

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKSORUBİSİN YÜKLÜ  
MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN MEME KANSERİNE  
ETKİSİNİN IN-VITRO İKİ BOYUTLU (2D) VE  
ÜÇ BOYUTLU (3D) DEĞERLENDİRİLMESİ**

MELEK AYDIN

**TEMEL ONKOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZMİR-2019**

**TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2016970076**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKSORUBİSİN YÜKLÜ  
MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN MEME KANSERİNE  
ETKİSİNİN IN-VITRO İKİ BOYUTLU (2D) VE  
ÜÇ BOYUTLU (3D) DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MELEK AYDIN**

**TEMEL ONKOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SAFİYE AKTAŞ**

**TEZ KODU: DEU.HSI.MSC-2016970076**

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı Temel Onkoloji  
Yüksek Lisans programı öğrencisi Melek AYDIN “**DOKSORUBİSİN YÜKLÜ  
MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN MEME KANSERİNE ETKİSİNİN IN-VITRO İKİ  
BOYUTLU (2D) VE ÜÇ BOYUTLU (3D) DEĞERLENDİRİLMESİ**” 25.06.19 tarihinde  
başarılı olarak tamamlanmıştır.



**BAŞKAN**

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

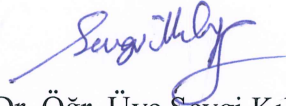
(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)



Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)



Dr. Öğr. Üye. Sevgi Kılıç ÖZDEMİR

ÜYE

(İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Kimya Mühendisliği)

Prof. Dr. Ekrem ÖZDEMİR

YEDEK ÜYE

(İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Kimya Mühendisliği)

Prof. Dr. Osman YILMAZ

YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri MYO)

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>TABLolar DİZİNİ .....</b>                                                        | <b>iii</b> |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>                                                        | <b>iv</b>  |
| <b>KISALTMALAR .....</b>                                                            | <b>vi</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR.....</b>                                                                | <b>vii</b> |
| <b>ÖZET.....</b>                                                                    | <b>1</b>   |
| <b>İNGİLİZCE ÖZET .....</b>                                                         | <b>3</b>   |
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                                                       | <b>5</b>   |
| 1.1. Problemin Tanımı .....                                                         | 5          |
| 1.2. Araştırmanın Amacı .....                                                       | 5          |
| 1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri .....                                            | 5          |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                                                       | <b>6</b>   |
| 2.1. Meme Kanseri.....                                                              | 6          |
| 2.2. Meme Kanseri Etiyolojisi.....                                                  | 7          |
| 2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi .....                                             | 8          |
| 2.4. Meme Kanseri Patogenezi .....                                                  | 9          |
| 2.5. Histopatoloji .....                                                            | 11         |
| 2.6. Meme Kanseri Fiziksel Belirtiler .....                                         | 11         |
| 2.7. Evreleme.....                                                                  | 11         |
| 2.8. Prognoz.....                                                                   | 12         |
| 2.9. Meme Kanseri Tedavi .....                                                      | 12         |
| 2.10. Doksorubisin.....                                                             | 13         |
| 2.10.1. Etki Mekanizması .....                                                      | 14         |
| 2.10.2. Uygulanma Şekli .....                                                       | 14         |
| 2.10.3. Yan Etkileri .....                                                          | 15         |
| 2.11. Lipozomal Doksorubisin .....                                                  | 15         |
| 2.12. Konvansiyonel Antrasiklinler ile Lipozomal Doksorubisinin Karşılaştırılması17 |            |
| 2.13. Ultrason ve Mikroköpükçük Yönlendirmeli İlaç Taşınımı .....                   | 18         |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                                     | <b>20</b>  |
| 3.1. Araştırmanın Tipi.....                                                         | 20         |

|                                                                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı .....                                                                                                                                            | 20        |
| 3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi .....                                                                                                                                       | 20        |
| 3.4. Çalışma Materyali .....                                                                                                                                                      | 20        |
| 3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....                                                                                                                                               | 21        |
| 3.6. Veri Toplama Araçları .....                                                                                                                                                  | 21        |
| 3.6.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler .....                                                                                                                                        | 21        |
| 3.6.2. Mikroköpükçüklerin hazırlanışı ve karakterizasyonu: .....                                                                                                                  | 22        |
| 3.6.3. Lipozomların hazırlanışı ve karakterizasyonu .....                                                                                                                         | 22        |
| 3.6.4. Mikroköpükçük-lipozom bağlanmalarının yapılması.....                                                                                                                       | 23        |
| 3.6.5. Doksorubisin, lipozomal doksorubisin ve hedeflendirilmiş doksorubisin<br>yükü mikroköpükçüklerin 2D ve 3D meme kanser hücreleri üzerine etkinliğinin<br>belirlenmesi ..... | 23        |
| 3.6.6. WST-1 ile hücre proliferasyonunun tayini.....                                                                                                                              | 24        |
| 3.6.7. Flow sitometrik Annexin V-FITC/PI boyaması ile apoptoz ve nekroptoz<br>Tayini .....                                                                                        | 24        |
| 3.6.8. Parafin kesitlerde TUNEL ile apoptoz analizi .....                                                                                                                         | 24        |
| 3.6.9. İmmunhistokimya boyama.....                                                                                                                                                | 25        |
| 3.6.10. Akış denemesi .....                                                                                                                                                       | 26        |
| 3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi .....                                                                                                                                          | 26        |
| 3.8. Verilerin Değerlendirilmesi .....                                                                                                                                            | 26        |
| 3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları .....                                                                                                                                            | 26        |
| 3.10. Etik Kurul Onayı.....                                                                                                                                                       | 27        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                                                                                                           | <b>28</b> |
| 4.1. WST-1 ile Hücre Proliferasyonunun Tayini.....                                                                                                                                | 28        |
| 4.1.1 DOX Etkisinin WST-1 ile araştırılması.....                                                                                                                                  | 28        |
| 4.1.2 LipoDOX Etkisinin WST-1 ile Araştırılması .....                                                                                                                             | 32        |
| 4.2. Flow sitometrik Annexin V-FITC/PI boyaması ile apoptoz ve nekroptoz<br>Tayini.....                                                                                           | 35        |
| 4.3. Parafin kesitlerde TUNEL ile apoptoz analizi.....                                                                                                                            | 36        |
| 4.4. İmmunhistokimya boyama .....                                                                                                                                                 | 37        |

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.1 2D Hücre Kesit Bulguları .....                          | 37        |
| 4.4.2 3D Kesit Hematoksilen Eozin Bulguları .....             | 41        |
| 4.4.3 3D Hücre Kesitlerin İmmünohistokimyasal Bulguları ..... | 42        |
| 4.5. Akış denemesi.....                                       | 45        |
| 4.5.1 2D Akış Düzenegi .....                                  | 45        |
| 4.5.2 3D Akış Düzenegi .....                                  | 47        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                       | <b>48</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                             | <b>51</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                     | <b>52</b> |
| <b>8. EKLER.....</b>                                          | <b>58</b> |
| <b>EK-1: Etik Kurul Raporu.....</b>                           | <b>58</b> |
| <b>EK-2:ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                    | <b>60</b> |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Deney koşullarındaki apoptoz değerlendirme bulguları.....                                  | 42 |
| <b>Tablo 2.</b> 4T1, MDAMB-231 ve MCF7 3D hücrelerinin parafin kesitlerin TUNEL ile apoptoz bulguları..... | 43 |
| <b>Tablo 3.</b> 4T1 hücrelerinde Ki-67,Kaspaz 3-8-9 ‘un immünohistokimyasal bulguları.....                 | 46 |
| <b>Tablo 4.</b> MDAMB-231 hücrelerinde Ki-67,Kaspaz 3-8-9 ‘un immünohistokimyasal Bulguları.....           | 47 |
| <b>Tablo 5.</b> MCF7 hücrelerinde Ki-67,Kaspaz 3-8-9 ‘un immünohistokimyasal bulguları ...                 | 47 |
| <b>Tablo 6.</b> MDAMB-231 3D hücrelerinde Ki-67,Kaspaz 3-8-9 ‘un immünohistokimyasal bulguları .....       | 51 |
| <b>Tablo 7.</b> MCF7 3D hücrelerinde Ki-67,Kaspaz 3-8-9 ‘un immünohistokimyasal Bulguları.....             | 51 |
| <b>Tablo 8.</b> 4T1 3D hücrelerinde Ki-67,Kaspaz 3-8-9 ‘un immünohistokimyasal bulguları ..                | 51 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                   | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Şekil 1. Memenin anatomisi.....                                                                   | 13       |
| Şekil 2. Risk faktörlerinin ve korunma yaklaşımlarının şematik diyagramı.....                     | 15       |
| Şekil 3. Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen kanserler .....                              | 16       |
| Şekil 4. Meme kanseri başlangıcı ve ilerlemesine dair iki teori.....                              | 17       |
| Şekil 5. Doksorubisinin Molekül Yapısı.....                                                       | 21       |
| Şekil 6. Pegile liposomal doksorubisin yapısı.....                                                | 23       |
| Şekil 7. 4T1 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği..               | 34       |
| Şekil 8.4T1 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.                 | 35       |
| Şekil 9.4T1 Hücrelerine 72 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.                 | 35       |
| Şekil 10. MCF-7 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği .....        | 36       |
| Şekil 11. MCF-7 Hücrelerine 48 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği. ....        | 36       |
| Şekil 12. MDAMB-231 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.....     | 37       |
| Şekil 13. MDAMB-231 Hücrelerine 48 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.....     | 37       |
| Şekil 14. MCF-7 hücrelerine 24 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği. ....    | 38       |
| Şekil 15. MCF-7 hücrelerine 48 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.....     | 39       |
| Şekil 15. 4T1 hücrelerine 24 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği. ....      | 39       |
| Şekil 16. 4T1 hücrelerine 48 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği .....      | 40       |
| Şekil 17. MDAMB-231 hücrelerine 24 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği..... | 40       |
| Şekil 18. MDAMB-231 hücrelerine 48 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği..... | 41       |
| Şekil 19.MCF-7 hücrelerinin DOX uygulanmasıyla Annexin-V –FITC/ PI bulguları .....                | 41       |
| Şekil 20. 4T1 hücrelerinin DOX uygulanmasıyla Annexin-V –FITC/ PI bulguları.....                  | 42       |

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 21.</b> MCF-7 ve 4T1 3D Hücre bloğunun parafin kesitlerde TUNEL ile apoptoz analizi.                                                                                  |    |
| <b>Şekil 22.</b> Hücre proliferasyonunun ( Ki-67) inhibisyonu. ....                                                                                                            | 44 |
| <b>Şekil 23.</b> 4T1 hücrelerinin Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 antikorları ile<br>immünohistokimyasal boyanması.....                                                                   | 44 |
| <b>Şekil 24.</b> 4T1,MCF7 hücrelerinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 antikorları ile<br>immünohistokimyasal boyanması.....                                                              | 45 |
| <b>Şekil 25.</b> MCF-7 hücrelerinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 antikorları ile<br>immünohistokimyasal boyanması.....                                                                 | 45 |
| <b>Şekil 26.</b> MDAMB-231 hücrelerinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 antikorları<br>ile immünohistokimyasal boyanması.....                                                             | 46 |
| <b>Şekil 27.</b> MCF-7 MDAMB-231 ve 4T1 hücrelerinin 3D Parafin kesitlerden<br>Hematoksilen Eozin ile boyanması.....                                                           | 48 |
| <b>Şekil 28.</b> MCF-7 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Ki-67 ve Kaspaz 3 antikorları<br>ile immünohistokimyasal boyanması.....                                                     | 48 |
| <b>Şekil 29.</b> MCF-7 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 antikorları<br>ile immünohistokimyasal boyanması.....                                                  | 49 |
| <b>Şekil 30.</b> 4T1 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Ki-67 ve Kaspaz 3 antikorları<br>ile immünohistokimyasal boyanması.....                                                       | 49 |
| <b>Şekil 31.</b> 4T1 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 antikorları<br>ile immünohistokimyasal boyanması.....                                                    | 50 |
| <b>Şekil 32.</b> MDAMB-231 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz<br>9 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. ....                            | 50 |
| <b>Şekil 33.</b> In- Vitro çalışmalarda kullanılan 2D ve 3D akış düzenek tasarımı (a) Taban<br>akış kanalı ve kapak tasarımı, (b) mikroskop altında görüntüleme düzeneği. .... | 52 |
| <b>Şekil 34.</b> MDAMB -231 2D hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile<br>akış düzeneğinde etkileşimi.....                                                               | 52 |
| <b>Şekil 35 .</b> MCF-7 hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile akış<br>düzeneğinde etkileşimi.....                                                                      | 53 |
| <b>Şekil 36.</b> MDAMB -231 3D hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile akış<br>düzeneğinde etkileşimi.....                                                               | 53 |
| <b>Şekil 37.</b> MCF7 3D hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile akış düzeneğinde<br>etkileşimi .....                                                                    | 54 |

## KISALTMALAR

|                 |                                                                         |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>CSC</b>      | : Kanser Kök Hücresi                                                    |
| <b>CMF</b>      | : Metotreksat ve 5-florourasil                                          |
| <b>DCIS</b>     | : Duktal Karsinom In Situ                                               |
| <b>DOX</b>      | : Dokсорubisin                                                          |
| <b>HRT</b>      | : Hormon Replasman Tedavisi                                             |
| <b>LCIS</b>     | : Lobüler Karsinom In Situ                                              |
| <b>PI</b>       | : Propidyum İyodür                                                      |
| <b>Lipo-DOX</b> | : Lipozomol Dokсорubicin                                                |
| <b>FITC</b>     | : Florosein İzotiyosiyanat                                              |
| <b>WST-1</b>    | : 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum |
| <b>TUNEL</b>    | : Terminal Deoksi Nükleotidil Transferaz dUTP Nick Ucu İşaretleme       |
| <b>2D/3D</b>    | : 2 boyutlu/3 boyutlu                                                   |

## TEŞEKKÜR

Zaman ve bilgi desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Safiye AKTAŞ hocam'a, desteğini esiremeyen Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN hocam'a akım sitometri cihazında yardımını esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Halil ATEŞ'e teşekkür ederim.

Çalışmada katkıları olan saygıdeğer hocalarım; Dr. Öğr. Üye. Sevgi Kılıç ÖZDEMİR ve Prof. Dr. Ekrem ÖZDEMİR'e,

Desteğini her zaman hissettiğim, bitirmem için beni sabırla teşvik eden Dr. Pınar ERÇETİN'e bu çalışmada emeği geçen destek ve katkılarıyla Ömer BEKÇİOĞLU, Gamze SANLAV, Berçem HANOĞLU ve Umur AYAZ'a teşekkür ederim.

Tezi, beni her zaman izlediğine emin olduğum Anneannem Melek ZEYDAN'a ithaf ediyorum.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde maddi desteklerinden dolayı 213M668 no'lu proje kapsamında TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Melek AYDIN

# DOKSORUBİSİN YÜKLÜ MİKROKÖPÜKÇÜKLERİN MEME KANSERİNE ETKİSİNİN IN - VITRO İKİ BOYUTLU( 2D) VE ÜÇ BOYUTLU( 3D ) DEĞERLENDİRİLMESİ

Melek AYDIN, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İnciraltı Mahallesi DEÜ Sağlık Yerleşkesi, İZMİR

## ÖZET

**Amaç:** Meme kanserinde kullanılan kemoterapötiklerin sistemik yan etkileri vardır. Bu yan etkilerin bertaraf edilmesi ya da azaltılması için son yıllarda hedeflendirilmiş tedavi stratejileri araştırılmaktadır. Ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin meme kanseri hücrelere hedeflendirilmesi ve bunlara meme kanseri tedavisinde kullanılan Doksorubisin (DOX) yüklenmesi, bu ajanların patlatılarak ilacın sonoporasyon etkisiyle doğrudan kanserli hücrelere aktarılması, ve kanserli hücrelerin bertaraf edilmeleri amaçlanmaktadır. Daha önceki çalışmalarımızda ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin üretilmiş, kemoterapötik ilaç olan DOX'un lipozomlar içerisine hapsedilmiş, DOX yüklü lipozomların mikroköpükçüklere bağlanmıştır. Bu çalışmada DOX yüklü mikroköpükçüklerin ve liposomal doksorubisinin *in vitro* meme kanseri hücre hatlarına iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) etkisi araştırılmıştır.

**Yöntem:** Bu çalışmada DOX, LipoDOX ve DOX yüklü mikroköpükçüklerin meme kanseri üzerine etkileri *in vitro* iki ve üç boyutlu düzeyde araştırılmıştır. Bu amaçla farklı özelliklerdeki meme kanseri hücre hatları (4T1, MDA-MB231, MCF-7) iki ve üç boyutlu (matrijel tabanlı) üretilerek, değişik koşul, süre ve dozlarda sitotoksik ve hücre ölümü etkisi WST-1, tripan mavisi, koloni sayımı, Annexin V-PI İmmunhistokimyasal (Ki-67, kaspaz 3, 8,9) yöntemleri ile araştırılmıştır. Elde edilen bulgular non-parametrik testlerle  $p<0,05$  düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** DOX uygulandıktan sonra her üç hücre hattında da proliferasyon indeksinin azaldığı ve intrinsik ve ekstrensik yolların her ikisinin de aktiflendiği hem 2D hem de 3D modelde tespit edilmiştir. Ancak bu etki 3D modelde DOX'un sferoidlerin içine difüzyonunun daha güç olması nedeniyle daha düşük düzeyde görülmüştür. Ayrıca 3D modellemenin meme kanseri hücre kültürü modeli açısından uygun olduğu oluşan duktus yapıları ve sferoidler ile desteklenmiştir. Mikroköpükçük deneylerin, mikroköpükçüklerin yüzeye çıkması ve 3D modelde büyük olmaları nedeniyle matrijelin altında kalmaları sonucu deneylere devam edilememiştir.

**Sonuç:** DOX, meme kanseri hücre kültüründe anti-proliferatif ve apoptoz indükleyici etki göstermektedir. Ancak bu etki; hücre hatlarının birbiri arasında ve 2D ile 3D modelleme türüne

göre değişmektedir. Bu nedenle 3D sferoid modellemesi özellikle ilaç etkinliği çalışması için oldukça önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** 3D hücre kültürü, meme kanseri, mikroköpükçük, ilaç taşınıml



IN-VITRO TWO-DIMENSIONAL ( 2D) AND THREE DIMENSIONAL (3D)  
EVALUATION OF THE EFFECT OF DOXORUBICIN-LOADED MICROBUBBLES ON  
BREAST CANCER

Melek AYDIN, Institute of Health Sciences, Inciraltı Mah, İZMİR

**İNGİLİZCE ÖZET**

**Aim:** Chemotherapeutics used in breast cancer have systemic side effects. In recent years, targeted treatment strategies have been investigated in order to eliminate or reduce these side effects. Mainly it is aimed to target ultrasound contrast agent micro-bubbles to breast cancer cells by loading doxorubicin (DOX) which is used in the treatment of breast cancer. In our previous studies, the ultrasound contrast agent was bound to the microbubbles were produced; DOX, a chemotherapeutic drug, was encapsulated in liposomes in the liposomes of DOX, and this structure was attached to microbubbles. In this study, two - dimensional (2D) and three - dimensional (3D) effects of DOX-loaded microbubbles and liposomal doxorubicin were investigated in *in vitro* breast cancer cell lines.

**Method:** In this study, the effects of DOX, LipoDOX and DOX-loaded microbubbles on breast cancer were investigated in *in vitro* two and three dimensional levels. For this purpose, breast cancer cell lines of different characteristics (4T1, MDA-MB231, MCF-7) were produced in two and three dimensions (matrigel-based). The cytotoxic effects of different doses and duration were evaluated by WST-1, trypan blue, colony forming assay, Annexin V-PI, and immunohistochemistry (Ki-67, caspase 3,8,9). The results obtained were statistically compared with nonparametric tests at  $p < 0.05$  level.

**Results:** After the DOX administration, both in the 2D and 3D models proliferation index were decreased and both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways were activated in all three breast cancer cell lines. However, these effects were lower in the 3D model due to the insufficient diffusion of DOX into spheroids. However, 3D modeling was found suitable for breast cancer cell culture model as supported by formation of ductal structures and spheroids. Microbubble experiments could not be continued due to the fact that the flooding of microbubbles in 2D and remaining above the matrigel as a result of their big sizes in 3D.

**Conclusion:** DOX shows anti-proliferative and apoptosis inducing effects in breast cancer cell culture. But this effect vary among different characterized cell lines and also according to 2D

and 3D modeling type. Therefore, 3D spheroid modeling is found to be important especially for drug efficacy studies.

**Keywords:** 3D cell culture, breast cancer, microbubbles, drug delivery



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

### 1.1. Problemin Tanımı

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve her yıl 10 yeni kanser tanısının birden fazlasını oluşturur. Dünya genelinde kadınlar arasında kanserden kaynaklanan en yaygın ikinci ölüm nedenidir. Yaygın olarak kanser hastalarındaki yan etkileri azaltmaya ve yok etmeye yönelik yeni yaklaşımlar getiren çalışmalar sürmektedir. Bu problemi berteraf etmek üzere lipozomlara hapsedilmiş kanser ilaçlarının kullanılması günümüzde uygulanan tedavi yöntemlerindendir. Lipoplatin (lipozom içinde hapsedilmiş sisplatin), LipoDOX (lipozom içine hapsedilmiş doksorubisin (DOX) ticari onay almış örneklerdir.

Mikroköpükçüklerin kabuk yapısında bir fosfolipid ve uzun zincirli emülsifier molekülleri bulunmaktadır. Ultrason uygulandığında yaratılan yüksek basınçlarda mikroköpükçüklerin boyutları küçülerek bir kompresyon hareketi yaparken, basınç azaldığında mikroköpükçüklerin boyutlarında büyüme meydana gelebilmektedir. Böylelikle, ultrason görüntülemeye oluşan osilasyon hareketi ile elde edilen sinyaller vasıtasıyla daha net ve anlaşılır bilgi edinilmesi sağlanır. Ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin ultrason altında osilasyonları esnasında hücre duvarında porlar meydana gelmektedir. Ultrason şiddeti arttığında, mikroköpükçüklerde jet akışı oluşmakta ve bunun sonucunda hücre duvarında delik açılarak dışarıdan hücre içerisine madde akışına imkân vermektedir.

Ultrason kontrast ajanları aynı zamanda ilaç ve gen taşınımında da kullanılabilir. Kanser ilacı DOX yüklü lipozomlar ile kaplanmış ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerde bağlanma avidin-biyotin köprüsü üzerinden yapılmaktadır. Bu proje kapsamında daha önceki çalışmalarımızda ultrason kontrast ajanı mikroköpükçüklerin üretilmiş, kemoterapik ilaç olan DOX'un lipozomlar içerisine hapsedilmiş, DOX yüklü lipozomların mikroköpükçüklere bağlanmıştır.

### 1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı *in vitro* meme kanseri hücrelerinde DOX, LipoDOX ve DOX-yüklü mikroköpükçüklerin 2D ve 3D hücre kültürü modelinde etkilerinin değerlendirilmesidir.

