Çok fonksiyonlu manyetik nanoparçacıkların kanser tedavisinde kullanıma hazırlanması

Program Kodu: 3001

Proje No: 214M595

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Sevim İŞÇİ TURUTOĞLU

Danışman:

Doç. Dr. Fatma Neşe Kök

Bursiyerler:

Gökçe Maide Bekaroğlu

Yavuz İşçi

Mart 2016

İSTANBUL

Önsöz

Çok fonksiyonlu manyetik nanoparçacıkların kanser tedavisinde kullanıma hazırlanması isimli 3001 projemiz Tübitak tarafından desteklenmiş ve Mart 2015 tarihinde başlatılmıştır. Proje bir yürütücü önderliğinde bir danışman ve iki yüksek lisans bursiyeri içermektedir. Proje devam ederken bursiyerler yüksek lisanslarını tamamlamış ve projeye doktora bursiyerleri olarak devam etmişlerdir. Proje kapsamında yapılan çalışmalarda bir yüksek lisans tezi yapılmış, iki uluslararası yayın ve bildiri hazırlanmış ve dergilere gönderilmiş ve sunulmuştur.

Tez:

Preparation characterization and *in vitro* evaluation of multifunctional magnetic nanoparticles for targeted cancer therapies

Gökçe Maide Bekaroğlu,

İstanbul Teknik Üniversitesi, Fizik Mühendisliği Bölümü, 2015.

Yayınlar:

1. **Colloidal Properties and *in-Vitro* Evaluation of Hydroxyl Ethylene Cellulose Coated Iron Oxide Particles for Targeted Drug Delivery**
   Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (dergiye gönderildi)
   Maide Gökçe Bekaroğlu, Yavuz İşçi, Sevim İşçi
2. **Polyvinylpyrrolidone Coating of Ironoxide particles as magnetic drug delivery agents**
   Biometals (dergide değerlendiriliyor)
   Yavuz İşçi, Maide Gökçe Bekaroğlu, Sevim İşçi

Bildiriler:

1. **Colloidal Properties and *in-Vitro* Evaluation of Hydroxyl Ethylene Cellulose Coated Iron Oxide Particles for Targeted Drug Delivery**
   Maide Gökçe Bekaroğlu, Yavuz İşçi, Sevim İşçi
   Nanoengineering for medicine an biology conference, 2016, USA
2. **Polyvinylpyrrolidone Coating of Ironoxide particles as magnetic drug delivery agents**
   Yavuz İşçi, Maide Gökçe Bekaroğlu, Sevim İşçi
   Nanoengineering for medicine an biology conference, 2016, USA

İÇİNDEKİLER

Şekil Listesi…… iii
Proje Özeti……... iv
Project Summary …….. v
1.GİRİŞ…….. 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ…… 3
2.1 MNP Parçacılarının İlaç Ulaştırma Ajanları Olarak Kullanılması…… 3
2.2 Kolloidal Stabilizasyon……... 5
2.3 Akış Özellikleri ve Reoloji…….. 6
2.4 Elektrokinetik Özellikler…….. 8
3. GEREÇ VE YÖNTEM…… 9
3.1 Malzemeler…… 9
3.2 Dispersiyonların Hazırlanması…… 9
3.3 Metodlar…… 10
3.4. Hücre Kültürü Hazırlama…… 10
4.BULGULAR VE TARTIŞMA…… 11
4.1. Reolojik Bulgular…… 11
4.2. Elektrokinetik Bulgular…… 13
4.3. SEM Resimleri…… 15
4.4. Magnetoreoloji…….. 16
4.5. XRD ve FTIR ile Karakterizasyon…….. 17
4.6. İlaç Ulaştırma…… 18
4.6.1. Termal Özellikler…… 18
4.6.2. Manyetik Özellikler…… 19
4.6.3. In Vitro Deneyler…… 20
4.6.3.1. Sitotoksisite Deneyleri…….. 21
4.6.3.2. Kanser Hücrelerine İlaç Ulaştırma Deneyleri…….. 22
5. SONUÇLAR…… 23
6. KAYNAKLAR…… 26

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.1 MNP ile tedaviler (a) manyetik alan etkisi ile ilaç yüklenmiş nanoparçacıkların tümörlü bölgeye toplanması, (b) MNP parçacıklarını değişen manyetik alan etkisi ile ısıtılarak tümörün yakılması……5

