



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SIÇAN BEYİN TÜMÖRÜ MODELİNDE
POLİLAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT (PLGA)
NANOPARTİKÜLÜNE YÜKLÜ CURCUMİNİN ETKİSİNİN
İZLENMESİ**

DR. MERDAN ORUNOĞLU

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2014



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SIÇAN BEYİN TÜMÖRÜ MODELİNDE
POLİLAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT (PLGA)
NANOPARTİKÜLÜNE YÜKLÜ CURCUMİNİN ETKİSİNİN
İZLENMESİ**

DR. MERDAN ORUNOĞLU

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. MELİKE MUT**

ANKARA

2014

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında gerekli ortamı sağlayan başta tez danışmanlığımı üstlenen **Sayın Doç.Dr. Melike Mut Aşkun'a** çok teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Başkanı **Sayın Prof.Dr. Servet İnci'ye** beyin cerrah olarak yetişmemde ve eğitimimde değerli zamanını harcayarak destek olmasından dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca asistanlık eğitimim süresince değerli vakitleri esirgemeyen **Sayın Prof.Dr. Mustafa Berker'e**, **Sayın Doç.Dr. Atilla Akbay'a**, **Sayın Doç.Dr. Gökhan Bozkurt'a**, **Sayın Dr.Halil Kamil Öge'e**, **Sayın Doç.Dr. Burçak Bilginer'e**, **Sayın Prof.Dr. Tunç Alp Özgen'e**, **Sayın Prof. Dr. Osman Ekin Özcan'a**, **Sayın Prof. Dr. Nejat Akalan'a**, **Sayın Prof.Dr. Hakan Oruçkaptan'a**, **Sayın Prof.Dr. Selçuk Palaoğlu'a**, **Sayın Uzm. Dr.İlkay Işıkkay'a** eğitimini almaktan ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk ve onur duydum. Magnetik rezonans görüntüleme de emeğini esirgemeyen **Sayın Prof.Dr. Kader Karlı Oğuz**, preparatların hazırlanması ve bakımında canla başla çalışan **Sayın Prof.Dr. Figen Söylemezoğlu**, **Sayın Dr.Ece Özoğlu'a**, tümör hücrelerini hazırlayan ve deneyin her aşamasında yardımcı olan **Sayın Dr.Sevda Lüle'ye**, Curcumin temininde ve nanopartiküle yüklenmesinde değerli vakitlerini harcayan **Sayın Semra Çalış**, **Sayın. Doç.Dr. Sibel Pehlivan** ve **Sayın Dr. Abbas Kaffashi'ye**, **Dr.Şahin Hanalioğlu'na** tez düzenleme aşamasında yardımları için çok teşekkür ederim. Tez süresince desteklerini esirgemeyen tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve yoğun bakım, bölüm 51, bölüm 61 hemşirelerine ve tüm çalışanlarına çok teşekkür ederim. Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Ailesi'ne teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeye ve değerli zamanlarını bana ayıran **Hüseyin Hazara'a** çok teşekkür ederim. Hayatımda önemli yerleri olan eşim **Pınar Orunoğlu'na** ve **oğlum Emirhan'a** asistanlık eğitimim sürecince verdikleri destek ve sabırlarından dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç

Orunoğlu. M.Deneysel sıçan beyin tümörü modelinde PLGA nanopartikülüne yüklü curcuminin etkisinin izlenmesi. Hacettepe Üniversite Tıp Fakültesi. Nöroşirurji ABD. Uzmanlık tezi. Ankara 2014. Glioblastoma multiforme (GBM) en malign tümörlerden biridir. Radikal cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ile ortalama sağkalım 12-14 aydır. Glioblastomanın infiltratif ve invaziv özelliğinden dolayı beyine yayılabilmektedir. Glioblastomanın tedavisinde en önemli sınırlayıcı faktör kan beyin bariyeridir(KBB); bu bariyer kemoterapötik ajanların tümör hücrelerine ulaşmasına engel olmaktadır ve kemoterapötik ilaçların istenmeyen yan etkileri olmaksızın terapötik dozlarda tümöre ulaşmaktadır. Bunu aşmak için lipit kaplı nanoparçacıkların ilaç taşıyıcılar olarak kullanılmasıyla daha az sistemik yan etki görülmekte ve tümör dokusunda daha yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşmakta ve tedavi etkinliği belirgin ölçüde arttırılmaktadır. Yapılan bu çalışmada zerdeçal bitkisinde bulunan “curcumin” adlı antitümöral etken madde polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülüne yüklenmiştir ve sıçan RG2 glioma modelinde tümöre karşı etkinliği test edilmiştir. Çalışmada kontrol, intravenöz (İV) ve intratümöral (İT) curcumin, İV ve İT boş nanopartikül, İV ve İT curcumin yüklü nanopartikül grupları oluşturulmuştur. Tümör oluşumu manyetik rezonans (MR) görüntüleme ile teyit edilmiş, tedavi uygulaması sırasında ve uygulamadan 5 gün sonra MR boyutları ölçülerek kıyaslanmıştır. Kontrol grubunda tümör boyutlarının belirgin olarak arttığı izlenmiştir ($33.9 \pm 21.3 \text{ mm}^3$ - $123.7 \pm 41.1 \text{ mm}^3$; $p=0.036$). Buna karşılık tümörde en belirgin küçülme İT uygulanan curcumin yüklü nanoparça grubunda gözlenmiştir ($66.6 \pm 44.6 \text{ mm}^3$ - $34.9 \pm 21.7 \text{ mm}^3$; $p=0.028$). İT curcumin yüklü nanoparça grubunda ise tümör boyutlarındaki küçülme istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($20.9 \pm 13.2 \text{ mm}^3$ - $9.0 \pm 6.8 \text{ mm}^3$; $p=0.249$), kontrol grubuyla kıyaslandığında tümör boyutlarındaki bu değişim anlamlı bulunmuştur ($p=0.036$). İV curcumin uygulaması ile de tümör boyutlarındaki büyüme bir ölçüde sınırlandırılabilmesiyle birlikte küçülme sağlanamamıştır ($17.7 \pm 21.2 \text{ mm}^3$ - $18.7 \pm 18.9 \text{ mm}^3$; $p=0.528$).

Yapılan deney çalışmasında PLGA nanopartikülüne yüklenmiş curcuminin özellikle intraserebral uygulamalarda intravenöz uygulamaya göre tümör boyutlarını küçülttüğü hem MRG ile hem de histopatolojik olarak görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma multiforme, polilaktik – ko- glikolik asit nanopartikülü, Curcumin, RG2 rat gliomu, in vivo çalışma

ABSTRACT

Orunoğlu. M, MD. Monitoring the effects of curcumin loaded PLGA nanoparticles in the experimental rat model of brain tumor. Hacettepe University Faculty of Medicine. Department of Neurosurgery. Ankara 2014.

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most malignant brain tumors. With radical surgery, radiotherapy and chemotherapy median survival is 12-14 months. Due to the infiltrative and invasive nature of glioblastoma may spread to the entire brain. The most important limiting factor in the treatment of glioblastoma is blood brain barrier (BBB). This barrier prevents chemotherapeutic agents reach into the tumor cells and without the adverse side effects of chemotherapeutic drugs at therapeutic doses do not have access to the tumor. To overcome this, the lipid-coated nanoparticles is observed using as few systemic side effects and drug delivery to achieve higher drug concentration in the tumor tissue and the treatment efficiency is significantly increased. Plants in this study performed in turmeric "curcumin" has anti tumor active ingredient polylactic-co-glycolic acid (PLGA) was charged to the nanoparticles and the antitumor activity was tested in the rat RG2 glioma model. In this study, control, intravenous (IV) and intratumoral (IT) empty nanoparticles and IV and IT groups curcumin loaded nanoparticles were formed. Tumor formation was confirmed by magnetic resonance imaging, during treatment and 5 days after administration was compared by measuring the dimensions of the MRI. In the control group, tumor size was increased significantly over time ($33.9 \pm 21.3 \text{ mm}^3$ - $123.7 \pm 41.1 \text{ mm}^3$; $p=0.036$). The most pronounced tumor shrinkage was observed in the IT administered curcumin-loaded nanoparticle group ($66.6 \pm 44.6 \text{ mm}^3$ - $34.9 \pm 21.7 \text{ mm}^3$; $p=0.028$). Although the reduction of tumor size in the IT curcumin-loaded nanoparticle group was not statistically significant ($20.9 \pm 13.2 \text{ mm}^3$ - $9.0 \pm 6.8 \text{ mm}^3$; $p=0.249$), this change in tumor size was significant when compared to the control group ($p=0.036$). IV curcumin was also effective in limiting the tumor growth to some extent, but, tumor shrinkage was not achieved with this treatment ($17.7 \pm 21.2 \text{ mm}^3$ - $18.7 \pm 18.9 \text{ mm}^3$; $p=0.528$).

The experiments in the study showed that curcumin-loaded PLGA nanoparticles, especially when administered via intracerebral route, reduce tumor size as demonstrated by both MRI and histopathologic investigation.

Keywords: Glioblastoma multiforme, polylactic-co-glycolic acid nanoparticles (PLGA), Curcumin, RG2 rat glioma, in vivo study

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| TABLolar DİZİNİ | viii |
| RESİMLER DİZİNİ | viii |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.2 Beyin Tümörleri | 2 |
| 1.3. Beyin Tümörleri Tarihçesi | 3 |
| 1.4. Beyin Tümörlerin Sınıflaması | 3 |
| 1.5. Glioblastoma | 5 |
| 1.5. Yayılım ve Metastaz | 6 |
| 1.6. Histopatoloji | 7 |
| 1.7.Glioblastomanın Özellikleri | 10 |
| 1.8. Histogenez | 13 |
| 1.9. Tümör Genetiği | 13 |
| 1.10. Prognostik Faktörler | 15 |
| 1.11. Tedaviye Yanıt Mekanizmaları | 15 |
| 1.12. Radyolojik Tanı | 16 |
| 1.13.Glioblastomanın Tedavi Prensipleri | 17 |
| 1.14. Reküren Glioblastom Olgularında Tekrar Tedavi Seçeneği | 21 |
| 1.15. Antiepileptik Tedavi ve Sağkalım Üzerine Etkisi | 22 |
| 1.16. Gen Tedavisindeki Zorluklar | 22 |
| 1.17. Kan – Beyin Baryeri (KBB) | 22 |
| 1.18. Beyin Tümörlerine İlaçların Ulaşımını Artırma Yöntemleri | 24 |
| 1.19. Nanoteknoloji | 25 |
| 1.20. Plga Nanopartikülün Özelliği | 27 |
| 1.21. Zerdaçal Nedir ve İçindeki Maddeler | 28 |
| 1.22. Curcumin Ve Genel Özellikleri | 30 |
| 2. YÖNTEM VE GEREÇLER | 33 |
| 2.1 Araç ve Gereçler | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.1.2. Curcumin Yüklü Nanopartikülerin Hazırlanması | 34 |
| 2.1.3. İn Vivo Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar Ve Anestezi | 34 |
| 2.1.4. Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturması | 35 |
| 2.1.5. Deney Hayvanı Olarak Sıçan Seçilmesi Nedeni | 37 |
| 2.1.6. RG2 Rat Gliomu | 37 |
| 2.1.7. Deney Hayvanlarına Magnetik Rezonans Görüntüleme Yapılması | 37 |
| 2.1.8. MRG İle Tümör Tespiti | 39 |
| 2.1.9. Histopatolojik Değerlendirme | 40 |
| 2.1.10. Sıçanlarda Deney Gruplarının Oluşturulması | 40 |
| 3. BULGULAR | 41 |
| 4. İSTATİSTİK | 52 |
| 4.1. Tedavi Öncesi Ve Sonrası Arasındaki Farkın İstatistiksel Analizi | 52 |
| 4.2. Tümör Boyutlarındaki Değişimin Gruplar Arasında İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması | 52 |
| 5. TARTIŞMA | 54 |
| 6. SONUÇ | 64 |
| 7. REFERANSLAR | 65 |

TABLolar DİZİNİ

| | | |
|----------|--|----|
| Tablo 1. | DSÖ SSS tümörleri ana grupları | 3 |
| Tablo 2. | DSÖ Nöroepitelyal tümörlerin alt grupları. | 4 |
| Tablo 3. | DSÖ Astroitik tümörler | 4 |
| Tablo 4. | GBM'in primer ve sekonder mutasyon genleri | |
| Tablo 5. | Kullanılan kimyasal maddeler | 33 |
| Tablo 6. | Kullanılan aletler | 33 |
| Tablo 7. | Kullanılan Yazılımlar | 34 |
| Tablo 8. | Deney gruplarında tedavi öncesi ve sonrası tümör hacimlerinin (mm ³) ortalama±standart sapma değerleri, tümör boyutlarındaki değişim yüzdesinin (fark) ortalama±standart sapma değerleri ve farkın istatistiksel anlamlılığı | 52 |
| Tablo 9. | Tümör boyutlarındaki değişimin gruplar arasında ikili karşılaştırması (p değerleri) | 53 |

RESİMLER DİZİNİ

| | | |
|-----------|---|----|
| Resim 1. | Otopsi vakasında korpus kallozumu kullanarak karşı hemisfere geçiş | 6 |
| Resim 2. | Otopsi vakasında bazal gangliondan karşı hemisfere geçiş | 7 |
| Resim 3. | Glial hücrelerin GFAP ile boyanması | 10 |
| Resim 4. | Glioblastomda mikrovasküler proliferasyon (2) David N Louis, H.O., Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavane,. | 11 |
| Resim 5. | Glioblastomda nekroz ve tromboze damar | 12 |
| Resim 6. | Çok katlı nekroz odakları | 13 |
| Resim 7. | Glioblastoma MR T1 ve kontrastlı T1 görüntüleri | 16 |
| Resim 8. | KBB şeması | 24 |
| Resim 9. | PLGA'nın formülü | 28 |
| Resim 10. | Curcumin longa bitkisi ve toz hali | 29 |
| Resim 11. | Curcumin'in kimyasal formülü | 30 |
| Resim 12. | Steriotaksik yöntemle enjeksiyon A. Enjeksiyon sonra koronal kesit; B. Striatuma enjeksiyunun şematik görünümü | 36 |
| Resim 13. | Stereotaksi cihazında sıçan beynine tümör hücreci enjekte edilmesi. | 36 |
| Resim 14. | Sıçan ve sıçan için geliştirilen sarmal. | 38 |
| Resim 15. | Siemens 3 Tesla MRG | 39 |
| Resim 16. | Sıçanlarda beyin MRG görüntülenmesi ve tümör boyutunun ölçülmesi | 39 |
| Resim 17. | Tümör oluşmamış sıçan beynine ait kesitlerin Hematoksilen Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek | 43 |
| Resim 18. | Tümör oluşmuş, sıçan beynine ait kesitlerin Hematoksilen Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek | 44 |
| Resim 19. | 40 X büyütmede alttaki tümör odağı | 44 |
| Resim 20. | 100 X büyütmede Tümör alanı içerisinde nekroz alanları ve pleomorfizm | 45 |
| Resim 21. | 100 X büyütmede daire ile işaretlenmiş alan | 45 |
| Resim 22. | 400 X büyütmede Tümör alanı içerisinde tümör hücreleri | 46 |

| | |
|--|----|
| Resim 23. Sham grubu 1: MRG ile Tümör + boş nanopartikül intraserebral enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B) | 47 |
| Resim 24. Sham grubu 2: MRG ile Tümör + boş nanopartikül intravenöz enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B) | 47 |
| Resim 25. Sham grubu 3: MRG ile Tümör + boş Curcumin intraserebral enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B) | 48 |
| Resim 26. Sham grubu 4: MRG ile Tümör + boş Curcumin intravenöz enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B) | 48 |
| Resim 27. Deney grubu 1: MRG ile Tümör + Nanopartiküle yüklü Curcumin intraserebral enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B) | 49 |
| Resim 28. Deney grubu 2: MRG ile Tümör + Nanopartiküle yüklü Curcumin intravenöz enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B) | 49 |
| Resim 29. 40 X büyütmede intraserebral nanopartiküle yüklü curcumin tedavisi sonrasında tedavi edilmiş histopatolojik alan | 50 |
| Resim 30. 100 X büyütmede intraserebral nanopartiküle yüklü curcumin tedavisi sonrasında tedavi edilmiş histopatolojik alan | 50 |
| Resim 31. 400 X büyütmeleerde intraserebral nanopartiküle yüklü curcumin tedavisi sonrasında tedavi edilmiş histopatolojik alan .Dev çekirdekli histiyosit ve hemosiderinli makrofaj görülüyor | 51 |

1. GİRİŞ

Gliomlar erişkin kaynaklı primer beyin tümörlerinin yaklaşık %29'unu oluşturmaktadır. Glioblastoma (GBM) tüm gliomların %58'ini teşkil etmektedir (1). Glioblastoma yüksek derecede malign (Dünya Sağlık Örgütü - DSÖ derece IV), diffüz infiltratif bir tümördür; bilinen en malign tümörlerden biridir. Radikal cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ile ortalama sağkalım 12-14 aydır(1,2). Radyoterapi tüm beyine etkili olmakta fakat birçok kemotörapatik ajan yüksek dereceli gliyal tümör tedavisinde kullanılamamaktadır. Glioblastoma infiltratif ve invaziv özelliğinden dolayı beyine yayılabilmektedir. Kan beyin bariyeri, invaze ve infiltre hücrelere yeterince ilaçların ulaşamaması, hızlı proliferasyon ve angiogenez gibi pek çok nedenden dolayı tedavide güçlük yaşanmaktadır.(1.2.3)

Son yıllarda önemi giderek artan bir yaklaşım olan lipit kaplı nanoparçacıkların ilaç taşıyıcılar olarak kullanılmasıyla daha az sistemik yan etki görülmekte ve tümör dokusunda daha yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşılmakta ve tedavi etkinliği belirgin ölçüde artırılmaktadır.(4)

Zerdeçal bitkisi, zencefil ailesine ait olup, en önemli etken maddesi "Curcumin"dir. Curcumin Doğu Asya ve Hindistan mutfağında kullanılan curcumin longo aktif bileşeni olup, antioksidan, **antienflamatuar**, **antiviral**, **antibakteriyel**, **antifungal**, **antikanser** özellikleri olan çok fonksiyonlu ilaçtır. Birçok çalışmada curcuminin insanlardaki farmokinetiğin, güvenliğinin ve etkinliği ortaya konulmuştur. Son zamanlarda curcuminin antikanser aktivitesi gösterilmiş kanser tedavisindeki önleyici ve tedavi edici potansiyeli vurgulanmıştır. Curcumin deney hayvanlarında induklenen deri ve gastrointestinal sistem tümörlerinde boyutlarında küçülme sağlamıştır.(5)

Gliomların büyüme için JAK 1,2/STAT3 sinyal yolu kullandıklarında oldukça agresif davranırlar. Özellikle bu yolun inhibisyonu gliom tedavisinde oldukça önemli role sahiptir. Bir çalışmada Polifenol curcumin sıçan modeli hazırlanmış ve bu etkiyi değerlendirmeye çalışılmış. Gavaj yolu ile alınan curcuminin farelerde JAK 1,2/STAT3 sinyal yolu inhibisyonu üzerinden etki ederek gliyal tümör büyümesi yavaşlattığı gösterilmiştir (6).

Ayrıca curcumin Bcl2 inhibe ve Caspase 9 aktive ederek apoptozu indüklediği ve aynı zamanda MAPK, AKT ve mTOR gibi birçok hücre proliferasyonu yollarını bloke ettiği gösterilmiştir.(7).

Başka bir çalışmada curcumin glioma başlatıcı hücrelerinde diferansiyon yapıcı ve otofaji indüklediği tümör süprese edici etkide bulunduğu gösterilmiştir (8). Curcuminin telomerazı inhibe ettiği ve telomer salmasını ve apoptozu indüklediği de gösterilmiştir. (9).

Curcumin invitro (U138MG, U87, U373 ve C6 hatları) ve invivo (C6 inplant) deneysel glioblastoma modellerinde tümör hücrelerin büyümesi selektif olarak inhibe etmektedir (10).

1.2 Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri, tüm hastalıklar içinde en dramatik türlerden birini oluşturmaktadır. Çocukluk çağının en sık rastlanan ikinci malinitesini oluşturmaktadır. Erişkinlerde primer beyin tümörleri en sık 6. malinite olarak karşımıza çıkmaktadır.

Santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinin görülme sıklığı yaklaşık 21/100.000'dir. Tüm kanserler içerisinde tümöre bağlı ölümlerin %10'unu bu sistemin tümörleri oluşturur. Amerika Birleşik Devletlerinde tüm kanser ölümlerinin ise % 2'si primer beyin tümörlerinden kaynaklanmaktadır. Son dönemlerde beyin tümörlerinin özellikle tanısında sağlanan gelişmeler beyin tümörlerinin sıklığının artmasında önemli rol oynamıştır. Aynı zamanda cerrahi tecrübelerin ve teknik gelişmelerin ilerlemesi de son dönemlerde primer beyin tümörlerinin giderek tedavi edilebilir veya önlenebilir olmasını sağlamaktadır. Geniş otopsi serilerinin sonuçlarına göre intrakranyal ve intravertebral tümörlerin görülme sıklığı %0.8-2 arasında değişmektedir. Hastane kayıtlarının ise %1'ini oluştururlar(1).

Özellikle beyin malign tümörler içersinde en sık görülen glioblastomadır. İntrakranial ve spinal tümörlerin içinde nöroepitelyal tümörlerin görülme sıklığı ise % 45'dir.

Nöroepitelyal tümörler beyin korteksin her yerlerinde yerleşirler, daha çok kanlaması iyi olan, özellikle MCA(orta serebral arter) sulama alanlarında sıktır.(1)

1.3. Beyin Tümörleri Tarihçesi

Beyin tümörleri ilk olarak 1829'da Cruveilhier tarafından makroskopik olarak tanımlanmış 1836'da ise Bressler tarafından makroskopik olarak sınıflandırılmışlardır. Ancak beyin tümörlerinin bugünkü sınıflamanın temelini Virchow atmıştır. 1860'da beynin hücrelerarası matriksi olarak nörogliaı tariflemiştir. Yine Virchow tarafından tümörlerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamış ve “*glioma*” tarifini de ilk kez yapmıştır. 1993'te DSÖ tümörlerin sınıflandırmasını yayınlamış ve derece I-IV arasında tümörler benign'den malign'e doğru sınıflanmıştır (2). Bu sınıflama histopatolojik özellikler kadar yaşam süresi verilerine de dayanmakta idi. Sınıflama daha sonra birkaç defa modifiye edilmiştir. En son olarak 2007'de modifiye edilmiştir.(2)

1.4. Beyin Tümörlerin Sınıflaması

Bugün için en sık kullanılan sistem ise 2007 yılında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan 1993 ve 2000'deki Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasıdır.(Tablo 1,2,3)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2007 sınıflamasında tüm SSS tümörleri 7 ana gruba bölünmüştür (4).(Tablo 1).

Tablo 1. DSÖ SSS tümörleri ana grupları

| |
|--|
| Nöroepitelyal Doku tümörleri |
| Kranyal ve Paraspinal Sinirlerin Tümörleri |
| Meninkslerin Tümörleri |
| Lenfomalar ve Hematopoietik Tümörler |
| Germ Hücre Tümörleri |
| Sellar Bölgenin Tümörleri |
| Metastazlar |

DSÖ nöroepitelyal doku tümörlerini 9 alt gruba ayırmıştır. (Tablo2)

Tablo 2. DSÖ Nöroepitelyal tümörlerin alt grupları.

| |
|--------------------------------------|
| Astrositik Tümörler |
| Oligodendrogliyal tümörler |
| Oligoastrositik tümörler |
| Ependimal tümörler |
| Koroid pleksus tümörleri |
| Diğer nöroepitelyal tümörler |
| Nöronal ve mikst nörogliyal tümörler |
| Pineal parankimal tümörler |
| Embriyonel tümörler |

DSÖ göre Astrositik tümörlerin alt grupları. (Tablo 3)

Tablo 3. DSÖ Astrositik tümörler

| | |
|----------------|---|
| DSÖ Derece I | Subependimal dev hücreli astrositom Pilositik astrositom |
| DSÖ Derece II | Diffüz astrositom Pilomiksoid astrositom Pleomorfik ksantoastrositom Oligoastrositom |
| DSÖ Derece III | Anaplastik astrositom |
| DSÖ Derece IV | Glioblastoma Gliosarkom |

Nöroepitelyal tümörlerden astrositomlar, oligodendrogliomlar, oligoastrositomlar ve ependimomlar glial tümörler (gliomlar) olarak adlandırılır.

Gliomların en sık görülen tipi astrositik tümörlerdir. Her tümör için DSÖ derecelendirilmesi vardır. Astrositomlar 4 dereceye ayrılır(11) (Tablo 3). Düşük dereceli astrositomlarda morbiditenin en büyük nedeni, yüksek dereceli astrositoma farklılaşabilmesidir.