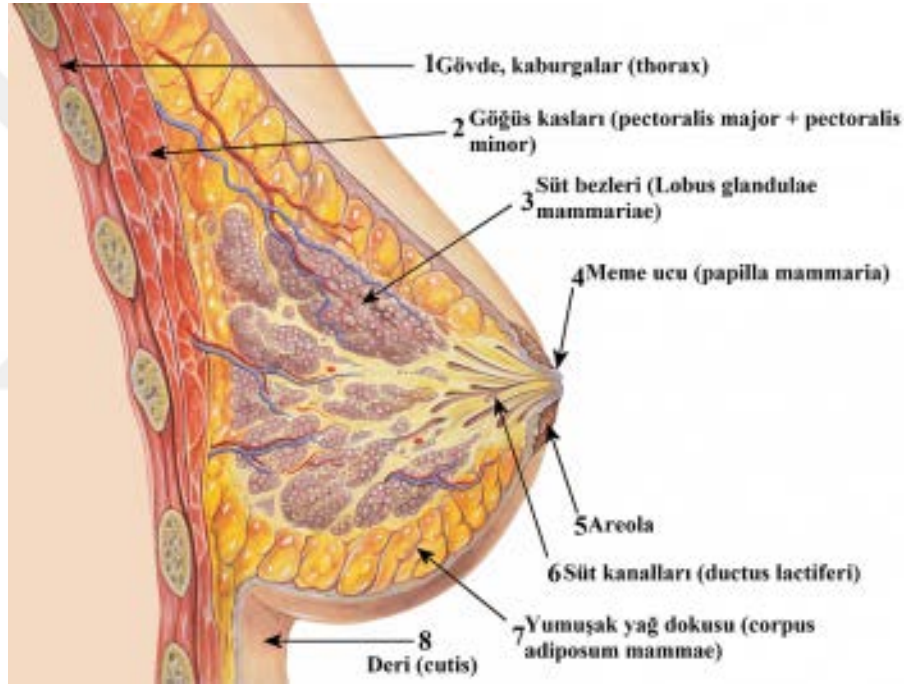
### 1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri

Dox ve LipoDOX 2D ve 3D meme kanseri üzerinde etkilidir. Bu nedenle preklinik ve klinik *in vivo* çalışmalarda meme kanserinde kullanıma adaydır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir. Her yıl 10 yeni kanser tanısının birden fazlasını oluşturur. Dünya genelinde kadınlar arasında kanserden kaynaklanan en yaygın ikinci ölüm nedenidir. Anatomik olarak, meme göğüs duvarı önünde süt üreten bezler içermektedir. Pectoralis majör kasının üzerinde bulunan meme dokusunu destekleyen ve göğüs duvarına bağlayan ligamentler mevcuttur. 15-20 lob dairesel olarak memeyi oluşturmak üzere düzenlenmiştir. Lobları kaplayan yağ meme büyüklüğünü ve şeklini belirler. Her lob, hormon uyarımına cevap olarak süt üretiminden sorumlu bezleri içeren lobüller tarafından oluşturulur. Meme dokusunun yapısı Şekil 1’de yer almaktadır.



Şekil 1. Memenin anatomisi (1)

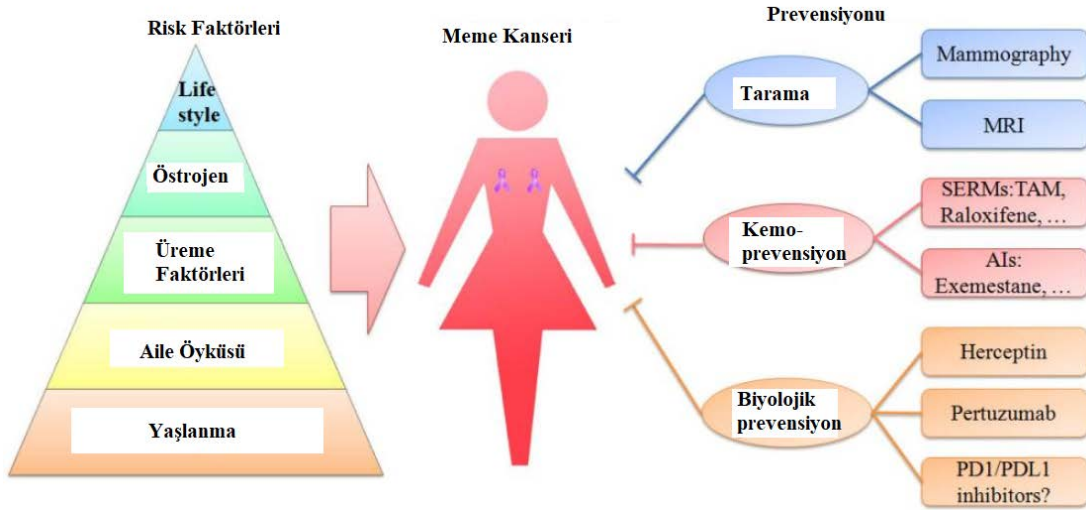
Meme kanseri sessizce gelişim göstermekte olup hastaların çoğu, rutin taramaları sırasında hastalıklarını keşfeder. Bununla beraber tesadüfen farkedilen memede kitle, meme şekli veya büyüklüğünde değişiklik veya meme başı akması ile ortaya çıkabilir. Meme kanserini teşhis etmek için fizik muayene, özellikle mamografi ve doku biyopsisi yapılmalıdır. Sağkalım oranı erken tanı ile iyileştirilebilir. Tümör lenfatik ve hematolojik olarak yayılma eğiliminde olup uzak metastaz ve kötü prognoza yol açar. Bu, meme kanseri tarama programlarının önemini açıklamakta ve vurgulamaktadır (2-4).

## 2.2. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri gelişimi insidansının artması ile ilişkili faktörlerin belirlenmesi, kadınlar için genel sağlık taramasında önemlidir (5, 6). Meme kanseri için risk faktörleri 7 geniş kategoriye ayrılabilir (7):

1. *Yaş*: Yaşa göre düzeltilmiş meme kanseri insidansı, kadın popülasyonun ilerleyen yaşı ile birlikte artmaya devam etmektedir.
2. *Cinsiyet*: Meme kanseri çoğunlukla kadınlarda görülür.
3. *Kişisel meme kanseri öyküsü*: Bir memede kanser öyküsü, kontralateral memede ikinci bir primer kanser olasılığını artırır.
4. *Histolojik risk faktörleri*: Meme biyopsisi ile teşhis edilen histolojik anormallikler, meme kanseri risk faktörlerinin önemli bir kategorisini oluşturur. Bu anormallikler yerinde lobüler karsinomu (LCIS) ve atipi ile proliferatif değişiklikleri içerir.
5. *Ailede meme kanseri öyküsü ve genetik risk faktörleri*: Meme kanserli hastaların birinci derece akrabalarında hastalık gelişimi için 2-3 kat fazla risk vardır. Tüm meme kanseri vakalarının% 5-10'u genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır. BRCA1 ve BRCA2, meme kanseri duyarlılığının artmasından sorumlu en önemli 2 gendir.
6. *Üreme riski faktörleri*: Bir kadının yaşam boyu östrojen maruziyetinin meme kanseri riskini arttırdığı düşünülmektedir. Oniki yaşından önce menarşın başlaması, 30 yaşından sonra ilk canlı doğum, nulliparite ve 55 yaşından sonra menopoz önemli risk faktörleridir.
7. *Ekzojen hormon kullanımı*: Terapötik veya tamamlayıcı östrojen ve progesteron çeşitli durumlar için alınır, en yaygın iki senaryo menopoz öncesi kadınlarda kontrasepsiyon ve menopoz sonrası kadınlarda hormon replasman tedavisidir.

Risk faktörlerinin ve korunma yaklaşımlarının şematik diyagramı Şekil 2 'de yer almaktadır. Yaş, aile öyküsü, üreme faktörü, östrojen ve yaşam tarzı, piramit tablosunda gösterilen, meme kanserinde önemli risk faktörleridir. Meme kanserini önlemek için tarama (mamografi ve MRG), kemoprevensiyon (seçici östrojen reseptörü modülatörleri [SERM'ler] ve aromataz inhibitörleri [AI'ler] ile) ve biyolojik korunma (Herceptin ve pertuzumab kullanılarak) kullanılmaktadır. PD1/PDL1 inhibitörleri immünoterapi ilaçlarıdır ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) tedavisinde umut verici stratejiler olabilir (20).



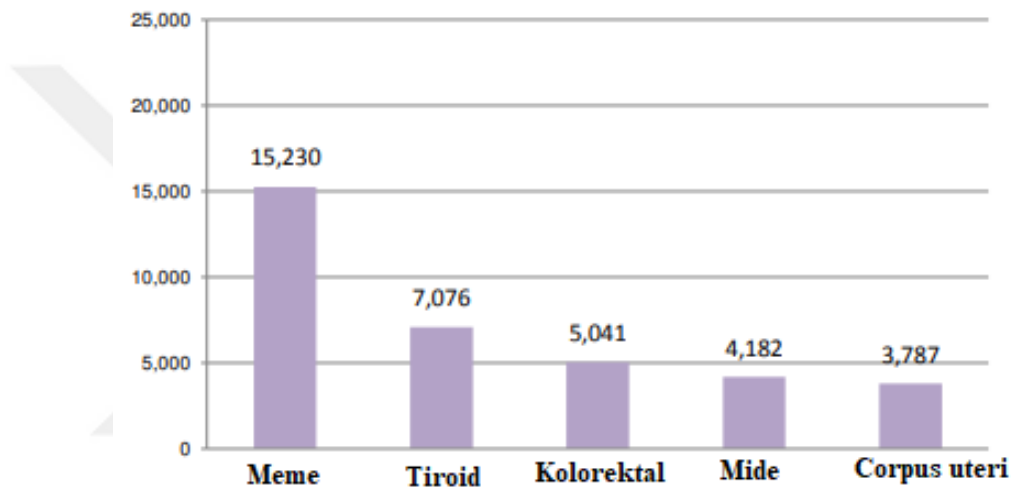
**Şekil 2.** Risk faktörlerinin ve korunma yaklaşımlarının şematik diyagramı

### 2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

İnvaziv meme kanseri, ABD'de 8 kadından 1'inde (% 12,4) yaşamı boyunca etkilenmektedir (8-10). Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 266.120 kadın invaziv meme kanseri ve 63.960'ı in situ meme kanseri tanısı almıştır. Bununla beraber, yaklaşık 2550 erkek invaziv meme kanseri tanısı almıştır. Her 1000 erkekten yaklaşık 1'i yaşamları boyunca meme kanseri geçirme riski taşımaktadır. 2000 yılında, Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri görülme sıklığı azalmaya başlamıştır. Bu düşüş, kadınlar tarafından hormon replasman tedavisinin (HRT) kullanımındaki azalmaya bağlı olabilir. HRT ile artmış meme kanseri riski arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür (11). ABD'li yaklaşık 40.920 kadın meme kanserinden ölmektedir. 2008 yılında, dünya genelinde tahmini 1,38 milyon yeni invaziv meme kanseri vakası bulunmaktaydı. Kadınlarda meme kanseri insidansı 2008 yılında Doğu Afrika'da 100.000'de 19,3, Batı Avrupa'da 100.000'de 89,9 'dır. Erken teşhis ve tedavide önemli ilerlemeler ile Kuzey Amerika ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde son 25 yılda meme kanserinden ölüm oranları düşmektedir. Ancak birçok Afrika ve Asya ülkesinde (örneğin, Uganda, Güney Kore ve Hindistan) meme kanseri ölüm oranları artmaktadır (12). Meme kanseri insidansı yaşla birlikte artmaktadır, 20-24 yaş arası kadınlarda 100.000'de 1.5 vakadan 75-79 yaş arası kadınlarda 100.000'de 421.3 vakaya kadar bu artış görülmektedir. Yeni vakaların % 95'i 40 yaş ve üstü kadınlarda görülür. Meme kanseri teşhisi sırasındaki kadınların ortalanca yaşı 61'dir (13). Amerikan Kanseri Derneği (ACS)'ye göre, çeşitli ırk ve etnik gruplardan kadınların meme kanseri oranları aşağıdaki gibidir (14):

- Hispanik olmayan beyaz: 128,1/100.000
- Afrika kökenli Amerikalı: 124,3/100.000
- İspanyol/ Latin: 91,0/100.000
- Amerikan Yerlisi/Alaska Yerli: 91,9 / 100.000
- Asya Amerikalı/Pasifik Adalı: 88,3/100.000

Dünya Sağlık Örgütü 2014 yılı raporuna göre Türkiye’de 15.230 kadın meme kanseri tanısı almış olup kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen kanserler Şekil 3 ‘de görülmektedir. Buna ek olarak, 2000-2012 yılları arasında da kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında da meme kanseri en başta yer almaktadır (15).



**Şekil 3.** Türkiye’de kadınlar arasında en sık görülen kanserler (15)

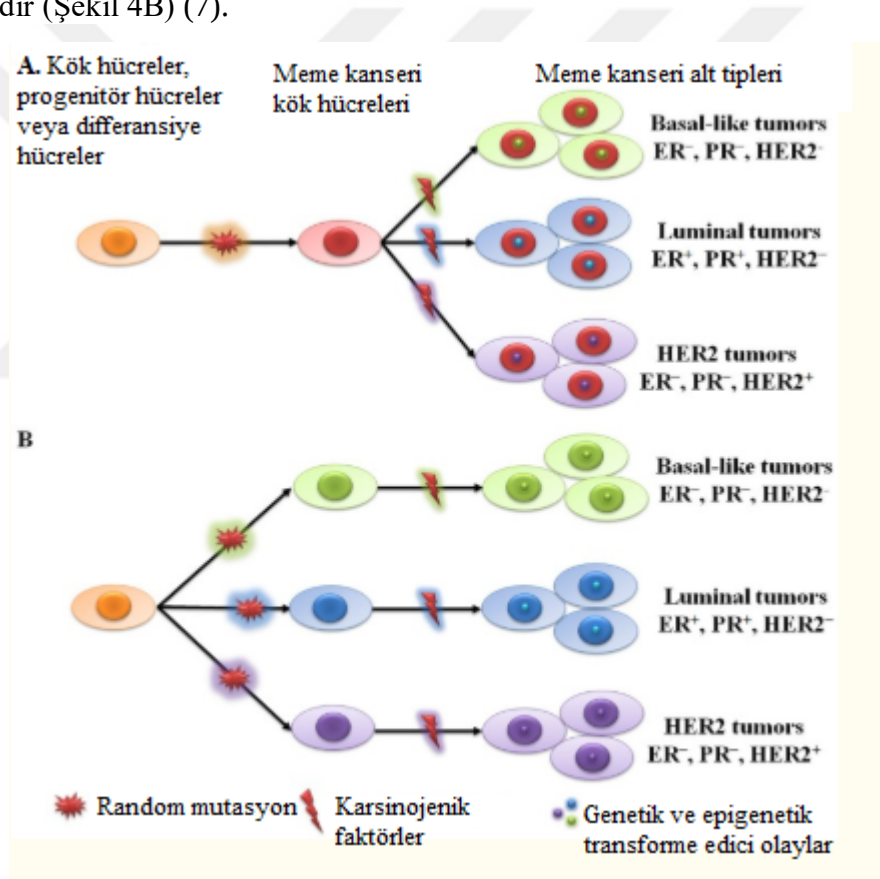
#### 2.4. Meme Kanseri Patogenezi

Meme tümörleri genellikle duktal hiperproliferasiyondan başlar ve daha sonra çeşitli kanserojen faktörler tarafından sürekli uyarıldıktan sonra benign tümörlere ve hatta metastatik karsinomlara dönüşür. Stromal etkiler veya makrofajlar gibi tümör mikroçevresi meme kanseri başlangıcında ve ilerlemesinde hayati rol oynar. Sıçanların meme bezlerinin yalnızca stroması karsinojenlere maruz kaldığında (ekstraselüler matriks veya epitel değil) neoplazmlara neden olabilir (16, 17).

Makrofajlar, anjiyogeneze neden olabilecek ve kanser hücrelerinin immün sistemden kaçmasını sağlayabilecek mutajenik bir inflamatuvar mikroçevre üretebilir (18, 19). Normal ve tümörle ilişkili mikroçevreler arasında farklı DNA metilasyon paternleri gözlenmiştir. Bu durum, tümör mikroçevresindeki epigenetik modifikasyonların karsinogenezi destekleyebileceğini gösterir (20, 21). Kanser kök hücreleri (CSC'ler) olarak adlandırılan hücreler, tümörler içindeki yeni bir malign hücre alt sınıfıdır ve tümörün başlatılması, immün

kaçış ve nüks ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Normal dokularda kök hücrelerden veya progenitör hücrelerden gelişebilecek bu küçük hücre popülasyonu, kendini yenileme yeteneklerine sahiptir ve kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilere dirençlidir (22-24).

Meme kanserinin başlatılması ve ilerlemesi için iki varsayımsal teori vardır: kanser kök hücre teorisi ve stokastik teori (20, 25). Kanser kök hücre teorisi, tüm tümör alt tiplerinin aynı kök hücrelerden veya transit amplifiye hücrelerden (progenitör hücreler) türetildiğini ortaya koymaktadır. Kök hücrelerde veya progenitör hücrelerde edinilmiş genetik ve epigenetik mutasyonlar farklı tümör fenotiplerine yol açmaktadır (Şekil 4A). Stokastik teori, her bir tümör alt tipinin, tek bir hücre tipinden (kök hücre, progenitör hücre veya farklılaşmış hücreden) başlatılmasıdır (Şekil 4B) (7).



Şekil 4. Meme kanseri başlangıcı ve ilerlemesine dair iki teori (7)

## 2.5. Histopatoloji

Meme kanseri bazal membranla olan ilişkisine göre invaziv veya non-invaziv olabilir. Memenin invaziv olmayan neoplazmaları, geniş şekilde iki ana tipte, in situ lobüler karsinom (LCIS) ve in situ duktal karsinom (DCIS) olarak görülmektedir.

LCIS, meme kanseri gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilir. LCIS, genişletilmiş ve dolgulu asini ile normal lobülün dış çizgisine uygunluğu ile tanınır. DCIS, morfolojik olarak LCIS'den daha heterojendir ve patologlar dört geniş DCIS tipini tanıır: papiller, kribriform, solid ve komedo.

DCIS, genellikle normal miyoepitelyal hücrelerden oluşan bazal hücre tabakası ile malign hücrelerle dolu ayrı alanlar olarak kabul edilir. Papiller ve kribriform DCIS tipleri genellikle düşük dereceli lezyonlardır ve invaziv kansere dönüşmeleri daha uzun sürebilir (26).

İnfiltrate duktal karsinom olarak da bilinen invaziv duktal kanser, meme kanserinin en yaygın şeklidir; invaziv meme kanserlerinin %50-70'ini oluşturur. İnvaziv lobüler karsinom meme kanserlerinin %10'unu oluşturur (27).

## **2.6. Meme Kanseri Fiziksel Belirtiler**

Erken meme kanseri hastalarının çoğu asemptomatiktir ve mamografi sırasında keşfedilmektedir. Artan sayıda hasta, kanseri çoğunlukla duş sırasında hissedilen bir şişlik olarak keşfetmektedir. Göğüs ağrısı, hastaların %5'inde gerçekleşen olağandışı bir semptomdur. Lokalize olarak ilerlemiş hastalık, peau d'orange, ülserasyon veya göğüs duvarına fiksasyonla birlikte görülebilir. İnflamatuvar meme kanseri, gelişmiş bir meme kanseri biçimidir, sıklıkla meme absesine benzer ve şişlik, kızarıklık ve diğer iltihaplanma belirtileri gösterir. Meme ucunun Paget hastalığı genellikle meme başı egzamasından ayrılması gereken meme ucu değişiklikleri ile ortaya çıkar.

## **2.7. Evreleme**

Meme kanseri evresi klinik olarak tedavi öncesi fizik muayene ve görüntüleme çalışmaları ile cerrahi tedaviden sonra primer tümör ve bölgesel lenf nodlarının patolojik olarak incelenmesiyle patolojik olarak belirlenir. Meme kanseri, hastaları primer tümör boyutuna (T), bölgesel lenf nodları durumuna (N) ve uzak metastaz (M) durumuna göre hastaları 4 aşamalı gruplara ayıran TNM sınıflandırma sistemi ile sınıflandırılır. En yaygın kullanılan sistem Amerikan Kanser Ortak Komitesi'ninkidir (28):

### *Primer Tümör (T)*

Tis: Karsinoma in-situ, Tümörü olmayan Paget'ler

T1: 2 cm T1a'dan az: 0,1-0,5 cm T1b: 0,5-1,0 cm T1c: 1,0-2,0 cm

T2: 2-5 cm

T3: 5 cm'den büyük

T4T4a: Göğüs duvarı tutulumu T4b: Deri tutulumu T4c: Hem 4a hem de 4bT4d: İnflamatuar kanser

#### *Bölgesel Lenf Nodları (N)*

N1: Mobil ipsilateral aksiller nodlar

N2: Sabit / donuk ipsilateral aksiller nodlar

N3N3a - Ipsilat infraklaviküler düğümleri N3b - Ipsilat int meme düğümleriN3c - Ipsilateral supraklaviküler düğümler

#### *Uzak Metastazlar (M)*

M1: Uzak metastazlar

Aşama 0 Tis

Aşama I T1N0

Aşama II T2N0, T3N0 T0N1, T1N1, T2N1

Aşama III

\* Cilt, kaburga invazyonu, keçeleşmiş LN'ler T3N1 T0N2, T1N2, T2N2, T3N2 Herhangi bir T, N3 T4, herhangi bir N Yerel olarak gelişmiş meme kanseri

Aşama IV

M1 Adv. Meme kanseri

## **2.8. Prognoz**

Erken meme kanseri prognozu oldukça iyidir. Evre 0 ve evre I, %100 5 yıllık sağkalım oranına sahiptir. Evre II ve evre III meme kanserinde 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %93 ve %72'dir. Hastalık sistematik olarak yayıldığında prognozu çarpıcı bir şekilde kötüleşir. Evre IV meme kanseri hastasının sadece %22'si önümüzdeki 5 yıl içinde hayatta kalmaktadır.

## **2.9. Meme Kanseri Tedavi**

Tedavinin iki temel prensibi lokal nüks olasılığını ve metastatik yayılma riskini azaltmaktır. Radyoterapili veya radyoterapisiz cerrahi, lokal kanser kontrolünü sağlar. Metastatik relaps için bir risk olduğunda, sistemik tedavi hormonal tedavi, kemoterapi, hedefli tedavi veya bunların herhangi bir kombinasyonu şeklinde gösterilir. Lokal ilerlemiş hastalıkta, sistemik tedavi, ameliyat için küçük veya hiç rolü olmayan bir palyatif tedavi olarak kullanılır (29-31).

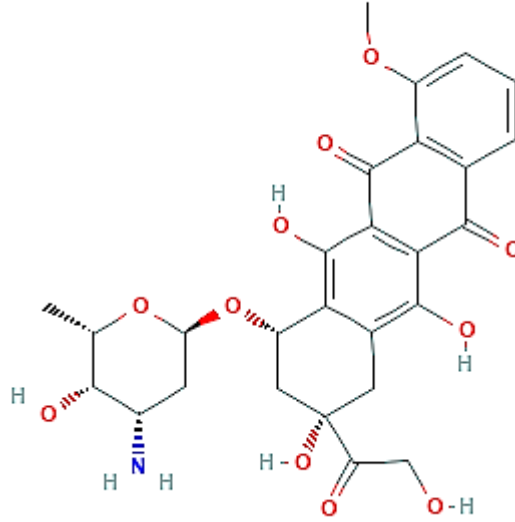
Meme kanserinin tedavisinde cerrahinin önemli bir rolü vardır. Hastalığın lokal kontrolü için temel yaklaşımdır. Radyasyon terapisinin lokal hastalık kontrolünde önemli bir rolü vardır. Radyasyon tedavisinin meme koruyucu cerrahiye takip ettiği 15 yıl içerisinde kanser nüksü riski yaklaşık %50 azalmaktave meme kanseri ölümü riski 15 yılda neredeyse %20 azalmaktadır. Bununla birlikte, küçük, lenf nodu negatif, hormon reseptörü pozitif (HR +) 70 yaş ve üzerindeki kadınlar için radyasyon gerekli değildir. Radyasyon tedavisi büyük tümörlerde (5-cm'den büyük) veya tümör cilt veya göğüs duvarına invaze olduğunda ve pozitif lenf nodu varlığında etkilidir.

Kemoterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedavi, meme kanseri tedavisinde kullanılan sistemik tedavilerdir. 6 aylık bir periyotta, siklofosamid, metotreksat ve 5-florourasil (CMF) gibi birinci kuşak kemoterapi rejimi kullanılarak, 10-15 yıllık bir süre içinde nüks riskinde yüzde 25'lik bir azalma sağlanabilmektedir. Antrasiklinler (doksorubisin veya epirubisin) ve taksanlar gibi daha yeni ajanlar meme kanseri için kullanılan modern rejimlerdir. Adjuvan ve neoadjuvan kemoterapi için 3-6 aylık süre kullanılır. Erken evre HR + meme kanserinin en az 5 yıl boyunca tamoksifenle adjuvan tedavisinin, ilk 10 yıl boyunca rekürrens oranını yaklaşık yarı yarıya düşürdüğü ve meme kanseri mortalitesini ilk 15 yıl boyunca yaklaşık %30 azalttığı gösterilmiştir. Hedefe yönelik tedavi genellikle büyümeyi teşvik eden protein HER2/neu'yu aşırı üreten meme kanserlerinin yaklaşık %17'sinde endikedir. İlk onaylı ilaç olan trastuzumab, HER2 proteinini doğrudan hedef alan monoklonal bir antikordur. Tek başına kemoterapiye kıyasla HER2 + erken evre meme kanserinde kemoterapi ile kombine edildiğinde, nüks ve ölüm riskini sırasıyla %52 ve %33 azaltır (34, 35).

## 2.10. Doksorubisin

Doksorubisin (Adriamisin), *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen bir antibiyotiktir. 1960'lı yıllardan beri yaygın olarak kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır (36, 37). Doksorubisin, kemoterapötik ajanların antrasiklin grubunun bir parçasıdır; diğer antrasiklinler daunorubisin, idarubisin ve epirubisindir. Genellikle, doksorubisin, yetişkin ve pediatrik hastaların solid tümörlerinin tedavisinde kullanılır. Doksorubisin, yumuşak doku ve kemik sarkomlarının yanı sıra meme, yumurtalık, mesane ve tiroid kanserlerini tedavi etmek için kullanılabilir. Ayrıca akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, Hodgkin lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kullanılır.

Doksorubisin, lipozomal formülasyonu Doxil'in, platin bazlı kemoterapi, AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomu ve multipl miyelomda başarısız olan hastalarda over kanserinin tedavisi için FDA onaylıdır (36, 38).



Şekil 5. Doksorubisinin Molekül Yapısı (37)

#### 2.10.1. Etki Mekanizması

Doksorubisinin birincil etki mekanizması, DNA baz çiftleri içinde araya girme kabiliyetini içerir, DNA iplikçiklerinin kırılmasına ve hem DNA hem de RNA sentezinin inhibisyonuna neden olur. Doksorubisin, topoizomeraaz II enzimini inhibe ederek DNA hasarına ve apoptozun indüklenmesine neden olur. Demir ile birleştirildiğinde, doksorubisin ayrıca DNA sentezini daha da sınırlayan serbest radikal kaynaklı oksidatif hasara neden olur. Dekstrazoksan gibi demir şelatörler, doksorubisinin demir ile bağlanmasını sınırlandırarak serbest radikal oluşumunu önleyebilir (39).

#### 2.10.2. Uygulanma Şekli

Doksorubisin intravenöz olarak uygulanır ve genellikle 21 günlük aralıklarla verilir. İlaç, pigmentli, kırmızımsı görünümü nedeniyle sıvı formunda kolayca tanınır. Doksorubisin, heparin ve fluorourasil ile uyumlu değildir ve bu ilaçlarla karışırsa çökelmeye neden olabilir. Doksorubisin hızlı bir şekilde (15-20 dakikadan fazla) uygulanabilirken, infüzyon reaksiyonu riskini azaltmak için lipozomal formülasyonun (Doxil) yavaş uygulanması önerilir. Doksorubisin soğuk bir alanda saklanmalı ve uygulamadan önce ışıktan korunmalıdır.

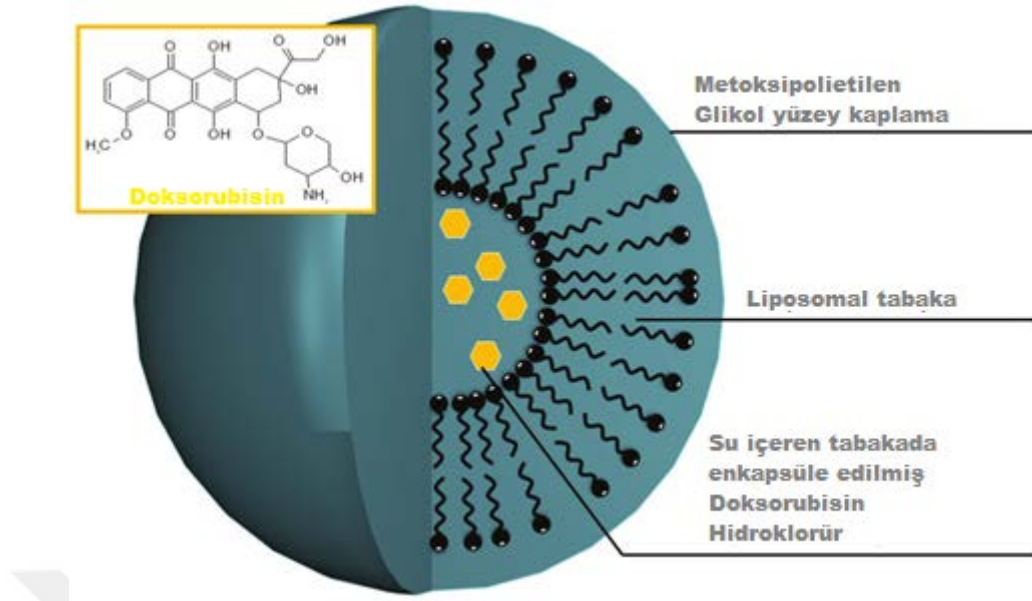
Doksorubisin dokularda hızlı bir dağılım gösterir ve 48 saate varan bir eliminasyon yarı ömrüne sahiptir. Doksorubisin enzimatik indirgemeye uğrar ve biliyer atılımı ile elimine edilir (40).

### **2.10.3. Yan Etkileri**

Doksorubisin uygulamasından sonra yaygın olarak bazı yan etkiler görülmektedir. Bunlar halsizlik, alopesi, bulantı ve kusma ve oral yaraları içerebilir. Kemik iliği baskılanması ve sekonder malignite tanısı riski artabilir. İntravenöz uygulama sırasında doksorubisin ekstrevasyonu, zaman içinde kötüleşen ciddi doku ülseri ve nekrozu ile sonuçlanabilir. Doksorubisin ayrıca ilacın uzun süreli kullanımını sınırlayan önemli kardiyak toksisite ile de ilişkilidir. Doksorubisin kaynaklı kardiyak toksisitenin etki mekanizması ilacın antitümör mekanizmasından farklıdır ve oksidatif stresin artması, kardiyo-spesifik genlerin negative yönlü regülasyonu ve kardiyak miyosit apoptozun doksorubisin ile indüklenmesini içerir (41). Doksorubisinin akut kardiyak toksisitesi, ilacın alınmasından sonraki günlerde ve ilacı alan hastaların yaklaşık %11'inde meydana gelir. Akut kardiyak toksisite, tersine çevrilebilir bir miyoperikardit, sol ventrikül fonksiyon bozukluğu veya aritmi olarak kendini gösterir. Doksorubisin ile ilişkili aritmi, tedavi alan hastaların %26'sına kadar görülür ve sinüs taşikardisi, erken atriyal ve ventriküler kasılmalar ve supraventriküler taşikardi içerebilir. Nadiren, doksorubisin uygulamasından sonra akut sol ventrikül disfonksiyonu oluşabilir; bu durum geri dönüşümlüdür (42).

### **2.11. Lipozomal Doksorubisin**

Pegile edilmiş lipozomal doksorubisin, yüzeye bağlı metoksipolietilen glikolün koruyucu bir hidrofilik dış kaplaması olan lipozomlar içinde kaplanmış sulu bir doksorubisin hidroklorür çekirdeği içerir (Şekil 6).



**Şekil 6.** Pegile liposomal dokсорubisin yapısı (43)

Dokсорubisin sitotoksik etkilerinin DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonuna aracılık etmekte; bu da DNA'nın bitişik baz çiftleri arasında dokсорubisinin araya girmesi ile gerçekleşmektedir. Böylece replikasyon için sarmalın açılması önlenir (44, 45). İn vitro çalışmalarda, dokсорubisin'in hızlı hücre penetrasyonunu ve ardından mitotik aktivitenin ve nükleik asit sentezinin inhibe edilmesi ve bunun sonucunda böylece mutajenez ve kromozomal aberasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (46).

Prelinik çalışmalarda, pegile lipozomal dokсорubisin'in, kolon, meme, yumurtalık, akciğer ve diğer kanser türlerinin çeşitli hayvan modellerinde, tümör büyüme oranlarını belirgin şekilde önleyen ve bazı durumlarda, geleneksel dokсорubisin ile karşılaştırıldığında sağkalımı iyileştiren antitümör aktivitesini göstermiştir (47). Ayrıca, fare meme karsinomu (MC2) modelinde, pegile lipozomal dokсорubisin, hem yüksek hem de düşük büyüme oranlı fraksiyon tümör varyantlarına, MC2A ve MC2B'ye karşı etkinlik göstermiştir (47).

Pegile lipozomal dokсорubisin, multipl miyelomlu hastalarda proteazom inhibitör bortezomib ile kombinasyon halinde kullanım için endikedir (48). Çeşitli tümör model sistemlerindeki prelinik çalışmalarda, dokсорubisin bortezomib ile kombinasyon halinde uygulandığında artmış apoptotik aktivitenin ve bastırılmış anti-apoptotik yolların sinerjistik bir etkisi gözlenmiştir. Aktive edilmiş protein kinaz fosfataz MKP-1'in bu süreçte rol oynadığı düşünülmektedir (49-51).

Kaposi sarkomlu, intravenöz pegile lipozomal doksorubisin ile döngü başına 20 mg/m<sup>2</sup> (n = 8) ile tedavi edilen hastalarda, söz konusu alanların histolojik incelemesinde tümör benzeri yapıların azaldığı ve Kaposi sarkomu iç hücrelerinin bulunmadığı gösterilmiştir. Bu gözlem için destekleyici kanıtlar, *in vitro* olarak da görülmüştür; pegile lipozomal doksorubisin (0.01-1 mg/L), Kaposi sarkom iç hücrelerinin ve AIDS'li hastalardan elde edilen fibroblastların çoğalmasını inhibe etmektedir. Ayrıca, pegile lipozomal doksorubisin, Kaposi sarkom iç hücrelerinde monosit kemoatraktan protein-1 ekspresyonunu indükleyerek Kaposi sarkom lezyonlarında fagositik hücrelerin sayısında artışa yol açabilmektedir (52).

## **2.12. Konvansiyonel Antrasiklinler ile Lipozomal Doksorubisinin Karşılaştırılması**

Antrasiklinler hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde en önemli ilaçlardan biri haline gelmiştir. Geleneksel olarak kullanılan antrasiklinler nispeten düşük bir terapötik indekse sahiptir (53, 54). Kardiyotoksisite riski, daha yüksek kümülatif antrasiklin dozlarıyla artar. Doksorubisinin kümülatif yaşam süresi dozunun 450–500 mg/m<sup>2</sup>'yi aşmaması önerilir. Antrasiklin kardiyotoksisitesi, sadece tek bir ajan olarak uygulandığında değil, aynı zamanda kendi başına bir kardiyotoksik ajanı olan trastuzumab gibi diğer ajanlarla birleştirildiğinde de bir sorundur (55). Kardiyotoksisite mekanizmaları, esas olarak, miyositlerde serbest radikal hasarı sonucu kardiyomiyopatinin gelişmesinden kaynaklanmaktadır. Toksisite, yüksek pik plazma antrasiklin seviyeleri ile artar. Serbest radikallerin miyositlerin mitokondri- sine verdiği hasarın kümülatif kardiyomiyopatiye katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Antrasiklinlerin terapötik endeksini arttırmak için antrasiklinlerin birkaç lipozomal formülasyonu geliştirilmiştir.

Lipozom-kapsüllenmiş antrasiklinler, doku dağılımını ve farmakokinetiğini değiştirerek antitümör etkinliğini korurken, doksorubisinin toksisitesini azaltmak için tasarlanmıştır. İntravenöz olarak enjekte edilen lipozomlar, kalp kası ve gastrointestinal sistem gibi sıkı kapiller birleşme bölgelerinde damar boşluğundan kaçamazlar. Lipozomlar genel olarak, sıkı bir şekilde birleştirilmiş olmayan veya kılcal damarların iltihaplanma veya tümör büyümesiyle bozulduğu alanlarda bulunan dokular ve organlardaki dolaşımdan çıkar. Bu nedenle, lipozomlar tercihen doksorubisini potansiyel toksisite alanlarından uzağa yönlendirmeli, ancak tümörü açıkta bırakmalıdır (56). Lipozomal doksorubisin anlamlı derecede daha az kardiyak ve gastrointestinal toksisite ile ilişkiliyken, antitümör etkinliği ana moleküle benzer görülmüştür (57).

Doxil/Caelyx, bir pegile (polietilen glikol kaplı) lipozom ile kapsüllenmiş (PLD) doksorubisin formudur. Doxil, polietilen glikol kaplama nedeniyle deride istenilen bir konsantrasyona sahiptir. Doxil ile ilişkili ana doz sınırlayıcı yan etkiler, el-ayak sendromu olarak bilinen palmar plantar eritrodisestezidir (PPE). Doxil'in uygulanmasının ardından, küçük miktarlarda ilaç, ellerin avuç içindeki kılcal damarlardan ve ayak tabanlarından sızabilir. Bu sızıntının sonucu, rahatsız edici ve hatta acı verici olabilen cildin kızarıklığı, hassasiyeti ve soyulmasıdır. Bu yan etkinin prevalansı, aynı tedavi rejiminde doksorubisin ile karşılaştırıldığında verilebilecek Doxil dozunu sınırlar. Amerika Birleşik Devletleri dışında, Doxil, Caelyx olarak bilinir (58).

Myocet, Avrupa ve Kanada'da metastatik meme kanserinin siklofosamid ile kombinasyon halinde tedavisi için onaylanan, pegile olmayan bir lipozomal doksorubisindir. Tasarımının ardındaki mantık Doxil'e benzerdir. Doxil'den farklı olarak, Myocet lipozomun bir polietilen glikol kaplaması yoktur ve bu nedenle el-ayak sendromu açısından aynı prevalansa neden olmaz. Bu yan etkinin en aza indirilmesi, aynı tedavi rejiminde doksorubisin ile 1:1 uygulanmamasına izin verebilir ve böylece etkinlik kaybı olmadan güvenliği artırır (59).

DaunoXome<sup>®</sup>, ileri düzeyde AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunun ilk sıra tedavisi için ABD'de belirtilen pegile olmayan bir lipozomal daunorubisindir (60).

Lipozomal antrasiklinleri konvansiyonel antrasiklinlerle karşılaştıran randomize çalışmalarda, liposomal antrasiklinlerin sıklıkla benzer veya daha yüksek etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Lipozomal doksorubisin ve pegile lipozomal doksorubisin, geleneksel antrasiklinlere kıyasla daha iyi kalp güvenliği ve daha az miyelosupresyon, alopesi, bulantı ve kusma ile olumlu toksisite profilleri göstermiştir. Etkinliği riske atmadan lipozomal antrasiklinlerin daha iyi terapötik indeksi, yaşlı hastalarda, kalp hastalığı için risk faktörü olan hastalarda ve daha önce antrasiklin kullanımı olan hastalarda konvansiyonel antrasiklinlere göre uygun bir seçimdir (61).

### **2.13. Ultrason ve Mikroköpükçük Yönlendirmeli İlaç Taşınımı**

Mikroköpükçükler kullanılarak yapılan ultrason aracılı ilaç verme, lokalize ilaç uygulaması için güvenli ve invazif olmayan bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, hücresel membranlarda ve damar duvarlarında ("sonoporasyon" adı verilen bir işlem) geçici ve geri dönüşümlü açıklıklar oluşturarak, terapötik ajanların bu doğal bariyerler boyunca daha fazla taşınmasını sağlar. Genel olarak, sonoporasyon işleminin, mikroköpükçük enerjisel kavitasyon



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma, *in vitro* hücre kültürü çalışması olup **deneysel araştırma** tipindedir.

#### 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma Şubat 2018 - Şubat 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Mikroköpükçük ve akış deneylerinin bir bölümü İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü'nde yapılmıştır.

#### 3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Yapılan bu çalışma hücre kültürü çalışmasıdır. Üç tip meme kanseri hücre hattı kullanılarak kültüre edilmiştir. Örneklemi ise; MCF-7 (HTB-22), MDA- MB-231 (HTB-26), 4T1 hücre hatları ile DOX, LipoDOX, DOX yüklü mikroköpükçüklerin farklı dozları oluşturmuştur.

#### 3.4. Çalışma Materyali

Her bir koşul 3 hücre hattı için (4T1,MDA-MB-231, MCF-7)

1) 2D: Her bir koşul 24, 48, 72 saat için 3'er kez

1a: 96'lık well'de her bir koşul için 6 kuyucuk olmak üzere DOX etkisinin 0,5-20 mikromolar ( $\mu$ M) doz aralığında WST-1 ile araştırılması

4T1 için

MDA-MB-231 için

MCF-7 için

1b. 2D'de 96 well'de her bir koşul için 6 kuyucuk olmak üzere LipoDOX (ticari Doxil) etkisinin 0,5-20 mikromolar ( $\mu$ M) doz aralığında WST-1 ile araştırılması)

1c. 2D'de lam üzerinde akış deneyi

1e. 6 well'de etkin saat ve dozda DOX, uygulamasının Annexin V+PI akım sitometri yöntemi ile apoptoz ve nekroz oranlarının tayini

1e. etkin saat ve dozda DOX, uygulamasının immünohistokimyasal analizi (Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8, kaspaz 9) .

2) 3D matrijel ile karıştırılmış hücre ekerek; etkin saat ve dozda her üç hücre hattı için DOX uygulaması

2a. 96 well' de her bir koşul için 6 kuyucuk olmak üzere DOX etkisinin etkin dozun koloni sayı, çap ölçümü ve tripan blue canlılık oranı ile araştırılması

2b. 3D'de lam üzerinde akış deneyi

2c. 25 cm<sup>2</sup> flaskta etkin saat ve dozda DOX yüklü mikroköpkük ultrason ile patlatılmış uygulamasının ilaç uygulanmamış kontrollerle karşılaştırmalı; kolonileri toplayıp parafin blok hazırlanarak kesitlerde immünohistokimyasal analizi (Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8, kaspaz 9).

### 3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: Meme kanseri hücre hatları, DOX, LipoDOX ve DOX yüklü mikroköpkük,

Bağımlı değişken: Canlılık ve apoptoz % değerleri, 3D sfteroid sayı çapları Ki-67 yüzdesi, kaspaz 3, 8, 9 yüzdeleri

### 3.6. Veri Toplama Araçları

#### 3.6.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

*Mevcut Olanaklar:* Temel Onkoloji Lab Mevcut Altyapı: Soğutmalı santrifüj (Heraeus), ELISA Reader (Thermo), -80 °C dondurucu (Nüve), CO2 inkübatörü (Nüve ve Thermo), laminar akışlı kabinet (Nüve), inverted mikroskop (Leica), pastör fırın (Thermo), flow sitometri (BD-Accuri), otomatik immünohistokimya boyama cihazı (Ventana Discover).

#### *Alınan Malzemeler*

- Serolojik pipet 25 ml steril
- Penisilin/streptomisin
- Hücre kazıyıcı (cell scraper)
- Caspase 9 antikor
- Well plate 6 kuyucuklu
- Primer antikor Ki-67 (C20)

- DMEM [DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM] 500 ml
- Flask 25 cm<sup>2</sup>
- Flask 75 cm<sup>2</sup>
- Santrifüj tüpü 15 ml
- Kaspaz 8 antikoru (caspase 8 antibody)
- Annexin-V FITC apoptosis detection kit
- Rabbit anti caspase 3 polyclonal antibody
- Petri kutusu 60x15 mm
- Nitril eldiven (lateks pudrasız, medium)
- Nitril eldiven (lateks pudrasız, small)
- Matrijel matriks
- RPMI 1640 W/O L-Glutamine
- FBS fötal dana (Fetal Bovine) serum
- Tripsin EDTA solüsyon 100 ml
- L-Glutamine 100 ml
- DMEM F-12 (phenol red içeren) 500 ml
- Serolojik pipet 5 ml steril
- Serolojik pipet 2 ml steril
- Serolojik pipet 10 ml steril
- Pipet ucu mavi 0-1000 mikrol
- Pipet ucu sarı 0-200 mikrol
- Santrifüj tüpü 50 ml

### **3.6.2. Mikroköpükçüklerin hazırlanışı ve karakterizasyonu:**

Mikroköpükçüklerin yapımında, lipid olarak disterol-gliserol-fosfokolin (DSPC, %99) Avanti polar lipids (Alabaster, AL), emülsifiyer olarak polietilen glikol-40-stearat (PEG40St) kullanılmıştır. Mikroköpükçükler, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği Laboratuvarı'nda hazırlanmıştır.

### **3.6.3. Lipozomların hazırlanışı ve karakterizasyonu:**

Lipozomların üretiminde, mikroköpükçük formülasyonlarına DSPC, DSPE-PEG2000 ve kolesterol ilave edilerek formülasyonlar hazırlanmıştır. Mikroköpükçük üretimi ile aynı süreçler kullanılarak ve farklı olarak lipozom üretiminde lipit karışımı 200 nm polikarbonat

mebranlardan geçirilerek üretilmişlerdir. Lipozomların boyut ve boyut dağılımları dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi ile belirlenmiştir.

İlaç yüklü ultrason kontrast ajanlarının yapılmasında öncelikle DOX yüklü lipozomların üretimi yapılmıştır. Üretilen lipozomlar suda süspansiyon olarak bulunmaktadır. Lipozomlara DOX yüklenmesi sonucu, içlerinde DOX bulunan lipozomlar kırmızıdan pembe renge doğru bir görünüm almaktadır. Farklı zamanlarda yüklenen Lipo-DOX'ların stabileteleri araştırılmış ve stabil oldukları bulunmuştur. Lipozomlara DOX yüklenmesi başarılmıştır.

