

**YENİ SENTEZ EDİLEN
NANO-KARMOFUR BİLEŞİĞİNİN
İNSAN AKCİĞER KANSERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Emre ÇÖMLEKÇİ

Eskişehir, 2017

**YENİ SENTEZ EDİLEN NANO-KARMOFUR BİLEŞİĞİNİN İNSAN AKCİĞER
KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Emre ÇÖMLEKÇİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Mayıs 2017

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1609F629 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emre ÇÖMLEKÇİ'nin “Yeni Sentez Edilen Nano-Karmofur Bileşiminin İnsan Akciğer Kanseri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tezi **15/05/2017** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, **Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalında, Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU
Üye	: Prof.Dr. Adnan AYHANCI
Üye	: Doç.Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI

.....
Enstitü Müdürü

ÖZET

YENİ SENTEZ EDİLEN NANO-KARMOFUR BİLEŞİĞİNİN İNSAN AKCİĞER KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Emre ÇÖMLEKÇİ

Biyoloji Anabilim Dalı, Mayıs, 2017

Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Günümüzde öldürücü hastalıklar arasında ilk sıralarda kanser aklımıza gelmektedir. Kanser, tedavi sürecinde hastalara büyük zorluklar yaşatan ve tedavisi çok pahalı olan bir hastalıktır. Akciğer kanseri dünyada yaygın görülen kanser türlerinden biridir ve dünya genelinde en çok ölüme sebep olan kanser türü olarak kabul edilmektedir. Bu durumun en önemli nedeni olarak hastaların ileri evrede doktora gitmesi ve geciken teşhis gösterilmektedir. Türkiye'de, erkeklerde akciğer kanseri görülme oranı %62, kadınlarda ise %5'tir. Kanser tedavilerinde ajanlara karşı direnç sıkça görülen bir durumdur. Bu yüzden kanser tedavisi için yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Antineoplastik ilaçlar; seçicilikleri kısıtlı, terapötik indeksleri dar, toksisiteyi fazla, antiproliferatif etkiyi amaçlayan, immün sistemi baskılayan ajanlardır. Karmofur ya da HCFU (1-hexilcarbamoyl-5-florouracil), meme kanseri ve kolorektal kanser tiplerinin tedavisinde antineoplastik ajan olarak kullanılan bir pirimidin analogudur. Bununla birlikte, karmofur çok güçlü bir asit seramidaz (AC) inhibitörüdür. Seramidazlar kanser hücrelerinin sağkalımını, büyümesini ve ölümünü etkilemektedirler. Asit seramidaz aktivitesinin inhibisyonu antineoplastik ajanlar ve radyasyon etkilerine karşı tümör hücrelerini duyarlı hale getirmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan daha az olan ve düşük dozlarda sitotoksik gösteren yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlar, kanserli hücrelere yeni tedavi ajanlarının sokulması, en az yan etkiye sahip olan ajanların seçilip geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmamızda akciğer kanserinin tedavisi için karmofurun ve yeni geliştirilen karmofur yüklü katı lipid nano formülasyonunun potansiyel sitotoksik, proapoptik, antiproliferatif etkileri ve sebep olabileceği morfolojik ve ince yapısal değişiklikler küçük hücreli insan akciğer adenokarsinoma hücre hattı (A549) üzerinde araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karmofur, katı lipid nanopartikül, Akciğer kanseri, A549.

ABSTRACT

THE NEW SYNTHESIZED NANO CARMOFUR COMPOUND, TO EXAMINE THE EFFECTS ON HUMAN LUNG CANCER

Emre ÇÖMLEKÇİ

Department of Biology,

Anadolu University, Graduate School of Science, May, 2017

Supervisor: Prof.Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Today, cancer comes to mind in the first place among fatal diseases. Cancer patients who experienced great difficulties in the treatment process and treatment of a disease which is very expensive. Lung cancer is one of the type common cases in the world, and the world is accepted as forms of cancer which causes the most deaths worldwide. This is the most important cause of the condition, the doctor delayed diagnosis in patients with advanced stage and is shown. In Turkey, the incidence of lung cancer in mans is abot %62 and %5 in womans. There is a fact that resistance to widely used chemotherapeutics occurs frequently. Thus novel agents for cancer treatment are required. Antineoplastic drugs; selectivity are limited, narrow therapeutic index, toxicity more are effective immunosuppressive agents aimed at the anti-proliferative effect. Carmofur or HCF of (1-hexilcarbamoyl-5-fluorouracil), for the treatment of types of breast cancer and colorectal cancer used used as antineoplastic agent is a pyrimidine analog. Carmofur is known to induce leukoencephalopathy. However, carmofur is a very potent inhibitor of acid ceramidase (AC). Ceramidase, survival of cancer cells, affects the growth and death. Prevention of acid ceramidase activity, making antineoplastic agents and sensitive tumor cells against radiation exposure. Several side effects are known in some of chemotherapeutics used to treat cancer. Therefore, no side effects and low doses indicates that the cytotoxicity is need for the development of new drugs. New approaches in cancer therapy, the introduction of new therapeutic agents to cancer cells, which aims at developing selected agents with minimal side effects. In this study, the carmofur for the treatment of lung cancer and a newly developed carmofur loaded solid lipid nano-formulation, potentially cytotoxic, proapoptotic, antiproliferative effects, it may cause morphological and subtle structural changes in non-small cell human lung cancer will be studied on adenocarcinoma cell line.

Keywords: Carmofur, Solid lipid nano, Lung cancer, A549.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Emre ÇÖMLEKÇİ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, bilimsel ve hayat ile ilgili bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her alanda ilerlememi sağlayıp desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof.Dr. Hatice Mehtap KUTLU'ya,

Tanıştığımız günden beri bilimsel olarak ve hayata dair konularda bana pek çok Őey katan, tım laboratuvar çalışmalarım boyunca hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen, Dr. Canan VEJSELOVA SEZER'e

Tezimin gerçekleşmesinde gerekli olanakları sağlayan Anadolu Üniuersitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tez deneylerim süresince TEM takip ve görüntülemeye destek aldığım, değerli Uzm. Biyolog Arzu İŐCAN'a,

Beni yetiştiren, her an sevgi ve desteklerini hissettiren, sabır ve hoşgörü ile bugünlere gelmemi sağlayan başta biricik annem, babam ve ablam olmak üzere tım aileme,

Çalışmalarım esnsında hoşgörüsü ve samimiyetine inandığım ve desteklerini her zaman hissettiğim tım arkadaşlarım ve sevdiklerime,

Sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Emre ÇÖMLEKÇİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
GÖRSELLER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kanser	6
2.1.1 Kanserin sebepleri	7
2.1.2. Kanser oluşum mekanizmaları	8
2.1.3. Kanser çeşitleri	11
2.2. Akciğer Kanseri	14
2.2.1. Akciğer kanseri belirtileri	16
2.2.2. Akciğer kanseri risk faktörleri	18
2.2.3. Akciğer kanseri türleri	21
2.2.3.1. Küçük hücreli akciğer kanseri	23
2.2.3.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri	25
2.3. İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanser Hücre Hattı A549	27
2.3.1. İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattının genel özellikleri	27

2.3.2. İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattını karakteristiği.....	28
2.3.3. İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattının kültür yöntemi.....	28
2.4. Hücre Lipid Metabolizması	29
2.4.1. Lipid sindirimi ve emilimi	30
2.4.2. Kanser ve lipid ilişkisi	32
2.5. Antimetabolit İlaçlar	34
2.5.1.5-florourasil	34
2.5.2. Karmofur	35
2.5.3. Karmofurun genel özellikleri ve kullanım alanları	35
2.5.3.1. Karmofurun fiziksel ve kimyasal özellikleri	35
2.5.3.2. Karmofurun kullanım alanları	36
2.5.4. Karmofur ve kanser ilişkisi	37
2.6. Sitotoksosite Testleri	38
2.6.1 MTT kolorimetrik sitotoksosite testi	39
2.7. Katı Lipid Nanopartiküller	40
2.7.1. Katı lipid nanopartiküllerin yapısı	41
2.7.2. Katı lipid nanopartiküllerin kullanım alanları	43
2.7.3. Katı lipid nanopartiküllerin avantajları ve dezavantajları	44
2.7.4. Katı lipid nanopartiküllerin sentezlenmesi	45
2.7.4.1. Katı lipid nanopartiküllerin sentez yöntemleri	46
2.7.4.1.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemleri	46
2.7.4.1.2. Mikroemülsiyon yöntemi	47
2.7.4.1.3. Çözücü emülsifikasyon-evaporasyon veya çözücü difüzyon yöntemi.....	48
2.7.4.1.4. Yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon yöntemi	48
2.7.5. Katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyon metodları	49

2.8. Apoptosis	51
2.8.1. Apoptozun morfolojisi	51
2.8.2. Apoptozun ve kanser ilişkisi	53
2.8.3. Apoptoz tayin metodları	54
2.8.3.1. Konfokal mikroskopisi	54
2.8.3.2. Geçirimli elektron mikroskopisi ile apoptoz tayini	55
3. MATERYAL VE METOD	56
3.1. Materyal	56
3.1.1. A549 hücreleri	56
3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri	56
3.2. Metod	56
3.2.1. A549 hücrelerinin çoğaltılması	56
3.2.2. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin sentezi	57
3.2.2.1. Karmofur yüklü katı lipid nanopartikülleri karakterizasyonu	57
3.2.2.1.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü	57
3.2.3. MTT Kolorimetrik Sitotoksosite Testi	58
3.2.4. Konfokal Mikroskopisi Yöntemi	58
3.2.4.1. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopisi ile tayini	58
3.2.5. Geçirimli elektron mikroskopisi yöntemi	59
3.2.5.1. Geçirimli elektron mikroskopisinde hücre takip yöntemi	59
3.2.6. Akış sitometri yöntemi	59
3.2.6.1. Akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI boyama yöntemi	59
3.2.6.2. Akış sitometrisinde hücre döngü analizi	60
3.2.7. İstatistiksel analiz	60

4. BULGULAR	61
4.1. Karmofur ve Karmofur Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyon Bulguları	61
4.1.1 Karmofur ve karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin partikül boyutunun ölçülmesine ait bulgular	61
4.2. MTT Kolorimetrik Sitotoksisite Bulguları	62
4.2.1. Karmofurun A549 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları	62
4.2.2. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları	62
4.2.3. Boş katı lipid nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları	63
4.3. Konfokal Mikroskopik Bulguları	63
4.3.1. Hücredeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları	64
4.3.1.1. A549 kontrol hücrelerindeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları	64
4.3.1.2. Karmofurun A549 hücreleri üzerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları	65
4.3.1.3. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerinde sebep olduğu morfolojik değişimlerin konfokal mikroskopik bulguları	66
4.4. Geçirimli Elektron Mikroskopik Bulguları	67
4.4.1. A549 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopik bulguları	67
4.4.2. Karmofurun A549 kontrol hücrelerinde sebep olduğu ince yapısal değişimlerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları	68

4.4.3. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin A549 hücrelerinde sebep olduğu ince yapısal değişimlerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları	71
4.5. Akış Sitometri Bulguları	73
4.5.1 Kaspaz 3/7 uygulamasının akış sitometrisindeki bulguları	73
4.5.1.1 A549 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3/7 uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları	73
4.5.2.1. Karmofur yüklü katı lipid nano partiküllerin uygulandığı 549 hücrelerinin kaspaz 3/7 uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları	74
5. TARTIŞMA	76
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Erkeklerde En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı	15
Tablo2.2. Akciğer Kanserinde Semptom ve Bulguların Görülme Sıklığı İle Nedenleri	16
Tablo 2.3. Akciğer Kanserinde Saptanan Uzak Metastazlar Ve Sıklığı	18
Tablo 2.4. Sigara İçimi ve Akciğer Kanseri Gelişme İlişkisi	19
Tablo 2.5. Akciğer Kanserinde Histopatolojik Sınıflama (WHO/IASLC1999)	22
Tablo 2.6. Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin (KHAK) Özellikleri	24
Tablo 2.7. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserlerinin Özellikleri	26
Tablo 3.1. Karmofur, Boş KLN ve Karmofur Yüklü KLN Formülasyonlarının Partikül Boyutu ve Polidispers İndeks Değerleri	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)	12
Şekil 2.2. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)	12
Şekil 2.3. Tütünle İlişkili Kanserlerin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre 2008-2012 Yılları Arasındaki Dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2008-2012) (Dünya Standart Nüfusu,100.000 Kişide)	15
Şekil 2.4. A549 Hücreleri	28
Şekil 2.5. Lipidlerin sindirimi	31
Şekil 2.6. Tümör varlığında lipid metabolizmasındaki değişiklikler	33
Şekil 2.7. Karmofurun iki boyutlu yapısı	35
Şekil 2.8. Karmofurun 3D yapısı	36
Şekil 2.9. Katı lipid nanoparçacıklarının ilaca dahil edilmiş modelleri: a İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli	41
Şekil 2.10. Nanoyapılı lipid taşıyıcılarının ilaç katılma modelleri	42
Şekil 2.11. Normal hücre ve apoptotik hücre	51
Şekil 3.1. Karmofurun A549 Hücrelerine 24 Saatlik Uygulanması Sonucundaki Etkisi ve Elde Edilen Grafik Sonucunda IC ₅₀ Değeri 23 µm Olarak Saptanmıştır	62
Şekil 3.2. Karmofur Yüklü KLN Formülasyonunun A549 Hücrelerine 24 Saatlik Uygulanması Sonucundaki Etkisi İle Elde Edilen Grafikte IC ₅₀ Değeri 16 µm Olarak Tespit Edilmiştir	63
Şekil 4.1. A549 Kontrol Hücrelerinin Apoptotik Profili	74

Şekil 4.2. Karmofur yüklü Kat Lipid Nanopartikül formülasyonunun A549 Hücrelerinde					
Kaspaz	3/7	Uygulaması	Sonucu	Apoptotik	Profil
.....					75

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

- Görsel 4.4.a.** Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen A549 hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).
..... 64
- Görsel 4.4.b.** Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen A549 hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).
..... 65
- Görsel 4.5.** Karmofurun IC₅₀ Konsantrasyonunun 24 Saat Süresince Uygulama Yapıldığı A549 Hücrelerinin Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).
..... 66
- Görsel 4.6.** Karmofur Yüklü Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun IC₅₀ Konsantrasyonunun 24 Saat Süresince Uygulama Yapıldığı A549 Hücrelerinin Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). 67
- Görsel 4.7.** A549 Kontrol Hücrelerinin TEM Görüntüsü (6000x). 68
- Görsel 4.8.** Karmofurun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü (6000x). 69
- Görsel 4.9.** Karmofurun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü (6000x). 70
- Görsel 4.10.** Karmofurun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü (6000x). 71
- Görsel 4.11.** Karmofur yüklü KLN formülasyonunun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü. 72
- Görsel 4.12.** Karmofur yüklü KLN formülasyonunun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü. 73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: American Type Culture Collection
A549	: İnsan Akciğer Karsinoması Hücre Hattı
CO ₂	: Karbon dioksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
IC ₅₀	: İnhibitör Konsantrasyonu 50
KHDAK:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KLN	: Katı Lipid Nanopartikül
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT testi	: 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide sitotoksite testi
nm	: Nanometre
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponu)
PI	: Propidyum iyodit
rpm	: Revolutions per minute
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
SEM	: Scanning Electron Microscope
TEM	: Transmission Electron Microscope
°C	: Santigrad derece
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

1.GİRİŞ

Kanser, hücre büyüme ve bölünmesini kontrol etmekte olan genlerin hasar görmesi ile meydana gelen, ölüm sebeplerinin ilk sıralarında yer almakta olan kritik, karmaşık ve önemli bir hastalıktır. Kanserın en önemli tanımsal özelliği, vücudun çeşitli bölgelerinde ortaya çıkan ve diğer organlara yayılabilen anormal hücre bölünmeleridir [1].

Kanser, günümüzde bütün dünya ülkeleri için büyük bir sorun oluşturan hastalıklar arasında başı çekmektedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumunun (IARC) 2030 yılı için ortaya koyduğu öngörüye göre, kanser ölüm nedenleri arasında ilk sırayı alacaktır. Yapılan bilimsel araştırmalar ile kanserin teşhis oranı sürekli bir şekilde artarken kanser kaynaklı ölüm oranı hemen hemen sabit kalmaktadır. Bu durum, kanserin mağlup edilebilir bir savaş olabileceği bakımından umut verici olmaktadır [1]. Akciğer kanseri halen dünyada en önemli ölüm sebeplerinin başında yer almaktadır ve akciğer kanseri 20. yüzyılın başında nadir görölmekte olan bir hastalıkken sıklığı gittikçe artmış ve 2008 yılında tüm dünyada 1.6 milyon yeni akciğer kanseri hastası kaydedilmiştir [2,3]. 2010 yılında ise tüm dünyadaki kanser ölümlerinin %19'undan akciğer kanserinin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Akciğer kanseri onkoloji, göğüs cerrahisi, göğüs hastalıkları, radyoloji, nükleer tıp, radyasyon onkolojisi, gibi birçok anabilim dalını ilgilendiren güncel bir hastalıktır [3]. Küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere temelde iki grupta incelenen akciğer kanserinin en yaygın olanı küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK) ve tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Bu grupta bulunan hastaların üçte birinden daha azı hastalığa erken evrede yakalanabilmektedir. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ise tüm akciğer tümörlerinin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. Bunların da yaklaşık 1/3'ü sınırlı evrededir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinden (KHDAK) daha hızlı tümör ikilenme zamanına sahip olması ve buna bağlı uzak metastazların erken gelişimi, kemoterapi ve radyoterapiye dramatik yanıt vermesi ile ayrılır ve evreleme sistemi de farklı görölmektedir [2,3].

Akciğer dokusunda oluşan bu hastalığın teşhis ve tedavisi konusunda yapılan çalışmalarda akciğer ve dokusunun yapısı ve fonksiyonlarını bilmek gerekmektedir. Sağ ve sol olmak üzere iki parçadan oluşan akciğerler göğüs boşluğunda bulunmaktadırlar.

Bu parçalar koni şeklinde olmakla birlikte üst kısımlar dar alt kısımlar ise daha geniştir. Akciğerlerde kaburga yüzü, diyafram yüzü ve mediastinum yüzü olmak üzere üç adet yüz bulunmaktadır. Mediastinum yüzünde akciğer göbeği (hilus pulmonis) bulunur ve buradan ana bronş, akciğer arteri, sinirler, iki adet akciğer veni ve lenf damarları geçer. Ana bronş akciğere girdiğinde bronşlara ayrılarak dallanma yapar ve bronş ağacını meydana getirirler. Sağ akciğer üç (üs, orta, alt), sol akciğer ise iki (üst, alt) lobludur, bunlar da çok sayıda lobçuk içermektedir. Lobçuklardaki bronşçuklar uzun alveol borularına ayrılmaktadır. Alveol ve kapiller arasında gaz alışverişi gerçekleşmektedir. Alveoller akciğerde solunum görevini yerine getirirken, bronşlar hava taşıma işini yaparlar [4]. Akciğer kanserleri bronşları kaplayan hücrelerde, bronşiyoller ve akciğerlerin alveoller gibi bölümlerinde başlayabilir [5]. Akciğer kanseri oluşumunun %94'ünden tütünden kaynaklanan dumanının sorumlu olduğu belirtilmektedir ve yine akciğer kanseri sebepli ölümlerin pek çoğunun tütünden kaynaklanan duman ile ilişkisi mevcuttur. [6]. Tütün dumanının solunum yolu ile vücuda alınması, solunum yolu epitelinde kalıcı değişikliklere sebep olmaktadır. Akciğer kanserinde erken tanıya yönelik yapılmakta olan çalışmalar erken tanı ile sağkalımda iyileşme sağlanmadığını göstermektedir. Buna sebep olarak, akciğer kanseri klinik anlamda küçük boyutta tespit edilse dahi akciğer kanserinin erken döneminde metastaz yapmış olma ihtimali gösterilmektedir. Sonuçta akciğer kanserini malign tümör gelişim riskinin arttığı evrede iken tespit etmek gerekmektedir [7]. Akciğer kanseri klinik anlamda tanı almış ise, oluşan kalıtsal değişikliklerin araştırıldığı çalışmalarda bronş epitelinde görülen kalıtsal değişikliklerin preneoplastik değişimin temelini oluşturduğu düşüncesini akla getirmektedir. Uzun süreli olarak karsinojenlere maruz kalınması kalıtsal yapıda hasar meydana getirerek hücre çoğalmasının kontrol edildiği genlerde değişikliklere sebep olarak DNA düzeyinde mutasyon ve delesyonlar ile RNA düzeyinde kanserle ilişkisi olan genlerde ekspresyonlar meydana getirmektedir [8]. Sigara kullanımı solunum yollarında sistemik ve lokal bağışıklığın azalmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte kanser hastalığı sigara kullanan kişilerin solunum yollarında, sigara kullanımını terk etmeleri durumunda bile uzun yıllar sürecektir olan akciğer kanseri ile meydana gelen moleküler değişiklikleri ortaya çıkarmaktadır. Sigaranın onkogenlerde artışa sebep olduğu ve tümör baskılayıcı genleri azalttığı birçok çalışma sonucunda belirtilmiştir [9]. Akciğer kanseri sigara kullanan kişilerde daha yaygın ve daha farklı genetik hasarlar meydana

getirmektedir. p53 mutasyonu sigara kullanan akciğer kanserli kişilerde daha sık gözlemlenmektedir. Özellikle büyük hücreli ve skumöz hücreli akciğer kanserinde, p53 gen mutasyonu adenokarsinomlara göre daha sık görülmektedir. Adenokarsinomlu hastalarda ve sigara kullanımı olan kişilerde sigara kullanmayan kişilere göre p53 ve K-ras mutasyonu daha sık gözlenmektedir [10,11]. Akciğer kanseri gelişiminde sigara kullanımı ve sigaraya pasif olarak maruz kalma haricinde yaş, ırk, cinsiyet, meslek, radyasyon, hava kirliliği, daha önce geçirilmiş akciğer hastalıkları, diyet, viral infeksiyonların ve immunolojik etkenlerinin de önemli olduğu bilinmektedir. Kadınlarda daha sık adenokarsinom gözlenmesi; Epidermal Growth Faktör Reseptörü (EGFR) ailesinin üyesi olan HER2 (EGFR2) 'deki mutasyonların daha sık görülmesi ile ilişkili olabilir [12]. Akciğer kanseri olguları yüksek oranda ileri (evre IV) veya lokal ileri (evre IIIA, IIIB) evrede tespit edilmektedir [13]. Akciğer kanseri direkt olarak genişleme veya lenfatik dolaşım yoluyla bölgesel yayılmakta sinir (Brakial pleksus, rekürren laringeal sinir, frenik sinir başlıca olmak üzere), vena kava superior gibi ana damar, organ (perikard, plevra, myokard, özefagus), diyafram ve göğüs duvarı tutulumuna yol açarak semptom ve bulgular sunabilir [14]. Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötikler, normal hücrelerin yenilenmesine ve tamir edilmesine olanak sağlarken, aktif olarak bölünen hücreleri hedef alarak tümörleri yok etmeyi amaçlamaktadır. Bu ilaçlar genel itibariyle, direnci aşabilmek ve sinerji oluşturabilmek amacıyla aralıklı olarak sık sık ve yüksek dozlar halinde verilmektedir [15]. Kemoterapotik ajanlar farklı kanser tiplerinin tedavilerinde kullanılmaktadır. Kemoterapotik ajanlar; alkilleyiciler, antimetabolitler, mitotik inhibitörler, enzimler, antibiyotikler, hormonlar ve hormon antagonistleri gibi kategorilere ayrılırlar ve tüm bu ajanların etki mekanizmaları birbirinden farklılık göstermektedir [16]. Antimetabolit ilaçlar; folik asit, pürin ve pirimidin antagonistleri olmakla birlikte, hücre döngüsünün “S” fazına etkilidirler ve dolayısıyla kemik iliği, kıl kökleri ve spermatojenik hücreler gibi hızlı bölünmekte olan hücrelerde görülen çoğalma potansiyeli yüksek tümörlerde etki göstermektedirler [17]. Antimetabolit ilaçlar, hücrenin normal metabolitleri ile benzerlik gösterirler. Bundan dolayı, enzimler benzerlik gösterdikleri metabolitlerin yerlerine geçer veya aynı rolü üstlenerek aktiviteyi bloke eder ve azaltırlar. Bunun dışında antimetabolitler, makromoleküllerin içlerine girmek suretiyle, fonksiyonu bulunmayan bir makromolekül meydana getirebilirler [18]. Antimetabolitler sınıfından pirimidin antimetabolitleri, kanser hücrelerinde pirimidin

sentezini durdurmakta ve hücrede DNA sentezi için gerekli olan yapı taşlarından birinin eksilmesine yol açmaktadır. Pirimidin antimetabolitler grubuna giren fluorourasil, genellikle yavaş büyüyen solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır ve meme, over, kolorektal, pankreas, gastrik karsinomların vb. üzerindeki çalışmalarda kullanılmaktadır [19].

Flourourasil, 2-deoksitimidilat (DTMP) sentezinde de etki göstermekte olan urasilin bir analogudur. Florodeoksiüridin monofosfat şeklinde sahte bir nükleotide dönüştürülmektedir ve timidilat sentezi ile etkileşim göstermektedir ancak DTMP'ye dönüştürülemez. Sonuç itibarıyla DNA sentezi engellenirken RNA ve protein sentezi engellenmemiş olmaktadır. Flourourasil genelde hastalara damar yolu ya da adele içi yollarla verilir. Temel olarak, gastrointestinal sistem epitel hasarı ve myelotoksisite gibi istenmeyen etkilere yol açabildiği gibi serebellar rahatsızlıklar da ortaya çıkarabilmektedir [20]. Karmofur, antineoplastik bir ajan olarak kullanılan bir antimetabolit olan fluorourasil'in bir türevidir [21]. Karmofur, intrasellüler olarak 5-FU salabilen bir ilaçtır [22]. Kolorektal kanseri tedavisi için yapılan araştırmalarda klinikte hali hazırda kullanılmakta olan bir anti-neoplastik ilaç olan karmofur, hücre içi asit seramidaz (acDaz) aktivitesinin ilk nanomolar inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Bu önleyici etki, karmofurun anti-proliferasyon etkisinin vazgeçilmez bir bileşeni olduğunu göstermekte olup karmofur'un 5-flourourasil (5-FU) üretme kabiliyetinden bağımsız bir gelişmedir. Tüm bunlarla birlikte, karmofur iskeletindeki yapısal değişiklikler, kanser hücresi çoğalmasını inhibe etmek için standart anti kanser ilaçları ile sinerjik olarak hareket etmekte olan yeni bir aCDaz inhibitör seti üretmiştir [23]. Pirimidin antimetabolitler grubu içerisinde yer almakta olan 5-flourourasilden türev alan carmofur bileşiği ile ilgili tüm bu özelliklerden yola çıkılarak carmofurun kanser hücreleri üzerindeki çok yönlü antiproliferatif ve apoptotik etkileri A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücrelerinde incelenmiştir. A549 hücrelerine daha fazla miktarda sokmak amacı ile karmofur yüklü katı lipid nanopatiküller sentezlenip A549 hücreleri üzerindeki hücre canlılığı, hücre döngüsü ve çekirdek, hücre iskeleti ve membranı üzerine etkisi araştırılmıştır. Karmofur ve sentezlenen katı lipid nanopatikül formunun A549 kanser hücresi içerisinde gerçekleştireceği etkilerinin araştırılması ve bu ajanların in vitro uygulamasına yönelik bulguların ortaya konulması amacıyla ve tüm dünyada en sık görülen kanser türü olmakla birlikte tedavi maliyeti de çok yüksek olan akciğer kanseri

hastalığın tedavisi için yeni bir potansiyel ilaç ve ilaç geliştirme yaklaşımı sunulması maksadıyla antineoplastic bir ajan olan karmofurun bu çalışmada yeni sentezlediğimiz lipid nanopartikül formunun, A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücrelerinin canlılığı, morfolojisi, ince yapısı üzerine sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri çok yönlü olarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser kelimesi vücudumuzun çeşitli organları ve dokularında bulunan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucunda meydana gelen 100'den fazla hastalığı tanımlamaktadır [24]. Vücudumuzda bulunan tüm organlar hücrelerden oluşmaktadırlar. Hücreler, vücudumuzun en küçük yapıtaşlarıdır ve ancak mikroskop ile görülebilmektedirler. Sağlıklı vücut hücrelerinin (kas ve sinir hücreleri hariç) bölünebilme yetenekleri bulunmaktadır. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların (vücut içi ve dışındaki) onarılması amacı ile bölünebilme yeteneklerini kullanmaktadırlar. Ancak bölünebilme yetenekleri de sınırlıdır. Hücreler sonsuz şekilde bölünemezler. Her hücrenin yaşamı boyunca belli bir bölünebilme sayısı mevcuttur. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölüneceğini bilmektedir. Buna karşın kanser hücreleri, bu kontrollü bölünebilme bilincini kaybetmektedir [25]. DNA'da meydana gelen mutasyon ve hasar sonucunda hücreler anormal şekilde bölünmekte ve çoğalmaktadırlar. Normal vücut hücreleri tamir edilemeyecek biçimde hasar gördüğü zaman hücre ölümü (apoptosis) ile elimine edilmektedirler. Kanserli hücrelerde apoptosis olmamakta ve bu hücreler gelişigüzel çoğalmakla birlikte anormal biçimde büyüyerek kitleler halinde tümörleri oluşturmaktadır. Oluşan tümörler iyi huylu ya da kötü huylu olabilmektedir. Kötü huylu olarak anılan tümörler sağlıklı dokuları sıkıştırabilmekte, içlerine doğru büyüebilmekte ya da tahrip edebilmektedir. Kanser hücreleri buldukları doku ya da organda bulunan tümörden ayrılıp lenfler ya da kan dolaşımı vasıtası ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilmektedir (metastaz). Yayılan hücreler gittikleri yerlerde yeni tümör kolonileri oluşturmakta ve büyümeye devam edebilmektedirler. Kanserde erken tanı çok önemlidir. Özellikle meme, rahim ağzı ve bağırsak kanserlerinin erken tanısında ulusal tarama programları uygulamaktadır. Kanserden korunmak için başta tütün ve alkol ürünlerinden ve zararlı çevresel faktörlerden uzak durmak gerekmektedir. Ayrıca düzenli spor yapmak, sağlıklı ve doğal beslenmek kanser riskinin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır [24].

