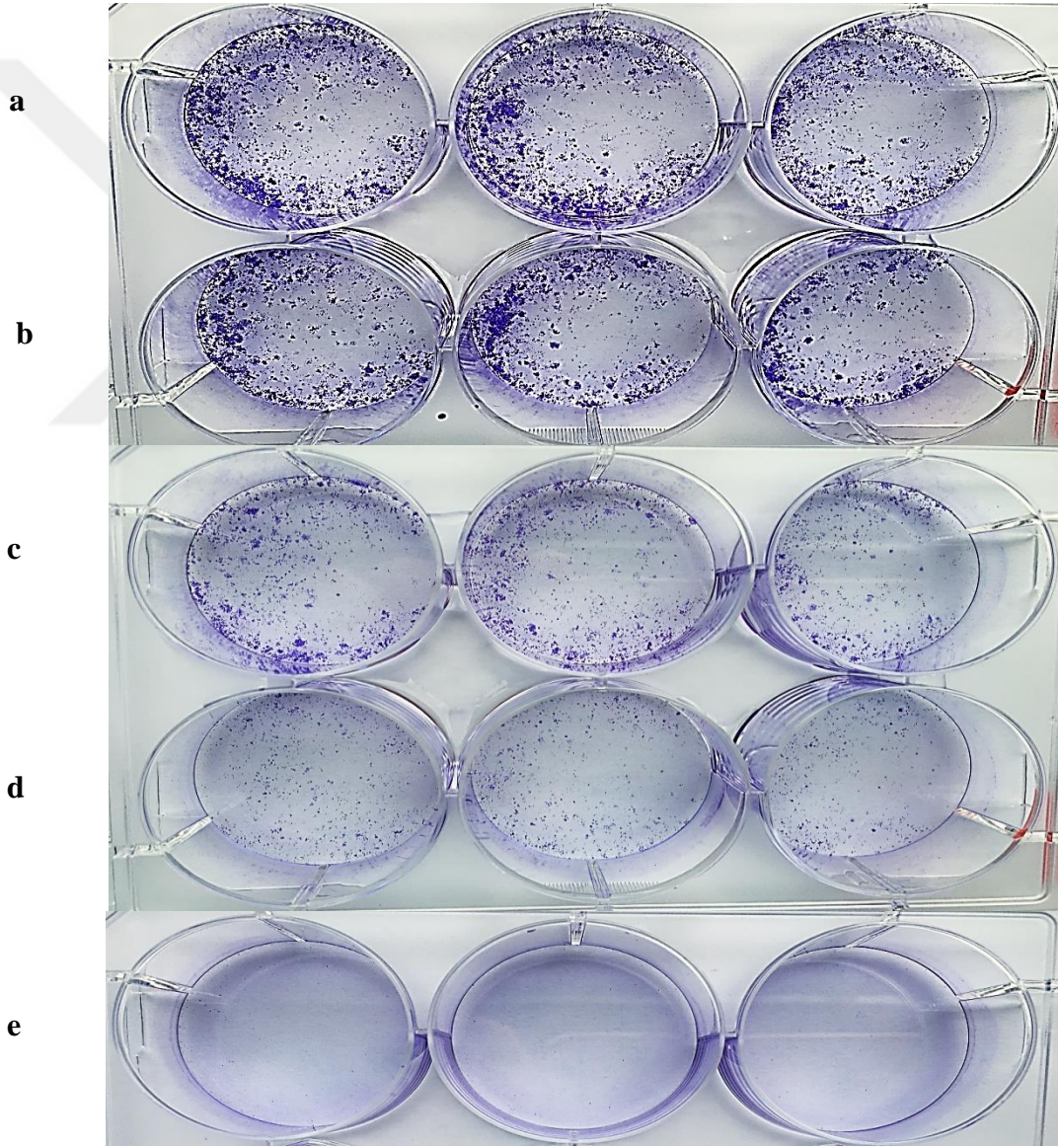
HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin etkisi incelendiğinde, hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin doza bağlı olarak BMN 673'e göre daha fazla oranda azaldığı görülmektedir (Şekil 148). HCC1937 kontrol grubunda ortalama koloni sayısı 443 iken, 0.01, 0.1 ve 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ortalama koloni sayısı sırasıyla 244, 208, 81 ve 18 olarak sayıldı ($p<0.01$, Şekil 151). 6 kuyulu plakada her bir kuyuya ekilen HCC1937 hücrelerinde kontrol grubunda ortalama kaplama verimliliği 44.3 ± 1.06 belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ortalama kaplama verimliliği sırasıyla 24.4 ± 0.95 , 20.8 ± 0.30 , 8.1 ± 0.80 ve 1.8 ± 0.30 olarak hesaplandı. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla 55.0 ± 2.00 , 47.0 ± 1.50 , 18.0 ± 1.38 ve 4.0 ± 0.59 'e azaldığı belirlendi (Tablo 67).



Şekil 148. BMN 673-KLN'nin HCC1937 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde üzerindeki etkisi (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM ve (e) 10 nM.

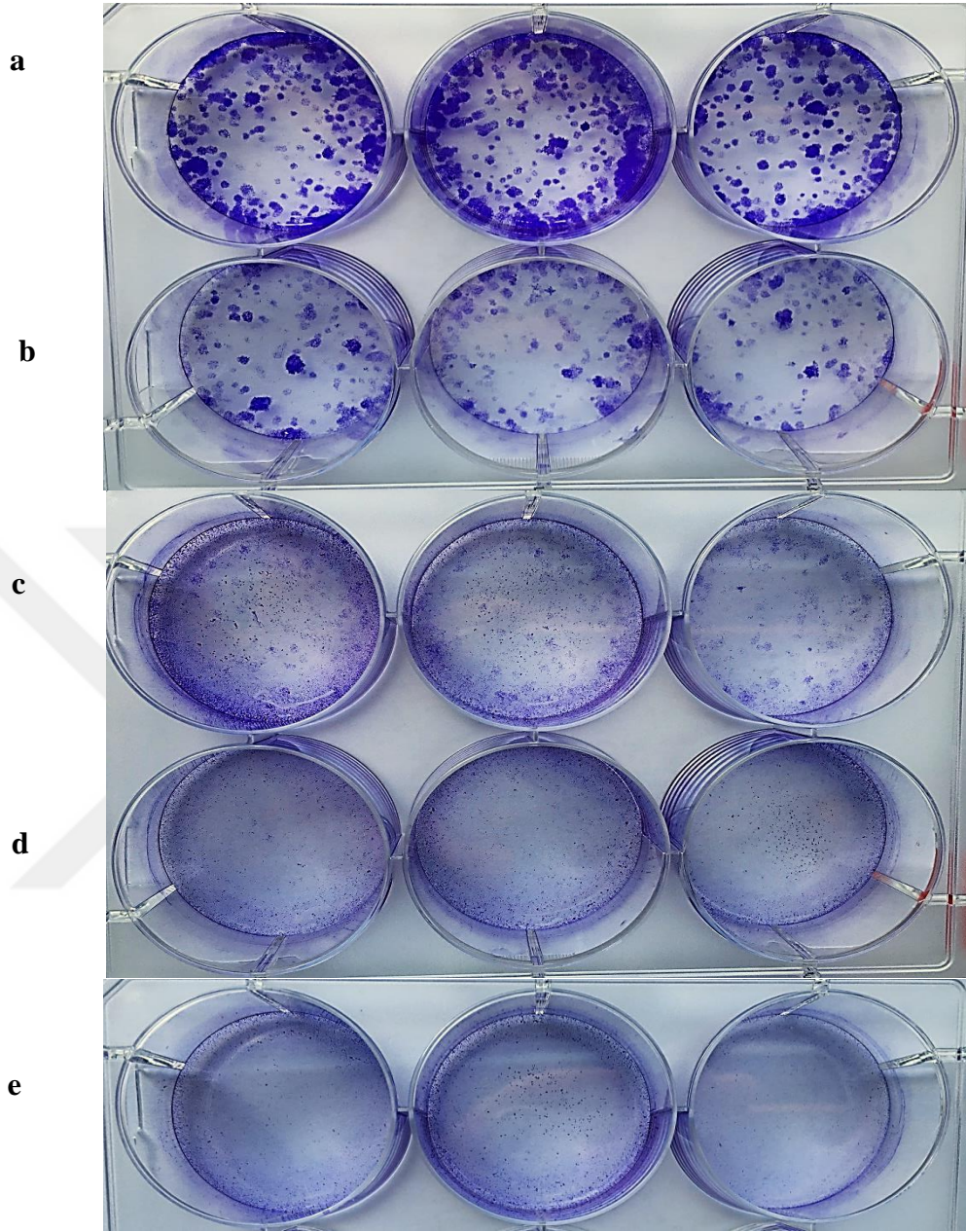
HCC1937-R hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerinde BMN 673-KLN'nin etkisi incelendiğinde, BMN 673-KLN'nin HCC1937-R hücrelerindeki koloni sayısının doza bağlı olarak azalmasında BMN 673'e göre daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 149). Ayrıca 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde herhangi bir koloni gözlemlenmemiştir. HCC1937-R kontrol grubunda ortalama

koloni sayısı 270 iken 0.01, 0.1 ve 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde ortalama koloni sayısı sırasıyla 256, 175 132 ve 0 olarak sayıldı ($p < 0.01$, Şekil 151). 6 kuyulu plakada her bir kuyuya ekilen HCC1937-R hücrelerinde kontrol grubunda ortalama kaplama verimliliği $\%27.0 \pm 0.70$ belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ortalama kaplama verimliliği sırasıyla $\%25.6 \pm 0.61$, $\%17.5 \pm 0.65$, $\%13.2 \pm 1.01$ ve $\%0.0$ olarak hesaplandı. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla $\%96.0 \pm 2.40$, $\%65.0 \pm 2.24$, $\%36.0 \pm 3.18$ ve $\%0$ olarak belirlendi (Tablo 67).

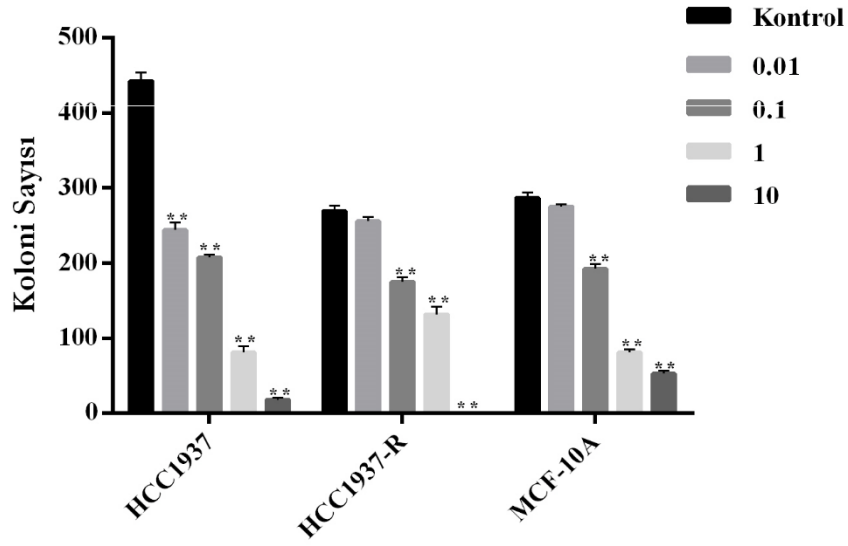


Şekil 149. BMN 673-KLN'nin HCC1937-R hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde üzerindeki etkisi (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM ve (e) 10 nM

MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin koloni oluşturma yetenekleri üzerinde etkisine bakıldığında, BMN 673-KLN'nin BMN 673'ün toksik etkisini azaltmasından dolayı doza bağlı olarak koloni sayısında azalma görülmesine rağmen koloni sayısı BMN 673-KLN uygulanan hücrelerden daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 150). MCF-10A kontrol grubunda ortalama koloni sayısı 287 iken 0.01, 0.1 ve 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ortalama koloni sayısı sırasıyla 275, 192, 81 ve 53 olarak sayıldı ($p < 0.01$, Şekil 151). 6 kuyulu plakada her bir kuyuya ekilen MCF-10A hücrelerinde kontrol grubunda ortalama kaplama verimliliği $\%287 \pm 7.21$ belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ortalama kaplama verimliliği sırasıyla $\%275 \pm 3.21$, $\%192 \pm 6.42$, $\%81 \pm 3.51$ ve $\%53.0 \pm 4.0$ olarak hesaplandı. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde canlılık oranları sırasıyla $\%96.0 \pm 1.30$, $\%67.0 \pm 2.72$, $\%28.0 \pm 0.83$ ve $\%18.0 \pm 1.84$ 'e azaldığı belirlendi (Tablo 67).



Şekil 150. BMN 673-KLN'nin MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğinde üzerindeki etkisi (a) Kontrol, (b) 0.01 nM, (c) 0.1 nM, (d) 1 nM ve (e) 10 nM.



Şekil 151. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde doza bağlı olarak koloni sayısında değişim (*p<0.05; **p<0.01; n=3).

Tablo 67. BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerinde etkisi

Hücre	Doz (nM)	Ekilen hücre sayısı	Koloni sayısı (n=3)			Ortalama koloni sayısı	S.S	Kaplama verimliliği (%)	Canlılık oranı (%)
HCC1937	Kontrol	1000	431	452	445	443	10.7	44.3	100
	0.01	1000	237	241	255	244	9.5	24.4	55
	0.1	1000	208	205	211	208	3.0	20.8	47
	1	1000	73	89	82	81	8.0	8.1	18
	10	1000	15	21	18	18	3.0	1.8	4
HCC1937-R	Kontrol	1000	262	275	272	270	6.8	27.0	100
	0.01	1000	257	261	249	256	6.1	25.6	95
	0.1	1000	175	168	181	175	6.5	17.5	65
	1	1000	137	120	138	132	10.1	13.2	36
	10	1000	0	0	0	0	0.0	0	0
MCF-10A	Kontrol	100	295	285	281	287	7.2	287	100
	0.01	100	279	274	273	275	3.2	275	96
	0.1	100	195	185	197	192	6.4	192	67
	1	100	85	78	81	81	3.5	81	28
	10	100	49	53	57	53	4.0	53	18

Sonuç olarak, BMN 673-KLN, HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde artan konsantrasyona bağlı olarak BMN 673'e göre daha fazla oranda canlılık oranında ve koloni sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, MCF-10A hücrelerinde KLN formülasyonunun BMN 673'ün toksik etkisini azaltmasından dolayı BMN 673'e göre daha az miktarda koloni sayısında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

4.29. BMN 673-KLN'nin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

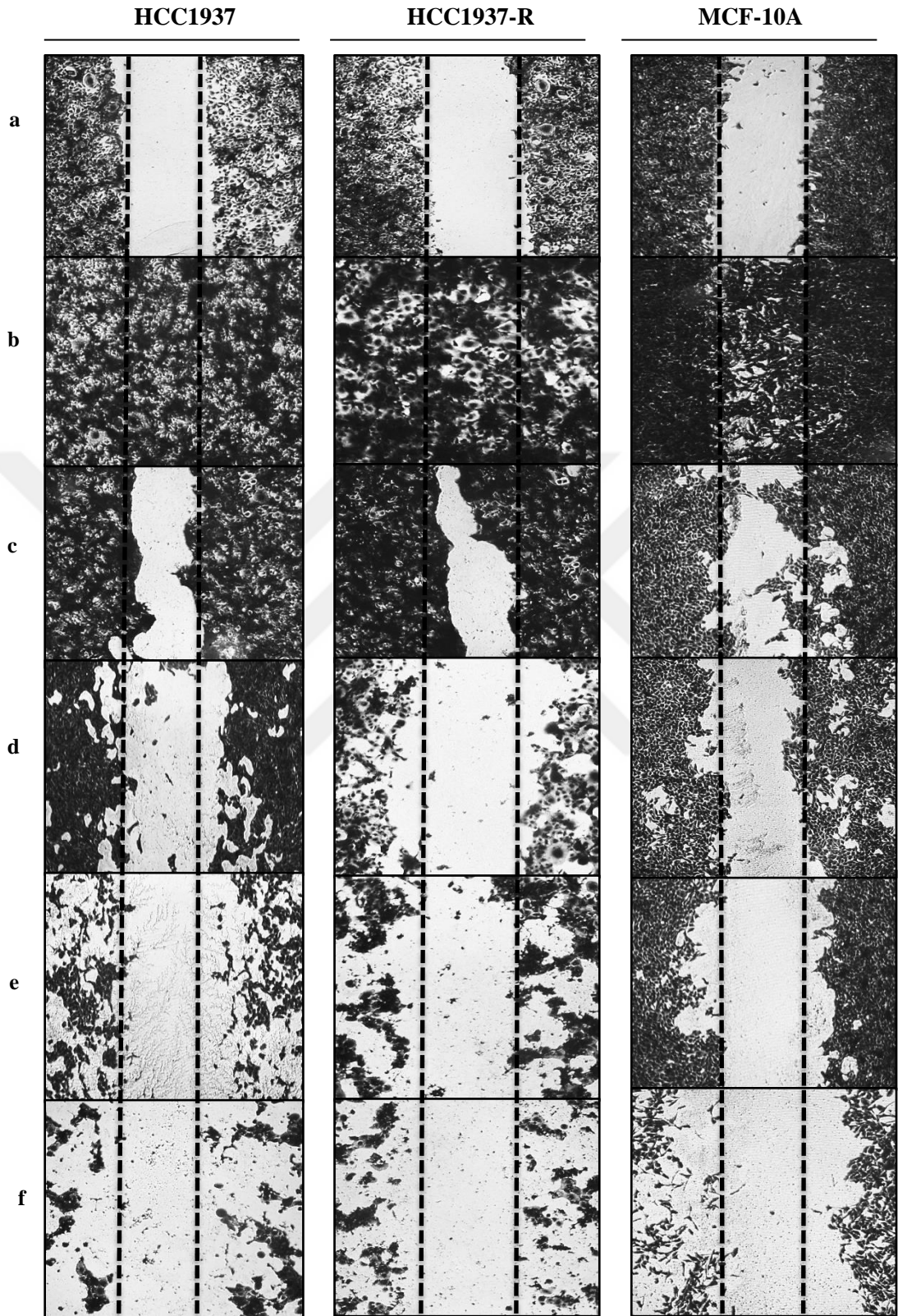
BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinin migrasyon yetenekleri üzerinde etkisi incelendiğinde, her bir deney grubunda yara iyileşme alanı elde edildikten 72 saat sonra kontrol gruplarında tamamen yara alanının kapanmasına rağmen, BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon yeteneklerinde azalışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 152).

HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon hızının azaldığı ve migrasyon mesafe (yara iyileşme) alanının arttığı görülmüştür.

HCC1937-R hücrelerinde belirlenen konsantrasyonlarda BMN 673-KLN uygulandıktan 72 saat sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, HCC1937 hücrelerinde olduğu gibi artan konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon hızında azalışa paralel olarak migrasyon mesafesinde artış gözlemlendi.

MCF-10A hücrelerinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KLN formülasyonunun BMN 673'ün toksik etkisini azaltmasından dolayı doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerde migrasyon mesafesinde artış gözlemlenmesine rağmen bu mesafenin BMN 673 uygulanan hücrelere göre daha az oranda olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, BMN 673-KLN, HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücrelerin migrasyon hızında azalmaya ve migrasyon mesafesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ancak BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinin migrasyon yeteneklerindeki değişimin BMN 673'e göre daha fazla olduğu ve ayrıca MCF-10A kontrol hücrelerinde ise BMN 673'egöre daha az oranda migrasyon mesafesinde azalma görülmüştür. Hücrelerin doza bağlı olarak migrasyon yeteneklerinde değişimler diğer deneylerde elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir

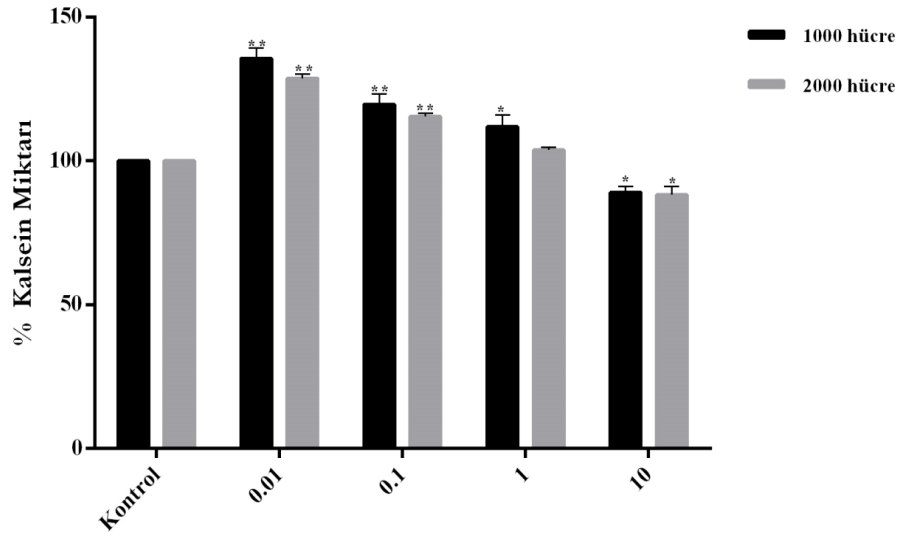
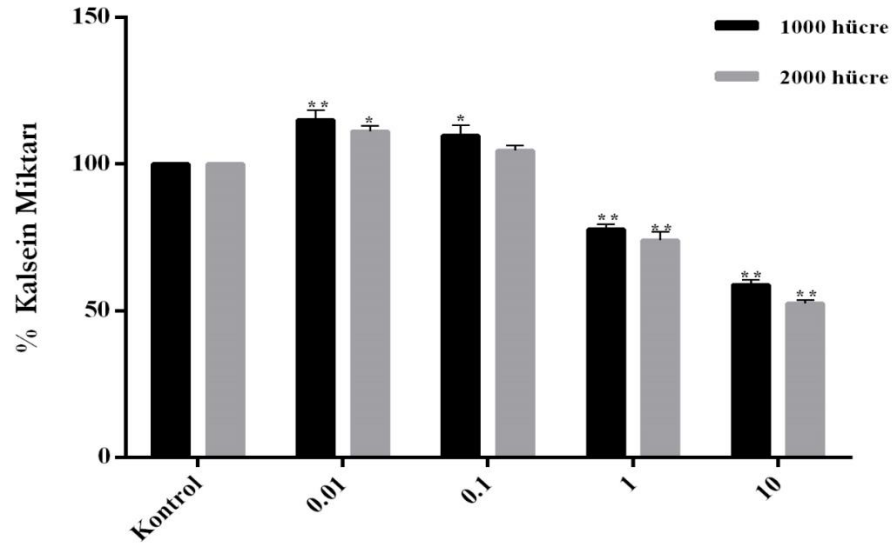


Şekil 152. BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde yara iyileşmesi üzerindeki etkisi (a) Yara iyileşme alanı, (b) Kontrol, (c) 0.01 nM, (d) 0.1 nM, (e) 1 nM, (f) 10 nM.

4.30. BMN 673-KLN'nin Hücrelerde Kalsein Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler alanda kalsein birikme miktarında etkisi incelendiğinde, HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde doza bağlı olarak intraselüler kalsein miktarında azalma belirlenmesine rağmen, hücrelerde BMN 673'e göre daha fazla oranda intraselüler kalsein miktarı gözlemlenmiştir.

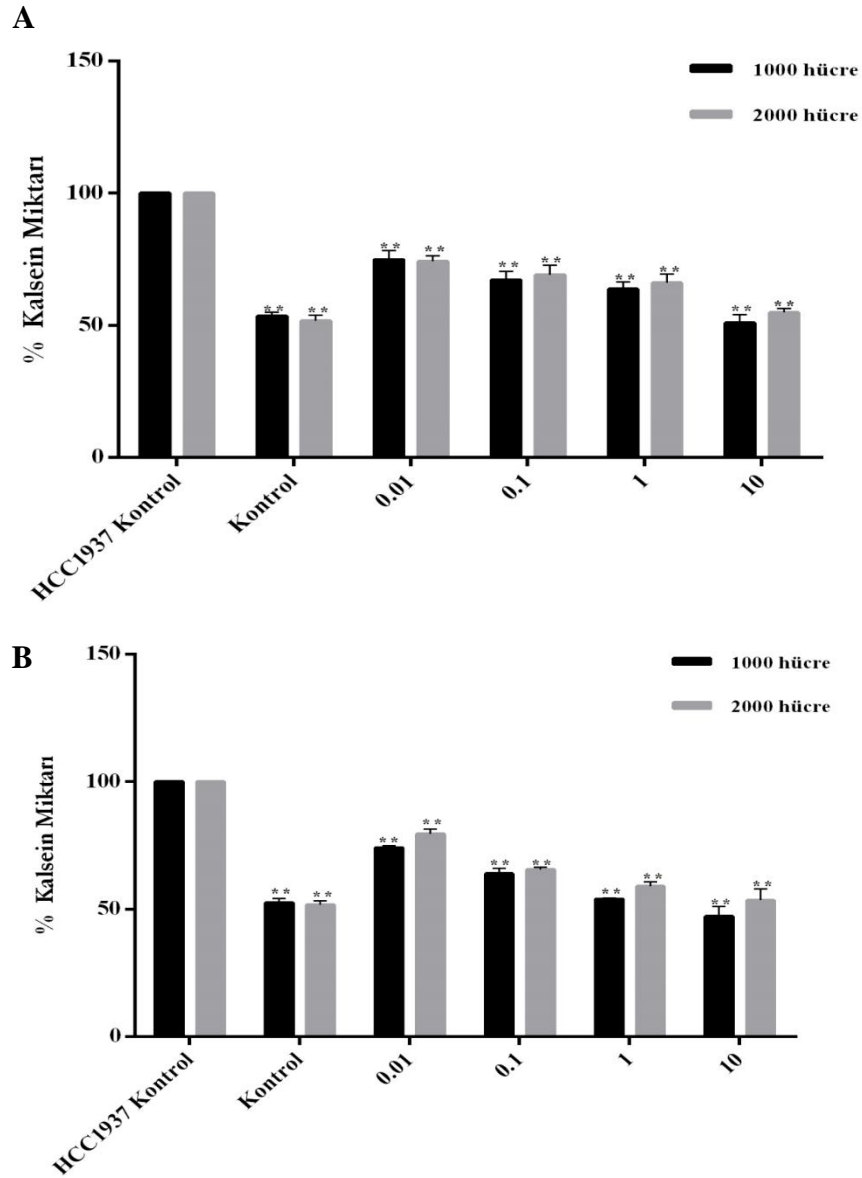
HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler kalsein miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, 96'lı plakaların her bir kuyu başına 1000 ve 2000 hücre ekilen deneyde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde intraselüler kalsein miktarı 1000 hücre için sırasıyla %135.7, %119.7, %111.9 ve %89.0 belirlenmesine rağmen, 2000 hücre için sırasıyla %128.8, %115.5, %103.8 ve %88.1 olarak analiz edildi ($p < 0.05$). 12. günün sonunda ise 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde intraselüler kalsein miktarı 1000 hücre için sırasıyla %115.0, %110.0, %77.8 ve %58.9 iken, 2000 hücre için sırasıyla %111.1, %104.7, %74.0 ve %52.6 olarak belirlendi (Şekil 153, $p < 0.01$).

A**B**

Şekil 153. HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler kalsin miktarındaki (A) 6 gün, (B) 12 günde etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

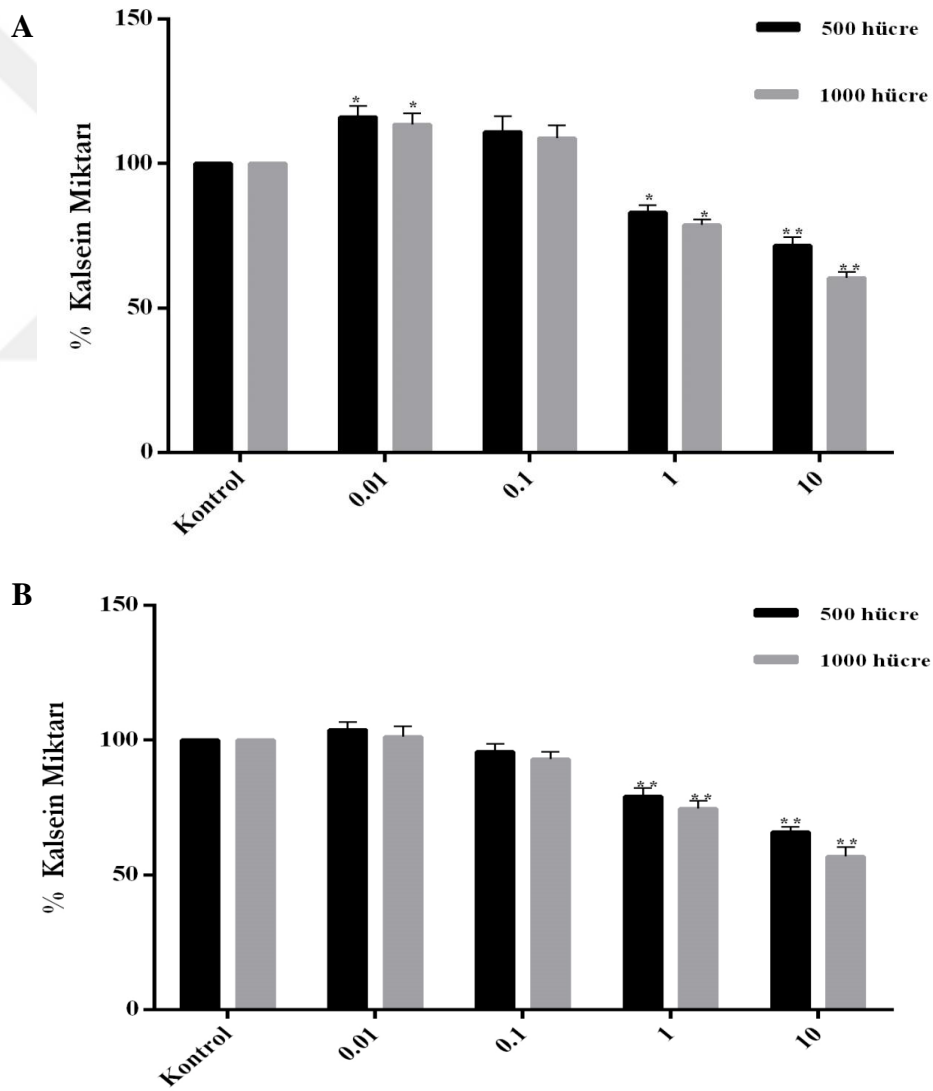
HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler kalsin miktarı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 96'lı plakaların her bir kuyu başına 1000 ve 2000 hücre ekilen deneyde, HCC1937 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1000 hücre için kontrol grubunda %53.5 iken, 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde intraselüler kalsin miktarı sırasıyla %74.9, %67.3, %63.8 ve %51.0 olarak belirlendi. 2000 hücre için ise intraselüler kalsin miktarı kontrol grubunda % 51.7 iken, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %74.1, %69.2, %66.0 ve %55.0 olarak analiz edildi ($p < 0.01$). 12. günün

sonunda ise 1000 hücre için kontrol grubunda intraselüler kalsein miktarı %52.5 iken, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde intraselüler kalsein miktarı sırasıyla %74.1, %64.0, %54.0 ve %47.3 olarak analiz edildi. 2000 hücre için ise, kontrol grubunda intraselüler kalsein miktarı %51.8 belirlenmesine rağmen, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %79.6, %65.6, %59.0 ve %53.5 olarak tespit edildi ($p<0.01$, Şekil 154).



Şekil 154. HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler kalsein miktarındaki (A) 6 gün, (B) 12 günde etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$).

MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler kalsein miktarı üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise, 96'lı plakaların her bir kuyu başına 500 ve 1000 hücre ekilen deneyde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde 500 hücre için intraselüler kalsein miktarı sırasıyla %116.1, %111.0, %83.1 ve %71.7 iken, 1000 hücre için sırasıyla %113.6, %108.9, %78.8 ve %60.6 olarak belirlendi ($p<0.01$). 12. günün sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde intraselüler kalsein miktarı 500 hücre için sırasıyla %103.9, %95.8, %79.1 ve %66.0 belirlenmesine rağmen, 1000 hücre için sırasıyla %101.3, %93.0, %74.6 ve %56.9 olarak analiz edildi (Şekil 155, $p<0.01$).



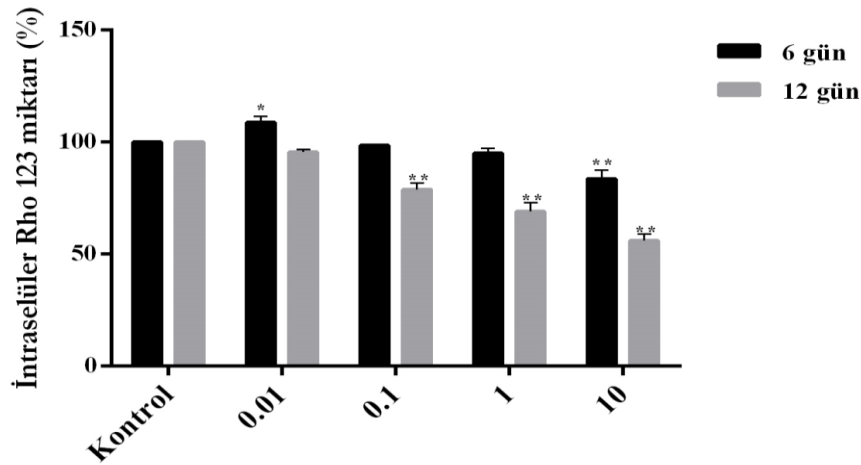
Şekil 155. MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler kalsein miktarındaki (A) 6 gün, (B) 12 günde etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$).

Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler kalsein miktarının doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmesine rağmen ($p < 0.01$), azalış miktarının BMN 673'e göre daha az oranda olduğu görülmektedir. Yaklaşık %50 oranında P-gp ve/veya MRP1 aktivitesi gözlenen HCC1937-R hücrelerinde ise BMN 673-KLN uygulandığında intraselüler kalsein miktarında doza bağlı olarak BMN 673'e göre daha az oranda azalış belirlendiği için KLN formülasyonunun BMN 673'e karşı gelişen ilaç direnci ve/veya artan ABC taşıyıcı ailesinin üyelerinin (P-gp ve MRP1) aktivitelerinde azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir.

4.31. BMN 673-KLN'nin İntraselüler Rhodamin 123 Miktarı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

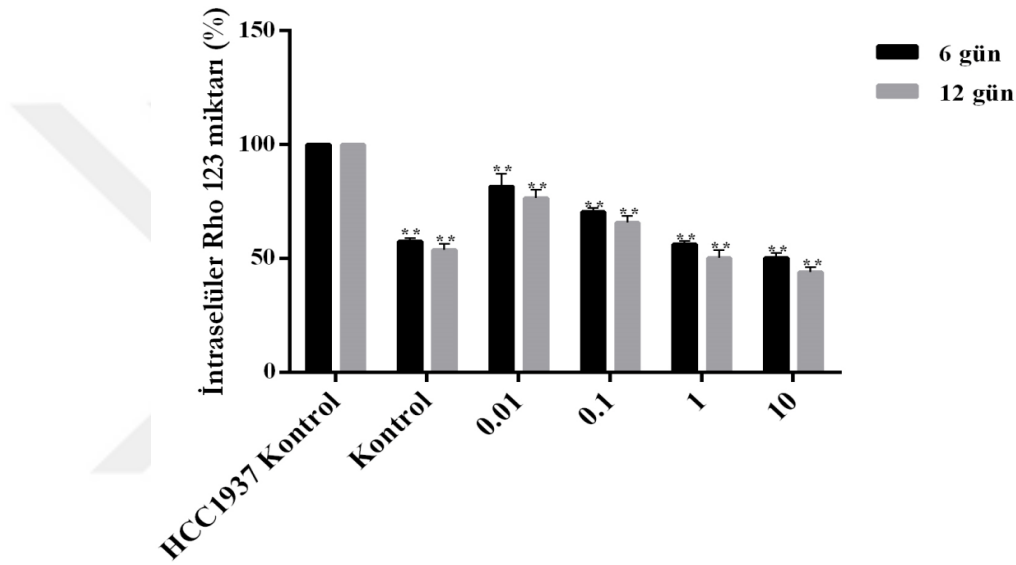
BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler Rhodamin 123 (Rho 123) miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, artan zamana ve konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde intraselüler Rho 123 miktarında azalma olmasına rağmen Rho 123'ün floresans yoğunluğundaki azalma BMN 673'e göre daha az oranda belirlenmiştir.

HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler Rho 123 miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde intraselüler Rho 123 miktarı sırasıyla %108.8, %98.6, %95.0 ve %83.7 iken, 12. günün sonunda sırasıyla %95.5, %78.9, %69.0 ve %56.0 olarak belirlendi ($p < 0.01$, Şekil 156).



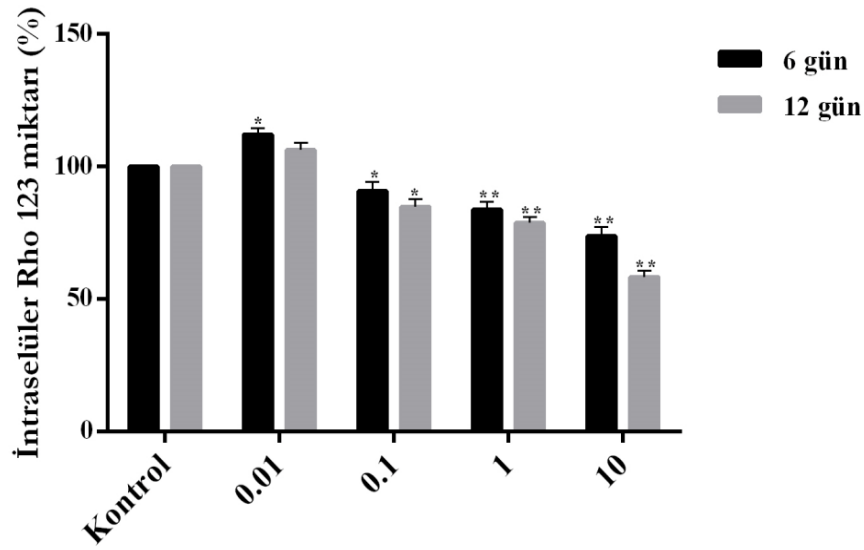
Şekil 156. HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler Rho 123 miktarındaki etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n=3$).

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler Rho 123 miktarı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, HCC1937-R kontrol grubu intraselüler Rho 123 miktarı HCC1937 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %57.7 iken, 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %81.7, %70.6, %56.4 ve %50.3 olarak analiz edildi ($p<0.01$). 12. günün sonunda ise kontrol grubunda intraselüler Rho 123 miktarı %53.9 iken, 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %76.6, %65.9, %50.3 ve %44.2 olarak belirlendi ($p<0.01$, Şekil 157).



Şekil 157. HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler Rho 123 miktarındaki etkisi (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$).

MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler Rho 123 miktarı üzerine etkisi incelendiğinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla %112.2, %90.8, %83.8 ve %73.8 belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda intraselüler Rho 123 miktarı sırasıyla %106.3, %85.0, %78.8 ve %53.5 olarak analiz edildi ($p<0.01$, Şekil 158).



Şekil 158. MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin intraselüler Rho 123 miktarındaki etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$).

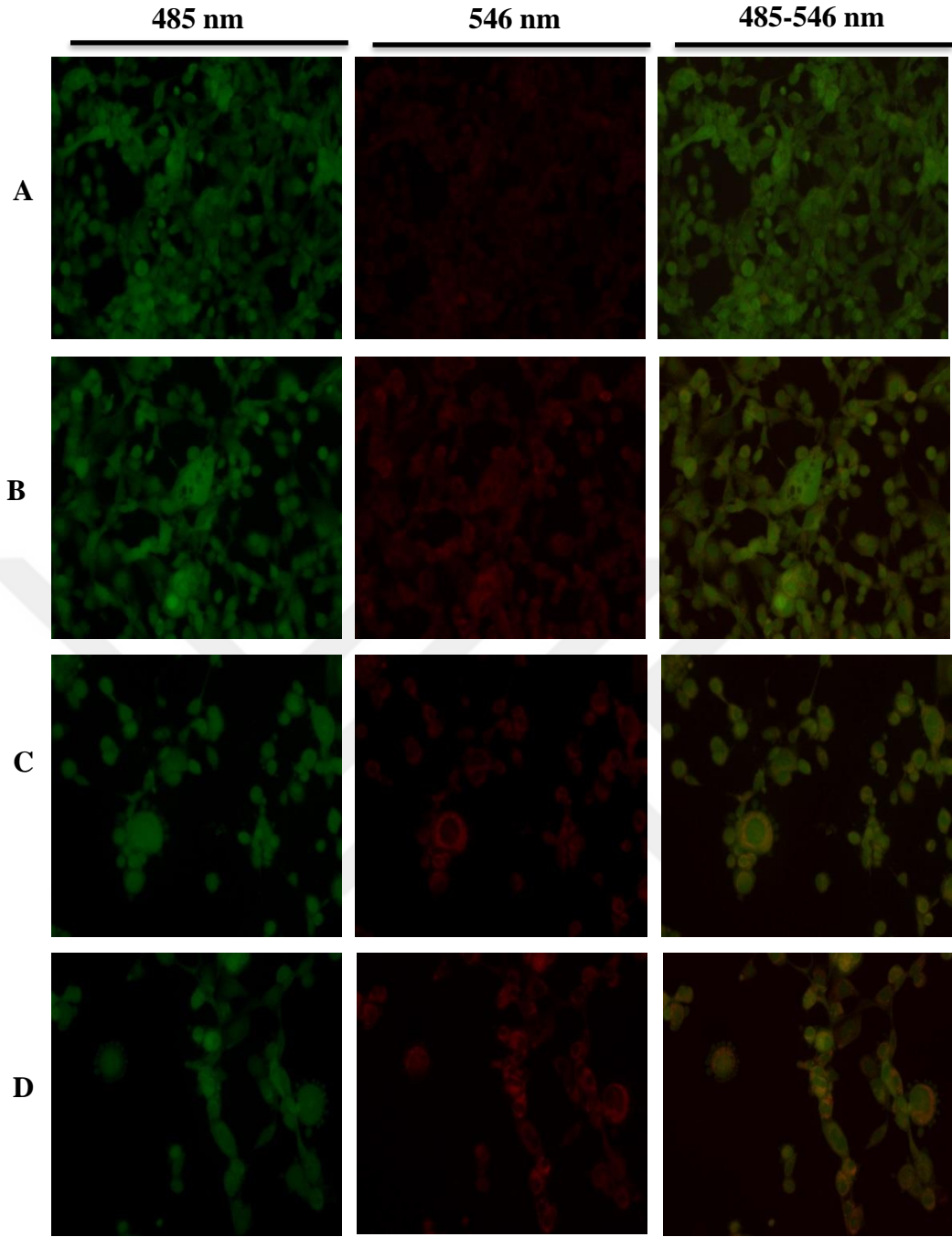
Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF10A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak intraselüler Rho123 miktarında anlamlı bir azalış belirlenmesine rağmen ($p < 0.01$), Rho 123 miktarında değişim BMN 673'e göre daha az oranda belirlenmiştir. Özellikle MCF-10A hücrelerinde KLN formülasyonunun BMN 673'ün toksik etkisini azaltmasından dolayı intraselüler Rho123 miktarı BMN 673'e göre anlamlı derecede daha fazla oranda analiz edilmiştir. Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e karşı gelişen ilaç direnci ve artan P-gp ve/veya MRP1 aktivitesine rağmen intraselüler Rho 123 miktarı BMN 673'e göre daha yüksek oranda olduğu için KLN formülasyonunun P-gp ve/veya MRP1 aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

BMN 673-KLN'nin intraselüler Rho 123 miktarında etkisinin valide edilmesi amacıyla, 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R Rho 123'ün floresans yoğunluğu değerlendirildiğinde, mitokondrilerde meydana gelen hasarlardan dolayı doza bağlı olarak Rho123 miktarının BMN 673'e göre daha fazla oranda sitozolde arttığı ve dolayısıyla hücrelerin apoptotik ölüme uğradığı gözlemlendi. Ancak MCF-10A hücrelerinde ise KLN formülasyonunun BMN 673'ün sitotoksik etkisini azaltmasından dolayı sitozolde Rho 123 miktarı BMN 673'e göre daha az oranda belirlendi.

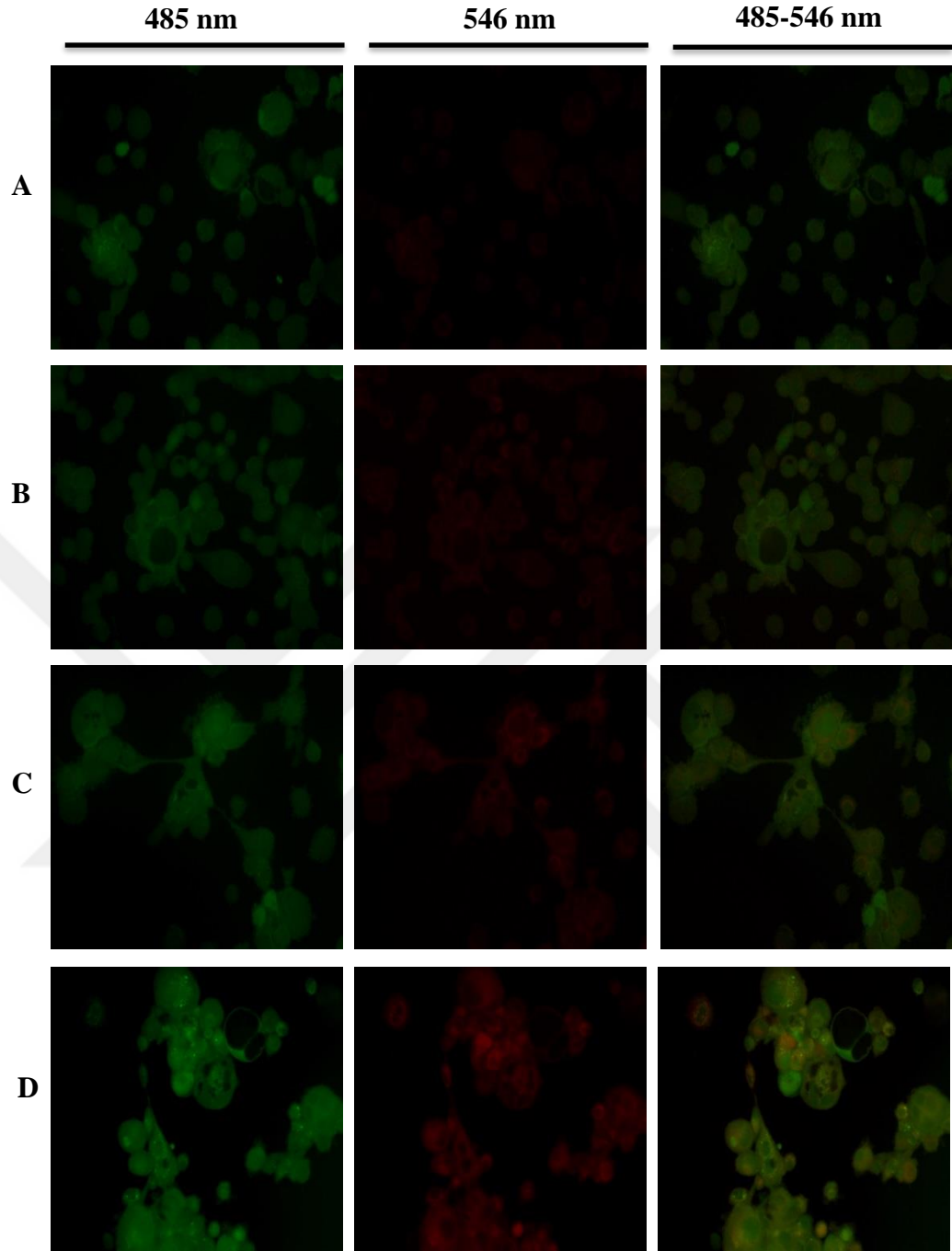
HCC1937 hücrelerinde uygulanan 12 gün boyunca BMN 673-KLN'nin konsantrasyonu arttıkça sitozolde artan Rho 123 miktarına paralel olarak hücreler arası

bağlantılarda kopmalar, hücrelerde meydana gelen boşluklar, hücrenin morfolojik yapısında değişimler ve çok sayıda apoptotik cisimcikler görüntüldü (Şekil 159). HCC1937-R hücrelerinde uygulanan BMN 673-KLN'nin konsantrasyonu arttıkça sitozolde Rho 123 floresans miktarının BMN 673'e göre daha fazla oranda arttığı ve hücrelerin apoptotik ölüme gittiği görüntüldü (Şekil 160). 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde özellikle 10 nM konsantrasyonda sitozolde Rho 123 miktarı artmasına rağmen, BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde 0.1 nM konsantrasyondan itibaren hücrelerde apoptotik ölümün başladığı ve doz arttıkça Rho 123 miktarının BMN 673'e göre daha fazla oranda arttığı gözlemlendi.

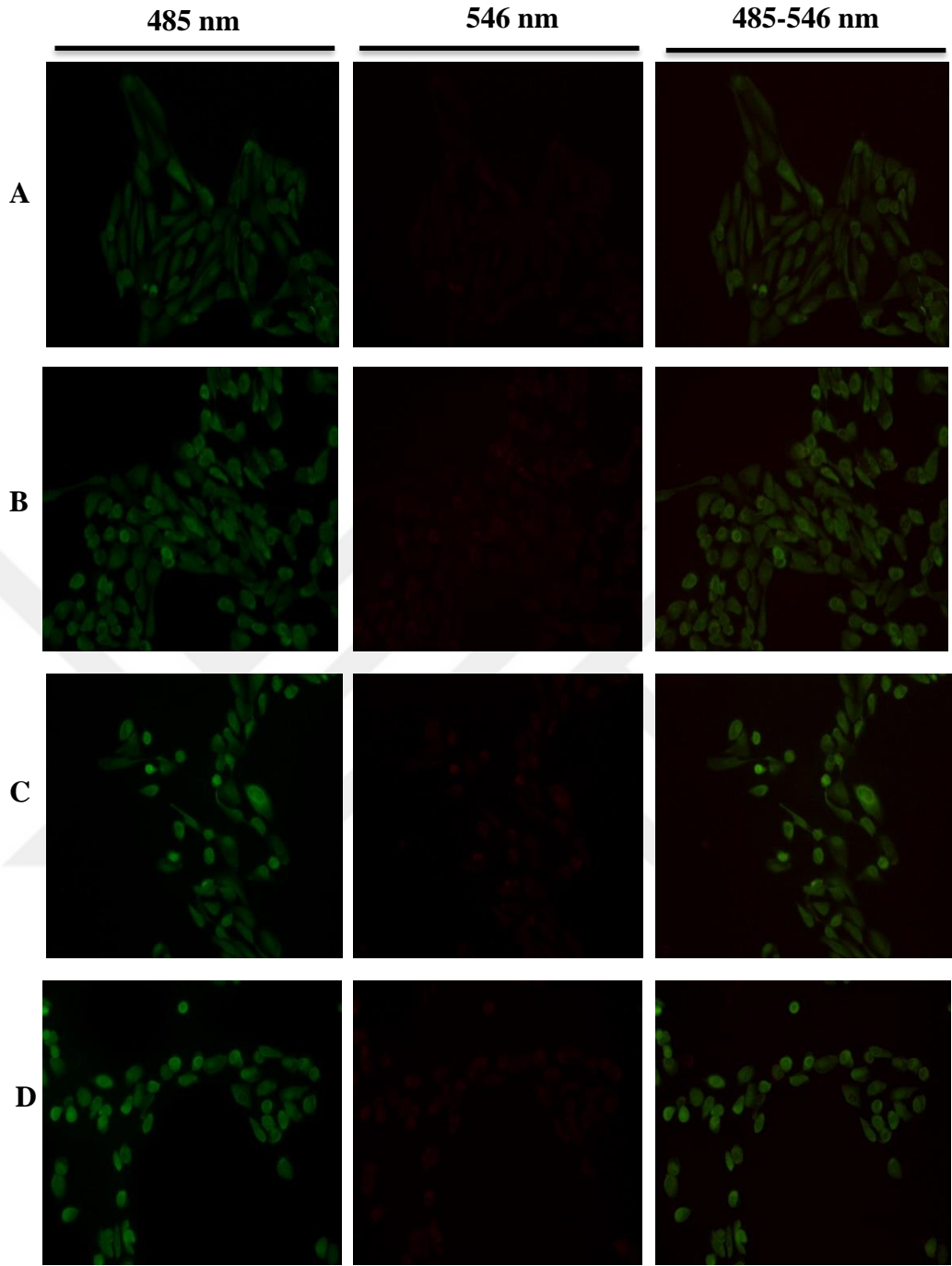
MCF-10A hücrelerinde ise, uygulanan BMN 673-KLN'nin konsantrasyonu arttıkça sitozolde Rho 123 miktarı artmasına rağmen, BMN 673'ün azalan sitotoksik etkisine bağlı olarak hücrelerin morfolojik yapılarının genel olarak aynı kaldığı ve BMN 673'e göre sitozolde daha az oranda Rho 123 miktarının olduğu gözlemlendi (Şekil 161).