#### **3.6.4. Mikroköpükçük-lipozom bağlanmalarının yapılması:**

DOX yüklü lipozomların mikroköpükçüklere bağlanması formülasyonlara biyotinli lipopolimer (DSPE, PEG2000 – biyotin) molekülü ilavesi ve daha sonra avidin ile konjuge edilmeleri vasıtasıyla yapılacaktır. Avidin-Biyotin ara bağı kullanılarak bağlanmalar sağlanmıştır. Mikroköpükçüklerin Meme Kanseri Hücrelere Hedeflendirilmesi: Meme kanseri hücrelerine ekspresse edilen oldukça yüksek EGFR molekülleri olduğu bilindiğinden, mikroköpükçüklerin meme kanseri hücrelere hedeflendirilmek üzere biyotinli EGF molekülleri kullanılmıştır.

#### **3.6.5. Doksorubisin, lipozomal doksorubisin ve hedeflendirilmiş doksorubisin yüklü mikroköpükçüklerin 2D ve 3D meme kanser hücreleri üzerine etkinliğinin belirlenmesi:**

Normal meme kanseri hücre hattı (MCF-10A) üretilmemiştir. Bu nedenle kullanımından vazgeçilmiştir. 3 tip meme kanser hücre hattı ve kullanılarak kültüre edilmiştir. MCF-7 (HTB-22), MDA- MB-231 (HTB-26), 4T1 hücre hatları 25 cm<sup>2</sup> flasklara 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ilaveli %10 fetal bovin serum içeren DMEM ve RPMI 1640 ortamlarında kültüre edilmiştir. Haftada 2 veya 3 defa ortamları tazelenerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'lik inkübatörde inkübe edilmiştir. Kültürler yaklaşık %80 sıkışıklığa eriştiğinde tripsin/EDTA solüsyonuyla kültür kaplarından kaldırılarak 1:2 oranında pasajlanmıştır. Çalışmalar en az 3 farklı zamanda 3 tekrar ile gerçekleştirilmiştir. 24, 48 ve 72 saatler için tekrarlanmıştır.

Meme kanseri hücreleri bir cam (steril lam) yüzeyde lam flaskı içinde veya petri kabı içerisinde üretilmiştir. 2D ve 3D boyutlarda deneyleri gerçekleştirebilmek üzere bir akış düzeneği tasarlanmıştır. 2D akış düzeneğine yerleştirilen hücre ihtiva eden cam yüzey yerleştirilmiş ve 2D akış deneyleri gerçekleştirilmiştir. 3D akış deneyleri için, hücreler matrijel ile karıştırılmış ve tasarlanan 3D akış düzeneğine gönderilmiştir.

### **3.6.6. WST-1 ile hücre proliferasyonunun tayini:**

Hücreler her kuyucukta  $10^4$  hücre olacak şekilde 96 well plate ekilecek, ertesi gün ortamları çekilerek DOX'un farklı dozları (0,5, 1,5, 2,5, 5, 10, 20 mikromolar) uygulanacaktır. İlaç uygulaması sonrasında 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

İnkübasyonların sonunda hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu plate içinde boş bir kuyucuğa da sadece ortam koyularak kör olarak kullanılmıştır. 100 mikrol/kuyucuk hücre için her kuyucuğa 10 mikrol/kuyucuk WST-1 hücre proliferasyon reaktifi eklenerek (1:10 dilüsyon) hücreler  $35^{\circ}\text{C}$  %5  $\text{CO}_2$ 'lik etüvde 2 saat inkübasyona bırakılacaktır. Plate çalkalayıcıda 1 dk çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda 450 nm de okutulmuştur. Referans dalga boyu olarak 600 nm'den fazlası (630 nm) seçilmiştir. Kontrol grubunun absorbans ortalamaları %100 canlılık olarak kabul edilerek diğer absorbanslar karşılaştırılarak hücre canlılık yüzdeleri tayin edilmiştir.

### **3.6.7. Flow sitometrik Annexin V-FITC/PI boyaması ile apoptoz ve nekroptoz tayini:**

Hücreler toplandıktan sonra tripsin ile muamele edilip tek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. 50 mikrometre çaplı polistren filtreden geçirilmiştir. Süspanse hücreler 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak, 1200 rpm de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet kit ile birlikte verilen 10 x bağlanma tamponundan dilüsyon yoluyla hazırlanan 1 x konsantrasyonlu 100 µl tampon ile resüspanse edilip polistren 5 ml'lik akım sitometri test tüpüne aktarılmıştır.

Bu analizde doğru kapılama ayarını yapabilmek için aynı örnek için bir tüp hiç boyanmadan ayrılıp, diğer tüpe de sadece 5 µl propidium iyodid (PI), bir tüpe sadece 5 µl FITC-Annexin V ve bir tüpe PI ve Annexin V birlikte 5'er µl eklenip karanlık ortamda oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpe 400 µl bağlanma tamponu eklenip akım sitometri analizi yapılmıştır. Uygun kapılamalar yapıldıktan sonra sadece Annexin V boyananlar erken apoptotik, Annexin V ve PI ikisi de boyananlar geç apoptotik veya nekrotik olarak tanımlanmıştır. Elde edilen bu yüzde verileri ile en başta yapılan hücre sayımına göre karşılaştırmalı hesaplamalar yapılmıştır.

### **3.6.8. Parafin kesitlerde TUNEL ile apoptoz analizi:**

Kesitler, bir gece  $60^{\circ}\text{C}$  etüvde tutulmuştur. Kesitler oda ısısında soğuduktan sonra 2 x 30 dk ksilende bekletilmiştir. Kesitler sırasıyla; %96, %80, %70 ve %60'lik etil alkolde 2'şer dk

bekletildikten sonra 5 dk PBS ile yıkanmıştır. TdT işaretleme karışımı TdT tamponu, Biotin d-UTP ve TdT nin sırasıyla 90:5:5 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. 50'şer mikrol TdT işaretleme karışımı ile hücreler 60 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. TB (10x) tamponunun distile su ile 1:10 dilüsyonu ile elde edilen TB (1x) tamponuna slaytların daldırılması ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilmesi ile TdT reaksiyonu sonlandırılmıştır. Kesitler PBS ile 2'şer dk olmak üzere 4 defa yıkanmıştır. 1:3 oranında sırasıyla bloklama solüsyonu ve PBS karıştırılarak bloklama tamponu hazırlanmıştır. Kesitler 50'şer mikrol bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildikten sonra tampon uzaklaştırılmıştır. 1:9 oranında sırasıyla avidin-FITC ile bir önceki adımda hazırlanan bloklama tamponu karıştırılarak örnek başına 50 mikrolitre olacak şekilde yeterli miktarda avidin-FITC solüsyonu hazırlanmıştır. Örnekler 50'şer mikrolitre avidin-FITC solüsyonu ile karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra karanlık ortamda 3 defa 5'er dk PBS ile yıkanmıştır. 10 dakika süre ile DAPI zemin boyama yapıp distile su ile yıkanp, gliserin ile slaytlar lamel ile kapatılarak floresan mikroskobu ile incelenmiştir. Yeşil floresans veren hücreler apoptotik kabul edilmemiştir. Mavi hücreler negatiftir. Toplam 5000 hücre sayılıp yeşil hücre oranı saptanmıştır.

### **3.6.9. İmmunhistokimya boyama**

Sferoidler katılaştırılmış agarozun yüzeyinden cell scrubber ile nazikçe çıkarılmıştır. İmmünohistokimyasal analiz için, sferoidler 4°C'de 24 saat fosfat tamponlu salin (PBS, pH 7.4) içerisinde %4 paraformaldehit içinde tesbit edilmiş, takiben sferoidler kademeli etanol (80, 95 ve 100% sırayla) ile dehidrate edilip, ksilen içinde bekletilip, parafin içine gömülüp ve mikrotom üzerinde 5 mikrometre koronal kesitler alınmıştır. Kesitler 60°C derece su banyosuna konulmuştur. Poli-L-lisin kaplı cam slaytlar üzerine alınan kesitler 60°C derece sıcaklığında etüvde 24 saat kurutulmuştur. Ventana discover otomatik immünohistokimya boyama cihazında Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 primer antikorlar ile primer antikor süresi 30 dakika olacak şekilde antirabbit HRP yöntemi ile immünohistokimyasal boyanmıştır. Zemin boyama hematoksilendir.

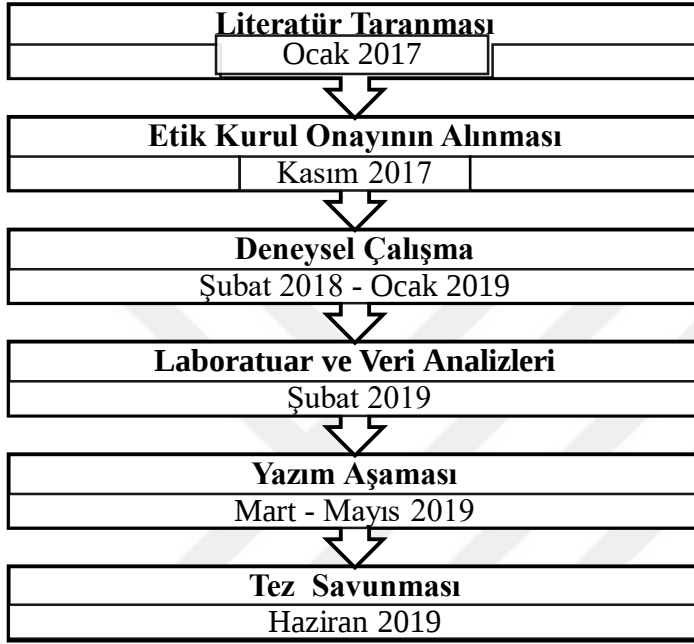
Tüm kesitteki kolonilerdeki pozitif hücre sayıları Olympus ışık mikroskobunda kaydedilmiştir.

### **3.6.10. Akış denemesi**

Meme kanseri hücreleri bir cam (steril lam) yüzeyde 4 well plate içerisinde büyütülmüştür. 2D ve 3D boyutlarda deneyleri gerçekleştirebilmek üzere bir akış hücresi

tasarlanmıştır. 2D akış düzeneğine yerleştirilen hücre ihtiva eden cam yüzey yerleştirilecek ve 2D akış dneyleri gerçekleştirilmiştir. 3D akış deneyleri için, hücreler matrijel ile karıştırılacak ve tasarlanan 3D akış düzeneğine gönderilmiştir.

### 3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi



### 3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

WST-1, tripan mavisi canlılık testleri, Anneksin-V ve PI apoptoz ve nekropitoz testleri, immünohistokimya bulguları % olarak kaydedilmiş; sferoid çap ve sayılarının numerik değerleri ortalamaların karşılaştırılması testi Mann Whitney U ile  $p < 0,05$  kesim noktası ile analiz edilmiştir.

### 3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmanın başlangıcında amaçlanan DOX yüklü mikroköpükçükler ile 2D ve 3D’de canlılık analizlerine bakılamamış ve ultrason ile patlatma yapılamamıştır. Çünkü ultrason patlatma için ortama verilen mikroköpükçükler medium içerisinde yüzmekte ve zemindeki hücrelere temas etmediği görülmüştür. Bu nedenle hücrelere bağlanma sağlanamadığı için başarılı olamamıştır. Bu yüzden 2D ve 3D hücre kültüründe bir diğer hedeflediğimiz DOX yüklü mikroköpükçüklerin akış düzeneğinde deneyleri yapılmıştır.

### **3.10. Etik Kurul Onayı**

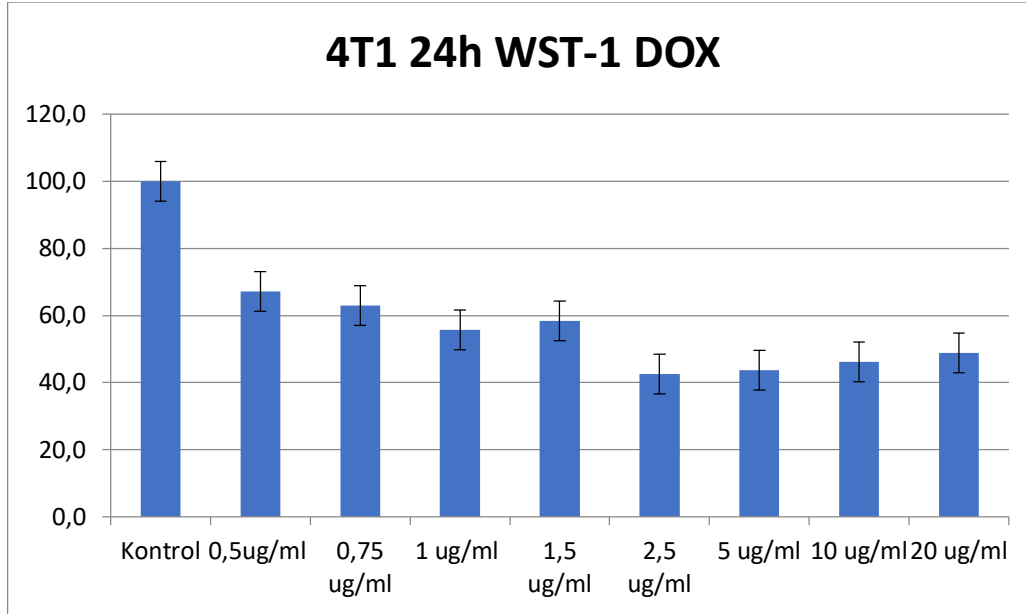
Tüm çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Tarafından 09.11.2017 ve 3647-GOA protokol numaralı 2017/26-22 karar numaralı etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirildi (Ek 1).



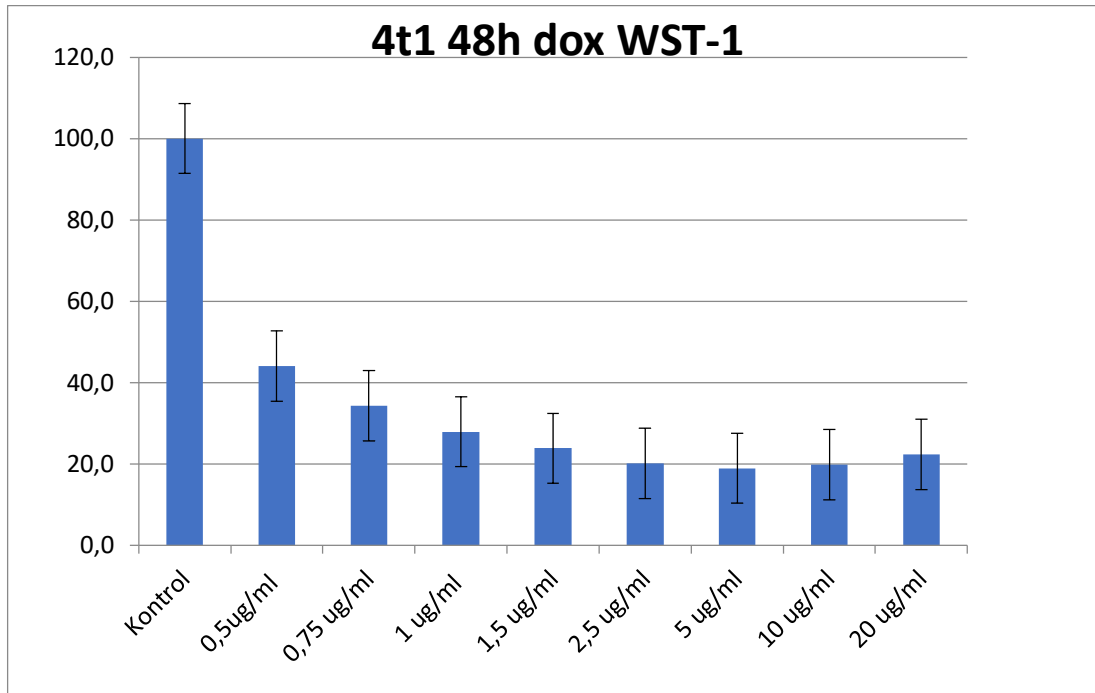
## 4. BULGULAR

### 4.1. WST-1 ile Hücre Proliferasyonunun Tayini

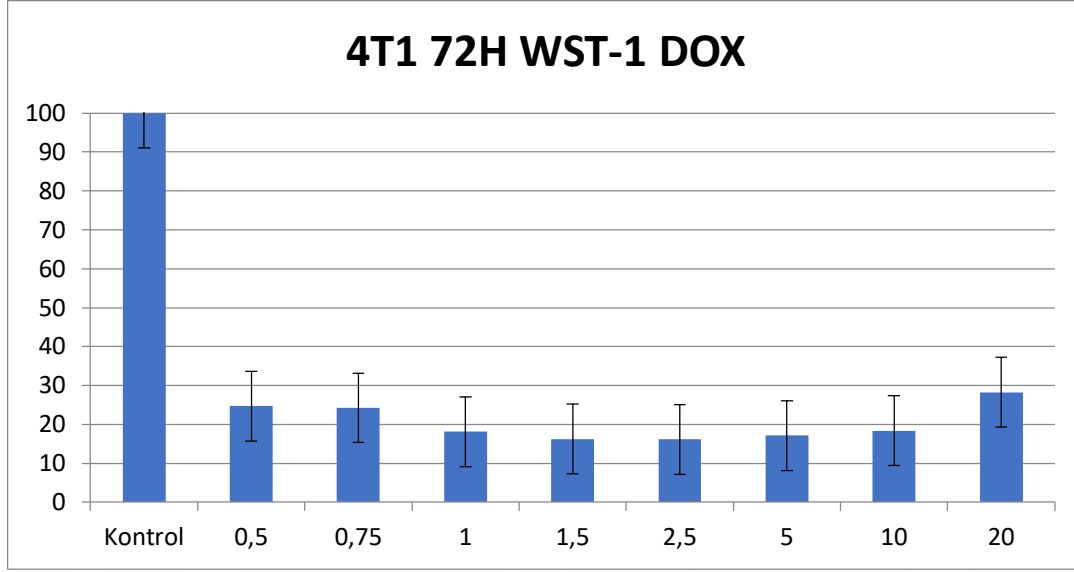
#### 4.1.1 DOX Etkisinin WST-1 ile araştırılması



Şekil 7. 4T1 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

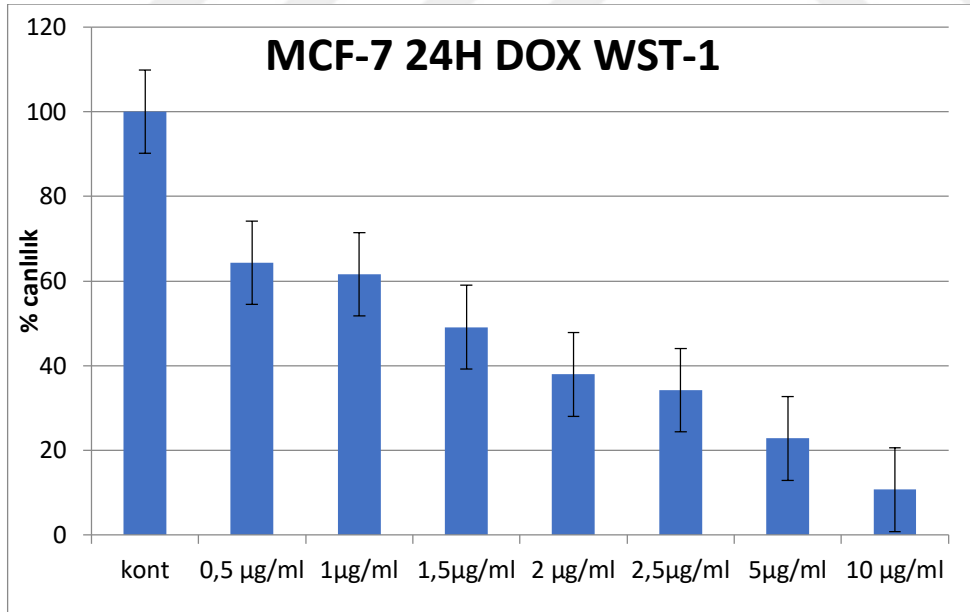


Şekil 8.4T1 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

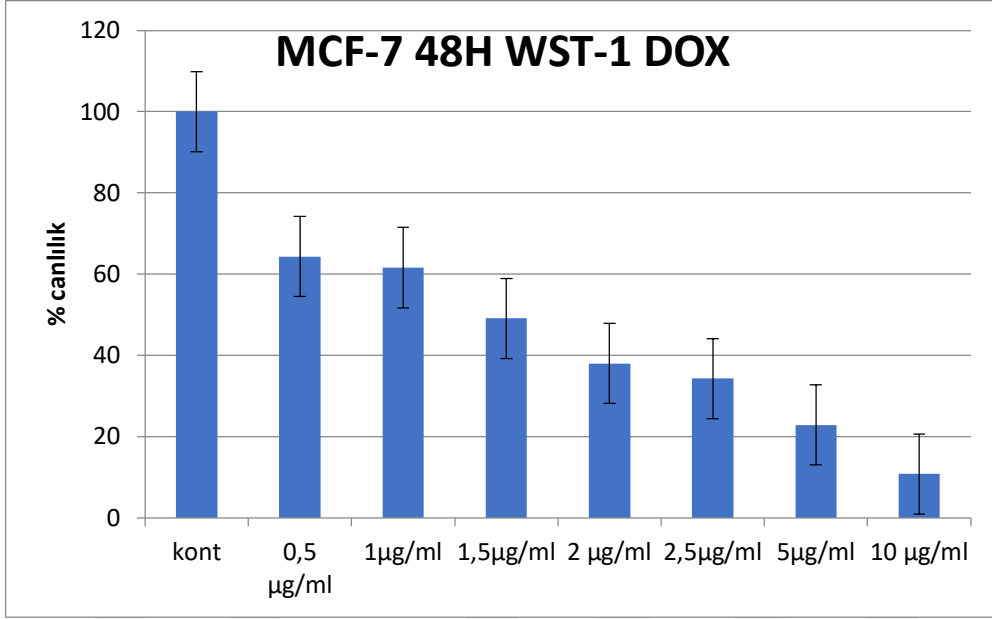


**Şekil 9.** 4T1 Hücrelerine 72 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

4T1 hücrelerinde DOX'un farklı dozları (0,5, 1,5, 2,5, 5, 10, 20 µg/ml) uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonrasında 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, WST-1 testi sonucunda 4T1 hücresi için etkin dozun 48 saat 1,5 µg/ml olduğu görülmüştür.