Santral sinir sistemi tümörleri en sık meninkslerde görülür (%35) ve bunu %15.8 ile glioblastoma takip eder. Meningiomların insidansı 100.000’de 7.49 iken nöroepitelyal tümörlerin insidansı 100.000’ de 6.6’dır, ki bunun % 58’ünü glioblastomalar oluşturmaktadır (11,12).

Özellikle 45 yaş üzerinde bu oran artmaktadır. DSÖ Derece I gliomlarda; örneğin pilositik astrositoma, cerrahi rezeksiyon kür sağlamaktadır. Oysa diffüz

gliomlarda (DSÖ Derece II ve üstü) mümkün olduğunca güvenli sınırlarda en geniş rezeksiyon tedavinin birinci basamağıdır ve cerrahi sonrası ek tedavi gerekir.(11,12)

1.5. Glioblastoma

Glioblastoma (GBM) en sık görülen ve en malign beyin tümörüdür. Astrositomaların yaş ile yerleşim alanları da değişkenlik gösterir. Ortalama görülme yaşı 56 yaştır. Glioblastom ve astrositomanın insidensi 14 yaş altında 100,000'de 0,2-0,5 iken 45 yaş üzerinde ise 100,000'de 4,5'a çıkmaktadır. Erkeklerde görülme oranı bir miktar fazladır (K/E=2:3). Tüm gliomların yaklaşık %50-52'sini oluştururlar.(13)

Tanı konulmadan belirti verme süresi ortalama 6 aydır. Glioblastoma hemisferlerde baskın olmak üzere her bölgede görülebilir. Yirmi beş yaş altında astrositomaların 2/3'ü infratentoryel iken 25 yaş üzerinde ise %90 supratentoryel yerleşim gösterirler. Glioblastoma sırayla yeri frontal (%29), temporal (%25), ani anda birden çok lobu tutan(%21), parietal (%13), oksipital (%2), geri kalanı beyinin diğer yerlerinde görülürler(%16).Korpus kallosum aracılığı ile kısa sürede karşı hemisfere geçer. Primer olarak kelebek tipi gliom tarzında korpus kallosumda yerleşebilir. Derin gri cevher çekirdeklerinden veya beyin sapından başlaması oldukça enderdir. (13,14)

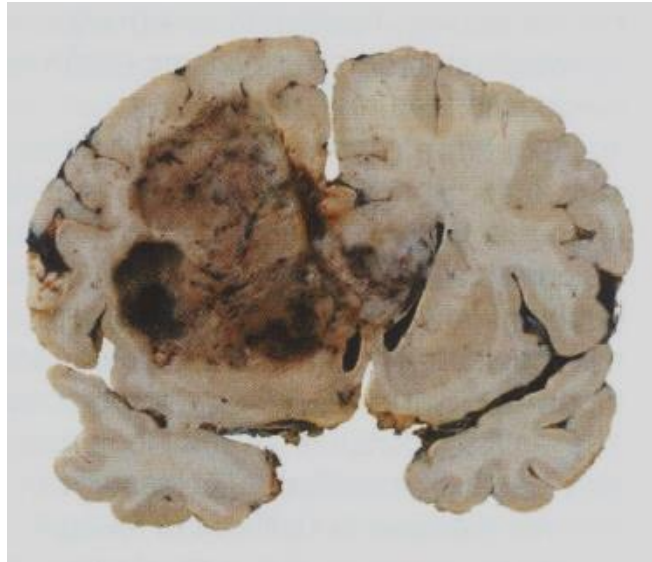
Glioblastomada yerleşim yerlerine göre kafa içi basınç artış semptomları (KİBAS) olarak baş ağrısı (%68), bulantı-kusma (%45) düşük dereceli gliomlardan daha sık olarak gözlenir. Mental durum değişiklikleri (%47), motor defisitler (%44) oldukça yaygın olarak saptanır. Epileptik nöbet ile başvuru yaklaşık %32'dir. Semptom süresi kısa olmasına rağmen başvuru anında kitle boyutu büyük olup, bir lobu tamamen kaplamış olabilir (şekil 2.2). Tümör içerisine geniş kanama olabilir ve hastalar buna bağlı olarak iskemik inmeye benzer bulgular ile başvurabilirler. (13,14)

Glioblastoma tiplerine görede özellikler gösterirler. Küçük hücreli glioblastoma küçük, yuvarlak şekilli, hiperkromatik nukleuslu, atipik, monoformik özellikler gösteren hücre topluluğundan oluşmaktadır. Yüksek proliferasyon gösterirler. Oligodendrogliom komponentli glioblastoma oligodendrogliomayı anımsatan foliküller içerirler. Diğer glioblastomlu hastalara nazaran daha iyi sağkalımları vardır. Nekroz içerenlerde sağkalım daha kötüdür. Dev hücreli glioblastoma büyük, çoklu çekirdekli olmaları özelliğidir, hücreler boyut ve

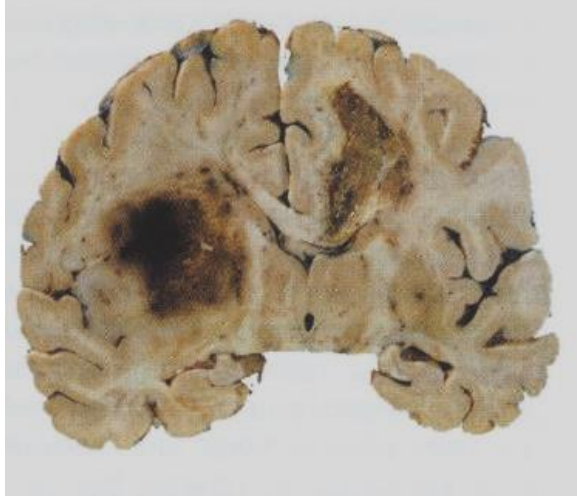
pleomorfizm derecesinde olabilir. Görünümlerine rağmen yüksek malignite ile ilgili değildirler. Gliosarkom ise hem glial, hem mezenşim hücre diferensiyasyonu gösteren glioblastoma varyantıdır. Tüm glioblastomaların yaklaşık %2'sini oluşturur. Gliosarkom gibi sarkamatöz komponenti yüksek tümörlerde (özellikle dural bağlantısı olanlarda) mikroskopik ve radyolojik görüntüsü meningiom ile karışabilir. Epitelyal metaplazi siktir, kıkırdak, kemik, kas veya yağ dokusu oluşumları görülebilmektedir. Glioblastoma ile benzer sağkalım değerlerine sahiptir.(13)

1.5. Yayılım ve Metastaz

İnfiltratif yayılım diffüz astrositik tümörlerin bir özelliği olmasına rağmen, glioblastoma çevre beyin dokusuna hızlı invazyon olur. Korpus kallozumdan karşı hemisfere geçmesi(Resim1), bilateral simetrik kelebek tümör görünümü oluşturması sık görülen bir özelliğidir. İnternal kapsülde, bazal ganglionda karşı hemisfere (Resim 2), fornikte, optik radyasyoda ve anterior komissürde de yayılımı görülebilmektedir. Hızlı ve infiltratif büyüme göstermesine rağmen subaraknoid boşluğa invaze olmaya eğilim göstermez ve nadiren beyin omurilik sıvısı (BOS) yolu ile metastaz yapar. Hematojen yayılım ise oldukça nadirdir, ventrikülo-peritoneal şant yolu ile abdominal metastazı görülmüştür.(1,2)



Resim1. Otopsi vakasında korpus kallozumu kullanarak karşı hemisfere geçiş (3,4)



Resim 2. Otopsi vakasında bazal gangliondan karşı hemisfere geçiş (3,4)

1.6. Histopatoloji

Histopatolojisinde nükleer atipi, sellüler pleomorfizm, mitoz, endotel proliferasyonu ile birlikte yeni damar oluşumu, nekroz alanları, bu nekroz alanlarına uzanan infiltrasyon odakları gözlenir. Nekroz ve endotel proliferasyonu olmazsa olmaz tanısal özelliğdir. Fakat tümör içerisindeki heterojenite steretaksik biopsilerde tanıyı zorlaştırmaktadır(3,4). Diğer bir histopatolojik özelliği migrasyon gösterdiği bölgede tümör hücrelerinin subpial bölgede nöronların çevresinde (satellitiosis) ve damarların çevresinde kümeleşmesidir. Bazı proliferasyon göstergeleri, tümörün agresif davranışını öngörmeye, alışlagelmiş histopatolojik tanı ve derecelendirme sisteminden daha çok bilgi vermektedir. Bugün için bu konuda ilgi daha çok düşük dereceli tümörler üzerinde yoğunlaşmıştır. Hoshino ve ark. tümörlerin histopatolojik olarak aynı olmasına karşın farklı proliferatif potansiyelleri olabileceğini ortaya koymuştur. Bu amaç ile kullanılan tümör proliferasyon göstergeleri aşağıda özellikleri ile tartışılmıştır.(1,2)

Mitotik figür sayısı

Mitotik indeks olarak da tanımlanan bu ölçüm, doku kesitlerinde rutin hemotoksilen- eosin boyası ile mitotik figürlerin basitçe sayımına dayanır. Bir mikroskopik alanda sayılabilen mitotik figür sayısı “mitotik indeks” olarak tanımlanır. Çoğu tümör ve glial tümörler dahil tümörlerde gradlama şemasını belirleyen en önemli özellik tanımlanabilir mitotik figürlerdir. Mitotik figürlerin

apoptotik hücrelerden ve parçalanmış nükleuslarda tanımlanması kısmen subjektiftir. Aynı zamanda en malign tümörlerde bile mitotik figürler durmuş olabilir. Mitotik figür sayılması ile hücre siklusunda sadece M fazı tanımlanabilir (15,16,17).

H timidin

Bu yöntem, cerrahi öncesi tritium ile işaretlenmiş timidin'in hastaya sistemik yolla verilmesi ve radyoaktif pirimidin'in replike olan DNA'ya girmesi ile işaretlenmiş DNA'nın biopsi materyallerinde saptanmasıdır. Radyoaktif madde kullanımı bu tetkiki sınırlandıran en önemli etkidir (15,16,17).

Bromodeoksiüridin Iododeoksiüridin (BUdR-IUdR)

5 Bromodeoksiüridin halojene edilmiş timidin anloğudur. Hücre siklusunun S fazında DNA'ya integre olur. Tıpkı H timidin gibi cerrahi öncesi hastaya BUdR'nin verilmesini gerektirir. Biopsi materyalinde. BUdR'e karşı monoklonal antikolar standart immunohistokimyasal metodlarla saptanır. BUdR işaretli indeksler tümör büyümesi, rekürens oranı, hasta yaşam süresi ile korelasyon gösterir. Direkt sistemik uygulama gerektirmesi yaygın kullanımını sınırlamaktadır. Gerekli olan doku miktarının fazla olması, suboptimal doku elde edilebilmesi de yine yaygın kullanımını engellemektedir (15,16,17).

Nükleolar organize edici bölge ilişkili proteinler (AgNOR)

Nükleolar organize edici bölgeler (NOR's), ribozomal RNA genlerini encode eden nükleolusda bulunan DNA loop'larıdır. NOR's 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomların kısa kollarında lokalizedir. NOR's ile birliktelik gösteren arginofilik nonhiston proteinler mevcuttur. Bu NOR's ile birlikte olan proteinleri, interfaz nükleus da gösterebilen gümüş kolloid histolojik teknikler mevcuttur (AgNOR's). Bu şekilde ortaya konulabilen proteinler RNA polimeraz 1, C 23 ve B 23 proteinleridir. AgNOR diğer göstergelerden farklı olarak hücre siklusunda 1 veya daha fazla faza sıkı bir şekilde bağımlı olan bir tetkik değildir. Tümör büyüme potansiyelini indirekt bir ölçümünü gösterir. AgNOR smear örneklerinde, frozen kesitlerinde ve parafin kesitlerde kolaylıkla ve çabukça uygulanabilir. AgNOR sayısı ile glial tümörlerde histolojik derece arasında pozitif bir korelasyon gösterilmiştir. AgNOR tekniğinin

standardizasyonunun çok kötü olması ve gözlemciler arası uyumsuzluk bu tetkiki sınılamaktadır (15,16,17).

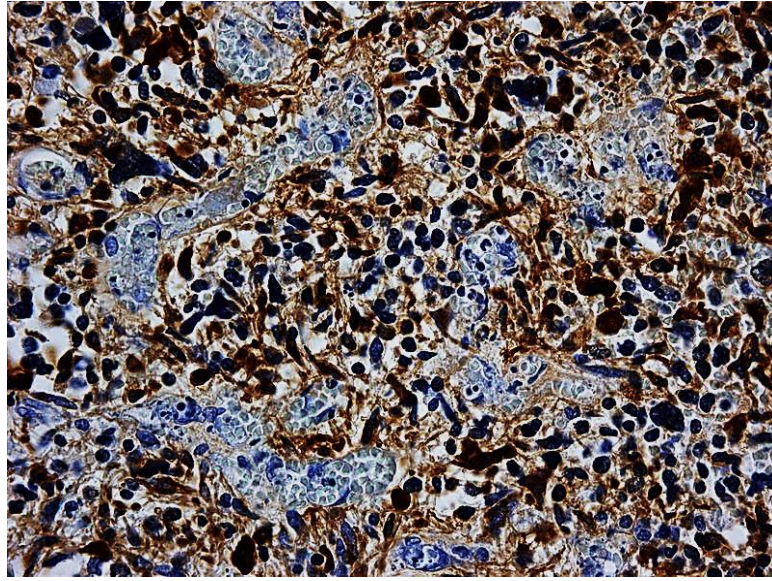
Ki-67 / MIB 1

İlk defa 1983 tarihinde Hodgkin lenfoma hücre kültüründen derive edilen nükleer fraksiyon ile immünize edilmiş olan farelerde üretilmiş olan monoklonal bir antikordur. 395 kilodalton ağırlığında non-histon bir proteindir. Siklusun G1, S, G2 ve M fazlarındaki hücrelerinde bulunan nonhiston nükleer proteinde lokalize bir antijen olan Ki-67 epitopuna karşı gelişir. Bu proteinin tam olarak fonksiyonu bilinmemektedir. Ki-67 “labeling indeks” diğer proliferasyon indeksleri ile ve bir çok primer beyin tümöründe derece ile doğru korelasyon gösterir. Ki-67 düzeyine bakabilmek için mutlaka donmuş kesitler üzerinde çalışmak gerekmektedir. Bu kullanımını sınırlayıcı bir neden olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü genellikle arşivlerde biopsi materyalleri parafin kesitlerde saklanmaktadır. Ancak son 10 yılda Ki- 67 67 indeksini gösteren monoklonal antikörlerin (MIB I gibi) kullanılması bu dezavantajı ortadan kaldırmıştır. Monoklonal antikörler rutin parafin bloklardan elde edilen kesitlerde uygulanabilmektedir.(15,16,17)

Glial fibriler asidik protein (GFAP)

Astroglialara özgü Tip III ara filament proteinidir. Ara filament proteinler, yüksek ökaryotlarda bulunan 8-10 nm’lik fibröz proteinlerdir; hücre iskeletinin oluşması, sitoplazmik alan organizasyonu, mitoz ve hücre hareketinin sağlanmasında rol oynar. Fosforilasyon, proteoliz, asetilasyon, glikozilasyon ve deiminasyon en sık gözlenen translasyon sonrası değişikliklerdir. GFAP küçük ve asidik bir proteindir (50 kDa, pI 4.6). Astrositin şekil ve mekanik dayanıklılığını sağlar. En az beş izoformu vardır: α , β , γ , σ ve ϵ ; α izoformu astroglialarda en fazla bulunur GFAP çeşitli uyarılara yanıt olarak N-terminalindeki beş bölgeden fosforillenir (Thy7, Ser8, Ser13, Ser17 ve Ser38); fosforilasyon, GFAP yerleşiminde rol oynar. Hücre yapı ve hareketi, mitoz, sinyal iletimi, kan-beyin bariyerinin fonksiyonel olması gibi birçok hücrenel olayda rolü vardır. GFAP astrositin şekil ve mekanik dayanıklılığını sağlar. Olgun hücrelerdeki GFAP fonksiyonları “knockout” fare çalışmaları ile ortaya konmuştur. Bu farelerde hipokampus ve spinal kordun beyaz maddesi yoktur, astrosit

fonksiyonları dejeneredir, miyelinizasyon anormaldir ve kan-beyin bariyeri bozulmuştur. Bu çalışma GFAP'nin miyelinizasyonun uzun süreli devamlılığında rol oynadığını göstermektedir. Antisens RNA çalışmalarında GFAP içermeyen astrositlerin nöronlar ile bağlantı oluşturmadıkları saptanmıştır. Yine bu çalışmalarda GFAP'nin purkinje hücre iletiminin devamlılığında önemli olduğu gösterilmiştir (15,16,17) Resim3)



Resim 3. Glial hücrelerin GFAP ile boyanması (15,16,17), ME Velasco, D. Dahl, *İnsan glial tümörler glial fibriler asidik protein immünohistokimyasal lokalizasyonu.* (Kanser Cilt 45, Sayı 3, Şubat 1980, s 484-494, ISSN 008-543x. PMID 6.243.508)

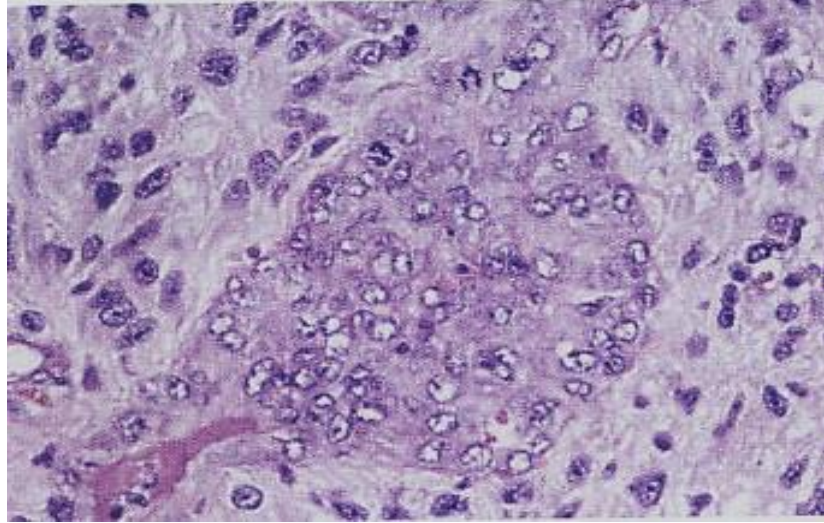
1.7.Glioblastomanın Özellikleri

Mikrovasküler Proliferasyon

Nekroza ek olarak mikrovasküler proliferasyonun oluşumu glioblastomanın histopatolojik olarak ayırıcı özelliğidir. Işık mikroskopunda, nekroz etrafında yumaklar şeklinde gözükür. Çok katmanlı mitotik epitel ve düz kas hücrelerinden oluşur (2) (Resim4).

Vasküler tromboz sık olarak görülür, iskemik tümör nekrozu oluşmasında etken olduğu düşünülmektedir. Proliferasyon glioblastomda mitoz ile birlikte nerdeyse her vakada gözükürken göze çarpan bir özelliktir. Mitotik aktivite tümörler arasında çok değişken olabilmekte, hatta bir tümörde bölgesel heterojenite gösterebilmektedir. Ki-67/MIB-1 antikorları ile belirlenen bölünme oranı bölgesel

değişiklikler göstermektedir. Ortalama değerler %15-20 civarındadır. Küçük, undifferansiye, fuziform şekilli hücrelerde genelde yüksek proliferasyon saptanmakta, oysa gemistotik hücreler bulunan tümörlerde daha düşük saptanmakta. Proliferasyon indeksindeki geniş değerlere rağmen, proliferasyon ve sağkalım arasında belirgin bir ilişki bulunamamıştır (2).



Resim 4. Glioblastomda mikrovasküler proliferasyon (2) David N Louis, H.O., Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavane, *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Glioblastoma, 2007: p. p33-49.*

Anjiogenez

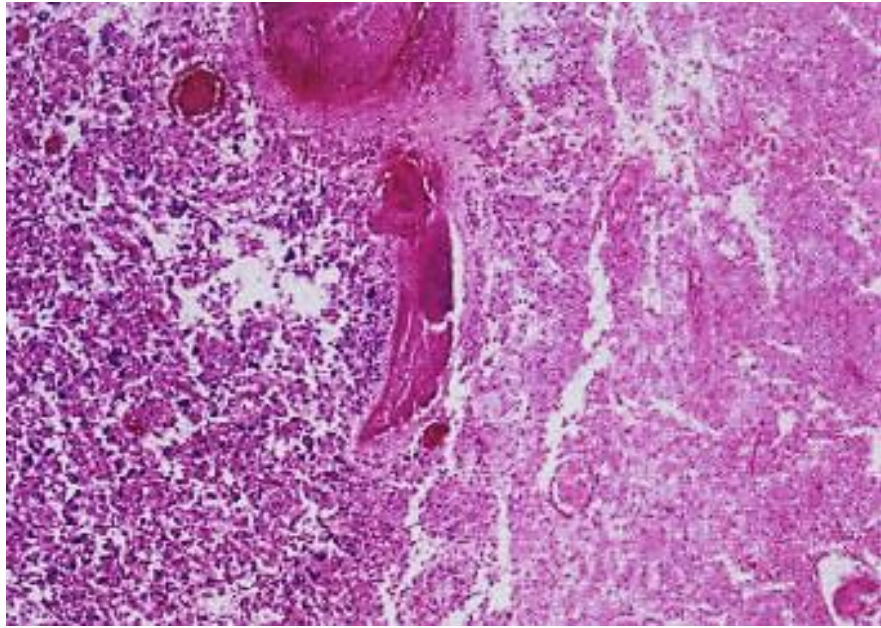
Glioblastoma insanda en iyi vaskülerize olan tümördür. Bunu birkaç yol ile sağlar; daha önce var olan damarların tümöre migrasyonu, klasik anjiogenez (var olan damarlardan tümöre yeni kapiller dallar vermesi) ve vaskülogenez (dolaşımda olan kemik iliği hücrelerinin perivasküler bölgeye yerleşerek damar oluşturması). Glioblastomada anjiogenezin en önemli faktörün hipoksi olduğu düşünülmektedir (2).

Vasküler endotelyal growt faktör (VEGF) glioblastomada damar disfonksiyonunun en önemli medyatörüdür. VEGF tümör anjiogenezini, damar geçirgenliğini (ödem) ve kemik iliği hücrelerinin perivasküler yerleşiminden sorumludur. Düz kas hücreleri ve kemik iliği hücreleri vasküler remodelling olayında görev alır. Bu vasküler remodelling glioblastomanın histopatolojik ayırıcı özelliğidir.(2)

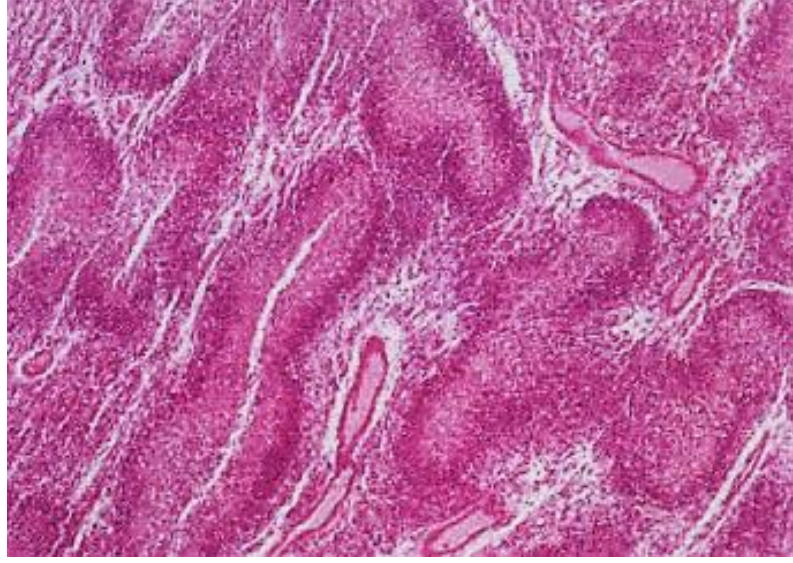
Nekroz

Tümör nekrozu glioblastomanın olmazsa olmaz özelliğidir ve varlığı diffüz astrositomda kötü prognozun en güçlü belirteçidir. Nekroz görüntüleme teknikleri ile kontrast tutmayan merkez olarak görülebilmekte, ki bu merkez canlı olamayan tümör hücrelerinden oluşmakta olup tüm tümör hacminin %80'nini oluşturabilmektedir(Resim 5-6). Nekroz içerisinde ender olarak canlı tümör ve damar yapıları görülebilmektedir. Nekrozun yetersiz kanlanmaya bağlı olarak iskemi sonucu geliştiği düşünülmektedir. (3)

Mikroskop ile görülebilen bir diğer nekroz formu ise çoklu, küçük, düzensiz band şekilli hücrelerin oluşturduğu merkezin küçük, sıkı yerleşimli glial hücreler tarafından yalancı çok katlı şekilde sarılmasıdır (Şekil). Bu nekroz glioblastomun ayırıcı bir özelliği olup primer ve sekonder glioblastomda da gözükülebilmektedir. (3)



Resim 5. Glioblastomda nekroz ve tromboze damar (3) Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. 114(2): p. 97-109.



