

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PMMA KAPLANMIŞ SÜPERPARAMANYETİK NANOPARÇACIKLARIN
KEMOTERAPİ İLAÇLARI İLE YÜKLENMESİ VE İNSAN KARACİĞER
HÜCRELERİ (Hep3B) ÜZERİNDE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Tuğşen AYDEMİR

Balıkesir, Ocak-2011

**Bu tez 2010-17 no'lu
Balıkesir Üniversitesi Araştırma Projesi
tarafından desteklenmiştir.**

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PMMA KAPLANMIŞ SÜPERPARAMANYETİK NANOPARÇACIKLARIN
KEMOTERAPİ İLAÇLARI İLE YÜKLENMESİ VE İNSAN KARACİĞER
HÜCRELERİ (Hep3B) ÜZERİNDE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Tuğşen AYDEMİR

Tez Danışmanları: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Sınav Tarihi: 24 Ocak 2011

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (Danışman-BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı
oturumunun nolu kararı ile mezun olmuştur.

Balıkesir, Ocak-2011

ÖZET

PMMA KAPLANMIŞ SÜPERPARAMANYETİK NANOPARÇACIKLARIN KEMOTERAPİ İLAÇLARI İLE YÜKLENMESİ VE İNSAN KARACİĞER HÜCRELERİ (Hep3B) ÜZERİNDE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe Tuğşen AYDEMİR

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

**(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanları: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR,
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM)**

Balıkesir, 2011

Kanser insan sağlığı için daima önemli bir tehdit oluşturmuştur. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanlar normal hücrelere de zarar verebilmektedir. Günümüzde en fazla dikkati çeken alan nanoteknolojik yöntemlerle kemoterapik ilaçların taşınması ve yan etkilerinin azaltılmasıdır. Nanoteknoloji yöntemleri ile nanoparçacıklar kullanılarak ilaçların veya proteinlerin kararlılıklarında artış sağlanmakla birlikte, hedef bölgede kontrollü ilaç salınımı da amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada, Süper Paramanyetik Polimetilmetakrilat (PMMA) lateksin potansiyel ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmamızın konusunu oluşturan, Polimetilmetakrilat (PMMA) lateksin sentezi sırasında Superparamanyetik parçacıklar eklenmiş ve yapısal ve manyetik karakterizasyonları yapılmış olan SP-PMMA nanoparçacıklara model ilaç olarak Cisplatin™ yüklenmiştir. Yüklenen ilaç etkinliği spektroskopik ve yapısal FT-IR analizi ile belirlenmiştir.

SP-PMMA, Cisplatin™ ile üç farklı metotla yüklenmiştir. Bunlar arasında, hidroksilleme ile yapılan yüklemede yaklaşık %30 oranında yüklenme tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan PMMA ve SP-PMMA ve Cisplatin™ ayrı ayrı HEP3B hücreleri üzerine etkisi farklı konsantrasyonlarda ve zaman aralıklarında yapılmıştır. PMMA ve SP-PMMA'nın biyoyumlu olduğu tespit edilmiştir. Hidroksilleme metodu ile Cisplatin™ yüklenmiş SP-PMMA'nın insan hepatoma hücre hattı olan Hep3B hücrelerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. İlaç yüklü SP-PMMA'nın da kontrol olarak seçilen Cisplatin™ uygulamasına göre doza bağımlı olarak sitotoksikite gösterdiği ve 72 saatlik zaman diliminde daha fazla sitotoksikiteye neden olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: süperparamanyetik lateks, Hep3B hücre hattı, ilaç yüklenmesi, MTT tekniği.

ABSTRACT

LOADING OF SUPERPARAMAGNETIC PMMA (SP-PMMA) LATEXES BY CHEMOTHERAPIC DRUGS AND DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS ON HUMAN HEPATOMA CELL LINES (Hep3B)

Ayşe Tuğşen AYDEMİR

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

**(Master Thesis / Supervisors: Associate.Prof.Dr. Feray Köçkar,
Assistant Prof.Dr. Hatice YILDIRIM)**

Balikesir-Turkey, 2011

Cancer has always been a threat to the health of human beings. The most common treatment of tumors is the administration of suitable chemotherapeutic agents. However, chemotherapy can also damage normal cells. Although there is a great effort to reduce the side-effects of chemotherapy, nanoparticles are the most focusing area. Nanoparticles are as important as they are offering advantages of increase in stability of drugs or proteins and controlled release of the drugs in the corresponding region.

In this work, superparamagnetic poly(methyl methacrylate) (PMMA) latex was tested for using as a potential drug carrier system. A novel method, loading magnetite nanoparticles to PMMA latex during the polymerization process, was used for sythesis of superparamagnetic PMMA (SP-PMMA) latexes. After the physical, chemical and magnetic characterizations were done for SP-PMMA, Cisplatin™ was used as a model drug. SP-PMMA was loaded with Cisplatin™ using different methods and drug loading efficiency was determined by spectroscopically and FTIR analysis.

SP-PMMA was loaded with Cisplatin™ by three different methods. From this methods, approximately 30% drug loading efficiency was determined by the hydroxylation method. Also the cytotoxic effects of PMMA, SP-PMMA, Cisplatin™ and drug loaded SP-PMMA were evaluated using human hepatoma cell lines, Hep3B. It was defined that PMMA and SP-PMMA are biocompatible with Hep3B cell line. The cytotoxic effects of Cisplatin™ loaded SP-PMMA on human hepatoma cell lines was also studied. Compared to the control groups, it was seen that the loaded SP-PMMA is effective due to the drug consantration and is more effective for 72 hours.

Keywords: superparamagnetic latex, Hep3B cells, drug loading, MTT assay.

İÇİNDEKİLER

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER.....	ii
ABSTRACT, KEY WORDS.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SEMBOL LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. Giriş.....	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Hücre Döngüsü ve Kanser.....	5
1.3. Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler.....	8
1.3.1. Cerrahi Müdahale.....	9
1.3.2. Radyoterapi.....	10
1.3.3. Modern Tedavi Yöntemleri.....	10
1.3.4. Kemoterapi.....	11
1.3.4.1. 5-fluorouracil (5FU).....	13
1.3.4.2. Cisplatin™.....	14
1.4. Nanoparçacıklar ve İlaç Taşınım Sistemleri.....	15
1.4.1 Polimetilmetakrilat (PMMA) Lateks.....	16
1.4.2 Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacıklar.....	17
1.5. Amaç.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.1. Kimyasallar.....	20
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	20
2.2. Yöntem.....	22
2.2.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu.....	22
2.2.2. Hücre Kültürü Deneyleri.....	22
2.2.2.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı.....	22
2.2.2.1.a. Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması.....	22
2.2.2.1.b. Fetal Calf Serum (FCS) Hazırlanması.....	22
2.2.2.1.c. Phosphate Buffered Saline (PBS) Tampon Çözeltilisinin Hazırlanması.....	23
2.2.2.1.d. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	23
2.2.2.1.e. İsoopropanol Çözücü Solüsyonunun Hazırlanması.....	23
2.2.3. Hücre Kültürü Teknikleri.....	23
2.2.3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları.....	23
2.2.3.2. Hücre Soyunun Başlatılması.....	24
2.2.3.3. Hücrelerin Büyütülmesi.....	24
2.2.3.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	24
2.2.3.5. Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı.....	25

2.2.3.6. Hücrelerin –80°C'de Saklanması.....	26
2.2.4. Sitotoksisite Deneylerinin Kurulması.....	26
2.2.4.1. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Testi.....	27
2.2.5. Nanoteknolojik Çalışmalar.....	28
2.2.5.1. Çalışmada Kullanılan Nanoparçacıklar (PMMA ve SP-PMMA).....	28
2.2.5.2. Yüklemelerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	29
2.2.5.3. 5Flurourasil ile Yüklenme.....	29
2.2.5.4. Cisplatin™ ile Yüklenme.....	29
2.2.5.4.a. İnkübasyon ile Yükleme.....	29
2.2.5.4.b. İmmobilizasyon Tekniği ile Yükleme.....	30
2.2.5.4.c. Hidroksilleme Tekniği ile Yükleme.....	30
2.2.5.5. Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması.....	30
2.2.5.6. İlaç Yüklemelerinin Hesaplanması.....	31
2.2.5.7. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) Spektrofotometre.....	31
2.2.6. Yüklenmiş Nanoparçacıkların Sitotoksisite Çalışmaları.....	31
2.2.7. İstatistiki analizler.....	32
3. BULGULAR.....	33
3.1. 5Fluorouracil (5FU) ile Yapılan Sitotoksisite ve İlaçla Yükleme Çalışmaları.....	34
3.1.1. 5Fluorouracil (5FU)'nun Sitotoksik Etkileri.....	34
3.1.2. 5Fluorouracil (5FU) ile Polimetilmetakrilat (PMMA) ve Süper Paramanyetik Polimetilmetakrilat (SP-PMMA) Nanoparçacıklarının Yüklenmesi (İnkübasyon İle Yükleme).....	35
3.2. Cisplatin™ Sitotoksisite ve İlaçla Yükleme Çalışmaları.....	36
3.2.1. Cisplatin™ ve Nanoparçacıkların (Polimetilmetakrilat (PMMA) ve Süper Paramanyetik Polimetilmetakrilat (SP-PMMA)) Sitotoksik Etkileri.....	36
3.2.2. Cisplatin™ ile Polimetilmetakrilat (PMMA) ve Süper Paramanyetik Polimetilmetakrilat (SP-PMMA) Nanoparçacıklarının Yüklenmesi.....	39
3.2.2.1. İnkübasyon ile Yükleme.....	40
3.2.2.2. İmmobilizasyon Tekniği ile Yükleme.....	41
3.2.2.3. Hidroksilleme ile Yükleme.....	43
3.2.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) Spektrofotometre Sonuçları.....	45
3.3. Yüklenmiş Nanoparçacıkların Sitotoksisite Çalışmaları.....	45
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	47
KAYNAKLAR.....	53

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
UV	: Ultra Viyole
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDI	: Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
IC ₅₀	: %50 İnhibe eden konsantrasyon
dH ₂ O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
FCS	: Fetal Calf Serum
PBS	: Dulbecco's phosphate-buffered saline
MTT	: 3 - (4, 5 – dimethylthiazolyl – 2) - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide
Hep3B	: Karaciğer kanserli hücre hattı
rpm	: Dakikada dönme sayısı
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
Cisplatin™	: Klinikte kullanılan ticari cisplatin
5FU	: 5Fluorouracil
PMMA	: Polimetilmetakrilat
SP-PMMA	: Süperparamanyetik Polimetilmetakrilat
NaOH	: Sodyum Hidroksit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Hücre döngüsünün fazları	6
Şekil 1.2	Kanser olgularında hastalığın teşhisi ve tedavisinde izlenen yol	9
Şekil 1.3	5-fluorouracil(5FU)'nun kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.4	Cisplatin™'in kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.5	(A) Guanin ile cisplatinin şelatlaşması (B) Cisplatin-DNA ve cisplatin-protein bağlanması. (C) Cisplatin-DNA zincir içi çarpaz bağları (D) Cisplatin-DNA zincirlerarası çarpaz bağları.....	15
Şekil 2.1	Karaciğer kanserli hücre hattının (Hep3B hücrelerinin) mikroskop görüntüsü (M.B:40x10).....	24
Şekil 2.2	Hemositometre.....	25
Şekil 2.3	MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.....	27
Şekil 2.4	Boncukların transmisyon elektron mikroskobu (High-resolution transmission electron microscopy, HRTEM) fotoğrafları ile gösterilen iç yapıları.....	28
Şekil 3.1	Tezle ilgili çalışmalarda izlenen yolun şematik gösterimi.	33
Şekil 3.2	5FU'nun MTT uygulaması sonrası konsantrasyona bağlı % inhibisyon grafikleri (6, 24 ve 48 saat için).....	34
Şekil 3.3	5FU'nun 6 farklı konsantrasyonuna göre kalibrasyon eğrisi. (OD=327nm).....	35
Şekil 3.4	Cisplatin™'in Hep3B hücrelerindeki etkilerinin gösterildiği zamana bağlı absorpsiyon grafiği. (OD=550nm).....	37
Şekil 3.5	Hep3B hücreleri üzerinde Cisplatin™'in oluşturduğu % hücre canlılıklarının zamana bağlı grafiği.....	37
Şekil 3.6	PMMA polimerinin uygulanmış hücrelerdeki MTT sonuçlarına göre zamana bağlı absorpsiyon değerleri. (OD=550nm).....	38
Şekil 3.7	7 SP- PMMA polimerinin uygulanmış hücrelerdeki MTT sonuçlarına göre zamana bağlı absorpsiyon değerleri. (OD=550nm).....	39
Şekil 3.8	Cisplatin™'in 5 farklı konsantrasyonu için kalibrasyon eğrisinin oluşturulması (OD=210 nm.).....	39
Şekil 3.9	Cisplatin™'in üç farklı hacimde (µl) PMMA latekse bağlanma % oranlarının grafiği.....	44
Şekil 3.10	Cisplatin™'in üç farklı hacimde (µl) SP-PMMA latekse bağlanma % oranlarının grafiği.....	44
Şekil 3.11	FT-IR Spektrofotometrisinde Cisplatin™ yüklemesinin gösterilmesi.....	45
Şekil 3.12	Cisplatin™ ile yüklenmiş SP-PMMA nanoparçacıklarının konsantrasyona bağlı absorpsiyon grafiği. (OD= 550nm).	46

TABLO LİSTESİ

Tablo Numarası	Adı	Sayfa
Tablo 1.1	Türkiye'de yıllara göre ölüm nedenleri (1999-2003)...	4
Tablo 1.2	Türkiye'de kadınlarda görülen kanser olgularının görüldüğü organa göre dağılımı (%), (2000).....	4
Tablo 1.3	Türkiye'de erkeklerde görülen kanser olgularının görüldüğü organa göre dağılımı (%), (2000).....	5
Tablo 1.4	Kanserin yaş gruplarına göre dağılımı (2005).....	5
Tablo 2.1	Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri.....	20
Tablo 3.1	İnkübasyon tekniği ile yüklemiş PMMA ve SP-PMMA'nın % yüklenme oranları.....	40
Tablo 3.2	Yıkamalar sonunda süpernatanttan alınan absorbanslar (OD= 210 nm).....	41
Tablo 3.3	İmmobilizasyon tekniği ile yapılan yüklemelerin absorbans değerleri (OD= 210 nm.).....	42
Tablo 3.4	İmmobilizasyon tekniği ile yapılan kontrol yüklemelerinin absorbans değerleri (OD= 210 nm.)..	42
Tablo 3.5	Hidroksilleme tekniği ile elde edilen % yükleme oranları. Yüklemeler dört defa tekrarlanmıştır.....	43

ÖNSÖZ

Hayatım boyunca takdir ve minnetle anacağım, bana sevgisini ve güvenini her zaman hissettiren değerli hocam Doç.Dr.Feray KÖÇKAR'a,

Yine sevgisini ve desteğini esirgemeyen, ayrıca bana olağanüstü tahammül göstererek kendisine hayran bırakan, yüreği sevgi dolu, çok sevdiğim kıymetli eş danışmanım Yrd.Doç.Dr. Hatice YILDIRIM'a,

Değerli hocam Feray KÖÇKAR' ın sonsuz sevgisi ve bilgisiyle oluşturduğu, eşi benzeri hiç bir yerde görülmemiş/görülemez, dost, çalışkan, mutlu FK GRUBU'nun sevgili mensupları; değerli hocalarım Yrd.Doç.Dr. Bahar SUNAY, Dr. Ayla AVCIKURT, Yrd.Doç.Dr. Elif SAVAŞ, Arş.Gör. Sümeyye AYDOĞAN, Arş.Gör. Meltem AYDIN, ve çok sevgili arkadaşlarım Esra TOKAY, Derya OKUYAN, Gülinay SELÇUK'a ve aynı zamanda ev arkadaşım, dostum İlknur PEKTAŞ'a,

Çalışmada kullanılan PMMA ve SP-PMMA lateksler Balıkesir Üniversitesi Kimya bölümünde Yrd. Doç. Dr. Taner TANRISEVER ve Yrd. Doç. Dr. Seda CAN BEYAZ tarafından sentezlenmiş; kimyasal ve manyetik analizleri Balıkesir Üniversitesi Fizik bölümünde Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR tarafından yapılmıştır.

Her zaman hatırladığım ve andığım, lise yıllarımda hayalini kurduğum bu mesleğe beni üniversite öncesinde hazırlayan, pozitif enerjisiyle hücrelerimi canlandıran, sevgili Biyoloji hocam Havva EKŞİ BÜKEN'e,

"İmdat!" dediğim her an yanımda olan, tezimde sözel bilgisi ile bana büyük desteği olan değerli arkadaşım Burcu SERTKAYA'ya,

Balıkesir'deki 7 senelik yaşantım boyunca mırıltılarıyla, her gün bana huzur veren miskin kedim Çeper'e,

Anne ve babamın yokluğunda, bana hem annelik hem babalık yapan sevgili abim Aykut AYDEMİR'e,

Okyanus ötesinden desteklerini esirgemeyen sevgili ailem;

Genlerinin bir çoğunu acımadan bana aktaran, yaşamım boyunca hep yanımda bana destek olan, yaşama tutunmamı sağlayan, psikoloğum güzel annem Neslihan AYDEMİR'e,

Çalışma disiplini, okuma azmini örnek aldığım, dünyada bir eşinin daha olmadığını bildiğim canım babam Niyazi AYDEMİR'e, ayrıca hala bıkmadan verdiği maddi destekler için de sonsuz teşekkür ederim.

