T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER TEDAVİSİ İÇİN İLAÇ YÜKLÜ NANO HİDROKSİAPATİT İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMİNİN ÜRETİLMESİ

REYHAN YANIKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. CEM BÜLENT ÜSTÜNDAĞ

İSTANBUL, 2018

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER TEDAVİSİ İÇİN İLAÇ YÜKLÜ NANO KALSİYUM FOSFAT İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMİNİN ÜRETİLMESİ

Reyhan YANIKOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 22.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

Marmara Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün FYL-2018-3374 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi konusunda beni sonsuz destekleyen, iş disiplininden bilimsel etiğe kadar gerçek bir bilim insanı kimliğini kazandıran ve hayatım boyunca örnek almaya devam edeceğim çok değerli hocam Doç. Dr. Cem Bülent Üstündağ'a

Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Sevil Yücel'e

Hücre kültürü çalışmalarında destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Adil Allahverdiyev'e

UV, FTIR ve TG-DTA karakterizasyon çalışmalarında destek sağlayan Sayın Doç. Dr. Didem Özçimen'e

TEM analizlerinde destek sağlayan Tübitak MAM'a

XRD analizlerinde destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Sahar Dinparvar, Ahmet Çetinkaya, Anıl Tevfik Koçer, Benan İnan, Emine Yapıcı, Cem Özel ve Zeynep Orman'a

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen, daima yanımda olan sevgili anneme, babama, abim ve kardeşime,

İlgi ve desteklerini eksik etmeyen tüm değerli dostlarıma,

Teşekkür ederim.

Haziran, 2018

Reyhan YANIKOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viiii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ xi

ÇİZELGE LİSTESİ xiii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3

BÖLÜM 2

NANO İLAÇ SİSTEMLERİ 5

2.1 Nanopartiküller 5
2.2 Nanopartikül Üretim Yöntemleri 7
2.2.1 Önceden Oluşturulmuş Polimerlerin Dispersiyonu 7
2.2.2 Polimerizasyon Yöntemi 8
2.2.3 Koaservasyon veya İyonik Jelasyon Yöntemi 8
2.2.4 Süperkritik Akışkan Teknolojisiyle Nanportikül Üretimi 9
2.3 Nanopartiküllerin Karakteristiklerinin İlaç Salımı Üzerine Etkisi 10
2.4 İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanulan Nanopartikül Türleri 15
2.5 Nanopartiküllerin Hedefli Salımı 18
2.5.1 Nanopartiküller Tarafından Pasif Hedefleme 19
2.5.2 Nanopartiküller ile Aktif Hedefleme 20

BÖLÜM 3

HİDROKSİAPATİT 22

3.1 Hidroksiapatit (HA) 22
3.2 Hidroksiapatit Sentez Yöntemleri 23
3.2.1 Kuru Metodlar 23
3.2.2 Islak Yöntemler 24
3.2.3 Alternatif Enerji Giriş Yöntemleri 27
3.2.4 Diğer Yöntemler 29

BÖLÜM 4

DOKSORUBİSİN 30

4.1 Doksorubisin 30
4.2 Doksorubisin Metabolizması 30
4.3 İlaç Etkisi (Biyolojik Etkiler) - Apoptoz, Otofaji ve Nekroz 32
4.4 Doksorubisin Toksisitesi 34

BÖLÜM 5

MEME KANSERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER 39

BÖLÜM 6

DENEYSEL ÇALIŞMA 44

6.1 Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerinin Üretilmesi 44
6.1.1 Yaş Kimyasal Yöntemiyle Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerinin Üretilmesi 45
6.1.2 Hidrotermal Yöntemle Hidroksiapatit Kristallerinin Üretilmesi 49
6.2 Doksorubisinin Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerine Yüklenmesi 52
6.2.1 Yaş Kimyasal Yöntemi İle Doksorubisinin Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerine Yüklenmesi 53
6.2.2 Doksorubisin Hidroklorür Yüklü Hidroksiapatit Kristallerine Hidrotermal Yöntem Uygulanması 57
6.3 Liyofilizasyon 58
6.4 Karakterizasyon 59
6.4.1 FT-IR Analizi 59
6.4.2 UV-Vis Spektrofotometre Analizi 59
6.4.3 Zeta Potansiyel Ölçümleri 59
6.4.4 X Işını Difraksiyonu Analizi (XRD) 60
6.4.5 BET Analizi 60
6.4.6 TG-DTA Analizi 60
6.4.7 TEM Analizi 60
6.5 Hücre Kültürü Çalışmaları 61

BÖLÜM 7

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA 65

7.1 FTIR Analizleri 65
7.2 Zeta Potansiyeli Analizi 69
7.3 UV-Vis Spektrofotometresi 71
7.4 XRD Analizi 76
7.5 BET Analizi 78
7.6 TG-DTA Analizi 80
7.7 TEM Analizi 82
7.8 Hücre Kültürü Çalışması 83

BÖLÜM 8

SONUÇ VE ÖNERİLER 85

KAYNAKLAR 87

ÖZGEÇMİŞ 105

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
nm	Nanometre
y/s	Su içinde yağ
s/y/s	Çoklu emülsiyon
Tc	Kritik sıcaklık
Pc	Kritik basınç
µm	Mikrometre
kDa	Kilodalton
gr	Gram
Å	Angstrom
GPa	Gigapaskal
MPa	Megapaskal
l	Litre
ml	Mililitre
dak	Dakika
mg	Miligram
m	Metre

KISALTMA LİSTESİ

3B	3 boyutlu
ADP	Adenozin difosfat
ANP	Atriyal natriüretik peptit
ATP	Adenozin trifosfat
BNP	Beyin natriüretik peptid
BSA	Sığır serum albümini
DCPD	Disiklopentadien
DMEM	Dulbecco'nun modifiye kartal ortamı (Besiyeri)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPR	Arttırılmış geçiş ve alıkonma
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre
GATA-4	GATA bağlayıcı protein 4
GSH	Azaltılmış glutatyon
HA	Hidroksiapatit
HPMA	N-(2-hidroksipropil) metakrilamid kopolimer
IFN-γ	İnterferon gamma
IgG	İmmunoglobülin G
IkK	IkB kinaz
IL-12	İnterlökin 12
MnSOD	Manganez süperoksit dismutaz
MPS	Mononükleer fagositler sistemi
MW	Mikrodalga
NAD	Nikotinamid adenin ve dinükleotid
NFkB	Nükleer faktör kappa B
Nha	Nano Hidroksiapatit
PEG	Poli (etilen glikol)
PARP-1	(poli (ADP-riboz) polimeraz-1)
PCA	Poli (siyanoakrilat)
PEO	Polimer etilen oksit

PEO-PPO	Etilen oksit-propilen oksit blok kopolimeri
PGA	Poli-L-glutamik asit
PK1	Doksorubisin ile HPMA'nın konjugatı
PLA	Poli (laktik asit)
PLG	Poli (D, L-glikolid)
PLGA	Poli (D, L-laktit-ko-glikolid)
PPO	Propilen oksit
PRINT	Islanmaz kalıplarda parçacık repkikasyonu
RESS	Kritik çözeltinin hızlı genişlemesi
NK	Doğal öldürücü
RNA	Ribo nükleik asit
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
SAS	Süperkritik anti-solvent
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TNF-alfa	Tümör nekroz faktör-alfa
TLR-4	Toll benzeri reseptör-4
UV-Vis	Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopi
XRD	X Işını Difraktometresi

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 6. 1 Yaş kimyasal yöntemi ile nana boyutlu hidroksiapatit üretimi akış şeması……. 45
Şekil 6. 2 Hazırlanan solüsyonları ultrasonik banyoda karıştırılması..... 46
Şekil 6. 3 Kalsiyum nitrat tetrahidrat solüsyonu 46
Şekil 6. 4 Di-amonyum hidrojen fosfat solüsyonu..... 47
Şekil 6. 5 Amonyak ile pH'ın ayarlanması..... 47
Şekil 6. 6 Solüsyonların biribirine damla damla karıştırılarak hidroksiapatit oluşumu…… ..... ……48
Şekil 6. 7 Çöken nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri..... 48
Şekil 6. 8 Kalıntılardan arındırılmış nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri 49
Şekil 6. 9 Hidrotermal yöntem ile nana boyutlu hidroksiapatit üretimi akış şeması 50
Şekil 6. 10 Hidrotermal reaktörün hücresi 51
Şekil 6. 11 Hidrotermal reaktörün parçaları..... 51
Şekil 6. 12 Hidrotermal reaktör 52
Şekil 6. 13 Liyofilize toz doksorubisin hidroklorür..... 53
Şekil 6. 14 Sırası ile kalsiyum nitrat tetrahidrat, di-amonyum hidrojen fosfat ve doksorubisin hidroklorür çözeltileri 54
Şekil 6. 15 Doksorubisin hidroklorür solüsyonunun kalsiyum nitrat tetrahidrat solüsyonuna damla damla karıştırılması..... 54
Şekil 6. 16 Kalsiyum nitrat tetrahidrat-doksorubisin hidroklorür çözeltisinin di-amonyum hidrojen fosfat çözeltisine damla damla karıştırılması..... 55
Şekil 6.17 Oluşan doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri……55
Şekil 6. 18 Çöken doksorubisin yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri 56
Şekil 6. 19 Kalıntılardan arındırılan doksorubisin yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri…… 56
Şekil 6. 20 Hidrotermal reaktörden çıkan kalıntılardan arındırılan doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri..... 57
Şekil 6. 21 Doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristallerinin yıkandıktan önce ve sonraki halleri..... 58
Şekil 6. 22 Liyafilizatör için dondurulmuş örnekler 58
Şekil 6. 23 Liyafilizatörden çıkan örnekler..... 59
Şekil 6. 24 Santrifüjden sonra MCF-7 meme kanseri hücreleri..... 61
Şekil 6. 25 MCF-7 hücreleri 96 well plate'e ekildikten sonra görünümü 62

Şekil 6. 26 MCF-7 hücreleri 96 well plate'e ekildikten sonra görünümü 62
Şekil 6. 27 24 saat inkübasyon sonrası MCF-7 meme kanseri hücreleri 63
Şekil 6. 28 96 well plate'e ekilen örnekler 63
Şekil 7. 1 Hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu 65
Şekil 7. 2 Hidrotermal hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu 66
Şekil 7. 3 Doksorubisin hidroklorür yüklü hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu ... 67
Şekil 7. 4 Hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu 68
Şekil 7. 5 Doksorubisin hidroklorüre ait FT-IR analizi sonucu 69
Şekil 7. 6 Zeta potansiyel değerleri 70
Şekil 7. 7 0,01 mg/ml HA çözeltisine ait UV spektrası 71
Şekil 7. 8 0,05 mg/ml HA çözeltisine ait UV spektrası 71
Şekil 7. 9 0,01 mg/ml H-HA çözeltisine ait UV spektrası..... 72
Şekil 7. 10 0,05 mg/ml H-HA çözeltisine ait UV spektrası 72
Şekil 7. 11 0,01 mg/ml Dox-HA çözeltisine ait UV spektrası 73
Şekil 7. 12 0,05 mg/ml Dox-HA çözeltisine ait UV spektrası 73
Şekil 7. 13 0,01 mg/ml H-HA+Dox çözeltisine ait UV spektrası 74
Şekil 7. 14 0,05 mg/ml H-HA+Dox çözeltisine ait UV spektrası 74
Şekil 7. 15 0,01 mg/ml Dox çözeltisine ait UV spektrası 75
Şekil 7. 16 0,05 mg/ml Dox çözeltisine ait UV spektrası 75
Şekil 7. 17 Hidroksiapatite ait XRD modeli 76
Şekil 7. 18 Hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli 76
Şekil 7. 19 Doksorubisin yüklü hidroksiapatite ait XRD modeli..... 77
Şekil 7. 20 Doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli 77
Şekil 7. 21 Doksorubisine ait XRD modeli 77
Şekil 7. 22 Hidroksiapatit ve hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli 78
Şekil 7. 23 Doksorubisin yüklü hidroksiapatit ve doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli 78
Şekil 7. 24 Hidroksiapatit için TG-DTA grafiği 80
Şekil 7. 25 Hidrotermal hidroksiapatit için TG-DTA grafiği 80
Şekil 7. 26 Doksorubisin yüklü hidroksiapatit için TG-DTA grafiği..... 81
Şekil 7. 27 Doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatite için TG-DTA grafiği 81
Şekil 7. 28 Hidroksiapatitin TEM görüntüsü 82
Şekil 7. 29 Hidrotermal hidroksiapatitin TEM görüntüsü 82
Şekil 7. 30 Hücrelerin canlılık oranı için grafik 83

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 6. 1 Hidroksiapatit üretimi için kullanılan yöntemeler ve üretim yöntemine göre isimlendirilmesi 44
Çizelge 6. 2 Doksorubisin hidroklorürün hidroksiapatit kristallerine yüklenmesi için yöntemler ve yönteme göre isimlendirilmesi 53
Çizelge 7. 1 BET analizi sonuçları 79
Çizelge 7. 2 Hücrelerin canlılık oranları 83

ÖZET

KANSER TEDAVİSİ İÇİN İLAÇ YÜKLÜ NANO HİDROKSİAPATİT İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMİNİN ÜRETİLMESİ

Reyhan YANIKOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile birlikte büyüyüp yayılan ve bunu takiben normal hücrelere yer bırakmayan, vücudun istediği gibi çalışmasını engelleyen bir hastalıktır. Meme kanseri, günümüzde en çok kadınlarda görülen, ortaya çıkma yaşı günden güne azalan ve kadınlarda ortaya çıkan tüm kanser türlerin de %30'unu oluşturan bir kanser türüdür. Günümüzde meme kanseri tedavisi için cerrahi tedavi, radyoterapi (ışın tedavisi), kemoterapi (ilaç tedavisi) ve hormonoterapi (hormon tedavisi) gibi standart tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Buna ek olarak yeni yöntemler araştırılmaya devam etmektedir.

Kalsiyum fosfat seramikleri arasında bulunan hidroksiapatit, kemikte ve dişlerin mine ve dentin tabakasında bulunan ve kimyasal formülü Ca10(PO4)6(OH)2 olan kalsiyum tuzudur. Hidroksiapatit hegzagonal kristal yapıya sahiptir. Ayrıca hidroksiapatitin yüzey özellikleri nedeniyle çeşitli metalleri (kurşun, çinko, kadmiyum, kobalt vb. gibi), çok çeşitli ilaç etken maddeleri, proteinler, boyarmaddeler, enzimler gibi maddeleri üzerine adsorblaması üzerine yapılan çalışmalar HA seramiklerin çok iyi bir adsorban madde olduğu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda yapılan tez çalışmasında elde edilen nano boyutlu hidroksiapatit-doksorubisin kristalleri ilaç taşıyıcılı sistem olarak kullanılacaktır.

Bu tez çalışmasında, doksorubisin yüklü hidroksiapatit (HA) taşıyıcıları üretildi ve karakterize edildi. Kalsiyum nitrat tetrahidrat, diamonyum hidrojen fosfat ve doksorubisinden yaş kimyasal yöntemi ile elde edilen hidroksiapatit, sırasıyla hidrotermal yöntem ve liyofilizasyon uygulanarak nano boyutlu hidroksiapatit

kristalleri üretilmesinde kullanılmıştır. Sentezlenen nano boyutlu hidroksiapatit-doksorubisin kristallerinin karakterizasyonu yapılmış ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında sitotoksisite testi yapılmıştır. Elde edilen bulgulardan yola çıkarak doksorubisin hidroksiapatit kristallerine başarılı bir şekilde yüklendiği ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında öldürücü etkisinin doksorubisinden daha fazla olduğu gözlemelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, ilaç, nanopartikül, hidroksiapatit, ilaç taşıyıcı, doksorubisin

ABSTRACT

PRODUCTION OF DRUG LOADED NANO HYDROXYAPATITE DRUG DELIVERY SYSTEM FOR CANCER TREATMENT

Reyhan YANIKOĞLU

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Cancer is a disease that grows and spreads with uncontrolled proliferation of cells, and then leaves no room for normal cells, preventing the body from working as it should. Breast cancer is a type of cancer most commonly seen in women today, whose age of onset is decreasing from day to day and constituting 30% of all types of cancer that occur in women. Today, standard treatment methods such as surgical treatment, radiotherapy (radiotherapy), chemotherapy (drug therapy) and hormonotherapy (hormone therapy) are applied for breast cancer treatment. In addition, new methods continue to be investigated.

Among the calcium phosphate ceramics, hydroxyapatite is the calcium salt of the chemical formula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ in the enamel and dentin layers of the bone and teeth. Hydroxyapatite has a hexagonal crystal structure. Furthermore, studies on the adsorption of various metals (such as lead, zinc, cadmium, cobalt, etc.) on a wide variety of pharmaceutical active substances, proteins, dyes, enzymes etc. due to the surface properties of hydroxyapatite reveal that HA ceramics are a very good adsorbent. In this context, the nano-sized hydroxyapatite-doxorubicin crystals obtained in the thesis study will be used as drug-delivery system.

In this thesis, doxorubicin-loaded hydroxyapatite (HA) carriers were produced and characterized. Hydroxyapatite obtained by wet chemical method of calcium nitrate

tetrahydrate, diammonium hydrogen phosphate and doxorubicin was used to produce nano-sized hydroxyapatite crystals by hydrothermal method and freeze-drying method, respectively. The synthesized nano-sized hydroxyapatite-doxorubicin crystals were characterized and tested for cytotoxicity in the MCF-7 breast cancer cell line. From the results obtained, it was observed that doxorubicin was successfully loaded onto hydroxyapatite crystals and that the MCF-7 breast cancer cell line had a higher killing effect than doxorubicin.

Keywords: Breast cancer, drug, nanoparticle, hydroxyapatite, drug carrier, doxorubicin

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

İnsan vücudundaki bütün dokular hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler vücudumuzdaki dokularda bulunan en küçük yapıtaşları olup ancak ve ancak mikroskop ile gözlemlenebilirler. Kas ve sinir hücreleri hariç sağlıklı somatik hücrelerin bölünebilme yetenekleri vardır. Bu yeteneklerini hücrelerin yenilenmesi ve hasar görmüş dokuların onarımı için kullanırlar. Ancak bu hücrelerin bölünebilme yetenekleri belirli bir noktaya kadar devam eder ve bir süre sonra bölünmezler. Yani belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünmeye devam ederler ise kanser hücreleri oluşmaya başlar ve bu hücreler kanser kitlelerine dönüşür. Kanser için yapılabilecek en net ve kısa tanım budur.

Hücrelerin kontrolsüz ve sınırsız çoğalmaları esnasında, hücrelerde bazı davranış bozuklukları ortaya çıkabilir. Örneğin, hücre yapması gereken bir şeyi yapmaz veya tam tersi yapmaması gereken bir şeyi yapabilir. Bu da doğal olarak vücutta istenmeyen olaylara sebep olur. Sınırsız bölünen bu hücreler bulundukları yerde çoğalarak komşu dokulara hatta onlardan da geçerek vücudun diğer dokularına invazyon başlar. Buna metastaz adı verilmektedir. Tümör komşu dokuları da işgal ettikten sonra bu dokuların işlevlerini engellerler. Kanser türleri vücudun hangi dokusunda konuşlanmış ise ona göre isimlendirilir. Üreme ve sindirim sistemleri, deri, meme, akciğer en yaygın rastlanan kanser türleridir.

Çeşitli kanser türleri, farklı hızlarda bölünürler, aynı zamanda birbirinden farklı yayılma yolları vardır. Bu farklılıklarından ötürü farklı tedavi çeşitlerine cevap verirler.

Tümör hedefli nanopartikül ilaç salım sistemleri, bir dönüm noktası olarak ifade edilebilecek bir buluştur ve tümör tanı ve tedavisinde, gelişmiş permeabilite ve retansiyon ya da diğer bir ifade ile arttırılmış geçiş ve alıkonma (EPR) etkisi ilk olarak 1986'da tanımlandığından beri kapsamlı olarak çalışılmaktadır [1]. İlaçları tümör dokularına etkili bir şekilde vermek için, nano parçacıkların kan dolaşımında dengeli kalması ve tümörde birikim artışı göstermesi gerekmektedir [2]. Terapötik etkinliği en üst düzeye çıkarmak için nanoparçacıklar derin tümör dokusuna nüfuz etmeli, tümör hücreleriyle yüksek afiniteli etkileşime sahip olmalı ve ilaçları tümör hücreleri içinde veya dışında serbest bırakmalıdır.

1990'lardan bu yana, kanser hücrelerinin çoğalması üzerine HA ultra ince (nano) partikülünün (nHA) önleyici etkisi araştırılmış ve rapor edilmiştir [3,4]. Bununla birlikte nHA için malzeme bilimi ve uygulamalı tıp topluluklarına büyük ilgi gösterilmiştir [5,6]. Nano boyutlu hisroksiapatitin bazı kanser hücre hatlarının çoğalmasını inhibe ettiği ve kanser hücresi hattı üzerinde normal hücre hattından çok daha fazla önleyici etki gösterdiği gözlemlenmiştir [7].

Bununla birlikte, kanser hücre çoğalmasının inhibisyonu sırasıyla düşük ve yüksek nano boyutlu hidroksiapatit konsantrasyonunda normal hücre çoğalmasınınkinden daha fazladır. Nano boyutlu hidroksiapatitin hücre proliferasyonu üzerindeki inhibisyon etkileri ayrıca tedavi süresine de bağlıdır [7].

Meme kanseri, sıklıkla kemiğe metastaz yapar; burada ikincil tümör büyümesine, osteolitik kemik bozulmasına ve kötü klinik prognoza neden olmaktadır. Kemiklerin inorganik bileşeni ile yakından ilişkili bir mineral olan hidroksiapatitin bu süreçlerde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, osteolitik kemik remodelinginin sonucu olarak değişen partikül boyutu ve kristalinite gibi kemik mineralinin nano ölçekli materyal özelliklerinin metastatik meme kanserini nasıl etkilediği şimdilik net olarak bilinmemektedir [8].

Meme metastazlarının yaklaşık % 60-75'i kemiklerde görülmektedir [9,11]. Artan osteoklastik aktivite ve osteoliz ile karakterize olan bu metastatik hastalıklar, ağrı, kırıklar ve sinir sıkıştırma sendromları ile ilişkilidir ve bu da yaşam kalitesinin

azalmasına neden olmaktadır [10,11]. Bununla birlikte halen, kemik tümörleri için tedavi edici bir tedavi mevcut değildir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı meme kanserinin tedavisinde kullanılabilecek ilaç yüklü nano kalsiyum fosfat ilaç taşıyıcı sistem üretilmesidir. Bu ilaç taşıyıcı sistem yaş kimyasal yöntemi ile sentezlenecek olup hidrotermal yöntem uygulanacaktır. Nano boyutlu kalsiyum fosfat ile kemoterapötik bir ilaç olan doksorubisinin konjugasyonu yapılarak doksorubisinin terapötik etkinliği artırılacaktır. Bunun yanısıra, üretilen doksorubin yüklü nano boyutlu kalsiyum fosfat kristallerinin ve doksorubisin yüklü olmayan nano boyutlu kalsiyum fosfat kristallerinin karakterizasyonu yapılacaktır. Son aşamada ise üretilen doksorubin yüklü nano boyutlu kalsiyum fosfat kristallerinin ve doksorubisin yüklü olmayan nano boyutlu kalsiyum fosfat kristallerinin in vitro hücre testleri yapılacaktır.

1.3 Hipotez

Kemoterapötik ilaçlar/maddeler kanserli hücrelere etki etmenin yanı sıra normal sağlıklı hücreleri de etkilediği için tümörlü bölgeye ulaşabilen ilaç dozajını sınırlandırır. Tedavi devam ettikçe tümörlü hücrelerin yanı sıra vücutta ilaç birikimine sebep olacağı için ağır yan etkilere sebep olmaktadır. Antikanser ilaçların istenilen yani kontrollü biyodağılımını sağlamak için iki yol bulunmaktadır: pasif hedefleme ve aktif hedefleme. EPR (arttırılmış geçiş ve alıkonma) etkisi sayesinde ilaç dağılımı ‘’pasif hedefleme’’ olarak adlandırılır. Normal sağlıklı hücre yapılarında 2 nm’den büyük moleküller sıkı bağlantılar nedeniyle endotel hücreler arasından geçemezler. Ancak, tümörü oluşturan kanser hücreleri arasına bu hücrelerin morfolojisi gereği sıkı paketlenememişlerdir ve aralarında diğer doku tiplerine nazaran daha fazla boşluk (gözenek) mevcuttur. Tümörün bahsedilen yapısı gereği 100-150 nm arası boyuttaki nano taşıyıcılar tümör içerisine penetre edebilir ve bu durumda tümörlü hücrelerde nano taşıyıcıların birikmesi meydana gelir. Bu özellikten faydalanarak pasif hedefleme ile ilacın kontrollü bir şekilde salınımı gerçekleşebilir. Meme kanseri tedavisinde pasif hedeflemede kullanılabilecek nano ilaç sistemini geliştirilmesi hedeflenmiştir. Nano ilaç sisteminde taşıyıcı olarak hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) nano kristalleri

kullanılacaktır. HA kemiğin ana mineral yapısını oluşturan kristaldir bu nedenle biyouyumluluğu yüksek bir malzemedir ve birçok biyomedikal uygulamada başarı ile kullanıldığı için ilaç taşıma sistemlerinde kullanılması uygun olarak düşünülmektedir. HA nano kristalleri üzerine meme kanseri tedavisinde kemoterapik ilaç olarak kullanılan doksorubisinin yüklenecek ve meme kanseri hücreleri üzerindeki etkinliği incelenecektir. Bu tez çalışmasında temel amaç doksorubisin HA taşıyıcı sisteme yüklenerek aktivitesinin artırılması ve hedeflenen bölgede uygulama kolaylığının sağlanmasıdır. Böylece kemoterapötik bir ilaç olan doksorubisinin tedavi esnasında gelişen olası yan etkileri azalacak ve hasta tedaviden en az olumsuz etki ile çıkması sağlanacaktır.

BÖLÜM 2

NANO İLAÇ SİSTEMLERİ

2.1 Nanopartiküller

Nanopartiküller, 1 nanometre (nm) ile 100 nm aralığında bir büyüklüğe sahip katı partiküller olarak tanımlanmaktadırlar. İlaç salım sistemi olarak, hapsedilebilir, kapsüllenebilir veya bir nanopartikül ile matrisine bağlanabilirler. Hazırlama yöntemine bağlı olarak nanopartiküller, nanoküreler ve nanokapsüller olarak elde edilebilirler. Nanoküreler, ilacın yüzeyde fiziksel olarak homojen dağıldığı matris sistemleri iken, nanokapsüller, ilacın eşsiz bir polimer membran ile çevrelenmiş bir oyukta sınırlı olarak bulunduğu sistemlerdir. Son yıllarda, biyobozunur polimerik nanopartiküller, özellikle uzun süre etkili partiküller olarak bilinen poli (etilen glikol) (PEG) gibi hidrofilik polimerler ile kaplanmış olanl nanopartiküller, protein, peptit ve genleri taşıma yetenekleri ve gen terapisinde DNA taşıyıcıları olarak, belirli bir organda uzun bir süre boyunca dolaşım kabiliyetleri nedeniyle, potansiyel ilaç salım sistemleri olarak kullanılmıştır [12-15].

İlaç salım sistemi olarak nanopartiküllerin tasarlanmasındaki başlıca amaçlar arasında, ilacın terapötik olarak optimum hız ve dozda olmak üzere hedeflenen bölgeye özgü iletimini sağlamak için partikül büyüklüğünü, yüzey özelliklerini ve farmakolojik olarak aktif maddelerin salınmasını kontrol etmek vardır. Lipozomlar, ilaçların bozulmasını önlemek, etki bölgesini hedef almak ve toksisite veya yan etkilerini azaltmak gibi eşsiz avantajlara sahip potansiyel taşıyıcılar olarak kullanılmasına rağmen, düşük enkapsülasyon verimliliği, suda çözünen ilacın kan bileşenlerinin varlığında hızlı

salınımı ve zayıf depolama kabiliyeti gibi olağan olumsuz özellikleri nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Öte yandan, polimerik nanopartiküller lipozomlarla kıyaslandığında bazı spesifik avantajlar sunmaktadırlar. Örneğin, ilaçların ve proteinlerin stabilitesini arttırmaya ve kullanışlı kontrollü salım özelliklerine sahip olmalarına yardımcı olurlar [16,17].

Bir ilaç salım sistemi olarak nanopartikülleri kullanmanın avantajları aşağıda sıralanmıştır:

- Parenteral uygulamadan sonra hem pasif hem de aktif ilaç hedeflemesini sağlamak için nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey karakteristikleri kolayca manipüle edilebilmektedir.
- Nanopartiküler ilaçlar, ilacın terapötik etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak için ilacın organlara dağılımını ve ilacın daha sonra temizlenmesini sağlamanın yanı sıra, ilacın taşınımı sırasında ve lokalizasyon yerinde ilacın salınmasını kontrol eder ve sürekli olmasını sağlarlar.
- Nanopartiküllerin kontrollü salım ve partikül degradasyon özellikleri matris bileşenlerinin seçimi ile kolayca modüle edilebilir.
- Nanopartiküllerin ilaç yüklemesi nispeten yüksektir ve ilaçlar herhangi bir kimyasal reaksiyon olmaksızın sistemlere dahil edilebilirler; bu özellik, ilaç aktivitesini korumak için önemli bir faktördür.
- Bölgeye özgü hedefleme, partiküllerin yüzeyine hedef ligandların bağlanmasıyla veya manyetik rehberlik kullanılmasıyla sağlanabilir.
- Nanopartiküllerle oluşturulan ilaç salım sistemleri oral, nazal, parenteral, intraoküler dâhil olmak üzere çeşitli uygulama yollarında kullanılabilirler.

Tüm bu avantajlara rağmen, nanopartiküllerin bazı sınırlamaları vardır. Örneğin, küçük boyut ve geniş yüzey alanına sahip olmaları, partiküllerin kümelenmesine yol açarak, nanopartiküllerin sıvı ve kuru formlarda fiziksel olarak işlenmesini zorlaştırabilmektedir. Bu duruma ek olarak, küçük partikül büyüklüğü ve geniş yüzey alanı, sınırlı ilaç yüklemesi ve partikülün patlamasıyla ilacın serbest kalması ile sonuçlanabilmektedir. Bu küçük problemler, nanopartiküller klinik olarak kullanılmadan veya ticari olarak temin edilmeden önce aşılmalıdır.

2.2 Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Nanopartiküller, proteinler, polisakkaritler ve sentetik polimerler gibi çeşitli malzemelerden hazırlanabilirler. Matris materyalinin seçimi, (a) gerekli nanopartiküllerin büyüklüğü; (b) ilacın doğal özellikleri, örneğin, suda çözünürlük ve kararlılık gibi; (c) yük ve geçirgenlik gibi yüzey özellikleri; (d) biyobozunurluk derecesi, biyouyumluluk ve toksisite; (e) İstenen ilaç salım profili; ve (f) Son ürünün antijenikliği dâhil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır [18].

Nanopartiküller şimdiye kadar en sık üç yöntemle hazırlanmıştır: (1) önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu; (2) monomerlerin polimerizasyonu; ve (3) hidrofilik polimerlerin iyonik jelasyonu veya koaservasyonu. Bununla birlikte literatürde, süper-kritik akışkan teknolojisi [19] ve ıslanmaz kalıplarda parçacık replikasyonu (PRINT) [20] gibi başka yöntemler de nanopartiküllerin üretimi için tanımlanmıştır. İkinci yöntemin, endüstride nanopartiküllerin gelecekteki seri üretimi için bir örnek oluşturabilecek partikül büyüklüğünün, şeklinin ve bileşiminin mutlak kontrolüne sahip olduğu öngörülmektedir.

2.2.1 Önceden Oluşturulmuş Polimerlerin Dispersiyonu

Önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu, poli (laktik asit) (PLA); poli (D, L-glikolid), PLG; poli (D, L-laktit-ko-glikolid) (PLGA) ve poli (siyanoakrilat) (PCA) 'dan biyobozunur nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan yaygın bir tekniktir [21-23]. Bu teknik, aşağıda tarif edildiği gibi çeşitli şekillerde kullanılabilir.

Solvent Buharlaşma Metodu: Bu yöntemde, polimer, hidrofobik olan ilacın çözündürülmesi için çözücü olarak kullanılan diklorometan, kloroform veya etil asetat gibi bir organik çözücü içinde çözündürülür. Polimer karışımı ve ilaç çözeltisi, daha sonra su içinde yağ (y/s) emülsiyonu oluşturmak için bir sürfaktan veya emülsifiye edici ajan içeren sulu bir çözelti içinde emülsifiye edilir. Kararlı emülsiyon oluştuktan sonra, organik çözücü, ya basınç düşürülerek ya da sürekli karıştırılarak buharlaştırılır. Partikül büyüklüğünün, stabilizatörün tipi ve konsantrasyonları, homojenleştirici hızı ve polimer konsantrasyonundan etkilendiği görülmüştür [24]. Küçük boyutlu partikül üretmek için, genellikle yüksek hızlı bir homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılabilir [25].

Spontan Emülsifikasyon Veya Çözücü Difüzyon Yöntemi: Bu yöntem solvent buharlaştırma yönteminin değiştirilmiş bir versiyonudur [26]. Bu yöntemde, suyla karışabilen çözücü az miktarda suyla karışmayan organik çözücü ile birlikte bir yağ fazı olarak kullanılır. Solventlerin spontane olarak yayılmasından dolayı oluşan ara yüzey türbülansı küçük parçacıkların oluşumuna yol açan iki faz arasında oluşturulur. Suyla karışabilen çözücünün konsantrasyonu arttıkça, partikül boyutunda bir azalma sağlanabilir.

Hem çözücü buharlaştırma hem de çözücü difüzyon yöntemleri hidrofobik veya hidrofilik ilaçlar için kullanılabilir. Hidrofilik ilaç olması durumunda, bir çoklu emülsiyonunun (s/y/s) iç sulu fazda çözünmüş ilaç ile birlikte oluşması gerekmektedir.