Resim 6. Çok katlı nekroz odakları. (3) Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. 114(2): p. 97-109.

1.8. Histogenez

Glioblastomanın hücesel kaynağı hep bir araştırma ve tartışma konusu olmuştur. Yıllarca düşünülmüştür ki glioblastomaların, astrosit markarlarını eksprese ettiğinden dolayı, astrosit kökenli olduğudur. Ama yapılan kimyasal ve genetik çalışmaların ardından glioblastomun prekürsör hücrelerden veya nöronal kök hücrelerden geliştiği görülmüştür.

Nöronal kök hücrelerin subventriküler zonda yerleşmesi ve glioblastomaların çıkış noktasının bu bölge olması bu görüşü desteklemektedir. Dahada fazlası, glioblastom içerisinde kök hücre davranışı gösteren hücreler izole edilmiştir. Bu hücrelerin kendilerini yenileme ve tümör oluşturma kabiliyetleri hayvan deneylerinde gösterilmiştir.(2)

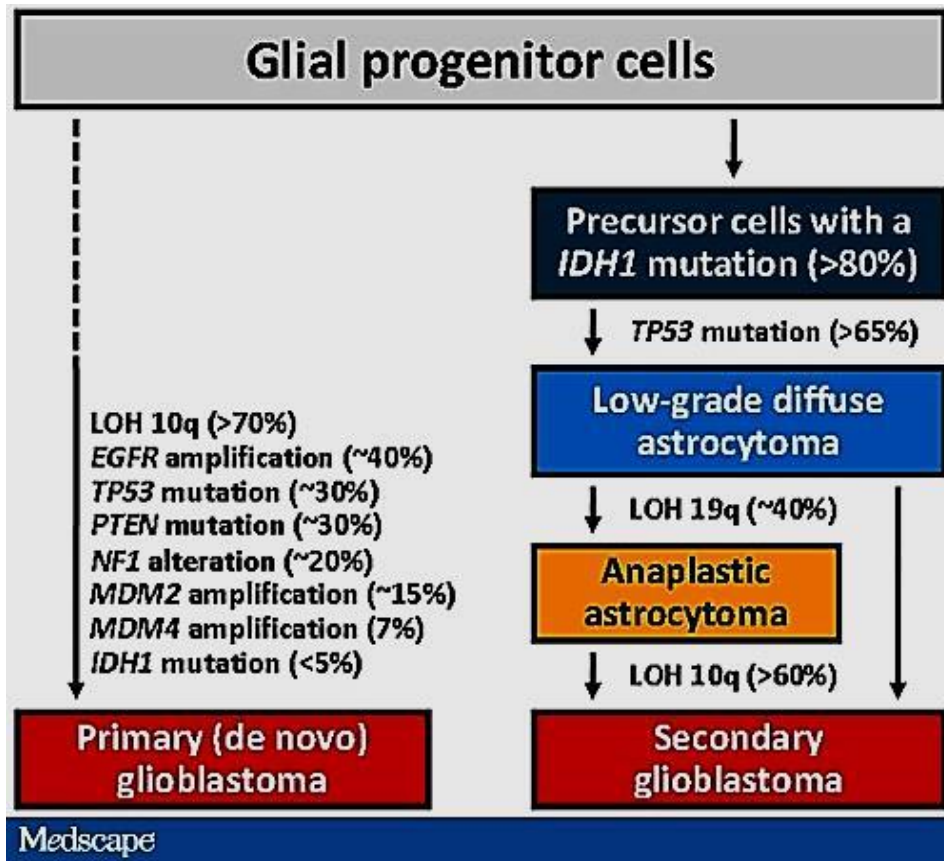
1.9. Tümör Genetiği

Kromozomal anomali çalışmaları sonucunda Glioblastoma primer ve sekonder gelişiminden sözedilmektedir.

Primer Glioblastoma'da(GBM de novo) 10. Kromozomun uzun kolunda q delesyon (LOH 10q) saptanmıştır. Prognozun daha kötü oluşunun göstergesidir. Ayrıca 7.kromozomda da EGFR artışı [7p13-p12] söz konusudur. Primer GBM olgularında düşük dereceli gliom öyküsü yoktur.

Sekonder Glioblastomada astrositom, anaplastik astrositom, Glioblastoma gelişim zinciri izleyen etiyoloji söz konusudur. Sekonder Glioblastomada P53, SRC ve 10q delesyonu tarzında kromozom anomalileri ile seyretmektedir. EGFR glioblastomda ekspresyon artışı en sık görülen gen dir(%40). Sekonder glioblastomarda nadirdir. LOH 10 Glioblastomada görülen en sık genetik değişikliktir. Tüm kromozom kaybolabildiği gibi kısmi kayıplar da olmaktadır (*10p14, 10q23 ve 10q25*).

Primer ve sekonder Glioblastomalar eşit oranda görülmektedir. Tam kayıpta ise primer Glioblastomada görülmektedir. Küçük hücreli Glioblastomada sıklıkla EGFR amplifikasyonu, p16 delesyonu, PTEN mutasyonu ve LOH 10q beraber görülmektedir. JAK1.2/STAT3 sinyal yollarının bulunması glioblastomanın agresif davranış göstergeninin işareti olarak yorumlanmaktadır.(3,13)(Tablo 4)



Tablo 4. GBM'in primer ve sekonder mutasyon genleri (13) Markett J, D.V.V., Rosenberg SA, Hellman S (ed.s), *Glioblastoma Multiforme 1 st ed.* Jones & Bartlett Pub., 2005;

1.10. Prognostik Faktörler

Tanı anında yaşın 50'nin altında olması ve Karnofsky performans değerinin 70 ve üzeri olması iyi prognostik faktörlerdir. DNA'yı alkilleyici ajanlara karşı koruyan O⁶-metilguanin-transferaz (MGMT) mutasyonu kemoterapinin etkinliğini arttırarak sağkalımı arttırmaktadır.(2)

GBM kötü prognostik faktörler:

- Nekroz varlığı ve genişliği
- 10. kromozomda heterojenite kaybı (LOH 10q)
- Chitinase 3 like 1(YKL 40) görevi bilinmeyen proteinin artışı

1.11. Tedaviye Yanıt Mekanizmaları

Glioblastomanın mevcut tedavilere oldukça dirençli tümördür. Agresif radikal cerrahi rezeksiyona, radyoterapiye ve kemoterapiye rağmen sağkalım oldukça düşüktür. Tedaviye direnç bazı nedenlere bağlanılmıştır:

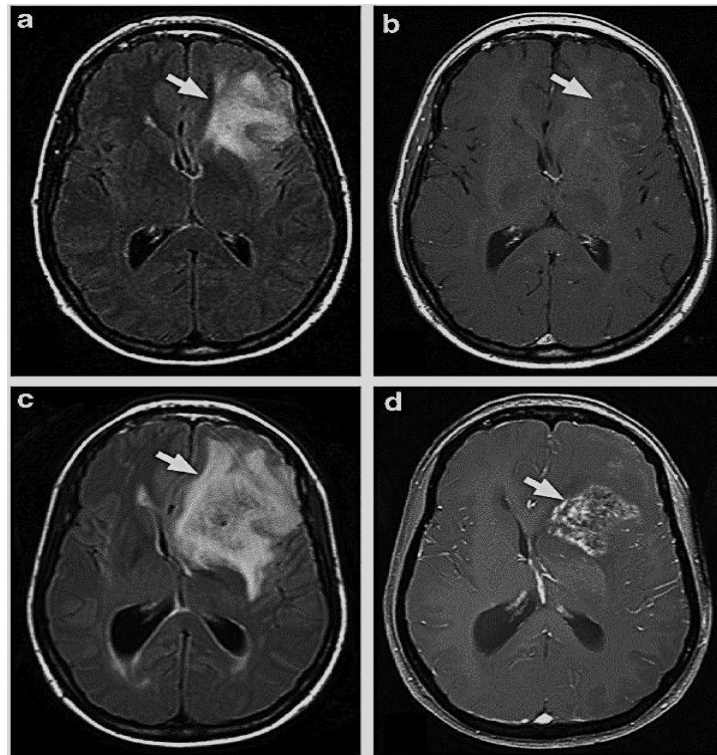
- Kan beyin bariyeri oldukça seçici geçirgenlik olması nedeniyle tümöre ulaşan ilaçların miktarı düşmektedir.
- Tek nokta gen mutasyonları, heterozigot kaybı, kromozom delesyonları, gen amplifikasyonları ve genetik heterojenite tedaviye yanıt vermede zorlanmaya sebep olmaktadır.
- Glioblastomanın invaziv özelliğinden dolayı hücresel düzeyde yayılması, zamanında tespit edilemesinin zorluğu.
- Glioblastomanın proliferasyonu, migrasyonu, invazyon için kullandıkları yolları iyi bilinmemesi tedavi zorlaştırmaktadır.
- Kemoterapi ve radyoterapinin tedavide yeterli düzeyde kullanılmayışı.

Bu yüzden Glioblastoma tedavisinden cerrahinin, kemoterapinin ve radyoterapinin tümör genetiğinin, sinyal yollarının, kan beyin bariyerini iyi geçen ilaçların iyi bilinmesi gerekir.(2)

1.12. Radyolojik Tanı

Glioblastomasupratentoryal yerleşimi siktır. Bazal ganglion ve talamus yerleşimi oldukça nadirdir. Beyin sapı ve serebellum yerleşimi çocuklarada siktır. Glioblastoma tipik olarak traktus aracılığı ile karşı hemisfere yayılırlar. Glioblastoma froceps minörü kullanarak karşı hemisfere geçer (kelebek tümörü).

Glioblastomanın beyin tomografisinde (BBT) kontrastsız tetkikte nekroza ait hipodansite, irregüler izodansite görülür. Belirgin ödem (vazojenik ödem) ve çevresel infiltrasyon görülür. Kanama siktır. Kontrastlı BBT’de ise yoğun homojen, düzensiz çevresel kontrastlanma görülür. Glioblastomanın beyin MRG’de T1 axialde ise irregüler, hipointens kitle, nekroz, kalın düzensiz kontür siktır. T2 axial tümör komşuluğunda vazojenik ödem akım sinyalsizliği (neovaskülarite) görülür.T1 axial kontrastlı tetkikte santral nekrozu çevreleyen kalın düzensiz kontrastlanma tipiktir.(18) (Resim7)



Resim 7.Glioblastoma MR T1 ve kontrastlı T1 görüntüleri (18) Salzman, L . MD, Barkovich, J. MD: OSBORN, Brain, Diagnostic Imaging

1.13.Glioblastomannın Tedavi Prensipleri

Cerrahi kabul edilebilir morbidite sınırları içerisinde maksimum sınırlarda rezeksiyon uygulanmasıyla histopatolojik tanının elde edilmesinin yanı sıra histopatolojiden bağımsız olarak en iyi tedavi sonuçlarının elde edilmesinde altın standart olarak değerlidir. Ayrıca Glioblastoma tedavisinde Karnovsky skorlaması önemlidir. Şuanda kabul gören tedavi prensibi maksimum güvenli cerrahi (gross total rezeksiyon veya subtotal rezeksiyon) sonrası eş zamanlı günlük 75 mg/m² temozolomid (TMZ) ile konvansiyonel 60 Gy radyoterapi sonrasında adjuvan 6 kür TMZ (150-200 mg/m²) uygulanmasıdır(19).Ortalama sağkalım cerrahi sonrasında eşzamanlı radyoterapi alan hastalarda 12 ay, radyoterapi ile eşzamanlı TMZ ve adjuvan TMZ ile 14 ay olarak bulunmuştur(19).

Cerrahi rezeksiyon sınırının dışında invaziv gliom hücrelerinin olması, daha etkin tedaviyi sağlamak için terapötik ajanların oraya ulaşmasını gerektirmektedir.(2) SSS'ni koruyan KBB beyine küçük ve büyük birçok molekülün geçişine engel olarak tedavide büyük zorluklar çıkarmaktadır(20).

a) Temozolomid

Temozolomid(TMZ) imidazotetrazin türevi, oral biyoyararlanımı yüksek 2. nesil alkilleyici ajandır. Gastrointestinal sistemden absorbe olduktan sonra Santral Sinir Sistemi de dahil olmak üzere bütün vücut dokularına penetre olur ve spontan olarak aktif metaboliti olan 5-(3-metil triazen1-yl) imidazol-4-karboksamid'e (MTIC) dönüşür. En sık görülen yan etkisi trombositopeni olmakla birlikte bulantı, yorgunluk, baş ağrısı ve kabızlık gibi istenmeyen etkiler de gözlenebilir.(21)

Bir diğer alkilleyici ajan olan carmustine (BCNU); bis-chloroethylnitrosourea) gliomların tedavisinde kullanılabilmekte; fakat glioblastomada belirgin bir faydalanım saptanmamıştır.(21)

b) DNA Tamir Enzim İnhibisyonu

MGMT daha önce bahsedildiği üzere TMZ'nin alkilleyici etkisini azaltmaktadır. O(6)-benzilguanin (O6-BG) sentezini durdurarak MGMT miktarını azaltmaktadır. Bu yolla TMZ etkinliği artırılabilir. Ancak ciddi toksisitesi

mevcut olup, kullanıldığı zaman TMZ dozunu düşürmek gerekmektedir, bu durumda TMZ etkisi de azalacaktır.(21)

c) **Anjiogenez İnhibitörleri**

Neovaskülarizasyon (yeni damar oluşumu) malign tümörlerin karakteristik özelliklerinden biridir. Özellikle yüksek dereceli gliomlarda tümör kitlesinin önemli bir komponentini endotel hücreleri oluşturur. Malign glial tümörlerde glial ve endotelyal hücreler yüzeylelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok proanjiojenik molekül sergilerler.

Bevacizumab VEGF'e karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikordur. Yapılan faz II çalışmasında, bevacizumab ile kombine edilen standart tedavi (cerrahi + radyoterapi + TMZ) grubunda ortalama sağkalım 20 ay olarak bulunurken standart tedavi grubunda ortalama sağkalım 14 ay olarak bulunmuştur. Birçok yan etkileri mevcuttur(11). Bevacizumab günler içerisinde damarlar üzerindeki etki sayesinde ödemde ve kontrast geçişinde azalmaya neden olmaktadır. Magnetik Rezonans Görüntüleme yalancı antitümör efekti görülmektedir. (21)

d) **Matriks Metalloproteinaz (MMP) ve İntegrin İnhibitörü**

MMP enzimleri, tümör hücreleri ve peritümöral stromal hücreler tarafından sekrete edilir ve bazal membran invazyonu, anjiogenez, metastaz gibi onkolojik süreçlerde rol alırlar. MMP enzimleri malign glial hücreler tarafından sekrete edilir ve bunun derecesi tümörün proliferatif potansiyeli ile doğru orantılıdır.

İntegrinler angiogenez ve hücre migrasyonunda rol oynayan moleküllerdir. Preklinik çalışmalarda normal beyin dokusunda bulunmayan bazı integrin moleküllerinin malign glial tümörlerde bulunduğu bildirilmiştir(16) İntegrin inhibitörü Silengitid ile faz I çalışması yapılmış, yan etki olarak trombositopeni, anoreksi, hiponatremi ve hipoglisemi görülmüştür (22).

e) **Sinyal İleti Sistemi İnhibitörleri**

Malign tümör hücreleri kontrolsüz proliferasyon, invazyon ve metastaz yapma gibi karakteristik özelliklere sahiptir. Bu süreç hücre yüzeyindeki reseptörlerden çakirdekteki sorumlu genlere kadar iletilen bir seri olaylar sonrası

ortaya çıkar. Hücre yüzeyinde yer alan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktör reseptörleri bu süreçte önemli rol alırlar. EGF reseptör tirozin kinaz inhibitörü ertolinib ile yapılan faz I ve faz II çalışmalarda anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.(22)

f) Diferensiasyon Yapıcı Ajanlar

Vitamin A türevleri (retinoidler) nükleer reseptörlerle etkileşim yolu ile hücre farklılaşmasını uyarır proliferasyon ve onkogenekspresyonunu inhibe eder, hücreyel immunitiyi arttırlar. Retinoidlerin glioblastoma hücre dizilerinde apoptozise yol açtığı da gösterilmiştir(23). Ancak yapılan bir çalışmada yeni tanı konmuş glioblastoma multiforme hastalarında radyoterapi ile eşzamanlı TMZ ve sis-retinoik asit kullanımının sağkalıma faydası olmadığı gösterilmiştir(24).

g) Gen Tedavisi

Malign beyin tümörlerinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapide oldukça yol kat edilmesine rağmen halen istenen sağ kalım oranları elde edilebilmiş değildir. Bu da araştırmacıları farklı arayışlara itmektedir. Bunlardan bir tanesi gen tedavisidir.

Gen tedavisi, tedavi amacıyla hastanın hücrelerine bir genetik materyalin (çoğunlukla bir DNA parçası) transfer edilerek hastanın tedavi edilmesidir. Amaç mutant fenotipi DNA düzeyinde iyileştirerek, anormal geni düzeltmektir. DNA parçasının hücre içerisine sokulması işlemine “transfeksiyon” denir. Hücre içindeki gene ise transfer edilmiş gen anlamını taşıyan “transgen” adı verilir.

Herpes simplex virüsünün Timidinkinaz (HSV-tk) geni ile transdüksiyonu takiben bir nükleotid analogu olan gansiklovir tedavisi sonucunda tümör hücrelerinin öldüğü ilk kez Molten tarafından gösterilmiştir(25).

h) Vektörler (Gen taşıyıcı araçlar)

Vektörlerin büyük çoğunluğunu genetik mühendisliğince laboratuvar ortamında hazırlanmış viruslar oluşturur. Bu amaçla en sık kullanılan virus adenovirus, herpes simplex virusu ve retroviruslardır. Bu virüslerin çoğalma yetenekleri alındıktan sonra genetik materyal virus DNA’sına eklenir. Herpes

simplex virüsü birçok hücreyi enfekte eder ama nöronlardaki infeksiyonlarının uzun süreli olması nedeni ile gliyal tümörlerde tercih edilirler.(26)

i) İntihar Gen tedavisi (Enzim/önilaç sistemi)

Bu yaklaşım memeli organizmalarında bulunmayan bir enzimi kodlayan genin tümör içine sokulması ve ardından non-toksik bir ilacın sistemik olarak verilmesi esasına dayanır. Burada seçilen intihar geni normal memeli hücresinde bulunmayan bir reaksiyonu katalize eder. Bu reaksiyon sonucu non-toksik ön-ilaç selektif olarak toksik formuna dönüşür ve hücrenin ölümü gerçekleşir.

İnhibitör genlerinden en iyi bilinen herpes simplex virüsünün timidin kinaz genidir. Normalde insan vücudunda bulunmayan HSV-tk geni, timidin kinaz enzimini kodlar. Timidin kinaz enzimi nükleotid analoglarından gansikloviri (GSV) fosforile gansiklovire çevirir. Fosforile GSV çoğalan hücrelerin DNA zincirlerinin oluşumuna katılır. DNA polimeraz enziminin fonksiyonunu bloke ederek DNA zincirinin uzamasını durdurur. Bir başka deyişle, bu toksik GSV formu DNA zincir terminatörü olarak işlev görerek özellikle bölünen hücrelerin ölümüne neden olur.

Bu tedavi yönteminin çözülmesi gereken bazı problemleri vardır. Bunlar: özellikle derin yerleşimli invaziv tümörlerde yeterli sayıda tümör hücresinin transfekte edilememesi ve kan beyin bariyerinin intakt olduğu hallerde yeterli konsantrasyonlarda GSV'nin bu engeli geçip tümör hücresine ulaşamamasıdır.(27,28)

j) Rekombinant Tümör Aşıları

Bu aşılar transfekte edilen genlerin tümör hücreleri içine sokulmasıyla elde edilir. Böylelikle tümörün daha immünojenik olması sağlanır. Burada sitotoksik T lenfositlerin bu hücreleri tanıyarak aktif hale gelmesi düşüncesi ile hareket edilir. Bu teknik sadece tümöre karşı immün cevap ortaya çıkarmakla kalmaz aynı zamanda sistemik tümör cevap oluşturur. Rekombinant aşıların hazırlanması için cerrahi sırasında çıkarılan tümör hücreleri önce hücre kültürü ortamında çoğaltılır. Seçilen genler bu hücrelere transfekte edilir, sonra bu hücreler hastanın vücuduna verilir(29)

k) Kemoproteksiyon

Tüm kemoterapilerde olduğu gibi santral sinir sistemi tümörlerinin kemoterapisinde de yüksek doz ilaç kullanımına bağlı olarak ilaç toksisitesi oluşmakta, bunun sonucunda kemik iliği baskılanmaktadır. Bu problemi aşmak için MDR geni (multiple drug resistance gene) kemik iliği hücrelerine verilir. Böylelikle yüksek doz antikanser ilaçlara karşı kemik iliğinin baskılanması önlenmiş veya azaltılmış olur (25)

l) Antisens Tedavi

Bu tedavi yaklaşımı antisenslerin aracılık ettiği gen inhibisyonu esasına dayanır. Antisensler kısa DNA parçalarıdır. Bu yapılar, mRNA yapısına paralel (Watson-Crick baz çiftleri boyunca) hidrizedir. Antisensler mRNA'ya bağlanır, ribozomlara ulaşır onları bloke eder ve protein sentezini durdurur. Antisens DNA istenmeyen proteinlerin (örnek c-myc-onkoprotein gibi) mRNA'ları için spesifik olarak dizayn edilmiştir(27)

m) Angelica Sinensis Tedavi

Angelica sinensis (AS-C) kloroform ile oluşturulan eldesi; n-butyridenephthalide (BP) glioblastom hücreleri üzerinde p53' bağlı olan ve olmayan yollardan hücre apoptozunu arttırarak tümör büyümesine engel olmaktadır. İnsan kaynaklı glioblastoma hücre kültürü ve RG2 rat beyin tümörü modelinde AS-C'nin tümör hacmini düşürdüğü gözlenmiş olup Ki-67 değerlerinde azalma görülmüştür.(28,30)

1.14. Reküren Glioblastom Olgularında Tekrar Tedavi Seçeneği

Dört ve üzeri cerrahi tedavi uygulanan DSÖ Derece IV tümörlü hastalarda ortalama sağkalım 24.5 ay olarak bulunmuştur ki bu hastalar Karnofski performans skalası 70 üzeri ve tümör lokalizasyonu açısından seçilmiş hastalardı (31). Cerrahi tedavi sağkalımı uzatmakta fakat komplikasyon riskini arttırmakta, hatta bazı hastaların yaşam kalitesini daha da düşürmekte, ölüm ile bile sonlanabilmektedir. Hemiparezi, duyu kaybı, afazi, yara yeri enfeksiyonu, beyin omurilik sıvısı fistülü en sık görülen komplikasyonlardır (31,32)

1.15. Antiepileptik Tedavi ve Sağkalım Üzerine Etkisi

Nöbet glioblastomalı hastalarında siktir; tanı öncesi %30-50 hastada tanı öncesi, %6-45 cerrahi sonrası gözükmetedir. Sodyum valporat (VPA), fenitoin, karbamazepin ve levetrisetam glioblastomalı hastaların nöbet tedavisi için sık kullanılan ajanlardandır(31). Yapılan bir çalışmada sodyum valporat(VPA), topiramet ve levetrisetam metabolitlerinin histon deasetilazı inhibe ettiği gösterilmiştir(14)

Yapılan hayvan deneylerinde histon deasetilazın kanser hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve metastaz oluşumunda görev aldığı gösterilmiştir(14).