Başarılı ve faydalı olduğuna inandığım bu çalışmanın verdiği mutluluğu ve gururu, teşekkürü borç bildiğim bütün bu güzel insanlarla paylaşıyorum. Bundan sonraki çalışmalarım da yanımda olmalarını diliyorum.

Ocak 2011

Ayşe Tuğşen AYDEMİR

1. GİRİŞ

1.1 Kanser

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üremesi ve çoğu zaman komşu dokuları işgal etmesi sonucu oluşur. Kanser, dünyada bilinen ölüm nedenlerinin ilk sıralarında yer almaktadır. Günümüzde, insanların beşte biri kanser yüzünden hayatını kaybetmektedir [1]. Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir.

Kanser, sadece tek bir hastalık olmayıp, ortak özelliklere sahip 200'den fazla hastalık için kullanılan genel bir terimdir. Kanser, hücresel kontrolün ve normal gelişim mekanizmasının azalması veya tamamen kaybolması ile karakterizedir [2].

Kanser, bir hücrede sürekli meydana gelen moleküler değişimlerin birikimi sonucu oluşur. Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen değişimler kanserin oluşumunda büyük rol oynarlar. Geçtiğimiz yıllarda, çok sayıda proto-onkogen ve tümör baskılayıcı gen bulunmuştur. Oldukça fazla sayıda gen keşfedilmiş olmasına rağmen halen kanserojen özellikte veya tümör baskılayıcı aktiviteye sahip genler keşfedilmeye çalışılmaktadır [3].

Teorik olarak çekirdeği olan her hücre çoğalabilme kabiliyetinde ise de vücudumuzdaki hücreler çoğalma özelliklerinden dolayı üç ana gruba ayrılırlar. Birincisi; kök hücreler, kemik iliği ve gastrointestinal sistemin epitel hücreleri gibi sürekli ama kontrollü bir şekilde kendini yenileyen hücreler, ikincisi; karaciğer, periferik lenfosit ve makrofajlar gibi uyarıldığı zaman

çoğalan hücreler, son grup ise; sinir sistemi ve gözün bazı hücrelerinde olduğu gibi yaşam boyu bir kez çoğalan hücrelerdir [4,5].

Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuçta hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik (aşırı hücre birikimi), hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından dolayıdır [6].

Kanser hücreleri, çok hücreli organizmalarda oluşturulmuş ve yerleşmiş olan tüm hücresel davranışların en temel kurallarını yıkarlar ve bu kuralları yıkabilmek için her türlü imkandan faydalanırlar. Kanser hücrelerinin iki kalıtsal özelliği bulunmaktadır: (1) Kanser hücreleri hücre büyüme ve bölünmesindeki normal baskılanmaya karşı koyar ve ürerler. (2) Kanser hücreleri diğer hücreler için ayrılmış olan bölgeleri işgal eder ve bu bölgelerde kolonileşirler [1].

Hücre biyolojisi alanında birçok temel araştırma kanserle mücadeleye fayda sağlamıştır. Proteinlerin fonksiyonlarındaki anormallikler kontrolsüz büyümeye, bölünmede artışa, hücre ölümlerinde azalmaya veya kanser hücrelerinin başka anormal özelliklerine neden olacağından, birçok yeni protein keşfedilmiştir. Bunların arasında, DNA tamirinde, hücre sel sinyallerde, hücre döngüsünde ve hücre büyümesinde, apoptosiste ve doku oluşumunda görev alan proteinler bulunmaktadır [1].

Kanserin teşhisi yalnızca ne tip bir tümör oluşturduğıyla değil aynı zamanda yayılma şekli ve tedaviye gösterdiği hassasiyetle de belirlenir. Tümör hücreleri sadece çevrelerindeki dokulara yayılmazlar aynı zamanda lenf sistemi ve kan dolaşımı yoluyla vücudun diğer bölgelerine de yayılarak "metastaz" yapabilmektedirler. Normal hücre kontrol mekanizması zarar görür yada tamamen bozulur. Kanser hücrelerinin mikroskopik olarak yayılmalarından dolayı, cerrahi olarak tümörün vücuttan uzaklaştırılması, her zaman başarılı sonuç vermemektedir. Malign tümörler genelde şekil olarak

tam tanımlanmamış sınırlara sahiptirler. Mikroskobik yayılma, dokuda hastalıktan etkilenmemiş gözükken bölgenin de çevrenmesi ile sonlanır. Her ne kadar patolojik incelenmesi sonucu malign tümörün varlığı tespit edilip, vücuttan uzaklaştırılsa da, kalan tek bir hücre bile yeniden kanser oluşabilmekte ve muhtemelen yeniden yayılabilmektedir. Genellikle, kanser ne kadar erken teşhis edilirse, metaztas oluşturma riski o kadar azalır ve hastalığın ilerleyişi hastanın lehine gelişir [2].

Dünyada her yıl 12 milyon kişiye kanser tanısı konuyor ve 7.6 milyon kişi kanserden yaşamını yitiriyor. Önlem alınmazsa dünya genelinde 2030'da 26 milyon yeni kanser vakasına ve 17 milyon ölüme ulaşılacağı tahmin ediliyor.

2004 yılında yayınlanan istatistiklere göre Türkiye'de sebebi bilinen ölüm nedenleri arasında kanser 2000 yılında %13.6 ile 2003 yılında ise %12.9 ile ikinci sırada yer almıştır (Tablo 1.1).

Cinsiyete göre değerlendirildiğinde, 2000 yılında kadınlarda %24.96 ile en fazla görülen kanser türü meme kanseridir (Tablo 1.2). Erkeklerde ise, %26.96 ile akciğer kanseri birinci sırada yer almaktadır (Tablo 1.3).

Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde kansere yakalanma oranı kadın ve erkeklerde özellikle 45'li yaşlardan sonra artış göstermektedir (Tablo 1.4).

Tablo 1.1 Türkiye'de yıllara göre ölüm nedenleri (1999-2003) [7].

Ölüm Nedenleri	2000		2003	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Dolaşım Sistemi Hastalıkları	78.666	45.1	89.077	48.3
Kanserler	23.681	13.6	23.775	12.9
İyi Tanımlanmayan Haller	17.025	9.8	17.815	9.7
Perinatal Mortalite	7.336	4.2	6.433	3.5
Enfeksiyon Hastalıkları	5.516	3.2	5.595	3.0
Kazalar	6.267	3.6	4.095	2.2
Konjenital Anomaliler	3.496	2.0	2.673	1.5
Endokrin Hastalıklar	3.757	2.2	2.389	1.3
Sindirim Sistemi Hastalıkları	2.877	1.7	2.163	1.2
İntihar ve Benzeri Durumlar	1.574	0.9	1.863	1.0
Solunum Sistemi Hastalıkları	2.754	1.6	1.642	0.9
Dış Sebepler	464	0.3	544	0.3
Sinir Sistemi Hastalıkları	349	0.2	178	0.1
Hemopoetik Sistem Hastalıkları	161	0.1	108	0.1
Ürogenital Sistem hastalıkları	78	0.0	62	0.0
Diğer	20.297	11.6	25.917	14.1
TOPLAM	174.315	100.0	184.330	100.0

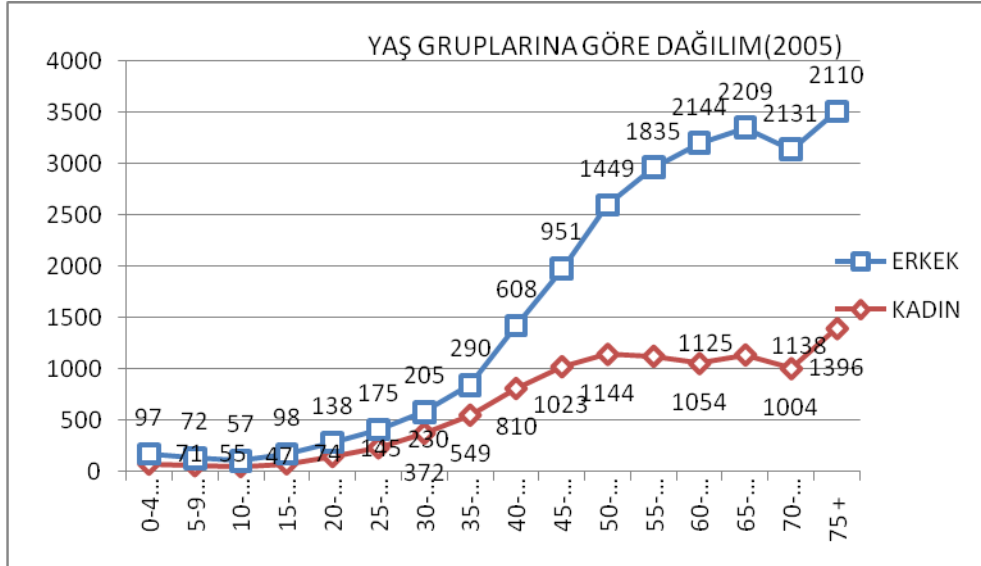
Tablo 1.2 Türkiye'de kadınlarda görülen kanser olgularının görüldüğü organa göre dağılımı (%), (2000) [8].

Organlar	Sayı	Yüzde(%)
Meme	3.354	24.96
Mide	836	6.22
Deri	797	5.93
Akciğer	692	5.15
Yumurtalık	634	4.72
Kolon	572	4.26
Beyin	536	3.99
Endometriyum	432	3.22
Serviks	417	3.10
Rektum	417	3.10
Diğerleri	4.750	35.35
TOPLAM	13437	100.0

Tablo 1.3 Türkiye’de erkeklerde görülen kanser olgularının görüldüğü organa göre dağılımı (%), (2000) [8].

Organlar	Sayı	Yüzde(%)
Akciğer	5.387	26.96
Mide	1.493	7.47
Mesane	1.359	6.80
Prostat	1.152	5.77
Larenks	1.086	5.43
Deri	1.035	5.18
Beyin	754	3.77
Kolon	737	3.69
Rektum	660	3.30
Kemik iliği	646	3.23
Diğerleri	5.673	28.39
TOPLAM	19.982	100.0

Tablo 1.4 Kanserın yaş gruplarına göre dağılımı (2005) [9].



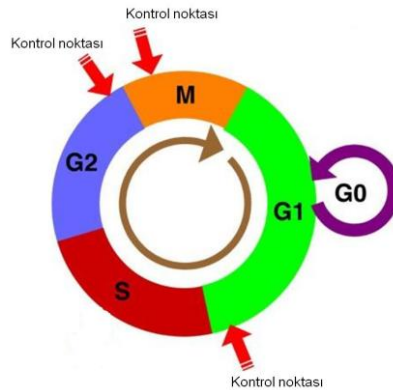
1.2 Hücre Döngüsü ve Kanser

Hücre çoğalması ve hücre döngüsünün ilerlemesi büyümenin kontrolünde rolü olan genlerin ekspresyonu ile bağlantılıdır. Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyacına göre belirlenir.

Azalmış hücre çoğalması veya artmış ölüm hızı herhangi bir aşırı artışı önler. Ökaryot hücre döngüsü Mitoz (M), Gap1 (G₁), Sentez (S) ve Gap2 (G₂) fazlarından oluşmaktadır. Şekil 1.1'de gösterildiği gibi hücre döngüsünde G₁–S geçişinde, G₂–M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Hücre döngüsü siklin bağımlı kinazlar (cdk, katalitik altbirim) ve siklin (cyc, düzenleyici altbirim) proteinleri tarafından kontrol edilmektedir. Hücre homeostazisi hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis ile sürdürülmektedir. Hücre döngüsünün düzenlenmesindeki hatalar hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasına neden olur.

Hücre döngüsünde birbirini takip eden olaylar ve kontrol eden etkileşimler çok sayıda ve komplekstir. Tümör baskılayıcı fonksiyonun ve programlı hücre ölüm yollarının anlaşılması yönünde ilerlemeler olmasının yanı sıra çözümlenmemiş çok sayıda soru vardır. Kemoterapi için hücre döngüsü kontrol noktaları büyük potansiyele sahip hedeflerdir. Kemoterapi ve radyoterapi sonrası kanser hücrelerinin yaşaması onarım yollarındaki hasarlara bağlı olabilir. Hücre döngüsü kontrol noktalarında ve DNA onarım yollarındaki moleküler bileşenlerin daha iyi anlaşılması için *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar klinik çalışmalarla da desteklenmelidir [10].

Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre döngüsüne özgü proteinler hücre döngüsü boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilirler.



Şekil 1.1 Hücre döngüsünün fazları [11].

G_0 fazında, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar. G_1 fazında, spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve ribo nükleik asit (RNA) sentezlenir. Geç G_1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir. S fazında hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır. G_2 fazında DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik "iğ iplikleri"nin mikrotübüler öncülleri üretilir. M fazında protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozu takiben oluşan yeni hücreler ya G_0 ya da G_1 fazına girerler.

Hücre döngüsünün çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinler bulunmaktadır. Bunlara siklinler denilmektedir. Hücre döngüsünde çeşitli fazlarda çeşitli siklinler sentezlenir ve düzeyleri senkronize bir şekilde döngünün çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar.

Bölünme yeteneğine sahip çoğu normal hücre büyüme faktörleri, bazı hormonlar ve hücre yüzey reseptörlerini etkileyen diğer uyarılara karşı yanıt olarak bölünür. Bu hücre yüzey reseptörleri alınan sinyali iletir ve hücre bölünür. Tirozin kinazlar, hücre dışı büyüme faktörlerinden nükleusa kadar olan bir kaskad şeklinde ilerleyen proliferatif sinyal sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Siklinler, kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktive ederler, ve etkilerini düzenlerler. Normal hücre popülasyonunun küçük bir miktarı ölümsüz (sınırsız sayıda çoğalabilen), hücrelerdir. Bu hücreler organizmanın diğer kısımlarından gelen sinyallerin etkisiyle kendilerini yenileyebilirler. Ayrıca bu hücreler organizmanın gerekli fonksiyonlarını görmek üzere farklılaşabilen yeni hücreler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Sadece bir kaç doku tipi farklılaşmasına rağmen, çoğu hücre tipi farklılaşırken canlılıklarını kaybederler, yaşlanıp istirahat fazına girerler, ve sonunda ölürlürl.

Ökaryotlarda aşağıdaki gibi 4 hücre populasyonu bulunur.

- Eşey hücreleri: Sınırsız sayıda çoğalabilme yetenekleri vardır. Bunun nedeni olasılıkla, mayozla bölünmeleridir. Kansere hücrelerinin aksine, bu hücreler ölümsüz hücre dizisi oluşturmak üzere mayoz bölünmeye girmelidirler.
- Kök hücreleri: İki işlevleri vardır, birincisi, tekrar oluşmak ve ikincisi ise diferansiye olmak ve böylece organizma için gerekli özgün işlevleri yerine getirmek. Kansere hücrelerinin aksine, bu hücrelerin tekrar oluşmak üzere girdikleri döngü sayısı sınırlıdır.
- Kısmen farklılaşmış hücreler: Bunlar da sınırlı sayıda çoğalma kapasitesine sahiptir ve kendilerinden oluşan yeni hücreler sonunda tam farklılaşma ve çoğalma yeteneği olmayan hücreler haline gelirler.
- Tam olgunlaşmış özelleşmiş hücreler: Bunlar bir daha çoğalamazlar [6].

1.3 Kansere Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

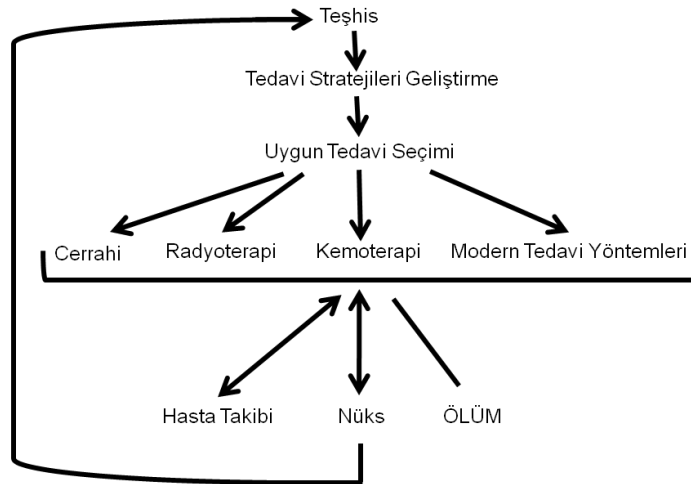
Her hastalıkta olduğu gibi kansere tedavisinde de en önemli önlem ve tedavi bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesidir. Bunun yanında hastalığın erken tanısı da kansere tedavisinde başarı oranını arttırmaktadır. Kansere tedavisinde farklı yöntemler vardır. Bazıları yalnız başına yada kombine olarak beraber uygulanırlar.