2.2.2 Polimerizasyon Yöntemi

Bu yöntemde, monomerler sulu bir solüsyon içinde nanopartiküller oluşturmak üzere polimerize edilir. İlaç, polimerizasyon ortamında çözünerek ya da polimerizasyon tamamlandıktan sonra nanopartiküller üzerine adsorpsiyon yoluyla dahil edilir. Nanopartikül süspansiyonu daha sonra ultrasantrifüjleme ile polimerizasyon için kullanılan çeşitli stabilizatörleri ve yüzey aktif maddeleri çıkarmak ve partikülleri izotonik yüzey aktif bir madde içermeyen ortamda yeniden süspanse etmek için saflaştırılır. Yapılan bir çalışmada bu yöntem, polibütilsiyanoakrilat veya poli (alkilsiyanoakrilat) nanopartiküllerin üretilmesi için rapor edilmiştir [27,28]. Bu yöntemde, nanokapsül oluşumu ve oluşan partikül büyüklüğü kullanılan yüzey aktif maddelerin ve stabilizatörlerin konsantrasyonuna bağlıdır [29].

2.2.3 Koaservasyon Veya İyonik Jelasyon Yöntemi

Kitosan, jelatin ve sodyum aljinat gibi biyobozunur hidrofilik polimerler kullanılarak nanopartiküllerin üretilmesi için çok fazla araştırma yapılmıştır. Calvo ve arkadaşları, iyonik jelleşme ile hidrofilik kitosan nanopartikülleri üretmek için bir yöntem geliştirmişlerdir [30,31]. Bu yöntem, bir polimer kitosan, bir di-blok ko-polimer etilen oksit veya propilen oksit (PEO-PPO) ve diğeri bir polianion sodyum tripolifosfat olan iki sulu fazın karışımını içermektedir. Bu yöntemde, kitosanın pozitif yüklü amino grubu, nanometre aralığında bir boyuta sahip koaservatlar oluşturmak için negatif

yüklü tripolifosfat ile etkileşmektedir. Koaservatlar, iki sulu faz arasındaki elektrostatik etkileşimin bir sonucu olarak oluşur, oysa iyonik jelasyon, oda sıcaklığında iyonik etkileşim koşulları nedeniyle sıvıdan jele geçiş yapılan malzemeyi içerir.

2.2.4 Süperkritik Akışkan Teknolojisi Kullanılarak Nanopartiküllerin Üretimi

Çözücü ekstraksiyon-buharlaştırma, çözücü difüzyonu ve organik faz ayırma yöntemleri gibi geleneksel yöntemler, çevreye ve fizyolojik sistemlere zararlı olan organik çözücülerin kullanılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle, süperkritik akışkanlar çevreye zarar vermeyeceğinden, biyobozunur mikro ve nanopartiküller hazırlamak için alternatif olarak süper kritik akış teknolojisi araştırılmıştır [32].

Süperkritik bir akışkan, genellikle, sıvının basınçtan bağımsız olarak tek bir fazda kaldığı kritik sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıktaki çözücü olarak tanımlanabilir. [32]. Süperkritik CO_2 (SC CO_2), hafif kritik koşulları (Tc = 31.1°C, Pc = 73.8 bar), toksik olmaması, yanmama ve düşük fiyata temin edilebilme gibi özellikleri nedeniyle en çok kullanılan süper kritik sıvıdır. Süperkritik sıvıları içeren en yaygın işleme teknikleri, süperkritik anti-solvent (SAS) ve kritik çözeltinin hızlı genişlemesidir(RESS). SAS prosesi, mikronize edilecek çözünenin çözünmesi için süper kritik akışkanla (SC CO_2) tamamen karışabilen bir sıvı çözücü, örneğin metanol kullanır; işlem koşullarında, çözünenin süper kritik akışkan içinde çözünmemesi nedeniyle, sıvı çözücünün süperkritik akışkan tarafından özütlenmesi, çözünenin anlık çökelmesine yol açar ve nano taneciklerin oluşumuyla sonuçlanır [19]. Thote ve arkadaşları mikrokapsülleme amaçlı hidrofilik ilaç deksametazon fosfat ilacı nanopartiküllerinin oluşumu için modifiye edilmiş bir SAS yönteminin kullanımını bildirmişlerdir [33]. RESS, çözünme işleminin süperkritik bir akışkanda (süper kritik metanol gibi) çözündürülmesi ve daha sonra çözeltinin küçük bir nozul boyunca düşük basınçlı bölgeye hızla genişlemesi nedeniyle SAS işleminden farklıdır [32]. Böylece süperkritik akışkanların çözücü gücü önemli ölçüde azalır ve çözünen sonunda çöker. Bu teknik temizdir çünkü çökelti temelde solvent içermez. Polimerik nanopartiküllerin üretimi için RESS ve onun modifiye edilmiş prosesi kullanılmıştır [34]. Süper kritik akışkan teknolojisi tekniği,

çevre dostu ve seri üretime uygun olmasına rağmen, özel olarak tasarlanmış ekipman gerektirir ve bu yüzden nispeten daha pahalıdır.

2.3 Nanopartiküllerin Karakteristiklerinin İlaç Salımı Üzerine Etkisi

Partikül Büyüklüğü

Partikül büyüklüğü ve boyut dağılımı, nanopartikül sistemlerinin en önemli karakteristik özellikleridir. Partikül büyüklüğü, nanopartikül sistemlerinin in vivo ortamda dağılımını, biyolojik gidişatını, toksisitesini ve hedefleme kabiliyetini belirler. Partikül büyüklüğü ayrıca, nanopartikülün ilaç yükleme kapasitesini, ilaç salınımını ve nanopartiküllerin stabilitesini de etkileyebilmektedir.

Birçok çalışma, mikron altı boyutundaki nanopartiküllerin bir ilaç salım sistemi olarak mikropartiküllere göre birtakım avantajlara sahip olduğunu göstermiştir [35]. Genel olarak nanopartiküller mikropartiküllere kıyasla nispeten daha yüksek hücre içi tutuluma sahip olmaları ile birlikte küçük boyutları ve nispeten hareketli olmaları nedeniyle daha geniş bir biyolojik hedefleme yelpazesine sahiptirler. Desai ve arkadaşları, 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin 1 µm mikropartiküllerden 2.5 kat daha fazla alım sağladığını ve bir Caco-2 hücre hattında 10 um mikropartiküllere göre 6 kat daha fazla alım sağladığını bulmuşlardır [36]. Daha sonraki bir çalışmada, mikropartiküller epitelyal dokuda ağırlıklı olarak lokalize iken, nanopartiküller bir in situ intestinal döngü modelinde submukozal tabakalar boyunca nüfuz etmişlerdir [37]. Ayrıca, nanopartiküllerin, beyin tümörleri gibi tedavi edilmesi zor hastalıklar için terapötik ajanların sürekli olarak verilmesini sağlayabilen hiper ozmotik mannitolün sıkı bağlantılarının açılmasını takiben kan-beyin bariyerini geçebileceği bildirilmiştir [38]. Yapılan bir çalışmada, Tween 80 kaplı nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir [39]. Bazı hücre hatlarında, yalnızca mikron altı nanopartiküller (daha büyük boyutlu mikropartiküller değil), verimli bir şekilde alınabilmektedir [40].

İlaç salımı partikül büyüklüğünden etkilenmektedir. Daha küçük partiküller daha büyük bir yüzey alanına sahiptir, bu nedenle, ilacın çoğunun partikül yüzeyinde ya da yakınında olması, hızlı ilaç salımına yol açacaktır. Oysa daha büyük partiküller daha fazla ilacın kapsüllenmesine ve yavaşça yayılmasına izin veren geniş çekirdeklere

sahiptirler [41]. Daha küçük partiküller ayrıca, nanopartikül dispersiyonunun taşınması ve depolanması sırasında partiküllerin daha fazla birikmesi riskine sahiptir. Nanopartikülleri mümkün olan en küçük ancak maksimum stabilite ile formüle etmek her zaman zor bir iştir.

Polimer bozunması ayrıca partikül büyüklüğünden de etkilenebilir. Örneğin, in vitro ortamda PLGA polimer bozunmasının, artan partikül büyüklüğü ile arttığı bulunmuştur [42]. Daha küçük parçacıklarda, oluşan PLGA'nın bozunma ürünlerinin partiküllerden kolayca dağıldığı ve büyük partiküllerde ise, polimer malzemenin otokatalitik bozunmasına neden olacak şekilde daha uzun bir süre boyunca polimer matrisinde degradasyon ürünlerinin daha fazla kaldığı düşünülmüştür. Bu nedenle, daha büyük parçacıkların daha hızlı polimer bozunmasının yanı sıra ilaç salımına katkıda bulunacağı hipotezi öne sürülmüştür. Bununla birlikte, Panyam ve arkadaşları farklı boyut aralıkları olan PLGA partikülleri hazırlamışlardır ve in vitro ortamda polimer bozunma oranlarının farklı büyüklükteki partiküller için önemli ölçüde farklı olmadığını bulmuşlardır [43].

Halen, partikül büyüklüğünü belirleyen en hızlı ve en rutin yöntem, foton-korelasyon spektroskopisi veya dinamik ışık saçılımıdır. Foton-korelasyon spektroskopisi, ortamın viskozitesinin bilinmesini gerektirir ve partikülün çapını Brownian hareketi ve ışık saçılımı özellikleri ile belirler [44]. Foton-korelasyon spektroskopisi ile elde edilen sonuçlar genellikle tarama veya transmisyon elektron mikroskobu (SEM veya TEM) ile doğrulanmaktadır.

Nanopartiküllerin Yüzey Özellikleri

Nanopartiküller intravenöz olarak uygulandığında, vücut bağışıklık sistemleri tarafından kolayca tanınır ve daha sonra dolaşımdan fagositler tarafından temizlenirler [45]. Nanopartiküllerin büyüklüğünün yanı sıra, yüzey hidrofobikliği de, esas olarak proteinler gibi adsorbe edilmiş kan bileşenlerinin(opsoninler) miktarını belirlemektedir. Bu sırayla nanopartiküllerin in vivo kaderini etkilemektedir [45,46]. Bu opsoninlerin opsonizasyon adı verilen nanopartiküllerin yüzeyine bağlanması, nanopartiküller ve fagositler arasında bir köprü görevi görmektedir. Bir ilacın geleneksel taşıyıcılara bağlanması, ilaç biyodağılım profilinin modifikasyonuna yol

açarak esas olarak karaciğer, dalak, akciğerler ve kemik iliği gibi mononükleer fagositler sistemine (MPS) dağılmasını sağlamaktadır. Gerçekten de, modifiye edilmemiş nanopartiküller (geleneksel nanopartiküller) kan akışında, hızla opsonize edilir ve MPS bakımından zengin organların makrofajları tarafından büyük ölçüde temizlenirler [47]. Genel olarak yabancı maddelerin, özellikle yabancı makromoleküllerin tanınması için kullanılan IgG, kompleman C3 bileşenleridir. Bu nedenle, nanopartiküller tarafından ilaç hedeflemede başarı olasılığını artırmak için, opsonizasyonu en aza indirmek ve in vivo olarak nanopartiküllerin dolaşımını uzatmak gereklidir. Bu, iki yolla elde edilebilmektedir. Bunlar

- Nanopartiküllerin hidrofilik polimerler/ yüzey aktif maddelerle yüzeylerinin kaplaması
- Nanopartiküllerin polietilen glikol (PEG), polietilen oksit, polioksamer, poloksamin ve polisorbat 80 (Tween 80) gibi hidrofilik segmentlere sahip biyobozunur kopolimerlerlerle formülasyonu.

Çalışmalar, nanopartikül yüzeyindeki PEG konformasyonunun PEG tabakasının opsonin itici fonksiyonu için çok önemli olduğunu göstermektedir. Fırça benzeri ve ara konfigürasyonlardaki PEG yüzeyleri fagositoz ve kompleman aktivasyonunu azaltırken, mantar benzeri konfigürasyondaki PEG yüzeyleri güçlü komplement aktivatörleri ve fagositoz sağlamışlardı [13,48].

Bir nanopartikülün zeta potansiyeli genellikle nanopartiküllerin yüzey yükü özelliğini karakterize etmek için kullanılmaktadır [49]. Zeta potansiyeli parçacıkların elektrik potansiyelini yansıtır ve parçacık içinde dağıldığı ortamın bileşiminden etkilenmektedir. Zeta potansiyeli, yüklü bir aktif malzemenin nanokapsülün merkezinde kapsüllenmiş veya yüzeye adsorbe edilmiş olup olmadığını belirlemek için de kullanılabilir.

İlaç Yüklenmesi

İdeal olarak, başarılı bir nanopartikülat sistemi, yüksek bir ilaç yükleme kapasitesine sahip olmalı, böylece uygulama için matris materyallerinin miktarını azaltmalıdır. İlaç yükleme iki yöntemle yapılabilir:

- Nanopartikül üretimi sırasında birleştirme (birleştirme yöntemi)
- Taşıyıcıyı konsantre bir ilaç çözeltisi (adsorpsiyon / absorpsiyon tekniği) ile inkübe ederek nanopartiküllerin oluşmasından sonra ilacın absorbsiyonu.

İlaç yükleme ve yakalama verimliliği, polimer bileşimi, molekül ağırlığı, ilaç polimer etkileşimi ve uç fonksiyonel grupların (ester veya karboksil) varlığı ile ilişkili olan matris materyali veya polimerdeki katı-halli ilaç çözünürlüğüne (katı çözünme veya dağılımına) bağlıdır [50-52]. PEG kısmının ilaç yüklemesi üzerinde az etkisi vardır veya hiç yoktur [53]. Makromoleküller veya proteinler, minimum çözünürlük ve maksimum adsorpsiyon olduğunda, izoelektrik noktasında veya yakınında yüklendiğinde en büyük yükleme verimliliğini göstermektedirler [30]. Küçük moleküller için yapılan çalışmalar, ilaç ile matris materyalleri arasındaki iyonik etkileşimin kullanımının ilaç yüklemesini arttırmak için çok etkili bir yol olduğunu göstermektedir [54,55].

İlaç Salımı

Başarılı bir nanopartikül ilaç salım sistemi geliştirmek için, hem ilaç salımı hem de polimer biyodegradasyonu önemli bir faktördür. Genel olarak, ilaç salım oranı aşağıdaki faktörlere bağlıdır:

- nanopartikül matrisi aşınması / bozunması;
- erozyon / difüzyon prosesinin kombinasyonu
- ilacın çözünürlüğü;
- sürfaktan/adsorbe edilen ilacın desorpsiyonu;
- nanopartikül matrisi ile ile difüzyonu.

Böylece matris materyallerinin çözünürlüğü, difüzyonu ve biyodegradasyonu, salım prosesini kontrol eder.

İlacın homojen olarak dağıldığı nanoküreler söz konusu olduğunda, ilacı salımı, gömülü koşulları altında matrisin difüzyonu veya erozyonu ile gerçekleşir. İlacın

difüzyonu matriks erozyonundan daha hızlı ise, salınım mekanizması büyük ölçüde bir difüzyon prosesi ile kontrol edilir. Hızlı başlangıç salımı veya "patlaması" esas olarak, nanopartiküllerin geniş yüzeyine zayıf bağlı veya adsorbe olmuş ilaca dayandırılır [56]. İlaç ile polimeri birleştirme yönteminin ilaç salım profili üzerinde etkisi olduğu açıktır. İlaç birleştirme yöntemi ile yüklenirse, sistem nispeten küçük bir patlama etkisine ve daha iyi sürekli salınım özelliklerine sahip olacaktır [57]. Eğer nanopartikül polimer ile kaplanırsa, ilacın salımı daha sonra ilacın çekirdekten polimerik zar boyunca yayılmasıyla kontrol edilir. Membran kaplaması ilacın serbest bırakılması için bir bariyer görevi görür, bu nedenle, polimer membranda ilacın çözünürlüğü ve difüzivitesi ilaç salımındaki belirleyici faktör olur. Ayrıca ilaç salım hızı, ilaç ile solüsyona ilave edilen yardımcı içeriklerin arasındaki iyonik etkileşimden de etkilenebilir.

İlaç daha az suda çözünür bir kompleks oluşturmak için yardımcı katkı maddeleri ile etkileşime girdiğinde, ilaç salınımı hemen hemen hiç patlama etkisi olmaksızın çok yavaş olabilir [54]. Buna rağmen, eğer yardımcı maddeler ilave edilirse, örneğin, etilen oksit-propilen oksit blok kopolimerinin (PEO-PPO) kitosana eklenmesi, PEO-PPO'nun kitosan ile rekabetçi elektrostatik etkileşimi nedeniyle model ilaç sığır serum albümini (BSA) ile matriks materyalin (kitosan) etkileşiminı artırır. Böylece, daha sonra ilaç salımında bir artış gözlemlenebilir [31].

İlacın in vitro salınımını incelemek için kullanılabilecek çeşitli yöntemler şunlardır:

- Yapay veya biyolojik membranlı yan yana difüzyon hücreleri;
- Diyaliz torbası difüzyon tekniği;
- Ters diyaliz torbası tekniği;
- Çalkalama, ardından ultrasantrifüj / santrifüjleme;
- Ultra filtrasyon veya santrifüj ultra filtrasyon teknikleridir.

Genellikle salım çalışması kontrollü çalkalama ve ardından santrifüjleme ile gerçekleştirilir. Nanopartiküllerin salınım ortamından ayrılmasında karşılaşılan zaman alıcı doğa ve teknik zorluklar nedeniyle, diyaliz tekniği genellikle tercih edilmektedir.

2.4 İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanılan Nanopartikül Türleri

İlaç salım sistemi olarak kullanılan nanopartiküller, polimerler (polimerik nanopartiküller, miseller veya dendrimerler), lipidler (lipozomlar), virüsler (viral nanopartiküller) ve hatta organometalik bileşik (nanotüpler) gibi çeşitli malzemeler kullanılarak uygulanan mikroskopik parçacıklar (3-200 nm), cihazlar veya sistemlerdir.

Polimer Bazlı İlaç Taşıyıcıları

Hazırlama yöntemine bağlı olarak, ilaç ya fiziksel olarak ya da polimer matrisine kovalent olarak bağlanır [75]. Elde edilen bileşikler, kapsül (polimerik nanopartiküller), amfifilik çekirdek / kabuk (polimerik miseller) veya aşırı dallanmış makromolekül (dendrimerler) yapısına sahip olabilir. İlaç konjugatları olarak kullanılan polimerler, doğal ve sentetik polimerler olmak üzere iki gruba ayrılabilirler.

Polimerik Nanopartiküller (Polimer-İlaç Konjugatları)

Albümin, kitosan ve heparin gibi polimerler doğal olarak meydana gelir ve bu polimerler ilaçların yanı sıra oligonükleotidler, DNA ve proteinlerin salınımı için tercih edilen bir malzeme olmuşlardır. Son günlerde yapılan bir çalışmada, metastatik meme kanseri tedavisi için klinikte, paklitakselin bir nanopartikül formülasyonu, serum albüminin bir taşıyıcı olarak kullanıldığı [nanometre büyüklüğünde albümin bağlı paklitaksel (Abraxane)] uygulanmıştır [76]. Abraxane, metastatik meme kanserinin yanı sıra, ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (faz II çalışması) ve ilerlemiş hematolojik maligniteler (faz I ve farmakokinetik çalışmalar) dâhil olmak üzere birçok başka kanserin dâhil olduğu klinik çalışmalarda da değerlendirilmiştir [77,78]. N- (2-hidroksipropil) metakrilamid kopolimer (HPMA), polistiren-maleik anhidritkopolimer, polietilenglikol (PEG) ve poli-L-glutamik asit (PGA) gibi sentetik polimerler arasında PGA, konjugat sentezinde kullanılan ilk biyobozunur polimerdir [79]. Klinikte yaygın olarak kullanılan çeşitli örnek kemoterapötikler, PGA ile in vitro ve in vivo ortamda konjugat olarak test edilmiş ve serbest ilaç muadillerinin eksikliklerini aşmak için umut verici sonuçlar göstermiştir [79]. Bunlar arasında Xyotax (PGA paclitaxel) ve CT-2106 (PGA-camptothecin) şuan yapılan klinik çalışmalar arasındadır [80,81].

HPMA ve PEG, en yaygın kullanılan biyolojik olarak çözünmeyen sentetik polimerlerdir [82]. Doksorubisin ile HPMA'nın konjugatı olan PK1, bir anti-kanser ajan olarak klinik deneylerde değerlendirilecek olan sentetik polimer-ilaç konjugatıdır. Yapılan bir çalışmada, bir faz I klinik deneyi, kemoterapi ve/veya radyasyon gibi öncelikli tedaviye dirençli veya dayanıklı olan çeşitli tümörlere sahip hastalarda tamamlanmıştır [83]. PK1, bir sonraki klinik çalışma seviyesinde daha ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir.

Polimerik Miseller (Amfifilik Blok Kopolimerleri)

Misellerin fonksiyonel özellikleri, sulu ortam içinde bir nanoboyutlu çekirdek / kabuk yapısını oluşturmak üzere birleştirilen amfifilik blok kopolimerlerine dayanmaktadır. Hidrofobik çekirdek bölgesi hidrofobik ilaçlar için bir rezervuar görevi görürken hidrofilik kabuk bölgesi hidrofobik çekirdeği stabilize eder ve polimerleri suda çözünür hale getirir, bu da partikülü uygulama için uygun bir aday haline getirir [84]. İlaç, bir polimerik misel içine iki şekilde yüklenebilir, bunlar, fiziksel kapsülleme veya kimyasal olarak kovalent bağlanmadır [85,86].

Paklitakselin ilk polimerik misel formülasyonu, Genexol-PM (PEG-poli (D, L-laktit) - paklitaksel), kremofor içermeyen bir polimerik misel formunda paklitakseldir. İleri refrakter maligniteleri olan hastalarda bir faz I ve farmakokinetik çalışma yapılmıştır [87]. Hedefleme ligandlarını içeren çok fonksiyonlu polimerik miseller ve görüntüleme ve terapötik ajanlar, aktif olarak geliştirilmektedir ve yakın gelecekte misel formülasyonun birkaç modeli arasında ana akım haline gelecektir [88].

Dendrimerler

Bir dendrimer, merkez çekirdekten radyal olarak ortaya çıkan çok sayıda yüksek ölçüde dallanmış monomerden oluşan, nanometre boyutlarının bir sentetik polimerik makromolekülüdür. Monodispers boyutu, modifiye edilebilir yüzey işlevselliği, çok değerlilik, suda çözünürlük ve mevcut iç boşluğu gibi dendrimerler ile ilişkili özellikler, dendrimerleri ilaç salım sistemi olarak kullanmak için çekici hale getirmektedir [89]. En yaygın olarak bir iskele olarak kullanılan dendrimer olan poliamidoamin dendrimer, cisplatin ile konjuge edilmiştir [90]. Dendrimerlerin kolayca modifiye

edilebilen yüzey karakteristiği, bunların aynı zamanda, görüntüleme kontrast ajanları, hedefleme ligandları veya terapötik ilaçlar gibi çeşitli moleküller ile eşzamanlı olarak konjugat hale getirilmesini sağlar, böylece dendrimer bazlı çok fonksiyonlu ilaç salım sistemi sağlanır [89].

Lipid Bazlı İlaç Taşıyıcıları

Lipozomlar: Lipozomlar, lipid bilayerlerden oluşan kendiliğinden toplanan kapalı kolloidal yapılardır ve bir dış lipit bilayer tabakasının bir merkezi sulu alanı çevrelediği küresel bir şekli vardır. Halen, çeşitli kanser ilaçları, lipid bazlı sistemlere çeşitli hazırlama yöntemleri kullanılarak uygulanmaktadır. Bu ilaçların arasında bulunan antrasiklin doksorubisin lipozomal formülasyonları (Doxil, Myocet) ve daunorubicin (DaunoXome), metastatik meme kanseri ve AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunun tedavisi için onaylanmıştır [91-93]. Bu onaylanmış ajanların yanı sıra, birçok lipozomal kemoterapötik ajan şu anda klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir [94]. Bir sonraki jenerasyon lipozomal ilaçlar, ilacı seçici olarak istenen etki alanlarına veren immünolipozomlar olabilecektir [95].

Viral Nanopartiküller: Doku hedefleme ve ilaç salımını içeren biyomedikal ve nanoteknoloji uygulamaları için, börülce mozaik virüsü, börülce klorotik benek virüsü, köpek parvovirüsü ve bakteriyofajlar dahil olmak üzere çeşitli virüsler geliştirilmiştir. Birçok hedefleyici molekül ve peptid, kapsid yüzeyinde kimyasal veya genetik araçlar kullanılarak, biyolojik olarak fonksiyonel bir formda gösterilebilir. Bu nedenle, transferrin, folik asit ve tek zincirli antikorları içeren çeşitli ligandlar veya antikorlar in vivo ortamda spesifik tümör hedeflemesi için virüslere konjuge edilmiştir [96]. Bu yapay hedeflemenin yanı sıra, köpek parvovirus gibi virüslerin bir alt kümesi, çeşitli tümör hücreleri üzerinde yukarı regüle edilen transferrin reseptörleri gibi reseptörler için doğal afiniteye sahiptir [97]. Isı şoku proteinini hedefleyerek, spesifik hedeflemeyle çift fonksiyonlu bir protein kafes ve doksorubisin enkapsülasyonu geliştirilmiştir [98,99].

Karbon Nanotüpler: Karbon nanotüpler, biyolojide uygulanan DNA ve proteini saptamak için sensör, serum örneklerinden farklı proteinlerin ayrıştırılması için teşhis cihazı ve aşı veya protein salımı için taşıyıcı olarak benzen halkalarından oluşan

karbon silindirlerdir [100]. Karbon nanotüpler tüm solventlerde tamamen çözünmezler ve bazı sağlık sorunları ve toksisite problemleri oluştururlar. Bununla birlikte, karbon nanotüplerine kimyasal modifikasyon uygulanması bu yapıları, suda çözünür ve fonksiyonel hale getirilebilir, böylece bunlar peptidler, proteinler, nükleik asitler ve terapötik maddeler gibi çok çeşitli aktif moleküllere bağlanabilirler [101].

Yapılan bir çalışmada, antifungal ajanlar (amfoterisin B) veya antikanser ilaçlar (metotreksat), bir floresan ajan (FITC) ile karbon nanotüplere kovalent olarak bağlanmıştır. In vitro ortamda yapılan bir çalışmada ise, karbon nanotüplere bağlanan ilaçların, tek başına serbest ilaç ile karşılaştırıldığında hücrelere daha etkili bir şekilde içselleştirildiği ve daha güçlü antifungal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [102,103]. Yan çeperindeki çoklu kovalent fonksiyonalizasyonlar veya karbon nanotüplerin uçları bir kerede birkaç molekülü taşımasına izin verir ve bu strateji, kanserin tedavisinde temel bir avantaj sağlar.

2.5 Nanopartiküllerin Hedefli Salımı

İdeal olarak, antikanser ilaçların kanser tedavisinde etkili olması için önce, uygulamadan sonra istenilen tümör dokularına, vücuttaki bariyerlerin penetrasyonu yoluyla, kan dolaşımındaki hacimleri veya aktivitelerinin minimum kaybı ile ulaşmaları sağlanmalıdır. İkinci olarak, tümör dokusuna ulaştıktan sonra, ilaçlar, aktif formun kontrollü salım mekanizması ile normal hücreleri etkilemeden tümör hücrelerini seçici olarak öldürme kabiliyetine sahip olmalıdır. Bu iki temel strateji, aynı zamanda, ilaçların hücre içi konsantrasyonunu arttırarak ve doz sınırlayıcı toksisiteleri azaltarak, hastanın hayatta kalma ve yaşam kalitesindeki gelişmeler ile de ilişkilidir. Giderek artan bir şekilde, nanopartiküller, etkili ilaç salım sistemleri için bu gerekliliklerin her ikisini de karşılayacak potansiyele sahip olduğu görünmektedir.

Nanopartiküllerin Boyut ve Yüzey Özellikleri

Hedeflenen tümör dokusuna etkili bir şekilde ilaç salınması için, nanopartiküller elimine edilmeksizin önemli bir süre boyunca kan dolaşımında kalma yeteneğine sahip olmalıdır. Geleneksel yüzeyi modifiye edilmemiş nanopartiküller, büyüklüklerine ve yüzey özelliklerine bağlı olarak karaciğer ve dalak gibi

retiküloendotelyal sistem tarafından dolaşımda genellikle yakalanırlar [104]. Enjekte nanopartiküllerin kaderi, boyutları ve yüzey özellikleri ayarlanarak kontrol edilebilir.

Boyut. Nanopartiküllerin avantajlarından biri, boyutlarının ayarlanabilir olmasıdır. Bir ilaç salım sisteminde kullanılan nanopartiküllerin büyüklüğü, kan kılcal damarlarına hızlı sızıntılarını önlemek için yeterince büyük olmalıdır, ancak karaciğer ve dalak gibi retiküloendotelyal sisteme yerleştirilmiş sabit makrofajlar tarafından yakalanmadan kaçacak kadar da küçük olmalıdır. Karaciğerdeki Kuffer hücrelerinin dalak ve fenestrasındaki sinüzoid büyüklüğü 150 nm ila 200 nm arasında değişmektedir ve sızıntılı tümör vaskülatürünün endotelyal hücreleri arasındaki boşluk bağlantısının büyüklüğü 100 ila 600 nm arasında değişebilmektedir [105,106]. Sonuç olarak, nanopartiküllerin büyüklüğü, bu iki özel vasküler yapıdan geçerek tümör dokularına ulaşmak için 100 nm'ye kadar olmalıdır.

Yüzey özellikleri. Boyutlarına ek olarak, nanopartiküllerin yüzey özellikleri, makrofajlar tarafından yakalanmalarıyla ilgili dolaşım sırasında yaşam sürelerini ve kaderlerini belirleyen önemli bir faktördür. Nanopartiküller, ideal olarak, makrofaj yakalamadan kaçmak için hidrofilik bir yüzeye sahip olmaları gerekmektedir [107]. Bu iki yolla elde edilebilir: Nanopartiküllerin yüzeyini PEG gibi bir hidrofilik polimer ile kaplamak, plazma proteinlerini itmek suretiyle opsonizasyondan korur; alternatif olarak, nanopartiküller, hidrofilik ve hidrofobik alanlara sahip blok kopolimerlerden oluşturulabilir [84,108].

2.5.1 Nanopartiküller Tarafından Pasif Hedefleme

Geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma etkisi. Retiküloendotelyal sistem yakalamasından kaçmak için yukarıda açıklanan boyut ve yüzey özellikleri gereksinimlerini karşılayan nanopartiküllerin, kan dolaşımında daha uzun süre kalabilme ve hedeflenen tümör dokularına ulaşma şansı daha yüksektir. Tümör damarlarının benzersiz patofizyolojik özellikleri, nanopartiküller dâhil olmak üzere makromoleküllerin, seçici olarak tümör dokularında birikmesine olanak tanır [109]. Hızlı büyüyen kanser hücreleri, yeni damarların oluşturulmasını (neovaskülarizasyon) veya oksijen ve besinler ile beslenmek üzere tümör kütlesinin yakınındaki mevcut damarların yeniden yönlendirilmesini gerektirir [110]. Büyüme faktörleri ve matriks metalloproteinazlar

gibi anjiyogenik regülatörlerden ortaya çıkan dengesizlik, tümör damarlarının, endotelyal hücreler ve riskli lenfatik bölge arasında genişlemiş boşluk bağlantı noktalarını gösteren çok sayıda gözenek ile oldukça dağınık ve dilate olmasına neden olur [110]. Bu özellikler, 50 kDa'nın üzerinde bir moleküler ağırlığa sahip olan nanopartiküller dâhil olmak üzere makromoleküllerin, seçici olarak tümör interstisyumunda birikebildiği önemli bir mekanizma oluşturan geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma etkisi olarak adlandırılır [109].

Tümör mikroçevresi. Pasif hedeflemenin bir başka katkısı, normal hücrelerden farklı olan tümör hücrelerini çevreleyen eşsiz mikroçevredir. Hızlı büyüyen, hiperproliferatif kanser hücreleri yüksek bir metabolik hız gösterirler ve oksijen ve besin maddelerinin desteği genellikle bunların muhafaza edilmesi için yeterli değildir. Bu nedenle, tümör hücreleri ekstra enerji elde etmek için glikoliz kullanırlar ve bu da asidik bir ortam oluşmasına neden olur [111]. pH-duyarlı lipozomlar, fizyolojik pH 7.4'te stabil olacak şekilde tasarlanmıştır, ancak, pH'ın, tümör hücrelerinin asidik ortamında olduğu gibi, fizyolojik değerlerden daha az olduğu hedef dokularda aktif ilacı salmak üzere bozunurlar [112].

Bunlara ek olarak, kanser hücreleri, hareket ve hayatta kalma mekanizmalarında rol oynayan matriks metalloproteinazlar gibi eşsiz enzimleri eksprese eder ve salgılarlar [113].

2.5.2 Nanopartiküller ile Aktif Hedefleme

Sadece pasif hedefleme mekanizmalarına dayanan bir ikili konjugat (yani, polimer-ilaç konjugatı) içeren bir ilaç salım sistemi, kaçınılmaz olarak özgüllüğüne yönelik içsel sınırlamalar ile karşı karşıyadır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için önerilen bir yaklaşım, polimer-ilaç konjugatlarına bir hedefleme ligandının veya antikorunun dâhil edilmesidir [114]. Başlangıçta bir antikorun bir ilaca direkt konjugasyonu denenmiştir. Bununla birlikte, şimdiye kadar yürütülen klinik çalışmalarda, bu tür erken antikor-ilaç konjugatları, kanser tedavisi için hedeflenen bir salım aracı olarak malesef üstünlük gösterememiştir [115]. Bunun nedenlerinden biri, bağışıklık tanıma korunurken antikor üzerine yüklenebilen ilaç moleküllerinin sayısının sınırlı olmasıdır.