Şekil 159. BMN 673-KLN'nin HCC1937 hücrelerinde sitozolde Rho 123 miktarı üzerinde etkisi. (A) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM.



Şekil 160. BMN 673-KLN'nin HCC1937-R hücrelerinde sitozolde Rho 123 miktarı üzerinde etkisi. (A) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM.



Şekil 161. BMN 673-KLN'nin MCF-10A hücrelerinde sitozolde Rho 123 miktarı üzerinde etkisi. (A) 0.01 nM, (C) 0.1 nM, (D) 1 nM, (E) 10 nM.

4.32. BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genlerde Mrna Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR yolağı ile ilişkili H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 ve MDR ile ilişkili, MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinde mRNA ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Şekil 162 ve 163'de sunuldu.

HCC1937 hücrelerinde HR yolağında görev alan H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde BMN 673-KLN'nin etkisi değerlendirildiğinde doza ve zamana bağlı olarak genlerin ifade düzeylerinin değiştiği belirlendi. 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1.29, 1.54, 1.28 ve 1.38 kat değişimi belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 3.97 (p=0.000), 3.80 (p=0.004), 4.41 (p=0.005) ve -1.80 kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla -1.06, 1.21, -2.36 (p=0.003) ve -3.16 (p=0.000) kat değişim saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 2.71, -1.22, 2.96 (p=0.039)ve -5.01 (p=0.000) kat değişim belirlendi (Şekil 162).

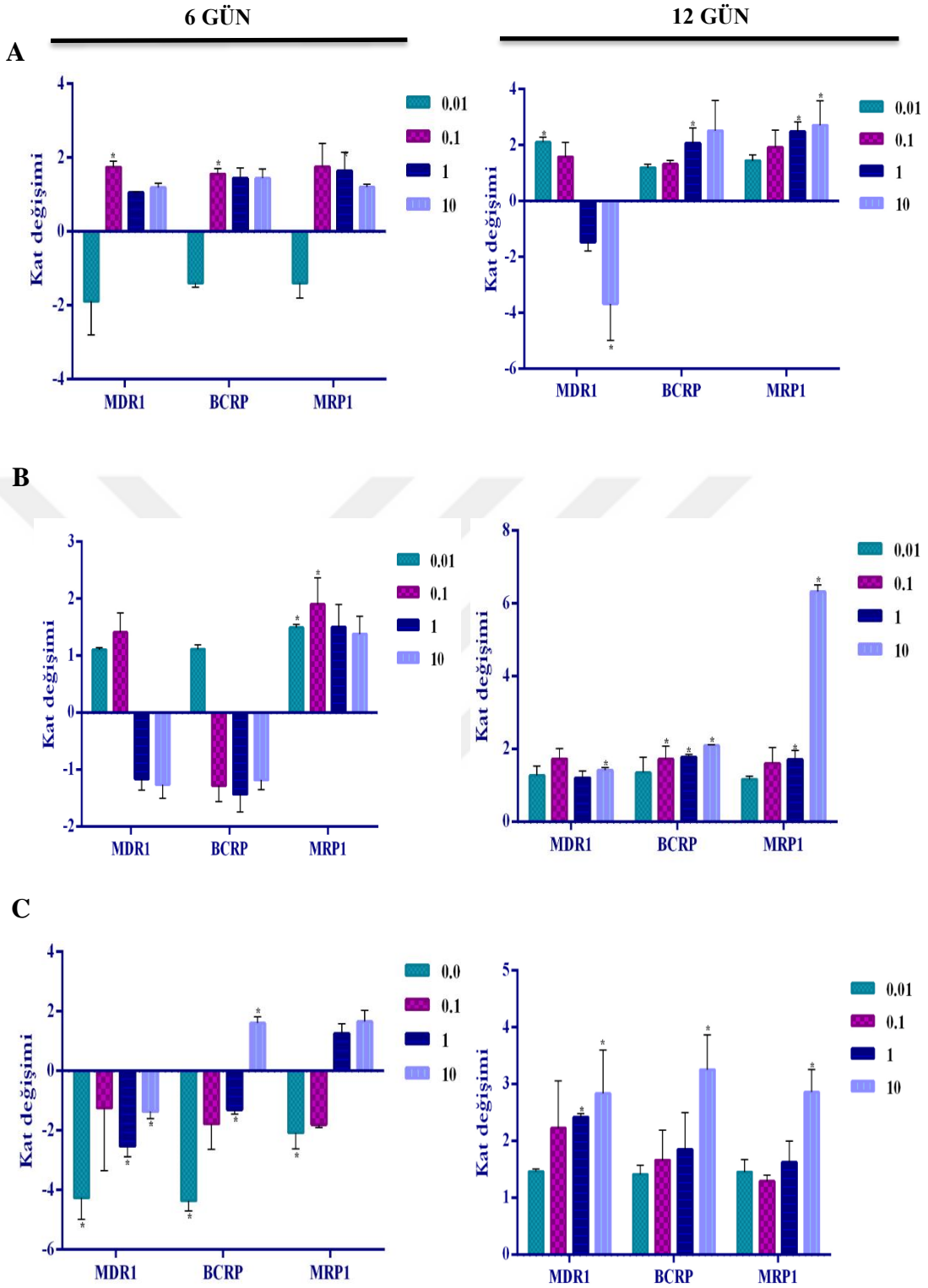
HCC1937-R hücrelerine 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanması sonucunda, H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.79 (p=0.031), 2.05 (p=0.042), -1.44 (p=0.011) ve 1.83 kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 2.72 (p=0.014), 1.90, 2.45 (p=0.009) ve 2.45 kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla -1.59, -1.23, 1.22 ve -1.35 kat değişim saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 2.24 (p=0.003), 1.44, 3.08 (p=0.000) ve -2.49 (p=0.033) kat değişim belirlendi (Şekil 162)

MCF-10A hücrelerinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanması sonucunda, H2AX, PARP1, RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -4.79 (p=0.000), -3.43 (p=0.000), -1.69 ve -2.42 (p=0.019) kat değişim

HCC1937 hücrelerinde MDR yolağında görev alan MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde BMN 673-KLN'nin etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.89, -1.39 ve -1.40 kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 1.19, 1.44, ve 1.20 kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 2.10 (p=0.006), 1.19 ve 1.44 (p=0.018) kat artış saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -3.67 (p=0.018), 2.51 ve 2.72 (p=0.027) kat değişim belirlendi (Şekil 163).

HCC1937-R hücrelerinde MDR yolağında görev alan MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde BMN 673-KLN'nin etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1.10, 1.12 ve 1.50 (p=0.010) kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -1.26, -1.18, ve 1.38 kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 1.27, 1.35 ve 1.17 kat artış saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 1.42 (p=0.009), 2.09 (p=0.000) ve 6.32 (p=0.000) kat değişim belirlendi (Şekil 163).

MCF-10A hücrelerinde MDR yolağında görev alan MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde BMN 673-KLN'nin etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -4.26 (p=0.000), -4.37 (p=0.000) ve -2.07 (p=0.047) kat değişim belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -1.37 (p=0.035), 1.61 (p=0.010) ve 1.65 kat değişim analiz edildi. Ancak 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 1.46, 1.41 ve 1.46 kat artış saptanmasına rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 2.83 (p=0.020), 3.26 (p=0.008) ve 2.86 (p=0.007) kat değişim belirlendi (Şekil 163).



Şekil 163. (A) HCC1937, (B) HCC1937-R ve (C) MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin 6. gün ve 12. günde MDR yolu ile ilişkili genlerin mRNA seviyesinde etkisi (* $p < 0.05$; $n = 3$).

Sonuç olarak, HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonu ve zamanı arttıkça HR yolağında görev alan genlerin ekspresyon seviyesinde azalma belirlenmesine rağmen, BCRP ve MRP1 genlerin ifade düzeylerinde doza bağlı olarak artış belirlenmiştir. Ancak MDR1'in ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir.

HCC1937-R hücrelerinde, MDR yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde doza bağlı olarak artış belirlenmesine rağmen, genlerin ekspresyon seviyesinde kat değişim oranı BMN 673'e göre oldukça az oranda analiz edilmiştir. Ayrıca, HR yolağı ile ilişkili olan H2AX, PARP1 ve BRCA1'in ekspresyon seviyesinde azalma olmasına rağmen, RAD51'in mRNA düzeyinde doza bağlı artış analiz edilmiştir.

MCF-10A hücrelerinde ise, KLN formülasyonunun BMN 673'ün toksik etkisinden azatmasından dolayı, HR yolağı ile ilişkili H2AX ve RAD51 ekspresyon seviyesinde azalma olmasına rağmen, diğer genlerde artış analiz edilmiştir. Ayrıca uygulanan doza ve zamana bağlı olarak MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde artış belirlenmesine rağmen, kat değişim oranının BMN 673'e göre daha az oranda olduğu tespit edilmiştir.

BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e göre HR mekanizmasının daha az aktive olduğu analiz edilmesine rağmen, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde RAD51'in mRNA düzeyinde ekspresyonunun BMN 673'e göre daha fazla oranda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, KLN formülasyonunun HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olarak ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673-KLN'nin HR ve MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde BMN 673'e göre daha az oranda kat değişimine neden olduğu tespit edilmiştir.

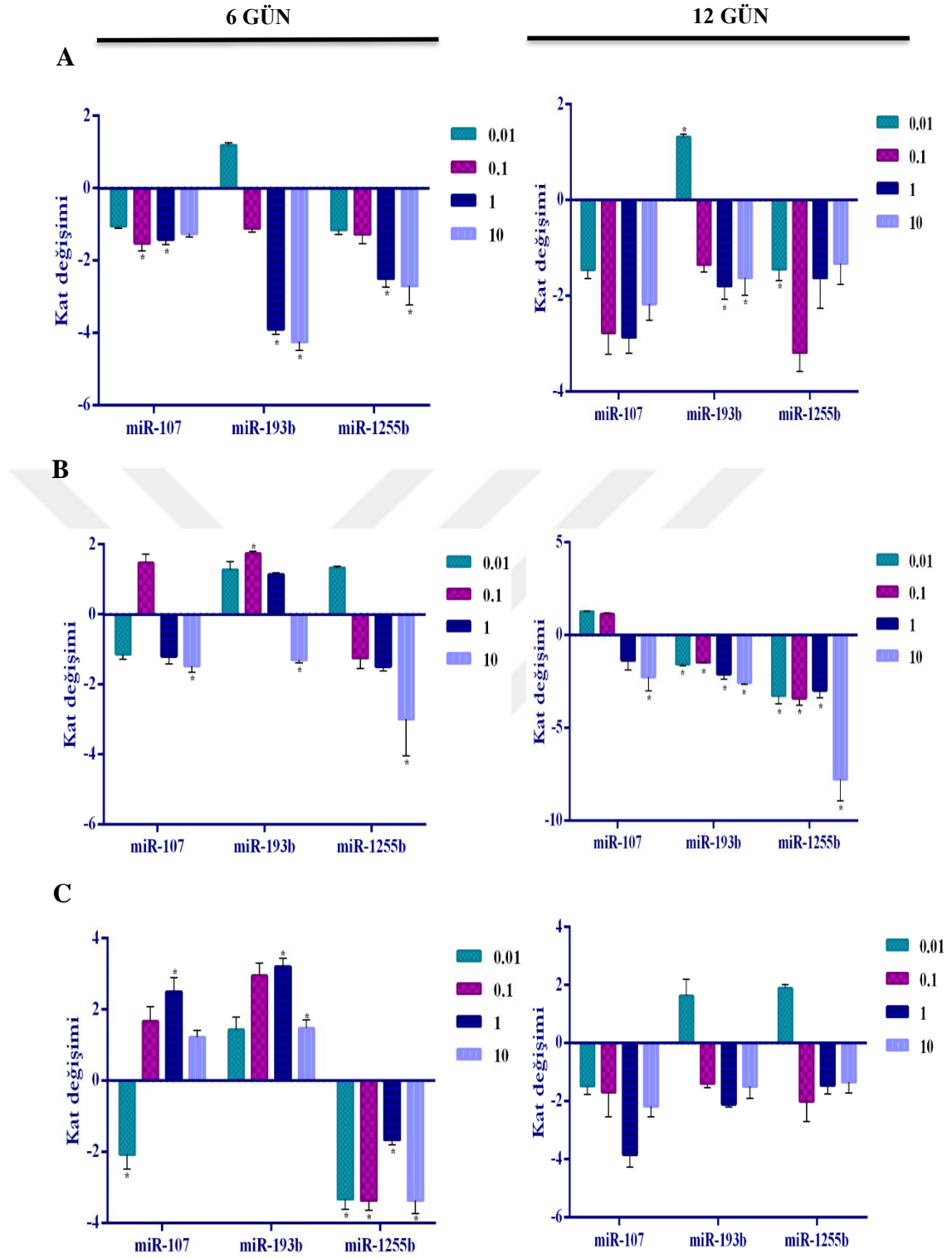
4.33. BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Mekanizmalarında Rol Alan Genleri Hedefleyen miRNA'lar Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde RAD51 ve BRCA1'i hedef aldığı bilinen miR-107, miR-193b ve miR-1255b ve MDR1, BCRP ve MRP1 genlerini hedef aldığı bilinen miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda elde edilen bulgular Şekil 164 ve 165'te sunuldu.

HCC1937 hücrelerinde miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde BMN 673-KLN'nin etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla -1.05, 1.18 ve -1.15 kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -1.27, -4.24 (p=0.000) ve -2.70 (p=0.001) kat değişimi analiz edildi. 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde ise miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesi sırasıyla -1.46, 1.32 (p=0.030) ve -1.45 (p=0.038) kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında ise sırasıyla -2.17, -1.62 (p=0.031) ve -1.33 kat değişimleri belirlendi (Şekil 164).

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin etkisi değerlendirildiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanması sonucunda miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.14, 1.27 ve 1.33 kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -1.47 (p=0.035), -1.29 (p=0.025) ve -2.99 (p=0.033) kat değişimi analiz edildi. 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesi sırasıyla 1.26, -1.57 (p=0.002) ve -3.27 (p=0.004) kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında ise sırasıyla -2.25 (p=0.020), -2.57 (p=0.000) ve -7.77 (p=0.001) kat değişimleri belirlendi (Şekil 164).

MCF-10A hücrelerinde 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanması sonucunda, miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde sırasıyla -2.07 (p=0.001), 1.43 ve -3.32 (p=0.000) kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla 1.22, 1.47 (p=0.027) ve -3.36 (p=0.000) kat değişimi analiz edildi. 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesi sırasıyla -1.49, 1.62 ve 1.88 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında ise sırasıyla -2.18, -1.50 ve -1.34 kat değişimleri belirlendi (Şekil 164).

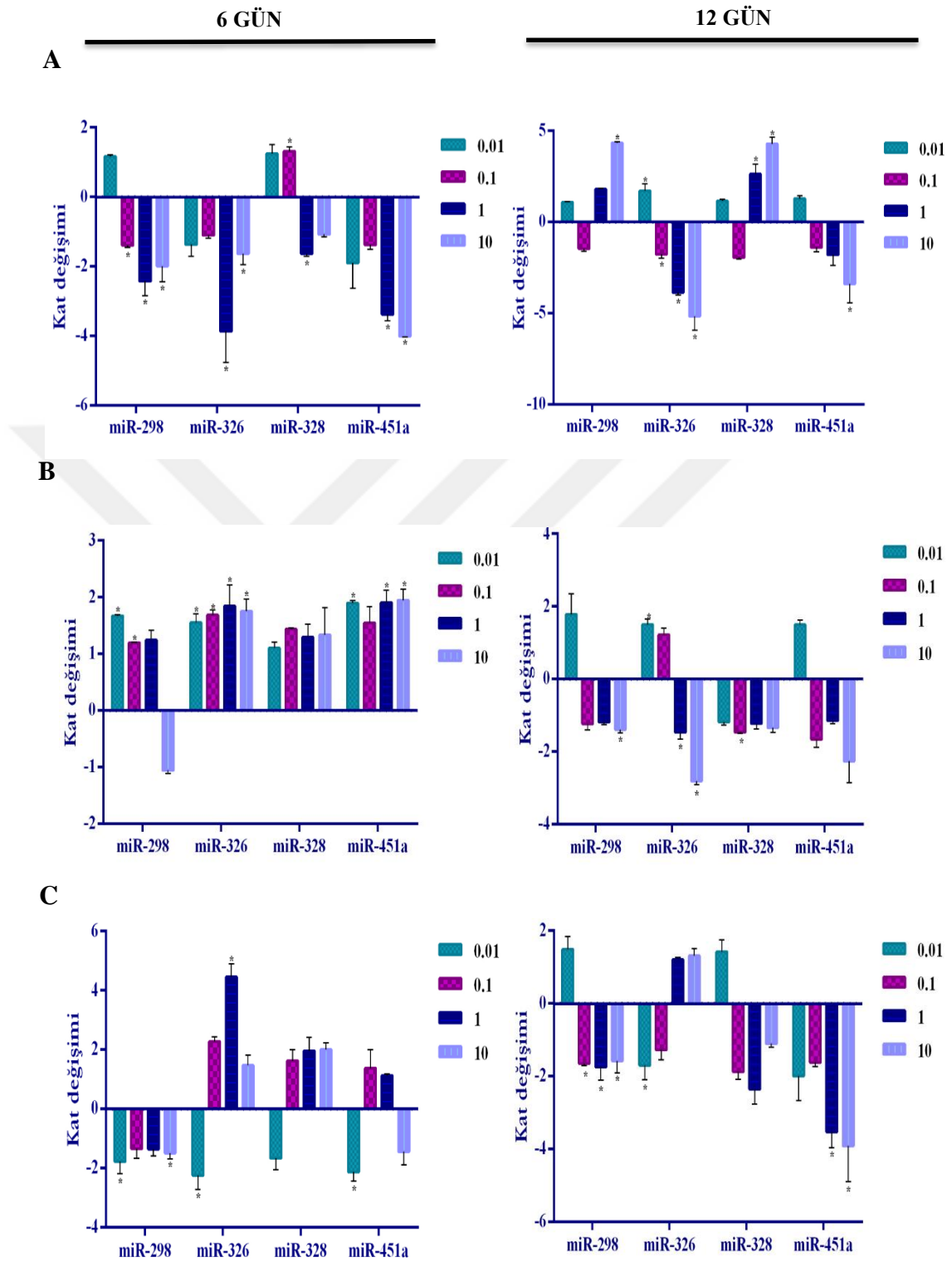


Şekil 164. A) HCC1937, (B) HCC1937-R ve (C) MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin 6. gün ve 12. günde HR yolağı ile ilişkili miRNA seviyesinde etkisi (* $p < 0.05$; $n=3$).

HCC1937 hücrelerinde miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde BMN 673-KLN'nin etkisi incelendiğinde, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde sırasıyla 1.17, -1.37, 1.25 ve -1.90 kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -1.99 (p=0.008), -1.63 (p=0.007), -1.08 ve -4.00 (p=0.005) kat değişimi analiz edildi. 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde ise, miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesi sırasıyla 1.09, 1.72 (p=0.033), 1.15 ve 1.29 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında ise sırasıyla 4.35 (p=0.002), -5.16 (p=0.000), 4.29 (p=0.000) ve -3.39 (p=0.037) kat değişimleri belirlendi (Şekil 165).

HCC1937-R hücrelerinde 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanması sonucunda miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1.68 (p=0.000), 1.55 (p=0.004), 1.10 ve 1.90 (p=0.002) kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -1.05, 1.75 (p=0.004), 1.33 ve 1.95 (p=0.004) kat değişimi analiz edildi. 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesi sırasıyla 1.78, 1.50 (p=0.006), -1.18 ve 1.50 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında ise sırasıyla -1.39 (p=0.041), -2.80 (p=0.000), -1.34 ve -2.26 kat değişimleri belirlendi (Şekil 165).

MCF-10A hücrelerinde ise, 6 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanması sonucunda miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde sırasıyla -1.77 (p=0.022), -2.24 (p=0.002), -1.66 ve -2.12 (p=0.034) kat değişimleri belirlenmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında sırasıyla -1.48 (p=0.020), 1.47, 2.00 ve -1.44 kat değişimi analiz edildi. 12 gün boyunca 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesi sırasıyla 1.49, -1.69 (p=0.037), 1.42 ve -1.99 kat değişimi analiz edilmesine rağmen, 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında ise sırasıyla -1.58 (p=0.016), 1.31, -1.10 ve -3.91 (p=0.010) kat değişimleri belirlendi (Şekil 165).



Şekil 165. (A) HCC1937, (B) HCC1937-R ve (C) MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin 6. gün ve 12. günde MDR yolağı ile ilişkili miRNA seviyesinde etkisi (* $p < 0.05$; $n=3$).

Sonuç olarak, HCC1937 hücrelerinde HR ile ilişkili olan genleri hedef alan miR-107'nin ekspresyon seviyesi BMN 673-KLN'nin uygulanan dozuna ve zamanına bağlı olarak azalmasına rağmen, miR-193b ve miR-1255b'nin ekspresyon seviyelerinin BMN 673 uygulanan hücrelere göre arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, BMN 673-KLN'nin uygulanan dozuna ve zamanına bağlı olarak MDR ile ilişkili genleri hedef alan miR-298, miR-326 ve miR-328 ekspresyon seviyelerinin BMN 673 uygulanan hücrelere göre daha az oranda azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, miR-451a ekspresyon düzeyinin BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde BMN 673 uygulanan hücrelere göre daha fazla bir oranda azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler, KLN formülasyonunun ilaç direnci ile ilişkili MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinin aktivitesinin BMN 673 uygulanan hücrelere göre daha az oranda belirlenmesi ile desteklenmiştir.

HCC1937-R hücrelerinde HR ile ilişkili genleri hedef alan miR-107 ve miR-193b ekspresyon seviyesinde BMN 673-KLN'nin uygulanan dozuna ve zamana bağlı belirlenen azalış miktarı BMN 673'e göre daha az oranda analiz edilmiştir. Ancak 10 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde miR-1255b'nin ekspresyon seviyesinde azalma BMN 673'e göre daha yüksek oranda belirlenmiştir. Sonuç olarak, HCC1937-R hücrelerinde ilgili miRNA'ların hedef aldıkları RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde artış oranı incelendiğinde, BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde BMN 673'e göre HR yolağının daha az aktive olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, MDR yolağı ile ilişkili miRNA'ların ekspresyon seviyesinde azalış oranlarının BMN 673'e göre daha az oranda analiz edilmesi KLN formülasyonunun ilaç direnci ile ilişkili genlerin aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak HR ile ilişkili özellikle miR-107'nin ekspresyon seviyesinde belirlenen azalış, HR temelli DNA tamirinin aktivitesini göstermektedir. Ayrıca, BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak özellikle miR-326 ve miR-328 ekspresyon seviyesinde azalış miktarının BMN 673'e göre daha az oranda olması, hücrelerde BCRP ve MRP1 genlerinin daha az aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde MDR1'i hedef alan miR-451a ekspresyon seviyesinde azalış miktarı, BMN 673'e göre daha fazla oranda belirlenmiştir.

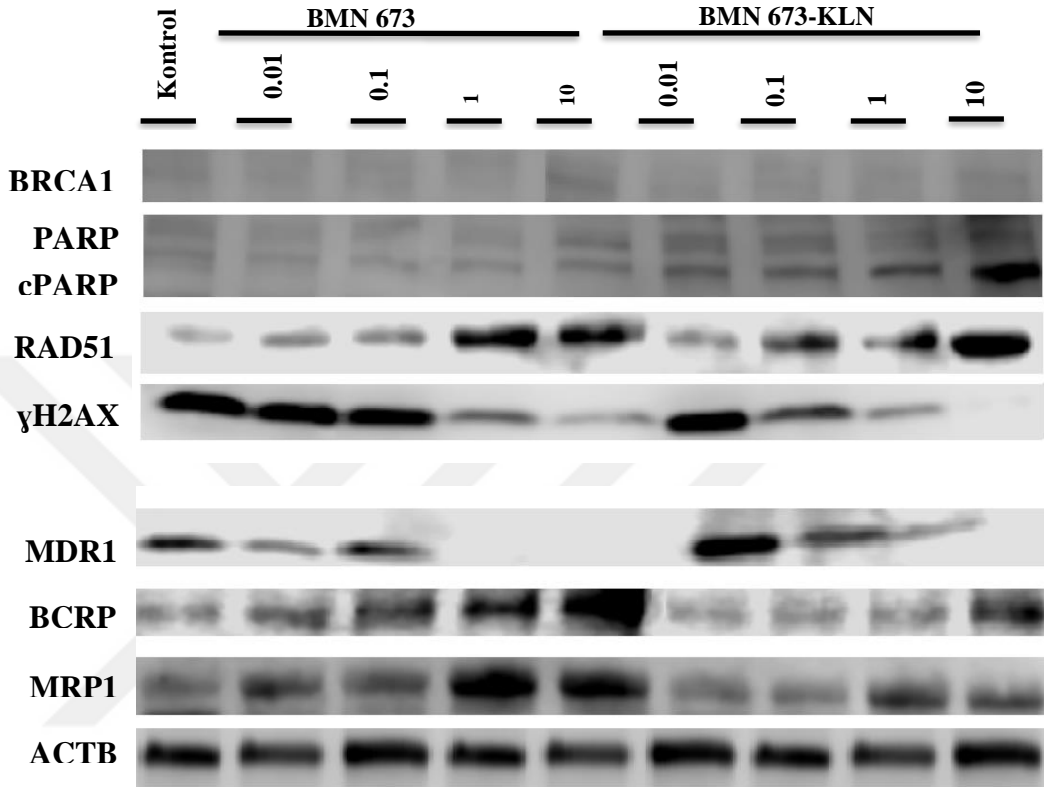
4.34. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Yolakları ile İlişkili Proteinlerin Ekspresyonuna Etkisinin Belirlenmesi

BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR ile ilişkili H2AX, PARP, RAD51 ve BRCA1 ve MDR ile ilişkili MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin ekspresyonuna etkisi referans protein beta-actin ile normalize edilerek western blot analizi ile değerlendirildi. Elde edilen bulgular Şekil 166-168'de ve ilgili proteinlerin ekspresyonlarındaki kat oranları Tablo 68'de sunuldu.

HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün HR ile ilişkili olan H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin seviyesi üzerinde etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde artan doza bağlı olarak γ H2AX ve PARP ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen ($p < 0.01$), RAD51'in ekspresyonunda artış analiz edildi (4.97- kat, $p < 0.01$). Ancak, HCC1937 hücrelerinde BRCA1 geninde 5266dupC mutasyonu olduğu için BRCA1 ekspresyonu belirlenmemesine rağmen, 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde protein ekspresyonunda 1.91- kat artış analiz edildi ($p < 0.01$). BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde ise, PARP ve γ H2AX proteinlerinin ekspresyon miktarlarında BMN 673'e göre daha fazla oranda azalış belirlendi ve kırılmış PARP (cPARP) miktarının BMN 673 uygulanan hücrelere göre daha fazla oranda olduğu analiz edildi ($p < 0.01$). Ancak, özellikle 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde RAD51 proteinin ekspresyon miktarının (5.87-kat) BMN 673 uygulanan hücrelere göre (4.97- kat) daha fazla eksprese olduğu görüntülendi. BRCA1 ekspresyonunda ise BMN 673 uygulanan gruplar ile benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 166).

HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin ekspresyonları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde, kontrol hücresi ile karşılaştırıldığında uygulanan BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDR1'in ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen (0.12- kat), BCRP (4.67- kat) ve MRP1 (6.08- kat) ekspresyonunda artış analiz edildi ($p < 0.01$). BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde ise, özellikle 0.01 nM BMN 673-KLN uygulandığında MDR1 proteini seviyesi 0.01 nM BMN 673'e göre daha fazla oranda belirlenmesine rağmen, (1.40-kat) 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında MDR1 ekspresyonunda benzer şekilde azalış belirlendi (0.10-kat, $p < 0.01$). Ancak,

BCRP (2.57- kat) ve MRP1 (2.40-kat) proteinlerinin ekspresyonlarının BMN 673-KLN'nin artan dozuna bağlı olarak artmasına rağmen, BMN 673'e göre artış oranının daha az miktarda olduğu analiz edildi (Şekil 166).

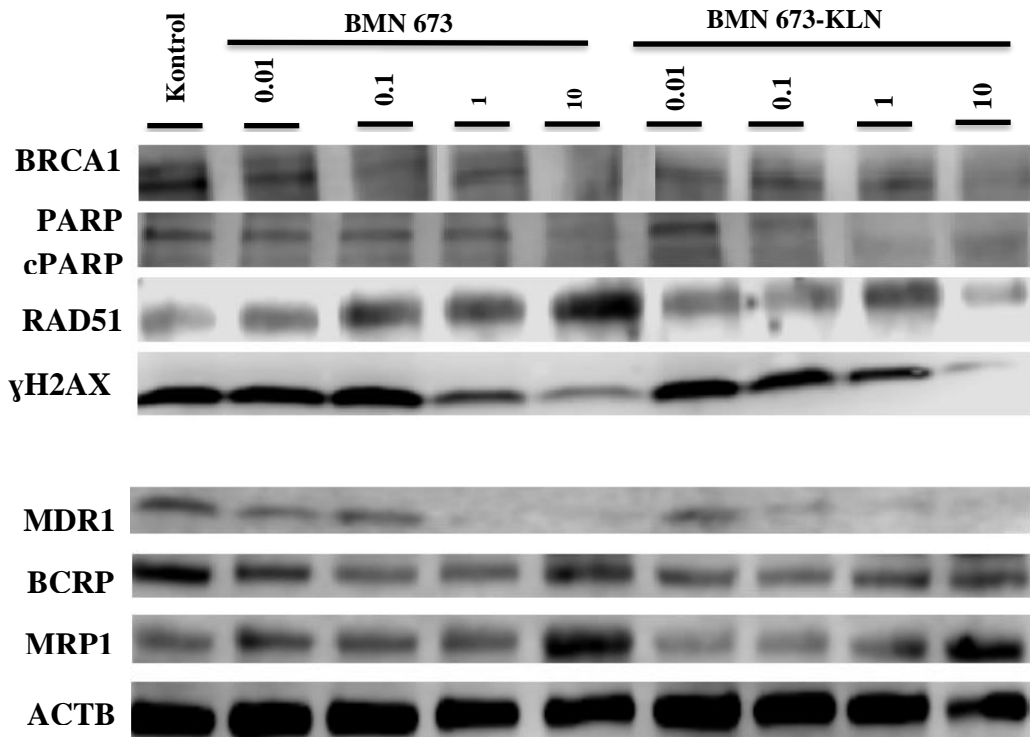


Şekil 166. HCC1937 hücrelerinde BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HR ve MDR ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunda etkisi.

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün HR ile ilişkili olan H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin seviyesi üzerinde etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde artan doza bağlı olarak γH2AX ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen (0.62-kat), RAD51'in ekspresyonunda artış analiz edildi (4.23-kat, $p < 0.01$). Ancak özellikle γH2AX seviyesi parental HCC1937 hücreleri ile karşılaştırıldığında önemli derecede azaldığı görüntülenmiştir. Ayrıca, HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığında, BRCA1 ekspresyonunda önemli derecede artış belirlenmesine rağmen ($p < 0.01$), doza bağlı olarak BRCA1'in seviyesinde azalma analiz edildi (0.66-kat). PARP'ın ekspresyon seviyesi ise doza bağlı olarak azalmasına rağmen, HCC1937 parental hücrelerine göre daha fazla eksprese olduğu belirlendi. BMN 673-

KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise, PARP ve γ H2AX (0.42-kat) proteinlerinin ekspresyon miktarlarında BMN 673'e göre daha fazla oranda azalış belirlenmesine rağmen, RAD51 (1.33-kat) ve BRCA1 (0.28-kat) ekspresyonlarında BMN 673'e göre daha az oranda bir artış analiz edildi (Şekil 167).

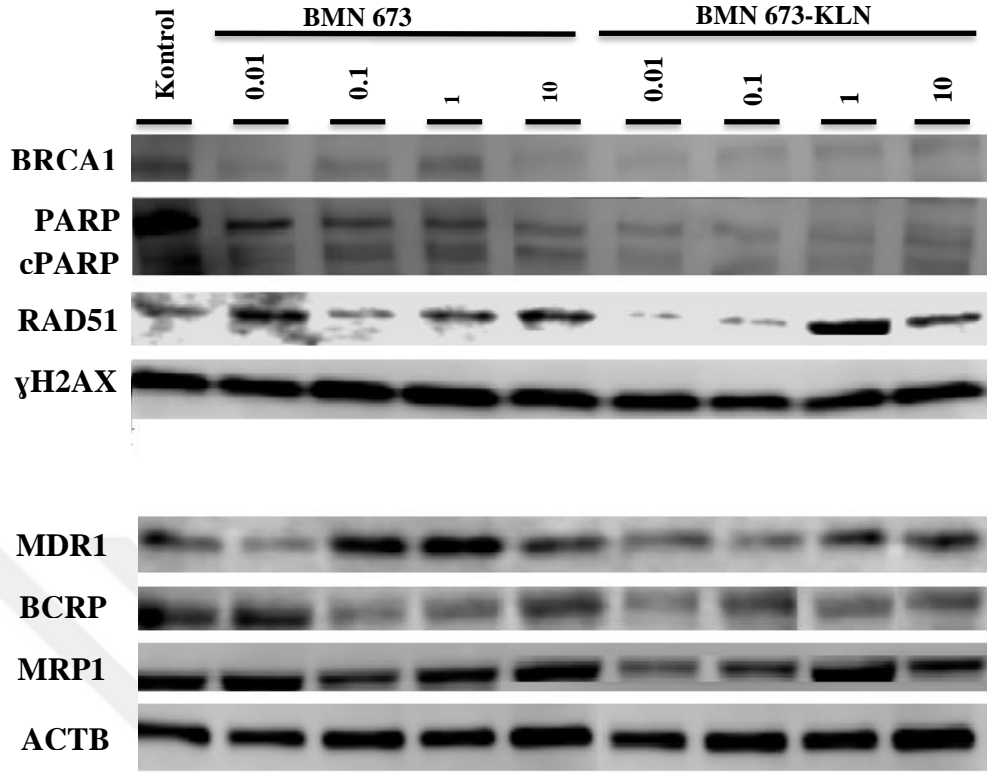
HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise, kontrol hücresi ile karşılaştırıldığında uygulanan BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDR1 (0.16-kat) ve BCRP'nin (2.11-kat) ekspresyonunda azalma belirlenmesine rağmen, MRP1 (4.20-kat) ekspresyonunda artış analiz edildi ($p < 0.01$). MDR1 ekspresyonu HCC1937 parental hücreleri ile benzer miktarda olmasına rağmen, BCRP ve MRP1 ekspresyonlarında özellikle 1 nM BMN 673 uygulanmasından itibaren önemli derecede artış görüntüledi. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise, MDR1 proteininin seviyesinin 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanmasından itibaren önemli derecede azaldığı belirlendi (0.09-kat, $p < 0.01$). Ayrıca, BCRP (1.16-kat) ve MRP1 (2.32-kat) proteinlerinin ekspresyonları 0.01 nM BMN 673-KLN uygulanmasından itibaren artmasına rağmen, artış oranının BMN 673'e göre daha az miktarda olduğu görüntüledi (Şekil 167).



Şekil 167. HCC1937-R hücrelerinde BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HR ve MDR ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunda etkisi.

MCF-10A hücrelerinde ise BMN 673'ün HR ile ilişkili olan H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin seviyesi üzerinde etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde artan doza bağlı olarak PARP ekspresyonunda azalış belirlenmesine rağmen, BRCA1 (0.34-kat) ve RAD51'in (2.55-kat) ekspresyonunda artış analiz edildi. γ H2AX proteinin seviyesinde BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu artmasına rağmen herhangi bir farklılık gözlemlenmedi. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673'e göre BRCA1 ekspresyonu neredeyse gözlemlenmesine rağmen, RAD51 ekspresyonunun 2.18-kat arttığı belirlendi. Ayrıca, PARP proteinin miktarında BMN 673'e göre daha az bir oranda azalış analiz edildi. γ H2AX proteininin ekspresyonunda ise, doza bağlı olarak herhangi bir fark gözlemlenmesine rağmen, BMN 673'e göre (1.20-kat) daha az miktarda olduğu görüldü (0.92-kat) (Şekil 168).

MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin ekspresyonları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde, kontrol hücresi ile karşılaştırıldığında uygulanan BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDR1 (3.88-kat)ve BCRP'nin (4.19-kat) ekspresyonunda artış belirlenmesine rağmen ($p < 0.01$), MRP1 ekspresyonunun BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak daha az eksprese olduğu belirlendi (2.89-kat, $p < 0.01$). BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, MDR1 (2.77-kat) ve BCRP (1.56-kat) proteinlerinin ekspresyonlarının BMN 673'e göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p < 0.01$). MRP1 ekspresyonunun ise, BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak artmasına rağmen (2.07-kat) , BMN 673'e göre daha az bir oranda (2.89-kat) eksprese olduğu belirlendi (Şekil 168).



Şekil 168. MCF-10A hücrelerinde BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HR ve MDR ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunda etkisi.

Tablo 68. BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR ve MDR ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyesinde kat değişimlerinin belirlenmesi

	HCC1937		HCC1937-R		MCF-10A		
	BMN 673	KLN	BMN 673	KLN	BMN 673	KLN	
0.01 nM	BRCA1	0.10	0.10	0.91	0.80	0.51	0.15
	cPARP	1.25	1.76	0.90	1.27	1.17	0.62
	RAD51	1.46	1.13	1.50	1.26	0.84	0.20
	γH2AX	0.95	0.66	0.94	0.96	1.04	0.92
	MDR1	0.37	1.40	0.87	0.80	0.92	1.15
	BCRP	1.09	0.92	0.80	0.55	1.11	0.83
	MRP1	1.56	1.07	1.18	0.94	1.56	1.08
	ACTB	1.91	1.50	0.66	0.28	0.34	0.29
10 nM	cPARP	1.97	2.85	1.61	2.46	2.52	1.60
	RAD51	4.97	5.87	4.23	1.33	2.55	2.18
	γH2AX	0.07	0.03	0.62	0.42	1.20	0.92
	MDR1	0.12	0.10	0.16	0.09	3.88	2.77
	BCRP	4.67	2.57	2.11	1.16	4.19	1.56
	MRP1	6.08	2.40	4.20	2.32	2.89	2.07
	ACTB						
	ACTB						

Sonuç olarak, HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin ilaca karşı direnç göstermesinden dolayı RAD51, BRCA1, BCRP ve MRP1'nin mRNA ve protein ekspresyonlarında artış belirlenmesine rağmen ($p<0.01$), hücrelerde BMN 673'ün neden olduğu apoptotik ölüme bağlı olarak kırılmış PARP seviyesinde artış belirlenmiştir. Ancak, BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde, KLN formülasyonunun sahip olduğu avantajlardan dolayı MDR ve HR ile ilişkili genlerin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde BMN 673'e göre daha az oranda artış belirlenmesine rağmen, kırılmış PARP miktarında daha fazla artış analiz edilmiştir. Fosforile H2AX (γ H2AX) proteininin ve H2AX'in mRNA düzeyinde ekspresyon seviyesinin ise, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde BMN 673'e göre daha az oranda olduğu belirlenmiştir.

HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673'e karşı kazanılan ilaç direncinden dolayı BRCA1 proteininin ekspresyonunda artış belirlenmesine rağmen ($p<0.01$), doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, RAD51 ekspresyon seviyesinde artış belirlenmesine rağmen, PARP proteininin seviyesinde belirgin bir değişim hücrelerin kazandığı dirençten dolayı gözlemlenmemiştir. γ H2AX seviyesinin ise, doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, MDR ile ilişkili genlerden özellikle BCRP ve MRP1 proteinlerinin ekspresyon seviyesinde parental HCC1937 hücrelerine göre önemli derecede artış belirlenmiştir ($p<0.01$). BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde MDR ile ilişkili genlerin ekspresyonunda anlamlı derecede azalma belirlenmekle ($p<0.01$) birlikte, BRCA1 ve RAD51 proteinlerinin ekspresyon seviyesinde de BMN 673'e göre daha az oranda artış belirlenmiştir. Ayrıca PARP ve γ H2AX proteinlerinin ekspresyonunun BMN 673'e göre daha az oranda olduğu görüntülenmiştir.

MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı BRCA1 ve RAD51 ekspresyonunda doza bağlı olarak artış belirlenmesine rağmen, hücrelerdeki apoptotik ölümden dolayı PARP ekspresyonunda azalış analiz edilmiştir ($p<0.01$). Ayrıca, MDR ile ilişkili olan MDR1 ve MRP1 ekspresyonunda önemli artış belirlenmiştir ($p<0.01$). Ancak BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün toksik etkisinin azalmasından dolayı MDR ile ilişkili MDR1 ve MRP1 ekspresyonunda daha az oranda artış görüntülenmiştir. Ayrıca, BRCA1 ve RAD51 ekspresyonunun BMN 673'e göre daha az oranda olduğu belirlenmiştir. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin

artan konsantrasyonuna rağmen γ H2AX'in ekspresyonunda herhangi bir fark gözlemlenmemesine rağmen, BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde γ H2AX ekspresyonunun BMN 673'e göre daha az oranda görüntülenmiştir.

Sonuçta, BMN 673-KLN'nin MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisini azalttığı ve HCC1937-R hücrelerinde ilaç direncinin aşılmasındaki HR ve MDR ile ilişkili genlerin mRNA ve protein seviyesinde potansiyel terapötik etkisi belirlenmiştir. BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde genel olarak HR ve MDR ile ilişkili genlerin mRNA ve protein ekspresyonlarında değişimlerin belirlenmesi için gerçekleştirilen RT-PCR ve Western blot analiz sonuçlarının birbirini desteklemektedir.

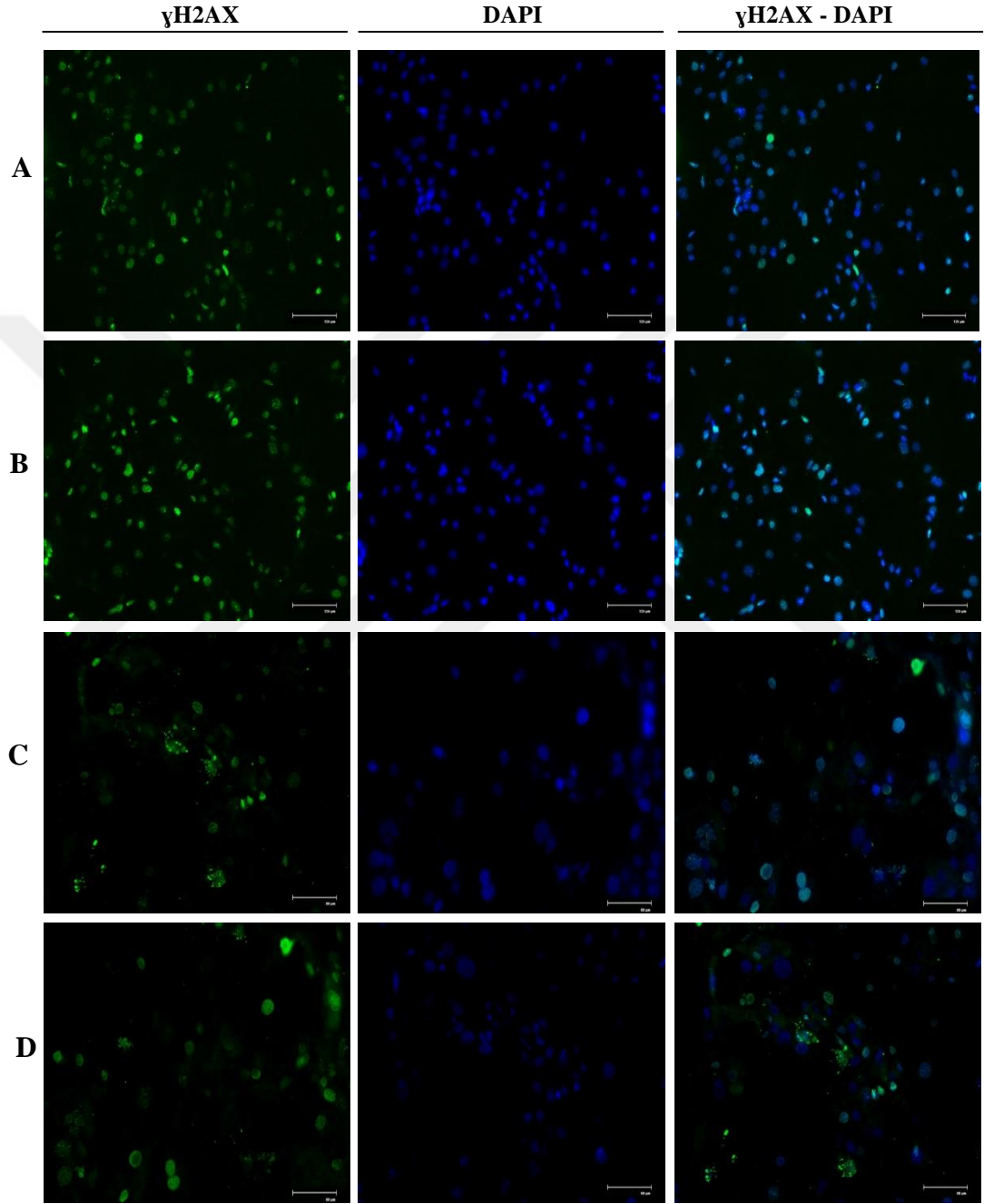
4.35. BMN 673-KLN'nin HR ve MDR Yolakları ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi

BMN 673-KLN'nin, HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR ile ilişkili H2AX, PARP, RAD51 ve BRCA1 ve MDR ile ilişkili MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları referans protein beta-actin ile normalize edilerek elde edilen bulgular Şekil 169-192'de sunuldu.

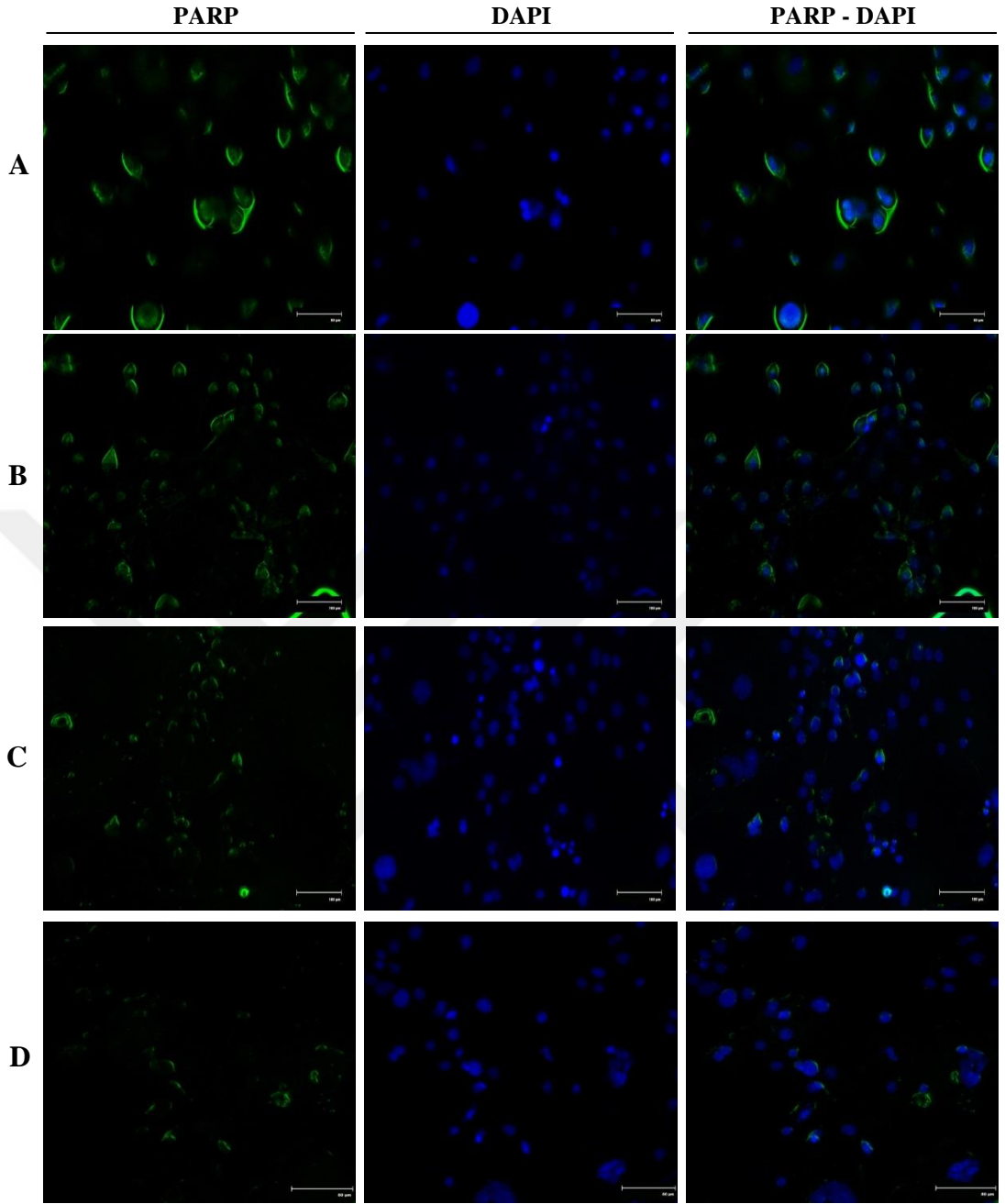
HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak HR ile ilişkili olan H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları üzerinde etkisi incelendiğinde, 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde artan doza bağlı olarak nükleusta BMN 673 uygulanan hücrelere göre daha az oranda γ H2AX ekspresyonu belirlenmesine rağmen (Şekil 169), nüklear PARP ekspresyonunda BMN 673'e göre daha fazla oranda azalış (Şekil 170) ve nüklear RAD51 ekspresyonunda BMN 673 uygulanan hücrelere benzer şekilde artış olduğu görüntüledi (Şekil 171). Ayrıca, BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde belirlendiği gibi BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonu arttıkça BRCA1'in nüklear ekspresyonunda az miktarda bir artış olduğu görüntüledi (Şekil 172).

HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin lokalizasyonları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak 0.01 nM BMN 673-KLN hariç BMN 673'e göre MDR1'in hücre membranında ekspresyonunda daha fazla oranda azalma belirlenmesine rağmen (Şekil 173), BCRP ve MRP1'in hücre membranı ve sitozolde ekspresyonunda BMN 673'e göre daha az

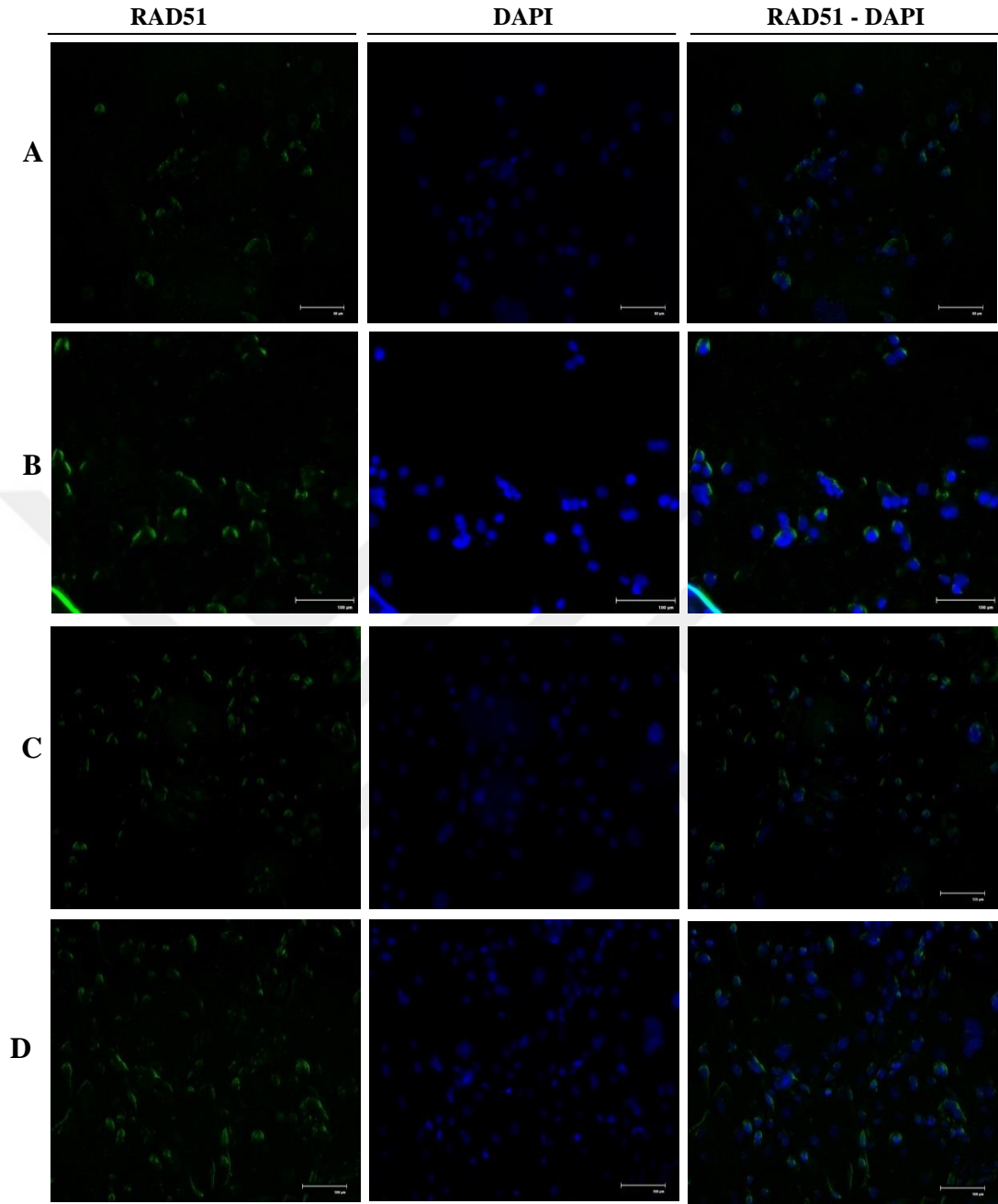
oranda bir artış görüldü (Şekil 174,175). BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinin genel morfolojik yapısı kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak beta-actin immünofloresans boyaması ile görüntüldü (Şekil 176).



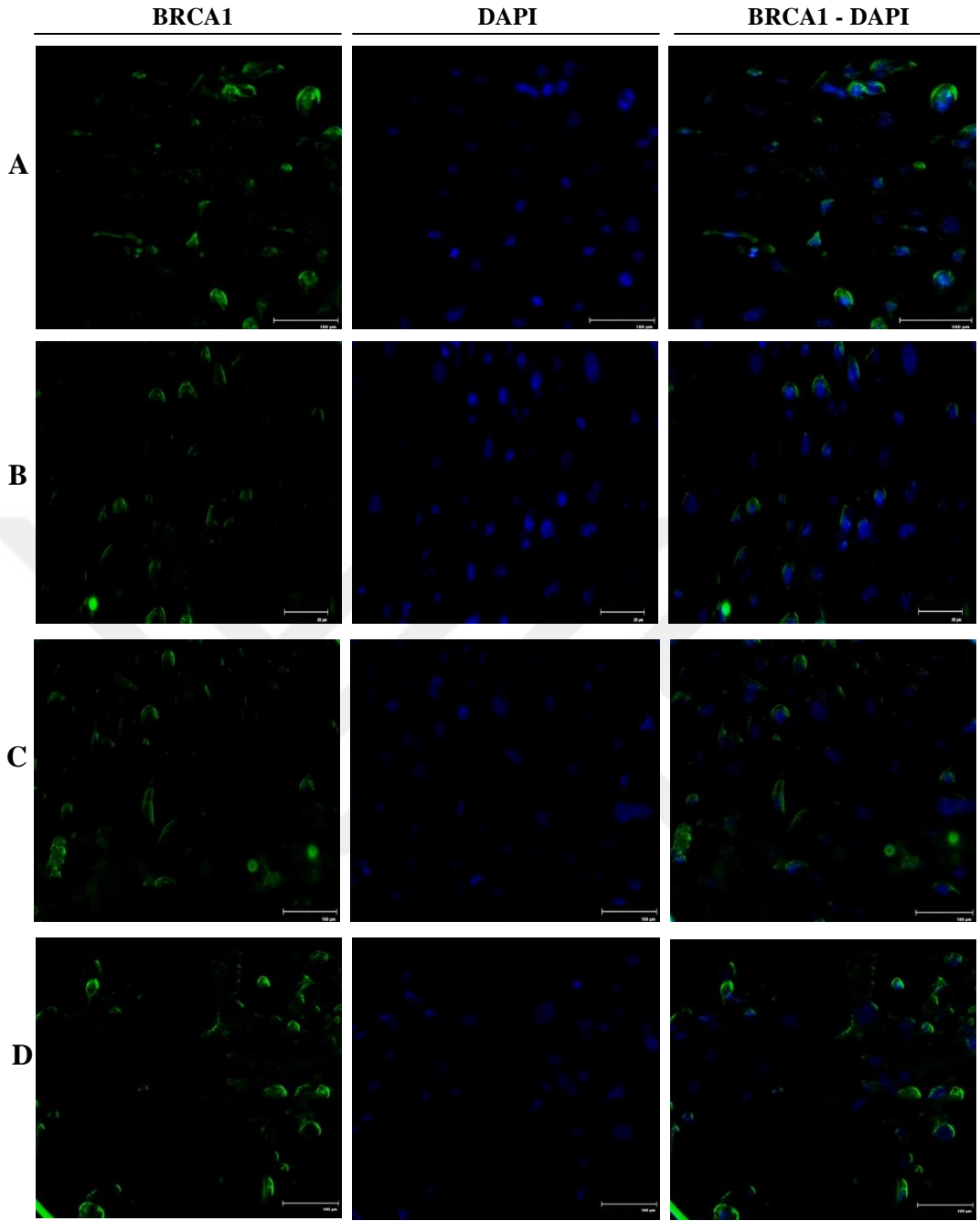
Şekil 169. HCC1937 hücrelerinde γ H2AX ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



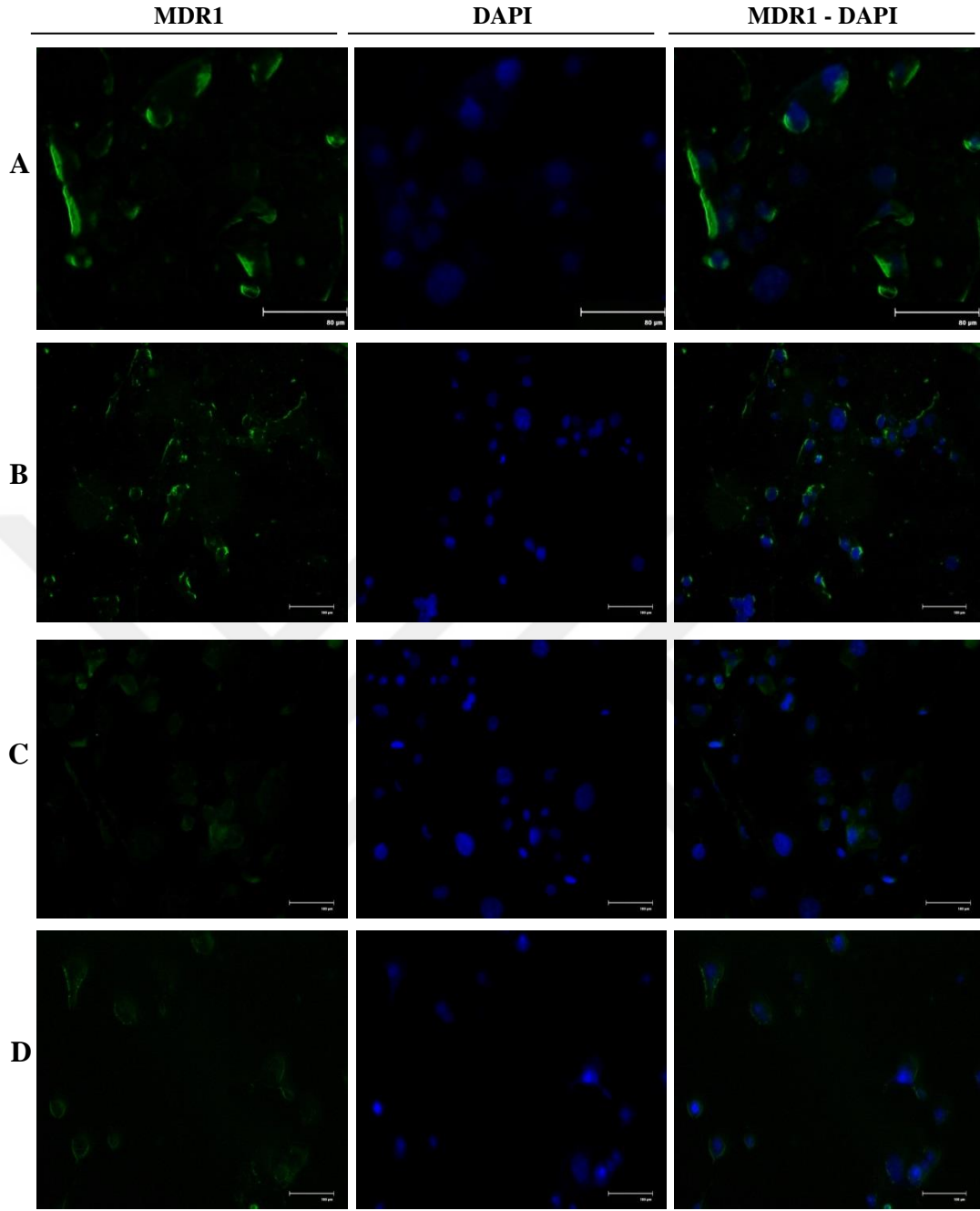
Şekil 170. HCC1937 hücrelerinde PARP ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



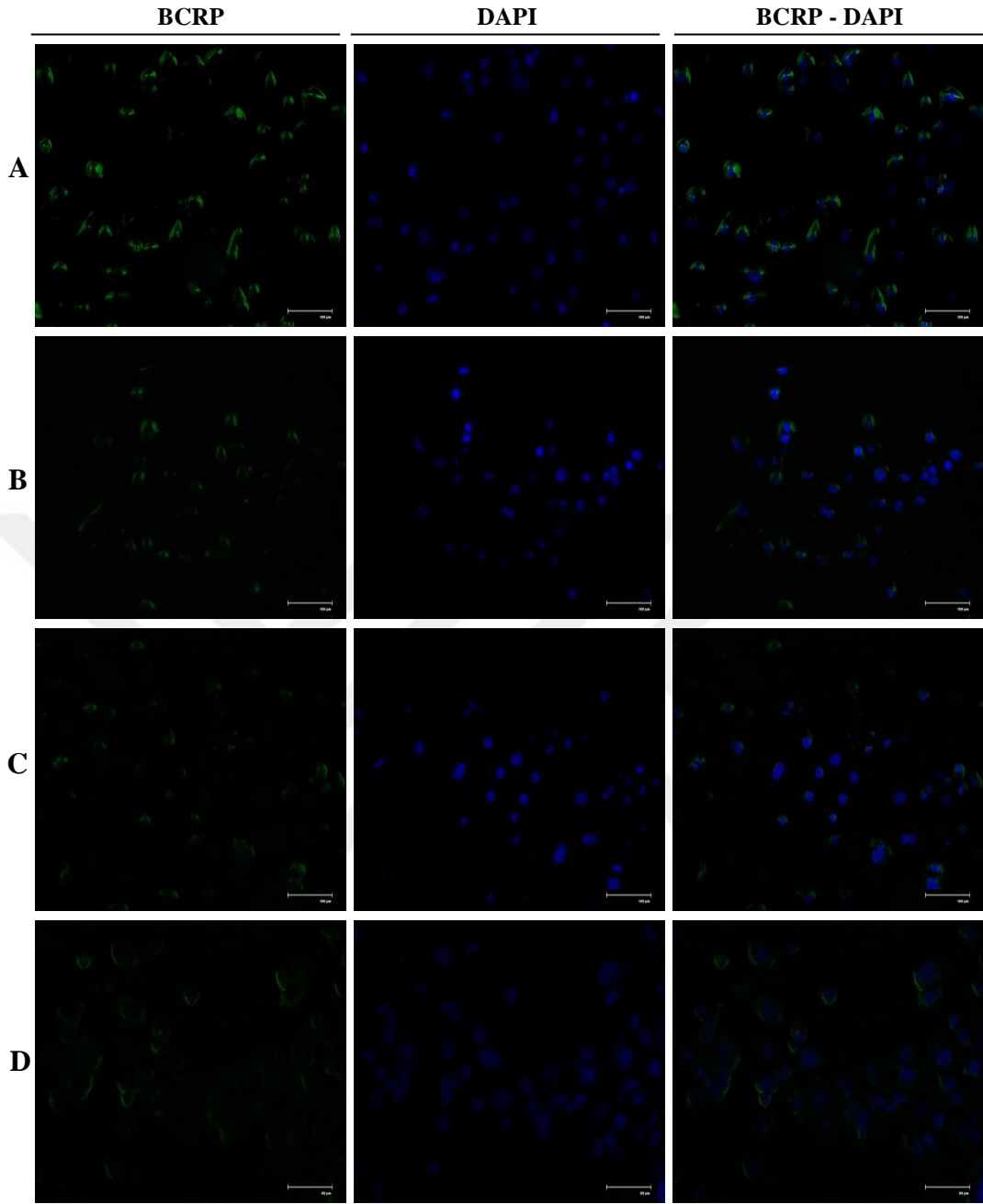
Şekil 171. HCC1937 hücrelerinde RAD51 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



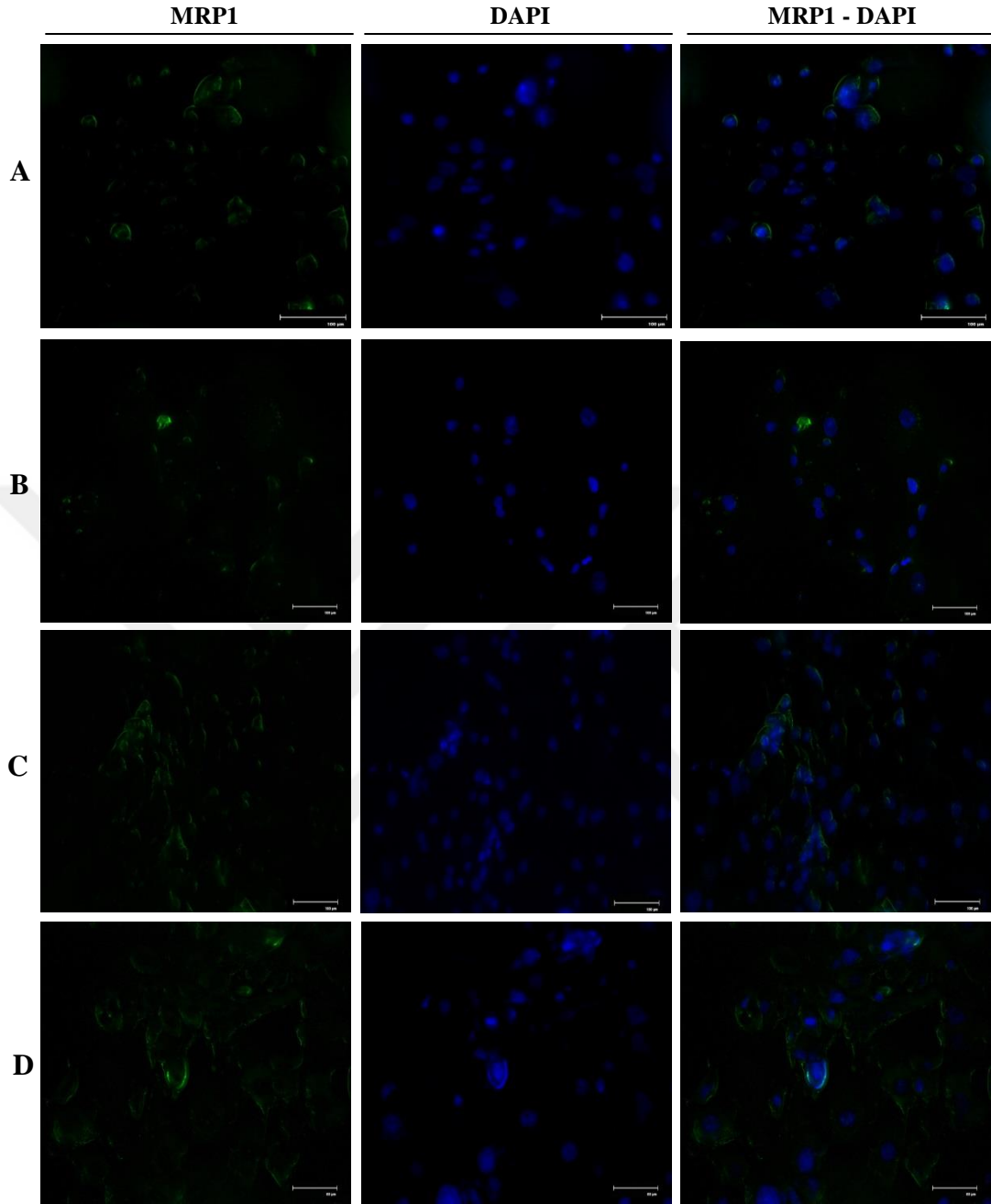
Şekil 172. HCC1937 hücrelerinde BRCA1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



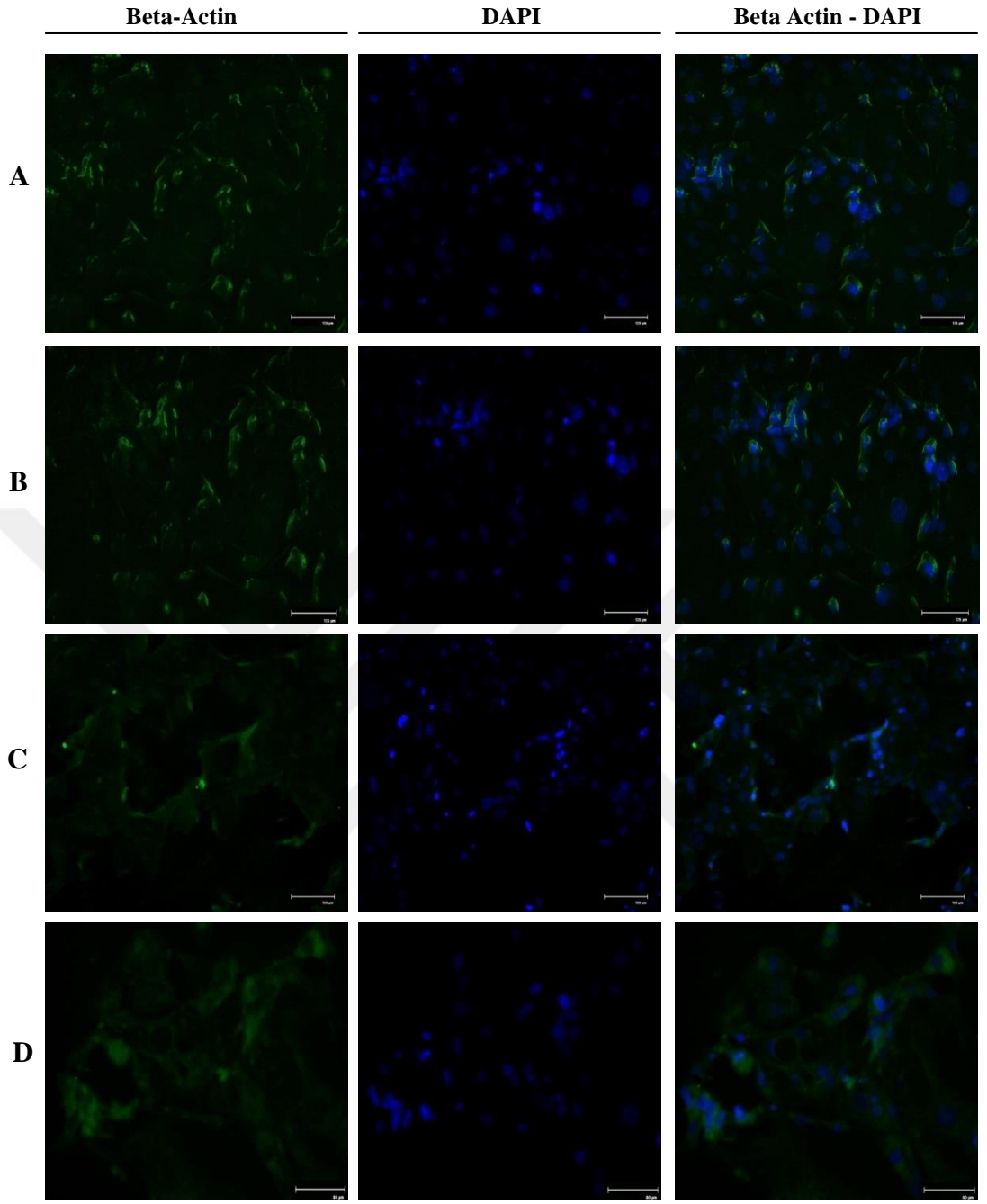
Şekil 173. HCC1937 hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



Şekil 174. HCC1937 hücrelerinde BCRP ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



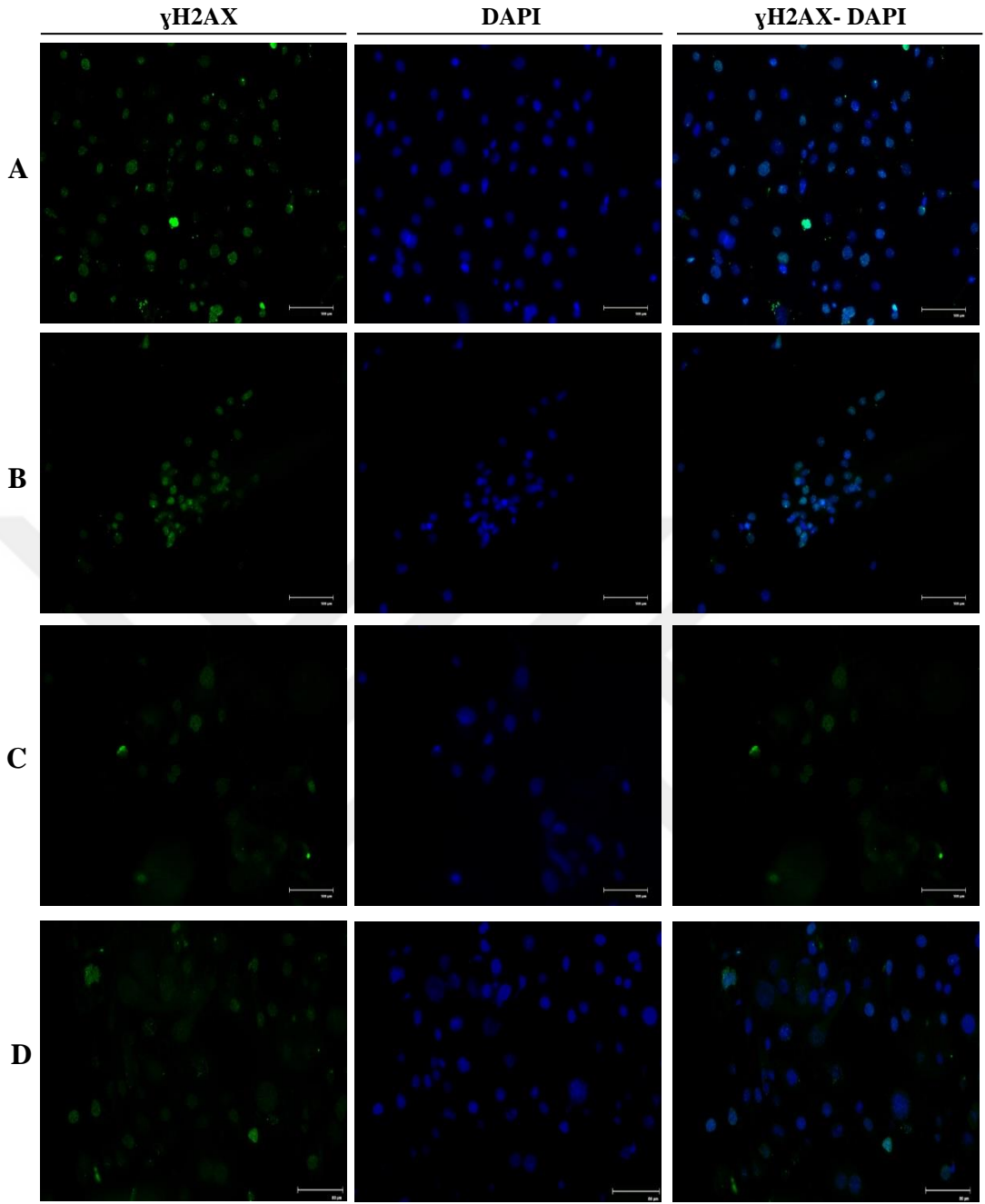
Şekil 175. HCC1937 hücrelerinde MRP1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



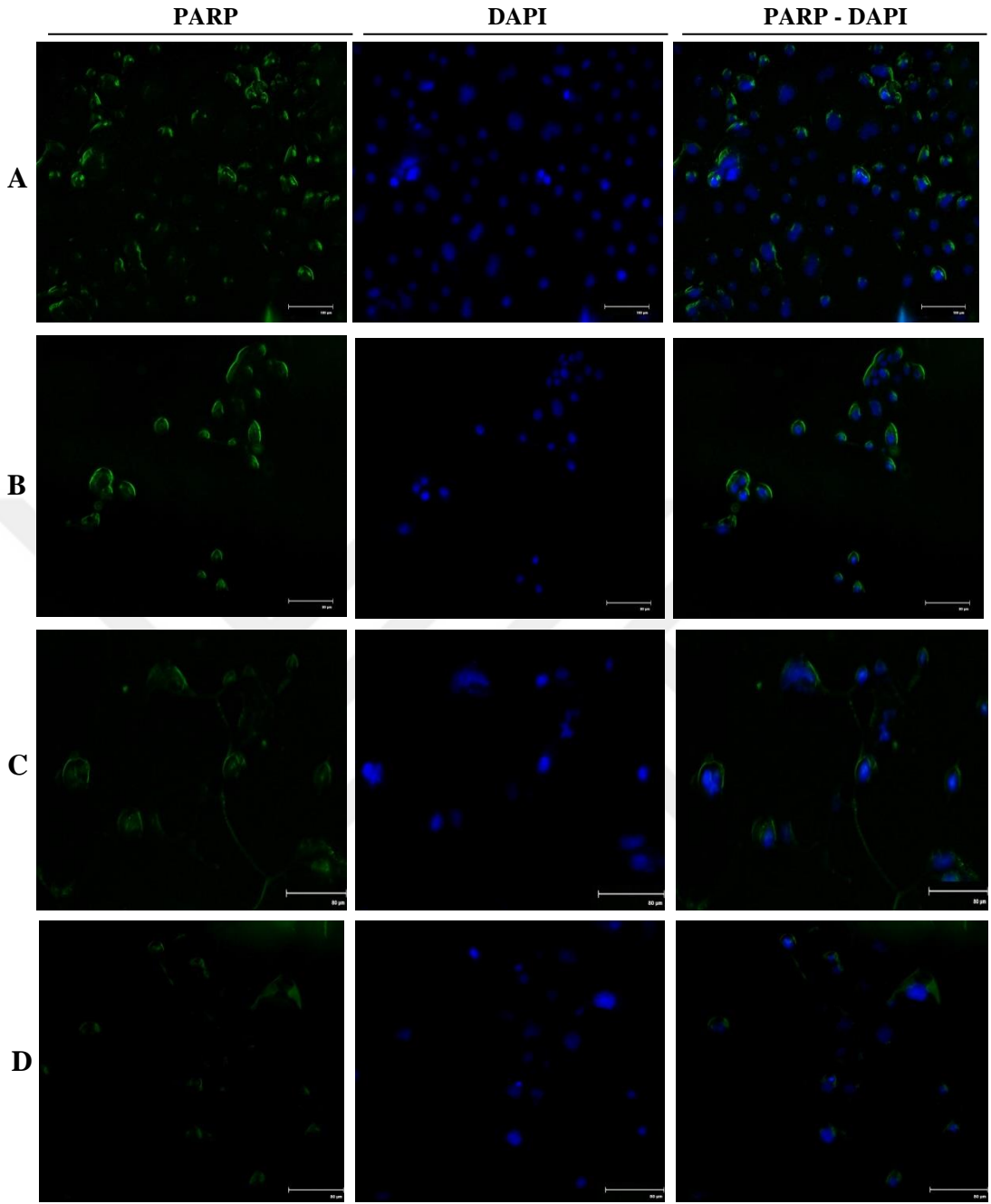
Şekil 176. HCC1937 hücrelerinde beta-actin ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin kontrol grubu ile karşılaştırılması olarak HR ile ilişkili olan H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları üzerine etkisi incelendiğinde, 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanması sonucunda artan doza bağlı olarak nükleusta γ H2AX ve PARP ekspresyonlarının BMN 673'e göre daha fazla miktarda azalmasına rağmen (Şekil 177, 178), nüklear RAD51 ekspresyonunun BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerine göre daha az oranda arttığı ve 10 nM BMN 673-KLN uygulandığında ise azaldığı görüldü (Şekil 179). Ayrıca, BRCA1'in nüklear ekspresyonunun belirlendiği HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak özellikle 0.1 nM BMN 673-KLN uygulanmasından itibaren BRCA1'in nüklear ekspresyonunda önemli derecede azalma olduğu görüldü (Şekil 180).

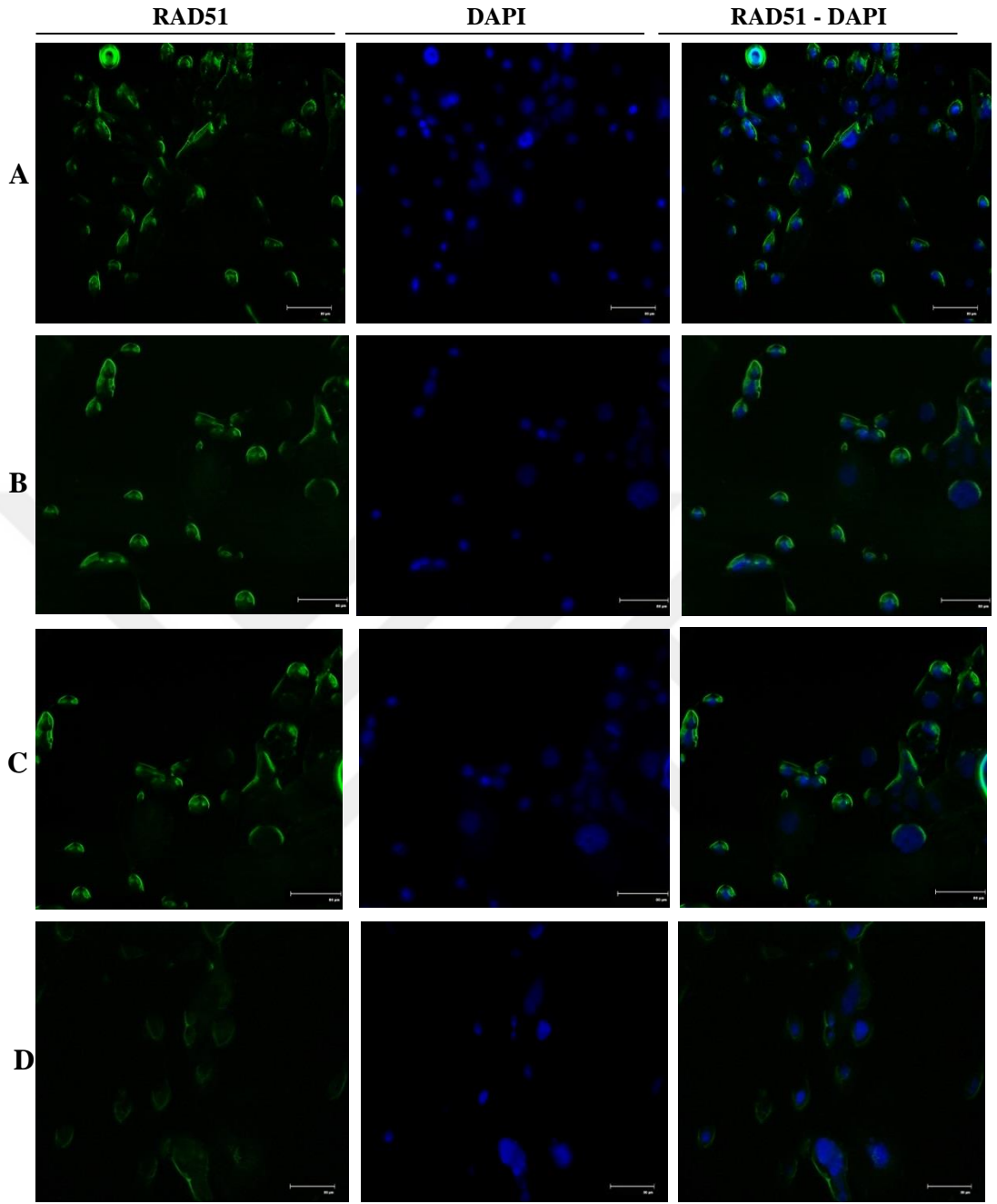
HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin kontrol grubu ile karşılaştırılması olarak MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin lokalizasyonları üzerine etkisi değerlendirildiğinde, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak MDR1 ve BCRP'nin hücre membranında ve sitozolde ekspresyonlarında BMN 673'e göre daha fazla oranda azalma belirlenmesine rağmen (Şekil 181, 182), MRP'in hücre membranı ve sitozolde ekspresyonunda BMN 673'e göre daha az miktarda artış görüldü (Şekil 183). BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinin genel morfolojik yapısı kontrol grubu ile karşılaştırılması olarak beta-actin immünüfloresans boyaması ile görüldü (Şekil 184).



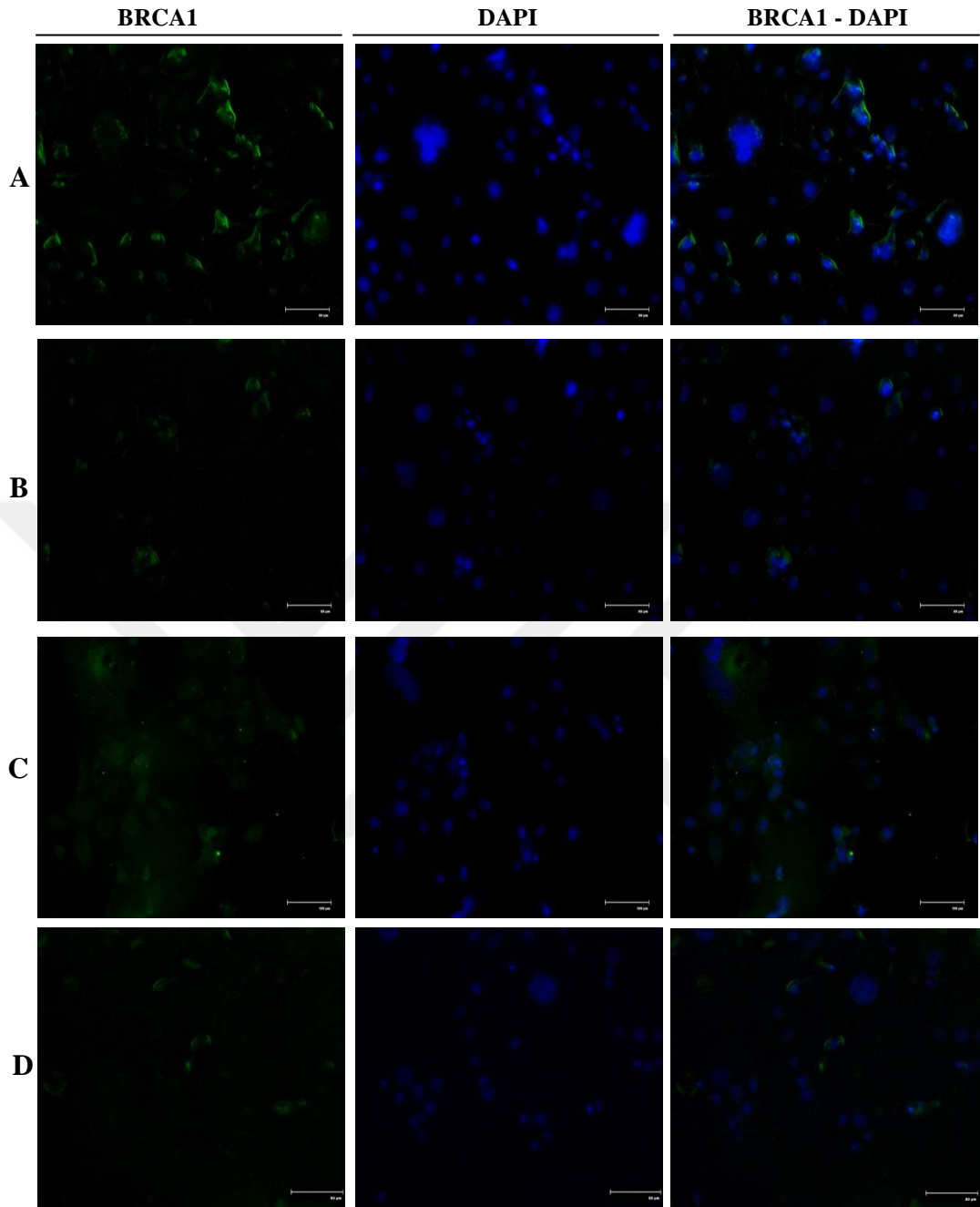
Şekil 177. HCC1937-R hücrelerinde γ H2AX ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



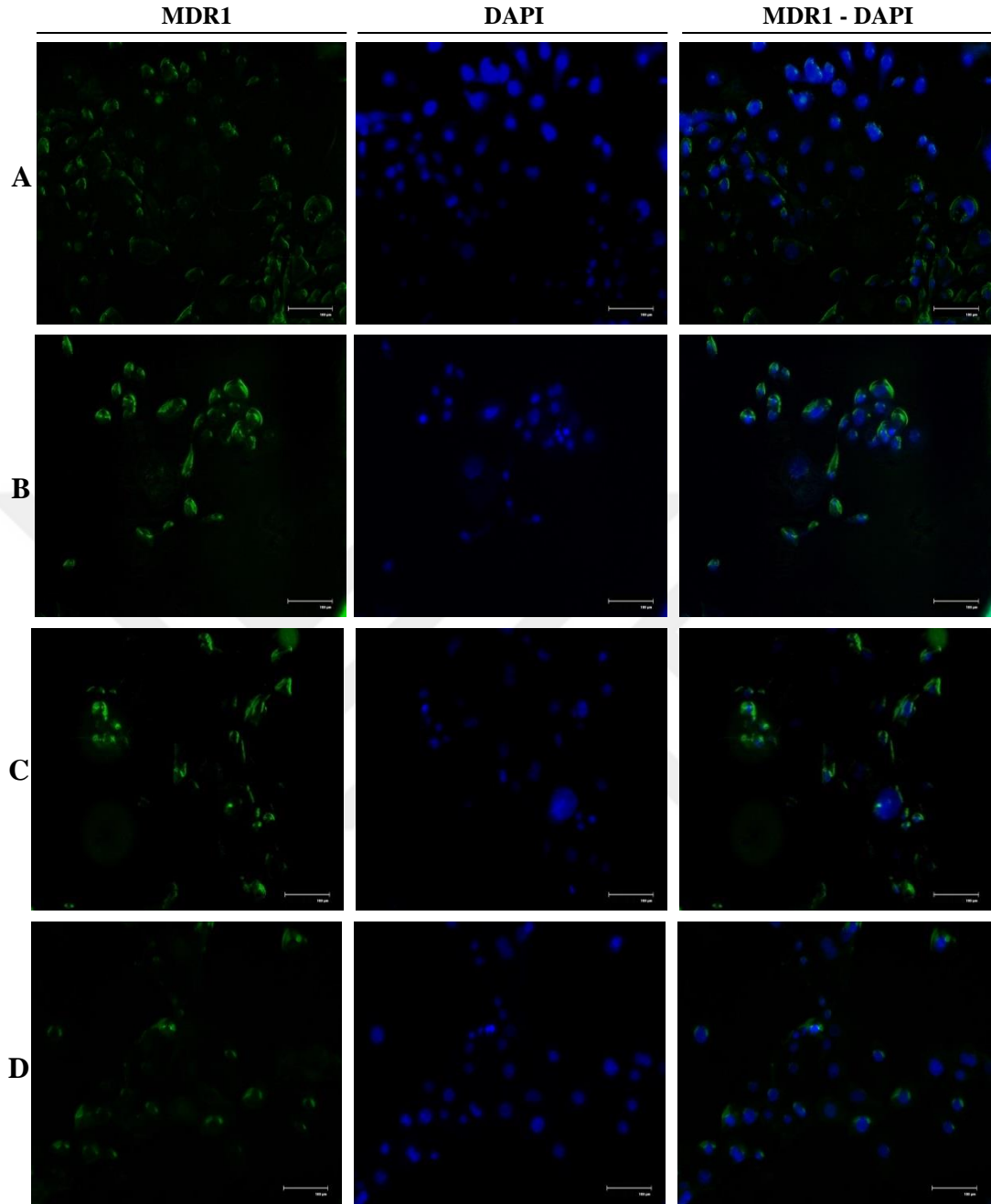
Şekil 178. HCC1937-R hücrelerinde PARP ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



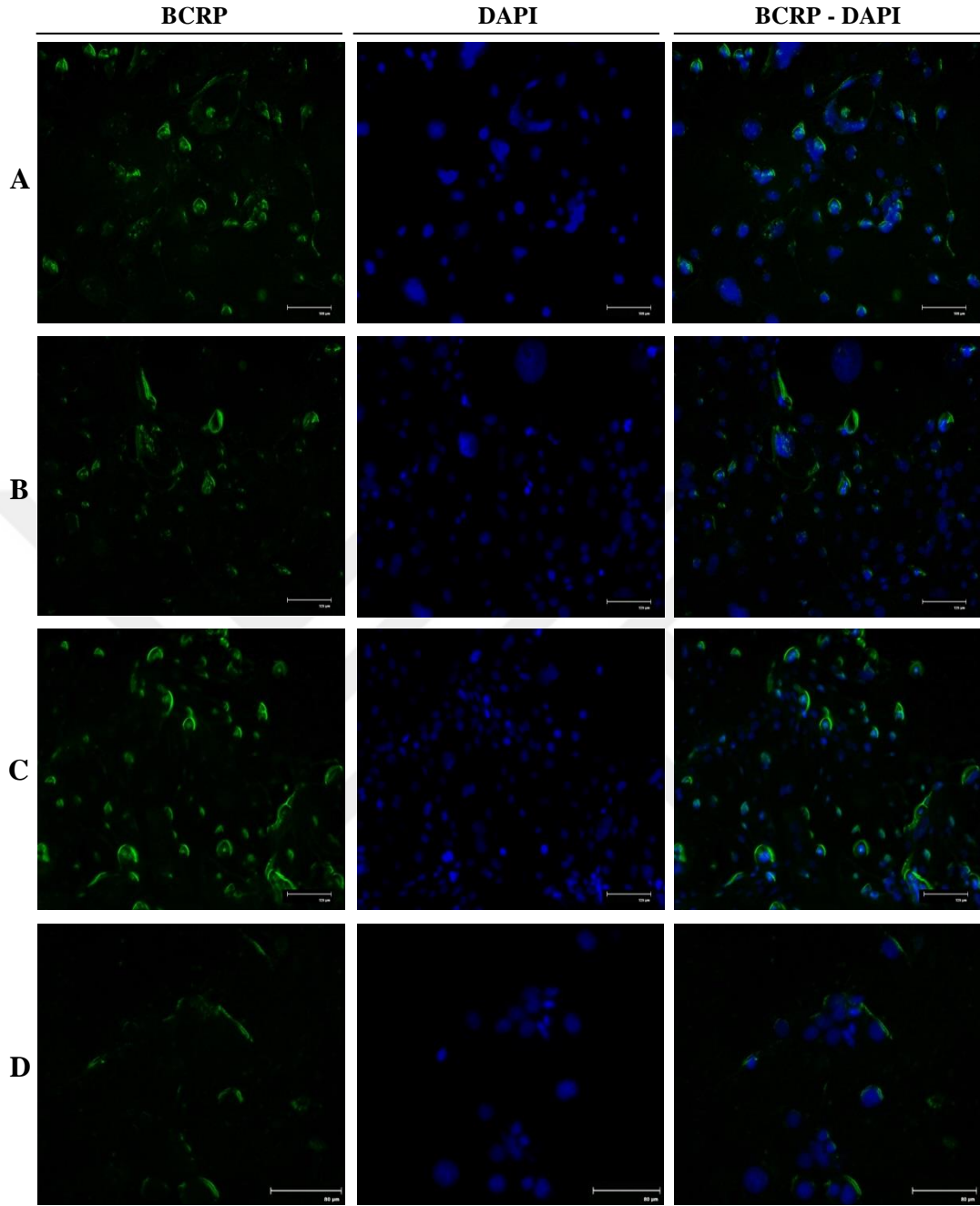
Şekil 179. HCC1937-R hücrelerinde RAD51 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



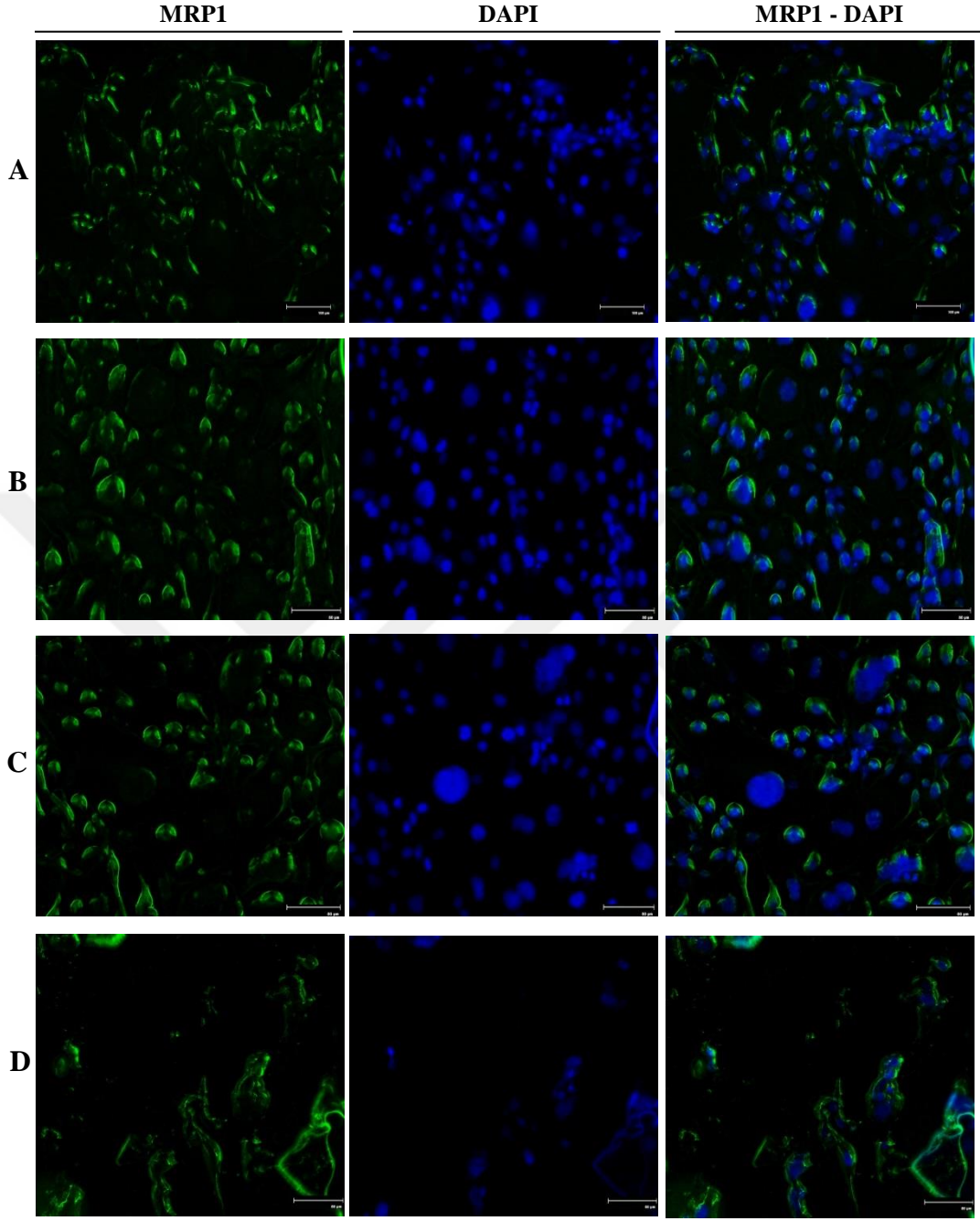
Şekil 180. HCC1937-R hücrelerinde BRCA1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