Kanserde erken tanıda en iyi doktor kişinin kendisidir. Ancak kansere yol açtığı şikayetler, birçok hastalığın şikayetleri ile benzerdir. Her organın kanseri değişik belirti verir. Örneğin idrar yolları ile ilgili kanserlerde ağrı, kanlı idrar yapma gibi şikayetler görülebilir. Ancak basit bir idrar yolu enfeksiyonu da aynı şikayetlere yol açabilir. Önemli olan nokta özellikle uzun süren şikayetleri önemseyip doktora başvurmaktır [4].

Şekil 1.2’de de şematize edildiği gibi kanser tedavisinde uygulanan dört temel yöntem vardır.

1. Cerrahi Müdahale
2. Radyoterapi
3. Modern Tedavi Yöntemleri
4. Kemoterapi

Tedavi yöntemlerinden hangisinin tedavi için en uygun olduğu, tümörün tipine ve gelişim safhasına bağlıdır. En önemli tedavi seçeneği olan kemoterapi tek başına uygulabildiği gibi diğer tedavi seçenekleriyle birlikte de uygulanabilmektedir.



Şekil 1.2 Kanser olgularında hastalığın teşhisi ve tedavisinde izlenen yol [2].

1.3.1 Cerrahi Müdahale

Kanserli dokuyu ve çevresindeki invazyon riski taşıyan bir miktar sağlıklı dokuyu alıp çıkartmaktır. Bazı durumlarda kanserli dokuyu cerrahi müdahale ile çıkartmak imkansız olabilir. Bu durumda radyoterapi veya kemoterapi uygulanır.

1.3.2 Radyoterapi

Uygun dozda iyonlaştırıcı radyasyon kullanılarak kanser hücrelerinin öldürülmesi ve küçültülmesini amaçlar. Kobalt-60'ın yaydığı gamma ışınları ya da lineer hızlandırıcılardan elde edilen X-ışınları en sık kullanılan iyonlaştırıcı radyasyonlardır. Işın tedavisinin amacı, hastalıklı dokuya en yüksek dozu verirken hastalıklı dokuyu çevreleyen sağlam dokuya en az radyasyon vermektir. Işın tedavisinin başarısı, ışınım kaynağına ve tümör tipinin ışınımaya karşı duyarlılığına bağlıdır.

1.3.3 Modern Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde kullanılan, radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi müdahale yöntemlerine yardımcı olarak, son dönemde kanser oluşumunu durduran ya da yavaşlatan modern tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden özellikle gen tedavisi, immünoterapi, antikor tedavisi ve kanser aşuları kanser terapisi için umut verici tedavi yöntemlerindedir.

İmmünoterapi, bağışıklık tedavisi anlamına gelmektedir. Bağışıklık sistemi, hücre ve organlardan oluşan ve vücudu enfeksiyon ve hastalıklara karşı koruyan bir sistemdir. Bağışıklık sistemi normal ve kanserli hücreler arasındaki farkı ayırt edebilir. İmmünoterapide, bağışıklık sistemini, kanserle savaşıma yönünde çalışmaya özendirilen ilaçlar kullanılmaktadır. İmmünoterapi, ağızdan, damardan ya da deri altından iğne yoluyla uygulanmaktadır ve çoğunlukla 'grip' benzeri yan etkilere sebep olmaktadır. Kişilerde üşüme, terleme, yorgunluk, baş ağrısı, kas ağrısı, mide bulantısı, kusma ya da ishal görülebilir.

Bazı kanser türlerinin (prostat ve bazı göğüs kanserleri) gelişebilmesi için vücut tarafından salgılanan hormonlara ihtiyaçları vardır. Hormon tedavisinde ilaçlar yardımıyla vücudun bu hormonları üretmesi engellenebilir yada hormonları üreten bez/organ ameliyatla alınabilir. Tedavi kanserin türüne bağlı olarak değişir. Hormon tedavisinin yan etkileri, iştah artışı, ödem

ve kilo almayı kapsayabilir. Bazı durumlarda kişinin ruh durumu ve cinsel isteği de etkilenebilir [12].

Antikor tedavisinde ise belirli tümör hücrelerine karşı çok özel antikorlar geliştirilip, daha sonra bunlarla kanser hücrelerini öldürmek amaçlanmaktadır. Kanser aşılı, kansere karşı bağışıklık oluşturmayı amaçlayan aşılardır ve henüz deney aşamasında olan ilginç tedavi yöntemlerindedir. Bu yöntemde önce tümör dokusundan antijenik özelliğe sahip moleküller alınır. Bu antijenler hayvana verilir ve bağışıklık sistemi aktif hale geçirilir ve B hücreleri çok miktarda antikor salgılar. Bu antikorlar özel yöntemlerle toplanarak, hastanın kan dolaşımına verilir. Bu antikorlar tümör dokusuna ulaştıklarında kanser hücrelerine yapışırlar. Antikor bağlanan kanser hücreleri hastanın bağışıklık sistemi tarafından daha kolay algılanır. Kanser hücresi üzerindeki antikora bağlanan bazı moleküllerde bir dizi reaksiyon sonunda kanserli hücreyi parçalarlar [4].

1.3.4 Kemoterapi

Kemoterapi, "ilaçla tedavi" anlamına gelmekle birlikte, daha çok kanser hücrelerini etkileyen kanser ilaçları kullanılarak yapılan tedavi için kullanılan terimdir. Bunun için kullanılan ilaçlara "antikanser" ilaçlar da denmektedir.

Kemoterapi tek başına kullanılabileceği gibi radyoterapi ile birlikte, ameliyattan önce ya da sonra uygulanabilmektedir. Kemoterapide bir çok değişik ilaç kullanılmaktadır. Tedavide tek bir ilaç kullanılabileceği gibi bir kaç ilaç birlikte de kullanılabilir.

Kemoterapinin kullanım amaçları şunlardır:

- Hastalığı tedavi etmek
- Hastalığın yayılmasını önlemek
- Ameliyat sonrası nüks olasılığını azaltmak
- Ameliyat veya radyoterapi öncesi hastalığı küçültmek

- Radyoterapiye duyarlılığı arttırmak
- Hastalığa bağlı rahatsızlıkları/şikayetleri azaltmak

Kemoterapi sistemik bir tedavi şeklidir, başka bir deyişle, kan dolaşımı aracılığı ile vücudun tüm bölgelerine yayılır, vücuttaki tüm doku ve organları etkiler. Bu açıdan kemoterapi, ameliyat ve radyoterapi gibi yerel tedavi amaçlayan tedavilerden farklıdır [4,13].

Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre hızlı büyümesi ve çoğalması nedeniyle antikanser ilaçları hızlı bölünen hücreleri tahrip etmeleri için geliştirilmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının ortak özelliği kanser hücresi ve normal hücreler arasında ayırım yapmaksızın hızla büyüyüp çoğalan hücrelere zarar vermeleridir. Vücudumuzdaki diğer hızlı bölünme yeteneğindeki hücreler de bu nedenle kemoterapiden etkilenmektedir. Bu durum çoğunlukla geçici olan yan etkilere neden olabilir. Bu yan etkiler en fazla saç kökü, mide-barsak sistemi ve kemik iliği hücreleri gibi hızlı bölünen normal vücut hücrelerinde görülmektedir. Tedavinin sonlandırılmasıyla birlikte bu yan etkiler ortadan kalkar.

Kemoterapide sıklıkla kullanılan bazı kemoterapi ilaçları 5-fluorouracil (5FU), Ebataxel, Campto, Mitoksantorin, Etoposide, Cisplatin ve Adriamisin' dir.

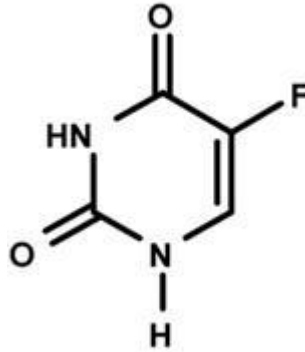
1.3.4.1 5FU 5-fluorouracil(5FU)

5-fluorouracil (5FU), akciğer, gastrointestinal sistem, baş ve boyun malign tümörlerinin düzenlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir pirimidin analogudur. Esas olarak 5FU'nun sitotoksik etkisi, floro-deoskiuridin'in monofosfata dönüşümü ile timidilat sentetazı inhibe etmesinin yanı sıra ilacın ribonükleik aside katılmasını sağlamaktadır [14].

5FU hücrelerde iki ayrı metabolik yolla katılmaktadır.

1. Katabolik yol; ilacın %80 kadarı karaciğerde inaktive edilerek 5-fluoro-5, 6-dihydro-uracil (5-FUH₂) metabolitine dönüştürülür.

2. Anabolik yol; ilaç, 5-fluorouridine-5'-monophosphate (FUMP), 5-fluorouridine (5-FUrd), 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5- FdUrd)'e dönüştürülerek; 5FU, tümör hücreleri ve diğer hücrelerde sitotoksik etki gösterir [15].

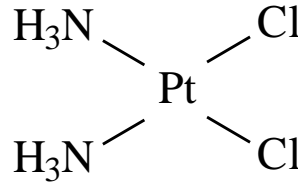


Şekil 1.3 5FU'nun kimyasal yapısı.

Bu ilacın hem hafifletici hem de tedavi edici olarak birçok karsinoma için özellikle akciğer, barsak ve deri kanserlerinde uzun bir kliniksel tarihi bulunmaktadır. 5FU'nun toksik etkisi alışıldık değildir fakat nadiren kemik iliği baskılanması, mukoza iltihabı ve çok daha nadir olarak serebral sendrom görülebilir [16]. Şekil 1.3'de kimyasal yapısı verilmiş olan 5-fluorouracil, suda çözülebilen, asidik, hidrofilik bir ilaçtır [17]. Beyin tümörlerinin dokular arası tedavisinde kullanılan hidrofilik ve antimetabolik bir ilaç olan 5-fluorouracil kan beyin bariyerini aşmayan etkinliği, uzun süreli kullanımlarda arttırılabilen antikanser etkinliği nedeniyle özellikle tercih edilmektedir [18].

1.3.4.2 Cisplatin™

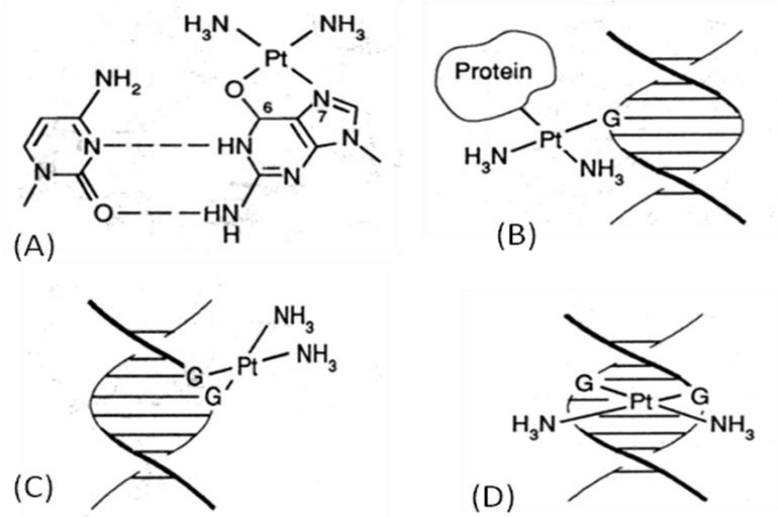
Cisplatin™ (cis-Dichlorodiamminoplatinum (II)), yaygın olarak kullanılan ve en fazla kemoterapik potansiyeli olan antikanser ilaçlarından bir tanesidir (Şekil 1.4). Cisplatinin, tümörler üzerinde olağanüstü aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Hem aktif hem pasif hücresel alınımından sonra cisplatin, uzantı oluşturmak ve hücresel apoptosis geliştirmek amacı ile DNA'da bulunan Guanin bazının 7. azot atomuna bağlanır [19]. Bu bağlanma ile DNA-protein ya da DNA-DNA zincirlerarası ve zincir içi çarpaz bağları kurulur ve cisplatinin sitotoksik etkisini göstermesi bu mekanizma ile sağlanmaktadır [4] (Şekil 1.5).



Şekil 1.4 Cisplatin™'in kimyasal yapısı.

Cisplatin™, en etkili antikanser ilaçlarından biri olmasına rağmen kullanımı, ağır yan etkilere neden olmasından dolayı sınırlanmıştır [20]. Yüksek dozlarda uygulandığında gastrointestinal problemler, ototoksisite, nefrotoksisite ve görmede anormallikler gibi sistemik yan etkilere neden olmaktadır. Bu toksik yan etkileri azaltmak amacıyla cisplatinin hedef kanserli bölgeye yönlenmesini sağlayan yeni ilaç taşıma mekanizmaları merak uyandırmaktadır. Azaltılmış toksisite, artırılmış aktivite, kolay tolare edilebilirlik gibi çeşitli özellikleri ile cazip hale gelen polimerik taşıma sistemleri farklı tipteki biyoaktif maddelerin taşınımında kullanılmıştır. Bu biyoaktif maddelere örnek küçük moleküller, aşular, proteinler, DNA ve RNA olarak sayılabilir [19]. Kanserli hücrelere spesifik ve daha seçici bir cisplatin ilacı geliştirmek için literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, cisplatinin sistemik uygulama formları olan, polikarboksilat, poli(amidoaminler), poliamidoamin dendrimerleri ve N-(2-hidroksipropil)

metakrilamid bileşikleri veya peglenmiş lipozomlar, poli(aspartik)asit-poli(etilen glikol) miselleri ve poli(kaprolakton)-poli(etilen glikol) veya poli(kaprolakton)-poli[2-(N, N-demetilamin)etil metakrilat] miselleri gibi koloidal taşıyıcılar formundaki ilaç-polimer solüsyonlarını kapsamaktadır [20].



Şekil 1.5 (A) Guanin ile cisplatinin şelatlaşması (B) Cisplatin-DNA ve cisplatin-protein bağlanması. (C) Cisplatin-DNA zincir içi çarpaz bağları (D) Cisplatin-DNA zincirlerarası çarpaz bağları [4].

1.4 Nanoparçacıklar ve İlaç Taşınım Sistemleri

Etkili bir ilaç taşıma sistemi olarak biyobozunabilen nanoparçacıkların geliştirilmesi büyük ilgi odağı olmuştur. Özellikle polimerlerin ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmalarına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Amaç, etkili bir şekilde ilacı hedef bölgeye taşımak ve tedavi edici etkiyi artırırken, yan etkileri azaltan polimerler geliştirmektir [21]. İlaçların nanokapsüllenmesi, büyüklükleri 1 ile 1000 nm. arasında değişen ilaç yüklü parçacıkların oluşturulmasını sağlamaktadır. Nanoparçacıklar katı olarak tanımlanmış, mikrondan daha küçük boyutta, biyoyumlu olan veya olmayan, polimer esaslı koloidal yapılardır. Nanoparçacık terimi, hem nanosfer hem de nanokapsüllenme için ortak bir isimdir [22]. Koloidal yapıdaki diğer taşıyıcılarla karşılaştırıldığında, polimerik nanoparçacıklar biyolojik sıvılarla

bir araya geldiklerinde daha kararlıdır, polimerik yapıları daha kontrollüdür ve sürekli ilaç salınımı sağlarlar. İlaç taşıma amacı ile kullanılacak nanoparçacıklar, biyouyumlulukları parçacığın büyüklüğü, toksisitesi, yüzey yükü, ilaç adsorbsiyon kapasitesi, yüzey hidrofobisitesi, yüklenme oranı, salınım kinetiği ve kararlılığı gibi fizikokimyasal özellikler açısından değerlendirilmektedir [23]. Son yıllarda özellikle biyobozunabilen polimerik nanoparçacıklar, ilaç salınımındaki uygulanabilirlikleri, organ veya dokulara hedeflenebilmeleri, ve gen terapisinde DNA taşıyıcısı olarak kullanılabilirmeleri açısından ilaç taşıma sistemi olarak dikkati çekmektedirler [21].

Kanser kemoterapisinde en önemli problem ilaçların kanser hücreleri üzerindeki düşük seçicilik özellikleri nedeniyle normal hücreleri de etkileyerek birçok yan etkiye neden olmalarıdır. Hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemleri bu nedenle öncelikli olarak çalışılmıştır. Biyobozunabilen polimerlerden oluşturulan ilaç yüklü nanoparçacıklar, kemoterapide karşılaşılan bu çok önemli problemin çözümü için potansiyel oluşturmaktadır. Hedefe spesifik yönlendirilme, nanoparçacık yüzeyine kanser hücrelerini tanıyan spesifik ligandların yerleştirilmesi ve bu ligandlar ile kanser hücreleri arasında ligand-reseptör etkileşiminin sağlanmasıyla oluşturulmaktadır [24]. Ayrıca hedeflenen bölgede sürekli ilaç salınımını sağlamasıyla, sadece ilacın tedavi edici etkisini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda uygulanan ilaç miktarını ve istenilmeyen yan etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır.