Şekil 2.2.1 Kolloidal dispersiyonların elektrostatik stabilizasyonu……6

Şekil 2.2.2 Kolloidal dispersiyonların sterik stabilizasyonu……6

Şekil 2.3.1 Newtoniyen olmayan akışların kayma gerilimi-kayma hızı grafikleri……7

Şekil 2.4.1 Zeta potansiyelinin şematik gösterimi……8

Şekil 3.1.1 Hidroksietil selüloz (HEC) polimerinin kimyasal yapısı……9

Şekil 3.1.2 PVP polimerinin kimyasal yapısı……9

Şekil 4.1.1 Farklı katı oranlarında demiroksit dispersiyonlarının a) akış diyagramları b) viskozite eğrileri……11

Şekil 4.1.2 Farklı HEC konsantrasyonlarındaki demiroksit dispersiyonlarının akış eğrileri, b) 1g/L HEC ilaveli dispersiyon ile %2'lik HEC ilavesiz demiroksit dispersiyonunun akış eğrileri……12

Şekil 4.1.3 a)Farklı NK konsantrasyonlarındaki demiroksit dispersiyonlarını akış eğrileri, b) 1g/L NK ilaveli dispersiyon ile %2'lik NK ilavesiz demiroksit dispersiyonunun akış eğrileri……12

Şekil 4.1.4 a)Farklı PVP konsantrasyonlarındaki demiroksit dispersiyonlarının akış eğrileri, b) 1g/L PVP ilaveli dispersiyon ile %2'lik PVP ilavesiz demiroksit dispersiyonunun akış eğrileri……13

Şekil 4.2.1 Polimer ilaveli demiroksit dispersiyonlarının zeta potansiyelinin a) HEC, b) NK, c) PVP konsantrasyonları ile değişimi……14

Şekil 4.2.2 Polimer ilavesi ile dispersiyonların zeta potansiyel değerlerinin değişiminin şematik gösterimi……15

Şekil 4.3.1 a) polimer ilavesiz demir oksitlerin, b) 5.10-3 g/L konsantrasyonundaki, c) 1g/L konsantrasyonundaki HEC polimerinin demiroksit parçacıklarına ilavesinin SEM görüntüleri……16

Şekil 4.4.1 a)HEC b) NK c) PVP polimer ilaveli demiroksitlerin farklı konsantrasyonlardaki manyetik alan altında viskozite – kayma hızı grafikleri……17

Şekil 4.5.1. HEC ilaveli demiroksitlerin a) XRD diyagramları, b)FTIR spektrumları……17

Şekil 4.6.1.1 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L HEC ve NK kaplı Fe_3O_4 parçacıklarının TGA eğrileri ……19

Şekil 4.6.2.1 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L HEC, NK ve PVP kaplı Fe_3O_4 parçacıklarının magnetizasyon eğrileri ……20

Şekil 4.6.3.1 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L HEC, NK ve PVP kaplı parçacıkların hücre canlılığı grafikleri……21

Şekil 4.6.3.2 1g/L HEC, ve NK kaplı parçacıkların DOX yükleme verimlilikleri……22

Şekil 4.6.3.3 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L a)HEC ve b) NK kaplı parçacıkların kanser hücreleri canlılığı grafikleri……23

Proje Özeti

Nanoteknoloji son zamanlarda ilaç endüstrisinde, hastalık görüntülemede, vücutta kontrollü ilaç salınımı ve ulaştırmada, doku mühendisliğinde, vs. kullanılmaya başlanılmıştır. Birçok farklı nano sistemlerden özellikle çok fonksiyonlu manyetik nanoparçacıklar (MNP) bu konuda çok ilgi çekmektedir. Yeni nesil tedavi yöntemlerinde sağlıklı hücrelere zarar vermeden ilaç ulaştırma, hedef kitleye tedavi için özellikle bu MNP kullanımları araştırılmaktadır.

Kanser tedavisi için kullanılan kemoterapi yönteminin en büyük dezavantajı spesifik olmaması ve bütün vücuda zarar vermesidir. Bunun üstesinden gelebilmek için çok fonksiyonlu manyetik nanoparçacıklar kullanılabilinir. MNP'ler vücuda alındıktan sonra dışarıdan uygulanan manyetik alanlar ile vücutta istenilen hedef bölgeye toplanabilirler. Bu yöntem ile geleneksel kemoterapinin aksine sadece tümörlü hücrelere müdahale edilebilir.