2.1.1 Kanserin sebepleri

Kanserde en çok sorulan sorulardan ve araştırılan konulardan birisi de kanserin sebeplerinin neler olduğu olmuştur. Kanserin sebebi ve oluş mekanizması tam bilinmemekle beraber yoğun olarak yürütülen çalışmalar ile son yıllarda önemli bilgiler elde edilmiştir. Kanser bulaşıcı bir hastalık değildir. Kanserin 1/3'ündeki sebepler bilinmekte ve çoğu kanserin çıkışında çevresel faktörlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Ancak genetik faktörlerin de kanser oluşumunda etken olabildiği bilinmektedir. Genel olarak genetik bazı faktörlerin temelinde çevresel karsinojenlerin (kansere yapıcı etken) faktör olduğu ileri sürülmektedir [26].

Başlıca faktörler şunlardır:

İyonize Radyasyon: Başta lösemiler ve epitelyal kanserler olmak üzere iyonize radyasyonun çeşitli kanserlere yol açtığı Japonya'ya atılan atom bombasına maruz kalanlarda, ankilozan spondilit hastalığı nedeni ile radyasyon verilenlerde ve diğer çeşitli nedenlerle radyasyon alanlarda gösterilmiştir. Burada önemli olan radyasyonun dozudur. Lösemiler en sık, atom bombasının atılmasından 6-8 yıl sonra ortaya çıkmıştır.

Ultraviyole ışınları: Açık havada çalışanlar, deri renkleri açık olan insanlar ve kontrolsüz biçimde güneş ışığına maruz kalan kişilerde deri kanserleri daha sık görülmektedir.

Hava kirliliği: Hava kirliliğinin tek başına veya sigara içilmesi ile birlikte akciğer kanserlerinin yaklaşık %10'unda rol oynadığı bilinmektedir.

Kimyasal karsinojenler: Çeşitli mesleklerde çalışan insanların katran ve kömürün yanma ürünleri, benzen, naftilaminler, asbest, vinil klorür, krom vb. maddelerle temas etmelerinin kanser oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Örneğin, boya sanayiinde çalışan kişilerde mesane kanserleri, plastik sanayiinde çalışanlarda karaciğer kanserleri, katranın kullanıldığı alanlarda çalışan kişilerde deri kanserleri, asbestle temasta bulunanlarda mezotelyoma görülmektedir. Mesleki sebeplere bağlı olan bu kanserler tüm kanser türlerinin %4 kadarını oluşturduğu sanılmaktadır. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçların, organ nakillerinden sonra kullanılan bağışıklık sistemini baskılayan ilaçların da kanser oluşturuıcı etkileri bilinmektedir.

Beslenme faktörleri: Sindirim sistemi kanserleri belirli beslenme alışkanlıkları ile doğrudan ilişkilidir. Bu sebeple düşük yağ ve yüksek lif içeren besinler tavsiye edilmektedir. Ayrıca karsinogen olduğu bilinen katkı maddelerinden de kaçınılmalıdır.

Sigara: Sigara ile akciğer kanserinin ilişkisi kesin olarak kanıtlanmıştır. Sigara ayrıca larenks, ağız boşluğu, yutak, mesane ve pankreas kanserlerinin risklerini de arttırmaktadır.

Alkol: Çok miktarda ve uzun süreli alkol tüketimi ağız, yutak, gırtlak ve yemek borusu kanserlerinin oluşma risklerini arttırmaktadır. Fazla alkol tüketenlerin bununla birlikte sigara da içiyor olması bu kişilerde kanser oluşumu tehlikesini daha da çok arttırmaktadır.

Virusler: Virüsler bilinen en küçük mikroorganizmalardır ve insanlarda çeşitli bulaşıcı hastalıklara yol açmaktadırlar. Bazı virüslerin deney hayvanlarında kansere sebep olduğu bilinmektedir. İnsanlarda da bazı virüslerin kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin, Hepatit-B virüsünün karaciğer kanseri ile Epstein-Barr virüsünün Burkitt lenfoma ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Genetik faktörler: Kanser tek başına genetik bir hastalık olarak görülmemektedir. Fakat çocuklarda görülen bir göz kanseri olan retinoblastom gibi bazı kanser türlerinde genetik bir geçiş görülmektedir. Kendisi kanser olmayan bazı ailevi hastalıklarda da kanser gelişimi görülmektedir. Kalın bağırsakta polipler vasıtasıyla gerçekleşen ailevi hastalık buna örnek olarak verilebilir. Bazı ailelerde ise, hiç bir genetik geçiş olmamasına rağmen bazı kanserler daha sık görülmektedir. Örneğin, kalın bağırsak meme, mide kanserleri gibi [26].

2.1.2. Kanser oluşum mekanizmaları

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içerdiklerinden dolayı oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde mevcut olan en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan reaktif oksijen türleri olarak bilinmektedir (ROS). ROS'un kanser oluşumunda farklı evreleri etkilediği ve bunun sonucunda kanser oluşumunda pek çok rol üstlendiği konusunda önemli kanıtlar bulunmaktadır [27,28]. ROS oluşumunu ve bu oluşumdan kaynaklanan hasarın önüne geçebilmek için vücutta bulunmakta olan savunma mekanizmalarına antioksidan koruma sistemi (antioksidanlar) denilmektedir.

Hücresel oksidan sisteme karşı antioksidan koruma sistemi, gerekli dengeyi sağlar. Hücresel oksidan sistemin aşırı yüklenmesi yüzünden bu kritik denge bozulduğu zaman (oksidatif stres) ROS, hücre hasarı oluşturur [29]. ROS kaynaklı DNA hasarının oluşumunun temelinde Halliwell'e göre iki mekanizma bulunmaktadır: Bunlardan birincisi direkt olarak hidroksil radikali tarafından meydana getirilen DNA zincir kırılımı, baz modifikasyonu ve deoksiriboz fragmentasyonudur. İkincisi, oksidatif stres sonucu oluşan endonükleaz inaktivasyonu ile DNA fragmentasyonlarının oluşmasıdır [30]. Ayrıca ROS ve ROS oluşumuna yol açan karsinogenler, büyüme desteği, büyüme inhibisyonu ve apoptotik sinyal yollarında etkisini göstererek, tümör oluşumunu ve gelişimini etkileyebilmektedir [31,32].

Normal dokulardan oluşturulmuş olan hücre kültürlerinin tümörlerden meydana getirilmiş hücre kültürlerine göre farklı özellikleri gözlemlenmiştir. Bu tür hücre kültürleri için transforme olmuş tanımı kullanılmaktadır. Transforme olmuş bir hücre daha az kısıtlı şartlarda büyümektedir ve genellikle sert bir zemine tutunma ihtiyacı duymamaktadır, bu sebeple şekil itibarıyla yuvarlak bir haldedirler. Transforme olmuş hücrelerin serum ihtiyaçları azalmıştır ve zeminde tek tabaka oluşturmak yerine fokus ismi verilen kitlesel bir yapı göstermektedirler [33]. Kanserin oluşabilmesi için genel anlamda pekçok genetik değişiklikler gerekmektedir. Nadir olarak kansere eğilim mendel kalıtımı ile kalıtılmaktadır. Karsinogen ismi verilen pekçok ajan hücrelerdeki transformasyon sıklığını arttırmaktadır. Bazen bu karsinogenler tümör gelişiminde başlatıcı karsinogenler ve teşvik edici karsinogenler olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Bu ikiye ayrılma durumu kanserde farklı evrelerin var olduğuna işaret etmektedir. Karsinogenler epigenetik değişikliklere veya sık olarak direkt ya da indirekt olarak hücre genotipinin değişmesine sebep olmaktadır. Mutasyonları durumunda transformasyona neden olan iki adet gen sınıfı bulunmaktadır: Onkogenler öncelikle virüslerin sahip oldukları ve hedef hücrelerde transformasyona neden olan genler olarak tanımlanmışlardır. Viral onkogenlerin normal hücrelerde fonksiyon meydana getiren hücresel olarak benzerleri vardır. Protoonkogen ismi verilen bu hücresel genlerin mutasyonları veya anormal aktivasyonları, tümör gelişimi ile alakalıdır. Şimdiye dek 100 adet onkogen tanımlanmıştır. Transmembran proteinlerden transkripsiyon faktörlerine değişebilen türlerde aktiviteleri bulunmaktadır [33].

Protoonkogenler, hücrelerin sinyal ileti mekanizmasında (büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için alınan iletiler) işlevi olan pekçok proteinin sentezinden sorumlu olan genlerdir. Normal hücre büyümesinin düzenlenmesinde aktif olan proteinler (büyüme faktörleri, büyüme faktörlerinin reseptörleri, ileti çeviricileri ve transkripsiyon faktörleri), protoonkogenler ve onkogenler tarafından sentezleri yaptırılmaktadır. Hücre ileti yollarındaki proteinleri kodlayan protoonkogenlerin (sis, hst-1, int-2, erb-B1, erb-B2, fms, ret, ras, abl, myc, N-myc, cyclin D, CDK4 vb.) mutasyona uğramaları neticesinde, büyüme faktörlerinin aşırı üretimi, hücre membranı ve çekirdek arasındaki ara yolların kontrolsüz uyarılması, transkripsiyon faktörlerinin sentez miktarının artması, hücre bölünmesine mani olunamaması gibi çeşitli sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Protoonkogenler büyümenin düzenlenmesini kontrol eden proteinlerdir ve onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakla birlikte kanser hücrelerinin kontrolsüz şekilde çoğalma göstermelerine ve büyümelerine yol açmaktadır. Büyüme ve diferansiasyonun biyokimyasal yollarında yer almakta olan enzimlerin aktivitesini ve ekspresyonunu bozan mutasyonlar onkogenin aktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Protoonkogenler, proteinleri önüne c [cellular(c-Fos, c-Myc)], onkogenlerin önüne ise v [viral (v-Fos, v-Myc)] ekleri getirilerek adlandırılmaktadır [34,35,36]. Onkogenler, hücre transformasyonunu başlatma ve devam ettirme kapasitesine sahiptirler. Onkogenler, hücre siklusunun normal çalışma düzenini bozmaktadırlar, ayrıca yeterli proliferasyon olmayan hücreleri de yok ederek apoptozisi de tetiklemektedirler [37,38,39]. Geçtiğimiz on yıldan fazla sürede yapılan deneysel çalışmalar potansiyel onkogen olarak 30 veya daha fazla onkogeni ayırt edilmiştir (v-Sis, v-ErbB, v-kit, Mutant Gs, Ras, Raf, Jun, Fos, Bcl-2 ailesi, p53, Rb geni vb.). Hücre onkogen aktivasyonuna yol açan genetik olaylar genin yaygın veya uygun olmayan ekspresyonu veya anormal gen ürününün ekspresyonu ile sonuçlanabilmektedir [40,41,42].

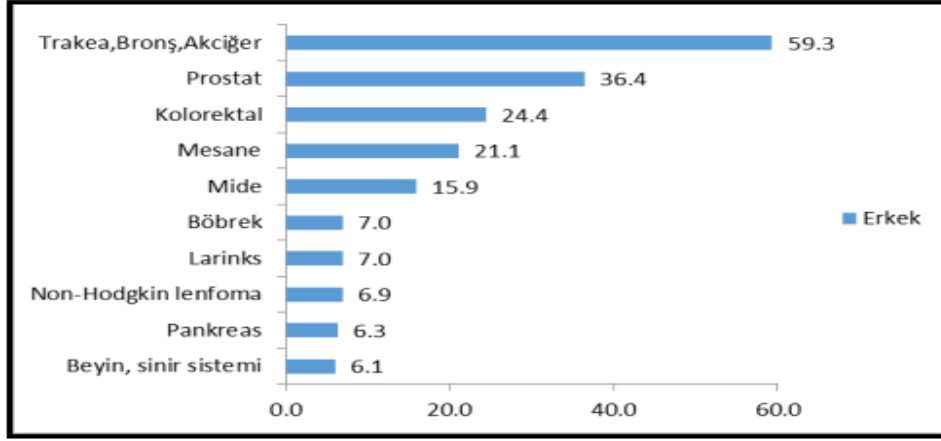
İnsan tümörlerinde en sık şekilde gözlenen onkogen anomalisi, ras geni mutasyonudur. İnaktif durumdaki normal ras proteinleri GDP bağlamakta ve hücreler büyüme faktörleri ile uyarıldığında GDP→GTP şekline çevirmektedir. Aktif ras, başta sitoplazmik kinazlar olmak üzere proliferasyon düzenleyicilerini etkilemekte ve böylece çekirdek hücre proliferasyonu için aşırı uyarı almaktadır. Normal ras proteininde kısa

süren bu dönemde, intrinsik GTPaz aktivitesi ile GTP hidroliz olmakta ve protein etkisiz şekline çevrilmektedir. Aktif ras proteininin GTPaz aktivitesi, GTPaz aktive eden proteinlerle (GAPs) belirgin olarak artmaktadır. Bu şekilde, kontrolsüz ras aktivasyonundan korunulmaktadır. Mutant ras proteini GAPs bağlayabilmekte, fakat GTPaz aktivitesini artıramamaktadır [35,36,43,44].

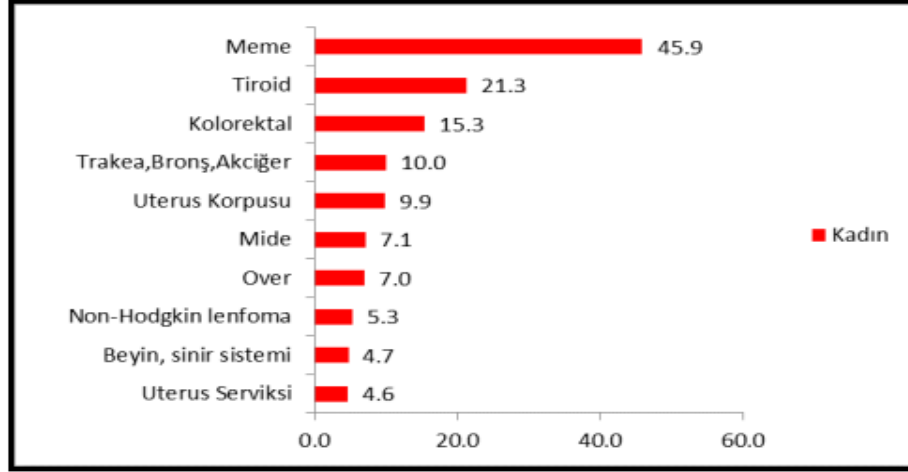
2.1.3. Kanseri çeşitleri

- Meme Kanseri
- Testis Kanseri
- Kalınbağırsak ve Rektum Kanseri
- Akciğer Kanseri
- Rahim Boynu Kanseri
- Rahim İç Zarı Kanseri
- İdrar Yolu Kanseri
- Mesane Kanseri
- Ağız Kanseri
- Gırtlak Kanseri
- Prostat Kanseri
- Cilt Kanseri

Kanseri türlerinden ülkemizde erkeklerde en sık görülenler, akciğer kanseri, prostat kanseri, kalın bağırsak kanseri, rektum kanseri, mide kanseri ve pankreas kanseridir. Ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanseri türleri ise, meme kanseri, akciğer kanseri, kalın bağırsak kanseri, rektum kanseri, rahim ağzı kanseri, over (yumurtalık) kanseri, mide kanseri ve pankreas kanseridir [45]. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yayınlanan Türkiye Kanseri İstatistikleri Raporlarına göre; erkeklerde en sık görülen on kanseri türünün yaşa göre standardize edilmiş hızları göz önüne alındığında, erkeklerde trake, bronş ve akciğer kanserleri, kadınlarda ise meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2)



Şekil 2.1. Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)



Şekil 2.2. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

Meme kanseri kadınlarda görülen en sık kanser türüdür. Meme kanseri kadınlarda ölüme sebebiyet veren kanserler arasında ikinci sırada gelmektedir. Meme kanseri ile ilişkili olarak pekçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar demografik, reproduktif öykü, ailesel/genetik faktörler, çevresel faktörler ve diğer faktörler şeklinde sınıflandırılabilir [46].

Testis kanseri insidansı dünya genelinde artış göstermektedir. Testis kanseri 20-40 yaş grubunda en sık şekilde görülmekle birlikte genç hastaların çoğunlukta olması sebebiyle testis kanseri tanılı hastaların sağkalım oranları yüksektir. Bundan dolayı tedavi öncesinde, fertilitenin korunmasının sağlanması önem arz eder [47].

Kolorektal kanser, dünyadaki değişik toplumlarda farklı sıklıklarda görülmektedir. Kolorektal kanser, kansere bağlı morbidite ve mortalitenin öncül sebepleri arasındadır ayrıca kolorektal kanserler gelişmiş ülkelerde ortaya çıkma sıklığı ve kanser nedeni ölümler bakımından tüm kanser türleri arasında her iki cinsten de üçüncü sırada yer almaktadır [48]. Kolorektal kanserler, erkeklerde akciğer kanseri ve prostat kanseri, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra en çok görülen kanser türleridir [49].

Serviks (rahim ağzı) kanseri, kadınlarda endometrium adenokarsinomundan sonra en sık görülmekte olan genital sistem kanseridir [50,51]. Serviks kanseri olguları kadın yaşamı açısından çok önemli bir tehdit oluşturmaktadır ve serviks kanserinin %80'inden fazlası gelişen ülkelerde görülmektedir. 2020'de bu oranın %90'a ulaşacağı tahminler dahilindedir [51]. Serviks kanseri Avrupa ülkelerinin halklarında halen önemli bir sağlık sorunu meydana getirmektedir. Doğu Avrupa ülkeleri ile Balkan ülkelerinde serviks kanseri yıllık insidansı yüz binde 24-40 arasında olmakla birlikte Batı ve Kuzey Avrupa ülkelerine bakıldığında yıllık insidans yüz binde 16 civarındadır ayrıca rahim ağzı kanseri Sahra-altı Afrika kadınlarında ölümlerin en sık sebebi olarak görülmektedir [52,53].

Larenks (gırtlak) kanseri, baş boyun kanserleri arasında cilt kanserlerinden sonra %3 görülme oranıyla en sık meydana gelen kanser türüdür. Büyük bir kısmı glottik yani ses tellerinin bulunduğu orta kısma yerleşmiş olarak görülmekte olan larenks kanserlerinde supraglottik olan kanserler ikinci sıklıktadır Bu durumun en önemli faktörü tütün kullanımıdır. Son senelerde larenksin supraglottik bölge karsinomunun, tüm larenks kanserleri içerisinde büyük bir orana sahip olduğu gösterilmektedir [54]. Larenks kanserlerinin %90'ı skuamöz (yassı) hücreli karsinomdur [55].

Prostat kanseri, batı toplumlarındaki erkeklerde en sık görülmekte olan solid doku kanseridir [56]. Klinik belirti veren prostat kanserinin sıklığı yaş artışı ile birlikte artış göstermektedir [26]. Cilt (deri) kanserleri, cilt dokularından kaynaklanan kanserlerdir ve birden fazla türü mevcuttur. Cilde rengini veren melanosit hücrelerinden kaynaklanan

kanserler malign melanoma olarak isimlendirilmektedir. Bazal hücre kaynaklı kanserler, bazal hücreli karsinomalar olarak bilinmekte, cildin dış tabakasında bulunan yassı hücrelerden kaynaklanan kanserler ise yassı hücreli karsinomalar olarak adlandırılmaktadır. Sinir sisteminden gelen uyarılara hormon üreterek cevap vermekte olan nöroendokrin hücrelerinden kaynaklanan cilt kanserleri de bulunmaktadır. Cilt kanserleri, ilerleyen yaşlarda, güneş ışığına fazla maruz kalan bölgelerde veya bağışıklık sistemleri zayıf olan kişilerde görülmektedir [57].

2.2. Akciğer kanseri

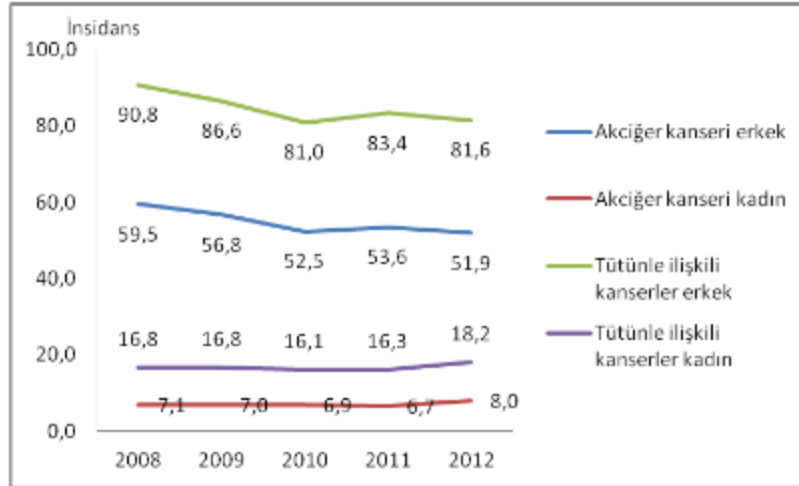
Akciğer kanseri halen dünyada kanser nedeni ölümler arasında ilk sırada yer almakta ve her yıl yaklaşık 1,2 milyon yeni akciğer kanseri tanısı konulmaktadır [58]. Akciğer kanseri, prostat kanserinden sonra en çok görülmekte olan kanser türüdür. Akciğer kanseri bütün kanser ölümlerinin yaklaşık olarak üçte birini oluşturmakla birlikte insidans hızı 75 yaşından sonra tepe noktaya ulaşmakta olan kanser türüdür. Türkiye’de yıllık beklenen yeni akciğer kanseri olgu sayısı 30239 olarak hesaplanmaktadır. Bu olguların %90’ından fazlası erkek hastalardır [27]. Akciğer kanserinin meydana gelmesinde %94 oranında sigara sorumludur. Sigara, akciğer kanseri riskini sigara içmeyen kişilere göre 30 kat arttırmaktadır. Sigara kullanımı bırakıldıktan sonra akciğer kanserinin gelişme riski 15 senede sigara kullanmayan kişilere hemen hemen yakın seviyede bir risk oranına düşmektedir. Sigara kullanımı konusunda pasif içicilik de akciğer kanseri riskini yaklaşık olarak iki kat arttırmaktadır [59]. Sigara dışında etkili olduğu belirtilen yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, diyet, geçirilmiş akciğer hastalığından kalmış olan doku bozukluğu, viral enfeksiyonlar, genetik ve immünolojik faktörlerin tamamı sadece %6 oranında etkilidir [60]. Ülkemizde görülen ilk beş kanser türünün dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki örnekler ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri (60,4/100000 kişide YSH), kadınlarda ise meme kanseri (46,8/100000 kişide YSH) en sık görülen kanser türleridir [61].

Tablo 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Erkeklerde En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı

	Türkiye*	Dünya	IARC'a üye 24	AB (28 ülke)	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Prostat	Prostat	Prostat
2	Prostat	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
3	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Mesane	Mide	Mide	Mesane	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Mesane	Böbrek	Böbrek

*Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2012

Ülkemizde görülmekte olan kanser türleri bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Örneğin; Van ilimizde, erkeklerde akciğer kanseri en sık görülen kanserler içerisinde 3. sırada yer almaktadır. İzmir’de ise bu farklıdır ve sıklık sırasına göre akciğer, GIS (gastro intestinal sistem) ve baş boyun tümörleri şeklinde sıralama yapılmaktadır [59]. Son yıllarda sigara kullanımına karşı yürütülmekte olan kampanyalar ile birlikte, akciğer kanseri insidansı erkeklerde düzenli bir düşüş göstermektedir. Ancak kadınlarda sigara kullanımının artması sebebiyle akciğer kanseri plato dönemine ulaşmıştır [59].



Şekil 2.3. Tütünle İlişkili Kanserlerin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre 2008-2012 Yılları Arasındaki Dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2008-2012) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) Kaynak: [61].

2.2.1. Akciğer kanseri belirtileri

Akciğer kanseri olan hastaların %90'ından fazla bir kısmı tanı döneminde lokal, bölgesel, metastatik veya tümörün sistemik etkilerine bağlı olarak semptomatiktir. Akciğer ve bronş sistemlerinin ağrı hissinden yoksun olmaları ve genellikle ilk semptom olarak bilinen öksürüğün sigara içen hastalar tarafından bir belirteç olarak değerlendirilmemesi sonucu, akciğer kanserinin tanısı çoğunlukla ileri evrelerde konulabilmektedir. Semptomlar kitlenin bölgesel büyümesi ile ilişkili olabilir bunun yanında metastaz ve paraneoplastik sendromlara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir [60].

Tablo2.2. Akciğer kanserinde semptom ve bulguların görülme sıklığı ile nedenleri.

Semptom ve bulgular	Sıklık (%)	Neden
Öksürük	75	Hava yolu obstrüksiyonu, enfeksiyon, akciğer kompresyonu
Kilo kaybı	68	İlerlemiş kanser, kanser metastazı
Dispne	58-60	Büyük hava yolu obstrüksiyonu, plevral efüzyon, diyafragma paralizisi
Göğüs ağrısı	45-50	Toraks duvarı invazyonu, brakial pleksus tutulumu
Hemoptizi	29-35	Hava yolunun tümör ile invazyonu
Kemik ağrısı	25	Kemik metastazı
Çomak parmak	20	Tırnak kökü ve uzun kemiklerde, periost reaksiyonu, hipertrofik pulmoner osyoeartropati, yeni kemik oluşumu
Ses kısıklığı	5-18	Rekürren larengeal sinir tutuluşu
Vena Kava Süperior sendromu	4	Vena Kava Süperior'abası veya invazyon
Disfaji	2	Özefagus basısı
Stridor	2	Trakea obstrüksiyonu

Kaynak: [60].

Akciğer kanserli olgularda herhangi bir fiziksel bulgu görülmeyebilir. Fizik muayenede ise plevral efüzyon, supraklaviküler lenfadenopati, Horner sendromu, lokalize hışırtı, hepatomegali, kaşeksi, lokalize kemik hassasiyeti, periferik motor veya sensöriyal nöropati bulguları saptanabilmektedir [60]. Primer tümörün büyümesine bağlı semptom ve bulgular içerisinde yer almakta olan öksürük, özellikle santral yerleşimli tümörlerde sık bir şekilde gözlemlenen bir semptomdur. Yeni meydana gelmiş olabileceği gibi pek çok yoğun sigara içicisinde kronik bronşit-amfizem sebebiyle daha önceden mevcut olan öksürüğün özyapısını değiştirmesi klinisyenler için uyarıcıdır. Bu tür olgularda öksürük şiddetinin artması, tedaviye yanıt verememe ya da balgamın kanlı olarak gelmesi akciğer kanserinin göstergesi olabilir [62]. Akciğer bol kanlanan bir dokudur. Bu sebeple kan yolu ile yayılımı sık olarak görülmektedir bununla birlikte oldukça değişik bölgeler etkilenebilir. Direkt veya lenfatik yayılım ile büyük damar ve sinir invazyonları gerçekleştirerek klinik verebilmektedir. Vena Kava Süperior Sendromu bunlara örnektir. Baş-boyun bölgesi ve üst ekstremitayı içine alan bu venöz dönüş anomalisinden kaynaklanan baş ağrısı, konjonktivalarda hiperemi, supraklaviküler şişlik, göğüs ön duvarında venöz yapıların belirgin hale gelmesi gözlenmektedir. Akciğerin üst kısmında (apex-kupula) yerleşen “Pancoast tümörü” genellikle bu bölgedeki yumuşak doku ve sınırlara invazyon gösterir. Sempatik pleksus tutulumu sonucu ipsilateral terleme kusuru, enoftalmi, ptozis ve miyozis izlenmektedir (Horner Sendromu). Omuz ve kol ağrısı ile birlikte, kas atrofisi ve güç kaybı da bulgular içinde yer almaktadır. Mediastinal invazyon sonucunda frenik sinir tutulumu meydana gelebilmektedir. Bunun sonucunda hasta diğer bulgulara da ek olarak solunum sıkıntısı çekebilmektedir [62].

Her zaman primer kansere ait olgular değil, bazen de uzak organ metastazlarına ait semptomlar görülebilmektedir. Akciğer kanserinde en sık metastaz gözlemlenen bölgeler kemik, santral sinir sistemi, karaciğer, sürrenal bezler ve karşı akciğer olarak sıralanır [62].

Tablo2.3. Akciğer kanserinde saptanan uzak metastazlar ve sıklığı.

Metastaz bölgesi	Sıklık (%)
Santral sinir sistemi	0-20
Kemik	25
Kalp-perikard	20
Böbrek	10-15
Gastrointestinal sistem	12
Plevra	8-15
Adrenal	2-22
Karaciğer	1-35
Deri-yumuşak doku	1-3

Kaynak: [62].