1.4.1 Polimetilmetakrilat (PMMA) Lateks

Nanoparçacıklar genellikle damar içi, kas içi veya deri altına enjeksiyon ile veya ağız yolu ile uygulanmak üzere geliştirilmişlerdir [25]. Polimetilmetakrilat (PMMA); metil metakrilat monomerinin polimeridir. Akriolik asitten derive edilen, metakrilik asit metil esterinin, ek polimerizasyonu ile elde edilir. PMMA; hafif, berrak, stabil bir maddedir. Çeşitli PMMA formları ticari olarak mevcuttur [26]. Polimetilmetakrilat (PMMA) ortodonti ve ortopedide protezlerde sıklıkla kullanılan bir polimerdir. Bu polimerlerin

konakçı dokulara uyumunu belirlemek için *in vivo* ve *in vitro*'da birçok biyouyumluluk testi yapılmıştır. Biyomateryallerin yüzey özellikleri, bitişik hücrelere tutunma sürecinde kritik rol oynamaktadır. Bu özelliklerin bir kısmı, hücre kültürü çalışmalarında *in vitro* olarak çalışılmıştır [27]. PMMA'lar Amerikan Yiyecek ve İlaç Denetleme Kurumu (Food and Drug Administration ,FDA) tarafından birçok biyomedikal malzemede kullanımı kabul görmüş polimerlerdir [28].

Her ne kadar nanoparçacıklar, manyetik rezonans görüntüleme netlik ajanı ve kanser hücrelerinin hipertermik tedavisinde kullanılıyor olsa da, hedeflenmiş ve kontrollü ilaç taşınımındaki kullanımları hala kısıtlıdır. Bunun bir nedeni saf demir oksitlerden yapılmış manyetik nanoparçacıkların kontrollü salınım için ilaçla yüklenememeleridir. Bu nedenle, manyetik nanoparçacıkların polimerler ve poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA), polistiren, hyaluronik asit ve kitosan gibi diğer biyouyumlu materyallerle kullanılarak biyouyumlulukları ve kontrollü ilaç taşınımında kullanımları sağlanmıştır [29].

1.4.2 Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacıklar

Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar, manyetik rezonans görüntülemesinin katalitik ve ayırım prosesinde, kök hücre ve tümör gelişiminin *in vivo* izlenmesinde, hücre ve DNA sınıflandırmasında, ilaç taşınımı ve hipertermia gibi biyolojik uygulama ve medikal görüntüleme çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu uygulamaların bir çoğunda, yüksek magnetizasyon özelliği, biyouyumluluk, suda çözünebilme ve kararlılık için manyetik nanoparçacıkların süspansiyon halde olması tercih edilmektedir. Bununla birlikte, uygun yüzey karakteristiği ile manyetik nanoparçacıklar birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar için büyük potansiyele sahiptirler [30]. Manyetik ilaç hedeflemesi -manyetik bir alan etkisinde manyetik bir materyale immobilize edilmiş olan ilacın hedeflendirilmesi- önemli bir ilaç taşıma tasarımı oluşturmaktadır. Tedavi edici moleküllerin taşınmasında kullanılan süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar, klinik uygulamalar için büyük

potansiyel oluşturmaktadır çünkü şu anda kullanılmakta olan ilaç taşınım ve gen transfeksiyon tekniklerinden çok daha üstün özellikler göstermektedirler. Manyetik alan, süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları hedef organ ya da dokuya çekebilir ve bu noktada biyobozulabilen taşıyıcı maddenin yıkılması ve ilacın, DNA plazmitlerinin veya biyoaktif maddelerin çevre dokulara salınması sağlanır. Bu sayede şu an uygulanmakta olan ilaçla tedavi metodlarındaki, sağlıklı hücreleri etkileyen ilaç toksisitesi ve istenmeyen yan etkiler gibi bir çok problem ortadan kaldırılabilmektedir. İdeal olanı; ilaç, peptid ya da genin, manyetik olarak güçlü parçacıklara bağlanması ve vücudun savunma sistemine karşı koyabilecek bir materyal ile parçacığın sarılması ile ilacın zamanından önce parçalanmasını önlemektir. Demir oksitler gibi manyetitler, parçacık sentezinde sıklıkla kullanılan bileşiklerdir çünkü düşük oksitlenme yapısında olan demir mıknatıssal materyaller, kalıcı manyetik cevap oluşumu sağlamaktadırlar. Eğer ilaç yüklü nanoparçacıklar, antikolar, lektinler, proteinler, hormonlar, yüklü moleküller veya düşük moleküler ağırlıklı ligandlar gibi hedef bölgeyi tanıyıp bağlanabilecek maddelerle konjuge edilirse nanoparçacıkların hedeflenme özellikleri daha da geliştirilebilir. Bu parçacıklar bir yandan ilacın taşınım sırasında erken inaktivasyonuna engel olurken, kanser hücreleri gibi bazı spesifik hücrelere de hedeflenmelerini sağlarlar [31].

Süperparamanyetik nanoparçacıkların sentezi ve bunların dispersiyonlarının hazırlanması üzerine çalışmalar son 30 yıla dayanırken, manyetik polimerik boncukların sentezi üzerine çalışmalar yeni olup yaklaşık son 10 yılı kapsamaktadır [32-35].

İlk olarak biyolojide ve daha sonra da tıp alanında biyokimyasal ürünlerin ve hücrelerin manyetik ayrılmasında ve spesifik ilaç taşınımında parçacık sistemlerinin manyetik yol göstericisi olarak kullanılabilmesi ve güçlü manyetik özellikleri nedeniyle manyetit (Fe_3O_4) sentezine güçlü bir ilgi vardır [36-41].

1.5 Amaç

Bu çalışmanın amacı, antitümör aktivitesi hakkında herhangi bir bilgi olmayan yeni sentezlenmiş PMMA ve SP-PMMA nanoparçacıklarının ve kemoterapi ilacı olan Cisplatin™'in sitotoksik aktivitelerini belirlemektir. Ayrıca sitotoksik etkileri belirlenmiş olan PMMA ve SP-PMMA'nın Cisplatin™ ile yüklenme oranlarının belirlenmesidir.

Bu anlamda yapılacak olan çalışmalar üç alt başlık halinde sıralanabilir.

- I) Polimerin, manyetik nanoparçacıkların ve kemoterapi ilaçlarının (PMMA, SP-PMMA, 5FU ve Cisplatin™ bileşiklerinin) hücre kültüründe hepatoma hücre hattı (Hep3B) MTT (3 - (4, 5 – dimethylthiazolyl – 2) - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide) sistemi kullanılarak antitümör aktivitelerinin zamana ve konsantrasyona bağlı etkilerinin belirlenmesi.
- II) Sitotoksik etkilerini belirlediğimiz PMMA ve SP-PMMA nanoparçacıklarının farklı yükleme teknikleri kullanılarak kemoterapi ilaçları ile yüklenmelerini sağlamaktır.
- III) İlaç yüklenmiş SP-PMMA'nın sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar, Merck ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Doku kültürü için kullanılan medyumlar ve diğer kimyasallar Sigma ve Biochrom AG firmalarından sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan PMMA ve SP-PMMA lateksler, Balıkesir Üniversitesi Kimya bölümünde, Yrd. Doç. Dr. Taner TANRISEVER ve Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR tarafından yönetilen Yrd. Doç. Dr. Seda CAN BEYAZ'ın doktora çalışması sırasında sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Tablo 2.1 Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon
-80°C ultralow freezer	Sanyo, Japonya

Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Yatay çalkalayıcı	Gesellschaft Für Labotechnic
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Otoklav	Hirayama, Japonya
pH Metre	WTW, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Almanya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Isı kontrollü çalkalmalı inkübatör	GFL, Almanya
UV visible spektrofotometre	Heios α (Unicam), Metro Lab
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas Terazi	Sartorius
Kuyucuklu plaka okuyucu spektrofotometre	BIO-TEK
Otomatik pipetler	Finnpipette

**Tablo 2.1'in devamı.

2.2 Yöntem

2.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ile sterilizasyonu

Isıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, 121 °C' de 20 dakika (1, 02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

Doku kültürü laboratuvarı her hafta periyodik olarak virkon içeren sıvılarla temizlendi. Oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak odanın havasının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

2.2.2 Hücre Kültürü Deneyleri

2.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

2.2.2.1.a Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumunu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine L-Glutamine son konsantrasyonu 0.2 mM ve fetal calf serum (FCS) son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüm bileşenler 0.22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.2.2.1.b Fetal Calf Serum (FCS) Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum) –20 °C'de saklanır ve taşınması soğuk zincirle yapılır. Stok serum ilk kullanımdan önce 56 °C 1 saat ısı ile inaktive edilir. 0.22 µm filtre ile steril edilir ve tekrar -20 °C de saklanır.

2.2.2.1.c PBS (Phosphate-Buffered Saline) Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml ddH₂O ile hazırlanmış ve otoklav edilmiştir. 2-8 °C'da saklanmıştır.

2.2.2.1.d MTT ((3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Toz halinde temin edilen MTT ((3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde steril PBS içinde bir gece boyunca magnetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. 0.22 µm filtre ile steril edilerek kullanılmıştır. 2-8 °C'da saklanmıştır.

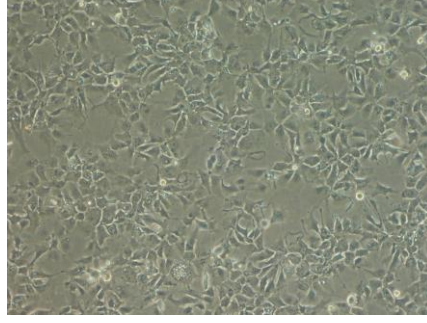
2.2.2.1.e İsoopropanol Çözücü Solüsyonunun Hazırlanması

MTT testinde oluşan formozan kristallerini çözmek için kullanılan isopropanol son konsantrasyonu 0.004 M HCl içerecek şekilde hazırlanmıştır.

2.2.3 Hücre Kültürü Teknikleri

2.2.3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmada tek bir hücre hattı kullanılmıştır. İnsan karaciğer kanserli hücre hattı (Hep3B) ATTC'den satın alınmıştır. Hücre hattının karakteristik mikroskop görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Karaciğer kanserli hücre hattının (Hep3B hücrelerinin) mikroskop görüntüsü (M.B:40x10)

2.2.3.2 Hücre Soyunun Başlatılması

Uzun dönemde -80 °C'de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için -80°C'den çıkarılan hücreler 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alınır ve hızlıca çözümleri sağlanır. Çözünen hücreler %10'luk FCS içeren medyuma alınır, alt üst edilir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır, oluşan pellet medyum ile çözülür ve flasklara ekim yapılır. Flasklar etiketlenir ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konulur.

2.2.3.3 Hücrelerin Büyütülmesi

Hücreler 15 ml medyumda 75 cm² flasklarda, içerisinde 0.2 mM L-Glutamine ve % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretilir.

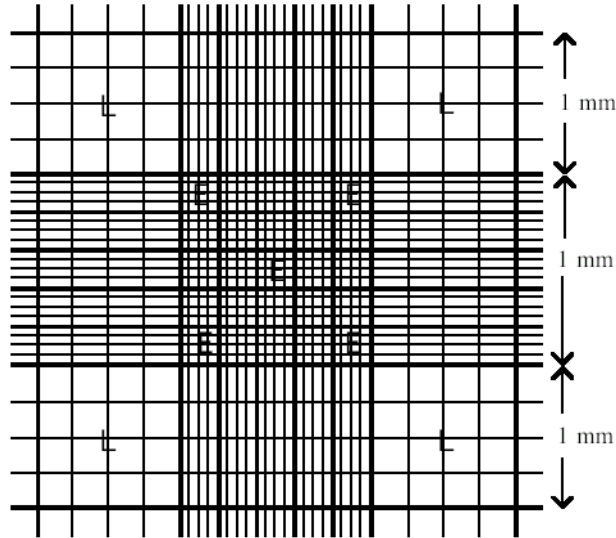
2.2.3.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanır ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılır. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenir ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülür.

Süpernatant uzaklaştırılır, pellet medyum ile çözülür ve flasklara ekim yapılır. Flasklar etiketlenir ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konulur.

2.2.3.5 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0.1mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 2.2) lamı kullanılır. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilüsyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmazlar ve sayım yapılır.



Şekil 2.2 Hemositometre

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/ml} = \text{hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$

2.2.3.6 Hücrelerin –80 °C’de Saklanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanır ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılır. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenir ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülür. Süpernatant uzaklaştırılır, pellet %10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözülür ve cryovial tüplerine konularak, etiketlenir ve –80 °C derin dondurucuya konulur.

2.2.4 Sitotoksisite Deneylerinin Kurulması

75 cm² flaskda büyümekte olan hücreler yüzeyi %80 oranında kapladıklarında, içerisindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanır ve 75 cm² flasklar için 3ml Tripsin-EDTA eklenir. 3-5 dakika CO₂'li inkübatörde inkübe edilir. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülür. Süpernatant uzaklaştırılır, pellet 10 ml. kadar medyum ile çözülür. Süspansiyondaki canlı hücre sayısını belirlemek amacıyla trypan blue exclusion yapılır ve canlı hücre sayısı belirlenir. Hücre sayısı belirlendikten sonra, 24 kuyucuklu plaka için hücre sayısı 125.000 hücre/well olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. 125.000 hücre son hacim 500 µl olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM medyumuna ekilmiştir. Hücre ekimi yapıldıktan bir gece sonra ilaç uygulaması yapılmış ve 6, 24, 48, 72 saat sonucunda MTT test yapılarak absorbansları alınmıştır.

Cisplatin™ ve orijinal sentezlenen PMMA ve SP-PMMA bileşiklerinin sitotoksisite deneyleri Hep3B karaciğer kanseri hücre hattında yapılmıştır. Bu bileşikler aşağıda belirtilen son konsantrasyonlarda hücreler üzerine eklenmiştir.

5FU için; 25 ng/μl, 6.25 ng/μl, 0.25 ng/μl konsantrasyonları çalışılmıştır.

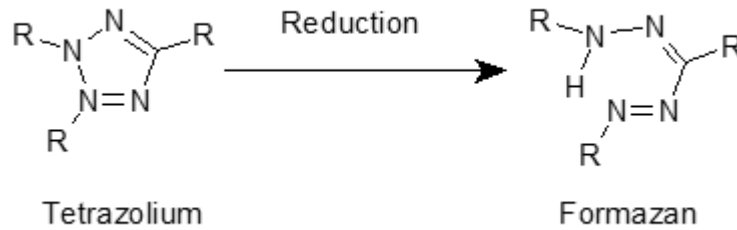
Cisplatin™ için; 0.25 μg/μl; 0.45 μg/μl; 0.49 μg/μl; konsantrasyonları çalışılmıştır.

PMMA ve SP-PMMA, son hacimler medyumla 500 μl'ye tamamlanacak şekilde 250 μl, 50 μl, 10 μl hacimlerinde hücrelere uygulanmıştır.

Tüm deneylerde en az 4 tekrarlı çalışılmıştır, ayrıca kontrol grubu olarak bileşiklerin uygulanmadığı hücreler kullanılmıştır.

2.2.4.1 MTT Testi

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksosite ölçümü için kullanılan ve kantitatif kolorometrik bir yöntem olan MTT metodu canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT 'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.

Bu metoda göre istenilen inkübasyon periyodundan sonra (6, 24, 48 ve 72 saat) hücrelerin bulunduğu ortama, optimizasyon sonucu belirlenen son konsantrasyonu 0,5mg/ml olacak şekilde stok MTT solüsyonu eklenir ve 4 saat 37 °C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir. İnkübasyon sonunda

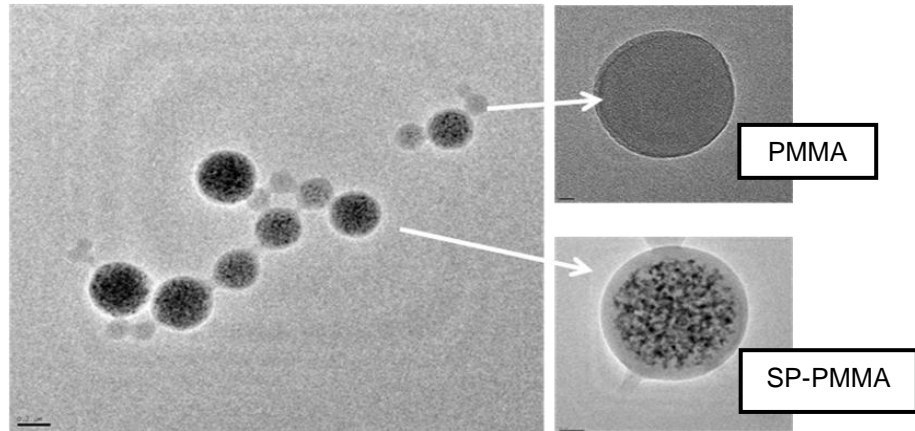
medyum uzaklaştırılır, 0.004 M HCl içeren isopropanol ile kristaller çözülür ve UV spektro okuyucu ile 550 nm dalga boyunda absorbands alınır.

2.2.5 Nanoteknolojik Çalışmalar

2.2.5.1 Çalışmada Kullanılan Nanoparçacıklar (PMMA ve SP-PMMA)

Çalışmada kullanılan PMMA ve SP-PMMA lateksler Balıkesir Üniversitesi Kimya bölümünde Yrd. Doç. Dr. Taner TANRISEVER ve Yrd. Doç. Dr. Seda CAN BEYAZ tarafından sentezlenmiş, kimyasal karakterizasyonu yapılmış ve manyetik analizi Balıkesir Üniversitesi Fizik Bölümünde Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR tarafından yapılmıştır.