236 hastalık bir çalışmada VPA kullanan hastalarda belirgin sağkalım arttırdığı ($p<0.001$), karbamazepin sağkalımı VPA'e nazaran daha az arttırdığı ($p<0.05$), fenitoinin ise belirgin bir sağkalım artışına neden olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır(31)

1.16. Gen Tedavisindeki Zorluklar

Yeni bir tedavi yöntemi olduğu için gen tedavisinin bugün belirli sınırlamaları vardır. Yakın gelecekte bu sınırlamaların kaldırılabilceği ifade edilse de halen var olanları şu şekilde özetlemek mümkündür:

- Derin yerleşimli invaziv tümörleede terapötik genlerin yerlerine verilememesi.
- Hedef hücre tipine spesifitesinde yetersizlik.
- Kullanılan vektöre veya genlere karşı organizmada oluşan patolojik veya immünolojik cevaplar.
- Tedavi için hedef hücrelerin yeterince transfekte edilememesi.
- Transfekte edilen hücrelerde genlerin uzun süre bulundurulamaması.
- Uzun süre bulundurulabilse bile transgenin aşırı veya yetersiz ekspresyonu. (29)

1.17. Kan – Beyin Baryeri (KBB)

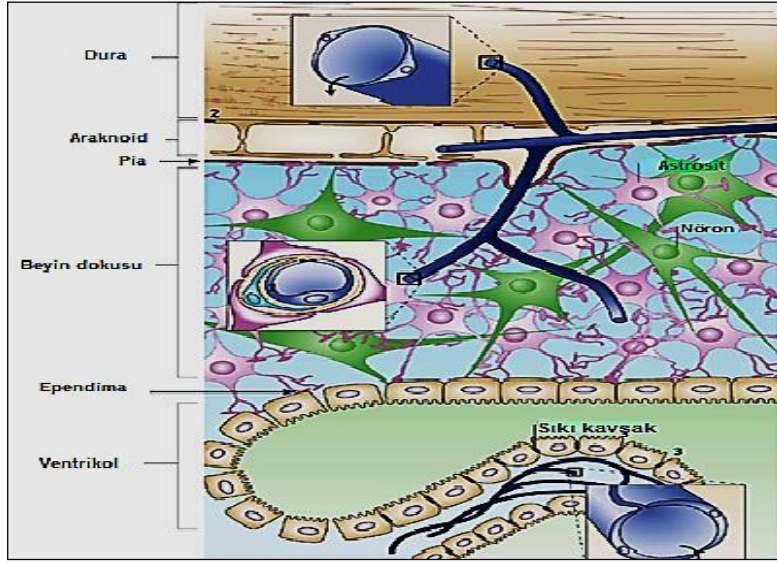
Kan beyin bariyeri beyin (KBB) kapillerlerinin luminal yüzeyini oluşturan sıkı kavşaklar (tight junctions) ile birbirlerine bağlanan endotel hücreleri, onları saran

perisit ve ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen, laminin ve heparan), en dışta ise astrositler ve perivasküler makrofajlardan meydana gelen bir engeldir.(35) Fenestrasyonların (endotel hücreleri arasında görülen boşluklar) bulunmaması, hücrelerarası sıkı kavşakların bulunması, pinositoz ve transitozun az olması, transsellüler transportun kısıtlı olması, ve çok sayıda mitokondri bulunması kan beyin bariyerini periferik endotelden farklı kılan özellikleridir.(35,36)

KBB'nin özellikleri:

- Kan ile santral sinir sistemi (SSS) arasında besinlerin ve suda çözünen maddelerin serbest alışverişini kısıtlamak.
- Toksin, patojen ve vücudun kendi immün hücrelerinin geçişini engelleyerek SSS'ni hasar ve hastalıktan korumak.
- Özel taşıma sistemleri aracılığı ile spesifik moleküllerin taşınmasını sağlamak.
- Kan ve/veya beyin kaynaklı maddelerin modifikasyonu/metabolizasyonunu sağlamak olarak sıralanabilir. (35)

Beyin kapillerinde değişim genellikle transsellüler yoldan olur. Pinostoz ve hücre içi geçiş yoktur. Bu nedenle sadece kapiller endotel membranından serbestçe diffüze olabilen, yağda çözünebilir ve küçük maddeler KBB'den pasif olarak geçebilir ki bunlar da taşıyıcılar tarafından SSS dışına taşınmaktadırlar(35). KBB'nin 12m² yüzey alanı ve toplamda 650 km uzunluğa sahip olmasına rağmen bariyer oldukça etkili olduğu için polar moleküller ve küçük iyonlar gibi yağda çözünmeyen maddelerin KBB'den geçişi pratik olarak imkansızdır. Bu nedenle terapötik değeri oldukça yüksek olan çoğu ilaç sistemik olarak kullanılamamaktadır. **(Resim8)**(35,36)



Resim 8. KBB şeması (36). Daneman, R., *The blood-brain barrier in health and disease*. Ann Neurol, 2012. 72(5): p. 648-72.

1.18. Beyin Tümörlerine İlaçların Ulaşımını Artırma Yöntemleri

Ozmotik şok uygulaması (intrakarotid hiperosmolar mannitol veya bradikinin enjeksiyonu) beyin tümörlerinde KBB'ni alt üst ederek SSS'ne kemoterapotik ajanlarının ulaşmasını sağlamaktadır. Fakat bu işlem nöbete veya inmeye neden olabilmekte ve önemli durumlarda kullanılması önerilmektedir.(35)

Geliştirilen insilün reseptör antikoları, Ox26 antikoları, lipozomlar, nanoparçlar ve dendrimerler üzerlerine yüklenen terapötik ajanları KBB geçerek SSS'ne taşıyabilmektedir. Fakat bu yöntemlerle terapötik ajanlar endotel hücrelerini geçebilsede, hedef hücreye ulaşabileceği garanti edilememektedir. (35,36)

Küçük moleküllerin hücre dışına çıkışını sağlayan taşıyıcıların verimliliğini azaltan ajanların kullanılması; verapamil, siklosporin A, quinidin, valspodar ve biricodar tedavinin etkinliğini arttırabilmektedir.(36)

İntra-arteryal ilaç enjeksiyonu, ilacın enjeksiyon sonrası SSS'ne yüksek konsantrasyonla ulaşmasına ve sistemik dolaşıma ulaşınca konsantrasyonunun düşmesine; yan etkilerinin azalması ilkesine dayanır. Fakar yapılan faz III çalışmasında anlamı klinik veri elde edilememiştir.(37,38)

Intratekal kemoterapi uygulaması eksternal ventriküler drenaj veya Ommaya rezervuar aracılığı ile ventriküle tedavi verilmesi, veya lomber ponksiyon aracılığı ile

Beyin omurilik sıvısına (BOS) tedavi verilmesi esasına dayanır. Düşük ilaç miktarına rağmen SSS’de yüksek konsantrasyon ve düşük sistemik yan etki elde edilir.

Konveksiyona dayalı tedavi direk tümör içerisine veya ameliyat lojuna KBB’ni geçemeyen büyüklükteki moleküllerden oluşan terapötik ajanların enjeksiyonudur. Stereotaksik olarak da yapılabilir. Fakat yapılan faz III çalışmasında bir faydalanım görülmemiştir (37,38,39).

1.19. Nanoteknoloji

Nanopartiküller partikül büyüklükleri 1-1000 nm arasında değişen, ilaçların içine hapsedildiği, yüzeye adsorbe ettirildiği ya da kovalent bağlarla bağlandığı makromoleküllerden oluşan katı kolloidal sistemlerdir (40).

Nanopartiküller, ilaç molekülünün limitleyici karakteristik özelliklerini maskeleyerek ve stabilitesini arttırarak membran bariyerleri aşmasını sağlarlar. Bu sistemler istenilen bölgeye ulaştığında ilaç salımı, desorpsiyon, nanopartikül matriksi ya da polimerik duvardan ilacın difüzyonu veya matriks/duvar erozyonu gibi mekanizmaların biri ya da birkaçı vasıtasıyla gerçekleşebilir (41).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef dokuda etki gösterebilmeleri için sistemin tasarımı oldukça önem taşımaktadır (41). Bu sistemlerdeki ana amaç, partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve etkin maddelerin salım kinetiklerinin kontrol edilerek ilacın etki bölgesine spesifik salımını terapötik olarak optimum dozda ve oranda sağlamaktır. Bu özellikleri sağlayan sistemler arasında, önceki bölümde de örnek olarak verilen lipozomlar kullanılsa da, düşük enkapsülasyon etkinliği, suda çözünen ilaçların dolaşımında hızlıca salınması ve zayıf saklama stabilitesi nedeniyle bu sistemlerin potansiyelleri sınırlıdır. Diğer yandan polimerik nanopartiküllerin lipozomlara ve diğer nano boyutlu sistemlere (nanokapsüller, miseller, katı lipit nanopartikülleri, vb.) karşı çeşitli spesifik üstünlükleri bulunmaktadır. Örnek olarak, nanopartiküller ilaçların (proteinler gibi makromoleküler yapıda olanlar da dahil) stabilitesini arttırırlar ve hedef bölgeye uygun, kontrollü salım profili gösterirler (42). Nanopartiküller polimerik yapıları sayesinde biyolojik sıvılarda ve saklama süresi boyunca lipozomlardan daha stabildirler(43).

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin sunduğu üstünlükler ;

- Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ya da yüzey özellikleri değiştirilerek aktif ya da pasif olarak hedeflendirilebilirler.
- Nanopartiküller, ilacın hedef bölgede salımını kontrol edip uzatabilir, organ dağılımını ve devamında klerensini değiştirebilir, dolayısıyla terapötik etkinlik artar ve yan etkiler azaltılabilir.
- Nanopartiküllerin yüzeyine hedeflendirici ligandlar bağlanarak ya da manyetik hedeflendiriciler kullanılarak spesifik hedeflendirme yapılabilir.
- Nanopartiküllerin matriks bileşenleri değiştirilerek kontrollü salım ve partikül degradasyon karakteristikleri değiştirilebilir. İlacı degradasyondan koruma özellikleri vardır.
- Nanopartiküllerin ilaç yüklenme kapasitesi yüksektir ve ilaçlar sisteme herhangi bir kimyasal reaksiyona girmeden yüklenebildikleri için aktiviteleri korunur.
- Nanopartiküller pek çok yoldan (oral, nasal, parenteral, intraoküler...) kullanılabilir.(44)

Nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılır. Doğal polimerler arasında lipitler, proteinler, karbonhidratlar; sentetik polimerler arasında da biyolojik olarak parçalanmayan ve parçalanmayan polimerler sayılabilir. Doğal polimerler (kitosan, aljinat, dekstran vb.) biyoparçalanabilir olmaları, metabolize edilebilmeleri, toksik bileşenler vermemeleri, stabiliteyi, büyüklük dağılımlarının kontrol edilebilir olmaları ve suda çözünen ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesi vermeleri nedeniyle tercih edilirler. Sentetik polimerler (poli(laktik-ko-glikolik)asit (PLGA); polilaktik asit (PLA), Eudragit vb.) ise istenilen spesifikasyonlara göre sentezlenebilmeleri, hazırlama ve saklama süresince dayanıklı olmaları, fazla miktarda ve yüksek saflıkta üretilenleri gibi üstünlüklerinden dolayı tercih edilirler (45).

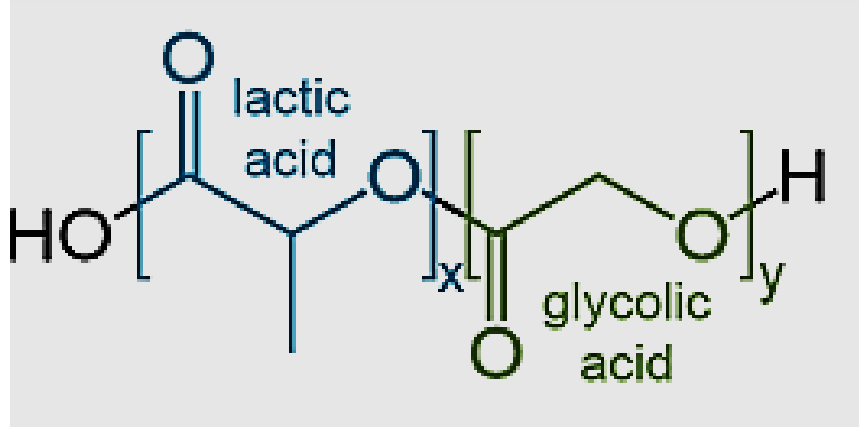
Sentetik polimerler arasında en çok kullanılan PLGA; molekül ağırlığı, kristal özelliği ve laktikglikolid oranı gibi özelliklere bağlı olarak farklı sürelerde biyoparçalanabilirlik özelliği sağlayabilen, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanma

ürünlerinin toksik olmadığı bir polimerdir. PLGA biyolojik olarak parçalandığında laktik ve glikolik asit meydana gelmektedir. Laktik asit, trikarboksilik asit döngüsüne girerek metabolize edilir ve enerji metabolizma döngüsünde CO₂ ve H₂O'ya dönüştürülür ve idrarla atılırlar (46). PLGA, fizyolojik ortamda inert, biyoparçalanabilir, biyouyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış bir biyomateryaldir. PLGA kopolimerleri gerek yağda gerekse suda çözünen ilaçların hapsedilebildiği nanopartikül sistemlerinin hazırlanmasında uygun taşıyıcılardır. Toksik olmayan metabolitlere dönüşen bu polimerler, beyne uygulanan uzun etkili ve kontrollü salım sistemlerinde de tercih edilmektedir (46).

1.20. Plga Nanopartikülün Özelliği

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), iki monomer, laktik asit ve glikolik asitten oluşur. Monomerlerin oranı ve molekül ağırlığı kimliği ve özellikleri ile ilişkilidir. Örneğin, PLGA88:12 polimer oluşur, yani % 88 laktik asit ve glikolik asit %12 yapılmıştır. Genel olarak, laktid birimleri yüzdesinin daha yüksek, daha fazlapolimerin, suyun varlığında kırılındır.

PLGA biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik uyumlu bir maleküldür. Monomerleri doğal olarak ortaya çıkarlar. Oldukça minimal toksiteye sahiptir. PLGA(kristaldeğildir) doğal olarakamorfür. Poli (laktik) ve poli (glikolik) asit en çözümlü içindeaz çözümlü olmakla birlikte, PLGA, tetrahidrofuran, aseton, etil asetat veکلرلر solventlerde dahil olmak üzerepek çözümlü bir çözümlü maddeçerisinde çözümlü. PLGA özellikle implant ve protez teknolojisinde, dikiş, gıda ve özellikle ilaç yüklü nanopartiküllerin teknolojisinde kullanılmaktadır. Buna örnek olarak prostat kanserinde kullanılan ilaç Leupron depottur.(47) (Resim9)



Resim 9. PLGA'nın formülü

1.21. Zerdaçal Nedir ve İçindeki Maddeler

Zerdeçal (zerdeçöp, zerdeçal, safran kökü, sarıboya, zerdeçav, hint safranı, CURCUMA LONGA L. Zingiberaceae) polifenolik bir bileşiktir. Zerdaçal sarı çiçekli, büyük yapraklı ve rizomlu çok yıllık otsu bir bitkidir. Başta Pakistan, Hindistan, Çin ve Bangladeş olmak üzere Asya'nın tropik bölgelerde yetişir.

Zerdeçal bitkisi, zencefil ailesine ait olup, en önemli etken maddesi "**Curcumin**"dir. Diğer iki curcuminoit çeşitleri, desmetilcurcumin ve bis-desmetil curcumin'dir. Bu iki curcuminoit çeşitleri de zerdaçalda bulunmaktadır. Curcumin'in iki tatomerik formları keto ve enol'dür. Katı faz ve çözelti enol şeklini dengelemektedir. Curcimin boron nicelendirmek için kullanılabilir.

Rosocyanine olarak bilinen kırmızı renkli bir bileşik oluşturan borik asit ile reaksiyonu ile Curcumin gıda renklendirici olarakta kullanılmaktadır. Gıda katkı maddesi E numarsı E100'dür. Piyasada parmak şeklinde (rizom) ve toz şeklinde bulunur. İçinde onlarca madde bulunur.

Zerdeçal tozunun yaklaşık 1:30- 1:100 kadarı curcumindir. 1 silme tatlı kaşığı zerdaçal 3 gramdır; ortalama 30-90 mg curcumin içerir. 200 mg/gün'lük dozlarda (yaklaşık 2-4 silme tatlı kaşığı toz) zerdaçalın **antiinflamatuvar, antikanserojen ve antiaterojenik** olduğu gösterilmiştir. Bilinen bir yan etkisi yoktur.(4,5) (Resim10)



Resim 10. Curcumin longa bitkisi ve toz hali

Zerdeçal'ın İçeriğindeki Etken Maddeler:

| | |
|--|--|
| » 1,8-CINEOLE (kgv) 30-720 ppm | » DIDESMETHOXYCURCUMIN (kgv) |
| » 2-BORNANOL (bt) | » DIDESMETHOXYCURCUMIN (kgv) |
| » 2-HYDROXY-METHYL-ANTHRAQUINONE (kgv) | » DIFERULOYL-» METHANE (kgv) |
| » 4-HYDROXY-CINNAMOYL-(FERULOYL)-METHANE (kgv) 180 ppm | » DIHYDROCURCUMIN (kgv) 57 ppm |
| » ALPHA-ATLANTONE (kgv) | » EO (kgv) 3,000-72,000 ppm |
| » ALPHA-PINENE (ey) 5,300 ppm | » EUGENOL (ey) 2,100 ppm |
| » ALPHA-TERPINEOL (kgv) | » FERULOYL-P-COUMAROYL-METHANE (kgv) |
| » AR-TURMERONE (kgv) 5,800 ppm | FOSFOR (kgv) 640-6,307 ppm |
| » ARABINOSE (kgv) 10,000 ppm | » FRUCTOSE (kgv) 120,000 ppm |
| » ASCORBIC-ACID (kgv) 0-293 ppm | » GAMMA-ATLANTONE (kgv) |
| » ASH (kgv) 9,000-148,000 ppm | » GLUCOSE (kgv) 280,000 ppm |
| » AZULENE (kgv) | » GUAIACOL (kgv) |
| » BAKIR (kgv) 6-17 ppm | » ISOBORNEOL (kgv) (ey) 200 ppm |
| » BETA-CAROTENE (kgv) | » KROM (kgv) 6 ppm |
| » BETA-PINENE (ey) 2,700 ppm | » KALSİYUM(kgv) 270-2,898 ppm |
| » BETA-SESQUIPELLANDRENE (kgv) | » L-ALPHA-CURCUMENE (kgv) 18,000 ppm |
| » BIS-(PARA-HYDROXY-CINNAMOYL)-METHANE (kgv) 1,360 ppm | » L-BETA-CURCUMENE (kgv) 18,000 ppm |
| » BIS-DESMETHOXYCURCUMIN (kgv) 67-27,000 ppm | » LIMONENE (ey) 2,300 ppm |
| » BISABOLENE (Kök) | » LİF(kgv) 9,000-84,000 ppm |
| » BORNEOL (kgv) | » LINALOL (ey) 1,600 ppm |
| » BORON (Kök) 1-6 ppm | » MANGANESE (kgv) 33-78 ppm |
| » CAFFEIC-ACID (kgv) 5 ppm | » MONODESMETHOXYCURCUMIN (kgv) |
| » CAPRYLIC-ACID (kgv) | » NIACIN (kgv) 5-62 ppm |
| » CARBOHYDRATES (kgv) 79,000-829,000 ppm | » NICKEL (kgv) 3.8 ppm |
| » CARYOPHYLLENE (ey) | » O-COUMARIC-ACID (yp) |
| » ÇİNKO (kgv) 22 ppm | » P-COUMARIC-ACID (kgv) 345 ppm |
| » CINEOLE (ey) 29,200 ppm | » P-CYMENE (kgv) |
| » CINNAMIC-ACID (kgv) | » P-METHOXYCINNAMIC-ACID (kgv) 360 ppm |
| » COBALT (kgv) 1 ppm | » P-TOLYMETHYLCARBINOL (kgv) 500-1,750 ppm |
| » CUMINYL-ALCOHOL (kgv) | » POTASSIUM (kgv) 4,870-41,271 ppm |
| » CURCUMENE (ey) 121,700 ppm | » PROTEIN (kgv) 12,000-306,000 ppm |
| » CURCUMENOL (ey) 21,300 ppm | » PROTOCATECHUIC-ACID (yp) |
| » CURCUMIN (kgv) 9-38,888 ppm | » RESIN (kgv) |
| » CURDIONE (ey) 11,900 ppm | » RIBOFLAVIN (kgv) 0-12 ppm |
| » CURLONE (kgv) 120 ppm | » SODYUM (kgv) 30-4,290 ppm |
| » CURZERENONE (kgv) | » SU (kgv) 133,000 ppm |
| » CURZERENONE-C (ey) 20,400 ppm | |

| | |
|--|------------------------------------|
| » CYCLO-ISOPRENYMYRCENE (kgv) 8,500-29,750 ppm | » SYRINGIC-ACID (yp) |
| » D-ALPHA-PHELLANDRENE (kgv) 30-720 ppm | » TERPINENE (ey) 27,200 ppm |
| » D-CAMPHENE (kgv) 480 ppm | » TERPINEOL (ey) 500 ppm |
| » D-CAMPHOR (kgv) 30-1,500 ppm | » THIAMIN (kgv) 0-8 ppm |
| » D-SABINENE (kgv) 20-432 ppm | » TURMERONE (kgv) 1,800-43,200 ppm |
| » DEHYDROTURMERONE (kgv) | » UKONAN-A (kgv) 33-6,600 ppm |
| » DEMİR (kgv) 121-467 ppm | » UKONAN-B (kgv) 47 ppm |
| » DESMETHOXYCURCUMIN (kgv) 500-11,100 ppm | » UKONAN-C (kgv) 52 ppm |
| » DI-P-COUMAROYL-METHANE (kgv) | » UKONAN-D (kgv) |
| » DICINNAMOYLMETHANE (kgv) | » VANILLIC-ACID (yp) |
| | » YAĞ (kgv) 18,000-153,000 ppm |
| | » ZINGIBERENE (kgv) 750-18,000 ppm |

1.22. Curcumin Ve Genel Özellikleri

Curcumin, zerdeçal olarak da bilinen hint safranı baharatında bulunan bir etkin madde.

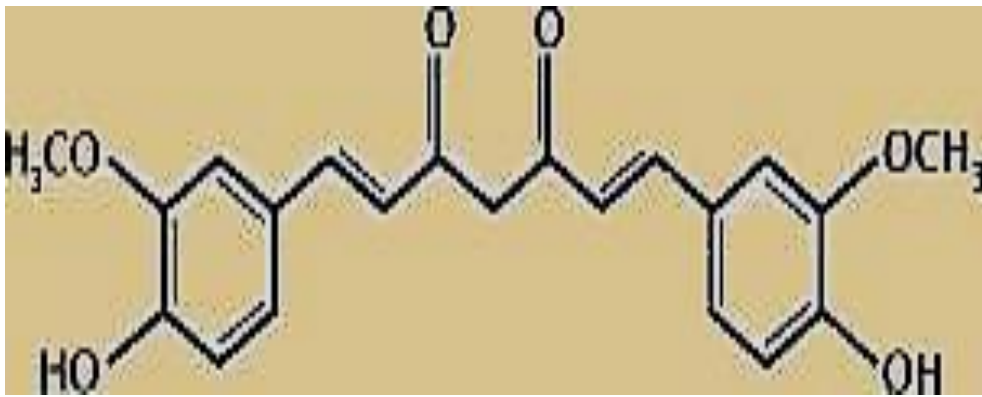
Formül: C₂₁H₂₀O₆' dir(**Resim 12**)

Molar kütle: 368,38 g/mol'dür

Erime noktası: 183 °C' dir

IUPAC Kimliği: (1E,6E)-1,7-bis (4-hydroxy- 3-methoxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione'dir

Aktif bileşenlerinde flavonoid curcumin (diferuloylmethane) ve tumerone, atlantane ve zingiberone dahil olmak üzere çeşitli uçucu yağlar bulunmaktadır. Diğer bileşenleri ise şekerler, proteinler ve reçineleri içerir. Ham zerdeçalın içerisinde 0.3-5.4 oranında curcumin bulunmaktadır..



Resim 11. Curcumin'in kimyasal formülü (4,5)

Curcuminin farmokenetiği

Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda curcumin'in 40-85 oranında bağırsak mukozasında ve karaciğerde metabolize olan absorbe flavonoidlerin çoğu, sindirim kanalından değişmeden geçtiğini göstermiştir. Emilim oranı düşük olması nedeniyle, curcimin genellikle emme ve gelişmiş antiinflamatuvar etki için bromelain ile formüle edilmiştir (4,5).

Curcumin ve antitümöral etkinliği:

Curcumin Doğu Asya ve Hindistan mutfağında kullanılan curcumin longo aktif bileşeni olup, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antikanser özellikleri olan çok fonksiyonlu ilaçtır. Birçok çalışmada curcuminin insanlardaki farmokinetiğın, güvenliğin ve etkinliği ortaya konulmuştur. Son zamanlarda curcuminin antikanser aktivitesi gösterilmiş kanser tedavisindeki potansiyeli vurgulanmıştır.

Curcumin deney hayvanlarında induklenen deri ve gastrointestinal sistem tümörlerinde boyutlarında küçülme sağlamıştır.