Dikkat edilmesi gereken diğer bir durum da Paraneoplastik sendromlara ait bulgulardır. Ektopik ACTH salgılanması sonucunda “Cushing Sendromu”, ADH salgılanmasına bağlı olarak Uygunsuz ADH Sendromu, jinekomasti, kemik metastazı olmadan gelişen hiperkalsemi bu bulgulara örnektir. Bununla birlikte hematolojik (lökomoid reaksiyon, trombositopeni) ve cilt lezyonları (akantozis, hipertrikozis) da tespit edilebilmektedir [62].

2.2.2. Akciğer kanseri risk faktörleri

Akciğer kanserinin gelişiminde birden fazla faktör rol oynamaktadır. Sigara, akciğer kanseri etyolojisinde başlıca sorumlu olan faktördür. Akciğer kanserine yakalanan hastalarının yaklaşık olarak %90’ı sigara kullanmaktadır. Sigara ile akciğer kanseri arasındaki ilişki ilk defa 1950 yılında gösterilmiş ve daha sonra yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır. Akciğer kanserinin ortaya çıkma riski sigara kullananlarda kullanmayanlara göre 24-36 kat daha fazladır [63]. Sigaranın akciğer kanseri nedeni olduğu yönündeki ilk bulgular 1962 yılında yayınlanmıştır. Akciğer kanseri hastalarında, sigaranın bir risk faktörü olması durumunu, sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigaranın tipi (filtreli, filtresiz, puro, düşük katran ve nikotin içeriği vb.) ve günlük olarak tüketilen sigara miktarı etkilemektedir. Nispi risk sigara kullanmayanlara kıyasla 10-30’dur ve özellikle 20 paket/yıldan sonra belirgin bir şekilde artış göstermektedir

(Tablo 2.4.). Pasif sigara içiminde görülen risk %3,5'tir. Sigara kullanımının akciğer kanseri ile olan direkt ilişkisi kadınlarda %90 erkeklerde %79 oranında bulunmuştur [60].

Tablo 2.4. Sigara içimi ve akciğer kanseri gelişme ilişkisi.

	Rölatif Risk
Hiç sigara içmeyen	1
1 paket/gün	17
1-2 paket/gün	42
>2 paket/gün	64
Sigarayı bırakmış	2-10

Kaynak: [60].

Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunur. 60'dan fazlasının kanıtlanmış karsinogen özelliği vardır. Bunların bir kısmı radyoaktif özelliktedir; radon, kurşun, bizmut ve polonyum. Polisiklik hidrakerbonlar ve N-nitrozamin özellikle prokarsinogenik olarak tanımlanmıştır [63]. Sigara kullanımına ne kadar erken başlanırsa akciğer hasarı da bununla doğru orantılı olarak o kadar çok olur. Sigara kullanmakta olan bir kişinin akciğer kanseri sebebiyle ölme riski yaşamı süresince hiç sigara kullanmamış bir kişiden 15 kat daha fazladır. Sigara kullanımının bırakılması kanser riskini tamamen ortadan kaldırmamaktadır, sadece riski azaltmaktadır. Yani akciğer kanserin ortaya çıkma riski sigara kullanımının bırakılması ile düşmeye başlar fakat hayatı boyunca hiç sigara içmemiş bir kişi ile aynı durumda olmaz. Küçük yaşlardan itibaren sigaraya başlayıp sürekli sigara içen bir insanda 75 yaşına ulaştığında görülebilecek bir akciğer kanseri kümülatif riski %15.9'dur. Bu kişi 60, 50, 40 ve 30 yaşlarında sigara kullanımını bıraktığında akciğer kanseri sebebiyle ölümün kümülatif riski sırasıyla %9.9, %6.0, %3.0 ve %1.7'e düşmektedir. Bununla birlikte erkek ve kadınlarda sigara kullanımına bakıldığında, gelişmiş ülkelerde sigara içimi prevalansı kadınlarda %20-40, erkeklerde %30-40 iken gelişmekte olan ülkelerde bu oranlar sırasıyla %2-10 ve %40-60'dır. Ülkemizde sigara içme oranları ortalama erkeklerde %63, kadınlarda %24'tür [59, 60].

Endüstriyel ve çevresel faktörler akciğer kanserinin gelişimi açısından önem arz etmektedir. Özellikle asbest minerali, mesleki maruziyette en önemli madde olmakla birlikte, gerek çevresel (ak toprak ve zeolit) gerekse endüstriyel (gemi ve otomotiv sanayi,

izolasyon) alanlardaki kullanımı ile başta mezoteliyoma olmak üzere akciğer ve gastroentestinal sistem malignitelerine sebep olmaktadır. Son yıllarda, topraktan havaya geçen doğal bir radyoaktif gaz olan radon akciğer kanseri oluşumunda etkin bir neden olarak karşımıza çıkmaktadır. Radon doğada mevcut olan uranyumun bozunma ürünlerinden biridir. Radonun yoğunluğu toprakta bulunan uranyum konsantrasyonuna bağlı olarak değişme göstermektedir. Mesleki maruziyetin yanında doğada da bulunan radonun son yıllarda akciğer kanserine yol açabileceğine dair bulgular mevcuttur. Evlerin üzerine yapıldığı arazi topraklarındaki radon miktarı yüksek olan evlerde de radon yüksek oranda bulunabilir ve arazideki topraktan, ev duvarlarında oluşan çatlaklardan, borulardan, elektrik tesisatı ve diğer girişlerden giriş yaparak tehlike oluşturmaktadır. Akciğer kanseri riskini 2 kat artırdığı ve ABD’deki akciğer kanseri olgularının %6’sının nedeni olduğu saptanmıştır [60, 63].

Hava kirliliği, akciğer kanserlerinin %1 kadarından sorumlu tutulmaktadır. Yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde dizel egzoz maruziyetinde de akciğer kanser riskinin arttığını göstermiştir. Trafikte maruz kalınan egzoz dumanları ve özellikle nitrojen oksitlere yoğun olarak kalınan maruziyet akciğer kanser riskini arttırmaktadır. Benzopiren, SO₂ gibi maddelere maruz kalan farelerde akciğer kanseri gelişmiştir. Aromatik hidrokarbonların yoğun olduğu bölgelerde akciğer kanseri olguları daha fazla görülmekle birlikte kentlerde yaşayanlarda risk 1.2-2.3 kat daha fazladır [59, 63].

Kalıtsal etkenlerin akciğer kanseri olgusunun gelişiminde etkili bir faktör olduğu öne sürülmektedir. Akciğer kanseri gelişiminde kalıtsal faktörler üzerinde yapılan araştırmalarda hastaların birinci dereceden akrabalarının kanser hastalığı görülenlerinde akciğer kanseri riskinin 2.4 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Çevresel faktörler ve sigara kullanımının kalıtsal faktörlerin üzerine eklenmesi ile ortaya çıkan faktörler hastalığı tetikleyen diğer faktörler olarak değerlendirilmektedir. Aril hidrokarbon hidroksilaz enzimi sigara dumanında yoğun bir şekilde bulunmakta olan polisiklik hidrokarbonları aktif karsinojenlere çevirmekte olan bir enzimdir. Bu enzimin yüksek aktivite gösterdiği kişilerde risk oranı artmış olabilir. Hücre büyümesi ile ilgili işlevleri olan bazı genlerde dış etkenlerle (radyasyon, virüsler, kimyasal maddeler) farklılıklar oluşarak “onkogen” haline dönüşmesi karsinogenezde önemli bir nokta teşkil etmektedir.

Bu onkogenlerin bilinen en önemli grupları “myc” (C-myc, L-myc, N-myc) ve “ras” (K-ras, H-ras, N-ras) aileleridir. Bunun aksine bazı tümör supresör genlerinde de (retinoblastoma ve p53 geni) kanser hastası olan kişilerde mutasyon tespit edilmiştir. Sigarada mevcut olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar DNA bağlarını parçalamakla birlikte DNA tamir, apoptoz ve hücre döngüsünü tayin eden p53 geninde mutasyona sebebiyet vermektedir. Akciğer kanseri olan hastalarda p53 geni, %50-70 oranında defektli olarak saptanmıştır. Kronik karsinojen maruziyetinin sonucu olarak onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyon gelişmektedir ve böylece hücreyi kanserleşmeye götürmekte olan süreç başlamaktadır [60, 63].

2.2.3. Akciğer kanseri türleri

Yeni yapılan araştırmalara ve bunlarla birlikte ortaya konulan görüşlere göre bütün akciğer kanserleri tek bir hücreden (stemcell) oluşmaktadır ve gen düzeyindeki değişikliklerden kaynaklı olarak farklı tipler birbirlerine dönüşmektedir. Patolojik anlamda akciğer kanserlerinde bilinen 4 ana grup mevcuttur. Skuamöz hücreli karsinom (SHK), adenokarsinom (AK), büyük hücreli karsinom (BHK) ve küçük hücreli karsinom (KHK). Hücre tipleri tedavi ile olduğu kadar prognoz ile de çok yakından ilişkilidir. KHK'lar diğer gruplar ile karşılaştırıldı zaman davranışsal olarak belirgin bir şekilde farklılıklar gösterdikleri için, klinisyenler akciğer kanserlerini küçük hücreli (small cell) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri (non-small cell) olarak iki grupta sınıflandırmaktadırlar. Ülkemizde en sık görülmekte olan histolojik tip skuamöz hücreli karsinom (%45.4) olmakla birlikte Kore ve Çin gibi Asya ülkelerinde de en sık görülen tiptir. Bununla beraber skuamöz hücreli karsinom ABD ve Japonya'da en sık tiptir [64]. Tez çalışmamızda kullanılan hücre hatları ile ilişkili olarak sadece küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri yakından incelenecektir. Bununla birlikte bugün için en fazla kabul gören akciğer kanserleri patolojik sınıflaması Tablo 2.5'te gösterilmiştir [64].

Tablo 2.5. Akciğer kanserinde histopatolojik sınıflama (WHO/IASLC1999)

Malign epitelial tümörler
Skvamöz hücreli karsinom
Papiller
Berrak hücreli (clear cell)
Küçük hücreli (small cell)
Basaloid
Küçük hücreli karsinom
Kombine küçük hücreli
Adenokarsinom
Asiner
Papiller
Bronşiolalveoler
Nonmüsinöz (clara hücreli/tip 2 pnömosit tip)
Müsinöz (goblet hücreli tip)
Mikst (müsinöz ve nonmüsinöz)
Solid (müsinöz formasyonlu)
Mikst
Diğer
İyi diferansiye fetal
Müsinöz (kolloid)
Müsinöz kistik
Berrak hücreli (clear cell)
Büyük hücreli karsinom
Nöroendokrin karsinom
Basaloid
Lenfoepitelyomaya benzer
Berrak hücreli (clear cell)
Rabdoid tip
Adenoskuamöz karsinom
Pleomorfik, sarkomatoid karsinomlar

Spindle veya giant cell
Pleomorfik
Spindle cell
Giant cell
Karsinosarkom
Pulmoner blastom
Karsinoid tümör
Tipik/atipik
Tükürük bezi tip
Mukoepidermoid
Adenoid kistik, Diğer

Kaynak: [64].

2.2.3.1. Küçük hücreli akciğer kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC-Small Cell Lung Cancer) tüm akciğer kanserlerinin %15'ini oluşturmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanserli hastaların yaklaşık olarak üçte ikisinde toraks dışında belirgin, metastatik hastalıklar meydana gelirken, hastaların sadece %33'ü tek bir radyasyon portu içerisindeki toraks bölgesi ile sınırlıdır. Bununla birlikte tanı sırasında pek çok olgunun ileri evrede olduğu bir akciğer kanseri türüdür. Tümör hücreleri tipik olarak ezilme, çekilme, yığılma artefaktı meydana getiren, yüksek mitotik aktivite gösteren ince granüler kromatine sahiptir, nükleolü belirsiz, yuvarlak ya da fuziform yapıda küçük nükleuslu, az sayıda ve dar yapılı sitoplazmaya sahip olabilir. Pek çok olguda nekrozun gözlendiği bu kanser tipi küçük hücreli dışı akciğer kanseriyle karşılaştırıldığında, küçük hücreli akciğer kanseri genellikle daha hızlı bir iki katına çıkma zamana, daha yüksek büyüme fraksiyonuna sahiptir ve yaygın metastazlar daha erken görülür. Küçük hücreli akciğer kanseri vakalarının çoğu sigaraya atfedilebilir; öte yandan, geri kalan vakaların çevresel veya genetik faktörlere bağlı olduğu düşünülmekle birlikte küçük hücreli karsinomlar akciğer dışı bölgelerden de, örneğin nazofarenks, gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistemlerden de kaynaklanabilir [65,66]. Küçük hücreli akciğer kanserinin özellikleri Tablo 2.6'da verilmiştir [64].

Tablo 2.6. *Küçük hücreli akciğer kanserinin (KHAK) özellikleri*

KHAK	
Özellikler	
Sıklık	%20-30 (30)
Cins (sıklık)	Erkeklerde
Yaş	Genç-Orta
Sigara ilişkisi	Kuvvetli
Yerleşim	2/3 santral
Kavite-Abse	Kitle
Histoloji	Dar sitoplazmalı,
Kökeni	küçük lenfosit benzer hiperkromatik nükleuslu, ince kromatinli, keratin + Bronş mukozasında nöroendokrin orijinli K tipi granüler hücrelerden
Sitogenetik ve mutasyon	
3p delesyonu	% 100 mevcut
Retinablastoma Rb	
Gen mutasyonu	
p53 mutasyonu	% 100 mevcut
p53 anormal ekspres.	(% 75-100) >%90
ras mutasyonu	% 40-70
p16 mutasyonu	>%1
myc onkogeni	>% 1
blc2 ekspresyonu	(% 15-30) >% 50
Nöroendokrin fenotipi	% 75-95
Telomeraz aktivitesi	% 100

Radyoterapiye yanıt	%100
Kombine kemoterapiye yanıt	% 80-90 belirgin küçülme, tam yanıt sık
Genel gerileme	
Tam gerileme	
5 yıllık yaşam şansı	%90
Paraneoplasik belirti	%50
	% 5

Kaynak: [64].

2.2.3.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, tüm akciğer kanseri olgularının %80-85 kadarından sorumlu olmakla beraber başlıca üç tipi içermektedir; “squamos” hücreli, adenokarsinoma ve büyük hücreli kanser. Tüm akciğer kanser olgularının yaklaşık olarak %30’unu squamos hücreli kanser oluşturmaktadır. Eskiden bu hücre tipindeki tümörlerin akciğer santralinde ve adenokanserlerin periferde oluşmaya eğilimli olduğu düşünülmekteyken yeni yapılan çalışmalarda her iki tipteki tümörün de benzer yerleşimler gösterdiği tespit edilmiştir. Squamos hücreli kanserler diğer tiplere göre lokal kalma eğilimindedirler ve bununla birlikte tedavilerden sonra da lokal tekrarlamalar daha fazla görülmektedir. Adenokanserler ve büyük hücreli kanserler tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %60’ını oluşturmaktadırlar. Sigara kullanmayanlarda ve kadınlarda en çok görülen tip adenokanserdir. Fakat hastaların çoğunda sigara içme olgusu bulunmaktadır. Akciğer periferinde yerleşim gösteren tümörlerin yarısından fazlasında lenf nodu metastazı görülmektedir ve bu tümörlerin metastaz yapma eğilimleri daha fazladır [65]. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin özellikleri Tablo 2.7’de verilmiştir [64].

Tablo 2.7. *Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin özellikleri*

NSCLC			
Özellikler	Skvamoz	Adeno	B.Hücreli
Sıklık	% 40-60 (50)	%20-30 (15)	% 5-10 (5)
Cins (sıklık)	Erkeklerde	Kadınlarda	Kadınlarda
Yaş	Orta-ileri	Orta	Orta-ileri
Sigara ilişkisi	Kuvvetli	Zayıf	Kuvvetli
Yerleşim	2/3 santral	2/3 periferik	2/3 periferik,
Kavite-Abse	Sık	Nodül < 4 cm Skar zemini	santr. Kitle>4 cm
Histoloji	Keratin	Asiner, papiller	Büyük
Kökeni	formasyonu, hücreler arası ipliğimsi bağlantılar (desmozom), sitoplazmalar geniş Bronş epiteli, bazal membrana paralel bazal hücrelerden	veya sitoplazmasında müsin içeren yapılar Bronş epiteli, müsin salgılayan bezlerden veya bronkoalveolar	nükleus, belirgin nükleulus, bol sitoplazma, keratinizasyon yok
Sitogenetik ve mutasyon			
3p delesyonu		>% 90	
Retinablastoma Rb		>% 20	
Gen mutasyonu		>% 50	
p53 mutasyonu		% 40-60	
p53 anormal ekspres.		>%30	
ras mutasyonu		% 10-40	
p16 mutasyonu		(% 5-10) >%50	
myc onkogeni			
bcl 2 ekspresyonu		% 10-35	

Nöroendokrin fenotipi	Büyük hücreli ve karsinoid, seyrek
Telomeraz aktivitesi	%80-85
Radyoterapiye yanıt	>% 30-50 belirgin küçülme
Kombine kemoterapiye yanıt	tam yanıt seyrek
Genel gerileme	%30-40
Tam gerileme	%5
5 yıllık yaşam şansı	% 8
Paraneoplastik belirti	seyrek

Kaynak: [64].

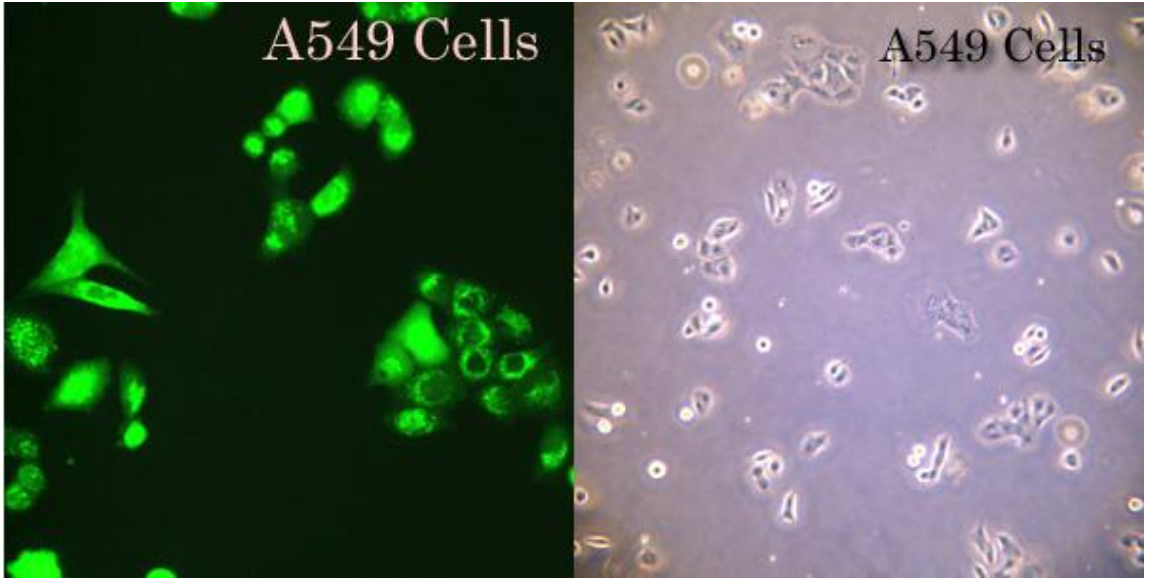
2.3. İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattı A549

2.3.1. İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattının genel özellikleri

A549, bir akciğer karsinom dokusundan türetilmiş bir insan epitel hücre dizisidir [67]. A549 hücre dizisi ilk kez 1972 yılında Giard ve ark. tarafından, 58 yaşındaki bir Kafkasya erkeğinin eksplan tümöründeki kanserli akciğer dokusunun çıkarılması ve kültürlenmesi yoluyla geliştirilmiştir [68]. A549 hücre hattı, astımı indükleme yeteneğine sahip viral enfeksiyonlar, asbeste maruz kalma ile bağlantılı doku hasarı ve sigara ile ilişkili amfizem gibi çok çeşitli solunum yolu rahatsızlıklarını araştırmak için sıklıkla kullanılır. Yapışık ve epitelyal A549 hücreleri immünoperoksidaz boyama ile keratin için pozitifdir, ancak integral retrovirüs genomlarının eksikliğini gösteren ters transkriptaz için negatifdir. M. Lieber liderliğindeki bir ekip tarafından yapılan çalışmalar, A549 hücrelerinin sitidin difosfokolin yolunu kullanarak yüksek oranda doymamış yağ asitleri ile lesitin sentezleyebildiğini ortaya koymuştur. A549 hücre hattının orijinal kaynağı olan karsinom, insan derisini oluşturan epitel dokusunda gelişimine başlayan ve çoğu organ ve bezin kaplamalarını içeren sağlam, kanserli bir büyümedir. Bununla birlikte, bir karsinom hücresi, başka türlü sağlıklı olan yakın dokulara yayılabilmekte ve aynı zamanda, başlangıçtaki büyümeden uzak olan vücut kısımlarında metastaz olarak bilinen sekonder tümörler oluşturabilmektedir. Karsinoma gelişiminde en sık görülen alanlardan bazıları cilt, akciğerler, rahim, mide, yumurtalıklar ve prostattır fakat bu bölgelerdeki ve diğer bölgelerdeki büyüme insidansı ülkeye göre önemli farklılıklar göstermektedir [69].

2.3.2. İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattının karakteristiği

İnsan alveolar bazal epitel hücreleri olan A549 hücreleri doğada skuamozdurlar ve ciğerlerin alveollerinde maddelerin difüzyonundan sorumludurlar, alveol yüzeyinde su, elektrolitler ve diğer maddeleri yayma görevini yerine getirmekle birlikte hücreler kültürde yapışık vaziyettedirler bunula birlikte in vitro olarak, tek tabaka halinde yapışarak büyürler ve in vivo olarak atimik farelerde tümörleri indüklerler. A549 hücreleri, sitidin difosfokolin yolunu kullanarak yüksek oranda doymamış yağ asitleri ile lesitini sentezleyebilir. Hücreler model kromozom sayısı 66 olan adenokarsinomik alveoler bazal epitelyal hücrelerdir ve karyotip, model kromozom sayısı 12 olan hipotriploit erkektir ayrıca çok sayıda kromozom anomalisi ve işaret kromozomu mevcuttur [67, 68, 70].



Şekil 2.4. A549 Hücreleri. Kaynak: [68].

2.3.3. İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattının kültür yöntemi

A549 hücreleri standart büyüme koşulları altında T75 hücre kültürü flasklarında yetiştirilir. Yaklaşık % 70-90 konsantrasyonlu hücreler, tripsin / EDTA muamelesi ile flasktan çıkarılır, pelet haline getirilir ve T75 flask başına 20 ml'lik komple hücre kültürü ortamında 5×10^5 ila 1×10^6 hücre konsantrasyonunda tekrar süspansiyon haline getirilir (Sırasıyla 2.5×10^4 hücre / ml ila 5×10^4 hücre / ml'ye eşittir). A549 hücreleri, T75 hücre kültürü flasklarında toplam 20 ml'lik komple hücre kültürü hacmi içinde yetiştirilir.

İnkübatör içinde nemlendirilmiş havada 37 ° C, % 5 CO₂'de tutulurlar (standart büyüme koşulları). Sıvı nitrojen deposundan cryo tüpleri çıkarılır. 37 °C'lik bir su banyosunda hücreleri sadece küçük bir donmuş parça görene kadar çözülür. Flask % 70 etanol püskürterek temizlenir ve steril bir cryo tüpe aktarılır. Steril koşullar altında çalışılarak cryo tüpün tüm içeriğini, önceden ısınmış (37 ° C) 20 ml hücre kültürü ortamına aktarılır. Hücreler oda sıcaklığında 200 x g'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatantı atılır, önceden ısıtılmış 20 mL'lik tam hücre kültürü ortamında hücreleri tekrar süspansiyon edilir ve bir T75 hücre kültürü flaskına hücreler aktarılır. Gecelik standart büyüme koşullarında inkübe edilir. Ertesi gün konfluensi kontrol edilir. Hücrelerin % 70 birleşimden başlamak üzere alt kültürlenmesi gerekir. Daha az konsantrasyonda olan kültürlere 20 ml taze önceden ısıtılmış komple hücre verilir [71].

2.4. Hücre lipid metabolizması

Karbonhidratlar ve proteinler ile birlikte organizmanın organik maddelerini oluşturan lipidlerin hücre zarlarında yer almak gibi yapısal fonksiyonları dışında, asıl görevleri organizmanın karbonhidratlardan sonra en önemli yakıt kaynağı olmalarıdır. Vücuda alınan besin maddeleri içerisinde lipidlerin olması yalnızca yağda eriyen vitaminler için ve belirli doymamış yağ asitleri açısından önem arz etmektedir. Bunların haricinde besinlerde bulunması şart değildir.

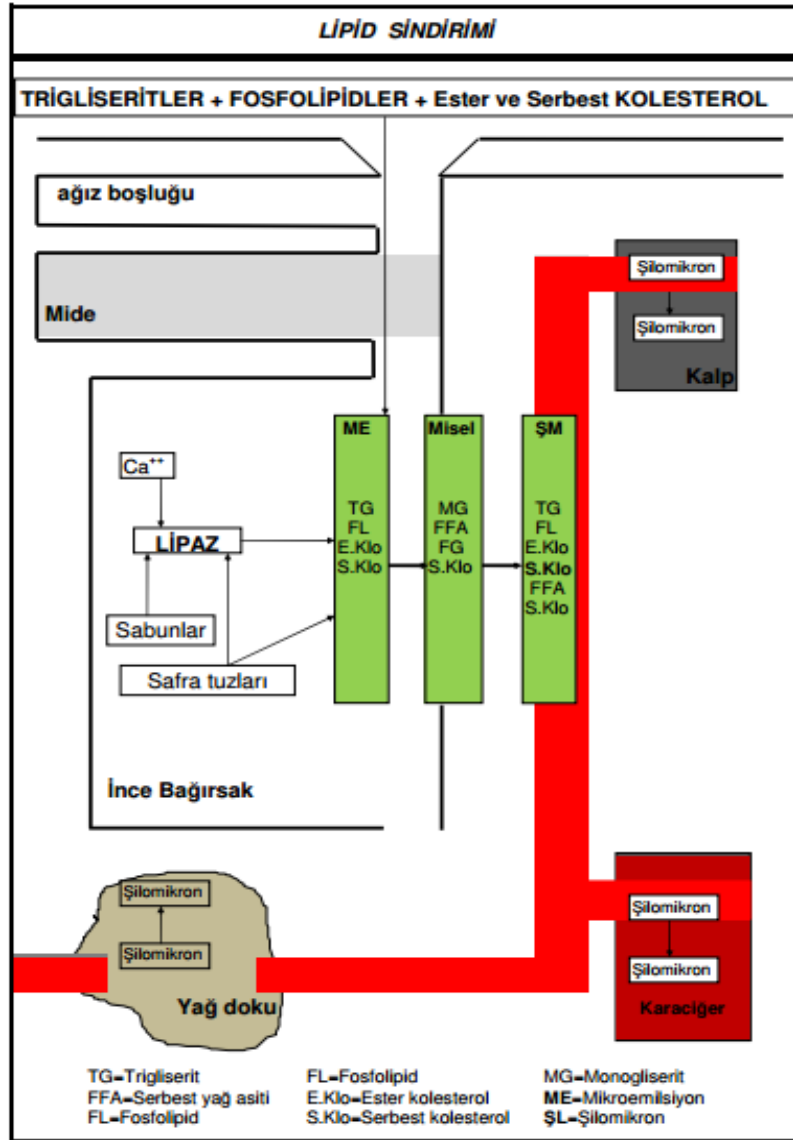
Lipidler organizmanın enerji deposunu meydana getirirler ve ağırlıkları göz önüne alındığında, aynı ağırlıkta bulunan karbonhidrat ve proteinlere nispeten yaklaşık iki kat fazla kalori verirler. Vücuttaki karbonhidrat depolama yeteneğinin çok sınırlı olmasına karşılık, yağlar sınırsız denilebilecek kadar çok miktarlarda depo edilebilirler. Fakat buna rağmen vücut kalori kaynağı olarak lipidler yerine karbonhidratları tercih etmektedir. Lipidler organizmaya en çok nötral yağlar, özellikle trigliseritler biçiminde dahil olmakla birlikte kolesterol ve diğer lipidlerde az miktarlarda organizmaya alınmaktadır. Lipidler, karbonhidratlar ve proteinler ile kıyaslandığında daha çok karbon ve daha az oksijen taşırlar. Bu sebeple, karbonhidrat ve proteinlere göre daha az oksitlenmiş halde olmalarına rağmen daha çok oksitlenebilirler ve bundan dolayı daha çok enerji verebilirler.

2.4.1. Lipid sindirimi ve emilimi

Besinlerle alınan lipidlerin büyük bir kısmını gliserol oluştururken, daha azı fosfolipidler ile serbest ve ester kolesteroldür. Lipid sindirimi ince bağırsaklarda ester bağlarının hidrolitik olarak parçalanması şeklinde meydana gerçekleşmektedir. Ester bağlarının hidrolitik parçalanması lipaz enziminin katalitik etkisi ile meydana gelmektedir.