Sentezlenen süperparamanyetik latekslerde, içinde manyetit taşıyan ve taşımayan olmak üzere iki tip boncuk morfolojisi görülmüştür. Bütün çalışmalarda içi boş boncukların boyutları manyetit yüklü olanlara göre her zaman küçük çıkmıştır. Bu manyetit içermeyen 100-150 nm'lik boncuklar, manyetit ilave edilmeyen ama aynı reçete ile üretilmiş 233 nm'lik polimerik boncuklara göre de küçüktür. Şekil 2.4'de HRTEM fotoğrafları bu boncukların iç yapısını göstermektedir.



Şekil 2.4 Boncukların transmisyon elektron mikroskobu (High-resolution transmission electron microscopy, HRTEM) fotoğrafları ile gösterilen iç yapıları [41].

2.2.5.2 Yüklemelelerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Solüsyon A (Buffer A) : 0.003M fosfat ve 0.1 M NaCl içeren solüsyon pH 6.0 olacak şekilde hazırlanır.

Karbodiimit Solüsyonu : 0.025 gr/ml. karbodiimit, Buffer A içerisinde çözülür.

Cisplatin Solüsyonu : 0.8–2,4 mg/ml. Cisplatin™, Buffer A içerisinde çözülür.

NaOH : 0.02 M 100 ml. NaOH saf suda çözülerek hazırlanır.

Saf su : İletkenliği 0.5 µs-1 µs olan ultra saf su Human Power–I marka su saflaştırma cihazından alınarak kullanılmıştır.

2.2.5.3 5FU (5Fluorourasil) ile Yükleme

Gaihre ve arkadaşlarınca belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir [42]. Buna göre, PMMA ve SP-PMMA polimerler ve ilaç 15 dakika 37 °C'de ısıtıldıktan sonra ilaç son konsantrasyonları 25 µg/µl, 33.3 µg/µl ve 40 µg/µl olacak şekilde ilaç ve polimerler bir araya getirilerek 5 dakika vorteks yapıldı. 37 °C'de çalkalayıcı etüvde 24 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan örneklerde süpernatantın absorbansı alındı [42].

2.2.5.4 Cisplatin™ ile Yükleme

Nanoparçacıkların ilaçla yüklenmesi için 3 farklı teknik kullanılmıştır.

2.2.5.4.a İnkübasyon ile Yükleme

PMMA ve SP-PMMA nanoparçacıkları ve ilaç 15 dakika 37 °C'de ısıtıldıktan sonra son ilaç konsantrasyonları 0.25 µg/µl, 0.45 µg/µl ve 0.49 µg/µl olacak şekilde ilaç ve polimerler bir araya getirilerek 5 dakika vorteks yapıldı. 37 °C'de çalkalayıcı etüvde 24 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

24 saat sonunda 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan örneklerde süpernatantın absorbanası alındı [42].

2.2.5.4.b İmmobilizasyon Tekniği ile Yükleme

3 ml PMMA ve 3 ml SP-PMMA 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pelletler 2 ml buffer A solüsyonu ve 0.5 ml karbodiimit solüsyonu ile çözüldü. 10 dakika sonikasyon yapıldı. Oluşturulan polimer karışımına cisplatin solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika sonikasyon yapıldı [43,44]. Sonikasyon sonrası 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatantların absorbanası alındı.

2.2.5.4.c Hidroksilleme Tekniği ile Yükleme

0.02 M 100 ml NaOH içerisinde 10 ml PMMA ve 10 ml SP-PMMA yatay çalkalayıcıda oda sıcaklığında 5 saat çalkalandı. Çalkalama sonrası örnekler 13.000 rpm'de santrifüj ile çöktürüldü. Üst faz atıldı. Pellet dH₂O'da çözüldü. Tekrar çöktürüldü. Bu yıkama işlemi pH nötr veya asidik olan kadar tekrarlandı. Elde edilen pelletler 1x, 2x ve 3x olacak şekilde ilaçla birleştirildi. 5 dakika vorteks yapıldıktan sonra 37 °C'de çalkalayıcı etüvde 24 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan örneklerde süpernatantın absorbanası alındı.

2.2.5.5 Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması

5FU ve Cisplatin™ için yüklemelerin hesaplanmasında kullanılmak üzere kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Öncelikle ilaçların maksimum absorbanas verdikleri dalga boyu tarama yapılarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrileri oluşturulurken, önce miktarı tespit edilmek istenilen ilacın farklı konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin

ölçümleri yapıldı. Grafikselsel olarak, konsantrasyonlar ve bunlara ait okuma değerlerinin kesişme noktaları birleştirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi.

Son olarak yükleme sonrası elde edilen süpernatantın ölçümü yapıp ölçüm değeri koordinat düzleminde işaretlenerek grafikte kesiştiği noktaya göre yükleme miktarı tespit edildi.

2.2.5.6 İlaç Yüklemelerinin Hesaplanması

Nanoparçacıklara ilaç yüklemesi yapıldıktan sonra örnekler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır ve süpernatantların belirlenmiş olan dalgaboyunda absorbansları ölçülür. Kalibrasyon eğrisindeki doğru denkleminde ($y=ax+b$) absorbansın yerine konulması ile hesaplama yapılır. Yüzde yüklenme oranı denkleminde olan $E=100-[(K_{ilaç}/K_{total}) \times 100]$ kullanılarak yüzde yüklenme oranları bulunur.

2.2.5.7 Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrofotometre

Nanoparçacıkların ilaçla yüklenmesinin spektrofotometrik belirlenmesine ek olarak, yüklenmenin gerçekleştiğini desteklemesi açısından infrared spektrofotometresi de belirleme kullanılmıştır.

2.2.6 Yüklenmiş Nanoparçacıkların Sitotoksisite Çalışmaları

Hidroksilleme metodu ile yüklenmiş olan nanoparçacıkların biyolojik etkilerini belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.4'de belirttiği şekilde 24 kuyucuklu plakalara her kuyuya 500 µl içerisinde 125.000 hücre olacak şekilde plate out yapılmıştır. 24 saat inkübasyondan alınan ve yaklaşık %30 yüklendiği belirlenen SP-PMMA + ilaç bileşikleri çöktürülerek pelletleri 2 ml medyum içerisinde çözülmüştür ve hücrelere 3 farklı konsantrasyonda 48 ve 72 saat uygulama yapılmıştır.

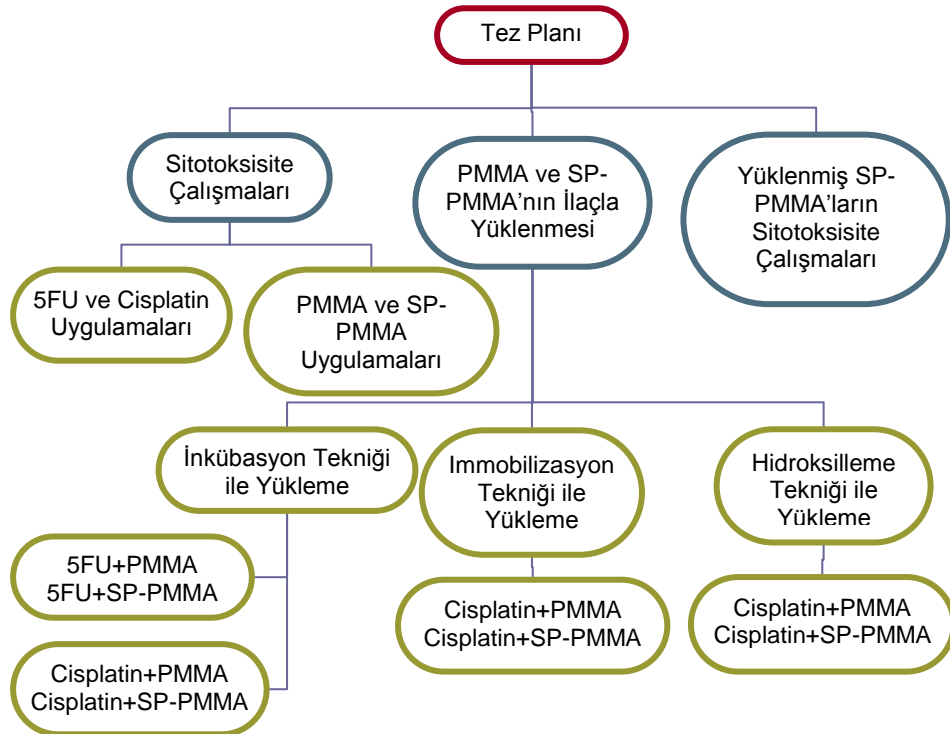
2.2.7 İstatistiki analizler

Elde edilen değerler kendi aralarında ve paralel kontrol gruplarıyla Minitab 14 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Varyans analizi ANOVA ONE WAY ANALYSIS ile yapılmıştır.

3. BULGULAR

Son yıllarda tekstil, otomotiv ve medikal gibi bir çok alanda kullanılan nanoteknoloji, özellikle hastalıkların tedavisinde ve yeni tedavilerin geliştirilmesi amacıyla bir çok araştırmada kullanılmaktadır. Özellikle nanoparçacıkların kemoterapi ilaçlarının taşınımında kullanımı kanser kemoterapisi için önemli yaklaşımlardan bir tanesidir.

PMMA polimeri ve SP-PMMA nanoparçacıklarının, 5FU ve Cisplatin™ ile yüklenmesi ve biyoyumluluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmamızda kısaca aşağıdaki gibi bir yol izlenmiştir (Şekil 3.1).



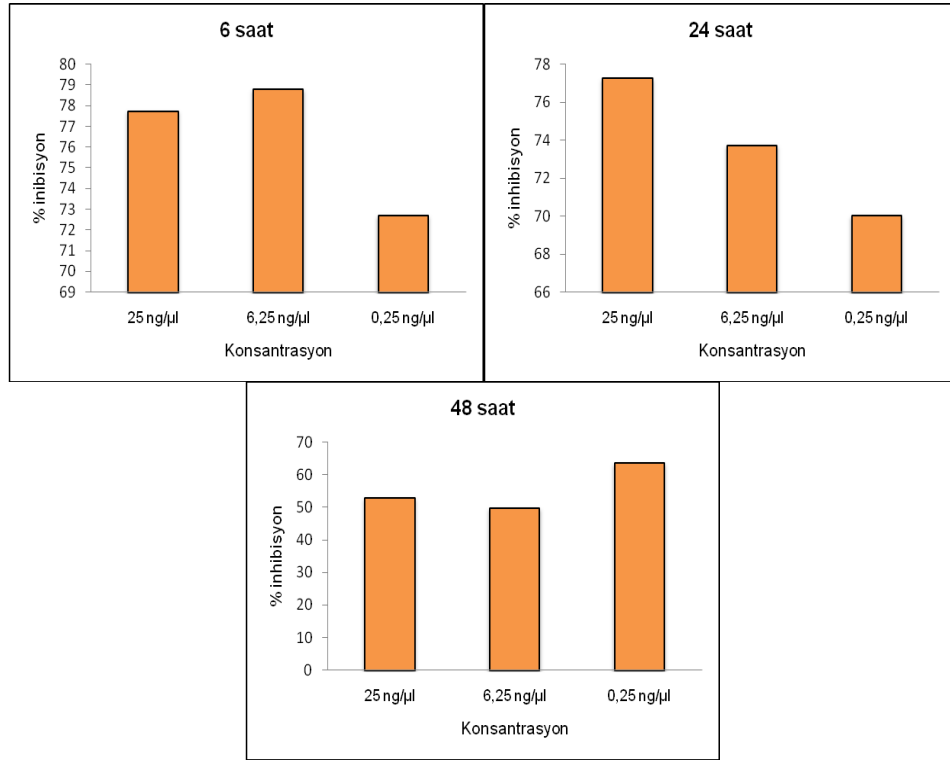
Şekil 3.1 Tezle ilgili çalışmalarda izlenen yolun şematik gösterimi.

3.1. 5-fluorourasil (5FU) ile Yapılan Sitotoksosite ve İlaçla Yükleme Çalışmaları

3.1.1. 5-fluorourasil (5FU)'nun Sitotoksik Etkileri

Çalışmamızda ilk olarak, 5FU kemoterapi ilacının nanopartiküllere yüklenmesi ve akıllı ilaç olarak dizayn edilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle 5FU'nun İnsan Hepatoma Hücre Hattı olan Hep3B hücrelerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

Hep3B hücrelerinde 6, 24 ve 48 saatlik aralıklarda 25 ng/μl, 6.25 ng/μl, 0.25 ng/μl 5FU ilaç uygulanmıştır ve sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 5FU'nun MTT uygulaması sonrası konsantrasyona bağlı % inhibisyon grafikleri (6, 24 ve 48 saat için).

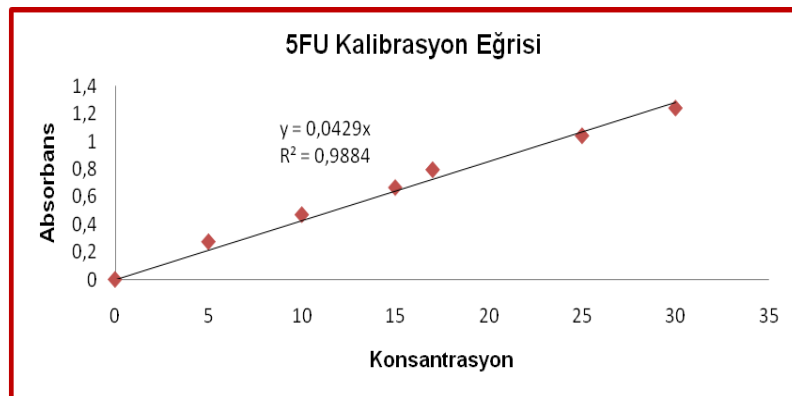
5FU bileşiğinin Hep3B hücrelerinde, 6 ve 24 saat sonucunda tüm konsantrasyonlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % inhibisyon

değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak 48 saatte özellikle 25 ng ve 6.25 ng uygulamalarında hücreler üzerinde ilaç uygulamasının sitotoksik etkisi görünmektedir (Şekil 3.2.).

3.1.2. 5-fluorourasil (5FU) ile PMMA ve SP-PMMA Nanoparçacıklarının Yüklenmesi (İnkübasyon İle Yükleme)

5FU, özellikle klinikte birçok kanserin tedavisinde tamamlayıcı ilaç olarak kullanılıyor olması nedeniyle ilaç yüklemesi deneyleri yapılmıştır. Buna göre ilaç yüklenmesi için inkübasyon metodu kullanılmıştır (Bölüm 2.2.5.4.a). Kısaca, PMMA, SP-PMMA ve ilaç 15 dakika 37 °C'de ısıtıldı. Daha sonra ilaç ve polimerler ayrı ayrı bir araya getirilerek 5 dakika vorteks yapıldı. 37 °C'de çalkalayıcı etüvde 24 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı ve 24 saat sonunda 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan örneklerde süpernatantın absorbansı alınmıştır [45].

Absorbanslar kullanılarak yükleme hesaplamaları yapıldı (Bölüm 2.2.5.6). Yüklemelerin hesaplanması sırasında kullanılan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.3'de verilmiştir. Ancak sonuçlar yorumlandığında ilaç yüklemesinin gerçekleşmediği ya da net olarak yüklemenin tespit edilemediği gözlenmiştir. Yükleme deneyleri farklı koşullarda (pH değişimi, sıcaklık değişimi.vb) tekrar edildiğinde de sonucun değişmediği gözlenmiştir. Bu nedenle yükleme çalışmalarına Cisplatin™ ile devam edilmiştir.



Şekil 3.3 5FU'nun 6 farklı konsantrasyonuna göre kalibrasyon eğrisi. (OD=327nm)

3.2. Cisplatin™ Sitotoksosite ve İlaçla Yükleme Çalışmaları

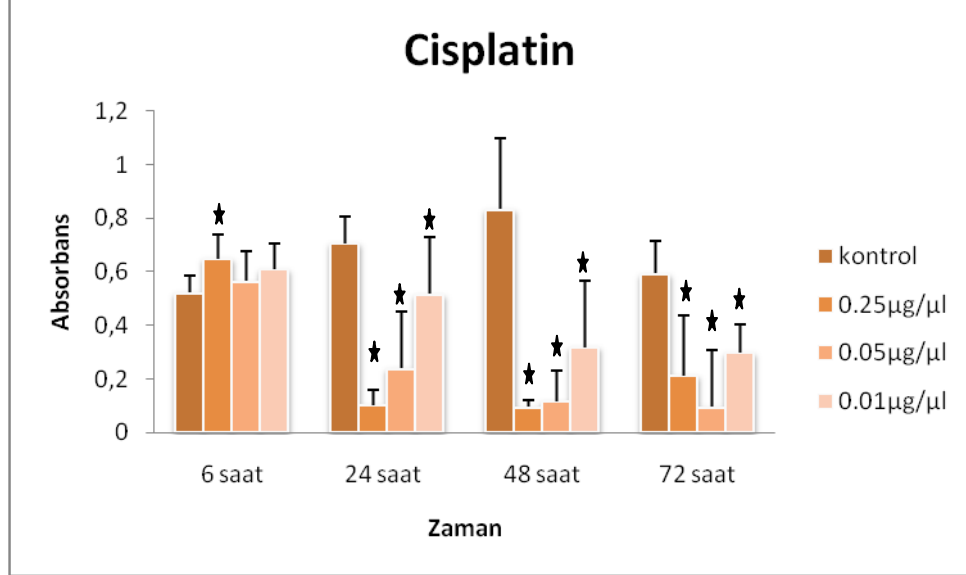
3.2.1. Cisplatin™ ve Nanoparçacıkların (PMMA ve SP-PMMA) Sitotoksik Etkileri

Çalışmamızın ikinci aşamasında kemoterapide yaygın olarak kullanılan ve en fazla kemoterapik potansiyeli olan antikanser ilaçlarından Cisplatin™ kullanılmıştır. İlk olarak Cisplatin™ ve nanoparçacıkların Hep3B hücre hattındaki sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Buna göre 0.25 µg/µl; 0.05 µg/µl; 0.01 µg/µl Cisplatin™ uygulaması yapılmıştır ve 6, 24, 48 ve 72 saat sonunda sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Aynı şekilde Hep3B hücrelerinde 6, 24, 48 ve 72 saatlik aralıklarda PMMA ve SP-PMMA uygulaması da yapılmıştır. PMMA ve SP-PMMA 250 µl, 50 µl ve 10 µl uygulanarak son hacimler 500 µl'ye medyum ile tamamlanmıştır. Biyouyumlu olup olmadıkları 6, 24, 48 ve 72 saat sonunda etkileri MTT testi ile belirlenmiştir.