İlaç salım sistemi olarak çeşitli lipozom ve polimerlerin son zamanlarda gelişimi ve piyasaya sürülmesi, önceki antikor-ilaç konjugatlarına göre hedefleme afinitesinden ödün vermeden hedef nanopartiküle konjuge olabilir potansiyel ilaç sayısını artırmaktadır. Bu taşıyıcılar dizisinden yararlanarak, hedefleme bölgeleri ve ilaçlar, son zamanlarda geliştirilen aktif hedefleyici ilaç konjugatları olarak, bir hedefleme parçası olarak bir ligand veya antikor, bir taşıyıcı olarak bir polimer veya lipit ve bir aktif kemoterapötik ilaçtan oluşan bir üçlü yapı kullanmaktadırlar. Bu üçlü yapı nanopartiküllerini oluştururken, daha etkili salım sistemleri oluşturmak için bazı faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

Antijen ve reseptör ekspresyonu. İdeal olarak, hücre yüzeyi antijenleri ve reseptörleri, özellikle onları tümöre özgü uygun hedefler haline getiren çeşitli özelliklere sahip olmalıdırlar [114]. İlk olarak, bunlar sadece tümör hücreleri üzerinde eksprese olmalı ve normal hücrelerde eksprese olmamalıdırlar. İkincisi, tüm hedeflenen tümör hücreleri üzerinde homojen olarak eksprese olmalıdır. Son olarak, hücre yüzeyi antijenleri ve reseptörleri kan dolaşımına dökülmemelidir.

Hedeflenen konjugatların içselleştirilmesi. Hedeflenen konjugatların hedef hücrelere bağlandıktan sonra içselleştirilip yerleştirilemesi, uygun hedefleme ligandlarının seçiminde önemli bir kriterdir.

İçselleştirme genellikle reseptör aracılı endositoz ile gerçekleşir. Folat-alıcı bir konjugatın hücre yüzeyi üzerinde folat reseptörü ile bağlandığı zaman, folat reseptörü örneğini kullanarak, invaze edici plazma membranı, bir endozom oluşturmak üzere reseptör ve ligand kompleksini zarflar. Yeni oluşan endozomlar hedef organellere transfer edilir. Endozomun iç kısmındaki pH değeri asidik hale geldiğinden ve lizozimler aktive edildiğinden, ilaç konjugattan salınır ve ilacın endozomal membranı geçmesi için uygun fiziko-kimyasal özelliklere sahip olması koşuluyla sitoplazmaya girer. Serbest bırakılan ilaçlar daha sonra ilaca bağlı olarak hedef organelleri tarafından muamele görür. O esnada, konjugattan salınan folat reseptörü, yeni folat-hedefli konjugatlar ile bağlanarak ikinci bir taşıma turunu başlatmak için hücre zarına geri döner [116].

BÖLÜM 3

HİDROKSİAPATİT

3.1 Hidroksiapatit (HA)

Hidroksiapatit, dişlerin mine ve dentin tabakası ve kemikte bulunan, kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan kalsiyum tuzudur. Oksijen ile tepkimeye girmeyen hidroksiapatit yanmaz. Doğada elmastan sonra bilinen en sert malzemedir. HA hekzagonal rombik kafes yapısındadır, birim hücre boyutları; a=b=9.432Å ve c=6.881Å'dur. İdeal Ca/P oranı 10/6 ve hesaplanan yoğunluğu 3.219 gr/cm^3'tür (Park, 1992) [58].

Nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri üretmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan en çok kullanılan yöntemler arasında sol-jel yöntemi, mikro-emülsiyon yöntemi, hidrotermal yöntem ve yaş kimyasal yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan uygulanabilirlik açısından kolay olduğu için en çok kullanılan yöntemler arasında yaş kimyasal yöntem bulunmaktadır. Bununla birlikte birçok çalışma, yaş kimyasal yöntemle hidroksiapatit sentezi tekniğinin yüksek güçlü ultrason ile geliştirilebileceğini göstermiştir. Hidroksiapatit üretim prosesi esnasında bazı parametreleri (sıcaklık, süre, pH değeri) değiştirmek üretilen yapının çözünürlüğünü ve kristalinitesini etkilemektedir.

Hidroksiapatit ilaç salım sistemi ve doku mühendisliği başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Biyomedikal olarak seramiklerle ilgili 3B üretimin büyük kısmı, kemikte doğal olarak bulunan mineraller, yapılar ve mekanik özellikleri taklit eden saf seramik iskele yapılarının oluşturulması içindir. Ayrıca, toz halindeki hidroksiapatit, mineralize edilmiş kemikte bir kalsiyum fosfat fazı olarak varlığı sayesinde, 3B üretimde de yaygın olarak kullanılmaktadır [59,60].

3.2 Hidroksiapatit Sentez Yöntemleri

HA'in çeşitli özelliklerde yapıları, morfolojileri ve dokuları ile sentezi, çok sayıda heterojen kataliz uygulaması için akademik ve endüstriyel araştırmalarda büyük ilgi uyandırmıştır. Geçtiğimiz otuz yılda, HA nanopartikülleri üretmek için bir dizi sentetik yol geliştirilmiştir. HA tozlarının üretimi dört farklı yöntemle sınıflandırılmıştır: i) kuru yöntemler, ii) ıslak yöntemler, iii) mikrodalga (MW) destekli yöntemler, bilyalı öğütücü ultrason ve iv) çeşitli yöntemlerdir. Her kategoride, uygulanan sentez ve reaktif koşullarına bağlı olarak çeşitli varyasyonlar vardır. Bu bölümde, HA nanokristalleri elde etmek için kullanılan en önemli sentetik yöntemler açıklanmıştır.

3.2.1 Kuru Metodlar

Hidroksiapatitin kuru sentez yöntemle hazırlanması, ince öğütülmüş karışık öncülerin ısıl işlemine dayanmaktadır. Bu yöntemle ilgili kapsamlı araştırmalar, bazı faktörlerin varyasyonlarının, sonuçların sonuçlarını etkileyebileceğini göstermiştir. Kuru sentez yöntemi için temel gereklilik, reaksiyonun tamamlanması için mükemmel bir şekilde homojen olan bir karışımın hazırlanmasıdır. Son ürünün saflığı, hazırlama sırasında tam tartım prosedürlerine bağlıdır; çok kararlı bir ara faz oluşumu ortaya çıkabilir. Bu değişken faktörler, istenen nihai bileşiğin oluşumunu potansiyel olarak sınırlayabilir. Tromel ve arkadaşları, havadaki 1050°C'de reaktiflerin karışımının kalsinasyonu yoluyla HA oluşumu için optimum koşulları olduğunu belirlemiştir [117]. Aşağıda hidroksiapatit kuru sentez yöntemi için geçerli reaksiyon gösterilmiştir.

$$2Ca_3(PO_4)_2 + Ca_4P_2O_9 + H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2\,OH \quad (3.1)$$

$$3Ca_3(PO_4)_2 + CaO \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \quad (3.2)$$

Genel olarak, katı halde oluşan reaksiyonlar genellikle iyi kristalize olmuş ürünler vermektedir. Aksi halde, bu yöntem, ürünün gözenekliliği açısından olumsuz olabilen nispeten yüksek bir sıcaklık gerektirir [119,120].

3.2.2 Islak Yöntemler

Proseslerin sadeliğinden dolayı çift dekompozisyon veya eş çöelme yöntemi, emülsiyon, hidroliz metodu, sol-jel metodu ve hidrotermal yaklaşımı içeren ıslak yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler, yapı, doku ve morfoloji üzerinde mükemmel kontrol olanağı sunar ve yüksek bir HA verimine sağlar. Islak yöntemler, çeşitli reaktifler ve yardımcı katkı maddeleri ve aparatları içeren çeşitli reaksiyonlarla suda veya organik solventlerde gerçekleştirilebilir. Ortam sıcaklığında veya yüksek sıcaklıklarda, atmosferik basınç altında veya yüksek basınç altında gerçekleştirilebilirler. Islak yöntemlerin en büyük dezavantajı, bazen kristalografik olarak saf olmayan yapılara neden olmalarıdır; fosfatların diğer fazları HA ile mevcuttur. Bununla birlikte, sulu çözeltideki çeşitli iyonlar, kristal yapıya dâhil edilerek, safsızlıklara yol açabilir.

Eş Çökelme Yöntemi

Eş çökelme, HA'nin hazırlanması için en basit ve sık kullanılan yöntemdir. Bu kimyasal işlem, diğer katkı maddelerinin (örneğin asit veya baz) varlığında bir kalsiyum kaynağı olan bir PO43- ligandı kaynağından oluşur, bu iki reaktifin çeşitli kaynakları kullanılır [121-123]. Eş çökelme yönteminin koşulları değişken olmakla birlikte, genel olarak bu işlem genellikle 3 ila 12 arasında değişen pH değerlerinde ve oda sıcaklığından suyun kaynama sıcaklığına kadar değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir. Ek olarak, bu yöntem uygulanırken bazen kalıplar kullanılmaktadır [124-128].

Sol-jel Yöntemi

HA sentezi için en yaygın yöntemlerden biri sol-jel yöntemidir [61]. Diğer tekniklerle kombine edilen sol-jel yöntemi (mikrodalga ısıtma, ultrasonikasyon, spin-kaplama, daldırma kaplama, laminar akış kaplama, güçlü saha indüksiyonu da dahil olmak üzere diğer tekniklerle birlikte) farklı morfolojilerde manyetik, elektronik ve yapısal parçacıklar, içi boş küreler, fiberler, nanokablolar ve filmlerle çeşitli türde materyaller

kullanılarak çeşitli gelişmiş malzemeler hazırlamak için kullanılmaktadır [62]. Sol-jel yönteminin diğer yöntemlere göre avantajları, kompozisyonun hassas olarak kontrol edilebilmesi, düşük işlem sıcaklığı ve daha iyi homojenlikte ürün elde edilebilmesidir. Bu yöntemden elde edilen nano yapılı malzemelerin gerekli kalsinasyon sıcaklığı düşüktür ve bu da faz değişikliklerini önlemektedir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında sol-jel yönteminin diğer avantajları, yüksek saflık, homojen kompozisyon ve düşük sentez sıcaklığıdır [61,63].

Emulsiyon Yöntemi

HA sentezi için geliştirilen yöntemler arasında, emülsiyon yönteminin, morfolojinin ve tane büyüklüğünün dağılımının tam kontrolünü sağlayan nano yapılı HA tozu üretmek için daha verimli, basit ve uygun olduğu düşünülmektedir. Genel olarak, bu yöntem, partikül aglomerasyonu konusunu aşmak için gözenekli bir materyal oluşturmak üzere geliştirilmiştir. Birçok kalsiyum ve fosfat kaynağı test edilmiştir, ancak çoğu zaman reaksiyon ortamının raporları açısından kalsiyum nitrat ve fosforik asit kullanıldığı ve daha fazla organik çözücü su ile karıştırıldığı görülmüştür [129]. Emülsiyon hazırlamak için kullanılan sürfaktanlar arasında, bazı örnekler: dioktil sodyum sülfosüksinat tuzu, dodesil fosfat, polioksietilen nonilfenol eter, polioksietilen eter nonilfenol, polioksietilen ve polisorbat 80, setiltrimetilamonyum bromür ve sodyum dodesil sülfat bulunmaktadır [130-132]. Ana sentez parametreleri, yüzey aktif madde türüne, sulu ve organik fazların oranına, pH ve sıcaklığa odaklanmaktadır.

Hidroliz Yöntemi

Günümüzde hidroksiapatit üretmek için hidroliz yöntemi de kullanılmaktadır. Shih ve arkadaşları $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ ve $CaCO_3$'den hidroliz metodu ile nano boyutta hidroksiapatit tozları üretmişlerdir. Bu çalışmada üretilen hidroksiapatitler 20 nm boyutlarındadır [64]. Ohta ve arkadaşları, dikalsiyum fosfat dihidratın ($CaHP0_4.\ 2H_2O$, DCPD), HA'nın öncüllerinden biri olduğuna dikkat çekmişlerdir ve c ekseni boyunca yönelen HA agregatlarının sentezi, aşağıdaki tepkime üzerinde DCPD tabanlı hidroliz yoluyla elde edilir [65].

$$10\ CaHPO_4.2H_2O \rightarrow Ca_{10}.(PO_4)_6.OH_2 + 18H_2O \quad (3.3)$$

DCPD'nin çözünmesine ve HA'ya dönüştürülmesine ilişkin mekanizma, yüksek bir sıvı/katı oranında meydana gelen hızlı bir katı-katı faz geçişidir ve Shih ve arkadaşları bu çalışmada HA ürününü kalsiyum eksikliği bulunan HA olarak tanımlanmışlardır [65]

Hidrotermal Yöntemler

Hidrotermal proses, HA'nın kristalinitesinin büyümesi için oldukça gelişmiş bir yöntemdir [133-135]. Bu işlem, aşağıdakilerin varlığında kalsiyum kaynağı ve fosfat öncüsü arasındaki bir reaksiyonu tanımlamak için kullanılan genel terimdir:

i) Su veya organik çözücü veya

ii) bir su/organik çözücü karışımı (su: hidrotermal, organik çözücü: solvotermal, su/organik çözücü: solvo-hidrotermal).

İşlem, otoklav veya basınçlı kap içinde, otojen bir ortam basıncından daha yüksek bir sıcaklık ve basınç ile sınırlı bir ortamda gerçekleşir; ortam, basınca ve sıcaklığa bağlı olarak subkritik veya süperkritik olabilir. Yoğunlaşma ve reaktivitenin artmasıyla ve basınç ve sıcaklığın değerine bağlı olarak, hidrotermal yöntem kimyasal bağlar oluşturur ve HA'in nispeten stoikiometrik ve oldukça kristalli yapıda olan bir sentezini sağlar [136-139]. Burada, yüksek basıncın, kontrollü morfoloji ve gözenekliliğe sahip, mikro veya nano boyutlu kristalitler formunda HA yapısına olanak sağladığına dikkat edilmelidir. Hidrotermal yöntem, katı/çözücü arasındaki etkileşimlerin, özellikle çözünürlük açısından modüle edilmesi sağlar ve aynı zamanda çekirdeklenme ve büyüme işlemlerinin kontrolünde bir kanal görevi de görür [140-141]. Dahası, bu teknik genellikle eş çökeltme veya sol-jel protokolleri gibi geleneksel yöntemlerle kombine edilmektedir.

Şelat Dekompozisyon Yöntemi

Şelat dekompozisyon yöntemi ilk kez, büyük kristallerinin HA kristalografisinin incelenmek istediği çalışmalarda kullanılmıştır [66,67]. Yoshimura ve arkadaşları 1991'de bu sürecin patentini almışlardır [68]. Şelat dekompozisyonu, bir şelatlama

maddesinin, genellikle bir karboksilik asidin, homojen bir kimyasal çözelti içerisinde kalsiyum iyonlarını bağlamak için kullanıldığı tüm yöntemleri içermektedir. Bu yöntemde çeşitli karboksilik asitler kullanılmaktadır. Bunlar içinde en yaygın olanlarını asetik asit, laktik asit, sitrik asit ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) bulunmaktadır. Çözelti ısıtıldıktan veya buharlaşma ile çözelti konsantrasyonunu arttırdıktan sonra, kalsiyum karboksilat "dekompozisyon" olarak parçalanır ve fosfat içeren çözeltiye kalsiyum salınır [69,70]. Çözelti aşırı doymuş hale geldikçe, kalsiyum fosfat kristalleri çekirdeği oluşturur ve büyür.

Yaş Kimyasal Yöntemi

Özellikle, deneylerdeki kolaylığı, düşük çalışma sıcaklığı, saf ürünlerin yüksek yüzdeleri ve ucuz ekipman gereksinimi nedeniyle yaş kimyasal yöntemi HA üretimi için en çok tercih edilen metottur [71,72]. Yaş kimyasal yöntemi ilk olarak Jarcho ve arkadaşı tarafından 1976 yılında çalışılmıştır ve yüksek mekanik özelliklere sahip yoğun bir polikristalin hidroksiapatit üretmeyi başarmışlardır [73]. Günümüzde kullanılan yaş kimyasal yönteminin, özellikle atmosferik basınç altında HA tozlarının üretimi için en uygun yol olduğu kanıtlanmıştır. Peipei ve arkadaşları, HA tozlarını kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$) ve fosfor kaynağı olarak diamonyum fosfat ($(NH_4)_2HP0_4$) kullanarak atmosferik basınç altında yaş kimyasal yöntemi ile hazırlamışlardır. $Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$ ve $(NH_4)_2HPO_4$, sırasıyla damıtılmış su veya etanol veya bunların karışımı içinde çözündürülmüştür. Etanolamin, sitrik asit ve polietilen glikol (PEG-12000), ürünlerin sentez işlemi sırasında birikmesini önlemek için dağıtıcı olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmada reaksiyon solüsyonlarının başlangıç pH'ları, sulu amonyak ($NH_3{\cdot}H_2O$) ile 8.00, 9.00, 10.00, 11.00'a ayarlanmıştır. Bütün çalışmalarda Ca/P mol oranı ise 1.67'de tutulmuştur [74].

3.2.3 Alternatif Enerji Giriş Yöntemleri

Bu yardımcı yöntemler, çoğu zaman, hızlı bir şekilde verimi arttırmak için farklı teknikler arasında bir sinerji sağlamak için diğer geleneksel yöntemlerle birleştirilirler [142,143].

Mikrodalga (MW) Destekli Yöntemler

Bu alternatif ısıtma tekniği alanındaki muazzam ilerlemeden dolayı, MW aktivasyonunu içeren metotlara sürekli olarak ilgi duyulmaktadır. MW destekli HA hazırlanması, boyut, gözeneklilik ve morfoloji açısından özellikle homojen olan mükemmel kristalin tozun artan verimliliğini sağlar [144,145]. Aktivasyon, katkıda bulunan iki faktörden kaynaklanır:

i) dipolun ters çevrilmesi ile elektrik alanının aşırı hızlı değişimlerinin sebep olduğu moleküler ajitasyon ile sonuçlanan, tamamen termal kaynaklı ve,
ii) polar moleküller ve elektrik alanı arasındaki dipol-dipol gibi etkileşimleri içeren, elektrostatik kaynaklıdır.

Bu durumun, aktivasyon enerjisindeki azalmanın kinetiğine doğrudan bir etkisi vardır. Aziz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sol-jel yöntemi ve ardından MW ışık saçılması ile desteklenen bir hidrotermal tedavi kullanarak bir teknik geliştirmiştir [146,147].

Bilyalı Öğütme Yöntemi

Aynı zamanda, mekanokimyasal proses olarak adlandırılan bilyalı öğütme yöntemi, HA'ın basitlik, tekrar üretilebilirlik ve büyük ölçekli HA üretimi gibi avantajlarla sentezlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır [148,149]. Bu teknikle HA'nin büyümesinin kontrolü, kullanılan reaktiflerin tipine, öğütme ortamına, öğütme bilyelerinin çapına, atmosfer tipine, öğütme adımlarının süresine, aralık durakları, tozun bilyeye oranına ve dönme hızına bağlıdır [150-153].

Sonokimyasal Yöntem

Sonokimyasal yaklaşım, güçlü ultrason radyasyonu tarafından aktive edilen reaksiyonlara dayanmaktadır [154-156]. Bu yöntem sürekli olarak nano boyutlu ürünler sunar ve gözeneklilik, morfoloji ve boyutun mükemmel kontrolünü sağlar [157,117]. Ayrıca kalsiyum ve fosfat öncüleri arasındaki reaksiyonun artmış uyarımı, reaksiyon oranını dikkate değer bir şekilde hızlandırır [159,160].

3.2.4 Diğer Yöntemler

Biyobenzetimli kimya, işlevsel ifadeleri benimseyerek verimli biyolojik sistemleri taklit eden materyaller üretmeyi amaçlayan bir kimya alanıdır [161-164]. Biyobenzetim kimya alanı altında geliştirilen, HA hazırlamak için bu iki yöntem, yanma ve piroliz veya sprey pirolizidir; yanma prosesi HA'nın hazırlanması için umut vadeden bir yöntemdir [165-167]. Bu yöntemin temel prensibi, itici gazlar ve patlayıcılar kimyası alanında kullanılan termokimyasal konseptlerden gelmektedir. Ekzotermik ve kendiliğinden meydana gelen redoks reaksiyonu, öncüler ve uygun bir organik yakıt (örneğin gliserin, üre, sükroz, sitrik asit ve süksinik asit) arasında sulu bir fazda meydana gelir [168-171]. Piroliz prosesi, buharlaştırılmış sıvı reaktifleri (öncüler ve kalsiyum fosfat) içermektedir [117,173,174].

BÖLÜM 4

DOKSORUBİSİN

4.1 Doksorubisin

Değişmemiş formunda doksorubisin, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış kemoterapötik ilaçların en güçlülerinden biri olarak kabul edilir ve büyük bir tedavi potansiyeli göstermiştir [175]. Hızlı bölünen hücrelerle savaşma kabiliyeti ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatması sayesinde onlarca yıldır yaygın olarak kabul görmüştür. Bu ilacın kullanımını sadece insan vücudundaki kanserli olmayan hücreler üzerindeki toksisitesi ile sınırlıdır. İlaç, aglikonik ve şeker kısımlarına sahip olan, seçici olmayan bir sınıf I antrasiklin sınıfındadır. Aglikon, kinin-hidrokinon bitişik gruplara sahip bir tetrasiklik halka ve metoksi yerine kısa yan zincirini takiben karbonil grubundan oluşur. Şeker bileşeni (daunosamin olarak da bilinir) halkalardan birine bir glikosidik bağ ile tutturulur. Bu 3-amino-2,3,4-trideoksi-L-fukosilmoietten oluşur [176].

4.2 Doksorubisin Metabolizması

Doksorubisin farmakokinetiği ile ilgili birçok çalışma, tek ya da çoklu ajanlı terapiden bir dizi tümör tipine karşı tedavi aralığını değerlendirmektedir. Bu çalışmaların çoğu, intravenöz enjeksiyondan sonra doksorubisin yapısının çok fazlı olduğunu göstermiştir. İntravenöz infüzyon yapıldığında, sıklıkla trifazik plazma klirensi izlenir. Bu, ilacın hücreler tarafından hızlı alımına işaret eden 3 ila 5 dakikalık doksorubisinin dağılım yarı ömrünü verir. Doksorubisin'in 24 ila 36 saatlik terminal yarı ömrü,

doksorubisinin dokudan çıkarılmasından çok daha uzun sürdüğünü göstermektedir [177]. İlacın kararlı durum dağılımı toksisite riskini azaltmak için zorunludur. İlacın kararlı dağılım aralığı 500-800 l/m^2 arasında değişir ve bu, vücut dokularının güçlü miktarda doksorubisin almasına izin vermektedir [177]. Doksorubisin ve onun başlıca ara ürünü olan doksorubisinol, plazma proteinlerine bağlanır. Çoğu ilaç gibi doksorubisin, hücre dışı bölümlerini 10-500 kat aşan hücre içi konsantrasyonlarına birikerek pasif difüzyon yoluyla hücreye girer. Nükleer bölmelerdeki doksorubisin, hücre sitoplazmasında bulunandan 50 kat daha fazladır. Daha spesifik olarak, çekirdek içindeki doksorubisin miktarı 340 mm'lik bir doyma seviyesine ulaşabilir, bu DNA ipliği üzerindeki her bir beşinci baz çiftinde araya girmiş bir doksorubisin molekülü olarak temsil edilebilir [178,179]. Serbest hücre içi doksorubisin (toplam hücre içi ilacın % 2'si), diğer organellerin (golgi aparatı, lizozomlar ve mitokondri) arasında rastgele dağılmıştır [180,181]. Doksorubisin, büyük olasılıkla organın metabolizmadaki rolü nedeniyle çoğunlukla karaciğerde biriktiği görülmektedir. Bununla birlikte, kemik iliğinde ve beyaz kan hücrelerinde bulunan doksorubisin konsantrasyonu, plazmada bulunandan 200 ila 500 kat daha yüksektir. Doksorubisin dokularda hızla dağıldığı için, bu dağılım hızı kandaki doksorubisin seviyelerinin hızla düşmesiyle eşleştirilir. Doksorubisin dokularda nüfuz etme yeteneğine sahiptir, bununla birlikte çekirdekli hücrelerin içinde kalması, lipofilik özellikleri ve DNA interkalasyon/bağlanma özelliklerinden kaynaklanır. Şaşırtıcı bir şekilde, doksorubisinin yüksek penetrasyon gücüne rağmen, kan-beyin bariyerinden geçemez.

Vücutta doksorubisin kimyasal modifikasyonu (biyotransformasyon) karaciğerde görülür. C-13 üreten doksorubisinol molekülünün ketonu, stereospektif indirgemeye maruz kalır. Bu işlemin gerçekleşmesi için, iki metabolize edici enzime ihtiyaç vardır; aldo-ketoredüktaz ve her yerde bulunan sitoplazmik karbonil redüktaz. Hem doksorubisin hem de doksorubisinolün metabolize olması için, her ikisi de, hidrolitik glikozidik ve indirgeyici parçalanma, O-sülfasyon, O-demetilasyon ve O-glukuronidasyon gibi bir dizi reaksiyondan geçmelidir. Hem doksorubisin hem de doksorubisinolün şeker bileşenleri, şekerin glikozidik bağları asitle katalize edilen hidrolize maruz kaldığında elimine olur. Glikozidik bağın hidrolizi, doksorubisinden

doksorubisinon ve doksorubisinolden bir doksorubisinolon elde edilmesini sağlar [177].

Doksorubisin plazma klirensi normalde 324-809 ml/dak/m^2 aralığındadır ve hepatobiliyer yolağından yöneltilir. Dışarı atılan ilacın yarısı safradadır, genellikle 5-7 gün içinde atılırken, ilacın sadece % 5 ila 12'si aynı zamanda hastanın idrarında görülür, idrarda bulunan ilacın % 3'ü doksorubisinol formunda bulunur. 24 saat sonra ilacın % 10-20'si, 150 saat sonra % 50'si dışkıda atılır. Obez kadınlarda, sistemik klirens oranı belirgin olarak azalır. Bolus (büyük hap) doksorubisin enjeksiyonunun ardından, plazma konsantrasyonunda doksorubisin seviyesinin hızla arttığını ve doksorubisin seviyesine paralel olarak tükendiğini gösterir. İlaç infüzyonu seviyesi uzun bir süre devam ederse, doksorubisinol konsantrasyonu en sonunda overdoksorubisini aşacaktır [177].

4.3 İlaç Etkisi (Biyolojik Etkiler) - Apoptoz, Otofaji Ve Nekroz

Yukarıda belirtildiği gibi, doksorubisin DNA ile ilişkili enzimlere bağlanarak etki eder, DNA'nın çift sarmalının baz çiftlerini birbirine bağlayabilir [176]. Topoizomeraz enzimleri I ve II gibi çoklu moleküler hedeflere bağlanarak, antiproliferasyonla birlikte bir dizi sitotoksik etki meydana gelir ve bu da DNA hasarına neden olur [182]. DNA'daki kırılmaları tamir etme girişimi başarısız olduğunda ve hücresel büyümede bu durum G1 ve G2 fazlarında inhibe edildiğinde apoptoz yolu tetiklenir. Doksorubisinin, DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu durdurarak DNA ve RNA polimerazın inhibisyonu ile kendini DNA'ya eklediği bilinmektedir.

Bu proses, doksorubisinin hücre içine, sitoplazmanın proteazomuna bağlanacak yüksek etkililiğini kullanarak difüzyon yoluyla girmesiyle oluşur. Doksorubisin, proteozomun 20S alt birimine bağlandığında bir doksorubisin proteazom kompleksi oluşur ve burada nükleer gözenek kompleksleri içinden çekirdeğe translokasyon yapılır. Doksorubisin, bağlandığı proteazom üzerindeki nükleer DNA için daha yüksek bir afiniteye sahip olup, kendisini proteazomdan ayırıp DNA'ya bağlanmasına izin verir [176]. Diğer doksorubisin etkileri, daha fazla DNA hasarı, makromolekül üretiminin inhibisyonu, DNA çözme/ayırma ve alkilasyondaki artışa neden olan serbest radikal

oluşumunu içerir [183,184]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, doksorubisinin sadece nükleer DNA ile değil, aynı zamanda mitokondriyal DNA ile de interkalasyon yapabileceği bildirilmiştir [185]. Bununla birlikte, doksorubisin, hücre zarını direkt olarak plazma proteinlerine bağlayarak, doksorubisinin enzimatik elektron azalmasına neden olabilir. Bu durum, yüksek oranda reaktif hidroksil serbest radikal türlerinin oluşmasına neden olabilir. Serbest radikaller, ilacın kullanımının yol açtığı toksisitenin tehlikeli yan etkilerinden sorumludur, ancak aynı mekanizmalar, doksorubisini güçlü bir antikanser ilacı haline getirerek, kanserlerin çeşitli formlarına karşı etkili olmalarını sağlar.

Sonuçlar aynı zamanda, doksorubisinin otofajiye yol açtığını ve DNA hasarına yanıt olarak sitoprotektif olduğunu öne sürmüştür. Nükleer enzim (poli (ADP-riboz) polimeraz-1) (PARP-1) aktivasyonu, hücrenin otofajiye girip girmeyeceğine karar veren hayati bir olaydır. Genotoksik stres PARP-1'in hiperaktif hale gelmesine neden olabilir ve bu da hem NAD + hem de ATP'yi tüketir. Hücre daha sonra geri dönüşü olmayan ve hücre ölümüne yol açan enerji yetersizliği yaşayacaktır [184]. PARP-1'in doksorubisin kaynaklı otofajide rolü, orta derecede yüksek konsantrasyonlarda doksorubisinin hücre ölümünü indükleyemediği PARP-1-dejenere hücrelerinin test edilmesinde belirgindir. Normalde, doksorubisin PARP-1'i hiperaktif hale getirdiğinde, hücre hem otofaji hem de nekrozun özelliklerini gösteren hücre ölümünü deneyimlemektedir. Bu olay, hücrenin otofajiye girmesini tetikleyen önemli olayın, PARP-1 hiperaktivasyonunun bir sonucu olarak hücresel enerjinin çöküşü olduğunu kanıtlar. PARP-1 inhibisyonu, hücresel enerji çöküşünü önler ve böylece hücreyi nekrozdan korur ve doksorubisin ile indüklenen otofajiyi geciktirir ve sıklıkla apoptosise yol açar. Bu çalışma, PARP-1'in aktivasyonunun bir hücrenin kaderinin önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni, PARP-1'in, doksorubisin tedavisinin neden olduğu lezyonları onarabilmesidir, bunun sonucunda, inhibisyonu sırasında PARP-1, DNA hasarını onaramaz ve hücre ölümüne yol açmaz. Son olarak, PARP-1, verilen doksorubisinin ve PARP-1 aktivitesinin doza bağlı olan enerji yoksunluğu ve DNA hasarı arasında bir denge gerektirir.

Doksorubisin tedavisinden kaynaklanan spesifik hücre ölüm formu, ilacın konsantrasyonuna, tedavi süresine ve kanserin spesifik formuna bağlı olarak değişir. Optimum konsantrasyonu belirleyerek toksisiteyi en aza indirirken kanser hücrelerini etkin bir şekilde öldürecektir. Ayrıca, seramid ve ABC nakil ailesi hakkındaki mevcut bilgilerimizi geliştirirken ilaca direnç gösteren diğer moleküler yolakları ve proteinleri değerlendirerek, gelecekteki ilaç tedavileri kanseri etkili bir şekilde tedavi etmek için optimize edilebilir.

4.4 Doksorubisin Toksisitesi

Daha önce bahsedildiği gibi, antrasiklin ilaçların ana yan etkileri, kardiyotoksisitenin en belirgin olduğu çok yönlü sitotoksik etkilerdir. Faz II ve III çalışmaları sırasında doksorubisinin 1970'lerde yapılan erken klinik değerlendirmeleri akut kusma ve bulantı, gastrointestinal problemler, kellik ve nörolojik sistemdeki rahatsızlıkların (genellikle halüsinasyonlara ve ışık başlığına neden olan) ortak yan etkilerini göstermiştir [175,186]. Ne yazık ki doksorubisin, tümöre spesifik olarak hedeflenmemiştir ve vücuttaki diğer birçok hücre tipinin büyümesini etkileyebilir. Bu bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olur ve bağışıklık hücrelerinin sayısı azaldıkça, hasta mikrobik enfeksiyonlara, yorgunluğa ve iyileşme süresinin azalmasına daha duyarlı hale gelir. Bu etkilerin ciddiyeti ve ortaya çıkmaları, doksorubisin dozu ve hastaya ait kemik iliğinin rejenerasyon kapasitesine bağlıdır [187]. Doksorubisin sürekli olarak küçük bir damar içine uygulandığında, flebosklerozu (damar duvarlarının kalınlaşması) gibi sorunlar ortaya çıkabilir ve lokal doku veya organlarda ekstravazasyonlar meydana gelirse nekrozis oluşabilir. Ekstravazasyonun diğer etkileri, ağrılı endükleme (dokunun patolojik sertleşmesi) sonucunda selülit, tromboflebit ve eklem hareketi sınırlamasını içermektedir [175].

Kalpteki Toksisite

Doksorubisin kaynaklı toksisitenin en büyük riski kardiyotoksisitedir ve bunun için çeşitli mekanizmalar vardır. Bu nedenle doksorubisinin uygulanması dozla sınırlandırılmalıdır. Hastalar akuttan kronik olana kadar farklı şekillerde etkilenmektedirler. Doksorubisin, kalpteki kardiyomiyositlerin yapısal

değişikliklerinden sorumludur ve bunları büyütür. Bundan sorumlu genler beyin natriüretik peptid (BNP) ve atriyal natriüretik peptit (ANP) 'dir. Yüksek oranda eksprese olduğunda, bu iki gen kardiyak hipertrofiye neden olmaktan sorumludur. Kardiyotoksisitenin gerçekleşmesi için alternatif bir yol, doksorubisinin kalp kasındaki mitokondriya üzerindeki etkisidir. Mitokondriyal protein ekspresyonunun seviyesini değiştirerek, doksorubisin ve NADH dehidrojenazın redoks döngüsü yoğunlaşır. Eğer ortamda doksorubisin varsa, reaktif oksijen ürünleri seviyeleri TNF-alfa seviyelerini artıran TLR-4 tarafından uyumlu hale getirilir. Reaktif oksijen ürünleri seviyeleri arttığında, apoptotik kaskad, mitokondriden salınan sitokrom c tarafından aktive edilir. Eğer ömür boyu doksorubisin birikimi 500 mg / m^{2}'ye yaklaşırsa, kardiyomiyopati riski genellikle hastaların %20'sinde konjestif kalp yetmezliği ile sonuçlanır [188]. Daha önce de bahsedildiği gibi, bu olayın arkasındaki moleküler mekanizma, oksijensiz radikallerin ve demir oksidasyonunun oluşumunu içerir. Doksorubisinin birden fazla biyobelirteçleri etkilediği bilindiğinden, troponinlerin ve spesifik natriüretik peptitlerin (proBNP ve DNP) değerlendirilmesinin, doksorubisine bağlı kardiyotoksisiteyi erken aşamalarında tahmin etmeye yardımcı olduğuna inanılmaktadır [189]. Antioksidan uygulama, seçici demir bağlayıcıları içeren çalışmalarda negatif veya tutarsız sonuçlar döndürürken, toksisite düzeylerini geçersiz kılan hiçbir belirti göstermemiştir. Bu testler hem reaktif oksijen ürünleri hem de demirden bağımsız diğer mekanizmaların doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteye katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [190]. Diğer çalışmalar GATA bağlayıcı protein 4'ün (GATA-4) downregülasyonunu, p53 ve p300 degradasyonunun aktivasyonunu keşfetmiştir, çünkü bu proteinler, kardiyomiyositlerin apoptosisine yol açan doksorubisin uygulaması sonucunda etkilenmiştir [191-194].