Proje kapsamında yaptığımız çalışmalarda MNP olarak kullandığımız demiroksit (Fe_3O_4) parçacıklarının üzerine literatürde henüz çalışılmamış olan HEK (hidroksiletil selüloz) polimerini, PVP (polivinilprolidon) polimerini ve nanokristaller olarak bilinen ağaç fiberlerinden üretilmiş olan polimeri kullanarak parçacıkların kolloidal özelliklerini takip ederek kararlı ve MNP parçacıklarının yüzeylerini tamamen kaplanmış numuneler elde edilmiştir. Sistemlerin akış özellikleri, zeta potansiyelleri ve parçacık boyutları bilgisi ile polimer konsantrasyonuna bağlı değişimlerini ve etkileşimlerini belirlenmiştir. Numunelerin geleneksel karakterizasyonları (SEM, XRD, FTIR, VSM, DSC, TGA) yapılmış ve kolloidal karakterizasyon sonuçları ile uyumu araştırılmıştır. Biyodemirlerin sitotoksisitesi canlı dışı (*in-vitro*) hücre deneyleri ile araştırılmıştır. Ayrıca biyodemirlere antitümör ajanları (DOX-doksorubisin) yüklenerek ve yine *in-vitro* sitotoksisite deneyleriyle kanserli hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Sonuçlara bakıldığında, kullandığımız polimerlerin ve yöntemlerin ilaç ulaştırma ajanları olarak demiroksit parçacıklarını uygun hale getirildiğini, sağlıklı hücrelere yüzeyleri kaplanmış demiroksitlerin zarar vermediğini, anti kanser ilaçlarının demiroksitlere bu kaplamalar sayesinde yüklenebildiğini ve kanserli hücrelerin ölümüne sebep oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Manyetik nanoparçacıklar, biyopolimerler, ilaç ulaştırma, kanser tedavisi

Project Summary

Nanotechnologies are wide spread in medicine and pharmaceutical industries, namely in disease detection, controlled drug delivery, in tissue engineering and so on. Especially multifunctional magnetic nanoparticles (MNP) are used for these purposes. New generation of targeted drug delivery systems of nanoparticles are highly researched by the researchers.

The major disadvantage of most chemotherapeutic approaches to cancer treatment is that most are non-specific. To overcome this disadvantages, the MNP can be used. MNP can be located at the targeted area with external magnetic fields. Nanoparticles can be used to treat tumors with the targeted delivery of anti-tumor agents adsorbed on the surface of MNPs is a promising alternative to conventional chemotherapy.

In this Project, Iron-oxide particles (Fe_3O_4) were coated with polymers which never used in literature like HEC (hydroxyeethyl cellulose), PVP (polyvinylprollidone), and a polymer known as nanocrystals which produced from the wood fibers. The amount of the biopolymers fort he fully covered surfaces of the iron oxide particles were obtained by controlling of the colloidal properties. The flocculation of MNP were controlled by the rheological properties of MNP, the surfaces were controlled by electrokinetical measurements. The stabile and fully covered surfaces of the bioirons were characterized by the conventional methods such as scanning electron microscopy (SEM), x-ray diffraction (XRD),Fourier Transform Infrared (FTIR), Vibrating sample magnetometer (VSM), thermal tests (DSC, TGA). The colloidal characterization results were satisfied by conventional ones. After the characterization of MNP, the in vitro tests were applied to detect the effect of the MNP on the alive cells. The anti-tumor drugs (DOX-doxorubicin) were loaded to the MNP agents and the effect of the drugs were investigated on the cancer cells.

The results showed that iron-oxide particles were prepared as drug delivery agents with the biopolymers coverage and reduced to the toxicity of the iron-oxide particles on the healty cells. The anti-tumor drugs were sucessfully loaded to the agents and increase the toxicity to the cancer cells.