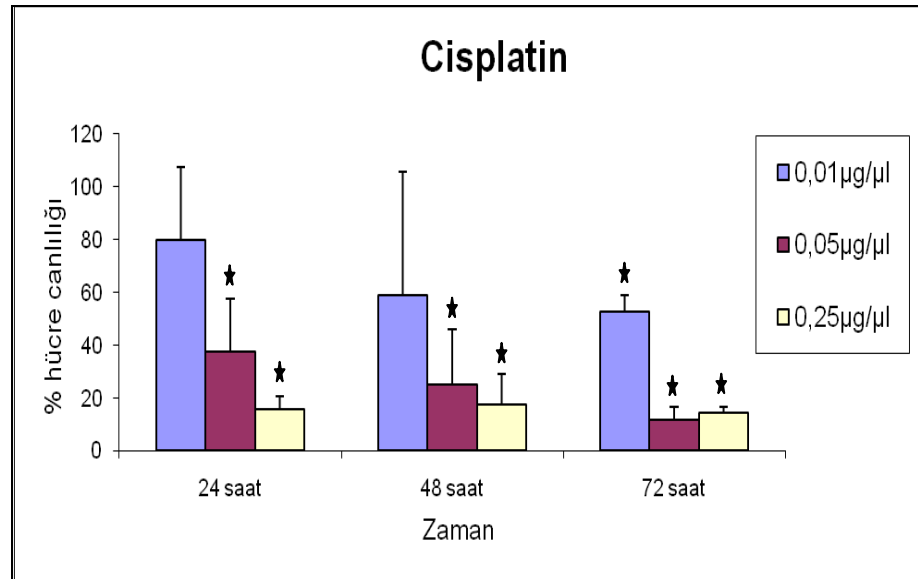
Şekil 3.4'te Cisplatin™ uygulanmış hücrelerdeki MTT sonuçlarına göre absorbans değerlerini gösteren grafikte görüldüğü gibi, 6 saat sonunda, aslında Cisplatin™'in hücreler üzerinde proliferatif etkisi olduğu görülmüştür. (Şekil 3.4). Ancak bu sonuçlar Cisplatin™'in Hep3B hücreleri üzerinde toksik etki göstermediğini söylemek için erken bir zaman aralığıdır. Çünkü bazı kemoterapi ilaçlarının, özellikle düşük konsantrasyonlarda ve erken evrede kanser hücrelerinin canlılığını arttırıcı etkiye sebep olduğu belirtilmiştir [4].

Cisplatin™'in uygulanan tüm zaman aralıklarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrelerde sitotoksik etki gösterdiği hem absorbans grafiğinde, hem de % hücre canlılığını gösteren grafiklerde görülmektedir (Şekil 3.5). Cisplatin™ hücrelerde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur. 24 saatte en düşük konsantrasyonda hücreler üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir, ancak 0.05 µg/µl ve 0.25 µg/µl konsantrasyonlarında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır. Bu etki 48 ve 72

saatte devam etmektedir. Özellikle 72 saatteki tüm konsantrasyonlarda hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkiye sebep olduğu görülmüştür.



Şekil 3.4 Cisplatin™'in Hep3B hücrelerindeki etkilerinin gösterildiği zamana bağlı absorbans grafiği. (OD=550nm) (★ istatistiki olarak anlamlı, p<0.05)

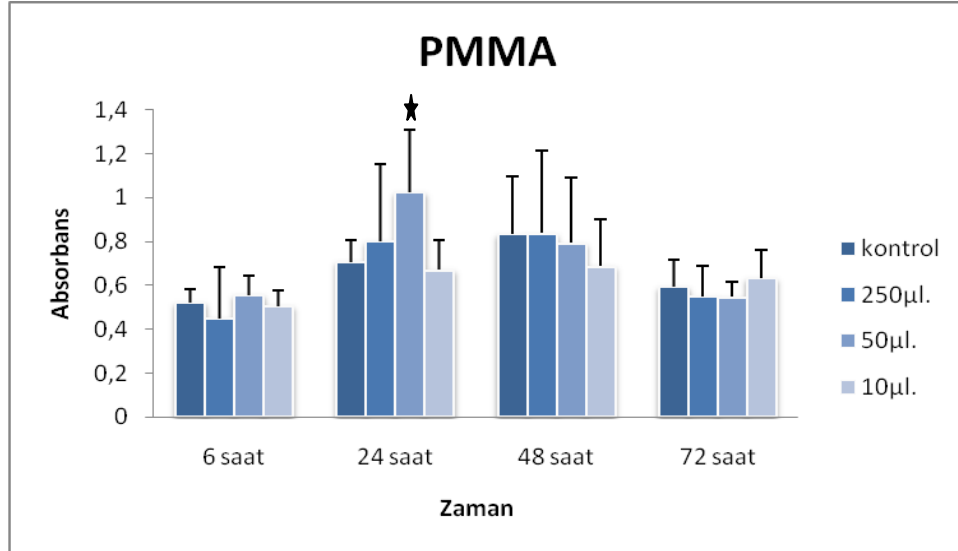


Şekil 3.5 Hep3B hücreleri üzerinde Cisplatin™'in oluşturduğu % hücre canlılıklarının zamana bağlı grafiği (★ istatistiki olarak anlamlı, p<0.05)

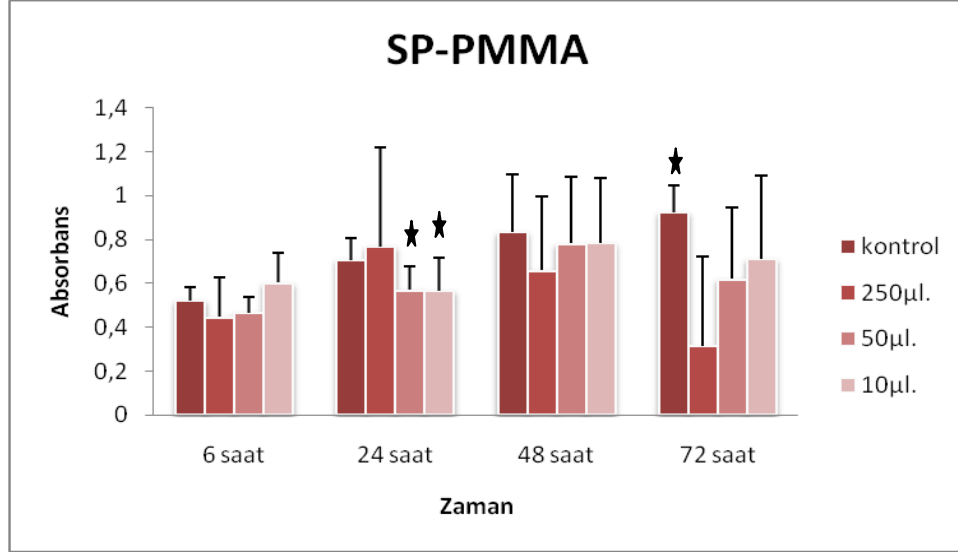
Şekil 3.6'de yükleme deneylerinde kullanacağımız PMMA polimerinin uygulanmış hücrelerdeki MTT sonuçlarına göre absorbans değerlerini gösteren grafik görülmektedir. Grafikte de görüldüğü gibi PMMA uygulanan bütün konsantrasyonlar ve zaman aralıkları için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitotoksik etkisi görülmemiştir. PMMA'nın hücreler üzerinde 24 saatte hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi gözlenmiştir.

Şekil 3.7'da SP-PMMA uygulanmış hücrelerdeki MTT sonuçlarına göre absorbans değerlerini gösteren grafik görülmektedir. Grafikte de görüldüğü gibi 6 ve 24 saat sonunda hücrelerin etkilenmediği ancak özellikle 48 ve 72 saatte hücre canlılığında bir miktar azalma olduğu görülmektedir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bu sonuçlar PMMA ve SP-PMMA'nın özellikle karaciğer kanser model hücre hatlarında hücreleri etkilemediği ve biyoyumlu bir materyal olduğunu göstermektedir.



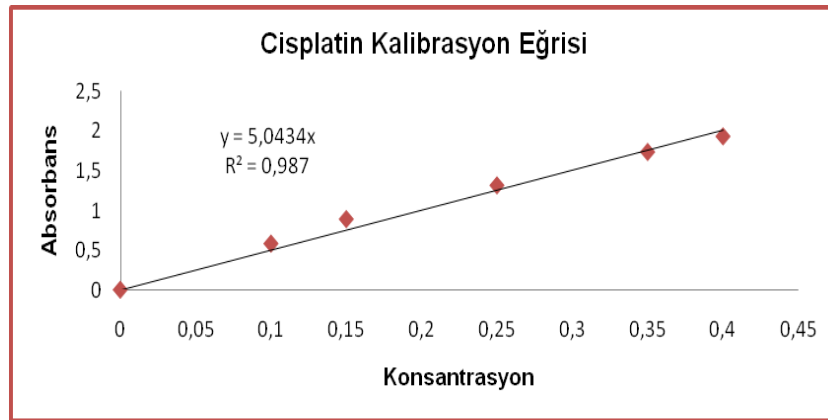
Şekil 3.6 PMMA polimerinin uygulanmış hücrelerdeki MTT sonuçlarına göre zamana bağlı absorbans değerleri. (OD=550nm) (★ istatistiki olarak anlamlı, p<0.05)



Şekil 3.7 SP- PMMA polimerinin uygulanmış hücrelerdeki MTT sonuçlarına göre zamana bağlı absorbans değerleri. (OD=550nm) (★ istatistiki olarak anlamlı,p<0.05)

3.2.2. Cisplatin™ ile PMMA ve SP-PMMA Nanoparçacıklarının Yüklenmesi.

Cisplatin™'in nanoparçacıklarla yüklenmesi için 3 ayrı teknik kullanılmıştır. Bu yöntemlerin sonucunda yüklenmenin gerçekleşip gerçekleşmediği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Bölüm 2.2.5.5) Aşağıda Cisplatin™ için kullanılan kalibrasyon eğrisi verilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Cisplatin™'in 5 farklı konsantrasyonu için kalibrasyon eğrisinin oluşturulması (OD=210 nm.).

3.2.2.1. İnkübasyon ile Yükleme

İnkübasyon ile yükleme için son hacim 1 ml olacak şekilde 3 farklı deney grubu oluşturulmuştur. Buna göre ilk grupta 500 µl PMMA ve 500 µl Cisplatin™ (ilaç son konsantrasyon 0.25 µg/µl), ikinci grupta 100 µl PMMA ve 900 µl Cisplatin™ (ilaç son konsantrasyon 0.45 µg/µl), son grupta ise 20 µl PMMA ve 980 µl Cisplatin™ (ilaç son konsantrasyon 0.49 µg/µl) inkübasyonu yapılmıştır. Kontrol grubu olarak değerlendirilmek üzere 500 µl Cisplatin™ ve 500 µl dH₂O kullanılmıştır. Aynı deney grupları SP-PMMA içinde ayrı olarak düzenlenmiştir.

İlk olarak PMMA ve SP-PMMA polimerler ve ilaç Bölüm 2.2.5.4.a'de belirtildiği gibi yüklenmiştir. ve örneklerin süpernatantlarının absorbansı alınarak yükleme oranları tespit edilmiştir. (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 İnkübasyon tekniği ile yüklenmiş PMMA ve SP-PMMA'nın % yüklenme oranları

Cisplatin™ konsantrasyonu (µg/µl)	PMMA + Cisplatin™ yüklenme oranı (%)	SP-PMMA + Cisplatin™ yüklenme oranı (%)
0.25 µg/µl.	-7.2	31.5
0.45 µg/µl.	12.5	27.0
0.49 µg/µl.	20.5	23.8

Tablo 3.1'de inkübasyon metodu ile yüklenmiş Cisplatin™-PMMA oranları, Cisplatin™ konsantrasyonu arttıkça yüklenmenin arttığı, SP-PMMA'da ise konsantrasyon arttıkça yüklenmenin azaldığı görülmektedir. Bu nedenle ilaç gerçekten PMMA ve SP PMMA üzerinde adsorbe olduğunu yada santrüfuj sırasında dibe polimerle birlikte çöküp çökmediğini anlamak amacıyla yüklenme sonrası pelletin dH₂O ile yıkanarak her basamakta çöktürme sonrası süpernatantın absorbansları alınmıştır. Buna göre

yıkamalar sonunda alınan absorbanlar arasındaki farklılıklar aşağıda verilmiştir (Tablo 3.2). Yıkamalar sonunda pellet ilk olarak 80 °C'de kurutularak 1:1 oranında kloroform:dH₂O içinde çözüldü. Bir süre pipetaj yapılarak pelletin çözünmesi sağlandı. İki faz oluştuğundan sonra, altta kalan faz ilacın içinde çözündüğü faz olduğu için spektrofotometrede absorbanı alındı. Kloroform fazında ise nanoparçacıkların çözündüğü gözlemlendi. Buradaki amaç, yüklenmiş olduğunu düşündüğümüz ilacın yıkamalar sırasında ayrılarak gerçekten yükleme olup olmadığının belirlenmesidir. Ayrıca nanoparçacıkların yüzeyine adsorbe olmayıp, parçacıkların içine girmiş olabilecek muhtemel Cisplatin™'in ayrılması ve tespit edilmesidir. Ancak alt fazın absorbanını almak özellikle üst fazdaki nanoparçacıkların ortamı bulanık hale getirmesi nedeniyle mümkün olmamıştır. Bu nedenle yükleme için alternatif metotlar denenmiştir.

Tablo 3.2 Yıkamalar sonunda süpernatanttan alınan absorbanlar (OD= 210 nm).

		0.25 µg/µl.	0.45 µg/µl.	0.49 µg/µl.
Yıkama öncesi	PMMA	1.992	2.216	2.229
	SP-PMMA	1.942	2.180	2.183
1.yıkama	PMMA	0.173	0.214	0.167
	SP-PMMA	0.369	0.558	1.141
2.yıkama	PMMA	0.034	0.04	0.024
	SP-PMMA	0.433	0.164	0.118
3.yıkama	PMMA	0.027	0.029	0.026
	SP-PMMA	0.519	0.152	0.082
4.yıkama	PMMA	0.018	0.003	0.084
	SP-PMMA	0.546	0.089	0.036

3.2.2.2. İmmobilizasyon Tekniği ile Yükleme

İmmobilizasyon tekniğine göre yükleme Chen ve arkadaşları tarafından belirlenen protokole göre yapılmıştır [43]. Detaylı protokol, Bölüm 2.2.5.4.b'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Sonikasyon sonrası yapılan santrüfüj işleminden sonra süpernatantların absorbanı alındı. İşlem iki ayrı bağımsız

deneyle yapıldı. Yalnız işlem sırasında kullanılan buffer sistemleri ve özellikle immobilizasyonda kullanılan Karbodimit'in aynı absorbandsda verdiği değeri kontrol etmek için kontrol gruplarımız detaylı bir şekilde analiz edilmiştir (Tablo 3.3). Karbodimit içeren çözeltinin referans olarak alındığı durumda, Cisplatin™'in maksimum absorbands verdiği dalga boyunda Cisplatin™ absorbands değerinin beklenilenden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu duruma karbodiimitin de aynı dalga boyunda absorbands veriyor olması sebep olmaktadır (Tablo 3.4). Bu sonuçlara göre, Cisplatin™'in nanoparçacıklara yüklenip yüklenmediği konusunda net bir yorum yapmamız mümkün değildir.

Tablo 3.3 İmmobilizasyon tekniği ile yapılan yüklemelerin absorbands değerleri (OD= 210 nm.)

Yükleme	PMMA Absorbans	SP-PMMA Absorbans
1. yükleme	2.34	2.35
2. yükleme	2.28	2.28

Tablo 3.4 İmmobilizasyon tekniği ile yapılan kontrol yüklemelerinin absorbands değerleri (OD= 210 nm.)

Kontrol Yükleme Sonuçları	PMMA absorbands	SP-PMMA absorbands
PMMA + Buffer A	0.06	0.37
PMMA + Buffer A + Karbodiimit	2.35	2.46
PMMA + Buffer A + Karbodiimit + Cisplatin™	2.28	2.28

*Kör olarak Buffer A kullanılmıştır.

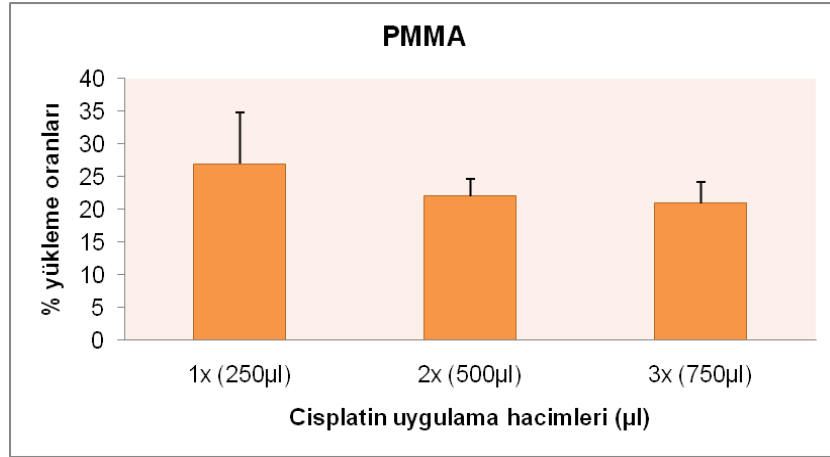
3.2.2.3 Hidroksilleme ile Yükleme

Hidroksilleme metodu ile nanoparçacıkların yüzeyindeki hidroksil gruplarının sayısı artırılarak Cisplatin™ için daha fazla bağlanma yüzeyinin oluşturulması amaçlanmıştır.[41,46] Bu metot da bölüm 2.2.5.4.c'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Pellet, pH nötr veya asidik olana kadar dH₂O ile yıkanmıştır. Ortalama pellet ağırlığı 0.12-0.13g olacak şekilde pelletler üzerine 250 µl (1X), 500 µl (2X) ve 750 µl (3X) Cisplatin™ ve kontrol grubu olarak dH₂O ilave edildi. 5 dakika vorteks yapıldıktan sonra 37 °C'de çalkalayıcı etüvde 24 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan örneklerde süpernatantın absorbansı alınarak yüklenme oranları hesaplandı. Aynı deney grupları SP-PMMA içinde ayrı olarak düzenlenmiştir (Tablo 3.5).

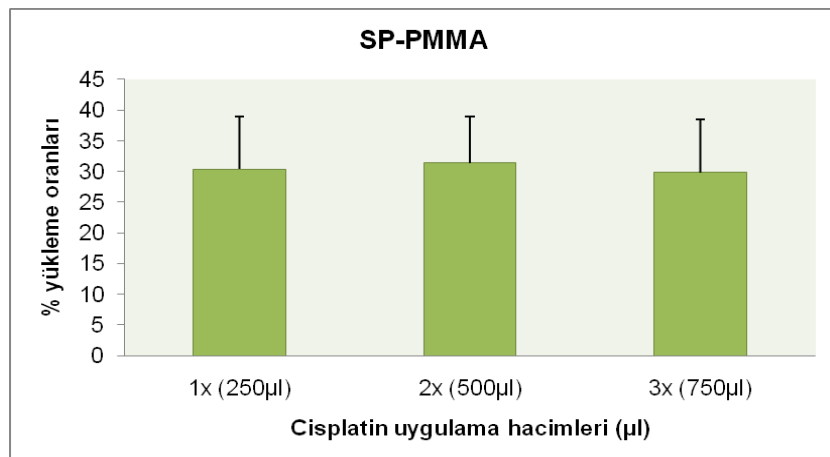
Tablo 3.5 Hidroksilleme tekniği ile elde edilen % yükleme oranları. Yükleme dört defa tekrarlanmıştır.

Cisplatin™ konsantrasyonu		PMMA + Cisplatin™ yüklenme oranı(%)	SP-PMMA + Cisplatin™ yüklenme oranı(%)
250 µl Cisplatin™ (0.5 mg/ml)	1.Tekrar	25	30
	2.Tekrar	22	20
	3.Tekrar	20	30
	4.Tekrar	28	40
500 µl Cisplatin™ (0.5 mg/ml)	1.Tekrar	26	30
	2.Tekrar	22	20
	3.Tekrar	20	30
	4.Tekrar	22	40
750 µl Cisplatin™ (0.5 mg/ml)	1.Tekrar	27	31
	2.Tekrar	18	22
	3.Tekrar	20	40
	4.Tekrar	20	26

Sonuç olarak, hem PMMA hem de SP-PMMA için yaklaşık olarak %30 yükleme tespit edilmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Kullanılan üç farklı konsantrasyonun yükleme oranına istatistiksel olarak etkisi olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni muhtemelen polimerin yüklenme açısından doygunluğa ulaşmış olabileceğidir. Ayrıca yüklenme oranlarından kesin olarak emin olmak için IR spektrofotometre çalışmaları yapılmıştır



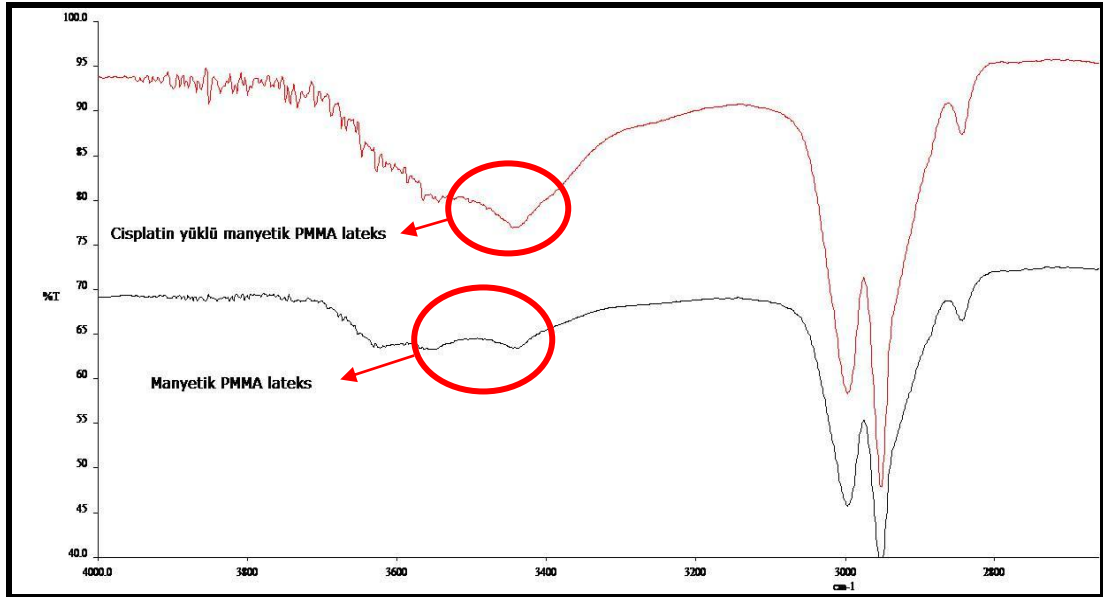
Şekil 3.9 Cisplatin™'in üç farklı hacimde (µl) PMMA latekse bağlanma % oranlarının grafiği.



Şekil 3.10 Cisplatin™'in üç farklı hacimde (µl) SP-PMMA latekse bağlanma % oranlarının grafiği.

3.2.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) Spektrofotometre Sonuçları

Hidroliz sonucu oluşan hidroksil gruplarının etkisiyle genişlemiş 3400-3600 cm^{-1} aralığındaki band Cisplatin™'in yüklenmesiyle hafifçe daralmış ve şiddetini arttırmıştır. Bunun nedeni Cisplatin™'deki 3300-3500 cm^{-1} aralığında pik veren amin grupları olmalıdır (Şekil 3.11). Böylece Cisplatin™'in latekse kimyasal olarak bağlandığı FT-IR spektrumu ile gösterilmiştir.

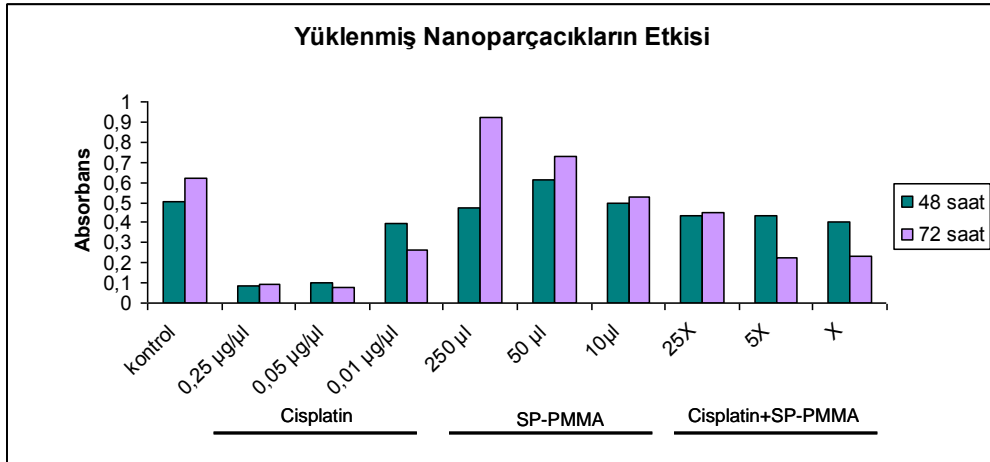


Şekil 3.11 FT-IR Spektrofotometrisinde Cisplatin™ yüklemesinin gösterilmesi.

3.3 Yüklenmiş Nanoparçacıkların Sitotoksisite Çalışmaları

Cisplatin™ ile yüklenmiş nanoparçacıkların hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.2.6'da belirtilen şekilde Hep3B hücrelerine uygulama yapılmıştır. Kısaca 24 kuyucuklu plakada büyümekte olan hücrelere pozitif kontrol olarak 3 farklı konsantrasyonda Cisplatin™ ve yine nanoparçacığın etkisini görmek amacıyla kontrol grubu olarak 3 farklı konsantrasyonda SP-PMMA uygulaması yapılmıştır. Yüklenmiş

nanoparçacıklar çöktürme sonrası 2 ml medyum içinde çözülerek benzer şekilde 3 farklı konsantrasyonda hücelere uygulanmıştır ve MTT testi ile sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Cisplatin™ ile yüklenmiş SP-PMMA nanoparçacıklarının konsantrasyona bağlı absorbans grafiği. (OD= 550nm)

Sonuç olarak, Cisplatin™ hücelerde hem 48 saat hem de 72 saatte sitotoksik etkisini göstermiştir. SP-PMMA ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücelerde 48 ve 72 saatte proliferatif etki göstermektedir. Cisplatin™ ile yüklenmiş SP-PMMA 48 saatte hücelere üzerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etkili görünmemektedir. Ancak 72 saatte hücelerde sitotoksik etkiye sebep olmuştur.

4.SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser normal hücrelerin çoğalması, olgunlaşması ve diğer fonksiyonlarındaki bütünlüğün kaybolması ile karakterize edilir. Dünyada her yıl yaklaşık 12 milyon kişi kansere yakalanıyor ve yaklaşık 7.6 milyon kişi kanserden yaşamını yitiriyor. Kanser, sadece tek bir hastalık olmayıp, ortak özelliklere sahip 200'den fazla hastalık için kullanılan genel bir terimdir.

Her hastalıkta olduğu gibi kanser tedavisinde birçok tedavi yaklaşımı bulunmaktadır. Ancak kansere karşı en önemli tedavi bağışıklık sisteminin güçlendirilmesidir. Ayrıca kanserin erken tanısı da tedavide başarıyı etkileyen diğer önemli faktördür. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan en etkili yöntemlerden kemoterapi, hem tek başına hem de diğer tedavi yöntemleri ile kombine olarak kullanılabilir. Kemoterapide amaç, normal hücrelere göre daha hızlı çoğalan hücreleri tahrip etmektir. Bunun için kullanılan çok sayıda kemoterapi ilacı bulunmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının ortak özelliği kanser hücresi ve normal hücreler arasında ayırım yapmaksızın hızla büyüyen çoğalan hücrelere zarar vermeleridir. Vücudumuzdaki diğer hızlı bölünme yeteneğindeki hücreler de bu nedenle kemoterapiden etkilenmektedir. Hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemleri ile özellikle bu yan etkilerin ortadan kaldırılması ve ilaçların düşük seçicilik özelliklerinin artırılması amaçlanmaktadır. Özellikle bir polimer-ilaç konjugasyonunun ilaçların yan etki sorunlarını ortadan kaldırarak daha uzun süreli aktivite oluşumuna sebep olabileceği düşünülmektedir [47]. İlaç yüklü mikrosferlerin geliştirilmesinin genellikle bu istenmeyen yan etkilerin ortadan kaldırılmasında ve aktivite süresinin uzatılmasında faydalı olacağına inanılmaktadır.

Bu amaçla pek çok polimer sistemine ilaçların yüklenmesi ile çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Bu nedenle ilaçlar farklı polimerlere farklı tekniklerle yüklenmekte, ilaç salınımı düzeyi kontrol edilmektedir. Bu stratejideki diğer bir sorun da nanoparçacıkla yüklenmiş hedefe spesifik ilaçların, vücuda verildiği zaman diğer kan serum proteinleri ve hücrelere etkileşimleridir. Bağışıklık sistem de hedefe odaklı bu ilaçların diğer bir sorunudur. Bu tip sorunları çözmek için kemoterapik ilaçlar farklı polimerlere yüklenmektedir. Örneğin: kendiliğinden birleşen nanoparçacıkların ilaç yüklenmesinde kullanılmasıyla ilgili literatürde çalışmalar vardır. Bu nanoparçacıklar hidrofobik çekirdek bölümü ve hidrofilik gruplar içeren dış kabuğa sahiptir. Kendiğinden birleşen nanoparçacıkların ampifilik yapılarının ilaç taşınımında özellikle suda çözünmeyen yapıdaki ilaçlar için kullanıldıklarında önemli avantajlar sağlayacağı düşünülmektedir. Çünkü hidrofobik yapıdaki iç çekirdek ilaç bağlanma bölgesini oluştururken, hidrofilik yapıdaki dış kabuk, makrofajlar ve plazma proteinleri gibi biyolojik yapıların saldırısından nanoparçacığı korumaktadır [48]. 1µm'den daha küçük boyutlardaki ilaç yüklü polimerik parçacıklar, yüklenmiş olan ilacın salınımını sağlamaları, küçük boyutlarda olmaları ve yüksek yüzey hacmine sahip olmalarından dolayı kullanılmışlardır. Bizim çalışmamızda da seçtiğimiz nanoparçacıkların küçük boyutlarda olmaları, yüksek yüzey hacmine sahip olmaları ve manyetik özellikleri nedeniyle, ilacın hedefe yönlendirilmesinde avantaj sağlayacağı muhakkaktır.

Manyetik nanoparçacıkların tanı ve tedavide özellikle tıp alanında oldukça geniş uygulamaları vardır. Manyetik alan manyetik süper paramanyetik nanoparçacıkları, hedef organ ve dokuya yönelmesini sağlamaktadır. Fakat nanoparçacıklara özellikle kemoterapi ilacı yüklenmesiyle ilgili oldukça sınırlı çalışma vardır. *Kumar* ve arkadaşları tarafından farklı moleküller manyetik nanoparçacıklarla farelere verilmiş ve fareler üzerinde yaptıkları deneyde manyetik alanla bu parçacıkların yönlendirilebildiği bulunmuştur [31]. İlaç yükleme deneylerinde, polimer olarak farklı polimerler kullanılmasına rağmen, bunlar arasında biyoyumluluğu yüksek olması nedeniyle Chitosan çok kullanılmıştır. Bizim

çalışmamızda da biyouyumlu olduğu bilinen PMMA polimeri kullanılmıştır. Polimetilmetakrilat (PMMA) ortodonti ve ortopedide protezlerde sıklıkla kullanılan bir polimerdir. Bu polimerlerin konakçı dokulara uyumunu belirlemek için *in vivo* ve *in vitro*'da birçok biyouyumluluk testi yapılmıştır. Bu özelliklerin bir kısmı, hücre kültürü çalışmalarında *in vitro* olarak çalışılmıştır [27]. PMMA'lar Amerikan Yiyecek ve İlaç Denetleme Kurumu (Food and Drug Administration) tarafından birçok biyomedikal malzemedeki kullanımı kabul görmüş polimerlerdir [49]. Çeşitli PMMA formları ticari olarak da satın alınabilmektedir [26]. Bu çalışmada, Yrd. Doç. Dr. Taner TANRISEVER ve Prof. Dr. Hakan KÖÇKAR tarafından yönetilen Yrd. Doç. Dr. Seda CAN BEYAZ tarafından doktora çalışmaları sırasında sentezlenmiş PMMA ve SP-PMMA nanoparçacıkları kullanılmıştır. Parçacıkların kimyasal, yapısal, fiziksel ve manyetik karakterizasyonu aynı ekip tarafından yapılmıştır. Bu manyetik nanoparçacıklara özellikle kemoterapi ilaçlarının yüklenmesi planlanmıştır. Öncelikle PMMA ve SP-PMMA'nın *in vitro* sitotoksik etkileri araştırılmıştır [41]. Bu amaçla karaciğer kanser hücre hattı Hep3B hücreleri kullanılmıştır. Sentezlenen ve hem fiziksel hem de kimyasal karakterizasyonları yapılan bu nanoparçacıklardan özellikle SP-PMMA ile yapılan bu çalışmalar konu ile ilgili ilk veriler niteliğindedir. Çünkü SP-PMMA'nın bir biyolojik sistem üzerinde etkileri hakkında literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Nanoparçacıklar ile aynı zamanda kemoterapide yaygın olarak kullanılan Cisplatin™ ve 5FU ilaçlarının da karaciğer kanser modelinde (Hep3B) sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

Kullanılan nanoparçacıkların ve Cisplatin™'in hücreler üzerindeki toksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu metot canlı hücrelerin sarı tetrazolium tuzu olan MTT'yi suda çözünmeyen koyu mavi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Yalnızca metabolik olarak aktif yani canlı hücreler tarafından formazan kristalleri haline dönüştürülebilen tetrazolium tuzları kullanarak canlı hücrelerin belirlenmesini sağlayan etkili bir yöntemdir. Buna göre Cisplatin™'in uygulanan tüm zaman aralıklarında ve özellikle 0.25 µg/µl ve 0.05 µg/µl konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkisi

görülmektedir. Cisplatin™ hücrelerde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur.