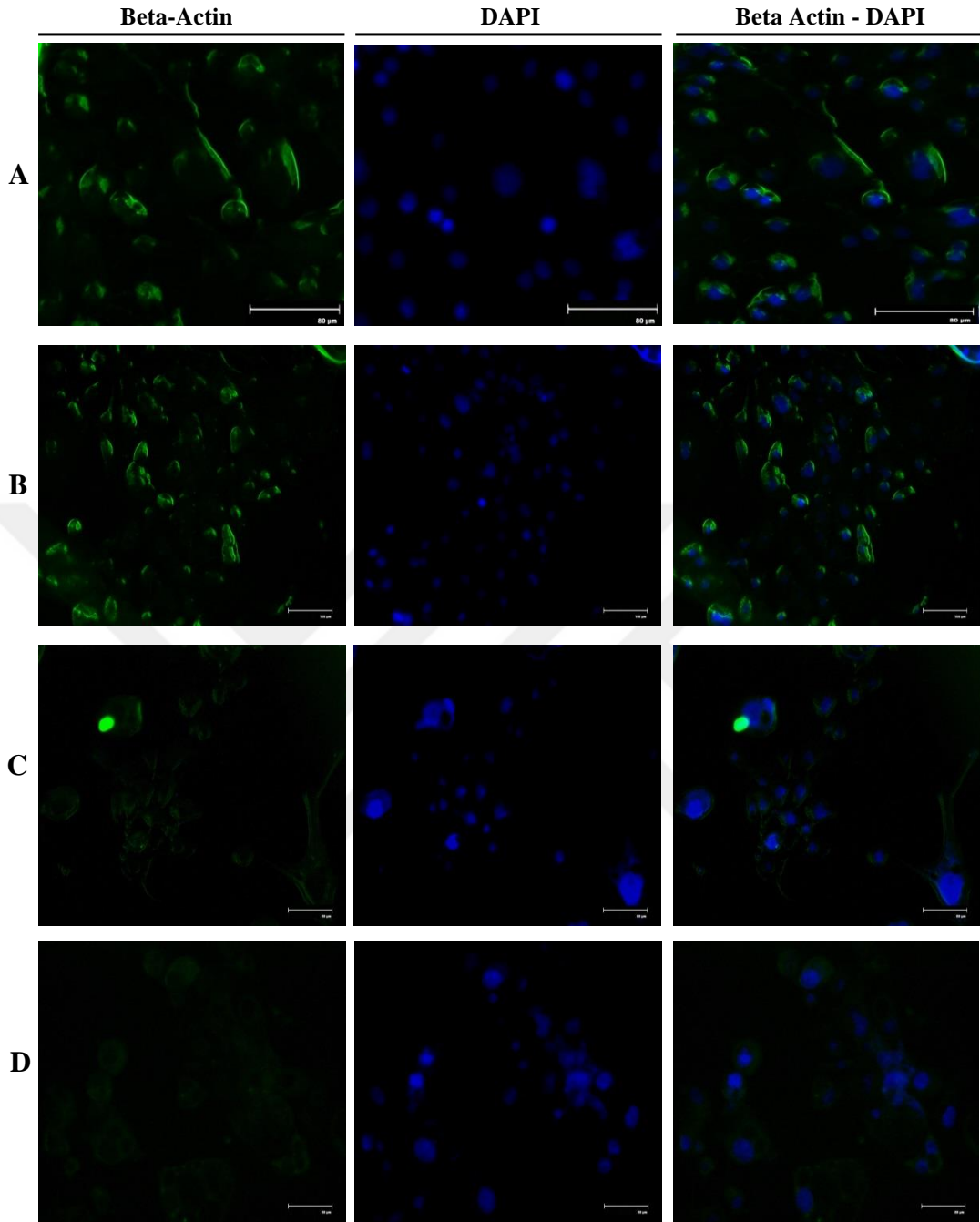
Şekil 181. HCC1937-R hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



Şekil 182. HCC1937-R hücrelerinde BCRP ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



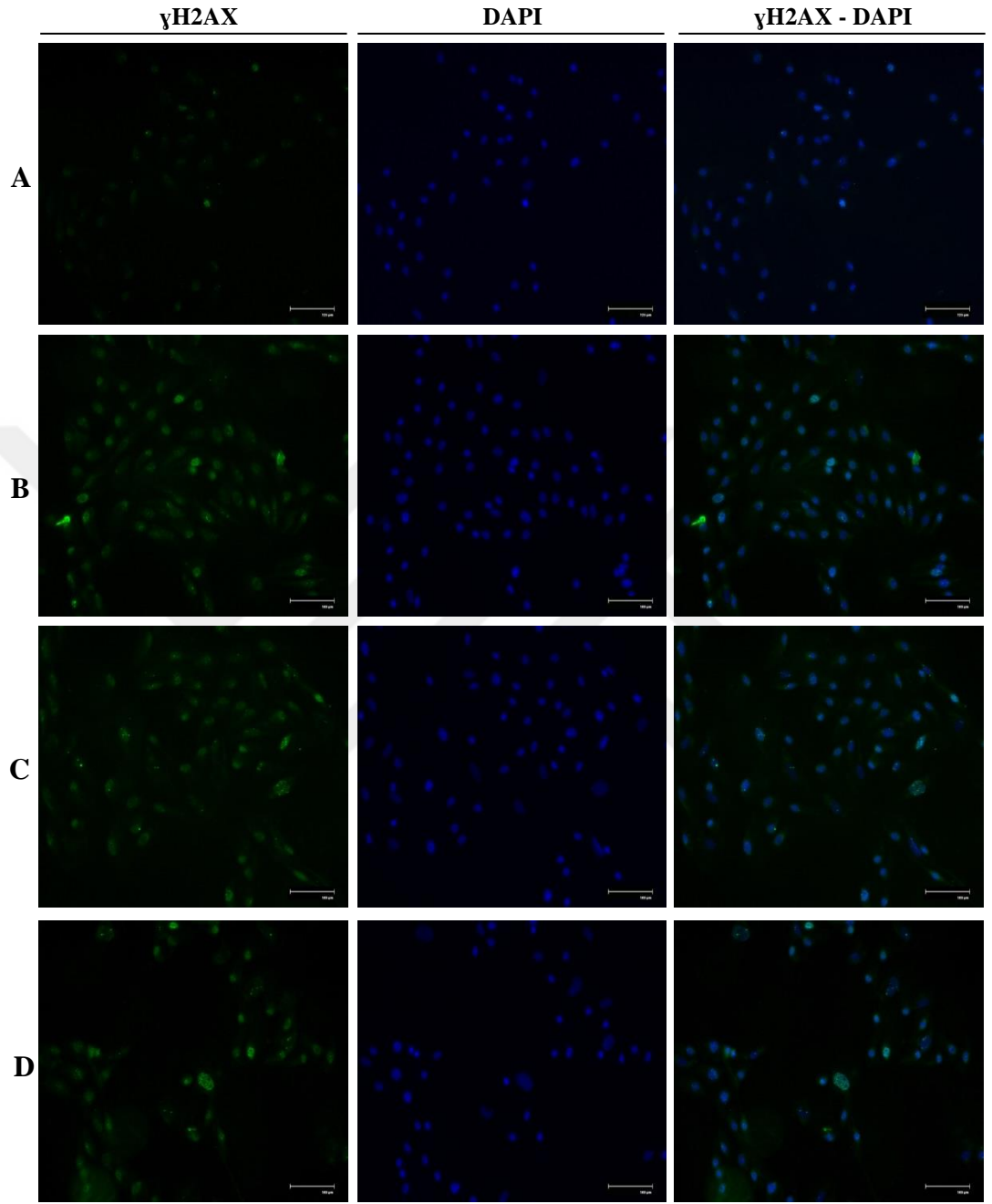
Şekil 183. HCC1937-R hücrelerinde MRP1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



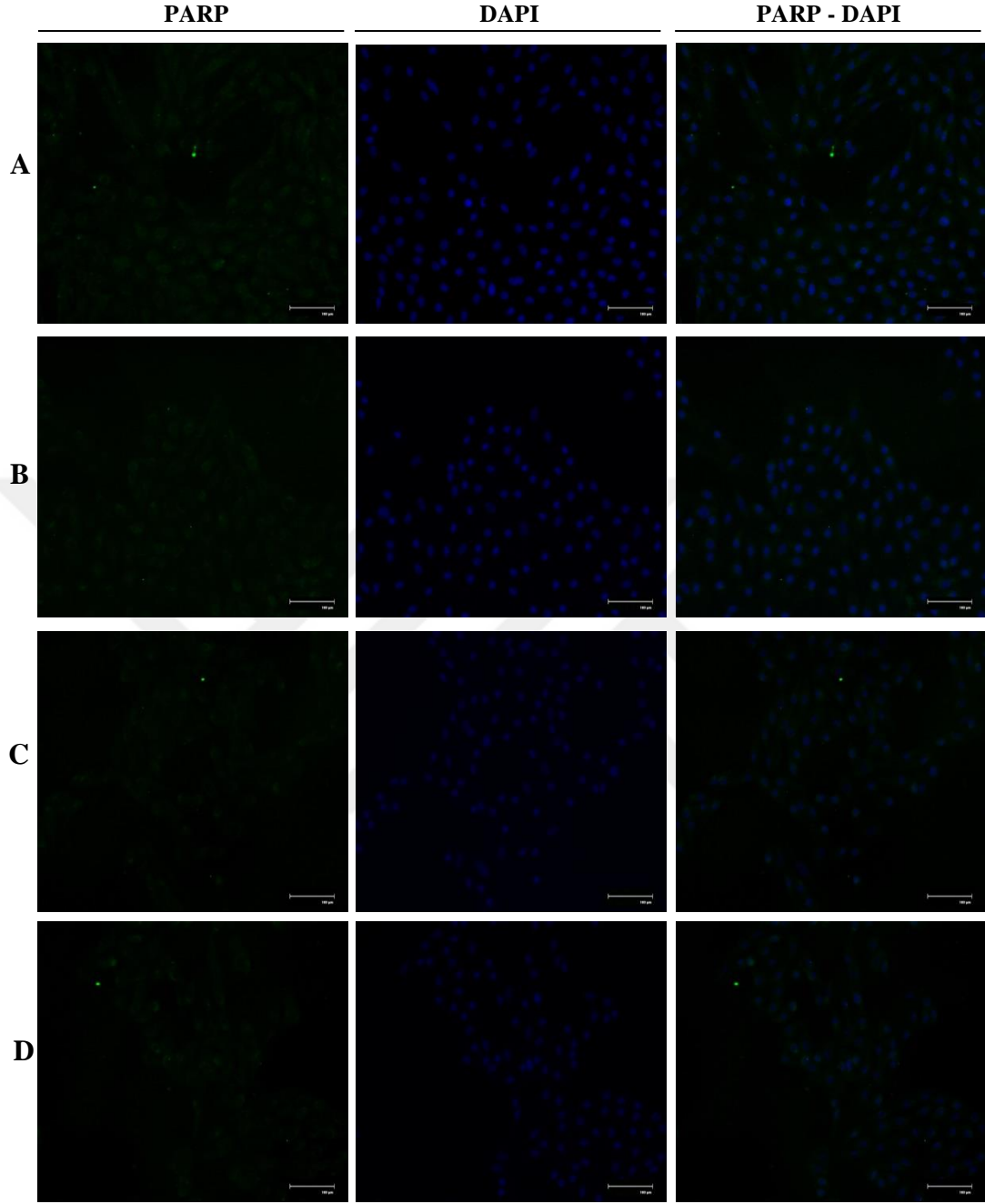
Şekil 184. HCC1937-R hücrelerinde beta-actin ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.

MCF-10A hücrelerinde ise BMN 673-KLN'nin kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak HR ile ilişkili olan H2AX, PARP ve RAD51 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde, 12 gün boyunca 0.01, 0.1, 1 ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna rağmen, nükleusta γ H2AX ekspresyonunda herhangi bir değişim belirlenmemiştir ve nüklear γ H2AX ekspresyonunun BMN 673'e göre daha az oranda olduğu görüntülendi (Şekil 185). Ayrıca, nüklear PARP ekspresyonunda BMN 673'e uygulanan hücrelere benzer bir oranda bir azalış (Şekil 186) ve nüklear RAD51 ve BRCA1 ekspresyonlarında BMN 673'e göre daha az bir oranda artış görüntülendi (Şekil 187, 188).

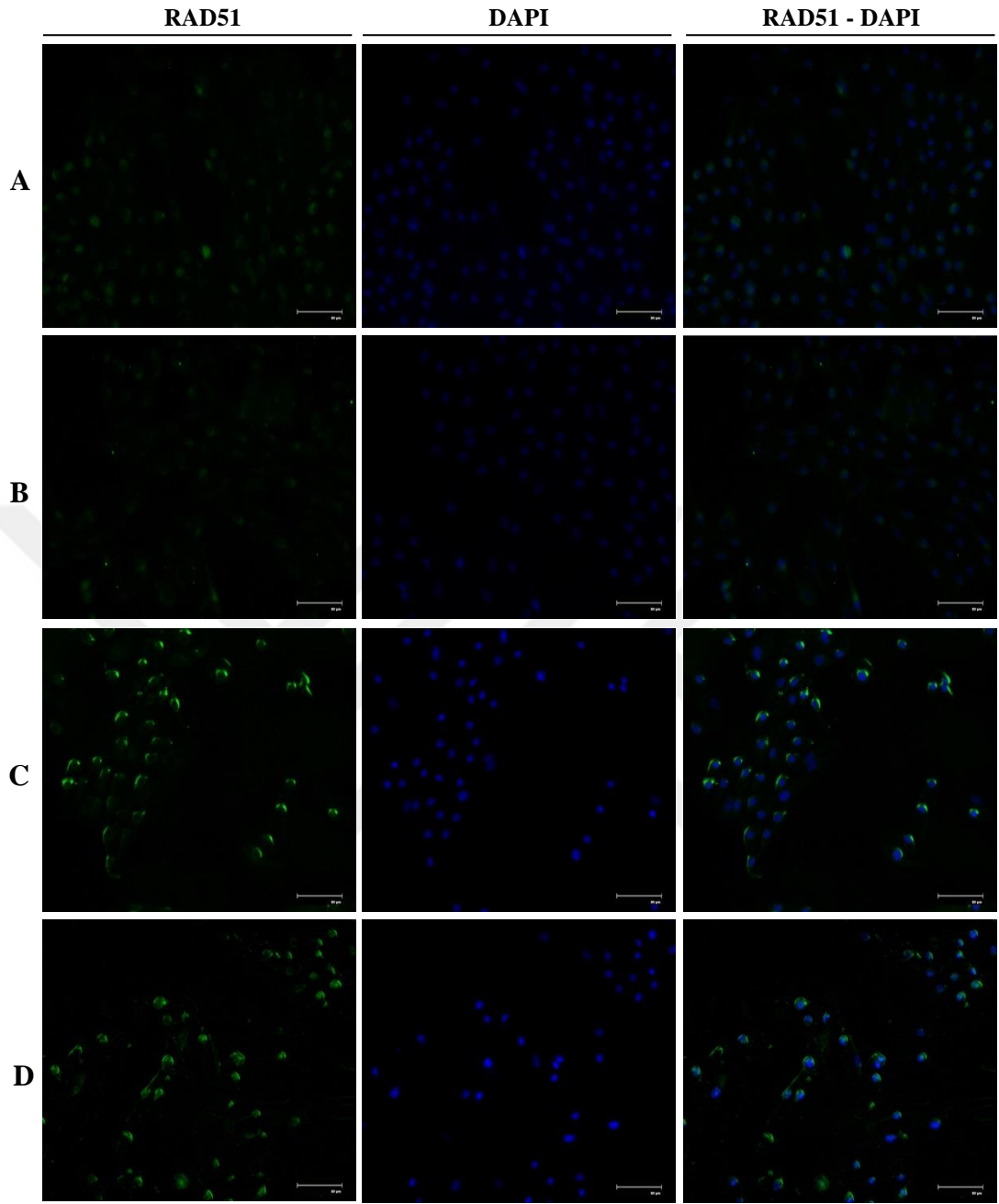
MCF-10A hücrelerinde BMN 673-KLN'nin kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak MDR ile ilişkili olan MDR1, BCRP ve MRP1 proteinlerinin lokalizasyonları üzerinde etkisi değerlendirildiğinde ise, BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonu arttıkça MDR1, BCRP ve MRP1'in ekspresyonlarında doza bağlı artış belirlenmesine rağmen BMN 673'e göre artış miktarı daha az oranda görüntülendi (Şekil 189-191). Ancak, 1 nM BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde MRP1'in sitozolde ekspresyon oranı daha fazla gözlemlendi. BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinin genel morfolojik yapısı kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak beta-actin immünfloresans boyaması ile görüntülendi ve BMN 673'ün aksine hücrenin morfolojik yapısında herhangi bir deformasyon gözlemlenmedi (Şekil 192).



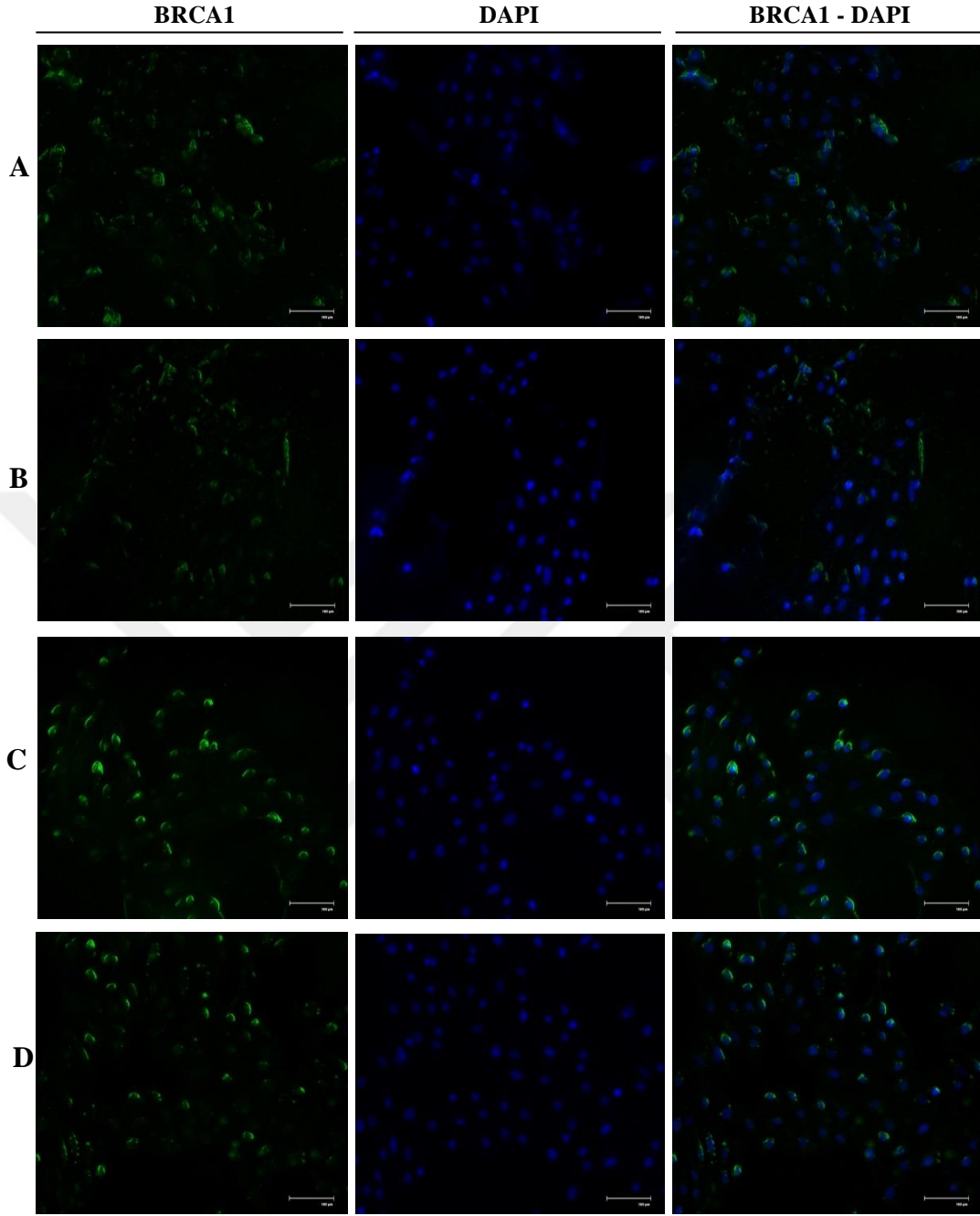
Şekil 185. MCF-10A hücrelerinde γ H2AX ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



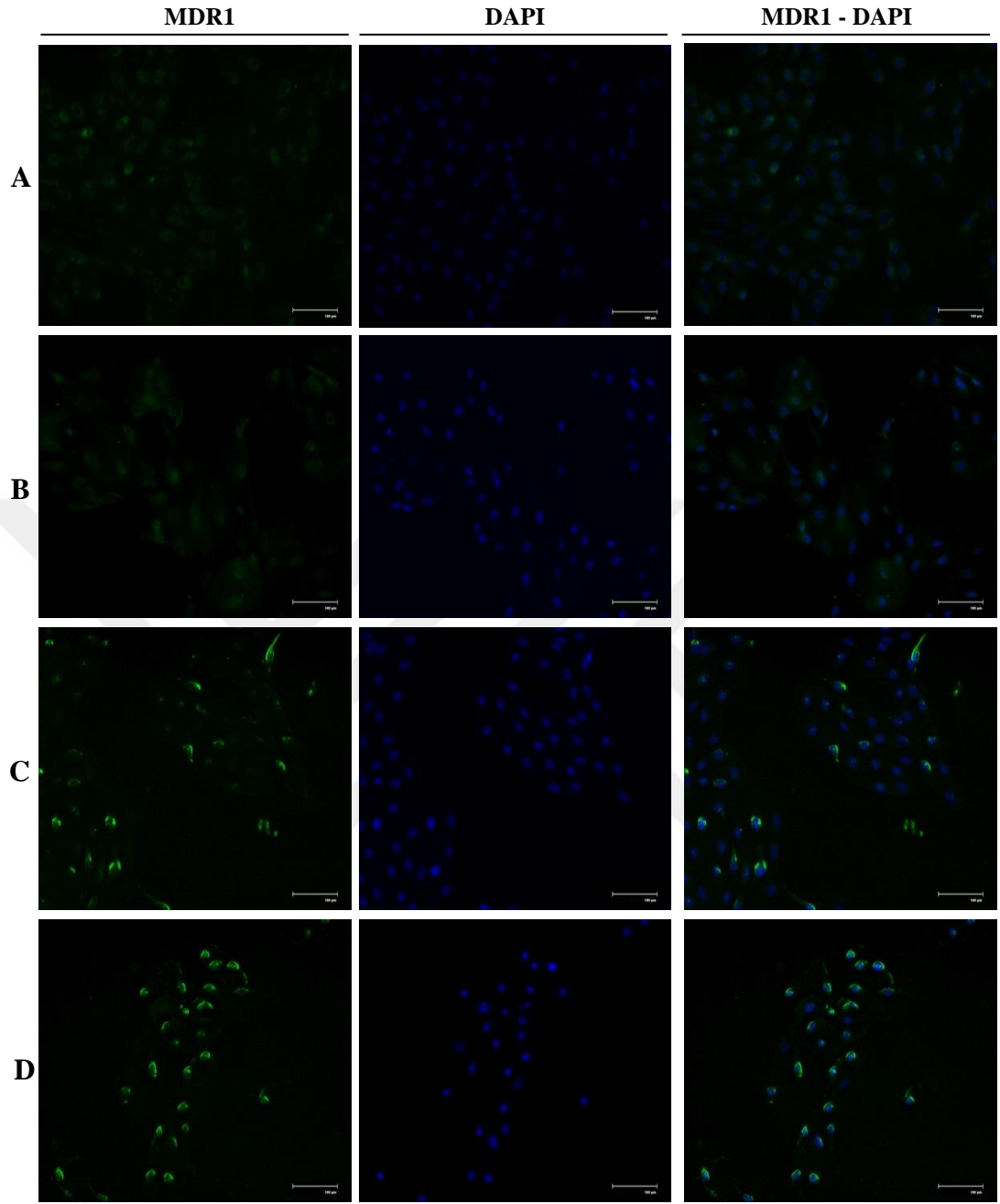
Şekil 186. MCF-10A hücrelerinde PARP ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



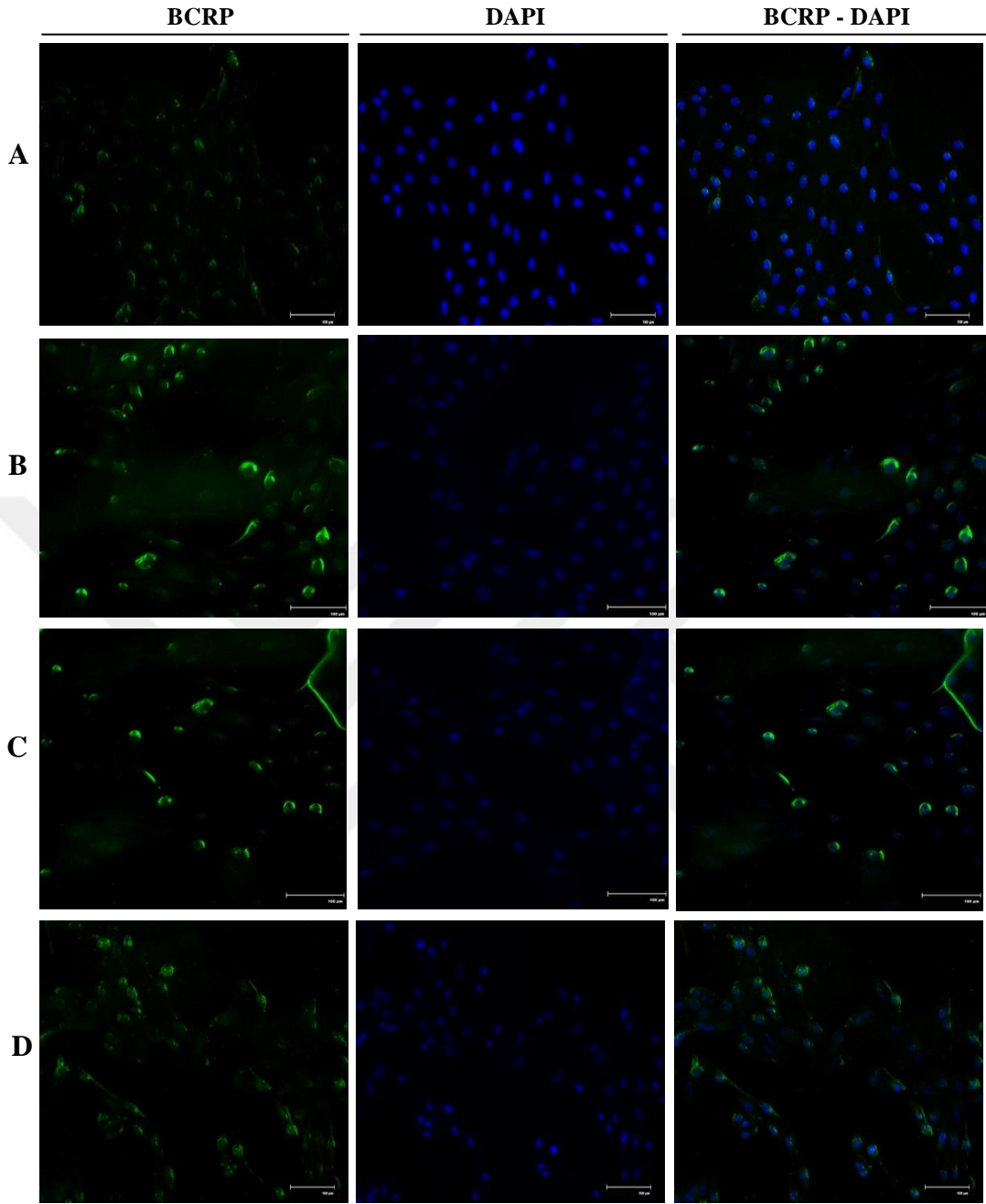
Şekil 187. MCF-10A hücrelerinde RAD51 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



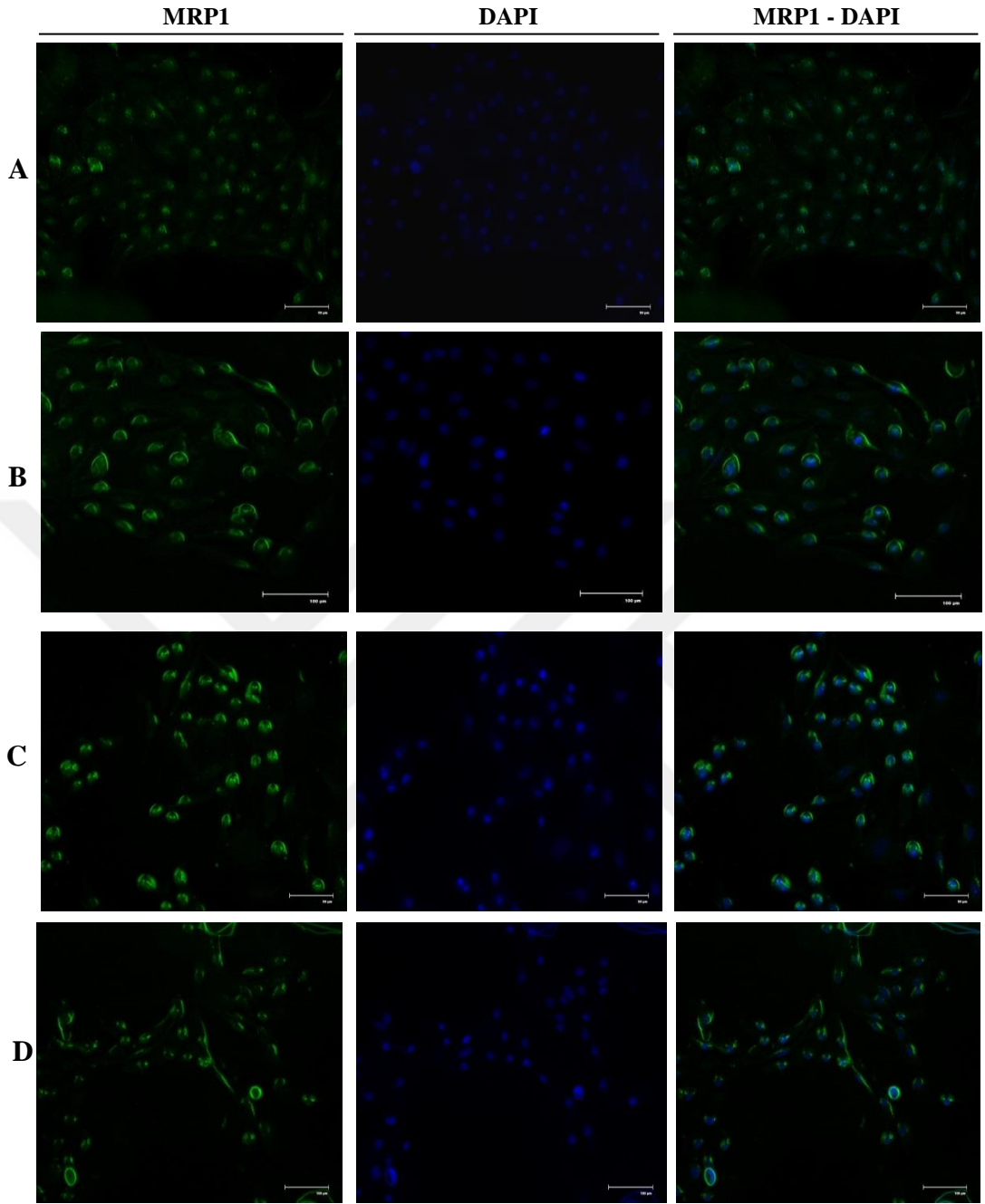
Şekil 188. MCF-10A hücrelerinde BRCA1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



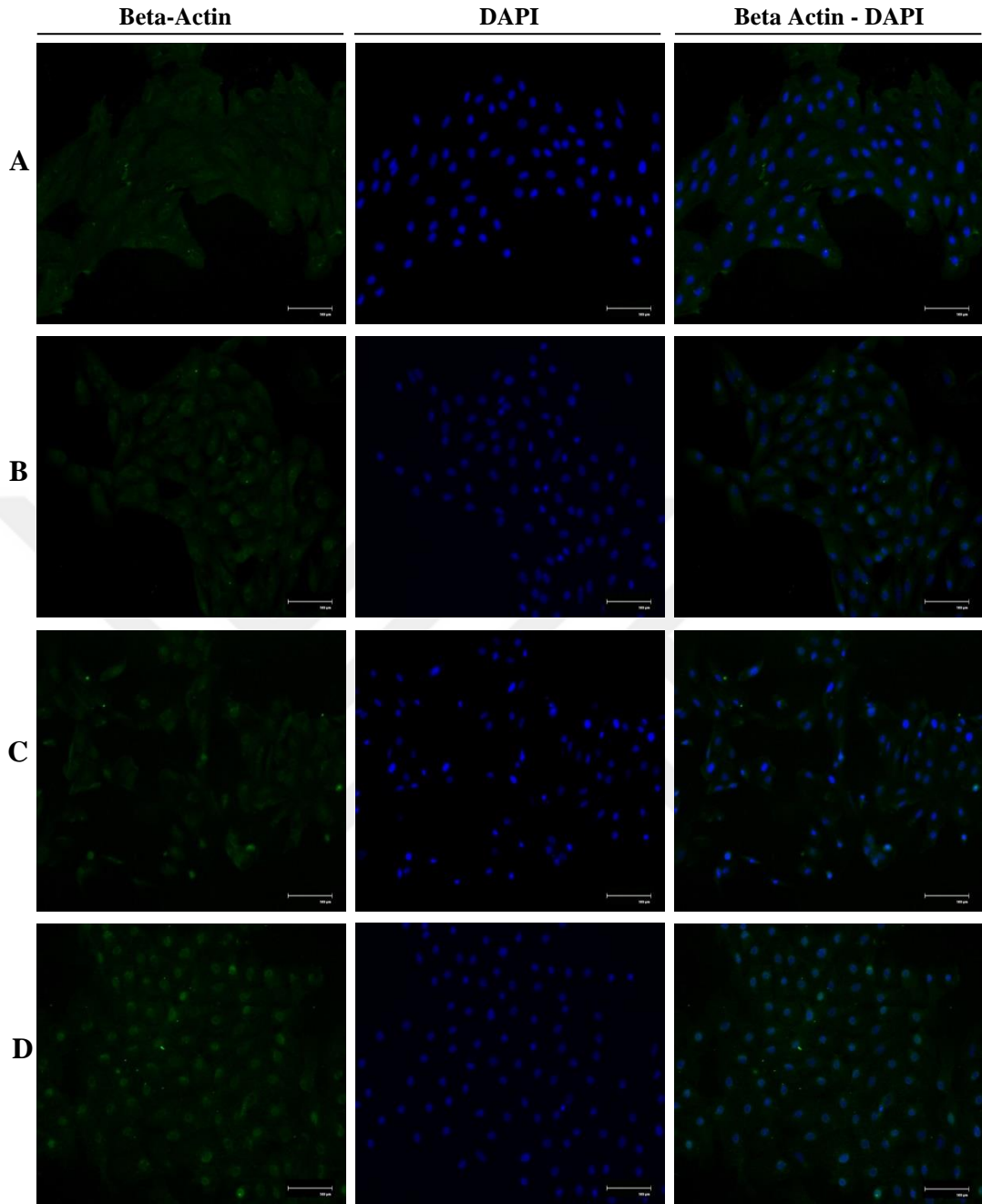
Şekil 189. MCF-10A hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



Şekil 190. MCF-10A hücrelerinde BCRP ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



Şekil 191. MCF-10A hücrelerinde MRP1 ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.



Şekil 192. MCF-10A hücrelerinde beta-actin ekspresyonunun immunofloresans analizi. (A) 0.01 nM, (B) 0.1 nM, (C) 1 nM, (D) 10 nM BMN 673-KLN.

Sonuç olarak, HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak BMN 673'e göre nüklear PARP ekspresyonunda daha fazla oranda azalma ve nüklear RAD51 ve BRCA1 ekspresyonunda daha az oranda artış belirlenmiştir. Ayrıca, MDR ile ilişkili olan özellikle BCRP ve MRP1'in hücre membranı ve sitozolde ekspresyon miktarında BMN 673'e göre daha az oranda artış görüntülenmiştir.

HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak nüklear BRCA1'in ekspresyonunda BMN 673'e göre anlamlı derecede azalma belirlenmesine rağmen, nüklear RAD51 ekspresyonunda BMN 673'e göre daha az oranda artış görüntülenmiştir. Ayrıca γ H2AX ekspresyonu BMN 673'e göre daha az oranda belirlenmiştir. HCC1937-R hücrelerinin BMN 673'e karşı dirençli olmasından dolayı hücre membranı ve sitozolde yüksek eksprese olduğu bilinen özellikle BCRP ve MRP1'in ekspresyonu, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak artmasına rağmen, BMN 673'e göre artış oranının daha az olduğu görüntülenmiştir. MDR1'in ekspresyonun ise, BMN 673 uygulanan hücelere göre daha düşük konsantrasyonda daha az seviyede olduğu gözlemlenmiştir.

BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde, γ H2AX, PARP, RAD51 ve BRCA1'in BMN 673 uygulanan hücelere göre daha az eksprese olduğu görüntülenmiştir. MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin ise, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak artmasına rağmen, BMN 673'e göre daha az oranda olduğu belirlenmiştir.

BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR ve MDR yolaklarında yer alan genlerin protein ürünlerinin hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen immünfloresans yönteminden elde edilen sonuçlar ile western blot analizi paralellik göstermektedir.

4.36. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin Hücrelerde Neden Olduğu İnce Yapısal Değişimlerin Belirlenmesi

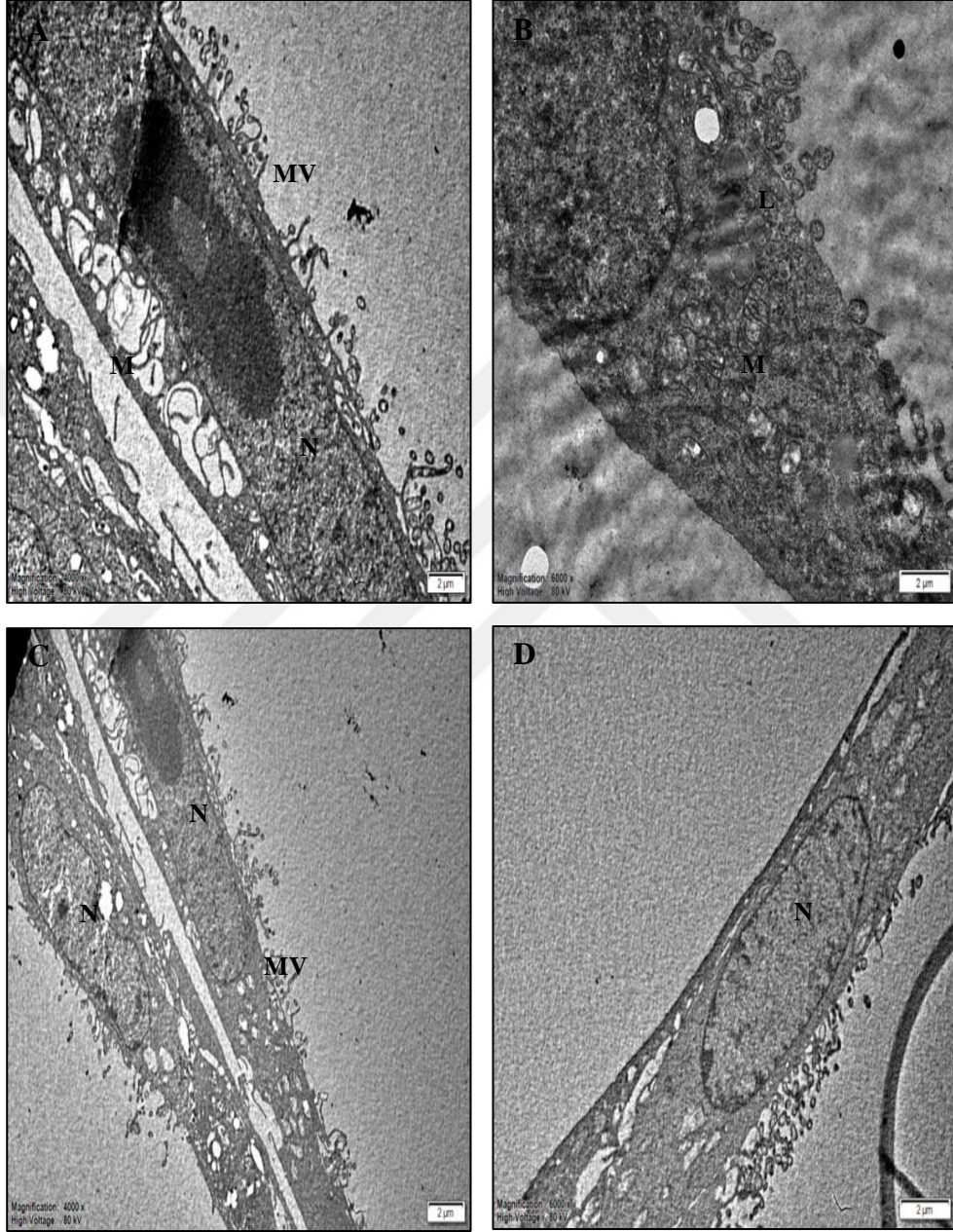
BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişimler TEM ile analiz edilerek elde edilen görüntüler Şekil 193-201'de sunuldu. HCC1937 hücrelerinin genel morfolojik yapısı incelendiğinde, sağlam hücre ve çekirdek membranları, hücrelerde farklı şekil ve boyutlarda mitokondriler ve membranlarda mikrovilli oluşumları görüntülenmesine

rağmen (Şekil 193), 12 gün boyunca 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde apoptotik cisimlere, lizozom ve çeşitli boyutlarda vakuollere ve ER lümenlerinde dilatasyonlara rastlandı (Şekil 194). BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ise, kontrol grubuna göre mitokondrilerin şekil ve boyutlarında değişiklikler, mitokondrilerde bozuk krista yapıları ve lizozomlar gözlemlendi (Şekil 195). Aynı zamanda, hücre ve çekirdek membran bütünlüğünün bozularak hücrelerin apoptotik ölüme (apoptotik cisimcikler, kromatin yoğunlaşması) gittiği gözlemlendi. Bu hücrelerin sitoplazmalarında kontrol hücrelerinde gözlenmeyen elektron yoğun küçük partiküller yapılarının BMN 673-KLN olabileceği düşünüldü. Bu nedenle hücre membranından girdiği ve hücreye nüfuz ettiği öngörüldü (Şekil 195).

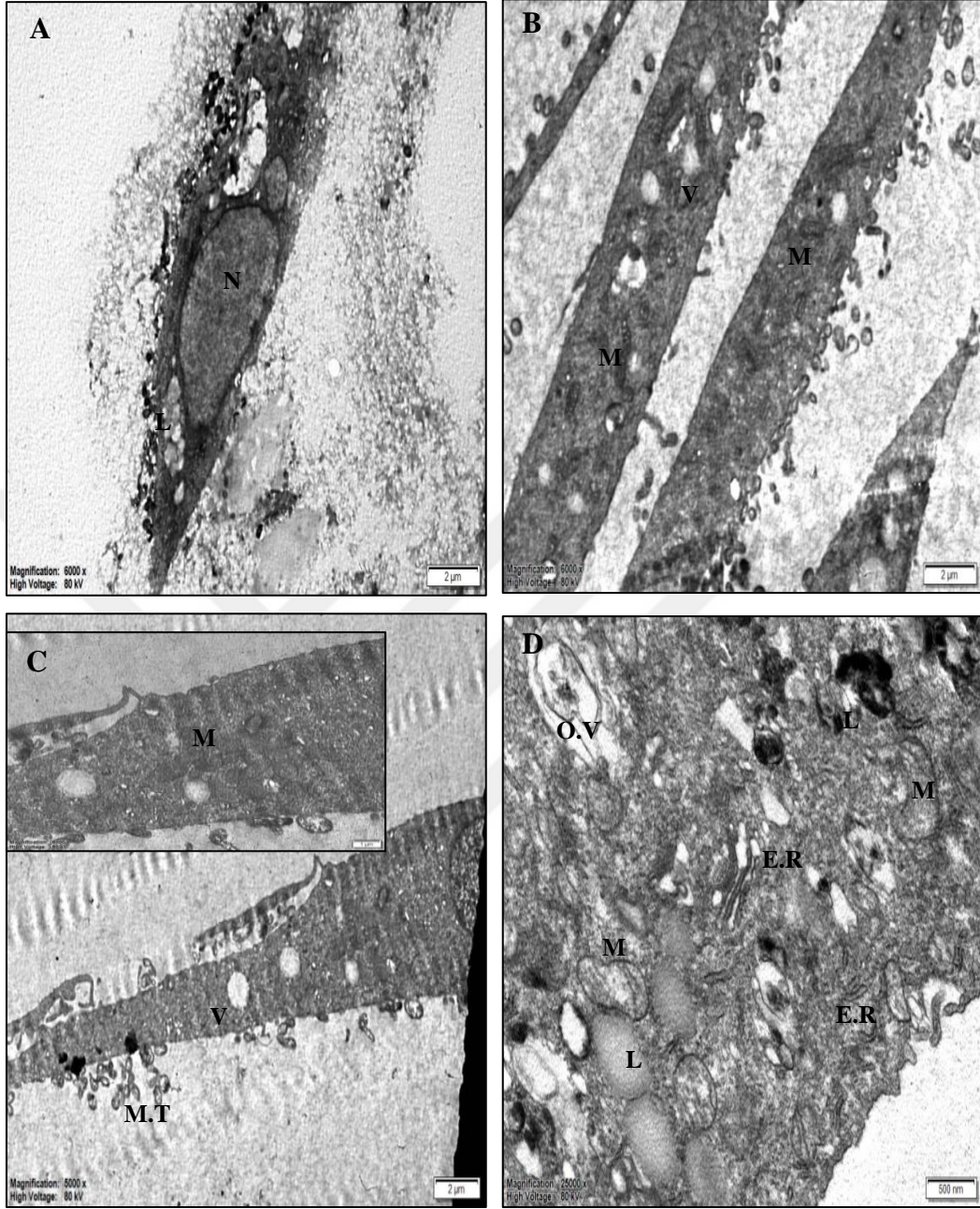
HCC1937-R hücrelerinin genel morfolojik yapısı HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığında, HCC1937-R hücrelerinin HCC1937 parental hücrelerine göre daha oval bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca, düzensiz nükleusa, normal yapılı mitokondrilere, lizozomlara ve hücre yüzeyinde mikrovilli oluşumlarına rastlandı (Şekil 196). BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, hücrelerin kazandığı dirençten dolayı kontrol HCC1937-R hücrelerine benzer görüntüler elde edildi. Hücrelerde düzgün hücre ve çekirdek membranı, normal morfolojiye sahip ER ve otofajik vakuoller gözlemlendi (Şekil 197). BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ise, apoptotik ölümden dolayı düzensiz ve girintili-çıkıntılı nükleus membranları, membran tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması, kontrol hücrelerine göre iyice büzülmüş hücre yapısı, farklı şekil ve boyutta mitokondriler ve vakuoller gözlemlendi. Ayrıca, hücre membranında mikrovilli oluşumları ve mitokondrilerin kristalarında hasar görüntülendi (Şekil 198).

MCF-10A kontrol hücrelerinin genel morfolojisi incelendiğinde ise, daha uzun hücre yapısına sahip, düzgün hücre ve çekirdek membranları olan ve çok sayıda mitokondri ve lizozoma sahip hücreler olarak gözlemlendi (Şekil 199). BMN 673 uygulanan hücrelerin BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı hücrelerin genel morfolojik yapısını kaybederek, nükleus ve hücre membranında deformasyonlar (membran tomurcuklanma) ve farklı şekil ve boyutlarda mitokondriler ve vakuoller gözlemlendi (Şekil 200). BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde ise, BMN 673'ün toksik etkisinin azalmasından dolayı, BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerine göre hücrelerin genel morfolojik yapısının, hücre ve çekirdek membranlarının bütünlüğünün

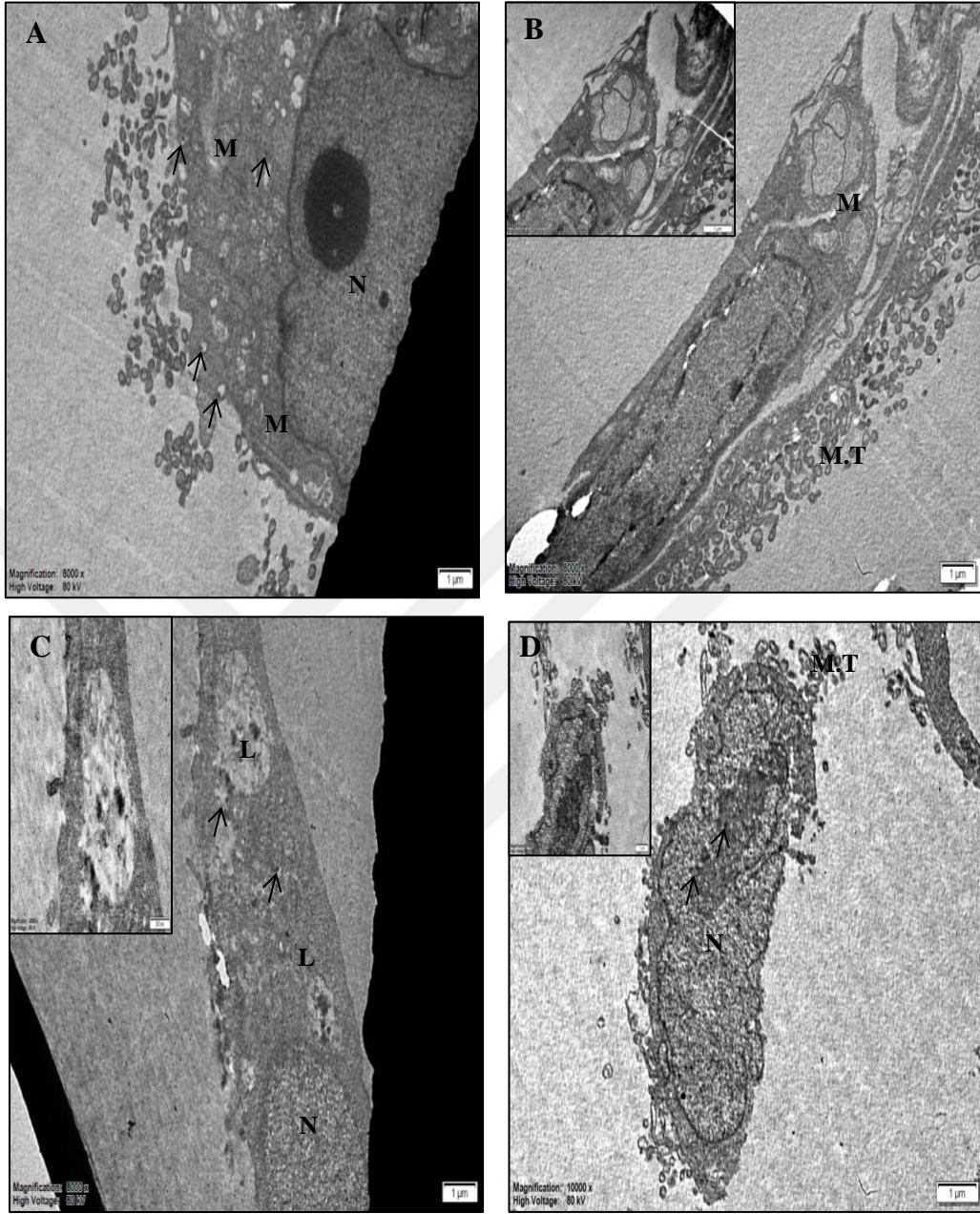
korunduğu, ancak kristalleri kaybolmuş, dilate olmuş veya vakuolleşmiş mitokondrilere rastlandı (şekil 201).