Keywords: Magnetic nanoparticles, biopolimers, drug delivery, cancer therapy

SONUÇ RAPORU

1.GİRİŞ

Son yıllarda nanoteknoloji endüstride ve ilaç sanayinde sıklıkla araştırılmaya ve kullanılmaya başlanmıştır. Kanser tedavisi için özellikle nanoparçacık içerikli hedef bölgeye tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Günümüzde uygulanan kanser tedavisi, kemoterapi yöntemleri sadece kanserli bölgeyi hedef almamakta ve gerekli dozları kanserli bölgelere ulaştırmak için vücuda çok yüksek dozlarda ilaçlar verilmektedir. Bunun sonucu olarak kanser ilaçlarının sağlıklı bölgelere yan etkileri çok fazla ve zararlı olmaktadır. Bunun üstesinden gelebilmek için tümörlü bölgelere yönelik tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Son zamanlarda dikkat çeken ve umut verici bir yöntem olarak çok fonksiyonlu manyetik nanoparçacıkların (MNP) kullanılması araştırılmaktadır. Manyetik özellik gösteren nanoparçacıklara kanser ilaçları yüklenerek dış manyetik alanların etkisi ile tümörlü bölgelere toplanmakta ve ilaç salınımları gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte tümörlü bölgelerin görüntülenmesi ve manyetik alan etkisi ile yüksek sıcaklıklara çıkılarak tümörlü bölgelerin yakılması gibi uygulamaları da olabilmektedir. MNP parçacığı olarak genelde demir, demiroksitler, (magnetit, hematit, geotit) gibi nano boyutlu parçacıklar kullanılmaktadır. Kullanılacak olan nanoparçacıkların boyutları damarlardan ilerleyebilecek boyutta, süperparamanyetik ve sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek yapıda olmalıdır. Klinik deneylerde kullanıma uygun olabilmesi için ise mutlaka biyouyumlu ve toksik olmayan özelliklerde olmalıdırlar.

Demir ve demir oksit parçacıkları vücuda verildiğinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiler göstermekte ve zararlı olmaktadırlar. Yüzeyleri negatif yüklü olan demir ve demiroksit parçacıkları topaklanmakta ve hızlıca çökmekte yani kararsız dispersiyonlar oluşturmaktadır. Zararlı etkileri azaltmak, yok etmek, kararlı hale getirmek ve bununla birlikte ilaçları yüzeylerinde adsorblayabilmeleri için yüzeylerinin modifiye edilmeleri gerekmektedir. (Chan et al., 2002; Chomoucka et al., 2010; Rivera Gil, Huhn, del Mercato, Sasse, & Parak, 2010; Winer, Liu, & Apuzzo, 2012) Bu modifikasyonlar çoğunlukla polimerik ve biyopolimerik malzemeler ile yapılmaktadır. Bu yöntem diğerlerinden daha ucuz kolay ve güvenli bir yöntemdir. (Mahmoudi et al., 2010; Rivera Gil et al., 2010)

Literatüre bakıldığında kullanılan polimerlerin konsantrasyon seçimleri, elde edilen dispersiyonların kararlılıkları ile ilgili bilgi veren çalışmalar bulunmamaktadır. Demir ve demiroksit parçacıkları kolloidal özellik göstermekte, içinde bulundukları çözücü moleküllerinden büyük olmakta ve birbirleri ile etkileşmektedirler. Bu etkileşimleri kullanarak

sistem içerisindeki parçacıkların durumları değiştirilebilmekte, çökebilmekte yada kararlı dispersiyonlar oluşturulabilmektedir.

Projemizin amacı demiroksit parçacıklarını literatürde hiç kullanılmamış ve ilaç ulaştırma ajanlarının hazırlanması için çok uygun biyopolimerler ile kolloidal özelliklerini kullanarak etkileşimlerini belirlemek, yine literatürde benzer bir çalışması olmayan seçilen polimerlerin konsantrasyonlarını kolloidal özellikleri kullanarak belirleyerek yüzeyleri tamamen kaplı, kararlı biyo-demiroksit malzemelerini üretmekti. Kolloidal karakterizasyon yöntemleri ile elde edilen sonuçları geleneksel yöntemler ile karşılaştırarak, kolloidal yöntemlerin daha kolay ucuz ve doğru yöntemler olduklarını vurgulamaktır. Bu araştırmaların ardından elde ettiğimiz sonuçları kullanarak üreteceğimiz biyodemiroksit malzemelerin hücrelere demiroksitlere oranla daha az zarar verdiğini, yüzeylerini ilaç tutabilecek şekilde modifiye edilebildiğini göstermektir. İlaç yüklenmiş demiroksitlerin kanser hücreleri üzerine ilaç ulaştırmaktaki başarısını araştırmak ve son zamanların güncel ve çok ilgi çeken hedef bölgeye ilaç ulaştırma araştırmalarına katkıda bulunmaktı. Bunun için literatürde hiç kullanılmamış hidroksiletil selüloz (HEC), ağaç fiberlerinden elde edilmiş nanokristalik selüloz polimer (NC) ve polivinilprolidon (PVP) polimerlerini kullandık. Değişen polimer konsantrasyonlarında dispersiyonların akış özellikleri ve elektrokinetik özelliklerini belirledik. Polimerlerin hangi konsantrasyonlarda kararlı ve yüzeyleri polimerlerce tamamen kaplanmış olduklarını belirledik. Belirlediğimiz konsantrasyonların SEM resimlerini alarak sonuçların doğruluğunu sorguladık. Polimerler ve demiroksitklerin etkileşimlerinden oluşabilecek yapısal değişiklikleri XRD, FTIR yöntemleri ile araştırdık. Elde ettiğimiz sonuçlardan kullanılması gereken polimer konsantrasyonlarını seçerek yüzeyleri tamamen kaplı kararlı biyodemiroksitler ürettik. Bu biyodemiroksitlerin manyetik özelliklerini, termal özelliklerini belirleyerek uygulama için uygunluklarını inceledik. Yine ürettiğimiz biyodemiroksitlerin canlı hücrelere zarar verip vermediklerini demiroksitlere göre ne kadar üstün olduklarını canlı dışı hücre deneyleri (*in-vitro*) deneyleri ile inceledik. Demiroksitlere oranla çok düşük toksik etkilere sahip olduklarını belirlediğmiz biyodemiroksitlere anti kanser ilacı doksorubicin yükleyerek ilaç tutabilme kabiliyetlerini ve ilaçları kanserli hücrelere iletip iletemediklerini araştırdık. Araştırmalarımızın sonuçları bize kolloidal yöntemlerin çok daha hızlı ve kesin sonuçlar verdiğini, bu sonuçlar kullanılarak elde edilen biyodemiroksit parçacıklarının ilaç ulaştırmada daha başarılı malzemeler olduklarını göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlardan bir yüksek lisans tezi, 2 uluslararası makale ve 2 kongre bildirisi hazırlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. MNP Parçacılarının İlaç Ulaştırma Ajanları Olarak Kullanılması

Proje konumuz ile ilgili benzer çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür. Bizim çalışmamızın literatürdeki çalışmalardan farkı kullandığımız polimerler ve uyguladığımız kolloidal karakterizasyon yöntemleridir. Literatürde kolloidal özelliklerinden bahsedilen yayınlar bulunmaktadır ancak polimerlerin MNP'lere etkisi araştırılarak sistemlerin kararlılığını, yüzey yüklerinin ve hidrodinamik yarıçaplarını takip eden ve uygun konsantrasyonu bulmaya yönelik yayınlar bulunmamaktadır.

Nano boyuttaki parçacıkların hedeflendirilmiş ilaç olarak kullanılması fikri 1970'lerin sonlarına doğru ortaya atılmıştır. İlk olarak Widder ve arkadaşlarının manyetik yönelimli parçacıkları ve anti tümor ilaçlarını kullanarak yaptıkları çalışma birçok farklı çalışmalara öncülük etmiştir. (McBain, Yiu, & Dobson, 2008)

Hedeflendirilmiş ilaç geliştirilmesi amacıyla kullanılabilecek farklı manyetik özellikte birçok manyetik malzeme bulunmaktadır ama kullanılacak malzemelerin toksik olmayan, biyouyumlu ve biyoçözünür olmaları, hedeflendirilmiş ilaç olarak kullanılabilmeleri için önemlidir. Demir oksit bazlı malzemeler en yaygın kullanılan manyetik malzemelerdir çünkü bu maddelerin vücuda daha az zararlı olduğu bilinmektedir ve hâlihazırda çeşitli görüntüleme tekniklerinde kullanılmaktadırlar. (McBain et al., 2008; Weissleder et al., 1989) Bunun yanında ise manyetik özellikleri daha iyi olan Fe (demir)' nin daha toksik olduğu ve daha az stabil olduğu belirtilmiştir. (Drbohlavova et al., 2009)

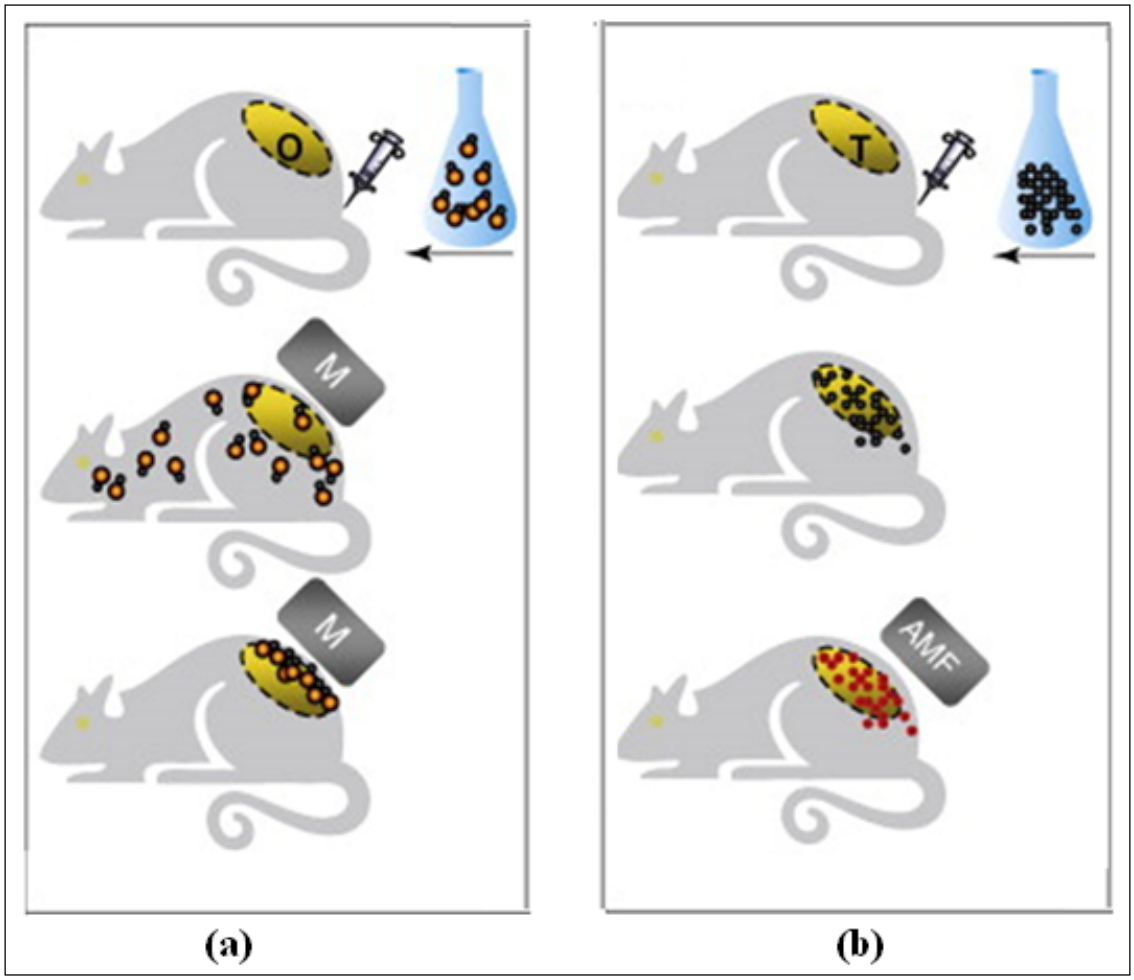
Yüzey aktifler veya organik bileşikler kullanarak manyetik nanoparçacıklara daha iyi fiziksel ve kimyasal özellikler verilmektedir. Çekirdek-kabuk şeklindeki manyetik nanoparçacıkların daha iyi dispers oldukları, oksidasyona daha dirençli oldukları ve kabuklarına istenilen miktarda ilacın eklenilebilir olduğu belirtilmiştir. (Chomoucka et al., 2010) Manyetik nanoparçacıkların bu özelikleri hedeflenebilir ilaç geliştirmek için uygun olduklarını göstermektedir.

Bu güne kadar çeşitli polimerler ve farklı manyetik parçacıklar kullanılarak hedeflendirilmş ilaç geliştirmek için çalışmalar yapılmıştır. Literatürde poly (ethyleneglycol) (PEG), polyvinyl alcohol (PVA) and poly-L-lactic acid (PLA) gibi sentetik polimerlerin ve nişasta, dekstran ve chitosan gibi doğal polimerlerin manyetik nanoparcacıklar ile kullanıldığı görülüyor. (Bhattarai, Badahur, Aryal, Khil, & Kim, 2007; Chertok et al., 2008; McBain et al., 2008; Y. Sun et al., 2009) Örneğin chitosan nanoparçacıklarının *in-vivo* ve *in-vitro* deneylerinin

sonuçlarında hedeflenme ve görüntülenme özelliklerinin çok iyi olduğu gözlemlenmiştir ve chitosan nanoparçacıklarının tümör dokusunda daha çok lokalize edilebildiği belirtilmiştir. (Gupta & Gupta, 2005) Farklı bir çalışmada ise urokinaz ve dekstran kaplı demir oksitin manyetik ilaç taşıyıcı olabilme özelliği incelenmiştir ve yapılan çalışmaların sonucunda chitosan nanoparçacıklarının sulu çözeltilerinin stabil, homojen ve manyetik yönelimlerinin güzel olduğu belirtilmiştir. (Purushotham & Ramanujan, 2010)

Birçok araştırmada ise MNP'ler ile termohassas polimerler kullanılmıştır. Örneğin, Purushotham ve Ramanujan demir oksit ve poly-(N-isopropylacrylamide) kompozit nanoparçacıklarının manyetik hedeflenmesi ve bu nanoparçacıkların termal kontrollü kemoterapatik ilaç salınımları ile ilgili çalışmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda *in-vitro* deneylerinde termal kontrollü ilaç (doxorubicin) salınımının başarılı olduğu belirtilmiştir ve bu nanoparçacıkların kanserin tedavisi için potansiyel taşıdığı önerilmiştir. (Hoare et al., 2009) Ayrıca termohassas polimerler kullanılarak nanojel-manyetik nanoparçacıklarla ilaç teslimi üzerine çalışılmıştır. (Koppolu, Rahimi, Nattama, Wadajkar, & Nguyen, 2010) Bunlara ek olarak MNP'ler ve poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA), polyacrylamide, polyvinyl alcohol, polyethylenoxide (PEO) triblock copolymers, poly((2-dimethylamino) ethyl methacrylate) gibi polimerler kullanılarak hedeflenmiş ilaç teslimi ve kontrollü ilaç salınımı sağlayacak manyetik nanoparçacıklar üretilmeye çalışıldığı görülmektedir. (Chomoucka et al., 2010; Hafelli et al., 2009; Mahmoudi et al., 2010; Sivudu & Rhee, 2009; Zhou et al., 2009)

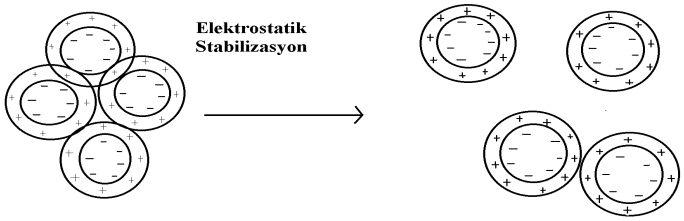
Literatürdeki yayınlara bakıldığında, konu ile ilgili geniş bilgiler veren özet (review) makaleler bulunmaktadır. Chomoucka vd.'nin review makalesinde MNP parçacıklarının hangi yöntemler ile tümör tedavisinde kullanılabileceği, MNP parçacıklarının yüzeylerinin ne tür malzemeler ile kaplanarak canlılar ile uyumlu hale getirilebileceği ve kullanılan yöntemler özetlenmiştir. Bunun dışında Sun vd. MNP'lerin ilaç ulaştırma ve MR görüntülemede kullanımlarını, McCarty ve Weissleder canlı dokulardaki görüntülerini özetleyen review makalerleri bulunmaktadır. (Kumar et al., 2010; McCarthy & Weissleder, 2008; Weissleder et al., 1989)