Curcumin Bcl2 inhibe ve Caspase 9 aktive ederek apoptozu indukler ve aynı zamanda MAPK, AKT ve mTOR gibi birçok hücre proliferasyonu yollarını bloke eder . Curcumin glioma başlatıcı hücrelerinde diferansiyasyon yapıcı ve otofaji indukleyerek tümör süprese edici etkide bulunduğu gösterilmiştir.

Curcumin invitro (U138MG, U87, U373 ve C6 hatları) ve invivo (C6 inplant) deneysel glioblastom modellerinde tümör hücrelerin büyümesi selektif olarak inhibe etmektedir. Başka bir çalışmada curcuminin telomerazı inhibe ettiği ve telomer salmasını ve apoptozu induklediği ortaya konulmuştur.

Diğer bir çalışmada diyet ile alınan Curcuminin farelerde JAK 1,2/STAT3 sinyal yolu inhibisyonu üzerinden etki ederek glial tümör büyümesi yavaşlattığı gösterilmiştir.

Bütün bunların yanında Curcuminin hidrofobikliğinin yüksek olması, biyoyararlanımı ve klinik etkisi sınırlamaktadır. Biyodegradabl polimerler kullanarak lokalize ve kontrollü salınımı ile bu dezajantaj aşılabılır. Curcumin yüklü PCL – PEG- PCL(PCEC) nanofiberlerin tümör dokusunda lokalize olarak uzun süreli antitümör aktivite gösterebildiği bildirilmiştir.

Ayrıca Curcuminin lipid-çekirdek nanokapsüller ile kaplanması gliom tedavisinde farmakolojik etkinliğin artırılmasında önemli bir strateji olduğu gösterilmiştir.

Yaptığımız deneysel çalışmada; Wistar sıçanda RG2 glioma hücreleri ile beyinde tümör oluşturularak tümörün gelişimini MR ile takip etmek, tümör oluştuktan sonra nanopartiküle yüklenmiş curcuminin intarümöral ve intravenöz yolla uygulanması ve etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. YÖNTEM VE GEREÇLER

2.1 Araç ve Gereçler

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 5. Kullanılan kimyasal maddeler

| | |
|--|--|
| DMEM F12 (Lonza) | BioWhittaker™ Cell Culture Media products, İsviçre |
| “Dulbecco’s Modified Eagle’s/ Ham’s F12” (DMEM/Ham’s F12)(1:1) | Biochrom AG, Almanya |
| Etanol (%100) | Merck, Almanya |
| Fetal sıgır serumu (FBS) | Biochrom AG, Almanya |
| Floresan Nanoparça | Bilkent Üni. Kimya Bölümü |
| Formaldehit | Vural Medikal, Türkiye |
| Hoechst | Molecular Probes, ABD |
| Ketamin %10 10ml flakon | Richterpharma AG Avusturya |
| Ksilazin %2 50 ml flakon | Alfasan International BV Hollanda |
| L-glutamin | Biochrom AG, Almanya |
| MTT | Sigma, ABD |
| Penisilin/Streptomisin (10000U/10000µg/ml) | Biochrom AG, Almanya |
| Tripsin-EDTA çözeltisi | Biochrom AG, Almanya |
| Xylene | Merck, Almanya |

Kullanılan Aletler

Tablo 6. Kullanılan aletler

| | |
|--|---|
| Dijial Kamera | Nikon DXM 1200, Japonya |
| Floresan Mikroskop | Nikon Eclipse E 600, Japonya |
| Hassas Terazi | Shimadzu AX 200, Japonya |
| Hamiltom 10µL Enjektör | Hamilton Messtechnik GmbH, Almanya |
| Hücre Kültürü için Flask | Greiner bio-one, Almanya |
| Hücre Kültür Kuyucukları | Greiner bio-one, Almanya |
| Işık Mikroskobu | Leica, Almanya |
| İnkübatör | Sanyo MCO-18AIC, Japonya |
| Laminar Hava Akımlı Kültür Kabini | BHG 2000 S/D, D:: Grou Company, Almanya |
| Menbran Filtre | Millipore, ABD |
| Mikropipet | Eppendorf, Almanya |
| pH metre | Sartorius, Almanya |
| Santrifüj, soğutmalı, değişken rotorlu | Hermle Z383 K, Almanya |
| Steril Pipet | Greiner bio-one, Almanya |
| Steril Santrifüj Tüpü | Greiner bio-one, Almanya |
| Surgical Blade, Braun | Braun, Almanya |
| Rat stereotaxic standart | Stoelting, Chicago, ABD |
| Ultra Saf Su Sistemi | Simplicity 185-Millipore, ABD |

Kullanılan Yazılımlar

Tablo 7. Kullanılan Yazılımlar

| | |
|-----------------------------------|---|
| Mikroskop dijital kamera yazılımı | Nikon Advanced Research 3.2, Japonya |
|-----------------------------------|---|

2.1.2. Curcumin Yüklü Nanopartikülerin Hazırlanması

İlaç taşıyıcı sistem olarak curcumin yüklü poli(laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) hibrit nanopartikülleri kullanılmıştır. Hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında polimer olarak PLGA (85:15, kopolimer oranında) ve lipid-PEG konjugatı olarak 2000 Da`luk PEG zinciri içeren 1,2-distearoil-glisero-3 fosfoetanolamin-N-[metoksi (polietilen glikol) - 2000] (amonyum tuzu) kopolimeri (DSPE-PEG) kullanılmıştır. Curcumin yüklü PLGA-DSPE-PEG hibrit nanopartikülleri emülsiyon sonikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Bunun için PLGA asetonitrilde çözülerek (2,5 µg/ml) organik faz hazırlanmıştır. Curcumin içeren formülasyonlarda formülasyondaki polimer oranının %5, %10 veya %20`si olacak şekilde curcumin organik faza eklenmiştir. Sulu fazın hazırlanması için, lesitin ve DSPE-PEG ayrı ayrı %4 etanolde çözülecek, daha sonra bu çözeltilerden belirli miktarlarda alınarak deiyonize su ile karıştırılarak sulu faz elde edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan sulu faz organik faza ilave edilerek kapalı bir flakon içine alınacak ve ultrasonik banyoda 5 dakika sonikasyona (42 kHz, 100 W) tabi tutulmuştur. Oluşan nanopartiküller 10 kDa` luk molekül büyüklüğü geçirgenliğine sahip membran içeren filtreli santrifüj tüplerinde (Millipore, 10 kDa) santrifüj edilecek ve tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (pH 7,4) kullanılarak 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen nanopartikül dispersiyonları -80 C° de dondurulacak ve 24 saat liyofilize edilmiştir.

2.1.3. İn Vivo Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar Ve Anestezi

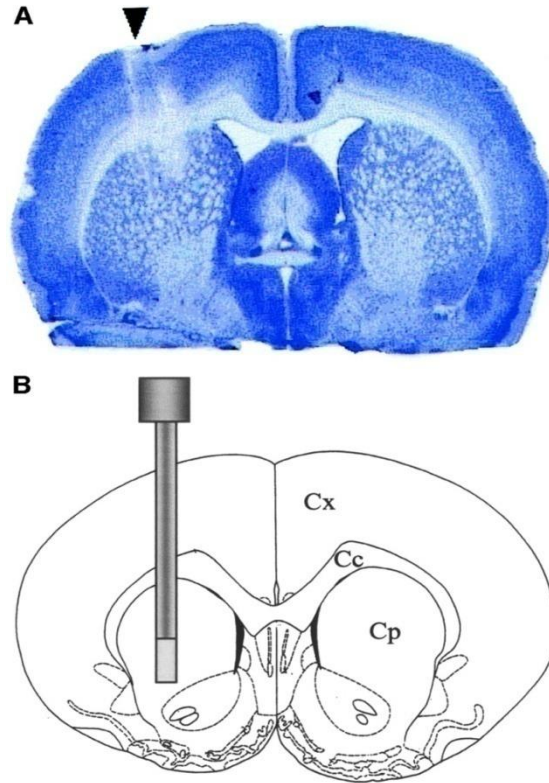
In vivo çalışmaların gerçekleştirilmesi için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu`ndan 2012/48(düzeltilmiş) nolu izin alınmıştır. Çalışmalarda Yemişçi ve ark.(48) ve Gelenetky ve ark.(49) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için 48 adet Wistar dişi sıçan (250-

300 gr.) üzerinde çalışılmıştır. Ayrıca ratlara düzenli olarak immunosupresif olarak 5 gün siklosporin 0.05 mg dozunda verilmiştir. Sıçanlara anestezi amacı ile 80 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin karışımı intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sıçanlar standart kafeslerde ve standart şartlarda tutulmuştur

2.1.4. Sıçanlarda Beyin Tümörü Oluşturması

Sıçanlarda beyin tümörü oluşturulması amacıyla Yemişçi ve ark. (29) ve Gelenetky ve ark. (28) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için öncelikle tümör ekiminde kullanılacak olan RG2 hücreleri hazırlanmıştır. RG2 hücreleri için kültür ortamı olarak 37⁰C de %5 CO₂'de glukoz (4.5 g.L⁻¹), fetal sığır serumu (FBS) (%10), L-glutamin (0.584 g.L⁻¹), sodyum pirüvat (0.11 g.L⁻¹), penisilin G sodyum (50 üniteml⁻¹) ve streptomisin sülfat (50µg.ml⁻¹) içeren "Dulbecco's Modified Eagle's" (DMEM) kullanılmıştır. Hücreler deney öncesi tripsin-EDTA çözeltisi (%0.002 tripsin-%0.005 EDTA) ile 2 dakika muamele edilerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonuna kültür ortamı ilave edilerek 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve taze kültür ortamı ilave edildikten sonra mikroskopta sayımı yapılmış ve 5µL'de 50x10⁴ RG2 hücresi olacak şekilde numuneler ekim için hazırlanmıştır.

Sıçanlara beyin tümörü oluşturmak için, öncelikle sıçanlar stereotaktik çerçeveye (Lab Standard Stereotaxic, Stoelting, Chicago, IL) yerleştirilmiştir. Kafa derisi açıldıktan sonra, 50x10⁴ RG2 hücresi içeren 5µL hücre süspansiyonu, 10µL'lik Hamilton cam şırınga (Hamilton, 32G, 700 seri RN) kullanılarak bregmanın 4mm lateral, 2mm posterior lokalizasyonda 6mm derinliğe sağ striatuma enjekte edilmiştir (Resim12, 13.).



Resim 12. Stereotaksik yöntemle enjeksiyon A. Enjeksiyon sonra koronal kesit; B. Striatuma enjeksiyonun şematik görünümü



Resim 13. Stereotaksi cihazında sıçan beynine tümör hücreci enjekte edilmesi.

Sıçanlara RG2 hücre implantasyonunun ilk gününden itibaren günlük aktivitelerinin ve genel durumlarının takibi amacı ile gözlem altına alınmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonrasında etrafı ile ilgileri kesilen, kendi kendilerine beslenemeyen, gözleri kızaran ve dışarıdan verilen uyarılara yanıt vermeyen sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

2.1.5. Deney Hayvanı Olarak Sıçan Seçilmesi Nedeni

Sıçan beyninin fareye nazaran daha büyük olması (1200mg karşı 400 mg), ölüme kadar geçen sürede daha büyük tümör boyutlarına ulaşılması; dolayısıyla daha iyi cerrahi, görüntüleme ve tedavi teknikleri uygulanması, literatürde daha geniş bilgi olması, yapılacak deneyde sıçan kullanılmasının avantajlarıdır. Sıçanların daha pahalı olması, beyin tümörü modellerinin genetik mühendisliğinin zor olması ve sayıca azlığı ise dezavantajdır. Bilmek gerekir ki hiçbir hayvan beyin tümörü modeli glioblastomayı birebir taklit edememektedir

2.1.6. RG2 Rat Gliomu

RG2 sıçan gliomu hamile fischer sıçana N-etil-nitrozüre enjeksiyonu yapılarak oluşturuldu. Yüksek derecede invazyon göstermesi glioblastomayı iyi temsil eden bir model olmasını sağlamıştır. Genetik çalışmalar IGF-1, ras, PDGFβ, Erb3/HER3 mRNA ve siklin D2 ekspresyonunun arttığını göstermiştir.

2.1.7. Deney Hayvanlarına Magnetik Rezonans Görüntüleme Yapılması

Magnetik rezonans görüntüleme (MRG) iyonizan radyasyon kullanmadan yüksek rezolüsyonları anatomik görüntülemeler elde etmemizi sağlar. MRG bir örneğe veya hastaya iyi ayarlanmış radyofrekans vererek H protonlarının relaksasyonunu izlenmesine dayanır. Aynı zamanda MRG proton yoğunluğunu, difüzyon sürecini görüntülemeye de kullanılır.

Faucher ve arkadaşları glioblastoma hücrelerini bir kontrast ajan olan gadolinium oksit ile işaretlemiş ve tavuk embriyo modelinde kontrast tutan tümörü görüntülemiştir.

İn vivo deneylerde tümör oluşumunun tespiti ve alan olarak büyüklüğünün hesaplanması için Manyetik Rezonans Görüntüleme kullanılmıştır. Bunun için

Bilkent Üniversitesi “Ulusal Manyetik Rezonans Araştırma Merkezi (UMRAM)’nde bulunan MR görüntüleme cihazı (3 Tesla, Magnetom Trio, Siemens, Almanya [slew rate:200mT/m/ms, maksimum amplitude 45mT/m] kullanılmıştır.

Tümör hücresi ekimini takiben 10. Ve 15. günde sıçanlara MRG görüntülemesi yapılarak tümör oluşumunun tespiti ve alan ölçümü yapılmıştır. Görüntüleme sırasında sıçanlara anestezi uygulaması yapılmış olup, küçük FOV ile görüntü elde edebilmek için bu çalışmada kullanılmak üzere UMRAM’da küçük sarmallar (koil) geliştirilmiş ve kullanılmıştır.

MRG görüntülemesi için, 2 mm aksiyel düzlemde çekim sayısı (NEX: 5), T2A (TR/TE 3900/100ms) aksiyel görüntüler elde edilmiştir. Görüntünün değerlendirilmesi ve tümör alanının tespiti Hacettepe Üniversitesi Radyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Ölçümler tümörün en büyük görüldüğü kesit üzerinde en büyük çaplar hesaplanarak yapılmıştır.(Resim14, 15)



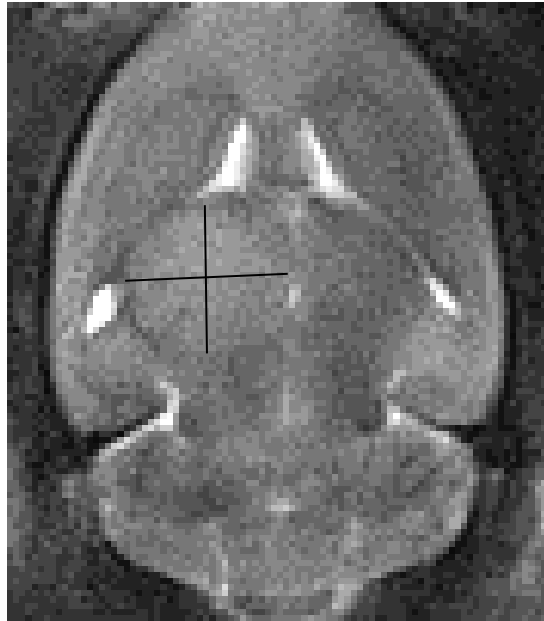
Resim 14. Sıçan ve sıçan için geliştirilen sarmal.



Resim 15. Siemens 3 Tesla MRG

2.1.8. MRG İle Tümör Tespiti

Sıçanlara tümör hücresi ekiminden 10 gün sonra MRG görüntüleme yapılarak oluşan tümörün başlangıç büyüklüğü tespit edilmiştir. Bu işlemi takiben, tümör taşıyan sıçanlara curcuminenjeksiyonu yapılmıştır, kontrol grubuna uygulanmadı. Curcumin uygulamasından 5 gün sonra MRG görüntüleme tekrarı yapılarak nanopartiküle yüklü curcuminenjeksiyonu sonrası tümör alınındaki değişim tespit edilip, başlangıçtaki büyüklüğü ile karşılaştırma yapılmıştır.(Resim16)



Resim 16. Sıçanlarda beyin MRG görüntülenmesi ve tümör boyutunun ölçülmesi

2.1.9. Histopatolojik Değerlendirme

Sıçanlarda MRG ile tespit edilen tümör oluşumunun teyidi için histopatolojik çalışma yapılmıştır. Bunun için, sıçanlara uygulana son MRG görüntüleme sonrası aynı gün sıçanlar sakrifiye edilmiş ve beyinleri çıkarılarak %10'luk formalin içinde tespit edilmiştir. Daha sonra beyinler 2 mm'lik parçalara ayrılarak parafine gömülmüştür. Bu işlemi takiben, parafine gömülmüş parçalar 6µm'lik kesitlere ayrılmış ve her bir kesit Hematoksilen Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda Hacettepe Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından incelenerek tümör varlığı değerlendirildi.

2.1.10. Sıçanlarda Deney Grupların Oluşturulması

Sıçanlara tümör ekiminden 10 gün sonra ilk MRG görüntülemesi yapılarak tümör oluşumu tespit edilmiş ve alan hesabı yapılmıştır. Görüntülemeye tümör boyutu 15 mm² üzerindeki olan sıçanlar nanopartikül işaretli curcumin enjeksiyonlar yapılacak gruplara ayrılmıştır. Nanopartikül(NP) işaretli curcumin enjeksiyonlar, MRG görüntülemeye tümör tespiti yapılan aynı gün içerisinde uygulanmıştır.

Nanoparça ile işaretlenmiş curcumin hayvanlara verilmeden önce steril tüp içerisine konup, tüp tüm enjeksiyonlar bitene kadar buzlu su içerisinde muhafaza edilmiştir.

Bu hacim intrahemisferik ve intravenöz uygulamalar için sıçanların tolere edebileceği maksimum miktar olarak ön denemelerde tespit edilmiştir.

Gruplar:

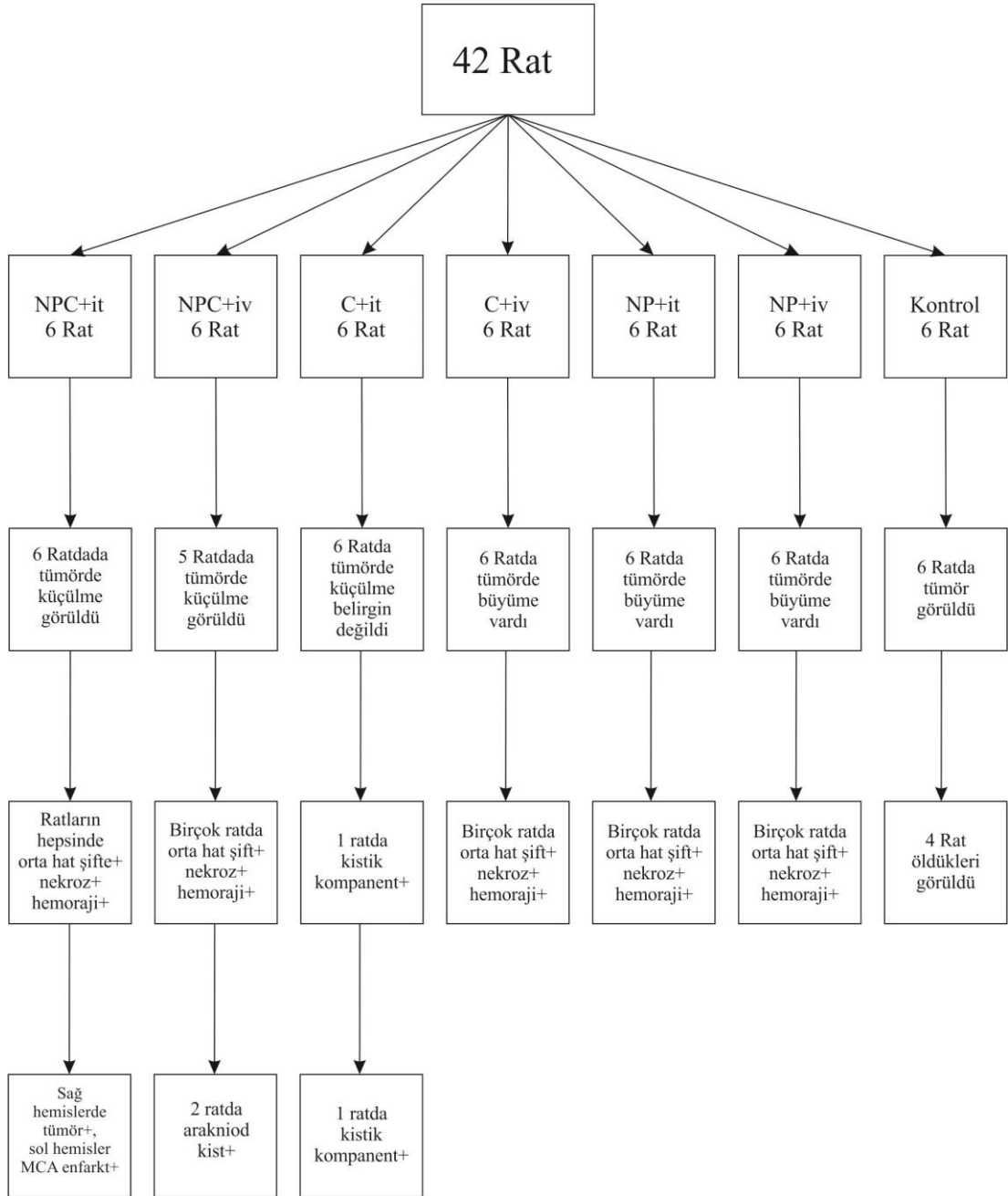
1. Tümör (kontrol)
2. Tümör + Boş nanopartikül(NP) (intratümöral)
3. Tümör + Boş nanopatikül(NP) (intravenöz)
4. Tümör + Curcumin (intratümöral)
5. Tümör + Curcumin (intravenöz)
6. Tümör + Curcumin-NP (intratümöral)
7. Tümör + Curcumin-NP (intravenöz)

3. BULGULAR

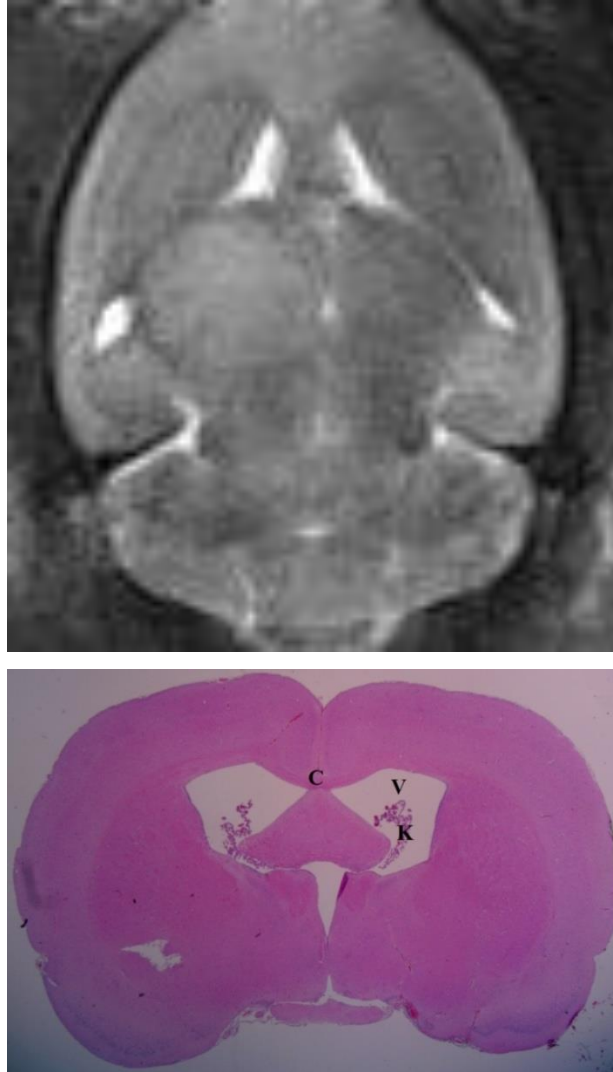
MRG BULGULARI

Yapılan çalışmada kontrol gruplarında 6 sıçanda tümör oluşumu görüldü. Daha sonra oluşan tümör gruplarına nanopartiküle yüklü curcumin intraserebral ve intravenöz ekimi yapıldı. Özellikle nanopartiküle yüklü curcuminin intaserebral ekimlerinden sonra çekilen kontrol kranial MRG'da tümör gruplarında tümörün küçüldüğü görüldü. Nanopartiküle yüklü curcuminin intravenöz ekimlerinden sonra çekilen kranial MRG'de belirgin küçülme görülmedi. Daha sonra oluşan tümör grubuna boş nanopartikül ve curcumin intaserebral ve intravenöz ekimleri yapıldı. Ancak çekilen kontrol kranial MRG'da tümölerinde küçülme olmadı, hatta tümörlerde büyüme görüldü. 4 adet sıçan ise MRG öncesinde öldükleri görüldü. Ölümünün nedeni olarak herniasyon olarak düşünüldü. Kranial MRG çekilmiş bir sıçanda tümörün büyüdüğü ve orta hat şifte sebep olduğu görüldü. Tümör gruplarında oluşan tümör homojendi. Birçok tümör sıçanlarında çekilen kranial MRG'da beyin tümörünün büyüdüğü ve orta hat shift olduğu görüldü. Tümör gruplarının ekim yerlerinde hemoraji, santral nekrozları mevcuttu. Bir adet sıçanda ise tümör lojunda kistik komponent mevcuttu. İki adet sıçanda kranial MRG'da tümöre bağlı ventrikülomegali görüldü. Bir sıçan da ise kranial MRG'da tümör ile birlikte arakniod kist görüldü. Bir sıçanda ise sağ hemisferde tümör olduğu görülürken karşı hemisferde MCA sulama alanında enfarkt görüldü. Bir sıçanda ise orta hattı geçip karşı hemisfere de tümör olduğu görüldü. Histopatolojik incelemesinde ise özellikle nanopartiküle yüklü curcumin enjekte edilmiş tümör gruplarında tümör regrese olan yerlerde makrofajlarda artış görüldü. Tümör oluşmuş sıçanların izlemlerinde özellikle başlarını atma tarzında nöbetleri görüldü. Tümör ekimden 5 gün sonra ise sıçanların nörolojik muayene değerlendirmesinde ise sol tarafta ekstremitelerinde ise hemiparezi görüldü. Sıçanlarda tümör görülme oranı %67 idi **(Resim17-18)**