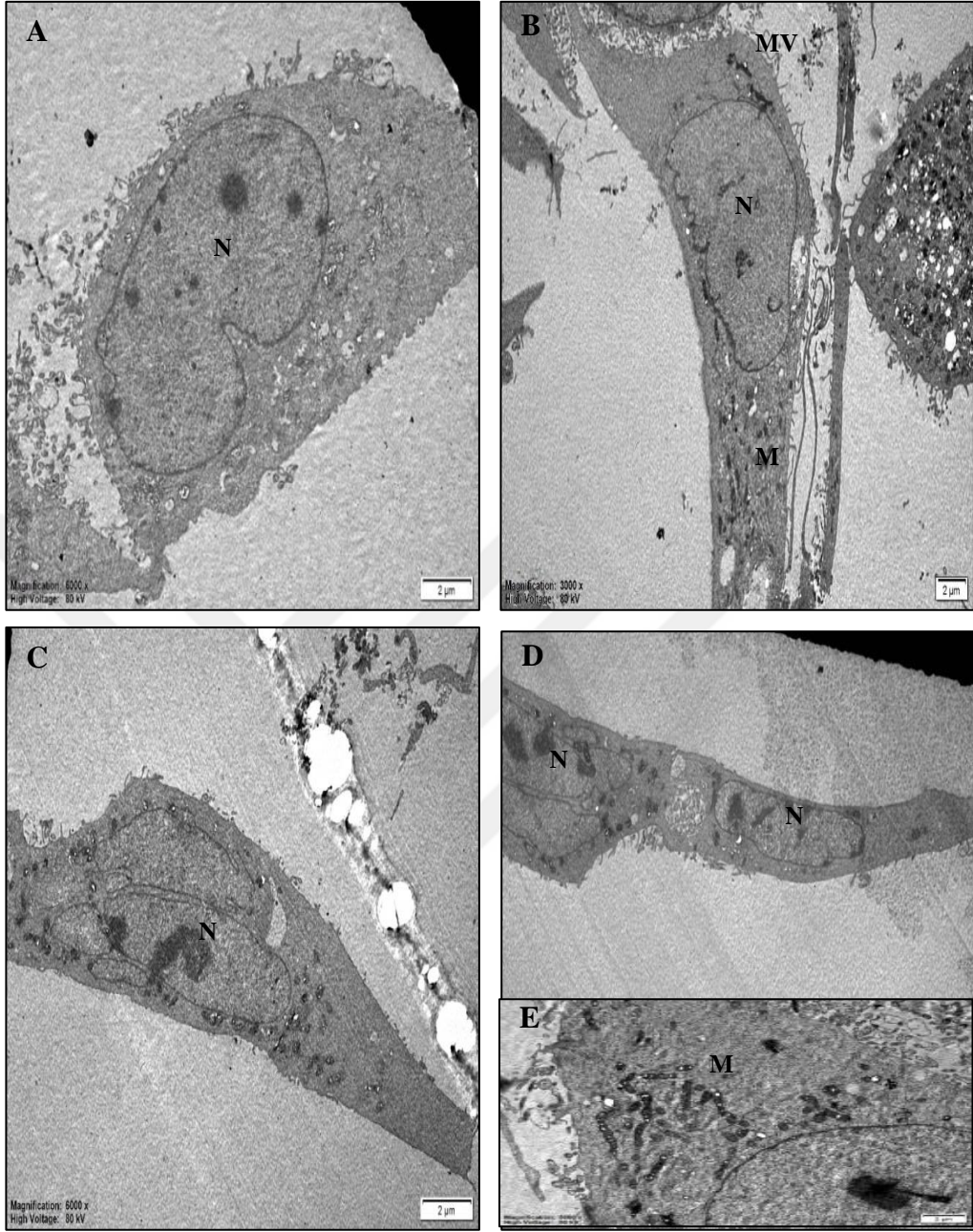
şekil 193. HCC1937 hücresinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A)X4000, (B)X6000, (C)X4000, (D)X6000. N:Nükleus; M:Mitochondri; L:Lizozom; MV:Mikrovillus.



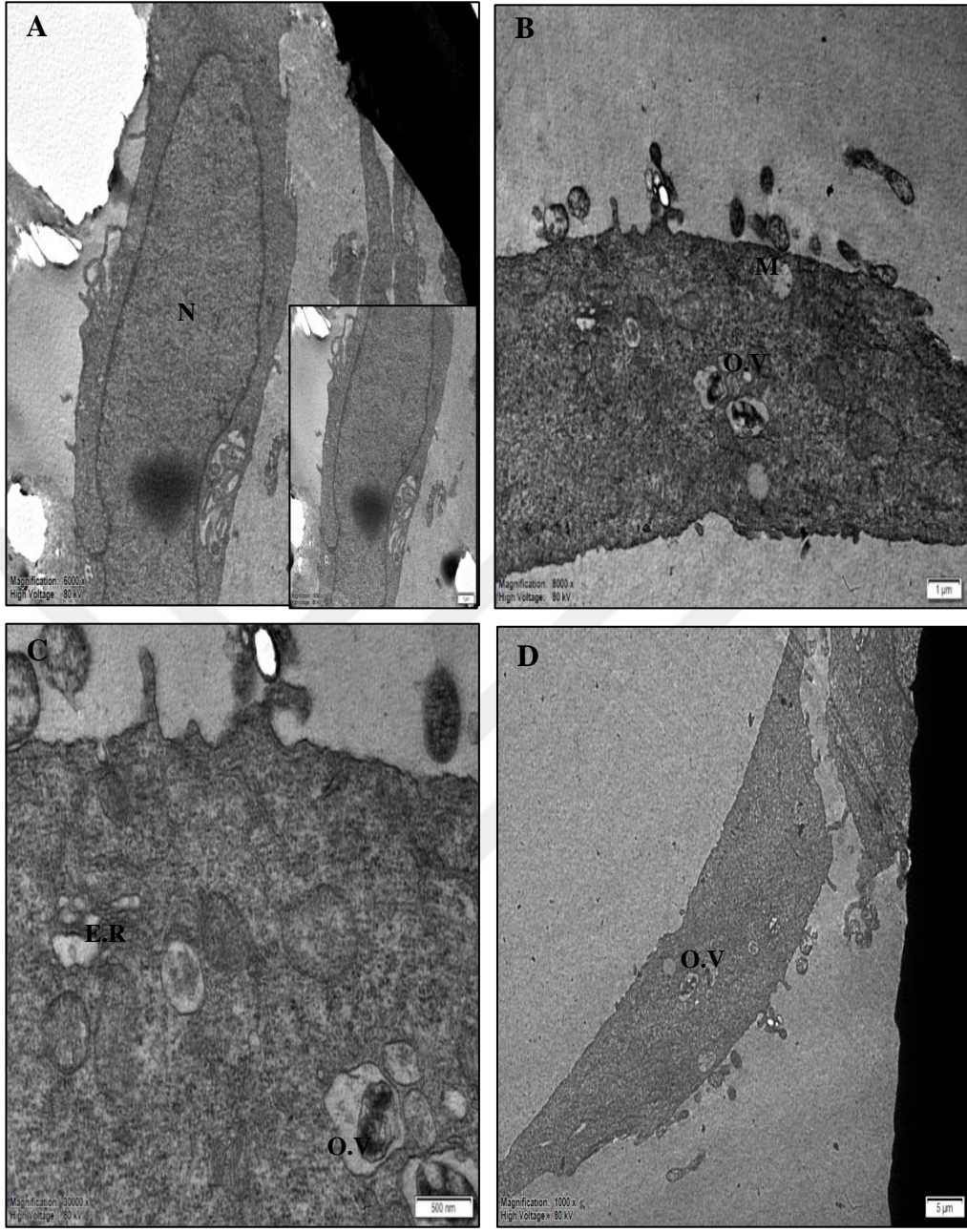
Şekil 194. BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A) X6000, (B)X6000, (C)X5000, (D)X25000. N:Nükleus; M:Mitokondri; L:Lizozom; V:Vakuol; E.R:Endoplazmik retikulum; O.V:Otofajik vakuol; M.T: Membran tomurcuklanma.



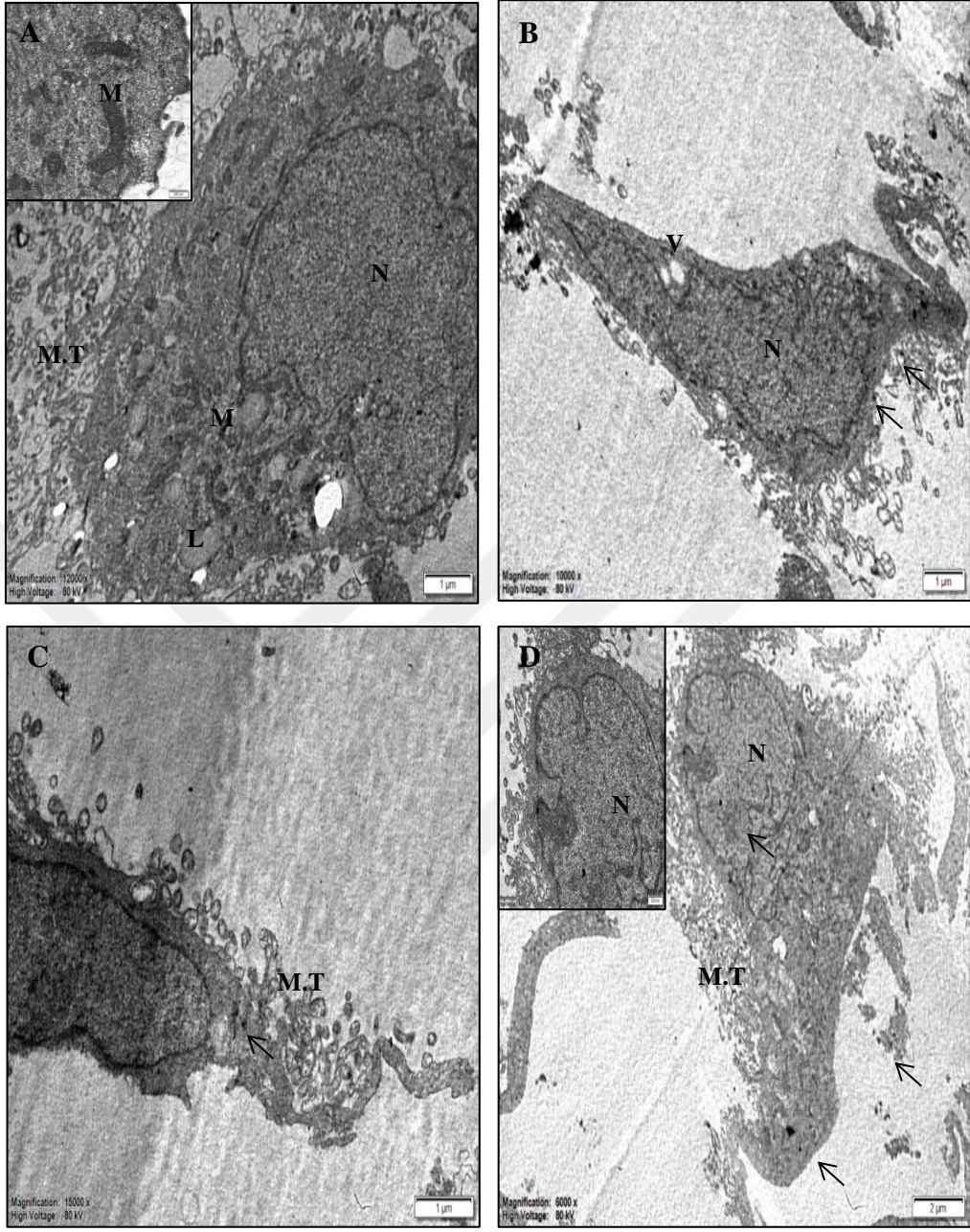
Şekil 195. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A) X8000, (B)X8000, (C)X8000, (D)X10000. N:Nükleus; M:Mitokondri; L:Lizozom; M.T: Membran tomurcuklanma; → BMN 673-KLN.



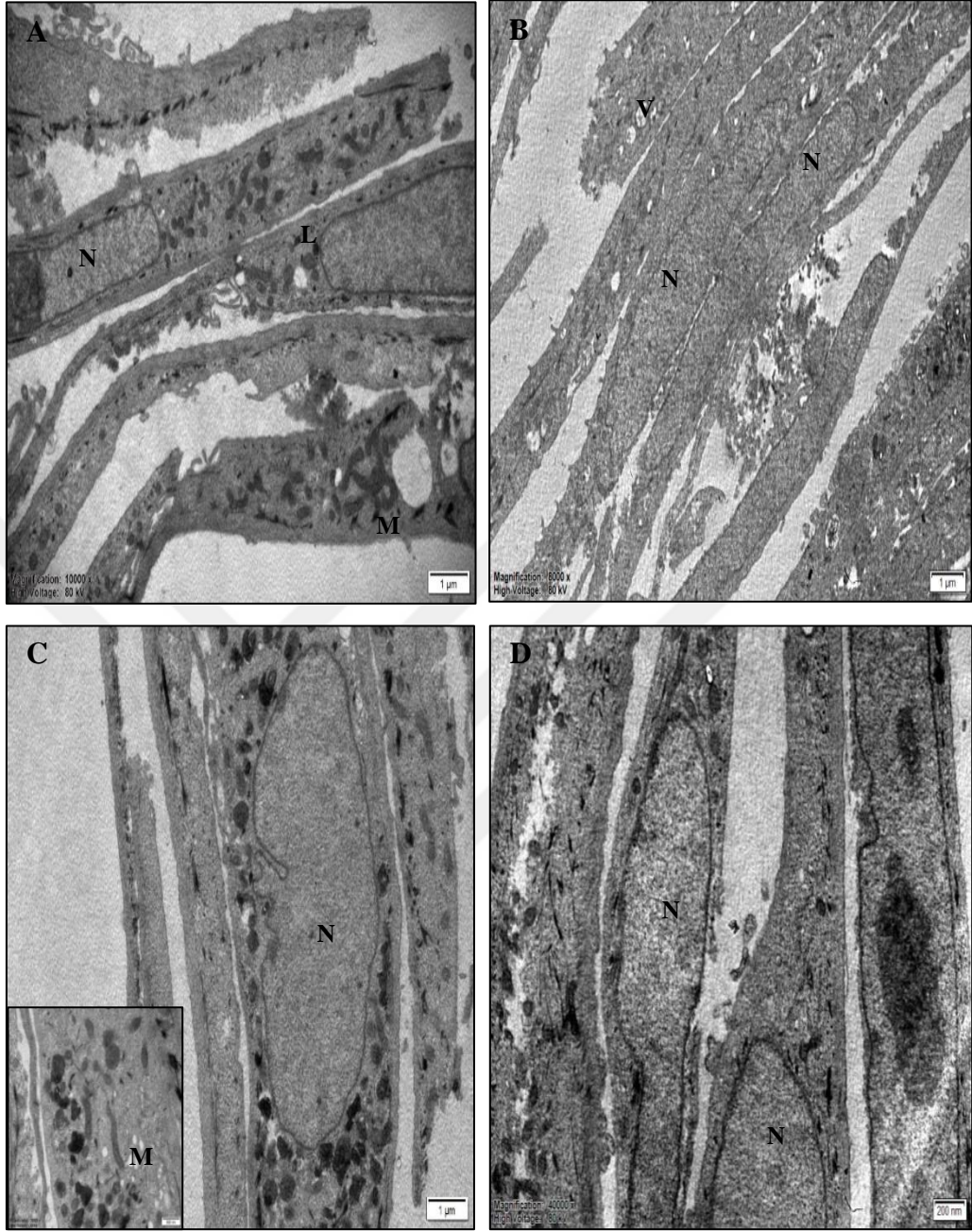
Şekil 196. HCC1937-R hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A)X6000, (B)X3000, (C)X6000, (D)X4000, (E)X6000. N:Nükleus; M:Mitokondri; MV: Mikrovillus.



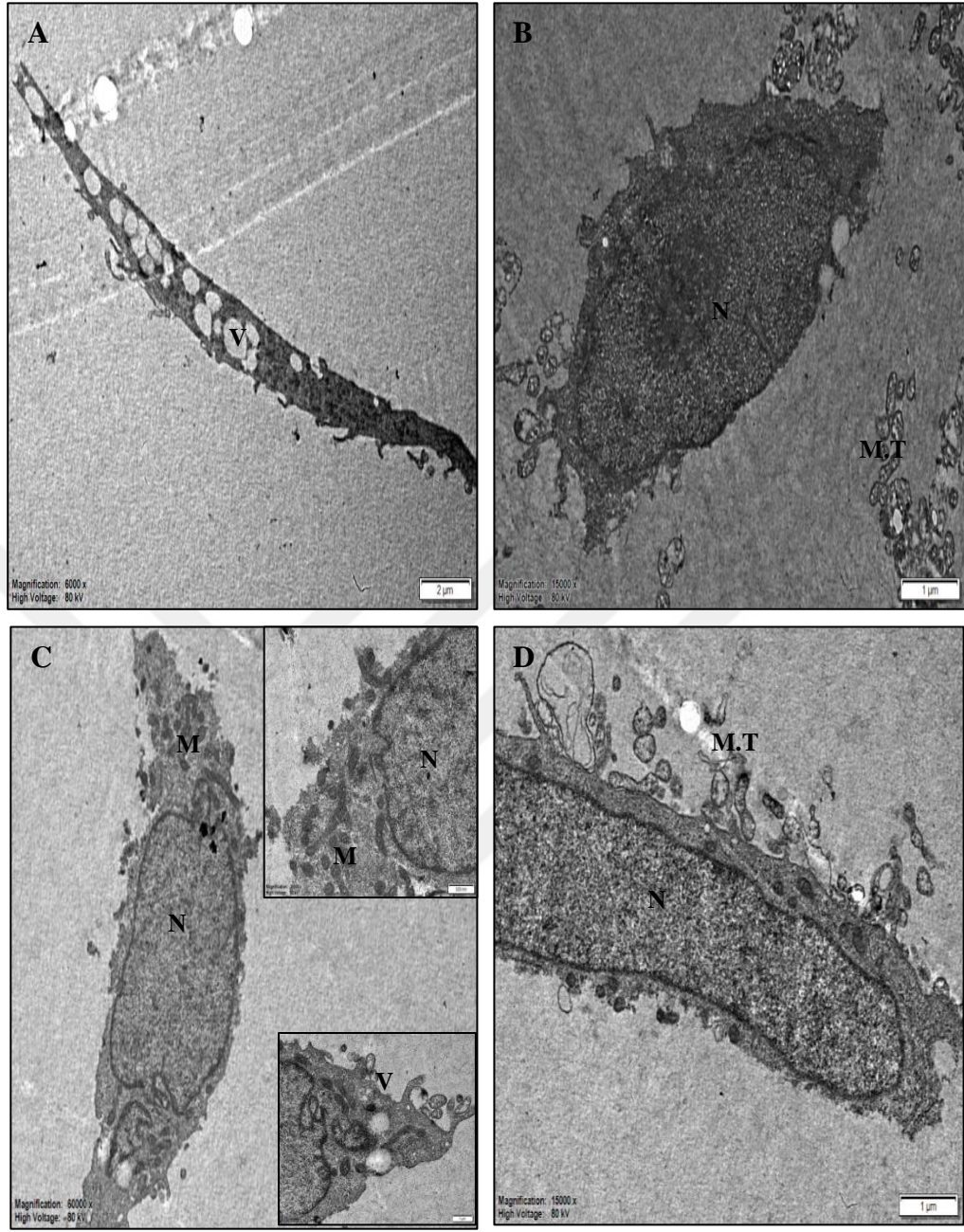
Şekil 197. BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A)X6000, (B)X8000, (C)X30000, (D)X1000. N:Nükleus; M:Mitokondri; E.R:Endoplazmik retikulum; O.V:Otofajik vakuol.



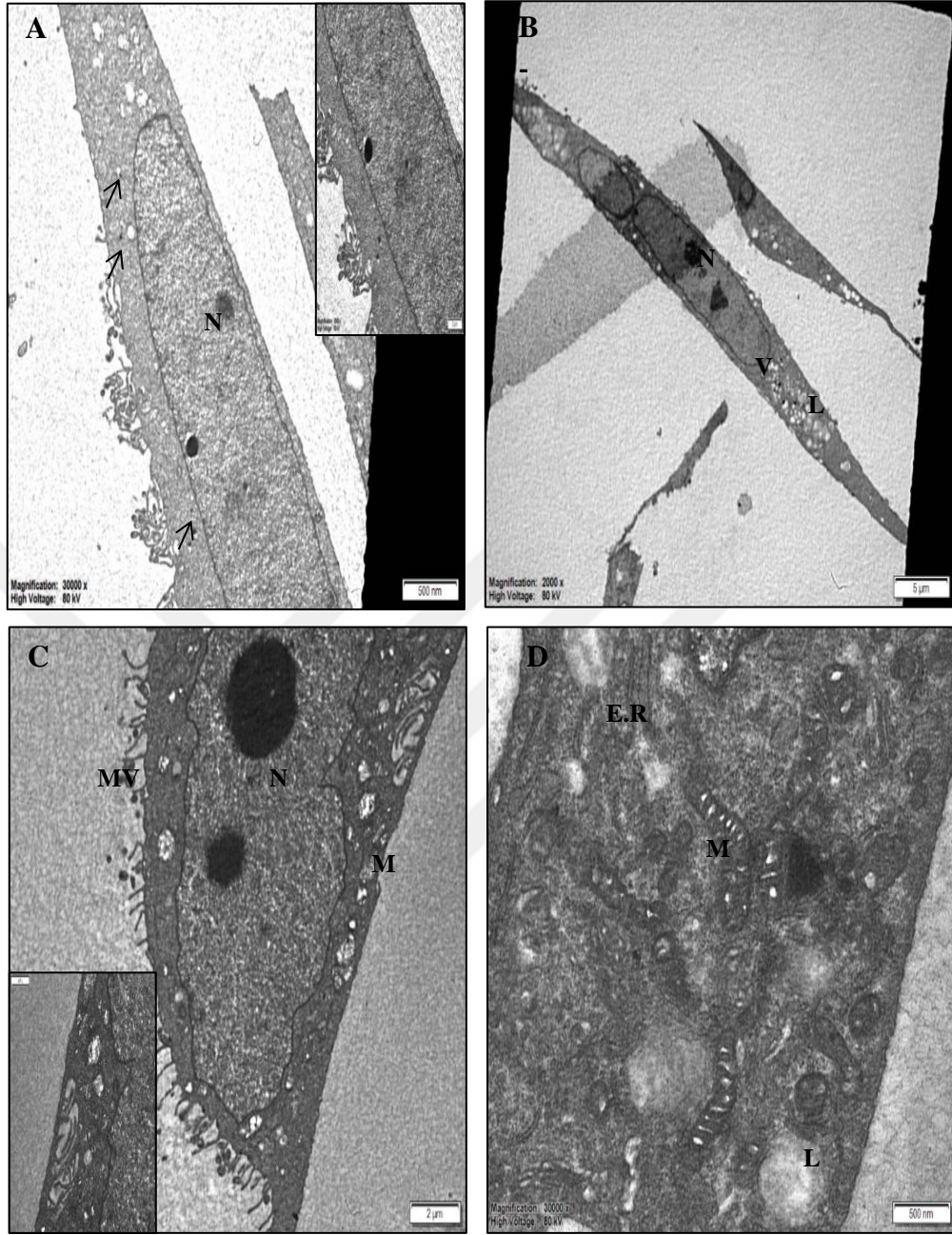
Şekil 198. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A)X12000, (B)X10000, (C)X15000, (D)X6000. N:Nükleus; M:Mitokondri; L:Lizozom; V:Vakuol; M.T: Membran tomurcuklanma; → BMN 673-KLN.



Şekil 199. MCF-10A hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A)X10000, (B)X8000, (C)X10000, (D)X40000. **N:**Nükleus; **M:**Mitokondri; **L:**Lizozom.



Şekil 200. BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A)X6000, (B)X15000, (C)X60000, (D)X15000. N:Nükleus; M:Mitokondri; V:Vakuol; M.T: Membran tomurculanma.



Şekil 201. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde intraselüler ince yapıların ve sitoplazma membranlarının TEM ile görüntülenmesi. (A)X6000, (B)X15000, (C)X60000, (D)X15000. N:Nükleus; M:Mitokondri; L:Lizozom; V:Vakuol; E.R:Endoplazmik retikulum; MV: Mikrovillus; → BMN 673-KLN.

Sonuç olarak, BMN 673'ün HCC1937 hücrelerinde apoptotik ve otofajik ölüme neden olduğu hücrelerde meydana gelen ince yapısal değişimler ile belirlenmiştir. Ancak, BMN 673-KLN'nin HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e göre daha fazla apoptotik ölüme neden olduğu ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin aşılmasında sitotoksik ve apoptotik etkisi görüntülenmiştir. Ayrıca, BMN 673-KLN'nin MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün toksik etkisini azaltarak hücrelerde daha az hasara neden olduğu ince yapısal değişimlerinde görüntülenmesi ile desteklenmiştir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında, TNMK tedavisinde henüz klinik faz denemeleri devam eden BMN 673'e karşı hücrelerde gelişen ilaç direncinde HR ve MDR mekanizmalarının rollerinin belirlenmesi ve bu mekanizmaların aşılması amacıyla ilk kez BMN 673 yüklü KLN formülasyonu üretilerek BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Kanser tedavisinde sentetik letalite kavramı son yıllarda yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde önem kazanan bir kavram haline gelmiştir. Özellikle *BRCA1/2* genlerinde mutasyon taşıyan hastalarda yeni terapötik bir hedef olarak PARP inhibitörlerinin *in vitro*, *in vivo* ve ön klinik çalışmalarda tek bir ajan olarak potansiyel rollerinin belirlenmesi ile sentetik letalite kavramı TNMK tedavisinde umut vadecici yaklaşımların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Hartwell 1997; Bryant ve ark., 2005; Farmer ve ark., 2005; Kaelin 2005; Zaremba ve Curtin 2007; Lord ve ark., 2015).

2005 yılında faz I klinik denemesinde, bir PARP inhibitörü olan olaparibin tek ajan olarak *BRCA1/2* mutasyonu olan meme ve over kanserli hastalarda sentetik letalite stratejisinin kullanımına dair ilk klinik kanıtlar elde edilmiştir (Fong ve ark., 2009; Fong ve ark., 2010). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, faz II çalışmalarında tek ajan olarak olaparibe meme ve over kanseri hastalarının kemoterapi de kullanımı araştırılmış ve *BRCA1/2* mutasyonu olan hastaların olaparibe daha iyi yanıt gösterdikleri belirlenmiştir (Audeh ve ark., 2010; Tutt ve ark., 2010). Diğer faz II denemelerinde, tek ajan olarak olaparibin ileri over ve TNMK tedavisinde etkisi araştırılmıştır (Gelmon ve ark., 2011; Ledermann ve ark., 2012). Ancak, Faz II denemelerinde, olaparib tedavisi uygulanan hastalarda sürdürülebilir yanıtın elde edilememesi ve hastalıksız sağ kalım sürecinin (5.7 ay) kısa olması gibi olumsuz sonuçlar, olaparibin özellikle TNMK tedavisinin klinik kullanımında gecikmelere neden olmuştur. Diğer bir PARP inhibitörü olan iniparibin ise, gemsitabin ve karboplatin gibi bazı ajanlarla birlikte TNMK hastalarının tedavisinde kullanıldığında hastaların tedaviye daha iyi yanıt verdiği ve bu nedenle TNMK tedavisinde potansiyel bir ajan olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (O'Shaughnessy ve ark., 2011). Ancak umut vadeden faz II deneylerinden sonra gerçekleştirilen faz III çalışmalarında hastaların hastalıksız sağ kalım ve genel sağ kalım sürelerinde başarısız sonuçlar elde edilmesi iniparibin TNMK tedavisindeki kullanımında çelişkili sonuçlara yol açmıştır

(Liu ve ark., 2012; Mateo ve ark., 2013; Sinha 2014). Yine de, sentetik letalite TNMK tedavisinde terapötik bir tedavi stratejisi olduğu için *BRCA1/2* genlerinde patojenik mutasyon taşıyan hastalarda iniparibin diğer faz II klinik denemeleri başlatılmıştır (Lord ve ark., 2015).

Olaparib ve iniparib ile elde edilen olumsuz sonuçlardan dolayı, *BRCA1/2* mutasyonu taşıyan hastalarda sentetik letalite aktivitesi gösteren BMN 673 (de Bono ve ark., 2013), niraparib (Sandhu ve ark., 2013), rucaparib (Drew ve ark., 2016) ve veliparib (LoRusso ve ark., 2016; Rodler ve ark., 2016) gibi diğer PARP inhibitörleri ön plana çıkmıştır.

BMN 673 ile ilgili gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, BMN 673'ün PARP-DNA kompleksini rucaparib, veliparib ve olaparib gibi diğer PARP inhibitörlerine göre ~100 kat daha yüksek seviyede yakalama kapasitesine ve BMN 673'ün nanomolar konsantrasyonda bile diğer PARP inhibitörlerine göre ≥ 10 kat daha fazla sitotoksik potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir (Shen ve ark., 2013; Murai ve ark., 2014). Ayrıca, BMN 673'ün meme, küçük hücreli olmayan akciğer, kronik lenfositik lösemi (CLL), prostat, endometriyal ve over kanser hücrelerinde spesifik bir şekilde apoptotik ölüme neden olduğu ve bu nedenle tek tedavi yöntemi olarak diğer PARP inhibitörlerine göre daha etkin bir şekilde kullanılabileceği belirtilmiştir (Postel-Vinay ve ark., 2013; Koppensteiner ve ark., 2014; Herriott ve ark., 2015; Lord ve ark., 2015; Huang ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016a).

Shen ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilen hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde, BMN 673'ün diğer PARP inhibitörlerine (olaparib, veliparib ve rucaparibe) göre daha düşük konsantrasyonlarda seçici antitümör sitotoksik etki göstererek *BRCA1/2* ve *PTEN*-eksik tümörlerde mevcut PARP inhibitörlerine göre 20-200 kat daha etkili olduğu ve bu nedenle özellikle *BRCA1/2*-eksik tümörlerin tedavisinde tek ajan olarak kullanımının avantajlı olduğu gösterilmiştir. *In vivo* deneylerde ise, 28 günde BMN 673'ün oral yolla alımının (0.33 mg/kg) *BRCA1* veya *PTEN*-eksik MX-1 tümör insan meme karsinoma ksenograft modelinde olaparibe (100 mg/kg) göre daha etkili olduğu ve temozolomid, SN38 veya platinyum ilaçları gibi ilaçlarla kombin tedavi olarak kullanıldığında sinerjik etki sergileyerek ilaçların antitümör etkilerini arttırdığı analiz edilmiştir. Ayrıca, BMN 673'ün veliparibe göre 40 kat daha yavaş PARP1'den ayrılma hızına ve diğer PARP inhibitörlerine göre 3-8 kat daha fazla enzimatik aktiviteye sahip

olduğu belirlenmiştir (Shen ve ark., 2013). Murai ve ark (2014), DU145 prostat ve DT40 lenfoma kanser hücrelerinde BMN 673'ün katalitik aktivitesinin ve nanomolar konsantrasyona sitotoksik etkisinin olaparibe ve rucaparibe göre daha fazla olduğu (DT40 ≥ 10 kat, DU145 ≥ 5 kat) belirlenmiştir. (Murai ve ark., 2014).

Bu çalışmaların dışında, BMN 673'ün farklı kemoterapik ilaçlar (temozolomid, gemsitabin, sisplatin, oksaliplatin, karboplatin SN-38, doksorubisin, metotreksat everolimus ve KU-0063794) ile kombin tedavide etkisinin farklı kanser tiplerinde (TNMK, lenfoma, pankreatik duktal adenokarsinom, osteosarkom, küçük hücreli akciğer kanser, pediatrik kanserler) araştırıldığı çalışmalar da literatürde mevcuttur.

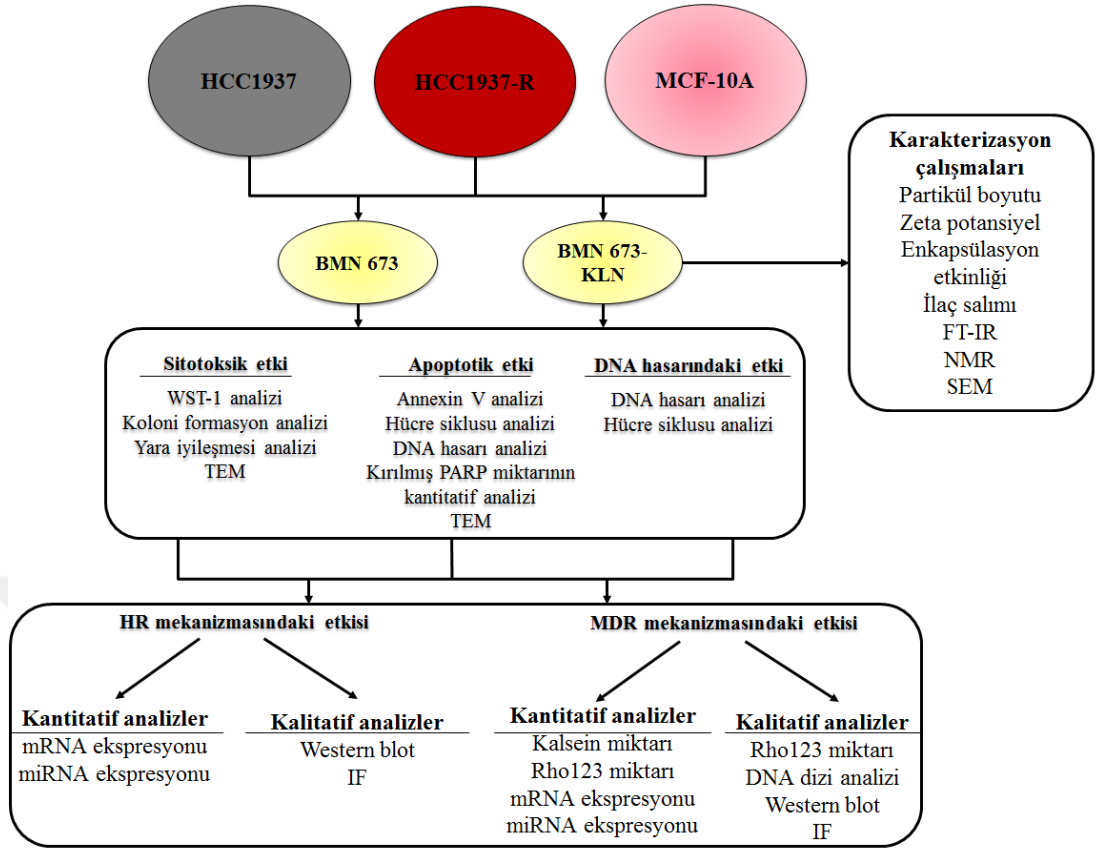
Murai ve ark. (2014), *BRCA2*-eksik DT40 lenfoma kanser hücrelerinde BMN 673'ün temozolomid ile kombin tedavisinin, olaparibin temozolomid ile kombin tedavisine göre daha fazla etkili olduğunu belirtmiştir (Murai ve ark., 2014). Andrei ve ark. (2015), *BRCA2* ile ilişkili pankreatik duktal adenokarsinom (*BRCA2*-eksik CAPAN-1 ve *BRCA2* normal MIA PaCa-2) hücrelerinde ve fare ksenograft modelinde, BMN 673 ve veliparibin gemsitabin, sisplatin, oksaliplatin ve karboplatin ile birlikte sitotoksik etkisini araştırmışlardır. BMN 673'ün veliparibe göre daha etkili olduğu ve kanser hücrelerinde sisplatin ile kombin tedavisinin hücrel proliferasyonu azaltarak apoptotik ölüme yol açtığı belirlenmiştir (Andrei ve ark., 2015). Smith ve ark. (2015a, 2015b) gerçekleştirdikleri çalışmalarında pediatrik ön klinik test programının *in vitro* ve *in vivo* panelinde tek ajan olarak BMN 673'ün *PALB2* mutasyonları belirlenen HR-eksik tümöre sahip hastalarda potansiyel kullanıma sahip olduğunu ancak BMN 673'ün temozolomid ile birlikte kombin tedavisinin Ewing sarkoma modeli ve lösemi hücre hatların da tek ajan olarak BMN 673'e göre daha etkili bir tedavi seçeneği olabileceğini belirtmişlerdir (Smith ve ark., 2015a; Smith ve ark., 2015b). Engert ve ark. (2014) tarafından, BMN 673'ün ve BMN 673'ün farklı kemoterapik ilaçlarla (temozolomid, SN-38, doksorubisin, sisplatin, metotreksat, etoposid/karboplatin) kombin tedavisinin *BRCA1/2* genlerinde mutasyon içeren osteosarkom (MG63, ZK-58, SaOS-, MNNG-HOS, U-2 OS) hücrelerinde etkisi araştırılmıştır. BMN 673'ün osteosarkom hücrelerinde önemli derecede inhibisyona neden olduğu ve BMN 673 ile en yüksek sinerjik etkiye sahip ilaç temozolomid olarak belirlenmiştir (Engert ve ark., 2014).

PARP inhibitörleri *BRCA1/2* mutasyonu olmayan TNMK hastalarının tedavisinde farklı ilaç kombinasyonları ile kullanıldığında terapötik etkiye sahip olduğu da belirtilmiştir. Mo ve ark. (2016), *BRCA1/2* normal TNMK hücre hatlarında ve *in vivo* deneylerde HR tamirinin mTOR inhibitörleri tarafından önemli bir derecede baskılandığı ve PARP inhibitörleri ile birlikte kombin tedavi olarak kullanıldığında TNMK hücre hatlarında sinerjik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Mo ve ark., 2016). BMN 673 diğer PARP inhibitörleri içerisinde en yüksek terapötik potansiyele sahip olduğu belirlenen bir inhibitör olmasına rağmen, NCI-60 (ABD Ulusal Kanser Enstitüsü insan tümör hücre hatları) panelinin yaklaşık olarak yarısında hücrelere 100 µM BMN 673 uygulandığında bile, hücrelerin BMN 673'e karşı direnç gösterdikleri bilinmektedir. Diğer kalan hücrelerinin ise, *BRCA1/2*, *ATM* ve *PTEN* genlerinde meydana gelen mutasyonlar, ekspresyonlarındaki eksiklikler veya HR yolağının inaktivasyonu gibi nedenlerden dolayı nanomolar konsantrasyonda BMN 673'e yanıt verdikleri belirlenmiştir. Ancak *BRCA2*-eksik HCC2998 meme, U2OS osteosarkom ve bazı küçük hücreli akciğer kanser hücrelerinin BMN 673'e karşı dirençli olduğu ve bu nedenle BMN 673 ve/veya diğer PARP inhibitörlerine yanıtta henüz aydınlatılmamış moleküler yolların veya belirteçlerin araştırılması gerektiği belirtilmiştir (Cardnell ve ark., 2013; Engert ve ark., 2014; Cardnell ve ark., 2016; Murai ve ark., 2016). Murai ve ark. (2016), küçük hücreli akciğer kanser hücre hatlarında ve ksenograft modellerinde gerçekleştirdikleri genomik analiz sonucunda, BMN 673 ile kanser hücre hattı ansiklopedisi (CCLE) ve NCI-60 panelinde yer alan kanser hücre hatlarının yaklaşık %45'inde mRNA ekspresyonun eksik olduğu belirlenen Schafen 11 (SLFN11) ekspresyonu arasında yüksek derecede korelasyon olduğunu ve PARP inhibitörlerine karşı gelişen ilaç direncinde SLFN11'in inaktivasyonunun yeni bir direnç mekanizması olarak tanımlanabileceğini belirlemişlerdir (Murai ve ark., 2016).

PARP inhibitörlerinin klinik gelişmesinde ilerlemeler devam etmesine rağmen, bazı ön klinik çalışmalarda *BRCA2*'de meydana gelen sekonder veya geri mutasyonlar ile artan HR aktivitesi, 53BP1'in kaybı ile artan NHEJ aktivitesi, PARP1 seviyesinde azalma, epigenetik değişimler ve artan P-gp ekspresyonu gibi dirence neden olan muhtemel mekanizmalar tanımlanmıştır. Ayrıca, PARP inhibitörlerine (olaparib, rucaparib, veliparib) dirençli kanser hücrelerinin (UWB1.289, HCC1937, UWB,

CAPAN-1), DNA hasarına neden olan diğer anti-kanser ilaçlarına (rucaparib, epirubisin, karboplatin, sisplatin) karşıda çapraz direnç gösterdiği literatürde belirlenmiştir (Edwards ve ark., 2008; Fojo ve Bates 2013; Johnson ve ark., 2013; Lord ve Ashworth 2013; Montoni ve ark., 2013; Nakagawa ve ark., 2015; Sedukhina ve ark., 2015). Bu nedenle, PARP inhibitörlerinin kanser tedavisinde potansiyel klinik önemi göz önünde bulundurulduğunda, PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol alan moleküler mekanizmaların anlaşılması ve bu mekanizmaların aşılmasında yeni terapötik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, PARP inhibitörlerinin tedavide kullanılmasında büyük öneme sahiptir.

BMN 673'ün TNMK ve diğer kanser tiplerinde gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda diğer PARP inhibitörlerine göre belirlenen avantajlı özelliklerinden dolayı, mevcut tez çalışmasında BMN 673'ün *BRCA1* geninde homozigot 5382insC mutasyonu olan HCC1937 TNMK hücre hattında ve kontrol grubu olarak MCF-10A hücrelerinde potansiyel terapötik etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, diğer PARP inhibitörlerine direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenen HR ve MDR mekanizmalarının BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla ilk kez BMN 673'e karşı dirençli HCC1937-R hücreleri geliştirilmiştir. BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde hem sitotoksik hem de apoptotik etkisi belirlendikten sonra, BMN 673'ün, HR mekanizması ile ilişkili γ H2AX, PARP, RAD51 ve BRCA1 ve MDR mekanizması ile ilişkili MDR1, BCRP ve MRP1 genlerinde mRNA düzeyinde ve bu genleri hedef aldığı bilinen miR-107, miR-193b, miR-1255b, miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a'nın ekspresyon seviyelerinde etkisi kantitatif düzeyde ilk kez analiz edilmiştir. Ayrıca, HR ve MDR mekanizması ile ilişkili genlerin protein miktarlarındaki değişimler western blot ve immünfloresan (IF) yöntemleri kullanılarak görüntülenmiştir. Son olarak, hücrelerde neden olduğu ince yapısal değişimler TEM kullanılarak belirlenmiştir. Mevcut tez çalışmasında kullanılan yöntemler ve amaçları Şekil 202'de özetlenmiştir.



Şekil 202. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde etkisinin ve HR ve MDR mekanizmaları ile ilişkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen yöntemler.

Mevcut tez çalışmasında, HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen WST-1 analizi sonucunda, HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün IC₅₀ konsantrasyonu 1000 ve 2000 hücre için sırasıyla 0.88±0.09 nM ve 0.47±0.08 nM olarak belirlenmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde ise 500 ve 1000 hücre için sırasıyla 3.99±0.74 ve 3.11±0.46 nM olarak hesaplanmıştır. BMN 673'ün literatürde IC₅₀ konsantrasyonu 0.57 nM olarak belirtilmesine rağmen, farklı kanser hücre hatlarında sitotoksik etkisinin araştırıldığı *in vitro* çalışmalarda, hücre tipine göre farklı IC₅₀ konsantrasyonlarının (IC₅₀: MIA PaCa-2=58.23 ± 8.1 µM, Capan-1=16.0 ± 5.4 µM, Capan-1=5 nmol/L, MG63 = 0.448 µM, ZK-58 = 0.115 µM, SaOS-2 = 33.57 µM, MNNG-HOS =87.56 µM ve PPTP=25.8 nM) belirlendiği görülmektedir (Shen ve ark., 2013; Engert ve ark., 2014; Andrei ve ark., 2015). Ayrıca, BMN 673'ün HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisi koloni formasyon ve yara iyileşme yöntemleri ile görüntülenerek desteklenmiştir. Hücrelerde BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı, BMN 673'ün

uygulanan konsantrasyonu arttıkça hem koloni sayısında hem de hücrelerin migrasyon yeteneklerinde azalıştan dolayı yara iyileşme alanında artış olduğu görüntülenmiştir. Elde edilen veriler, WST-1 sonuçlarını destekler niteliktedir.

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673'e karşı ilaç direnci gelişmesinde HR ve MDR mekanizmalarının etkisinin araştırılması amacıyla HCC1937 hücrelerine 6 ay boyunca 0.01 nM BMN 673 uygulanarak ilk kez BMN 673'e karşı dirençli HCC1937-R hücreleri elde edilmiştir. Literatürde BMN 673'e karşı dirençli hücre hattı veya hatlarının geliştirildiği herhangi bir *in vitro* çalışma bulunmadığından dolayı, hücrelere direnç kazandırılması için yöntem olarak diğer PARP inhibitörlerine karşı (olaparib, rucaparib vb) dirençli farklı hücre hatlarının geliştirildiği çalışmalardan faydalanılmıştır (Gottipati ve ark., 2010; Johnson ve ark., 2013; Nakagawa ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016b).

HCC1937-R hücrelerinin elde edilmesi için her ayın sonunda WST-1 analizi gerçekleştirilerek hücrelerin BMN 673'e karşı kazandığı direnç katsayıları hesaplanmıştır ve 6. ayın sonunda 12 gün boyunca 10 ve 100 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde direnç katsayıları sırasıyla -2.9 ve -3.1 kat olarak belirlenmiştir. HCC1937-R hücrelerinin BMN 673'e karşı kazandıkları dirence bağlı olarak HCC1937 parental hücrelerine (uzun iğ şeklinde yapı) göre daha yuvarlak (oval) morfolojiye sahip oldukları inverted mikroskop ile de görüntülenmiştir. Literatürde farklı ilaçlara karşı (gefitinib, paklitaksel, lapatinib) direnç kazandırılan farklı hücre hatlarında (NCI-H1975 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, A2780 over kanseri, MDA-MB-231 ve HCC1954 meme kanseri) parental hücrelerine göre hücre morfolojisinde benzer değişimlerin olduğu görüntülenmiştir (Du ve ark., 2013; McDermott ve ark., 2014; Zhao ve ark., 2015; Jeong ve ark., 2016). Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinin koloni oluşturma ve migrasyon yeteneklerindeki değişimler HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığında, HCC1937-R hücrelerinin canlılık oranı, koloni sayısı ve migrasyon yeteneklerinde azalış miktarının HCC1937 hücrelerine göre daha az oranda olduğu görüntülenmiştir. Elde edilen veriler, WST-1 sonuçlarını desteklemektedir.

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Annexin V analizi sonucunda, 10 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. günde toplam apoptotik (erken ve geç apoptoz) hücre

miktarı sırasıyla %40.6 ve %82.86 olarak belirlenmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde 6. ve 12. günde toplam apoptotik hücre miktarı sırasıyla %21.7 ve %41.85 olarak analiz edilmiştir ($p < 0.05$). 10 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise, 6. ve 12. günde toplam apoptotik (erken ve geç apoptoz) hücre miktarı sırasıyla %12.82 ve %25.86 olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak, BMN 673'ün HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde hem erken hem de geç apoptotik hücre miktarında anlamlı derecede artışa neden olduğu ($p < 0.05$) ancak, HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e karşı kazandıkları dirençten dolayı, HCC1937 parental hücrelerine göre apoptotik hücre miktarında anlamlı bir azalış analiz edilmiştir ($p < 0.05$). BMN 673'ün apoptotik etkisinin BRCA 1^{-/-} BR5FVB1-Akt over kanseri hücrelerinde (Huang ve ark., 2015) ve DU145 prostat kanseri ve CCRF-CEM insan lösemik lenfoblast hücrelerinde (Murai ve ark., 2016) araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmada, BMN 673'ün apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir.

Apoptozun erken belirlenmesinde PARP'ın kaspazlar tarafından 89 kDa ve 24 kDa fragmentine proteolitik kırılımının öneminden dolayı (Hawkins ve ark., 2011; Jain ve ark., 2013; Fridman 2015; Liu ve ark., 2016), mevcut tez çalışmasında BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde 89 kDa PARP fragmentinin kantitatif miktarı florometrik olarak analiz edilmiştir. BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün uygulanan konsantrasyon arttıkça, 89 kDa PARP fragmentinin kantitatif miktarında artış tespit edilmiştir ($p < 0.05$). HCC1937-R hücrelerinde ise, 10 nM BMN 673 uygulanması sonucunda 89 kDa PARP fragmentinin kantitatif miktarının HCC1937 parental hücrelerine göre daha az oranda olduğu (1.74-;2.37-kat) belirlenmiştir. Sonuç olarak, hem HCC1937 hem de MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün apoptotik ölüme neden olduğu hem Annexin V hem de 89 kDa PARP fragmenti kantitatif miktarının belirlenmesi ile desteklenmiştir.

BMN 673'ün doza ve zamana bağlı anlamlı sitotoksik etkisinin spesifik bir hücre siklusu fazında hücrelerin tutulmasından kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi amacıyla hücre siklusu analizi gerçekleştirilmiştir. Mevcut tez çalışmasında, 12 gün boyunca 10 nM BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde G2/M fazında hücre miktarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %39'dan %49.3'e arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). MCF-10A hücrelerinde kontrol grubunda G2/M fazında

hücre miktarı %21.6 iken, 12 gün boyunca 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde %39.7'e arttığı tespit edilmiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise, 12 gün boyunca 10 nM BMN 673 uygulanması sonucunda G2/M fazında hücre miktarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %40.5'den %52.0'ye arttığı ve artış miktarının HCC1937 parental hücrelerine göre daha fazla oranda olduğu analiz edilmiştir. BMN 673 uygulanan hücrelerde G2/M fazında hücre miktarındaki artışın veya bu fazdaki uzamanın sebebi olarak, hücrelerin mitozaya girmeden önce BMN 673'ün neden olduğu dsDNA kırıklarını tamir etme gereksiniminden veya BMN 673'ün PARP'ı hapsedme yeteneğinden kaynaklandığı öngörülmektedir. Elde edilen veriler, literatürde farklı PARP inhibitörlerinin (olaparib, veliparib) uygulandığı farklı kanser hücre hatlarında (U2OSDR^{-GFP} ve H1299DR^{-GFP}, U698, JVM-2, HCC827, PC9 ve HEC-6) G2/M fazında hücre miktarında önemli derecede artış belirlenen çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Cheng ve ark., 2013; Michels ve ark., 2013; Jelinic ve Levine 2014; Miyasaka ve ark., 2014; Rein ve ark., 2015).