GATA-4, sağkalım faktörü olarak postnatal ve farklılaşmış kardiyomiyozlar üzerinde etkili olan bilinen bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca anti-apoptotik bir gen olan Bcl-xL'yi aktive ettiği gösterilmiştir [190]. Çoğu hasta kemoterapiye maruz kaldıklarında, yorgunluk ve sonuçta bağışıklık sisteminin baskılanmasını tecrübe etmeye başlarlar. Doksorubisin, aynı anda doğal öldürücü (NK) hücrelerinin aktivitesini arttırırken sitokinlerin üretimini ve sitotoksik T lenfosit tepkilerini uyarmaktadır [195]. Bu doğuştan gelen ve adaptif immün tepki bileşenlerini uyararak, kardiyak sistem

üzerindeki etkiler hayret verici hale gelmekte ve agresif kalp hasarı ile sonuçlanmaktadır.

Beynindeki Toksisite

Doksorubisinin sebep olduğu beyin toksisitesi araştırılırken, beynin neden olduğu toksisitenin doğrudan olduğuna dikkat etmek önemlidir, çünkü doksorubisin kan-beyin bariyerini geçememektedir [196,197]. Doksorubisin, iltihaplı sitokinler üretmek için beyindeki mikrogliyal hücreleri tetikleyen TNF-a üretimini uyarır. TNF-a fazla üretildiği zaman, reaktif nitrojen türlerinin (RNS) yükselmesine neden olarak indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu aktive eder. RNS seviyeleri sürekli arttıkça, çevredeki proteinler (örneğin manganez süperoksit dismutaz, MnSOD) nitrasyona uğrar. Protein nitrasyona maruz kaldıktan sonra, mitokondrilerin geçirgenlik geçiş gözeneklerini arttırarak reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşumunu uyarır. Mitokondri gözenekleri sitokrom c'yi serbest bıraktığı zaman, hücre ölüm prosesi apoptoz ile gerçekleşir [175]. Sonuç olarak bu eylemler, beynin kognitif bozukluğa maruz kaldığı çeşitli alanlardan sorumludur [198]. Hastalar genellikle hem bilişsel hatırlama hem de görsel-mekansal becerilerde bozulma belirtileri gösterirler, fakat bilişsel işlevin çoğunluğu doksorubisin tedavisi olmaksızın bir yıl sonra tekrar kazanılır [199].

Karaciğerdeki Toksisite

Doksorubisin kaynaklı hücre ölümü ve doku hasarı için başka bir yaygın bölge, tedaviye giren hastaların % 40'ının bir çeşit karaciğer hasarı geçirmesiyle karaciğerdedir. Metabolizması ve detoksiasyon aktivitesiyle bilinen karaciğer, doksorubisini de her şeyi olduğu gibi işler. Böylece, bir hasta ilaçla tedavi edildiğinde ilacın çoğunu alan, birikmesine izin veren ve daha sonra metabolize eden karaciğerdir [200]. Yüksek konsantrasyonlarda doksorubisinin metabolize edilmesiyle, çok sayıda reaktif oksijen ürünleri üretilir. Sonuç olarak, reaktif oksijen ürünleri, DNA hasarından, lipid peroksidasyon üretiminden, E vitamini seviyelerinin düşürülmesinden, azaltılmış glutatyonun (GSH) azaltılmasından ve oksidatif süreçlerin dengesizleşmesine neden olan aşırı miktarda hasara neden olur. Reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimi,

nükleer faktör kappaB'yi (NFkB) aktive etmek için IkK inhibitörlerini fosforile eden IkB kinaz (IkK) aktivasyonuna neden olabilir. NFkB daha sonra apoptoza neden olmak için proinflamatuar sitokinleri aktive eder. Doksorubisin aracılı toksisite ile ortaya çıkan en önemli aksiyon şudur: hepatositlerde patolojik koşullara neden olan AMP'nin yanı sıra hem ADP hem de ATP inorganik fosfat seviyelerinin azaltılmasından sorumludur.

Böbreklerdeki Toksisite

Böbreklerdeki toksisite meydana geldiğinde, doksorubisinin glomerüler podositleri yaralayarak nefropati ve proteinüriye neden olduğu bilinmektedir [201-206]. Doksorubisin kaynaklı nefropati, mitokondrilerin I ve IV komplekslerinin aktivitesini azaltarak mitokondrinin normal işleyişi engellendiğinde oluşur. Bu trigliseritlerin, süperoksitlerin ve sitrat sentaz düzeylerinin artmasına neden olurken, lipid peroksidasyonun oluşumuyla E vitamini ve antioksidan bileşiklerin seviyeleri azalır. Glomeruli etkileyen hastalığın, hipertansiyona, steroidlere ve proteinüre dirençli olmasına ve sonuçta böbrek yetmezliğine neden olduğu bilinmektedir [175]. Karaciğerin aksine, böbreğin rejenerasyon yeteneği zayıftır, glomerulus hasar gördüğünde kendini iyileştirme yeteneğini azaltır. Bu durum, kandaki kimyasal bileşimin düzenlenmesi ve rasyonel dengenin korunmasında büyük rol oynaması nedeniyle tüm vücutta özellikle böbreğin kendisinde hasara olan duyarlılık derecesini artırır. Glomerulus hasar gördüğü zaman, glomerüler lezyonlara neden olan normal fonksiyonlarını yerine getirememekte, tutulum, tübüler dilatasyonda ve ayrıca kılcal geçirgenliği etkilemektedir.

Diğer Olumsuz Etkileri

Bazı hastalarda kütanöz yaralanmalar gibi doksorubisin tedavisindenden kaynaklı başka olumsuz reaksiyonlar gözlenmiştir. Kutanöz yaralanmaları olan hastalarda dermal kırışıklıklar ve tırnak yatakları, alopesi, kaşıntı, fotosensitivite ve döküntülerde hiperpigmentasyon bulguları gözlemlenebilir. Doksorubisinin ayrıca aşırı duyarlılık ile ilişkili ateş, ürtiker ve anafilaksiye neden olduğu bilinmektedir. Diğer yan etkiler ise, gastrointestinal sistemi etkileyen doksorubisinin, hastaların tedaviye erken

dönemlerinde (5–10 gün) kusma ve mukoza iltihabı geçirmelerine neden olduğunu göstermiştir.

Çoğu hasta tedaviden sonraki 10 gün içinde iyileşir, ancak şiddetli reaksiyonları olanlarda ülserleşme ve nekroz bulguları görülür, sıklıkla kolonda ve kör bağırsakta ciddi enfeksiyonlara ve ölümcül olabilen cerahatlere neden olur.

BÖLÜM 5

MEME KANSERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Son yıllarda kanser insidansının artması ve insan hayatının farklı fiziksel, zihinsel ve sosyal boyutları üzerindeki etkisi kanseri yüzyılın önemli bir sorununa dönüştürmüştür [118]. Gelişmiş ülkelerde bu hastalığın görülme sıklığı % 1 ila % 2 arasında değişmekte olup, daha az gelişmiş ülkelerde yıllık artış oranı % 5'tir [158]. Yapılan değerlendirmelere göre, dünya genelinde 7 milyondan fazla insan kanserden ölüyor. Yeni kanser vakalarının sayısının 2020 yılına kadar 10 milyondan 15 milyona çıktığı tahmin edilmektedir [172,207]. Bununla birlikte, meme kanseri, yılda bir milyondan fazla yeni vakaya sahip kadınlar arasında en sık görülen malign neoplazm türüdür. [208,209]. ABD'de kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri % 12,5 oranında görülme sıklığına sahiptir. Bir bireyin meme kanserinden ölme riski ise % 1 ile % 35 arasındadır [210]. Şu anda, meme kanseri yaşam süresi boyunca gelişme şansı Amerika Birleşik Devletleri'nde % 12'dir.

Meme kanseri, memedeki hücrelerin kontrol dışı büyümeye başladığında başlar. Bu hücreler genellikle bir röntgende görülebilen veya yumru olarak hissedilen bir tümör oluştururlar. Hücreler, bulunduğu bölgeyi çevreleyen dokularda büyür (istila eder) veya vücudun uzak bölgelerine yayılırsa (metastaz yaparsa), bu hücreler malignndir (kanserdir). Meme kanseri neredeyse tamamen kadınlarda görülür, ancak erkekler de meme kanseri olabilmektedir. Vücudun hemen her yerinde bulunan hücreler kansere dönüşebilir ve diğer bölgelere yayılabilir.

Meme Kanseri Ve Etiyolojisi

Meme kanseri en sık görülen kanser türüdür ve ölümün ikinci sebebidir. Bu hastalık, 45-55 yaş arası kadınlarda mortalitenin birincil nedenidir[211] ve kansere bağlı ölümün ikinci önde gelen nedenidir. Meme kanseri insidansı neredeyse 8 kadından 1inde görülmekte olup, çoğu kez tam doku çıkarılması, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavisi gerektirir [211]. Meme kanseri, esas olarak süt bezlerinin veya lobüllerin iç tabakasını ve kanallarını (sütü taşıyan küçük tüpler) içeren bir doku kanseri türüdür [213]. Kanserin birincil risk faktörleri arasında yaş, yüksek hormon düzeyi, ırk, ekonomik durum ve diyette iyot eksikliği yer alır [214-218]. Meme kanseri, bu patojenik sürecin bir aşamasında virüslerin rol oynadığı çok aşamalı bir hastalıktır [219]. Genel olarak, virüslerin farklı kanser türleriyle ilişkisi vardır [220].

Meme Kanseri Başlangıcı

Meme kanserleri, memenin farklı bölgelerinden başlayabilir. Meme kanserinin çoğu, meme ucuna süt taşıyan kanallarda başlar (duktal kanserler). Bazıları ise anne sütünü yapan bezlerde başlar (lobüler kanserler). Daha az yaygın olan başka meme kanseri türleri de vardır. Memede diğer dokularda az sayıda kanser türü başlar. Bu kanserler sarkomlar ve lenfomalar olarak adlandırılır ve gerçekte meme kanseri olarak düşünülmez.

Her ne kadar meme kanserinin birçok türü memede bir yumruya neden olsa da, hepsi neden olmayabilir. Birçok meme kanseri, daha önce hissedilmeden ve semptomlar gelişmeden önce kanserleri daha erken bir aşamada tespit edebilen tarama mamogramlarında bulunabilir.

Meme Kanserinin Yayılması

Meme kanseri, kanser hücreleri kan veya lenf sistemine girdiğinde ve vücudun diğer bölgelerine taşındığında yayılabilir. Lenf sistemi, lenf düğümlerini (bağışıklık sistemi hücrelerinin küçük fasulye şeklindeki modelleri) birbirine bağlayan vücutta bulunan bir lenf damarları ağıdır. Lenf denilen lenf damarlarının içindeki temiz sıvı, doku yan ürünleri ve atık materyal ile bağışıklık sistemi hücrelerini içerir. Lenf damarları, lenf

sıvısını memeden uzak tutar. Meme kanserinin oluşmaya başladığı durumunda, kanser hücreleri bu lenf damarlarına girebilir ve lenf düğümlerinde büyümeye başlarlar. Memenin lenf damarlarının çoğu:

- Kolun altındaki lenf düğümleri (aksiller düğümler)
- Köprücük kemiği etrafındaki lenf düğümleri (supraklavikular [köprücük kemiği üstünde] ve infraklavikular [köprücük kemiğinin altında] lenf düğümleri)
- Meme kemiğinin yakınındaki meme içindeki lenf düğümleri (iç meme lenf düğümleri)'ne akıtılır.

Kanser hücreleri lenf düğümlerine yayılırsa, hücrelerin lenf sistemi boyunca dolaşıp (metastaz yaparak) vücudun diğer bölgelerine yayılma şansı daha yüksektir. Meme kanseri hücreleri olan lenf boğumu arttıkça, kanserin diğer organlarda bulunma olasılığı da artar. Bu nedenle, bir veya daha fazla lenf düğümünde kanser bulmak genellikle tedavi planını etkiler. Genellikle, kanserin yayılıp yayılmadığını bilmek için bir veya daha fazla lenf düğümünü çıkarmak için ameliyat gerekir. Yine de, lenf düğümlerinde kanser hücresi olan tüm kadınlarda metastaz gelişmez ve lenf düğümlerinde kanser hücresi olmayan bazı kadınlarda daha sonra metastaz gelebilir.

Proto-Onkogenler

Proto-onkogenler, hücrelerin normal büyümesine yardımcı olan genlerdir. Bir proto-onkogen mutasyona uğradığında (değiştiğinde) ya da çok fazla kopyası olduğunda, olması gerekmediği şekilde açık ya da aktive olan bir "kötü" gen olur. Bu olduğunda, hücre kontrolden çıkar ve kontrolden çıkan daha fazla hücre yapar. Bu durum kansere yol açabilir. Bu kötü gene onkogen denir.

Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesini yavaşlatan (hücre büyümesi), DNA hatalarını tamir eden veya hücrelere ölmeleri gerektiğini söyleyen (apoptoz veya programlanmış hücre ölümü olarak bilinen bir süreç) normal genlerdir. Tümör

baskılayıcı genler düzgün çalışmadığında, hücreler kontrolden çıkabilir, kontrolden çıkan daha fazla hücre üretebilir ve gerektiğinde ölmez, bu da kansere yol açabilir.

Kalıtsal Gen Değişiklikleri

Genetik olmayan meme kanserinin ana risk faktörleri hormonal kökenlidir. Örneğin, cinsiyet, il, adet(regl) ve menopoz yaşı, üreme öyküsü, emzirme ve eksojen östrojen kullanımı (dış kaynaklı) dikkate alınabilir. Çoğu durumda, genetik olmayan meme kanseri, östrojen reseptörünün yüksek ekspresyonuna sahip olan menopozdaki kadınlar arasında görülür. Östrojenin meme kanseri gelişiminde en az iki ana rolü vardır:

(1) Östrojen metabolitleri DNA'ya zarar veren serbest radikalleri değiştirebilir veya oluşturabilir [118],

(2) Östrojen hormonal aktivitesi ile prekanseröz ve kanserli lezyonlardaki hücreleri çoğaltabilir.

Ayrıca, meme karsinomunun önemli bir kısmı östrojen reseptörü negatif (veya ER-) olduğundan, diğer mekanizmalar da meme kanserinin gelişiminde rol oynar [221].

Bazı kalıtsal DNA mutasyonları (değişiklikler), belirli kanserler geliştirme riskini önemli ölçüde artırabilir ve bazı ailelerde görünen kanserlerin birçoğuna bağlıdır. Örneğin, BRCA genleri (BRCA1 ve BRCA2) tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genlerden biri değiştiğinde, anormal hücre büyümesini artık bastıramaz ve kanserin gelişmesi daha olasıdır. Bu genlerden birinde bir değişiklik bir ebeveynden bir çocuğa geçebilir.

Kadınlar meme kanserinin genetik temelini anlamadaki ilerlemelerden faydalanmaya başlamışlardır. Genetik testler, BRCA1 veya BRCA2 tümör supresor genlerdeki kalıtsal mutasyonları olan bazı kadınları tanımlayabilir. Bu kadınlar daha sonra meme kanseri riskini azaltmak için adımlar atabilir ve erken tedavi edilebilir bir aşamada kanseri bulmaya yardımcı olmak için memelerindeki değişiklikleri aramaya yönelik planlar yapabilirler. BRCA 1 ve BRCA 2 genlerindeki bu mutasyonlar ayrıca diğer kanserler (meme dışında) ile de ilişkili olduğundan, bu mutasyona sahip kadınlar diğer kanserler için de erken tarama yöntemlerini ve kanseri önleyici etkileri dikkate alabilirler.

BRCA1'in mutasyonu meme kanseri riskini 50 ve 70 yaşlarında sırasıyla % 51 ve % 85'e yükseltmektedir, aynı zamanda yumurtalık kanseri riskini 50 ve 70 yaşlarına kadar sırasıyla % 23 ve % 63'e çıkarır [222].

BRCA genleri gibi tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar, genellikle kansere yol açtıkları için "yüksek penetrasyon" olarak kabul edilir. Yüksek penetransyon mutasyonları olan birçok kadın kanser geliştirmesine rağmen, çoğu kanser vakası (meme kanseri dahil) bu tür mutasyondan kaynaklanmaz.

Bağışıklık Sistemi Ve Meme Kanseri

Bağışıklık sistemi tümörler ile tamamen mücadele edebilmektedir ve örneğin IL-12 ve IFN-γ gibi sitokinler ile çalışan birçok immünolojik parametre bu bakımdan önemli rol oynamaktadır. IL-12 aynı zamanda güçlü IFN-γ üreticileri olan TH1 hücrelerinin farklılaşmasından sorumlu ana sitokindir, IFN-γ, sırayla, fagositlerin IL-12 üretme kabiliyeti ve hücresel bağışıklık yanıtında önemli bir role sahip olmaları üzerinde güçlü bir güçlendirici etkiye sahiptir [223].

BÖLÜM 6

DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölüm nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin farklı yöntemlerle üretimi, nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin kanser tedavisi olan kemoterapide kullanılan doksorubisin ile birlikte farklı yöntemlerle üretilmesi, üretilen nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri ve nano boyutlu doksorubisin yüklü hidroksiapatit kristallerine ait karakterizasyon çalışmaları ve farklı yöntemlerle üretilen doksorubisin yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerine ait hücre kültür çalışmalarını içermektedir.

6.1 Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerinin Üretilmesi

Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin üretilmesinde iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler sırasıyla yaş kimyasal yöntemi ve hidrotermal proses ile nano boyutlu toz üretim yöntemidir. Yaş kimyasal yöntemi ile üretilen nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri ile hidrotermal proses ile elde edilen nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 6. 1 Hidroksiapatit üretimi için kullanılan yöntemeler ve üretim yöntemine göre isimlendirilmesi

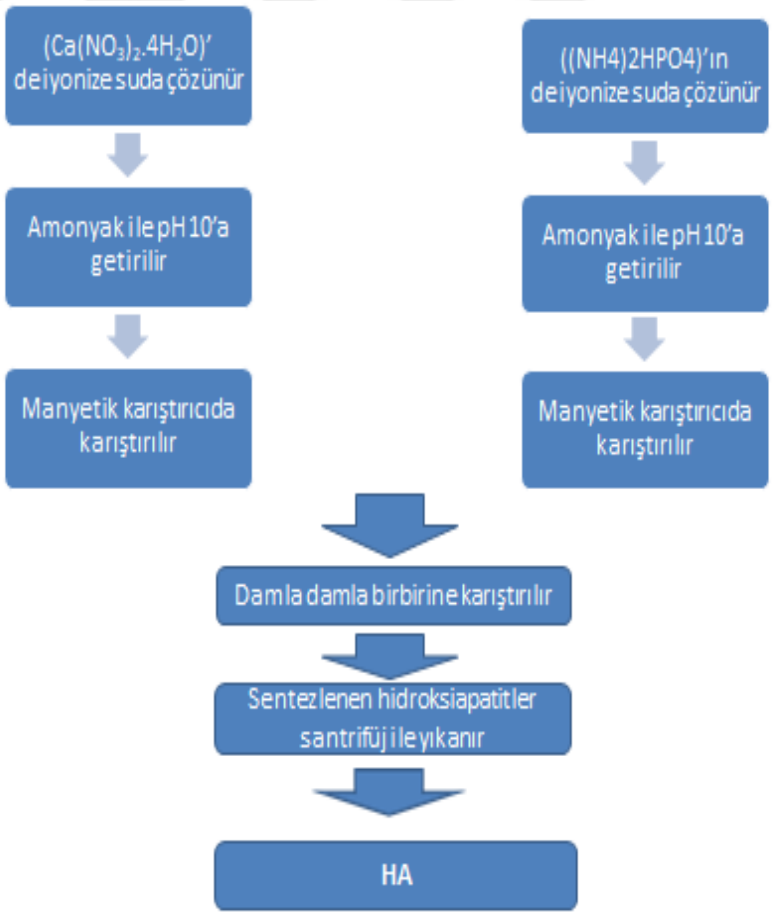
Yöntem / Başlangıç Malzemeleri	Yaş Kimyasal Yöntemi	Hidrotermal Proses
$Ca(NO_3)_2.4H_2O+(NH_4)_2HPO_4$	HA	H-HA

6.1.1 Yaş Kimyasal Yöntemiyle Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerinin Üretilmesi

Bu yöntemle hidroksiapatit üretiminde başlangıç malzemeleri olarak iki farklı kimyasal kullanılmıştır. Bunlar kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$) ve di-amonyum hidrojen fosfat ($(NH_4)_2HPO_4$)'tır. Nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri aşağıda verilen eşitlikte gösterildiği gibi üretilmiştir. HA senteziiçin Ca/P oranı 1,67 olacak şekilde başlangıç malzemelerinin miktarı belirlenmiştir.

$$10Ca\ (NO_3)_2.4H_2O + 6(NH_4)_2\ (HPO_4) + 8\ NH_4OH \rightarrow Ca_{10}\ (PO_4)_6(OH)_2\ OH + 20NH_4NO_3\ NO + 10H_2O \quad (6.1)$$

Aşağıda nano boyutlu hidroksiapatit kristalinin sentezine ait akış şeması verilmiştir.

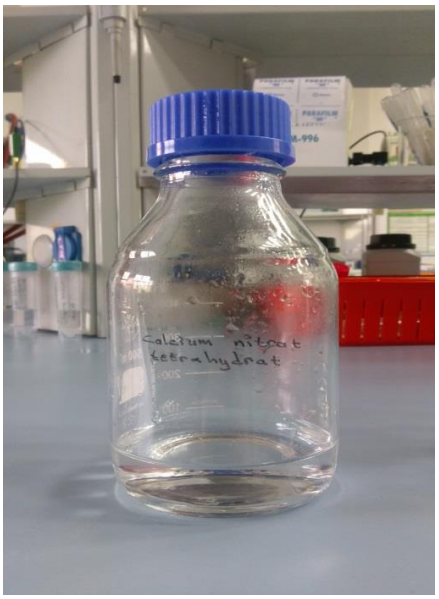


Şekil 6. 1 Yaş kimyasal yöntemi ile nana boyutlu hidroksiapatit üretimi akış şeması

23,66 gram kalsiyum nitrat tetrahidrat 100 ml suda çözündü. Hazırlanan kalsiyum nitrat tetrahidrat ve di-amonyum hidrojen fosfat ultrasonik banyoda 15 dakika karıştırıldı.



Şekil 6. 2 Hazırlanan solüsyonları ultrasonik banyoda karıştırılması



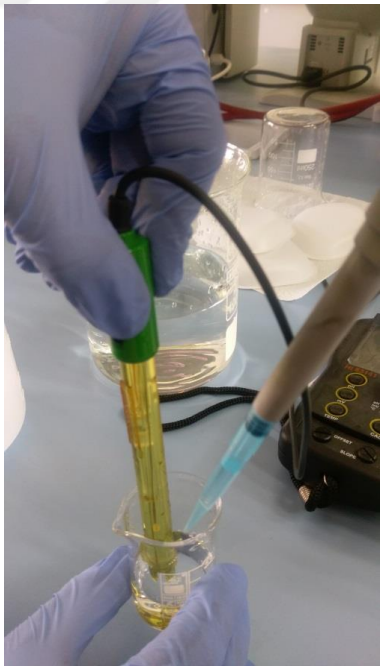
Şekil 6. 3 Kalsiyum nitrat tetrahidrat solüsyonu

7,93 gram di-amonyum hidrojen fosfat 100 ml suda çözündürerek stok çözelti hazırlandı.



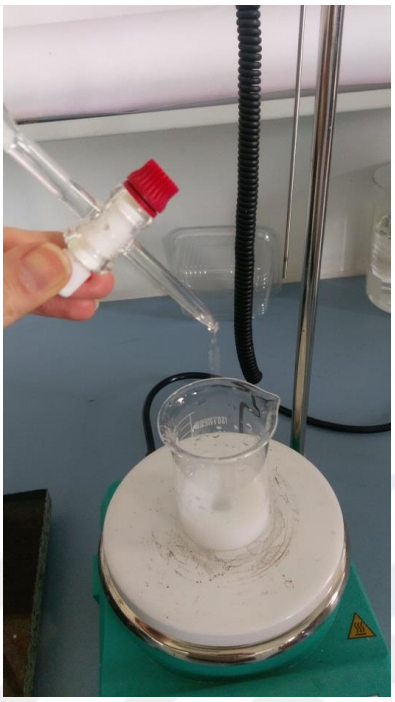
Şekil 6. 4 Di-amonyum hidrojen fosfat solüsyonu

Hazırlanan solüsyonların pH'ı ≥10'a getirmek için damla damla amonyak solüsyonu ile pH≥10 olacak şekilde ayarlandı.



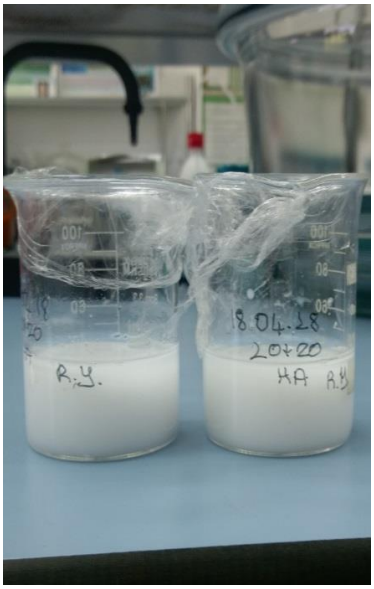
Şekil 6. 5 Amonyak ile pH'ın ayarlanması

Hazırlanan kalsiyum nitrat tetrahidrat ve di-amonyum hidrojen fosfat stok çözeltilerinden 20şer ml alınarak damla damla birbirine karıştırıldı.



Şekil 6. 6 Solüsyonların biribirine damla damla karıştırılarak hidroksiapatit oluşumu

Oluşan nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin çökmesi için 24 saat oda sıcaklığında bekletildi.



Şekil 6. 7 Çöken nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri

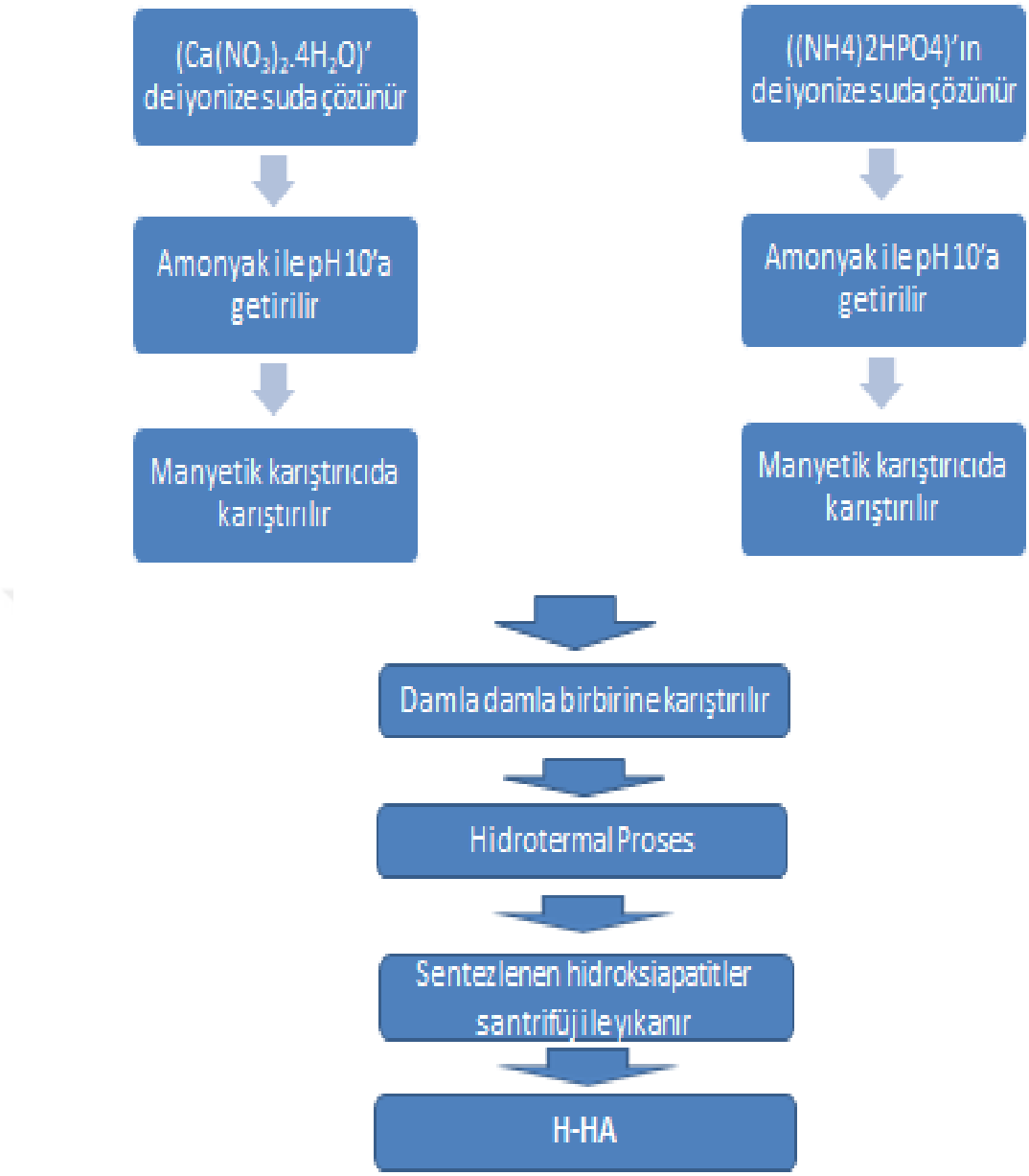
Reaksiyon sonucu oluşan kalıntılardan temizlemek için 4100 rpm'de 5 dakika olacak şekilde 6 kere yıkandı.



Şekil 6. 8 Kalıntılardan arındırılmış nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri

6.1.2 Hidrotermal Yöntemle Hidroksiapatit Kristallerinin Üretilmesi

Bu yöntemde de yaş kimyasal yönteminde olduğu gibi başlangıç malzemesi olarak iki farklı kimyasal kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$) ve di-amonyum hidrojen fosfat ($(NH_4)_2HPO_4$)'tır. Aşağıda hidrotermal yöntemle nano boyutlu hidroksiapatit kristalinin sentezine ait akış şeması verilmiştir.



Şekil 6. 9 Hidrotermal yöntem ile nana boyutlu hidroksiapatit üretimi akış şeması

Yaş kimyasal yöntemde olduğu gibi üretilen hidroksiapatitler 24 saat çökmesi için beklendikten sonra hidrotermal reaktör içindeki hücreye yerleştirildi.



Şekil 6. 10 Hidrotermal reaktörün hücresi



Şekil 6. 11 Hidrotermal reaktörün parçaları

Hidroksiapatitler hidrotermal reaktörün hücresine döküldükten sonra hidrotermal reaktöre yerleştilir ve sıkıca kapatılır. Hidrotermal reaktöre yerleştirilen hidroksiapatitler 2 saat 200 °C'de reaksiyona bırakıldı.



Şekil 6. 12 Hidrotermal reaktör

Reaksiyon gerçekleştikten sonra hidrotermal reaktörün soğuması beklendi ve oluşan hidroksiapatitler reaktörden dikkatli bir şekilde çıkarılırdı. Reaksiyon sonucu oluşan kalıntılardan arındırmak için hidroksiapatitler 4100 rpm'de 5 dakika olacak şekilde 6 kere yıkandı.

6.2 Doksorubisinin Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerine Yüklenmesi

Doksorubisin hidroklorürün nano boyutlu hidroksiapatit kristallerine yüklenmesi 2 farklı üretim aşamasından geçmiştir. Bu yöntemler sırasıyla yaş kimyasal yöntemi ve hidrotermal proses ile nano boyutlu toz üretim yöntemidir. Yaş kimyasal yöntemi ile üretilen doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri ile hidrotermal proses ile elde edilen doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 6. 2 Doksorubisin hidroklorürün hidroksiapatit kristallerine yüklenmesi için yöntemler ve yönteme göre isimlendirilmesi

Yöntem / Başlangıç Malzemeleri	Yaş Kimyasal Yöntemi	Hidrotermal Proses
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$+Dox+$(NH_4)_2HPO_4$	HA+Dox	H-HA+Dox

6.2.1 Yaş Kimyasal Yöntemi İle Doksorubisinin Nano Boyutlu Hidroksiapatit Kristallerine Yüklenmesi

Toz halinde alınan 50 mg liyofilize doksorubisin hidroklorür 50 ml enjeksiyonluk su içerisinde çözündürülerek 1mg/ml'lik doksorubisin solüsyonu hazırlandı.



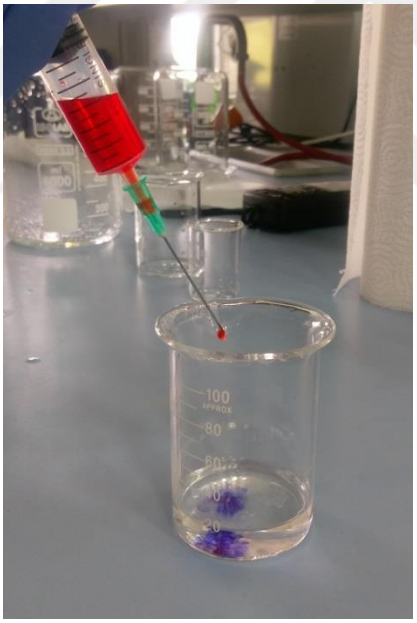
Şekil 6. 13 Liyofilize toz doksorubisin hidroklorür

Stok kalsiyum nitrat tetrahidrat çözeltisinden ve stok di-amonyum hidrojen fosfat çözeltisinden 20'şer ml alınır. Alınan bu çözeltilerin pH'ı amonyak ile ≥10 olacak şekilde ayarlandı.