MR BULGULAR

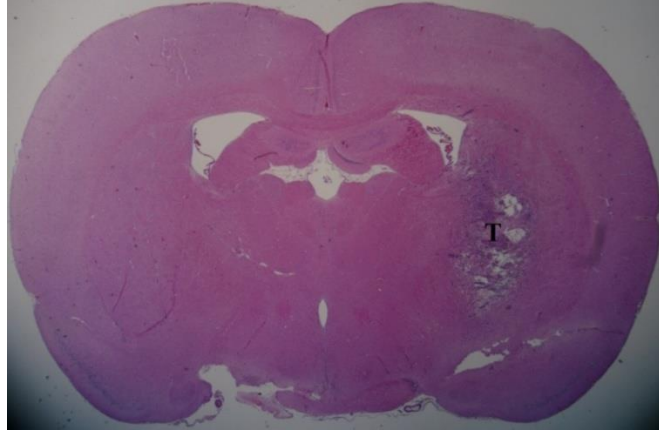


1. KONTROL TUMÖR GRUBU: MRG İLE TUMÖR VARLIĞI TESPİTİ

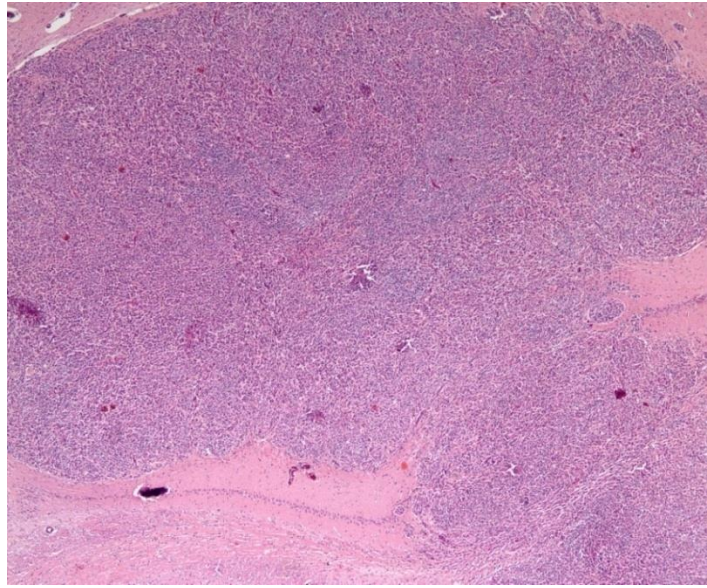


Resim 17. Tumor oluşmamış sıçan beynine ait kesitlerin Hematoksilen Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek (10 X büyütme ile). C: corpus callosum, V: ventrikül, K: Koroid pleksus

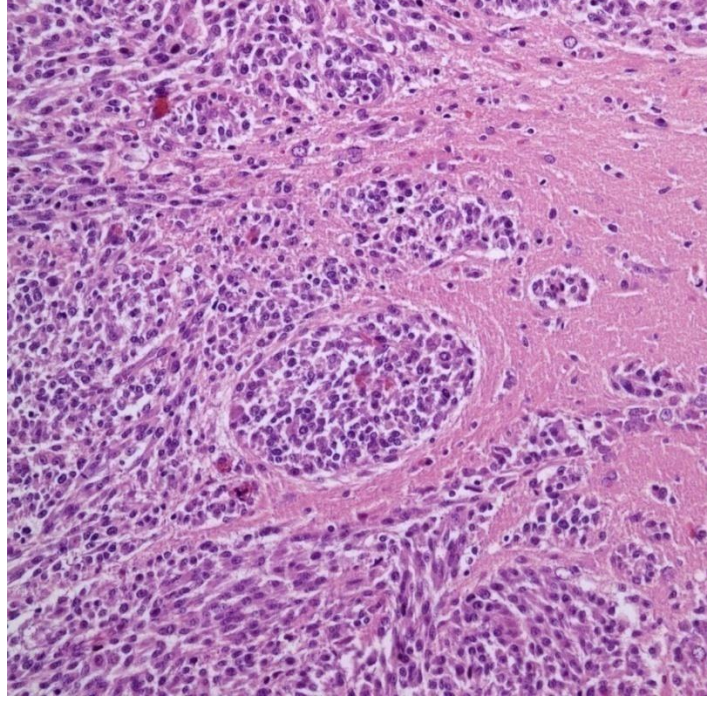
Kontrol grubu: histopatolojik olarak tümör tespiti



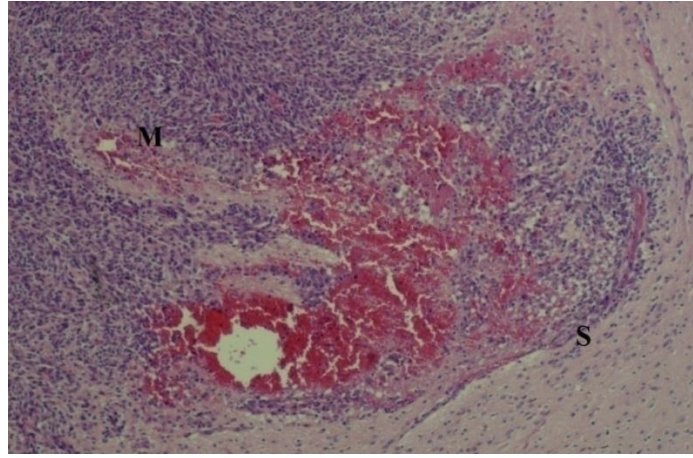
Resim 18. Tümör oluşmuş, sıçan beynine ait kesitlerin Hematoksilen Eosin boyası ile boyanması sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine ait bir örnek (10 X büyütme ile). T: Tümör



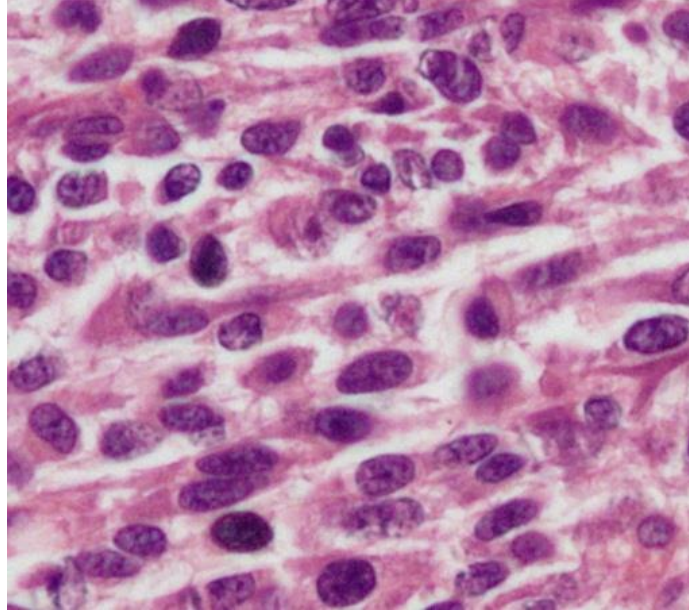
Resim 19. 40 X büyütmede alttaki tümör odağı



Resim 20. 100 X büyütmelerde Tumor alanı içerisinde nekroz alanları ve pleomorfizm

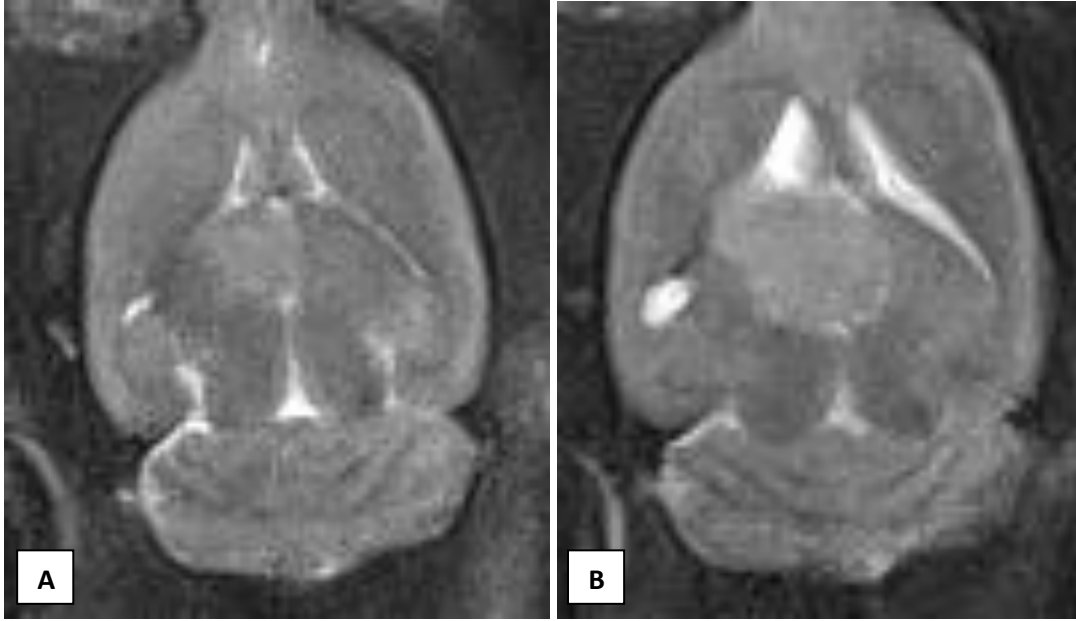


Resim 21. 100 X büyütmelerde daire ile işaretlenmiş alan. Mikrovasküler proliferasyon (M) ve tümör sınırı (kapsülü) (S) görülüyor.

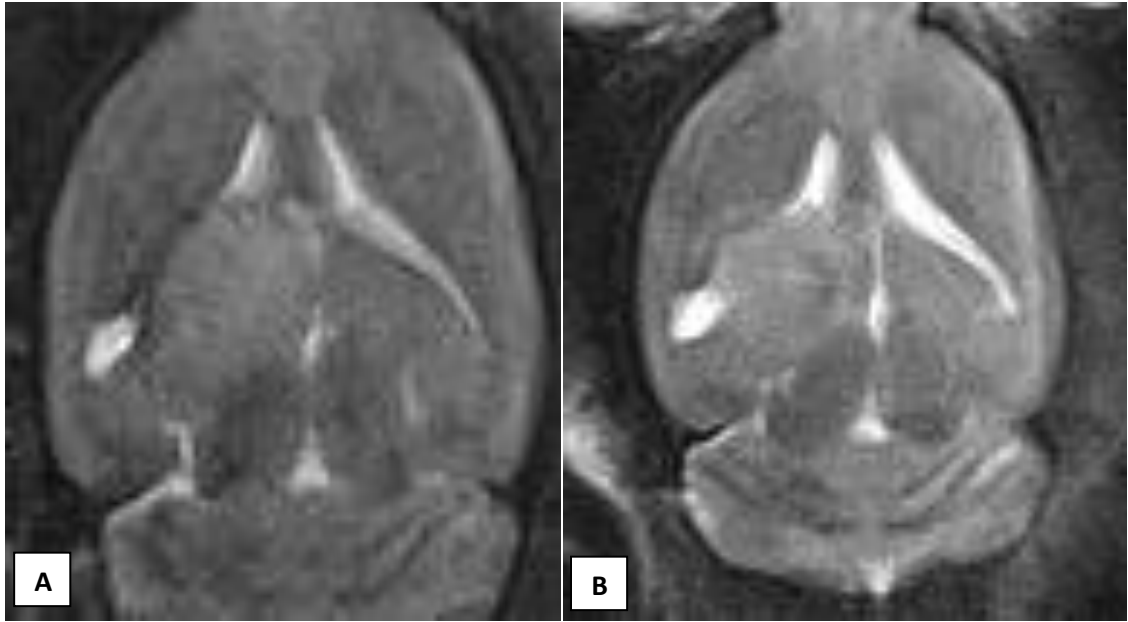


Resim 22. 400 X büyütmelerdeTümör alanı içerisinde tümör hücreleri. Oluşan tümörün hücre çekirdeklerinin pleomorfik olduğu ve hemoraji, nekroz, mikrovasküler proliferasyon gibi glioblastoma tanısında önemli kriterlere sahip tümörler olduğu histopatolojik olarak gösterildi. Tümörler tamamıyla tümör hücrelerinden oluşmakta ve inflammatuar yanıt görülmemektedir

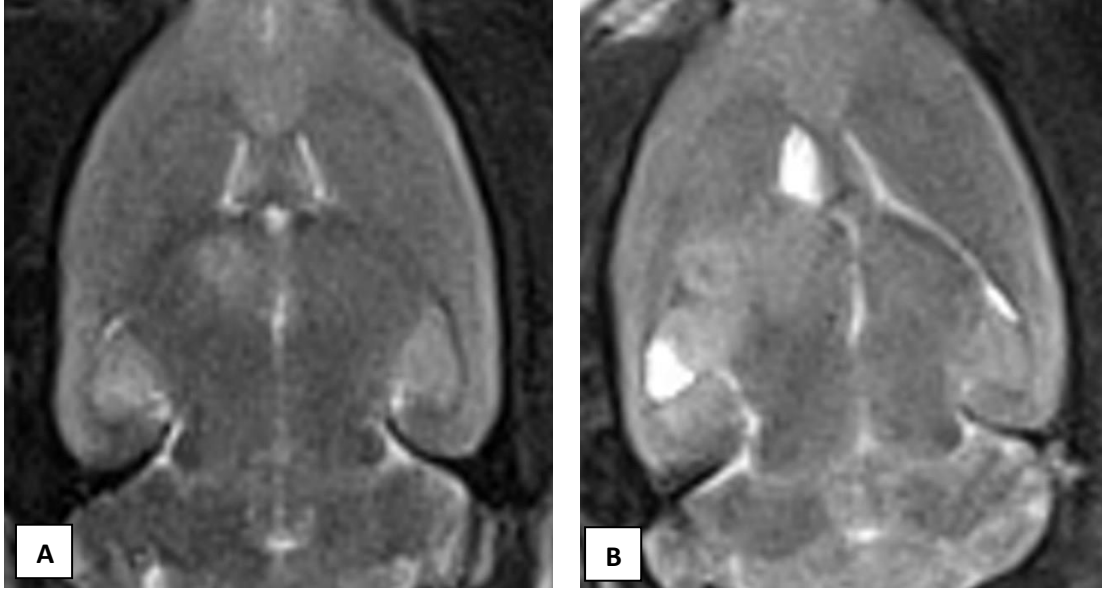
Sham Grupları ve Denev Grupların Tedavi öncesi ve Tedavi Sonrası MR Görüntüleri



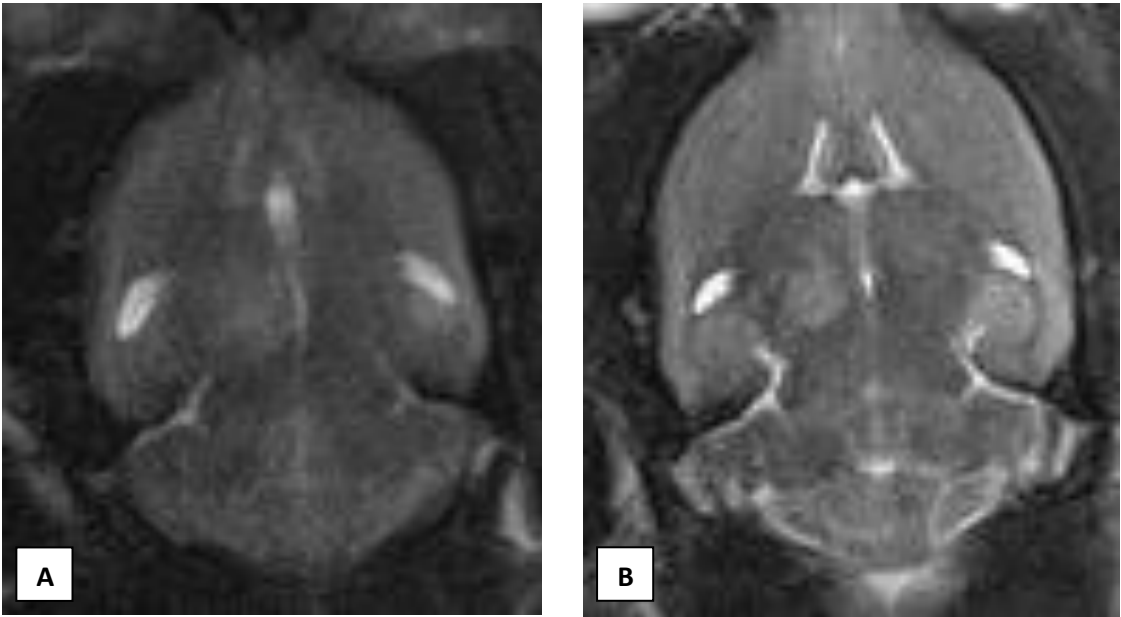
Resim 23. Sham grubu 1: MRG ile Tümör + boş nanopartikül intraserebral enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B)



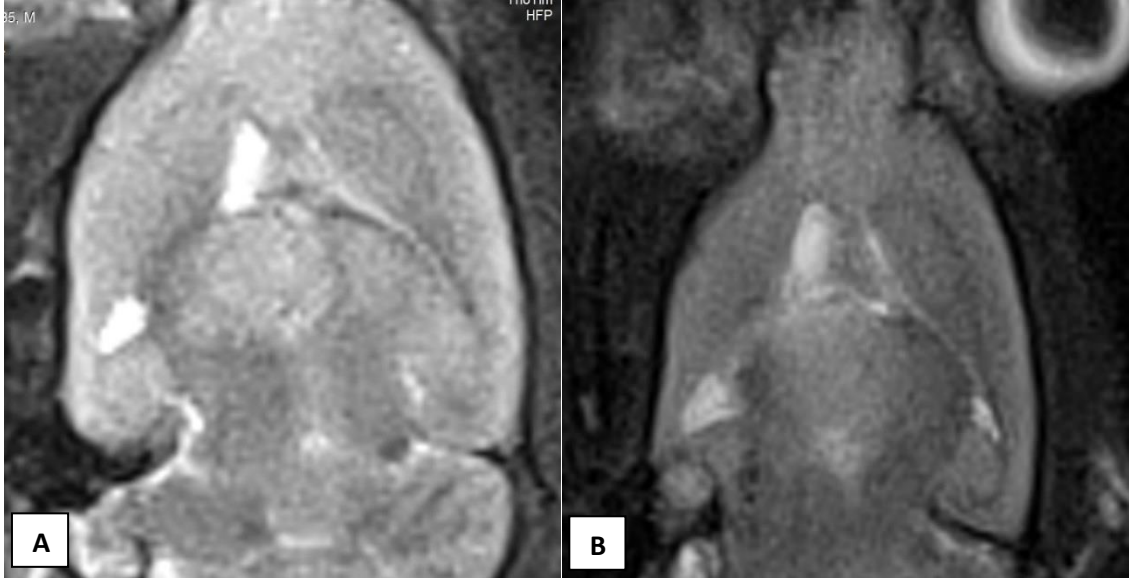
Resim 24. Sham grubu 2: MRG ile Tümör + boş nanopartikül intravenöz enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B)



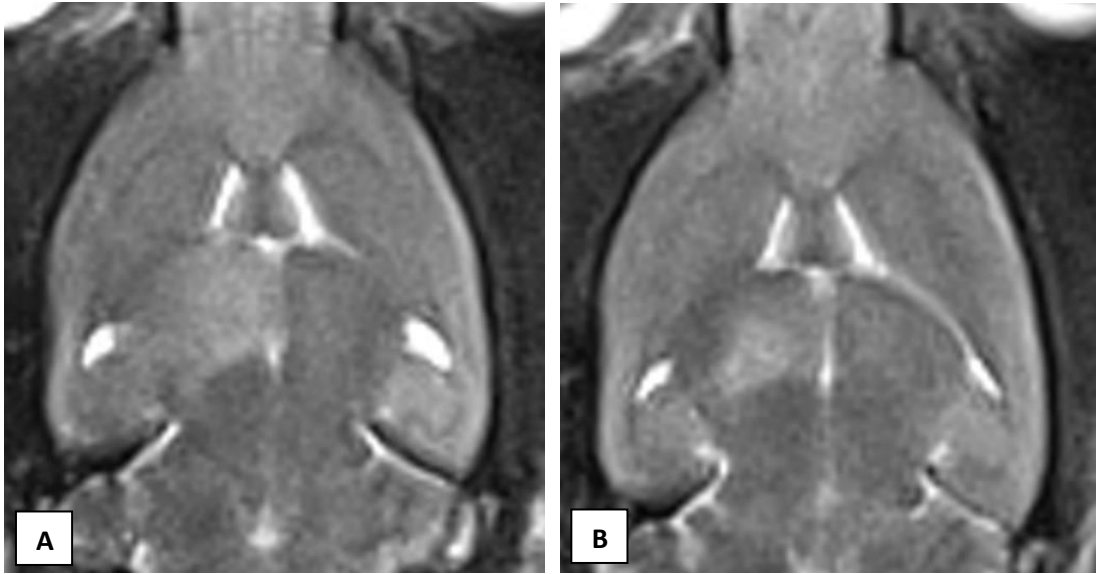
Resim 25. Sham grubu 3: MRG ile Tümör + boş Curcumin intraserebral enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B)



Resim 26. Sham grubu 4: MRG ile Tümör + boş Curcumin intravenöz enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B)

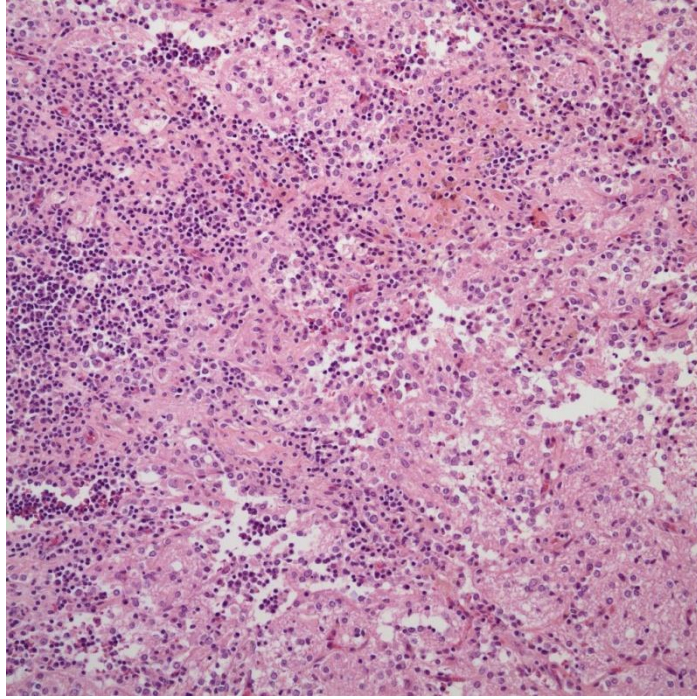


Resim 27. Deney grubu 1: MRG ile Tümör + Nanopartiküle yüklü Curcumin intraserebral enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B)