BMN 673'ün hücrelerde neden olduğu DNA hasarı ve bu hasarın belirlenmesinde p-ATM ve p-H2AX miktarlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analizler sonucunda ise, 6 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937 hücrelerinde p-ATM ve dsDNA miktarı artmasına rağmen, 12. günde p-ATM miktarında azalış ve p-H2AX miktarında artış belirlenmiştir. BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde, 6. ve 12. günün sonunda p-ATM miktarında artış belirlenmesine rağmen, p-H2AX miktarında belirgin bir artış saptanmamıştır. Ancak özellikle 12. günde BMN 673'ün sitotoksik etkisinden dolayı hücrelerde dsDNA miktarında artış analiz edilmiştir. 6. ve 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise, p-ATM, p-H2AX ve dsDNA miktarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BMN 673 uygulanan HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde DNA'da çift zincir kırıklarının artması hücrelerde G2/M fazında uzamasına neden olduğundan dolayı, elde edilen veriler hücre siklusu analizi sonuçlarını desteklemektedir.

BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde ABC ilaç taşıyıcı ailesinin üyelerinin aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarları analiz edilmiştir. Kalsein AM esterazlar tarafından floresans özellikte kalseine dönüşmeden önce hücreden aktif bir şekilde P-gp tarafından dışarı atılmasına rağmen, hem kalsein hem

de kalsein-AM'nin ATP bağımlı olarak MRP taşıyıcıları tarafından hücrelerden dışarı atıldığı ilk olarak Homolya ve ark. (1993) ve Feller ve ark. (1995) tarafından belirlenmiştir (Homolya ve ark., 1993; Feller ve ark., 1995). Bu nedenle, farklı anti-kanserojen ilaçların veya bileşiklerin uygulandığı (doksorubisin, ivermektin, setraline, fluoksetin, folat) P-gp ve/veya MRP1 yüksek eksprese eden farklı kanser hücre hatlarında (T47D, HB2 (epitelyal meme kanseri hücre hatları), tamoksifen dirençli MCF-7 hücreleri, LLCPK1-mdr1 (mdr1 geni transfekte edilen domuz böbrek epitelyal hücreleri), A549 (insan akciğer kanseri) , primer beyin endotel hücreleri, SW-1573/2R160 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) ve HL60/ADR (insan akut myeloblastik lösemi hücre hattı), over karsinoma hücre hatları intraselüler kalsein miktarındaki azalışın, artan MDR1 ve/veya MRP1/2/3 aktivitesinden kaynaklandığı literatürde belirlenmiştir (Lespine ve ark., 2006; Choi ve ark., 2007; Kanintronkul ve ark., 2011; Kapoor ve ark., 2013; Pasquier ve ark., 2013; Kim ve ark., 2015). Ayrıca, Colabufo ve ark. (2008), bikalutamid uygulanan P-gp veya BCRP veya MRP1 transfekte edilen LnCAP ve PC-3 prostat kanser hücrelerinde intraselüler kalsein miktarındaki azalışın, artan P-gp ve BCRP aktivitesinden kaynaklandığının belirlenmişlerdir (Colabufo ve ark., 2008).

MDR1 ve/veya MRP1'i yüksek eksprese eden veya farklı ilaçlara (doksorubisin, epirubisin, daunorubisin vb.) karşı direnç gelişen kanser hücrelerinde (meme, over, prostat ve akciğer kanseri ve lenfoma vb.) artan MDR1 ve/veya MRP1 aktivitesinin intraselüler Rho 123 miktarında azalışa neden olduğu literatürde belirlenmiştir (Altenberg ve ark., 1994; Webb ve ark., 1996; Forster ve ark., 2012; Dong ve ark., 2015; Balaji ve ark., 2016; Jouan ve ark., 2016). Ayrıca, Doyle ve Ross (2003), BCRP yüksek eksprese eden antrasiklin dirençli MCF-7/AdrVp hücrelerinde intraselüler daunorubisin ve Rho 123 miktarında azalış olduğunu belirlemişlerdir (Austin Doyle ve Ross 2003). Bu nedenle, intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarlarında değişim, MDR1 ve MRP taşıyıcılarının yanında BCRP'nin de aktivitesinde değişimin analiz edilmesinde kullanılan yöntemlerdir.

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673 uygulanan HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün artan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak hücrelerde genel olarak artan P-gp ve/veya MRP1 aktivitesinden dolayı, intraselüler kalsein miktarında anlamlı bir azalış analiz edilmiştir ($p < 0.05$). Ancak, MCF-10A hücrelerinde BMN

673'ün toksik etkisinden dolayı HCC1937 hücrelerinde göre intraselüler kalsein miktarında daha fazla oranda azalış tespit edilmiştir. Aynı zamanda, BMN 673 uygulanan HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler Rho 123 miktarında BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı bir azalış belirlenmiştir ($p<0.05$). Hücrelerde genel olarak artan P-gp veya MRP1 aktivasyonu intraselüler Rho 123 miktarında azalışa neden olduğu için elde edilen verilen kalsein analizi sonuçlarını desteklemektedir. 6 ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde ise, intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarının HCC1937 parental hücrelerine göre anlamlı derecede azaldığı analiz edilmiştir ($p<0.05$). Ayrıca, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak özellikle 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarlarının azaldığı ve bu nedenle genel olarak artan MDR1 ve/veya MRP1'in aktivitesinin BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenmiştir. Ancak, BCRP aktivitesinde değişimin de hücrelerde intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarlarında azalışa neden olabileceği öngörülmektedir.

Hücrelerde apoptotik ölümün bir göstergesi mitokondriyel transmembran potansiyelinin değişmesi sonucunda sitozolde Rho 123 miktarının artması olduğundan dolayı (Johnson ve ark., 1980; Solazzo ve ark., 2006; Shen ve ark., 2012), 12 gün boyunca BMN 673 (0.01-10 nM) uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler Rho 123 miktarı görüntülenmiştir. HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673 uygulanan konsantrasyon arttıkça hücrelerde apoptotik ölüm ve sitozolde Rho 123 miktarının arttığı gözlemlenmiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak sitozolde Rho 123 miktarında artış gözlemlenmesine rağmen, bu artışın HCC1937 parental hücrelerine göre daha az oranda olduğu görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler apoptotik analizlerin sonuçlarını destekler niteliktedir.

BMN 673 uygulanan HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde HR ve MDR yollarında rol alan genlerin mRNA ve protein düzeyinde değişiklikler, RT-PCR, western blot ve IF yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. DNA'da çift zincir kırıklarının (dsDNA) oluşması sonucunda, fosforile H2AX proteini (γ H2AX) tamir proteinlerinin kırık bölgesi etrafında toplanmasını sağlayarak dsDNA tamir edilmesinde rol aldığı bilinmektedir (Rogakou ve ark., 1998; Meador ve ark., 2008; Seo ve ark., 2012). BMN

673, olaparib ve veliparib gibi PARP inhibitörleri ile ilgili gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, özellikle *BRCA1/2* genlerinde mutasyon taşıyan kanser hücrelerinde, BMN 673'ün diğer PARP inhibitörlerine göre oldukça düşük konsantrasyonlarda nükleusta γ H2AX odak oluşumuna neden olduğu görüntülenmiştir (Issaeva ve ark., 2010; Weston ve ark., 2010; Patel ve ark., 2011; Shen ve ark., 2013; Miyasaka ve ark., 2014; Andrei ve ark., 2015; Hong ve ark., 2016). Mevcut tez çalışmasında, HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde *H2AX* geninin ekspresyonunun BMN 673'ün uygulanan zamanı ve konsantrasyonu bağlı olarak anlamlı derecede arttığı ancak HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün artan dozuna bağlı olarak kontrol ile karşılaştırıldığında, γ H2AX'in protein ekspresyonunun ve nüklear γ H2AX odaklarının azaldığı görüntülenmiştir ($p < 0.05$). MCF-10A hücrelerinde γ H2AX'in odaklarında ve protein düzeyinde ekspresyonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim olmadığı görüntülenmiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise, *H2AX* geninin ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BMN 673'ün artan konsantrasyonu bağlı olarak HCC1937 parental hücrelerine göre daha az oranda arttığı analiz edilmiştir. γ H2AX'in protein ekspresyonunun ve nüklear γ H2AX odaklarının ise, HCC1937 parental hücrelerine göre daha az oranda eksprese olduğu ve HCC1937 parental hücrelerinde belirlendiği gibi HCC1937-R hücrelerinde de BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak γ H2AX'in protein ekspresyonunun ($p < 0.05$) ve nüklear γ H2AX odaklarının azaldığı görüntülenmiştir. HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinin kontrol gruplarında γ H2AX belirlenmesinin sebebi, 12 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda BMN 673 uygulanan deney grupları ile aynı koşulların sağlanması için, kontrol gruplarında 12 günün sonunda deneylerin gerçekleştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak γ H2AX odakları ve protein ekspresyonunda azalma, temelde G1 fazında aktif olan NHEJ mekanizmasının aktive olması sonucu dsDNA kırıklarının azalmasından ve hücre siklusunda rol alan diğer genlerin aktivasyonu sonucu, hücrelerde apoptotik ölümden kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak azalan γ H2AX odakları ve protein ekspresyonundaki değişimlerin nedenlerinin belirlenmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, çoğu antikanser ajanı genelde kanser hücrelerinde apoptotik ölüme neden olmasına rağmen, G2 kontrol

noktasını aktive ederek de, G2/M fazında yanlış tamir edilen dsDNA kırıklarının hücrelerde ölümcül olmayan kromozom aberasyonlarının oluşmasına yol açarak dirençli hücrelerin gelişmesini sağlarlar (Erenpreisa ve Cragg 2001; Kawabe 2004; Lobrich ve Jeggo 2007; Chen ve ark., 2012; Visconti ve ark., 2016). Bu yüzden, BMN 673'e karşı dirençli HCC1937-R hücrelerinde G2/M fazında hücre miktarındaki artışa neden olan mekanizmaların (artan HR ve/veya NHEJ aktivitesi veya G2/M kontrol noktasında görev alan genlerin) etkisinin belirleneceği detaylı çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

PARP inhibitörlerinin PARP1'in mRNA seviyesinde neden olduğu değişikliklerin araştırıldığı çalışmalar ise, literatürde sınırlıdır (Cheng ve ark., 2013; Guillot ve ark., 2014). Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, PARP1 ekspresyon seviyesinin PARP1'in aktivitesi ile ilişkili olmadığı ve HR aktif veya inaktif olan kanser hücrelerinde PARP1'in protein seviyesinin değişmeyebileceği belirtilmiştir (Gottipati ve ark., 2010; Turner ve Ashworth 2011). Meme tümörlerinde PARP1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon bulunmamasına rağmen, protein ekspresyonu ve PARP aktivitesi arasında bir korelasyon belirlenmiştir (Bieche ve ark., 2013; Guillot ve ark., 2014). Ancak, Zhang ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, bir PARP inhibitörü olan 3-AB'nin C13 over kanseri hücrelerinde PARP1'in ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olduğunu RT-PCR, western blot ve IF yöntemleri ile belirlemişlerdir (Zhang ve ark., 2013). Diğer yandan, PARP1 seviyesinde azalmanın PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı da literatürde belirtilmiştir (Gottipati ve ark., 2010; Helleday 2011; Montoni ve ark., 2013). Mevcut tez çalışmasında, BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu arttıkça HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PARP1'in ekspresyon seviyesinde azalma belirlenmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde özellikle BMN 673 uygulanmasından 12 gün sonra PARP1 ekspresyon seviyesinde artış olduğu analiz edilmiştir ($p < 0.05$). HCC1937 hücrelerinde azalan PARP-1 ekspresyon seviyesi diğer HR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde değişimler ile birlikte değerlendirildiğinde, BMN 673'e karşı direnç gelişmesi ile ilişkili olabileceği öngörülmektedir. HCC1937-R hücrelerinde ise , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu arttıkça, 6. günün sonunda PARP1'in ekspresyon seviyesinde azalma belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda PARP1'in

ekspresyon seviyesinde artış olduğu ve bu artışın hücrelerin BMN 673'e karşı kazandığı dirençten ve BMN 673'ün PARP1'e bağlanma yeteneğinin azalmasından kaynaklanabileceği öngörülmektedir.

Ayrıca PARP'ın DNA'da oluşan tek zincir kırıklarına bağlanması sonucu, hücrelerde NAD ve ATP'nin tükenmesine bağlı olarak farklı hücre ölüm tiplerinde (apoptoz, nekroz veya parthanatos) rol aldığı bilinmektedir. Örneğin, hücrelerde aşırı hasar olduğunda, PARP-1 tarafından yüksek seviyede PAR sentezi, hücrel NAD⁺ ve ATP'nin tükenmesini sağlayarak nekrotik ölüme neden olurken, PARP-1'in aşırı aktivasyonu ve PAR birikmesi, PAR'ın sitozole translokasyonuna neden olarak mitokondriyal yüzeyde bulunan apoptoz indükleyici faktör (AIF) ile bağlanmasına ve böylece AIF'in nükleusa translokasyonu sonucu PARP-1 temelli ölüm mekanizması parthanatos'a neden olmaktadır. Ayrıca, PARP1'in aşırı aktivasyonu sonucu 89 kDA C-terminal ve 24 kDA N-terminal fragmentine kırılması, programlanmış hücre ölümünün başlamasında rol almaktadır. Bu nedenle, PARP1'in metabolik kofaktörlerinin, kaspazlar, kalpain, katepsin ve granzimler gibi farklı proteazlar ile ilişkisinin, bağlanma bölgelerinin ve bu bölgeleri etkileyen değişimlerin farklı hücre ölüm tipleri ile etkileşiminin belirlenmesi, PARP inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinde etkin terapötik bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılmasında önem taşımaktadır (Boulares ve ark., 1999; Luo ve Kraus 2012; Weaver ve Yang 2013). Mevcut tez çalışmasında, BMN 673 uygulanan HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak 116 kDA PARP proteininin ekspresyonunda azalma ve 89 kDA PARP proteininin ekspresyonunda artış görüntülenmiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak, hem western blot hemde IF yöntemleri ile 116 kDA PARP proteininin ekspresyonunda önemli bir değişim görüntülenmemiştir. Ancak, 10 nM BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'ün apoptotik etkisinden dolayı 89 kDA PARP fragmentinin ekspresyonu belirlenmiştir. Elde edilen veriler, 89 kDa PARP fragmentinin kantitatif miktar analizi ve Annexin V sonuçlarını destekler niteliktedir.

RAD51'in nükleer lokalizasyonu DNA'da dsDNA kırıklarının tamir edilmesinde rol aldığı için HR mekanizmasının aktivitesinin belirlenmesinde önemlidir. RAD51'in lösemi, pankreas, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yüksek

eksprese olmasına rağmen, meme ve kolorektal kanserlerde az derecede eksprese olduğu belirlenmiştir. *BRCA1/2*-eksik kanser hücrelerinde PARP fonksiyonunun inhibisyonu dsDNA kırıklarının HR tarafından tamir edilmesini engellediği için bu hücrelerde artan RAD51'in ekspresyonu, HR mekanizmasının aktivitesi ve dolayısıyla bu hücrelerde kemoterapik ilaçlara karşı direnç gelişimi ile ilişkili olduğu literatürde belirtilmiştir (Hegan ve ark., 2010; Wang ve Weaver 2011; Johnson ve ark., 2013; Miyasaka ve ark., 2014; Herriott ve ark., 2015; Velic ve ark., 2015; Andrei ve ark., 2015; Johnson ve ark., 2016). Mevcut tez çalışmasında, BMN 673 uygulanan HCC1937 ve MCF-10A hücrelerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, RAD51'in mRNA ve protein seviyesinde ekspresyonunun ve aynı zamanda nükleer lokalizasyonunun BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı derecede arttığı analiz edilmiştir ($p<0.05$). HCC1937-R hücrelerinde ise, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak HCC1937 parental hücrelerine göre RAD51'in protein ekspresyonunun ve nükleer lokalizasyonunun anlamlı derecede arttığı görüntülenmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde RAD51'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyesindeki artış, HR mekanizmasının aktivitesini göstermektedir.

PARP inhibisyonu özellikle *BRCA1/2* genlerinde mutasyon taşıyan meme ve over kanseri hastalarında sentetik letaliteye sebep olduğundan dolayı terapötik bir strateji olarak görülmektedir (Helleday 2011; Livraghi ve Garber 2015). *BRCA1*, hücre döngüsünde S ve G2 fazı boyunca eksprese olarak HR ve NHEJ mekanizmalarında DNA'da oluşan dsDNA kırıklarının tamir edilmesinde diğer tamir proteinleri ile birlikte görev almaktadır (Aly ve Ganesan 2011). Farklı *in vitro* biyokimyasal analizler ve genetik çalışmalarda, DNA tamirinde *BRCA1*'in doğrudan etkili olduğu ve *BRCA1*'in N-terminal RING bölgesinde (C61G gibi) ve C-terminal BRCT bölgesinde mutasyonların DNA tamir fonksiyonunu engellediği belirtilmiştir. Ayrıca, hücrel *BRCA1*'in, genel olarak S fazında DNA replikasyonu boyunca nükleusta RING bölgesinde partneri olan *BARD1* ile DNA'da oluşan dsDNA kırıklarının tamir edilmesinde nükleer odaklar şeklinde bulunduğu görüntülenmiştir. Ancak, HCC1937 hücrelerinde 5382insC mutasyonu, *BRCA1* proteininin C-terminalinde BRCT bölgesinde 33 aa delesyonuna (ikinci BRCT tekrarlarının delesyonu) sebep olduğu için, DNA'da oluşan dsDNA kırıklarına rağmen *BRCA1*'in nükleer odak

oluşturmadığı ve bu nedenle BRCT mutasyonlarının BRCA1'in nükleer hedefini değiştirdiği belirtilmiştir (Rodriguez ve ark., 2004; Au ve Henderson 2005; Dever ve ark., 2011).

BRCA1'in farklı nedenlerden dolayı tekrar aktive olmasının PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı bilinmektedir (Helleday 2011; Fojo ve Bates 2013; Sedukhina ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016b). Johson ve ark. (2013) 5396+1G>A mutasyonu olan MDA-MB-436 hücrelerinde, BRCA1 ve RAD51 protein ekspresyonu belirlenmemesine rağmen, rucaparibe karşı dirençli olan MDA-MB-436 hücrelerinde BRCA1 ve RAD51'in ekspresyon seviyesinin arttığı analiz edilmiştir (Johnson ve ark., 2013). Wang ve ark. (2016b), *BRCA1* 185delAG mutasyonu olan ve rucaparib veya cisplatine karşı direnç geliştirilen SUM1315MO2 hücrelerinde *BRCA1*'in mRNA ve protein seviyesinde ekspresyonunun arttığını ve mutant BRCA1 proteinin DNA'da dsDNA kırıklarına *RAD51*'in bağlanmasını arttırdığı analiz edilmiştir. Sonuç olarak, HR mekanizmasının aktivitesinin direnç gelişimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 2016b).

Mevcut tez çalışmasında, HCC1937 hücrelerinde Tulchin ve ark. (2013)'nın gerçekleştirdikleri western blot analizinde belirlendiği gibi kontrol grubunda BRCA1'in protein ekspresyonu görüntülenmemiştir. Ancak, BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonu arttıkça hücrelerde gelişen dirence bağlı olarak BRCA1'in protein ekspresyonunda artış RT-PCR, western blot ve immunofloresans analizleri ile belirlenmiştir ve hücrelerde *BRCA1*'in herhangi bir nükleer odak oluşumu gerçekleştirmediği gözlemlenmiştir. MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak BRCA1'in mRNA ve protein seviyesinde artış analiz edilmiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise, BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinden dolayı BRCA1'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyesinin HCC1937 parental hücrelerine göre anlamlı derecede arttığı analiz edilmiştir ($p<0.05$). Ancak, 12 gün boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak BRCA1'in mRNA ekspresyon seviyesinde artış belirlenmesine rağmen, protein ekspresyonunda azalış görüntülenmiştir. Bir genin mRNA ve protein seviyesi arasında zayıf korelasyonun muhtemel sebepleri arasında literatürde mRNA'nın proteine dönüşmesinde post-transkripsiyonel mekanizmalardaki değişikliklerin ve farklı

proteinlerin sentezi ve degradasyonu sonucunda proteinlerin *in vivo* yarı ömründe farklılıkların yer aldığı belirtilmiştir. Ayrıca, özellikle miRNA'ların, mRNA'nın destabilizasyonunu sağlayarak mRNA miktarının azalmasında veya translasyonel baskılama ile mRNA miktarında değişikliğe neden olmadan protein miktarında değişikliğe neden olabileceği ve bu nedenle bir genin mRNA ve protein seviyesinde farklılıklarda miRNA'ların rol alabileceği belirtilmiştir (Greenbaum ve ark., 2003; Schwanhäusser ve ark., 2011; Payne 2015). Bu nedenle, HCC1937-R hücrelerinde BRCA1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyesindeki farklılığın belirtilen nedenlerden kaynaklanabileceği öngörülmektedir.

Ayrıca, farklı PARP inhibitörlerine (rucaparib, olaparib) karşı dirençli kanser hücre hatlarının (MDA-MB-436, UWB1.289, SUM1315MO2) geliştirildiği çalışmalarda, hücrelerde *BRCA1* geninde mutasyon taşıyan (5396+1G>A, 5382insC, 185delAG) hücrelerde gelişen ilaç direncine rağmen, *BRCA1* geninde herhangi bir farklı mutasyon tespit edilmemiştir (Johnson ve ark., 2013; Nakagawa ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016a). Mevcut tez çalışmasında, 6 ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde de, *BRCA1* geninde c.5366dupC (5382insC) mutasyonu dışında herhangi bir geri yada sekonder mutasyon analiz edilmemiştir.

Çoklu ilaç direnci (MDR), kanser hücrelerinde kemoterapik ilaçlara karşı direnç gelişmesinde rol alan temel mekanizmadır. TNMK hastalarında kemoterapide direnç gelişmesinde rol alan temel mekanizmalardan biri ABC taşıyıcı ailesinin üyelerinin yüksek ekspresyonudur. TNMK'da temel olarak kanser hücrelerinin membranında kemoterapik ilaçların dışarı atılması ile ilişkili olan 3 temel ABC taşıyıcı ailesinin üyesi olan P-gp (MDR1), BCRP ve MRP1 üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Szakacs ve ark., 2006; Liu 2009; Marquette ve Nabell 2012; Martin ve ark., 2014; O'Reilly ve ark., 2015).

Ayrıca, PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde ABC taşıyıcı ailesinin üyelerinin rol aldığı literatürde belirtilmiştir (Chiarugi 2012; Fojo ve Bates 2013; Lord ve Ashworth 2013; Montoni ve ark., 2013; Lupo ve Trusolino 2014; Sedukhina ve ark., 2015). Rottenberg ve ark (2008) yılında olaparib uygulanan *BRCA1*-eksik meme tümörlerinde P-gp ekspresyonunun arttığını ve P-gp inhibitörü olan tariquidarın olaparibe karşı direncin aşılmasında etkili olduğunu belirlenmiştir (Rottenberg ve ark., 2008). Oplustilova ve ark. (2012) MRN-eksik HCT116 kolon kanseri

hücrelerinde KU 58948'e karşı direnç gelişmesinde artan P-gp ekspresyonunun rol aldığını belirtmişlerdir (Oplustilova ve ark., 2012). Lawlor ve ark. (2014), P-gp yüksek eksprese eden IGROVCDDP ve KB-8-5-11 hücrelerinde olaparibe karşı direnç geliştiği ancak veliparib ve CEP-8983'ün P-gp substratı olmadığından dolayı başarılı bir şekilde PARP'ı inhibe ettiği belirlenmiştir (Lawlor ve ark., 2014). Dufour ve ark (2015) olaparib uygulanan SUM1315 TNMK hücrelerinde başlangıçta BCRP'nin yüksek eksprese olduğunu ve hücrelerin ilaca maruz kalma süreleri arttıkça BCRP'nin ekspresyonunun bazal seviyesine düşerek, P-gp'nin yüksek eksprese olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak, birbirinin yerine görev alan P-gp ve BCRP'nin ekspresyonunda artışın olaparibe karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenmiştir (Dufour ve ark., 2015). Henneman ve ark (2015), *BRCA1*-eksik metaplastik meme karsinom fare modelinde, artan Pgp ekspresyonunun, olaparibe karşı intrinsik direnç gelişiminde rol aldığı ve bu direncin zayıf P-gp substratı olan diğer PARP inhibitörleri ile (AZD2461) aşılabileceği belirtilmiştir (Henneman ve ark., 2015). Durmus ve ark. (2015) gerçekleştirdiği *in vivo* çalışmada, BCRP ve P-gp ekspresyonundaki artışın, kanser hücrelerinde rucaparibin etkisini engellediğini belirlemişlerdir (Durmus ve ark., 2015). Nakagawa ve ark. (2015) UWB1.289 over ve HCC1937 meme kanseri hücrelerine sürekli nanomolar konsantrasyonunda olaparib uygulanması sonucunda, olaparibe karşı dirençli hücre fenotipinin geliştiğini ve bu hücrelerin rucaparibe karşı da dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, hem parental hemde dirençli hücrelerde P-gp ekspresyonunun değişmediği analiz edilmiştir (Nakagawa ve ark., 2015). Smith ve ark. (2015) gerçekleştirdikleri pediatrik ön klinikal test programının *in vitro* ve *in vivo* panelinde, BMN 673'e karşı dirençli çoğu tümörde vinkristin ve eribulin gibi P-gp substratı olarak bilinen anti-mitotik ajanlara karşı yüksek oranda yanıt belirlendiği için, BMN 673'e karşı gelişen *in vivo* ilaç direncinin P-gp temelli olmadığı belirlenmiştir (Smith ve ark., 2015). Vaidyanathan ve ark. (2016) olaparib ve paklitaksel dirençli A2780 over kanseri hücrelerinde MDR1 ekspresyonunda artış belirlenmesine rağmen, bu hücrelerin veliparib ve AZD2461'e karşı dirençli olmadığı gösterilmiştir (Vaidyanathan ve ark., 2016). Sonuç olarak, MDR'nin PARP inhibitörlerine karşı gelişen dirençte rol aldığı ancak zayıf P-gp substratı olarak yeni geliştirilen PARP inhibitörlerinin (veliparib, AZD2461, BMN 673, CEP-8983) MDR1-temelli ilaç direncinin aşılmasında terapötik potansiyelinin daha

fazla olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, zayıf P-gp substratı özelliğine sahip PARP inhibitörlerinin tedavide kullanımının daha fazla önem kazandığı görülmektedir (Lawlor ve ark., 2014; Henneman ve ark., 2015; Naipal ve van Gent 2015; Smith ve ark., 2015).

Mevcut tez çalışmasında gerçekleştirilen RT-PCR, western blot ve IF analizleri sonucunda, BMN 673 uygulanan HCC1937 hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDR1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyesinde BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak bir azalış belirlenmesine rağmen, BCRP ve MRP1'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış analiz edilmiştir ($p < 0.05$). BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde, MDR1, BCRP ve MRP1'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyelerinin doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p < 0.05$) ve MDR1'in protein seviyesinde artışın BCRP ve MRP1'e göre daha fazla oranda olduğu analiz edilmiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise, HCC1937 parental hücreleri ile karşılaştırıldığında BCRP ve MRP1'in mRNA ve protein seviyesinde ekspresyonunun anlamlı bir derecede arttığı analiz edilmiştir ($p < 0.05$). Ayrıca, hücrelerde BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak BCRP ve MRP1'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyesinde artış olduğu ancak MDR1'in özellikle protein seviyesinde ekspresyonunun HCC1937 hücrelerinde belirlendiği gibi azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak, HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde BCRP ve MRP1'in, MDR1'e göre daha etkin rol aldığı belirlenmiştir.

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673'ün HR ve MDR ile ilişkili olan genlerin mRNA ve protein düzeyinde etkisi RT-PCR, western blot ve IF yöntemleri kullanılarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçların birbirini destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Ancak, HCC1937-R hücrelerinin BMN 673'e karşı kazandıkları dirence bağlı olarak, *MDR1* ve *BRCA1* genlerinin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyelerinde farklılıklar belirlenmiştir.

miRNA'lar hedef aldıkları mRNA'ların 3'UTR bölgesinin tamamlayıcı nükleotit dizisine bağlanarak, RNA transkripsiyonunu ve translasyonunu inhibe eden ve dolayısıyla hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptosis, DNA tamiri, hücre siklusu, stress yanıtı, metabolizma ve anjiyogenez gibi birçok hücresel süreçte etkili olan

küçük kodlanmayan RNA'lardır. Ayrıca, miRNA'lar ilaç taşınmasında ve metabolizmasında yer alan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde görev aldığı için, miRNA ekspresyonunda değişimlerin kanser hücrelerinin ilaç dirençli fenotip kazanmasında önemli rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların ekspresyonlarında meydana gelen değişimlerin farklı kanser tiplerinde kemoterapik ilaçlara karşı direnç gelişmesinde rolünün belirlendiği farklı çalışmalar mevcuttur (Kutanzi ve ark., 2011; Donzelli ve ark., 2014; Raza ve ark., 2014). Meme kanserinde, farklı miRNA'ların ekspresyonundaki değişikliklerin kanserin gelişim, metastaz ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu ve meme kanserinin her bir alt tipine göre miRNA ekspresyon profilinin değiştiğinin belirlendiği çalışmalar literatürde mevcuttur (Serpico ve ark., 2014; Sempere ve ark., 2015; Takahashi ve ark., 2015; Kurozumi ve ark., 2016).

PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde, miRNA ekspresyonunda meydana gelen değişimlerin etkisinin araştırıldığı çalışmalar literatürde sınırlıdır. Ancak, HR yolağında özellikle BRCA1 ve RAD51'i hedef alan bazı miRNA'ların (miR-107, miR-148b, miR181a/b, miR-182, miR-193b, miR-1255b vb.) ve NHEJ yolağında Ku kompleksini hedef alan miR-622'nin ekspresyonlarında meydana gelen değişimlerin hücrelerde olaparibe ve veliparibe karşı direnç gelişmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Bisso ve ark., 2013; Neijenhuis ve ark., 2013; Choi ve ark., 2014; Murata ve ark., 2016; Choi ve ark., 2016).

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673 uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR ile ilişkili RAD51 ve BRCA1'i hedef aldığı bilinen ve daha önce olaparibe karşı direnç gelişmesinde rolleri belirlenen miR-107, miR-193b ve miR-1255b ve MDR1, BCRP ve MRP1 genlerini hedef aldığı bilinen miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a'nın ekspresyon seviyesindeki değişimler analiz edilmiştir. HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün uygulanan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde azalma ve hedef aldıkları RAD51 ve BRCA1'in ekspresyon seviyesinde artış, HR mekanizmasının BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol aldığını göstermektedir. MDR ile ilişkili genleri hedef alan miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyesinde ise, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak azalma belirlenmiştir. Ancak özellikle MRP1 ve BCRP'yi hedef alan sırasıyla miR-326 ve miR-328'in ekspresyon

seviyesinin, MDR1'i hedef alan miR-298 ve miR-451a'ya göre daha fazla bir oranda azaldığı belirlenmiştir.

HCC1937-R hücrelerinde ise, HCC1937 parental hücrelerine göre BRCA1 ve RAD51'i hedef aldığı bilinen miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde anlamlı bir derecede azaldığı analiz edilmiştir ($p < 0.05$). BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak miR-107, miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde azalış HR mekanizmasının BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol aldığını göstermektedir. Ayrıca, HCC1937-R hücrelerinde artan MDR1, BCRP ve MRP1 ekspresyonundan dolayı, bu genleri hedef alan miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon seviyelerinin HCC1937 parental hücrelerine göre daha fazla oranda azaldığı belirlenmiştir. Ancak, HCC1937 parental hücrelerinde de belirlendiği gibi, özellikle sırasıyla MRP1 ve BCRP'yi hedef alan miR-326 ve miR-328'in ekspresyon seviyesinde, MDR1'i hedef alan miR-298 ve miR-451a'ya göre daha yüksek bir oranda azalış tespit edilmiştir. Sonuç olarak, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde hem mRNA hem de miRNA ekspresyon seviyesinde değişimlere göre, HCC1937 parantel hücrelerindedede belirlendiği gibi BCRP ve MRP1'in MDR1'e göre daha etkin rol aldığı görülmektedir.

MCF-10A hücrelerinde, BMN 673'ün artan konsantrasyonuna bağlı olarak miR-107 ve miR-1255b'nin ekspresyon seviyesinde artış belirlenmesine rağmen, miR-193b'nin ekspresyonunda azalış analiz edilmiştir. Sonuç olarak, MCF-10A hücrelerinde miR-193b'nin HR ile ilişkili diğer miRNA'lara göre daha etkin rol aldığı ve RAD51 ve BRCA1 genlerinin ekspresyon seviyesinde değişim ile ilişkili olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde MDR1'i hedef alan miR-298 ve miR-451a'nın ekspresyon seviyesinin arttığı belirlenmesine rağmen, BCRP ve MRP1'i hedef alan miR-326 ve miR-328'in ekspresyon seviyesinin azaldığı analiz edilmiştir. Sonuç olarak, BMN 673 uygulanan MCF-10A hücrelerinde MDR1'in BCRP ve MRP1 gibi BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde etkin rol aldığı mRNA düzeyinde belirlenmesine rağmen, MDR1'i hedef aldığı bilinen miR-298 ve miR-451a'nın ekspresyonlarındaki artış, özellikle 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde MDR1'in protein ekspresyonunun azalması ile ilişkili olabileceği öngörülmektedir.

Son olarak, BMN 673'ün HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişimler elektron mikroskop ile görüntülenmiştir. BMN 673 HCC1937 hücrelerinde apoptotik ve otofajik ölüme neden olmasına rağmen, BMN 673'ün toksik etkisinden dolayı MCF-10A hücrelerinde hasar görüntülenmiştir. HCC1937-R hücrelerinin kazandığı dirençten dolayı genel morfolojik yapısının HCC1937 parental hücrelerine göre değiştiği ve BMN 673 uygulandığında hücrelerde belirgin bir hasar olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, çok sayıda lizozom ve otofajik lizozoma sahip ve nükleus içermeyen hücre parçaları alınan ince kesitlerde gözlemlenmiştir. Otofaji, besin yokluğu, nükleer DNA hasarı ve metabolik ve terapötik stres koşullarında aktive olan mitokondri, golgi kompleksleri, poliribozomlar ve endoplazmik retikulum gibi hasarlı veya yaşlı organellerin sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrelediği otofagozom sayısında artış ile karakterize olan lizozomal degradasyon yolağıdır. Otofagozomlar, lizozomlar ile birleşerek hasarlı organellerin amino asitlere sindirilmesini sağlayarak hücre kullanımı için yeniden kazandırılmasını ve hücrenin korunmasını sağlarlar (Öz Arslan ve ark., 2011; Yang ve ark., 2011). Otofaji, metabolik stress altında kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayarak antikanser ilaçlarına karşı direnç gelişmesinde rol aldığı farklı kanser hücre hatlarında belirlenmesine rağmen, aşırı aktivasyonunun ise hücre ölümüne neden olduğu da literatürde belirtilmiştir (Sui ve ark., 2013; Liu ve ark., 2014; Wang ve Wu 2014; Kwan ve Wai 2016). Bu yüzden, HCC1937-R hücrelerinde çok sayıda lizozom içeren hücre parçalarının görülmesinin sebebi olarak, hücrelerin BMN 673'e karşı kazandığı dirençten kaynaklanabileceği öngörülmektedir. PARP inhibitörlerinin kanser hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişimlerin analiz edildiği çalışmalar literatürde sınırlıdır. Arun ve ark. (2015), olaparibin 14 farklı meme kanseri hücre hattı içerisinde *BRCA* mutasyonu olan ve olmayan ancak *BRCA1* allel kaybı olan meme kanseri hücrelerinde otofajik ölüme neden olduğu görüntülenmiştir. Olaparibin, mitofaji olarak bilinen otofaji tarafından mitokondrilerin degradasyonu sonucunda hücre ölümüne neden olduğu hem kantitatif hem de hücrelerde otofajik lizozom ve vakuollerin görüntülenmesi ile desteklenmiştir ve otofajinin PARP inhibisyonuna dayalı tedavilerde prediktif bir belirteç olarak kullanılabilmesi öngörülmüştür (Arun ve ark., 2015). Bu nedenle, BMN 673'ün hücrelerde neden olduğu otofajik ölümün kantitatif ve kalitatif olarak analiz edildiği ve otofajinin BMN

673'e karşı direnç gelişmesinde etkisinin belirlendiği detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Geleneksel ilaç formülasyonları ile ilişkili farmakokinetik sınırlamaların ve kanser hücrelerinin farklı kemoterapik ajanlara karşı kazandığı çoklu ilaç direncinin (MDR) aşılması amacıyla, son 20 yıldır gerçekleştirilen çalışmalarda özellikle ilacın tümör dokusunda daha fazla miktarda birikmesini sağlayan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde kullanılmasına odaklanılmaktadır (Mitragotri ve ark., 2014; Blanco ve ark., 2015; Huang ve ark., 2016; OS ve ark., 2016).

Günümüzde, bazı nanopartikül-temelli kemoterapötikler (Doxil:doksorubisinin lipozomal formülasyonu, Abraxane: paklitaksel-bağlı protein partiküller, DaunoXome: daunorubisin lipozomal formülasyonu, Marqibo: Lipozomal vinkristin ve Onivyd: lipozomal irinotekan) farklı kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmasına rağmen, PROMITIL, ThermoDox®, VYEXOS, CPX-351, BIND-014, Genexol-PM, NC-6004 Nanoplatin ve NBTXR3 PEP503 (Nanobiotix) vb. gibi lipozomal, polimerik misel ve inorganik nanopartiküllerin prostat, akciğer, meme, over kanseri gibi farklı kanser tiplerinin tedavisinde klinik faz deneyleri devam etmektedir (Hu ve ark., 2010; Crucho ve ark., 2015).

İlk olarak 1965 yılında terapötik lipid-temelli ilaç taşıyıcı sistem olarak lipozomlar keşfedilmesine rağmen, lipozomların kısa raf ömrü, düşük stabilite, düşük yükleme kapasitesi ve üretiminin maliyetli olması gibi dezavantajlarından dolayı, 1990 yılının başlarında geleneksel taşıyıcı sistemlere (emülsiyonlar, lipozomlar ve polimerik miseller) alternatif kolloidal lipid temelli terapötik bir ilaç taşıyıcı sistem olarak katı lipid nanopartiküller (KLN) geliştirilmiştir. KLN'ler farklı özellikte terapötiklerin taşınmasını sağlayarak farklı alanlarda potansiyel uygulamalarından dolayı, klinik tıpta ve araştırmalarda önde gelen bir ilaç taşıyıcı sistem olarak dikkat çekmektedir. KLN'ler lipid-matriks bileşen yapısından dolayı, fizyolojik olarak uyumlu, küçük boyuta ve yüksek biyouyumluluğa sahip, geniş çapta üretilebilen, organik çözücüye ihtiyaç duymadan hem hidrofobik hemde hidrofilik özellikle terapötik ajanları taşıyabilen, ilacı degrade olmaktan koruyan, kontrollü ilaç salınımı sağlayan ve az akut yada kronik toksik etki sergileyen kolloidal taşıyıcı bir sistem olduğu için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda KLN'nin kanser tedavisinde potansiyel terapötik etkisinin belirlenmesine odaklanılmaktadır (Müller, RH ve ark., 1995; Müller ve ark., 2000;

Muller ve Keck 2004; Mukherjee ve ark., 2009; Sanap 2014; Naseri ve ark., 2015; Geszke-Moritz ve Moritz 2016).

Mevcut tez çalışmasında, ilk kez bir ilaç taşıyıcı sistemin BMN 673 için üretilmesi ile BMN 673'ün farmokokinetik ve farmokodinamik özelliklerinin geliştirilmesi ve BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, ilk kez BMN 673 yüklü KLN sıcak homojenizasyon tekniği ile üretildikten sonra karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. BMN 673-KLN'nin potansiyel terapötik etkisi belirlenmesi amacıyla Şekil 222'de özetlendiği gibi, öncelikle HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde hem sitotoksik hem de apoptotik etkisi ilk kez analiz edilmiştir. BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol alan HR ve MDR mekanizmalarının aşılmasında potansiyel rolü, HR ve MDR ile ilişkili genlerin mRNA ve protein düzeyinde ve bu genleri hedef aldığı bilinen miRNA'ların ekspresyon seviyesinde neden olduğu değişimlerde ise RT-PCR, Western blot ve IF yöntemleri kullanılarak ilk kez belirlenmiştir. Son olarak, BMN 673-KLN'nin hücrelerde neden olduğu ince yapısal değişimler ilk kez TEM kullanılarak görüntülenmiştir. BMN 673 ve BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde elde edilen kantitatif veriler Tablo 69'da karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Tablo 69. HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde 10 nM BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin sitotoksik ve apoptotik etkisinin ve HR ve MDR mekanizmaları ile etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler sonucu elde edilen kantitatif verilerin karşılaştırılması. (EA: Erken apoptoz, GA: Geç apoptoz)

	Yöntemler		BMN 673						BMN 673-KLN					
			HCC1937		HCC1937-R		MCF-10A		HCC1937		HCC1937-R		MCF-10A	
			6g	12g	6g	12g	6g	12g	6g	12g	6g	12g	6g	12g
Canlılık	WST-1		%58.19	%30.15	%99.60	%87.56	%107.0	%29.07	%58.20	%30.16	%53.34	%35.15	%107.0	%60.47
Apoptoz	Annexin V	EA	%10.85	%10.19	%2.18	%16.37	%4.49	%14.40	%10.11	%9.19	%5.45	%6.13	%7.03	%23.44
		GA	%29.75	%72.67	%10.64	%9.49	%17.21	%27.45	%40.14	%79.59	%35.75	%79.43	%13.06	%10.94
	Hücre siklusu	Kontrol	%41.9	%39.0	%33.2	%40.5	%14.0	%21.6	%37.0	%39.2	%38.2	%39.7	%10.9	%8.3
		G2/M	%45.4	%49.3	%42.0	%52.0	%33.3	%39.7	%43.8	%51.7	%41.0	%45.7	%28.7	%25.5
	dsDNA		%23.27	%22.51	%0.21	%1.30	%1.12	%13.03	%29.45	%59.95	%20.48	%71.23	%4.51	%3.42
	Kırılmış PARP miktarı		-	2.37-	-	1.74-	-	2.63-	-	2.56-	-	2.09-	-	1.80-
İlaç direnci	Intraselüler Kalsein		%77.2	%47.3	%50.8	%42.0	%46.3	%39.5	%88.1	%52.6	%55.0	%53.5	%60.6	%56.9
	Intraselüler Rho 123		%66.7	%50.5	%46.0	%38.0	%47.5	%35.7	%83.7	%56.0	%50.3	%44.2	%73.8	%53.5
Ekspresyon (mRNA)	H2AX		-1.10	6.18	-1.32	1.52	-1.41	2.32	3.97	2.71	2.72	2.24	-2.11	-2.18
	PARP1		-1.45	-1.40	-4.15	5.69	-3.59	2.22	3.80	-1.22	1.90	1.44	-1.74	1.73
	RAD51		-1.00	1.32	4.28	3.77	-1.43	5.33	4.41	2.96	2.45	3.08	7.00	2.30
	BRCA1		-1.42	2.75	-1.94	4.20	4.68	4.60	-1.80	-5.01	2.45	-2.49	2.49	2.75
	MDR1		1.26	1.67	2.15	5.37	1.74	5.55	1.19	-3.67	-1.26	1.42	-1.37	2.83
	BCRP		0.27	5.24	2.83	7.76	1.60	4.62	1.44	2.51	-1.18	2.09	1.61	3.26
	MRP1		1.33	6.73	4.29	10.87	1.92	4.86	1.20	2.72	1.38	6.32	1.65	2.86
Ekspresyon (miRNA)	miR-107		-1.94	-1.84	-3.64	-7.23	-3.32	2.32	-1.27	-2.17	-1.47	-2.25	1.22	-2.18
	miR-193b		-1.78	-1.76	-2.89	-3.80	1.38	-1.30	-4.24	-1.62	-1.29	-2.57	1.47	-1.50
	miR-1255b		1.12	-3.36	-3.80	-5.29	-2.36	1.09	-2.70	-1.33	-2.99	-7.77	-3.36	-1.34
	miR-298		-1.40	-1.00	-3.99	-5.00	-2.66	-1.41	-1.99	4.35	-1.05	-1.39	-1.48	-1.58
	miR-326		1.08	-7.00	-3.44	-14.82	-1.61	-2.42	-1.63	-5.16	1.75	-2.80	1.47	1.31
	miR-328		-1.48	-5.86	-1.69	-12.79	1.10	-1.30	-1.08	4.29	1.33	-1.34	2.00	-1.10
	miR-451a		-1.11	-2.40	-1.55	-9.57	-1.73	-1.57	-4.00	-3.39	1.95	-2.26	-1.44	-3.91

Mevcut tez çalışmasında, KLN formülasyonunun öncelikle 3 farklı sıcaklıkta (4, 25 ve 40°C) partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri BMN 673 ve boş KLN ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, BMN 673-KLN'nin BMN 673'e göre anlamlı derecede küçük boyuta sahip olduğu, homojen bir dağılım ve daha kararlı bir yapı sergilediği analiz edilmiştir. Ayrıca, BMN 673 yüklü KLN'nin enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi değerlerinin yüksek analiz edilmesi, KLN formülasyonunun BMN 673 için başarılı bir şekilde üretildiğini ve gerçekleştirilen ilaç salınım analizleri ile KLN formülasyonunun kontrollü salınım yapma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. KLN formülasyonunun farklı etken maddelerin (doksorubisin, elakridar, kurkumin, paklitaksel, doksoetaksel, etoposid, metformin ve topotekan) yüklendiği KLN formülasyonlarının, etken maddelere göre daha düşük boyuta (~200-400 nm) sahip olduğu ve daha kararlı bir yapı sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca, literatürde yüklenen etken maddenin farmokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin KLN'nin matriks yapısı ve kullanılan lipid ile uyumuna göre, KLN formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliğinin ve ilaç yükleme kapasitesinin değişebileceği belirtilmiştir (Harivardhan Reddy ve ark., 2005; Wong ve ark., 2006; Lee ve ark., 2007; Subedi ve ark., 2009; Xu ve ark., 2009; Kang ve ark., 2010; Mulik ve ark., 2010; Mussi ve ark., 2013; Athawale ve ark., 2014; Chen ve ark., 2016; Ngwuluka ve ark., 2016; Peira ve ark., 2016). Ancak, bugüne kadar literatürde BMN 673 ve diğer PARP inhibitörler için geliştirilmiş herhangi bir ilaç taşıyıcı sistemin terapötik etkisinin belirlendiği bir çalışma bulunmadığından dolayı, PARP inhibitörlerinin ön-klinik ve klinik denemelerde dezavantajlı özelliklerinin ortadan kaldırılması için farklı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerinin etkilerinin araştırıldığı detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ullal ve ark. (2011) manyetik nanopartiküle olaparibin konjuge edilmesi sonucunda PARP-nano sensörünün terapötik etkisi yerine PARP1 ve PARP2 bağlanma affinitesinde değişikliklerin analiz edildiği sadece bir çalışma mevcuttur (Ullal ve ark., 2011).

KLN'nin yüzey morfolojilerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan SEM analizi ile KLN formülasyonunun sahip olduğu yuvarlak yapının BMN 673'ün partikül boyutunda azalma sağladığı görüntülenmiştir. KLN'ler lipid temelli bir ilaç taşıyıcı sistemi olduğu için literatürde farklı etken maddelerin yüklendiği KLN formülasyonlarının yuvarlak/oval bir yapıya sahip olduğu görüntülenmiştir (Lee ve

ark., 2007; Mulik ve ark., 2010; Kuo ve Liang 2011; Tran ve ark., 2014; Sachdeva ve ark., 2015; Chen ve ark., 2016). Ayrıca, KLN formülasyonun üretilmesi için kullanılan lipid ile etken maddenin uyumunun FT-IR ve NMR analizleri ile araştırıldığı çalışmalarda mevcuttur (Zimmermann ve ark., 2005; Nair ve ark., 2012; Singh ve ark., 2013; Ebrahimi ve ark., 2015; Fouad ve ark., 2015; Polchi ve ark., 2016). Mevcut tez çalışmasında, gerçekleştirilen FT-IR ve NMR analizleri sonucunda, KLN formülasyonunun BMN 673'ü lipid yapısının içine başarılı bir şekilde hapsettiği, kararlı bir yapı sergilediği ve lipid ve etken madde arasında herhangi bir uyumsuzluğun olmadığı belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen karakterizasyon deneylerinin sonucunda KLN formülasyonun BMN 673 için ideal bir taşıyıcı sistem olarak uygun olduğu belirlendikten sonra, BMN 673-KLN ve boş KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisi belirlenmiştir. BMN 673-KLN'nin HCC1937 hücrelerinde BMN 673'ün terapötik etkisini arttırarak daha düşük konsantrasyonlarda daha fazla etkiye sahip olduğu ve aynı zamanda MCF-10A kontrol hücrelerinde BMN 673'ün toksik etkisinin önemli derecede azalmasını sağladığı analiz edilmiştir. BMN 673-KLN'nin HCC1937 parental hücrelerinde (IC_{50} : 2000 hücre için 0.40 ± 0.04 nM) etkili olduğu benzer konsantrasyonlarda HCC1937-R hücrelerinde de (IC_{50} : 2000 hücre için 0.45 ± 0.03 nM) sitotoksik etki sergilemesi, BMN 673'e karşı kazanılan ilaç direncinin aşılmasında BMN 673-KLN'nin potansiyel terapötik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, boş KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve dolayısıyla HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin sahip olduğu sitotoksik etkinin BMN 673'den kaynaklandığını göstermektedir.

Farklı kemoterapik ilaçların (doksorubisin, mitomisin-C, etoposid, topotekan, doksetaksel, karmustin, emodin ve tamoksifen) veya antikanser özelliğe sahip etken maddelerin (resveratrol, retionik asit, kurkumin, askorbik asit, vitamin B12, kafeik asit) yüklendiği farklı yöntemlerle üretilmiş KLN formülasyonlarının etkisinin incelendiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, KLN formülasyonlarının normal hücrelerde özellikle kemoterapik ilaçların toksik etkisini azaltarak kanser hücrelerinde serbest etken maddeye göre daha etkili olduğu ve bu nedenle kanser tedavisinde ideal bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Lim ve ark., 2004;

Harivardhan Reddy ve ark., 2005; Lee ve ark., 2007; Yuan ve ark., 2008; Abbasalipourkabir ve ark., 2009; Xu ve ark., 2009; Mulik ve ark., 2010; Teskač ve Kristl 2010; Kuo ve Liang 2011; Souza ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012; Genç ve ark., 2015; Kutlu ve ark., 2013; Mussi ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013; Athawale ve ark., 2014; Güney ve ark., 2014; Dikmen ve ark., 2015; Chen ve ark., 2016; Eskiler ve ark., 2016). Ayrıca, doksorubisin, idarubisin, paklitaksel, tamoksifen ve 10-hidroksikamptotesin vb. kemoterapik ilaçlara karşı dirençli kanser hücre hatları (MCF7/ADR, MCF7-TamR, A2780, P388, SKOV3-TR30) ve/veya ksenograft modeller (MDA-MB-435/LCC6/MDR1) ile gerçekleştirilen çalışmalarda, lipid-matriks temelli KLN formülasyonunun ilacın kontrollü salınımını sağlayarak dirençli kanser hücrelerinde ilacın intraselüler miktarının artmasında etkin rol aldığı dolayısıyla özellikle P-gp temelli MDR'nin aşılmasında KLN'nin potansiyel terapötik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Ma ve ark., 2009; Kang ve ark., 2010; Li ve ark., 2011; Miao ve ark., 2013; Prasad ve ark., 2013; Kapse-Mistry ve ark., 2014; Chen ve ark., 2015; Liu ve ark., 2015; Eskiler ve ark., 2016; Peira ve ark., 2016; Cavaco ve ark., 2017) .