Pankreas tarafından salgılanan lipaz enzimi, Ca^{++} iyonları, sabunlar ve safra tuzları gibi maddeler ile aktif hale getirilmektedir. Lipazın suda erimesinden dolayı lipidlere etkisini yağ/su sınır yüzeylerinde gösterir ve bundan dolayı yağların, bağırsak peristaltik hareketleri ve safra tuzlarının etkisi ile sınır yüzeyleri genişlemekte ve bir mikroemülsiyon haline gelmektedirler. Safra asitleri burada yüzey gerilimini azaltıcı bir etki gösterir. Mikroemülsiyon haline gelen yağlar hidroliz sonunda trigliseritlere, serbest yağ asitlerine ve β -monogliseritlere parçalanırlar. Lipaz enzimi, trigliseritlerin β -ester bağlarını etkilememektedir. Bağırsak kanalındaki kolesterol esterleri, kolesterol esteraz enzimi vasıtası ile kolesterol ve serbest yağ asitlerine ayrılırken fosfolipidler de lipaz enzimi ile fosfolipid ve serbest yağ asitlerine ayrılırlar. Hidroliz ürünleri başta yağ asitleri monogliseritler ve olmak üzere tüm lipidlerin katıldığı miselleri meydana getirirler. Bu misellerin yapısında gliserol, -di ve trigliseritler de bulunabilir. Miseller biçiminde mukoza hücrelerine alınan lipidlerin mukoza hücrelerinde yağ asitleri monogliseritler ile birleşerek trigliseritleri, serbest kolesteroler ile birleşerek kolesterol esterlerini, fosfolipidlerle de tekrar fosfolipidleri sentezlerler ve bu sentez ürünlerinin az miktarda da serbest yağ asitleri ve serbest kolesterolün proteinler ile birleşmesi sonucu şilomikronlar meydana gelmektedir. Şilomikronlar mukoza hücrelerini terk ederek önce doku aralarına girmekte oradan da lenf kanallarına ve en son olarak da ductus thorasicus'a geçmektedirler. Böylece dolaşıma dahil olan lipidler ductus thorasicus'tan adipoz doku, kalp kası, akciğer ve karaciğer dokularına taşınırlar. Lenf yolu ile taşınan şilomikronların kan dolaşımına geçmesi sayesinde plazma süt halini alır. Bu olay emilim hiperlipemisi ismi verilir. Besin alındıktan yaklaşık olarak 5-6 saat sonra emilim hiperlipemisi en üst seviyeye erişir. Yavaş bir şekilde azalma göstererek yaklaşık olarak 10-12 saat sonra plazma berrak hal alır ve yine eski haline döner.

Plazmanın berrak hale geçmesi şilomikronların hücre içine dahil olması ile gerçekleşir. Şilomikronların hücrelere girmesi olayına plazma berraklaştırıcı faktör (plazma-clearing factor) yardımcı olmaktadır. Şilomikronların yapı taşlarına ayrılmaları dahil oldukları dokularda parçalanması ile gerçekleşir. Bunun sonucunda açığa çıkan yağ asitleri ve diğer lipidler, parçalandıkları dokulara göre farklı şekillerde kullanılırlar. Örneğin, adipoz dokuda tekrar trigliseritler meydana getirmek suretiyle depo edilirler ve kalp kasında oksitlenip enerji üretirler [72].



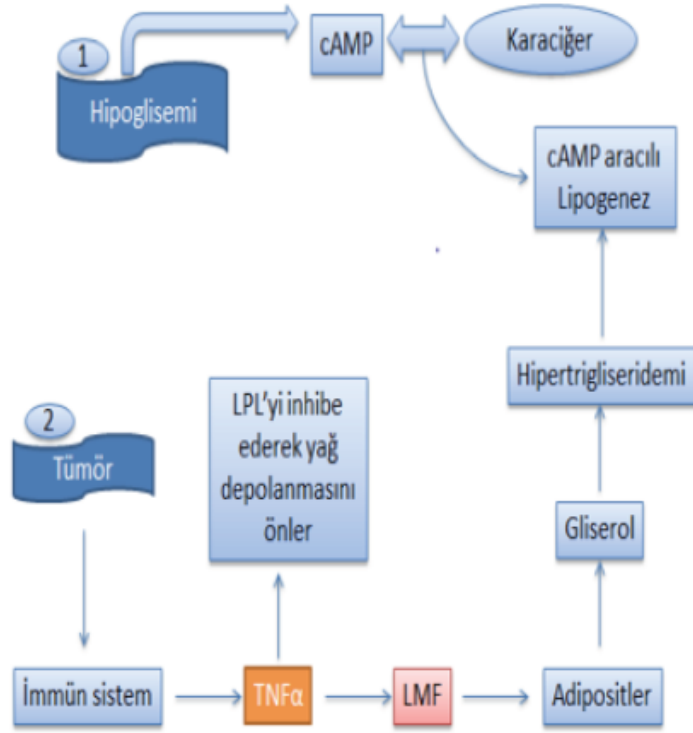
Şekil 2.5. Lipidlerin sindirimi. Kaynak: [72]

ApoC-II, lipoprotein lipazı aktive ederek çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) trigliseridlerinden serbest yağ asitlerinin salıverilmesine neden olur. Böylece

lipid içeriği gittikçe azalan VLDL'ler, yaklaşık olarak eşit miktarlarda trigliserid ve kolesterol içeren ara dansiteli lipoprotein (IDL) ve daha sonra düşük dansiteli lipoprotein (LDL) haline değiştirilirler. Lipoprotein lipaz (LPL) vasıtasıyla şilomikronlardan ve VLDL'lerden salıverilen yağ asitleri, yağ doku hücrelerinde trigliseridler (TG, triaçilgliserol) olarak depolanırlar [73].

2.4.2. Kanseri ve lipid ilişkisi

Kanserde meydana gelen lipid metabolizmasındaki değişiklikler en az diğer makro moleküllerde görülen değişiklikler kadar önem arz etmektedir. Kaşeksi yani beslenme işlevlerinin tümüyle bozulmasıyla ortaya çıkmakta olan kilo kaybının büyük çoğunluğu yağ dokusu kaybına bağlıdır. Açlık, yetersiz besin alımının uzaması, glukoz kullanımı yetersizliği, adrenalini ve büyüme hormonlarının sekresyonuna bağlı olarak plazma serbest yağ asidi (FFA) konsantrasyonu artış gösterir. Yağ mobilizasyonunun artışı kanserde, yağ asidi metabolizmasında hiperaktiviteye sebebiyet verir. Tümör varlığında lipid metabolizmasında gözlemlenen diğer bir değişiklik ise, total kolesterolün, özellikle de LDL-kolesterolün azalmasıdır. Bu değişikliğin nedeni kanserli hücre membranında LDL reseptör ekspresyonunun artmasına bağlı olarak LDL klirensinin artışıdır [75].



Şekil 2.6. Tumor varlığında lipid metabolizmasındaki değişiklikler. Kaynak: [75].

Ayrıca kanserde normal dokularda olmayan, atipik lipidler sentezlenir. Bunlar:

- Dezmosterol: Kolesterol sentezinde bir ara üründür, normalde sadece fetus beyinde tespit edilmiştir. Glioblastomalı hastaların beyinde miktarının artış gösterdiği gözlemlenmiştir.
- Fukolipid: Fukoz (= metil pentoz) içeren lipid olan fukolipid, fukoz adenokarsinomların tanısında tumor belirteci olarak kullanılmaktadır.
- Bunların haricinde kanserde sentezi tamamlanmamış, farklı karbonhidrat dizilimleri olan, artmış çift bağ içeren ya da anormal uzunlukta glikosfingolipid sentezi de görülebilmektedir.

Sialik asid, nörominik asitin asetillenmiş türevi olup, doku ve hücrelerin yapısal bileşenidir. Karbonhidrat dizilimindeki farklılıklar sialik asidin glikoproteinlere bağlanmasını etkilemektedir. Yapılan çalışmalar sayesinde kanser evresi ile özellikle metastaz varlığı ile serum sialik asit düzeyi arasında çok güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [75].

2.5. Antimetabolit ilaçlar

Antimetabolitler hücre döngüsüne bağımlı olan ilaçlardır ve prensip olarak S-fazna özgüdürler. Etkilerini DNA sentezi üzerinde gösterirler. Bu ajanlar genellikle alkilleyici ajanlar ile birlikte kullanılmaktadır. Baş ve boyun karsinomlarına karşı, akciğer, meme ve bağırsak kanserlerine karşı, osteojenik sarkom, koryokarsinom ve lösemiye karşı etkilidirler [76]. En önemli toksik etkilerini kemik iliği ve bağırsak mukozası üzerinde göstermektedir. Fetüse, gebeliğin tüm dönemlerinde zararlı etki yapmakla birlikte kemik iliği baskılanması, bulantı ve kusma yaygın olarak görülen advers etkileridir [76, 77].

2.5.1. 5-fluorourasil

Floranmış bir pirimidin analogu olan 5-fluorourasil hücrede timin sentezini bozmak suretiyle DNA sentezini durdurmakla birlikte RNA yapısına katılarak protein sentezini de bozmaktadır. Fluorourasil çoğalan hücrelerde daha toksik etki göstermektedir. Ayrıca folinik asit 5-FU'in etkisini artırmaktadır. Başta kolorektal kanser ve meme kanseri olmak üzere over, uterus serviksi, mesane, baş ve boyun, prostat, erndometriyum, pankreas, mide ve karaciğer kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır [77].

5-fluorourasilin yağlar ile sinerjistik etkileşimlerine bakılacak olursak; omega 3 yağ asitlerinin kolon kanseri hücre dizisi olan Caco-2 üzerinde apoptozu uyardığını ve kanserli hücreler üzerinde 5-FU'in etkisini belirgin biçimde arttırdığı gözlemlenmektedir. Yine kolon kanseri dizisi olan Caco-2 hücre kültürü üzerinde yapılan çalışmalarda bitkisel kaynaklı lipid olan geraniol'un 5-FU etkisini arttırdığı ve bununla beraber 5-FU'in hücre içinde akümülyasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Deney hayvanları kullanılarak yapılan prelinik bir çalışmada ise balık yağları 5-FU ile kombine edilmiş ve bu çalışmada sazan ve tuna kaynaklı balık yağları kullanılmıştır. Başka bir çalışmada ise sarkom 180 taşıyan fareler kullanılırken, bu çalışmalar sonucunda her iki yağ, yan etkiyi arttırmadan 5-FU etkinliğini arttırmışlardır [78].

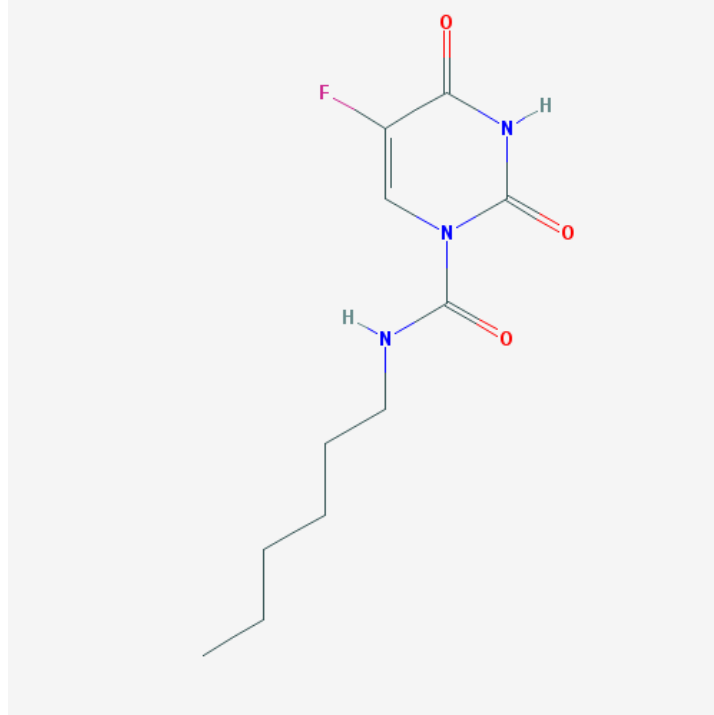
2.5.2. Karmofur

Karmofur (1-heksilkarbamoyl-5-fluorourasil, HCFU, Mifuro), antineoplastik bir madde olarak yaygın olarak kullanılan 5-fluorourasilin maskelenmiş formlarından biridir. Karmofur molekülü, taşınım biçimi olarak 5-fluorourasil ve heksil karbamoyl ikame edicisinin aktif bir çekirdeğini içerir ve 5-FU'nun hücrenin içine nüfuz etmesine yardımcı olur [79].

2.5.3. Karmofurun genel özellikleri ve kullanım alanları

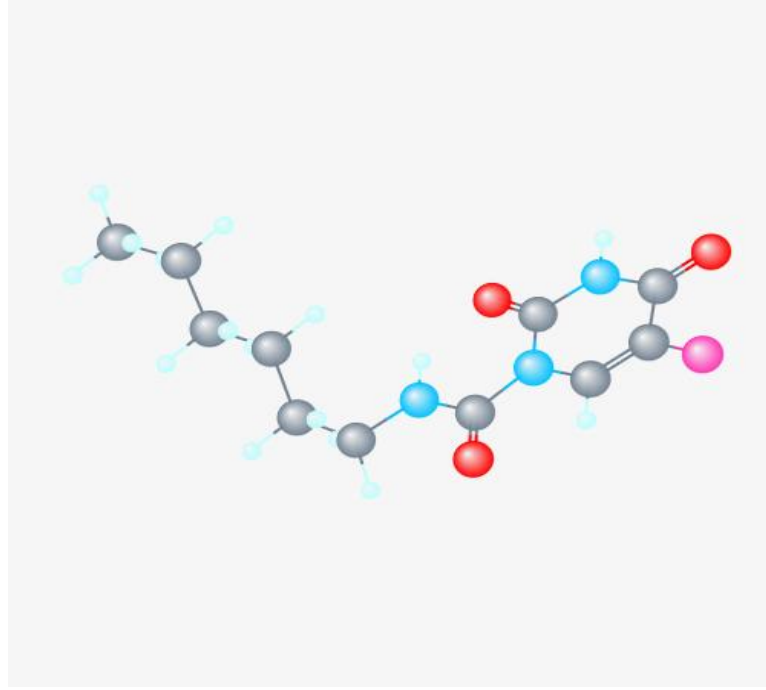
2.5.3.1. Karmofurun fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül formülü, $C_{11}H_{16}FN_3O_3$ şeklinde olan Karmofurun molekül ağırlığı, 257.265 g/mol'dür. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ismi 5-fluoro-N-hexyl-2,4-dioxopyrimidine-1-carboxamide ve tanımlı eş anlamları 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil, HCFU, Mifuro ve N-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil'dir [80].



Şekil 2.7. Karmofurun iki boyutlu yapısı. Kaynak: [80].

Formülü kristal halinde bir katı madde olan Karmofur -20°C 'de saklanmaktadır ve erime noktası 283°C 'dir [81]. Karmofurun yağda yüksek miktarda çözünme özelliği olmakla birlikte 5-fluorourasile ait olan fiziko-kimyasal özelliklere de sahiptir [82].



Şekil 2.8. *Karmofurun 3D yapısı. Kaynak: [80].*

Antineoplastik bir ilaç olan karmofur, güçlü bir asit seramidaz inhibitörüdür ve bu özellik, anti-proliferatif etkileri için esastır. Karmofur'un kimyasal iskeletindeki değişiklikler, kanser hücre çoğalmasını önlemek için standart antitümöral ilaçlarla sinerjik olarak hareket eden yeni asit seramidaz inhibitörlerini üretir [83]. Karmofur, fluorourasil'in bir pirimidin benzeri ve türevi olduğundan tıpkı onun gibi antikanser kemoterapötik ve anti-metastatik aktiviteler sergilemektedir [84].

2.5.3.2. Karmofurun kullanım alanları

Dünyada yapılan çalışmalarda, oral olarak uygulanan karmofur'un, enzimatik olarak veya enzimatik olmayan bir şekilde insan vücudundaki 5-FU'ya dönüştürüldüğü ve antitümör etkisini uyguladığı rapor edilmiştir. Tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon şeklinde kullanılan oral karmofur, küratif olarak rezekte edilen kolon kanseri hastaları için adjuvan kemoterapi olarak kullanılmıştır [85]. Karmofur,

kolorektal kanserin adjuvan tedavisinde kullanılmasının dışında göğüs ve yumurtalık kanserlerinin tedavilerinde de kullanılmaktadır. Karmofur, lökoensefalopati dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozuklukların gelişimleri ile ilişkilendirilmiştir [86]. Sürekli uygulama sırasında karmofur ve onun metabolitleri kademeli bir şekilde beyinde birikmekte ve çok yavaş biçimde çıkarılmaktadır. Bununla birlikte karmofur, 5-FU nörotoksitesine benzer bir beyincik sendromu ile beraber şiddetli lökoensefalopati üretebilme yeteneğine sahiptir [87].

2.5.4. Karmofur ve kanser ilişkisi

Karmofurun kanser ile ilişkisini belirlemek ve kanser tedavisi uygulamaları için pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Asit seramidazın ekspresyonu, insanda meydana gelen kanser tiplerinde yukarı yönlü düzenlenmekte ve kanser tedavisi için ilginç bir farmakolojik hedef meydana getirmektedir. Bir anti kanser ilacı olan karmofur diğer bir ismiyle 1-heksilkarbamoil-5-fluorourasil'in güçlü bir asit seramidaz inhibitörü olduğu ve bu mekanizmanın anti-kanser özelliklerine çeşitli katkılar bulunabileceği bildirilmektedir. Çeşitli kanser hücre dizilerinde (SW403 ve LNCaP dahil) yapılan çalışmalar, karmofurun asit seramidaz aktivitesini inhibe ettiğini ve sağlam olan hücrelerdeki seramid seviyelerini artırmakta olduğunu göstermektedir. Bunun dışında, fareler üzerinde yapılan araştırmalarda, karmofurun in vivo olarak uygulanması, çeşitli organ ve dokulardaki seramid seviyelerinde artış ve beraberinde asit seramidaz aktivitesinin zaman ve doza bağlı olarak inhibisyonu ile neticelenmiştir [88].

Pro-apoptotik lipid seramidi hidroliz eden bir sistein amidaz olan asit seramidaz'ın ifadesi, birçok insan tümöründe anormal seviyede yüksektir ve görülen bu yüksek seviye kemorezistans rolüne işaret etmektedir. Bununla birlikte, mevcut asit seramidaz inhibitörleri, bu işareti desteklemek için gerekli potansi ve ilaca benzerlikten yoksundur. Klinik araştırmalarda kolorektal kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaç olan karmofur'un güçlü bir asit seramidaz inhibitörü olduğunu ve bu özelliğin anti-proliferatif etkileri için şart olduğunu göstermektedir. Karmofur'un kimyasal iskeleti üzerindeki değişiklikler, kanser hücre çoğalmasını önlemek amacıyla standart antitümöral ilaçlarla sinerjik olarak hareket eden yeni asit seramidaz inhibitörlerini üretmektedir. Yapılan araştırmalarda elde edilen bulgular karmofur için beklenmedik bir hedef olarak asit seramidazı belirtir ve bu molekülün yeni kemosenitizasyon ajanlarının tasarımında

başlangıç noktası olarak kullanılabileceğini önermektedir. Bununla birlikte kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan karmofur'un in vivo aktif intraselüler asit seramidaz aktivitesi inhibitörü olduğu da gösterilmektedir. Ayrıca, asit seramidaz inhibisyonunun karmofurun anti-proliferatif etkilerinde önemli bir rol oynadığını ve bu molekülün kimyasal iskeletindeki değişikliklerin kanser hücresi çoğalmasını önlemek amacıyla standart antitümöral ilaçlar ile sinerjik olarak hareket eden yeni asit seramidaz inhibitörlerini ürettiğini göstermektedir [83].

2.6. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite, moleküler olaylar neticesinde çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve dolayısıyla hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarların ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır [89]. Bir başka deyişle sitotoksisite, hücrenin aktivitesinin geri dönüşümsüz şekilde durdurulması ve hücre yapısının onarılamaz bir biçimde bozulduğunu ifade eder [90].

Sitotoksisite testlerinde hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in-vitro olarak değerlendirilmektedir.

Sitotoksisite testleri:

- Hücre canlılığı ve ölümü
- Hücre membranı
- Hücre organelleri
- Protein veya DNA sentezi
- Hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler verir. Testi yapılacak olan materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile temas yöntemi önem arz etmektedir. Hücre ile materyalin temas şekilleri direkt, indirekt veya ekstrakt yolu ile olabilmektedir [89].

Sitotoksisite değerlendirme yöntemleri dört başlık altında incelenebilir. Bunlar:

- Canlılık (viability) değerlendiren testler: kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.

- Yaşam (survival) değerlendiren testler: uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
- Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler.
- Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleri [89].

Sitotoksisite testleri:

- Tripan Mavisi (Trypan Blue Exclusion)
- MTT, XTT, WST
- Nötral Kırmızı Alımı (Neutral Red Uptake)
- Sülförödamın B (Sulförödamine B)
- Laktat Dehidrojenaz (Lactate Dehydrogenase) testleridir [90].

Sitotoksisitenin değerlendirilmesi konusunda yapılan çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan, enzimatik bir test olan MTT (tetrazolium tuzu 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testidir. MTT yöntemi sayesinde hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntem ile kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu test yöntemi, sağlam olan hücrelerdeki mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanarak çalışmaktadır [92].

2.6.1 MTT kolorimetrik sitotoksisite testi

Kolorimetrik MTT (3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) testi sitotoksisite değerlendirmelerinde çok sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, MTT'yi mavi-mor, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrojenaz enzim aktivitesini ölçmektedir ve uygulanan yöntemin ana ilkesi sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesidir. Frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrojenaz enziminin aktivitesine bağlı olan bu reaksiyonda uygulanan materyalin sitotoksik etkisi sebebiyle hücrede dehidrojenaz aktivitesinin etkilendiği hallerde mavi-mor renkli formazan oluşmamaktadır, bununla birlikte tetrazolium halkasının parçalanması neticesinde sarı renkli MTT boyası mavi-mor formazan ürününü oluşturmakta, sonuç olarak yalnızca aktif mitokondrinin mevcut olduğu canlı ve mitokondri fonksiyonları bozulmamış hücrelerde görülmektedir. Yani ölü ya da mitokondri fonksiyonlarında bozukluk olan hücreler boya ile boyanmamaktadır. MTT yöntemi ile hücrelerin MTT boyası

kullanılarak yapılan inkübasyonu, prensip olarak reaksiyon ürününün çözünür duruma getirilmesi ve reaksiyon sonucu oluşan ürünün kolorimetrik ölçümü basamaklarından meydana gelmektedir [89,91].

2.7. Katı Lipid Nanopartiküller

Bilindiği üzere birkaç kanser türü haricinde sitotoksik ilaçlar kemoterapide önemli bir yer tutmaktadır. Sitotoksik ilaçlar, hızlı bir şekilde büyüme ve bölünme gösteren hücrelerde toksik etki meydana getirip hücreyi öldürmeyi ya da hücre fonksiyonlarını durdurmayı amaçlamaktadır. Bu ilaçların yan etkilerinin oluşmaması için çeşitli çözümler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu çözümlerden ve umut vaat edenlerden biri de nanotaşıyıcılardır. Antikanser ilaç taşımada yeni bir yaklaşım olması ve sahip olduğu çeşitli avantajlar dolayısıyla katı lipid partiküller (KLN) ön plana çıkmaktadır. Bunlar, 50-1000 nm arasında değişmekte olan, oda ve vücut sıcaklığında katı hal ve lipid yapısında bulunan parçacıklardır [92].

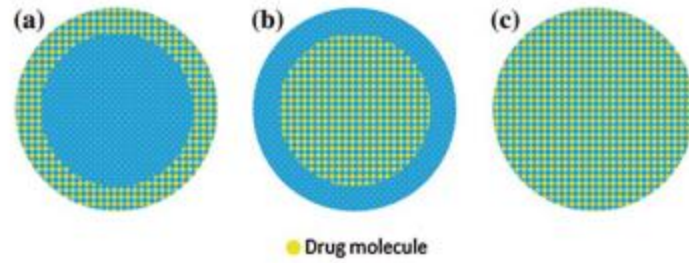
Günümüzde kontrollü etkin madde salınımı amacıyla yaygın vaziyette araştırması yapılan kolloidal taşıyıcıların (polimerik nanopartiküller, lipozomlar, yağ emülsiyonları vb), kendilerine has avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Polimerik nanopartiküller göreceli olarak yavaş degradasyona uğramaları, endüstriyel anlamda üretimleri için bir yöntemin olmaması bununla beraber üretimlerinden kaynaklanan toksik organik çözücü kalıntıları, ve otoklav ile sterilizasyon edilememesi gibi dezavantajları bulunurken; lipozomların da, düşük fiziksel-kimyasal stabilitesinin bulunması ve büyük ölçekte üretim yapılabilmesi için uygun yöntemin olmaması gibi, piyasada az sayıda lipozomal ilaç formülasyonunun yer almasına sebebiyet veren çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Büyük ölçekli üretim yapılabilmesine imkan tanıyabilecek uygun yöntemler olmasına rağmen, yağ emülsiyonları taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında, sıvı yağ damlacıklarının içerisinde etkin maddenin dağılması sebebiyle etkin madde salınımı çok hızlı görülmektedir. Son 10 yıldan beri, katı lipid nanopartiküllerin (KLN) diğer kolloidal taşıyıcı sistemlere alternatif bir ilaç taşıyıcı sistem şeklinde kullanımları için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Farklı kolloidal taşıyıcıların avantajlarını bir arada barındıran ve dezavantajlarını ortadan kaldıran KLN'lerin, kolloidal taşıyıcı sistem olarak kullanımları hızla artan bir ilgi görmektedir [93].

2.7.1. Katı lipid nanopartiküllerin yapısı

KLN'lerin, ilaç molekülünün bulunduğu yere göre üç farklı morfolojisi vardır.

- İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli
- İlaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli
- Homojen matris modeli.

Bu yapılar, Müller ve ark. tarafından gözlemlenen sonuçlara dayanılarak belirtilmiştir [94].

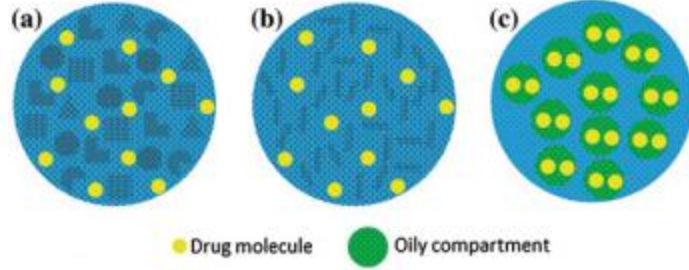


Şekil 2.9. Katı lipid nanoparçacıkların ilaca dahil edilmiş modelleri: (a) İlaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli. (b) İlaç ile zenginleştirilmiş çekirdek modeli. (c) Katı çözelti (homojen matris) modeli. Kaynak: [94].

- İlaçla Zenginleştirilmiş Kabuk Modeli.

Sertleşmiş bir kabuk, ilaç ile zenginleştirilmiş bir dış kabuk ile kaplı bir lipid çekirdeğidir. Böyle bir yapı, sıcak sıvı damlacıklarının, faz ayrımı sonucunda lipid nanopartiküllerini oluşturmak üzere hızla soğumasıyla elde edilir. İlaç zenginleştirilmiş kabuk morfolojisi, üretim sırasında ve soğutma aşamasında ortaya çıkan ilacın yeniden bölünmesi ile oluşan bir lipid çökeltme mekanizması ile açıklanabilir. Sıcak homojenizasyondan sonra, her damla erimiş lipid ve ilacın bir karışımıdır. Hızlı soğutma, çekirdekteki lipid çökeltisini hızlandırır ve bununla birlikte dış sıvı lipiddeki ilaç konsantrasyonunda bir artış olur. Tam soğutma, bir ilaçla zenginleştirilmiş kabuğun çökmesine neden olur. Bu yapısal model, patlamış olarak bırakılan ilaçların dahil edilmesi için uygundur. Böyle bir hızlı salınım, KLN'nin oklüzif etkisine ilaveten artmış ilaç penetrasyonu gerektiren dermatolojik KLN formülasyonları için oldukça arzu edilir.

Topikal bir KLN formülasyonundan klotrimazolün kontrollü salımı, ilacın zenginleşmiş kabuk yapısından kaynaklanmıştır [94].



Şekil 2.10. Nanoyapılı lipid taşıyıcıların ilaç katılma modelleri: (a) Tip I veya kusurlu kristal türü nanolipid taşıyıcı. (b) Tip II veya çoklu tip nanolipid taşıyıcı. (c) Tip III veya amorf tip nanolipid taşıyıcı. Kaynak: [94].

- İlaç Zenginleştirilmiş Çekirdek Modeli.

İlaç bakımından zenginleştirilmiş çekirdek modeli, ilaçla zenginleştirilmiş kabuk modeli için tarif edilenin aksine yeniden kristalleştirme mekanizması olduğunda elde edilir. Şekil 2.10. ilaçla zenginleştirilmiş çekirdek modelinin şematik bir temsilini göstermektedir.

Bu morfoloji, ilacın lipitten önce kristalleşme eğilimi olduğunda elde edilir. İlaç, lipid eriyik içinde doymuş çözünürlüğüne yakın bir şekilde çözünür hale getirilir. Lipid emülsiyonunun daha sonra soğutulması, lipid eriyiği içindeki ilacın aşırı doyumuna neden olur. Bu lipidin yeniden kristalleşmeden önce ilacın tekrar kristalleştirilmesine yol açar. İlave soğutma, hali hazırda kristalize edilmiş ilaçla zenginleştirilmiş çekirdek etrafında bir zar oluşturan lipidin yeniden kristalleşmesine yol açar. Bu yapısal model, Fick'in difüzyon kanununa tabi olarak, belirli bir süre boyunca uzatılmış salınım gerektiren ilaçlar için uygundur [94].