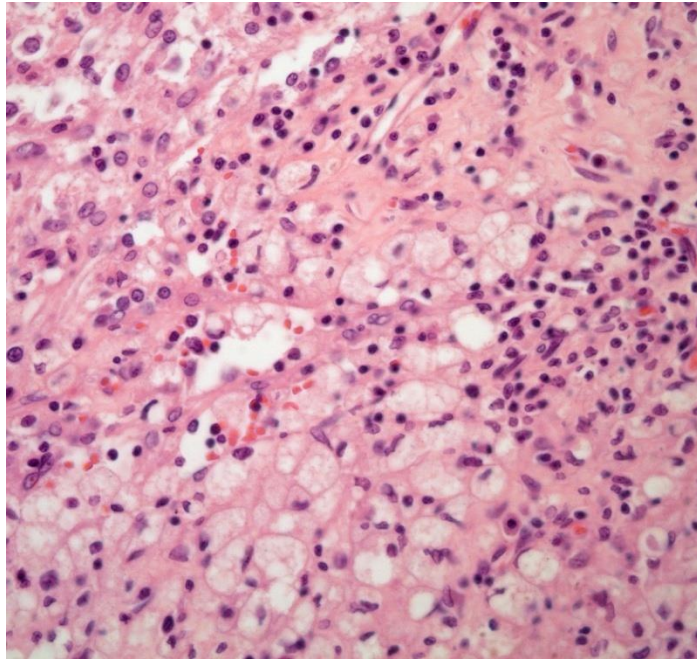


Resim 28. Deney grubu 2: MRG ile Tümör + Nanopartiküle yüklü Curcumin intravenöz enjeksiyon öncesi (A) ve sonrası (B)

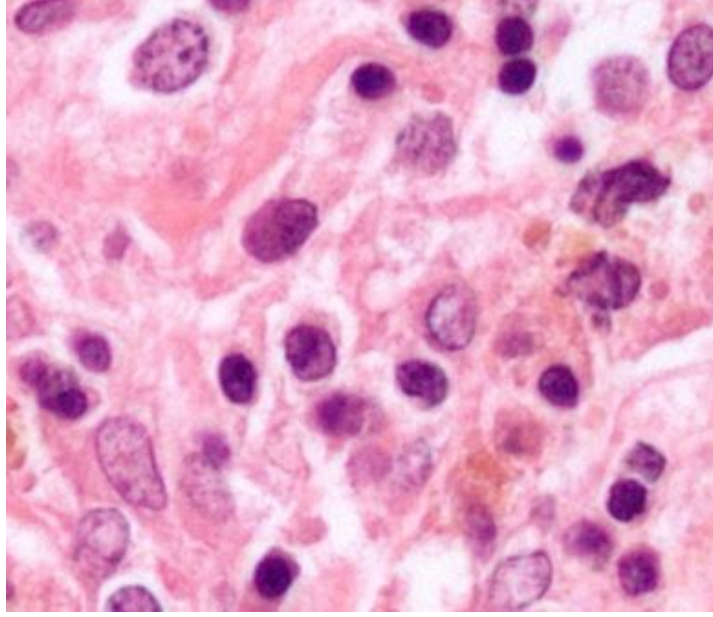
Tedavi sonrasında histopatolojik incelemesi görüntüleri:



Resim 29. 40 X büyütmede intraserebral nanopartiküle yüklü curcumin tedavisi sonrasında tedavi edilmiş histopatolojik alan



Resim 30. 100 X büyütmede intraserebral nanopartiküle yüklü curcumin tedavisi sonrasında tedavi edilmiş histopatolojik alan



Resim 31. 400 X büyütmelede intraserebral nanopartiküle yüklü curcumin tedavisi sonrasında tedavi edilmiş histopatolojik alan .Dev çekirdekli histiyosit ve hemosiderinli makrofaj görülüyor

4. İSTATİSTİK

4.1. Tedavi Öncesi Ve Sonrası Arasındaki Farkın İstatiksel Analizi

Gruplar ayrı ayrı ele alınarak, her grupta tedavi öncesi tümör hacimleri (mm^3), tedavi sonrası tümör hacimleri (mm^3) ile kıyaslanmıştır. Aradaki fark tedavi öncesi hacmin yüzdesi (%) cinsinden verilmiştir. Tümör hacmindeki küçülme Tablo 7’de “-“ işareti ile belirtilmiştir. Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan analizler sonucunda bulunan p değerleri Tablo 8’de verilmiştir. Tedavi verilmeyen kontrol grubunda 7 gündeki büyüme dikkat çekicidir ($p=0.036$). Bununla birlikte incelenen gruplar içerisinde yalnızca intratümöral olarak uygulanan curcumin yüklü nanopartikül grubunda (Grup6) tümör boyutlarında anlamlı küçülme tespit edilmiştir ($p=0.028$).

Tablo 8. Deney gruplarında tedavi öncesi ve sonrası tümör hacimlerinin (mm^3) ortalama±standart sapma değerleri, tümör boyutlarındaki değişim yüzdesinin (fark) ortalama±standart sapma değerleri ve farkın istatistiksel anlamlılığı

| | Tedavi öncesi (mm^3) | Tedavi sonrası (mm^3) | Fark (%) | p değeri |
|------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------|----------|
| Grup1 (kontrol) | 33.9±21.3 | 123.7±41.1 | 502.1±453.6 | p=0.036* |
| Grup2 (NP+IS) | 18.4±9.4 | 23.4±22.2 | 24.5±76.3 | p=0.753 |
| Grup3 (NP+IV) | 16.0±6.8 | 24.6±18.1 | 95.1±206.1 | p=0.463 |
| Grup4 (C+IS) | 20.9±13.2 | 9.0±6.8 | -50.5±27.5 | p=0.249 |
| Grup5 (C+IV) | 17.7±21.2 | 18.7±18.9 | 22.3±30.7 | p=0.528 |
| Grup6 (NP+C+IS) | 66.6±44.6 | 34.9±21.7 | -37.4±28.0 | p=0.028* |
| Grup7 (NP+C+IV) | 13.2±9.3 | 33.3±33.9 | 221.7±306.5 | p=0.249 |

4.2. Tümör Boyutlarındaki Değişimin Gruplar Arasında İstatiksel Olarak Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanılmış olup, her bir grupta tümör boyutlarındaki değişimin (Tablo 7’deki “Fark (%)”) ortalamaları karşılaştırılmıştır. Tablo 8’de gruplar arası karşılaştırmanın istatistiksel analiz sonuçları p değerleri olarak sunulmuştur. Tablo 9’da göre Grup 3 (iv boş nanopartikül) ve Grup 7 (iv curcumin yüklü nanopartikül) ile kontrol grubu arasında

hiçbir fark gözlenmemiştir. Tablo 7 ve Tablo 8 birlikte değerlendirildiğinde; Grup 2 (intraserebral boş nanopartikül) ve Grup 5 (intravenöz curcumin)'teki tedavilerin tümör boyutlarındaki büyümeyi yavaşlatmakla birlikte küçülme sağlayamadığı gözlenmiştir. Grup 4 (intraserebral curcumin) ve Grup 6 (intraserebral curcumin yüklü nanopartikül)'da ise, diğer tedavi gruplarına göre anlamlı olarak daha iyi sonuçlar elde edilmiş olup tümör boyutlarında küçülme sağlanabilmiştir. Buna göre curcuminin gerek nanopartikül içerisine yüklenmesi gerekse doğrudan tümör içine verilmesi anlamlı bir antitümöral etki ortaya çıkarmaktadır.

Tablo 9. Tümör boyutlarındaki değişimin gruplar arasında ikili karşılaştırması (p değerleri)

| | Grup1 | Grup2 | Grup3 | Grup4 | Grup5 | Grup6 | Grup7 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Grup1 | | 0.024 | 0.095 | 0.036 | 0.024 | 0.024 | 0.381 |
| Grup2 | 0.024 | | 0.699 | 0.082 | 1.000 | 0.180 | 0.310 |
| Grup3 | 0.095 | 0.699 | | 0.126 | 0.818 | 0.24 | 0.589 |
| Grup4 | 0.036 | 0.082 | 0.126 | | 0.004 | 0.429 | 0.052 |
| Grup5 | 0.024 | 1.000 | 0.818 | 0.004 | | 0.009 | 0.699 |
| Grup6 | 0.024 | 0.180 | 0.24 | 0.429 | 0.009 | | 0.132 |
| Grup7 | 0.381 | 0.310 | 0.589 | 0.052 | 0.699 | 0.132 | |

5. TARTIŞMA

Son yıllarda nanopartiküllerin beyin tümörlerinin teşhis, görüntüleme ve tedavisinde kullanılmaları üzerinde araştırmalar yoğun bir biçimde devam etmektedir (50).

Beyin tümörlerinin kemoterapisinde antikanser ilaç yüklü nanopartiküler sistemler, ilacın tümör dokusuna penetrasyonunu artırmaları ve sağlıklı dokularda görülebilecek yan etkileri azaltmaları nedeniyle klasik tedavilere üstünlük göstermektedirler (50). Bu çalışmalarda tümör etkinliği artırmak için antikanser ilaç yüklü nanopartiküler sistemlerin intravenöz yolla, intratümöral yolla verilmektedir.

A) Intravenöz Uygulama:

Intravenöz (i.v.) uygulamadan sonra nanopartiküller diğer tüm kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerde olduğu gibi plazma proteinleriyle etkileşirler. Bu süreç ‘opsonizasyon’ olarak adlandırılır. Hidrofobik yüzey özelliği taşıyan nanopartiküller plazma bileşenleri tarafından yabancı bileşenler olarak tanımlanırlar. Plazma bileşenleri, bu yabancı nanopartikülleri kandan uzaklaştırabilmek için yüzeylerini etkin bir şekilde kaplarlar ve bunun sonucunda karaciğer ile dalakta bulunan makrofajlar nanopartikül yüzeyindeki opsoninleri tanıyan özel reseptörleri sayesinde bu yapıları hızla dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Bununla birlikte yeterince küçük ve hidrofilik yüzey özelliğine sahip nanopartiküller bu uzaklaştırmadan kaçabilir ve kan dolaşımında uzun süre kalabilir (51).

Beyin tümörlerinin tedavisinde i.v. olarak kullanılacak nanopartiküllerin KBB’ ni geçerek tümör dokusuna ulaşabilmeleri için öncelikle uygulamadan sonra kan dolaşımında uzun süre kalabilmeleri gerekmektedir. Kanda dolaşım süresi uzatılmış nano boyutlu taşıyıcı sistem olarak kullanılacak nanopartiküllerin geliştirilmesi için özel bir şekilde tasarlanmaları gerekmektedir (50).

a) Nanopartiküllerin sürfaktan ile kaplanması:

Kreuter ve ark. (51) tarafından nanopartiküllerin KBB’nden geçişini artırmaya yönelik olarak yapılan bir çalışmada, dalarjin poli(bütilsiyanoakrilat) nanopartiküllerine adsorbe ettirilmiş daha sonra bu nanopartiküllerin üzeri bir sürfaktan (polisorbata-80) ile kaplanarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Çalışmada,

farelere dalarjinin tek başına i.v. olarak uygulandığında KBB'den geçemediği, geliştirilen nanopartikül içinde verildiğinde ise artan translokasyona bağlı olarak uygulamadan 45 dakika sonra analjezik etkinin gözlemlendiği bildirilmiştir. Polisorbitat-80 kaplı nanopartiküllerin KBB'den geçiş mekanizması tam olarak aydınlatılmamamakla beraber, maddenin deterjan özelliğinin sıkı kavşakları açtığı ve nanopartikül geçişini artırdığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, literatürde KBB' den geçemeyen ilaçların polisorbitat-80, poloksamer 188, poloksamer 407 gibi yüzey aktif madde (süpfaktan) kaplı nanopartiküllere adsorbe ettirilerek veya yüklenerek bu engelden geçişlerinin sağlandığı pek çok çalışmaya rastlanmaktadır (52,53,54,55,56,57).

Wohlfart ve ark. (58), antikanser bir ilaç olan doksurubisin yüklü, polisorbitat 80 (Tween 80) kaplı poliizohexzil siyanoakrilat(PIHCA) nanopartikül formülasyonlarını hazırlamışlar ve beyin tümörü (glioblastom 101/8) oluşturulan sıçanlara i.v. olarak uygulamışlardır. Çalışmada, doksurubisin yüklü, polisorbitat 80 kaplı PIHCA nanopartikülleri, doksurubisin çözeltisi ve boş nanopartikül formülasyonları uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında tümör hacminde 10 kata kadar daha fazla azalma sağladıkları bildirilmiştir.

Kulkarni ve ark (59) kumarin-6 ve doketaksiel yüklü PLGA nanopartiküllerini poloksamer 188, poloksamer 407 veya polisorbitat-80 ile kaplamışlar ve hazırlanan formülasyonlarda bulunan ilaçların KBB' den geçişlerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kaplı olmayan gruplara göre, polisorbitat-80 ve poloksamer 407 ile kaplı nanopartikül formülasyonlarının beyin dokusunda ilaç miktarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmaların ışığında nanopartiküllere uygulanacak bir kaplamanın (süpfaktan) KBB geçişine yardımcı olması, intravenöz uygulamada kullanılan bir yaklaşım olmuştur.

b) Nanopartiküllerin Poli(etilen glikol) (PEG) ile konjugasyonu veya kaplanması:

Nanopartiküllerin kan dolaşımında uzun süre kalabilmeleri için uygulanan yaklaşımlardan biri polietilen glikol(PEG) gibi hidrofilik polimerler ile kaplanmaları veya kullanılan polimerlerin PEG ile ko-polimerize edilmeleridir (PEGilasyon).

PEGilasyon işleminin nano boyutlu ilaç taşıyıcıları opsonizasyondan bunu izleyen kandan uzaklaştırma işleminden koruduğu birçok araştırmada ayrıntılı olarak çalışılmıştır. PEG gibi esnek ve hidrofilik bir polimer ile nanopartiküllerin yüzeylerinin kaplanması bu sistemlerin etrafında konformasyonel bir bulutumsu tabaka oluşturduğu ve bu tabaka sayesinde nanopartiküllerin başka polimerik yapılarla (kan bileşenleri gibi) etkileşmesinin önüne geçildiği gösterilmiştir (60). Bu sterik engelleme sayesinde kanda kalış süreleri uzatılmış olan nano boyutlu sistemlerin tümör dokularında birikimi artırılabilmiştir (61).

Brigger ve ark. (2005) (62) tarafından yapılan bir çalışmada, poli(hekzadesilsiyanoakrilat) polimeri ile nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve PEG ile kaplanarak, etkinliği 9L gliosarkoma taşıyan sıçanlara i.v. uygulanarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kaplanmamış nanopartikül formülasyonları ile karşılaştırıldığında, PEG kaplı nanopartiküllerin dolaşımında çok daha uzun süre kaldığı ve tümör dokusunda 3 kat daha fazla biriktiği tespit edilmiştir.

Cole ve ark (63) tarafından glioblastomaların görüntülenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, nişasta kaplı demir oksit nanopartiküllerinin dolaşımdan hızla uzaklaşmasını engellemek için yüzeylerine PEG zincirleri bağlanmış ve 9L gliom hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş sıçanlara i.v. uygulanmaları sonucundaki beyinde birikme oranları tespit edilmiştir. Çalışmada PEG bağlanmamış nanopartiküllere göre PEG bağlı nanopartiküllerin beyinde 15 kat daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir.

PEG nanopartiküllerin kanda kalış sürelerini uzatmanın yanısıra, hücresel alımlarının artırılmaları konusunda da üstünlükler sağlamaktadır (64,65). Kısaca PEG ile nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu etkin maddelerin tümör dokularına ulaştırılmasında ve hücresel düzeyde alımlarının artırılmasında uygulanan en önemli yaklaşımlardan birisidir.

c) **Nanopartiküllerin Lipit/Lipit-PEG ile konjugasyonu veya kaplanması:**

Nanopartiküllerin KBB'ni geçişini artırmak üzere uygulanan yaklaşımlardan biri de lipit veya lipit-PEG ile kaplanmalarıdır. Fenart ve ark. (66) tarafından yapılan bir çalışmada, 60 nm büyüklüğünde hazırlanan maltodekstrin nanopartikülleri

anyonik, katyonik veya non-iyonik lipitlerle kaplanmış ve KBB'den geçişleri değerlendirilmiştir. Çalışmada anyonik veya katyonik lipit kaplı nanopartiküllerin kaplı olmayanlara göre KBE'den geçişi 3 veya 4 kat artırdığı bildirilirken, non-iyonik lipit ile kaplı formülasyonlarda geçişte kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir.

Huang ve ark (67) demiroksit nanopartiküllerini hazırlamış ve katyonik lipit (DOTAP) 1,2 dioleoil-3-trimetilamonyum propan ve PEG ile modifiye edilmiş katyonik lipit (PEG-DSPE) polietilenglikol-2000-1,2-distearil-3-sn-fosfatidiletanolamin karışımı (3:1 molar oran) ile kaplayarak formülasyonların insan servikal kanser (HeLa), insan prostatik adenokarsinom (PC-3), fare nöroblastom (Neuro-2a) ve fare kolorektal adenokarsinoma hücrelerine alımlarını incelemişlerdir. Çalışmada kontrol grubuna göre kaplanmış nanopartiküllerin hücre içine alımlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

d) Nanopartiküllere Katyonik Yük Kazandırılması

Nanopartiküllerin KBB'nden geçişini artırmak için literatürde yer alan yaklaşımlardan biri de nanopartiküllere katyonik yük kazandırmaktır. Bu yaklaşımın gerçekleştirilmesi için; biyouyumlu katyonik polimerler kullanarak nanopartikül hazırlanması, nanopartiküllerin katyonik maddelerle konjugasyonu veya kaplanması gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Agarwal ve ark (68) tarafından yapılan bir çalışmada, antikanser bir ilaç olan doksisisiklin yüklü katı lipit nanopartikülleri hazırlanmış ve katyonik sığır serum albumini ile konjuge edilerek i.v. uygulamayı takiben KBB' den geçişi değerlendirilmiştir. Çalışmada koagülasyona tabi tutulmuş formülasyonların, tabi tutulmamış formülasyonlar ve serbest doksisisikline göre daha sitotoksik olduğu ve KBB'den çok daha yüksek oranda geçtiği tespit edilmiştir.

Chertok ve ark (69), beyin tümörlerinin tedavisi için hazırladıkları katyonik demiroksit nanopartiküllerinin yüzeyine heparin-PEG adsorpsiyonu sağlamışlar ve i.v. olarak sıçanlara uygulayarak KBB'den geçişlerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada heparin-PEG adsorbe ettirilmiş nanopartiküllerin kontrol grubuna göre dolaşımında daha uzun süre kaldıkları ve tümörde iki kat daha fazla oranda biriktikleri bildirilmiştir.

e) Nanopartiküllerin Beyin Tümörüne Spesifik Hedeflendirilme Ajanları ile Konjugasyonu/Kaplanması

Nanopartiküllerin KBB'ni geçişini artırmak ve sağlıklı dokulara zarar vermeden tümöre spesifik olarak hedeflenmesini sağlamak üzere literatürde; nanopartiküllerin tümör reseptörlerine hedeflendirilmesi, biyomimetik özelliklerde hazırlanmaları, antikor bağlı olarak hazırlanmaları, immünolojik ve genetik materyali içerecek şekilde hazırlanmaları gibi yaklaşımlar bulunmaktadır.

Chang ve ark (71) tarafından yapılan bir çalışmada PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve albumin veya transferin proteinleri ile kaplanarak sağlıklı veya F98 glioma hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş fare ve sıçanlardaki i.v. uygulama sonrası dağılımı değerlendirilmiştir. Çalışmada protein kaplamanın hem sağlıklı hem tümör taşıyan hayvanların plazmasında nanopartiküllerin uzun süre kalmasına neden olduğu ve transferin ile kaplı formülasyonların tümör taşıyan hayvanlarda glioma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen transferin reseptörü nedeniyle daha yüksek miktarda tümör dokusunda bulunduğu bildirilmiştir.

Guo ve ark (72) tarafından yapılan bir çalışmada paklitaksel yüklü PEG-PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine bir DNA aptameri olan ve glioma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen AS1411 (Ap) konjuge edilmiş ve C6 glioma hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş sıçanlarda i.v. uygulamadan sonraki dağılımı ve etkinliği incelenmiştir. Çalışmada, kontrol gruplarına göre, Ap konjuge edilmiş PEG-PLGA nanopartiküllerinin kan dolaşımında daha uzun süre kaldığı ve tümör bölgesinde yüksek miktarda bulunarak tümör hacminde etkin bir azalma ve sıçanların hayatta kalış sürelerinde önemli derecede artmaya neden olduğu bildirilmiştir.

B) Intratümöral Uygulama:

Beyin tümörlerinin birçoğu “solid/katı” tümörler olduğu için kemoterapötik ilaçlar KBB' den geçerek tümör bölgesine ulaşsa bile, tümör içindeki dağılımları, avasküler yapı nedeniyle istenen etkinlikte olamamaktadır. Pekçok “solid” tümörde hücre popülasyonu damarlardan 100 µm veya daha fazla miktarda uzaklıkta olabilir, bu durum uzakta bulunan hücelere besin, oksijen, ilaç gibi moleküllerin ulaşmasını sınırlamaktadır. Buna ilaveten, yüksek hücre dansitesi, artmış dokular arası basınç,

hipoksi ve asidik pH, tümör bölgesine ulaşan ilaçların tümör içine penetrasyonunu, dağılımını ve hücre içine birikmesini yetersiz kılmaktadır (73). Kemoterapötik ilaçların intratumöral olarak tümör merkezine uygulanması ile intravenöz uygulamaya göre tümör içindeki ilaç konsantrasyonu artırılabilir ve dağılımı iyileştirilebilir (74).

Beyin tümörlerinin bazılarının yerleşimi cerrahiye uygun bir konumda olmaz (görme, konuşma merkezlerinin yakınında olmaları veya çok derin yerleşimde olmaları) ve bu tür tümörlerin tedavisinde intratumöral kemoterapi uygulaması büyük önem taşımaktadır. Bu yöntemle, cerrahi olmayan bir teknikle (injeksiyon) tümörde yüksek miktarda ilaç bulunmasının sağlanması, tedavi için büyük avantajlar sağlamaktadır.(75,76)

Literatürde beyin tümörlerinin tedavisi için mikropartiküler sistemlerin intratumöral olarak uygulandığı çalışmalara rastlanmaktadır. Menei ve ark. (77), 5-Flourourasil (5-FU) yüklü PLGA mikroküreleri hazırlamışlar ve gliom taşıyan hastalara intrakaviter (tümörünün çıkarılmasını takiben oluşan kavite) olarak injekte ederek lokal radyasyon uygulamışlardır. Çalışmada kontrol grubuna göre tedavi uygulanan grubun 2 kat daha uzun ortalama hayatta kalış süresine sahip olduğu bildirilmiştir. Yine aynı grup (77) tarafından yapılan bir başka çalışmada, 5-FU yüklü PLGA mikroküreleri hazırlanarak, 9L hücreleri ile gliom oluşturulmuş sıçanlara intratumöral olarak uygulanmış ve boş mikroküre ve etkin madde çözeltisine göre artmış ortalama hayatta kalış süresi elde edildiği bildirilmiştir.

Literatürde nanopartiküler sistemlerin de beyin tümörlerinin tedavisinde intratumöral olarak uygulandığı çalışmalar bulunmaktadır (78). Allard ve ark (79), antikanser bir ilaç olan ferrosipenol yüklü lipit nanopartikül formülasyonlarını hazırlayarak 9L glima hücresi ile tümör oluşturulmuş sıçanlara intratumöral olarak uygulamış ve etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kontrol gruplarına göre nanopartikül formülasyonları ile tümör hacminde daha fazla küçülme sağlandığı bildirilmiştir.

Roger ve ark (80) tarafından yapılan bir çalışmada ise kumarin-6 yüklü poli(laktik asit)(PLA) nanopartikülleri ve lipit nanopartiküller hazırlanarak mezenkimal kök hücrelere yüklenmiş ve intratumöral olarak U87MG hücreleri ile beyin tümörü oluşturulmuş farelere uygulanmıştır. Çalışmada nanopartikül yüklü

hücrelerin tümör içinde etkin bir şekilde dağıldığı ve gliomların tedavisinde kullanılmak üzere ümit verici olduğu bildirilmiştir.

Curcumin Doğu Asya ve Hindistan mutfağında kullanılan curcumin longo aktif bileşeni olup, antioksidan, antienflamatuar, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antikanser özellikleri olan çok fonksiyonlu ilaçtır. Birçok çalışmada curcuminin insanlardaki farmokinetiğin, güvenliğinin ve etkinliği ortaya konulmuştur.

Son zamanlarda curcuminin antikanser aktivitesi gösterilmiş kanser tedavisindeki potansiyeli vurgulanmıştır. Curcumin deney hayvanlarında induklenen deri ve gastrointestinal sistem tümörlerinde boyutlarında küçülme sağlamıştır.