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkisi, koloni formasyon ve yara iyileşme yöntemleri ile de görüntülenerek desteklenmiştir. HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinin koloni oluşturma ve migrasyon yeteneklerinin BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak BMN 673'e göre daha fazla oranda azaldığı görüntülenmiştir. Ayrıca, BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinin koloni sayısında ve migrasyon mesafesinde BMN 673'e göre daha az oranda bir azalış olduğu görüntülenmiştir. Elde edilen veriler, WST-1 sonuçları ile desteklenmiştir.

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde apoptotik etkisi incelendiğinde, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. günde toplam apoptotik (erken ve geç apoptoz) hücre miktarı sırasıyla %50.25 ve %88.78 olarak belirlenmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde 6. ve 12. günde toplam apoptotik hücre miktarı sırasıyla %20.09 ve %34.38 olarak analiz edilmiştir ($p < 0.05$). HCC1937-R hücrelerinde ise, 6. ve 12 .günde toplam apoptotik hücre miktarı sırasıyla %41.20 ve %85.56 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, BMN 673-KLN'nin HCC1937 ve HCC1937-R

hücrelerinde uygulanan doza ve zamana bağlı olarak BMN 673'e göre daha fazla oranda ve MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün toksik etkisini azaltmasından dolayı BMN 673'e göre daha az oranda apoptotik ölüme neden olduğu tespit edilmiştir. BMN 673-KLN'nin HCC1937-R hücrelerinde, HCC1937 parental hücrelerine benzer oranlarda hem sitotoksik hem de apoptotik ölüme neden olması, BMN 673'e karşı gelişen ilaç direncinin kırılmasında ideal bir terapötik taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

BMN 673-KLN uygulanan HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde 89 kDA PARP fragmentinin kantitatif analizi sonucunda ise, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonu bağlı olarak HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde 89 kDA PARP fragmentinin kantitatif miktarında BMN 673'e göre daha fazla oranda bir kat artışı belirlenmiştir ($p<0.05$). MCF-10A hücrelerinde ise, normalize 89 kDA PARP fragmenti miktarının BMN 673'e göre daha az oranda arttığı analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, Annexin V sonuçlarını destekler niteliktedir. Aynı zamanda, BMN 673'ün ve BMN 673-KLN'nin PARP'a bağlanma affinitesi analiz edildiğinde, hem BMN 673'ün hem de BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak PARP inhibisyonunda anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ancak, BMN 673-KLN'nin BMN 673'e göre PARP aktivasyonunu daha fazla oranda inhibe ettiği ve dolayısıyla KLN formülasyonunun BMN 673'ün aktivitesinde herhangi bir engel oluşturmayarak BMN 673 için ideal bir taşıyıcı sistem olduğu belirlenmiştir.

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde hücre siklusu üzerinde etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analiz sonucunda, 12 gün boyunca 10 nM BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde G2/M fazında hücre miktarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %39.2'den %51.7'e artmasına rağmen, MCF-10A hücrelerinde kontrol grubunda G2/M fazında hücre miktarı %8.3 iken, 12 gün boyunca 10 nM BMN 673 uygulanan hücrelerde %25.5'e arttığı tespit edilmiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise kontrol grubunda G2/M fazında hücre miktarı %39.7 iken, 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde %45.7 olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak, BMN 673-KLN'nin HCC1937 hücrelerinde BMN 673'e göre daha fazla oranda G2/M fazında hücre miktarında artışa neden olduğu analiz edilmiştir. MCF-10A hücrelerinde ise, azalan dsDNA kırıklarının dolayı BMN 673'e göre daha az oranda G2/M fazında hücre popülasyonu tespit edilmiştir.

KLN formülasyonunun apoptotik etkisinin ve hücre siklusu üzerinde etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmada, farklı anti-kanserojen ajan (Kolesteril bütirat, emodin, doksetaksel, tamoksifen, metotreksat dietil ester) yüklü KLN formülasyonlarının farklı kanser hücre hatlarında (MCF-7, MDA-MB-231, HT29, HCT15, HCT116, CAL27), serbest ilaca göre daha fazla miktarda G0/G1 veya G2/M fazında hücre miktarının artmasına ve apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmiştir (Minelli ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Chang ve ark., 2013; Minelli ve ark., 2013; Yuan ve ark., 2014; Yurgel ve ark., 2014; Abbasalipourkabir ve ark., 2015; Eskiler ve ark., 2016)

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde neden olduğu DNA hasarının belirlenmesi için, p-ATM, dsDNA ve p-H2AX miktarlarındaki değişimler analiz edilmiştir. 6 ve 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde dsDNA miktarında BMN 673'e göre daha fazla oranda artış analiz edilmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde 6. ve 12. günün sonunda p-ATM miktarında BMN 673'e göre daha az oranda bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca, 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde dsDNA ve p-H2AX miktarlarında BMN 673'ün aksine belirgin bir artış belirlenmemiştir. HCC1937-R hücrelerinde ise, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak özellikle dsDNA miktarında anlamlı derecede bir artış analiz edilmiştir ($p < 0.05$). Ancak HCC1937 parental hücrelerinde de belirlendiği gibi, BMN 673-KLN uygulandıktan 6 gün sonra p-H2AX miktarı artmasına rağmen, 12. günde BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde BMN 673'ün aksine p-H2AX miktarında azalış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde G2/M fazının BMN 673'e göre daha fazla uzamasının sebebi, BMN 673-KLN'nin hücrelerde neden olduğu dsDNA miktarındaki önemli derecede artıştan kaynaklanmaktadır. MCF-10A hücrelerinde dsDNA miktarında önemli bir değişim belirlenmemesi, KLN formülasyonunun BMN 673'ün toksik etkisini azalttığını göstermektedir. Elde edilen veriler, hücre siklusu analizi sonuçlarını desteklemektedir. Ancak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde önemli derecede artan dsDNA kırıklarına rağmen, BMN 673'e göre G2/M fazında daha az hücre miktarı belirlenmiştir. G2/M fazında hücre miktarının azalmasının nedeni olarak, artan

dsDNA kırıklarının HR ve/veya NHEJ mekanizmalarının aktivitesinin azalması sonucu hücrelerde artan apoptotik ölümden kaynaklanabileceği öngörülmektedir.

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin genellikle P-gp substratı olduğu bilinen farklı kemoterapik ajanlara karşı gelişen ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkilerinin belirlenmesinde, intraselüler kalsein-AM ve Rho123 miktarının analiz edildiği çalışmalar mevcuttur. Dong ve ark. (2009), paklitaksel ve doksorubisin yüklü KLN formülasyonunun P-gp yüksek eksprese eden MDA-MB-435/LCC6MDR1 melanoma kanser hücre hatları ve ksenograft modelinde, KLN formülasyonları uygulanan dirençli hücrelerde intraselüler kalsein-AM miktarının arttığı ve hücrelerde apoptotik ölüme neden olarak gelişen ilaç direncinin aşılmasında KLN'nin terapötik etkisi belirlenmiştir (Dong ve ark., 2009). Salomon ve Ehrhardt (2011) karboksilatlanmış (100 nm), amin ve sülfat ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin, P-gp'nin yüksek eksprese eden A549 akciğer kanseri hücrelerinde, intraselüler Rho123 miktarında artışa neden olduğunu göstermişlerdir (Salomon ve Ehrhardt 2011). Li ve ark (2011) kurkumin ile birlikte paklitaksel yüklü KLN'nin P-gp yüksek eksprese eden MCF7/ADR hücrelerinde ilaç direncinin aşılmasında potansiyel role sahip olduğu ve hücrelerde azalan P-gp aktivitesine bağlı olarak intraselüler kalsein miktarın artış olduğunu belirtmişlerdir (Li ve ark., 2011). Miao ve ark (2013), floresans işaretli KLN uygulanan doksorubisin dirençli (MCF-7/ADR ve SKOV3-TR30), parental (MCF-7 ve SKOV3) hücrelerinde KLN'nin hücrelerde endositozis ile alındığı ve dolayısıyla ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Miao ve ark., 2013). Xu ve ark. (2015), metformin yüklü KLN'nin etkisini araştırdıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında, KLN formülasyonunun intraselüler Rho 123 miktarında serbest ilaca göre daha fazla oranda artış sağladığını ve intraselüler metformin miktarının önemli derecede arttığını belirlemişlerdir (Xu ve ark., 2015). Singh ve Lamprecht (2015), hidrofilik ve lipofilik özellikte verapamil ve elakridar yüklü nanopartiküllerin ve yüzey yüklerinin A2780 parental ve doksorubisin dirençli over kanseri hücre hatlarında etkisini ve ilaç direncinin aşılmasında potansiyel rollerini araştırdıkları çalışmalarında, nanopartikül formülasyonlarının kontrollü ilaç salınımı sağlayarak P-gp temelli gelişen ilaç direncinin aşılmasında etkili olduğunu ve dolayısıyla dirençli hücrelerde intraselüler

kalsein ve Rho 123 miktarında artış olduğunu belirtmişlerdir (Singh ve Lamprecht 2015).

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol alan MDR1 ve/veya MRP1 veya BCRP'nin aktivasyonunun aşılmasında BMN 673-KLN'nin potansiyel rolünün belirlenmesi amacıyla HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarı analiz edilmiştir. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde intraselüler kalsein ve Rho123 miktarının BMN 673'e göre anlamlı derecede arttığı ($p<0.05$) ve BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarında daha az oranda bir azalış belirlenmiştir. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarının BMN 673 uygulanan hücrelere göre önemli derecede arttığı analiz edilmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, hücrelerde KLN formülasyonunun artan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarında azalış, serbest BMN 673'e göre MDR1, MRP1 veya BCRP aktivitesinin daha az oranda olduğunu ve özellikle HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN uygulandıktan sonra intraselüler kalsein ve Rho 123 miktarındaki artış, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol alan MDR-temelli mekanizmanın aşılmasında KLN formülasyonunun terapötik etkisini göstermektedir. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde sitozolde Rho 123 miktarının BMN 673'e göre daha fazla oranda arttığına görüntülenmesi ise, hücrelerde BMN 673-KLN'nin BMN 673'e göre daha fazla apoptotik ölüme neden olduğunu göstermektedir. MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673'e göre daha az miktarda sitozolde Rho 123 görüntülenmesi hücrelerde daha az miktarda apoptotik ölüm olduğunu bir göstergesidir. Elde edilen görüntüler apoptotik analiz sonuçlarını desteklemektedir.

BMN 673-KLN'nin HCC1937, HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde HR ve MDR mekanizmalarında rol alan genlerin mRNA ve protein düzeyinde neden olduğu kantitatif ve kalitatif değişiklikler RT-PCR, western blot ve IF yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Mevcut tez çalışmasında, HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde nükleer γ H2AX odaklarının, *H2AX* geninin ve γ H2AX'in protein ekspresyonunun BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonuna bağlı BMN 673'e göre daha az oranda eksprese olduğu belirlenmiştir. MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673-

KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak H2AX'in mRNA düzeyinde ekspresyon seviyesinde azalma belirlenmesine rağmen, ̳H2AX'in protein düzeyinde ekspresyonunun aynı seviyede kaldığı ancak BMN 673'e göre daha az oranda eksprese olduğu görüntülenmiştir. Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673'e göre dsDNA kırıklarının daha fazla ve ̳H2AX odaklarının ve protein ekspresyonunun daha az miktarda olması, özellikle ATM geninin aktivitesinde meydana gelen değişimlerden dolayı, H2AX'in Ser139'dan daha az fosforile olmasından kaynaklanabileceği öngörülmektedir. nk, BMN 673'n neden olduğu PARP inhibisyonu, hücrelerde ATM'yi aktive ederek ̳H2AX odaklarının oluşmasına neden olduğu için ATM-eksik tümörlerde PARP inhibitörlerinin potansiyel terapötik etkiye sahip olduğu literatürde belirtilmiştir (Weston ve ark., 2010; De Lorenzo ve ark., 2013; Hong ve ark., 2016). Ayrıca, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde artan dsDNA kırıklarına rağmen, G2/M fazının BMN 673'e göre daha kısa olması, HR mekanizmasının daha az aktive olmasından ve G2/M kontrol noktasında yer alan genlerin aktivitesinin değişmesi sonucu, hücrelerde BMN 673'e göre daha fazla apoptotik ölümden kaynaklanabileceği öngörülmektedir.

BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PARP1'in ekspresyon seviyesinde azalma belirlenmesine rağmen, 12 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde PARP1'in mRNA ekspresyon seviyesinde artış olduğu analiz edilmiştir. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde PARP1'in ekspresyon seviyesinin BMN 673'e göre daha fazla oranda olması ve HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde PARP1 ekspresyonunda azalış, BMN 673-KLN'nin BMN 673'e karşı PARP1-temelli direncin aşılmasında terapötik etkiye sahip olabileceğini ve MCF-10A hücrelerinde daha az hasara neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak 89 kDA PARP proteininin ekspresyonunda BMN 673'e göre daha fazla oranda bir artış analiz edilmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde 116 kDA PARP proteininin ekspresyon miktarının BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna rağmen hemen hemen aynı seviyede kaldığı ve 89 kDA PARP proteininin BMN 673'e göre daha az oranda eksprese

olduğu görüntülenmiştir. Elde edilen veriler, 89 kDa PARP fragmentinin kantitatif miktarı ve Annexin V sonuçlarını destekler niteliktedir.

Mevcut tez çalışmasında, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde BRCA1 ve RAD51'in mRNA ve protein seviyesinde artışın HR mekanizmasının aktivitesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak RAD51'in mRNA ve protein seviyesinde ekspresyonunun ve nükleer lokalizasyonunun BMN 673'e göre daha fazla oranda arttığı analiz edilmiştir. HCC1937-R ve MCF-10A hücrelerinde ise, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, RAD51'in mRNA ve protein seviyesinde ekspresyonunun BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ancak, artış miktarının BMN 673'e göre daha az oranda olduğu analiz edilmiştir. HCC1937 hücrelerinde BRCA1'in mRNA ekspresyon seviyesinin BMN 673-KLN uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak BMN 673'e göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ve 10 nM BMN 673-KLN uygulanan hücreler dışında genel olarak BRCA1 protein ekspresyonunda belirgin bir artış olmadığı gözlemlenmiştir. HCC1937-R hücrelerinde, farklı nedenler dolayı aktive olan BRCA1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyesinin BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak BRCA1'in mRNA ve protein seviyesinde artış görüntülenmesine rağmen, BMN 673'e göre daha az oranda artış analiz edilmiştir. Sonuç olarak, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol alan HR mekanizmasının KLN formülasyonu uygulanan hücrelerde daha az aktive olması, KLN'nin HR-temelli ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

KLN formülasyonlarının farklı kemoterapik ilaçlara karşı dirençli kanser hücreleri ve ksenograft modellerinde özellikle P-gp temelli ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkisinin belirlendiği çalışmalar literatürde mevcuttur. Mevcut tez çalışmasında, BMN 673'ün zayıf P-gp substratı olmasından dolayı BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde BCRP ve MRP1'in daha etkin rol aldığı belirlenmiştir. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, MDR1, BCRP ve MRP1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyesinin BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak BMN

673'e göre daha fazla miktarda azaldığı görüntülenmiştir. BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MDR1, BCRP ve MRP1'in mRNA ve protein ekspresyon seviyesinde doza bağlı olarak bir artış belirlenmesine rağmen, bu artışın BMN 673 uygulanan hücelere göre daha az bir oranda olduğu görüntülenmiştir. Sonuç olarak, BMN 673'e karşı direnç gelişmesi ile ilişkili olan özellikle BCRP ve MRP1'in aktivitesinin BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde daha az belirlenmesi, KLN formülasyonunun MDR-temelli ilaç direncinin aşılmasında potansiyel terapötik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Mevcut tez çalışmasında, HR ve MDR mekanizması ile ilişkili genleri hedef aldığı bilinen miRNA'ların ekspresyonlarının da meydana gelen değişimlerin BMN 673'e karşı direnç gelişmesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde BMN 673-KLN'nin uygulanan konsantrasyonuna ve zamanına bağlı olarak miR-193b ve miR-1255b ekspresyon seviyesinde negatif yönde bir artış analiz edilmesine rağmen, miR-107 ekspresyonunda azalış belirlenmiştir ve genel olarak miRNA'ların ekspresyonlarındaki artışın özellikle BRCA1'in ekspresyon seviyesinin BMN 673'e göre daha az oranda artması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, HR mekanizmasının BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde daha az aktive olduğu öngörülmektedir. Ancak, BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde RAD51'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyesinde artışın ve RAD51'i hedef aldığı bilinen miR-107 ekspresyon seviyesinde azalışın belirlenmesi, RAD51'in BMN 673-KLN uygulanan HCC1937 hücrelerinde BMN 673'e göre daha aktif olduğunu desteklemektedir. Yinede, elde edilen diğer analiz sonuçlarına (HR ile ilişkili diğer genlerin mRNA ekspresyonu) göre, HR mekanizmasının KLN formülasyonu uygulanan hücrelerde daha az aktive olduğu öngörülmektedir.

MDR ile ilişkili genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon seviyesinde ise, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak HCC1937 hücrelerinde miR-298, miR-328 ve miR-451a'nın ekspresyon seviyesinde artış belirlenmesine rağmen, miR-326'nın ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmiştir. Sonuç olarak, MRP1'i hedef alan miR-326'nın ve MRP1'in ekspresyon seviyesindeki değişim, BMN 673-KLN

uygulanan hücrelerde BMN 673'e göre daha az oranda olmasına rağmen, MRP1'in MDR1 ve BCRP'ye göre daha etkin rol aldığını göstermektedir.

HCC1937-R hücrelerinde BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak, miR-107 ve miR-193b'nin ekspresyon seviyesinin BMN 673'e göre arttığı analiz edilmesine rağmen, miR-1255b'nin ekspresyonunun BMN 673'e göre daha fazla bir oranda azaldığı belirlenmiştir.

Bir genin bir ilaca yanıtında miRNA'ların ekspresyon seviyesinde değişimlerin etkili olduğu bazı deneysel modellerde gösterilmiştir. Bazen bir miRNA'nin hedeflediği genler özel bir kemoterapik ilaca yanıtta etkili olabildiği gibi, bazen de kemoterapik ilaçlara karşı direnç gelişmesinde bir genin ekspresyonunda birden çok miRNA ekspresyon seviyesinde değişim olduğu belirlenmiştir. Örneğin sisplatine dirençli kanser hücrelerinde 4 farklı genin düşük ekspresyonunun 7 farklı miRNA ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. İlaç fonksiyonunda ise, miRNA'ların etkisi bilinmesine rağmen, ilaç hücreye girdikten sonra miRNA'ların ekspresyonlarında meydana gelen değişimler de etkili olmaktadır. Bazen, ilacın neden olduğu miRNA ekspresyonundaki değişiklikler doğrudan ilacın etkinliğinin artmasına yardımcı olmasına rağmen, bazen de miRNA ekspresyonundaki değişimler hücrelerde ilaca karşı direnç gelişmesi ile ilişkilidir (Zheng ve ark., 2010; Rukov ve Shomron 2011). Bu nedenle, miRNA-temelli farmakogenomik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile ilacın etkinliğinin ve toksisitesinin belirlenmesinde post-transkripsiyonel faktörlerin hedef aldıkları genler ve yolaklarda rolünün ve hücre çevresi ile ilaçların etkileşiminin araştırıldığı detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir (Garzon ve ark., 2010; Rukov ve Shomron 2011).

BMN 673-KLN uygulanan HCC1937-R hücrelerinde RAD51 ve BRCA1'in mRNA düzeyinde ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmesine rağmen, miR-1255b ekspresyonunun artması, hücrelerde BMN 673'e göre daha az oranda da olsa HR mekanizmasının aktif olabileceği, miR-1255b'nin hedef aldığı diğer genler ile ilişkili ekspresyonunda azalma olabileceği veya miR-1255b'nin hedef aldığı geni hedefleyen diğer miRNA'ların genin regülasyonunda daha etkili olabileceği öngörülmektedir.

MDR ile ilişkili genleri hedef alan miR-298, miR-326, miR-328 ve miR-451a ekspresyon düzeylerinin ise, 6 gün boyunca BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde yüksek seviyede olduğu belirlenmesine rağmen, 12. günün sonunda miRNA'ların

ekspresyon seviyesinde azalış analiz edilmiştir. Ancak, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak BMN 673'e göre MDR1, BCRP ve MRP1 hedef aldıkları bilinen miRNA'ların ekspresyon seviyesinde önemli derecede bir artış belirlenmiştir. Sonuç olarak, HCC1937-R hücrelerinde MDR ile ilişkili genlerin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonunda azalış ve bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde artış, BMN 673-KLN'nin MDR-temelli ilaç direncinin aşılmasında potansiyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

MCF-10A hücrelerinde ise, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak BRCA1 ve RAD51'i hedef alan miR-107 ve miR-193b'nin ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmesine rağmen, miR-1255b'nin ekspresyonunda negatif yönde bir artış analiz edilmiştir. Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde miR-107 ve miR-1255b'nin ekspresyon seviyelerinde BMN 673'e göre daha fazla oranda azalış analiz edilmesine rağmen, BMN 673'e göre hücrelerde HR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin daha az olması, HR mekanizmasının daha az aktive olduğunu göstermektedir. Ayrıca, BMN 673-KLN'nin artan konsantrasyonuna bağlı olarak, BCRP ve MRP1'i hedef alan miR-326 ve miR-328'in ekspresyon seviyesinin BMN 673'e göre daha az bir oranda azaldığı analiz edilmesine rağmen, MDR1'i hedef alan miR-298 ve miR-451a'nın ekspresyon seviyesinin KLN uygulanan hücrelerde daha fazla bir oranda azaldığı belirlenmiştir.

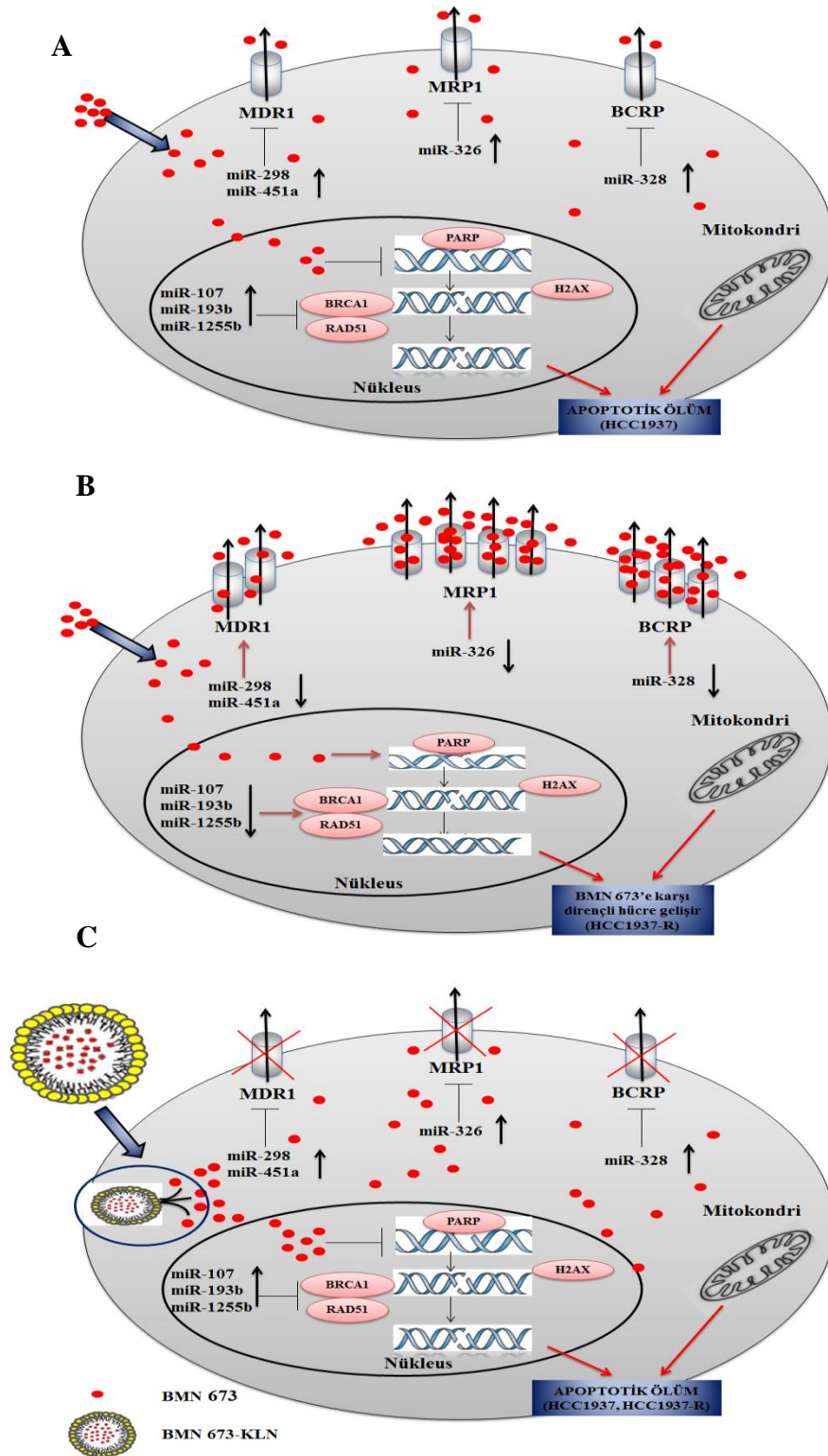
miRNA'lar ekspresyonlarında meydana gelen genetik ve epigenetik değişimler hedefledikleri genlerin ekspresyon seviyelerinde değişimlere neden olmaktadır. Ancak, bir gen birçok miRNA tarafından hedeflendiğinden dolayı her miRNA'nın ekspresyon seviyesinde değişim hedefledikleri genin mRNA'sında önemli değişime neden olmayabilir (Zheng ve ark., 2010; Garzon ve ark., 2010; Jacobsen ve ark., 2013). Sonuç olarak, BMN 673-KLN uygulanan MCF-10A hücrelerinde BMN 673'e göre MDR1'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon seviyesinin daha fazla oranda azaldığı belirlenmesine rağmen, MDR1'i hedef aldığı bilinen miRNA'ların BMN 673'e göre ekspresyon seviyelerinde daha fazla bir azalış analiz edilmiştir. Ancak, BMN 673-KLN uygulanan hücrelerde BMN 673'e göre MDR-temelli direncin gelişmesinde rol alan diğer genlerin aktivitesinin daha az ve bu genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon seviyesinin daha fazla oranda değiştiği analiz edildiğinden

dolayı BMN 673-KLN'nin BMN 673'e göre MDR-temelli ilaç direncine daha az neden olduğu belirlenmiştir.

Son olarak, mevcut tez çalışmasında BMN 673-KLN'nin hücrelerde neden olduğu ince yapısal değişimlerin elektron mikroskop ile incelenmesi sonucunda, BMN 673-KLN'nin BMN 673'e göre HCC1937 hücrelerinde daha fazla apoptotik ölüme neden olduğu görüntülenmiştir. MCF-10A hücrelerinde BMN 673'ün neden olduğu toksik etkinin azalmasını sağlayarak hücrelerde daha az hasara yol açtığı görüntülenmiştir. BMN 673-KLN'nin HCC1937-R hücrelerinde ise, direncin aşılmadaki rolü hücrelerde apoptozun belirgin morfolojik yapılarının gözlemlenmesi ile desteklenmiştir. Sonuç olarak, BMN 673'ün ve BMN 673-KLN'nin hücrelerde neden olduğu apoptotik ölüm hem kantitatif hemde kalitatif olarak analiz edilmiştir. Elde edilen tüm analiz sonuçlarına ilave olarak elektron mikroskop görüntülerinden elde edilen verilere göre, BMN 673'ün BMN 673-KLN'ye göre TNMK hücrelerinde daha fazla otofajik ölüme ve KLN formülasyonunun hücrelerde daha fazla apoptotik ölüme yol açmasının nedenlerinin araştırılacağı ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Mevcut tez çalışmasında,

- Bir PARP inhibitörü olarak BMN 673'ün TNMK'da sitotoksik ve apoptotik etkisi,
- PARP inhibitörlerine karşı ilaç direnci gelişmesine neden olan mekanizmalar içinde ilk kez HR ve MDR mekanizmalarının BMN 673'e karşı gelişen dirençteki rolleri,
- BMN 673'ün farmakokinetik ve farmokodinamik özelliklerinin geliştirilmesi için ilk kez bir ilaç taşıyıcı sistem olarak KLN'nin BMN 673 için üretilmesi ve TNMK tedavisindeki rolü ve
- İlk kez KLN'nin BMN 673'e karşı gelişen HR ve MDR-temelli ilaç direncinin aşılmasında *in vitro* olarak potansiyel terapötik etkisi ortaya konmuştur (Şekil 203).



Şekil 203. BMN 673 ve BMN 673-KLN'nin HCC1937 ve HCC1937-R hücrelerinde neden olduğu HR ve MDR mekanizmaları ile ilişkili genetik ve epigenetik değişimlerin etkisi (A) BMN 673'ün *BRCA1* geninde mutasyon taşıyan HCC1937 TNMK hücre hattında HR ve MDR mekanizmaları ile etkileşiminin ve hücrelerde terapötik etkisinin belirlenmesi, (B) 6 ay boyunca BMN 673 uygulanan HCC1937-R hücrelerinde, BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde HR ve MDR mekanizmalarının rollerinin belirlenmesi, (C) BMN 673 yüklü KLN'nin BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde rol alan HR ve MDR mekanizmalarının aşılmasında potansiyel terapötik etkisinin belirlenmesi.

BMN 673'ün özellikle *BRCA1/2* genlerinde mutasyon taşıyan ve/veya *BRCA1/2* genlerinin inaktif olduğu TNMK hastalarında umut vadeci terapötik etkisi bilinmektedir. Ancak diğer PARP inhibitörlerine karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirlenen mekanizmalardan HR ve MDR mekanizmalarının BMN 673'e karşı direnç gelişmesinde etkin rol aldığı ve tedaviyi sınırlayan bu direnç mekanizmalarının nanopartikül formülasyonlarının kullanılması ile aşılabileceğine dair temel moleküler veriler elde edilmiştir. Bu çalışma, henüz FDA onayı almamış klinik faz deneyleri devam eden BMN 673'ün meme ve over kanseri tedavisinde kullanılmasına yönelik yeni stratejilerin gerçekleştirilmesine katkı sağlayabilir niteliktedir. Ayrıca, PARP inhibitörlerinin kullanımını sınırlayan ilaç direnç mekanizmalarının aşılmasına yönelik nanopartikül formülasyonlarının etkilerinin araştırılması ve *in vivo* deneylerin gerçekleştirilmesi ile TNMK tedavisinde PARP inhibitörlerinin kullanımına yönelik yenilikçi terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlanabilir.

6. KAYNAKÇA

- A.Eroglu EÇ (2014) Meme kanserinde moleküler alt tiplere göre cerrahi tedavi yaklaşımları. *Yeni Tıp Dergisi* 31(2): 83-87.
- Abbasalipourkabir R (2011) Solid lipid nanoparticles as new drug delivery system. *Int J Biotechnol Mol Biol Res* 2:252-261.
- Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A, Abdullah R (2009) Cytotoxicity of tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles. *Deliv Nanoparticle* 59-70.
- Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A, Abdullah R (2015) Tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *J Exp Nanosci* 8080:1-14.
- Abd El-Rehim DM, Ball G, Finder SE, et al (2005) High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer* 116:340-350.
- Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. (2014) Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer* 121(1): 8-16.
- Ademuyiwa FO, Ellis MJ, Ma CX (2013) Neoadjuvant therapy in operable breast cancer: Application to triple negative breast cancer. *J Oncol*.
- Agrahari V, Agrahari V, Mitra AK (2016) Nanocarrier fabrication and macromolecule drug delivery: challenges and opportunities. *Ther Deliv* 7:257-278.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, et al (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8:102.
- Akshata Desai KA, Dennis MK, Field AS, et al (2012) Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hered Genet* 127:358-366.
- Al Haj NA, Abdullah R, Ibrahim S, Bustamam A (2008) Tamoxifen drug loading solid lipid nanoparticles prepared by hot high pressure homogenization techniques. *Am J Pharmacol Toxicol* 3:219-224.
- Allen KE, Weiss GJ (2010) Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics. *Mol Cancer Ther* 9:3126-3136.
- Altenberg G, Vanoye C, Horton J, Reuss L (1994) Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: Evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4654-4657.
- Aly A, Ganesan S (2011) BRCA1, PARP, and 53BP1: Conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* 3:66-74.
- Amé JC, Spenlehauer C, De Murcia G (2004) The PARP superfamily. *BioEssays* 26:882-893.
- American Cancer Society (2016) Cancer Facts & Figures 2016. *Cancer Facts Fig* 2016 1-9.
- Amin ML (2013) P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insights* 2013:27-34.
- Anders C, Carey L a La (2008) Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncol (willist Park NY)* 22:1233-1243.
- Anders CK, Winer EP, Ford JM, et al (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: “Targeted” therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 16:4702-4710.
- Andrei A-Z, Hall A, Smith AL, et al (2015) Increased in vitro and in vivo sensitivity of BRCA2-associated pancreatic cancer to the poly(ADP-ribose) polymerase-1/2

- inhibitor BMN 673. *Cancer Lett* 364:8-16.
- Arnaudeau C, Lundin C, Helleday T (2001) DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol* 307:1235-45.
- Arnedos M, Bihan C, Delaloue S, Andre F (2012) Triple-negative breast cancer: are we making headway at least? *Ther Adv Med Oncol* 4:195-210.
- Arslan C, Dizdar O, Altundag K (2009) Pharmacotherapy of triple-negative breast cancer. Expert opinion on pharmacotherapy. 10.13: 2081-2093.
- Arun B, Akar U, Gutierrez-Barrera AM, et al (2015) The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells. *Int J Oncol* 47:262-268.
- Ashworth A (2008) Drug resistance caused by reversion mutation. *Cancer Res* 68:10021-10023.
- Ashworth A (2008) A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 26:3785-3790.
- Athawale RB, Jain DS, Singh KK, Gude RP (2014) Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. *Biomed Pharmacother* 68:231-240.
- Attama AA, Umeyor CE (2015) The use of solid lipid nanoparticles for sustained drug release. *Ther Deliv* 6:669-684.
- Au WWY, Henderson BR (2005) The BRCA1 RING and BRCT domains cooperate in targeting BRCA1 to ionizing radiation-induced nuclear foci. *J Biol Chem* 280:6993-7001.
- Audeh MW (2014) Novel treatment strategies in triple-negative breast cancer: specific role of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibition. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 7:307-316.
- Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, et al (2010) Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: A proof-of-concept trial. *Lancet* 376:245-251.
- Austin Doyle L, Ross DD (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 22:7340-7358.
- Badrealam KF, Owais M Nanoscale drug delivery systems: An updated view. *Nanobiotechnology*, 180: 180-204.
- Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, et al (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* 24:157-167.
- Bae YH, Park K (2011) Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J Control Release* 153:198-205.
- Baek JS, Cho CW (2015) Controlled release and reversal of multidrug resistance by co-encapsulation of paclitaxel and verapamil in solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 478:617-624.
- Baek JS, So JW, Shin SC, Cho CW (2012) Solid lipid nanoparticles of paclitaxel strengthened by hydroxypropylcyclodextrin as an oral delivery system. *Int J Mol Med* 30:953-959.
- Baeza A (2014) Ceramic Nanoparticles for Cancer Treatment. Editör: Vallet-Regí M, Bio-Ceramics with Clinical Applications. JohnWiley & Sons, Ltd., pp: 421-455.
- Balaji SA, Udupa N, Chamallamudi MR (2016) Role of the drug transporter ABCC3

- in Breast Cancer Chemoresistance. *PloS one* 11(5): 1-22.
- Bao L, Hazari S, Mehra S, et al (2012) Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol* 180:2490-2503.
- Barber LJ, Sandhu S, Chen L, et al (2013) Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *J Pathol* 229:422-429.
- Benafif S, Hall M (2015) An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer. *Onco Targets Ther* 8:519-528.
- Bernard PS, Parker JS, Mullins M, et al (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27:1160-1167.
- Bertrand N, Wu J, Xu X, et al (2014) Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev* 66:2-25.
- Bilge Debeleç-Bütüner, Kantarcı G (2006) Mutasyon , DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları ve Kanslerle İlişkisi. *J Fac Pharm, Ankara* 35:149-170.
- Bisso A, Faleschini M, Zampa F, et al (2013) Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer. *Cell Cycle* 12:1679-1687.
- Blanco E, Shen H, Ferrari M (2015) Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* 33:941-951.
- Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, et al (2010) Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev* 36:206-215.
- Boulares a H, Yakovlev AG, Ivanova V, et al (1999) Role of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. *J Biol Chem* 274:22932-22940.
- Bouwman P, Jonkers J (2014) Molecular pathways: How can BRCA-mutated tumors become resistant to PARP inhibitors? *Clin Cancer Res* 20:540-547.
- Brady-west DC, McGrowder DA (2011) Triple negative breast cancer: therapeutic and prognostic implications. *Asian Pac J Cancer Prev* 12:2139-2143.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54:631-651.
- Brioschi A, Zara GP, Calderoni S, et al (2008) Cholesterylbutyrate solid lipid nanoparticles as a butyric acid prodrug. *Molecules* 13:230-254.
- Britta Weigelt & Jorge S. Reis-Filho (2009) Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 6:718-730.
- Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P (2012) Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *Int J Womens Heal* 4:511-520.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913-917.
- Bunjes H (2005) Characterization of Solid Lipid Nano and Microparticles. Editör: Nastruzzi C, *Lipospheres in Drug Targets and Delivery*. CRC Press LLC, Florida, pp 41-66.
- Bunting SF, Callén E, Wong N, et al (2010) 53BP1 inhibits homologous recombination in brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141:243-254.
- Burgess M, Puhalla S (2014) BRCA 1/2-Mutation Related and Sporadic Breast and Ovarian Cancers: More Alike than Different. *Front Oncol* 4:19.
- Caban S, Aytakin E, Sahin A, Capan Y (2014) Nanosystems for drug delivery. *OA Drug Des Deliv* 2:1-7.

- Caldecott KW (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9:619-631.
- Cardnell RJ, Feng Y, Diao L, et al (2013) Proteomic Markers of DNA Repair and PI3K Pathway Activation Predict Response to the PARP Inhibitor BMN 673 in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 19:6322-6328.
- Cardnell RJ, Feng Y, Mukherjee S, et al (2016) Activation of the PI3K/mTOR pathway following PARP inhibition in small cell lung cancer. *PLoS One* 11:1-17.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al (2007) The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 13:2329-2334.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295:2492-502.
- Carey L, Winer E, Viale G, et al (2010) Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* 7:683-692.
- Cavaco MC, Pereira C, Kreutzer B, et al (2017) Evading P-glycoprotein mediated-efflux chemoresistance using Solid Lipid Nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 110:76-84.
- Cetin I, Topcul M (2014) Triple Negative Breast Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15:2427-2431.
- Chacón RD, Costanzo M V (2010) Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 12(2):S3.
- Chan DA, Giaccia AJ (2011) Harnessing synthetic lethal interactions in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 10:351-364.
- Chang PY, Peng SF, Lee CY, et al (2013) Curcumin-loaded nanoparticles induce apoptotic cell death through regulation of the function of MDR1 and reactive oxygen species in cisplatin-resistant CAR human oral cancer cells. *Int J Oncol* 43:1141-1150.
- Chen HH, Huang WC, Chiang WH, et al (2015) Ph-responsive therapeutic solid lipid nanoparticles for reducing P-glycoprotein-mediated drug efflux of multidrug resistant cancer cells. *Int J Nanomedicine* 10:5035-5048. doi: 10.2147/IJN.S86053
- Chen KG, Sikic BI (2012) Molecular pathways: Regulation and therapeutic implications of multidrug resistance. *Clin Cancer Res* 18:1863-1869.
- Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ (2012) Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today* 17:194-202.
- Chen X, Che T (2011) Roles of MicroRNA in DNA Damage and Repair. Editor: Kruman I, DNA Repair. InTech, pp: 341-354.
- Chen Z, Zhang Z, Xie B, Zhang H (2016) Development and evaluation of topotecan loaded solid lipid nanoparticles: A study in cervical cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B Biol* 165:182-188.
- Cheng H, Zhang Z, Borczuk A, et al (2013) PARP inhibition selectively increases sensitivity to cisplatin in ERCC1-low non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis* 34:739-749.
- Chiarugi A (2012) A snapshot of chemoresistance to PARP inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 33:42-48.
- Chimmiri P, Rajalakshmi R, Mahitha B, et al (2012) Solid lipid nanoparticles: A novel carrier for cancer therapy. 3:405-413.
- Chiorean R, Braicu C, Berindan-Neagoe I (2013) Another review on triple negative

- breast cancer. Are we on the right way towards the exit from the labyrinth? *Breast* 22:1026-1033.
- Cho H, Lai TC, Tomoda K, Kwon GS (2015) Polymeric micelles for multi-drug delivery in cancer. *AAPS PharmSciTech* 16:10-20.
- Cho K, Wang X, Nie S, et al (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 14:1310-1316.
- Choi HK, Yang JW, Roh SH, et al (2007) Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 14:293-303.
- Choi SH, Jin S-E, Lee M-K, et al (2008) Novel cationic solid lipid nanoparticles enhanced p53 gene transfer to lung cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm* 68:545-554.
- Choi YE, Meghani K, Brault M-EE, et al (2016) Platinum and PARP Inhibitor Resistance Due to Overexpression of MicroRNA-622 in BRCA1-Mutant Ovarian Cancer. *Cell Rep* 14:429-439.
- Choi YE, Pan Y, Park E, et al (2014) MicroRNAs down-regulate homologous recombination in the G1 phase of cycling cells to maintain genomic stability. *Elife* 2014:1-21.
- Cleere DW (2010) Triple-negative breast cancer: a clinical update. *Community Oncol* 7:203-211.
- Colabufo NA, Pagliarulo V, Berardi F, et al (2008) Bicalutamide failure in prostate cancer treatment: Involvement of Multi Drug Resistance proteins. *Eur J Pharmacol* 601:38-42.
- Collignon J, Lousberg L, Schroeder H JG (2016) Triple-negative breast cancer : treatment challenges and solutions. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 8: 93-107.
- Conde J, de la Fuente JM, Baptista PV (2013) Nanomaterials for reversion of multidrug resistance in cancer: a new hope for an old idea? Editor: Nobili S, Mini E, Riganti C, Multidrug resistance in cancer: Pharmacological strategies from basic research to clinical issues, *Frontiers in Oncology*, pp: 74-77.
- Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RDS, et al (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85:1083-1099.
- Creixell M, Peppas NA (2012) Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance. *Nano Today* 7:367-379.
- Crowley LC, Christensen ME, Waterhouse NJ (2016) Measuring survival of adherent cells with the colony-forming Assay. 721-725.
- Crown J, O'Shaughnessy J, Gullo G (2012) Emerging targeted therapies in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 23(6): 56-65.
- Crucho CIC, Anselmo AC, Mitragotri S (2015) Nanoparticles in the Clinic. *ChemMedChem* 55:24-38.
- Curtis C, Shah SP, Chin S, Turashvili G (2012) Europe PMC Funders Group The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486:346-352.
- Dai X, Chen A, Bai Z (2014) Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. *Sci Rep* 4:6566.
- Dai X, Li T, Bai Z, et al (2015) Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 5:2929-2943.

- Danhier F, Pr at V (2015) Strategies to improve the EPR effect for the delivery of anti-cancer nanomedicines. *Cancer Cell & Microenvironment*, 2(3): 1–7.
- De Bono JS., Mina LA, Gonzalez M et al (2013) First-in-human trial of novel oral PARP inhibitor BMN 673 in patients with solid tumors. In: ASCO. p Abstract No: 2580.
- De Giorgi U, Rosti G, Frassinetti L, et al (2007) High-dose chemotherapy for triple negative breast cancer. *Ann Oncol* 18: 202-213.
- De Lorenzo SB, Patel AG, Hurley RM, Kaufmann SH (2013) The elephant and the blind men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells. *Front Oncol* 3:228.
- Dean M (2002) The Human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily introduction to ABC protein and gene organization. National Center for Biotechnology Information, Bethesda.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The Human ATP-Binding Cassette transporter superfamily. *J Lipid Res* 42:1007-1017.
- De Summa S, Pinto R, Sambiasi D, et al (2013) BRCAness: A deeper insight into basal-like breast tumors. *Ann Oncol.* 24(8): 813-821.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al (2007) Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13:4429-4434.
- Dever SM, Golding SE, Rosenberg E, et al (2011) Mutations in the BRCT binding site of BRCA1 result in hyperrecombination. *Aging (Albany NY)* 3:515-532.
- Dexheimer TS (2013) DNA Repair Pathways and Mechanisms. Editor: Lesley A Mathews, Stephanie M Cabarcas EMH, DNA Repair of Cancer Stem Cells. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 19-32.
- Dikmen G, Guney G, Genc L (2015) Characterization of Solid Lipid Nanoparticles Containing Caffeic Acid and Determination of its Effects on MCF-7 Cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 10:224-232.
- Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W (2008) Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics Chromatin* 1:9.
- Dineshkumar B, Krishnakumar K, Bhatt AR, et al (2012) Current research in drug targeting solid lipid nanoparticles: Investigation in cancer cell lines - A Review. 2:1-3.
- Dolatabadi JEN, Valizadeh H, Hamishehkar H (2015) Solid lipid nanoparticles as efficient drug and gene delivery systems: Recent breakthroughs. *Adv Pharm Bull* 5:151-159.
- Dong X (2009) Lipid-based paclitaxel and doxorubicin nanoparticles to overcome P-Gp-mediated drug resistance in solid tumors.
- Dong X, Mattingly CA, Tseng MT, et al (2009) Doxorubicin and Paclitaxel-Loaded Lipid-Based Nanoparticles Overcome Multidrug Resistance by Inhibiting P-Glycoprotein and Depleting ATP. *Cancer Res* 69:3918-3926.
- Dong Z, Ren L, Lin L, et al (2015) Effect of microRNA-21 on multidrug resistance reversal in A549/DDP human lung cancer cells. *Mol Med Rep* 11:682-690.
- Donzelli S, Mori F, Biagioni F, et al (2014) MicroRNAs: short non-coding players in cancer chemoresistance. *Mol Cell Ther* 2(1): 16.
- Drew Y, Ledermann J, Hall G, et al (2016) Phase 2 multicentre trial investigating intermittent and continuous dosing schedules of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib in germline BRCA mutation carriers with advanced ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 114:723-730.

- Du F, Wu X, Liu Y, et al (2013) Acquisition of paclitaxel resistance via PI3K-dependent epithelial-mesenchymal transition in A2780 human ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 30:1113-1118.
- Duffy MJ, McGowan PM, Crown J (2012) Targeted therapy for triple-negative breast cancer: Where are we? *Int J Cancer* 131:2471-2477.
- Dufour R, Daumar P, Mounetou E, et al (2015) BCRP and P-gp relay overexpression in triple negative basal-like breast cancer cell line: A prospective role in resistance to Olaparib. *Sci Rep* 5:12670.
- Durmus S, Sparidans RW, Van Esch A, et al (2015) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1) restrict oral availability and brain accumulation of the PARP inhibitor rucaparib (AG-014699). *Pharm Res* 32:37-46.
- Eatemadi A, Daraee H, Karimkhanloo H, et al (2014) Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Res Lett* 9:1-13.
- Edwards SL, Brough R, Lord CJ, et al (2008) Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* 451:1111-1115.
- Eliyatkin N, Yalcin E, Zengel B, et al (2015) Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Heal* 11:59-66.
- Elsamany S, Abdullah S (2014) Triple-negative breast cancer: future prospects in diagnosis and management. *Med Oncol* 31(2): 1-7.
- Engebraaten O, Vollan HKM, Børresen-Dale A-L (2013) Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. *Am J Pathol* 183:1064-1074.
- Engert F, Kovac M, Baumhoer D, et al (2014) Osteosarcoma cells with genetic signatures of BRCAness are susceptible to the PARP inhibitor talazoparib alone or in combination with chemotherapeutics. *Oncotarget* 5.
- Erenpreisa J, Cragg MS (2001) Mitotic death: A mechanism of survival? A review. *Cancer Cell Int* 1(1):1.
- Eskiler GG, Cecener G, Dikmen G, et al (2016) The effect of solid lipid nanoparticles on tamoxifen - resistant breast cancer. *Int J Pharm Pharm Sci* 8(2):43-46.
- Estanqueiro M, Amaral MH, Conceição J, Sousa Lobo JM (2015) Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 126:631-648.
- Fan C, Oh DS, Wessels L, et al (2006) Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 355:560-569.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434:917-921.
- Feller N, Broxterman HJ, Währer DCR, Pinedo HM (1995) ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Lett* 368:385-388.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359–E386.
- Feynman RP (1960) There's (still) plenty of room at the bottom. *Appl. Therm. Eng.* 61.
- Fojo T, Bates S (2013) Mechanisms of resistance to PARP inhibitors-three and counting. *Cancer Discov* 3:20-23.
- Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al (2009) Inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase

- in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361:123-134.
- Fong PC, Yap TA, Boss DS, et al (2010) Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: Frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 28:2512-2519.
- Forster S, Thumser AE, Hood SR, Plant N (2012) Characterization of Rhodamine-123 as a Tracer Dye for Use In In vitro Drug Transport Assays. *PloS one* 7(3): e33253.
- Fortini P, Dogliotti E (2007) Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6:398-409.
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363:1938-1948.
- Fousteri M, Mullenders LHF (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 18:73-84.
- Fridman (2015) Non-thermal plasma with 2-deoxy-D-glucose synergistically induces cell death by targeting glycolysis in blood cancer cells. *Sci Rep* 5:8726.
- Gao W, Lin Z, Chen M, et al (2014) The co-delivery of a low-dose P-glycoprotein inhibitor with doxorubicin sterically stabilized liposomes against breast cancer with low P-glycoprotein expression. *Int J Nanomedicine* 9:3425-3437.
- Garud A, Singh D, Garud N (2012) Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method , Characterization and Applications. *Int Curr Pharm J* 1:384-393.
- Garzon R, Marcucci G, Croce CM (2010) Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 9:775-789.
- Gatza ML, Lucas JE, Barry WT, et al (2010) A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6994-6999.
- Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, et al (2011) Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: A phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol* 12:852-861.
- Gelmon K, Dent R, Mackey JR, et al (2012) Targeting triple-negative breast cancer: Optimising therapeutic outcomes. *Ann Oncol* 23:2223-2234.
- Genç L, Kutlu HM, Güney G (2015) Vitamin B12-loaded solid lipid nanoparticles as a drug carrier in cancer therapy. *Pharmaceutical development and technology* 20(3):337-344.
- Gezke-Moritz M, Moritz M (2016) Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Mater Sci Eng C* 68:982-994.
- Gisel A, Valvano M, El Idrissi IG, et al (2014) MiRNAs for the detection of multidrug resistance: Overview and perspectives. *Molecules* 19:5611-5623.
- Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al (2009) Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol* 20:1913-1927.
- Gnant M, Filipits M, Greil R, et al (2014) Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: Using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol* 25:339-345.
- Gottipati P, Vischioni B, Schultz N, et al (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer Res*

70:5389-5398.

- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gernstein M (2003) Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4(9):117.
- Griffiths CL, Olin JL (2012) Triple Negative Breast Cancer: A Brief Review of its Characteristics and Treatment Options. *J Pharm Pract* 25:319-323.
- Guarneri V, Dieci MV, Conte P (2013) Relapsed triple-negative breast cancer: Challenges and treatment strategies. *Drugs* 73:1257-1265.
- Gucalp A, Traina T a. (2011) Triple-Negative Breast Cancer: Adjuvant Therapeutic Options. *Chemother Res Pract* 2011:1-13.
- Guillot C, Favaudon V, Herceg Z, et al (2014) PARP inhibition and the radiosensitizing effects of the PARP inhibitor ABT-888 in in vitro hepatocellular carcinoma models. *BMC Cancer* 14(1):603.
- Guiu S, Michiels S, André F, et al (2012) Molecular subclasses of breast cancer: How do we define them? The IMPAKT 2012 working group statement. *Ann Oncol* 23:2997-3006.
- Gunes ME, Celik G, Trabulus FD, et al (2012) Analysis of 47 Patients with Triple Negative (ER, PGR, HER2) Breast Cancer. *Istanbul Med J* 13:166-168.
- Gültekin M, Boztaş G (2014) Türkiye kanser istatistikleri. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html>. (31.03.2016)
- Güney G, Kutlu HM, Genç L, et al (2014) Preparation and characterization of ascorbic acid loaded solid lipid nanoparticles and investigation of their apoptotic effects. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 121:270-280.
- Ha K, Fiskus W, Choi DS, et al (2014) Histone deacetylase inhibitor treatment induces “BRCAness” and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* 5:5637-5650.
- Hanawalt PC, Spivak G (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12):958-970.
- Harivardhan Reddy L, Sharma RK, Chuttani K, et al (2005) Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton’s lymphoma tumor bearing mice. *J Control Release* 105:185-198.
- Hartman A-R, Ford JM (2002) BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32:180-184.
- Hartwell LH (1997) Integrating Genetic Approaches into the Discovery of Anticancer Drugs. *Science* (80-) 278:1064-1068.
- Hawkins O, Verma B, Lightfoot S, et al (2011) An HLA-presented fragment of macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target for invasive breast cancer. *J Immunol* 186:6607-6616.
- Hegan DC, Lu Y, Stachelek GC, et al (2010) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase down-regulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2201-2206.
- Helleday T (2011) The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol* 5:387-393.
- Helleday T, Bryant HE, Schultz N (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle* 4:1176-1178.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al (2008) DNA repair pathways as targets for

- cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8:193-204.
- Henneman L, van Miltenburg MH, Michalak EM, et al (2015) Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 112(27): 8409-8414.
- Herriott A, Tudhope SJ, Junge G, et al (2015) PARP1 expression, activity and ex vivo sensitivity to the PARP inhibitor, talazoparib (BMN 673), in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget* 6:43978-43991.
- Hitomi K, Iwai S, Tainer JA (2007) The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst)* 6:410-428.
- Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361:1475-1485.
- Hoffmann F, Cornelius M, Morell J, Fröba M (2006) Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angew Chemie - Int Ed* 45:3216-3251.
- Homolya L, Holló Z, Germann UA, et al (1993) Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* 268:21493-21496.
- Hong R, Ma F, Zhang W, et al (2016) 53BP1 depletion causes PARP inhibitor resistance in ATM-deficient breast cancer cells. *BMC Cancer* 16(1):725.
- Hosford SR, Miller TW (2014) Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4 / 6 , Src , JAK / STAT , PARP , HDAC , and PI3K / AKT / mTOR pathways. *Pharmgenomics Pers Med* 7:203-215.
- Hu C-MJ, Aryal S, Zhang L (2010) Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment. *Ther Deliv* 1:323-334.
- Hu H, Gatti RA (2011) MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *J Mol Cell Biol* 3:151-158.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, et al (2006) The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7(1):96.
- Huang J-W, Wang Y, Dhillon KK, et al (2013) Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Mol Cancer Res* 11:1564-1573.
- Huang J, Wang L, Cong Z, et al (2015) The PARP1 inhibitor BMN 673 exhibits immunoregulatory effects in a *Brcal*^{-/-} murine model of ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 463:551-556.
- Huang Y, Cole S, Cai T, Cai Y (2016) Applications of nanoparticle drug delivery systems for the reversal of multidrug resistance in cancer (Review). *Oncol Lett* 11-15.
- Hudis C a, Gianni L (2011) Triple-negative breast cancer: An unmet medical need. *Oncologist* 16 Suppl 1:1-11.
- Ibrahim YH, García-García C, Serra V, et al (2012) PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression and sensitizes BRCA-proficient triple-negative breast cancer to PARP inhibition. *Cancer Discov* 2:1036-1047.
- Indira, T, Lakshmi P (2010) Magnetic nanoparticles: A Review. *Int J Pharm* 3:1035-1042.
- Irvin WJ, Carey L a. (2008) What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* 44:2799-2805.
- Isakoff S (2010) Triple negative breast cancer: Role of specific chemotherapy agents. *Cancer J* 16:53-61.
- Ismail-khan R, Bui MM (2010) A review of triple-negative breast cancer. *Cancer*

- Control 17:173-176.
- Issaeva N, Thomas HD, Djurenovic T, et al (2010) 6-thioguanine selectively kills BRCA2-defective tumors and overcomes PARP inhibitor resistance. *Cancer Res* 70:6268-6276.
- Jacobs AL, Schär P (2012) DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. *Chromosoma* 121:1-20.
- Jacobsen A, Silber J, Harinath G, et al (2013) Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types. *Nat Struct Mol Biol* 20:1325-1332.
- Jain A, Agarwal A, Majumder S, et al (2010a) Mannosylated solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of an anti-cancer drug. *J Control Release* 148:359-367.
- Jain KK (2009) Drug Delivery Systems - An Overview. Editör: Jain KK, *Methods in Molecular Biology*, 437th edn. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 1-50
- Jain N, Jain R, Thakur N, et al (2010b) Nanotechnology: A safe and effective drug delivery system. *Asian J Pharm Clin Res* 3:159-165.
- Jain R, Rawat A, Verma B, et al (2013) Antitumor activity of a monoclonal antibody targeting major histocompatibility complex class I-Her2 peptide complexes. *J Natl Cancer Inst* 105:202-218.
- Javle M, Curtin NJ (2011) The potential for poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy. *Ther Adv Med Oncol* 3:257-267.
- Jelinic P, Levine D. (2014) New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair. *Mol Cancer Ther* 13:1645-1654.
- Jeong YJ, Kang JS, Lee SI, et al (2016) Breast cancer cells evade paclitaxel-induced cell death by developing resistance to dasatinib. *Oncol Lett* 12:2153-2158.
- Jiao X, Zhao L, Ma M, et al (2013) MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Breast Cancer Res Treat* 139:717-730.
- Johnson N, Johnson SF, Yao W, et al (2013) Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17041-17056.
- Johnson SF, Cruz C, Greifenberg AK, et al (2016) CDK12 inhibition reverses de novo and acquired PARP inhibitor resistance in BRCA wild-type and mutated models of triple-negative breast cancer. *Cell Rep* 17:2367-2381.
- Johnson L V, Walsh ML, Chen B, Buchanan JM (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Froc Natl Acad Sc USA Cell Biol* 77:990-994.
- Jones MC, Leroux JC (1999) Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 48:101-111.
- Jouan E, Vée M Le, Mayati A, et al (2016) Evaluation of P-glycoprotein inhibitory potential using a rhodamine 123 accumulation assay. *8(2):1-13*.
- Judefind A, M. de Villiers M (2009) Drug loading into and in vitro release from nanosized drug delivery systems. Editör: M. de Villiers M, Aramwit P, Kwon GS *Nanotechnology in drug delivery*. Springer, New York, pp 129-162
- Juvekar A, Burga LN, Hu H, et al (2012) Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer. *Cancer Discov* 2:1048-1063.
- Kaelin WG (2005) The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 5:689-98.

- Kakde D, Jain D, Shrivastava V, et al (2011) Cancer therapeutics-opportunities, challenges and advances in drug delivery. *J Appl Pharm Sci* 1:1--0.
- Kang KW, Chun M-K, Kim O, et al (2010) Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. *Nanomedicine* 6:210-213.
- Kanintronkul Y, Worayuthakarn R, Thasana N, et al (2011) Overcoming multidrug resistance in human lung cancer with novel benzo [a] quinolizin-4-ones. *Anticancer research*, 31(3):921-927.
- Kapoor A, Iqbal M, Petropoulos S, et al (2013) Effects of sertraline and fluoxetine on p-glycoprotein at barrier sites: In vivo and in vitro approaches. *PLoS One*. 8(2):e56525.
- Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M (2014) Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol* 5:1--22.
- Kara Z, Ozturk N, Ozturk D, Okyar A (2013) ABC transporters: circadian rhythms and sex-related differences. *J Marmara Univ Inst Heal Sci* 3(1):1-13.
- Karvar S (2014) The role of ABC transporters in anticancer drug transport. *Turkish J Biol* 38:800-805.
- Kassam F, Enright K, Dent R, et al (2009) Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. *Clin Breast Cancer* 9:29-33.
- Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y (2014a) Regulations of P-glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *new J Sci* 2014:1-10.
- Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y (2014b) Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New J Sci* 2014:1-10.
- Kaur T, Slavcev R (2013) Solid lipid nanoparticles: Tuneable anti-cancer gene/drug delivery systems. Editör: Wei M, Good D, *Novel Gene Therapy Approaches*. InTech, pp 53-73
- Kawabe T (2004) G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 3:513--519.
- Kesharwani P, Jain K, Jain NK (2014) Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog Polym Sci* 39:268-307.
- Khurana S, Oberdoerffer P (2015) Replication stress: A lifetime of epigenetic change. *Genes (Basel)* 6:858-877.
- Kim B, Stephen SL, Hanby AM, et al (2015) Chemotherapy induces Notch1-dependent MRP1 up-regulation, inhibition of which sensitizes breast cancer cells to chemotherapy. *BMC Cancer* 15(1):634.
- King MC, Marks JH, Mandell JB, New York Breast Cancer Study G (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science (80-)* 302:643-646.
- Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490:61-70.
- Koppensteiner R, Samartzis EP, Noske A, et al (2014) Effect of MRE11 loss on PARP-inhibitor sensitivity in endometrial cancer In Vitro. *PLoS One* 9(6): e100041.
- Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, et al (2008) Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther* 7:2152-2159.
- Kulaksız G, Sancar A (2007) Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokim Derg* 32:104-111.

- Kuo Y-C, Liang C-T (2011) Inhibition of human brain malignant glioblastoma cells using carmustine-loaded cationic solid lipid nanoparticles with surface anti-epithelial growth factor receptor. *Biomaterials* 32:3340-3350.
- Kurozumi S, Yamaguchi Y, Kurozumi M, et al (2016) Recent trends in microRNA research into breast cancer with particular focus on the associations between microRNAs and intrinsic subtypes. *J Hum Genet* 1–10. doi: 10.1038/jhg.2016.89
- Kurtoğlu EL, Tekedereli İ (2015) DNA Repair Mechanisms. *Balıkesir Heal Sci J* 4:169-177.
- Kutanzi KR, Yurchenko O V., Beland FA, et al (2011) MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics* 2:171-185.
- Kutlu HM, Genc L, Guney G (2013) The Impact of Caffeic Acid Loaded Solid Lipid Nanoparticles on Cancer Treatment. *Curr Nanosci* 9:698-703.
- Kwan BLY, Wai VWK (2016) Autophagy in multidrug-resistant cancers. Editör: *Autophagy in current trends in cellular physiology and pathology*. InTech, pp 435-454.
- Kwon S, Singh RK, Perez RA, et al (2013) Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. *J Tissue Eng* 4:2041731413503357.
- Lahtz C, Pfeifer GP (2011) Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol* 3:51-58.
- Lakhani SR, Reis-filho JS, Fulford L, et al (2005) Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clinical Cancer Research* 11(14):5175-5180.
- Lalge R, Rathi S (2014) Targeted Drug Delivery Using Magnetic Nanoparticles : A Review. *Bombay Tech* 64:78-87.
- Lawlor D, Martin P, Busschots S, et al (2014) PARP inhibitors as p-glycoprotein substrates. *J Pharm Sci* 103:1913-1920.
- Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al (2012) Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* 366:1382-1392.
- Lee M-K, Lim S-J, Kim C-K (2007) Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 28:2137-2146.
- Lee M-Y, Kong WH, Jung HS, Hahn SK (2014) Hyaluronic acid–siRNA conjugates complexed with cationic solid lipid nanoparticles for target specific gene silencing. *RSC Adv* 4(37):19338-19344.
- Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, et al (2016) Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 11:1-22.
- Lehmann BD, Pietenpol JA, Tan AR (2015) Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Subtypes and New Targets for Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 35:e31–e39.
- Lehmann BDB, Bauer JAJ, Chen X, et al (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121:2750-2767.
- Lespine A, Dupuy J, Orłowski S, et al (2006) Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem Biol Interact* 159:169-179.
- Levy-Lahad E, Friedman E (2007) Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer* 96:11-5.
- Li G-M (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18:85-98.

- Li H, Yang BB (2013) Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol Sin* 34:870-879.
- Li R, Xu W, Eun JS, Lee M-K (2011) Combination of Curcumin and paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance. *J Pharm Investig* 41:381-386.
- Li X, Heyer WD (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18:99-113.
- Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2:329-333.
- Liang Z, Wu H, Xia J, et al (2010) Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochem Pharmacol* 79:817-824.
- Lieber MR (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79:181-211.
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al (2008) Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1275-1281.
- Lim SJ, Lee MK, Kim CK (2004) Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *J Control Release* 100:53-61.
- Liu D, Yang Y, Zhao S (2014) Autophagy facilitates the EGFR-TKI acquired resistance of non-small-cell lung cancer cells. *J Formos Med Assoc* 113:141-142.
- Liu F, Jiang N, Xiao Z, et al (2016) Effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibition on sulfur mustard-induced cutaneous injuries *in vitro* and *in vivo*. *PeerJ* 4:e1890.
- Liu FS (2009) Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 48:239-244.
- Liu M, Chen D, Wang C, et al (2015) Intracellular target delivery of 10-hydroxycamptothecin with solid lipid nanoparticles against multidrug resistance. *J Drug Target* 23:800-805.
- Liu X, Shi Y, Maag DX, et al (2012) Iniparib nonselectively modifies cysteine-containing proteins in tumor cells and is not a Bona Fide PARP inhibitor. *Clin Cancer Res* 18:510-523.
- Livraghi L, Garber JE (2015) PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med* 13(1):188.
- Lobovkina T, Jacobson GB, Gonzalez-Gonzalez E, et al (2011) In vivo sustained release of siRNA from solid lipid nanoparticles. *ACS Nano* 5:9977-9983.
- Lobrich M, Jeggo PA (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7:861-869.
- Lord CJ, Ashworth A (2008) Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 8:363-369.
- Lord CJ, Ashworth A (2013) Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. *Nat Med* 19:1381-1388.
- Lord CJ, Tutt ANJ, Ashworth A (2015) Synthetic lethality and cancer therapy: Lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu Rev Med* 66:455-470.
- LoRusso PM, Li J, Burger A, et al (2016) Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor veliparib (ABT-888) in combination with irinotecan in patients with advanced

- solid tumors. *Clin Cancer Res* 22:3227-3237.
- Lovato A, Panasci L, Witcher M (2012) Is there an epigenetic component underlying the resistance of triple-negative breast cancers to parp inhibitors? *Front Pharmacol* 3:202.
- Lu B, Xiong S-B, Yang H, et al (2006) Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *Eur J Pharm Sci* 28:86-95.
- Luo X, Kraus WL (2012) On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly (ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev* 26:417-432.
- Lupo B, Trusolino L (2014) Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: Old and new paradigms revisited. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1846:201-215.
- Luque-Michel E, Imbuluzqueta E, Sebastián V, Blanco-Prieto MJ (2017) Clinical advances of nanocarrier-based cancer therapy and diagnostics. *Expert Opinion on Drug Delivery* 14(1):75-92.
- Ma P, Dong X, Swadley CL, et al (2009) Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia. *J Biomed Nanotechnol* 5:151-161.
- Mäder K, Mehnert W (2005) Solid Lipid Nanoparticles-Concepts, Procedures, and Physicochemical Aspects. Editör: Nastruzzi C, Lipospheres in Drug Targets and Delivery. CRC Press, Florida, pp 1–23
- Malanga M, Althaus FR (2005) The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem Cell Biol* 83:354-364.
- Marquette C, Nabell L (2012) Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 13:263-275.
- Martin HL, Smith L, Tomlinson DC (2014) Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. *Breast cancer (Dove Med Press)* 6:1-13.
- Martins S, Costa-Lima S, Carneiro T, et al (2012) Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int J Pharm* 430:216-227.
- Mateo J, Ong M, Tan DSP, et al (2013) Appraising iniparib, the PARP inhibitor that never was--what must we learn? *Nat Rev Clin Oncol* 10:688-696.
- Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA (2014) New strategies for triple-negative breast cancer-deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res* 20:782-790.
- McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, et al (2014) In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: A practical guide with case studies. *Front Oncol* 4:40.
- Meador J a, Zhao M, Su Y, et al (2008) Histone H2AX is a critical factor for cellular protection against DNA alkylating agents. *Oncogene* 27:5662-5671.
- Mehnert W, Mäder K (2001) Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47:165-196.
- Miao J, Du YZ, Yuan H, et al (2013) Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 110:74-80.
- Michels J, Vitale I, Sapparbaev M, et al (2013) Predictive biomarkers for cancer therapy with PARP inhibitors. *Oncogene* 33:3894-3907.
- Minami C a., Chung DU, Chang HR (2011) Management options in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Basic Clin Res* 5:175-199.

- Minelli R, Occhipinti S, Gigliotti CL, et al (2013) Solid lipid nanoparticles of cholesteryl butyrate inhibit the proliferation of cancer cells in vitro and in vivo models. *Br J Pharmacol* 170:233-244.
- Minelli R, Serpe L, Pettazzoni P, et al (2012) Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit the adhesion and migration of colon cancer cells. *Br J Pharmacol* 166:587-601.
- Mitragotri S, Burke PA, Langer R (2014) Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat Rev Drug Discov* 13:655-672.
- Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, et al (2014) Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. *BMC cancer*, 14(1):1–10.
- Mo R, Jiang T, Di J, et al (2014) Emerging micro- and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery. *Chem Soc Rev* 43:3595-3629.
- Mo W, Liu Q, Lin CC-J, et al (2016) mTOR Inhibitors suppress homologous recombination repair and synergize with PARP inhibitors via regulating SUV39H1 in BRCA-Proficient triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 22:1699-1712.
- Modrich P (2006) Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 281:30305-30309.
- Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al (2013) Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer: Histologic Subtyping to Inform the Outcome. *Clin Breast Cancer* 13:31–39.
- Montoni A, Robu M, Pouliot E, Shah GM (2013) Resistance to PARP-inhibitors in cancer therapy. *Front Pharmacol* 4(18):1-7.
- Morales J, Li L, Fattah FJ, et al (2014) Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 24:15-28.
- Mukherjee S, Ray S, Thakur RS (2009) Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J Pharm Sci* 71:349-358.
- Mulik RS, Mönkkönen J, Juvonen RO, et al (2010) Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: Enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis. *Int J Pharm* 398:190-203.
- Muller RH, Keck CM (2004) Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs - A review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol* 113:151-170.
- Murai J, Feng Y, Yu GK, et al (2016) Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget*. 7(47):76534-76550.
- Murai J, Huang S-YN, Renaud A, et al (2014) Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol Cancer Ther* 13:433-443.
- Murata S, Zhang C, Finch N, et al (2016) Predictors and Modulators of Synthetic Lethality: An Update on PARP Inhibitors and Personalized Medicine. *Biomed Res Int*. 1-12.
- Mussi SV, Silva RC, Oliveira MC De, et al (2013) New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 48:282-290.
- Müller, RH, Mehnert, W, Lucks JS, Ruhl D (1995) Solid lipid nanoparticles (SLN) –

- an Alternative Colloidal Carrier System for Controlled Drug Delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 41:62-69.
- Müller RH, Karsten M, Gohla S (2000) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 50:161-177.
- Naguib YW, Rodriguez BL, Li X, et al (2014) Solid lipid nanoparticle formulations of docetaxel prepared with high melting point triglycerides: In vitro and in vivo evaluation. *Mol Pharm* 11:1239-1249.
- Naipal KAT, van Gent DC (2015) PARP inhibitors: the journey from research hypothesis to clinical approval. *Per Med* 12:139-154.
- Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, Nagasawa S (2015) NF- κ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition. *Oncotarget* 6:3825-3839.
- Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P (2015) Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Adv Pharm Bull* 5:305-313.
- Neijenhuis S, Bajrami I, Miller R, et al (2013) Identification of miRNA modulators to PARP inhibitor response. *DNA Repair (Amst)* 12:394-402.
- Nekkanti V, Vabalaboina V, Pillai R (2012) Drug Nanoparticles-An Overview. Editör: Hashim AA, *The Delivery of Nanoparticles*. InTech, pp: 111–132
- Ngwuluka NC, Kotak DJ, Devarajan P V (2016) Design and Characterization of Metformin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Colon Cancer. *AAPS PharmSciTech* 53:1-11.
- Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q (2010) Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab* 11:603-617.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5367-5374.
- Numanoglu U, Tarımcı N (2006) Katı lipid nanopartiküllerin (SLNTM) özellikleri, farmasötik ve kozmetik alandaki uygulamaları. *J Fac Pharm* 35:211-235.
- Nursal AF (2015) Triple Negatif Meme Kanserinin Moleküler Temeli. *Arşiv Kaynak Tarama Derg* 24:251-259.
- O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, et al (2015) The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin* 3:257-275.
- O'Shaughnessy CMA and J (2010) PARP as a novel therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 16:4517-4526.
- O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al (2011) Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 364:205-214.
- Ojea-Jiménez I, Tort O, Lorenzo J, Puentes VF (2012) Engineered nonviral nanocarriers for intracellular gene delivery applications. *Biomed Mater* 75(5):4106.
- Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F (2009) DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klin Biyokim Derg* 7:61-70.
- Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, et al (2012) Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle* 11:3837-3850.
- OS K, YV R, Kumar P, R K (2016) Nano drug delivery systems to overcome cancer drug resistance - A review. *J Nanomed Nanotechnol* 7:1-9.
- Ozmen V (2008) Breast cancer in the World and Turkey. *J Breast Heal* 4:7-12.
- Öz Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D (2011) Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim Derg* 2:184-194.

- Pal SK, Mortimer J (2009) Triple-negative breast cancer: Novel therapies and new directions. *Maturitas* 63:269-274.
- Palmeira a., Sousa E, H. Vasconcelos M, M. Pinto M (2012) Three decades of P-gp inhibitors: Skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem* 19:1946-2025.
- Pan Y, Morris ME, Yu A (2009) MicroRNA-328 Negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP / ABCG2) in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 75:1374-1379.
- Parhi R, Suresh P (2010) Production of Solid lipid nanoparticles-drug loading and release mechanism. *J Chem Pharm Res* 2:211-227.
- Parhi R, Suresh P (2012) preparation and characterization of solid lipid nanoparticles- A Review. *Curr Drug Discov Technol* 9:2-16.
- Park K (2014) Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J Control Release* 190:3-8.
- Pasquier J, Rioult D, Abu-Kaoud N, et al (2013) P-glycoprotein-activity measurements in multidrug resistant cell lines: Single-cell versus single-well population fluorescence methods. *Biomed Res Int*.
- Patel AG, Sarkaria JN, Kaufmann SH (2011) Nonhomologous end joining drives poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous. *Pnas* 108:3406-3411.
- Patel MN, Lakkadwala S, Majrad MS, et al (2014) Characterization and evaluation of 5-fluorouracil-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification technique. *AAPS PharmSciTech* 15:1498-1508.
- Payne SH (2015) The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci* 40:1-3.
- Peira E, Chirio D, Battaglia L, et al (2016) Solid lipid nanoparticles carrying lipophilic derivatives of doxorubicin: preparation, characterization, and *in vitro* cytotoxicity studies. *J Microencapsul* 33:381-390.
- Peltomaki P (2001) Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 10:735-740.
- Perche F, Torchilin VP (2013) Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *J Drug Deliv* 2013.
- Perou CM (2011) Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 16 Suppl 1:61-70.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752.
- Peshkin BN, Alabek ML, Isaacs C (2011) BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Dis* 32:25-33.
- Petrucci, Nancie, Mary B. Daly and GLF (2013) BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer. Editor: Roberta A Pagon, Margaret P Adam, Holly H Ardinger, Stephanie E Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D Bird, Chin-To Fong, Heather C Mefford, Richard JH Smith and KS GeneReviews(®). University of Washington, Seattle.
- Piao L, Zhang M, Datta J, et al (2012) Lipid-based Nanoparticle Delivery of Pre-miR-107 Inhibits the Tumorigenicity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol Ther* 20:1261-1269.
- Pierce A, McGowan PM, Cotter M, et al (2013) Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative

- breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther* 14:537-545.
- Piktel E, Niemirowicz K, Wątek M, et al (2016) Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 14(1):39.
- Plummer R (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new direction for BRCA and triple-negative breast cancer? *Breast Cancer Res* 13(4):218.
- Podo F, Buydens LMC, Degani H, et al (2010) Triple-negative breast cancer: Present challenges and new perspectives. *Mol Oncol* 4:209-229.
- Postel-Vinay S, Bajrami I, Friboulet L, et al (2013) A high-throughput screen identifies PARP1/2 inhibitors as a potential therapy for ERCC1-deficient non-small cell lung cancer. *Oncogene* 32:5377-5387.
- Postel-Vinay S, Vanhecke E, Olaussen K a., et al (2012) The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 9:144-155.
- Prasad P, Shuhendler A, Cai P, et al (2013) Doxorubicin and mitomycin C co-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles inhibit growth of sensitive and multidrug resistant human mammary tumor xenografts. *Cancer Lett* 334:263-273.
- Prat A, Adamo B, Cheang MCU, et al (2013) Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 18:123-133.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, et al (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research*, 12(5), R68.
- Qiu H (2014) Proteomic Markers of DNA repair and PI3K pathway activation predict response to the PARP inhibitor BMN 673 in small cell lung cancer Letter. *Clin Cancer Res* 20:2236-2236.
- Qureshi SR, Sahni YP, Singh SK, et al (2011) Nanotechnology based drug delivery system. *J Pharm Res Opin* 1:6-161.
- Radu G, Ȃ GT, Penu R, Litescu SC (2012) Use of the fourier transform infrared spectroscopy in characterization of specific samples. *UPB Scientific Bulletin B: Chemical and Materials Science*, 74(4), 137-148
- Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, et al (2011) Clonogenic Assay: Adherent Cells. *J Vis Exp* 15-17.
- Ratanaphan A (2012) A DNA repair BRCA1 estrogen receptor and targeted therapy in breast cancer. *Int J Mol Sci* 13:14898-14916.
- Raza U, Zhang JD, Şahin Ö (2014) MicroRNAs: Master regulators of drug resistance, stemness, and metastasis. *J Mol Med* 92:321-336.
- Redon CE, Nakamura AJ, Zhang YW, et al (2010) Histone H2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clin Cancer Res* 16:4532-4542.
- Rehman FL, Lord CJ, Ashworth A (2012) The promise of combining inhibition of PI3K and PARP as cancer therapy. *Cancer Discov* 2:982-984.
- Rehman FL, Lord CJ, Ashworth A (2010) Synthetic lethal approaches to breast cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 7:718-724.
- Rein ID, Landsverk KS, Micci F, et al (2015) Replication-induced DNA damage after PARP inhibition causes G2 delay, and cell line-dependent apoptosis, necrosis and multinucleation. *Cell Cycle* 14:3248-3260.
- Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB (2013) Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *Am J Pathol* 183:1113-1124.

- Robson ME, Chappuis PO, Satagopan J, et al (2004) A combined analysis of outcome following breast cancer: differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status and administration of adjuvant treatment. *Breast Cancer Res* 6:8–17.
- Rodler ET, Kurland BF, Griffin M, et al (2016) Phase I study of veliparib (ABT-888) combined with cisplatin and vinorelbine in advanced triple-negative breast cancer and/or BRCA mutation-associated breast cancer. *Clin Cancer Res* 22:2855-2864.
- Rodriguez JA, Au WWY, Henderson BR (2004) Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Exp Cell Res* 293:14-21.
- Rodríguez MI, Majuelos-Melguizo J, Martí Martín-Consuegra JM, et al (2015) Deciphering the insights of Poly(ADP-Ribosylation) in tumor progression. *Med Res Rev* 35:678-697.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al (1998) Double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on Serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868.
- Rossetto D, Truman AW, Kron SJ, Cote J (2010) Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin Cancer Res* 16:4543-4552.
- Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, et al (2008) High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci* 105:17079-17084.
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al (2005) Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11:5678-5685.
- Rukov JL, Shomron N (2011) MicroRNA pharmacogenomics: Post-transcriptional regulation of drug response. *Trends Mol Med* 17:412-423.
- Sabatier R, Finetti P, Guille A, et al (2014) Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer* 13(1):228.
- Safari J, Zarnegar Z (2014) Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *J Saudi Chem Soc* 18:85-99.
- Sağlık Bakanlığı TC (2014) Sağlık İstatistikleri Yıllığı.
- Sahoo SK, Jain TK, Reddy MK, Labhasetwar V (2008) Nano-Sized Carriers for Drug Delivery. Editör: Ode S, Levy I, *NanoBioTechnology: BioInspired Devices and Materials of the Future*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp: 329–348
- Sakai W, Swisher EM, Jacquemont C, et al (2009) Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma. *Cancer Res* 69:6381-6386.
- Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, et al (2008) Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* 451:1116-1120.
- Salomon JJ, Ehrhardt C (2011) Nanoparticles attenuate P-glycoprotein/MDR1 function in A549 human alveolar epithelial cells. *Eur J Pharm Biopharm* 77:392-397
- Sanap G (2014) A Review: Solid lipid nanoparticle a potential drug delivery carrier. *Int J Chem Pharm Anal* 1:52-62.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39-85.
- Sandhu SK, Schelman WR, Wilding G, et al (2013) The poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor niraparib (MK4827) in BRCA mutation carriers and patients with

- sporadic cancer: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 14:882-892.
- Santana-Davila R, Perez EA (2010) Treatment options for patients with triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol* 3(1):42.
- Sarker M, Fraser RE, Lumsden MD, et al (2015) Characterization of variant soft nanoparticle structure and morphology in solution by NMR spectroscopy. *J Phys Chem C* 119:7461-7471.
- Schmadeka R, Harmon BE, Singh M (2014) Triple-negative breast carcinoma: Current and emerging concepts. *Am J Clin Pathol* 141:462-477.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, et al (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337-342.
- Sedukhina AS, Sundaramoorthy E, Hara M, et al (2015) Beyond resistance to PARP inhibition: Mechanisms and effective treatment options. *Cancer Cell Microenviron* 31:14-17
- Sempere L, Graveel C, Calderone H, et al (2015) Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast Cancer Targets Ther* 7:59-79.
- Seo J, Kim SC, Lee HS, et al (2012) Genome-wide profiles of H2AX and γ -H2AX differentiate endogenous and exogenous DNA damage hotspots in human cells. *Nucleic Acids Res* 40:5965-5974.
- Serpe L, Catalano MG, Cavalli R, et al (2004) Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur J Pharm Biopharm* 58:673-680.
- Serpico D, Molino L, Di Cosimo S (2014) MicroRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer Treat Rev* 40:595-604.
- Shaji J, Jain V (2010) Solid lipid nanoparticles : A novel carrier for chemotherapy. *Int J Pharm Pharm Sci* 2:8-17.
- Sharma S, Singh A (2011) Nanotechnology Based Targeted Drug Delivery: Current Status and Future Prospects for Drug Development. Editör: Kapetanović I. *Drug Discovery and Development - Present and Future*. InTech
- Sharp A, Harper-wynne C (2014) Treatment of advanced breast cancer (ABC): The expanding landscape of targeted therapies. *J cancer Biol Res* 2:1-5.
- Shastri M, Yardley DA (2013) Updates in the treatment of basal/triple-negative breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 25:40-48.
- Shen Y, Chu Y, Yang Y, Wang Z (2012) Mitochondrial localization of P-glycoprotein in the human breast cancer cell line MCF-7/ADM and its functional characterization. *Oncol Rep* 27:1535-1540.
- Shen Y, Rehman FL, Feng Y, et al (2013) BMN 673, a Novel and Highly Potent PARP1/2 Inhibitor for the Treatment of Human Cancers with DNA Repair Deficiency. *Clin Cancer Res* 19:5003-5015.
- Shi S, Han L, Deng L, et al (2014) Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression. *J Control Release* 194:228-237.
- Shi SJ, Zhong ZR, Liu J, et al (2012) Solid lipid nanoparticles loaded with anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) for suppression of microRNA-21 functions in human lung cancer cells. *Pharm Res* 29:97-109.
- Shuck SC, Short EA, Turchi JJ (2008) Eukaryotic nucleotide excision repair, from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell* 18:64-72.
- Siddiqui A, Gupta V, Liu YY, Nazzal S (2012) Doxorubicin and MBO-asGCS

- oligonucleotide loaded lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in adriamycin resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR-RES). *Int J Pharm* 431:222-229.
- Siddiqui A, Patwardhan GA, Liu Y-Y, Nazzal S (2010) Mixed backbone antisense glucosylceramide synthase oligonucleotide (MBO-asGCS) loaded solid lipid nanoparticles: In vitro characterization and reversal of multidrug resistance in NCI/ADR-RES cells. *Int J Pharm* 400:251-259.
- Silva J, Fernandes AR, Baptista P V (2014) Application of Nanotechnology in Drug Delivery. Editör: Sezer AD. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech, pp: 14–17.
- Singh MS, Lamprecht A (2015) Cargoning P-gp inhibitors via nanoparticle sensitizes tumor cells against doxorubicin. *Int J Pharm* 478:745-752.
- Singh R, W. LJ (2009) Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86:215-223.
- Singh S, Pandey VK, Tewari RP, Agarwal V (2011) Nanoparticle based drug delivery system : Advantages and applications. *Indian J Sci Technol* 4:177-180.
- Singhal GB, Patel RP, Prajapati BG, Patel NA (2011) Solid lipid nanoparticles and nanolipid carriers: As novel solid lipid based drug carrier. *Int Res J Pharm* 2:40-52.
- Sinha G (2014) Downfall of iniparib: a PARP inhibitor that doesn't inhibit PARP after all. *J Natl Cancer Inst* 106:1-2.
- Smith MA, Hampton OA, Reynolds CP, et al (2015a) Initial testing (stage 1) of the PARP inhibitor BMN 673 by the pediatric preclinical testing program: PALB2 mutation predicts exceptional in vivo response to BMN 673. *Pediatr Blood Cancer* 62:91-98.
- Smith MA, Reynolds CP, Kang MH, et al (2015b) Synergistic activity of PARP inhibition by Talazoparib (BMN 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program. *Clin Cancer Res* 21:819-832.
- Solazzo M, Fantappiè O, Lasagna N, et al (2006) P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Exp Cell Res* 312:4070-4078.
- Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim H a., Piccart M (2014a) An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 12:27-41.
- Sonnenblick A, Fumagalli D, Sotiriou C, Piccart M (2014b) Is the differentiation into molecular subtypes of breast cancer important for staging, local and systemic therapy, and follow up? *Cancer Treat Rev* 40:1089-1095.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869-10874.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8418-8423.
- Sotiriou C, Neo S-Y-Y, McShane LM, et al (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10393-10398.
- Souto EB, Müller RH (2007) Lipid Nanoparticles(Solid Lipid Nanoparticles and Nano Structured Lipid Carriers) for Cosmetic, Dermal and Transdermal Applications. Editör: Thassu D, Pathak Y, Deleers M. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*.

- Informa Healthcare USA, Inc. New York, New York, pp: 213–234
- Souza LG, Silva EJ, Martins ALL, et al (2011) Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. *Eur J Pharm Biopharm* 79:189-196.
- Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ (2013) Genetic Susceptibility to Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 73:2025-2030.
- Ström CE, Johansson F, Uhlén M, et al (2011) Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res* 39:3166-3175.
- Subedi RK, Kang KW, Choi H-K (2009) Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. *Eur J Pharm Sci* 37:508-513.
- Sugasawa K (2010) Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 685:29-37.
- Sui X, Chen R, Wang Z, et al (2013) Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 4(10):e838.
- Sun J, Bi C, Chan HM, et al (2013) Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 111:367-375.
- Sutradhar KB, Amin ML (2014) Nanotechnology in cancer drug delivery and selective targeting. *ISRN Nanotechnol* 2014:1-12.
- Svilenov H, Tzachev C (2014) Solid Lipid Nanoparticles – A Promising Drug Delivery System. Editör: Seifalian A, de Mel A, Kalaskar DM. *Nanomedicine*. One Central Press, pp: 187–237.
- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, et al (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:219-234.
- Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T (2015) The roles of microRNAs in breast cancer. *Cancers (Basel)* 7:598-616.
- Tataurova YN (2014) Proton NMR studies of functionalized nanoparticles in aqueous environments.
- Taurin S, Nehoff H, van Aswegen T, Greish K (2013) Tumor Vasculature, EPR Effect, and Anticancer Nanomedicine: Connecting the Dots. Editör: Bae YH, Mrsny RJ, Park K. *Cancer Targeted Drug Delivery*. Springer New York, New York, pp: 207-239.
- Teskač K, Kristl J (2010) The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm* 390:61-69.
- Tessitore A, Ciccirelli G, Vecchio F Del, et al (2014) MicroRNAs in the DNA damage/repair network and cancer. *International journal of genomics*.
- Thassu D, Pathak Y, Deleers M (2007) Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview. Editör: Thassu D, Pathak Y, Deleers M. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. Informa Healthcare USA, Inc. New York, pp: 1–32
- To KKW (2013) MicroRNA: a prognostic biomarker and a possible druggable target for circumventing multidrug resistance in cancer chemotherapy. *J Biomed Sci* 20:99.
- Tok F, KocyigitKaymakcioglu B (2015) A New Approach in Cancer Treatment: Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitors. *J Marmara Univ Inst Heal Sci* 1:1.
- Tomao F, Papa A, Zaccarelli E, et al (2015) Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *Onco Targets Ther* 8:177-193.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J*

Clin 65:87-108.

- Tran TH, Choi JY, Ramasamy T, et al (2014) Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostat to CD44 overexpressing cancer cells. *Carbohydr Polym* 114:407-415.
- Tripathy S, Das MK (2013) Dendrimers and their applications as novel drug delivery carriers. *J Appl Pharm Sci* 3:142-149.
- Turinetto V, Giachino C (2015) Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 43:2489-498.
- Turner NC, Ashworth A (2011) Biomarkers of PARP inhibitor sensitivity. *Breast Cancer Res Treat* 127:283-286.
- Tutt A, Robson M, Garber JE, et al (2010) Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 376:235-244.
- Tzakos AG, Briasoulis E, Thalhammer T, et al (2013) Novel oncology therapeutics: targeted drug delivery for cancer. *J Drug Deliv*.
- Ullal A V., Reiner T, Yang KS, et al (2011) Nanoparticle-mediated measurement of target-drug binding in cancer cells. *ACS Nano* 5:9216-9224.
- Üner M, Yener G (2007) Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspective. *Int J Nanomedicine* 2:289-300.
- Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon A-L, et al (2016) ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Imaging drug resistance with radiolabeled molecules. Br J Cancer* 115:431-441.
- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196-206.
- Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 3:281-290.
- Velic D, Couturier A, Ferreira M, et al (2015) DNA damage signalling and repair inhibitors: The long-sought-after achilles' heel of cancer. *Biomolecules* 5:3204-3259.
- Velingkar V, Dandekar V (2010) Modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance (MDR) in cancer using chemosensitizer. *Int J Pharma Sci Res* 1:104-111.
- Vici P, Pizzuti L, Natoli C, et al (2015) Triple positive breast cancer: A distinct subtype? *Cancer Treat Rev* 41:69-76.
- Videira M, Almeida AJ, Fabra ngels (2012) Preclinical evaluation of a pulmonary delivered paclitaxel-loaded lipid nanocarrier antitumor effect. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 8:1208-1215.
- Visconti R, Della Monica R, Grieco D (2016) Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *J Exp Clin Cancer Res* 35(1):153.
- Volinia S, Galasso M, Sana ME, et al (2012) Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:3024-3029.
- Wan G, Mathur R, Hu X, et al (2011) miRNA response to DNA damage. *Trends Biochem Sci* 36:478-484.
- Wang B, Chu D, Feng Y, et al (2016a) Discovery and Characterization of (8 S ,9 R)-5-Fluoro-8-(4-fluorophenyl)-9-(1-methyl-1 H -1,2,4-triazol-5-yl)-2,7,8,9-

- tetrahydro-3 H -pyrido[4,3,2-de]phthalazin-3-one (BMN 673, Talazoparib), a Novel, highly potent, and orally efficacious Poly(ADP-ribose). *J Med Chem* 59:335-357.
- Wang J, Wu GS (2014) Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 289:17163-17173.
- Wang J, Zhu R, Sun X, et al (2014) Intracellular uptake of etoposide-loaded solid lipid nanoparticles induces an enhancing inhibitory effect on gastric cancer through mitochondria-mediated apoptosis pathway. *Int J Nanomedicine* 9:3987-3998.
- Wang P, Zhang L, Peng H, et al (2013) The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33:4802-4808.
- Wang S, Chen T, Chen R, et al (2012) Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies. *Int J Pharm* 430:238-246.
- Wang X, Weaver DT (2011) The ups and downs of DNA repair biomarkers for PARP inhibitor therapies. *Am J Cancer Res* 1:301-327.
- Wang Y, Krais JJ, Bernhardt AJ, et al (2016b) RING domain-deficient BRCA1 promotes PARP inhibitor and platinum resistance. *J Clin Invest* 126:3145-3157.
- Weaver AN, Yang ES (2013) Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front Oncol* 3:1-11.
- Webb M, Raphael CL, Asbahr H, et al (1996) The detection of rhodamine 123 efflux at low levels of drug resistance. *Br J Cancer* 93:650-655.
- Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS (2010) Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol Oncol* 4:192-208.
- Weigelt B, Reis-Filho JS (2010) Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Res* 12(4):S5.
- Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, et al (2010) The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM -deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* 116:4578-4587.
- Wilczewska A, Niemirowicz K, Markiewicz K, Car H (2012) Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Reports* 64:1864-1882.
- Wind NS, Holen I (2011) Multidrug Resistance in Breast Cancer: From *In Vitro* Models to Clinical Studies. *Int J Breast Cancer* 2011:1-12.
- Wolfgang M, Mäder K (2001) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Del Rev* 47:165-196.
- Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Wu XY (2006) Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. *J Control Release* 116:275-284.
- Wu J, Lu LY, Yu X (2010) The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell* 1:117-123.
- Xin Y, Huang Q, Tang J-Q, et al (2016) Nanoscale drug delivery for targeted chemotherapy. *Cancer Lett.* 379(1), 24-31.
- Xu Q, Zhu T, Yi C, Shen Q (2015) Characterization and evaluation of metformin-loaded solid lipid nanoparticles for cellular and mitochondrial uptake. *Drug Dev Ind Pharm* 0:1-6.
- Xu Z, Chen L, Gu W, et al (2009) The performance of docetaxel-loaded solid lipid

- nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. *Biomaterials* 30:226-232.
- Yadav A, Ghune M, Jain DK (2011) Nano-medicine based drug delivery system. *J Adv Pharm Educ Res* 1:201–213.
- Yadav BS, Chanana P, Jhamb S (2015) Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol* 6:252-263.
- Yadav BS, Sharma SC, Chanana P, Jhamb S (2014) Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J Clin Oncol* 5:125-133.
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA (2011) The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 10:1533-1541.
- Yelamos J, Farres J, Llacuna L, et al (2011) PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development. *Am J Cancer Res* 1:328-346.
- Yhee JY, Son S, Son S, et al (2013) The EPR Effect in Cancer Therapy. Editör: Bae YH, Mrsny RJ, Park K. *Cancer Targeted Drug Delivery*. Springer New York, New York, pp: 621-632.
- Yin H, Liao L, Fang J (2014) Enhanced permeability and retention (EPR) effect based tumor targeting : the concept , application and prospect. *JSM Clin Oncol Res* 2:1-5.
- Ying B, Campbell RB (2014) Delivery of kinesin spindle protein targeting siRNA in solid lipid nanoparticles to cellular models of tumor vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* 446:441-447.
- Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR (2016) Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy : What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacological Reviews*, 68(3): 701-787.
- Yokoyama M (2011) Clinical Applications of polymeric micelle carrier systems in chemotherapy and image diagnosis of solid tumors. *J Exp Clin Med* 3:151-158.
- Yoshida K, Miki Y (2004) Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95:866-871.
- Yu YH, Kim E, Park DE, et al (2012) Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *Eur J Pharm Biopharm* 80:268-273.
- Yuan H, Miao J, Du YZ, et al (2008) Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *Int J Pharm* 348:137-145.
- Yuan Q, Han J, Cong W, et al (2014) Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles suppress breast cancer cells growth with reduced myelosuppression toxicity. *Int J Nanomedicine* 9:4829-4846.
- Yurgel VC, Oliveira CP, Begnini KR, et al (2014) Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. *Int J Nanomedicine* 9:1583-1591.
- Zahr AS, Pishko M V (2009) *Nanotechnology for Cancer Chemotherapy*. Editör: M. de Villiers M, Aramwit P, Kwon GS. *Nanotechnology in Drug Delivery*. Springer, New York, pp: 491–518.
- Zaremba T, Curtin NJ (2007) PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. *Anticancer Agents Med Chem* 7:515-523.
- Zhang B, Yan B (2010) Analytical strategies for characterizing the surface chemistry of nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* 396:973-982.
- Zhao BX, Wang J, Song B, et al (2015) Establishment and biological characteristics of acquired gefitinib resistance in cell line NCI-H1975/gefitinib-resistant with epidermal growth factor receptor T790M mutation. *Mol Med Rep* 11:2767-2774.

Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L (2010) Role of microRNA in anticancer drug resistance. *Int J Cancer* 126:2-10.



7. SİMGELER VE KISALTMALAR

5-dRP	: 5-deoksiriboz fosfat
AP	: Apürinik/Apirimidinik
APE1	: Apurinik/Apirimidinik Endonükleaz 1
AR	: Androjen Reseptörü
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCRP	: Meme kanseri direnç proteini
BER	: Baz Ekzisyon Onarımı
BL1	: Bazal-Benzeri 1
BMN-673	: Talozoparib
BR2	: Bazal Benzeri 2
BRCA	: Meme Kanseri Geni
CS	: Cockayne sendromu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA-PKC	: DNA Bağımlı Protein Kinaz
DSB	: Çift Zincir Kırıkları
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ER	: Östrojen Reseptörü
FDA	: Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi
FEN1	: Flap endonükleaz 1
HDAC	: Histon Deasetilaz
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HNPCC	: Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanser
HR	: Homog Rekombinasyonel Onarım
IgG	: İmmüoglobulin
IM	: İmmünmodülatör
LAR	: Luminal Androjen Reseptörü
LIGIIIα	: DNA ligaz III α
M	: Mezenkimal
MDR	: Çoklu ilaç direnci
MLH	: MutL Homolog
MMR	: Yanlış Eşleşme Onarımı
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MRP	: Çoklu direnç proteini
MSI	: Mikrosatellit İnstabilite
MSL	: Mezenkimal Kök Hücre- Benzeri
mTOR	: Rapamisin protein kompleksi
NAD+	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBD	: Nükleotid Bağlanma Bölgesi
NER	: Nükleotid Kesip Çıkarma
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PAR	: Poli ADP ribozilasyon
PARP	: Poli (ADP Riboz) Polimeraz
PCNA	: Proliferatif Hücre Çekirdek Antijeni
PDGFR	: Platelet-Kaynaklı Büyüme Faktör Reseptörü

P-gp	: P-glikoprotein
PI3K/AKT	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PNKP	: Polinükleotit kinaz 3'-fosfataz
PR	: Progesteron Reseptörü
RFC	: Replikasyon faktör c
RNAPII	: RNA polimeraz II
RPA	: Replikasyon Proteini A
SNP	: Küçük Nükleotid Polimorfizimleri
TCDD	: Tetraklorodibenzo-p-dioxin
TDP1	: Tirozil-DNA fosfodiesteraz
TFIIH	: Transkripsiyon faktörü II
TMD	: Transmembran Bölge
TN	: Triple Negatif
TNMK	: Triple Negatif Meme Kanseri
TTD	: Trikotiodistrofi
UV	: Ultraviyole
VEGF-A	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 1
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgisini ve desteğini daima hissettiğim, emeğini ve zamanını harcayarak, mesleki bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde ve çalışmalarımda beni yönlendiren değerli hocam, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER'e,

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ünal EGELİ'ye, Sn. Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya, tez izleme ve tez savunma komitesi üyelerine,

Akademik hayatım boyunca beni yönlendiren ve katkılarını esirgemeyen değerli hocalarıma,

Doktora eğitimimin yanısıra çalışmalarım sırasında her zaman bana destek olan ve beni sürekli motive eden başta Sn. Ayten HACİEFENDİ olmak üzere Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim süresinde desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Hayatımın her aşamasında bana hep destek olan ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Sn. Aysel GÜNEY'e ve merhum babam Sn. M. Zeki GÜNEY'e,

Son olarak, tezin daha kısa sürede bitmesinde ve başarıya ulaşmasında her zaman bana destek olan ve katkı sağlayan sevgili eşim Sn. Ersin ESKİLER'e

teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsani Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BUAP(T) 2015/1 nolu araştırma projesi kapsamında sağlanan maddi destek için teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

22.06.1986 yılında Gaziantep’te doğmuştur. Lise öğrenimini Eskişehir Muzaffer Çil Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 2003-2004 eğitim-öğretim yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladığı eğitimini 2008 yılında tamamlayarak mezun olmuştur. 2008 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İleri Teknolojiler ABD Biyoteknoloji Bölümünde Yüksek Lisans öğrenimine başlamıştır. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-110T028) tarafından desteklenen “Askorbik Asit Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Kanser Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri” adlı Yüksek Lisans tezi ile 2011 yılında mezun olmuştur. 2013 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD’de doktora eğitimine başlamıştır. Doktora eğitimi ve tezi, 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı ve 2014 yılında Uludağ Üniversitesi Bilgilendirme ve Arge Günleri “İyi Fikir” İş Projeleri ve Girişimcilik Yarışması kapsamında kazanılan “Taşıyıcı Bir Sistem Olan Katı Lipid Nanopartikül (KLN)’lerin Meme Kanseri Gen Tedavisinde Kullanılması” adlı büyük ölçekli Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (BUAP(T) 2015/1) ile desteklenmiştir. Bunun yanı sıra, 2014 yılında Uludağ’ın Zirvesindekiler Öğrenci Ödülleri, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisans Üstü Başarı Ödülünü kazanmıştır.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Gamze GÜNEY ESKİLER
Tez Adı	TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE PARP İNHİBİTÖRÜ YÜKLÜ KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN İLAÇ DİRENÇ MEKANİZMALARININ AŞILMASINDAKİ ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI
Enstitü	Sağlık Bilimleri
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji
Bilim Dalı	
Tez Türü	Doktora
Tez Danışman(lar)ı	Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 05.05.2017

İmza: 