Şekil 6. 14 Sırası ile kalsiyum nitrat tetrahidrat, di-amonyum hidrojen fosfat ve doksorubisin hidroklorür çözeltileri

Hazılanan 1mg/ml'lik doksorubisin hidroklorür çözeltisi kalsiyum nitrat tetrahidrat çözeltisine damla damla eklendi. pH'ı tekrar kontrol edilir ve eğer 10'dan düşükse tekrar ≥10 olacak şekilde amonyak eklenerek ayarlandı.



Şekil 6. 15 Doksorubisin hidroklorür solüsyonunun kalsiyum nitrat tetrahidrat solüsyonuna damla damla karıştırılması

Oluşan kalsiyum nitrat tetrahidrat-doksorubisin hidroklorür çözeltisi di-amonyum hidrojen fosfat çözeltisine damla damla karıştırıldı.



Şekil 6. 16 Kalsiyum nitrat tetrahidrat-doksorubisin hidroklorür çözeltisinin di-amonyum hidrojen fosfat çözeltisine damla damla karıştırılması



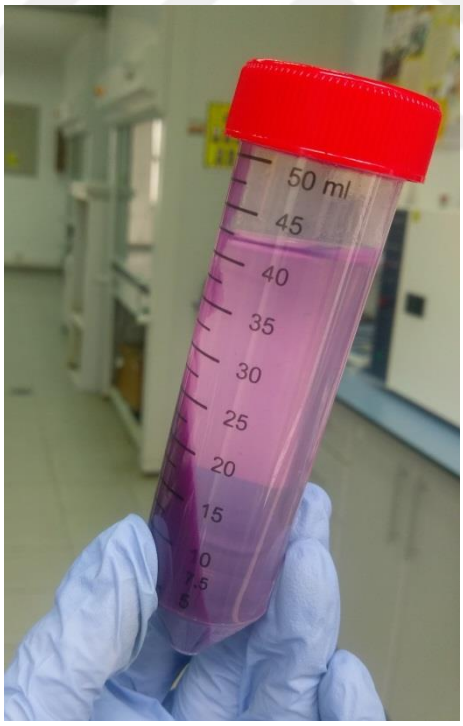
Şekil 6. 17 Oluşan doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri

Oluşan doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri çökmesi için 24 saat oda sıcaklığında bekletildi.



Şekil 6. 18 Çöken doksorubisin yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri

24 saat oda sıcaklığında bekleyen doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristallerinin yarısı ayrıldı ve oluşan yan ürünler ve kalıntılardan arınması için 4100 rpm'de 5 dk olmak üzere 10 kere yıkandı.



Şekil 6. 19 Kalıntılardan arındırılan doksorubisin yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri

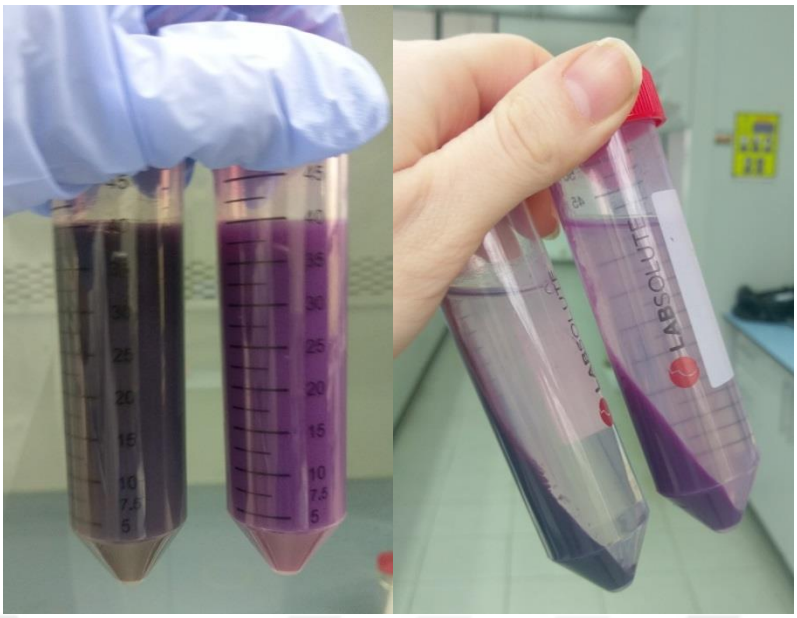
6.2.2 Doksorubisin Hidroklorür Yüklü Hidroksiapatit Kristallerine Hidrotermal Yöntem Uygulanması

Yaş kimyasal yöntemi ile oluşan doksorubisin yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri çöktükten sonra ayrılan yarısı hidrotermal reaktörün içindeki hücreye döküldü. Hidrotermal reaktörde bulunan hücre yerleştirildikten sonra reaktör sıkıca kapatıldı. Reaktör içindeki doksorubisin hidroklorür yüklü hidroksiapatitler 200°C'de 2 saat reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon gerçekleştikten sonra hidrotermal reaktörün soğuması beklendi. Reaktör soğuduktan sonra içindeki doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri oluşan yan ürünler ve kalıntılardan arınması için 4100 rpm'de 5 dk olmak üzere 10 kere yıkandı.



Şekil 6. 20 Hidrotermal reaktörden çıkan kalıntılardan arındırılan doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristalleri

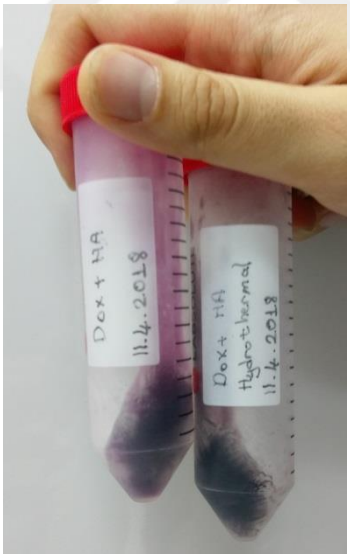
Aşağıdaki resimde hidrotermal reaktörden çıkan ve yaş kimyasal yöntemle üretilen doksorubisin yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristallerinin yıkandıktan önce ve sonraki resimleri gösterilmiştir.



Şekil 6. 21 Doksorubisin hidroklorür yüklü nano yapılı hidroksiapatit kristallerinin yıkandıktan önce ve sonraki halleri

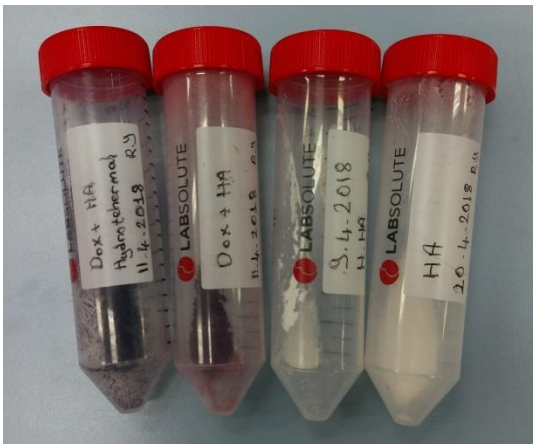
6.3 Liyofilizasyon

Elde edilen tüm örnekler liyafilizatöre hazırlanmak üzere -20 °C'de donduruldu.



Şekil 6. 22 Liyafilizatör için dondurulmuş örnekler

Nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri ve hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristalleri 24 saat için liyofilizatöre konuldu. Liyafilizatörden çıkan örnekler aşağıda şekil 6.21'de verilmiştir.



Şekil 6. 23 Liyafilizatörden çıkan örnekler

6.4 Karakterizasyon

6.4.1 FT-IR Analizi

Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin ve doksorubisin hidroklorürün kimyasal bağları ve fonksiyonel grupları Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (Alpha FTIR Spectroscopy, Bruker, ABD) ile 375-7500 cm^{-1} dalga boyunda belirlendi.

6.4.2 UV-Vis Spektrofotometre Analizi

Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin ve dokrorubisin hidroklorürün absorbans değerleri UV Spektrofotometre (T-60 UV–Vis spectrometer, PG Instruments, UK) ile analiz edildi.

6.4.3 Zeta Potansiyel Ölçümleri

Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit

kristallerinin ve dokrorubisin hidroklorürün zeta potansiyeli zetasizer cihazında (Zetasizer Nano ZS 63) yapıldı.

6.4.4 X Işını Difraksiyonu Analizi (XRD)

Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin ve dokrorubisin hidroklorürün tozlarının faz yapılarının belirlenmesinde XRD cihazı kullanılmıştır. XRD ölçümü için Braket XPERT-PRO kullanıldı.

6.4.5 BET Analizi

Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin ve dokrorubisin hidroklorürün tozlarının yüzey alanları hakkında bilgi sahibi olmak için kullanılmıştır. Üretilen tozların yüzey alanlarını belirlemek için Micromeritics TriStar II, BET cihazı kullanıldı.

6.4.6 TG-DTA Analizi

Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin ve dokrorubisin hidroklorürün tozlarının termal davranışı, 25- 900 ℃'de bir SDT Q600 analizörü kullanılarak diferansiyel termal analiz (DTA) ve termal gravimetrik analiz (TGA) ile incelenmiştir. Analizler kuru havada yapılmıştır.

6.4.7 TEM Analizi

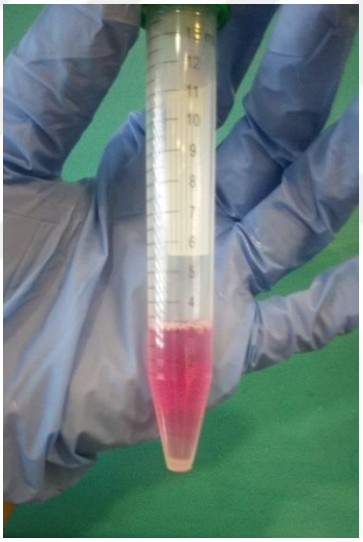
Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin ve dokrorubisin hidroklorürün şekillerini, boyutlarını ve etkileşimlerini

incelemek için TEM analizi yapıldı. Üretilen tozların BET analizinde Hitachi HF-2000 TEM kullanılmıştır.

6.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

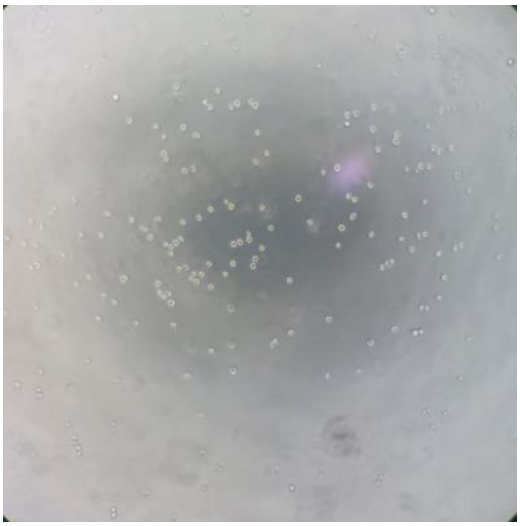
Nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin, hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü nano boyutlu hidroksiapatit kristallerinin ve dokrorubisin hidroklorürün meme kanseri hücrelerini öldürebilme kabiliyeti MTT testi ile MCF-7 meme kanser hücre hattı üzerinde çalışıldı.

Daha önceden pasajlanan insan meme kanser hücresi olan MCF-7 hücreleri tripsin enzimi ile flasklardan kaldırılır ve santrifüjle hücreler besiyerinden ayrılır. Aşağıdaki şekilde santrifüjle dibe çöken hücreler gösterilmiştir.

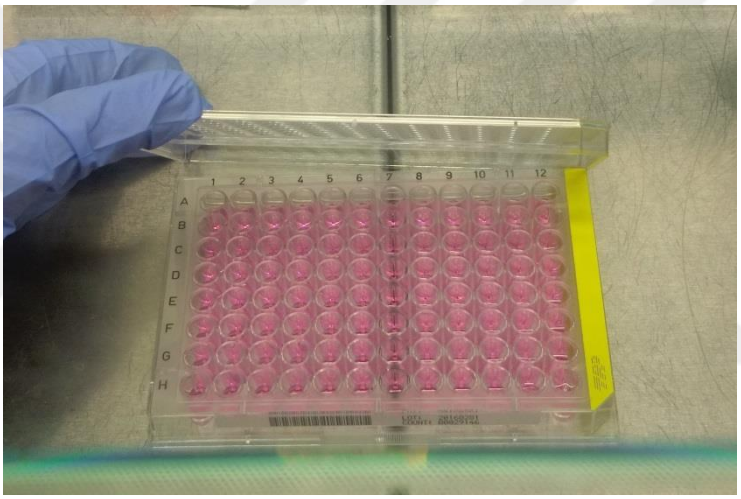


Şekil 6. 24 Santrifüjden sonra MCF-7 meme kanseri hücreleri

Çalışmada kullanılan hücrelerin kültürü %10 FBS içeren DMEM besiyerinde yapıldı. MCF-7 meme kanseri hücreleri 96'lık well plattin her bir kuyusunda 10,000 hücre olacak şekilde hücrelerin ekimi gerçekleşti. Aşağıda şekillerde MCF-7 meme kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüsü ve ekildikten sonraki 96 well plate'in resmi verilmiştir.



Şekil 6. 25 MCF-7 hücrelerinin 96 well plate'e ekildikten sonra mikroskop görüntüsü



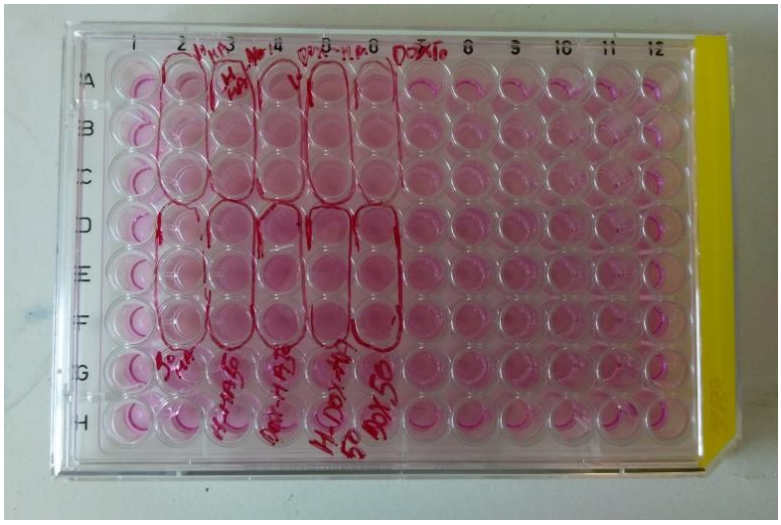
Şekil 6. 26 MCF-7 hücreleri 96 well plate'e ekildikten sonra görünümü

96 well plate'e ekilen MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 saat %5 CO_2 içeren 37º etüve inkübe edildi. Aşağıdaki şekilde 24 saat inkübasyon sonrası MCF-7 meme kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir.



Şekil 6. 27 24 saat inkübasyon sonrası MCF-7 meme kanseri hücreleri

Sentezlenen her bileşiğin 2 farklı (0,01 mg/ml ve 0,05 mg/ml) konsantrasyonu MCF-7 hücre hattında test edildi. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki bileşikler 3 tekrarlı olacak şekilde kuyulara eklenip 48 saat %5 CO_2 içeren 37º etüve inkübe edildi. Aşağıdaki şekilde 96 well plate'e örnekler ekildikten sonraki görünümü verilmiştir.



Şekil 6. 28 96 well plate'e ekilen örnekler

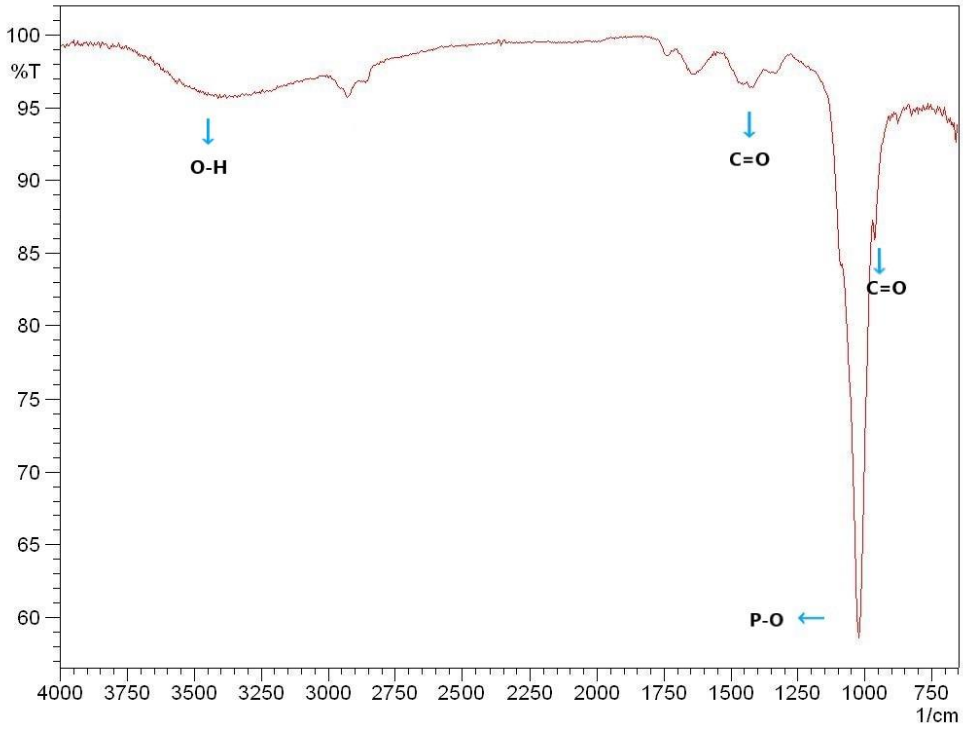
Daha sonra sitotoksisite testi (MTT) gerçekleşti, Bunun için, 10 µl MTT tuzu her bir kuyuya eklenip ardından 3 saat, 37º etüvde inkübe edildi. Tuz kristallerinin

oluşumundan sonra her kuyuya 100 µl DMSO (Dimetilsulfoksid) eklenip 30 dk karanlikta bekletildi. Ardından sonuçlar ELİSA redear da 570 nm de okundu.

BÖLÜM 7

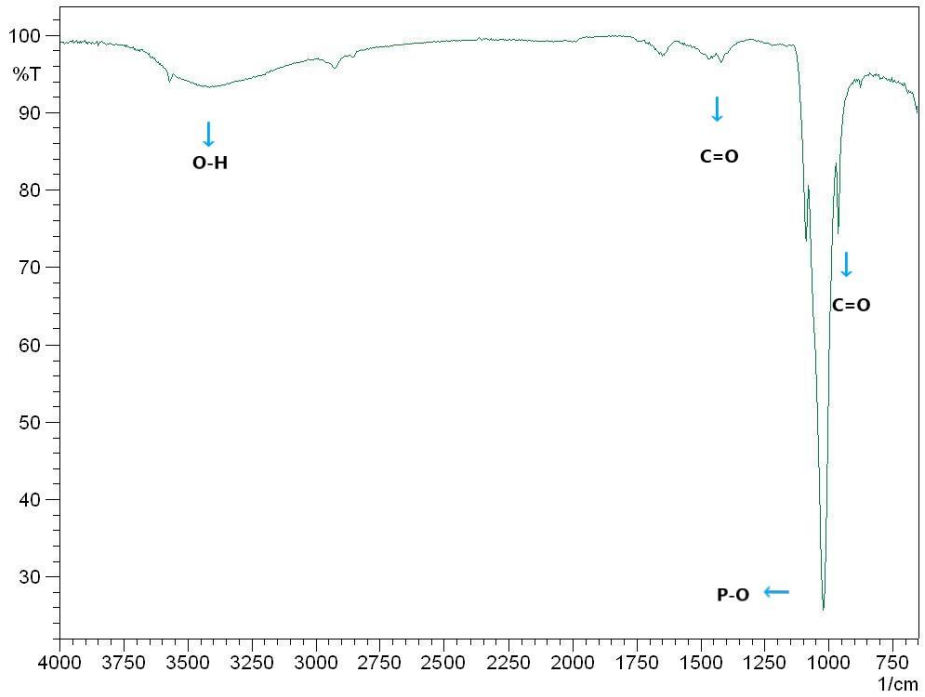
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

7.1 FTIR Analizleri



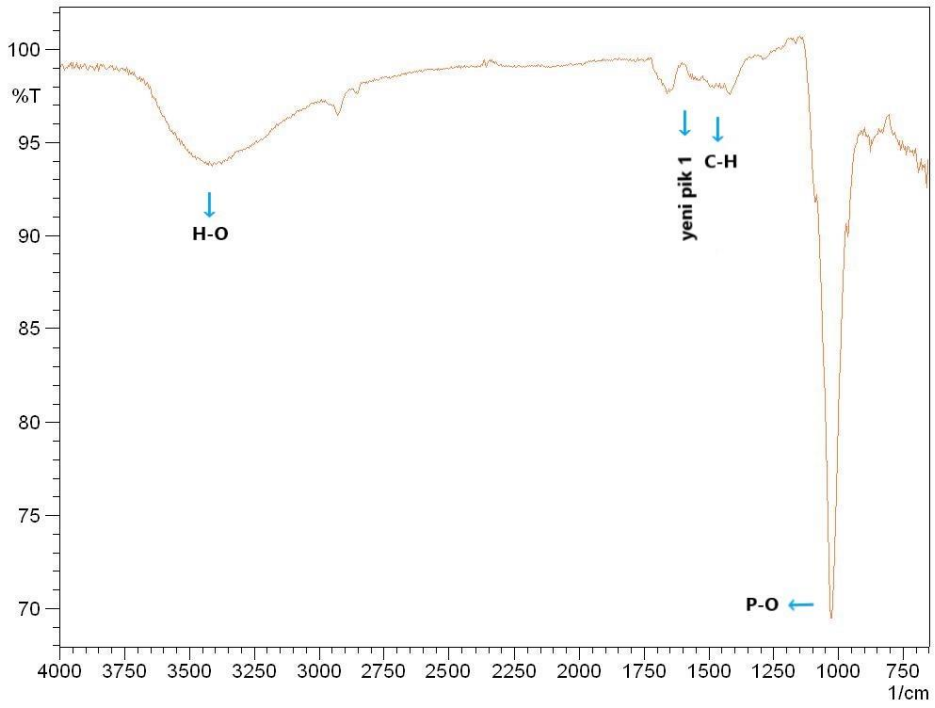
Şekil 7. 1 Hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu

Hidroksiapatitin fonksiyonel grupları FTIR spektroskopisi ile yapıldı. Hazırlanan örneğin FTIR spektrumu şekil 7.1'de verilmiştir. Bu analiz sonucunda O-H bağları 3373.50 cm^{-1}'de bir pik göstermektedir. C=O bağları 1427.32 cm^{-1}'de, P-O bağı için 1022.27 cm^{-1}'de ve yine C=O için 962.48 cm^{-1}'de pik görülmektedir [224].



Şekil 7. 2 Hidrotermal hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu

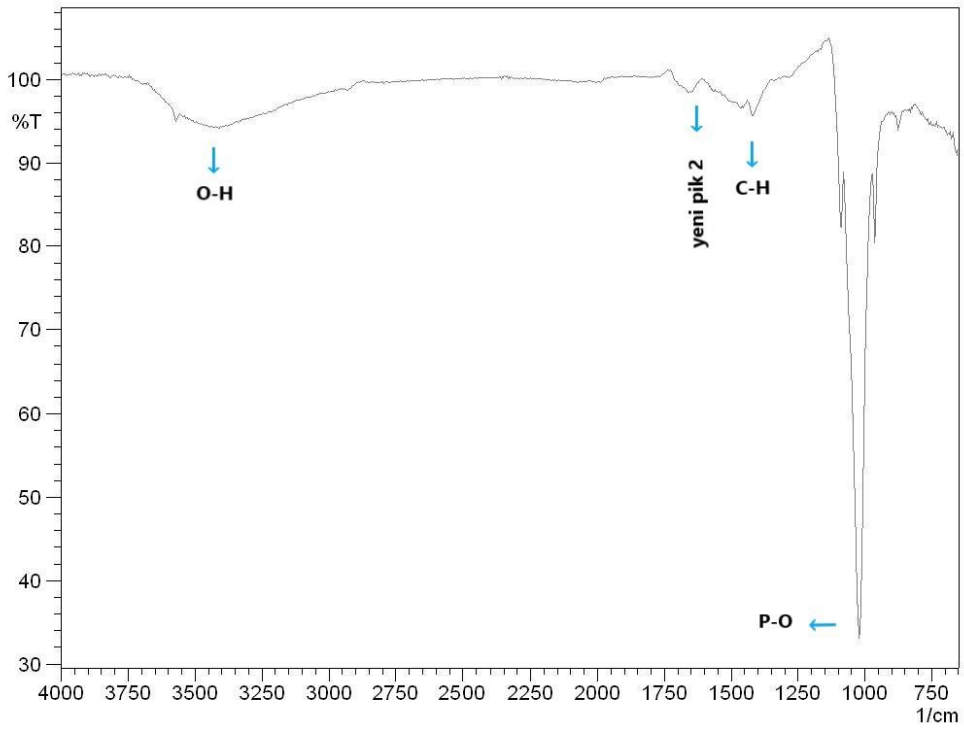
Hidrotermal hidroksiapatitin fonksiyonel grupları FTIR spektroskopisi ile yapıldı. Hazırlanan örneğin FTIR spektrumu şekil 7.2'de verilmiştir. Bu analiz sonucunda O-H bağları 3388.93 cm^{-1}'de bir pik göstermektedir. C=O bağları 1421.54 cm^{-1}'de, P-O bağı için 1020.34 cm^{-1}'de ve yine C=O için 962.48 cm^{-1}'de pik görülmektedir [224].



Şekil 7. 3 Doksorubisin hidroklorür yüklü hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu

Doksorubisin hidroklorür yüklü hidroksiapatitin fonksiyonel grupları FTIR spektroskopisi ile yapıldı. Hazırlanan örneğin FTIR spektrumu şekil 7.3'de verilmiştir. Bu analiz sonucunda O-H bağları 3425.58 cm^{-1}'de bir pik ve 1338,60 cm^{-1}'de C-H bağına aitbir pik göstermektedir. 1658.78 cm^{-1} ve doksorubisin hidroklorür ve saf hidroksiapatitte bulunmayan yeni bir pik ortaya çıkmıştır. 1658.78 cm^{-1} de ortaya çıkan yeni pik 1, 1543.05 cm^{-1}'de doksorubisin hidroklorürün 1427.32 cm^{-1}'de bulunan bozunmamış hidroksiapatite binmesinden kaynaklı olabilir. 1028 cm^{-1}'de ise P-O'ya ait bir pik görülmektedir.

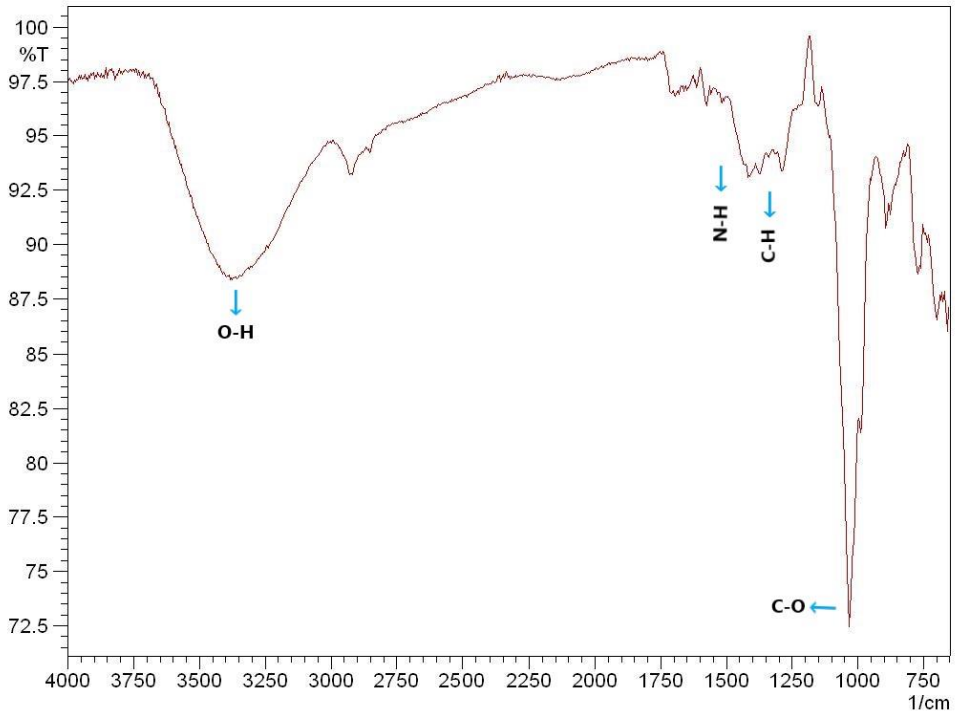
1338 cm^{-1}'deki bant, belirgin bir kayma sergilememektedir, bu da hidroksiapatitin yüzey kalsiyum iyonları ve doksorubisin karboksilat radikalleri arasında kimyasal bağın bulunmadığını düşündürmektedir. İlaç yüklemesinin mekanizması, esas olarak HA yüzeyindeki pozitif kalsiyum iyonları ve doksorubisin üzerindeki negatif karboksilat radikali arasındaki elektrostatik etkileşim ile görülmektedir [224].



Şekil 7. 4 Hidrotermal doksorubisin hidroklorür yüklü hidroksiapatite ait FT-IR analizi sonucu

Doksorubisin hidroklorür yüklü hidrotermal hidroksiapatitin fonksiyonel grupları FTIR spektroskopisi ile yapıldı. Hazırlanan örneğin FTIR spektrumu şekil 7.4'de verilmiştir. Bu analiz sonucunda O-H bağları için 3394,72 cm^{-1}'de bir pik ve 1338,60 cm^{-1}'de C-H bağına ait bir pik görülmektedir. 1651.07 cm^{-1} de doksorubisin hidroklorür ve saf hidroksiapatitte bulunmayan yeni pikler ortaya çıkmıştır. 1651.07 cm^{-1} de ortaya çıkan bu yeni pik 2, 1543.05 cm^{-1}'de doksorubisin hidroklorürün 1421.54 cm^{-1}'de bulunan bozunmamış hidroksiapatite binmesinden kaynaklı olabilir. 1020.34 cm^{-1}'de ise P-O'ya ait bir pik görülmektedir.

1338 cm^{-1}'deki bant, belirgin bir kayma sergilememektedir, bu da hidroksiapatitin yüzey kalsiyum iyonları ve doksorubisin karboksilat radikalleri arasında kimyasal bağın bulunmadığını düşündürmektedir. İlaç yüklemesinin mekanizması, esas olarak HA yüzeyindeki pozitif kalsiyum iyonları ve doksorubisin üzerindeki negatif karboksilat radikali arasındaki elektrostatik etkileşim ile görülmektedir [224].

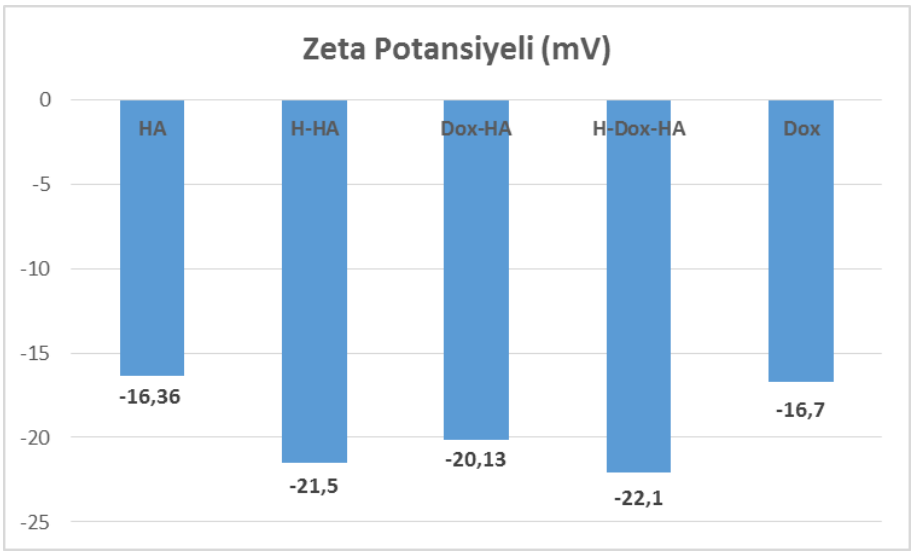


Şekil 7. 5 Doksorubisin hidroklorüre ait FT-IR analizi sonucu

Doksorubisin hidroklorürün fonksiyonel grupları FTIR spektroskopisi ile yapıldı. Hazırlanan örneğin FTIR spektrumu şekil 7.5'de verilmiştir. Bu analiz sonucunda O-H bağları 3388.93 cm^{-1}'de bir pik göstermektedir. 1543.05 cm^{-1}'de N-H bağı için bir pik, 1338.60 cm^{-1}'de C-H bağı için bir pik ve 1031.92 cm^{-1}'de C-O bağına ait bir pik gözlenmektedir [224].

7.2 Zeta Potansiyeli Analizi

Yapılan çalışmada üretilen ürünlerin yüzeylerindeki yük miktarını anlayabilmek için zeta potansiyel analizi yapılmıştır. Yapılan deney sonucu elde edilen verilere dair grafik aşağıda verilmiştir.