Bu çalışmada nanopartiküle yüklü etken maddenin(curcumin)beğinde glial tümöre ulaştığı ve onların tümör tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir

Daha önce yapılan çalışmalarda fare ve sıçan beyin tümörü modellerinde nanopartiküle yüklübirçok ilaçların intravenöz ve intraserebral uygulamalarda tümöre etki ettiği gösterilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada verilen ilaç yüklü nanopartiküllerin sadece tümör içine verildiğinde etki edebildiğini, aynı hemisferde uzak bir noktadan veya karşı hemisferden tümöre etki etmediği gösterilmiştir.(81)

Bu çalışmada nanopartiküle yüklü etken maddenin tümör üzerine etkisi intraserebral ve intravenöz verilerek izlenmiştir, ancak birçok çalışmalarda ise gavaj yöntemi ile bu etken madde verilmiştir. Etken maddenin etkinliği tam olarak değerlendirilmemiştir.(82)

Bu çalışmada ve daha önce yapılmış çalışmalarda ilaç yüklü nanopartiküllerin tümör üzerine etkisi ratların MRG ile tümör üzerine etkileri ve boyutundaki değişiklikler izlenmiştir.

Bu çalışma ise uluslararası yayınlarında sadece invivo değerlendirilmesi histopatolojik ve immunoflorosan değerlendirilmesi yapılmıştır, ancak MRG görüntülemesi yapılmamıştı.

Bizim çalışmamız bu anlamda ilk olma özelliği taşımaktadır; denekler sakrifiye edilmeden tümör gelişimi ve tedaviye yanıtı MRG ile izlenmiştir.

Magnetik Rezonans Görüntüleme deney hayvanlarında beyin tümörü çalışmalarında son zamanlarda birkaç çalışmada kullanılmış yeni bir yöntemdir. Ülkemizde de deney hayvanına MRG yapılması yeni bir uygulama olup, ilk kez

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Eczacılık Fakültesinde “malign gliomların tedavisi için lipit ile işlevselleştirilmiş PLGA nanopartiküllerin tasarımı, in vitro ve in vivo değerlendirilmesi” adlı master tezinde kullanılmıştır(83). Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisinde tez çalışması olarak “Deneysel sıçan yüksek dereceli beyin tümör modelinde insan kaynaklı mezenkimal kök hücre göçünün izlenmesi” yapılmıştır(84). Bizim çalışmamız ülkemizde hayvan beyin tümörü görüntülemesinde MRG'nin kullanıldığı üçüncü çalışmadır. Bu çalışmaları yapabilmek amacı ile sıçan kafasına özel koil dizayn edilmesi ilk kez UMRAM'da yapılmıştır. Bu sayede MRG tümör oluşumunun gösterilmesinde ve ancak tümör teyit edildikten sonra nanopartiküle yüklü curcumin uygulanmasının güvenilir olarak yapılmasına izin vermiştir.

Ancak KBB'nin selektif geçirgen olmasından dolayı etken maddeler baryeri geçmesi için taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyarlar. Bu taşıyıcı sistemler, nanopartiküller partikül büyüklükleri 1-1000 nm arasında değişen, ilaçların içine hapsedildiği, yüzeye adsorbe ettirildiği ya da kovalent bağlarla bağlandığı makromoleküllerden oluşan katı kolloidal sistemlerdir. Nanopartiküller, ilaç molekülünün limitleyici karakteristik özelliklerini maskeleyerek ve stabilitesini arttırarak membran bariyerleri aşmasını sağlarlar. Bu sistemler istenilen bölgeye ulaştığında ilaç salımı, desorpsiyon, nanopartikül matriksi ya da polimerik duvardan ilacın difüzyonu veya matriks/duvar erozyonu gibi mekanizmaların biri ya da birkaçı vasıtasıyla gerçekleşebilir.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef dokuda etki gösterebilmeleri için sistemin tasarımı oldukça önem taşımaktadır. Bu sistemlerdeki ana amaç, partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve etkin maddelerin salım kinetiklerinin kontrol edilerek ilacın etki bölgesine spesifik salımını terapötik olarak optimum dozda ve oranda sağlamaktır. Bu özellikleri sağlayan sistemler arasında, önceki bölümde de örnek olarak verilen lipozomlar kullanılsa da, düşük enkapsülasyon etkinliği, suda çözünen ilaçların dolaşımında hızlıca salınması ve zayıf saklama stabilitesi nedeniyle bu sistemlerin potansiyelleri sınırlıdır. Diğer yandan polimerik nanopartiküllerin lipozomlara ve diğer nano boyutlu sistemlere (nanokapsüller, miseller, katı lipit nanopartikülleri, vb.) karşı çeşitli spesifik üstünlükleri bulunmaktadır. Örnek olarak,

nanopartiküller ilaçların (proteinler gibi makromoleküler yapıda olanlar da dahil) stabilitesini arttırırlar ve hedef bölgeye uygun, kontrollü salım profili gösterirler.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılır. Doğal polimerler arasında lipitler, proteinler, karbonhidratlar; sentetik polimerler arasında da biyolojik olarak parçalanmayan ve parçalanmayan polimerler sayılabilir. Doğal polimerler (kitosan, aljinat, dekstran vb.) biyoparçalanabilir olmaları, metabolize edilebilmeleri, toksik bileşenler vermemeleri, stabiliteleri, büyüklük dağılımlarının kontrol edilebilir olmaları ve suda çözünen ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesi vermeleri nedeniyle tercih edilirler. Sentetik polimerler (poli(laktik-ko-glikolik)asit (PLGA); polilaktik asit (PLA), Eudragit vb.) ise istenilen spesifikasyonlara göre sentezlenebilmeleri, hazırlama ve saklama süresince dayanıklı olmaları, fazla miktarda ve yüksek saflıkta üretilibilmeleri gibi üstünlüklerinden dolayı tercih edilirler.(40)

PLGA sentetik polimerler arasında en çok kullanılan; molekül ağırlığı, kristal özelliği ve laktidglikolid oranı gibi özelliklere bağlı olarak farklı sürelerde biyoparçalanabilirlik özelliği sağlayabilen, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanma ürünlerinin toksik olmadığı bir polimerdir. PLGA biyolojik olarak parçalandığında laktik ve glikolik asit meydana gelmektedir. Laktik asit, trikarboksilik asit döngüsüne girerek metabolize edilir ve enerji metabolizma döngüsünde CO₂ ve H₂O'ya dönüştürülür ve idrarla atılırlar. PLGA, fizyolojik ortamda inert, biyoparçalanabilir, biyouyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış bir biyomateryaldir. PLGA kopolimerleri gerek yağda gerekse suda çözünen ilaçların hapsedilebildiği nanopartikül sistemlerinin hazırlanmasında uygun taşıyıcılardır. Toksik olmayan metabolitlere dönüşen bu polimerler, beyne uygulanan uzun etkili ve kontrollü salım sistemlerinde de tercih edilmektedir.

Biz de bu çalışmada bu özelliklerinden dolayı PLGA taşıyıcı sistemi kullandık. Ancak Manyetik rezonans görüntülemenin çalışmaya katkılarının yanında MRG merkezinin başka bir üniversitenin kampüsünde oluşu, deney hayvanlarının uzun yol taşınması deney sürecinde zorluklara ve ek morbidite/mortaliteye neden olmuştur.

Çalışmamız sıçanda glioma (RG2) oluşturma deneysel modeli üzerine kurulmuştur. Literatürdeki hayvan beyin tümörü modellerinde doğal olarak bağışıklık sistemi olmayan atimik ve çıplak (genetik olarak immünsüprese) fare ve sıçanlar tercih edilmektedir. Genetik olarak immünsüprese hayvan kullanılmayan birkaç deneyde ise hayvanlar deneyden 3 gün önceden başlanılarak tüm deney boyunca siklosporin ile immünsüprese edilmiştir. Hayvanların immünsüprese olması nedeni ile tümör hücresi enjeksiyonundan 10 gün sonra tümör gelişme oranı oldukça iyidi. (% 67; 60 sıçanda 42 tümör).

Tümör oluşumu sonrası 5 gün beklendiğinde hiçbir tedavi uygulanmayan kontrol grubunda tümör boyutlarının belirgin ölçüde arttığı izlenmiştir. Uygulanan tedavilerin etkinliği incelendiğinde ise intravenöz nanopartikül (curcuminli veya boş) uygulamasının hiçbir etkinliğinin olmadığı gözlenmiştir. Bu durum iv verilen nanopartiküllerin kan beyin bariyerini yeterince geçememesi ile açıklanabilir. İntravenöz curcumin uygulaması ile tümör boyutlarındaki büyüme bir ölçüde sınırlandırılabilmeyle birlikte küçülme sağlanamamıştır. Benzer şekilde intraserebral boş nanopartikül grubunda da tümör boyutlarındaki büyüme azaltılmakla birlikte küçülme sağlanamamıştır. Bu duruma intraserebral/intratümöral uygulamanın oluşturduğu hasar veya lokal inflamasyon neden olmuş olabilir. En iyi sonuçlar ise intraserebral/intratümöralcurcumin ve intraserebral/intratümöral curcumin yüklü nanopartikül ile elde edilmiştir. Bu gruplarda tümör boyutlarında küçülme sağlanmış olup, bu küçülme özellikle (intraserebral) intratümöral curcumin yüklü nanopartikül grubunda istatistiksel anlamlılığa ulaşmıştır. Bu sonuçlar, tümör içine uygulanan nanopartikül kaplı curcumin antitümöral etkinliğini doğrulamıştır. Curcumin nanopartikül ile kaplanması, ilacın tümöre hedeflenmesini ve tümör dokusuna ulaştırılabilecek ilaç konsantrasyonunun artırılabilmesini sağlaması nedeniyle ideal bir ilaç uygulama yöntemi olarak öne çıkmaktadır. Gelecekte nanopartikül yüzeyine kan-beyin bariyerini ve tümör dokusunu hedefleyen moleküllerin (reseptör vb.) yerleştirilmesiyle intravenöz uygulamanın, intraserebral uygulamanın yerini alması mümkün olabilecektir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada;

- Magnetik Rezonans Görüntüleme ile sıçan beyni gibi küçük bir organın patolojisinin dahi görüntülenebileceği
- Nanopatiküle yüklü etken maddelerin KBB'i daha iyi geçtiği
- Nanopatiküle yüklü curcuminin intraserebral yolla verildiğinde ratın beyin tümör boyunun küçültüğü
- Nanopatiküle yüklü curcuminin intrasvenöz yolla verildiğinde ratın beyin tümör boyutunda değişiklik olmadığı tespit edildi.
- Nanopatiküle yüklü curcumin özellikle glioblastoma tedavisinde daha ileri yöntemler ile araştırılması kanatine varılmıştır.
- Özellikle curcumin hangi siyal yolları kullanarak gliomun migrasyonunu, proliferasyonu ve invazyonunu inhibe ettiği araştırılmalıdır.
- Bu çalışmada RG2 gliomu kullandık, ancak özellikle insan kaynaklı gliomlara(U87) nasıl ettiği araştırılmalıdır ve MRG ile desteklenmelidir.

7. REFERANSLAR

1. Dolecek, T.A., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. Neuro Oncol, 2012. 14 Suppl 5: p. v1-49.
2. David N Louis, H.O., Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavane, *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Glioblastoma, 2007: p. p33-49.
3. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. 114(2): p. 97-109.
4. Norris L, The role of cancer stem cells in the anti – carcinogenicity of curcumin. Mol Nutr Food Res. 2013 Sep; 57(9): 1630-7
5. Hasima N, Targeting Proteasomal Pathways by Dietary Curcumin for Cancer Prevention and Treatment. Curr Med Chem. 2013 Jun 25
6. Weissenberger J, Priester M, Bernreuther C, Rakel S, Glatzel M, Seifert V, Kögel D. Dietary curcumin attenuates glioma growth in a syngeneic mouse model by inhibition of the JAK1,2/STAT3 signaling pathway. Clin Cancer Res. 2010 Dec 1;16(23):5781-95.
7. Allard E, Hindre F., et al., (188)Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. Eur J Nucl Med Mol Imaging 35, 1838–1846, (2008).
8. Zhuang W, Long L, Zheng B, Ji W, Yang N, Zhang Q, Liang Z. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. Cancer Sci. 2012 Apr;103(4):684-90.
9. Khaw AK, Hande MP, Kalthur G, Hande MP. Curcumin inhibits telomerase and induces telomere shortening and apoptosis in brain tumour cells. J Cell Biochem. 2013 Jun;114(6):1257-70.
10. ZANOTTO-FILHO A, Coradini K, Braganhol E, Schröder R, de Oliveira CM, Simões-Pires A, Battastini AM, Pohlmann AR, Guterres SS, Forcelini CM, Beck RC, Moreira JC. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. Eur J Pharm Biopharm. 2012 Nov 28. pii: S0939-6411(12)00345-1.

11. Shafqat, S., E.T. Hedley-Whyte, and J.W. Henson, *Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma*. Neurology, 1999. 52(4): p. 867-9.
12. Parney, I.F. and M.S. Berger, *Principles of brain tumor surgery*. Handb Clin Neurol, 2012. 104: p. 187-213.
13. Markett J, D.V.V., Rosenberg SA, Hellman S (ed.s), *Glioblastoma Multiforme 1 st ed*. Jones & Bartlett Pub., 2005.
14. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 987-96.
15. Andrew H. Kaye, E.R.L., Jr., *Brain Tumors, Third Edition*. 2012(Neurogenetics and the molecular biology of human brain tumors): p. 83-101.
16. ME Velasco, D. Dahl , *İnsan glial tümörler glial fibriler asidik protein immünohistokimyasal lokalizasyonu*. Kanser Cilt 45, Sayı 3, Şubat 1980, s 484-494, ISSN 008-543x. PMID 6.243.508
17. D. Sturm, H. Witt, V. Hovestadt, Quang-Khuong DA, DT Jones, C. Konermann, E. *Glioblastomada IDH1 ve H3F3A içinde Hotspot mutasyonlar*: Kanser hücre Cilt 22, Sayı 4, Ekim 2012, s 425-437
18. Salzman, L . MD, Barkovich, J. MD: OSBORN, Brain, Diagnostic Imaging Türkçe çeviri – 2013 ikinci baskı
19. Hoover, J.M., S.M. Chang, and I.F. Parney, *Clinical trials in brain tumor surgery*. Neuroimaging Clin N Am, 2010. 20(3): p. 409-24.
20. Pardridge, W.M., *The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development*. NeuroRx, 2005. 2(1): p. 3-14.
21. Ahluwalia, M.S., *Schmidek & Sweet Operative Neurosurgical Techniques: Indications, Methods and Results Sixth edition*. Chemotherapy for Brain Tumors, 2012. 1: p. 94-104.
22. Lai, A., et al., *Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol, 2011. 29(2): p. 142-8.

23. Costa, S.L., et al., *Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation.* Eur J Cancer, 2001. 37(4): p. 520-30.
24. Butowski, N., et al., *A phase II study of concurrent temozolomide and cis-retinoic acid with radiation for adult patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. 61(5): p. 1454-9.
25. Moolten, F.L. and J.M. Wells, *Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors.* J Natl Cancer Inst, 1990. 82(4): p. 297-300.
26. Groves, M.D., et al., *Phase II trial of temozolomide plus marimastat for recurrent anaplastic gliomas: a relationship among efficacy, joint toxicity and anticonvulsant status.* J Neurooncol, 2006. 80(1): p. 83-90.
27. Engelhard, H.H., *Gene therapy for brain tumors: the fundamentals.* Surg Neurol, 2000. 54(1): p. 3-9.
28. Oldfield, E.H., et al., *Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir.* Hum Gene Ther, 1993. 4(1): p. 39-69.
29. Haas-Kogan, D.A., et al., *Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib.* J Natl Cancer Inst, 2005. 97(12): p. 880-7
30. Trask, T.W., et al., *Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors.* Mol Ther, 2000. 1(2): p. 195-203.
31. Parney, I.F. and M.S. Berger, *Principles of brain tumor surgery.* Handb Clin Neurol, 2012. 104: p. 187-213.
32. Hoover, J.M., S.M. Chang, and I.F. Parney, *Clinical trials in brain tumor surgery.* Neuroimaging Clin N Am, 2010. 20(3): p. 409-24.
33. Gladson, C.L., *Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors.* J Neuropathol Exp Neurol, 1996. 55(11): p. 1143-9.

34. Costa, S.L., et al., *Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation*. Eur J Cancer, 2001. 37(4): p. 520-30.
35. Zlokovic, B.V. and M.L. Apuzzo, *Cellular and molecular neurosurgery: pathways from concept to reality--part I: target disorders and concept approaches to gene therapy of the central nervous system*. Neurosurgery, 1997. 40(4): p. 789-803; discussion 803-4.
36. Daneman, R., *The blood-brain barrier in health and disease*. Ann Neurol, 2012. 72(5): p. 648-72.
37. Yang, H., *Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis*. Pharm Res, 2010. 27(9): p. 1759-71.
38. Brannon Peppas L., Polimerlerin Sınıflandırılması. in *Kontrollü Salım Sistemleri* (ed. Gürsoy, A.) (Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul, 2002).
39. Kumar M.N., Kumar N., Polymeric controlled drug-delivery systems: perspective issues and opportunities. Drug Dev Ind Pharm 27, 1-30, (2001).
40. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski A.E., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. Journal of Controlled Release, 70, 1-20, (2001).
41. Lockman P.R., Mumper R.J., Khan M.A., Allen D.D., Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. Drug Dev Ind Pharm, 28 (1), 1-13, (2002).
42. Villa A., Sanchez A., Tobio M., Calvo P., Alonso M.J., Design of biodegradable particles for protein delivery. J Control Release, 78 (1-3), 15-24, (2002).
43. Pinto-Alphandary H., Andremont A., Couvreur P., Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. Int J Antimicrob Agents, 13 (3), 155-168, (2000).
44. Schlossauer B.a.S., H. Comparative anatomy, physiology and in vitro models of the blood-brain and blood-retina barrier. Curr Med Chem, 2, 175-186, (2002).

45. Lucke A., Tessmar J., Schnell E., Schmeer G., Gopferich A., Biodegradable poly(D,L-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials* 21, 2361-2370, (2000).
46. Kumar M.N., Kumar N., Polymeric controlled drug-delivery systems: perspective issues and opportunities. *Drug Dev Ind Pharm* 27, 1-30, (2001).
47. Brigger I., Morizet J., Aubert G., Chacun H., Terrier-Lacombe M.J., Couvreur P., Vassal G., Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 928–936, (2002).
48. Yemisci, M., et al., *Treatment of malignant gliomas with mitoxantrone-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres*. *Neurosurgery*, 2006. **59**(6): p. 1296-302; discussion 1302-3.
49. Geletneky, K., et al., *Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(8): p. 804-14.
50. Caruso, G., Caffo M., Alafaci C., Raudino G., Cafarella D., Lucerna S., Salpietro FM., Tomasello F., Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? *Nanomedicine*, 7(6), 744-52, (2011).
51. Garcia E., Andrieux K., Gil S., Couvreur P., Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain? *Int J Pharm*, 25;298(2):274-92, (2005).
52. Kreuter J., Alyautdin R.N., Kharkevich D.A., Ivanov A.A., Passage of peptides through the blood–brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res*. 674, 171–174, (1995).
53. Gajbhaye V., Jain NK., The treatment of Glioblastoma Xenografts by surfactant conjugated dendritic nanoconjugates. *Biomaterials*, 32(26), 6213-25, (2011).
54. Tian XH, Lin XN., Wei F., Feng W., Huang ZC., Wang P., Ren L., Diao Y., Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 6, 445-52, (2011).
55. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J., Drug

- delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, (2010).
56. Wang CX, Huang LS., Hou LB., Jiang L., Yan ZT., Wang YL., Chen ZL., Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model. *Brain Res*, 19, 1261:91-9, (2009).
 57. Petri B, Bootz A., Khalansky A., Hekmatara T., Müller R., Uhl R., Kreuter J., Gelperina S., Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J Control Release*, 117(1), 51-8, (2007).
 58. Wohlfart S, Khalansky AS., Gelperina S., Maksimenko O., Bernreuther C., Glatzel M., Kreuter J., Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PLoS One*, 6(5), (2011).
 59. Kulkarni SA, Feng SS., Effects of surface modification on delivery efficiency of biodegradable nanoparticles across the blood-brain barrier. *Nanomedicine (Lond)*, 6(2):377-94, (2011).
 60. Torchilin VP, Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J Microencapsul*, 15(1):1-19, (1998).
 61. Moghimi SM, Hunter AC., Murray JC., Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53(2), 283-318, (2001).
 62. Brigger I, Morizet J., Aubert G., Chacun H., Terrier-Lacombe M.J., Couvreur P., Vassal G., Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 928–936, (2002).
 63. Cole AJ, David AE., Wang J., Galbán CJ., Yang VC., Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(26), 6291-301, (2011).
 64. Kaul G, Amiji M., Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm Res*, 19(7), 1061-7, (2002).

65. Dmitri B., Kirpotin Daryl C., Drummond Yi Shao., Refaat Shalaby., Keelung Hong., Ulrik B.Nielsen., James D.Marks., Christopher C.Benz., John W.Park., Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models. *Cancer Res*, 66, 6732-6740, (2006).
66. Fenart L, Casanova A., Dehouck B., Duhem C., Slupek S., Cecchelli R., Betbeder D., Evaluation of effect of charge and lipid coating on magnetic nanoparticles as the probe for in vivo imaging. *J Biomed Sci*, 16, 86, (2009)ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 291(3), 1017-22, (1999).
67. Huang HC, Chang PY., Chang K., Chen CY., Lin CW., Chen JH., Mou CY., Chang ZF., Chang FH., Formulation of novel lipid-coated).
68. Agarwal A, Agrawal H., Tiwari S., Jain S., Agrawal GP., Cationic ligand appended nanoconstructs: a prospective strategy for brain targeting. *Int J Pharm*, 421(1), 189-201, (2011).
69. Chertok B, David AE., Moffat BA., Yang VC., Substantiating in vivo magnetic brain tumor targeting of cationic iron oxide nanocarriers via adsorptive surface masking. *Biomaterials*, 30(35), 6780-7, (2009).
70. Haque S., Alam MI., Sahni JK., Ali J., Baboota S., Nanostructure-based drug delivery systems for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm*, (2011).
71. Chang J, Paillard A., Passirani C., Morille M., Benoit JP., Betbeder D., Garcion E., Transferrin Adsorption onto PLGA Nanoparticles Governs Their Interaction with Biological Systems from Blood Circulation to Brain Cancer Cells. *Pharm Res*, DOI 10.1007/s11095-011-0624-1, (2011).
72. Guo J, Gao X, Su L., Xia H., Gu G., Pang Z., Jiang X., Yao L., Chen J., Chen H., Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. *Biomaterials*, 32(31), 8010-20, (2011).
73. Allard E, Hindre F., et al., (188)Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 1838–1846, (2008).

74. Allard E, Passirani C., et al., Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J Control Release* 130, 146–153, (2008).
75. Allarde, Passirani C., et al., Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. *Biomaterials* 30, 2302–2318, (2009).
76. Emerich DF., Winn SR., Snodgrass P., LaFreniere D., Agostino M., Wiens T., Xiong H., Bartus RT., Injectable chemotherapeutic microspheres and glioma II: enhanced survival following implantation into deep inoperable tumors. *Pharm Res*, 17(7), 776-781, (2000).
77. Menei P, Venier MC., Gamelin E., Saint-André JP., Hayek G., Jadaud E., Fournier D., Mercier P., Guy G., Benoit JP., Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma: a pilot study. *Cancer*, 86(2), 325-30, (1999).
78. Menei P , Boisdron-Celle M., Croué A., Guy G., Benoit JP., Effect of stereotactic implantation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres in healthy and C6 glioma-bearing rats. *Neurosurgery*, 39(1),117-23, (1996).
79. Allard E, Huynh NT., Vessières A., Pigeon P., Jaouen G., Benoit JP., Passirani C., Dose effect activity of ferrocifen-loaded lipid nanocapsules on a 9L-glioma model. *Int J Pharm*, 379(2), 317-23, (2009).
80. Roger M, Clavreul A., Venier-Julienne MC., Passirani C., Sindji L., Schiller P., Montero-Menei C., Menei P., *Biomaterials*, 31(32), 8393-401, (2010).
81. Di Nicola, M., et al., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3838-43.
82. Zanutto - Filho A, Braganhol E, Edelweiss MI, Behr GA, Zanin R, Schröder R, Simões-Pires A, Battastini AM, Moreira JC. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma.
83. Kaffashi, A., *Malign gliomların tedavisi için lipit ile işlevselleştirilmiş PLGA nanopartiküllerin tasarımı, in vitro ve in vivo değerlendirilmesi*. 2013(Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi).

84. Hüsnu Koşucu Deneysel sıçan yüksek dereceli beyin tümörü modelinde insan kaynaklı mezenkimal kök hücre göçünün 2013(Hacettepe Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi).