

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİNKO KATKILANMIŞ HİDROKSİAPATİT
NANOPARÇACIKLARININ KANSER HÜCRELERİNİN
RADYODUYARLILIĞINA ETKİSİ**

Fiz. Müh. Fazlı Yağız Yedekçi

**Radyoterapi Fiziği Programı
Doktora Tezi**

**ANKARA
2019**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİNKO KATKILANMIŞ HİDROKSİAPATİT
NANOPARÇACIKLARININ KANSER HÜCRELERİNİN
RADYODUYARLILIĞINA ETKİSİ**

Fiz. Müh. Fazlı Yağız Yedekçi

**Radyoterapi Fiziği Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Murat Gürkaynak**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Mete Yeğiner**

**ANKARA
2019**

ONAY SAYFASI

**Çinko Katkılanmış Hidroksiapatit Nanoparçacıklarının Kanser Hücrelerinin
Radyoduyarlılığına Etkisi
Fazlı Yağız Yedekçi**

Danışman: Prof.Dr. Murat Gürkaynak

İkinci Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Mete Yeğiner

Bu tez çalışması 09.04.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Radyoterapi Fiziği Programı"
nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof.Dr.Fadıl Akyol
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof.Dr.Gökhan Özyiğit
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof.Dr.Lale Doğan
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof.Dr.Zafer Evis
(Orta Doğu Teknik Üniversitesi)

Üye:

Doç.Dr.Çağdaş Yavaş
(Selçuk Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

06 Mayıs 2019

Diclehan ORHAN

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

06/05/2019

(İmza)

FAZLI YAĞIZ YEDEKÇİ

¹"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

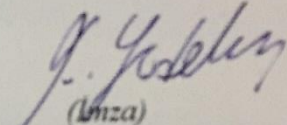
(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerde ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. H. Murat Gürkaynak danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.


(İmza)
Fiz.Müh. Fazlı Yağız Yedekçi

TEŞEKKÜRLER

Hacettepe Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gökhan Özyiğit'e ve Anabilim Dalı'nda görevli tüm hocalarıma,
Radyoterapi Fiziği Doktora Programındaki eğitimimiz boyunca yönlendirmeleri ve tecrübesiyle, bana ve programa katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Fadıl Akyol'a,
Öğrenciliğim süresince her zaman her şeyi danışabildiğim, yardım ve desteğini benden esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Murat Gürkaynak'a,
Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, bölüm olanaklarından faydalanmamızı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. A. Lale Doğan'a,
Bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, bölüm olanaklarını kullanmamı sağlayan Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Zafer Evis'e,
Hücre kültürü deneylerinde gece gündüz, özveriyle çalışan, çalışma süresince karşılaştığımız sorunların çözümünde elinden geleni yapan, doktora öğrencisi Sayın M. Emre Gedik'e,
Eğitimim boyunca yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında çalışan iş arkadaşlarım Sayın Dr. Fatih Biltekin, Sayın Hüseyin Kıvanç, Sayın Demet Yıldız, Sayın Gözde Düğel İmran, Sayın Bülent Ünlü ve Sayın Talip Yolcu'ya,
Her zaman her konuda bana destek olan eşim Buşra Yedekçi'ye ve sevgili aileme,
Bu çalışmayı destekleyen Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine,
Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜRLER	vi
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Radyoterapinin Kanser Tedavisindeki Önemi	5
2.2. İyonlaştırıcı Radyasyonun Etki Mekanizması	5
2.3. Hücre Sağ Kalım Eğrileri	7
2.3.1. <i>MD Anderson-Metastatic Breast-231</i> Hücre Dizisi	10
2.3.2. 3- (4,5-dimetiltiyazolil-2) -2,5-difeniltetrazolyum Bromür Testi	10
2.3.3. MTT testi ve Sağ Kalım Eğrilerinin Oluşturulması	11
2.3.4. Hücre Sağ Kalım Eğrilerini Etkileyen Faktörler	11
2.4. Radyoterapinin Etkinliğinin Arttırılması	13
2.4.1. Radyoduyarlaştırıcı Nanoparçacıklar	16
2.5. Hidroksiapatit	20
2.6. Apoptoz	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Hidroksiapatit Sentezi	25
3.2. Hidroksiapatitlerin Karakterizasyonu	26
3.2.1. X Işını Kırınımı Analizi	26
3.3. MTT ile Sitotoksisite Testi	27
3.4. MTT Analizi İle Işınlama Sonrası Hücre Sağkalımlarının Belirlenmesi	28
3.5. HA'ların Işınlanan Hücrelerin Sağkalımına Etkisinin İncelenmesi	30
3.6. Western Blot Tekniği	31
3.6.1. Protein Lizatlarının Elde Edilmesi ve Protein Kantitasyonu	31

3.6.2. SDS Jel Elektroforezi ve Western Blot	31
3.6.3. Kemilüminesans Görüntüleme ve Dansitometrik Analiz	32
3.7. İstatiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Sentetik Olarak Sentezlenmiş Hidroksiapatitlerin Karakterizasyonu	33
4.2. SEM Görüntüleri	36
4.3. MTT Sitotoksosite Test Sonuçları	38
4.4. MTT testi ile Hücre Sağkalımların Elde Edilmesi İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmasının Sonuçları	41
4.5. HA'ların Radyoduyarlığa Etkisi ve Yapılan MTT Testi Sonuçları	47
4.6. MDA MB 231 hücrelerinde kaspaz-3 ve PARP ekspresyonunun incelenmesi	49
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR	58
7. KAYNAKLAR	58
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışmasıyla ilgili Etik Kurul İzini	
EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK-3: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Yedekçi, F.Y., Çinko Katkılanmış Hidroksiapatit Nanoparçacıklarının Kansere Hücrelerinin Radyoduyarlılığına Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Radyoterapi Fiziki Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019. Bu çalışmada radyoduyarlılık profili açısından ilk kez araştırılacak çinko katkılı hidroksiapatit nanoparçacıklar sentezlenmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Tüm karakterizasyonlarda kullanılan örnekler 500 °C'de 2 saat kalsine edildikten sonra 900 °C'de 1 saat sinterlenmiştir. X-ışını kırınımı desenlerinde örneklerin referans 09-0432 hidroksiapatit pikleri ile örtüştüğü görülmüştür. Ancak çinko katkı miktarı arttıkça beta trikalsiyum fosfat fazları %1, %2, %5 ve %10 mol çinko katkılı örnekler için %7.3, %10, %33 ve %59 şeklinde arttığı izlenmiştir. Sentezlenen HA'ların bağ yapılarını incelemek amacıyla yapılan fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi analizleri sonucunda hidroksiapatitlerin tüm karakteristik pikleri %1, %2, %5 mol çinko katkılı örneklerde gözlenmiştir. Ancak %10 çinko katkılı numunelerde fosfat oksijen germe bağı gösteren 1087 cm⁻¹'deki band kaybolmuştur. Taramalı elektron mikroskobu görüntülerinden parçacık boyutları saf, %1 mol, %2 mol, %5 mol ve %10 mol çinko katkılı numuneler için sırasıyla 218, 245, 246, 302 ve 352 nm olarak ölçülmüştür. 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür testi ile 72 saat sonunda saf hidroksiapatite göre canlılığın %1 mol, %2 mol, %5 mol ve %10 mol çinko katkılı örnekler için sırasıyla %50, %38, %160 ve %150 olduğu görülmüştür. Hücre sağkalım eğrilerinin 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür testi ile oluşturulması için bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre testin yapılacağı en uygun zamanın 6 ve 8. günlerin olabileceği belirlenmiştir. Karakterizasyon ve canlılık testleri sonucunda %10 çinko katkılı hidroksiapatitlerde beta trikalsiyum fosfat oranının yüksek olması sebebiyle %5 çinko katkılı hidroksiapatit grubu western blot deneyinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda %5 çinko katkılı hidroksiapatitlerin biyoyumlu oldukları ve radyoterapi ile birlikte kullanıldıklarında hücre ölüm oranlarını arttırdığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiapatit, Radyoduyarlaştırıcılar, çinko katkılı nanohidroksiapatit, Radyoterapi

ABSTRACT

Yedekçi, F.Y., Effect Of Zinc Doped Hydroxyapatite Nanoparticles On Radiosensitivity Of Cancer Cells, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Radiation Therapy Physics, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2019. In this study, zinc doped hydroxyapatite nanoparticles were synthesized and characterized for the first time in terms of the radiosensitivity profile. Zinc doped hydroxyapatites were produced in 4 different compositions in order to determine the best rate of doping. The samples used in all characterizations were calcined at 500 °C for 2 hours and then sintered at 900 °C for 1 hour. X-ray diffraction patterns of the samples were found to overlap with the reference 09-0432 hydroxyapatite peaks. However, as the amount of zinc increased, beta tricalcium phosphate phases increased by 7.3%, 10%, 33% and 59% for 1%, 2%, 5% and 10 mol% zinc doped samples, respectively. As a result of fourier transform infrared spectroscopy analysis, all characteristic peaks of hydroxyapatites were observed in 1%, 2%, 5% zinc doped samples. However, for the 10% zinc doped samples, 1087 cm⁻¹ band was lost which is showing the phosphate oxygen stretching bond. The particle sizes from the scanning electron microscope images were measured as 218, 245, 246, 302 and 352 nm for 1%, 2%, 5% and 10% zinc doped powders, respectively. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays showed viability was after 72 hours according to pure hydroxapatite 50%, 38%, 160% and 150% for 1%, 2%, 5% and 10% zinc doped samples, respectively. An optimization study was performed to generate cell survival curves using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. According to the results of the study, it was determined that the most appropriate time was 6 and 8 days for the test. As a result of the characterization and vitablity tests, the 5% zinc added hydroxyapatite group was selected for use in the western blot test because of the high rate of beta tricalcium phosphate in 10% zinc doped hydroxyapatites. As a result of the study it was observed that 5% zinc doped hydroxyapatites were biocompatible and increased cell death rates when used with radiotherapy.

Keywords: Hydroxyapatite, Radiosensitization, Zinc doped nanohydroxyapatite, Radiotherapy

SİMGELER VE KISALTMALAR

5FU	5 Florourasil	
bFGF	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü	(Basic Fibroblast Growth Factor)
BT	Bilgisayarlı Tomografi	
CaP	Kalsiyum Fosfat	(Calcium Phosphate)
DNA	Deoksiribonükleik Asit	(Deoxyribonucleic Acid)
DRF	Doz Azaltma Faktörü	(Dose Reduction Factor)
FBS	Fötal Dana Serumu	(Fetal Bovine Serum)
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi	(Fourier Transform Infrared)
HA	Hidroksiapatit	(Hydroxyapatite)
ICDD	Uluslararası Difraksiyon Verileri	(The International Centre for Diffraction Data)
LET	Lineer Enerji Transfer	(Linear Energy Transfer)
LQ	Lineer Kuadratik	(Linear Quadratic)
MR	Manyetik Rezonans	(Magnetic Resonance)
NEXT	Nanoparçacık ile Geliştirilmiş X Işını Tedavisi	(Nanoparticle Enhanced X-Ray Therapy)
OD	Optik Yoğunluk	(Optical Density)
OER	Oksijenin İyileştirme Oranı	(Oxygen Enhancement Ratio)
PE	Koloni Verimi	(Plating Efficiency)
PET	Pozitron Emisyon Tomografi	(Positron Emission Tomography)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri	(Reactive Oxygen Species)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu	(Scanning Electron Microscope)
SF	Sağkalım Fraksiyonu	
TCP	Tri-kalsiyum Fosfat	(Tri-calcium Phosphate)
TPS	Tedavi Planlama Sistemi	(Treatment Planning System)
VEGF	Endotelial Büyüme Faktörü	(Vascular Endothelial Growth Factor)
XRD	X Işını Kırınımı	(X-Ray Diffraction)
Zn	Çinko	(Zinc)

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1. A) Lineer kuadratik modele, B) çok hedef-tek vuruş teorisine göre doz-SF ilişkisi (31).	9
2. Kanser hücrelerinde radyosensitizasyonu arttırmak için çeşitli yaklaşımların özeti (40).	14
3. Metal X ışını etkileşimi (7).	18
4. HA'ların mikrodalga ışını yöntemi ile üretiminin gösterimi (73).	23
5. HA numunelerinin sitotoksisitelerini incelemek amacıyla oluşturulmuş MTT deney planı	26
6. Optimizasyon çalışmasına ait ilk 10 gün için deney planı.	28
7. Işınlama düzeneği	29
8. 900 °C 1 saat sinterlenmiş numunelerin XRD kırınım desenleri.	32
9. Elde edilen beş farklı numuneye ait FTIR sonuçları	35
10. 900 °C'de sinterlenmiş HA örneklerinden elde edilen a) saf HA, b) Zn(%1mol):HA, c) Zn(%2.5mol):HA, d) Zn(%5mol):HA, e) Zn(%10mol):HA ait SEM görüntüleri.	36
11. SEM görüntülerinden ölçülen parçacık boyutları a) saf HA, b) Zn(%1mol):HA, c) Zn(%2.5mol):HA, d) Zn(%5mol):HA, e) Zn(%10mol):HA.	37
12. MDA MB 231 hücreleri ekildikten 24 saat ve 72 saat sonra MTT testi ile elde edilen canlılık oranları. Kontrol grubu olarak sadece hücre ekilen grup seçilmiştir.	38
13. MDA MB 231 hücreleri için saf HA referans alındığında MTT testi sonucu elde edilen canlılık oranları.	39
14. 1000 adet MDA MB 231 hücresi ekildiğinde farklı günlerde MTT testi ile oluşturulan hücre sağkalım eğrileri.	40
15. 2000 adet MDA MB 231 hücresi ekildiğinde farklı günlerde MTT testi ile oluşturulan hücre sağkalım eğrileri.	41
16. 4000 adet MDA MB 231 hücresi ekildiğinde farklı günlerde MTT testi ile oluşturulan hücre sağkalım eğrileri.	42
17. Ekilen MDA MB 231 hücre sayısının MTT testi ile oluşturulan sağkalım eğrileri üzerindeki etkisinin incelenmesi.	43
18. MDA MB 231 hücrelerine ait farklı ekilen hücre sayılarına ait hücre çoğalma eğrileri.	45

19. 1 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 1 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir. 46
20. 2 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 2 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir. 47
21. 4 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 4 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir. 47
22. 6 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 6 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir. 48
23. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde kaspaz-3 protein ekspresyonunun incelenmesi. 49
24. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde kırılmış kaspaz-3 protein ekspresyonunun incelenmesi. 49
25. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde PARP protein ekspresyonunun incelenmesi. 50
26. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde kırılmış PARP protein ekspresyonunun incelenmesi. 50
27. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında PARP, kırılmış PARP ve B-aktin protein ekspresyonu. A) Radyasyonsuz, 4 Gray radyasyonlu, radyasyonsuz-HA (Hidroksiapatit) ve 4 Gray radyasyonlu-HA ile inkübe edilmiş hücrelerden elde edilen protein lizatlarında PARP, Kırılmış PARP protein ekspresyonlarının western blot görüntüleri. Kontrol proteini olarak B-aktin kullanılmıştır (n=3). B) Radyasyonsuz, 4 Gray radyasyonlu, radyasyonsuz-HA ve 4 Gray radyasyonlu-HA ile inkübe edilmiş hücrelerden elde edilen protein lizatlarında Kaspaz-3 protein ekspresyonlarının western blot görüntüleri. Kontrol proteini olarak B-aktin kullanılmıştır (n=3). C) Radyasyonsuz ve 4 Gray radyasyon uygulanmış hücrelerden elde edilen protein lizatlarında kırılmış kaspaz-3 protein ekspresyonlarının western blot görüntüleri. Kontrol proteini olarak B-aktin kullanılmıştır (n=3). 51

TABLolar

Tablo		Sayfa
1.	Saf ve katkılı HA sentezinde kullanılan madde miktarları	26
2.	900 °C 1 saat sinterlenmiş numunelere ait hesaplanan faz oranları	34
3.	Numunelerin XRD kırınım desenlerinden elde edilmiş (0 0 2) ve (3 1 0) piklerinin ölçülen genişlikleri	34
4.	XRD sonuçlarına göre kafes parametleri ve teorik yoğunluklar	35
5.	Farklı gün ve ekilen MDA MB 231 hücre sayısına göre elde edilen D0 doz değerleri	45

1. GİRİŞ

Radyoterapi kanser tedavisinde iyonizan radyasyonun kullanıldığı bir yöntemdir. Alman asıllı bilim adamı Wilhelm Conrad Röntgen'in 1895 yılında X ışınlarını keşfi ile birlikte radyoterapi uygulamaları başlamıştır. İlk zamanlarda kanser tedavisi açısından umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Ancak zamanla normal dokularda görülen ciddi hasarlar ve tümör rekürrensleri tedavi yönteminde değişiklik yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu problemin çözümü, radyoterapinin temel amacıdır. Farklı radyasyon tipleri ve enerjileri, tedavi şemaları ve cihazları, radyokoruyucu ve duyarlaştırıcı ilaçlar kullanılarak normal dokular olabildiğince radyasyondan korunurken tümör hücrelerinin yok edilmesi hedeflenmektedir.

Radyoduyarlaştırıcıların kullanımı radyasyonun tümör hücreleri üzerindeki etkisini arttırmak için tercih edilen yöntemlerden biridir. Radyoduyarlaştırıcı etkide çok sayıda mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar radyasyon hasarının arttırılması, deoksiribonükleik asit (DNA) hasar onarımının engellenmesi, hücre siklusunda senkronizasyon sağlanarak hücrelerin duyarlı fazda biriktirilmesi, hipoksik hücrelere karşı artmış sitotoksikite ve hızlı tümör repopulasyonunun yavaşlatılması veya engellenmesidir.

Metal tabanlı radyoduyarlaştırıcılar ortamdaki reaktif oksijen türlerinin (*Reactive Oxygen Species*, ROS) oluşumunu tetiklemektedir. Radyasyon maruziyeti sonucu oluşan ROS'lar DNA'nın yapısına katılarak hasar fiksasyonunu arttırmaktadır. Bu nedenle hücrelerin ölüm olasılıkları da yükselmektedir. Literatürde metallerin radyoduyarlaştırıcı özelliklerinin gösterildiği ilk çalışmalar 1970'li yılların ortalarında görülmektedir (1, 2). Nanoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak metal nanoparçacıklar, bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı radyoterapinin etkinliğini arttırmada faydalı olabilmektedir (3). Son yıllarda altın (Au) nanoparçacıklar son derece küçük boyutları, iyi biyoyumlulukları ve kimyasal modifikasyon kolaylığı nedeniyle radyoterapide yaygın olarak kullanılmaktadır ve radyosensitizasyonuyla ilgili rapor sayısı hızla artmıştır (4). Klinikte kullanılan megavoltaj enerjilerde artan radyoduyarlılık iyonlaştırıcı radyasyon ile nanoparçacıkların etkileşimi sırasında meydana gelen düşük enerjili elektronlardan

kaynaklanmaktadır (5). İyonizan radyasyonun su moleküllerinin radyolizi yoluyla HO•, O₂• ve H₂O₂ gibi ROS'ların oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Bu ROS'lar eşlenmemiş elektronları nedeniyle DNA molekülüne hasar verebilmektedir (6). Meydana gelen düşük enerjili elektronlar ROS oluşumunu tetiklemektedir. Au nanoparçacıkların dezavantajları yüksek maliyetleri, vücut içerisinde yarı ömürlerinin fazla olması ve artan Au nanoparçacık konsantrasyonunun yüksek toksisite riski taşımasıdır (7). Antitümör etkisi ile kabul görmüş bir diğer metal tabanlı radyoduyarlaştırıcı gümüş (Ag) nanoparçacıklarıdır. Ag nanoparçacıkların radyasyon hasarını arttırma yeteneği apoptozu indüklemesine, oksidatif stresi aktive etmesine ve membran akışkanlığını etkilemesine dayandırılmaktadır (8, 9). Bazı çalışmalarda, Ag nanoparçacıkların radyoduyarlaştırıcı mekanizmalarının, Ag nano yapılarından Ag⁺ katyonunun salınmasıyla ilişkili olabileceği üzerinde durulmaktadır (8, 9). Ag⁺ katyonu, elektron yakalama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle ROS üretimini artıracak bir oksidatif madde olarak işlev görmektedir (9). Ag nanoparçacıklarının Au nanoparçacıklara göre daha ekonomik olması bir avantaj iken düşük biyoyoumlulukları ile bu avantajlarını kaybetmektedirler (10).

Titanyum tabanlı metal nanoparçacıkların radyoduyarlaştırıcı özellikleri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (11-15). Bu parçacıkların ROS oluşumunu tetiklediği ve glioblastom için G2/M fazındaki tümör hücrelerinin sayısını arttırdığı gösterilmiştir (13, 16).

Literatürde yukarıda bahsedilen parçacıkların dışında kalsiyum florür, lantan florür, çinko sülfür ve çinko oksit (ZnO) gibi nanoparçacıkların da kanser tedavisi için uygunluğu araştırılmıştır. Özellikle ZnO nanoparçacıklar etkileri nedeniyle çok dikkat çekmektedir. Akhtar ve ark. (17) ZnO nanoparçacıklarının kanser hücrelerinin apoptozunu seçici olarak indüklediğini göstermiştir. ROS oluşumunun p53 yolu yoluyla kanser hücrelerinin apoptozunu tetiklediği de bildirilmiştir.

Hidroksiapatitlerin (HA) biyoyoumlulukları 1980'li yılların ortalarında gösterilmiştir (18, 19). 2000'li yıllardan itibaren ise nano-HA'ların sentezi ve kanser hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Y. Han ve ark. (20) tarafından yapılan bir çalışmada HA nanoparçacıklarının kanser hücrelerinin büyümelerini engelleme kabiliyetine sahip oldukları rapor edilmiştir. Bu çalışmaya göre nanoparçacıklar in

vitro olarak insan kanser hücrelerinin çoğalmasını % 65'den fazla inhibe etmektedir (20). Araştırmacılar tarafından HA nanoparçacıklarının antikanser etkisi esas olarak kanser hücrelerinde neden olduğu yüksek miktardaki endositoz ve protein sentezindeki inhibisyona bağlanmaktadır. İnsan glioma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise HA nanoparçacıklarının apoptotik hücre ölümü oranını anlamlı derecede arttırdığı ortaya konulmuştur (21).

Saf HA'lar çeşitli yöntemlerle fiziksel ve biyolojik özelliklerini değiştirmek amacıyla farklı iyonlarla katkılanabilmektedir. Nitekim selenyum katkılı HA'lar kanser hücrelerinin çoğalmasını saf HA'lara göre daha fazla etkilemektedir (22). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada 36 günlük izlem sonucunda sağkalım oranlarının HA yokken, saf HA varlığında ve selenyum katkılı HA varlığında sırasıyla %50, %76.92 ve %100 olduğu ifade edilmiştir (22).

HA ve iyonlaştırıcı radyasyonun birlikte kanser hücreleri üzerindeki etkileri ise Chu ve ark. (23) ile Chen ve ark. (24) tarafından incelenmiştir. Chu ve ark. saf HA'ların U251 ve MDA-MB-231 hücrelerinde radyoduyarlılığı arttırdığını, Chen ve ark.(24) ise hafniyum katkılı HA'ların kanser hücrelerinin radyoduyarlılığına etkisi olduğunu bildirmiştir. Literatürde henüz farklı iyonlar ile katkılanmış HA nanoparçacıklarının kanser hücrelerinin radyoduyarlılıklarına etkisi araştırılmamıştır.

Bu tezde mevcut radyoduyarlılaştırıcılara ek olarak biyoyumluluğu yüksek, maliyeti düşük ve üretimi kolay kanser hücreleri açısından radyasyonun hasarını arttırabilecek bir malzeme sentezlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda konak malzeme olarak biyoyumluluğu yüksek olması sebebiyle HA'lar seçilmiştir. HA'nın biyoyumluluğu, Bajpai ve ark. (18) ile Piattelli ve ark. (19) tarafından 1980'li yıllarda yapılan deneylerle kanıtlanmıştır ve o yıllardan beri biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Demir, kobalt ya da nikel ile katkılanmış HA ajanları manyetik rezonans görüntüleme, ilaç salımı ve hipertermi tedavilerinde tercih edilmiştir (25). 2000'li yılların başlarından itibaren ise HA nanoparçacıklarının sentezi ve kanser hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalara rastlanmaktadır (20-22).

Çinko (Zn) periyodik cetvelde 4. periyotta bulunan atom numarası 30, yoğunluğu 7,14 olan bir geçiş metalidir (17). Vücudumuzda 300'den fazla enzimin aktivitesinde rol oynamaktadır. Ayrıca tümör hücrelerine doğrudan etkileri gösterilmiştir. Hücre bölünmesine ilişkin hücre içi mekanizmaların stabilitesi ve işleyişinde rol oynamaktadır. Bağışıklık sisteminde ve apoptoz üzerinde etkileri vardır(26). Bu nedenlerle katkılama malzemesi olarak Zn seçilmiştir. Bu çalışmada elde edilen Zn katkılı nano-HA'ların malign hücrelerin radyoduyarlılığına etkisinin MD-MBA-231 meme kanseri hücre hattı kullanılarak in vitro ortamda araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyoterapinin Kanser Tedavisindeki Önemi

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. GLOBOCAN tahminlerine göre 2018 yılı içerisinde dünya genelinde 18 milyon yeni kanser vakası ve 9.5 milyon kanserden ölüm meydana geldiği rapor edilmiştir (27). Toplumda ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan bu hastalığın tedavi seçenekleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Radyoterapi hastaların yaklaşık %50'sine küratif veya palyatif amaçlı uygulanmaktadır (28).

Modern radyoterapide bilgisayarlı tomografi (BT), ultrason, magnetik rezonans (MR) görüntüleme ve pozitron emisyon tomografi (PET) cihazları sayesinde tümör lokalizasyonu ve kritik yapılar yüksek hassasiyetle belirlenebilmektedir. İmmobilizasyon sistemleri ile tedavi esnasında hasta pozisyonu ve harekete bağlı belirsizlikler azaltılabilmektedir. Bilgisayar teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak geliştirilen tedavi planlama sistemleri (TPS) hedefe doğru dozu verebilmemize olanak sağlamaktadır. Yüksek teknolojiye sahip tedavi cihazları ile hızlı bir şekilde, tümörü görerek ve takip ederek daha etkili tedavi yapılabilmektedir.

Günümüzde radyoterapi vücudun hemen her bölgesinde kür sağlamak amacı ile bir çok kanser türünde tek başına, cerrahi veya kemoterapi ile birlikte uygulanmaktadır. Pankreatik kanserler, glioblastom ve sarkomlar gibi bazı kanser türleri ise bu tedaviye karşı daha dirençlidir. Radyoterapinin terapötik etkinliğinin bu tarz radyasyona dirençli tümörler için artırılması gerekmektedir.

Geliştirilen kemoterapötik ajanlar ve nanoparçacıklar kullanılarak radyoterapi daha etkin hale getirilebilmektedir (29, 30).

2.2. İyonlaştırıcı Radyasyonun Etki Mekanizması

İyonlaştırıcı özelliğe sahip radyasyon temel olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlar parçacık ve elektromanyetik dalga tipleridir. X ve gama ışınları gibi fotonlar elektromanyetik radyasyona örnektir. Alfa ve beta parçacıkları, karbon iyonları, elektron, proton ve nötronlar ise parçacık tipi radyasyonlardır. İyonlaştırıcı radyasyonun canlı sistemler üzerindeki etkileri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak

üzere üç aşamayla ifade edilmektedir. Fiziksel aşamada atomların uyarılması ve iyonlaşması gerçekleşir. Kimyasal aşama fiziksel etkilerin sonucu olarak serbest radikallerin oluşma ve hücre içindeki kritik hedeflerin yapısına katılma sürecidir. Biyolojik aşama da ise hücre yapısında meydana gelen hasarların etkileri görünmektedir. İyonlaştırıcı radyasyonların biyolojik sistemler üzerindeki temel hedefi DNA'dır. Doğrudan ya da dolaylı olarak DNA'ya hasar verebilmektedir. DNA'da meydana gelen hasar tamir edilebilir ya da hücre ölümüne, karsinogeneze veya mutasyona sebep olabilir. Doğrudan etki durumunda iyonlaştırıcı radyasyon, proteinler ve lipoidler gibi biyomoleküllere, özellikle DNA'ya zarar vermektedir. DNA'da tek ya da çift zincir kırıkları oluşturmaktadır. Bu olay hücre bölünmesinin ve proliferasyonun sonlanmasına ve hatta hücre nekrozuna veya apoptozuna sebep olmaktadır. Yüksek lineer enerji transfer (LET) değerine sahip radyasyon tiplerinde bu etki baskındır.

Dolaylı etki ise serbest radikaller üzerinden gerçekleşmektedir. Bu etki mekanizmasında iyonlaştırıcı radyasyon hücre içerisindeki su ile etkileşime girerek hidrolizine sebep olmaktadır. Böylelikle ortamda aktif ROS meydana gelmektedir. ROS eşlenmemiş elektronlarından dolayı kolayca kimyasal reaksiyonlara girebilmektedir. Biyomoleküllerin yapısına katılarak hasar oluşturabilmektedir.

Hücrelerin X ışınlarına maruziyeti sonucu DNA'nın tek zincirinde ya da çift zincirinde birden kırıklar meydana gelmektedir. Eğer kırık tek zincirde ise ya da çift zincirde olmasına rağmen birbirinden uzakta ise karşı zincir dikkate alınarak bu tip hasarlar onarılabilir. Kırıklar iki zincirde birden oluşmuş ve birbirlerine çok yakınsa DNA'nın onarımı daha zordur. Bu tarz hasarlar sıklıkla hücre ölümü ve karsinogeneze yol açabilen mutasyonlar ile sonuçlanmaktadır. X ışınlarına maruz kalmış bir biyolojik sistemde çift zincirde kırık oluşma oranı tek zincir kırıklarının %4'ü kadardır (31).

Radyoterapinin temel amacı kanser hücrelerini çoğalma potansiyelinden yoksun bırakmak ve sonunda kanser hücrelerini öldürmektir. Hücre ölümlerinde çeşitli mekanizmalar rol almaktadır. Sıklıkla apoptozis, mitotik ölüm, nekrosiz, yaşlanma ve otofaji ile gerçekleşmektedir. Radyasyona bağlı hücre ölümlerinde ise apoptozis ve mitotik ölüm baskın mekanizmalardır. Bu ölümlerde farklı genlerin ve hücre içi

yolakların etkili olduğu gösterilmiştir (32). Apoptoz, ATM-p53-bax-sitokrom c-kaspaz yolu ile ilişkilidir. Ancak mitotik ölüm p53-kaspaz-sitokrom c yolunu içermektedir (32).

2.3. Hücre Sağ Kalım Eğrileri

Hücre sağ kalım eğrileri radyasyon veya ilaç dozu ile sağ kalan hücre sayıları arasındaki ilişkiyi veren eğrilerdir. Hücre kültürlerine farklı radyasyon dozları uygulayarak hesaplanan sağkalım fraksiyonları (SF) uygulanan radyasyon dozuna karşı çizilen eğrilerle ifade edilmektedir. SF radyasyon maruziyeti sonrasında oluşan koloni sayısının ekilen hücre sayısı ve koloni veriminin (*Plating Efficiency*, PE) çarpımına oranıdır (31). PE, normal koşullarda oluşan koloni sayısının ekilen hücre sayısına oranı ile hesaplanmaktadır. SF ve PE formülleri denklem 2.3.1 ve 2.3.2’de belirtilmiştir.

$$PE = \frac{\text{Koloni Sayısı(normal)}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (2.3.1)$$

$$SF = \frac{\text{Koloni Sayısı(rad.)}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı} \times PE} \quad (2.3.2)$$

Yukarıda verilen denklemlere göre elde edilen sağkalım eğrileri sigmoid sağkalım eğrileridir. Hücre sağkalım eğrileri genellikle SF’nin logaritması alınarak çizdirilmektedir. Bu grafiklerde SF ile absorbe edilen doz arasındaki eksponansiyel ilişki doğrusal bir eğri şeklinde ya da başlangıç eğimi sıfır olan omuzlu sağkalım eğrileri veya başlangıç eğimi sıfır olmayan omuzlu sağkalım eğrileri şeklinde olabilir. Doğrusal eğriler tek hedef-tek vuruş teorisiyle açıklanmaktadır. Bu teori, hücre içindeki tek bir hassas hedefe tek bir isabetin hücre ölümüne yol açtığını öne sürmektedir. Böylelikle dozdaki belli bir artışla aynı sayıda değil aynı oranda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Nötronlar ve ağır iyonlar gibi yoğun iyonize radyasyonlarda, virüs ve bazı bakterilerde, radyasyona çok duyarlı hücrelerde bu tip sağkalım eğrileri gözlenmektedir (31). SF denklem 2.3.3’deki formül ile ifade edilmektedir.

$$SF = \frac{N}{N_0} = e^{-\frac{D}{D_0}} \quad (2.3.3)$$

N, D dozu uygulandığında sağkalan hücre sayısını, N_0 başlangıçtaki hücre sayısını, D_0 ise uygulandığında sağkalan hücre sayısını %37'ye (e^{-1}) indiren dozu göstermektedir.

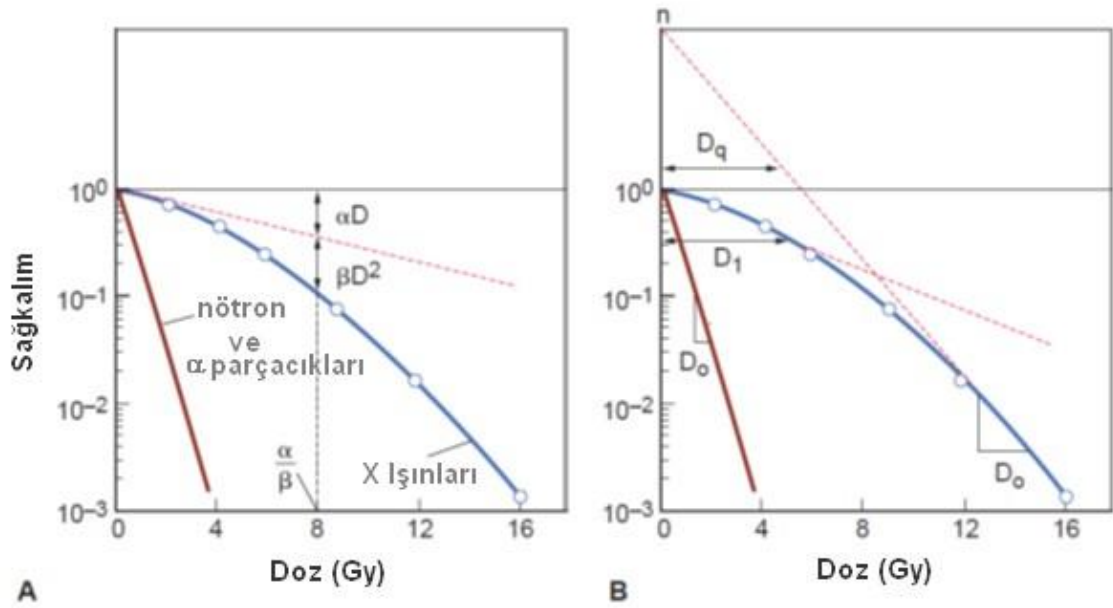
Başlangıç eğimi sıfır olan eğriler çok hedef tek vuruş teorisiyle açıklanmaktadır. Bu modelde, hücreyi etkisiz hale getirmek için n sayıdaki hedefe bir vuruş gerekli olduğu varsayılmaktadır. SF denklem 2.3.4'te verilmiştir.

$$SF = 1 - \left(1 - e^{-\frac{D}{D_0}}\right)^n \quad (2.3.4)$$

n ekstrapolasyon katsayısıdır. Hücrelerin tamamı ölünceye kadar verilecek D_0 dozu sayısına eşittir. Başlangıç eğimi sıfır olan sağkalım eğrileri incelendiğinde radyasyonun etkisinin gözlenebilmesi için bir eşik doz olduğu durumu ortaya çıkmaktadır. Oysaki radyasyon dozu ne kadar az olursa olsun hücreler üzerinde etkisi vardır. Memeli hücrelerinin sağkalım eğrileri genellikle eğimli bir omuza sahiptir. Bu model eğriler radyasyonun düşük dozlardaki etkilerini de göstermektedir. Tek hedef-tek vuruş ve çok hedef-tek vuruş bileşenlerinin ikisini içermektedir. SF denklem 2.3.5'teki gibi ifade edilmektedir.

$$SF = e^{-\frac{D}{D_1}} \left(1 - \left(1 - e^{-\frac{D}{D_0}}\right)^n\right) \quad (2.3.5)$$

$\frac{1}{D_1}$, başlangıçtaki omuz bölgesinin eğimidir. $\frac{1}{D_0}$ ise terminal bölümün eğimidir (Şekil 1).



Şekil 1. A) Lineer kuadratik modele, B) çok hedef-tek vuruş teorisine göre doz-SF ilişkisi (31).

Günümüzde radyoterapide kullanılan en yaygın model lineer kuadratik (LQ) modeldir. Bu model ilk olarak Douglas ve Fowler (31) tarafından 1972’de geliştirilmiş ve SF denklem 2.3.6’da verilmiştir.

$$SF=e^{-(\alpha D+\beta D^2)} \quad (2.3.6)$$

α ve β hücre tipine ve radyasyon kalitesine bağlı parametrelerdir. α başlangıç bölgesinin eğimidir. Radyasyon etkisi ile tek vuruşta ölen hücreleri yansıtır. β ise hücre onarım mekanizmalarını yansıtır. α/β oranı lineer ve kuadratik komponentlerce eşit sayıda hücrenin öldüğü dozu ifade etmektedir. Erken yanıt veren ve radyasyona duyarlı dokular için bu oran büyüktür. Denklem 2.3.6 radyoterapide fraksiyone rejimleri dikkate almak için kullanılan ilişkilerin çoğunun temelidir. Bununla birlikte, bu eğrinin dezavantajı, eğimin, soğrulan doz ile sürekli olarak artmasıdır. Bu sonuç deneysel olarak desteklenmemektedir. Bu model günlük tedavi dozları, 2 Gy civarında olan dozlarda daha başarılıdır. Ancak günümüzde kliniklerde yüksek fraksiyon dozlarında radyoterapi de uygulanmaktadır. Bu tarz tedaviler için LQ model modifiye

edilmiştir. Bu model lineer kuadratik lineer (LQ-L) model olarak isimlendirilmiştir (33). SF için iki tanımlama yapılmış olup denklem 2.3.7 ve 2.3.8'de gösterilmiştir.

$$SF=e^{-(\alpha D+\beta D^2)}, D<D_T \quad (2.3.7)$$

$$SF = e^{-(\alpha DT+\beta D^2T+\gamma(D-DT))}, D \geq D_T \quad (2.3.8)$$

Bu denklemlerde D_T , sağkalım eğrisinin doğrusal hale geldiği dozdur. Deneysel olarak hesaplanabilir. Bu dozun altı için LQ model kullanılırken, bu dozun üzerinde ikinci denklem kullanılmaktadır. γ ise eğrinin ikinci lineer bölgesinde Gy başına hücre ölümünü ifade etmektedir.

2.3.1. MD Anderson-Metastatic Breast-231 Hücre Dizisi

MD Anderson-Metastatic Breast-231 (MDA-MB-231) invazif duktal karsinoma hücre dizisidir. Metastatik adeno karsinom tanılı plevral efüzyonu olan 51 yaşındaki bir kadın olgudan elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücre dizisi, östrojen reseptörü (*Estrogen Receptor*, ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonunun yanı sıra insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2) amplifikasyonundan yoksundur (34). İnkubasyon süresi yaklaşık 38 saattir.

2.3.2. 3-(4,5-dimetiltiyazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür Testi

3-(4,5-dimetiltiyazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, hücre canlılığının ve proliferasyonunun ölçülmesi için kullanılan bir yöntemdir. Metabolik olarak aktif hücreler tarafından tetrazolyum boyası olan sarı renkli MTT'nin, suda çözünmeyen mor renkli formazana indirgenmesine dayanmaktadır. Birkaç inkübasyondan sonra suda çözünmeyen formazan boyaları kristalleşir ve organik bir çözücü ile çözünebilir. Çözülen formazan boyalarının optik yoğunlukları (*Optical Density*, OD) özel okuyucular tarafından okunarak hücre canlılığı ile ilgili bilgiler elde edilmektedir.

2.3.3. MTT testi ve Sağ Kalım Eğrilerinin Oluşturulması

Geleneksel olarak hücre sağ kalım eğrilerin oluşturulmasında klonojenik test kullanılmaktadır. Klonojenik testin detayları yukarıda anlatılmıştır. Son yıllarda hücre sağ kalım eğrilerinin oluşturulmasında MTT testi gündeme gelmiştir (35). MTT testi sayesinde klonojenik testte hataya açık olan gözle koloni sayma aşaması otomatik olarak yapılabilmektedir. Ayrıca haftalar süren sağ kalım eğrilerinin oluşturma işlemi günler içinde yapılabilmektedir. MTT testinin dezavantajı bölünme yetisi kaybetmiş ama metabolik olarak aktif olan hücrelerin de OD değerlerine olan katkısıdır (35).

2.3.4. Hücre Sağ Kalım Eğrilerini Etkileyen Faktörler

Hücre sağ kalım eğrilerini etkileyen faktörler aşağıda maddeler halinde açıklanarak verilmiştir.

Hücre Döngüsü

Hücre döngüsünün değişik fazlarının radyasyona olan duyarlılıkları birbirinden farklıdır. Radyasyona en duyarlı fazların geç G2 ve M olduğunu bilinmektedir. Geç S fazı ise en dirençli fazdır. Bu yüzden sağ kalım eğrileri hücre döngüsünün fazlarına göre farklılık gösterebilmektedir (36).

Lineer Enerji Transfer (LET) Değeri

LET iyonlaştırıcı radyasyonun birim mesafe başına bıraktığı ortalama enerjiyi tarif etmektedir. Birimi keV/ μm 'dir. LET değeri arttıkça radyasyonun hasar miktarı da artmaktadır. Yüksek LET'li ışınların sağkalım eğrilerinin eğimi dar ve diktir (31).

Sublethal Hasar Onarımı

Sublethal hasarlar onarılabilen hasarlardır. Genellikle radyasyonun indirek etkisi ile oluşurlar. Ek bir radyasyon dozu uygulanmadıkça saatler içinde tamir edilebilir. Eğer bir hücre ortamında sublethal hasar oluşumu varsa ve tamir için gerekli süreden önce ek bir radyasyon dozu uygulanmışsa radyoduyarlılık artar. Sublethal hasarın varlığı hücre sağkalım eğrilerini radyasyona duyarlılığın arttığı yönde etkilemektedir.

Potansitel Lethal Hasar Onarımı

Hücreleri X-ışınlarına maruz bıraktıktan sonra oluşan çevresel koşulların değiştirilmesi, hayatta kalan hücrelerin oranını etkileyebilir. Çevresel koşullara bağlı olarak onarılabilen hasarlara potansiyel lethal hasar denir. Suboptimal koşullarda tutulan hücreler kromozomlardaki radyasyona bağlı hasarlar sebebiyle mitoz bölünme girişimi yapmamaktadır. Bu gecikme DNA hasarının onarılması için bir süre sağlamaktadır. Sağ kalan hücre oranı potansiyel lethal hasarın bu süre içerisinde tamiri ile artmaktadır. Eğer çevresel ortam zenginleştirilmemiş olsa, hasar onarılamayabilir ve mitozla gitmekte olan hücre için bu hasar öldürücü olabilir (37).

Doz Oranı

İyonlaştırıcı radyasyon için verilen bir dozun biyolojik etkisini belirleyen en önemli faktörlerden biri doz oranıdır. Doz oranı azaldıkça ve maruz kalma süresi arttıkça biyolojik etki genel olarak azalmaktadır. 0.3 Gy/saat'ten daha düşük doz oranlarında ters etki söz konusudur. Bu doz hızlarında hücreler hücre döngüsünün radyoduyarlı bir fazı olan G2'de durma eğilimindedirler. Yüksek doz hızında ise ışınlandıkları anda buldukları fazda kalmaktadırlar.

Oksijenlenme

Oksijen iyonlaştırıcı radyasyon sırasında oluşan serbest radikallerin yapısına girerek hasar fiksasyonunu arttırmaktadır (38). Oksik hücreler hipoksik hücrelere göre daha radyoduyarlıdır. Oksijenin radyasyonun etkisinde sağladığı artışı ifade etmek için oksijenin iyileştirme oranı (*Oxygen Enhancement Ratio*, OER) tanımlanmıştır. OER oksijensiz ortamda bir etkiyi oluşturmak için gerekli dozun, oksijenli ortamda aynı etkiyi oluşturmak için gerekli doza oranıdır (31, 37).

Isı

Yüksek ısıda hücrelerin çoğu radyasyona daha duyarlıdır. Bu olayın yüksek ısılarda DNA onarım sürecinin supresyonu sebebiyle olduğu bilinmektedir (25).

Kimyasal Maddeler

Radyokoruyucular

Radyokoruyucular radyasyonun biyolojik etkisini azaltan kimyasallardır. Genellikle işleyiş mekanizmaları iyonlaştırıcı radyasyon maruziyeti sonrası ortamda oluşan serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması ya da etkisinin azaltılmasına dayanmaktadır.

Sistein ve sistamin gibi sülfhidril bileşikler bu özellikleri göstermektedir. Bu kimyasalların toksik etkileri fosfat grupları ile kaplanarak azaltılmıştır.

Amifostin ise baş ve boyun kanseri tedavisi gören hastalarda kserostomi önlenmesinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanan tek radyokoruyucu ilaçtır (39).

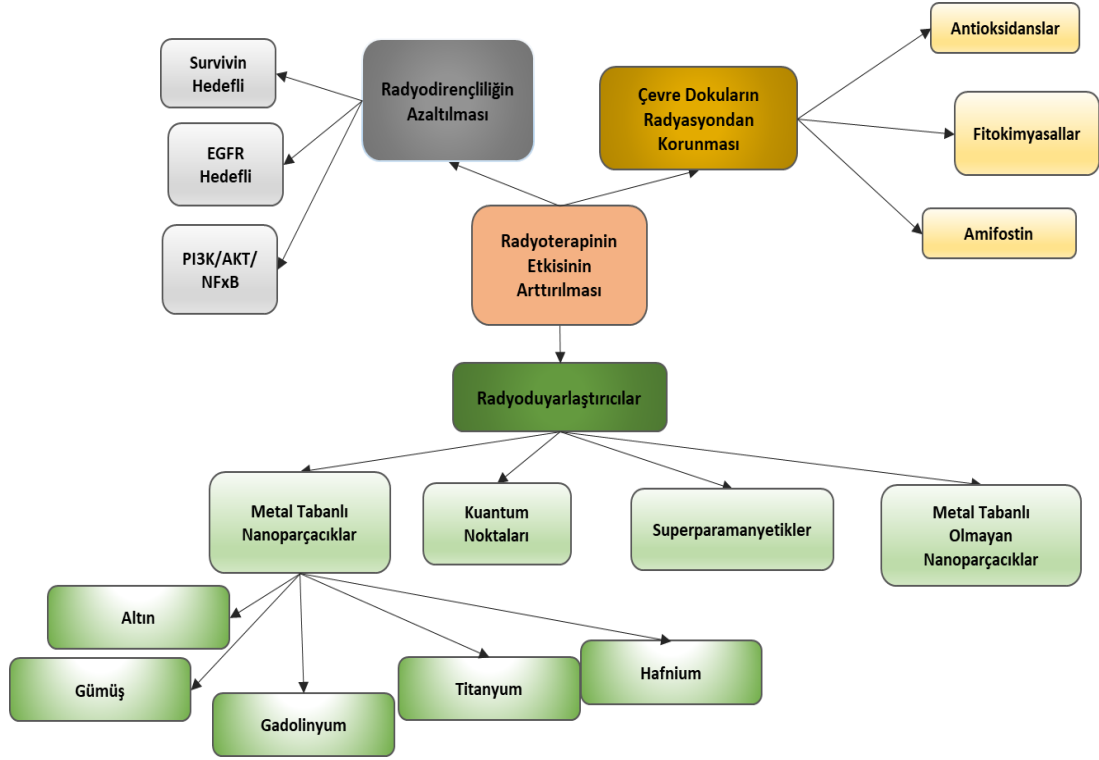
Radyokoruyucuların etkinliğini değerlendirebilmek amacıyla doz azaltma faktörü (*Dose Reduction Factor*, DRF) tanımlaması yapılmıştır. DRF, radyokoruyucunun yokluğunda ve varlığında aynı biyolojik etkiyi üretmek için gerekli radyasyon dozlarının oranıdır.

Radyoduyarlaştırıcılar

Radyoduyarlaştırıcılar radyasyonun etkisini attıran ilaçlardır. Hücre sağ kalım eğrileri üzerinde önemli ölçüde etkileri vardır. Detaylı bir şekilde aşağıda anlatılmıştır.

2.4. Radyoterapinin Etkinliğinin Arttırılması

Radyoterapinin etkinliğini üç şekilde arttırmak mümkündür. Bunlar, radyoduyarlaştırıcıların kullanımı, tümörün radyasyona olan direncinin azaltılması ve normal dokular için radyokoruyucuların kullanımıdır. Şekil 2.'de mevcut yöntemler özetlenmiştir (40).



Şekil 2. Kanser hücrelerinde radyosensitizasyonu arttırmak için çeşitli yaklaşımların özeti (40).

Radyoterapinin etkisini arttıran ajanlar etki mekanizması açısından DNA'yı hedef alan ve DNA'yı hedef almayan radyoduyarlaştırıcılar olarak iki kategoride değerlendirilmektedir. 5 florourasil (5FU), plantin analogları, gemitabin, DNA topoizomeraz I enzimini hedef alan ajanlar gibi radyoduyarlaştırıcı ilaçların hedefinde DNA vardır (41).

5FU radyoduyarlaştırıcı olarak kullanılan ilk maddelerden biridir. Etki mekanizması timidilat sentez inhibisyonu üzerinden çalışmaktadır. Timidilat sentez enziminin bloklanması DNA replikasyonu için gerekli bir nükleotit olan timidini baskılamaktadır. Dolayısıyla hızlı çoğalan kanser hücreleri timidin eksikliğinden dolayı ölüme gitmektedir.

Platin analogları arasında sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin bulunur. Platin analogları radyoterapi sonrasında oluşan serbest radikallerin etkinliğini toksik platinyum ara maddeleri ile arttırmaktadır. Sonuç olarak DNA onarımı engellenmekte ve hücre siklusu durdurulmaktadır. Sisplatin veya karboplatinin eş zamanlı radyoterapi ile kullanımının küçük hücreli dışı akciğer kanseri, serviks kanseri ve baş-boyun kanserleri için klinik sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir (42-44). Oxaliplatin ise son

zamanlarda kolorektal kanserde kullanım için onaylanmış bir üçüncü jenerasyon sisplatin analogudur (45).

Gemsitabin özellikle pankreatik ve küçük hücreli dışı akciğer kanserine karşı geniş bir klinik aktivite spektrumuna sahip sitarabin (sitozin arabinozid) analogudur (46). Gemsitabinin hem laboratuvar çalışmalarında hem de klinik çalışmalarda güçlü bir radyoduyarlaştırıcı olduğu gösterilmiştir.

Kamptotesin türevi olan topotekan ve irinotekan, topoizomeraz enzimini hedef almaktadır. Topoizomeraz I DNA'nın metabolik aktiviteleri açısından oldukça önemlidir. Bu aktiviteler RNA transkripsiyonunun başlatılması ve uzatılması, DNA replikasyonu ve DNA sarmalının düzenlenmesidir. DNA iplikçiklerinin yeniden birleşimine yardımcı olan topoizomeraz I enziminin inhibisyonu bu ilaçların temel etki mekanizmasıdır. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında tümör hücrelerindeki yüksek topoizomeraz varlığı seçici olarak topoizomeraz I hedefleyici ilaçlar için terapötik avantaj sağlamaktadır (47).

DNA dışı hedefler de hücrelerin öldürülmesinde ya da radyasyona daha duyarlı hale getirilmesinde etkili olabilmektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) blokajı, farnesiltransferaz inhibitörleri, Cox-2 inhibitörleri, damarlanmanın hedeflenmesi DNA'yı hedef almayan radyoduyarlaştırma yöntemlerine örnektir.

EGFR tirozin kinaz aktivitesine sahip yapısal olarak benzer 4 büyüme faktörü reseptörlerinden biridir. Bu reseptörün aşırı ekspresyonu sıklıkla tümörlerin büyümesine ve gelişmesine eşlik eder. Anti-EGFR monoklonal antikoru, C225, antiproliferatif bir ajandır. Tümör hücresi büyüme kinetiklerini inhibe edebilmektedir. İn vitro çalışmalar ile C225'in radyasyonun neden olduğu apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (48).

Ras geninin mutasyon ile aktivasyonu, aşırı ekspresyonu ya da tirozin-kinaz reseptörlerine sinyal iletimi radyodirençlilik ile ilişkilidir. Ras fonksiyonunu inhibe eden tedaviler bazı katı tümörlerin radyoduyarlı hale getirilmesi için etkili bir yöntemdir. Brunner ve ark. (49) insan ve kemirgen tümör hücre hatlarında klonojenik

deney ile radyoduyarlılık araştırması yapmıştır. Bu çalışmada ksenograft tümörleri, farnesiltransferaz inhibitörleri kullanılarak ışınlanmıştır ve tümörlerin yeniden büyümesi analiz edilmiştir. Sonuç olarak Ras proteinlerinin parçalanmasının bloke edilmesinin in vivo ve in vitro olarak radyoduyarlılığı arttırdığını göstermişlerdir.

Prostaglandinlerin, hücrelerin ve dokuların radyosensitivitesini etkilediği bilinmektedir. Birçok çalışma terapötik kazanç için nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar gibi nonspesifik prostaglandin inhibitörlerinin kullanılması üzerine odaklanmıştır (48). Bu çalışmalar tümöre karşı hedefe yönelik olma özelliklerinin eksikliği nedeniyle başarısız olmuştur. İndüklenebilen Cox-2'nin keşfi ve bazı seçici selektif inhibitörlerin geliştirilmesi (Cox-1 aktivitesini bozan), tümör prostaglandinlerini modifiye etme konusunda başarı sağlamıştır ve selektif olarak tümör hücrelerinin radyoduyarlılığı arttırılmıştır. Selekoksisib küçük hücreli dışı akciğer kanserinde ve üst gastrointestinal kanserlerinde çalışılan seçici Cox-2 inhibitörüdür (50).

Tümör boyutları genişledikçe besin ve oksijen sağlanabilmesi için yeni damarların oluşması gereklidir. Bu süreç anjiyogenez olarak adlandırılır ve tüm solid tümör hücreleri, endotel hücre büyüme faktörlerini serbest bırakarak yeni kan damarı oluşumunu hızlandırmaktadır. İki önemli büyüme faktörü temel fibroblast büyüme faktörü (*Basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörüdür (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). bFGF ve VEGF'yi hedefleyen çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bevasizumab ve talidomid bu amaç için kullanılan ajanlardır. Bevasizumab son zamanlarda kolorektal kanserlerde kullanılmaktadır (51). Talidomid ise kaposi sarkomlarında, multipl miyelomda, prostat kanserinde etkin olduğu gösterilmiştir (41).

2.4.1. Radyoduyarlaştırıcı Nanoparçacıklar

Nanoteknoloji kanser tedavisinde karşılaşılan zorlukların üstesinden gelebilmek için son yıllarda üzerinde yoğunlaşmış bir alandır. Görüntüleme, teşhis ve tedavi aşamalarında klinisyenlere ve araştırmacılara yeni pencereler açmıştır. Aynı malzemenin makro ve nano boyutlarındaki fiziksel ve kimyasal özelliklerinin birbirinden farklı olması nanoteknolojinin temel konusudur. Örnek olarak wartmannin

fosfatidilinositol 3-kinazlar ve fosfatidilinositol 3-kinaz-ilişkili kinazlar gibi DNA'ya bağımlı kinazların inhibitörüdür ve klinik öncesi çalışmalar ile etkili bir radyoduyarlaştırıcı olduğu gösterilmiştir. Fakat klinik uygulamaları düşük çözünürlük ve yüksek toksisiteden dolayı kısıtlıdır. DSPE-PED limit kabuk ve PLGA polimer çekirdekten oluşan wortmannin nanoparçacık formülasyonu ile bu problem çözülmüştür. Bu parçacıkların radyoduyarlaştırıcı özelliklerinin Karve ve ark. (52) tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışma ile 5FU'dan daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Onkolojide, nano boyuttaki terapötik ajanların kullanılmasının en önemli avantajı kan dolaşımında uzun bulunma süreleridir. Bu sayede hedef dokuya ilacın daha verimli bir şekilde ulaştırılması sağlanabilmektedir. Daha ileri seviyede ise tümör biyolojisinin karakteristik özelliklerinden yararlanılarak nanoparçacıklar ile kanserli hücreler hedeflenebilmekte veya normal dokuya penetrasyon yetenekleri azaltılabilmektedir. Tümör bölgesinde yoğunlaştırılmış nanoparçacıklar daha önce bahsedilen etki mekanizmalarının çoğunda rol alarak direk olarak DNA ya da DNA dışı hedeflere zarar verebilmektedir.

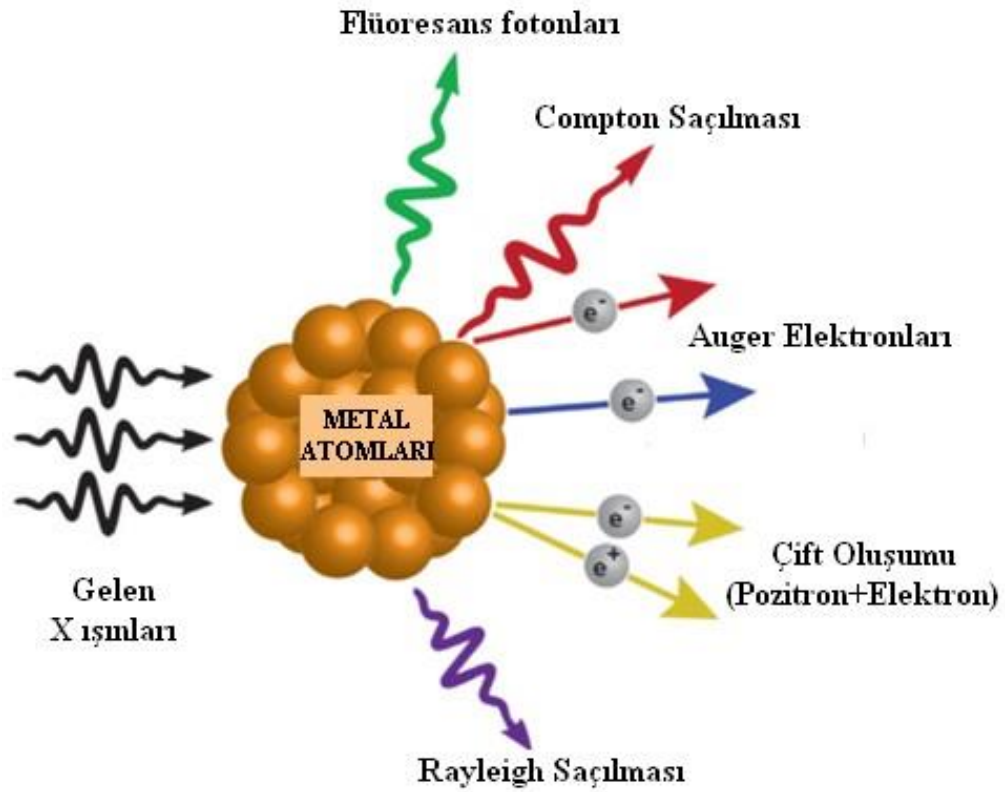
Radyoterapide en çok kullanılan nanoparçacıklar metal tabanlı olanlardır ve aşağıda detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

Metal Tabanlı Radyoduyarlaştırıcılar

1970'li yılların ortalarında iyot anjiyografi kullanılan hastalarda lenfosit toksisitesinin arttığı rapor edilmiştir (3). Aynı dönemde yapılan in vitro çalışmalarda da iyot varlığında radyasyonun sitotoksik etkilerinde benzer artışların olduğu gösterilmiştir (2). Bu sonuçlar hücrelere metaller gibi yüksek atom numaralı malzemeler eklendiğinde hasar miktarının arttığı düşüncesini ortaya çıkartmıştır. İlk çalışmalarda kullanılan parçacık boyutları 3 µm civarındadır. Boyutlarından dolayı bu parçacıkların kanserli dokulara difüzyonu zordur. Böylelikle daha küçük boyutlu nanoparçacıklar üreterek aynı prensiple radyasyonun etkisini artırılması birçok araştırmanın konusu olmuştur. Son yıllarda, özellikle Au gibi metal tabanlı nanoparçacıklar ile radyoterapötik etkilerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar artmıştır. Nanoradyoduyarlaştırıcılar ile radyoterapinin etkisinin artırıldığı

uygulamalar nanoparçacık ile geliştirilmiş X-ışını tedavisi (*Nanoparticle Enhanced X-Ray Therapy*, NEXT) olarak adlandırılmıştır.

Yoğun şekilde paketlenmiş metal parçacıkları fotonların etkileşim kesitini arttırmaktadır. Fotonlar bir metal ile etkileştiğinde birden fazla olasılık söz konusudur. Radyoterapi açısından bu etkileşimin en önemli sonuçları fotoelektronların, Compton elektronlarının, Auger elektronlarının ve flüoresans fotonlarının oluşumudur (Şekil 3).



Şekil 3. Metal X ışını etkileşimi (7).

Fotoelektrik etki hedeflenen molekülün atom numarasının küpü ile doğru orantılıdır. Gelen foton enerjisinin küpü ile ters orantılıdır. Gelen fotonun enerjisi elektronun bağlanma enerjisinden fazla ise fotonun enerjisinin bir kısmı elektronu koparmak için harcanmakta ve kalan kısmı elektrona kinetik enerji olarak aktarılmaktadır (53). Oluşan elektronlar enerjilerini tümör hücrelerine aktararak DNA hasarlarına sebep olmaktadır (31).

Hedef atomun iç yörüngelerinde bulunan bir elektron yeterince enerjiye sahip bir foton tarafından kopartıldığında kopan elektronun geride bıraktığı boşluk üst

yörüngelerdeki bir elektron tarafından doldurulabilmektedir. Geçiş sırasında yörüngeler arasındaki enerji farkı kadar enerji açığa çıkmaktadır. Bu enerji atomun bir başka elektronuna aktarılabilir. Hatta elektronun bağlanma enerjisinden büyük ise elektronu koparabilmektedir. Bu şekilde atomdan ayrılan elektronlar Auger elektronları olarak adlandırılmaktadır. Yörüngeler arasındaki geçişten dolayı açığa çıkan enerjinin salınmasının bir başka şekli de fotonlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu fotonlar flüoresans foton ismini almaktadır (53). Auger elektronlarının doku içerisinde kat edebileceği mesafe flüoresans fotonlarından çok daha azdır. Bu sebeple Auger elektronları enerjilerini daha sınırlandırılmış bir alanda bırakmaktadır. Auger elektronları 5 keV'nin altında enerjiye sahiptir ve DNA'ya doğrudan zarar vermektedirler. Tümör içerisinde oluşturulan fazla sayıda Auger elektronu, tümör dozunu artırırken çevre dokuların korunmasına olanak sağlamaktadır (7).

Compton etkisi bir foton ile elektronun çarpışması sonucu her ikisinin belli bir açı ile saçılması olayıdır. Momentumun ve enerjinin korunumu yasaları geçerlidir. Fotonların parçacık özelliğine sahip olduklarına kanıt gösterilebilecek bir etkileşimdir. Compton olayı hedefin atom numarasından bağımsızdır. Oluşma olasılığı etkileştiği malzemenin elektron yoğunluğu ve fotonun enerjisine bağlıdır. Atomların elektron yoğunlukları en hafif element ile en ağır element arasında yaklaşık %20 oranında değişebilmektedir. 35 kV ile 50 MV arasındaki geniş bir enerji spektrumunda bu etki gözlenebilmektedir (54). Radyoterapide radyasyonun soğrulmasında diğer etkileşimlere göre daha baskındır (53).

Metal tabanlı radyoduyarlaştırıcılarda en çok tercih edilen materyal Au'dur. Atom numarası 79'dur ve biyoyumluluğu yüksektir. Buna ek olarak küçük boyutlu olmaları ve kimyasal modifikasyon kolaylığı nedeniyle de ön plandadır. Etki mekanizması olarak ROS oluşumunu tetikledikleri öne sürülmektedir. Geng ve ark. (55) Au nanoparçacıkların, SKOV-3 insan over kanseri hücrelerinde 90 kVp veya 6 MV X-ışınları ile ışınlandığında hücre içi ROS üretimini artırdığını göstermiştir. Bir diğer etki mekanizmasının ise hücre apoptozunun tetiklenmesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesidir. Xu ve ark. (56) insan melanom hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada Au nanoparçacıkların apoptozisi artırdığını ortaya koymuştur. Roa ve

ark.(57) ise bu parçacıkların G1/S fazını hızlandırdığını ve G2/M fazında hücreleri beklettiğini rapor etmiştir.

Ag nanoparçacıklar bir diğer metal tabanlı radyoduyarlaştırıcılardır. Literatürde bu parçacıkların parçacık boyutunun radyoduyarlılığı değiştirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Xu ve ark. 20, 50 ve 100 nm boyutundaki parçacıkları in vitro ortamda karşılaştırdıkları çalışmada en iyi radyoduyarlaştırıcı boyutun 20 nm en kötünün ise 100 nm olduğu sonucu çıkarılmıştır (58). Mide kanseri, akciğer kanseri ve meme kanseri hücrelerinde radyoduyarlaştırıcı etkileri gösterilmiştir (59). Ag nanoparçacıkların anti-tümör özelliği, esas olarak, apoptozu indüklemek, oksidatif stresi aktive etmek ve membran akışkanlığını etkilemekle ilişkilendirilmiştir (60).

Au ve Ag dışında metal tabanlı olarak nanogermanyumun hücreleri radyasyona duyarlı fazlarda tuttuğunu, nanoplatinyumun lethal hasarı arttırdığını, nanobizmut ile oluşan Auger elektronlarının 2.4 kat daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (61).

Genel olarak metal tabanlı radyoduyarlaştırıcıların ROS oluşumunu tetiklediğini ve nanoyapıların hücrel aktiviteyi etkilediğini söylemek mümkündür.

2.5. Hidroksiapatit

İskelet sisteminin hasarlı ve hastalıklı kısımlarının onarımı ve değiştirilmesi için kullanılan seramikler biyoseramik olarak adlandırılmaktadır (62). En çok kullanılan biyoseramikler arasında kalsiyum fosfatlar (CaP) bulunmaktadır. Kemik, diş ve geyik boynuzunun yapısında yer almaktadır. Bulunduğu organlara sertlik ve stabilite kazandırmaktadır. Bilinen 11 adet Ca/P oranı 0.5 ile 2.0 arasında değişen CaP vardır. HA 1.67 Ca/P oranı ile CaP'lar arasında en yaygın kullanılanıdır. HA, hegzagonal sistemde aşağıdaki kristalografik parametrelerle kristalize olur: $a = 9.418 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$ (63). Kimyasal formülasyonu $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 'dir. Ca Mg^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Eu^{+3} , K^+ , Na^+ gibi iyonlarla, P S, Cr, Mn gibi iyonlarla, OH^- ise Br^- , F^- , I^- , Cl^- ile yer değiştirilebilmektedir. Sentetik HA'ların kimyasal formülü ve özelliklerinin, kemiklerin ve dişlerin ana inorganik bileşenlerine benzer olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu mineral ortopedi ve diş uygulamalarında sert dokuların onarılması ve değiştirilmesinde kullanılmaktadır.

HA'ların katı çözeltiler oluşturma ve birçok anyon ve katyon kabul etme yetenekleri bulunmaktadır. Çok sayıda çalışma, HA özelliklerinin farklı metalik iyonların katılanmasıyla değiştirilebileceğini göstermiştir. Örneğin HA yapısındaki Ca^{+2} katyonları Fe, Co veya Ni gibi iyonlar ile değiştirildiğinde manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanı olarak kullanılabilir (64, 65). Lantanit iyonları ile katıldığında HA'lara floresan özellik kazandırılabilir (66). Ag iyonları ile sitotoksositeye sebep olmadan antimikrobiyal özellikler artırılabilir (67-69). HA'ların diğer bilinen uygulamaları ilaç salım ajanı, biyokompozitler için dolgu malzemesi, kök hücre ekimi için iskele, metalik kemik implantların biyoaktif kaplamalarıdır (64). Ayrıca son çalışmalar HA parçacıklarının birçok kanser hücresi türünün büyümesini engellediğini göstermiştir (21, 22).

HA'ların kanser hücreleri üzerindeki etkileri farklı tedavi yöntemleriyle birlikte incelenmiştir. Hou ve ark. Fe^{+2} (70) katkılayarak elde ettikleri manyetik HA'ları kolon kanserli farelerin hipertermi ile tedavisinde kullanmıştır. Düşük toksisiteyle 2 hafta içinde tümör hücrelerinin yok olduğu ve rekürrens olmadı bu çalışmada rapor edilmiştir. Bir diğer kanser tedavi yöntemi olan radyoterapi ile birlikte kullanıldıklarında saf HA'ların radyasyonun etkisini attırdığı da gösterilmiştir (23). Radyoterapi ile birlikte HA'nın nasıl bir etki mekanizması ile hücre ölümüne sebep olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte Chen ve ark. (24) HA'lar hafnium ile katıldıklarında ROS oluşumunu tetiklediğini ortaya koymuştur.

Kanser hücreleri üzerinde HA'ların etkilerinin parçacık boyutuna bağlı olduğu birçok çalışmada ifade edilmiştir (40). HA nanoparçacıklarının HA mikroparçacıklardan daha güçlü bir antikanser etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaların birinde Fu ve ark. (71) U2-OS ve hepatosellüler karsinom Bel-7402 hücreleri için nano HA'ların mikro HA'lara göre in vitro ortamda hücre inhibisyonunu arttırdığını belirtmiştir. Diğerinde ise Liu ve ark. (72) in vivo ortamda nano HA'ların kanser hücrelerinin çoğalmasını durdururken her hangi bir yan etkiye sebep olmadığını rapor etmiştir.

Farklı boyutlarda ve morfolojilerde nano boyutta HA hazırlamak için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler, bilinen kimyasal sentez yollarını içerir. Mehdi

Sadat-Shojai ve ark. (73) sentez yöntemlerini kuru, ıslak, yüksek sıcaklık süreçleri, biyojenik kaynaklara dayalı sentez ve hibrit olmak üzere beş grupta toplamıştır.

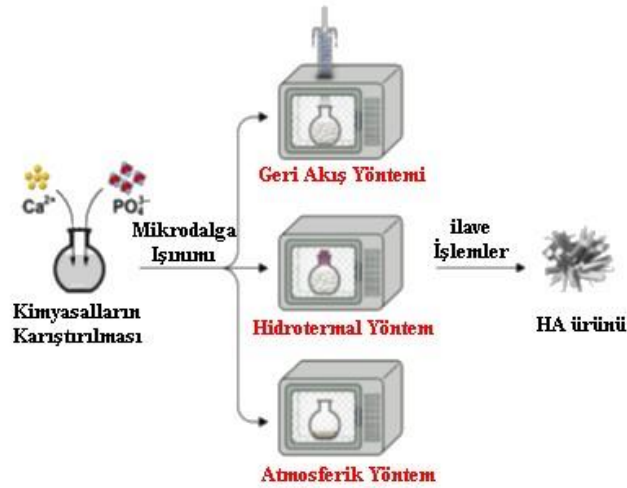
Kuru yöntemlerde herhangi bir çözücü kullanılmamaktadır. Hassas kontrollü koşullar gerektirmemektedir. Çünkü işlem içindeki parametreler tozların özelliklerini çok fazla etkilememektedir. Bu sebeple tozların seri üretimi için uygun tekniklerdir. Alt grupları katı hal sentezi ve mekanokimyasal yöntemdir. Katı hal sentezinde kalsiyum ve fosfat kaynakları belirli oranlarda öğütülerek yüksek sıcaklıkta kalsine edilmektedir. Genel olarak katı hal sentezi ile iyi kristalize stokiyometrik ürünler elde edilmektedir. Fakat bu yöntem yüksek sıcaklık gerekliliğinden dolayı ürünün gözenekliliği açısından dezavantajlıdır. Mekanik alaşımlama olarak da bilinen mekanokimyasal süreç, nanokristal alaşımlar ve seramikler gibi çeşitli gelişmiş malzemelerin imalatı için basit bir yöntemdir. Bu yöntemde öğütücü değirmenler içerisine belli stokiyometrik oranlardaki kimyasallar yerleştirilmektedir. Oluşan ürünün özelliklerini öğütücü tozların büyüklüğü, dönme hızı, öğütme süresi gibi parametreler etkilemektedir. Katı hal sentezine göre daha düzgün şekilli parçacıklar üretmek mümkündür.

Islak yöntemler suda veya organik bir çözücüde reaktiflerin çözünmesine dayanmaktadır. Bu yöntemler yapı, doku ve morfoloji üzerinde mükemmel kontrol sağlamaktadır. Ayrıca yüksek bir HA verimi söz konusudur. Kimyasal çökeltme, hidroliz metodu, sol-jel metodu, hidrotermal metod, emülsiyon yöntemi ve sonokimyasal yöntem bu kategoridedir. Kimyasal çöktürme HA'nın hazırlanması için en basit ve sık kullanılan yöntemdir. Kimyasal süreç PO_4^{-3} ve Ca^{+2} kaynaklarının bazik tepkimelerinden oluşmaktadır. Genel olarak bu yöntem 10 ila 12 arasında değişen pH değerlerinde ve oda sıcaklığından suyun kaynama sıcaklığına kadar değişen sıcaklıklarda uygulanabilmektedir. Sol-jel HA'nın ıslak sentezi için önerilen ilk yöntemlerden biridir. Çözelti içerisinde mineralizasyon işlemidir. Bu teknikte HA sentezi, yumuşak kimya koşulları olarak adlandırılan geleneksel sentetik yöntemlerden daha düşük sıcaklıkta meydana gelmektedir. Alkoksit esaslı kimyasalların azlığı ve yüksek maliyeti ile zaman alıcı süreçler dezavantajı olarak gösterilmektedir. Yüksek sıcaklık süreçleri istenmeyen CaP fazlarının az olduğu yüksek kristallik ve iyi

kimyasal homojenliğe sahip HA'ların üretiminde kullanılmaktadır. İşlem sırasındaki değişkenlerin kontrolünün zayıf olması temel dezavantajdır.

HA seramikleri üretmek için başta kemik atıkları, yumurta kabukları, deniz organizmalarının dış iskeleti, doğal olarak türetilen biyomoleküller ve biyomembranlar olmak üzere çeşitli doğal malzemeler kullanılmıştır. Biyojenik kaynaklardan sentez olarak adlandırılan bu teknikler ile elde edilen HA'ların iyi fizikokimyasal özellikleri nedeniyle bu alanın yakın gelecekte daha fazla dikkat çekmesi beklenmektedir.

Hibrid tekniklere en iyi örnek mikrodalga ışını yoluyla HA üretme yöntemidir. Bu yöntemde reaksiyonu aktive etmek için karışım dışarıdan değil mikrodalga üreteçlerinde kendi moleküler hareketleri ile ısıtılmaktadır. Mikrodalga ilk başlangıçta HA'ların mekanik ve fiziksel özelliklerini geliştirmek için sinterleme amaçlı kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu teknik artık daha az enerji tüketen ve daha tekrarlanabilir bir şekilde HA nanopartiküllerini sentezlemek için kullanılmaktadır. Mikrodalga yönteminin bir diğer önemli avantajı ise karışımın her bölgesinin homojen bir şekilde ısıtılmasıdır. Hızlı ve homojen ısıtmanın sonucu olarak bu yöntemle HA sentezi 30 dakikadan kısa bir süre almaktadır. Mikrodalga ışınması ile daha küçük boyut ve daha yüksek saflık içeren HA tozları üretilebilmektedir. HA mikrodalga işlemi Şekil 4'te şematik olarak gösterildiği gibi, geri akış veya hidrotermal koşullar altında ya da atmosferik koşullarda gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 4. HA'ların mikrodalga ışını yöntemi ile üretiminin gösterimi (73).

2.6. Apoptoz

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz hücre ölüm tiplerinden biridir. Hücreler fizyolojik ya da bazen patolojik sebepler ile apoptozu seçebilmektedir. Apoptotik ölüm mekanizmaları ölüm reseptörleri yolu veya mitokondri yolu ile gerçekleşmektedir. Ölüm reseptörleri yolu, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri tarafından apoptozun tetiklenmesidir. Buna intrinsek apoptozis yolağı denir. Mitokondri yolu ise hücre içindeki sinyaller tarafından apoptozun tetiklenmesidir. Apoptozu p53 proteini kontrol etmektedir. DNA hasarı tamir edilemediğinde bax, noxa ve pumayı aktifleyerek bcl-2 ve bclxl'yi baskılayarak hücreyi apoptozu yönlendirmektedir. Apoptotik süreçte hücre küçülmekte, sitoplazması yoğunlaşmakta ve büzüşmektedir. Bu süreç, kaspazlar, farklı moleküller ve ayrıca bcl-2 / bax ve Fas / Fas ligand gibi moleküler sistemler tarafından düzenlenmektedir. Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Açılımı; "*Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE*" şeklindedir. Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmıştır. Kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 ve 9 intrinsek apoptoziste önemlidir. Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmektedirler. Daha sonra hücre hedeflerindeki tetrapeptit motifleri tanımakta ve mevcut substratı bir karboksil terminali ile ayırmaktadır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücre ve şekilsel değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişmektedir. Kaspaz aracılı apoptotik hücre ölümü, hücre işlevsellik ve hayatta kalmak için gerekli olan birkaç anahtar proteinin bölünmesiyle gerçekleştirilmektedir. PARP (*Poly (ADP-ribose) polymerase*, Poli (ADP-riboz) polimeraz), kaspazların bilinen çeşitli selektif substratlarından biridir. PARP çok çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyonları olan bir nükleer proteindir. PARP'ın kaspazlarla kırılması apoptozun bir özelliği olarak kabul edilmektedir. PARP kırılması, 2 spesifik fragman oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bunlar 89 kD katalitik fragman ve 24 kD DNA bağlanma alanıdır (*DNA binding domain*).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hidroksiapatit Sentezi

HA sentezi için kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum nitrat tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Almanya), fosfat kaynağı olarak ise amonyum fosfat dibazik ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Zn katkılı HA sentezinde ise Zn kaynağı olarak çinko nitrat heksahidrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Ca, PO_4 ve Zn kaynaklarının molekül ağırlıkları sırasıyla 236.15, 132.05 ve 297.49 g/mol'dür.

Saf HA sentezi için, Ca/P=1.67 oranını sağlayacak şekilde $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ayrı ayrı kaplarda 200 ml distile suda çözülmüştür. Çözdürme işleminden sonra sürekli karıştırılan $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ içerisine $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisi damlatılarak eklenmiştir. Bu işlem sırasında belirli aralıklarla pH değeri kontrol edilerek amonyak solüsyonu eklemek suretiyle pH=10'da tutulmaya çalışılmıştır. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisinin damlama işlemi bittikten sonra elde edilen karışım 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karışma süreci boyunca pH değeri kontrol edilerek 10'da tutulmaya devam edilmiştir. Daha sonra karışım mikrodalga fırın içerisinde geri akış düzeneği ile 800 W'lık güçte 15 dakika tutulmuştur. Mikrodalga fırından 15 dakika sonra çıkarılan karışım filtre kağıtlarına dökülerek süzölmüştür. Süzölme işlemi sırasında pH değeri 7 olana kadar filtre kağıdındaki karışım distile su ile yıkanmıştır. pH değeri 7 olduktan sonra kağıttaki çökelti 17 saat boyunca 80°C ısıtılmış fırında kurutulmuştur. Böylelikle saf HA tozları elde edilmiştir.

Zn katkılı HA'lar dört farklı Zn oranında üretilmiştir. Farklı miktarlarda Zn ile katkılanmış HA grupları Zn(%1mol):HA, Zn(%2.5mol):HA, Zn(%5mol):HA ve Zn(%10mol):HA ile ifade edilmiştir. Katkılı HA sentezinde kullanılan madde miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Saf ve katkılı HA sentezinde kullanılan madde miktarları.

	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (mol)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (mol)	Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (mol)
Saf HA	0,2	0,12	-
Zn(%1mol):HA	0,198	0,12	0,002
Zn(%2.5mol):HA	0,195	0,12	0,005
Zn(%5mol):HA	0,190	0,12	0,01
Zn(%10mol):HA	0,180	0,12	0,02

Zn atomları Ca atomları ile yer değiştireceği için Ca ve Zn kaynakları yukarıda belirtilen oranlarda 200 ml su içerisinde birlikte, PO₄ kaynağı ise ayrı bir kaptta 200 ml suda çözülmüştür. İşlemin geri kalan kısmında yukarıda saf HA üretimi için izlenen yöntemin aynısı uygulanmıştır. Fırınlama işlemi sonrası elde edilen HA tozları 500°C'de 2 saat kalsine edilerek 900°C'de 1 saat sinterlenmiştir.

3.2. Hidroksiapatitlerin Karakterizasyonu

3.2.1. X Işını Kırınımı Analizi

X ışını kırınımı (*X-Ray Diffraction*, XRD) verileri, Cu-K α hedefine sahip 40 kV ve 30 mA'da X ışınlarının üretilmiş olduğu difraktometre (Rigaku Ultima-IV, Japonya) ile 10°≤2 θ ≤90° aralığında elde edilmiştir. Analiz için 500°C'de 2 saat kalsine edilerek 900°C'de 1 saat sinterlenmiş HA tozları kullanılmıştır. Sonuçlar MDI Jade 6 yazılımı vasıtasıyla incelenerek HA'lara ait ilgili fazlar, kafes parametreleri, kristal boyutları ve teorik yoğunluklar hesaplanmıştır. Mevcut fazlar uluslararası difraksiyon verileri® (ICDD) ile karşılaştırılmıştır.

3.2.2. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) analizi HA'ların içindeki bağların verifikasyonu amacıyla, bir spektrometre ve bir mikroskoptan (Bruker IFS 66 / S ve Hyperion 1000, Almanya) oluşan birleşik bir cihaz ile yapılmıştır. 500°C'de 2 saat kalsine¹ edilerek 900°C'de 1 saat sinterlenmiş² toz halindeki HA'lar kullanılmıştır. Numuneler orta kızılötesi (MIR)

¹ Kalsine bünyedeki bağlı su, CO₂ veya diğer gazların uzaklaştırılması işlemidir.

² Sinterleme, preslenmiş parçayı oluşturan tozların yüksek sıcaklıkta birbirine bağlanarak parçanın mukavemet kazandığı bir ısıl işlemidir.

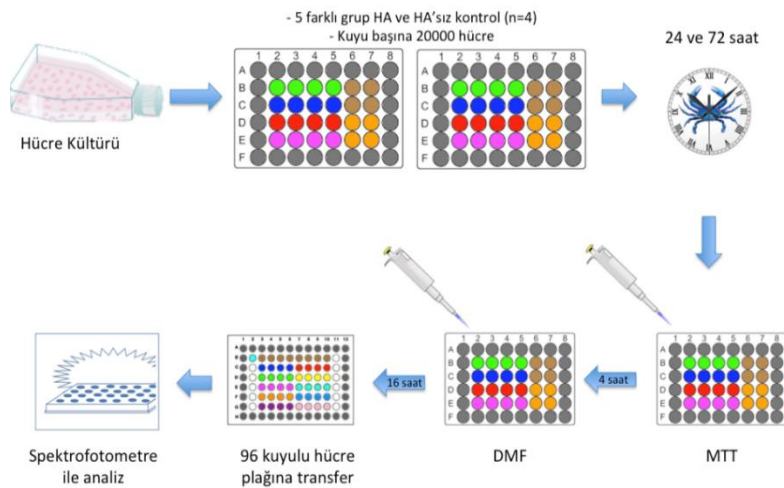
aralığında ($4000-400 \text{ cm}^{-1}$ arasında) incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde yer alan HA'lara ait bağ yapılarına karşılık gelen dalga boyları ile karşılaştırılmıştır.

3.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

Saf ve katkılı HA'lara ait mikroskobik görüntüler QUANTA 400F Field Emission SEM (ABD) cihazı ile elde edilmiştir.

3.3. MTT ile Sitotoksosite Testi

Deneyin bu aşamasında sentezlenmiş HA tozları, tek eksenli soğuk pres makinası (Carver) ile 22,241 kN ($\approx 5000 \text{ lbs}$) kuvvet uygulanarak 12.5 mm çaplı, 1 mm kalınlıkta 300 mg'lık diskler haline getirilmiştir. Hücre kültürü deneyleri için HA diskleri hazır hale geldikten sonra çalışma kapsamında kullanılacak meme kanseri hücre dizisi olan MDA-MB-231 hücresi sıvı azottan alınmıştır. Hücreler 25 cm^2 flask içerisinde, %10'luk fetal dana serumu (FBS), antibiyotik (Penisilin/Streptomisin) ve L-glutamin içeren DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) tam besiyeri ortamında 37 °C'de %5 CO_2 'lik etüvde çoğaltılmıştır. Her 3 günde bir hücrelerin besiyeri değiştirilmiş, tek tabaka halinde büyüyen hücreler haftada bir defa tripsinizasyon yapılarak pasajlanmıştır. Deney günü öncelikli olarak HA diskleri 48 kuyulu plaklara yerleştirilmiştir. Disk içerisindeki Zn katkı oranına göre 5 farklı grup oluşturulmuştur (Şekil 5).



Şekil 5. HA numunelerinin sitotoksisitelerini incelemek amacıyla oluşturulmuş MTT deney planı.

Bu gruplar; saf HA ve %1, %2.5, %5 ve %10 mol Zn katkılı HA'dır. Kontrol grubuna HA diski konulmamıştır. Her bir gruptan toplam 4 bağımsız tekrar yapılmıştır. Diskler üzerine 200 µl hacimde kuyu başına 20.000 hücre gelecek şekilde besiyeri hücre süspansiyonu eklenmiştir. Bu aşamadan sonra, 24 ve 72 saat sonra stotoksisiteyi görmek amacıyla aynı şekilde hazırlanmış iki farklı plaka etüvde inkübe edilmiştir. 24 saatlik HA etkisini görmek için, 24 saat sonra ilk hücre plağı etüvden alınmıştır ve her bir kuyuya 50 µl MTT eklenmiştir. MTT'nin canlı hücrelerde formazan kristali oluşturması amacıyla etüvde 4 saat inkübasyonu sağlanmıştır. MTT, PBS içinde 5 mg/ml olacak şekilde çözülerek hazırlanmıştır. 4 saatlik inkübasyondan sonra, ekstraksiyon tamponu olarak %45 DMF (Dimetilformamid) içinde çözülmüş %23 SDS çözeltisi (pH= 4.7) kullanılmıştır. Her bir kuyuya 160 µL ekstraksiyon tamponu eklenmiştir ve formazan kristallerinin çözünmesi için 16 saat etüvde inkübe edilmiştir. Ekstraksiyon tamponu ile inkübasyon aşamasından sonra, 48 kuyulu plaka içerisindeki çözelti, 96 kuyulu hücre plağına aktarılmıştır. Bu sayede, renk değişimleri plak okuyuculu spektrofotometre cihazında 570 nm dalga boyunda okunmuştur. Aynı işlemler 72 saat sonra, 72 saatlik 48 kuyulu hücre plağı için uygulanmıştır.

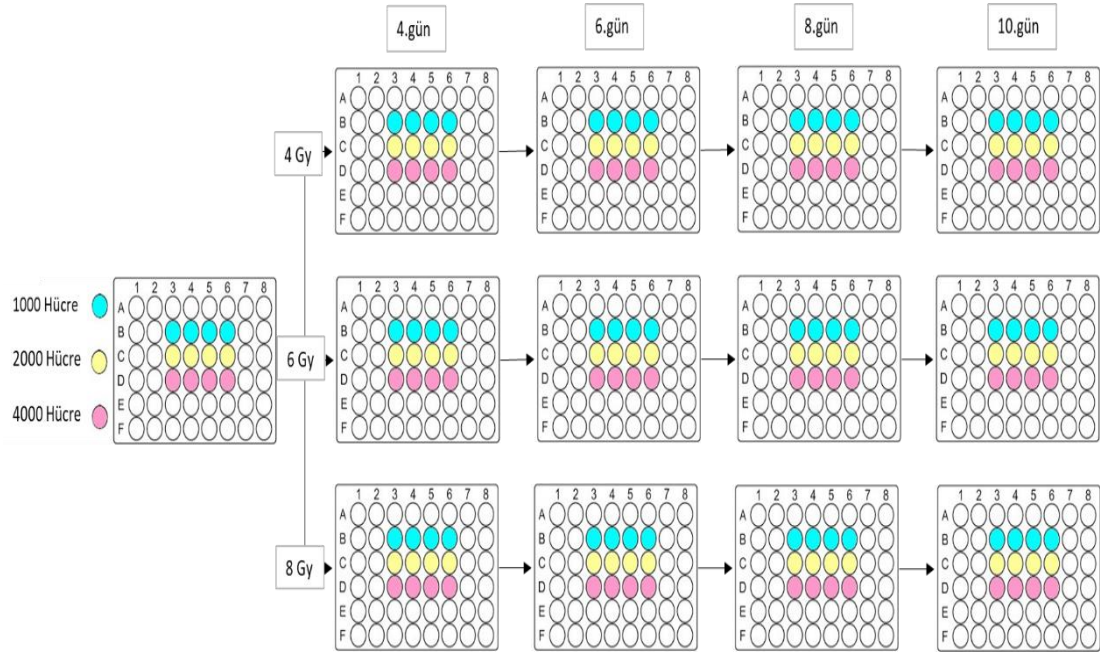
Elde edilen sonuçlardan HA'sız kontrol grubunun OD değeri referans alınarak diğer grupların canlılık oranları hesaplanmıştır. Bu sayede toksik olan ya da olmayan HA gruplarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.4. MTT Analizi İle Işınlama Sonrası Hücre Sağkalımlarının Belirlenmesi

MTT analizi ile ışınlanmış hücre gruplarının sağkalımının belirlenmesi amacıyla öncelikli olarak bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimizasyon çalışması kuyulara ekilecek en uygun hücre sayısını ve MTT analizi yapılacak günü belirlemek üzere tasarlanmıştır. Deneyin bu aşamasında MDA-MB-231 hücre dizisi sitotoksisite testinde anlatıldığı şekilde çoğaltılmıştır.

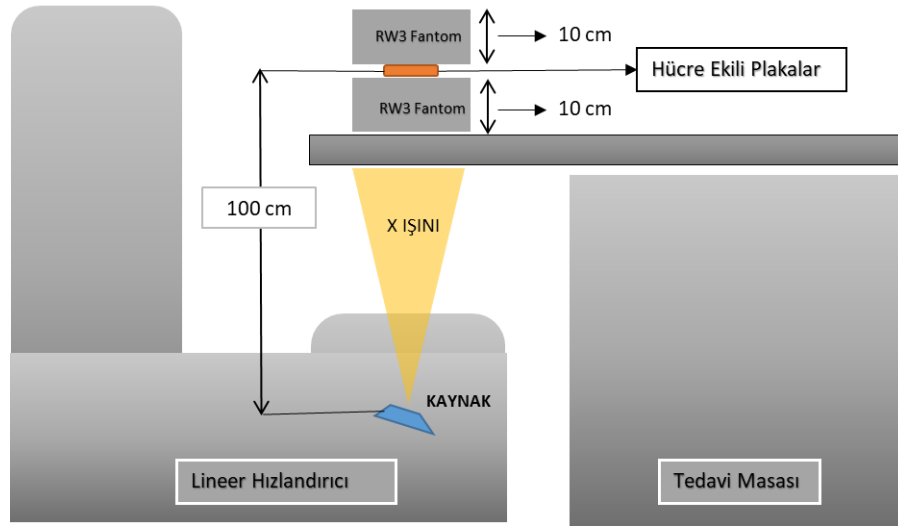
Yukarıda bahsedilen amaç doğrultusunda 48 kuyulu plakalara 1000, 2000 ve 4000 hücre, her grup için 4 bağımsız tekrar olacak şekilde ekilmiştir. Sağkalım analizi yapılacak günler 4, 6, 8, 10, 12 ve 14. günler olarak belirlenmiştir. Uygulanacak radyasyon dozları ise 4, 6, 8 Gy olarak belirlenmiştir ve her doz için bir plaka

hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak ışınlanmamış plakalar seçilmiştir. Böylece toplamda 24 plakaya hücre ekilmiştir. 6. günden sonra tüm plakalardaki hücrelerin besi yeri değiştirilmiştir. Şekil 6’da ilk 10 güne kadar oluşturulan deney planı verilmiştir.



Şekil 6. Optimizasyon çalışmasına ait ilk 10 gün için deney planı.

Işınlama işlemi Elekta Versa HD lineer hızlandırıcı cihazında gantri 180° 'de iken SAD=100 cm olacak şekilde 10 cm derinlikte 20x20 alan boyutunda 6 MV foton demetleriyle RW3 katı fantomlar üzerinde yapılmıştır. Geri saçılan radyasyon etkisinden dolayı plakaların üzerine 10 cm katı fantom yerleştirilmiştir. Her ışınlama günü öncesi cihazın çıkış kalibrasyonu 1 MU, 1.5 cm derinlikte 1 cGy olacak şekilde yapılmıştır. Işınlama düzeneği Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. Işınlama düzeni.

Sağkalım oranlarının inceleneği günlerde her bir kuyuya 50 μ L MTT eklenerek stotoksisite testinde anlatılan adımlar birebir uygulanmıştır. Her uygulanan doz miktarı için belirlenen günlerde elde edilen OD değerleri 3 farklı hücre sayısı için kayıt edilmiştir. Günlere karşılık gelen OD değerlerinin grafiği oluşturularak hücre çoğalma eğrilerine ulaşılmıştır. Grafikler analiz edilerek MTT testi için uygun hücre sayısına ve testin yapılacağı güne karar verilmiştir.

3.5. HA'ların Işınlanan Hücrelerin Sağkalımına Etkisinin İncelenmesi

Radyasyon ve HA'ların toplam etkisinin hücre sağkalımları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla disk haline getirilmiş saf HA ve Zn katkılı diğer dört grup 48 kuyulu plakalara yerleştirilmiştir. Her gruptan toplam 4 adet bağımsız grup oluşturulmuştur. HA'lar plakalara yerleştirilmeden önce 2 saat PBS ile birlikte orta hızda çalkalanmıştır. Daha sonra 80 °C'ye kadar ısıtılmış fırında 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Diskler kurutulduktan sonra sterilizasyon amacıyla cam kaplara yerleştirilip, alüminyum folyo ile üstleri örtülerek 200 °C'de iki saat bekletilmiştir.

Her bir kuyuda 2000 adet MDA-MB-231 hücresi olacak şekilde ekim işlemi yapılmıştır. Hücrelerin disklere yapışmasını sağlamak amacıyla ekim işleminden sonra 24 saat boyunca plakalar etüvde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda hücre ekili plakalar şekil 7'de gösterilmiş ışınlama koşullarında 6 MV foton demetleri ile 1, 2, 4 ve 6 Gy radyasyon dozu verilecek şekilde ışınlanmıştır. Işınlama işleminden sonra hücreler 96

saat boyunca etüvde bekletilmiştir. 96 saatin sonunda daha önce anlatılmış MTT test protokolü uygulanarak grupların canlılığı hakkında veriler elde edilmiştir. Deneyin bu aşamasında ulaşılan sonuçlar ile sadece radyasyonun hücre canlılığı üzerindeki etkisi, sadece HA'ların etkisi ve toplam etki karşılaştırılmıştır.

3.6. Western Blot Tekniği

Western Blot tekniği ile apoptotik ölüm oranlarının belirlenme aşaması basamaklar halinde aşağıda açıklanmıştır.

3.6.1. Protein Lizatlarının Elde Edilmesi ve Protein Kantitasyonu

Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması aşamasından sonra 6 kuyulu plakların her birine 16×10^3 hücre ekilmiştir. Hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37°C 'de %5 CO_2 'lik etüvde 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra kuyu içerisinde bulunan tam besiyerleri çekilmiştir. Bu aşamanın devamında, serum açıklığı koşulu uygulanarak kuyulara serumsuz besiyeri eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda, besiyerleri tekrar çekilmiştir. Kontrol kuyularına tam besiyeri eklenmiştir. Hidroksiapatit ile inkübe edilecek kuyulara, besiyeri ve $8 \mu\text{M}$ pora sahip transwell içerisinde hidroksiapatit tozları yerleştirilmiştir. Devamında, hücreler 4 Gy radyasyon ile ışınlanmıştır. Kontrol grubu olarak seçilen plaka direkt olarak etüvde inkübe edilmiştir.

Kontrol grubu ve radyasyon uygulaması yapılmış grup 6 gün süresince etüvde inkübe edildikten sonra lizis tamponu ile plaka içerisinde bulunan hücreler lizis edilmiştir. Bu sayede hücre lizatlarına ulaşılmıştır. Western Blot deneyinde kullanılacak olan protein lizatlarının, protein miktarlarının tayini amacıyla protein kantitasyonu yapılmıştır. Protein kantitasyonundan sonra lizatlar 95°C 'ye getirilmiş olan kuru ısıtma bloğu içerisinde 5 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır.

3.6.2. SDS Jel Elektroforezi ve Western Blot

Western Blot yöntemi kullanılarak, insan meme kanseri hücresinde PARP (total ve cleaved) ve Kaspaz-3 (total ve cleaved) protein ekspresyonları incelenmiştir. Kısaca protein denatürasyonu aşamasından sonra lizat içerisinde bulunan farklı

ağırlığa (kDa) sahip proteinlerin SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile yürütülerek ayrışması sağlanmıştır. Bu aşama tamamlandıktan sonra jel içerisinde ağırlıklarına göre ayrılan proteinler jelden PVDF membrana transfer edilmiştir. Daha sonra membranın %5 BSA TBST solüsyonu içerisinde 1-1.5 saat süresince oda sıcaklığında ve 100 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde blokasyonu gerçekleştirilmiştir. Blokasyon işlemi bittikten sonra 1X PBS-T ile membran 3 defa 10'ar dakika 100 rpm hızda çalkalayıcıda yıkanmıştır. Bu sayede BSA kalıntıları membran yüzeyinden temizlenmiştir.

3.6.3. Kemilüminesans Görüntüleme ve Dansitometrik Analiz

Membran primer antikor ile muamele edilmiştir. Denatüre olmuş proteinlerin tek bir determinantını yüksek afinite ve özgülükte tanıyan monoklonal antikorlar hedeflediğimiz proteinlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Kontrol proteini olarak β -aktin seçilmiştir. Primer antikor inkübasyonundan sonra primer antikorun görüntülenebilmesi için *horseradish* peroksidaz (HRP) konjuge primer antikorun elde edildiği organizmaya karşı üretilmiş sekonder antikor ile inkübasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. Sekonder antikorun bağlanmış olduğu proteinlerin kemoluminesans ışımaya yapabilmesi için, sekonder antikora konjuge HRP'de bulunan peroksidaz enziminin substratı olan luminol içeren *enhanced chemiluminescence* (ECL) solüsyonu kullanılmıştır. Son olarak kemoluminesans görüntüleme ile elde edilen bantların dansitometrik yoğunlukları tespit edilmiştir.

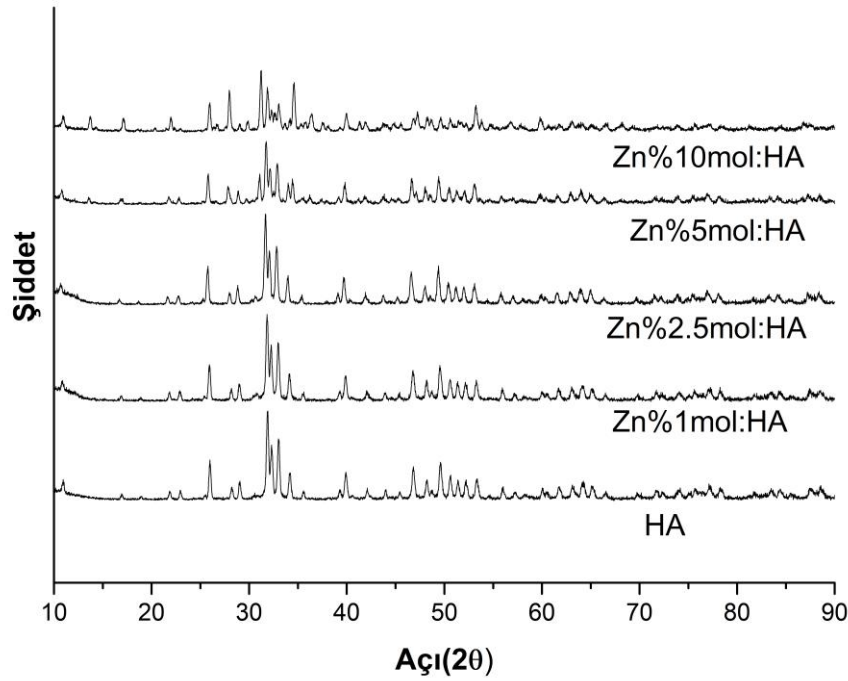
3.7. İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler için IBM SPSS Statistics Version 22 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analiz amacıyla Student t testi uygulanmıştır. Yapılan testlerin sonucunda $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sentetik Olarak Sentezlenmiş Hidroksiapatitlerin Karakterizasyonu

Beş farklı numune için $10^{\circ} \leq 2\theta \leq 90^{\circ}$ 'de elde edilmiş XRD kırınım desenleri Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. 900 °C 1 saat sinterlenmiş numuların XRD kırınım desenleri.

XRD desenleri incelendiğinde piklerin referans 09-0432 HA pikleri ile örtüştüğü görülmüştür. HA, Zn(%1 mol):HA, Zn(%2.5 mol):HA ve ve Zn(%5 mol):HA maksimum şiddetleri referans 09-0432 HA ile yakın açı değerlerindedir. Ancak Zn(%10 mol):HA'nın maksimum pikinin grafikte sola doğru kaydığı görülmektedir. Zn(%10 mol):HA'nın XRD deseni 09-0169 beta tri-kalsiyum fosfat (*tricalcium phosphate*, β -TCP) HA fazının desenine daha yakındır. Nitekim Farzadi ve ark.(74) β -TCP ve HA fazlarının yüzdeleri hesapladıkları formülasyon ile elde edilen sonuçlara göre Zn(%10 mol):HA'da %59 β -TCP, %41 HA fazı olduğu görülmüştür. Kullanılan formülasyon denklemi 4.1.1'de verilmiştir (74).

$$RIR = \frac{I_{\beta-TCP}}{I_{\beta-TCP} + I_{HA}} \quad (4.1.1)$$

Bu denklemde RIR (*Relative Intensity Ratio*) bağıl yoğunluk oranını ifade etmektedir. $I_{\beta-TCP}$ ve I_{HA} sırasıyla (2 0 1 0) ve (2 1 1) piklerine ait normalize edilmiş şiddetlerdir. Tablo 2’de hesaplanan faz oranları 5 farklı örnek için verilmiştir.

Tablo 2. 900 °C 1 saat sinterlenmiş numunelere ait XRD kırınım desenlerinden hesaplanan faz oranları.

Örnek	Faz Oranları (%)	
	HA	β -TCP
Saf HA	100	0
Zn(%1 mol):HA	92,7	7,3
Zn(%2.5 mol):HA	90	10
Zn(%5 mol):HA	67	33
Zn(%10 mol):HA	41	59

XRD kırınım desenleri analiz edildiğinde (0 0 2) ve (3 1 0) piklerine ait ölçülmüş pik genişlikleri Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Numunelerin XRD kırınım desenlerinden elde edilmiş (0 0 2) ve (3 1 0) piklerinin ölçülen genişlikleri.

Örnek	Pik Genişlikleri(2 θ)	
	(0 0 2)	(3 1 0)
Saf HA	0,416	0,568
Zn(%1mol):HA	0,514	0,574
Zn(%2.5mol):HA	0,466	0,572
Zn(%5mol):HA	0,468	0,574
Zn(%10mol):HA	0,526	0,610

Pik genişlikleri incelendiğinde en dar genişliğe saf HA'nın sahip olduğu görülmektedir. Zn katkılama miktarı değiştikçe piklerin genişliği değişmektedir. En geniş pik değerleri Zn(%10mol):HA örneğinde ölçülmüştür. Tablo 3'teki sonuçlar saf HA'nın kristalitesinin Zn katkılı HA'lardan daha fazla olduğunu gösterir niteliktedir.

Örneklerin teorik olarak hesaplanmış yoğunlukları, kafes parametreleri ve kristal boyutları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. XRD sonuçlarına göre hesaplanmış kafes parametreleri ve teorik yoğunluklar.

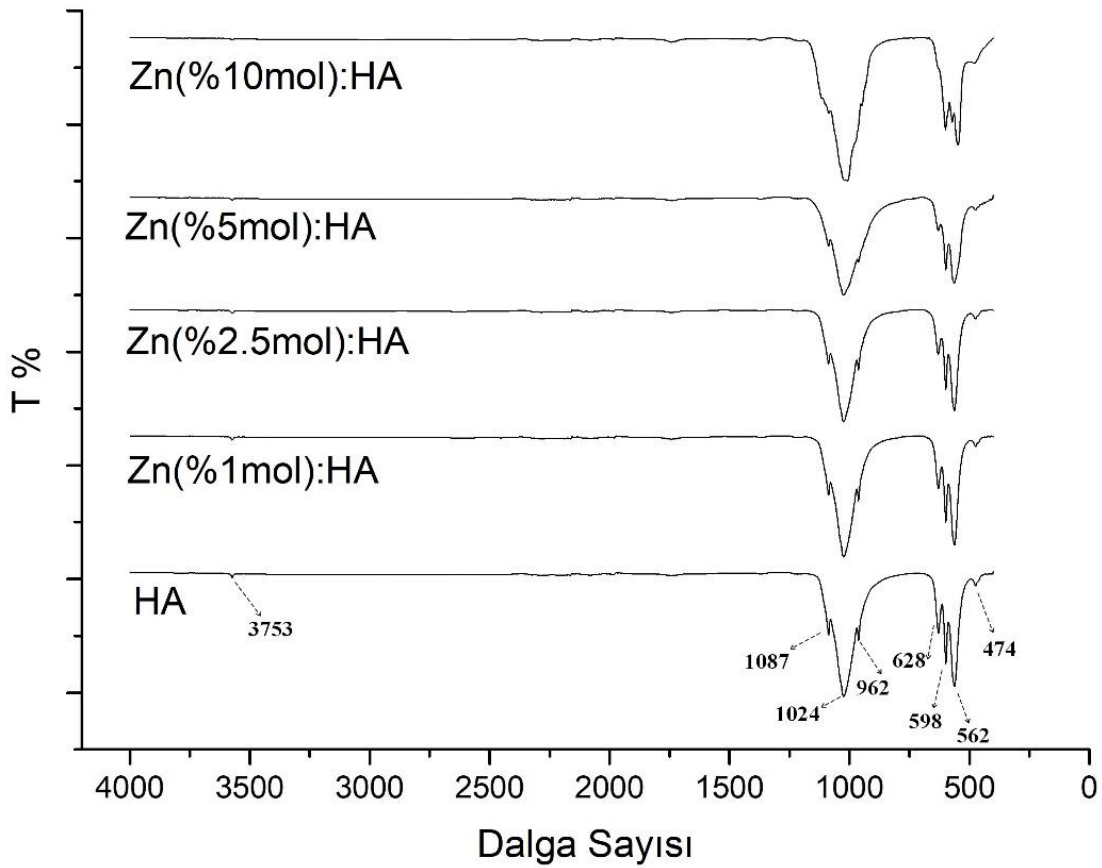
Örnek	Kafes Parametreleri			Teorik Yoğunluklar (g/cm ³)	Kristal Boyutları (nm)
	α -Axis(Å)	c-Axis(Å)	Hücre Hacmi. (Å) ³		
Saf HA	9,40484	6,86718	526,03	3,1712	39,98
Zn(%1 mol):HA	9,41017	6,87572	527,28	3,1636	33,13
Zn(%2.5 mol):HA	9,43112	6,89758	531,32	3,1396	36,53
Zn(%5 mol):HA	9,42537	6,89043	530,12	3,1467	36,38
Zn(%10 mol):HA	9,40956	6,8691	526,71	3,1671	33,66

09-0432 HA fazına ait kafes parametreleri $\alpha = 9.418 \text{ \AA}$ ve $c = 6.884 \text{ \AA}$, teorik yoğunluk $3,16 \text{ g/cm}^3$ 'tür. Hacim ise $528.8 (\text{Å})^3$ 'tür. Sonuçlar referans değerler ile uyumludur.

Ortalama kristal boyutlarının Zn katkılı HA örneklerinde saf HA'ya göre azaldığı görülmüştür. Kafes parametreleri ve hücre hacimleri de Zn oranına göre farklılık göstermektedir. Her iki eksen uzunlukları genel olarak Zn katkılı örneklerde saf HA'ya göre daha fazladır.

Sentezlenen HA'ların bağ yapılarını incelemek amacıyla yapılan FTIR analizinin sonuçları Şekil 9'da verilmiştir. HA, Zn(%1 mol):HA, Zn(%2.5 mol):HA ve Zn(%5 mol):HA örneklerinin spektrumunda PO_4^{-3} 'e ait karakteristik asimetrik P-O germe bandı 1087 ve 1024 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Zn(%10 mol):HA'nın spektrumunda ise bu bağlardan 1087 'de olanı kaybolmuştur. 598 cm^{-1} ve 562 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantlar PO_4^{-3} 'ün bükülme titreşimlerine bağlıdır. Tüm örneklerde bu bantlara rastlanmıştır. Fosfat germe bandı 474 cm^{-1} 'de izlenmiştir (O-P-O). 962 cm^{-1}

¹'de simetrik P-O germe bandına ait soğrulma gözlenmiştir. Bu bant Zn katkılama miktarı arttıkça kaybolmuştur. HA fazının karakteristik bantı olan ve OH⁻ grubundan kaynaklanan 3573 cm⁻¹'deki bant Zn(%10 mol):HA için minimum şiddettedir. Artan β-TCP ve azalan HA fazı bu davranışın sebebi olabilir. β-TCP'nin PO₄⁻³'e ait karakteristik bantları 3404 ve 1737 cm⁻¹'de görülmüştür. Bu bantlar, Zn(%10 mol):HA

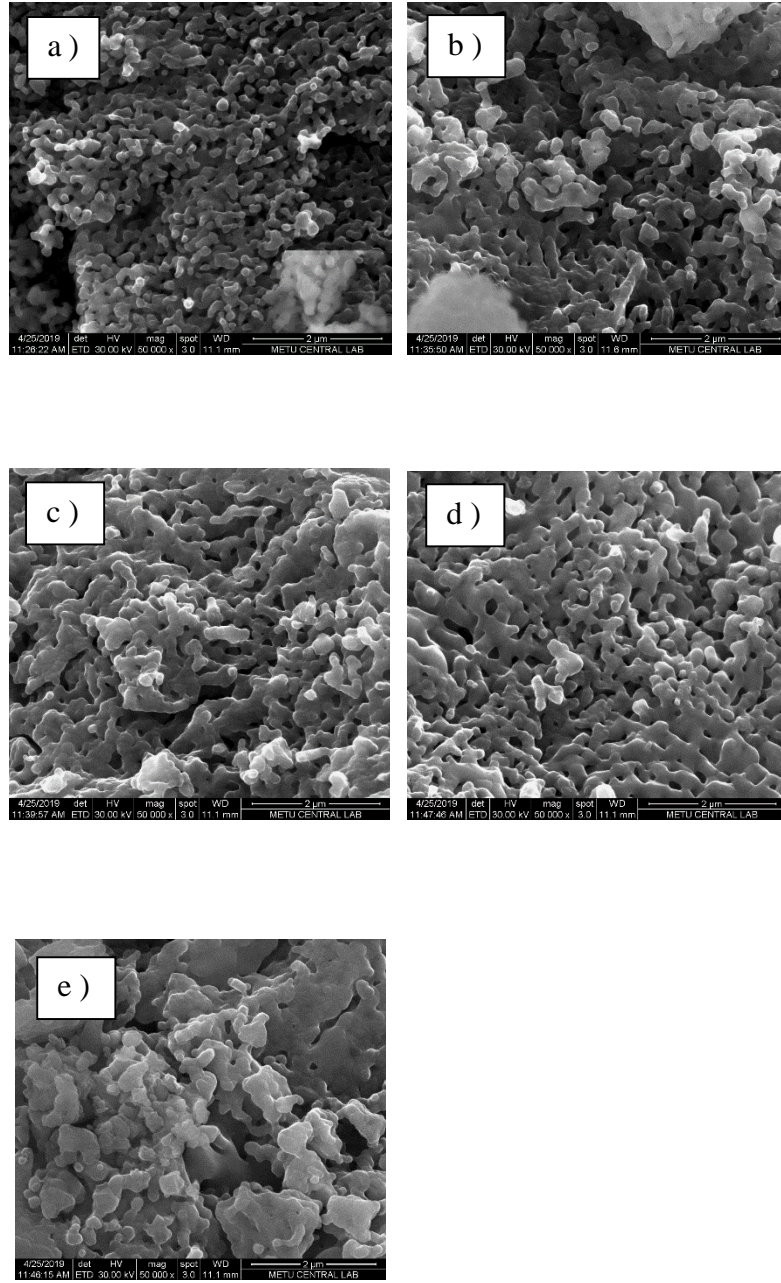


Şekil 9. Elde edilen beş farklı numuneye ait FTIR sonuçları

grubunda en belirgindir. Bu örnek için 940-1082 cm⁻¹ de gözlenen bantlar PO₄⁻³'ün germe bandına aittir. 546 ve 600 cm⁻¹ ise PO₄⁻³'ün titreşim tepe noktalarını ifade eder.

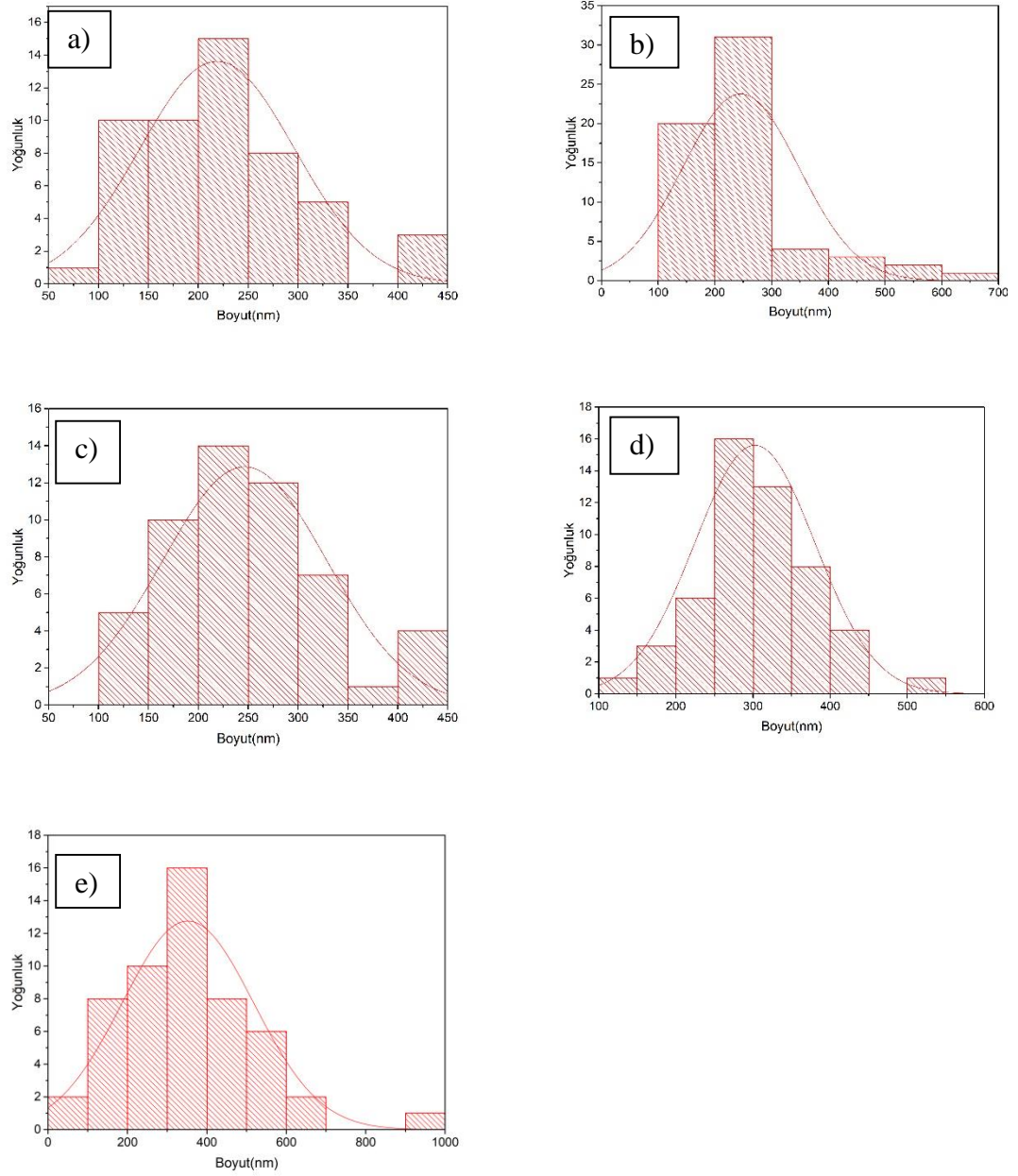
4.2. SEM Görüntüleri

Sentezlenen HA gruplarının ait SEM görüntüleri Şekil 10'da gösterilmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinde sentezlenen HA'ların morfolojik görüntülerinin benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 10. 900 °C’de sinterlenmiş HA örneklerinden elde edilen a) saf HA, b) Zn(%1mol):HA, c) Zn(%2.5mol):HA, d) Zn(%5mol):HA, e) Zn(%10mol):HA ait SEM görüntüleri.

Zn katkılama miktarı arttıkça parçacık boyutlarının arttığı gözlenmiştir. Parçacık boyutları sırasıyla saf HA, Zn(%1mol):HA, Zn(%2.5mol):HA, Zn(%5mol):HA ve Zn(%10mol):HA için 218, 245, 246, 302 ve 352 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 11).

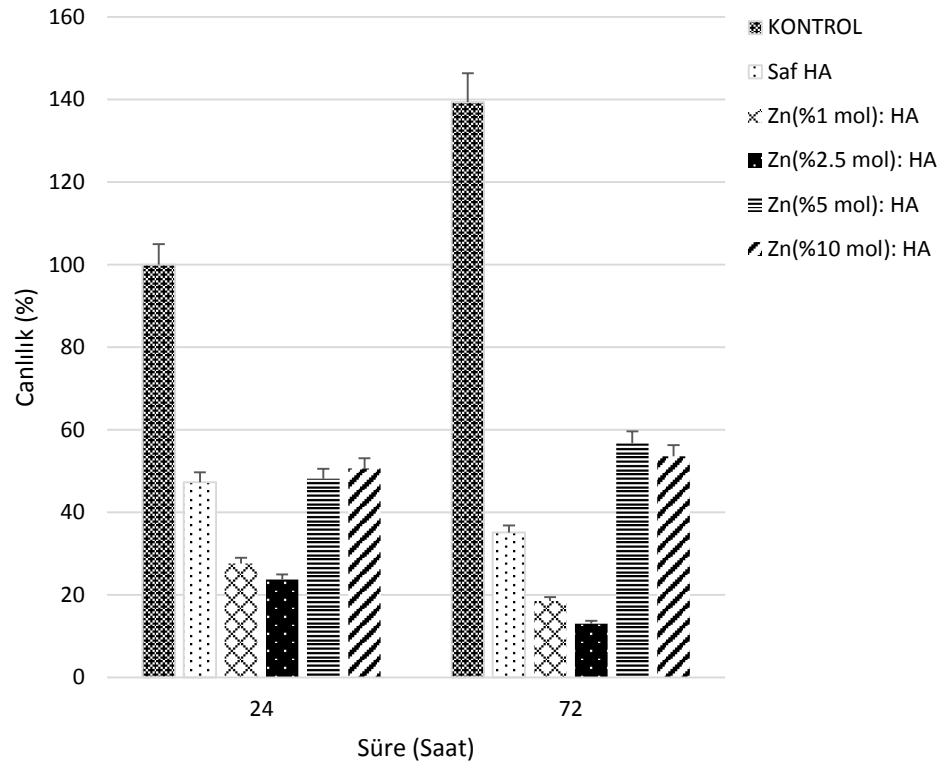


Şekil 11. SEM görüntülerinden ölçülen parçacık boyutları a) saf HA, b) Zn(%1mol):HA, c) Zn(%2.5mol):HA, d) Zn(%5mol):HA, e) Zn(%10mol):HA.

4.3. MTT Sitotoksosite Test Sonuçları

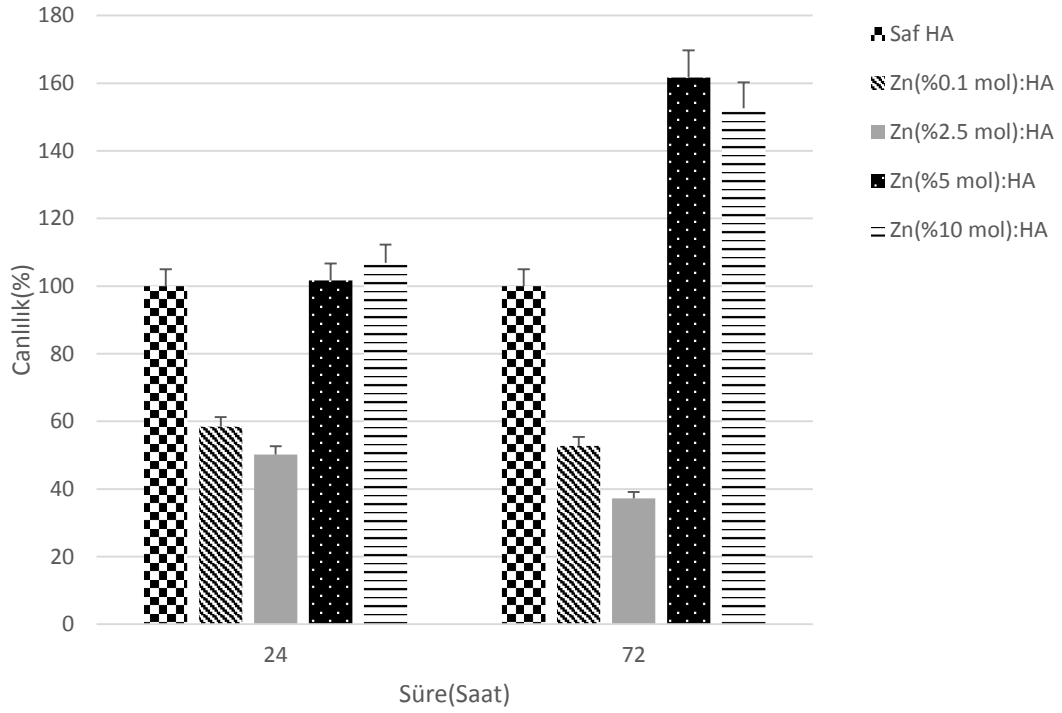
MTT sitotoksosite sonuçları, Şekil 12’de verilmiştir. Şekil 12’de, HA’sız grup kontrol grubu olarak seçilmiştir. Grafik incelendiğinde 24 saat sonuçlarına göre yaklaşık %50 canlılık oranına sahip saf HA, Zn(%5 mol):HA ve Zn(%10 mol):HA gruplarının biyoyumlu olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Zn(%2.5 mol):HA’nın hem 24 saat hem de 72 saat sonuçlarına göre canlılık oranının incelenen gruplar arasında

en az olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Zn(%2.5 mol):HA'ların MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği söylenebilir.



Şekil 12. MDA MB 231 hücreleri ekildikten 24 saat ve 72 saat sonra MTT testi ile elde edilen canlılık oranları. Kontrol grubu olarak sadece hücre ekilen grup seçilmiştir.

Literatürde biyoyumlu olarak kabul edilen saf HA'lara ait canlılık oranları referans alınarak elde edilen sonuçlar Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13. MDA MB 231 hücreleri için saf HA referans alındığında MTT testi sonucu elde edilen canlılık oranları.

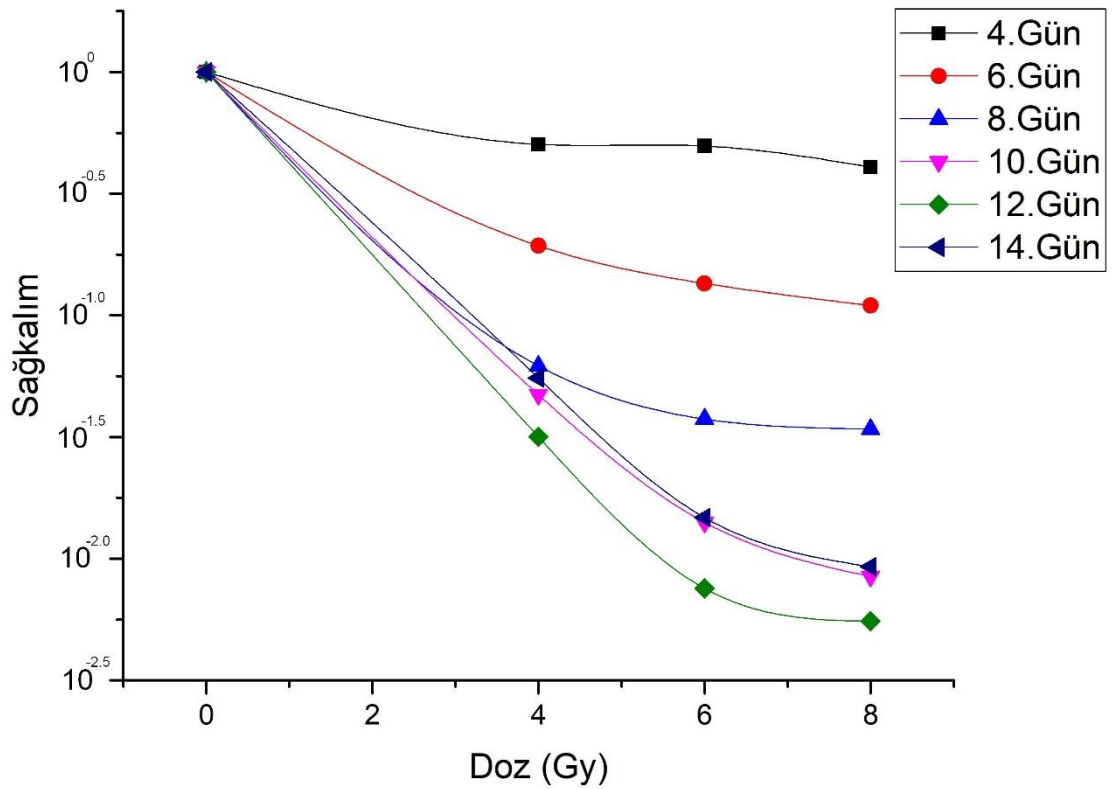
Şekil 13'te hücrelerin canlılığının Zn(%5 mol):HA ve Zn(%10 mol):HA gruplarında saf HA'ya göre daha fazla olduğu söylenebilir ($p < 0.01$). Zn(%2.5 mol):HA grubunda ise en az olduğu görülmektedir. Ayrıca 24 ve 72. saat sonuçları kıyaslandığında canlılık sadece Zn(%5 mol):HA ve Zn(%10 mol):HA gruplarında artmaktadır. Zn %5 mol ve %10 mol katkılama miktarları saf HA'ların biyoyumluluklarını arttırmaktadır ($p < 0.01$). Ancak %1 ve %2.5 mol Zn katkılama oranlarında ise saf HA'ya göre daha toksik örnekler elde edilmiştir.

Genel olarak sonuçlar incelendiğinde hücre canlılık oranının Zn katkılama miktarına bağlı olduğu sonucu çıkarılabilir.

4.4. MTT testi ile Hücre Sağkalımların Elde Edilmesi İçin Yapılan Optimizasyon Çalışmasının Sonuçları

Çalışmanın bu aşamasında kuyulara ekilen hücre sayısının ve MTT deneyi uygulanacak günün sağkalım eğrileri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

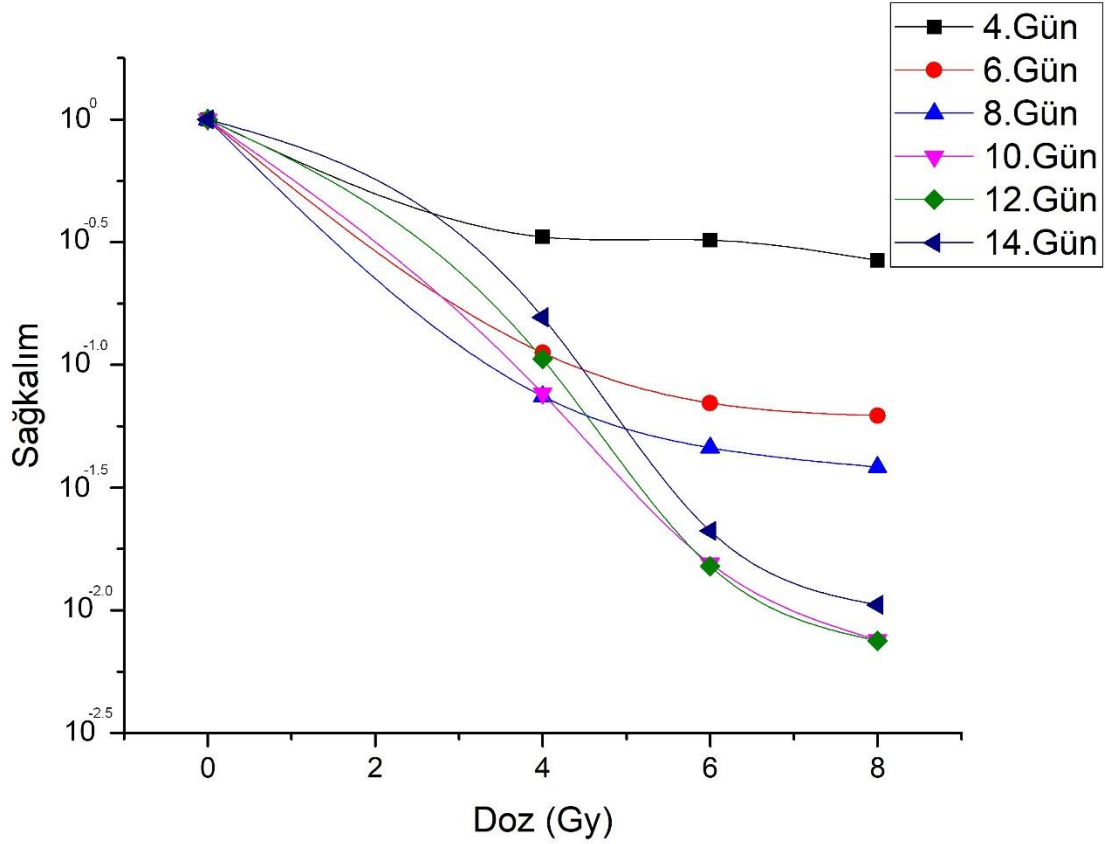
Kuyulara 1000 hücre ekilerek farklı günlerde oluşturulmuş sağkalım eğrileri Şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14. 1000 adet MDA MB 231 hücresi ekildiğinde farklı günlerde MTT testi ile oluşturulan hücre sağkalım eğrileri.

Şekil 14 incelendiğinde, MTT testi değişik günlerde uygulandığında birbirinden farklı sağkalım eğrileri elde edilmiştir. Ancak 10. günden itibaren eğri şekillerinin birbirine benzemeye başladığı görülmektedir. Sonuçlar MTT testi uygulanacak günün sağ kalım eğrilerini etkilediğini gösterir niteliktedir.

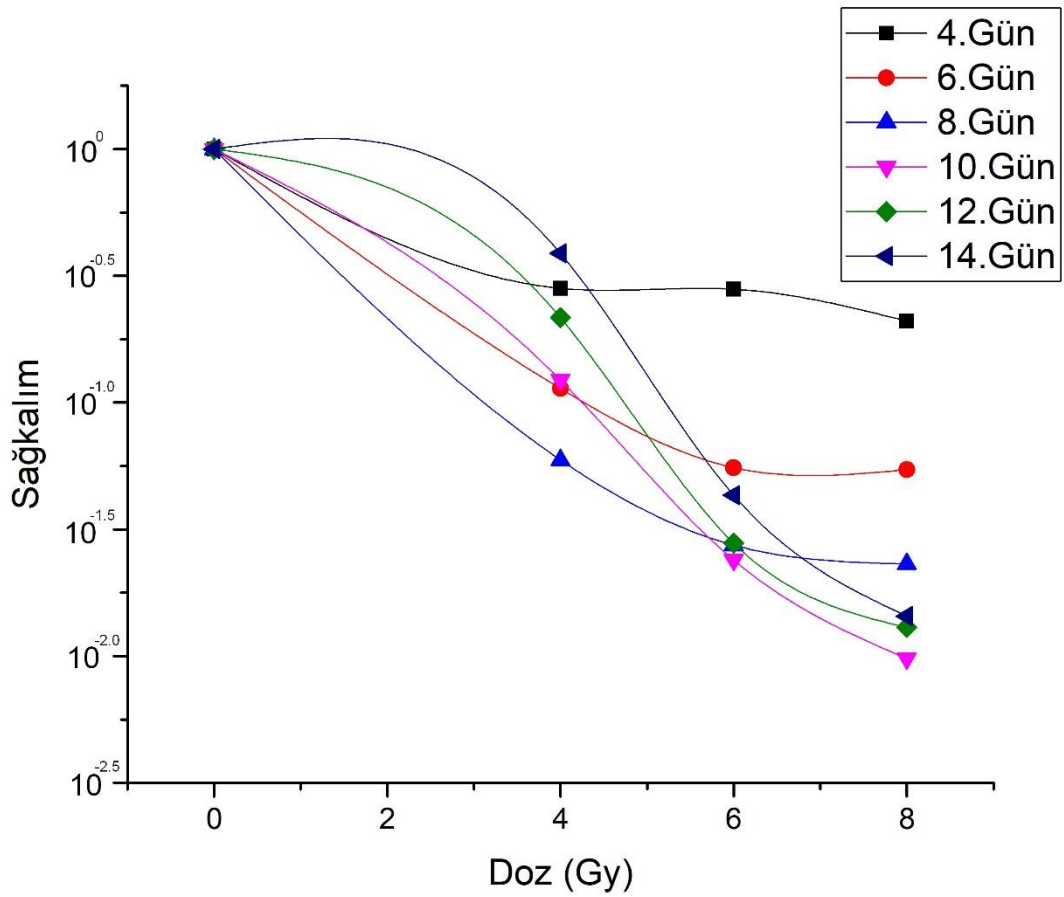
Şekil 15'te kuyulara 2000 hücre ekilerek elde edilen sağkalım eğrileri gösterilmiştir.



Şekil 15. 2000 adet MDA MB 231 hücre ekildiğinde farklı günlerde MTT testi ile oluşturulan hücre sağkalım eğrileri.

Şekil 15 incelendiğinde, 2000 hücre için 1000 hücrede gözlendiği gibi değişik günlerde yapılan MTT testi ile elde edilmiş eğrilerin birbirinden farklı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. 10. gün ve sonrasında elde edilen sağkalım eğrilerinin birbirine benzer olduğu görülmektedir.

Şekil 16'da ise kuyulara 4000 hücre ekildiğinde elde edilen sağkalım eğrileri verilmiştir.



Şekil 16. 4000 adet MDA MB 231 hücre ekildiğinde farklı günlerde MTT testi ile oluşturulan hücre sağkalım eğrileri.

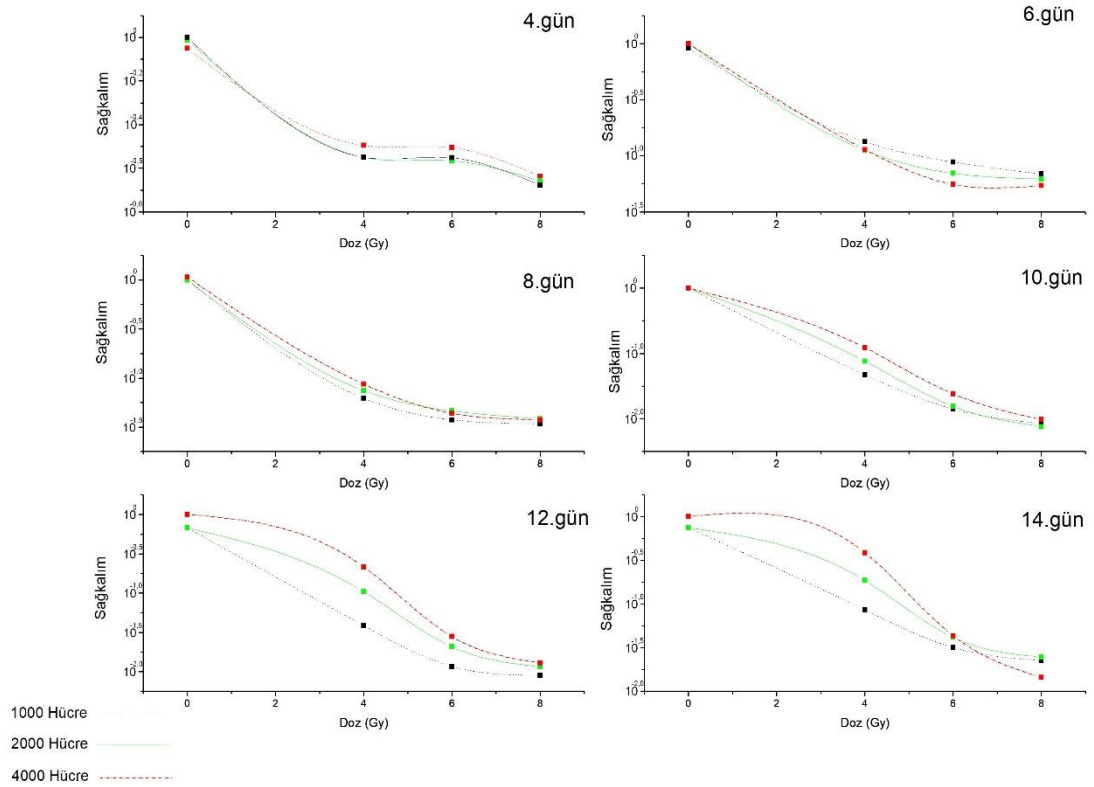
Şekil 16 incelendiğinde 1000 ve 2000 hücre ekilmiş gruplarda olduğu gibi 4000 hücre için de sağkalım eğrilerinin MTT uygulanan güne göre farklılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Deneyin bu aşamasında MTT testi ile hücre sağkalım eğrileri elde edilmiş ve canlılığın okunduğu günün önemli olduğu gözlenmiştir. Genel olarak 6. ve 8. günlerde oluşturulanların kendi içinde, 10, 12 ve 14. gündekilerin ise kendi içinde benzer oldukları izlenmiştir. 4. günün ise MTT deneyinin uygulanması için erken olduğu düşünülmektedir.

Deneyin bir sonraki aşamasında ekilen hücre sayısının sağkalım eğrileri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu incelemede hücre sayısından bağımsız olarak

oluşturulabilecekleri günlerin tayini amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı hücre sayıları için aynı günlerde sağkalım eğrileri çizilmiştir.

Şekil 17’de farklı hücre sayıları ile aynı gün oluşturulan sağkalım eğrileri verilmiştir.



Şekil 17. Ekilen MDA MB 231 hücre sayısının MTT testi ile oluşturulan sağkalım eğrileri üzerindeki etkisinin incelenmesi.

Grafikler incelendiğinde 4, 6 ve 8. günlerde yapılan MTT deney sonuçları ile tüm test edilen hücre sayıları için benzer sağkalım eğrileri elde edilmiştir. Fakat 10. gün ve sonrasında oluşturulanlar farklı sayıdaki hücre grupları için değişmektedir.

Daha önce elde ettiğimiz sonuçlar MTT deneyi ile hücre sağkalım eğrilerinin oluşturulmasında deneyin yapılacağı günün önemli olduğunu göstermektedir. Şekil 17 ise kuyulara ekilen hücre sayısının elde edilen sağkalım eğrilerini etkilediğini düşündürmektedir.

Hücre sağkalım eğrilerinden elde edilebilecek en önemli bilgilerden bir tanesi D_0 dozudur. D_0 dozu uygulandığında hücre popülasyonunun canlılığını %37'ye düşüren dozdur. Deney sonuçlarından elde edilen D_0 (Gy) dozları Tablo 5'te verilmiştir.

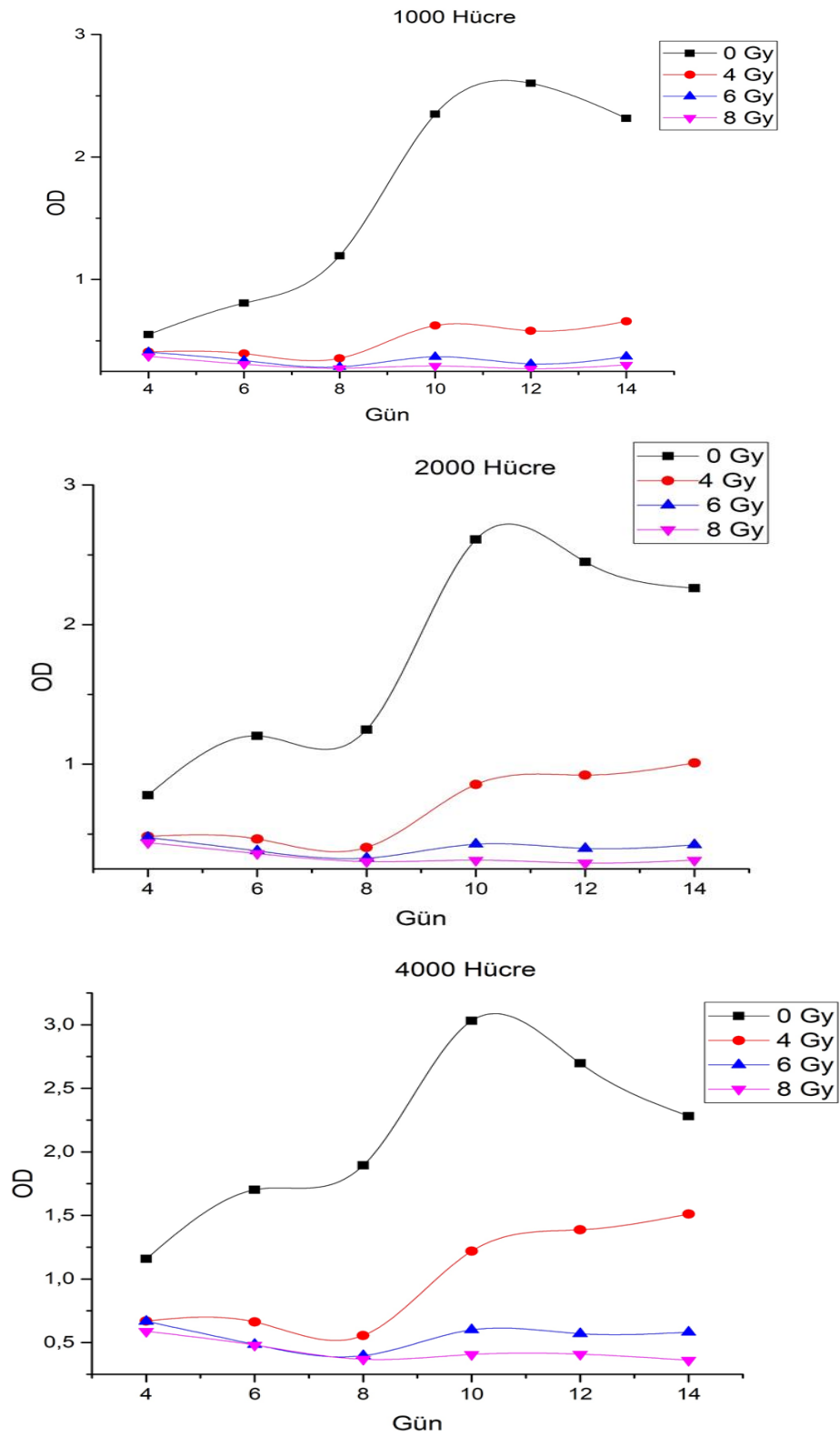
Tablo 5. Farklı gün ve ekilen MDA MB 231 hücre sayısına göre elde edilen D_0 doz değerleri.

Hücre Sayısı	D_0 (Gy)					
	4. Gün	6. Gün	8. Gün	10. Gün	12. Gün	14. Gün
1000	8,00±0,02	2,03±0,02	1,21±0,08	1,27±0,02	1,15±0,07	1,39±0,04
2000	3,30±0,04	1,67±0,06	1,28±0,04	1,74±0,12	2,29±0,03	2,91±0,03
4000	2,60±0,04	1,72±0,02	1,22±0,05	2,33±0,03	3,36±0,02	4,00±0,12

Tablo 5 incelendiğinde 4, 6, 8, 10, 12 ve 14. günlerde ekilen farklı hücre sayıları için D_0 doz değerleri arasındaki maksimum fark sırasıyla 5.4, 0.3, 0.07, 1.06, 2.21 ve 2.61 Gy'dir. 6. ve 8. günlerde D_0 dozları arasındaki fark en az iken, 4. günde bu fark en fazladır.

Daha önce gösterilmiş Şekil 17'deki 4. güne ait grafiklere bakıldığında oluşturulan sağkalım eğrilerinin hücre sayısından bağımsız olduğu sonucu çıkarılabilir. Ancak D_0 değerleri irdelendiğinde aralarındaki farkın fazla olması aksini düşündürmektedir.

Deneyin sonraki aşamasında uygulanan radyasyon dozlarına göre hücre çoğalma eğrileri oluşturulmuştur. Oluşturulan grafikler Şekil 18'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde kontrol grubu için 10. günden sonra canlılık azalırken 2000 ve 4000 hücre gruplarında 6 ile 8. günler arasında bir plato gözlenmiştir. 8. günden sonra proliferasyonun bazı gruplarda daha az olmakla birlikte, tüm gruplarda arttığı görülmektedir. 2000 ve 4000 hücre gruplarında 6 ile 8. günler arasında bir plato izlenmiştir. Proliferasyonun bu günlerden sonra artmasında 6. günden sonra değiştirilen besi yerinin etkili olabileceği düşünülmektedir.



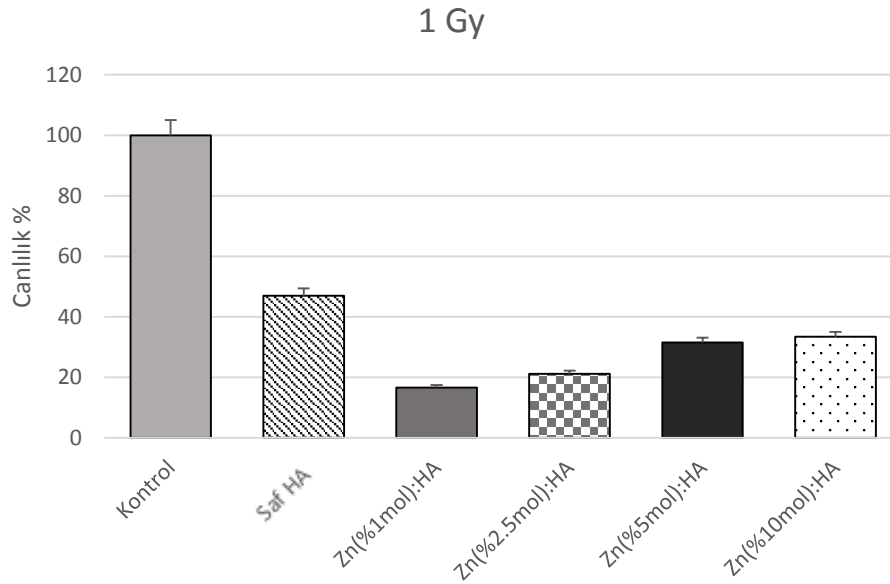
Şekil 18. MDA MB 231 hücrelerine ait farklı ekilen hücre sayılarına ait hücre çoğalma eğrileri.

Elde edilen bulgular neticesinde HA'lı gruplara 1, 2, 4 ve 6 Gy radyasyon uygulanarak 6. günde yapılan MTT testi sonuçları ile HA'ların radyoduyarlılığa olan etkisi araştırılmıştır.

4.5. HA'ların Radyoduyarlılığa Etkisi ve Yapılan MTT Testi Sonuçları

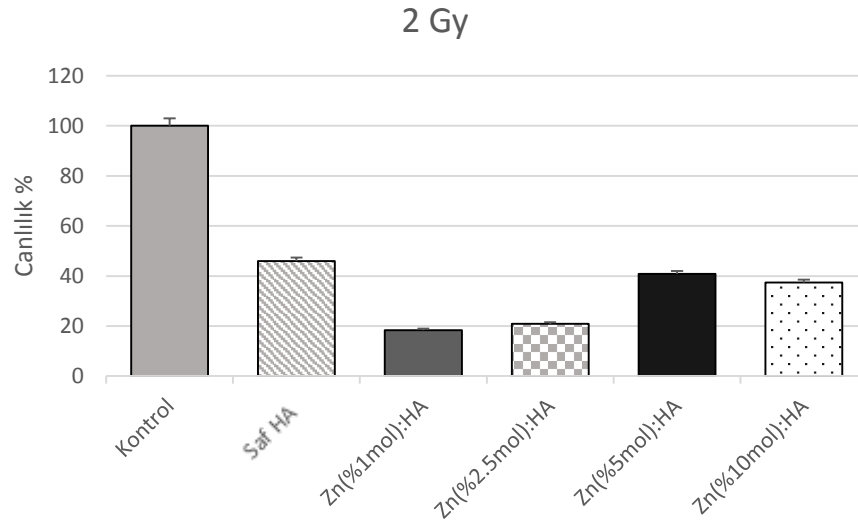
Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21 ve Şekil 22'de sırasıyla 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy ve 6 Gy radyasyon dozu ile ışınlanmış HA'sız ve diğer beş farklı HA'lı hücre gruplarına ait canlılık oranları verilmiştir. Verilen grafiklerde kontrol grubu olarak ışınlanmış HA'sız hücre grupları seçilmiştir.

Canlılık oranı 1 Gy radyasyon dozu uygulandığında Zn(%1mol):HA için %20'nin altında iken Zn(%10mol):HA için %30 civarındadır (Şekil 19). Saf HA için %40 civarındadır.



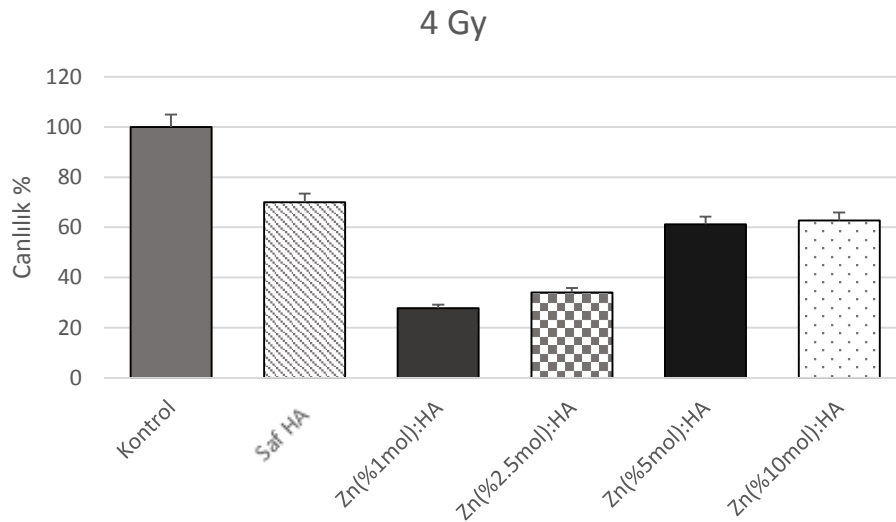
Şekil 19. 1 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 1 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir.

2 Gy radyasyon dozu uygulandığında HA'sız kontrol grubuna göre en az canlılık %20'nin altında olan Zn(%1mol):HA grubuna ait iken en fazla canlılık oranının ise %45 civarında olan saf HA'ya ait olduğu görülmüştür (Şekil 20).



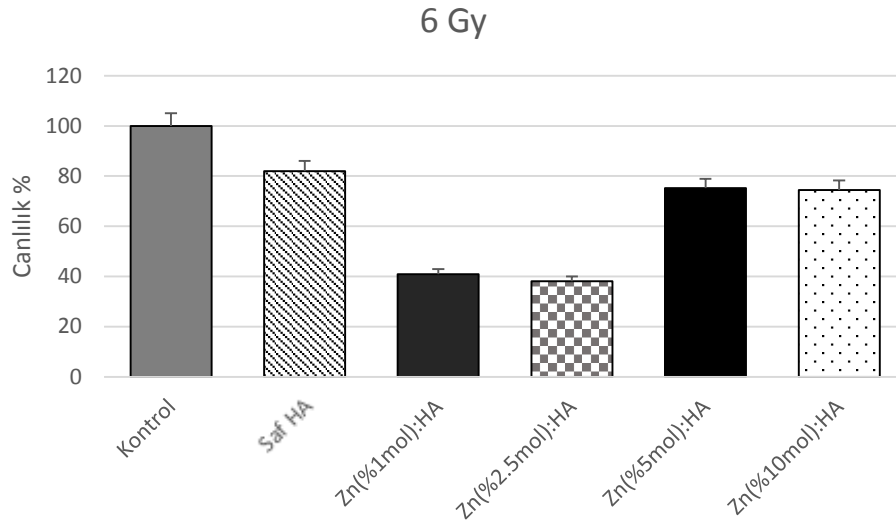
Şekil 20. 2 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 2 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir.

4 Gy ve 6 Gy için elde edilen canlılık oranlarına ait grafikler incelendiğinde 1 ve 2 Gy radyasyon dozu uygulanan gruplara göre HA'lı ve HA'sız hücrelere ait canlılık oranları arasındaki farkın azaldığı görülmektedir ($p < 0.05$) (Şekil 21 ve Şekil 22).



Şekil 21. 4 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 4 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir.

6 Gy radyasyon dozu için verilen canlılık oranları Zn(%5mol):HA ve Zn(%10mol):HA için yaklaşık %70'i bulmaktadır.



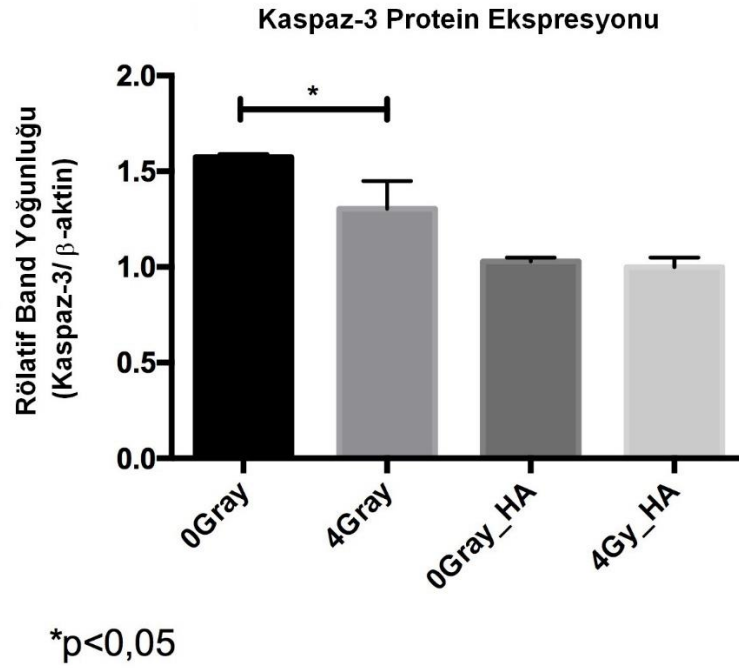
Şekil 22. 6 Gy radyasyon dozu uygulanan HA'sız ve HA'lı MDA MB 231 hücre dizisine ait yüzde canlılık. Kontrol grubu olarak sadece 6 Gy radyasyon uygulanan grup seçilmiştir.

Genel olarak tüm grafiklerde HA'lı gruplara ait canlılığın sadece radyasyon uygulanan gruplara göre oldukça azaldığı görülmektedir. Canlılık oranları arasındaki fark, düşük radyasyon dozlarında daha fazladır ve radyasyon dozu arttıkça azalmaktadır. Bu azalmanın sebebi olarak radyasyon dozu arttıkça kontrol gruplarındaki ölüm oranlarındaki artış düşünülmektedir.

HA'ların sitotoksisite testlerinde, Zn(%5mol):HA ve Zn(%10mol):HA gruplarında canlılık oranlarının saf HA grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$). Radyasyon ile birlikte HA uygulanan gruplar da ise yukarıdaki sonuçların aksine saf HA'ya ait canlılığın Zn(%5mol):HA ve Zn(%10mol):HA gruplarına göre daha fazla olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Sonuçlar katkılanan HA'lar ile birlikte radyasyonun etkisinin arttığı yönündedir.

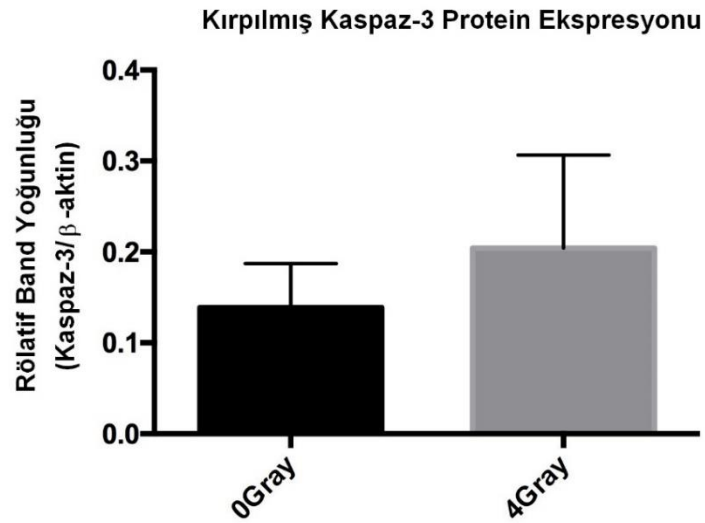
4.6. MDA MB 231 hücrelerinde kaspaz-3 ve PARP ekspresyonunun incelenmesi

Western Blot deneyinde yüklenen protein lizatlarında PARP ve kaspaz-3 proteinleri incelenmiştir. Kaspaz-3 protein ekspresyonları Şekil 23'te verilmiştir. Radyasyonsuz ve HA'sız gruplara göre 4 Gy radyasyon uygulanan, sadece HA uygulanan ve HA ile birlikte 4 Gy radyasyon uygulanan gruplarda kaspaz-3 protein ekspresyonu azalmaktadır ($p < 0.05$).



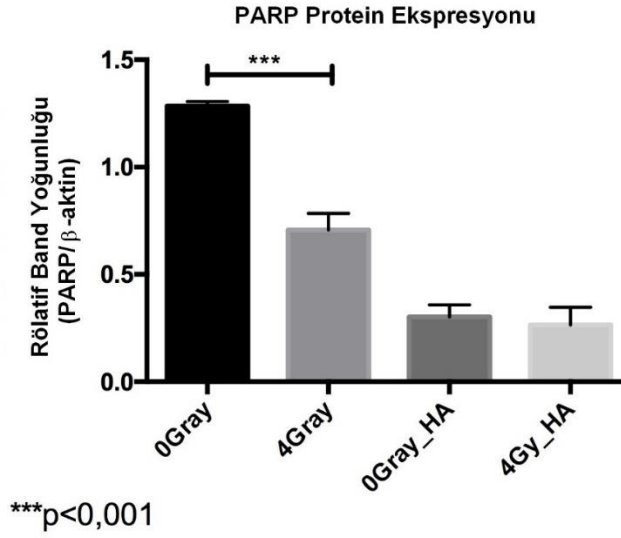
Şekil 23. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde kaspaz-3 protein ekspresyonunun incelenmesi.

Deneyle sırasında HA'lı gruplara ait kırılmış kaspaz-3 görüntüsü elde edilememiştir. Işınlanmamış ve ışınlanmış gruplara ait kırılmış kaspaz-3 sonuçları Şekil 24'te verilmiştir. Uygulanan radyasyon dozu ile birlikte kırılmış kaspaz-3 ekspresyonu artmaktadır ($p<0.05$).



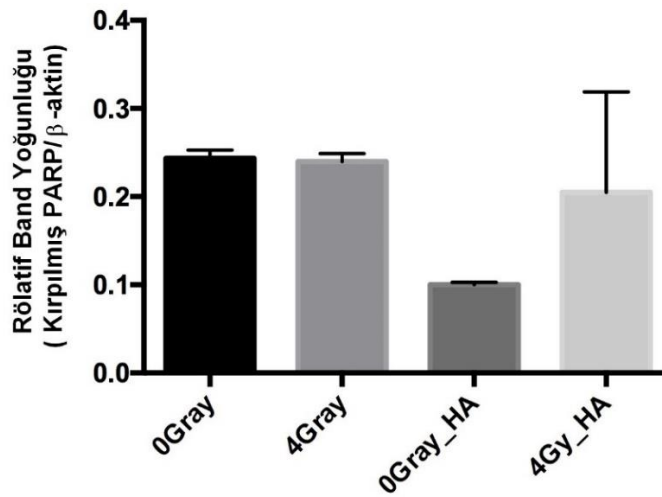
Şekil 24. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde kırılmış kaspaz-3 protein ekspresyonunun incelenmesi.

PARP proteinlerine ait sonuçlar Şekil 25'te verilmiştir. Radyasyon uygulanmamış gruba göre diğer gruplarda PARP proteinlerinin ekspresyonlarının azaldığı gözlenmiştir.



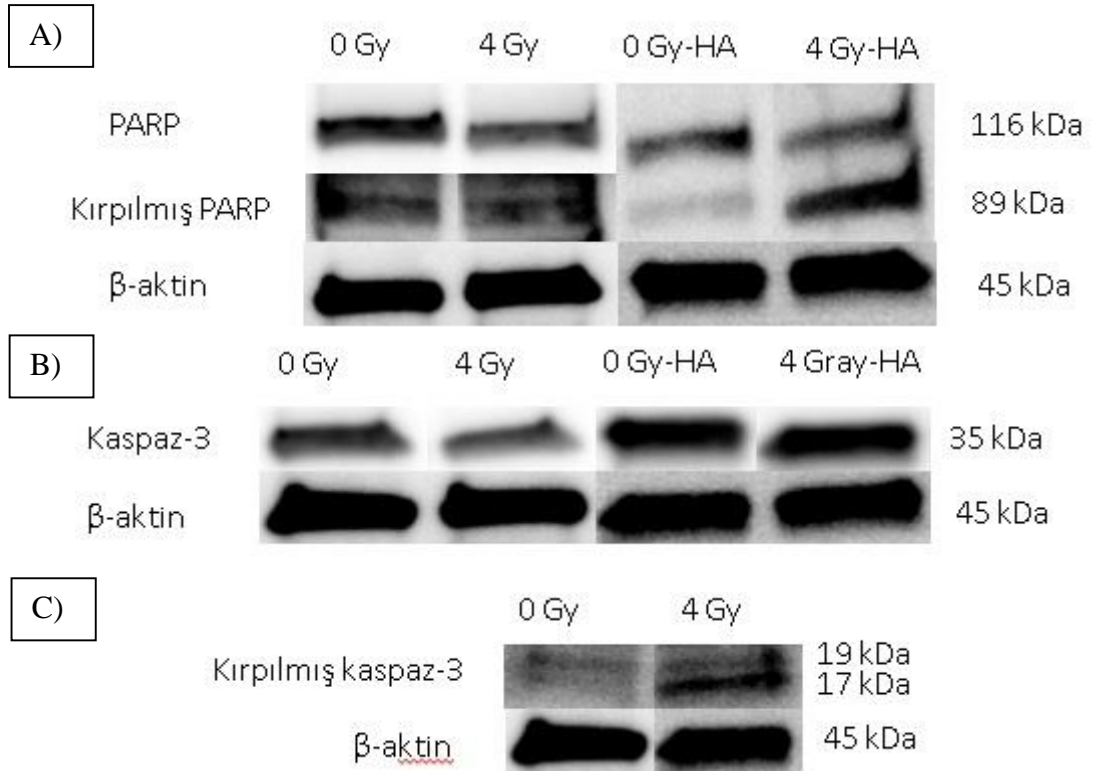
Şekil 25. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde PARP protein ekspresyonunun incelenmesi.

Kırılmış PARP proteinlerine ait sonuçlar Şekil 26'da verilmiştir. Sadece HA'lı gruba göre HA ile birlikte radyasyon uygulanmış grupta kırılmış PARP proteini ekspresyonu artmaktadır (p>0.05).



Şekil 26. Kontrol, radyasyon uygulanmış ve radyasyon ile birlikte HA uygulanmış MDA MB 231 hücrelerinde kırılmış PARP protein ekspresyonunun incelenmesi.

Deney sırasında elde edilen western blot görüntüleri ise şekil 27’de verilmiştir.



Şekil 27. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında PARP, kırpılmış PARP ve B-aktin protein ekspresyonu. A) Radyasyonsuz, 4 Gray radyasyonlu, radyasyonsuz-HA (Hidroksiapatit) ve 4 Gray radyasyonlu-HA ile inkübe edilmiş hücrelerden elde edilen protein lizatlarında PARP, Kırpılmış PARP protein ekspresyonlarının western blot görüntüleri. Kontrol proteini olarak B-aktin kullanılmıştır (n=3). B) Radyasyonsuz, 4 Gray radyasyonlu, radyasyonsuz-HA ve 4 Gray radyasyonlu-HA ile inkübe edilmiş hücrelerden elde edilen protein lizatlarında Kaspaz-3 protein ekspresyonlarının western blot görüntüleri. Kontrol proteini olarak B-aktin kullanılmıştır (n=3). C) Radyasyonsuz ve 4 Gray radyasyon uygulanmış hücrelerden elde edilen protein lizatlarında kırpılmış kaspaz-3 protein ekspresyonlarının western blot görüntüleri. Kontrol proteini olarak B-aktin kullanılmıştır (n=3).

Western Blot deneyinde azalan Kaspaz-3 ve PARP protein miktarı apoptozun arttığını göstermektedir. Artan kırpılmış protein miktarları da artan apoptoz oranı ile ilişkilidir. Yukarıda verilen grafikler incelendiğinde HA’lı gruplarda apoptoz oranının arttığı sonucuna ulaşılmaktadır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma dört aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak saf ve farklı oranlarda Zn içeren katkılı HA parçacıkları sentezlenmiştir. Daha sonra üretilen parçacıkların karakterizasyonları yapılmıştır. İkinci kısımda ise elde edilen örneklerin biyoyumlulukları in vitro ortamda MD-MBA-231 hücre dizisi kullanılarak test edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda saf HA ile birlikte %5 mol ve % 10 mol Zn içeren katkılı HA grupları biyoyumlu olarak bulunmuştur. Üçüncü aşamada ise kullanılan hücre dizisi sentezlenen HA grupları ile birlikte radyasyona maruz bırakıldığında canlılık üzerindeki etkiler araştırılmıştır. Son olarak karakterizasyon, biyoyumluluk ve radyoduyarlılık deneyleri sonucunda en ideal örnek %5 mol Zn seçilerek western blot tekniği ile apoptotik ölüm oranları araştırılmıştır. Yapılan deneylerin sonuçları Zn katkılı HA nanoparçacıklarının kanser hücrelerinin radyoduyarlılığını arttırdığını gösterir niteliktedir.

Bu tez, literatürdeki Zn katkılı HA'ların radyoduyarlılık üzerindeki etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Daha önce saf HA'ların ve çeşitli iyonlarla katkılı HA'ların kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği in vitro ve in vivo olarak yapılmış birçok deney ile gösterilmiştir (70, 75, 76). Ancak HA'ların radyoduyarlılık üzerindeki etkilerinin incelendiği araştırmalar oldukça kısıtlıdır. Yakın tarihte ilk olarak Chu ve ark.(23) tarafından yapılan çalışmada, radyasyon ile birlikte saf HA uygulandığında, insan glioblastoma (U251) ve meme kanseri (MD-DM-231) hücrelerinde DNA hasar miktarının arttığı gösterilmiştir. Bu tezde ek olarak HA'lara Zn katkılanmış ve radyoduyarlaştırıcı özelliklerinin ne yönde değiştiği araştırılmıştır. Bir diğer çalışmada ise Hf katkılı HA'ların ROS oluşumunu arttırdığı ve radyoduyarlılığı etkilediği rapor edilmiştir (24). İnsan vücudunun Zn elementine Hf'den daha aşina olması nedeniyle Zn katkılı HA'ların bu amaçla kullanılmasında daha ön planda olacağını düşündürmektedir.

Sentez aşamasında saf ve Zn katkılı HA'lar mikrodalga ışını yoluyla sentezlenmiştir. Bu teknik ilk kez Lerner ark. (77) tarafından 1991 yılında uygulanmıştır. Pratik olması sebebiyle sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Literatürde Zn^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} ve Cu^{+2} gibi iki değerli katyonların Ca^{+2} 'nın yerine geçmesinin

oldukça zor olduğu rapor edilmiştir (78). XRD ve FTIR sonuçları mikrodalga metodu ile Zn katkılı HA'ların başarılı bir şekilde sentezlenebileceğini göstermektedir.

XRD analizlerinin sonucunda elde edilen HA ve β -TCP oranlarının artan Zn miktarı ile değiştiği görülmüştür. %10 Zn katkılı örnekte β -TCP oranı HA'dan daha fazla bulunmuştur. Sonuçlar Miyaji ve ark. (79) tarafından yapılan çalışma ile uyumludur. Miyaji ve ark. %70 mol Zn'ye kadar sentezledikleri örneklerde %15 Zn katkılama miktarından sonra HA fazının kaybolduğunu göstermiştir.

XRD pikleri incelendiğinde pik genişliklerinin artan Zn miktarı ile değiştiği izlenmiştir. Genel olarak Zn katkılı HA'larda pik genişliklerinin saf HA'dan fazla olması Zn'nin kristaliteyi azalttığını göstermektedir. Literatürdeki diğer çalışmalar ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır (79, 80). Latis parametreleri "a" ve "c" ise saf HA için elde edilen değerlerden farklıdır. %5 mol Zn katkılama miktarına kadar her iki değer de artmakta, sonra ise azalmaktadır. Literatürde Zn katkılı HA'ların latis parametrelerinin incelendiği iki çalışma bulunmaktadır. Racquel ve ark. (81) tarafından artan Zn miktarı ile birlikte latis parametrelerinin de arttığı edilmiştir. Ancak Miyaji ve ark. (79)'nın sonuçlarında %5 mol Zn'ye kadar arttığı ve daha sonrasında azaldığı gösterilmiştir. Bu tezde elde edilen sonuçlar bu çalışma ile uyumludur. Saf HA ile katkılı HA'lara ait latis parametrelerindeki farklılığın Zn^{2+} (0.074 nm) iyon çapının Ca^{2+} (0.099 nm)'den daha küçük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

XRD sonuçlarından elde edilen bir diğer parametre ise kristal boyutlarıdır. Genel olarak Zn katkılı örneklerde kristal boyutları azalmaktadır. Benzer gözlem Venkatasubbu ve ark. (82) tarafından da yapılmıştır. Bu çalışmada %2, %3, %4 ve %5 Zn katkılı oldukları HA'ların kristal boyutlarının saf HA grubuna göre daha az olduğu rapor edilmiştir. Aynı şekilde bir başka araştırmada Kim ve ark.(83) ıslak kimyasal çöktürme yöntemi ile %1, %2 ve %5 mol Zn ile katkılı oldukları HA gruplarında kristal boyutlarının azaldığını göstermiştir. Kristal boyutlarındaki azalmanın, Zn^{2+} ve Ca^{2+} 'nin iyon çapları arasındaki farklılığın kristal yapısını bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Norhidayu ve ark. (84) 500, 600, 700, 800 ve 900 °C'de sinterledikleri %5 ve %10 mol Zn katkılı örneklerde artan sinterleme sıcaklığı ile kristal boyutlarının arttığını bildirmiştir. 900 °C'de sinterlenmiş %5 ve %10 mol Zn

katkılı örnekler için kristal boyutları 50.1 ve 49.24 nm hesaplanmıştır. Bu tezde ise aynı sinterleme sıcaklığında kristal boyutları 36.4 ve 33.7 nm hesaplanmıştır. Hesaplanan parçacık boyutları arasında farkın sentezleme yöntemlerinin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (73).

FTIR sonuçlarında saf HA grubunda HA'ların karakteristik bandı olan 8 adet bant gözlenmiştir. PO_4^{3-} 'e ait bantlar 1087, 1024, 962, 598, 562 ve 474 cm^{-1} 'de gözlenirken, OH^{-1} 'e ait bantlar ise 3573 ve 628 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. İzlenen bu bantlar sentezin başarıyla yapıldığını göstermektedir. Zn katkılama miktarı arttıkça bu bantların bazılarının kaybolduğu ve 628 bandının ise genişlediği görülmektedir. Genişleyen bantlar Zn miktarı arttıkça kristalitenin de azaldığını göstermektedir (81). Zn miktarı ile OH^{-1} 'e ait 3573 cm^{-1} bandının şiddeti azalmaktadır. Uysal ve ark. (85) % 2 mol Zn katkıladıkları örneklerde benzer sonucu rapor etmiştir. OH^{-1} 'e ait bandın alanının %2 mol Zn katkılı örnekte saf HA'ya göre azaldığı gösterilmiştir ($p < 0.05$). Bu azalma Zn^{+2} 'nin OH^{-1} 'in yerini aldığını göstermektedir ve Zn^{+2} 'nin HA'nın yapısına başarıyla katıldığına işaret eder. Zn miktarındaki artışa bağlı olarak değişen bir başka nicelik ise β -TCP'nin karakteristik piklerinin şiddetidir. β -TCP'ye ait karakteristik bantların şiddeti Zn arttıkça artmaktadır. HA ve Zn-HA arasındaki ayırt edici Zn-O germe bandı FTIR sonuçlarında 437 cm^{-1} gözlenmiştir(26). Zn miktarı arttıkça bu bant şiddeti artmaktadır ve P-O titreşim bandı azalmaktadır. Uysal ve ark. (85) Zn-O'ya ait bandı 433 ve 3403 cm^{-1} 'de göstermiştir. Kim ve ark. (83) ise 470 cm^{-1} 'de bu bandı rapor etmiştir. FTIR sonuçları XRD sonuçları ile örtüşmektedir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında sentezlenen HA'ların canlı hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MTT ile sitotoksikite test sonuçları incelendiğinde, Zn katkılama miktarına göre canlılığın farklılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Zn(%1 mol):HA ve Zn(%5 mol):HA'nın 72. saatte canlılık oranının 24. saate göre daha düşük olması bu örneklerin toksik olduğunu göstermektedir. Zn(%5 mol):HA ve Zn(%10 mol):HA gruplarında 24 saatten sonra canlılık oranının artması bu nanoparçacıkların biyouyumlu olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca 72. saatte Zn(%5 mol):HA ve Zn(%10 mol):HA'ya ait canlılığın saf HA'dan daha fazla olması Zn elementinin HA'ların biyolojik özelliklerini pozitif yönde etkilediğini göstermektedir. Literatürde bakteriler ve kanser hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda, Zn'nin sitotoksik özelliklerinin

miktarına bağılı olduğu belirtilmektedir (86, 87). Nilsson (88) tarafından yapılan bir çalışmada az miktarda Zn'nin hücre çoğalmasını durdurduğu rapor edilmiştir. Hücre kültürü deneylerinde elde ettiğimiz sonuçlar sitotoksosite açısından literatür ile uyumludur.

Çalışmamızın üçüncü aşamasında hücre sağkalım eğrileri elde edilmiştir. Sağkalım eğrileri klasik yöntem olan klonojenik sayım ile oluşturulmaktadır. Bu yöntem gözle sayıma dayandığından hata olasılığı oldukça yüksektir. Son yıllarda sağkalım eğrilerinin oluşturulmasında MTT testi gündeme gelmiştir. Literatürde bu teknik ile oluşturulmuş sağkalım eğrilerine rastlanmaktadır. Ancak bu test için standart bir protokol mevcut değildir. Literatürdeki farklı uygulamalar dikkate alınarak çalışmamızda MTT testi ile sağkalım eğrilerinin oluşturulmasına yönelik optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Bunun için farklı sayıda hücreler ekilerek, farklı günlerde MTT uygulanarak sağ kalım eğrileri elde edilmiştir. Sonuçlar hücreler ışınılandıktan sonra 6. ve 8. günde elde edilen sağkalım eğrilerinin ekilen hücre sayısından bağımsız olduğunu göstermektedir. 6. günden sonra hücrelerin besi yeri değiştirildiğinden dolayı 6. gün sağkalım eğrilerinin elde edilmesi için ideal gün olarak gözükmektedir.

4000 hücre ekilen grupta 10. günde spektrofotometrik olarak okunabilen maksimum OD değeri olan "3" aşılmıştır. 1000 hücre ekilen grupta ise 4,6 ve 8 Gy için tüm OD değerlerinin "0.5" civarında olduğu görülmektedir. Optik okuyucunun minimum değerine yakın olması sebebiyle HA eklendiğinde etkisinin görülemeyeceği düşünüldüğünden HA içeren gruplara 2000 hücre ekilmesine karar verilmiştir.

Bu tezde MD-MB-231 hücre dizisi için hücre sağkalım eğrilerinin elde edileceği zaman 6. gün ve ekilecek hücre sayısı 2000 olarak belirlenmiştir. Farklı çoğalma hızına sahip hücre dizilerinde bu protokol farklılık gösterebilir.

HA'nın radyoduyarlılığa etkisini incelemek amacıyla 6. günde MTT yapılacak şekilde 1, 2, 4, 6 Gy radyasyon dozu uygulanarak canlılık oranları sadece HA ve sadece radyasyona göre kıyaslanmıştır. Hücreler sadece Zn(%5mol):HA'ya maruz bırakıldığında canlılık oranları %50'ye düşmektedir. Sadece 1 Gy radyasyon dozu uygulandığında ise bu oran %90'dır. Zn(%5mol):HA ve radyasyon kombinasyonunda

ise bu oran %25'e düşmektedir. Aynı grup için 6 Gy radyasyon dozunda sağ kalan hücre oranı %20 iken, Zn(%5mol):HA ve radyasyon birlikte uygulandığında bu oran %14'dür. Genel olarak HA ile birlikte radyasyon uygulandığında en düşük canlılık oranları elde edilmiştir. Sitotoksisite testlerinde saf HA'lara ait canlılık oranları Zn(%5mol):HA ve Zn(%10mol):HA'ya göre daha azdır. Ancak ışınlanmış gruplarda tam tersi bulgular söz konusudur. Bu durum HA'ların %5 ve %10 mol Zn ile katkılanmasıyla radyoduyarlaştırıcı özelliklerinin artırılabilceğini ortaya koymaktadır. Bu sonuç M. Kiortsis ve ark. (89)'larının bakteriler üzerinde yaptığı çalışma ile açıklanabilir. M. Kiortsis'in Zn'nin radyoduyarlılık üzerindeki etkilerini araştırdığı çalışması, Zn ile birlikte ışınlanmış bakterilerde toksik etkilerin daha fazla olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada, Zn'nin miktarına bağlı olarak hem radyokoruyucu hem de duyarlaştırıcı olabileceği rapor edilmiştir.

Western Blot tekniği ile apoptotik ölüm oranları 4 Gy radyasyon uygulanarak Zn(%5mol):HA'lı ve HA'sız gruplar için kıyaslanmıştır. Bu ölümün belirteçleri olan Kaspaz-3 ve PARP proteinlerinin kırılmış formlarının artması HA ve 4 Gy radyasyon uygulanan gruplarda en aza inmektedir. HA'lı gruplarda elde edilen protein miktarları 0.15 µg/µl civarında idi. Farklı sayılarda hücre ekilmesine rağmen (16000, 32000, 64000) aynı oranda protein elde edilmiştir. Bunun sebebi olarak HA'nın hücre profilasyonunu azaltması düşünülmektedir. HA harici gruplarda hücre sayısı ile doğru orantılı artan protein elde edilmiştir. HA'lı gruplarda düşük olan protein ekspresyonu sebebiyle 8 µg ile gerçekleştirilmiştir. β-aktin proteini hem eşit miktarda protein yükleyip yüklediğimizi hem de hedef proteinleri normalize etmek amacıyla eklenmiştir. HA'lı gruplardaki düşük protein miktarlarından dolayı sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu tez in vitro ortamda %5 ve %10 mol Zn katkılı HA'ların saf HA'ya göre daha biyoyumlu olduklarını ortaya koymaktadır. Bu durum sağlıklı hücrelerin korunması açısından önemlidir. Diğer taraftan, radyoterapinin etkinliğinin ise saf HA'ya göre arttığı gösterilmiştir. Bu çıkarım ise tümör hücrelerinin yok edilmesi aşamasında önemlidir. İn vitro ortamda tek bir hücre dizisi ile yapılan bu deney farklı hücre dizilerine genişletilebilir. Ayrıca in vivo olarak da araştırılması önerilmektedir.

6. SONUÇLAR

Bu tezde elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

1. Mikrodalga ışını yoluyla nanoboyutta Zn katkılı HA'nın üretilebilirliği gösterilmiştir. Zn katkılama miktarı artıkça β -TCP faz oranı artmaktadır.
2. HA'nın kanser hücrelerinin proliferasyonunu etkilediği gözlenmiştir. Zn katkılama oranına göre bu etki değişmektedir. Katkılama oranı %5 mol Zn'nin altında ise toksik, üstünde ise biyouyumlu özellik göstermektedir.
3. MTT deneyi ile hücre sağkalım eğrilerini oluşturmak mümkündür. Ancak çalışılan hücre dizisine ait optimizasyon çalışması yapılması gerekmektedir. Hücre sağkalım eğrileri testin yapıldığı gün ve ekilen hücre sayısına göre farklılık gösterebilmektedir. Çoklu MTT deneyleri sonucunda MD-MBA-231 hücre dizisi için ideal günün 6. gün, hücre sayısının ise 2000 olduğu bulunmuştur.
4. %5 mol Zn katkılı HA grubunun hem fiziksel hem de biyolojik açıdan en uygun grup olduğu gösterilmiştir. Saf HA'ya göre biyouyumluluğu daha yüksek olup radyoduyarlaştırıcı etkisi de daha fazladır.

7. KAYNAKLAR

1. Adams FH, Norman A, Mello RS, Bass D. Effect of radiation and contrast media on chromosomes. Preliminary report. *Radiology*. 1977;124(3):823-6.
2. Matsudaira H, Ueno AM, Furuno I. Iodine contrast medium sensitizes cultured mammalian cells to X rays but not to gamma rays. *Radiat Res*. 1980;84(1):144-8.
3. Conde J, Doria G, Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. *J Drug Deliv*. 2012;2012:751075.
4. Mesbahi A. A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2010;15(6):176-80.
5. Zheng Y, Hunting DJ, Ayotte P, Sanche L. Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons. *Radiat Res*. 2008;169(1):19-27.
6. Chompoosor A, Saha K, Ghosh PS, Macarthy DJ, Miranda OR, Zhu ZJ, et al. The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small*. 2010;6(20):2246-9.
7. Jeremic B, Aguerri AR, Filipovic N. Radiosensitization by gold nanoparticles. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(8):593-601.
8. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Gomez-Flores RA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, et al. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:148.
9. Asharani PV, Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol*. 2009;10:65.
10. Coulter JA, Hyland WB, Nicol J, Currell FJ. Radiosensitising nanoparticles as novel cancer therapeutics--pipe dream or realistic prospect? *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2013;25(10):593-603.
11. Townley HE, Kim J, Dobson PJ. In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles. *Nanoscale*. 2012;4(16):5043-50.
12. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11613-8.
13. Mirjolet C, Papa AL, Crehange G, Raguin O, Seignez C, Paul C, et al. The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept. *Radiother Oncol*. 2013;108(1):136-42.
14. Blatnik J, Luebke L, Simonet S, Nelson M, Price R, Leek R, et al. Dye surface coating enables visible light activation of TiO₂ nanoparticles leading to degradation of neighboring biological structures. *Microsc Microanal*. 2012;18(1):134-42.
15. Hong C, An S, Son M, Hong SS, Lee DH, Lee C. In-vitro cell tests using doxorubicin-loaded polymeric TiO₂ nanotubes used for cancer photothermotherapy. *Anticancer Drugs*. 2012;23(5):553-60.

16. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 2008;180(3):222-9.
17. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:845-57.
18. Bajpai PK, Fuchs, C.M., editor Development of a hydroxyapatite bone grout. first annual scientific session of the academy of surgical research; 1985. San Antonio, TX. C.W. .
19. Piattelli A, Trisi P, Passi P, Piattelli M, Cordioli GP. Histochemical and confocal laser scanning microscopy study of the bone-titanium interface: an experimental study in rabbits. *Biomaterials.* 1994;15(3):194-200.
20. Han Y, Li S, Cao X, Yuan L, Wang Y, Yin Y, et al. Different inhibitory effect and mechanism of hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2014;4:7134.
21. Chu SH, Feng DF, Ma YB, Li ZQ. Hydroxyapatite nanoparticles inhibit the growth of human glioma cells in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:3659-66.
22. Yanhua W, Hao H, Li Y, Zhang S. Selenium-substituted hydroxyapatite nanoparticles and their in vivo antitumor effect on hepatocellular carcinoma. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces.* 2016;140:297-306.
23. Chu SH, Karri S, Ma YB, Feng DF, Li ZQ. In vitro and in vivo radiosensitization induced by hydroxyapatite nanoparticles. *Neuro-oncology.* 2013;15(7):880-90.
24. Chen MH, Hanagata N, Ikoma T, Huang JY, Li KY, Lin CP, et al. Hafnium-doped hydroxyapatite nanoparticles with ionizing radiation for lung cancer treatment. *Acta biomaterialia.* 2016;37:165-73.
25. Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group.* 2002;18(4):267-84.
26. Anwar A, Akbar S, Sadiqa A, Kazmi M. Novel continuous flow synthesis, characterization and antibacterial studies of nanoscale zinc substituted hydroxyapatite bioceramics. *Inorganica Chimica Acta.* 2016;453:16-22.
27. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>. [
28. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2011;61(2):69-90.
29. Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clinical oncology.* 2007;19(6):397-417.
30. Fan W, Shen B, Bu W, Zheng X, He Q, Cui Z, et al. Intranuclear biophotonics by smart design of nuclear-targeting photo-/radio-sensitizers co-loaded upconversion nanoparticles. *Biomaterials.* 2015;69:89-98.
31. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist: Wolters Kluwer Health;* 2018.

32. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.
33. Guerrero M, Carlone M. Mechanistic formulation of a lineal-quadratic-linear (LQL) model: split-dose experiments and exponentially decaying sources. *Med Phys*. 2010;37(8):4173-81.
34. Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*. 1978;14(11):911-5.
35. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay--a comparative study. *Radiation oncology (London, England)*. 2012;7:1.
36. Steel GG. The radiobiology of human tumour cells. *Br J Radiol Suppl*. 1988;22:116-20.
37. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of radiobiology. *Int J Radiat Biol*. 1989;56(6):1045-8.
38. Harada H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? *Journal of radiation research*. 2011;52(5):545-56.
39. Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *The oncologist*. 2007;12(6):738-47.
40. Kwatra D, Venugopal A, Anant S. Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Translational Cancer Research*. 2013;2(4):330-42.
41. Kvols LK. Radiation sensitizers: a selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2005;46 Suppl 1:187s-90s.
42. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Jr HW, Kish JA, Ensley JF, et al. An Intergroup Phase III Comparison of Standard Radiation Therapy and Two Schedules of Concurrent Chemoradiotherapy in Patients With Unresectable Squamous Cell Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(1):92-8.
43. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent Cisplatin-Based Radiotherapy and Chemotherapy for Locally Advanced Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(15):1144-53.
44. Albain KS, Crowley JJ, III ATT, Gandara DR, Farrar WB, Clark JI, et al. Concurrent Cisplatin, Etoposide, and Chest Radiotherapy in Pathologic Stage IIIB Non-Small-Cell Lung Cancer: A Southwest Oncology Group Phase II Study, SWOG 9019. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(16):3454-60.
45. Comella P, Casaretti R, Sandomenico C, Avallone A, Franco L. Role of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *Therapeutics and clinical risk management*. 2009;5(1):229-38.
46. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of*

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1997;15(6):2403-13.

47. Chen AY, Okunieff P, Pommier Y, Mitchell JB. Mammalian DNA Topoisomerase I Mediates the Enhancement of Radiation Cytotoxicity by Camptothecin Derivatives. *Cancer Research*. 1997;57(8):1529-36.

48. Huang S-M, Bock JM, Harari PM. Epidermal Growth Factor Receptor Blockade with C225 Modulates Proliferation, Apoptosis, and Radiosensitivity in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Cancer Research*. 1999;59(8):1935-40.

49. Brunner TB, Gupta AK, Shi Y, Hahn SM, Muschel RJ, McKenna WG, et al. Farnesyltransferase inhibitors as radiation sensitizers. *International Journal of Radiation Biology*. 2003;79(7):569-76.

50. Gore E. Celecoxib and radiation therapy in non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2004;18(14 Suppl 14):10-4.

51. Rosen LS, Jacobs IA, Burkes RL. Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Targeted oncology*. 2017;12(5):599-610.

52. Karve S, Werner ME, Sukumar R, Cummings ND, Copp JA, Wang EC, et al. Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(21):8230-5.

53. Khan FM, Gibbons JP. Khan's the physics of radiation therapy: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.

54. Beiser A, Öngüt G. Modern fiziğin kavramları: McGraw-Hill&Akademi; 1997.

55. Geng F, Song K, Xing JZ, Yuan C, Yan S, Yang Q, et al. Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer. *Nanotechnology*. 2011;22(28):285101.

56. Xu W, Luo T, Pang B, Li P, Zhou C, Huang P, et al. The radiosensitization of melanoma cells by gold nanorods irradiated with MV X-ray. *Nano Biomedicine & Engineering*. 2012;4(1).

57. Roa W, Zhang X, Guo L, Shaw A, Hu X, Xiong Y, et al. Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. *Nanotechnology*. 2009;20(37):375101.

58. Xu R, Ma J, Sun X, Chen Z, Jiang X, Guo Z, et al. Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells. *Cell research*. 2009;19(8):1031-4.

59. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*. 2011;85(7):743-50.

60. Su XY, Liu PD, Wu H, Gu N. Enhancement of radiosensitization by metal-based nanoparticles in cancer radiation therapy. *Cancer biology & medicine*. 2014;11(2):86-91.

61. Mi Y, Shao Z, Vang J, Kaidar-Person O, Wang AZ. Application of nanotechnology to cancer radiotherapy. *Cancer nanotechnology*. 2016;7(1):11.

62. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*. 1991;74(7):1487-510.
63. Ruksudjarit A, Pengpat K, Rujijanagul G, Tunkasiri T. Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone. *Current Applied Physics*. 2008;8(3-4):270-2.
64. Sarath Chandra V, Baskar G, Suganthi R, Elayaraja K, Ahymah Joshy M, Sofi Beaula W, et al. Blood compatibility of iron-doped nanosize hydroxyapatite and its drug release. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2012;4(3):1200-10.
65. Tampieri A, D'Alessandro T, Sandri M, Sprio S, Landi E, Bertinetti L, et al. Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(2):843-51.
66. Hui J, Zhang X, Zhang Z, Wang S, Tao L, Wei Y, et al. Fluoridated HAp: Ln³⁺(Ln= Eu or Tb) nanoparticles for cell-imaging. *Nanoscale*. 2012;4(22):6967-70.
67. Feng QL, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;52(4):662-8.
68. Stanić V, Janačković D, Dimitrijević S, Tanasković SB, Mitrić M, Pavlović MS, et al. Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. *Applied Surface Science*. 2011;257(9):4510-8.
69. Ciobanu CS, Iconaru SL, Le Coustumer P, Constantin LV, Predoi D. Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanoscale Research Letters*. 2012;7(1):324.
70. Hou CH, Hou SM, Hsueh YS, Lin J, Wu HC, Lin FH. The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. *Biomaterials*. 2009;30(23-24):3956-60.
71. Dey S, Das M, Balla VK. Effect of hydroxyapatite particle size, morphology and crystallinity on proliferation of colon cancer HCT116 cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;39:336-9.
72. Liu Z-S, Tang S-L, Ai Z-L. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2003;9(9):1968.
73. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater*. 2013;9(8):7591-621.
74. Farzadi A, Solati-Hashjin M, Bakhshi F, Aminian A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation. *Ceramics International*. 2011;37(1):65-71.
75. Venkatesan P, Puvvada N, Dash R, Kumar BP, Sarkar D, Azab B, et al. The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials*. 2011;32(15):3794-806.
76. Andronescu E, Ficai M, Voicu G, Ficai D, Maganu M, Ficai A. Synthesis and characterization of collagen/hydroxyapatite: magnetite composite material for bone

cancer treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(7):2237-42.

77. Lerner E, Sarig S, Azoury R. Enhanced maturation of hydroxyapatite from aqueous solutions using microwave irradiation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1991;2(3):138-41.

78. Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;50(2):178-83.

79. Miyaji F, Kono Y, Suyama Y. Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. *Materials Research Bulletin*. 2005;40(2):209-20.

80. Popa CL, Deniaud A, #xe9, lien, Michaud-Soret I, Gu, et al. Structural and Biological Assessment of Zinc Doped Hydroxyapatite Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2016;2016:10.

81. LeGeros RZ, LeGeros JP. DENSE HYDROXYAPATITE. *An Introduction to Bioceramics*. p. 139-80.

82. Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Ramakrishnan V, Kumar J. Nanocrystalline hydroxyapatite and zinc-doped hydroxyapatite as carrier material for controlled delivery of ciprofloxacin. *3 Biotech*. 2011;1(3):173-86.

83. Kim H, Mondal S, Bharathiraja S, Manivasagan P, Moorthy MS, Oh J. Optimized Zn-doped hydroxyapatite/doxorubicin bioceramics system for efficient drug delivery and tissue engineering application. *Ceramics International*. 2018;44(6):6062-71.

84. Norhidayu D, Sopyan I, Ramesh S, editors. Development of zinc doped hydroxyapatite for bone implant applications. *ICCBT 2008 Conference*; 2008.

85. Uysal I, Severcan F, Evis Z. Characterization by Fourier transform infrared spectroscopy of hydroxyapatite co-doped with zinc and fluoride. *Ceramics International*. 2013;39(7):7727-33.

86. Sigel H. *Metal Ions in Biological Systems*: Taylor & Francis; 1980.


87. Rodríguez JP, Rosselot G. Effects of zinc on cell proliferation and proteoglycan characteristics of epiphyseal chondrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001;82(3):501-11.

88. Nilsson JR. How cytotoxic is zinc? A study on effects of zinc on cell proliferation, endocytosis, and fine structure of the ciliate *Tetrahymena*. *Acta protozoologica*. 2003;42(1):19-29.

89. Kiortsis M. The effects of zinc on the radiosensitivity of *Bacillus megaterium* cells. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*. 1977;32(6):583-7.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışmasıyla ilgili Etik Kurul İzini

 **T.C.**
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1058
Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 12 TEMMUZ 2017 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2017/17
Proje No : GO 17/629 (Değerlendirme Tarihi: 12.07.2017)
Karar No : GO 17/629- 30

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsü Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. H. Murat GÜRKAYNAK' ın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. A. Lale DOĞAN, Prof. Dr. Zafer EVİS, Mustafa Emre GEDİK ile birlikte çalışacakları ve Arş. Gör. Fazlı Yağız YEDEKÇİ' nin doktora tezi olan, GO 17/629 kayıt numaralı, "**Çinko Katkılanmış Hidroksiapatit Nanoparçacıklarının Kansere Hücrelerinin Radyoduyarlılığına Etkisi**" başlıklı proje önerisi araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)	10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)	11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARILCI (Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)	14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)
İZİNLİ	İZİNLİ
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)
KATILMADI	
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)
İZİNLİ	
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)	17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)
İZİNLİ	İZİNLİ
9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)	18. Av. Meltem ONURLU (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

ÇİNKO KATKILANMIŞ HİDROKSİPATİT NANOPARÇACIKLARININ KANSER HÜCRELERİNİN RADYODUYARLILIĞINA ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 11 BENZERLİK ENDEKSİ	% 9 İNTERNET KAYNAKLARI	% 4 YAYINLAR	% 8 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	--------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.turkiyat.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
4	www.clinicagirona.es İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Beykent Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	busqueda.bvsalud.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	A. Canbolat, H. Kivanc, Y. Yedekci, A. Dogan, F. Yıldız, M. Yeginer. "Investigation of Out-of-Field Scattered Radiation Based on Dose Rate for Sliding Window IMRT", International Journal of	<% 1

EK-3: Dijital Makbuz

turnitin

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Fazlı Yağız Yedekçi
Ödev başlığı:	ÇİNKO KATKILANMIŞ HİDROKSİAP...
Gönderi Başlığı:	ÇİNKO KATKILANMIŞ HİDROKSİAP...
Dosya adı:	LARININ_KANSER_HU_CRELERI_N...
Dosya boyutu:	9.04-M
Sayfa sayısı:	85
Kelime sayısı:	16,706
Karakter sayısı:	114,749
Gönderim Tarihi:	06-May-2019 02:40PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1125678620

YÜZÜMÜN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİNKO KATKILANMIŞ HİDROKSİAP...
SANDIĞIÇI OLAN BİR KANSER HÜCRELERİNİN
BİYOFİZİKSEL İZLENİMİ

Dr. Fazlı Yağız Yedekçi

Biyofiziksel İzlenim
2019-2020

06.05.2019

Copyright 2019 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ

Fazlı Yağız YEDEKÇİ

Doğum Tarihi ve Yeri:

01.02.1987 Ankara/Altındağ

İletişim:

Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı 06100, Ankara

Tel: 0-312-305 29 00 (iş), 0-505-214 06 29 (cep) E-posta: yagiz.yedekci@hacettepe.edu.tr

Eğitim Bilgileri:

Derece	Bölüm	Üniversite	Yıl
Lisans	Fizik Mühendisliği	Hacettepe Üniversitesi, Ankara	2010
Yüksek Lisans	Radyoterapi Fiziği	Hacettepe Üniversitesi, Ankara	2013
Doktora	Radyoterapi Fiziği	Hacettepe Üniversitesi, Ankara	2019

Mesleki Deneyim :

1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, 2011-2019
2. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Öğretim Görevlisi, 2019-Halen

Tamamlanan Projeler ve Yaptığı Görevler

1. Çinko Katkılanmış Hidroksiapatit Nanoparçacıklarının Kanser Hücrelerinin Radyoduyarlılığına Etkisi, BAP projesi, Araştırmacı
2. Cyberknife SRS/SBRT Sisteminin OSL Tabanlı Küçük Alan Dozimetrisi, TÜBİTAK 1001 Projesi, Bursiyer

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

A1.The dosimetric impact of implants on the spinal cord dose during stereotactic body radiotherapy.

Yazici G, Sari SY, **Yedekci FY**, Yucekul A, Birgi SD, Demirkiran G, Gultekin M, Hurmuz P, Yazici M, Ozyigit G, Cengiz M. Radiat Oncol. 2016 May 25;11(1):71. doi: 10.1186/s13014-016-0649-z. PMID:27225270

A2. Evaluation of NanoDot Optically Stimulated Luminescence Dosimeter for Cone-shaped Small-field Dosimetry of Cyberknife Stereotactic Radiosurgery Unit: A Monte Carlo Simulation and Dosimetric Verification Study.

Akyol F, Sarigul N, Yeginer M, **Yedekci Y**, Utku H. J Med Phys. 2019 Jan-Mar;44(1):27-34. doi: 10.4103/jmp.JMP_96_18.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :

B1.Feasibility study of diode detectors-based in-vivo dosimetry for dynamic and static IMRT plans of head & neck cases. **F. Yedekci**, M. Yeginer, H. Kivanc, M. Gürkaynak, F. Akyol Radiotherapy and Oncology, Volume 111, Supplement 1, 2014, Pages S151-S152 doi:10.1016/S0167-8140(15)31594-2

B2.The effect of hip prosthesis on dose distribution: In vivo thermoluminescent dosimeter in a cervical cancer patient G. Yazici, S.D. Birgi, **F.Y. Yedekci**, M. Gultekin, P. Hurmuz, F. Yildiz, M. Gurkaynak, G. Ozyigit Radiotherapy and Oncology, Volume 111, Supplement 1, 2014, Page S154 doi:10.1016/S0167-8140(15)31601-7

B3.Investigation of Out-of-Field Scattered Radiation Based on Dose Rate for Sliding Window IMRT A. Canbolat, H. Kivanc, **Y. Yedekci**, A. Dogan, F. Yildiz, M. Yeginer International Journal of Radiation Oncology*Biophysics, Volume 84, Issue 3, Supplement, 1 November 2012, Pages S855-S856 doi:10.1016/j.ijrobp.2012.07.2287

B4.A Hybrid Method To Reduce Low Dose Volume Of Critical Organs For Breast Imrt: Imrt Plus 3dcrt **F.Y. Yedekci**, M. Gultekin, M. Yeginer, A. Canbolat Radiotherapy and Oncology, Volume 103, Supplement 1, May 2012, Page S583 doi:10.1016/S0167-8140(12)71854-6

B5.The Dosimetric Impact of Implants on the Spinal Cord Dose in Stereotactic Body Radiation

Therapy,G. Yazici,**Y.Yedekci**,A.Yucekul,S.BirgiG.DemirkiranM.GultekinP.Hurmuz,
M.Yazici,M.Cengiz,M.Gurkaynak, International Journal of Radiation
Oncology*Biology*Physics Volume 90, Issue 1, Supplement, 1 September 2014, Page
S909, doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.05.2582

B6.Investigating The Effect Of Dose Rate On The Duration Of Imrt Qa Procedure,
A.Canbolat,H.Kivanc,**Y.Yedekci**,A.Dogan,T.Yolcu,M.Yeginer,D.Yildiz,Radiotherapy
and Oncology Volume 103, Supplement 1, May 2012, Page S523,
doi.org/10.1016/S0167-8140(12)71711-5

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :

D1.Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi(YART) Uygulanan Meme Kanseri Olgularında Cilt
Dozlarının Değerlendirilmesi **Fazlı Yağız Yedekçi**,Abdulmecit Canbolat,Hüseyin
Kıvanç,Ali Doğan,Ferah Yıldız Ulusal Radyasyon Onkoloji Kongresi(UROK),2012

D2.Meme Kanseri Radyoterapisinde YART ve 3BKRT Tekniklerinin Kombinasyonu
ile Kritik Organ Dozlarının İncelenmesi **Fazlı Yağız Yedekçi**,Abdulmecit
Canbolat,Hüseyin Kıvanç,Ali Doğan,Melis Gültekin,Ferah Yıldız Ulusal Radyasyon
Onkoloji Kongresi(UROK),2012

D3. 3 Boyutlu Planlama Sisteminde Abdomen Işınlamalarının Fraksiyonlararası SSD
değişimine göre incelenmesi **Fazlı Yağız Yedekçi**,Abdulmecit Canbolat,Hüseyin
Kıvanç,Ali Doğan,Melis Gültekin,Murat Gürkaynak Ulusal Radyasyon Onkoloji
Kongresi(UROK),2012

D4.Kliniğimizde Uygulanan Hastaya Özgü Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi(YART)
Kalite Kontrol Mutlak Doz Sonuçlarımızın Analizi Hüseyin Kıvanç, **Fazlı Yağız
Yedekçi**,Abdulmecit Canbolat, Talip Yolcu,Demet Yıldız,Ali Doğan,Ferah Yıldız
Ulusal Radyasyon Onkoloji Kongresi(UROK),2012

D5.Kliniğimizde Uygulanan Üç Boyutlu Konformal Planlamalarda Kullanılan Alan-
içi-Alanların Dozimetrik doğruluklarının İncelenmesi Hüseyin Kıvanç,Abdulmecit
Canbolat, **Fazlı Yağız Yedekçi**,Talip Yolcu,Demet Yıldız,Ali Doğan,Ferah Yıldız
Ulusal Radyasyon Onkoloji Kongresi(UROK),2012

D6. Stereotaktik Vücut Radyoterapisinde Spinal İmplantların Dozimetrik Etkisi, Gözde Yazıcı, **Yağız Yedekçi**, Altuğ Yücekul, Sümerya Duru Birgi, Göham Demir Kıran, Melis Gültekin, Pervin Hürmüz, Muharrem Yazıcı, Mustafa Cengiz, Murat Gürkaynak, 11. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Türk Onkoloji Dergisi, Cilt 29, Ek1, sayfa 267, 2014

D7. Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi Tabanlı Baş Boyun Planlarının Adaptif Radyoterapi Kararı için İn-vivo İki Boyutlu Dozimetrik Analiz Yöntemi ve Eşik Değer İncelemesi, Fazlı Yağız Yedekçi, Mete Yeğiner, Hüseyin Kıvanç, Murat Gürkaynak, Fadıl Akyol, Türk Onkoloji Dergisi, Cilt 29, Ek1, sayfa 292, 11. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 2014

D8. Diyot Dedektörlerin Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi Tedavilerinde İn-vivo Dozimetrik Sistem Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması, **Fazlı Yağız Yedekçi**, Mete Yeğiner, Hüseyin Kıvanç, Murat Gürkaynak, Fadıl Akyol, Türk Onkoloji Dergisi, Cilt 29, Ek1, sayfa 307, 11. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 2014

D9. Kalça Protezli Bir Olguda Pelvik Radyoterapi: Doz Dağılımının İn-vivo Termoluminesans Dozimetri ile İncelenmesi, Gözde Yazıcı, Sümerya Duru Birgi, **Yağız Yedekçi**, Melis Gültekin, Pervin Hürmüz, Ferah Yıldız, Murat Gürkaynak, Gökhan Özyiğit, , Türk Onkoloji Dergisi, Cilt 29, Ek1, sayfa 313, 11. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 2014

D10. Kemiğin İnorganik Bileşeni Hidroksiapatitlere Uygulanan Radyasyonun Radyoterapiye Bağlı Kemik Kırıklarına Etkisi, **Fazlı Yağız Yedekçi**, Zafer Evis, Murat Gürkaynak, Gökhan Özyiğit, 13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Turkish Journal of Oncology, Volume 33, Supplementum 1, page 50, 2018

D11. Yoğunluk Ayarlı Radyoterapide Doz Hızının Doz Dağılımına Etkisi, **Fazlı Yağız Yedekçi**, Murat Gürkaynak, Gökhan Özyiğit, 13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Turkish Journal of Oncology, Volume 33, Supplementum 1, page 58, 2018

D12. Göğüs Duvarı ve Lenfatik Işınlamada Ters Planlamalı Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi: Erken Dönem Sonuçlar, Çağlayan Selenge Bedük, Tuğçe Yılmaz, **Fazlı Yağız Yedekçi**, Sezin Yüce Sarı, Melis Gültekin, Gökhan Özyiğit, Ferah Yıldız, 13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Turkish Journal of Oncology, Volume 33, Supplementum 1, page 151, 2018

Sözel Bildiriler

C1.Doz Hızının Etkisinin Araştırılması, Abdulmecit Canbolat,Hüseyin Kıvanç,**Fazlı Yağız Yedekçi**,Ali Doğan Medikal Fizik Kongresi,2011

C2.Akciger Hibrid Planları, Abdulmecit Canbolat, **Fazlı Yağız Yedekçi** ,Hüseyin Kıvanç, Ali Doğan Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi,2012

KONUŞMACI OLARAK KATILDIĞI KURSLAR

Tedavi Planlama ve Değerlendirme Kursu, Prostat SBRT Planlama,Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği, 8-9 Ekim 2016,İstanbul

Tedavi Planlama ve Değerlendirme Kursu, Lenfoma Tedavi Planlaması,Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği, 8-9 Eylül 2017,İstanbul

Stereotaktik Radyoterapi Kursu-1, Akciğer SBRT Planlama, Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği, 26 Mayıs 2018,Ankara

KATILDIĞI KURS ve KONGRELER

IMRT Tedavisinde Kalite Kontrolü:MLC testleri,9.ekim.2010,Medikal Fizik Derneği,Ankara

Türk Radyasyon Onkolojisi Derneği 2.Radyofizik Kursu,10-11 Aralık 2010,Ankara

Dose Modelling And Verification For External Beam Radiotherapy ,European Society for Radiotherapy and Oncology Teaching Course ,11-15 March 2012,İzmir-Turkey

11.Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi,23-27 Nisan 2014,Antalya

Advanced Skills In Modern Radiotherapy, European Society for Radiotherapy and Oncology Teaching Course ,11-15 June,2017, Prague, Czech Republic

13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi,27 Nisan-1 Mayıs,2018, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