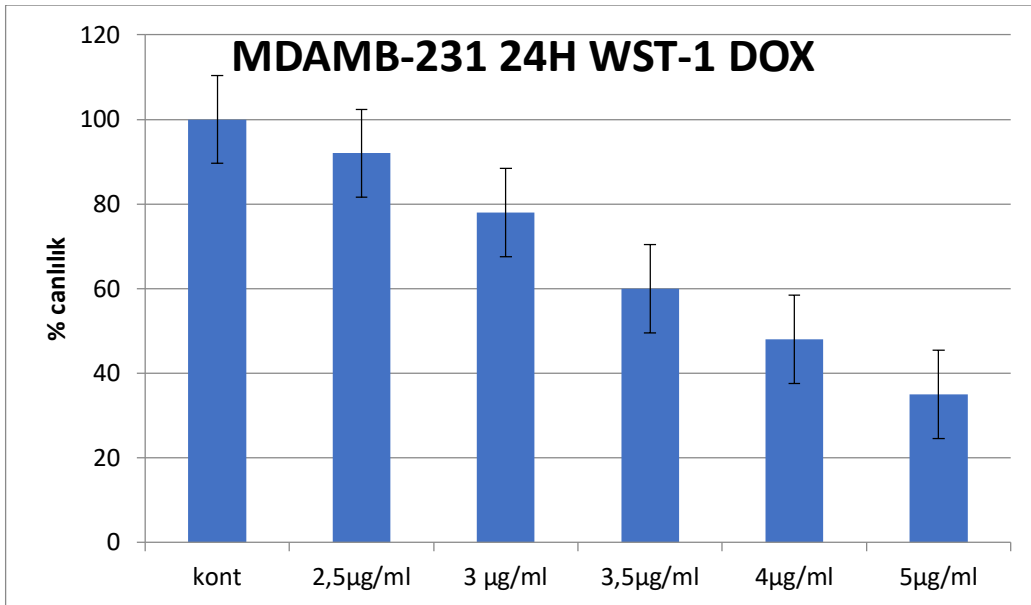


**Şekil 10.** MCF-7 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

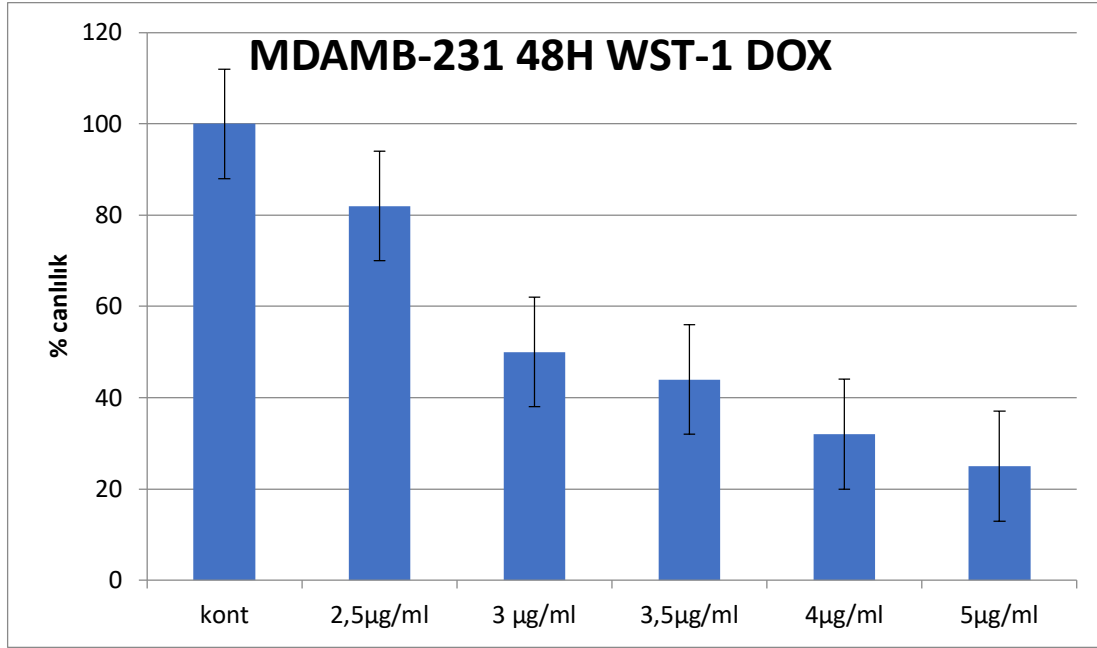


**Şekil 11.** MCF-7 Hücrelerine 48 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

MCF7 hücrelerinde DOX'un farklı dozları (0,5, 1,5, 2,5, 5, 10, 20 µg/ml) uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonrasında 24 ve 48 saat inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, WST-1 testi sonucunda MCF7 hücresi için etkin dozun 24 saat 1,5 µg/ml olduğu görülmüştür.



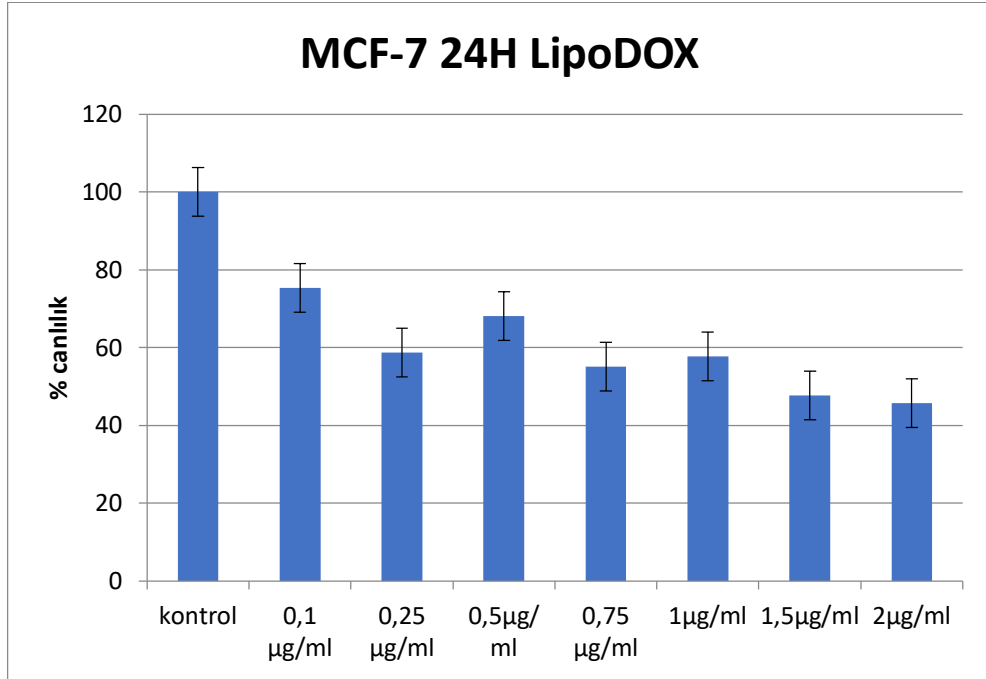
**Şekil 12.** MDAMB-231 Hücrelerine 24 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.



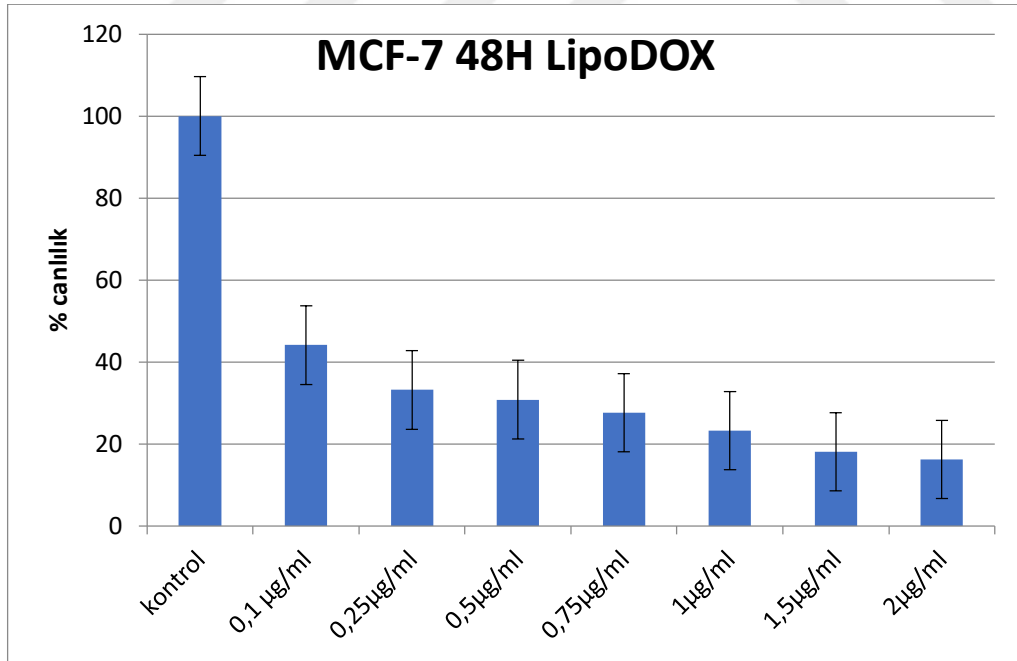
**Şekil 13.** MDAMB-231 Hücrelerine 48 saat DOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

MDAMB-231 hücrelerinde DOX'un farklı dozları (0,5, 1,5, 2,5, 5, 10, 20 µg/ml) uygulandığında ilaç uygulaması sonrasında 24 ve 48 saat inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, bu dozlar için etkin doz bulunamamıştır. Bu yüzden DOX'un dozları arttırılmıştır (2,5,3,3,5,4,5 µg/ml). WST-1 testi sonucunda MDAMB-231 hücresi için etkin dozun 48 saat 3 µg/ml olduğu görülmüştür.

#### 4.1.2 LipoDOX Etkisin WST-1 ile Araştırılması

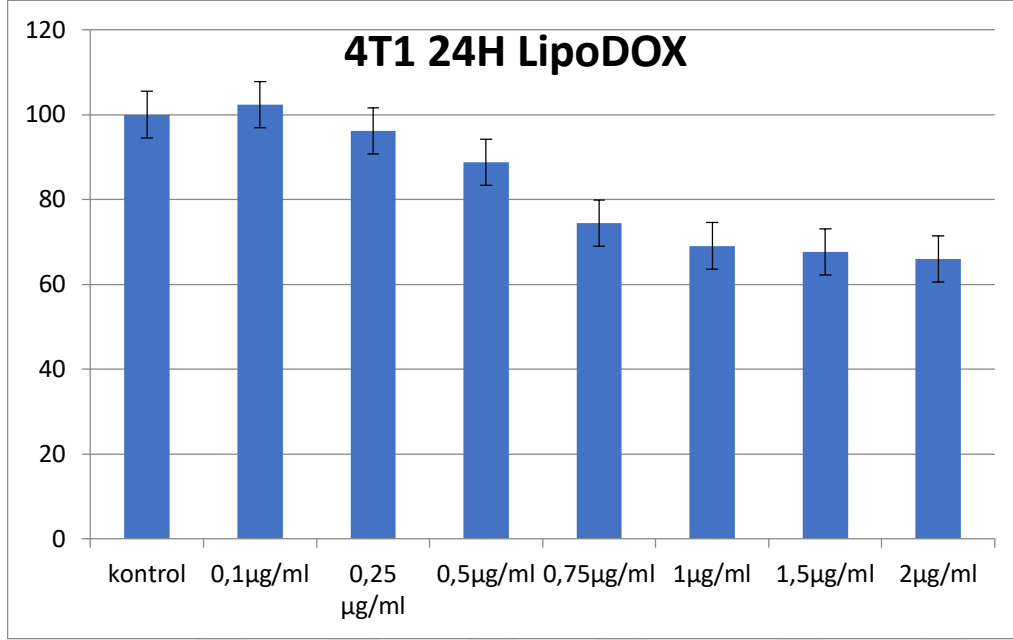


**Şekil 14.** MCF-7 hücrelerine 24 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

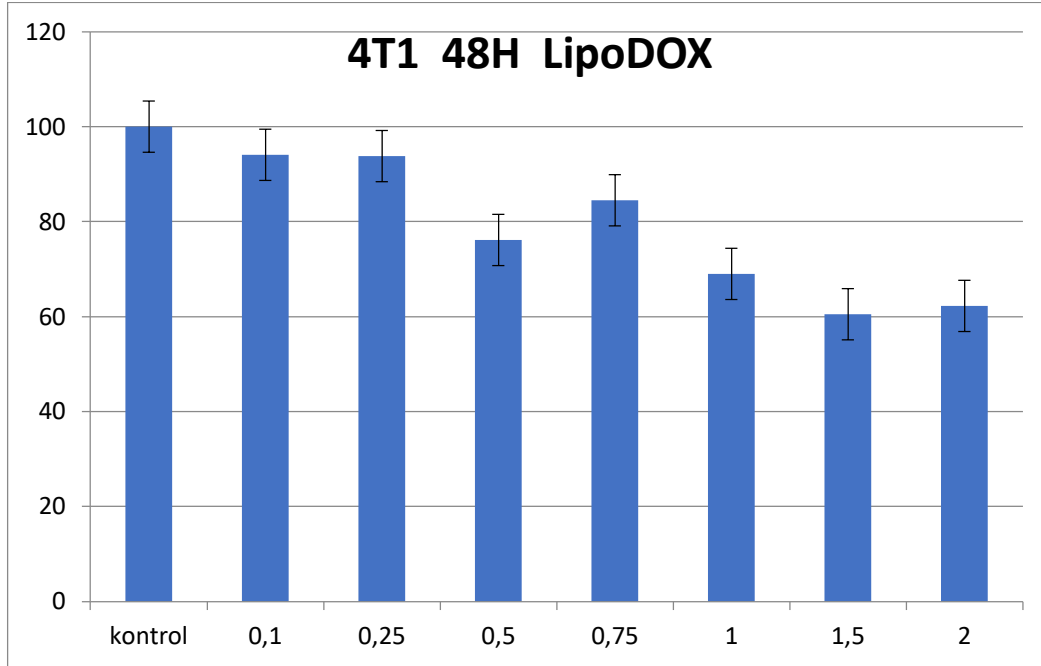


**Şekil 15.** MCF-7 hücrelerine 48 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

MCF7 hücrelerinde LipoDOX'un farklı dozları (0,1,0,25,0,5,0,75,1,1,5,2  $\mu\text{g/ml}$ ) uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonrasında 24 ve 48 saat inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, WST-1 testi sonucunda MCF7 hücresi için etkin dozun 24 saat 0,75  $\mu\text{g/ml}$  olduğu görülmüştür.

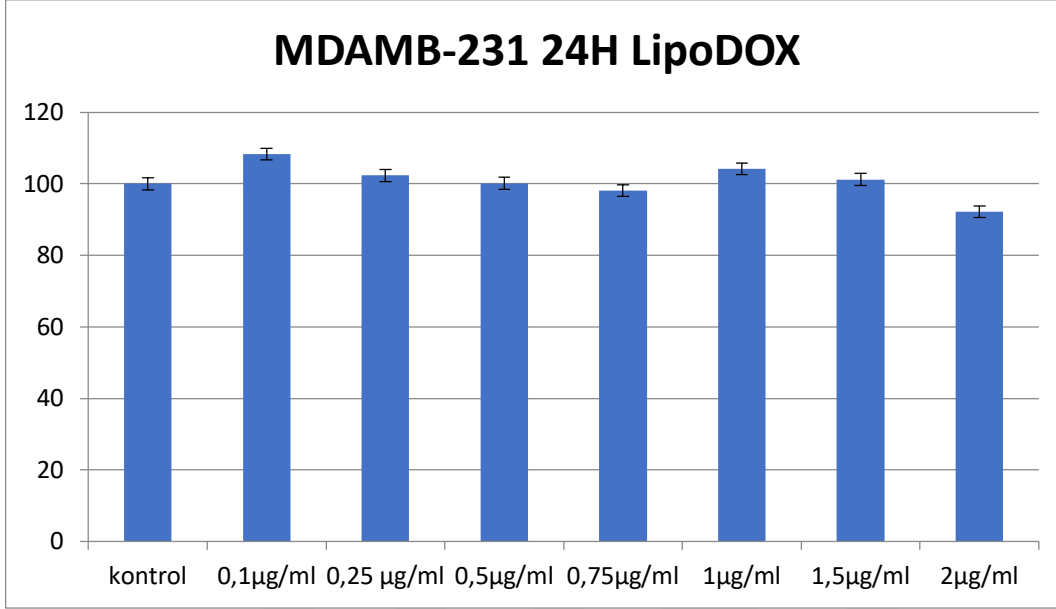


Şekil 15. 4T1 hücrelerine 24 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

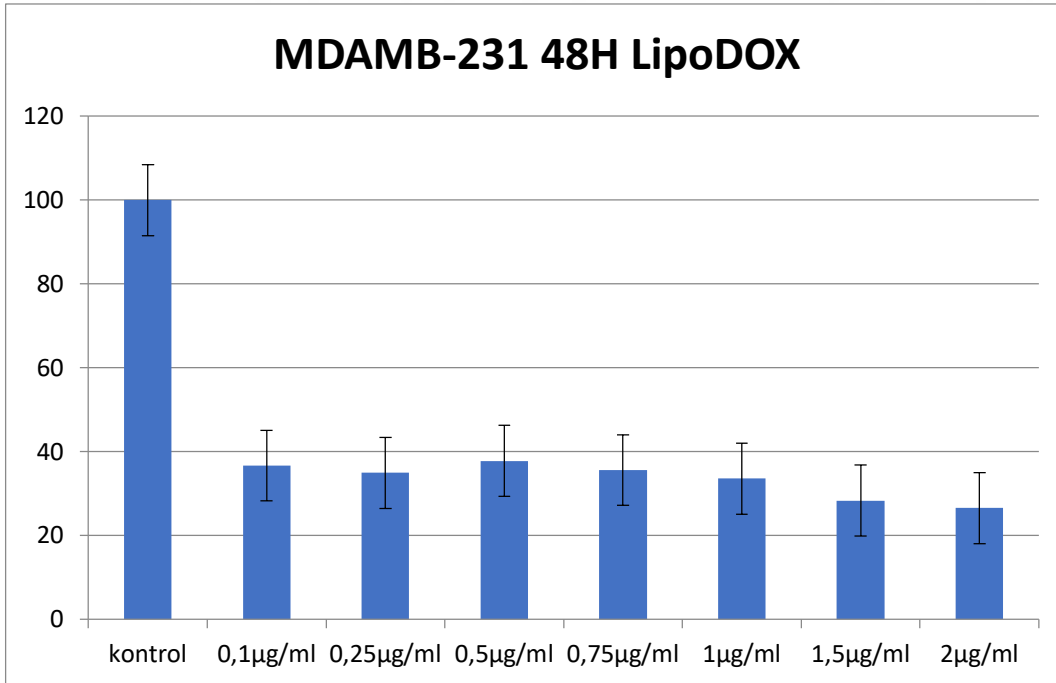


Şekil 16. 4T1 hücrelerine 48 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

4T1 hücrelerinde LipoDOX'un farklı dozları (0,1,0,25,0,5,0,75,1,1,5,2 µg/ml) uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonrasında 24 ve 48 saatt inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, WST-1 testi sonucunda 4T1 hücresi için etkin dozun 48 saat 1,5 µg/ml olduğu görülmüştür.



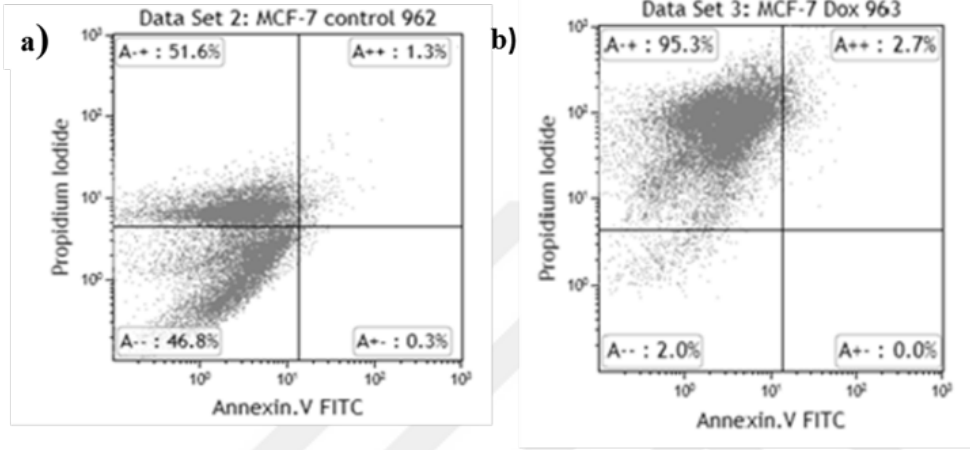
**Şekil 17.** MDAMB-231 hücrelerine 24 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.



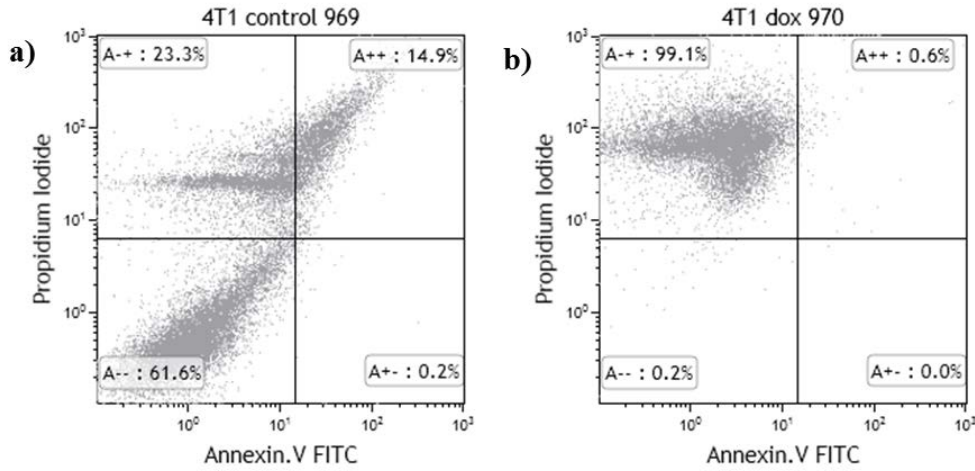
**Şekil 18.** MDAMB-231 hücrelerine 48 saat LipoDOX Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

MDAMB-231 hücrelerinde LipoDOX'un farklı dozları (0,1,0,25,0,5,0,75,1,1,5,2 µg/ml) uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonrasında 24 ve 48 saatt inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, WST-1 testi sonucunda 24 saatte hiç bir etkinlik gözlememiştir. MDAMB-231 hücresi için etkin dozun 48 saat 0,25 µg/ml olduğu görülmüştür.

#### 4.2. Flow sitometrik Annexin V - FITC/PI boyaması ile apoptoz ve nekroptoz tayini



**Şekil 19.** MCF-7 hücresinin DOX uygulanmasıyla Annexin-V –FITC/ PI bulguları **a.** MCF-7 kontrol **b.** MCF-7 DOX.

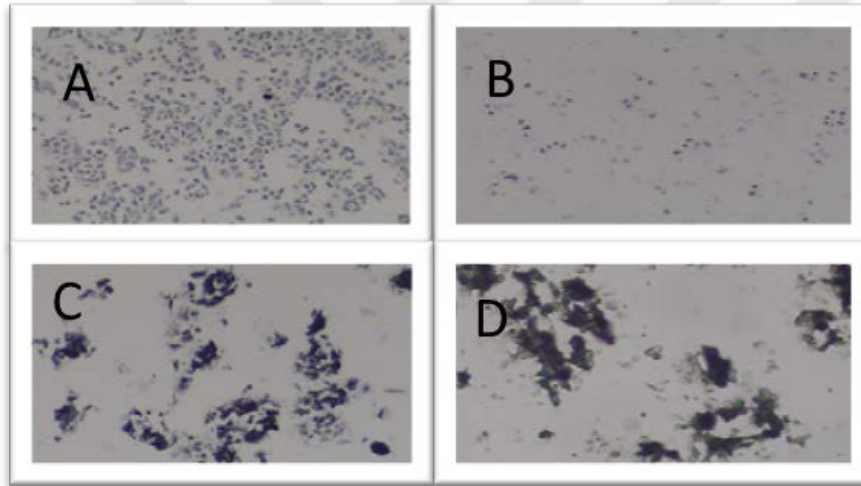


**Şekil 20.** 4T1 hücresinin DOX uygulanmasıyla Annexin-V –FITC/ PI bulguları **a.** 4T1 kontrol **b.** 4T1 DOX.

**Tablo 1.**Deney Koşullarındaki Apoptoz Değerlendirme Bulguları

| Deney koşulu       | Canlılık | Erken apoptoz | Geç apoptoz | Nekroz |
|--------------------|----------|---------------|-------------|--------|
| 4T1 kontrol        | %61,6    | % 0,2         | %14,9       | %23,3  |
| 4T1 1,5 µg/ml DOX  | % 0,2    | %0,0          | % 0,6       | %99,1  |
| MCF7 kontrol       | %46,8    | %0,3          | %1,3        | %51,6  |
| MCF7 1,5 µg/ml DOX | %2,0     | %0,0          | %2,7        | %95,3  |

#### 4.3. Parafin kesitlerde TUNEL ile apoptoz analizi



**Şekil 21.**MCF-7 ve 4T1 3D Hücre bloğunun parafin kesitlerde TUNEL ile apoptoz analizi. A) 4T1 Kontrol. B) 4T1 DOX. C) MCF-7 Kontrol. D) MCF7 DOX.

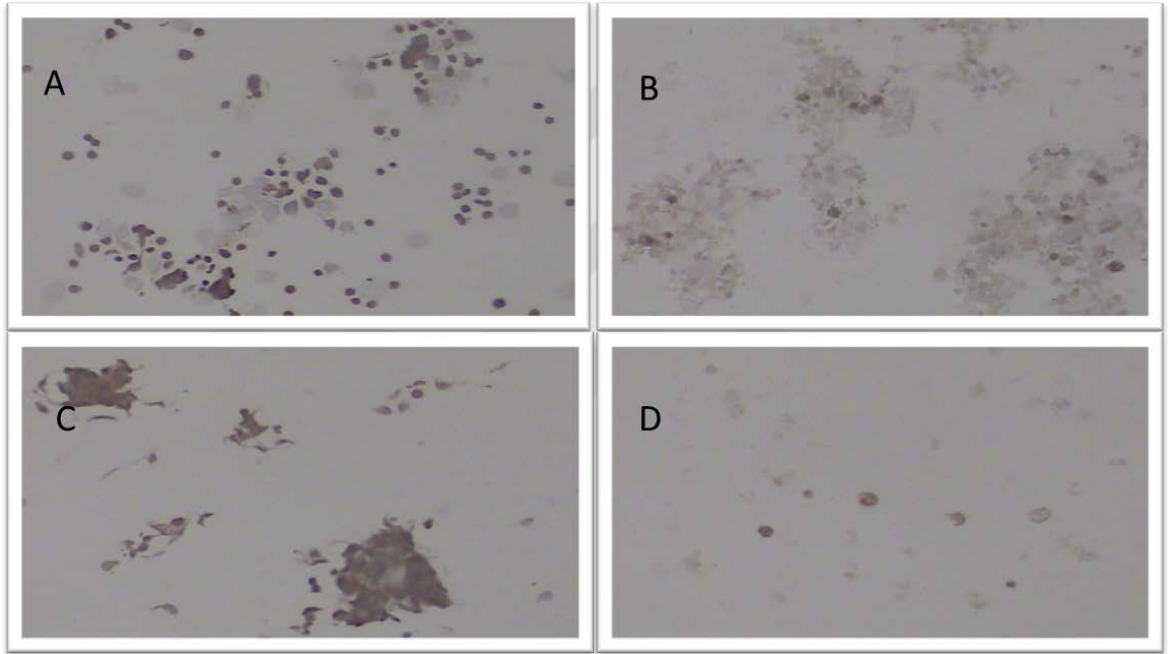
**Tablo 2.** 4T1,MDAMB-231 ve MCF7 3D Hücrelerinin parafin kesitlerinde TUNEL ile apoptoz bulguları

| Hücre hattı | Koşullar | % pozitiflik            |
|-------------|----------|-------------------------|
| 4T1         | Kontrol  | % 3                     |
| 4T1         | DOX      | % 35                    |
| MDAMB-231   | Kontrol  | ----(değerlendirilmedi) |
| MDAMB-231   | DOX      | %24                     |
| MCF7        | Kontrol  | % 5                     |
| MCF7        | DOX      | %25                     |

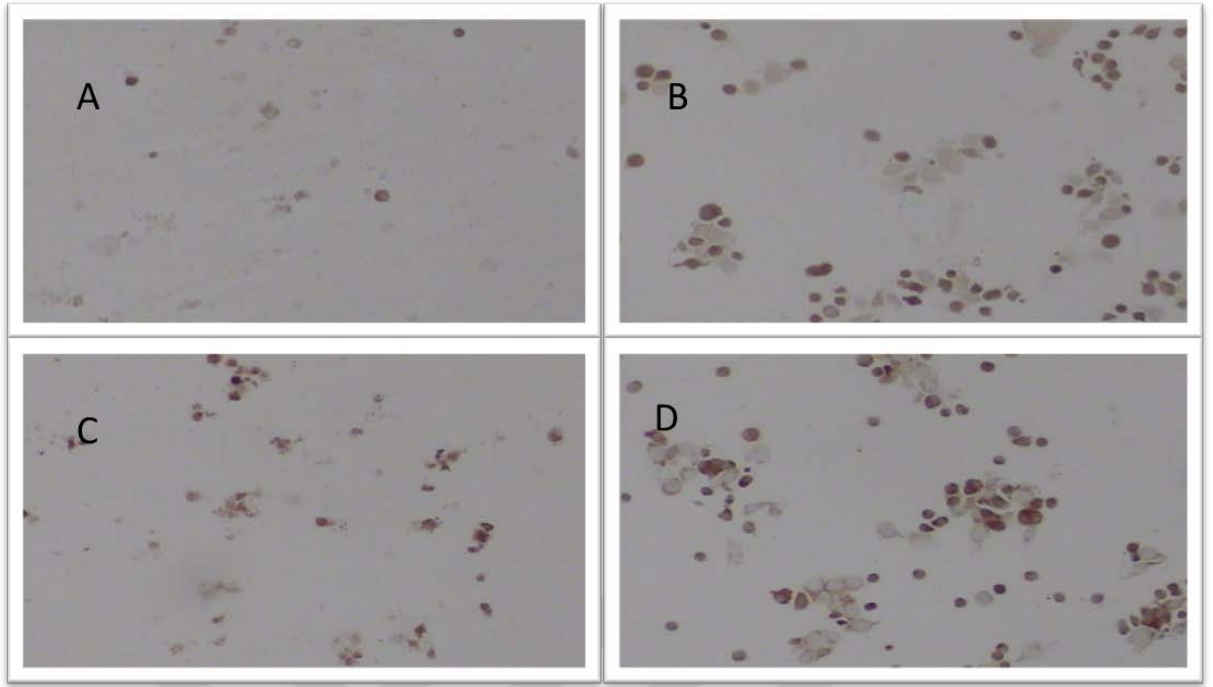
3D modelde apoptoz sayılarının saptanması için TUNEL ile boyama yapılmıştır. Buna göre 4T1 hücrelerinin 3D modellenmesi sonucunda apoptoz değeri kontrol grubunda % 3 iken DOX uygulanan hücrelerde %35 oranında saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinin 3D modellemesi sonucunda da benzer bulgular saptanmış ve 4T1'e kıyasla daha az düzeyde olmakla birlikte DOX sonrası apoptoz artmıştır (kontrol %5, DOX sonrası %25). MDA-MB-231 hücreleri 3D modellemesinde de DOX sonrası apoptoz artarak % 24 düzeyinde görülmektedir.

#### 4.4. İmmunhistokimya boyama

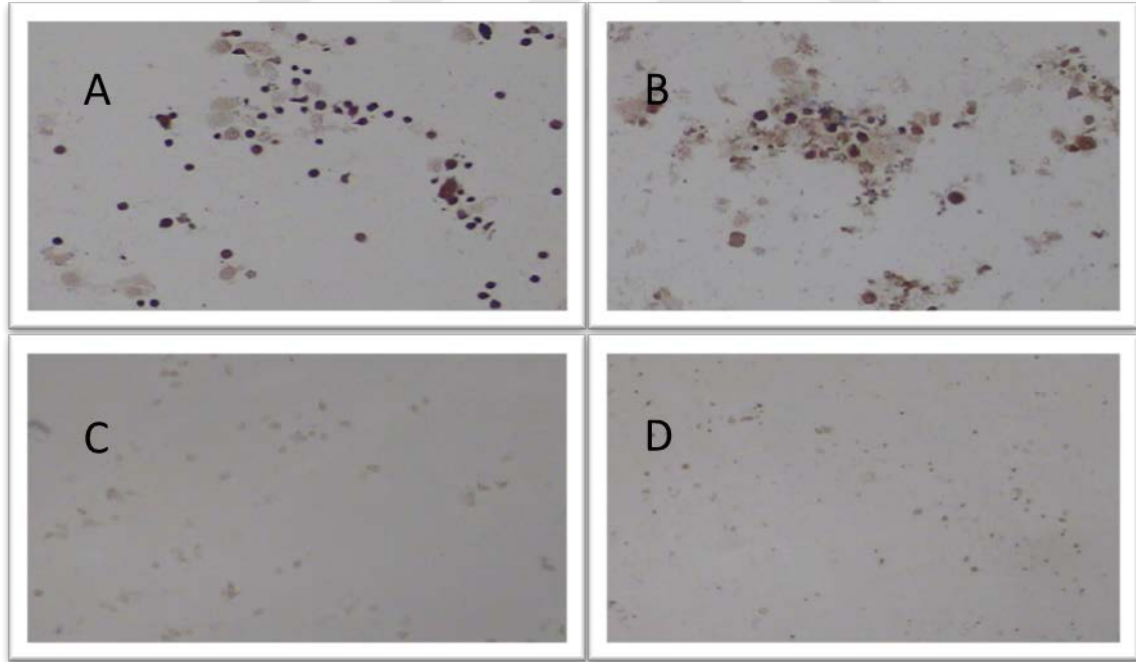
##### 4.4.1 2D Hücre Kesit Bulguları



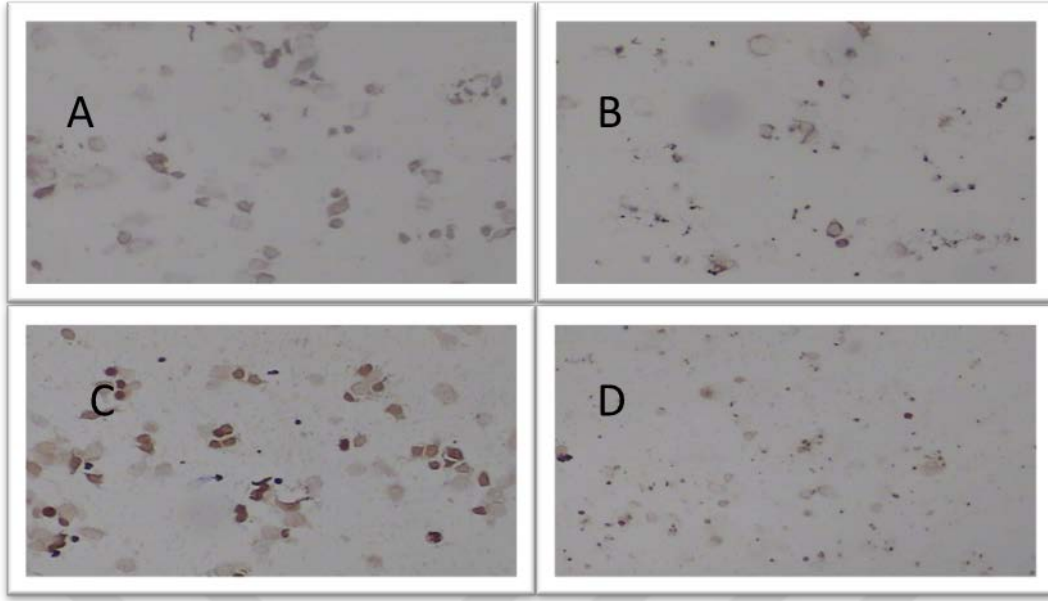
**Şekil 22.** Hücre proliferasyonunun ( Ki-67) inhibisyonu. A) 4T1 Kontrol. B) 4T1 DOX. C) MDAMB-231 Kontrol. D) MDAMB-231 DOX.



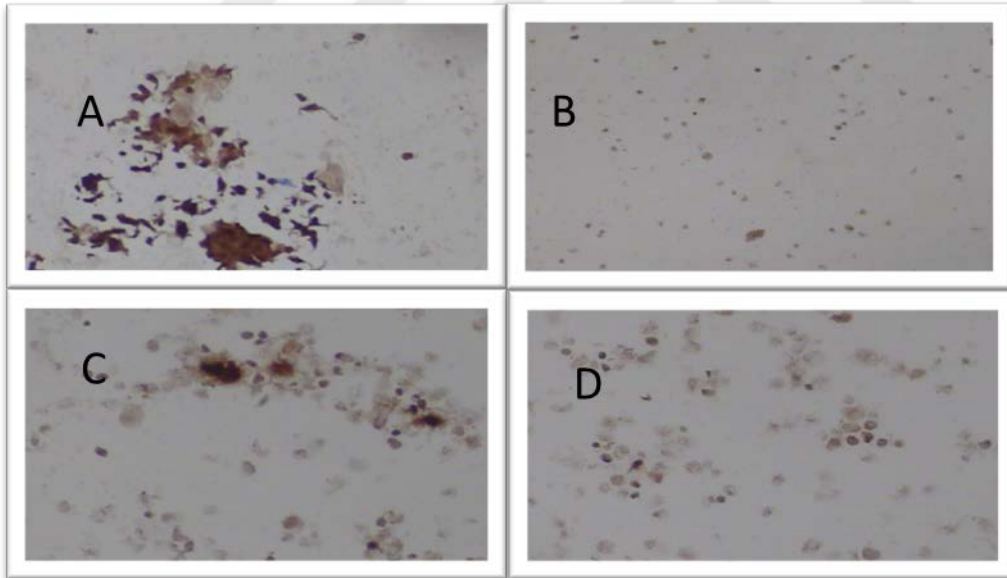
**Şekil 23.** 4T1 hücresinin Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) 4T1 DOX Kaspaz 9. B) 4T1 Kontrol Kaspaz 9. C) 4T1 DOX Kaspaz 8. D) 4T1 Kontrol Kaspaz 8.



**Şekil 24.** 4T1,MCF7 hücrelerinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) 4T1 Kontrol Kaspaz 3. B) 4T1 DOX Kaspaz 3. C) MCF-7 Kontrol Kaspaz 9. D) MCF-7 DOX Kaspaz 9



**Şekil 25.** MCF-7 hücresinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) MCF-7 Kontrol Kaspaz 8. B) MCF-7 DOX Kaspaz 8. C) MCF-7 Kontrol Kaspaz 3. D) MCF-7 DOX Kaspaz 3.



**Şekil 26.** MDAMB-231 hücresinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) MDAMB-231 Kontrol Kaspaz 3. B) MDAMB-231 DOX. C) MDAMB-231 Kontrol Kaspaz 8. D) MDAMB-231 DOX Kaspaz 8.

**Tablo 3.** 4T1 hücrelerinde Ki-67, Kaspaz3, Kaspaz 8 ve Kaspaz9'un İmmunohistokimyasal Bulguları.

| 4T1     | Ki-67 | Kaspaz 3 | Kaspaz 8 | Kaspaz9 |
|---------|-------|----------|----------|---------|
| Kontrol | %80   | %60      | % 50     | %30     |
| DOX     | %27,2 | %80      | % 90     | %50     |

4T1 fare kökenli progresif üçlü negative meme kanseri hücrelerinde Ki-67'nin %80 düzeyinde yüksek proliferative aktiflik gösterirken DOX uygulandıktan sonra %27,2'ye düştüğü görülmektedir. 4T1 hücrelerinin 2D kültürü sonucunda kaspaz 3'ün kontrole göre %20 oranda arttığı, kaspaz 8'in %40 oranında, kaspaz 9'un ise %20 oranında protein düzeyinde artış gösterdiği görülmüştür.

**Tablo 4.** MDAMB-231 hücrelerinde Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 'un İmmunohistakimyasal Bulguları.

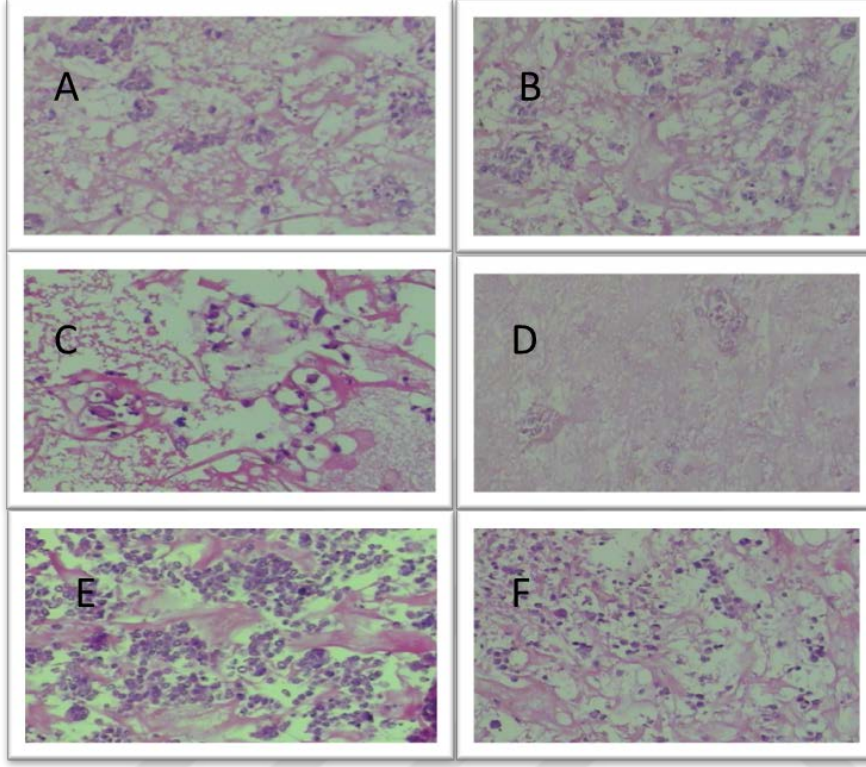
| MDAMB-231 | Ki-67 | Kaspaz 3 | Kaspaz 8 | Kaspaz 9 |
|-----------|-------|----------|----------|----------|
| Kontrol   | % 98  | -        | %21      | -        |
| DOX       | %13,6 | %95      | % 96     | % 90     |

MDA-MB-231 hücrelerinde 2D kültür koşullarında DOX 'un kontrole kıyasla Ki-67 proliferasyon indeksini %98'den %13,6'ya indirdiği, kaspaz 3, 8 ve 9'u belirgin olarak arttığı tespit edilmiştir.

**Tablo 5.** MCF7 hücrelerinde Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'un İmmunohistakimyasal Bulguları.

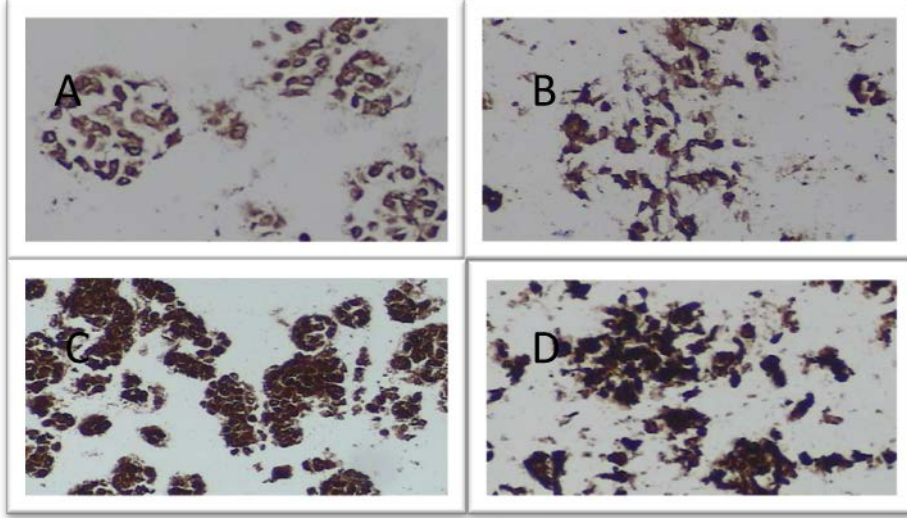
| MCF7    | Ki-67  | Kaspaz 8 | Kaspaz 3 | Kaspaz 9 |
|---------|--------|----------|----------|----------|
| Kontrol | ---    | % 30     | % 49     | % 20     |
| DOX     | % 18,8 | % 60     | % 82     | % 81     |

#### 4.4.2 3D Kesit Hematoksilen Eozin Bulguları

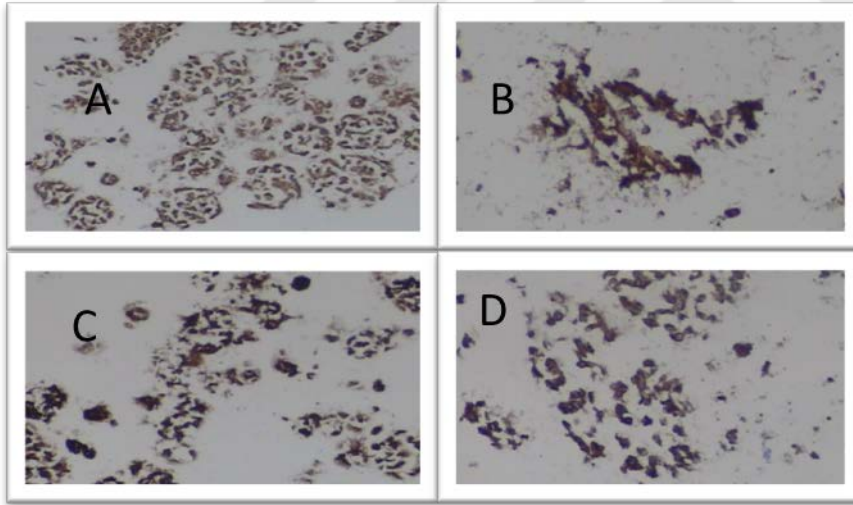


**Şekil 27.** MCF-7, MDAMB-231 ve 4T1 hücrelerinin 3D Parafin kesitlerden Hematoksilen Eozin ile boyanması. A) MCF-7 Kontrol. B) MCF-7 DOX. C) MDAMB-231 Kontrol. D) MDAMB-231 DOX. E) 4T1 Kontrol. F) 4T1 DOX.