- Homojen Matriks Modeli (Kati Çözüm Modeli)

Homojen matriks modeli olarak da anılan katı solüsyon modeli, ilaç molekülleri ya da amorf kümelerdeki lipid matrisi içinde homojen olarak dağıtıldığında elde edilir. Bu model genellikle soğuk bir homojenizasyon tekniği ile hazırlanan lipit nanoparçacıklar için veya yüksek oranda lipofilik ilaçlar katılarak hazırlanan sıcak homojenizasyon

tekniki ile tanımlanır. Bununla birlikte, yüzey aktif maddeler veya ilaç ile çözünür moleküller olmadan kullanılabilir.

Soğuk bir homojenizasyon tekniği kullanıldığında, çözündürülmüş ilaç, lipid yığınında dağıtılır. Yüksek basınçlı homojenizasyona maruz bırakıldığında, mekanik ajitasyon, homojen bir matrise sahip lipid nanopartiküllerinin oluşumuna neden olur.

Sıcak bir homojenleştirme tekniği ile üretilen lipid damlacıkları hızla soğutulduğunda da benzer bir sonuç elde edilir; Damlacıklar kristalleşir ve ilaç ile lipid arasında faz ayrımı olmaz. Bu tür modeller, parçacıklardan uzatılmış salınım gösteren ilaçların dahil edilmesi için uygundur (Muchow Et al. 2008). Böyle bir modelin bir örneği, prednizolon yüklü bir KLN sistemidir ve prednizolonun yavaş salımı, genellikle 1 gün ile 6 hafta arasındadır (Jenning ve Gohla 2000) [94].

2.7.2. Katı lipid nanopartiküllerin kullanım alanları

1991'de piyasaya sürülen katı lipid nanopartikülleri (KLN), emülsiyonlar, lipozomlar ve polimerik mikro ve nanoparçacıklar gibi koloidal taşıyıcıları geleneksel yapılara alternatif bir taşıyıcı sistem oluşturmaktadır. Katı lipidlerden yapılmış nanoparçacıklar alternatif bir partiküllü taşıyıcı sistem olarak önerildikleri intravenöz uygulamalar için yeni kolloid ilaç taşıyıcısı olarak dikkat çekmektedir. KLN, küçük boyut, geniş yüzey alanı, yüksek ilaç yüklemesi ve ara yüzdeki fazların etkileşimi gibi benzersiz özellikleri sunar ve farmasötiklerin performansını artırma potansiyeli açısından caziptir [95]. KLN'ler, kozmetik uygulamalarda kullanılmak üzere umut verici taşıyıcılar olmalarını sağlayan çeşitli özelliklere sahiptirler. Bu özellikler, Retinol ve α -tokoferol gibi stabilitesi iyi olmayan bileşikleri kimyasal bozunmalara karşı korumaktadırlar. Üretilen KLN'nin türüyle birlikte, kozmetik aktif bileşenlerin kontrollü salınımını sağlamaktadırlar. Deriye uygulandıklarında bir film tabakası oluşturarak örtücü etki göstermektedirler. UV bloke edici özellikleri vardır. Partiküler özellikleri sebebiyle UV ışığını etkili bir biçimde yansıtarak, fiziksel güneş filtresi (sunscreen) olarak rol oynarlar. Ayrıca, moleküler güneşten koruyucu ajanlar için taşıyıcı olarak kullanılabilirler. Bu, uzun süreli stabil formülasyonların kazanılmasını sağlar. Ayrıca UV bloke edici etkinin artış göstermesine ve formülasyondaki güneşten koruyucu madde konsantrasyonunun düşürülmesine olanak sağlarlar [93]. Diş hekimliğinde, protez yapım

materyalleri içinde gümüş nanopartikülleri kullanılarak antibakteriyel etki sağlanmıştır ve protez stomatitisini önlemek için potansiyel bir yaklaşım olabileceği ileri sürülmüştür. Bunun dışında nanopartikül dolduruculu dental kompozitler diş dokusuna adezyonu ve materyalin kırılma dayanıklılığını artırmıştır. Diş hekimliğinde, implant uygulamaları için, karbon nanotüpler titanyum implantların yüzeyini kaplama amacıyla kullanılabilir. Yumuşak astar materyallerine antifungal etki göstermesi için belirli konsantrasyonlarda gümüş nanopartikülleri ilave edilmiştir. Nanopartiküller diş hekimliğinde lokal anestezi amacıyla da kullanılmaktadır. Milyonlarca aktif analjezik mikron boyutlu süspansiyon hastanın diş etine aşılabilir ve nanorobotlar gingival sulkus, lamina propia, dental tübüller vasıtasıyla pulpaya ulaşmaktadır. Diş hassasiyetini azaltmak amacıyla analjezik dental robotlar pulpaya aşılabilir [96].

2.7.3. Katı lipid nanopartiküllerin avantajları ve dezavantajları

KLN'ler; lipozomların, emülsiyonların ve katı partiküllerin temin ettiği avantajların birleşimini ihtiva etmektedirler. Düşük sitotoksikite ve düşük sistemik toksisite içermeleri bununla birlikte organik çözücü kalıntılara sahip olmamaları, büyük ölçekte üretim alanlarının olanaklar dahilinde olması gibi yağ emülsiyonlarının avantajlarını taşımakla birlikte dokulara etkin maddelerin hedeflenebilmesi gibi lipozomların avantajlarını da bulundurmaktadır, bunların dışında katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarına da sahiptir, bunlar; katı lipid matrisleri vasıtasıyla etkin maddenin kontrollü bir şekilde salımı ve etkin maddelerin kimyasal bozunmaya karşı korunması olarak belirtilmektedir [93].

KLN'lerin avantajları özetlenecek olursa:

- KLN'ler koloidal büyüklüğe sahiptirler.
- Lipofilik ve hidrofilik etkin maddeler hapsedilme özellikleri mevcuttur.
- Sulu dispersiyonları uzun süre stabil kalabilmektedir bununla beraber alternatif olarak, dondurma veya püskürtme şeklinde kurutma uygulanabilmektedir.
- Hazırlama esnasında fizyolojik bileşiklerin kullanılmasından dolayı toksikolojik olarak kabul edilebilmektedirler.

- KLN'ler ile etkin maddenin kontrollü salımı sağlanabilmektedir.
- Otoklav veya gama ışınları vasıtasıyla sterilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir.
- Organik çözücülerin üretimde kullanılmaması sebebiyle, organik çözücü kalıntısı ihtiva etmemektedir.
- Endüstriyel ölçekte üretimleri olanak dahilindedir.
- Yüzey özelliklerinde görülen modifikasyonlar ile belirli dokulara ilaç hedeflemesi sağlanabilmektedir.
- Etkin madde çevresel etkenlerden korunmakta ve aynı zamanda stabilitesi de artırılmaktadır.
- Ekonomik anlamda kabul edilmekte olan bir taşıyıcı sistemdir [93].

KLN'lerin Dezavantajları:

KLN'lerin pek çok avantajları olmasına rağmen, KLN'lerin kullanımlarını sınırlamakta olan bazı faktörler de mevcuttur:

- Etkin madde yükleme kapasiteleri nispeten düşüktür.
- Saklama esnasında görülebilen polimorfik geçişler sebebiyle, etkin madde taşıyıcıdan dışarıya sızabilmektedir.
- KLN dispersiyonlarının su içerikleri nispeten (%70 – 99.9) yüksektir.
- Ortamda farklı kolloidal yapılar da mevcut olabilir [93].

2.7.4. Katı lipid nanopartiküllerin sentezlenmesi

KLN'ler katı lipid, emülgatör ve su / çözücüden meydana gelmektedir. Kullanılan lipidler trigliseridler (tri-stearin), kısmi gliseridler (Imwitor), yağlı asitler (stearik asit, palmitik asit), steroidler (kolesterol) ve mumlar (setil palmitat) olabilir. Çeşitli emülsiyon yapıcılar ve bunların kombinasyonu lipid dispersiyonunu stabilize etmek için kullanılmaktadır. Emülgatörlerin kombinasyonu parçacık yığılmayı daha etkin bir şekilde önleyebilmektedir ve KLN'lerin belli bir avantajı, lipid matrisinin akut ve kronik toksisite tehlikesini azaltan fizyolojik lipidlerden yapılmış olmasıdır. Emülgatörün seçimi,

parenteral uygulama için uygun emülgatörün uygun bir miktarı ile uygulama yoluna bağlıdır. Nanopartikül sentezleme yöntemleri ile ilgili olarak pek çok sentezleme yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler, yüksek basınçlı homojenizasyon (sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon), mikroemülsiyon, çözücü emülsifikasyon- evaporasyon/çözücü difüzyon ve yüksek hızda karıştırma ya da ultrasonikasyon yöntemleridir [97].

2.7.4.1. Katı lipid nanopartiküllerin sentez yöntemleri

2.7.4.1.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemleri

Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH), KLN üretimi için güvenilir ve etkili bir yöntemdir. Yüksek basınçlı homojenizatörler, birkaç mikron genişlikteki dar bir delikten, yüksek bir basınç ile birlikte (100-2000 bar) sıvıyı itmektedirler. İtilen sıvı, çok kısa bir mesafede çok yüksek bir hıza (1000 km/saat'in üzerinde) ulaşmaktadır. Yüksek bir kayma stresi (gerilimi) ve kavitasyon kuvvetleri, partikülleri mikron altında büyüklükteki parçalara ayırmaktadır. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon olarak iki şekilde uygulanabilmektedir [93].

- Sıcak Homojenizasyon:

Sıcak homojenizasyon, lipidin erime noktası üzerinde görülen sıcaklıklarda gerçekleşmektedir bundan dolayı emülsiyonun homojenizasyonu olarak değerlendirilebilmektedir. Etkin madde, erime noktasının 5-10 °C üzerindeki bir sıcaklıkta eritilmiş olan lipid içinde çözülür ya da disperse edilir. Etkin madde ihtiva eden erimiş lipid, aynı sıcaklıktaki sulu emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızda karıştırma ile disperse edilir. Elde edilen sıcak pre-emülsiyon homojenizatörden geçirildikten sonra oluşan sıcak Y/S nanoemülsiyonu oda sıcaklığına soğutulmaktave bu şekilde lipid katı hale gelmektedir (rekristalize olur) sonuç olarak katı lipid nanopartiküller elde edilmektedir. Bununla beraber, kısa zincirli yağ asitlerinden meydana gelen ya da erime noktası düşük (oda sıcaklığına çok yakın) olan gliseridler kullanıldığında, rekristalizasyonun başlatılabilmesi için, nanoemülsiyonların daha düşük sıcaklıklara kadar soğutulması gerekebilir. Rekristalizasyon, liyofilizasyon uygulaması ile de başlatılabilmektedir. Partikül büyüklüğünün küçük oluşu ve emülgatör bulunması sebebiyle, lipid rekristalizasyonu fazla gecikebilmekte bundan dolayı da ürün, uzun aylar

süresince aşırı soğutulmuş bir karışım (supercooled melt) olarak kalabilmektedir. Sıcak homojenizasyon yöntemi, sıcağa karşı hassasiyetleri düşük olan etkin maddeler için uygundur. Bunun sebebi, yüksek sıcaklığa maruz kalınan sürenin daha kısa olmasından kaynaklanır. Fakat, yüksek sıcaklığa karşı aşırı hassasiyet gösteren bileşikler ve hidrofilik özelliği bulunan etkin maddeler için soğuk homojenizasyon metodu kullanılabilir [93].

- Soğuk Homojenizasyon:

Etkin maddenin içerisinde çözüldüğü ya da disperse edildiği erimiş haldeki lipid, kuru buz veya sıvı nitrojen vasıtasıyla hızlı bir şekilde soğutulmaktadır. Katı lipid, yaklaşık olarak 50 – 100 µm boyutundaki lipid mikropartiküllere küçültülmektedir. Katı lipid mikropartiküller, soğuk emülgatör çözeltisinde disperse edilmekte ve oluşturulan presüspanسیون, oda sıcaklığında ya da oda sıcaklığından daha düşük sıcaklıkta yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilmesi sonucunda katı lipid nanopartiküller meydana getirilmektedir. Soğuk homojenizasyon metodu, sıcak homojenizasyon metodunda ortaya çıkan; sıcaklıkla etkin madde degradasyonunun indüklenmesi, homojenizasyon esnasında etkin maddenin sulu fazda dağılması, nanoemülsiyonun lipid rekristalizasyonunun zorluğu gibi sorunlar ile baş edilmesi için geliştirilmiştir. Bu iki homojenizasyon yöntemi de, %40'a kadar olan lipid konsantrasyonlarında uygulama yapmak için elverişlidir ve genel anlamda, dar partikül büyüklüğü dağılımlarını vermektedir [93].

2.7.4.1.2. Mikroemülsiyon yöntemi

Mikroemülsiyonların dilüsyonuna dayanan bir KLN hazırlama yöntemi Gasco ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Mikroemülsiyon yönteminde ilk olarak, lipid (yağ asitleri veya gliseridler) eritmekte, daha sonra su, emülgatör ve koemülgatör karışımı, lipid ile eşit sıcaklığa sahip olacak biçimde ısıtmakta ve erimiş lipid içerisine eklenip karıştırılmaktadır. Bu maddeler, mikroemülsiyon oluşması amacıyla belirli oranlarda karıştırıldığı zaman, transparan ve termodinamik olarak stabil bir sistem kazanılmış olur. Meydana gelen sıcak ya da ılık mikroemülsiyon, özel bir şekilde geliştirilen termostatlı şırınga vasıtasıyla aşırı miktardaki soğuk su (2–3 °C) içerisinde mekanik bir karıştırma yoluyla disperse edilir. Sıcak mikroemülsiyonda soğuk suyun hacim oranı, 1:25 ile 1:50

arasında değişebilmektedir bununla birlikte fazla su, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon ile uzaklaştırılmaktadır [93].

2.7.4.1.3. Çözücü emülsifikasyon-eyaporasyon veya çözücü difüzyon yöntemi

Çözücü emülsifikasyon-eyaporasyon yönteminde; lipid, su ile karışmayan organik bir çözücüde (toluen, kloroform vb) çözülür. Bu çözelti, bir sulu faz içerisinde emülsifiye edilir ve çözücünün vakum altında buharlaştırılması ile, lipid nanopartikülleri meydana gelerek çökme oluşur. Hazırlama sırasında ısı uygulanmaması bu yöntemin sağladığı bir avantajdır. Bu sebeple, yüksek sıcaklık altında bozulan etkin maddelerin yüklenmesi için elverişli bir yöntemdir. Yöntemin avantajı olduğu gibi dezavantajı da vardır, bu da, organik çözücünün kullanılması gerekliliğidir. Bununla birlikte, bu yöntemle üretim yapılması scaling up işleminin yapılmasında da sorunları beraberinde getirmektedir. Bu metod ile meydana getirilen ürünün ortalama partikül büyüklüğü, organik fazdaki lipidin konsantrasyonuna bağlıdır. Çözücü difüzyon yönteminde; su ile kısmen karışmakta olan çözücüler (benzil alkol, etil format vb) kullanılmaktadır. Lipid, su ile doyurulmuş çözücüde çözülmekte ve fazla sıcaklıktaki, çözücü ile doyurulmuş sulu emülgatör çözeltisi ile emülsifiye edilmektedir. Çok miktarda (1:5 – 1:10 oranlarında) su ilave edilmesinden sonra, organik çözücünün emülsiyon damlacıklarından sürekli faza difüzyon olması sebebiyle KLN'lerde çökme gözlenir. Epey seyreklik olan dispersiyon, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon uygulamasıyla konsantre edilmektedir. Trotta ve ark. (2003), çözücü difüzyon yöntemi ile düşük toksisitede oldukları kabul edilen çözücü ve emülgatörleri kullanarak, gliserin monostearat nanopartiküllerinin hazırlanabilirliği üzerinde araştırmalarda bulunmuşlardır. Benzil alkol veya bütillaktat ile emülsifikasyon difüzyon yöntemi uygulanarak katı lipid nanokürelerin üretilmesinin mümkün olduğunu göstermişlerdir [93].

2.7.4.1.4. Yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon yöntemi

Yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon yöntemlerinin her ikisi de, yaygın ve kolay bir şekilde kullanılmakta olan yöntemlerdir. Çoğunlukla bu iki yöntem birlikte kullanılmakla beraber belirli bir zaman boyunca yüksek sıcaklıklarda uygulanmaktadırlar. Yüksek hızda karıştırma yönteminde bulunan dezavantaj, mikrometre boyutuna ulaşabilen geniş partikül büyüklüğü dağılımlı ürün verebilmesidir.

Bu dezavantaj, saklama esnasında partikül büyümesi gibi fiziksel stabilite sorunlarına yol açmaktadır. İlave olarak, ultrasonikasyon yöntemi kullanıldığı takdirde, metal kontaminasyonunun göz önüne alınması gerekliliği belirtilmiştir.

KLN üretimi için, modifiye yüksek hızda homojenizasyon ve ultrason yöntemi Hou ve ark. (2003), tarafından geliştirilmiştir ve bu yöntem, organik çözücüye gereksinim duyulmadan yüksek kalitede KLN'lerin hazırlanması olanağını sunabilecek, etkin, basit, uygun ve bir yöntem olarak belirtilmiştir [93].

2.7.5. Katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyon metodları

Kalite kontrolünde KLN'lerin yeterli ve doğru karakterizasyonu gereklidir. Bununla birlikte, KLN'nin karakterizasyonu, parçacıkların koloidal boyutu ile sunum sisteminin karmaşıklığı ve dinamik yapısı nedeniyle ciddi bir soruna sahiptir. KLN'ler için değerlendirilen önemli parametreler arasında, partikül boyutu, boyut dağılım kinetiği (zeta potansiyeli), kristallik derecesi ve lipid modifikasyonu (polimorfizm), ilave koloidal yapıların (miseller, lipozom, süper soğutmalı eriyikler, ilaç nanopartikülleri) birlikte bulunması, dağıtım süreci zaman ölçeği, ilaç içeriği, in-vitro ilaç salınımı ve yüzey morfolojisi yer almaktadır [98].

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelin ölçülmesi:

Partikül büyüklüğü ve dağılımı, koloidal taşıyıcı sistemlerde en önemli fizikokimyasal özelliktir. Partikül büyüklüğünü ve dağılımını etkileyen önemli faktörlerden biri hazırlama yönteminin parametreleridir.

Basıncın ve devir sayısının artırılması ile partiküllerin büyüklüğünde azalma olduğu belirlenmiştir. Üretimde kullanılan emülgatörün tipi ve miktarı da, partikül büyüklüğünü etkilemektedir. Genellikle, emülgatör miktarını belirli bir orana kadar artırmak, ortalama partikül büyüklüğünü azaltmaktadır. Emülgatörler, KLN'lerin hazırlanması sırasında, damlacıkların yüzeylerini kaplayarak damlacık kümeleşmesini ve uzun dönemdeki partikül birleşmesini önleyecek mekanik veya elektriksel engel oluşturmaktadırlar. Damlacıkların stabilitesi yeterince sağlanabilirse, katılaştırma işleminden sonra elde edilen partiküllerin boyutu nanometrik aralıktadır. Partikül büyüklüğünün rutin ölçümleri için en güçlü yöntemler; foton korelasyon spektroskopisi

(PCS) ve lazer kırınımı yöntemi (LD)'dir. Coulter Counter yöntemi ise, kolloidal dispersiyonları destabilize edebilecek elektrolitlere ihtiyaç göstermesi ve küçük nanopartiküllerin değerlendirilmesindeki zorluklar nedeniyle, KLN'lerin partikül büyüklüğü ölçümünde nadiren kullanılmaktadır. KLN'lerin şekillerinin belirlenmesinde, diğer partiküler sistemlerde olduğu gibi, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve elektron mikroskobu kullanılabilir. Düz bir silikon yüzeye sabitlenen nanopartiküllerin şekilleri, AFM ile vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmektedir. Zeta potansiyelinin ölçülmesi, kolloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Ancak bu kural, sterik stabilizatörler içeren sistemler için tam olarak geçerli olmamaktadır. Çünkü, sterik stabilizatörlerin adsorpsiyonu, zeta potansiyeli azaltmaktadır [93].

Lipid matrisin yapısının (lipid modifikasyonunun) rekristallenme özelliklerinin ve diğer kolloidal yapıların değerlendirilmesi:

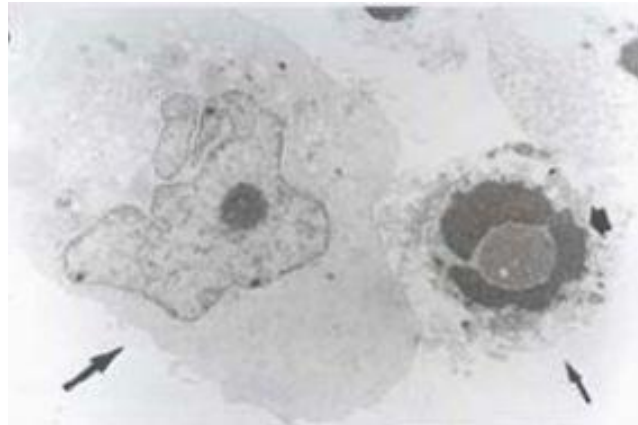
KLN kalitesini karakterize etmek için, partikül büyüklüğü analizi gereklidir; ancak, yeterli değildir. Lipid modifikasyonunun ve lipidin kristalinite derecesinin karakterizasyonu da önemlidir. Çünkü, bu parametrelerin yani lipid yapıdaki değişikliklerin saptanması, lipid matristeki etkin madde enkapsülasyonu ve etkin maddenin salım hızı ile son derece ilişkilidir. DSC ve X ışını kırınımı yöntemleri, lipidin durumunu araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipidlerin yapısal özelliklerini araştırmak için IR ve Raman spektroskopisi yöntemleri de kullanılmaktadır. Etkin maddenin fiziksel durumu ve yerleşimi de, DSC ve X ışını kırınımı cihazı ile analiz edilebilmektedir. Etkin madde içeriğinin lipidin kristal özelliklerine etkisi, özellikle X ışını kırınımı cihazı ile incelenebilmektedir. Farklı kolloidal türlerin tayini için, hazırlık adımları gerektirmeyen ve duyarlı yöntemler olarak, NMR ve Elektron Spin Rezonans (ESR) yöntemleri kullanılmaktadır. Her iki yöntemin de sisteme zarar vermemesi nedeniyle, aynı örnekten tekrarlanan ölçümler almak mümkün olmaktadır [93].

2.8. Apoptozis

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinmekte olan fizyolojik bir olaydır. Embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamının sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevlerini tamamlamış olan veya hasarlı halde bulunan hücreler apoptozis olayı ile genetik bir şekilde kontrol edilerek ortadan kaldırılmaktadır. Apoptozisin hızlandığı veya yavaşladığı durumlarda çeşitli hastalıklar oluşmaktadır. Apoptozis, klasik hücre ölüm şeklini niteleyen nekrozisten pek çok özelliği bakımından farklı bir hücre ölüm mekanizması olarak bilinmektedir. Nekrozis, fizyolojik ölüm şeklini ifade etmemesine rağmen, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda oluşabilmektedir. Apoptozis mekanizmasının tetiklenememesi veya mekanizmanın herhangi bir basamağında oluşan değişikliklerin tümör gelişimine katkı sağladığı bilinmektedir. [99].

2.8.1. Apoptozun morfolojisi

Apoptozisde gerçekleşen ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve sonrasında parçalara ayrılmasıdır. İmmun elektroforez gerçekleştirildiğinde 'ladder pattern' olarak adlandırılan merdiven biçiminde bir görünüm oluşmaktadır. Normal durumda bir hücrede birbirini takip etmekte olan 7 adet kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık olarak 300000 kırılma oluşmakta fakat hücre onarımı yapılamamaktadır.



Şekil 2.11. Normal hücre ve apoptotik hücre görünimleri

Kromatin, apoptozis halinde süperkondens bir hale geçerek nükleus zarı altında kresentik bir görünüm oluşturmaktadır. Floresan boyama uygulaması yapıldığında

DNA'da boncuklanma şeklinde bir görünüme meydana gelir, oluşan bu durumun nedeni DNA'nın endonükleaz ile özgül bir biçimde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. Hücreler apoptozisin erken evresinde birleşme bölgelerinden ayrılmakla birlikte özelleşmiş yüzey organellerini kaybetmekte ve belirgin bir şekilde büzülme göstermektedirler. Büzülme ile birlikte birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybetmektedirler. Bu durumun nedeni, plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarındaki aktivasyon durumunun bozulmasıdır. Apoptotik hücrelerin var olduğu dokulardan elde edilen kesitler ile yapılan çalışmalarda kesitler ışık mikroskopunda incelenmiş ve hücrelerin plazma membranında tomurcuklanmaların olduğu bununla birlikte hücrenin, sitoplazma ile çevrili olan kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalandığı belirtilmiştir ve bu anda hücre yaşamını halen sürdürmektedir. Apoptotik hücreler; komşu hücreler ve makrofajlar yoluyla tanınmakta ve fagosite edilmektedir. Plazma membranında görülen değişiklikler ile apoptotik hücreler tanınırken, normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimi ile membranın dış tabakasına göç eder, fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliği gösteren reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanıp fagositozu uyarmaktadır. Apoptoz iki ana yol ile başlatılmaktadır. Bunlardan birincisi, hücre dışından tetiklenen, pozitif (TNF α varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) ekstrinsek yoldur. İkincisi, hücre içinde görülmekte olan DNA hasarı, endoplazmikretikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrinsek yol. Hücre içi ya da hücre dışı mekanizmaların hangisiyle başlarsa başlasın, apoptotik süreç kaspazlar (Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE) olarak isimlendirilen proteolitik enzimler yolu ile gerçekleştirilir. Kaspazlar apoptozisde önemli roller üstlenen sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazlar ilk olarak inaktif proteinler halinde sentezlenmektedir. Kaspazlar farklı yollar ile aktive edilip hücresel hedeflerdeki tetrapeptitleri tanımaktadır ve var olan substratı, bir karboksil ile ayırmaktadır. Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmakla birlikte filogenetik analiz neticesinde gen ailesinin ICE (kaspaz-1) ile ilişkili ve CED-3 benzeri olmak üzere iki adet altgrubu mevcuttur [99].

2.8.2. Apoptoz ve kanser ilişkisi

Hücrelerin normal apoptotik prosesten kaçabilmeleri için belli bir özellik kazanmaları gerekmektedir ve bu neredeyse bütün kanser hücrelerinde görülen bir özelliktir. Tümör hücreleri antiapoptotik proteinlerin aşırı yapımı ya da proapoptotik proteinlerin yapılarının veya etkilerinin azalması sonucunda apoptoza direnç kazanmaktadırlar. Örneğin, foliküler B hücreli lenfomada kromozomal bir yer değiştirmenin neticesinde Bcl-2 proteininin yapımında artış gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmalarla p53 yolu ile başlatılan apoptoz yolundaki proteinlerin yapım ya da işlevlerinde görülen bozuklukların insanlardaki kanserlerin hemen hemen yarısında etkili gösterdiği belirtilmiş bunun dışında Apaf-1 in metastatik melanom hücrelerinde yapılmadığı gösterilmiştir. Bazı kanser türlerinde (hepatosellüler karsinom, melanomlar) ölüm reseptörlerinden biri olan CD95'in yapımının azaldığı bulunmuştur. Kanserleşme ve apoptoz düzenlemesinin bozulması arasındaki ilişki kemoterapötiklere ya da radyasyona direnç oluşurarak da klinik tıbbi ilgilendiren sonuçlara yol açabilmektedir [100].

Kanser tedavisinde apoptozis etkisine bakacak olursak, geride kalan 10 yıl içerisinde, insan kanserlerinin intrinsek apoptoz direnci altında yatan moleküler mekanizmaların ortaya çıkartılması terapötik amaçlarda fayda sağlayacak hedeflerin belirlenmesine ön ayak olmuştur. Ölüm reseptörleri vasıtası ile apoptozis, insan kanserlerinde sinyal iletim kaskatını çeşitli düzeylerde devre dışı bırakabilmekte ve plazma zarı düzeyinde ölüm reseptörlerinin hücre yüzey ifadesi bozulabilmektedir. CD95 yüzey ifadesinin azalma göstermesi, nöroblastom hücreleri ve lösemide ilaç dirençli varyantlarda görülerek ilaç direncine bağlı olduğu rapor edilmiştir. CD95'in dışında TRAIL reseptörlerinin meydana getirdiği değişiklikler rezistans mekanizması olarak belirtilmektedir. TRAIL/TRAIL reseptör sistemleri kanser tedavileri için ölüm reseptör ailesinin umut vaat eden bir örneği olarak kabul edilmektedir. TRAIL'in malignan olmayan insan hücreleri ile karşılaştırılması sonucunda kanser hücrelerinde hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir.

Mitokondriyal apoptozis yolu ele alındığında, insan kanserlerinde apoptozisin mitokondriyal (intrinsek) yolundaki sinyalleme sıklıkla bozulmaktadır bununla birlikte mitokondriyal dış zar geçirgenliği, proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin Bcl-

2 ailesini içeren çeşitli faktörlerle, Bcl-2'deki genetik değişiklikleri ya da posttranslasyonel modifikasyonlarıyla insan kanserlerinde görülmekte olan hücre ölüm rezistansı da sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Foliküler lenfomada immünooglobulin ağır zincir gen bölgesine Bcl-2 onkogeninin kromozomal translokasyonu, Bcl-2'nin aşırı transkripsiyonel aktivasyonu ve yüksek ekspresyon seviyeleri ile neticelenmektedir. İnsan kanserlerinde, proapoptotik Bcl-2 ailesindeki Bax proteininde gerçekleşen genetik değişiklikler rapor edilmiştir. Örneğin, Bax geninde bulunan tek nükleotid değişimi ya da çerçeve kayması mutasyonları hematopoetik neoplazmlarda ya da kolon kanseri içinde tanımlanmıştır [101].

2.8.3. Apoptoz tayin metodları

2.8.3.1. Konfokal mikroskopi

Hücrelerde oluşan büzüşme, kromatin yoğunlaşması, yoğunlaşma, membran tomurcuklanması, DNA parçalanması, çekirdek parçalanması ve apoptotik cisim meydana gelmesi şeklindeki morfolojik değişiklikler belirgin apoptoz göstergeleridir [102].

Konfokal mikroskopi, bir numunenin yüksek çözünürlüklü görüntülerini ve 3-D rekonstrüksiyonunu üretmek için güçlü bir araçtır. Konfokal mikroskopide bir lazer ışını, objektif mercekle aracılığıyla bir flüoresan numuneye odaklanır. Yansıtılan ışık ayna tarafından sapıtılırken, yayan flüoresan ışık "odak dışı" ışığı azaltmak için bir konfokal apertürden geçer. Odaklanmış ışık daha sonra emisyon filtresi içinden geçer ve fotoçoğaltıcıya geçer. Bütün bir görüntü elde etmek için lazer odak noktası numune üzerinde hareket ettikçe tek nokta XY olarak taranır [103]. Konfokal mikroskopi hücre araştırmaları için ideal bir araştırma yöntemidir fakat doku parçalarında kullanımı nispeten kısıtlıdır. Uyarı ışığının derindeki hücreye penetrasyonu ve floresan emisyonunun dokuda yayılımı zor olduğu için kullanılacak enerjinin yüksek olması gerekmektedir. Yüksek enerji ile doku ve hücre zarar göreceğinden canlı yapılar üzerinde kullanımı uygun değildir. Bu tip sorunların üstesinden gelmek amacıyla multi-foton tekniği geliştirilmiştir. Bu tekniğin bilinen konfokal teknikten farkı özel bir lazerin kullanılıyor olmasıdır [104]. Lazer konfokal mikroskopi tekniği, boyama uygulamaları ile elde edilen görüntülerden üç boyutlu fotoğrafların meydana getirilmesine de imkan

sağlarken bu donanımlar ile birçok hücre içi organel ve tüm bileşenlerin detaylı incelenebilmesinde konfokal mikroskop yaygın olarak kullanılmaktadır. Çekirdek ve/veya aktin filamentlerinin senkronik bir şekilde uygun floresan boyalar ile boyanması hücrelerin bulunduğu yerin ve şeklinin görüntülenmesini kolaylaştırmaktadır. Floresan boyalar DNA'ya bağlandıkları için hücrenin kromatini ve bununla birlikte hücre çekirdeğini görünür hale getirebilmektedir [105].

2.8.3.2. Geçirimli elektron mikroskopi ile apoptoz tayini

İnsan gözü ile çok ince detayların görülebilme imkânı kısıtlıdır. Bu sebeple görüntü transferini sağlayan ışık yollarının mercekler ile değiştirilmesiyle, çok daha küçük olan detayların görülebilmesine imkân veren optik cihazlar geliştirilmiştir. Fakat geliştirilen bu tür cihazlar, büyütme oranlarının sınırlı olması ve görüntüde işlem yapma olanağının olmaması sebebiyle bu yöntem üzerinde yeni sistemler geliştirilmesine yol açmıştır. Elektronik ve optik sistemler birlikte kullanılarak yüksek büyütme analizleri yapılabilen görüntülerin sağlandığı cihazlar geliştirilmiştir. Elektro-optik prensipler ile taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM) geliştirilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM), pek çok alandaki çalışmalarda kullanılmakla beraber, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır [106]. Apoptotik hücrelerde oluşan ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskobunda incelenebilmesi için, öncelikle hücrelerin TEM'de biyolojik numune takibine uygun bir şekilde takip edilmesi ve bloklar biçimine getirilmesi gerekmektedir. Oluşturulan bloklar önce mikrotom cihazında yarı ince kesitler alınmasıyla hücrelerin dağılımının ışık mikroskobunda bakılması amaçlanır daha sonrasında yarı ince kesitte incelenecek olanlar işaretlenerek kesit (70-100nm) alınmaktadır. Elde edilen ince kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat boya ile muamele edilerek hücre çekirdeği, hücre membranı ve organelleri daha belirgin duruma getirilmekte ve geçirimli elektron mikroskobunda görüntüleri elde edilebilmektedir [107].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. A549 hücreleri

A549 insan akciğer kanseri hücre hattı American Type Culture Collection'dan (ATCC) temin edilmiştir. Esas ATCC numarası ve kodu CCL-185 olan A549 hücreleri ATCC'nin önerdiği protokol doğrultusunda çoğaltılarak -196 °C'de sıvı azotta stoklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri

Dimetil sülfoksit (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma); Osmium tetraoksit, Glutaraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranil asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science); Annexin V apoptosis detection kit (BD, Pharmingen, USA); firmalarından temin edilmiştir. 25 ve 75 cm²'lik flask (TPP, İsviçre); 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP, İsviçre); cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), pastör pipetler, enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), steril falkon tüpler (15 ve 50 mL) (TPP, İsviçre); steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), kriotüp, yuvarlak lamel (Biolab) ve bakır grid (EMS) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. A549 hücrelerinin çoğaltılması

Sıvı azot tankı içerisinde -196 °C'de stok halinde bulunan A549 hücreleri tanktan çıkarılmış, tüp içeriği eritildikten sonra %10 serum (Fetal Bovine Serum/FBS) içeren RPMI besi yeri içerisine alınarak, 1200 rpm' da 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücreler yeni besi yeri içinde süspansiyon edilerek kültür flasklarına alınmış, 37 °C'de, %5 CO₂ ve uygun nem standartlarını içeren inkübatörde inkübe edilmişlerdir. Tamamen hücreler ile kaplanmış flask içerisindeki besi yeri bir pipet vasıtasıyla uzaklaştırılarak, PBS ile hafifçe yıkanma işleminden sonra 1X tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak inkübatörde hücreler kaldırılmıştır. Flask tabanından kalkan

hücrelerin üzerine, uygulanan tripsinin iki katı hacminde besi yeri eklenmiş ve 1200 rpm'da 5 dk santrifüj edilmiştir. Meydana gelen hücre pelleti üzerindeki besi yeri pipet ile atılarak tekrar besi yeri ilave edilmiş ve karıştırma işleminden sonra hücreler eşit oranlarda ayrı şekilde yeni flasklara bölünmüştür. Bu şekilde çoğaltılan hücreler 6. pasajda deneylerde kullanılmıştır. Hücrelerin bulunduğu flasklardan bazıları PBS ile yıkandıktan sonra, 1X tripsin/EDTA yardımıyla kaldırılıp yine iki katı besi yeri eklendikten sonra santrifüjlenmiş ve elde edilen hücre pelleti besi yerinde süspansiyon edilerek %5 oranında DMSO eklendikten sonra kryo tüplerde dondurulup sıvı azot tankında stoklanmıştır.

3.2.2. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin sentezi

Karmofur yüklü KLN hazırlamak için sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. KLN hazırlanmasında % 3 lipid, % 5 etken madde ve % 1,2 oranında Tween 80 kullanılmıştır. Önce lipidin 80°C'de erimesi sağlanarak karmofur eklemesi yapılmış ve Tween 80 eklenerek ultraturaks ile 20500 rpm'de yaklaşık 1 dakika karıştırılarak karmofur yüklü KLN formülasyonu elde edilmiştir. Boş katı lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında yine aynı yöntem kullanılmıştır ancak karmofur ilavesi yapılmamıştır. Elde edilen süspansiyonlar oda sıcaklığında soğutulmuş ve 0.25 µm'lik filtrelerden geçirilerek kullanıma kadar siyah cam şişede ve buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır [108,109].

3.2.2.1. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyonu

3.2.2.1.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Karmofur yüklü KLN'lerin zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için hazırlanan katı lipid nanopartiküller NaCl ile iletkenliği 50µS'ye ayarlanmış distile suda seyreltilerek süspansiyon edilmiş ve cihazın küvetine yerleştirilmiştir. Küvetten yapılan ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır. Her ölçüm ard arda üç kez tekrar edilmiş ve elde edilen ortalama değerler dikkate alınmıştır [109].

3.2.3. MTT Kolorimetrik Sitotoksisite Testi

A549 hücreleri 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına, kuyu başına 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakaya ekilen hücreler 37°C 'de ve %5 karbon dioksitli ortamda inkübe edilmiştir. A549 hücreleri, karmofur, boş KLN, ve karmofur yüklü KLN'lerde 3.13-200 μM konsantrasyon aralığında seri dilüsyon yapılarak 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara 20 μL MTT boyası (5mg/mL) ilave edilerek, 37°C 'de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda plakadaki her kuyucuk içeriğindeki sıvı kısım boşaltılarak canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünebilmesi amacıyla 200 μL ELx808-IU (Bio-Tek, USA) plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Deney 3 kez tekrarlanmıştır. Karmofur ve KLN ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol olarak kabul edilmiştir. Her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır [110]. Uygulanan karmofur ve karmofur yüklü KLN'lerin A549 hücreleri üzerindeki IC_{50} konsantrasyonu bu canlılık değerleri kullanılarak Microsoft Office Excel programında hesaplanmıştır.

3.2.4. Konfokal Mikroskopi Yöntemi

3.2.4.1. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi ile tayini

Konfokal mikroskopi yöntemi ile karmofur ve yeni sentezlenen karmofur yüklü-KLN ve boş karmofur formülasyonunun A549 hücreleri üzerinde sebep olduğu morfolojik değişiklikler incelenmiştir. Konfokal mikroskopta incelenecek A549 hücrelerinin hazırlık aşamında öncelikle 3×10^5 hücre/kuyu yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen hücreler karmofur, karmofur KLN ve boş KLN formülasyonunun IC_{50} konsantrasyonu ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besi yeri uzaklaştırılmış, hücreler fosfat tamponu (PBS)'de yıkanarak glutaraldehitte fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında tekrar PBS ile yıkanan hücreler akridin oranj ve falloidin boya ile ikili boyama uygulaması gerçekleştirilerek hücrelerde oluşan morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopta (Leica TCS-SP5 II) Leica Confocal Software Version 2.00 yazılımı kullanılarak incelenmiş ve görüntülenmiştir [111].

3.2.5. Geçirimli elektron mikroskopi yöntemi

3.2.5.1. Geçirimli elektron mikroskobunda hücre takip yöntemi

Geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) ince yapı değişikliklerini incelemek amacıyla $1 \times 10^6/\text{mL}$ yoğunluğundaki A549 hücreleri 12 ayrı flaska her grup için üçer tekrarlı olacak şekilde ekilmiş, 24 saat süresince karbon dioksitli etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Karmofür, karmofür yüklü KLN ve boş KLN formlarının IC_{50} konsantrasyonları üçer flaska uygulanmış ve 24 saat etüv içerisinde inkübe edilmiştir. 3 flask A549 hücresi ise kontrol grubu hücresi olarak hiçbir madde uygulaması gerçekleştirilmeden inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda flasklarda glutaraldehit ile fikse edilen A549 hücreleri doku takibine alınmış ve gece boyu $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de glutaraldehit içinde fikse edilmiştir. Bu süre sonunda tampon ile yıkamaya tabi tutulan hücreler osmiyum tetraoksit içerisinde ikincil fiksasyon uygulamasına tabi tutulmuştur. Osmiyumun hücrelerden tampon çözeltisinde yıkanmasından sonra etil alkol serisinde (%50, %70, %90, %96 ve absöü etil alkol) dehidrate edilmiştir. Propilen oksit ile dehidrasyon neticesinde şeffaflaştırılan hücreler resine alıştırıldıktan sonra kalıplara yerleştirilmek üzere resin ile bloklanmış, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de etüv içerisinde 48 saat boyunca polimerizasyonu yapılan bloklar kesit alınma hazır vaziyete getirilmiştir. Hazır hale getirilen bloklar traşlanmış ve 80-100 nm'lik ince kesitleri alınmıştır. Hazırlanan ince kesitler bakır gridlere alınır ve kurşun sitrat ve uranil asetatla boyanarak geçirimli elektron mikroskobunda 120 KV'de (Biotwin FEI, USA) görüntülenmiştir [107].

3.2.6. Akış sitometri yöntemi

3.2.6.1. Akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI boyama yöntemi

Akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI uygulamaları için ilk olarak A549 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda 5×10^5 hücre olacak biçimde ekilmiş ve 24 saat boyunca, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve %5 karbon dioksitli etüv içerisinde çoğaltılmıştır. 24 saatlik süre neticesinde A549 hücreleri karmofür, karmofür yüklü KLN ve boş KLN'nin IC_{50} konsantrasyonları ile 24 saat süresince uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda hücreler flasktan kaldırılmış, 2 defa PBS ile santrifüjlenmiş ve yıkanmıştır. Hücreler yıkandıktan sonra 1 mL içerisindeki sayısı hesaplanmıştır. Akış sitometri tüpüne $5 \mu\text{L}$ anneksin ve $5 \mu\text{L}$ PI boyaları eklenmiş ve daha sonrasında 1×10^6 hücre/mL hücre

süspansiyonundan 100 µL alınarak boyaların üzerine aktarım yapılmış, oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika bekletilmiş ve sonrasında akış sitometri cihazında (BD FACSCalibur™, ABD) analiz edilmiştir (Annexin V-FITC apoptosis detection kit, BD, Pharmingen).

3.2.6.2. Akış sitometrisinde hücre döngü analizi

Akış sitometride hücre döngüsü analizinde CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (BD Pharmingen, ABD) kullanılmıştır. Kullanılan bu kit prensip olarak iyonik olmayan bir deterjan vasıtasıyla hücre membran lipidlerin çözülmesini ve tripsin kullanımı sayesinde hücre iskeleti ve çekirdek proteinleri yok edilmektedir. Hücrede bulunan RNA bir enzim vasıtasıyla uzaklaştırılır. Bunun sonucunda çekirdek kromatini spermin ile sabit tutulmaktadır. Propidyum (PI) hücre çekirdeğine bağlanmakta ve boyanmış olan çekirdekler 580-650 nm dalga boyunda akış sitometride ışına gerçekleştirmektedir. A549 hücrelerinde gerçekleştirilecek DNA analizinde, A549 kontrol hücrelerine (5×10^5) 24 saat süresince karmofur, karmofur yüklü KLN ve boş KLN'nin IC₅₀ konsantrasyonları uygulanmıştır. Deney grubu olan A549 hücreleri farklı tüplere alınmış 1200 rpm'de 5 dakika süresince santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları atılmıştır. Tüm tüplere tripsinli tampondan 250 µL eklenmiş ve yavaş bir şekilde karıştırılmıştır. Tüpler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. 10 dakika sonunda tüm tüplere 200 µL RNaz tamponlu solüsyon eklenmiş ve yine yavaş bir şekilde karıştırılmıştır. Tüpler 10 dakika süresince oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüplere PI boyası solüsyonundan 200 µL eklenmiş, yavaş bir biçimde karıştırılmıştır. Sonrasında buzdolabı içerisinde karanlık ortamda buz içinde 10 dakika boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Hücre örnekleri 50 µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra sitometri cihazında (BD FACSCalibur™, ABD) analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. İstatistiksel analiz

Microsoft Office Excel programı kullanılarak IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Karmofur ve Karmofur Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyon Bulguları

4.1.1 Karmofur ve karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin partikül boyutunun ölçülmesine ait bulgular

Sentezlenen nanopartiküllerin fiziksel kararlılıkları ve etkinlikleri, partikül büyüklüklerine göre farklılık arz etmektedir [118]. Yaptığımız çalışmada yeni sentezlediğimiz karmofur yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının 0. Günde 25°C’de parçacık boyutları ölçülmüştür. Karmofur yüklü KLN ve boş KLN formülasyonlarının partikül boyutları sırasıyla 60,12 nm ve 69,71 nm olduğu tespit edilmiştir. Karmofurun aynı şartlar altında ölçülen partikül boyutu ise 374,1 nm olarak tespit edilmiştir. Yapılan ölçümlerde aynı şartlar altında polidispers indeks ile parçacık dağılımı değerlendirmesinde karmofur yüklü KLN ve boş KLN partiküllerinin indeksleri sırasıyla 0,380 ve 0,311 olarak saptanmıştır. Polidispers indeksi sıfıra yakın olan örneklerin homojen dağılım gösterdiği kabul edilmiştir (Tablo.3.1).

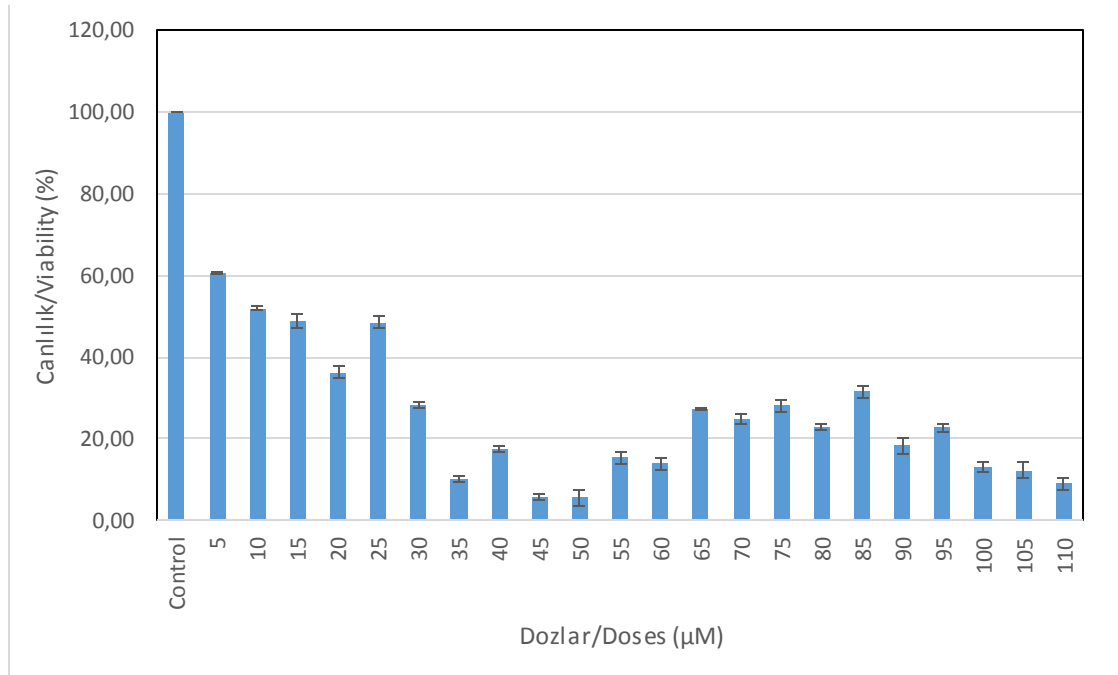
Tablo 3.1. *Karmofur, Boş KLN ve Karmofur Yüklü KLN Formülasyonlarının Partikül Boyutu ve Polidispers İndeks Değerleri*

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm)		Polidispers İndeksi (PI)	
	Ortalama (n=3)	S.S.	Ortalama (n=3)	S.S.
Karmofur	374,1	41,78	0,330	0,000
Boş KLN	69,71	66,56	0,311	13,03
Karmofur yüklü KLN	60,12	9,74	0,380	1,17

4.2. MTT Kolorimetrik Sitotoksisite Bulguları

4.2.1. Karmofurun A549 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları

Karmofurun A549 insan akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksisitesi MTT yöntemi uygulanarak tespit edilmiştir. MTT yöntemiyle A549 hücrelerine uygulanan 5-110 μM aralıklarındaki karmofur konsantrasyonları arttıkça, hücrelerin canlılık yüzdelilerindeki azalmanın 24 saat süresi sonunda olduğu gözlemlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonların uygulandığı A549 hücrelerinin canlılık yüzdesi kontrol grubu hücrelerinin canlılık yüzdesi ile kıyaslandığında doza bağlı olarak azalış göstermiştir. Deney neticesinde elde edilen canlılık inhibisyon eğrisi grafiği Microsoft Office Excel programı ile hazırlanmış ve aynı programla IC_{50} konsantrasyonu 23 μM olarak saptanmıştır.

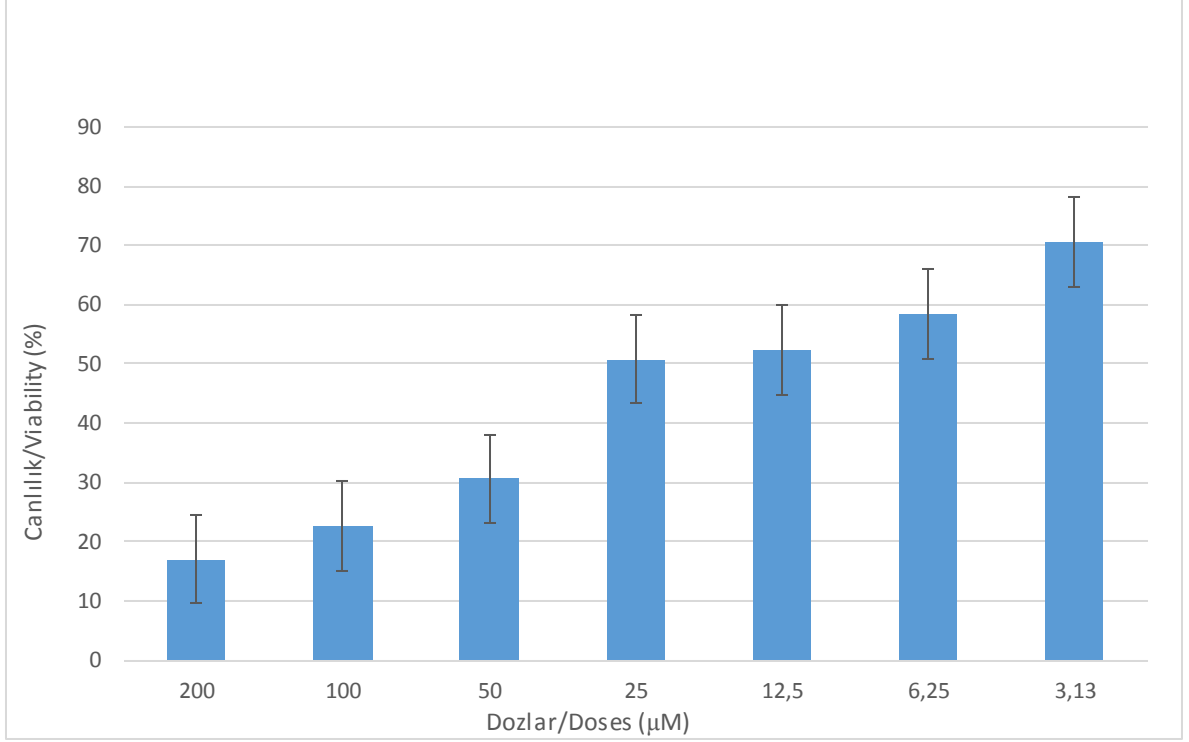


Şekil 3.1. Karmofurun A549 hücrelerine 24 saatlik uygulanması sonucunda elde edilen IC_{50} değeri (23 μM olarak saptanmıştır.)

4.2.2. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları

Karmofur yüklü KLN formülasyonunun A549 insan akciğer kanseri üzerindeki sitotoksisitesi MTT yöntemi ile tespit edilmiştir. Karmofur KLN uygulamasında 3,13-

200 μM aralığındaki konsantrasyonlar A549 hücrelerine uygulanmıştır. Uygulama yapılmayan A549 hücreleri ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre 24 saatlik inkübasyon süresi neticesinde A549 hücrelerinin canlılık yüzdelерinin doza bağlı olarak düştüğü saptanmıştır. Elde edilen canlılık yüzdeleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak IC_{50} konsantrasyonu 16 μM olarak saptanmıştır.



Şekil 3.2. Karmofur yüklü KLN formülasyonunun A549 hücrelerine 24 saatlik uygulanması sonucundaki etkisi ile elde edilen grafikte IC_{50} değeri 16 μM olarak tespit edilmiştir.

4.2.3. Boş katı lipid nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik bulguları

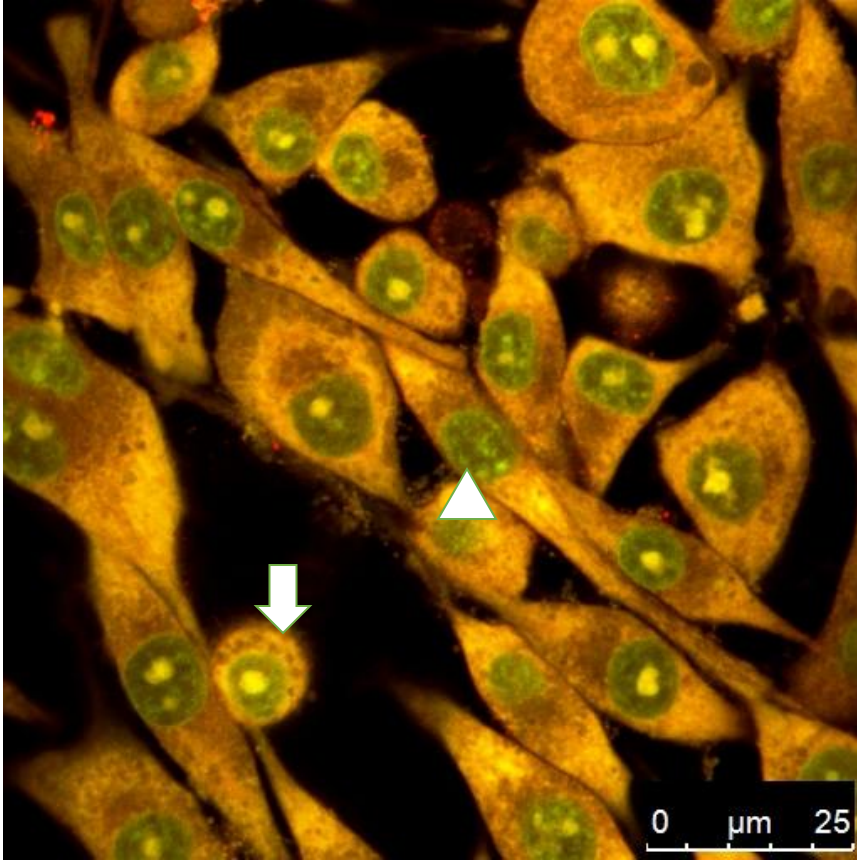
A549 hücrelerine 24 saat süresince uygulanmış olan boş KLN formülasyonunun 3,13-200 μM konsantrasyon aralığında hücreler üzerinde anlamlı derecede sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Kontrol grubu A549 hücreleri ile aynı % canlılık değerleri elde edilmesi sebebiyle IC_{50} değeri hesaplanmamıştır.

4.3. Konfokal Mikroskopik Bulguları

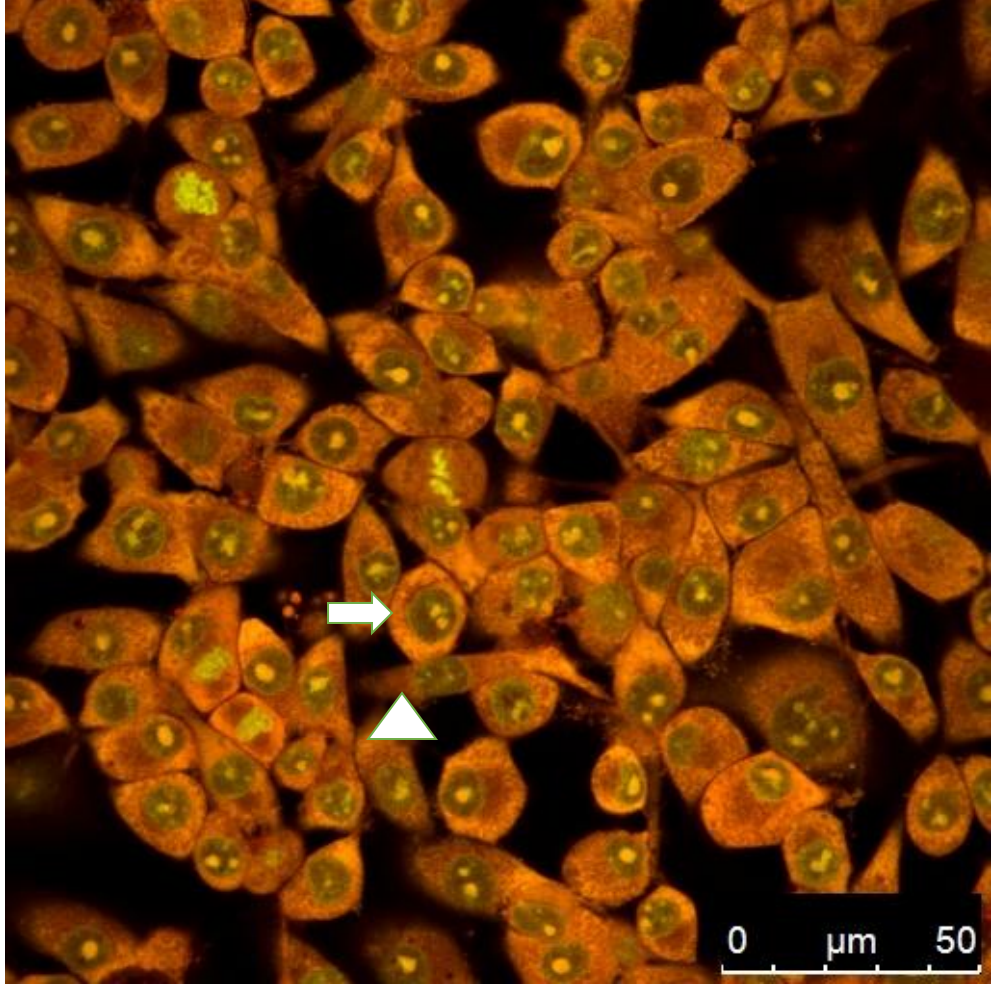
4.3.1. Hücredeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları

4.3.1.1. A549 kontrol hücrelerindeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları

A549 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısı falloidin ve akridin oranj ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskop görüntüsü Görsel 4.4.a. ve Görsel 4.4.b. ile gösterilmektedir.



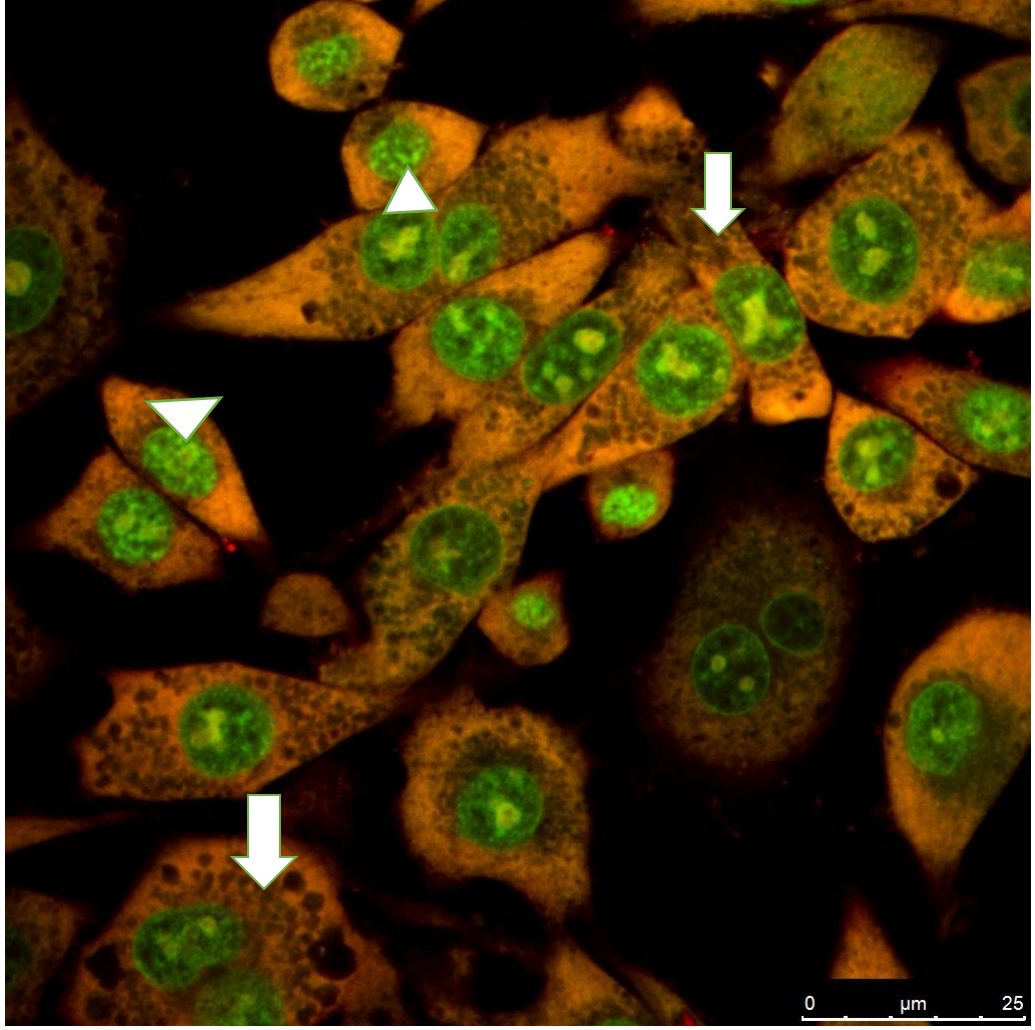
Görsel 4.4.a. Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen A549 hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı; çekirdek yapısı, Ok; hücre iskeleti.



Görsel 4.4.b. *Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen A549 hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı; Normal hücre iskeleti yapısı. Ok; Normal çekirdek yapısı.*

4.3.1.2. Karmofurun A549 hücreleri üzerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları

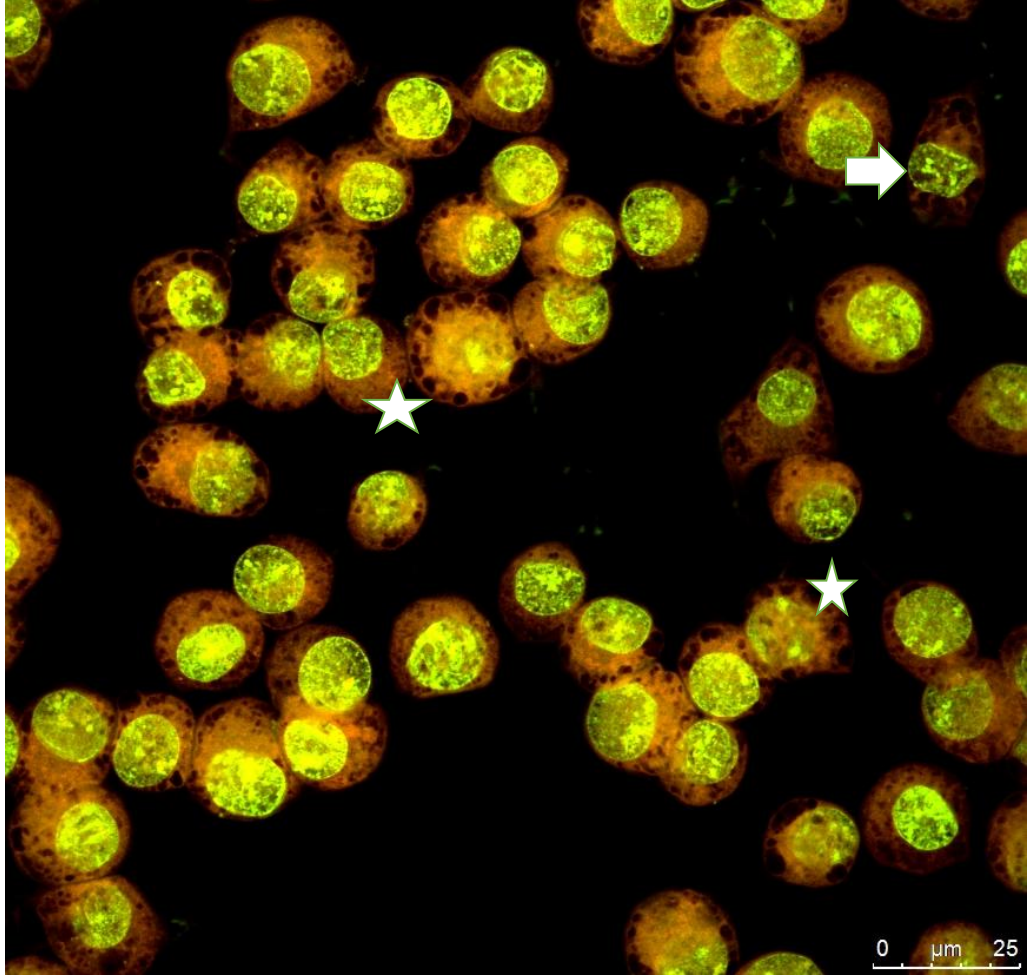
Karmofurun A549 hücrelerinin morfolojik yapısı üzerinde sebep olduğu değişiklikler falloidin ve akridin oranje ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskop ile incelenmiştir. Görsel 4.5 ile A549 hücrelerinin elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri gösterilmektedir.



Görsel 4.5. *Karmofurun IC₅₀ Konsantrasyonunun 24 Saat Süresince Uygulama Yapıldığı A549 Hücrelerinin Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı; Kromatin kondenzasyonu, Ok; hücre iskeletinde parçalanma.*

4.3.1.3. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerinde sebep olduğu morfoloik değişimlerin konfokal mikroskopik bulguları

Karmofur yüklü katı nanopartiküllerin IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince A549 hücrelerinin morfolojik yapısı üzerinde sebep olduğu değişiklikler falloidin ve akridin oranje ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskop ile incelenmiştir. Görsel 4.6 ile A549 hücrelerinin elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri gösterilmektedir.



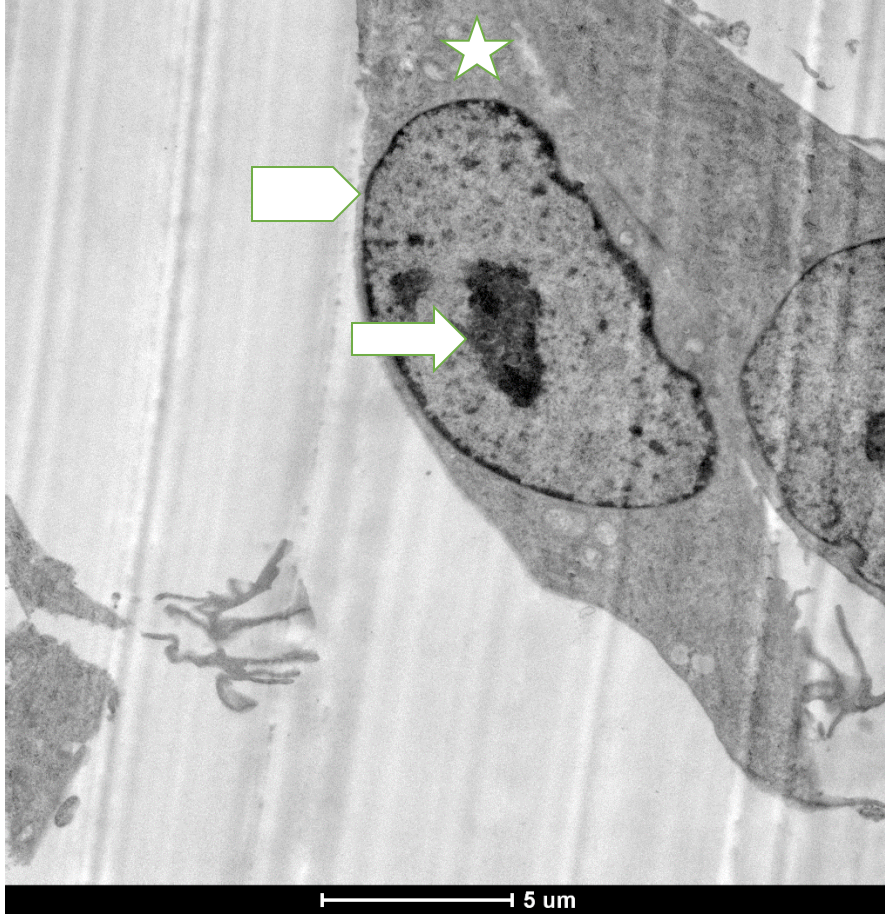
Görsel 4.6. *Karmofur Yüklü Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun IC_{50} Konsantrasyonunun 24 Saat Süresince Uygulama Yapıldığı A549 Hücrelerinin Falloidin ve Akridin oranj kullanılarak yapılan ikili boyama ile elde edilen Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Yıldız; Hücre iskeletinde delik oluşumu ve İskelet parçalanması Ok; Kromatin kondenzasyonu.*

4.4. Geçirimli Elektron Mikroskopik Bulguları

4.4.1. A549 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopik bulguları

A549 kontrol hücrelerinin ince yapısı karmofur, karmofur yüklü katı lipid nanopartiküller ve boş nano katı lipid nanopartiküllerin formülasyonları ile uygulandıktan

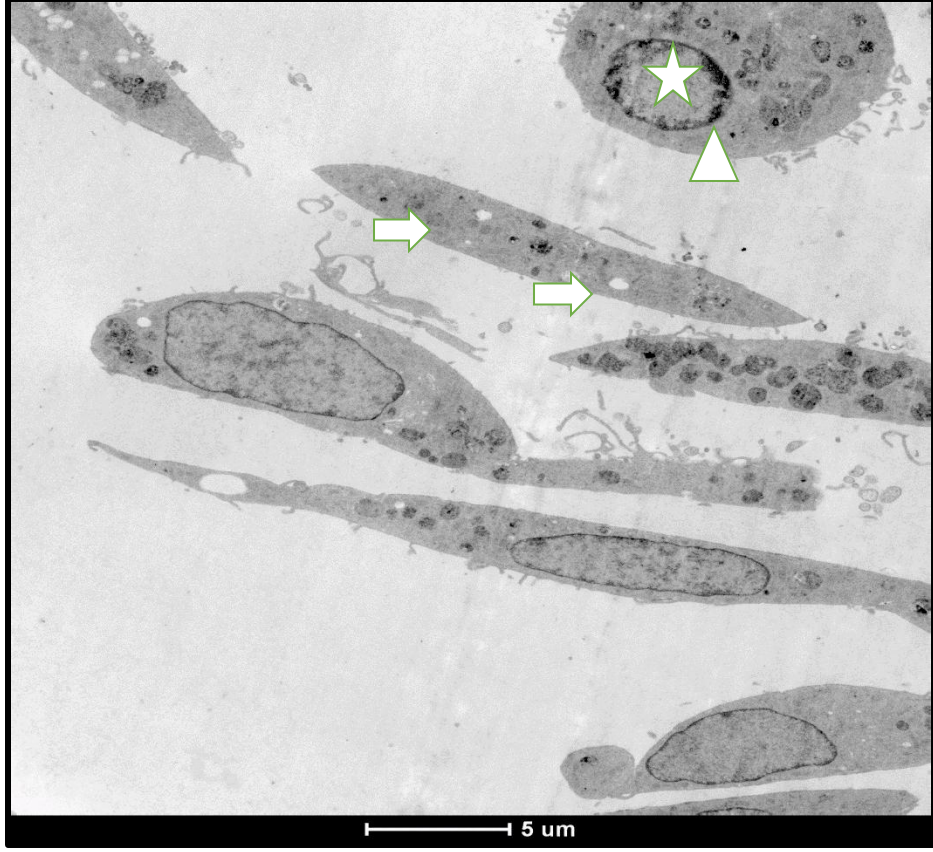
sonra oluşacak sitotoksik etki sebebi ile gerçekleşen değişikliklerin karşılaştırılması bakımından geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. Kontrol A549 hücrelerinin TEM görüntüleri Görsel 4.7’de gösterilmiştir.



Görsel 4.7. A549 Kontrol Hücrelerinin TEM Görüntüsü (6000x). Ok başı; Normal çekirdek membranı, Ok; Normal Çekirdekçik Yapısı, Yıldız; Hücre İskeleti ve Organeller

4.4.2. Karmofurun A549 kontrol hücrelerinde sebep olduğu ince yapısal değişimlerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları

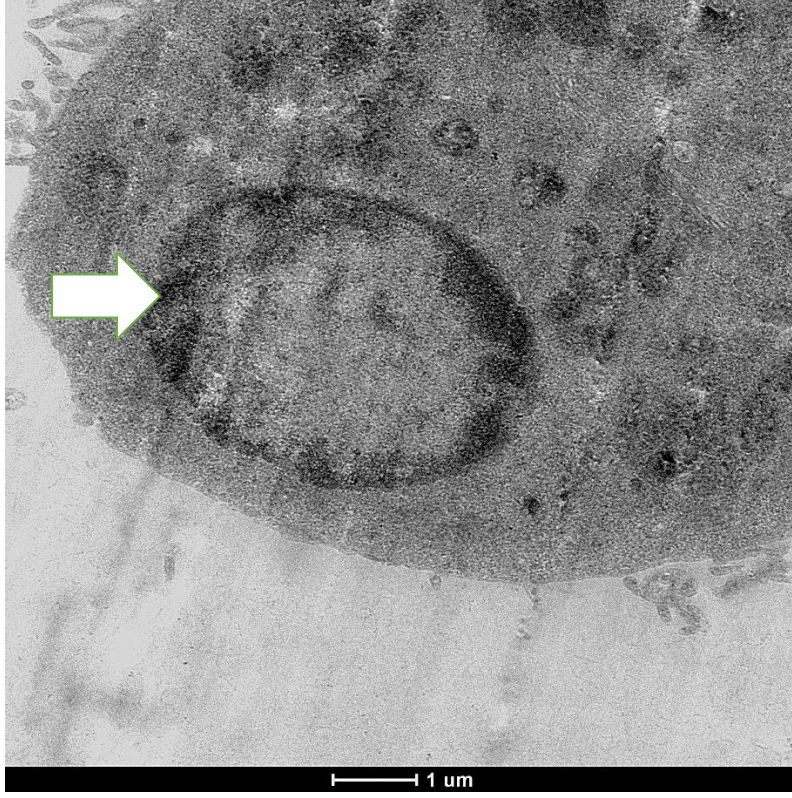
Karmofurun 23 μ M IC₅₀ konsantrasyonu ile uygulanan A549 hücrelerinde meydana gelen ince yapısal değişiklikler TEM ile incelenmiştir. Oluşan değişiklikler Görsel 4.8, Görsel 4.9. ve Görsel 4.10. ile gösterilmiştir.



Görsel 4.8. *Karmofurun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü (6000x). Ok; Hücre iskeletinde delikler, Yıldız; Kromatin kondenzasyon, Ok başı; Dairesel hücre şekli*



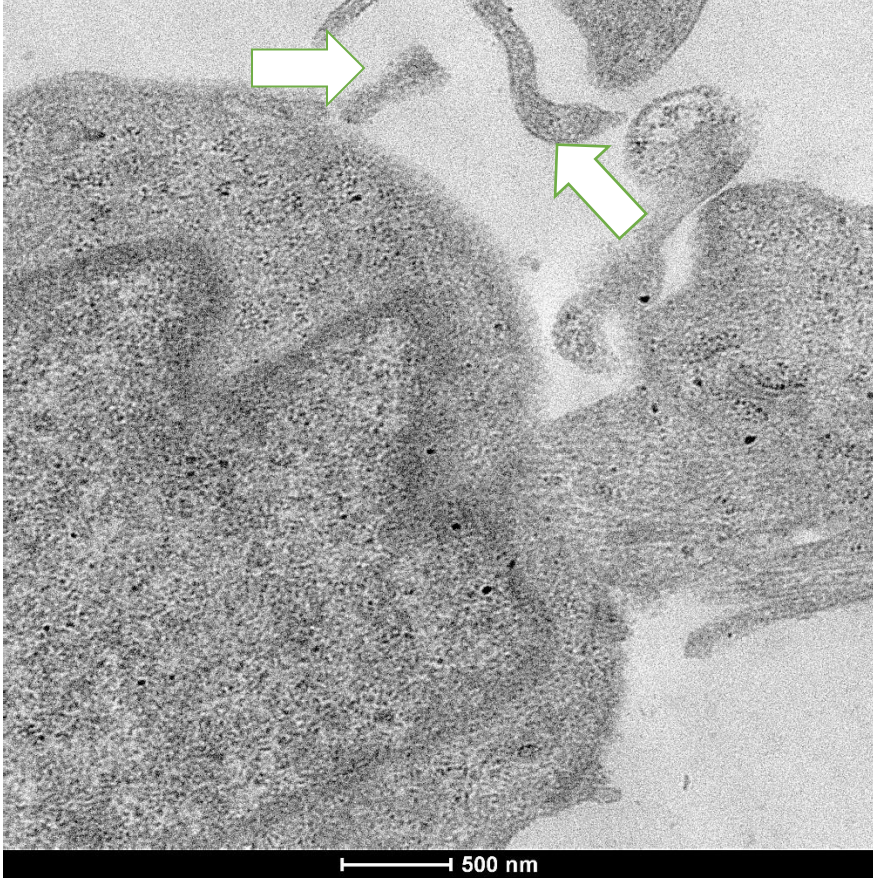
Görsel 4.9. *Karmofurun IC₅₀ konsantrasyonununun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü (6000x). Ok; Kromatin kondenzasyon, Ok başı; Hücre çekirdek membranında ondülasyon.*



Görsel 4.10. *Karmofurun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü (6000x). Ok; Hücre çekirdek zarına çekilmiş kromozomlar ve yüzük şekli oluşması.*

4.4.3. Karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin A549 hücrelerinde sebep olduğu ince yapısal değişimlerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları

Karmofur yüklü KLN'lerin 16 μ M IC₅₀ konsantrasyonu ile uygulanan A549 hücrelerinde meydana gelen ince yapısal değişiklikler TEM ile incelenmiştir.



Görsel 4.11. *Karmofur yüklü KLN formülasyonunun IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü. Ok; Kopmuş haldeki hücre tomurcuklanmaları.*



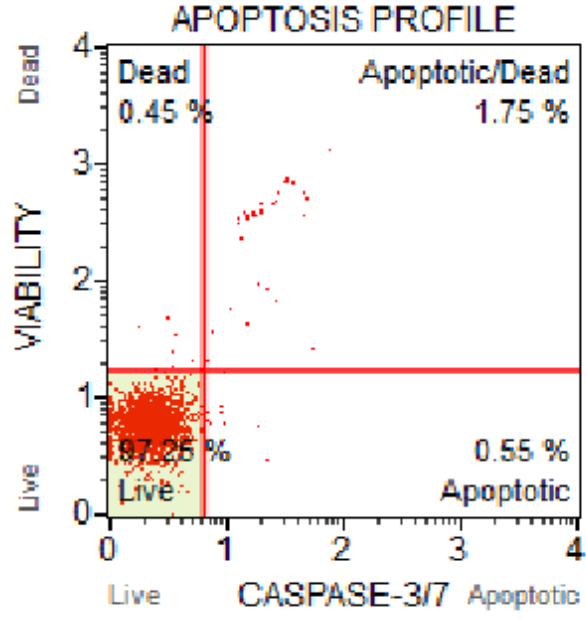
Görsel 4.12. *Karmofur yüklü KLN formülasyonunun IC_{50} konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin TEM görüntüsü. Ok; Kopmuş ve şişmiş haldeki granüllü endoplazmik retikulumlar.*

4.5. Akış Sitometri Bulguları

4.5.1 Kaspaz 3/7 uygulamasının akış sitometrisindeki bulguları

4.5.1.1 A549 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3/7 uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları

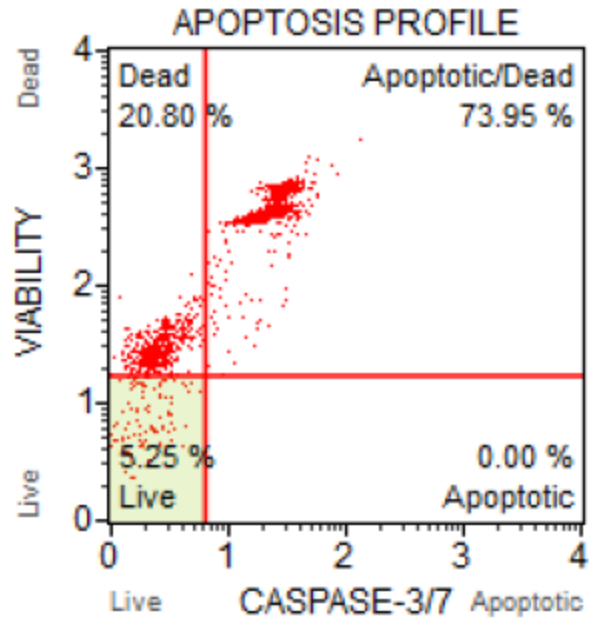
A549 hücrelerinin apoptotik profil bakımından incelenmesi amacıyla akış sitometrisinde Caspase 3/7 uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. A549 kontrol hücrelerinin deney gruplarında %97.25 canlılık tespit edilmiştir. %0.45 oranında ölü hücelere rastlanmıştır.



Şekil 4.1. A549 Kontrol Hücrelerinin Apoptotik Profili. Geç nekrotik, nekrotik veya ölü hücreler (%0.45), Apoptotik/Ölü hücreler (%1.75), Canlı Hücreler (%97.25), Apoptotik veya Erken Apoptotik Hücreler (%0.55)

4.5.1.2. Karmofur yüklü katı lipid nano partiküllerin uygulandığı A549 hücrelerinin kaspaz 3/7 uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları

Karmofur yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonunun A549 hücrelerinde apoptotik profil bakımından incelenmesi amacıyla akış sitometrisinde Caspase 3/7 uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. Karmofur yüklü KLN uygulanmış A549 hücrelerinde %5.25 canlılık tespit edilmiştir. %73.95 oranında apoptotik/ölü hücrelere rastlanmıştır.



Şekil 4.2. *Karmofur yüklü Kat Lipid Nanopartikül formülasyonunun A549 Hücrelerinde Kaspaz 3/7 Uygulaması Sonucu Apoptotik Profili. Geç nekrotik, nekrotik veya ölü hücreler (%20.80), Apoptotik/Ölü hücreler (%73.95), Canlı Hücreler (%5.25), Apoptotik veya Erken Apoptotik Hücreler (%0.00)*

5. TARTIŞMA

Kanser, ölüm nedeni olarak ilk sıralarda bulunan kompleks ve önemli bir hastalıktır. Kanser tedavisinde kullanılmakta olan geleneksel yöntemlerden kaynaklanan yan etkiler, tedavinin başarısını ve etkinliğini düşürmektedir. Kanser tedavisinde erken teşhis, çok önemlidir. Kanser erken evrelerde teşhis edilmesi geleneksel tanı yöntemlerinin kullanılması ile güçtür. Kanser, gelişimi uzun süren bir hastalıktır. Kanser erken evrelerinde teşhis edilmesi kanser tedavisinde kolaylıklar sağlamaktadır. Hücrelere, mutasyonun erken evrelerinde müdahale edildiği takdirde kanser gelişimi durdurulabilmektedir [1]. Son yıllarda kanserin oluşumu ve gelişimi üzerine yapılan çeşitli çalışmalar sayesinde moleküler ve biyokimyasal düzeyde yeni katkılar sağlanmıştır. Genotipik ve fenotipik düzeyde bir süreç olan kanser çok basamaklı ve uzun sürelidir. Günümüzde hücrenin bölünme ve büyümesinden sorumlu olan biyokimyasal mekanizmalar, hücre büyümesini uyaran moleküller, büyüme mekanizmasını kontrol etmekte olan proteinler, gerektiği zamanda büyümeyi sınırlandırıcı etkide olan genler ve mekanizmalar ile kanser oluşumu ve gelişimi, moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmaktadır. Bununla birlikte ilerleyen senelerde, uygulanan klasik kanser tedavileri yerine hücre siklusu ve kanser alanında ulaşılan yeni bilgiler öncülüğünde, yeni ve daha özel tedavi metodları uygulanacaktır [114].

Hem normal hem de tümörlü hücreler çeşitli evrelerden geçerek gelişmektedirler. Yalnızca çoğalmakta olan hücreler üzerinde etkili olan kemoterapötik ilaçlar; döngüye spesifik ilaçlar olarak anılmaktadır. Döngüye spesifik olmayan ilaçlar, çoğalmakta olan hücreler üzerinde daha etkili olmalarına rağmen büyüme hızı düşük olan tümör tedavilerinde etkili olmaktadır. Kanser tedavisinde faydalanılan ilaçlar daha farklı mekanizmalar ile de etki göstermektedirler. Genel olarak sınıflandırılmış olan bütün ilaçların sadece malin hücreleri etkilemesi amaçlanmaktadır. Fakat pratikte ilaçlar kanser hücrelerine seçici etki göstermemekte ve proliferen olan tüm normal ve anormal hücreleri ise etkilemektedir [115].

Bir pirimidin analogu olan 5-Fluorouracil (5-FU), 1957'de Duschinsky tarafından sentezlendiğinden bu yana, malignansların tedavisinde oldukça etkili bir antimetabolizma ilacıdır. Yapılan çalışmalarda 5-FU, timidilat sintazı inhibe ederek DNA biyosentezini bloke ettiği için intihar inaktivatörü olarak düşünülmüş ve nihayetinde hücre döngüsü

durdurulmuştur. Bununla birlikte, 5-FU, yüksek toksisite ve zayıf tümör ilgisi sergilemiş; bu, terapötik uygulamasını sınırlı hale getirmiş ve yüksek kemik iliği, gastrointestinal sistem ve merkezi sinir toksisitesi insidansına yol açmıştır. 5-FU yapısının çok sayıda modifikasyonu, farmakolojik ve farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek için araştırılmıştır, bunlar arasında tegafur, karmofur ve floxuridin artmış biyoaktivite, seçicilik, metabolik stabilite, absorpsiyon veya düşük toksisite ile yaygın olarak kullanılmaktadır [116]. Tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde oral karmofur, küratif olarak rezeke edilen kolon kanseri hastaları için adjuvan kemoterapi olarak kullanılmıştır. Geçmiş denemeler ve meta-analizler, bu kanserli hastaların hayatta kalmasının uzatılmasında etkili olduğunu göstermektedir [85].

Kullanılan mevcut yöntemlere rağmen yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır ve bunun çeşitli sebepleri bulunmaktadır. Mevcut yöntemlerin eksikliği, mevcut ilaçlar ve ilaç kombinasyonları ile birçok kanser türünde tedavi ya hiç sağlanamamakta, ya da yeterli sonuç alınmamaktadır. Kullanımda olan ilaçların önemli yan-etki ve diğer dezavantajları ortadan kaldırılamamıştır. Yeni olguların ve etki mekanizmalarının saptanması sayesinde doğrudan ve daha etkin tedavi uygulamaları kanser tedavisinde umut verici olacaktır [115].

Nano-teknoloji alanındaki gelişmeler, kanserde hedefe odaklı ilaç dağıtım konusunda pek çok önemli yenilikler getirmiştir. Bu doğrultuda ilaçların kanser hücrelerindeki hücre içi konsantrasyonları arttırılabilirken, sağlıklı hücrelere olan toksik etkileri en aza indirilebilmektedir. Kanserde erken teşhis için, kansere özgü biyomoleküller ile biyokonjugasyon oluşturabilen nanoyapılar kullanılabilir. Biyomoleküller ile birleşim sağladıklarında, nano yapıların çeşitli fiziksel özellikleri değişiklik göstermektedir ve bu değişiklikler optik, mekanik ve elektriksel yöntemler ile saptanarak söz konusu biyomolekülün varlığı veya miktarı hakkında bilgi edinilebilir [1].

Yaptığımız çalışmada, nanoteknolojinin kanserli hücreler üzerindeki etkisi irdelenmiştir. Teşhis ve tedavide kanser, epey zorlu bir hastalıktır. İnterdisipliner bir bilim olan nanoteknoloji kanser konusunda önemli avantajlar sunmaktadır. Nanoteknoloji yardımıyla kanserli dokuya yönelik kemoterapi mümkün olmaktadır. Bu sayede halihazırda kullanılan kemoterapi ilaçlarının yan etkileri büyük ölçüde ortadan kaldırılmış olur. Bunun yanısıra kanserli dokulara etkili dozlar verilmesi ile iyileşme

süresi kısaltılabilir. Nanoteknoloji, kanser tedavisi yanında teşhisi konusunda da önemli olanaklar sunmaktadır. Nanoteknolojinin sağladığı erken teşhis ve etkili tedavi olanakları ile kanser, rutin tedavi edilebilir, iyileşme oranı yüksek, ölüm oranı düşük bir hastalık haline getirilebilir [1]. Son 10 yıldır, katı lipid nanopartiküllerin (KLN) diğer kolloidal taşıyıcı sistemlere alternatif bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımları için çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Farklı kolloidal taşıyıcıların avantajlarını bir arada barındıran ve dezavantajlarını ortadan kaldıran KLN'lerin, kolloidal taşıyıcı sistem olarak kullanımları giderek artan bir ilgi görmektedir. Katı lipid nanopartiküller (KLN), oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipidler ile hazırlanan ve emülgatörler ile stabilize edilen, nanometre boyutundaki partiküllerdir [93]. 5-FU türevi olan karmofurun anti-kanser etkisini ortaya koyabilmesi için, hücreler içerisine karmofuru daha fazla miktarda ve daha kolay sokabilmek amacıyla çalışmamızda karmofur yüklü katı lipid nanopartiküller sentezlenmiştir. KLN'ler toksikolojik olarak kabul edilebilir olmaları, etkin maddenin kontrollü salımına ve ilaç hedeflemesine olanak sağlamaları ve endüstriyel boyutta üretilibilmeleri gibi avantajları sayesinde çalışmamızda kullandığımız kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir [93].

KLN'ler canlı sistemlerde iyi tolere edilmektedirler. Partikül büyüklüğü dağılımı, i.v. enjeksiyon için çok önemli bir konudur. Bununla birlikte partikül büyüklüğünün tamamen mikron altı aralıkta olması gerekmektedir. Çünkü mikrometre boyutundan büyük partiküllerin bulunması, KLN sisteminin performansını azaltabilmektedir [93]. Bu sebeple çalışmamızda gerçekleştirilen poidispers indeks ve parçacık boyutu ölçümü ile sentezlediğimiz KLN formülasyonlarının partikül boyutlarının birbirlerine yakın olup homojen bir dağılım sergilediği bulunmuştur (Tablo 3.1.). Yaptığımız çalışmada yeni sentezlediğimiz karmofur yüklü KLN formülasyonlarının partikül boyutları ile karmofurun partikül boyutları ölçülmüş, sırasıyla 60,12 nm ve 374,1 nm olarak tespit edilen sonuçlar kıyaslandığında yapılan kıyaslama ile partikül boyutunun yaklaşık 6 katı kadar küçük olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda yeni sentezlenen karmofur yüklü KLN formülasyonunun sitotoksik, antikanser ve antiproliferatif etkilerinin olup olmadığı A549 insan akciğer kanseri hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Karmofurun 5-110 μM aralığında ve karmofur yüklü KLN formülasyonunun 3,13-200 μM aralığında uygulanması sonucu A549

hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir. Karmofur ve karmofur yüklü KLN formülasyonunun 24 saatlik IC₅₀ konsantrasyonlarının sırasıyla 23 µM ve 16 µM olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalardan birinde kolorektal kanseri tedavi etmek amacıyla kullanılan karmofur, sıçan rekombinant asid seramidazının oldukça güçlü bir inhibitörü olarak tespit edilirken, IC₅₀ konsantrasyonu 29 ±5 µM olarak belirtilmiştir [83]. Çeşitli hücre hatlarıyla yapılan çalışmalar ile düşük dozlarda sitotoksikite gösterme açısından kendi çalışmamız uyum göstermektedir.

Çalışmamızda karmofur ve karmofur yüklü katı lipid nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerinde apoptozu indüklemeye özellikleri tespit edilmiştir. A549 hücrelerine karmofur ve karmofur yüklü KLN formülasyonlarının uygulanması ile A549 hücre morfolojileri konfokal mikroskopta incelenmiştir. Karmofur ve karmofur yüklü KLN formülasyonlarının IC₅₀ konsantrasyonlarının uygulandığı A549 hücrelerinde; hücre iskeletinde delik oluşumu, hücre iskeletinin parçalanması, kromatin kondenzasyonu şeklindeki değişiklikler saptanan morfolojik değişikliklerdir (Görsel 4.4.A ve Görsel 4.4.B). Saptanan bu değişiklikler hücrelerde apoptoz işaret edici değişiklikler olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, karmofur ve karmofur yüklü KLN formülasyonlarının A549 hücreleri üzerinde apoptoz indüklemeye etkisinin karşılaştırılması amacıyla apoptoz profilleri akış sitometrisinde incelemeye alınmıştır. Karmofur'un IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinin apoptotik profillerinin incelenmesi ele alındığında, geç nekrotik, nekrotik veya ölü hücrelerin oranının %7.05, nekrotik, erken nekrotik veya geç apoptotik hücrelerin ise %1.30 olduğu tespit edilmiştir. Canlı Hücrelerin %90.40 ve son olarak Apoptotik veya Erken Apoptotik Hücrelerin oranı ise %1.25 olarak saptanmıştır. Karmofur yüklü KLN formülasyonunun A549 hücreleri üzerine uygulanmasına bakıldığında ise geç nekrotik, nekrotik veya ölü hücreler %82.45, nekrotik, erken nekrotik veya geç apoptotik hücreler %10.20, canlı Hücreler %7.10, apoptotik veya erken apoptotik hücreler %0.25 oranındadır ve bununla birlikte karmofur yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonunun A549 hücrelerinde apoptotik profil bakımından incelenmesi için gerçekleştirilen akış sitometrisinde yapılan Caspase 3/7 uygulamasında A549 hücrelerine karmofur yüklü KLN uygulanmış ve

%5.25 canlılık tespit edilmiştir. %73.95 oranında apoptotik/ölu hücelere rastlanmıştır. Karmofur uygulamasında ise %97.25 canlılık tespit edilmiştir. %0.45 oranında ölu hücelere rastlanmıştır ve apoptoz indüklenmesinin arttığı tespit edilmiştir.

Bizim gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada fluorourasil türevi olan karmofur ve yeni sentezlediğimiz karmofur yüklü KLN formülasyonlarının A549 insan akciğer kanseri hüceleri üzerinde etkili bir antikanser özelliği göstermiştir. A549 hüceleri üzerinde yapılan uygulamalar ile gerçekleşen değişikliklerin yeni sentezlenen karmofur yüklü KLN formülasyonunda gerçekleşmesi, yeni bir antikanser terapötik ajanının meydana getirilmesi ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Ortaya çıkan bulgular neticesinde karmofur yüklü KLN formülasyonunun çeşitli hücre hatlarında denenerak antikanser özelliklerinin geliştirilmesi ve çeşitli hücre ve dokular üzerinde hedefli biçimde çalışma alanı bularak klinik tedavi uygulamalarında yer alacağı tahmin edilmektedir.

Yapılan araştırmanın sonuçlarına bakılarak, karmofur yüklü KLN formülasyonunun uygulanacak hücre içerisine daha kolay şekilde girmesi ve kontrolölu ilaç salınımı yapılması açısından A549 hücelerini karmofur ajanına kıyasla daha etkin bir biçimde apoptotik indükleme yolu kullanarak öldürdüğü görölmektedir. Bununla birlikte karmofur yüklü KLN formülasyonunun kanser tedavisi uygulamaları için gelecekte etkili bir şekilde kullanılacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Oylar, Ö., Tekin, İ., (2011). Kanserin Teşhis Ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt 16, Sayı 1.
- [2] Yaren, A., Öztop, İ., Erken Evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Adjuvan Kemoterapi, Adjuvant Chemotherapy For Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer: Review, Türkiye Klinikleri J Med Sci 2006, 26:649-654.
- [3] Öz, G., Sarınc Ulaşlı, S., Günay, E., Uysal, M., Ahsen, A., Solak, O., Afyonkarahisar Tuberk Toraks (2013). Akciğer Kanseri Konusunda Bilimsel Yayınlar: Türkiye’den Bir Bakış 61(4): 351-354.
- [4] Derman Semiz, B., (1990). İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi, Marmara Üniversitesi Yayın No: 476, Fen-Edebiyat Fakültesi Yayın No: 15.
- [5] http://www.turkkanserderneği.org/cancer_types_submenu.php?id=14 (Erişim Tarihi:30.12.2016)
- [6] Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group, Pattern of Lung Cancer in Turkey, 1994– 1998; Respiration 2002; 69: 207– 210.
- [7] Hastürk, S., Yüksel, M., (2000). Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi, Akciğer Kanseri. İstanbul: Bilmedya grup, 2000: 1- 27.
- [8] Fleischhacker, M., Beinert, T., Possinger, K.. (1999). Molecular genetic characteristics of lung cancer useful as ‘real’ tumor markers? Lung Cancer 1999; 25: 7– 24.
- [9] Niklinski, J., Niklinska, W., Laudanski, J., Chyczewska, E., Chyczewski, L. (2001) Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2001; 34: 53– 58.
- [10] Ahrendt SA, Chow JT, Yang, SC., Wu, L., Zhang, MJ., Jen, J., Sidransky, D. (2000). Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. 60 (12): 3155- 9.
- [11] Ahrendt, SA., Decker, PA., Alawi, EA., Zhu, Y., Cespedes, MS., Yang, SC., Haasler, GB., (2001). Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. Cancer 2001; 92: 1525- 1530.
- [12] Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, I., Fong, K., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T. ,Minna, J., Gazdar, A., (2005) Somatic Mutations of the HER2 Kinase Domain in Lung Adenocarcinomas. Cancer Res 2005; 65 (5) 1642-6.
- [13] Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. (2006) Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. Toraks Dergisi 2006; 7 (2): 1- 37.
- [14] Beckles, MA., Spiro, SG., Colice, GL., Rudd, RM., (2003). Initial evaluation of the patient with lung cancer. Chest 2003; 123: 97- 104.

- [15] Thomson, P., Greenwood, M., Meechan, G., (2010). General medicine and surgery for dental practitioners. Part 6 – cancer, radiotherapy and chemotherapy, British Dental Journal (BDJ), 2010, 209, 65–69.
- [16] Kayaalp, O., (1994), Tıbbi Farmakoloji, 4. Cilt, Feryal Matbaası, Ankara.
- [17] Aşcı, H., (2010), Metotreksat Kaynaklı Karaciğer Ve Böbrek Hasarında Misoprostolün Koruyucu Etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı.
- [18] Akyol, H., (2004), Kemoterapinin temel ilkeleri, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı.
- [19] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Sekreterliği, Kemoterapötikler, (2011), 421BB0015, Ankara.
- [20] Rang, HP., Dale, MM., Ritter, JM., Flower, RJ., Henderson, G., (2012). Rang and Dale's Pharmacology, New York, 2012, s: 673-688.
- [21] <http://www.generon.co.uk/amine-oxides-1830/carmofur-hc-fu-mifuro1-yamaful-98-231009409.html> (Erişim Tarihi: 30.12.2016)
- [22] Hajj, C., Becker-Flegler, KA., and Haimovitz-Friedman, A., (2015). Novel mechanisms of action of classical chemotherapeutic agents on sphingolipid pathways, Biol. Chem. 2015; 396(6-7): 669–679.
- [23] Saied, EM., Arenz, C., (2014). Small Molecule Inhibitors of Ceramidases, Cellular Physiology and Biochemistry, Cell Physiol Biochem 2014;34:197-212.
- [24] http://www.bilimteknik.tubitak.gov.tr/sites/default/files/posterler/kanser_poster.pdf (Erişim Tarihi: 10.12.2016)
- [25] <http://bilheal.bilkent.edu.tr/aykonu/ay2005/april05/kanser.html> (Erişim Tarihi: 10.12.2016)
- [26] Kutluk, T., Kars, A., (1992). Kanser Konusunda Genel Bilgiler, Ankara.
- [27] Williams, GM., (1992). DNA reactive and epigenetic carcinogens. Experimental and Toxicologic Pathology. 44: 457– 64.
- [28] Yokus, B., Akdag, M.Z., Dardag, S., Cakir, D.U., Kizil, M., (2008). Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Cause Oxidative DNA Damage in Rats. International Journal of Radiation Biology, 8 (10), 789-795.
- [29] Yokuş, B., Çakır, DÜ., (2012). İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.5: 535- 43.
- [30] Halliwell, B., Aruoma, OI., (1991). DNA damage by oxygen-derived species; Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS letters 281: 9-19.

- [31] Deshpande, SS., Irani, K., (2002). Oxidant signalling in carcinogenesis: a commentary. *Hum Exp Toxicol* 2: 63- 4.
- [32] Williams, GM., Jeffrey, A., (2000). Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Reg. Pharmacol. Toxicol* 32: 283–92.
- [33] Pazarbaşı, A., Kasap, M., (2003); *Kanser Genetiği*;12: 328.
- [34] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, EY., (2002). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme yayıncılık 569-75.
- [35] Scriver, CR., Beaudet, AL., Sly, WS., Valle, D. (2001). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill; 613-74.
- [36] Cotran, R., Kumar, V., Collins, T., (1998). *Robins Pathologic Basis of Disease*. In: *Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death*. *Cellular Pathology, II: Adaptations, Intracellular Accumulations, and Cell Aging*. Philadelphia: WB Saunders Co. 238- 85.
- [37] Fearhead, HO. (2004). Getting back on track, or what to do when apoptosis is derailed: recoupling oncogenes to the apoptotic machinery. *Cancer Biol Ther*. 3(1):21-8.
- [38] Yokuş, B., Mete, N. (2003). Oksidatif DNA hasarı. *Klinik Laboratuar Araştırma Dergisi*. 7(2); 51-64.
- [39] Smith, MR., Matthews, NT., Jones, KA., Kung, HF. (1993). Biological actions of onkogenes. *Pharmacol Ther*. 2: 211-36.
- [40] Kopnin, BP. (2000). Targets of onkogenes and tümör suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 1: 2-27.
- [41] Labazi, M., Phillips, AC. (2003). Oncogenes as regulators of apoptosis. *Essays Biochem*. 39: 89-104.
- [42] Liu, D., Wang, LH. (1994). Onkogenes, Protein Tyrosine Kinases, and Signal Transduction. *J Biomed Sci*. 2: 65-82.
- [43] Loeb, K.R., Loeb, LA. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21: 379–85.
- [44] Felsher, DW. (2004). Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 14(1):37-42.
- [45] Erkol Yılmaz, B., (2011), *Kansere Genel Bakış Kanser Tarama Programları Alternatif Tedavilere Bakış*, Haydarpaşa Numune EAH Tıbbi Onkoloji Ünitesi.
- [46] Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Dizbay Sak, S., Tükün, A., Yalçın, B. (2011). *Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi Ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu*, *Meme Sağlığı Dergisi* 2011 Cilt: 7, Sayı: 2.

- [47] Záková, J., Lousová, E., Ventruba, P., et al. (2014). Testis kanseri tedavisi öncesi sperm kriyoprezervasyonu ve infertilite tedavisine katkıları, *Scientific World Journal* 2014: 1-5.
- [48] Altıntoprak, F., Balık, E., Hacıahmetoglu, T., Eren, T., Yamaner, S., Bulut, T., Bugra, D., Büyükuncu, Y., Akyüz, A., Sökücü, N., The Comparison of Endorectal Magnetic Resonance Imaging and Endorectal Ultrasound for the Staging of Rectal Cancer İstanbul Üniversitesi, Çapa Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD, İstanbul.
- [49] Karahasanoğlu, T., (2001). Kolorektal Kanserler: Tanı ve Cerrahi Tedavi Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu 11-12 Ocak 2001, İstanbul, s. 271-279.
- [50] Kling, M., Zeichner, JA., (2010). The role of the human papillomavirus (HPV) vaccine in developing countries. *International Journal of Dermatology* 2010;49(4):377-379.
- [51] Nazlıcan, E., Akbaba, M., Koyuncu, H., Savaş, N., Karaca, B., (2010). Hatay ili Kisecek bölgesinde 35-40 yaş arası kadınlarda serviks kanseri taraması. *TAF Preventive Medicine Buletin* 2010;9(5):471-474.
- [52] Arbyn, M., Raifu, AO., Autier, P., Ferlay, J., (2007). Burden of cervical cancer in Europe: Estimates for 2004. *Annals of Oncology* 2007;18(10):1708-1715.
- [53] Mthembu, NN., Motadi, LR. (2014). Apoptotic potential role of *Agave palmeri* and *Tulbaghia violacea* extracts in cervical cancer cells. *Molecular Biology Reports* 2014; 42(9):6143-6155.
- [54] Akın, İ., Vuralkan, E., Günsoy, B., Saka, C., Akçayöz, N., Simsek, G., (2013). Oncologic outcomes of surgical treatment in supraglottic larynx cancer. *J Med Updates* 2013;3(1):8-12 doi:10.2399/jmu.2013001003.
- [55] <http://www.kanserveyasam.org/kanser-hakkinda/kanser-turleri/adan-zye-kanser-turleri/larenks--girtlak-kanserleri/> (Erişim Tarihi:10.12.2016)
- [56] Prostat Kanserinde Yeni Belirteçler ve Phi Skoru Novel Biomarkers in Prostate Cancer and Phi Score Ahmet Hamdi Tefekli Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, İstanbul, *Türk Urol Sem* 2012; 3: 61-9, doi:10.5152/tus.2012.1.
- [57] <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/43-cilt-kanseri.html> (Erişim Tarihi: 10.12.2016)
- [58] Öztöp, İ., (2009). *International Journal of Hematology & Oncology / UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, Vol. 19 Issue 3, p184-194. 11p. 3 Charts.
- [59] Aydiner, A., Can, G., (2010). Akciğer kanserinde tedavi ve bakım, 1. Baskı: İstanbul, Haziran 2010, ISBN: 978-605-125-143-1.

- [60] Alar, T., Şahin, EM., (2012), Akciğer kanseri: birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma, Lung cancer: Diagnosis, treatment and prevention in primary care, Smyrna Tıp Dergisi.
- [61] T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, (2015), Türkiye Kanser İstatistikleri, Ankara 2015.
- [62] Kvale, PA. (2002). Lung Cancer. In ACCP Pulmonary Board Review. Continuing medical education course syllabus, USA, 2002;35-50.
- [63] Müsellim, B., (2007). Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar II, Sindirim Sistemi Hastalıkları-Akciğer Kanseri Güncel Yaklaşım, Sempozyum Dizisi No:58 1 Kasım 2007; s.113-118.
- [64] http://file.toraks.org.tr/TORAKSFD23NJKLANJ4H3BG3JH/mesleki-kurslar-2-ppt-pdf/Atilla_Akkoclu.pdf (Erişim Tarihi: 07.11.2016)
- [65] Aydın, A., Topuz, E. (2006), Akciğer Kanseri Tanı - Tedavi – Takip İstanbul Konsensusu (2006), 2007, Nobel Tıp Kitabevleri Isbn: 978-975-420-567-1.
- [66] Yener, NA., Apa, DD. (2014), Türk Radyoloji Derneği, Türk Radyoloji Seminerleri, Akciğer Kanseri Morfolojik Tanı ve Sınıflama, Trd Sem 2014; 2: 281-289.
- [67]https://www.encodeproject.org/documents/7f983ac2-a390-4b37-b0d5-458d61b8a1a2/@download/attachment/A549_protocol.pdf (Erişim Tarihi: 08.02.2017)
- [68] <http://www.a549.com> (Erişim Tarihi: 08.02.2017)
- [69]http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/a549/a549_cells.html (Erişim Tarihi: 07.03.2017)
- [70] <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-209-gfp-a549-cell-line.pdf> (Erişim Tarihi: 07.03.2017)
- [71] http://www.nanopartikel.info/files/methodik/VIGO/cell_culture_A549.pdf (Erişim Tarihi: 08.03.2017)
- [72] Ası, T., (1999). Tablolarla Biyokimya Cilt 2, Ankara, 1999.
- [73] <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-12.pdf>. (Erişim Tarihi: 09.03.2017)
- [74]http://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1026/mod_resource/content/1/8.%20Lipid-metabol.pdf (Erişim Tarihi: 09.03.2017)

- [75] Erdamar, H., Hacıevliyagil, F., Gök, S., (2015) Biochemical Changes in Cancer, Kanserde Biyokimyasal Değişiklikler, Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2015 DOI: 10.4328/JCAM.3234.
- [76] Van Boxel, C.J. (2007) İlaç Yararları ve Riskleri, Farmakoterapötik Ürünler, 10. Bölüm, Antineoplastik Ajanlar.
- [77] Türker, A., Dizar, Ö. (2005). Kematerapötikler, MİSED, 11-12. Sayılar.
- [78]https://kanser.org/saglik/upload/Onkolojide_ilac_Etkilesimleri/Antimetabolitelerin_Ilac_Etkilesimleri%23Gokhan_Demir.pdf (Erişim Tarihi: 10.03.2017)
- [79] Domracheva, I., Muhamadejev, R., Petrova, M., Liepinsh, E., Gulbe, A., Shestakova, I., Duburs, G., Arsenyan, P. (2015). 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) increases Carmofur stability and in vitro antiproliferative effect. Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, LV-1006, Riga, Latvia, Toxicology Reports 2 (2015) 377–383, 2015.
- [80] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carmofur#section=Top> (Erişim Tarihi: 10.03.2017)
- [81] <https://www.caymanchem.com/pdfs/14243.pdf> (Erişim Tarihi: 10.03.2017)
- [82] Niimoto, M., Hattori, T., Tamada, R., Sugimachi, K., Inokuch, K., Ogawa, N. (1987). Mitomycin C Plus Carmofur (Hcfu) Adjuvant Chemotherapy For Noncuratively Resected Cases Of Colorectal Carcinoma (Interim Report), Japanese Journal Of Surgery, Vol 17, No. 5 Pp. 354-361, 1987.
- [83] Realini, N., Solorzano, C., Pagliuca, C., Pizzirani, D., Armirotti, A., Luciani, R., Costi, MP., Bandiera, T., Piomelli, D. (2012), Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity. Scientific Reports;3:1035.
- [84] <https://www.lktlabs.com/product/carmofur/> (Erişim Tarihi: 20.03.2017)
- [85] Sakamoto, J., Hamada, C., Rahman, M., Kodaira, S., Ito, K., Nakazato, H., Ohashi, Y., Yasutomi, M. (2005), An Individual Patient Data Meta-analysis of Adjuvant Therapy with Carmofur in Patients with Curatively Resected Colon Cancer, Jpn J Clin Oncol (2005) 35 (9): 536-544.
- [86] <http://www.drugfuture.com/mt/carmofur.pdf> (Erişim Tarihi: 20.03.2017)
- [87] <http://www.selleckchem.com/products/Carmofur.html> (Erişim Tarihi: 20.03.2017)
- [88] Natalia, R., Daniela, P., Chiara, P., Andrea, A., Tiziano, B., De Vivo, M., Daniele, P., (2013) Highly potent acid ceramidase inhibitors with marked cancer chemosensitization activity, Unit of Drug Discovery and Development, Italian Institute of Technology, 16163 Genoa, Italy, Departments of Pharmacology and Biological Chemistry, University of California, Irvine, Irvine, California 92697-4625.

[89] Tuncer, S., Demirci, M. (2011), Dental Materyallerde Biyoyumluluk Değerlendirmeleri, The Evaluation Of Dental Materials Biocompatibility, Dr. Safa Tuncer, Prof. Dr. Mustafa Demirci, Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. Cilt:21, Sayı: 2, Yıl: 2011, Sayfa: 141-149.

[90]<http://aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=9&USER=746>
(Erişim Tarihi: 21.03.2017)

[91] Zeynep, A., Biçer, Y., (2011). Seromer Esaslı İki Farklı İndirekt Kompozit Materyalin Sitotoksik Etkilerinin In Vitro Değerlendirilmesi, An In Vitro Cytotoxicity Of Ceromer Based Two Different Indirect Composite Materials, Gü Diş Hek Fak Derg 28(2): 69-74, 2011.

[92] <https://prezi.com/5w8yfk4ftvp/ilac-tasyc-sistemlerde-kat-lipid-nanopartikullerinin-onemi/> (Erişim Tarihi: 21.03.2017)

[93] Numanoğlu, U., Tarmacı, N., (2006). Katı Lipid Nanopartiküllerin (SLN) Özellikleri, Farmasötik Ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları, Characterization Of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) And Their Pharmaceutical And Cosmetic Applications, Ankara Ecz. Fak. Derg, Ankara 35 (3) 211 - 235, 2006.

[94]http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783319107103-c2.pdf?SGWID=0-0-45-1475520-p176914612 (Erişim Tarihi: 21.03.2017)

[95] Ekambaram, P., Sathali AH., Priyanka, K. (2011). Solid Lipid Nanoparticles: A Review And K. Priyanka Department Of Pharmaceutics, College Of Pharmacy, Madurai Medical College, Madurai – 625020 (T.N.).

[96] Oyar, P., (2014). Diş Hekimliğinde Nanopartiküllerin Kullanım Alanları, Nanoparticles Application Areas In Dentistry, Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. Oyar J Dent Fac Atatürk Uni Supplement: 8, Yıl: 2014, Sayfa: 49-55.

[97] Mukherjee, S., Ray, S., Thakur, R.S., (2009) Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System Department of Pharmaceutics, Krupanidhi College of Pharmacy, Bangalore-560 034, India.

[98] Garud, A., Singh, D., Garud, N., (2012) Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications, Garud et al., International Current Pharmaceutical Journal 2012, 1(11): 384-393.

[99] Akşit, H., Bildik, A. (2008) Apoptosis, Yü. Vet. Fak. Derg. (2008) 19(1): 55-63.

[100] Solakoğlu, Z., (2009) Apoptoz Varlığı Ya Da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni, Klinik Gelişim Dergisi, Cilt: 22 / No:3 2009 Klinik Fizyopatoloji.

- [101] Kartlaşmış, K., Kökbaş, U., Kayrın, L., (2016) Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, Archives Medical Review Journal Apoptozis Biyokimyası Biochemistry of Apoptosis, 2016; 25(1):52-69 doi:10.17827/aktd.16717.
- [102] Lambert, B., Wiele, C.V. (2005). Treatment of hepatocellular carcinoma by means of radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*, 32, 980–989.
- [103] <https://home.ccr.cancer.gov/CCBB/Confocal%20Poster.pdf> (Erişim Tarihi: 08.04.2017)
- [104] http://www.tip.hacettepe.edu.tr/actamedica/2004/sayi_2/baslik10.pdf (Erişim Tarihi: 08.04.2017)
- [105] Gourdie, R.G.(1993). Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in Cell Biology.*, 38.
- [106] <http://docplayer.biz.tr/6570666-1-elektron-taramali-mikroskop-sem.html> (ErişimTarihi: 08.04.2017)
- [107] Glauert, A.M., Lewis, P.R. (1998). Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. *Princeton University Press, New Jersey*, ISBN: 0-691-00749-2 (Cloth) , ISBN: 0-691-00900-7 (pbk).
- [108] Müller, R.H., Mader, K. and Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm-Biopharm.*, 5,161-177.
- [109] Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, SA. (2003). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, suppl. 1, 131-S155.
- [110] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 16 (65), 55-63.
- [111] Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., Takata, K. (1997). DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 45 (1), 49–53.
- [112] Tepikin, A.V. (2001). Calcium Signalling, A Practical approach, Second Edition, *Oxford University Press.*, 17-21.
- [113] Ray, R.S., Ghosh, B., Rana, A., Chatterjee M. (2006). Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: Chemopreventive activity of vanadium *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Cancer.*, 120, 13–23.
- [114] Yokus B. ve Ülker D.Ü. (2012): Kanser Biyokimyası, Dicle Üniv Vet Fak Derg 2012: 1(2): 7-18.

[115] Ölgem, S., Bıçak, I., Nebioğlu, D., (2002) Angiogenesis Ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar, Angiogenesis And New Aspects Of Cancer Chemotherapy, Ankara Ecz. Fak. Derg. 31 (3)193-214,2002, Ankara-Turkey.

[116] Sun, J., Zhang, S.J., Li, H.B., Zhou, W., Hu, W.X., Shan, S., (2013) Novel 5-Fluorouracil Derivatives: Synthesis and Cytotoxic Activity of 2-Butoxy-4-Substituted 5-Fluoropyrimidines, Synthesis and Cytotoxicity of 5-Fluorouracil Derivatives, Bull. Korean Chem. Soc. 2013, Vol. 34, No. 5 1349.