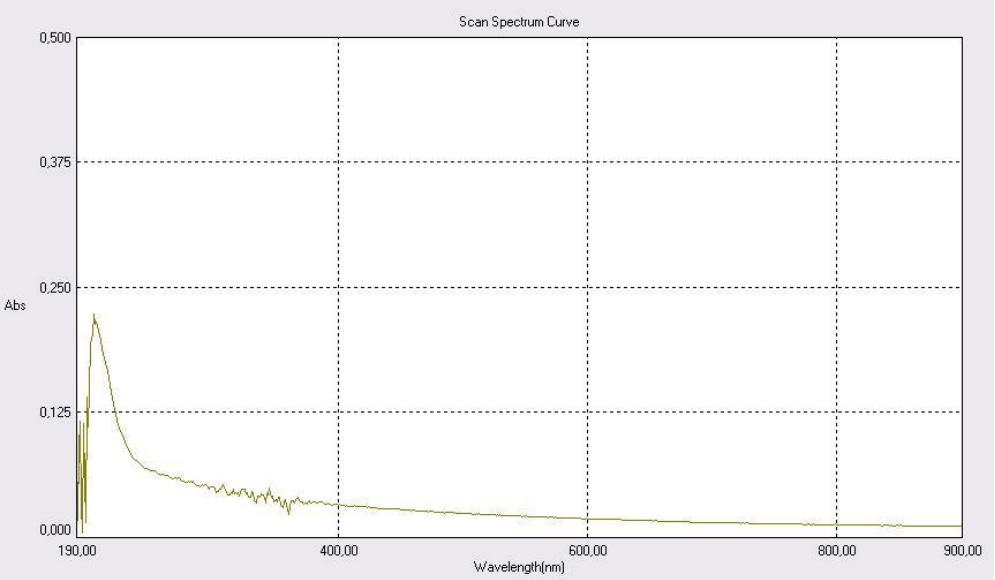


Şekil 7.6 Zeta potansiyel değerleri

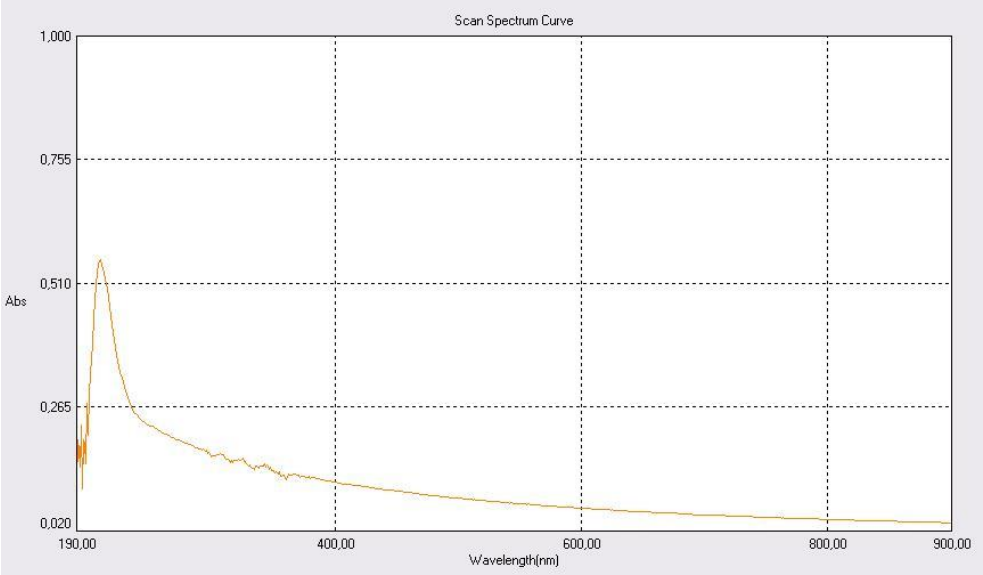
Zeta potansiyeli yüzey yük yoğunluğu ve çift tabaka kalınlığı ile ilgilidir. Yüzey yük yoğunluğu potansiyel belirleyici iyonların konsantrasyonuna bağlıdır. Birçok sistemde H^+ iyonu potansiyel belirleyici iyon olduğu için zeta potansiyeli pH'a bağlıdır. Zeta potansiyeli düşük pH değerleri için pozitif ve yüksek pH değerleri için negatiftir. Grafikte görüldüğü gibi, bütün örneklerin zeta potansiyel değerleri negatiftir ve hidroksiapatit için -16,36, hidrotermal hidroksiapatit için -21,5, doksorubisin yüklü hidroksiapatit için -20,13, doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatit için -22,1 ve doksorubisin için -16,7 olarak çıkmıştır. Bu hazırlanan örneklerin istendiği pH değerlerinde başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir. Ayrıca, hidroksiapatite hidrotermal yöntem uygulanınca ve doksorubisin yüklü hidroksiapatite hidrotermal yöntem uygulanınca zeta potansiyel değerleri daha düşük - değerlerinde gözlemlenmektedir. Bu demek oluyor ki hidrotermal yöntem uygulanan örneklerin stabilitesi artmış yani bozunma hızları azalmıştır. Bununla birlikte doksorubisin yüklü hidroksiapatit ve doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatitlerin stabilitesinin tek başına hidroksiapatitttten daha fazla olduğu görülmektedir. Bu demek oluyor ki, tasarlanan ilaç sistemi hastaya intravenöz olarak uygulandığında kanda kalma süresi tek başına doksorubisinden daha fazla olacaktır. Zeta potansiyeli analizlerinde bir örnek daha yüklü olduğunda, örnek daha iyi disperse olur. Örneğin zeta potansiyelinin düşük olması malzemenin topaklaşma eğiliminde olduğunu gösterir. Topaklaşma ise embolize sebep olur ve damarı tıkar. Zeta potansiyelinin yüksek

olması tasarlanan ilaç salım sisteminin damar tıkanıklığına yol açmayacağını göstermektedir.

7.3 UV-Vis Spektrofotometresi

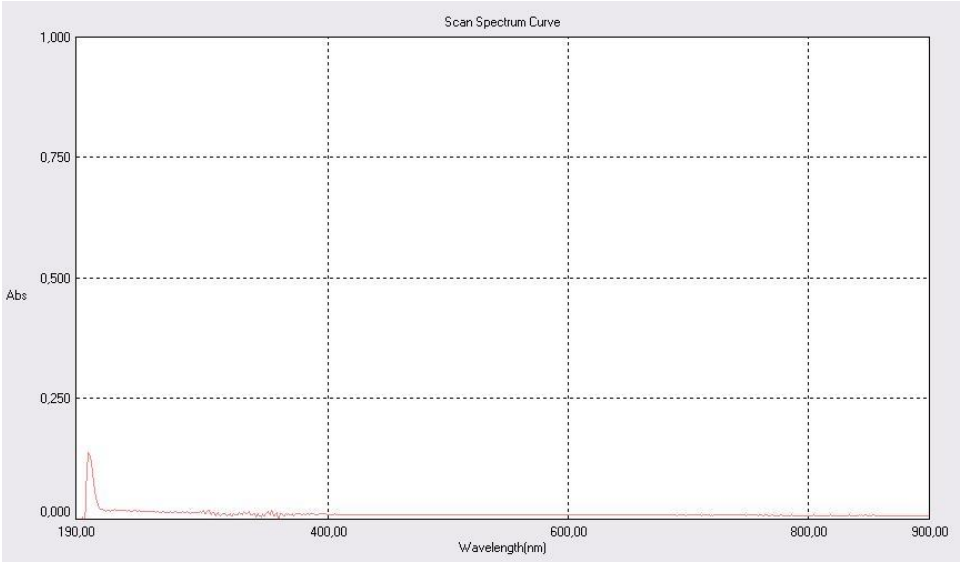


Şekil 7.7 0,01 mg/ml HA çözeltisine ait UV spektrası

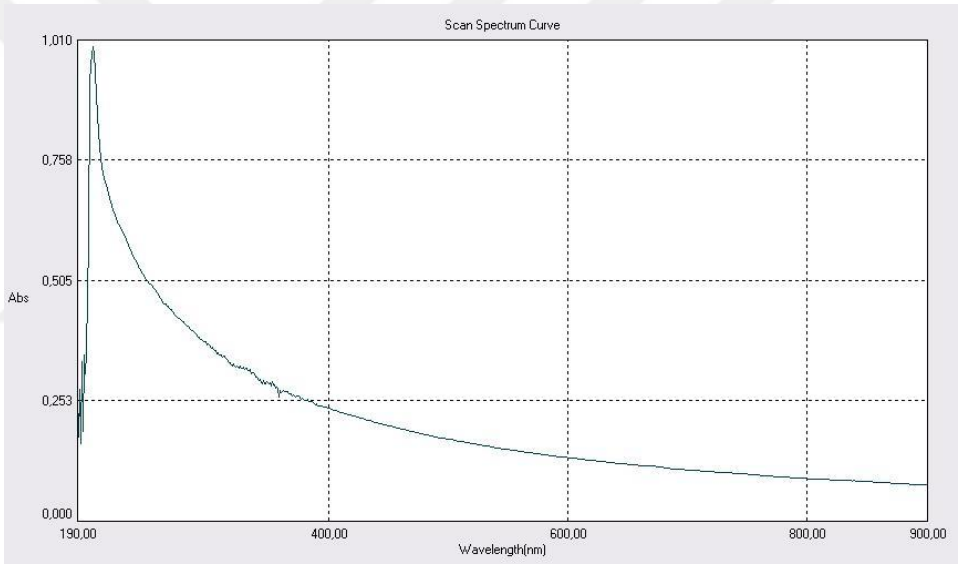


Şekil 7.8 0,05 mg/ml HA çözeltisine ait UV spektrası

Şekil 7.6 ‘da 0,01 mg/ml HA çözeltisine ait UV spektrası ve şekil 7.7’de 0,05 mg/ml HA çözeltisine ait UV spektraları verilmiştir. Her iki spektrumlara bakıldığında molaritesi fazla olan örneğin daha büyük pik verdiği görülmektedir.

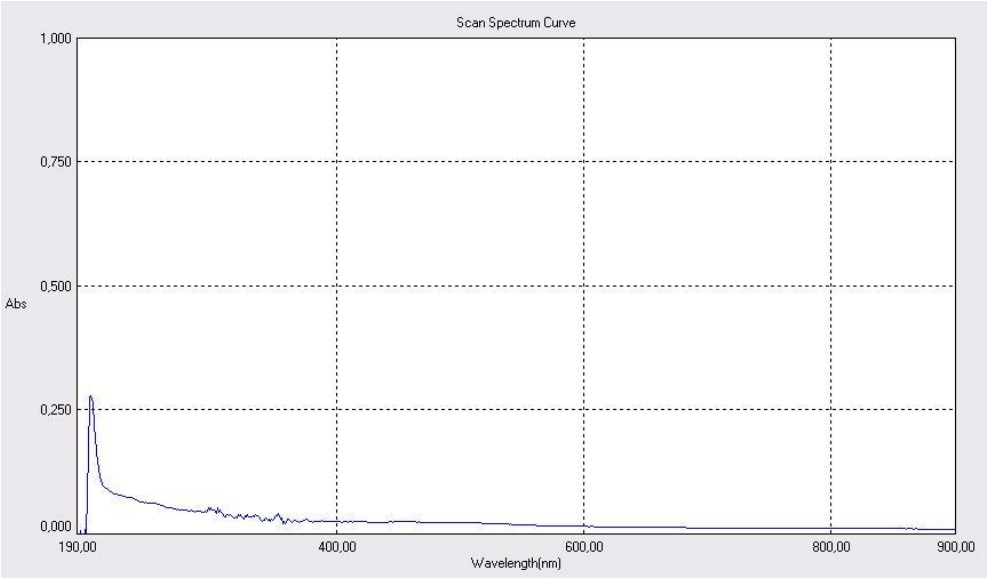


Şekil 7.9 0,01 mg/ml H-HA çözeltisine ait UV spektrası

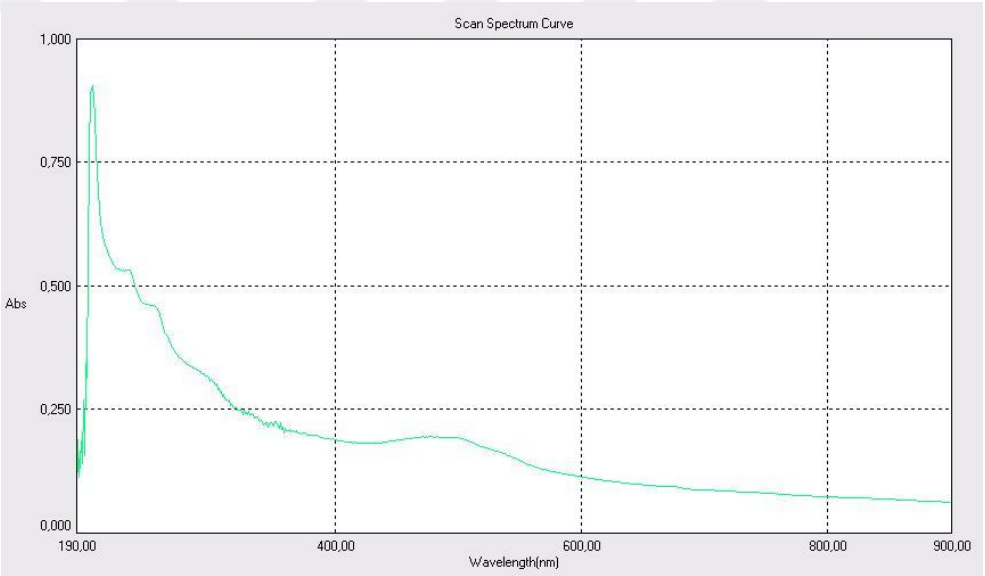


Şekil 7.10 0,05 mg/ml H-HA çözeltisine ait UV spektrası

Şekil 7.8 ‘de 0,01 mg/ml H-HA çözeltisine ait UV spektrası ve şekil 7.9’da 0,05 mg/ml H-HA çözeltisine ait UV spektraları verilmiştir. Her iki spektrumlara bakıldığında molaritesi fazla olan örneğin daha büyük pik verdiği görülmektedir.

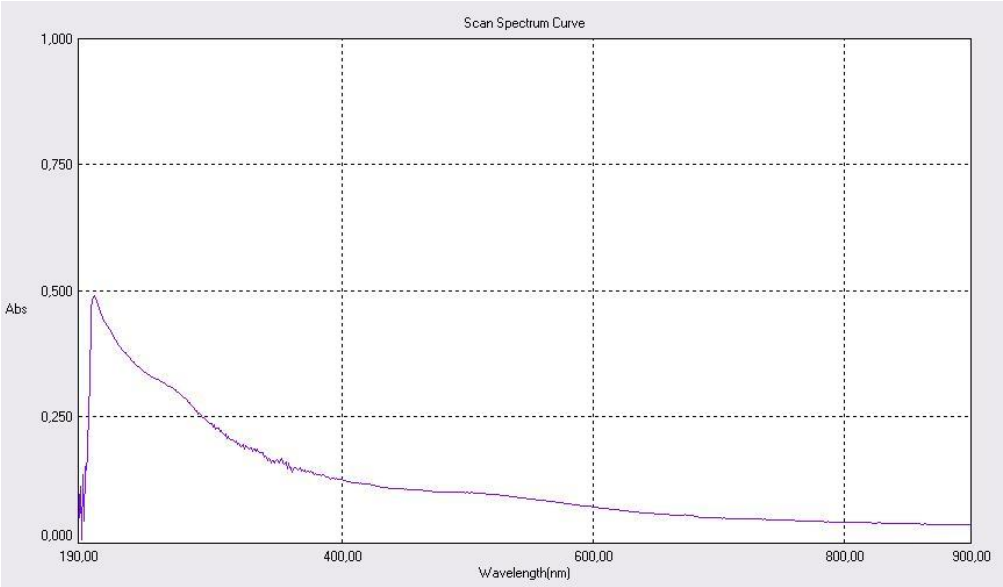


Şekil 7.11 0,01 mg/ml Dox-HA çözeltisine ait UV spektrası

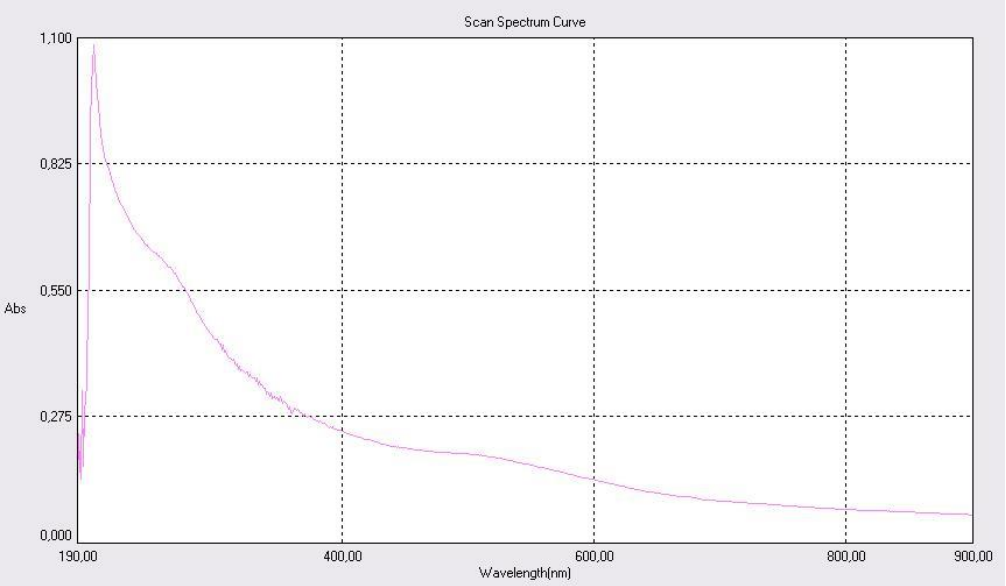


Şekil 7.12 0,05 mg/ml Dox-HA çözeltisine ait UV spektrası

Şekil 7.10 'da 0,01 mg/ml Dox-HA çözeltisine ait UV spektrası ve şekil 7.11'de 0,05 mg/ml Dox-HA çözeltisine ait UV spektrası verilmiştir. Her iki spektrumlara bakıldığında molaritesi fazla olan örneğin daha büyük pik verdiği görülmektedir. Şekil 7.11 ve şekil 7.12 de görüldüğü gibi 400-600 nm arasında görülen spektrumlar doksorubisine aittir.

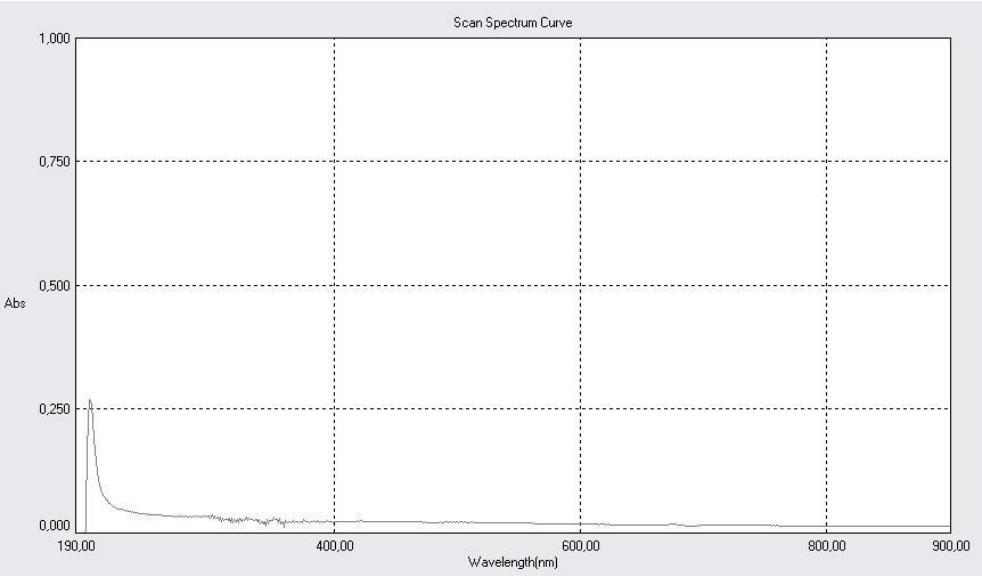


Şekil 7.13 0,01 mg/ml H-HA+Dox çözeltisine ait UV spektrası

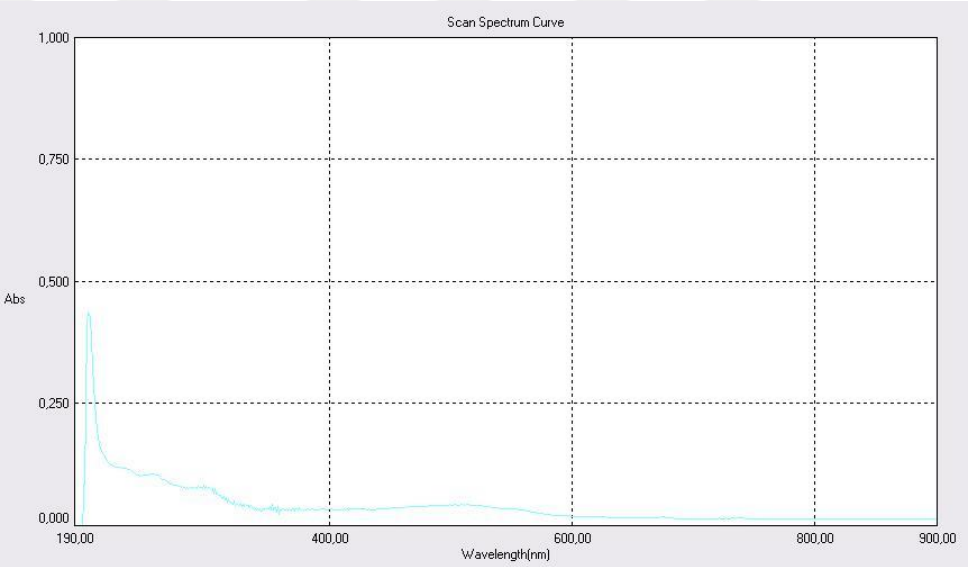


Şekil 7.14 0,05 mg/ml H-HA+Dox çözeltisine ait UV spektrası

Şekil 7.12 ‘de 0,01 mg/ml H-HA+Dox çözeltisine ait UV spektrası ve şekil 7.13’de 0,05 mg/ml H-HA+Dox çözeltisine ait UV spektrası verilmiştir. Her iki spektrumlara bakıldığında molaritesi fazla olan örneğin daha büyük pik verdiği görülmektedir. Şekil 7.13 ve şekil 7.14 de görüldüğü gibi 400-600 nm arasında görülen spektrumlar doksorubisine aittir.



Şekil 7.15 0,01 mg/ml Dox çözeltisine ait UV spektrası



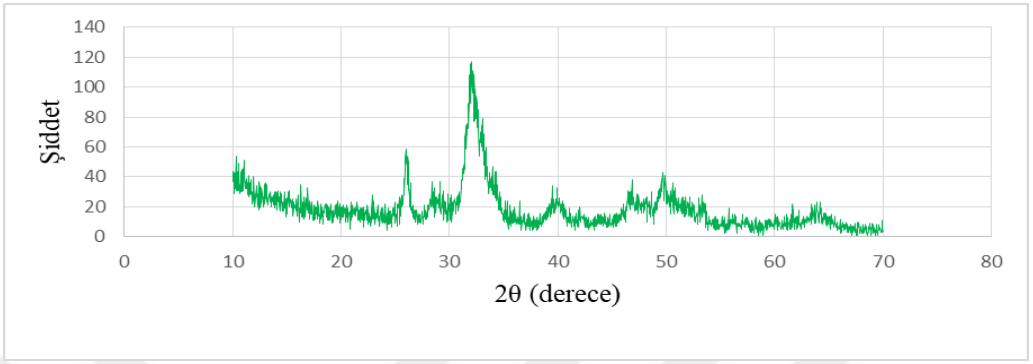
Şekil 7.16 0,05 mg/ml Dox çözeltisine ait UV spektrası

Şekil 7.14 ‘de 0,01 mg/ml Dox çözeltisine ait UV spektrası ve şekil 7.15’de 0,05 mg/ml Dox çözeltisine ait UV spektrası verilmiştir. Her iki spektrumlara bakıldığında molaritesi fazla olan örneğin daha büyük pik verdiği görülmektedir. Şekil 7.15 ve şekil 7.16 da görüldüğü gibi 400-600 nm arasında görülen spektrumlar doksorubisine aittir.

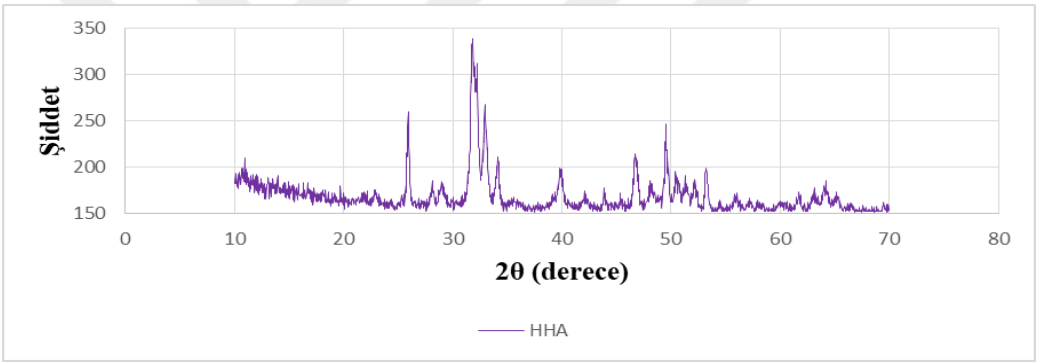
İlaç yüklü örneklerin absorbans değerleri ise tek başına hidroksiapatit veya tek başına doksorubisin hidroklorürden daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Hidrotermal yapıda olan örneklerin absorbans değerleri ise hidrotermal yapıda olmayanlardan daha fazla çıkmıştır.

7.4 XRD Analizi

XRD analizleri, hidroksiapatit, hidrotermal hidroksiapatit, doksorubisin yüklü hidroksiapatit, doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatit ve doksorubisine ait kristal formasyonu göstermek için yapılmıştır.

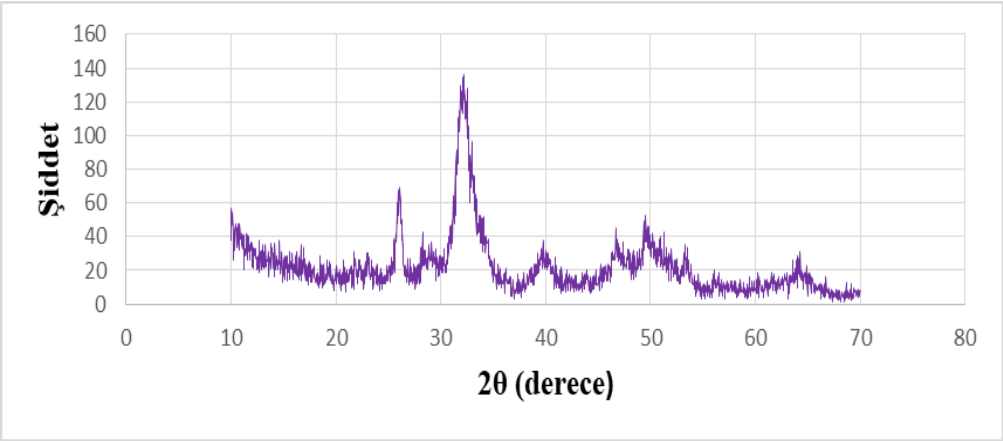


Şekil 7. 17 Hidroksiapatite ait XRD modeli

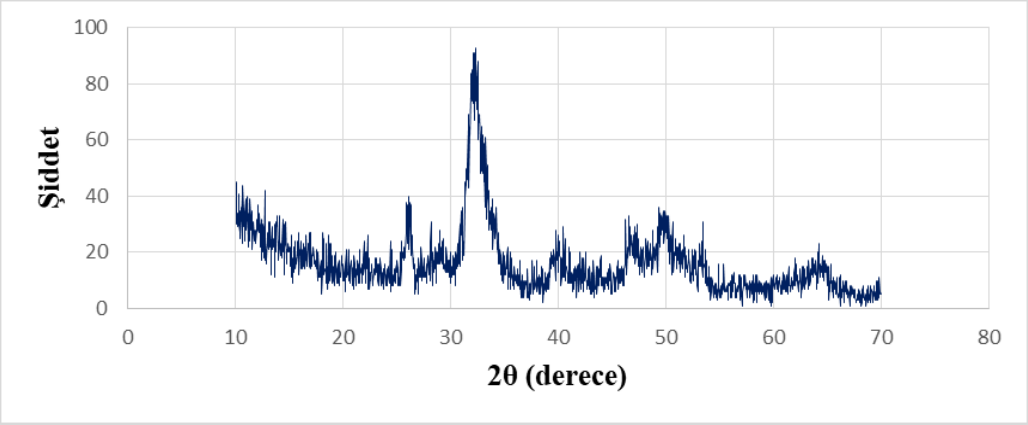


Şekil 7. 18 Hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli

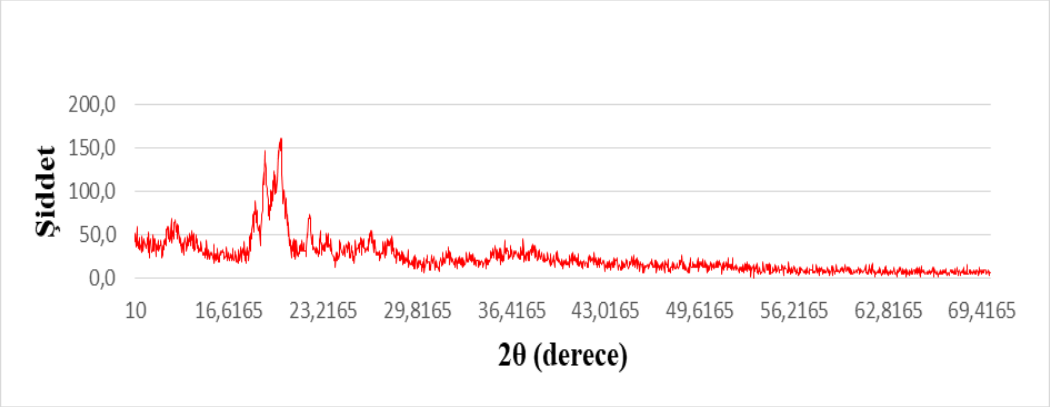
Hidroksiapatit ve hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modelleri karşılaştırıldığında hidrotermal hidroksiapatitin karakteristik piklerinin daha ince ve sivri olduğu görülmektedir. Bu hidrotermal hidroksiapatitin yapısının hidroksiapatite göre daha kristalin formda olduğunu göstermektedir.



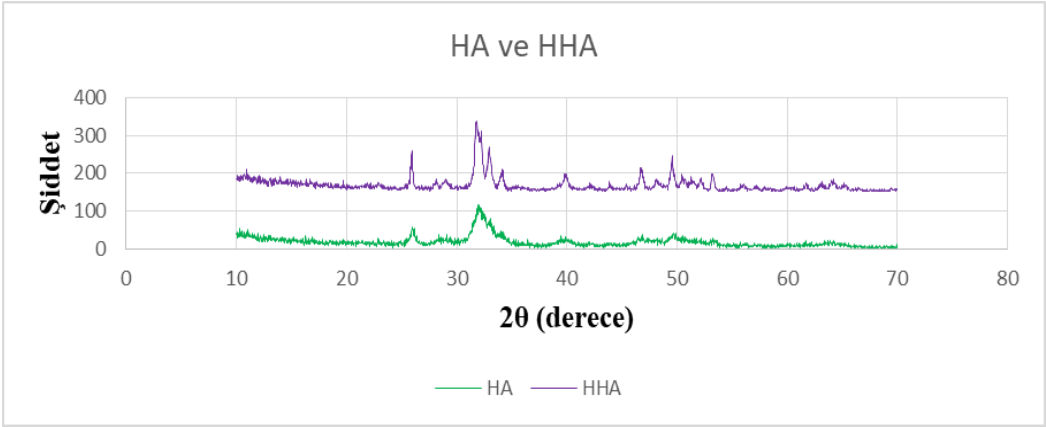
Şekil 7.19 Doksorubisin yüklü hidroksiapatite ait XRD modeli



Şekil 7.20 Doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli

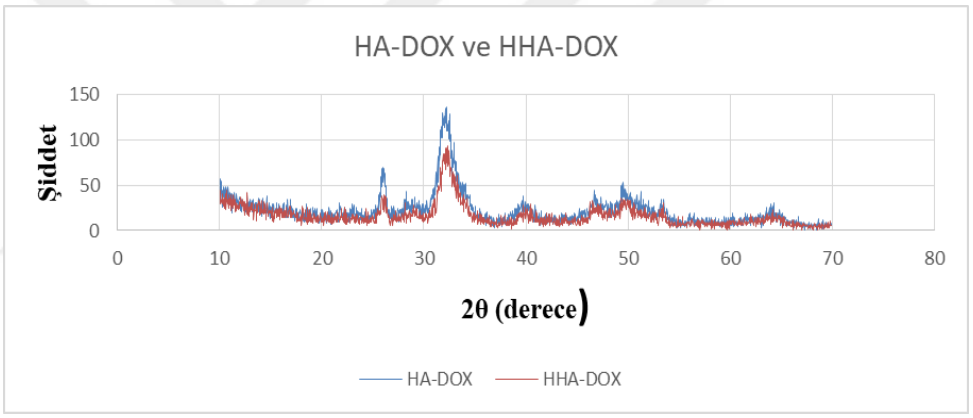


Şekil 7.21 Doksorubisine ait XRD modeli



Şekil 2.22 Hidroksiapatit ve hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli

Şekilde iki grafik birbiriyle karşılaştırıldığında hidrotermal yapıda hidroksiapatititin karakteristik piklerinin daha sivri olduğu göülmektedir. Buradan hidrotermal hidroksiapatitin daha kristalin yapıda olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 7.23 Doksorubisin yüklü hidroksiapatit ve doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatite ait XRD modeli

Şekilde görüle grafikten anlaşıldığı üzeredoksorubisin yüklü hidrotermal yapılı hidroksiapatitte hafif bir sapma olduğu ve piklerin sağa kaydığı görülmektedir. Bu durum hidrotermal proses esnasında doksorubisinin kristalin içine girdiği ve latis gerilmesine sebep olduğunu göstermektedir.

7.5 BET Analizi

BET adsorpsiyonu ve Azot (N_2) gaz emisyonunun desorpsiyonu ile gözenekli yüzey alanı ve gözenek boyutu ölçümü gerçekleştirilmiştir. Yüzey alanı tarafından

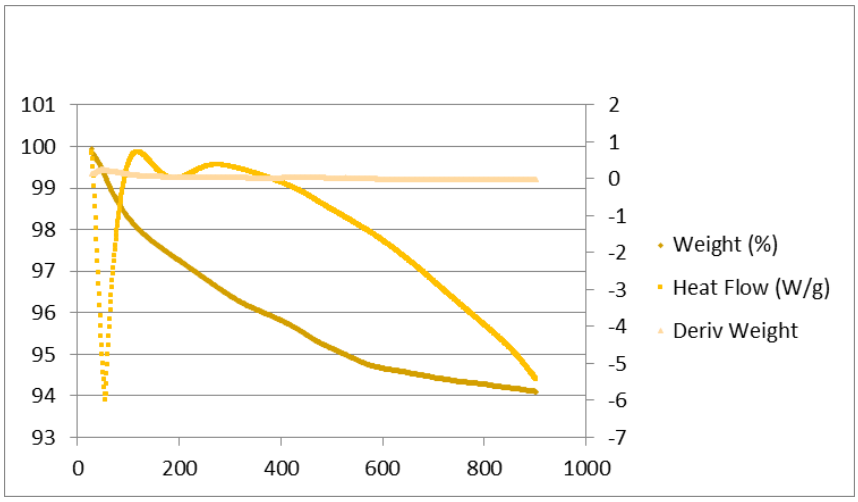
adsorpsiyona dayanan N_2 kullanımı, daha sonra gözenek dispersiyonu tüketilen N_2 gazı ile değerlendirilebilir.

Çizelge 7. 1 BET analizi sonuçları

Örnek		HA-Dox	HHA-Dox
Spesific Surface Area (m^2/g)	BET	167,6706	72,1912
	Largmuir	443,1015	172,8516
	BJH Adsoption	200,049	71,207
	BJH Desorption	229,8037	73,8921

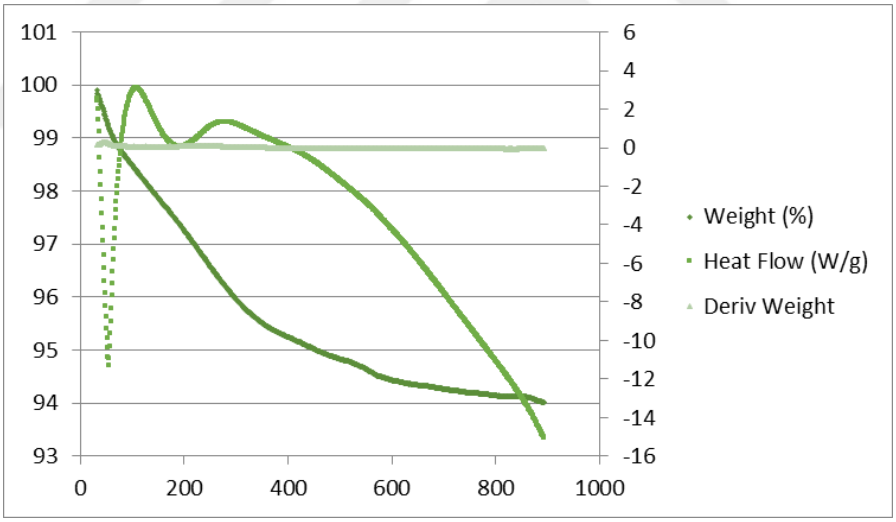
Yukarıda verilen çizelgede BET analizi sonucu elde edilen veriler gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre doksorubisin yüklü hidroksiapatitin spesifik yüzey alanı 167,6706 m^2/g ve doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatitin yüzel alanı 72,1912 m^2/g olarak görülmüştür. Doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatitte yüzey alanı daha küçük çıkmıştır çünkü hidrotermal hidroksiapatit kristalin yapıdadır ve bu demek oluyor ki bir örnek ne kadar kristalin yapıdaysa o kadar küçüktür ve bu da yüzey alanının büyük olmasını gösterir. Hidrotermal yapıda, hidroksiapatit düzgün şekilli değilken düzgün forma geliyor. Böylece kristal büyümesi gerçekleşiyor.

7.6 TG-DTA Analizi



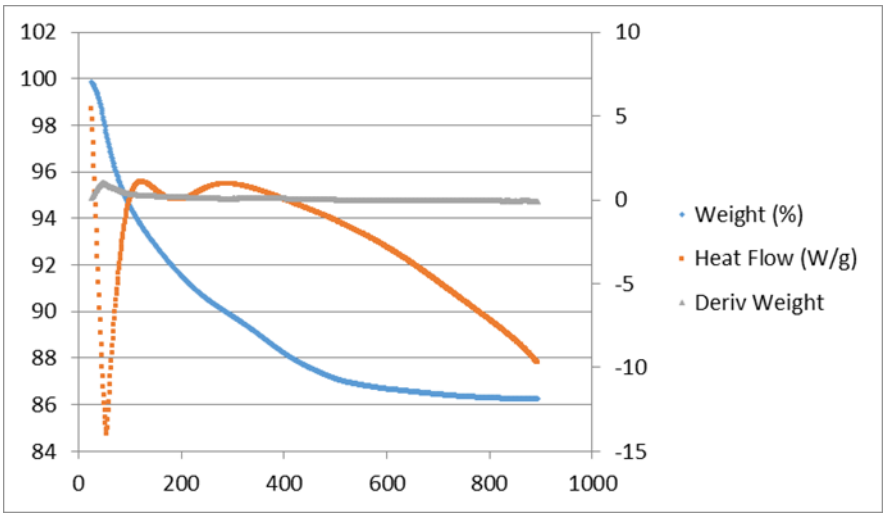
Şekil 7.24 Hidroksiapatit için TG-DTA grafiği

Şekilde hidroksiapatite ait TG-DTA grafiği verilmiştir. Grafikten anlaşıldığı üzere, hidroksiapatitlerde %6'lık bir nem kaybı vardır. Bu kayıp, hidroksiapatitlerde bulunan OH kaybından kaynaklanmaktadır. Buna dehidroksilasyon denir.



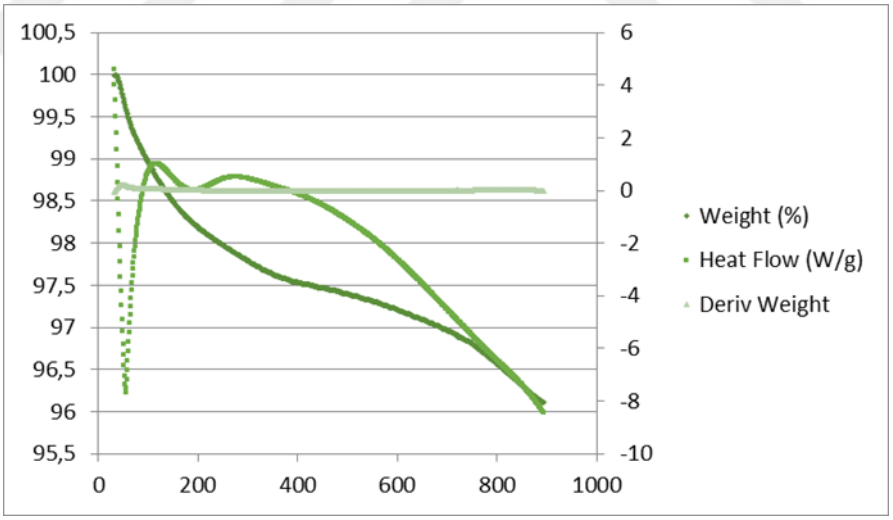
Şekil 7.25 Hidrotermal hidroksiapatit için TG-DTA grafiği

Şekilde hidrotermal hidroksiapatite ait TG-DTA grafiği verilmiştir. Grafikten anlaşıldığı üzere, hidroksiapatitlerde %6'lık bir nem kaybı vardır. Bu kayıp, hidroksiapatitlerde bulunan OH kaybından kaynaklanmaktadır. Buna dehidroksilasyon denir.



Şekil 2.26 Doksorubisin yüklü hidroksiapatit için TG-DTA grafiği

Şekilde doksorubisin yüklü hidroksiapatite ait TG-DTA grafiği verilmiştir. Grafikten anlaşıldığı üzere, hidroksiapatitlerde %14'lük bir kayıp vardır. Hidroksiapatitte kayıp % 6 idi. Hidroksiapatit ile doksorubisin yüklü hidroksiapatit karşılaştırıldığında, % 8'lik kaybın ilaç sisteminde bulunan doksorubisin, laktoz monohidrat ve metil paraben kaynaklı olduğu anlaşılmaktadır.

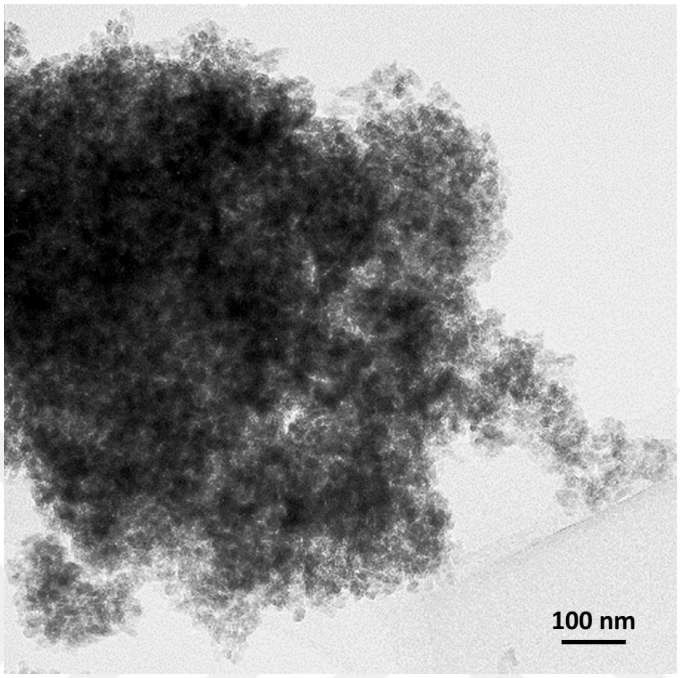


Şekil 7.27 Doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatit için TG-DTA grafiği

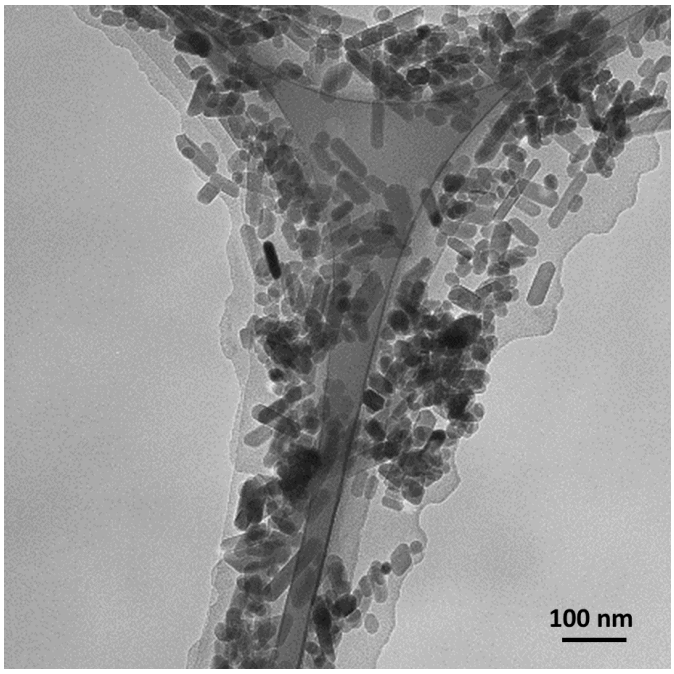
Şekilde doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatite ait TG-DTA grafiği verilmiştir. Grafikten anlaşıldığı üzere, hidroksiapatitlerde %4'lük bir kayıp vardır. Doksorubisin yüklü hidroksiapatit ile karşılaştırıldığında burada kayıp daha azdır. Bunun iki sebebi olabilir. Birincisi, doksorubisin hidroksiapatit kristalinin içine girdiği için ilaç işlem

esnasında kaybolmamış olabilir. İkincisi ise, hidrotermal proses esnasında ilaçtaki birtakım molekküller bozulmuş olabilir.

7.7 TEM Analizi



Şekil 7.28 Hidroksiapatitin TEM görüntüsü



Şekil 7.29 Hidrotermal hidroksiapatitin TEM görüntüsü

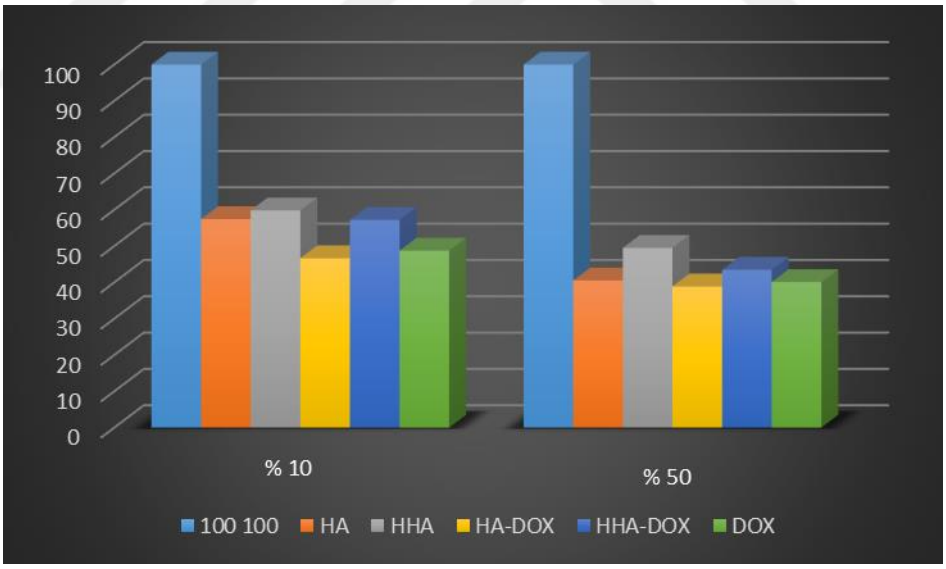
TEM çalışmalarından elde edilen verilere göre, hidrotermal proses sonucu hidroksipapatitlerin şekli değişmiş ve şekilde 2.28 ve şekil 7.29 daki kıyaslama ile silindirik hale geldiği görülmektedir. Ayrıca bu silindirik yapılar daha kristalin formdadır.

7.8 Hücre Kültürü Çalışması

Sonuçlar ELİSA redear da 570 nm de okundu. Yapılan analiz sonucu elde edilen hücrelerin canlılık oranlarına ait veriler aşağıdaki 7.2 nolu çizelgede verilmiştir. Bununla birlikte aşağıdaki şekilde MTT deneyi sonucunda hücrelerin canlılığı hakkında bilgi veren grafikler verilmiştir.

Çizelge 7.2 Hücrelerin canlılık oranları

% Kons	Kontrol	HA	HHA	HA-DOX	HHA-DOX	DOX
10	100	57,8	59,8	46,6	57,2	48,7
50	100	40,5	49,5	38,8	43,4	40,0



Şekil 7. 30 Hücrelerin canlılık oranı için grafik

Yapılan MTT hücre canlılık testi çalışmasına göre elde edilen veriler yukarıda grafik olarak verilmiştir. Bu grafikte 1. sütunlar %10 konsantrasyon olarak hazırlanan örneklere ait MTT canlılık testi sonuçlarını verirken, 2. sütunlar %50 konsantranson olarak hazırlanan örneklere ait MTT canlılık testi sonuçlarını vermektedir. 1 numaralı

sütünlarda da görüldüğü gibi hidroksiapatit için canlılık oranı %57.8, hidrotermal hidroksiapatit için canlılık oranı %59.8, doksorubisin yüklü hidroksiapatit için canlılık oranı %46.6, doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatit için canlılık oranı %57.2 ve doksorubisin için canlılık oranı %48.8 olarak görülmüştür. 2 numaralı sütunda ise hidroksiapatit için canlılık oranı %40.5, hidrotermal hidroksiapatit için canlılık oranı %49.5, doksorubisin yüklü hidroksiapatit için canlılık oranı %38.8, doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatit için canlılık oranı %43.4 ve doksorubisin için canlılık oranı %40.0 olarak görülmüştür. Sonuçlardan görüldüğü üzere, bütün örnekler MCF-7 meme kanseri hücre hattında hücreleri ekarte ederek başarılı olunmuştur. Hidroksiapatit, hidrotermal hidroksiapatit, doksorubisin yüklü hidroksiapatit, doksorubisin yüklü hidrotermal yapılı hidroksiapatit ve doksorubisin için örnek konsantrasyonu arttıkça ilacın etkisi artmış ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık oranı düşmüştür. 2. sütunda görüldüğü gibi, doksorubisin yüklü hidroksiapatit MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tek başına hidroksiapatit ve tek başına doksorubisinde daha fazla etkili olup hücre canlılık oranının daha düşük olduğu görülmüştür. Buradan doksorubisin ve hidroksiapatitin sinerjetik etki yaparak daha fazla MCF-7 meme kanseri hücresi öldürdüğü sonucu çıkarılabilir.

BÖLÜM 8

SONUÇ ve ÖNERİLER

Hidroksiapatit kemikte ve diş minesinde ve dentin tabakasında bulunan ve günümüzde gerek doku mühendisliği gerekse ilaç salım sistemleri gibi birçok alanda yeni çözümler üretmek üzere kullanılan bir kalsiyum tuzudur. Elmastan sonra en sert molekül olarak bilinen ve oksijen ile tepkimeye girmediği için yanmayan bir moleküldür. Doksorubisin çeşitli kanser tedavileri için kemoterapide tek başına veya başka ilaçlarla birlikte hastaya intravenöz yolla uygulanan çok güçlü bir ilaçtır. Doksorubisin ile tedavi sonrası çoğunlukla olumlu geri dönüşler olsa bile çok fazla yan etkisi bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında meme kanserinde kullanılan doksorubisinin etkinliğinin artırılması ile hedeflenmiş dokularda etkili olması hedeflenmiş ve hastalara uygulanmak üzere ilaç salım sistemi geliştirilmiştir. Doksorubisini taşıyıcı molekül olarak nano yapılı hidroksiapatit kristalleri kullanılmıştır. Eşsiz özellikleri, sentezi metodları, ilaç salım sistemlerinde uygulamaları dikkate alınarak çeşitli laboratuvar çalışmaları yapılmiştır. Yapılan çalışmalarda iki farklı yöntem kullanılarak doksorubisin hidroksiapatit kristallerine yüklenmiştir. Bu çalışmada karakterizasyon çalışmaları olarak, örneklerin yapılarındaki bağları incelemek için FTIR, yüzey yükleri hakkında bilgi sahibi olmak için zeta potansiyeli, faz yapılarını belirlemek için XRD, spesifik yüzey alanlarını görmek için BET, termal davranışlarını incelemek için TG-DTA analizleri yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarına ek olarak MCF-7 meme kanseri hücre hattında öldürücü etkisini incelemek için MTT testleri yapılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda FTIR analizlerinde ilaç yüklü yapılarda tek başına doksorubisin

ve tek başına hidroksiapatitte bulunmayan yeni pikler ortaya çıktığı görülmüştür. Bu durumdan doksorubisinin hidroksiapatit kristallerine yüklendiği anlamı çıkarılabilir. Yapılan XRD çalışmasında, hidrotermal yapılarda görülen piklerin daha keskin olduğu gözlemelenmiştir. Bu durum hidrotermal yapıların kristalin yapıda olduğunu kanıtlamaktadır. Bununla birlikte, doksorubisin yüklü hidroksiapatit ile doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatitlerin pikleri karşılaştırıldığında, doksorubisin yüklü hidrotermal hidroksiapatit için verilen piklerde saga kayma olduğu görülmektedir. Buna latis gerilmesi denir. Zeta potansiyeli çalışmasında doksorubisin yüklü hidroksiapatitit tek başına hidroksiapatit ve tek başına doksorubisinde daha yüklü olduğu görülmüştür. Bu bize, oluşturulan ilaç yüklü yapının daha kararlı olduğu ve embolize sebep olmayacağını gösterir. Yapılan BET çalışmasında, doksorubisin yüklü hidroksiapatit kristallerinin doksorubisin yüklü hidroksiapatit kristallerinden daha düzgün yapılar olduğu ve kristal büyümesi gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Yapılan TG-DTA analizinde doksorubisin yüklü hidroksiapatitte, hidroksiapatite gore daha fazla kayıp olduğu görülmüşütür. Buradan hidroksiapatite doksorubisin moleküllerinin yüklendiği ve analiz sırasında yapıdan uzaklaştığı sonucu çıkarılabilir. TEM çalışmaları sonucunda ise hidrotermal proses ile muamele olan hidroksiapatitlerin daha kristalin yapıda ve silindirik şekilde olduğu görülmüştür. Hücre kültürü çalışmalarında ise bütün örneklerin MCF-7 meme kanseri hücre hattında öldürücü etkinliği görülmüştürTüm örneklerin MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki etkinliği karşılaştırıldığında en etkili olanın doksorubisin yüklü hidroksiapatit olan ilaç salım sisteminin olduğu ve doksorubisinin tek başına kullanımından daha etkili olduğu görülmüştür. . Literatürde bir çok doksorubisin yüklü hidroksiapatit ilaç salım sistemi çalışması yapılmıştır, fakat piyasada bulunan ve hastalara doğrudan uygulanan doksorubisin ile bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada özgün olarak piyasada bulunan Adrimisin kullanılmıştır.

KAYNAKLAR

[1] Matsumura, Y. ve Maeda, H., (1986). ''A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs'', Cancer Research, 46: 6387–92.

[2] Ciocca, D.R., Frayssinet, P. ve Cuelle-Carrion F.D., (2007). ''A pilot study with a therapeutic vaccine based on hydroxyapatite ceramic particles and self-antigens in cancer patients'', Cell Stress Chaperones, 12(1): 33–43.

[3] Hideki, A., Masataka, O. ve Seisuke, K., (1992). ''Effects of HAP-Solon Cell Growth.'' Report of the institute for Medical and Dental Engineering, 26: 15–21.

[4] Li, S., Zhang, S., Chen, W. ve Wen, O., (1996). ''Effects of hydroxyapatite ultrafine powder oncolony formationand cytoskeletons of MGC-803 cell'', Bioceramics, 9:225–227.

[5] Wang, Y.F., Yan, Y.H., Cao, X.Y. ve Li, S.P., (2005). ''Preparation and Characterization of Strontium-Containing HAP Soland Studies on Its Effects on Cancer and Normal cells'', Key Engineering Materials, 288: 537–540.

[6] Meena, R., Kesari, K. K., Rani, M. ve Paulraj, R., (2012). ''Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Proliferation and Apoptosis of Human Breast Cancer Cells (MCF-7)'',Journal of Nanoparticle Research, 14: 712.

[7] Han, Y., Li, S., Cao, X., Yuan, L., Wang, Y., Yin, Y., Qiu, T., Dai, H. ve Wang, X., (2014). ''Different Inhibitory Effect and Mechanism of Hydroxyapatite Nanoparticles on Normal Cells and Cancer Cells In Vitro and In Vivo'', Scientific Reports, 4: 7134.

[8] Pathi, S., Lin, D.D.W., Dorvee, J.R., Estroff, L. ve Fischbach, C., (2011). ''Hydroxyapatite nanoparticle-containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis'', Biomaterials, 22: 5112-5122.

[9] Harvey, H.A ve Cream L.R., (2007). ''Biology of bone metastases: causes and consequences'', Clinical Breast Cancer, 7:7–13.

[10] Li, S., Peng, Y., Weinhandl, E.D.,Blaes, A.H., Cetin, K., Chia, V.M., Stryker S., Pinzone, J.J., Acquavella, J.F. ve Arneson, T.J., (2012). ''Estimated number of

prevalent cases of metastatic bone disease in the US adult population'', Clinical Epidemiology, 4: 87–93.

[11] Liede, A., Jerzak, K.J., Hernandez, R.K., Wade, S.W., Sun, P. ve Narod, S.A.,(2016) ''The incidence of bone metastasis after early-stage breast cancer in Canada'', Breast Cancer Res Treat. 156: 587–595.

[12] Langer, R., (2000). ''Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience'', Acc Chem Res 33: 94-101.

[13] Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, P. ve Jain, N.K., (2002). ''Pegnology: a review of PEG-ylated systems'', Pharmazie, 57: 5-29.

[14] Kommareddy, S., Tiwari, S.B. ve Amiji, M.M., (2005). ''Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery'', Technol Cancer Research Treat, 4(6):1525.

[15] Lee, M., Kim ve S.W., (2005). ''Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery'', Pharm Res, 22, 1-10.

[16] Vila, A., Sanchez, A., Tobio, M., Calvo, P. ve Alonso, M.J., (2002). ''Design of biodegradable particles for protein delivery'', Journal of Controled Release, 78: 15-24.

[17] Mu, L. ve Feng, S.S., (2003). ''A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol(R)): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS'', J Control Release, 86: 33-48.

[18] Kreuter, J. (1994). ''Nanoparticles. In Colloidal drug delivery systems'', Edited by Marcel Dekker: New York, 219-342.

[19] Reverchon, E. ve Adami, R., (2006) ''Nanomaterials and supercritical fluids'', The Journal of Supercritical Fluids, 37:1-22.

[20] Rolland, J.P., Maynor, B.W., Euliss, L.E., Exner, A.E., Denison, G.M. ve DeSimone, J.M., (2005). ''Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials'', Journal American Chemical Society, 127: 10096-10100

[21] Kompella, U.B., Bandi, N. ve Ayalasomayajula, S.P., (2001) ''Poly (lactic acid) nanoparticles for sustained release of budesonide'', Drug Delivery Technology, 1: 1-7.

[22] Ravi, M.N., Bakowsky, U. ve Lehr, C.M., (2004). ''Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers'', Biomaterials, 25: 1771-1777.

[23] Li, Y.P., Pei, Y.Y., Zhou, Z.H., Zhang, X.Y., Gu, Z.H., Ding, J., Zhou, J.J. ve Gao, X.J., (2001). ''PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor-[alpha] carriers'', Journal Controled Release 71: 287-296.

[24] Kwon, H.Y., Lee, J.Y., Choi, S.W., Jang, Y. ve Kim, J.H., (2001). ''Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method'', Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects, 182: 123-130.

[25] Zambaux, M., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M., Labrude, P. ve Vigneron, C., (1998). ''Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by double emulsion method'', Journal Controled Release 50: 31-40.

[26] Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N. ve Kawashima, Y., (1993). ''Preparation of biodegradable nanoparticles of water-soluble and insoluble drugs with D,L lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior'', Journal Controlled Release, 25: 89-98.

[27] Zhang, Q., Shen, Z. ve Nagai, T., (2001). ''Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats'', International Journal Pharmaceutics. 218: 75-80.

[28] Boudad, H., Legrand, P., Lebas, G., Cheron, M., Duchene, D. ve Ponchel, G., (2001). ''Combined hydroxypropyl-[beta]cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir'', International Journal Pharmaceutics. 218: 113-124.

[29] Puglisi, G,. Fresta, M,. Giammona, G, ve Ventura, C.A., (1995). ''Influence of the preparation conditions on poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation'', International Journal Pharmaceutics 125: 283-287.

[30] Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. ve Alonso, M.J., (1997). ''Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoprticles as protein carriers'', J. Applied Polymer Science 63: 125-132.

[31] Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. ve Alonso, M.J., (1997). ''Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines'', Pharmaceutical Research 14: 1431-1436.

[32] Jung, J. ve Perrut, M., (2001). ''Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey'', Journal Supercritical Fluids 20: 179-219.

[33] Thote, A.J. ve Gupta, R.B., (2005). ''Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release'', Nanomedicine: Nanotech. Biology Medicine, 1: 85-90.

[34] Sun, Y., Mezian, M., Pathak, P. ve Qu, L., (2005). ''Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution'', Chemistry, 11: 1366-73.

[35] Panyam, J ve Labhasetwar, V., (2003). ''Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue'', Advanced Drug Delivery Reviews, 55 (3): 29-47.

[36] Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J. ve Amidon, G, L, ''The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent'', Pharmaceutical Research 14(15): 68-73.

[37] Desai, M.P., Labhasetwar, V., Amidon, G.L. ve Levy, R.J., (1996). ''Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size'', Pharmaceutical Research 13(18), 38-45.

[38] Kroll, R.A., Pagel, M.A., Muldoon, L.L., Roman-Goldstein, S., Fiamengo, S.A. ve Neuwelt E.A., (1998). ''Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers'', Neurosurgery, 43(8): 79-86.

[39] Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., Briesen, H. ve Begley, D.J., ''Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles'', Pharmaceutical Research 20(4), 09-16.

[40] Zauner, W., Farrow, N.A. ve Haines, A.M., (2001). ''In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density'', Journal Controlled Release, 71: 39-51.

[41] Redhead, H.M., Davis, S.S. ve Illum, L., (2001). ''Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation'', Journal Controlled Release 70: 353-363.

[42] Dunne, M., Corrigan, O.L. ve Ramtoola, Z., (2000). ''Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles'', Biomaterials, 21: 1659-1668.

[43] Panyam, J., Dali, M.M., Sahoo, S.K., Ma, W., Chakravarthi, S.S., Amidon, G.L., Levy, R.J. ve Labhasetwar, V., ''Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(,-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles'', Journal Control Release 92: 173-187.

[44] Swarbrick, J. ve Boylan, J., (2002). ''Encyclopedia of pharmaceutical technology'' Second edition; Marcel Dekker: New York.

[45] Muller, R.H. ve Wallis, K.H., (1993). ''Surface modification of i.v. injectable biodegradable nanoparticles with poloxamer polymers and poloxamine 908'' International Journal of Pharmaceutics 89: 25-31.

[46] Brigger, L., Dubernet, C. ve Couvreur, P., (2002) ''Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis'' Advanced Drug Delivery. Reviews 54: 631-651.

[47] Grislain, L., Couvreur, P., Lenaerts, V., Roland, M., DeprezDecampeneere, D. ve Speiser, P., (1983). ''Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier'' International Journal Pharmaceutics. 15: 335-345.

[48] Olivier, J.C., (2005). ''Drug transport to brain with targeted nanoparticles'' NeuroRx 2: 108-119.

[49] Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P. ve Vauthier, C., (2002). ''Nanocapsule technology: a review'' Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 19: 99-134.

[50] Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M.C., Illum, L. ve Davis, S.S., (1999). ''PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug'' Journal Controlled Release, 57: 171-185.

[51] Govender, T., Riley, T., Ehtezazi, T., Garnett, M.C., Stolnik, S., Illum, L. ve Davis, S.S., (2000). ''Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles'' International Journal of Pharmateutics 199: 95-110.

[52] Panyam, J., Williams, D. ve Dash, A., (2004). ''Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles'' Journal Pharmateutics Science 93(18): 04-14.

[53] Peracchia, M., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A., Lotan, N. ve Langer, R., (1997). ''PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: investigation of their drug encapsulation and release characteristics'' Journal of Controlled Release, 46: 223–231

[54] Chen, Y., McCulloch, R.K. ve Gray, B.N., (1994). ''Synthesis of albumin-dextran sulfate microspheres possessing favourable loading and release characteristics for the anti-cancer drug doxorubicin'' Journal of Controlled Release, 31: 49-54.

[55] Chen, Y., Mohanraj, V.J. ve Parkin, J.E., (2003). Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an antiangiogenesis peptide'' Letters in Peptide Science 10: 621-627.

[56] Magenheim, B., Levy, M.Y. ve Benita, S., (1993). ''A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers – ultrafiltration technique at ow pressure'' International Journal of Pharmateutics 94: 115-123.

[57] Fresta, M., Puglisi, G., Giammona, G., Cavallaro, G., Micali, N. ve Furneri, P.M., (1995). ''Pefloxacin mesilate- and ofloxacinloaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles; characterization of the colloidal drug carrier formulation'' Journal of Pharmateutical Science 84: 895-902.

[58] Billotte, W.G., (2000). ''Ceramic Biomaterials, The Biomedical Engineering Handbook'', Second Edition, CRC Press LLC.

[59] Roy, T.D., Simon, J.L., Ricci, J.L., Rekow, E.D., Thompson, V.P. ve Parsons, J.R., (2003). ''Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques'' Journal of Biomedical Material Research, 4: 1228−1237.

[60] Leukers, B., Gulkan, H., Irsen, S.H., Milz, S., Tille, C., Schieker, M. ve Seitz, H., (2005). ''Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing'', Journal of Material Science: Materials in Medicine, 16: 1121−1124.

[61] Kim, S. ve Kumta, P.N., (2004). ''Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder'', Material Science Engineerring B. 111: 232–236.

[62] Li F.L. ve Zhang H.J., (2017). ‘’Synthesis of Hollow Sphere and 1D Structural Materials by Sol-Gel Process’’, Materials, 10(9): 995.

[63] Liu, D.M., Yang, Q., Troczynski, T. ve Tseng Wenjea, J., (2002) ‘’Structural evolution of sol-gel derived hydroxyapatite’’, Biomaterials, 23, 1679–1687

[64] Shih, W.J., Chen, Y.F., Wang, M.C. ve Hon, M.H., (2004). ‘’Crystal growth and morphology of the nano-sized hydroxyapatite powders synthesized from $CaHPO_4{\cdot}2H_2O$ and $CaCO_3$ by hydrolysis method’’, Journal of Crystal Growth 270: 211-218.

[65] Evis, Z., (2011). ‘’Çeşitli İyonlar Eklenmiş Nano Hidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi’’, International Journal of Research and Development.

[66] LeGeros, R.Z., Trautz, O.R., LeGeros, J.P., Klein, E. ve Shirra W.P., (1967) ‘’Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology’’, Science, 155: 1409– 1411.

[67] Simpson, D.R., (1968) ‘’Substitutions in Apatite: I. Potassium-Bearing Apatite’’, Am. Mineral., 53(4):32–44.

[68] Yoshimura, M., Loku K., Okamoto, K.ve Takeuchi H., (1993). ‘’Apatite Whisker and Method for Preparation Thereof’’, U.S. Patent No: 5:227-147.

[69] Christiansen, N. ve Riman R.E., (1989). ‘’Bioceramics—A Future Through Microstructural and Chemical Design’’; 209–20 in Proceedings of the 5th Scandinavian Symposium on Materials Science, New Materials and Processes May 22–25, 1989, Edited by I. L. H. Hansson and H. Lilhot. Danish Society for Materials Testing and Research, Copenhagen, Denmark.

[70] Asaoka, N., Suda, H. ve Yoshimura, M., (1995). ‘’Preparation of Hydroxyapatite Whiskers by Hydrothermal Method’’, Journal of Chemical Society. Japan., 1(2): 5–9.

[71] Cao, L., Zhang, C. ve Huang, J., (2005). ‘’Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation.’’ Ceramic International 31, 1041-1044.

[72] Kong, L.B., Ma, J. ve Boey, F., (2002). ‘’Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process.’’ Journal Material Science 37: 1131-1134.

[73] Jarcho, M. ve Bolen, C.H., (1976). ‘’Hydroxyapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form.’’, Journal Material Science, 11: 2027-2035

[74] Wang, P., Li, C., Gong, H., Jiang, X., Wang, H. ve Li, K., (2010). ‘’Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process’’, Powder Technology 203: 315–321.

[75] Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. ve Saraf, S., (2006). ‘’Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs’’, Biological Pharmateucial Bull, 29: 1790-1798.

[76] Gradishar, W.J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M. ve O'Shaughnessy, J., (2005). ''Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer'', Journal Clinical Oncology 23: 7794-7803.

[77] Green, M.R., Manikhas, G.M., Orlov, S., Afanasyev, B., Makhson, A.M., Bhar, P. ve Hawkins, M.J., (2006). ''Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced nonsmall-celllung cancer'', Annual Oncology, 17: 1263-1268.

[78] Nyman, D.W., Campbell, K.J., Hersh, E., Long, K., Richardson, K., Trieu, V., Desai, N., Hawkins, M.J. ve Von, Hoff, D.D., (2005). ''Phase and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies.'' Journal Clinical Oncology, 23: 7785-7793.

[79] Li, C., (2002). ''Poly(L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates'' Advanced Drug Delivery Reviews, 54: 695-713.

[80] Sabbatini, P., Aghajanian, C., Dizon, D., Anderson, S., Dupont, J., Brown, J.V., Peters, W.A., Jacobs, A., Mehdi, A., Rivkin, S., Eisenfeld, A.J. ve Springgs, D., (2004). ''Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma'' Journal Clinical Oncology, 22: 4523-4531.

[81] Bhatt, R., DeVries, P., Tulinsky, J.,Bellamy, G.,Baker, B.,Singer, J.W. ve Klein, P., (2003). ''Synthesis and in vivo antitumor activity of poly(l-glutamic acid) conjugates of 20S-camptothecin'' Journal Medical Chemistry, 46: 190-193.

[82] Duncan, R., (2003). ''The dawning era of polymer therapeutics'', National Reviews of Drug Discovery, 2: 347-360.

[83] Vasey, P.A., Kaye, S.B., Morrison, R., Twelves, C., Wilson, P., Duncan, R., Thomson, A.H., Murray, L.S., Hilditch, T.E., Murray, T., Burtles, S., Fraier, D., Frigerio, E. Ve Cassidy, J., (1999). ''Phase clinical and pharmacokinetic stüdyo fPK1[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a newc lass of chemotherapeutic agents-drug polymer conjugates'', Clinical Cancer Research, 5: 83-94.

[84] Adams, M.L., Lavasanifar, A., Kwon, G.S., (2003). ''Amphiphilic block copolymers for drug delivery'', Journal Pharmateucial Science 92: 1343-1355.

[85] Batrakova, E.V., Dorodnych, T.Y., Klinskii, E.Y., Kliushnenkova, E.N., Shemchukova, O.B., Goncharova, O.N., Arjakov, S.A., Alakhov, V.Y. ve Kabanov, A.V., (1996). ''Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anticancer activity'', British Journal of Cancer, 74: 1545-1552.

[86] Nakanishi, T., Fukushima, S., Okamoto, K., Suzuki, M., Matsumura, Y., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K., (2001). ''Development of

the polymer micelle carrier system for doxorubicin'', Journal of Controled Release, 74: 295-302.

[87] Kim, T.Y., Kim, D.W., Chung, J.Y., Shin, S.G., Kim, S.C., Heo, D.S., Kim, N.K. ve Bang, Y.J., (2004). ''Phase Iand pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies'', Clinical Cancer Research, 10: 3708-3716.

[88] Nasongkla, N., Bey, E., Ren, J., Ai, H., Khemtong, C. ve Guthi, J.S., (2006). ''Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems'', Nano Letters 6: 2427-2430.

[89] Svenson, S. ve Tomalia, D.A., (2012). ''Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field'', Advanced Drug Delivery Reviews, 64: 102-115.

[90] Malik, N., Evagorou, E.G. ve Duncan, R., (1999). ''Dendrimer platinate: a novel approach to cancer chemotherapy'', Anticancer Drugs, 10, 767-776.

[91] Markman, M., (2006). ''Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary'', Expert Opin Pharmacother 7: 1469-1474.

[92] Rivera, E., (2003). ''Current status of liposomal anthracycline therapy in metastatic breast cancer'', Clinical Breast Cancer, 4: 76-83.

[93] Rosenthal, E., Poizot-Martin, I., Saint-Marc, T., Spano, J.P. ve Cacoub, P., (2002). ''Group DNXS. Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma'', American Journal of Clinic Oncology, 25, 57-59.

[94] Hofheinz, R.D., Gnad-Vogt, S.U., Beyer, U. ve Hochhaus, A., (2005). ''Liposomal encapsulated anti-cancer drugs'', Anticancer Drugs, 16: 691-707.

[95] Wu, J., Liu, Q. ve Lee, R.J., (2006). ''A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel'', International Journal of Pharmaceutics, 316: 148-153.

[96] Manchester, M. ve Singh, P., (2006). ''Virus-based nanoparticles (Vnanoparticles): platform technologies for diagnostic imaging'', Advanced Drug Delivery Reviews, 58: 1505-1522.

[97] Singh, P., Destito, G., Schneemann, A. ve Manchester, M., (2006). ''Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting'', Journal of Nanobiotechnology 4: 2.

[98] Flenniken, M.L., Willits, D.A., Harmsen, A.L., Liepold, L.O., Harmsen, A.G., Young, M.J. ve Douglas, T., (2006). ''Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into a heat shock protein cage architecture'', Chemistry and Biology, 13: 161-170.

[99] Flenniken, M.L., Liepold, L.O., Crowley, B.E., Willits, D.A., Young, M.J. ve Douglas, T., (2005). ''Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture'', Chemical Commun (Camb), 4: 447-449.

[100] Bianco, A., Kostarelos, K., Partidos C.D. ve Prato, M., (2005). ''Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes'', Chemical Commun, 5: 571-577.

[101] Bianco, A., Kostarelos, K. ve Prato, M., (2005). ''Applications of carbon nanotubes in drug delivery'', Current Opinion in Chemical Biology, 9: 674-679.

[102] Wu, W., Wieckowski, S., Pastorin, G., Benincasa, M., Klumpp, C., Briand, J.P., Gennaro, R., Prato, M. ve Bianco, A., (2005). ''Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes'', Angewantde Chemie International Edition 30(44): 6358-6362.

[103] Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Briand, J.P., Kostarelos, K., Prato, M. ve Bianco, A., (2006). ''Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery'', Chemical Commun, 11: 1182-1184.

[104] Moghimi, S.M., Hunter, A.C. ve Murray, J.C., (2001). ''Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice'', Pharmacology Reviews, 53: 283-318.

[105] Wisse, E., Braet, F., Luo, D., Zanger, R.D., Jans, D., Crabbe, D. ve Vermoesen, A., (1996). ''Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver'', Toxicol Pathology, 24: 100-111.

[106] Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P. ve Jain, R.K., (1995). ''Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size'', Cancer Research, 55: 3752-3756.

[107] Moghimi, S.M. ve Szebeni, J., (2003). ''Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties'', Prog Lipid Res, 42: 463-478.

[108] Harris, J.M., Martin, N.E., Modi ve M., (2001), ''Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics'', Clinical Pharmacokinet, 40: 539-551.

[109] Maeda, H., (2001). ''The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting'', Advanced Enzyme Regulations, 41: 189-207.

[110] Carmeliet, P. ve Jain, R.K., (2000). ''Angiogenesis in cancer and otherdiseases'', Nature, 407:249-257.

[111] Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.H. ve Huang, P., (2006). ''Glycolysis inhibition for anticancer treatment'', Oncogene, 25: 4633-4646.

[112] Yatvin, M.B., Kreutz, W., Horwitz, B.A. ve Shinitzky, M., (1980). ''pH-sensitive liposomes: possible clinicalimplications'', Science, 210: 1253-1255.

[113] Deryugina, E.I. ve Quigley, J.P., (2006). ''Matrix metalloproteinases and tumor metastasis'', Cancer Metastasis Reviews, 25: 9-34.

[114] Allen, T.M., (2002). ''Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy'', Naionalt Reviews of Cancer, 2: 750-763.

[115] Tolcher, A.W., Sugarman, S., Gelmon, K.A., Cohen, r., Saleh, M., Isaacs, C., Young, L., Healey, D., Onetto, N. Ve Slichenmyer, W., (1999). ''Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer'', Journal of Clinical Oncology, 17: 478-484.

[116] Leamon, C.P. ve Reddy, J.A., (2004). ''Folate-targeted chemotherapy'', Advanced Drug Delivery Reviews, 56: 1127-1141.

[117] Fihri, A., Len, C., Varma, R.S. ve Solhi A., (2017). ''Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis'', Coordination Chemistry Reviews, 347: 48–76.

[118] Poorkiani, M., Hazrati, M., Abbaszadeh, A., Jafari, P., Sadeghi, M., Dejbakhsh, T. ve Mohammadian Panah, M., (2010). ''Does a rehabilitation program improve quality of life in breast cancer patients'', Payesh., 9(1): 61–68.

[119] Guo, X., Yan, H., Zhao, S., Li, Z., Li, Y. ve Liang, X., (2013). ''Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature'', Advanced Powder Technology, 24: 1034–1038.

[120] Pramanik, S., Agarwal A.K., Rai, K.N. ve Garg, A., (2007). ''Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process'', Ceramics International, 33, 419-426.

[121] Ikoma, T, Yamazaki, A., Nakamura, S. ve Akao, M., (1999). ''Preparation and Structure Refinement of Monoclinic Hydroxyapatite'', Journal of Solid State Chemistry, 144: 272-276.

[122] Tao, J., Jiang, W., Pan, H., Xu, X. ve Tang, R., (2007). ''Preparation of large-sized hydroxyapatite single crystals using homogeneous releasing controls'', Journal of Crystal Growth, 308: 151-158.

[123] Zhang, Y. ve Lu, J., (2008). ''A Mild and Efficient Biomimetic Synthesis of Rodlike Hydroxyapatite Particles with a High Aspect Ratio Using Polyvinylpyrrolidone As Capping Agent'', Crystal Growth Design, 8: 2101–2107.

[124] Swain, S.K. ve Sarkar, D., (2011). ''A comparative study: Hydroxyapatite spherical nanopowders and elongated nanorods'', Ceramics International, 37: 2927-2930.

[125] Verwilghen, C., Chkir, M., Rio, S., Nzihou, A., Sharrock, P. ve Depelsenaire, G., (2009). ''Convenient conversion of calcium carbonate to hydroxyapatite at ambient pressure'', Materials Science and Engineering: C, 29, Issue 3, 771-773.

[126] Liou S.C., Chena, S.Y., Lee, H.Y. ve Bow, J.S., (2004). ''Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders'', Biomaterials, 25: 189-196.

[127] Wang, J. ve Shaw, L.L., (2007). ''Morphology-Enhanced Low-Temperature Sintering of Nanocrystalline Hydroxyapatite'', Advanced Materials, 19: 2364–2369.

[128] Cai, Y., Mei, D., Jiang, T. ve Yao, J., (2010). ''Synthesis of oriented hydroxyapatite crystals: Effect of reaction conditions in the presence or absence of silk sericin'', Materials Letters, 64: 2676-2678.

[129] Saha, S.K., Banerjee, A., Banerjee, S. ve Bose, S., (2009). ''Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite using surfactant template systems: Role of templates in controlling morphology'', Materials Science and Engineering: C, 29: 2294-2301.

[130] Mitchell S., Michels, N.L. ve Pérez-Ramirez, J., (2013). ''From powder to technical body: the undervalued science of catalyst scale up'', Chemical Society Reviews 42: 6094– 6112.

[131] Sheldon, R.A., (2012). ''Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design'', Chemical Society Reviews, 41: 1437–1451.

[132] Guo, G., Sun, Y., Wang, Z. ve Guo, H., (2005). ''Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion'', Ceramics International, 31: 869-872.

[133] Zhang, G., Chen, J., Yang, S., Yu, Q., Wang, Z. ve Zhang, Q., (2011). ''Preparation of amino-acid-regulated hydroxyapatite particles by hydrothermal method'', Materials Letters, 65: 572-574.

[134] Cao, H., Zhang, L., Zheng, H. ve Wang, Z., (2010). ''Hydroxyapatite Nanocrystals for Biomedical Applications'', The Journal of Physical Chemistry C, 114: 18352–18357

[135] Zhu K., Yanagisawa, K., Onda, A., Kajiyoshi K. ve Qiu, J., (2009). ''Morphology variation of cadmium hydroxyapatite synthesized by high temperature mixing method under hydrothermal conditions'', Materials Chemistry and Physics, 113: 239-243.

[136] Lee, D.K., Park, J.Y., Kim, M.R. ve Jang, D.J., (2011). ''Facile hydrothermal fabrication of hollow hexagonal hydroxyapatite prisms'', Crystal Engineering Community, 13: 5455–5459

[137] Lin K., Liu, X., Chang, J. ve Zhu, Y., (2011). ''Facile synthesis of hydroxyapatite nanoparticles, nanowires and hollow nano-structured microspheres using similar structured hard-precursors'', Nanoscale, 3: 3052–3055.

[138] Zhang, H. ve Darvell, B.W., (2011). ''Morphology and structural characteristics of hydroxyapatite whiskers: Effect of the initial Ca concentration, Ca/P ratio and Ph'', Acta Biomaterialia, 7: 2960-2968.

[139] Guo, X., Xiao, P., Liu, J., Shen, Z. ve Am, J., (2005). ''Fabrication of Nanostructured Hydroxyapatite via Hydrothermal Synthesis and Spark Plasma Sintering'', Journal of The American Ceramic Society, 88: 1026–1029.

[140] Tsiourvas, D., Tsetsekou, A., Kammenou, M.I., Boukos, N. ve Am, J., (2011). ''Controlling the Formation of Hydroxyapatite Nanorods with Dendrimers'', Journal of The American Ceramic Society, 94: 2023–2029.

[141] Zhang H. ve Zhang, M., (2011). ''Phase and thermal stability of hydroxyapatite whiskers precipitated using amine additives'', Ceramics International, 37: 279-286.

[142] Abdel-Aal, E., El-Midany, A. ve El-Shall, H., (2008). ''Mechanochemical-hydrothermal preparation of nano-crystallite hydroxyapatite using statistical design'', Materials Chemistry and Physics, 112: 202-207.

[143] Suchanek, W.L., Shuk, P., Byrappa, K., Riman, R.E., TenHuisen K.S. ve Janas, V.F., (2002). ''Mechanochemical–hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature'', Biomaterials, 23: 699-710.

[144] Farzadi, A., Solati-Hashjin, M., Bakhshi, F. ve Aminian, A., (2011). ''Synthesis and characterization of hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation'', Ceramics International, 37: 65-71.

[145] Lak, A., Mazloumi, M., Mohajerani, M.S., Zanganeh, S., Shayegh, M.R., Kajbafvala, A., Arami, H. ve Sadrnezhaad, S.K., (2008). ''Rapid Formation of Mono-Dispersed Hydroxyapatite Nanorods with Narrow-Size Distribution via Microwave'', Irradiation Journal of The American Ceramic Society, 91: 3580–3584.

[146] Amer, W., Abdelouahdi, K., Ramananarivo, H.R., Zahouily, M., Fihri, A., Coppel, Y., Varma, R.S. ve Solhy, A., (2013). ''Synthesis of mesoporous nano-hydroxyapatite by using zwitterions surfactant'', Materials Letters, 107: 189-193.

[147] Amer, W., Abdelouahdi, K., Ramananarivo, H.R., Zahouily, M., Fihri A., Djessas, K., Zahouily, K., Varma, R.S. ve Solhy, A., (2014). ''Microwave-assisted synthesis of mesoporous nano-hydroxyapatite using surfactant templates'', Crystal Engineering Community, 16: 543–549.

[148] Honarmandi, P., Shokuhfar, A., Nasiri-Tabrizi, B. ve Ebrahimi-Kahrizsangi, R., (2010). ''Milling media effects on synthesis, morphology and structural characteristics of single crystal hydroxyapatite nanoparticles'', Advances in Applied Ceramics, 109: 2.

[149] Fathi, M. ve Mohammadi Zahrani, E., (2009). ''Mechanical alloying synthesis and bioactivity evaluation of nanocrystalline fluoridated hydroxyapatite'', Journal of Crystal Growth, 311: 1392-1403.

[150] El Briak-Ben Abdeslam, H., Ginebra, M., Vert, M. ve Boudeville, P., (2008). ''Wet or dry mechanochemical synthesis of calcium phosphates İnfluence of the water content on DCPD–CaO reaction kinetics'', Acta Biomater, 4: 378-386.

[151] Silva, C.C., Pinheiro, A.G., De Oliveira, R.S., Goes, J.C., Aranha, N., De Oliveira, L.R. ve Sombra, A.S.B, (2004). ''Properties and in vivo investigation of nanocrystalline hydroxyapatite obtained by mechanical alloying'', Materials Science and Engineering: C, 24: 549-554.

[152] Yeong, B., Junmin, X. ve Wang, J., (2001). ''Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite from calcium oxide and brushite'', Journal of the American Ceramic Society, 84: 465-467.

[153] Kim, W., Zhang, Q. ve Saito, F., (2000). ''Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite from $Ca(OH)_2$-P_2O_5 and CaO-$Ca(OH)_2$-P_2O_5 mixtures'', Journal of Materials Science, 35: 5401–5405.

[154] Han, Y., Wang, X. ve Li, S., (2009). ''Change of phase composition and morphology of sonochemically synthesised hydroxyapatite nanoparticles with glycosaminoglycans during thermal treatment'', Advances in Applied Ceramics, 108: 400–405

[155] Cao, L., Zhang, C. ve Huang, J., (2005). ''Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation'', Ceramics International, 31: 1041-1044.

[156] Han, Y., Li, S., Wang, X., Bauer, I. ve Yin, M., (2007). ''Sonochemical preparation of hydroxyapatite nanoparticles stabilized by glycosaminoglycans'', Ultrasonics Sonochemistry, 14: 286-290.

[157] Giardina, M.A. ve Fanovich, M.A., (2010). ''Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from $Ca(OH)_2$ and H_3PO_4 assisted by ultrasonic irradiation'', Ceramics International, 36: 1961-1969.

[158] Aghabarari, M., Ahamadi, F., Mohammadi, E., Hajizadeh, E. ve Farahania, V., (2005). ''Physical, emotional and social dimension of quality of life among breast cancer women under chemotherapy'', Iranian Journal of Nursing Research, 3: 55–65.

[159] Rouhani, P., Taghavinia, N. ve Rouhani, S., (2010). ''Rapid growth of hydroxyapatite nanoparticles using ultrasonic irradiation'', Ultrasonics Sonochemistry, 17: 853-856.

[160] Kim, W. ve Saito, F., (2001). ''Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H_3PO_4 solution with $Ca(OH)_2$'', Ultrasonics Sonochemistry, 8: 85-88.

[161] Myung, S.W., Ko, Y.M. ve Kim, B.H., (2013). ''Effect of plasma surface functionalization on preosteoblast cells spreading and adhesion on a biomimetic hydroxyapatite layer formed on a titanium surface'', Applied Surface Science, 287(15): 62-68.

[162] Du, K., Xudong ve S., Zhihua, G., (2013). ''Rapid Biomimetic Mineralization of Hydroxyapatite-g-PDLLA Hybrid Microspheres'', 29: 15293–15301

[163] Deng, Y., Zhao, X., Zhou, Y., Zhu, P., Zhang, L. ve Wei, S., (2013). ''In Vitro Growth of Bioactive Nanostructured Apatites via Agar-Gelatin Hybrid Hydrogel'', Journal of Biomedical Nanotechnology, 9: 1972-1983.

[164] Guha, A., Nayar, S. ve Thatoi, H.N., (2010). ''Microwave irradiation enhances kinetics of the biomimetic process of hydroxyapatite nanocomposites'', Bioinspiration & Biomimetics, 5: 5.

[165] Ghosh, S.K., Roy, S.K., Kundu, B., Datta, S. ve Basu, D., (2011). ''Ergonomics: A bridge between fundamentals and applied research'', Material Science Engineering, 15: 14-17.

[166] Sasikumar, S. ve Vijayaraghavan, R., (2008). ''Solution combustion synthesis of bioceramic calcium phosphates by single and mixed fuels—A comparative study'', Ceramics International, 34: 1373-1379.

[167] Ghosh, S.K., Prakash, A., Datta, S., Roy, S.K. ve Basu, D., (2010). ''Effect of fuel characteristics on synthesis of calcium hydroxyapatite by solution combustion route'', Bulletin of Materials Science, 33: 7–16.

[168] Sasikumar, S. ve Vijayaraghavan, R., (2010). ''Synthesis and Characterization of Bioceramic Calcium Phosphates by Rapid Combustion Synthesis'', Journal of Materials Science & Technology, 26: 1114-1118.

[169] Ghosh, S.K., Pal, S., Roy, S.K., Pal, S.K. ve Basu, D., (2010). ''Modelling of flame temperature of solution combustion synthesis of nanocrystalline calcium hydroxyapatite material and its parametric optimization'', Bulletin of Materials Science, 33: 339–350.

[170] Trommer, R., Santos, L. ve Bergmann, C., (2009). ''Nanostructured hydroxyapatite powders produced by a flame-based technique'', Materials Science and Engineering: C, 29: 1770-1775.

[171] Tas, A.C., (2000). ''Combustion synthesis of calcium phosphate bioceramic powders, Journal of the European Ceramic Society, 20: 2389-2394.

[172] Hasanpoor Dehkordi, A. ve Azari, S., (2006). ''Quality of life and related factor in cancer patients'', Behbood., 10: 110–119.

[173] An, G.H., Wang, H.J., Kim, B.H., Jeong, Y.G. ve Choa, Y.H., (2007). ''Fabrication and characterization of a hydroxyapatite nanopowder by ultrasonic spray pyrolysis with salt-assisted decomposition'', Materials Science and Engineering: A, 449–451: 821-824.

[174] Hwang, K.S., Jeon, K.O., Jeon, Y.S. ve Kim, B.H., ''Hydroxyapatite forming ability of electrostatic spray pyrolysis derived calcium phosphate nano powder'', Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18: 619–622.

[175] Carvalho, C., Santos, R.X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P.J., Santos, M.S. ve Moreira, P.I., (2009). ''Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect'', Curr Med Chem, 16: 3267–3285.

[176] Hilmer, S.N., Cogger, V.C., Muller, M. ve Le Couteur, D.G., (2004). ''The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin'', Drug Metabolism and Disposition, 32: 794–799.

[177] Zheng, Z., Pavlidis, P., Chua, S., Agati, V.D. ve Gharavi, A.G., (2006). '' An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse'', Journal of the American Society of Nephrology, 17: 1796– 1800.

[178] Wang, Y., Wang, Y.P., Tay, Y.C. ve Harris, D.C.H., (2000). ''Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events'', Kidney International, 58: 1797–1804.

[179] Rook, M., Lely, A.T., Kramer, A.B., Goor, H.V. ve Navis, G., (2005). ''Individual differences in renal ACE activity in healthy rats predict susceptibility to adriamycin induced renal damage'', Nephrology Dialysis Transplantation, 20: 59–64.

[180] Bertani, T., Cutillo, F., Zoja, C., Broggini, M. ve Remuzzi, G., (1986). ''Tubulo interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy'', Kidney International, 30: 488-496.

[181] Lal, S., Manajan, A., Ning, C.W. ve Chowbay, B., (2010). ''Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathways: a review'', Current Drug Metabolism, 11: 115-128.

[182] Buchholz, T.A., Stivers, D.N., Stec, J., Ayers, M., Clark, E., Bolt, A., Sahin, A., Symmans, W.F., Hess, K.R., Kuerer, H.M., Valero, V., Hortobagyi, G., Gabriel, N. ve Pusztai, L., (2002). ''Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer'', The Cancer Journal, 8: 461–468.

[183] Gewirtz, D.A., (1999). ''A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin'', Biochem Pharmacol, 57: 727– 741.

[184] Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. ve Gianni, L., (2004). ''Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity'', The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Pharmacological Reviews, 56: 185–229.

[185] Ashley, N. ve Poulton, J., (2009). ''Mitochondrial DNA is a direct target of anticancer anthracycline drugs'', Biochemical and Biophysical Research Communications, 378: 450-455.

[186] Hortobagyi, G., (1997). ''Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview'', Drugs, 54: 1–7.

[187] Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. ve Karliner, J.S., (2010). ''Doxorubicin cardiomyopathy'', Cardiology, 115: 155–162.

[188] Sakata, Y., Dong, J.W., Vallejo, J.G., Huang, C.H., Baker, J.S., Tracey, K.J., Tacheuchi, O., Akira, S. ve Mann, D.L., (2007). ''Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury'', American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology, 292: 503-509.

[189] Umlauf, J. ve Horky, M., (2002). ''Molecular biology of doxorubicin-induced cardiomyopathy'', Experimental Clinical Cardiology, 7(1): 35–39.

[190] Shi, Y., Moon, M., Dawood, S., McManus, B. ve Liu, P.P., (2011). ''Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity'', Herz, 36: 296–305.

[191] Kim, Y., Ma, A.G., Kitta, K., Fitch, S.N., Ikeda, T., Ihara, Y., Simon, A.R., Evans, T. ve Suzuki, Y.J., (2003). ''Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis'', Molecular Pharmacology, 63: 368-377.

[192] Park, A.M., Nagase, H., Liu, L., Kumar, S.V., Szwergold, N., Wong, C.M. ve Suzuki, J.M., (2011). ''Mechanism of anthracycline-mediated downregulation of GATA4 in the heart'', Cardiovascular Research, 90: 97–104.

[193] Liu, X., Chua, C.C., Gao, J., Zhongyi, C., Landy, C.L.C., Hamdy, R. Ve Chua, B.H.L., (2004). ''Pifithrin-alpha protects againstdoxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice'', American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 286: 933–939.

[194] Liu, J. Mao, W.Ding, B. andLiang, C., (2008). ''ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes'', American Journal Physiol Heart and Circulatory Physiology, 295: 1956–1965.

[195] Haskill, J.S., (1981). ''Adriamycin-activated macrophages as tumor growth inhibitors'', Cancer Research 41: 3852–3856.

[196] Bigotte, L. ve Olsson, Y., (1982). ''Cytofluorescence localization of adriamycin in the nervous system'', Acta Neuropathol, 58: 193–202.

[197] Tangpong, J., Cole, M.P., Sultana, R., Joshi, G., Estus, S., Vore, M., Clair, W.S., Ratanachaiyavong, S., Clair, D.K.S. ve Butterfield, D.A., (2006). ''Adriamycin-induced, TNF-a-mediated central nervous systemtoxicity'', Neurobiology of Disease, 23: 127-139.

[198] Jansen, C.E., Dodd, M.J., Miaskowski, C.A., Dowling, G.A. ve Kramer, J., (2008). ''Preliminary results of a longitudinal study of changes in cognitive function in breast cancer patients undergoing chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide'', Psychooncology: 17, 1189–1195.

[199] Collins, B., Mackenzie, J., Stewart, A., Bielajew, C. ve Verma, S., (2008). ''Cognitive effects of chemotherapy in post-menopausal breast cancer patients 1 year after treatment'', Psychooncology, 18: 134–143.

[200] Yang, X.L., Fan, C.H. ve Zhu, H.S., (2002). ''Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C60] fullerene derivatives and its mechanism'', Toxicology in Vitro, 16: 41-46.

[201] Park, E.S., Kim, S.D., Lee, M.H., Lee, H.S., Lee, I.S., Sung, J.K. ve Yoon, Y.S., (2003). ''Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats'', Journal of Veterinary Science, 4: 129-136.

[202] Okuda, S., Oh, Y., Tsuruda, H., Onoyama, K., Fujimi, S. ve Fujishima, M., (1986). ''Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease'', Kidney International, 29: 502–510.

[203] Peterson, C. ve Trouet, A., (1978). ''Transport and storage of daunorubicin and doxorubicin in cultured fibroblasts'', Cancer Research, 38: 4645–4649.

[204] Takanashi, S. ve Bachur, N.R., (1976). ''Adriamycin metabolism in man. Evidence from urinary metabolites'', Drug Metabolism and Disposition, 4(1): 79–87.

[205] Cummings, J. ve McArdle, C.S., (1986). ''Studies on the in vivo disposition of adriamycin in human tumours which exhibit different responses to the drug'', British Journal of Cancer, 53(6): 835–838.

[206] Asbell, M.A., Schwartzbach, E., Bullock, F.J. ve Yesaır, D.W., (1972). ''Daunomycin and adriamycin metabolism via reductive glycosidic cleavage'', The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 182: 63-69

[207] Saki, A., Hajizadeh, E. ve Tehranian, N., (2011). ''Evaluating the Risk Factors of Breast Cancer Using the Analysis of Tree Models'', Ofogh-e-Danesh. Journal of Gonabad University of Medical Sciences, 17: 60–69.

[208] Safaee, A., Zeighami, B., Tabatabaee, H.R. ve Moghimi Dehkordi, B., (2008). ''Quality of life and Related Factors in Breast Cancer Patients under Chemotherapy'', Iranian Journal of Epidemiology, 3: 61–66.

[209] McPherson, K., Steel, C.M. ve Dixon, J.M., (2000). ''ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics'', British Journal Medical, 321: 624–628.

[210] Lynch, H.T., Watson, P. ve Conway, T.A., (1990). ''Clinical/ genetic features in hereditary breast cancer'', Breast Cancer Research Treat., 15: 63–71.

[211] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. ve Thun, M.J., (2009). ''Cancer statistics'', CA Cancer Journal Clinical, 59, 225–249.

[212] Heravi Karimovi, M., Pourdehqan, M., Jadid Milani, M., Foroutan, S.K. ve Aieen, F., (2006). ''Study of the effects of group counseling on quality of sexual life of patients with breast cancer under chemotherapy at Imam Khomeini Hospital'', Journal of Mazandaran Univ Medicine Science, 16: 43–51.

[213] Sariego, J., (2010). ''Breast cancer in the young patient'', Am Surg. 76: 1397–1400.

[214] Steiner, E. ve Klubert, D., (2008). ''Assessing Breast Cancer Risk in Women'', Am Fam Physician, 78: 1361–1366.

[215] Yager, J.D. ve Davidson, N.E., (2006). ''Estrogen carcinogenesis in breast cancer'', The New England Journal of Medicine, 354: 270–282.

[216] Venturi, S., (2001). ''Is there a role for iodine in breast diseases?'', Breast., 10: 379–382.

[217] Aceves, C., Anguiano, B. ve Delgado, G., (2005). ''Is iodinea gatekeeper of the integrity of the mammary gland?'', Journal of Mammary Gland Biological Neoplasia., 10: 189–196.

[218] Stoddard, F.R., Brooks, A.D., Eskin, B.A. ve Johannes, G.J., ''Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: evidence for an anti-estrogen effect of iodine'', International Journal of Medicine Science, 5: 189–196.

[219] Labrecque, L.G., Barnes, D.M., Fentiman, I.S. ve Griffin, B.E., (1995). ‘’Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study’’, Cancer Research, 55: 39–45.

[220] Glaser, S.L., Hsu, J.L., Gulley ve M.L., (2004). ‘’Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis’’, Cancer Epidemiology, Biomarkers and Preventation, 13: 688–697.

[221] Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H. ve Brody, L.C., (2002). ‘’BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage’’, Nature Genetics, 30: 265–269.

[222] Kumar, V., Abbas, A.K. ve Fausto, N., (2004). ‘’Robbins and Cortran Pathologic Basis of Disease, Seventh Edition;82–85, Philadelphia: Saunders.

[223] Malone, K.E., Dalling, J.R., Thompson, J.D., Obrien, C.A., Francisco, L.V. ve Ostrander, E.A., (1998). ‘’BRCA1 mutation and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history’’, JAMA, 297(12): 922–929.

[224] Victor, S.P., Paul, W., Jayabalana, M. ve Sharma, C.P., (2014). ‘’ Supramolecular hydroxyapatite complexes as theranostic near-infrared luminescent drug carriers’’, CrystEngComm, 16: 9033.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Reyhan YANIKOĞLU

Doğum Tarihi ve Yeri : 20/01/1991

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : reyhanyanikoglu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2018
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Fen	Bolu Abant Lisesi (YDAL)	2008

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2016	Spinamer Sağlık Ürünleri	Arge Mühendisi

YAYINLARI

Bildiri

1. Yanikoglu, R., Çiftçi, F. ve Üstündağ, C.B., (2017). ‘’Ortopedi ve Travmatolojide Kullanılan Nanokompozitler’’, V. Ulusal Nanoteknoloji Kongresi, 9-10 Mart 2017, İstanbul.

2. Çiftçi, F., Özder, M.N., Yanikoglu, R., Cevizci, R. ve Üstündağ, C.B., (2017). ‘’Kulak Burun Boğaz Cerrahisinde Kullanılan Nanokompozit Biyomalzemeler’’, V. Ulusal Nanoteknoloji Kongresi, 9-10 Mart 2017, İstanbul.

3. Yanikoglu, R., Çiftçi, F. veÜstündağ, C.B., (2018). ‘’Kanser Tedavisi için İlaç Yüklü Nano Hidroksiapatit İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi’’, 6. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, 5-6 Nisan 2018, İstanbul.

4. Yanikoglu, R. ve Üstündağ, C.B., (2017). ‘’Ortopedi Ve Travmatolojide Kullanılan İlaç Yüklü Nanokompozitler’’, IVEK 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26-29 Nisan 2017, İstanbul.

5. Hacioglu, A., Çiftçi, F., Yanikoglu, R., Yeşil, T.B. veÜstündağ, C.B., (2018). **‘’**3D Printed Implantable Hydrogel Drug Design for Schizophrenia’’, 3rd International Congress on 3D Printing Technologies and Digital Industry, 19-21 Nisan 2018, Antalya.

Proje

1. Kanser Tedavisi İçin İlaç Yüklü Nnao Hidroksiapatit İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi, YTÜ-BAP, 2017-2018.