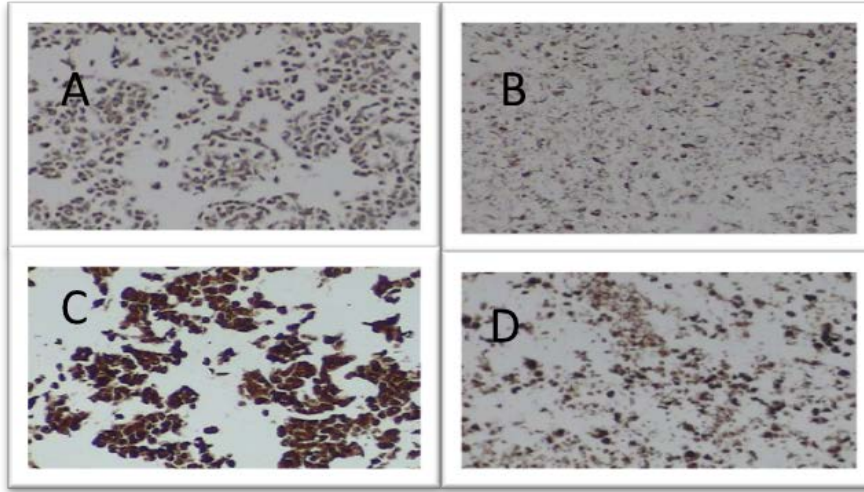
#### 4.4.3 3D Hücre Kesitlerin İmmünohistokimyasal Bulguları



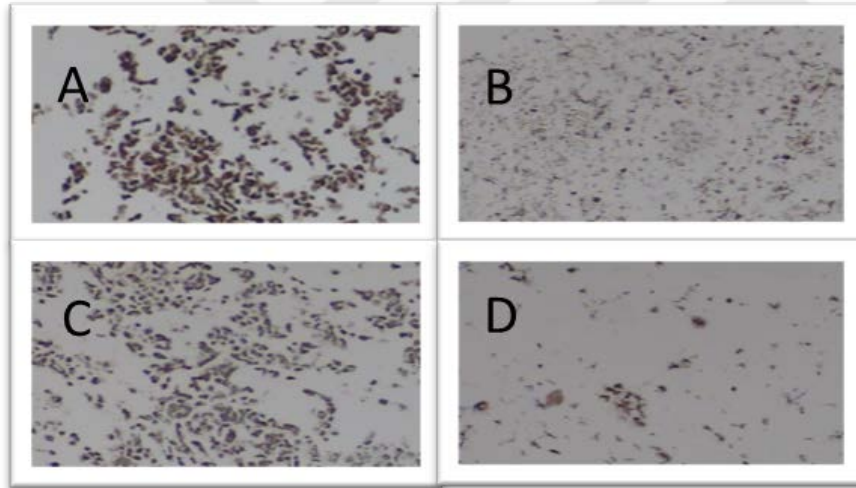
**Şekil 28.** MCF-7 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Ki-67 ve Kaspaz 3 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) MCF-7 Kontrol Ki-67. B) MCF-7 DOX Ki-67. C) MCF-7 Kontrol Kaspaz 3. D) MCF-7 DOX Kaspaz 3.



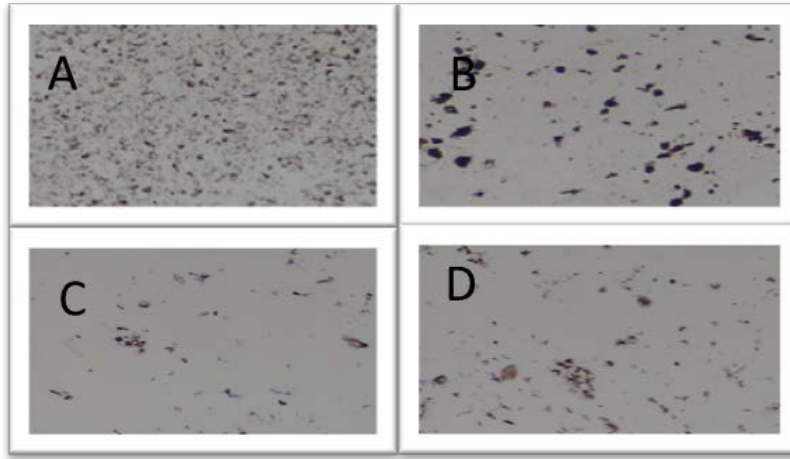
**Şekil 29.** MCF-7 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) Kontrol Kaspaz 9. B) DOX Kaspaz 9. C) Kontrol Kaspaz 8. D) DOX Kaspaz 8.



**Şekil 30.** 4T1 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Ki-67 ve Kaspaz 3 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) Kontrol Ki-67. B) DOX Ki-67. C) Kontrol Kaspaz 3.D) DOX Kaspaz 3.



**Şekil 31.** 4T1 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) Kontrol Kaspaz 8. B) DOX Kaspaz 8. C) Kontrol Kaspaz 9. D) DOX Kaspaz 9.



**Şekil 32.** MDAMB-231 3D Hücre Bloğu kesitlerinin Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 antikorları ile immünohistokimyasal boyanması. A) DOX Ki-67. B) DOX Kaspaz 3. C) DOX Kaspaz 8. D) DOX Kaspaz 9.

**Tablo 6.** MDAMB-231 3D hücrelerinde Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'un İmmunohistakimyasal Bulguları.

| MDAMB231 | Ki-67                 | Kaspaz3 | Kaspaz 8 | Kaspaz 9 |
|----------|-----------------------|---------|----------|----------|
| Kontrol  | - (değerlendirilmedi) | -       | -        | -        |
| DOX      | % 50                  | % 100   | % 73     | % 70     |

**Tablo 7.** MCF7 3D hücrelerinde Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'un İmmunohistakimyasal Bulguları.

| MCF7    | Ki-67 | Kaspaz3 | Kaspaz 8 | Kaspaz 9 |
|---------|-------|---------|----------|----------|
| Kontrol | % 100 | %80     | % 80     | % 80     |
| DOX     | % 80  | % 95    | % 95     | % 95     |

MCF7 hücrelerinin 3D sferoidlerinde DOX sonrasında kontrole kıyasla %15 oranında kaspaz 3, 8 ve 9 aktivasyonlarında artış saptanmıştır. Bununla beraber proliferasyon indeksi açısından %20 azalma görülmüştür.

**Tablo 8.** 4T1 3D hücrelerinde Ki-67, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'un İmmunohistakimyasal Bulguları.

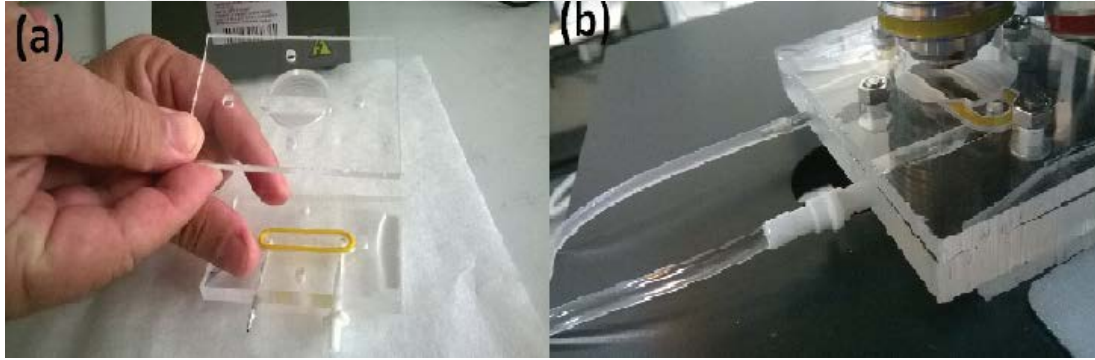
| 4T1     | Ki-67 | Kaspaz3 | Kaspaz 8 | Kaspaz 9 |
|---------|-------|---------|----------|----------|
| Kontrol | % 90  | %100    | % 100    | % 90     |
| DOX     | % 50  | % 100   | % 100    | % 85     |

4T1 hücre hattında 3D sferoid modelde, DOX Ki-67 proliferasyon indeksini % 40 azaltmıştır, ancak kaspaz 3, 8 ve 9 ekspresyonlarının yüksek olmasına rağmen kontrol grubunda da ekspresyonları yüksek saptanmıştır.

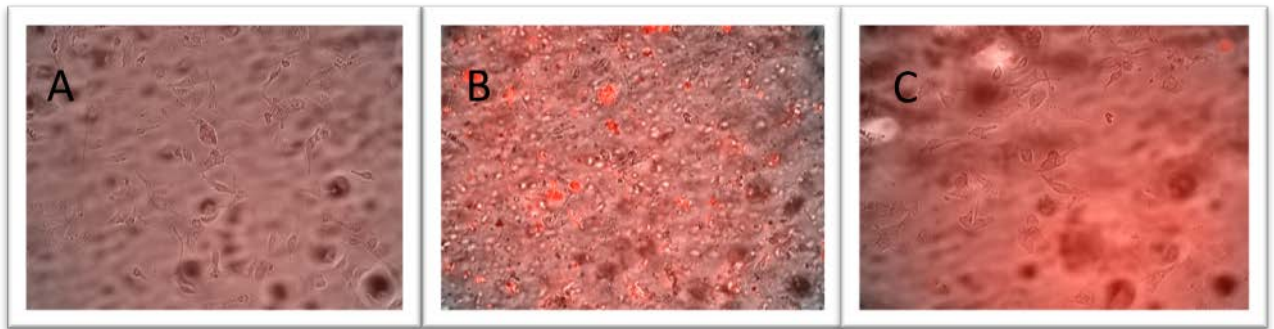
#### 4.5. Akış denemesi

Tasarlanan 2D ve 3D akış kanalları Şekil 33'de gösterilmiştir. Uygun bir kamera sistemi ile akış video ile kayıt altına alınabilmekte ve mikroköpükçüklerin hücrelerle etkileşimi hücrelere bağlanma eğilimleri, kayma gerilimi altında hücre davranışları incelenmiştir.

##### 4.5.1 2D Akış Düzenegi

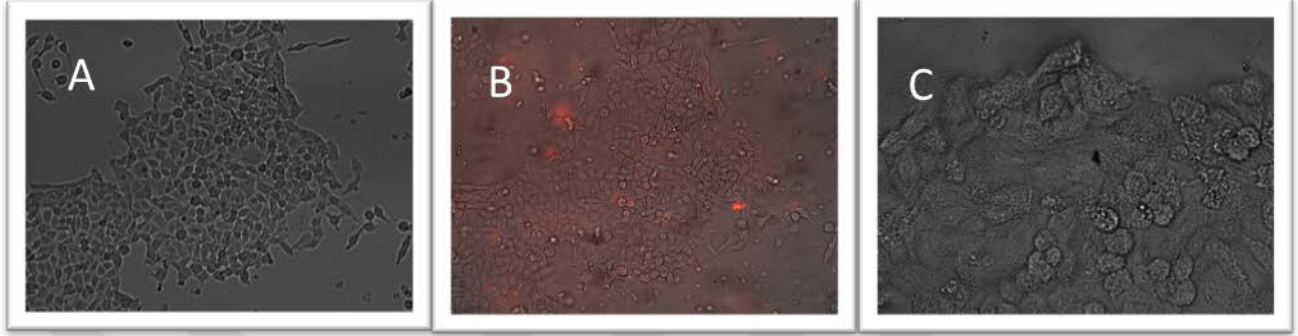


**Şekil 33.** *In Vitro* çalışmalarda kullanılan 2D ve 3D akış düzenek tasarımı (a) Taban akış kanalı ve kapak tasarımı, (b) mikroskop altında görüntüleme düzenegi.



**Şekil 34.** MDAMB-231 2D hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile akış düzeneğinde etkileşimi. A) Akış öncesi. B) Akış esnası. C) Akış sonrası.

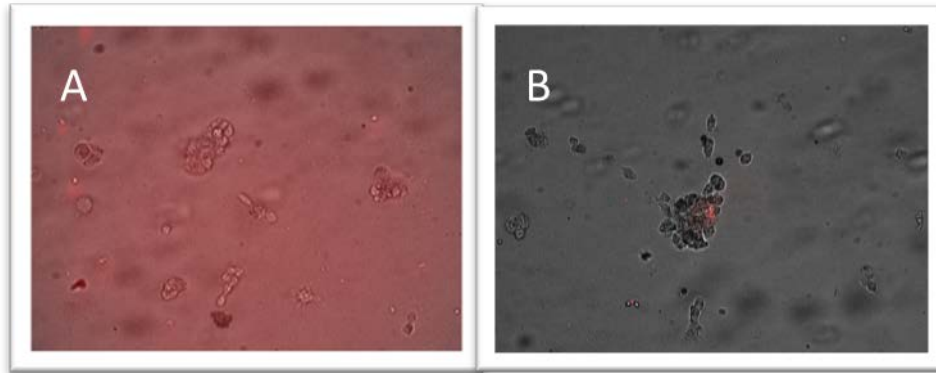
Şekil 34’de görüldüğü gibi mikroköpükçüklerin MDAMB-231 hücrelerine bağlandığı gözlenmiştir.



**Şekil 35.** MCF-7 hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile akış düzeneğinde etkileşimi. A) Akış öncesi. B) Akış esnası. C) Yıkıma sonrası.

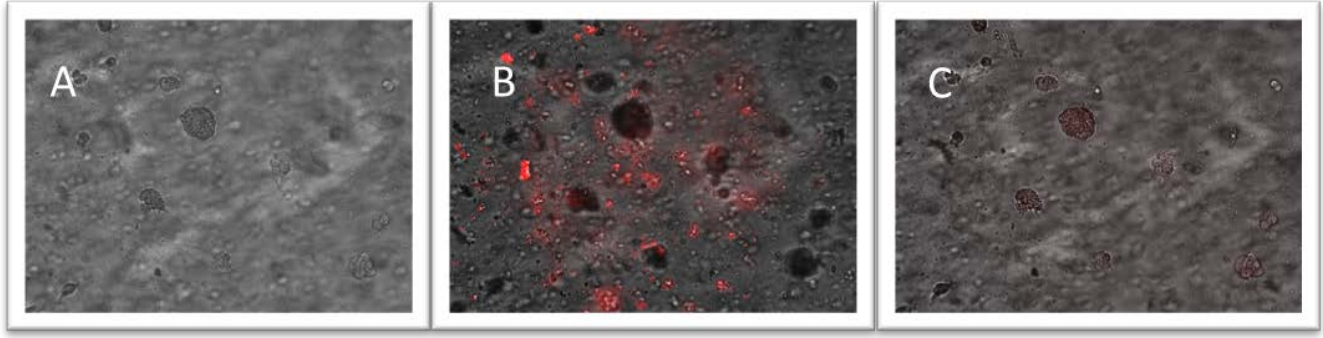
MCF7 2D akış düzeneğinde mikroköpükçüklerin yapışmadığı görülmüştür. Şekil 35’de de görüldüğü gibi hücrelerin üzerinde MB yoktur. Akış esnasında gönderilen free-DOX’ların membranlara absorblandığı fakat DOX yüklü Mikroköpükçüklerin absorblanmadığı görülmüştür.

#### 4.5.2 3D Akış Düzeneği



**Şekil 36.** MDAMB -231 3D hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile akış düzeneğinde etkileşimi.

Şekil 36’da görüldüğü gibi akış jelin altından gidiyor bu yüzden DOX yüklü MB’lar sferoide ulaşamadığı görülmüştür.



**Şekil 37.** MCF7 3D hücrelerinin DOX yüklü Mikroköpükçük (MB) ile akış düzeneginde etkileşimi

3D akış düzeneginde MB'lar büyük olduğu için akış esnasında matrijelin altında kalmaktadır. Sadece free-DOX'un (ortamda çözülmüş olan DOX'un hücrelere bağlandığı görülmüştür). Matrijel üzerinde oluşan sferoidler, matrijelin porları lipozomların ve MB'ların geçişine izin vermemektedir. Bundan dolayı gönderilen DOX yüklü MB'ların porlardan geçemediği için hücrelere attach olmadığı görülmüştür.

Akış deneyinde çalışmamızın amaçlarından biri olan Mikroköpükçüklerin ultrason ile patlatma gerçekleştirilmemiştir Ultrason patlatma için ortama verilen mikroköpükçükler yüzdüğü için ve zemindeki hücrelere temas etmediği için ve bu nedenle bağlanma sağlanamadığı için başarılı olamamıştır.

## 5. TARTIŞMA

2D kültürde MCF7, MDA-MB-231 ve 4T1 hücrelerinde kontrol ve DOX olarak belirlenen gruplarda immünohistokimyasal olarak Ki-67 proliferasyon indeksi ile kaspaz 3, 8 ve 9 değerlendirilmiştir. Buna göre 4T1 fare kökenli progresif üçlü negative meme kanseri hücrelerinde Ki-67 'nin %80 düzeyinde yüksek proliferative aktiflik gösterirken DOX uygulandıktan sonra %27,2 'ye düştüğü görülmektedir. Ki-67 değerlendirme bulguları DOX'un 4T1 hücreleri üzerine 2D kültür koşullarında anti-proliferatif etki gösterdiğini belirtmektedir. Hücrelerin proliferere olmak üzere hücre döngüsüne girişini büyük oranda durdurmuştur. Apoptoz üzerine olan etki değerlendirildiğinde intrinsik apoptoz yolağı belirteci olarak kaspaz 9, ekstrensik yolak belirteci olarak kaspaz 8 ve ortak belirteç olarak kaspaz 3 ekspresyonları 2D kültür sonunda immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

4T1 hücrelerinin 2D kültürü sonucunda kaspaz 3'ün kontrole göre %20 orandaarttığı, kaspaz 8'in %40 oranında, kaspaz 9'un ise %20 oranında protein düzeyinde artış gösterdiği

görülmüştür. Kaspazlar arasında karşılaştırılmalı değerlendirilme yapıldığında en çok kaspaz 8'de artış görülmesi her iki yolak üzerinden apoptozun indüklenmesine karşın ekstrensik yolağın daha fazla aktiflendiğini düşündürmektedir.

MDA-MB-231 hücrelerinde 2D kültür koşullarında DOX 'un kontrole kıyasla Ki-67 proliferasyon indeksini %98'den %13,6'ya indirdiği, kaspaz 3, 8 ve 9'u belirgin olarak arttırdığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında DOX 'un apoptoz ilişkili proteinler olan kaspaz 3, 8 ve 9'u aktive etmesi ve proliferasyon indeksini düşürmesi 4T1 hücrelerine kıyasla daha fazladır. Her iki hücre hattı da üçlü negatif meme kanseri karakteristiğindedir ancak orjinleri farklıdır. İnsan kökenli MDA-MB-231 hücrelerinde DOX 2D kültürde daha etkindir ve apoptoz indükleyici etkisi hem ekstrensik hem de intrinsik yolak üzerindedir.

MCF-7 hücreleri 2D kültür koşulunda değerlendirildiğinde DOX'un proliferasyon indeksinin düşük olduğu dikkat çekmektedir. Kaspaz 3,8 ve 9 protein ekspresyonlarında belirgin artış görülmektedir. Bu artış oranları 4T1 ve MDA-MB-231 hücrelerinden daha az düzeydedir. DOX, 2D MCF7 kültür koşullarında hem ekstrensik hem de intrinsik yolak üzerinden apoptozu uyarmaktadır.

3D kültür sonrasında başarılı şekilde parafin bloklama yapılarak sferoidlerin morfolojileri hematoksilin eosin boyama ile değerlendirilebilmiştir. Elde edilen görüntüler 3D kültürün meme kanseri kültüründe uygun bir modelleme olduğunu göstermiştir. Matrijel, hücre sferoidlerinin etrafından adeta bağ dokusu halinde bir yapı oluşturmuştur. Sferoidlerin merkezlerinde yer yer apoptotik cisimcikler ve duktus yapıları (özellikle MCF-7 hücrelerinde) dikkat çekmektedir. Bu yapılar 3D kültür ile oluşturulan yapıların meme kanseri için uygun olduğunu kanıtlar niteliktedir. Bu sferoidlerin boyut, çap ve sayıları değişkenlik göstermektedir. Kontrol grubunda özellikle duktus yapılarının bulunduğu sferoidlerin daha büyük boyutta olduğu tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin sferoidleri MCF-7'ye göre daha küçük boyutlarda dikkat çekmektedir. 4T1 hücrelerinin sferoidlerinin en başarılı ve yoğun olarak oluşmuş daha belirgin ve çok sayıda durumdadır. Bunlarda da oluşan duktus yapıları sferoidlerin merkezlerinde yer almaktadır.

Kontroller ile DOX uygulanmış karşılaştırıldığında tüm hücrelerde sferoidlerin çaplarının belirgin oranda düşük olduğu, nekroz ve apoptozun sferoidlerin içindeki hücrelerde görülmüştür. MCF-7'de sferoidler daha küçük olmakla beraber hala korunmuş durumdadır. Apoptoz oranının diğer hücrelere göre daha düşük olması bulgusu ile bu durum uyumludur.

MDA-MB-231 DOX uygulanmış sferoidlerin çok az sayıda olduğu ve bu hücrelerin tamamen apoptotik morfoloji gösterdiği dikkat çekmektedir. MDA-MB-231 hücrelerindeki DOX sonrası proliferasyon indeksindeki azalma ve apoptoz ilişkili proteinlerdeki artma 3D sferoidlerdeki bu morfolojiyi desteklemektedir. 4T1 hücrelerinde ise DOX sonrasındaki sferoidlerin sayısı diğer iki hücre hattına kıyasla daha fazla olmakla birlikte çapları azalmıştır. Her bir sferoidi oluşturan hücre sayısı da azalmıştır ancak canlı hücre oranının diğer hücrelerin 3D sferoidlerine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. DOX uygulanmış 4T1 hücrelerinin 3D modelinde duktus yapılarının da bozulduğu ve azaldığı görülmüştür. Her üç hücre hattı için 3D modelleme sonucunda proliferasyon indeksi yüksek saptanmıştır. Ancak 2D kültüre göre 3D modelde proliferasyon indeksinin saptanmasının daha güç olduğu sonucuna varılmıştır.