PMMA ve SP-PMMA ise uygulanan bütün konsantrasyonlar ve zaman aralıkları için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitotoksik etkilerinin olmadığı görülmüştür. Yalnızca SP-PMMA uygulanan hücrelerde 48 ve 72 saatte hücre canlılığında bir miktar azalma olduğu belirlenmiş olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PMMA'nın hücreler üzerinde 24 saatte hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında ise, hücreler üzerinde sitotoksik etkisi bulunmayan, biyouyumlu PMMA ve SP-PMMA nanoparçacıklarına ilaç yükleme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında farklı teknikler kullanılmıştır [43]. Bu teknikler içerisinde hidrosilleme metodunun daha sonradan ilaç yüklemesinin belirlenmesinde daha kullanışlı bir teknik olduğu tespit edilmiştir. Hidrosilleme ile yapılan yüklemede %30 oranında başarı sağlanmıştır. Kullanılan farklı polimer ve ilaçların fiziksel ve kimyasal özelliklerine uygun olarak yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. *Liang* ve arkadaşları 5FU ile yapılan çalışmada, hidrojel nanoparçacıklar olan PA, PA/SDM1 ve PA/SDM2'leri kullanmışlar ve bu polimerlerin hidrofobik domainlerinden yararlanarak 5FU'yu polimerlere sırasıyla %30.8, %21.4 ve %26.6 oranında yüklemeyi başarmışlardır [48]. *Koppolu* ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada çok katmanlı nanoparçacıklar olan PNIPAAm ve PLGA'ya yüklenmek üzere BSA ve Curcumin model ilaç olarak kullanılmıştır. Yüklenme oranları; BSA'nın PNIPAAm'ye yüklenmesi için %65, Curcumin'in PLGA'ya yüklenmesi için %49.5 olarak tespit edilmiştir [29]. Adsorbsiyon metodu kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise poli(akrilamid-co-metilmetakrilat) polimerinin 5FU ile yüklenmesi yapılmış ve 5FU miktarı arttıkça yüklenme oranı da %69 oranında %79 oranına kadar yükselmiştir [17].

Yüklenen ilaçların sitotoksisite çalışmalarında; Cisplatin™ ile yüklenmiş nanoparçacıkların özellikle 72 saatte hücrelerde etkili olduğu gözlenmiştir. SP-PMMA, tek başına hücrelerde proliferatif etki gösterirken, Cisplatin™'le yüklenmiş SP-PMMA, hücrelerde belirgin bir şekilde azalmaya neden olmuştur.

Cisplatin™ ile ilgili olarak literatür taraması yapıldığında bazı çalışmalara rastlanmaktadır. Cisplatin™'in kimyasal olarak polimer–metal kompleksi oluşturmak üzere polimerlerle konjuge edildiği ilk çalışmada, *Kataoka* ve arkadaşları tarafından Cisplatin™ ve poly(ethylene glycol)–poly(aspartic acid) blok kopolimerleri arasında bir bağlanma gösterilmiştir [50]. Sonraki çalışmalar ise bu komplekslerin antikanser etkilerini *in vivo* olarak belirlenmesini kapsamaktadır. Ancak Cisplatin™'in polimer ile bağlanmış durumda iken sitotoksik etkisinin olmadığı, ilacın polimerden salınımından sonra etkili olduğu gözlenmiştir.

Cisplatinin polimerik implantlara yüklenmesi sonucunda sistemik toksisitesinin düştüğü ve aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bu polimerik sistemde yapıtaşları olarak poli(akrilik asit) ve MMA (metilmetakrilat) kullanılmıştır. Akrilik polimerler farelerde deri altı implantı olarak 24 günlük zaman diliminde uygulandıklarında yüksek *in vivo* tolerans göstermişlerdir. Biyoadeziv özelliği ile poli(akrilik asit) bir çok farklı taşıma sistemi için iyi bir adaydır. Daha önemlisi, poli (akrilik asit)'te bulunan karboksilik gruplar birçok ilaçta bulunan gruplarla bağ yapabilmektedir [19]. Cisplatin, iyonik çekirdekli misellere de çekirdeklerde bulunan karboksilli gruplarla kompleks oluşturarak yüklenmiştir, fakat ampifilik polimerlerin kullanıldığı bir cisplatin taşıma sistemi bulunmamaktadır [51-53].

Sonuç olarak bu çalışma, literatürde sınırlı bilgi bulunan SP-PMMA'nın bir biyolojik sistem üzerindeki biyouyumlu etkileri hakkında ilk verileri sağlamaktadır. Ayrıca çalışmamız sonucunda kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan Cisplatin™'in daha önce kullanılmamış bir yöntem

olan hidroksilleme tekniği ile SP-PMMA'ya yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. Yüklenmiş nanoparçacıkların, hücreler üzerindeki toksik etkileri hakkında da ilk bilgileri elde etmemizi sağlamıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen bilgiler, ilaç salınımı ve hedefe spesifik olarak ilacın yönlendirilmesi ile ilgili çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

KAYNAKLAR

[1] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Molecular Biology Of The Cell, ed. Anderson, M., Granum, S., 5th edition, Garland Science, New York, (2008).

[2] Gabriel, J., The Biology of Cancer, ed. Gabriel, J., Whurr Publishers London and Philadelphia, (2004).

[3] Song, J., Xie, H., Lian, Z., Yang, G., Du, R., Du, Y., Zou, X., Jin, H., Gao, J., Liu, J., Fan, D., "Enhanced cell survival of gastric cancer cells by a novel gene URG4" *Neoplasia.*, 8(12), (2006), 995-1002.

[4] Bozkurt, H., Bazı Cisplatin Analoglarının Sitotoksitesinin Ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2004).

[5] Uçar, F., Ovalı, E., Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kitabı, Isparta, (2003), 1-9.

[6] Lowitz, B.B., Casciato, A.D, "Cancer Biology and Oncogens" , Medical Oncology and Principles Of Cancer Biology, (2003).

[7] Hamzaoğlu, O., Özcan, U., "Türkiye İstatistik Yıllığı 2004"., DİE 2005, Türkiye Sağlık İstatistikleri 2006, *Türk Tabipleri Birliği Yayınları*, Birinci Baskı Aralık (2005).

[8] Hamzaoğlu, O., Özcan, U., "Sağlık İstatistikleri, 2003"., SB 2004, Türkiye Sağlık İstatistikleri 2006, *Türk Tabipleri Birliği Yayınları*, Birinci Baskı Aralık (2005).

[9] <http://www.saglik.gov.tr/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF71BE64510F6C8BC92747D9FFFE7A122>(Temmuz 2010)

[10] Cabadak, H., "Hücre Siklusu Ve Kanser", *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3),(2008), 51 – 61.

[11] <http://homepage.mac.com/enognog/checkpoint.htm> (Ocak 2011).

[12] Cancer Council Australia
<http://www.cancer.org.au/aboutcancer/treatment.htm> (Ocak 2011).

[13] http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/s_liu/Html (Temmuz 2010).

[14] Zhou, Q., Chan, E., "Effect of 5-fluorouracil on the anticoagulant activity and the pharmacokinetics of warfarin enantiomers in rats.", *Eur J Pharm Sci.* 17(1-2) ,(2002),73-80.

[15] Casale, F., Canaparo, R., Serpe, L., Muntoni, E., Pepa, C.D., Costa, M., Mairone, L., Zara, G.P., Fornari, G., Eandi, M., "Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients.", *Pharmacol Res.* 50(2),(2004),173-9.

[16] McCarron, P.A., Hall, M., "Incorporation of novel 1-alkylcarbonyloxymethyl prodrugs of 5-fluorouracil into poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.348, Issues 1, (2008), 2115-124.

[17] Babu, V.R., Sairam, M., Hosamani, K.M., Aminabhavi, T.M., "Development of 5-fluorouracil loaded poly(acrylamide-co-methylmethacrylate) novel core-shell microspheres: in vitro release studies." *Int. J. Pharm.* 15;325(1-2), (2006), 55-62.

[18] Menei, P., Venier, M.C., Gamelin, E., Saint-André, J.P., Hayek, G., Jadaud, E., Fournier, D., Mercier, P., Guy, G., Benoit, J.P., "Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma: a pilot study.", *Cancer.*, 15;86(2), (1999), 325-30.

[19] Yan, X., Gemeinhart, R.A., "Cisplatin delivery from poly(acrylic acid-co-methyl methacrylate) microparticles.", *J Control Release.*, 8;106(1-2), (2005), 198-208.

[20] Gryparis, E.C., Hatziapostolou, M., Papadimitriou, E., Avgoustakis, K., "Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells." *Eur J Pharm Biopharm.*, 67(1), (2007), 1-8.

[21] Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.", *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 1;75(1), (2009),1-18.

[22] Pinto, R.C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles.", *Nanomedicine.* 2(1), (2006), 8-21.

[23] Chouhan, R., Bajpai, A.K., "Release dynamics of ciprofloxacin from swellable nanocarriers of poly(2-hydroxyethyl methacrylate): an in vitro study", *Nanomedicine* Vol. 6, 3, (2010), 453-462.

[24] Ebrahimnejad, P., Dinarvand, R., Sajadi, A., Jaafari, M.R., Nomani, A.R., Azizi, E., Rad-Malekshahi, M., Atyabi, F., "Preparation and in vitro evaluation of actively targetable nanoparticles for SN-38 delivery against HT-29 cell lines.", *Nanomedicine.*, 6(3), (2009), 478-85.

[25] Polacco, G., Cascone, M.G., Lazzeri, L., Ferrara, S., Giusti, P., "Biodegradable hollow fibres containing drug-loaded nanoparticles as controlled release systems", *Polym. Int.*, 51, (2002),1464–1472.

[26] Bulut, E., Sekonder Göz İçi Lens İmplantasyonlarımız: Pmma Ve Katlanabilir Transskleral Fiksasyonlu Göz İçi Lens İmplantasyonu Klinik Sonuçlarının Karşılaştırılması., Uzmanlık Tezi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Kliniği, (2006).

[27] Lampin, M., Clérout, W., Legris, C., Degrange, M., Sigot-Luizard, M.F., "Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration.", *J. Biomed Mater Res.*, 36(1), (1997), 99-108.

[28] McManus, A.J., Doremus, R.H., Siegel, R.W., Bizios, R., "Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites.", *J Biomed Mater Res A.* 1;72(1), (2005), 98-106.

[29] Koppolu, B., Rahimi, M., Nattama, S., Wadajkar, A., Nguyen, K.T., "Development of multiple-layer polymeric particles for targeted and controlled drug delivery.", *Nanomedicine*. 6(2), (2009), 355-61.

[30] Kettering, M., Zorn, H., Bremer-Streck, S., Oehring, H., Zeisberger, M., Bergemann, C., Hergt, R., Halbhuber, K.J., Kaiser, W.A., Hilger, I., "Characterization of iron oxide nanoparticles adsorbed with cisplatin for biomedical applications.", *Phys Med Biol*. 7;54(17), (2009), 5109-21.

[31] Kumar, A., Jena, P.K., Behera, S., Lockey, R.F., Mohapatra, S., Mohapatra, S., "Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery.", *Nanomedicine*., 6(1), (2009), 64-9.

[32] Zahn, M., Sheenton, K.E., "Magnetic fluids bibliography", *IEEE Trans.Magn.*,16, 2, (1980),387.

[33] Van Ewijk, G.A., Vroege, G.J., Philipse, A.P., "Convenient preparation methods for magnetic colloids", *J. Magn. and Magn. Mat.*,201,(1999),31.

[34] Elaissari, A., "Review: Magnetic colloids: preparation and biomedical applications" *e-Polymers*,(2005), 28.

[35] Maeda, M., Kuroda, C.S., Shimura, T., Tada, M., Abe, M., Yamamuro, S., Sumiyam, K., Handa, H., "Magnetic carriers of iron nanoparticles coated with a functional polymer for high throughput bioscreening.", *J.App.Phys.* 99,(2006),08H103.

[36] Patton, W.F., Kim, J., Jacobson, B.S., "Rapid, high-yield purification of cell surface membrane using colloidal magnetite coated with polyvinylamine: sedimentation versus magnetic isolation", *Biochem. Biophys. Acta.*, 816,(1985),83.

[37] Kemshead, J.T., Treleaven, J.G., Gibson, F.M., Ugelstad, J., Rembaum, A., Philip, T., "Removal of malignant cells from bone marrow using magnetic microspheres and monoclonal antibodies", *Prog. Exp. Tumor Res.*,29,(1985),249.

[38] Gupta, P.K., Hung, C.T., "Magnetically controlled targeted micro-carrier systems", *Life Sci.*, 44,(1989),175.

[39] Lübbe, A.S., Alexiou, C., Bergemann, C., “Clinical applications of magnetic drug target” *J. Surgical Research*, 95,(2001),200.

[40] Gupta, A.K., Gupta, M., “Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications”, *Biomaterials*, 26, (2005), 3995.

[41] Beyaz, S., Süperparamanyetik Nano-Manyetit İçeren Lateks Eldesi Ve Karakterizasyonu., Doktora tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, (2009).

[42] Gaihre, B., Khil, M.S., Lee, D.R., Kim, H.Y., “Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study.” *Int J Pharm.* 5;365(1-2), (2009),180-9.

[43] Chen, D.H., Liao, M.H., “Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles.”, *J Mol Catal B*,16, (2002), 283–91.

[44] Kockar, F., Beyaz, S., Sinan, S., Köçkar, H., Demir, D., Eryılmaz, S., Tanrisever, T., Arslan, O.,. “Paraoxonase 1-bound magnetic nanoparticles: preparation and characterizations.”, *J Nanosci Nanotechnol.* ,10(11), (2010), 7554-9.

[45] Gaihre B, Khil MS, Lee DR, Kim HY. “Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study.” *Int J Pharm.*, 5;365(1-2), (2009),180-9.

[46] Yang, C., Xing, J., Guan, Y., Liu, H.”Superparamagnetic poly(methyl methacrylate) beads for nattokinase purification from fermentation broth.”, *Appl Microbiol Biotechnol* 72, (2006), 616–622.

[47] Ouchi, T., Tada, M., Matsumoto, M., Ohya, Y., Hasegawa, K., Arai, Y., Kadowaki, K., Akao, S., Matsumoto, T., Suzuki, S., Suzuki, M., “Design of macromolecular prodrug of Sflurouracil using N-acetylpolygalactosamine as a targeting carrier to hepatoma.” *Reactive & Functional Polymers* 37, (1998), 235-244.

[48] Liu, L., Jin, P., Heng, M., Zhang, G. And Zhang F., “5-Fluorouracil-loaded Self-assembled pH-sensitive Nanoparticles as Novel Drug Carrier for Treatment of Malignant Tumors”, *Chinese J. Chem. Eng.*, 14(3), (2006), 377-382.

[49] McManus, A.J., Doremus, R.H., Siegel, R.W., Bizios, R., "Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites.", *J Biomed Mater Res A*. 1;72(1), (2005),98-106.

[50] Nishiyama, N., Kataoka, K., "Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the core.", *J.Control. Release* 74 (2001) 83–94.

[51] Nishiyama, N., Okazaki, S., Cabral, H., Miyamoto, M., Kato, Y., Sugiyama, Y., Nishio, K., Matsumura, Y., Kataoka, K., *Cancer Res.* 63, (2003), 8977.

[52] Bronich, T.K., Kabanov, A.V., *Polym. Prepr. (ACS)* 45, (2004), 384.

[53] Xu, P., Van Kirk, E.A., Li, S., Murdoch, W.J., Ren, J., Hussain, M.D., Radosz, M., Shen, Y., "Highly stable core-surface-crosslinked nanoparticles as cisplatin carriers for cancer chemotherapy" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48, (2006), 50–57.