3D hücre kültürü sonrası parafin bloklardan alınan kesitlerde immünohistokimyasal olarak Ki-67, Kaspaz 3, 8 ve 9 değerlendirilmiştir. 4T1 hücre hattında 3D sferoid modelde, DOX Ki-67 proliferasyon indeksini % 40 azaltmıştır, ancak kaspaz 3, 8 ve 9 ekspresyonlarının yüksek olmasına rağmen kontrol grubunda da ekspresyonları yüksek saptanmıştır. 3D modellerde kontrol grubunda da görülen yüksek kaspaz 3, 8 ve 9 ekspresyonu; hücre kültüründe matrijel gibi az desteği olan ve vaskülerizasyona gidemeyen sferoidlerde belli bir süre sonra hücre ölümünün indüklenmiş olabileceği şeklinde açıklanabilmektedir. Bununla beraber teknik bir hatadan kaynaklanabilirliği sorgulandığında sferoidler içinde kaspazlar açısından negative hücrelerin de tespit edilmesi immünohistokimyasal boyamada bir sorun olmadığı işaret etmektedir. DOX sonrası meydana gelen apoptoz mekanizması açısından kaspaz 3 ortak yolak, kaspaz 8 ekstrensik yolak ve kaspaz 9 intrinsik yolak her üç hücre hattı için 2D’de olduğu gibi 3D modelde de aktif saptanmıştır. Ancak bu modelde 3D modelin kontrol grupları, 2D kontrol gruplarına göre daha yüksek düzeyde kaspaz 3, 8 ve 9 ekspresyon paterni göstermektedir. MCF7 hücrelerinin 3D sferoidlerinde DOX sonrasında kontrole kıyasla %15 oranında kaspaz 3, 8 ve 9 aktivasyonlarında artış saptanmıştır. Bununla beraber proliferasyon indeksi açısından %20 azalma görülmüştür. MDA-MB-231 hücrelerinin 3D sferoidlerinde DOX sonrası proliferasyon indeksinin, 2D’de olduğundan daha az düzeyde azaldığı dikkat çekmiştir. 3D modelde her üç hücre hattında proliferasyon indeksinin DOX sonrası azaldığı görülmekle birlikte bu azalmanın 2D modeldeki azalmaya oranla daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Bu durum 3D modellemede DOX ‘un hücre içine difüzyonunda bir azalma meydana geldiğini düşündürmüştür ve 3D hücre kültürünün ilaç etkinliği çalışmaları için ne kadar önemli olduğunu desteklemiştir. Sferoid yapılar oluştuğunda DOX ‘un *in vivoda* olduğu gibi hücrelerin tümüne

difüzyonu güçleşmektedir. Bu durum *in vivo* koşullarda tekrarlayan dozların belirli aralıklarla verilmesinin nedenlerinden biri olabilir. Her üç hücre hattında hem 2D hem de 3D modellerde DOX 'un anti-proliferatif ve apoptoz indükleyici etkisi görülmüş ancak hücre hatları arasında bu etkinin düzeyi farklılık göstermektedir. Bu durum aynı kanser tanılı farklı bireylerin farklı tedavi yanıtları göstermesini, dolayısıyla bireye özgü tedavi yaklaşımlarının önemini pre-klinik yansıtmaktadır. 3D modelde apoptoz sayılarının saptanması için TUNEL ile boyama yapılmıştır. Buna göre 4T1 hücrelerinin 3D modellenmesi sonucunda apoptoz değeri kontrol grubunda % 3 iken DOX uygulanan hücrelerde %35 oranında saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinin 3D modellemesi sonucunda da benzer bulgular saptanmış ve 4T1'e kıyasla daha az düzeyde olmakla birlikte DOX sonrası apoptoz artmıştır (kontrol %5, DOX sonrası %25). MDA-MB-231 hücreleri 3D modellemesinde de DOX sonrası apoptoz artarak %24 düzeyinde görülmektedir. DOX 'un bu apoptoz indükleyici etkisinin hem ekstrensik hem de intrinsik yoldan üzerinden gerçekleştiği kaspaz sonuçları ile anlaşılmıştır. Bununla beraber morfolojik değerlendirmelerde nekroz yaptığı da dikkat çekmektedir. 3D ve 2D modellerin bulguları birbiriyle karşılaştırıldığında proliferasyon indeksleri ve kaspaz düzeyleri açısından da farklılıklar görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Üç farklı meme kanseri hücre hattında yapılan *in vitro* 2D ve 3D modellemeler ile DOX etkisinin değerlendirildiği bu çalışmada DOX 'un kültür modeline göre etki düzeyinin farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu değerlendirme hücre kültürü çalışmalarında 3D modellemenin gerekliliğine ilişkin literature katkıda bulunmaktadır. Çalışma bulgularımız apoptoz ve nekroz açısından sferoid modellerde de değerlendirme yapılabileceği kanıtlanmıştır. 3D modellerdeki sferoidlerin proliferasyon açısından değerlendirilmesi WST-1 gibi absorban temelli analizlerle yapılması oldukça güçtür. Bu nedenle 3D hücre kültürü sferoid modellerinde canlılık testi için tripan mavisi boyanması çalışmamız sonucunda daha etkin ve güvenilir bulunarak önerilmektedir. DOX renkli bir madde olduğu için WST-1 ile absorban temelli ölçümlerde sorun yaratabilmektedir. Bir sonraki çalışmamızda fare modelinde DOX'un mikroköpükçük içinde uygulanması ve EGFR reseptörüne bağlanarak hedefe ulaştığında ultrasonik olarak patlatılması ile etkisinin değerlendirilmesi planlanmaktadır. Hedeflenen bu değerlendirmenin *in vitro* olarak ön çalışması yapıldığında mikroköpükçüklerin yüzmesi ve akış halinde stabil kalmaması nedeniyle değerlendirme yapılamamıştır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Tekin E. Meme Anatomisi. İnternet adresi:  
<http://www.ercumenttekin.com/tr/icerik/53/meme-anatomisi>. Erişim tarihi: 10.02.2019
2. Mahvi DA, Liu R, Grinstaff MW, Colson YL, Raut CP. Local Cancer Recurrence: The Realities, Challenges, and Opportunities for New Therapies. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):488-505.
3. Narod SA. Personalised medicine and population health: breast and ovarian cancer. *Hum. Genet*. 2018;137(10):769-778.
4. Cain EH, Saha A, Harowicz MR, Marks JR, Marcom PK, Mazurowski MA. Multivariate machine learning models for prediction of pathologic response to neoadjuvant therapy in breast cancer using MRI features: a study using an independent validation set. *Breast Cancer Res. Treat*. 2018
5. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US); Bethesda (MD):2018. Breast Cancer Screening (PDQ®): Health Professional Version.
6. Doren A, Vecchiola A, Aguirre B, Villaseca P. Gynecological-endocrinological aspects in women carriers of BRCA1/2 gene mutations. *Climacteric*. 2018;1-7.
7. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387-1397. Published 2017 Nov 1. doi:10.7150/ijbs.21635
8. Parada H, Sun X, Tse CK, Olshan AF, Troester MA. Lifestyle Patterns and Survival Following Breast Cancer in the Carolina Breast Cancer Study. *Epidemiology*. 2019;30(1):83-92.
9. White AJ, Bradshaw PT, Hamra GB. Air pollution and Breast Cancer: A Review. *Curr Epidemiol Rep*. 2018;5(2):92-100.
10. Guçalp A, Traina TA, Eisner JR, Parker JS, Selitsky SR, Park BH, Elias AD, Baskin-Bey ES, Cardoso F. Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat*. 2018;16
11. Howell A, Evans GD. Hormone replacement therapy and breast cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2011;188:115-24. doi: 10.1007/978-3-642-10858-7\_10.
12. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(S3):43-6.

13. McGuire A, Brown JA, Malone C, McLaughlin R, Kerin MJ. Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2015;7(2):908-29. doi:10.3390/cancers7020815
14. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. İnternet: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf> Erişim tarihi: 16.02.2019
15. World Health Organization. Cancer country profiles. 2014.
16. Maffini MV, Soto AM, Calabro JM. et al. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci*. 2004;117:1495–1502.
17. Sonnenschein C, Soto AM. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2016;122:70–76.
18. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141:39–51.
19. Dumars C, Ngyuen JM, Gaultier A. et al. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget*. 2016;7:78343–78354.
20. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007;117:3155–3163.
21. Basse C, Arock M. The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *Int J Cancer*. 2015;137:2785–2794.
22. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:545–554.
23. Smalley M, Piggott L, Clarkson R. Breast cancer stem cells: obstacles to therapy. *Cancer Lett*. 2013;338:57–62.
24. Zhang M, Lee AV, Rosen JM. The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2017;7:a027128.
25. Sgroi DC. Preinvasive breast cancer. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:193–221.
26. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23-31. Published 2015 Dec 21. doi:10.4137/CPath.S31563

27. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955-60.
28. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch*. 2018 May;472(5):697-703. doi: 10.1007/s00428-018-2301-9. Epub 2018.
29. Rocque GB, Williams CP, Kenzik KM, Jackson BE, Azuero A, Halilova KI, Ingram SA, Pisu M, Forero A, Bhatia S. Concordance with NCCN treatment guidelines: Relations with health care utilization, cost, and mortality in breast cancer patients with secondary metastasis. *Cancer*. 2018;124(21):4231-4240.
30. Vande Perre P, Toledano D, Corsini C, Escriba E, Laporte M, Bertet H, Yaury K, Toledano A, Galibert V, Baudry K, Clotet L, Million E, Picot MC, Geneviève D, Pujol P. Role of the general practitioner in the care of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: General practitioner and patient perspectives. *Mol Genet Genomic Med*. 2018.
31. Seroussi B, Lamy JB, Muro N, Larburu N, Sekar BD, Guézennec G, Bouaud J. Implementing Guideline-Based, Experience-Based, and Case-Based Approaches to Enrich Decision Support for the Management of Breast Cancer Patients in the DESIREE Project. *Stud Health Technol Inform*. 2018;255:190-194.
32. Wang X, Xu L, Yin Z, Wang D, Wang Q, Xu K, Zhao J, Zhao L, Yuan Z, Wang P. Locoregional recurrence-associated factors and risk-adapted postmastectomy radiotherapy for breast cancer staged in cT1-2N0-1 after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Manag Res*. 2018;10:4105-4112.
33. Tang L, Matsushita H, Jingu K. Controversial issues in radiotherapy after breast-conserving surgery for early breast cancer in older patients: a systematic review. *J. Radiat. Res*. 2018;59(6):789-793.
34. Wu YT, Xu Z, Zhang K, Wu JS, Li X, Arshad B, Li YC, Wang ZL, Li HY, Wu KN, Kong LQ. Efficacy and cardiac safety of the concurrent use of trastuzumab and anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:1789-1797.
35. Dieci MV, Vernaci G, Guarneri V. Escalation and de-escalation in HER2 positive early breast cancer. *Curr Opin Oncol*. 2019 Jan;31(1):35-42.
36. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(4):853-8. doi: 10.4103/0973-1482.139267.

37. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=31703, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31703> (Erişim tarihi: 22.02.2019).
38. Denard B, Lee C, Ye J. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *Elife*. 2012;1:e00090. Published 2012. doi:10.7554/eLife.00090
39. Patel AG, Kaufmann SH. How does doxorubicin work?. *Elife*. 2012;1:e00387. Published 2012. doi:10.7554/eLife.00387
40. Moreira A, Lobato R, Morais J, Silva S, Ribeiro J, Figueira A, Vale D, Sousa C, Araújo F, Fernandes A, Oliveira J, Passos-Coelho JL. Influence of the interval between the administration of doxorubicin and paclitaxel on the pharmacokinetics of these drugs in patients with locally advanced breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001;48(4):333-7.
41. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(7):440-6.
42. Hanna AD, Lam A, Tham S, Dulhunty AF, Beard NA. Adverse effects of doxorubicin and its metabolic product on cardiac RyR2 and SERCA2A. *Mol Pharmacol*. 2014;86(4):438-49.
43. Engelberth SA, Hempel N, Bergkvist M. Development of Nanoscale Approaches for Ovarian Cancer Therapeutics and Diagnostics. *Critical reviews in oncogenesis* 2014;19(3-4):281-315
44. European Medicines Agency. Summary of product characteristics: Caelyx (doxorubicin hydrochloride in a pegylated liposomal formulation) 2mg/ml concentrate for infusion [online]. Available from URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000089/WC500020180.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000089/WC500020180.pdf) (Erişim: 23.02.2019)
45. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56(2): 185–229
46. Alza Corporation. Doxil® (doxorubicin HCl liposome injection) for intravenous infusion: US prescribing information [online]. Available from URL: <http://www.doxiline.com> (Erişim: 23.02.2019).

47. Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, et al. Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies. *Semin Oncol* 2004; 31 (6 Suppl. 13): 16–35
48. Bladé J, Sonneveld P, San Miguel JF, Sutherland HJ, Hajek R, Nagler A, Spencer A, Robak T, Lantz KC, Zhuang SH, Harousseau JL, Orlowski RZ; DOXIL-MMY-3001 Study Investigators. Efficacy and safety of pegylated liposomal Doxorubicin in combination with bortezomib for multiple myeloma: effects of adverse prognostic factors on outcome. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(1):44-9. doi: 10.3816/CLML.2011.n.005.
49. Voorhees PM, Orlowski RZ. Emerging data on the use of anthracyclines in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007; 7 Suppl. 4: S156–162
50. Small GW, Somasundaram S, Moore DT, et al. Repression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 by anthracyclines contributes to their antiapoptotic activation of p44/42-MAPK. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307(3): 861–9
51. Small GW, Shi YY, Edmund NA, et al. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol* 2004; 66(6): 1478–90
52. Martin-Carbonero L, Barrios A, Saballs P, et al. Pegylated liposomal doxorubicin plus highly active antiretroviral therapy versus highly active antiretroviral therapy alone in HIV patients with Kaposi's sarcoma. *AIDS* 2004; 18(12): 1737–40
53. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2011;4:36. doi: 10.1186/1756-8722-4-36.
54. Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *J Hematol Oncol*. 2011;4:13. doi: 10.1186/1756-8722-4-13.
55. Harris L, Batist G, Belt R, Rovira D, Navari R, Azarnia N, Welles L, Winer E, Group TDS. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2002;94(1):25–36. doi: 10.1002/cncr.10201
56. Safra T. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Oncologist*. 2003;8(Suppl 2):17–24.

57. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological reports: PR.* 2009;61(1):154–171.
58. O'Shaughnessy J. Liposomal anthracyclines for breast cancer: overview. *Oncologist.* 2003;8(Suppl 2):1–2.
59. Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Gutheil J, Guthrie T, Shah P, Khojasteh A, Nair MK, Hoelzer K. et al. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2001;19(5):1444–1454
60. Rivera E. Liposomal anthracyclines in metastatic breast cancer: clinical update. *Oncologist.* 2003;8(Suppl 2):3–9.
61. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, Wei G, Lamba G, Liu D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp Hematol Oncol.* 2012;1(1):10. Published 2012 Apr 23. doi:10.1186/2162-3619-1-10

## 8. EKLER

### EK-1: Etik Kurul Raporu

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

|                     |                                                                          |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| ETİK KOMİSYONUN ADI | DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ<br>GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU |
| AÇIK ADRES          | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR  |
| TELEFON             | 0 232 412 22 54-0 232 412 22 58                                          |
| FAKS                | 0 232 412 22 43                                                          |
| E-POSTA             | etikkurul@deu.edu.tr                                                     |

|                   |                                                         |                                                                                                                                                           |
|-------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | DOSYA NO:                                               | 3647-GOA                                                                                                                                                  |
|                   | ARAŞTIRMA                                               | UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/><br>YÜKSEKLİSANS <input type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/> |
|                   | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                   | Doktorubisin Yüklü Mikroköpküklerin Meme Kanserine Etkisinin İn-Vitro İki Boyutlu (2D) ve Üç Boyutlu (3D) Değerlendirilmesi                               |
|                   | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                                 |                                                                                                                                                           |
|                   | SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI | Prof.Dr.Safiye AKTAŞ<br>Onkoloji Enstitüsü                                                                                                                |
|                   | DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ                             | -                                                                                                                                                         |
|                   | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ              | -                                                                                                                                                         |
|                   | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                           | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>                                                                      |

|                          |                                     |        |                   |                                                                                                              |
|--------------------------|-------------------------------------|--------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER | Belge Adı                           | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili                                                                                                         |
|                          | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 | Mevcut |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR      | Mevcut |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input checked="" type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | Mevcut |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                          | OLGU RAPOR FORMU                    | Mevcut |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| KARAR BİLGİLERİ             | Karar No:2017/26-22                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Tarih:09.11.2017 |
|                             | Prof.Dr.Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu "Doksorubisin Yüklü Mikroköpküklerin Meme Kanserine Etkisinin İn-Vitro İki Boyutlu (2D) ve Üç Boyutlu (3D) Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. |                  |
| <b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |
| ÇALIŞMA ESASI               | Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                  |
| <b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |

| Unvanı/Adı/Soyadı                         | Uzmanlık Alanı                                       | Kurumu                                                             | Cinsi yet | Araştırma ile ilişkili mi? |                                       | İmza       |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------|---------------------------------------|------------|
| Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)             | Tıbbi Biyokimya                                      | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı) | Halk Sağlığı                                         | DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.                                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Prof.Dr.Nejat SARIOŞMANOĞLU               | Kalp Damar Cerrahisi                                 | DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Prof.Dr.Sevinç ERASLAN                    | Endokrinoloji                                        | DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK                | Tıbbi Mikrobiyoloji                                  | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılamadı |
| Prof.Dr.Müge KIRAY                        | Fizyoloji                                            | DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı                          | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER                 | Anesteziyoloji                                       | DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.               | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılamadı |
| Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU                    | Patoloji                                             | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.                              | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Prof.Dr.Bilge KARA                        | Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon                       | DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ                     | Tıbbi Biyoloji ve Genetik                            | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.                   | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılamadı |
| Prof.Dr.Ayhan ABACI                       | Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları | DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı      | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Doç.Dr.M.Aylin ARICI                      | Tıbbi Farmakoloji                                    | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı                  | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Doç.Dr.Murat BEKTAŞ                       | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği            | DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN                   | Hukuk                                                | DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.                                        | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |
| Mehmet Erhan ÖZKUL                        | Sağlık mensubu olmayan üye                           | D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler                               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |            |



## MELEK AYDIN

### Kişisel Bilgiler

#### İletişim Bilgileri

|                 |                                                                                                                                     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kimlik Numarası | 51619127664                                                                                                                         |
| Doğum Tarihi    | 20/05/1993                                                                                                                          |
| İletişim Adresi | Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Kat:3<br>Korutük Mah.üzgar Sok.no:24 Daire:3 Balçova/izmir |
| Telefon         | (537) 295 90 87                                                                                                                     |
| E-posta         | melekaydin.ege@gmail.com                                                                                                            |
| Web Adresi      |                                                                                                                                     |

#### Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2016 - Şu Anda (2 yıl 9 ay)  
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (YL)  
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.61 / 4.0

20 Temmuz 2012 - 20 Temmuz 2016 (4 yıl 1 ay)  
DİĞER (Ege Üniversitesi), TÜRKİYE  
DİĞER, DİĞER

### Ar-Ge Yetkinlik

#### Bildiriler

M. AYDIN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, E. GENÇKURT, Y. KAFALI, S. HİDİR & S. AKTAŞ,  
Withafenn-a: A Candidate Anti-tumour Natural Compound For Non-small Cell  
Lung Cancer And Stem Cells, Poster Sunumu, Eacr, 29 Haziran 2018, 31 Mayıs  
2019.

Ö. BEKİOĞLU, S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, H. E. KOLATAN, A. P.  
E. ÖZDEMİR, A. İ. KILIÇ, H. HAVİTÇIOĞLU, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Examining  
Microenvironment In Osteosarcoma: Bone Graft Material Cement Does Not  
Interfere With Chemo And Immunotherapy In Osteosarcoma, Sözlü Sunum, 7.  
Multidisipliner Kanser Araştırm& 1. Temel Onkoloji Kongresi, 11 Ekim 2018, 14  
Ekim 2018.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. BEKÇİOĞLU, H. E. KOLATAN, Ö. GÖKBAYRAK, A. EROL, O. YILMAZ, Z. ALTUN & S. AKTAŞ, Ksenograft Farede Kansere Modellemesinin Optimizasyonu, Sözlü Sunum, 7. Multidisipliner Kansere Araştırma & 1. Temel Onkoloji Kongresi, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

T. AKTAŞ, E. SERİNAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. GÖKBAYRAK, A. EROL, S. AKTAŞ, Z. ALTUN & H. N. OLGUN, Molecular Heterogeneity In Neuroblastoma (on Behalf Of Turkish Paediatric Oncology Group), Poster Sunumu, Siop, 29 Haziran 2018, 30 Haziran 2018.

S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. BEKÇİOĞLU, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Nöroblastom Deney Hayvanı Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Ve Sisplatin Etkileşiminin Değerlendirilmesi, Sözlü Sunum, 1. Temel Onkoloji Sempozyumu, 09 Mayıs 2018, 11 Mayıs 2018.

S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, E. SERİNAN, M. AYDIN, Z. ALTUN & H. N. OLGUN, The Relation Of Microenvironment Associated Gene Expression With Risk Classification In Neuroblastoma, Poster Sunumu, 49th Congress Of The International Society Of Paediatric Oncology (siop), 12 Ekim 2017, 15 Ekim 2017.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, Y. OLGUN, S. AKTAŞ, M. AYDIN, H. EVİN, Z. ALTUN, G. KIRKIM, E. GÜNERİ & H. N. OLGUN, Effect Of Mesenchymal Stem Cells On Cochlear Cell Viability After Cisplatin Induced Ototoxicity, Sözlü Sunum, 11th Asia Pacific Symposium On Cochlear Implants And Related Sciences, 08 Eylül 2017, 12 Eylül 2017.

M. AYDIN, Y. OLGUN, Z. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Is Oleuropein Protective For Cisplatin Induced Ototoxicity In Hec-oc1 Cells?, Poster Sunumu, 11th Asia Pacific Symposium On Cochlear Implants And Related Sciences, 08 Eylül 2017, 12 Eylül 2017.

E. Ö. SERİNAN, M. BARIŞ, G. KÜRKÇÜ, M. ÇALIŞIR, M. AYDIN, C. ÖNERCAN, S. AKTAŞ, Z. ALTUN, S. KILIÇ ÖZDEMİR, O. YILMAZ & E. ÖZDEMİR, The Effect Of Doxorubicine Loaded Microbubbles On Breast Cancer In In-vivo Experimental Animal Model, Poster Sunumu, Vi. International Congress Of Molecular Medicine, 22 Mayıs 2017, 25 Mayıs 2017.

E. Ö. SERİNAN, M. BARIŞ, G. KÜRKÇÜ, M. ÇALIŞIR, M. AYDIN, C. ÖNERCAN, S. AKTAŞ, Z. ALTUN, S. KILIÇ ÖZDEMİR, O. YILMAZ & E. ÖZDEMİR, Dokсорubisin Yüklendiği Mikropüsküklerin In-vivo Deney Hayvanı Modelinde Meme Kanseri Üzerine Etkisi, Sözlü Sunum, 22. Ulusal Kansere Kongresi, 19 Nisan 2017, 23 Nisan 2017.

S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, E. SERİNAN, M. AYDIN, Z. ALTUN & H. N. OLGUN, Nöroblastomda Mikroçevre İlişkili Genlerin Ekspresyonunun Risk Sınıflaması İle İlişkisi, Poster Sunumu, 22. Ulusal Kansere Kongresi, 19 Nisan 2017, 23 Nisan 2017.

N. D. DEMİRKIRAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, E. SERİNAN, H. HAVİTÇİOĞLU & S. AKTAŞ, Osteosarkomda Kadmıyımın Sement İçerisinde In-vitro Uygulanabilirliği, Poster Sunumu, 22. Ulusal Kansere Kongresi, 19 Nisan 2017, 23 Nisan 2017.

M. AYDIN, B. ŞENTÜRK, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, E. SERİNAN, F. ÇAĞLAR, A. B. DEMİR & S. AKTAŞ, Prostat Kansere Hücreleri Ve Kök Hücrelerinde Taksanların Etkisi, Sözlü Sunum, 1. Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi-kansere Multidisipliner Yaklaşım, 15 Mayıs 2015, 17 Mayıs 2015.

#### Patentler

Skafold Yapıda 3d Kemik Tümör Ve Metastaz Modeli, Onkoloji, Patent Başvurusu, Ulusal, Başvuru No: 2019.0188F, 25 Şubat 2019

#### TÜBİTAK Burs ve Destekleri

##### Proje Bilgileri

2155048, Üçlü Negatif Meme Kanseri Deney Hayvanı Modelinde Tacrolimus Etkisi, 1002 - Hızlı Destek, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Kabulma/Aynılma Tarihleri: 01.09.2016 - 01.01.2017, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.01.2016 - 01.01.2017.  
213M668, Hedeflendirilmiş Ultrason Kontrast Ajansı Mikroköpükçükler İle İlaç Taşınımı Ve Kontrollü Lokal İlaç Salınımı İle Kansere Tedavisinde Kullanılması, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, MAG - Mühendislik Araştırma Destek Grubu, Projeye Kabulma/Aynılma Tarihleri: 01.01.2017 - 15.08.2017, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.08.2014 - 15.08.2017.

##### Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

|                                    |               |          |          |
|------------------------------------|---------------|----------|----------|
| Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |
| İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı     | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |
| Raportörlük Sayısı                 | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |