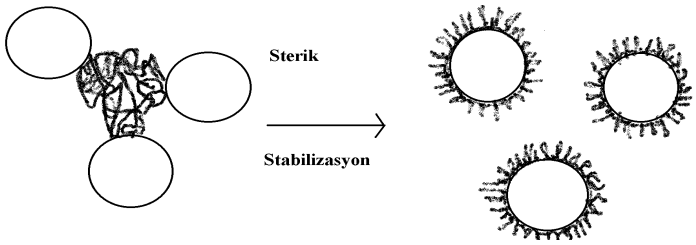
Şekil 2.1.1 MNP ile tedaviler (a) manyetik alan etkisi ile ilaç yüklenmiş nanoparçacıkların tümörlü bölgeye toplanması, (b) MNP parçacıklarını değişen manyetik alan etkisi ile ısıtılarak tümörün yakılması (Corchero & Villaverde, 2009; Matsumine et al., 2011).

2.2. Kolloidal Stabilizasyon

Projemizde öne çıkartmak istediğimiz kolloidal özellik gösteren MNP'lerin kararlılığı polimerler, tuzlar, yüzeyaktif gibi malzemeler ile sağlanabilir. Polimerlerin yüklü yada yüksüz olmalarına göre kararlılıkları, stabilizasyonları ve etkileşimleri değişebilmektedir. Stabilizasyon için iki farklı mekanizma vardır. Parçacıkların hepsi aynı elektrik yükü ile yüklendiğinde aralarında itme kuvvetleri oluşur. Buna elektrostatik stabilizasyon denir. Bazı maddelerin parçacıklar tarafından adsorblanması sonucunda parçacık yüzeyi bu maddelerce kaplanır. Bu parçacıkların birbirlerine yaklaşmasını engeller. Buna da sterik stabilizasyon denir. (Şekil 2.1.ve Şekil 2.2.)



Şekil 2.2.1 Kolloidal dispersiyonların elektrostatik stabilizasyonu



Şekil 2.2.2 Kolloidal dispersiyonların sterik stabilizasyonu

Polimerler parçacık yüzeylerini kapatacak miktardaki konsantrasyonlarda değilse, kolloid parçacıklarının yüzeylerine yapışmalarına ve aralarında köprüleme etkisi oluşmasına neden olmaktadır. Bu durumda çoğunlukla kolloidler çökerler (flokülasyon). Yeteri miktarda polimer kolloidlerin yüzeylerini sarar ve onları stabil hale getirebilirler. Bu etkileşimler polimerlerin türüne, zincir uzunluğuna, kolloid ile etkileşim türüne göre değişir. Fazla miktarda polimer ilaveleri ise aralarında oluşan yük fazlalığından yada ozmotik itmelerden tekrar çökmelere neden olabilmektedir. Kolloide uygulanacak olan polimer miktarı stabilizasyon için çok kritiktir. (Gerhard Lagaly, 2007) Kolloidal sistemlerin özellikleri akış özellikleri, elektrokinetik özellikleri ve parçacık boyutu dağılımına bakılarak belirlenir.

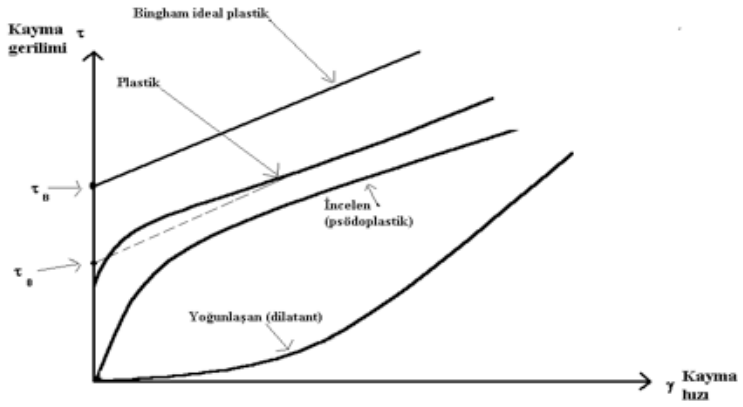
2.3. Akış Özellikleri ve Reoloji

Akışkan; akabilen, bir kayma kuvvetine karşı hiçbir direnç göstermeyen maddeyi ifade eder. Çok küçük bir kuvvetin etkisi ile bile büyük değişeme uğrar. Reoloji maddelerin mekanik kuvvetler etkisinde deformasyonu (şekil bozukluğu) ve akış özellikleri ile ilgili bilim dalıdır. Akışkanların akıcılığı ile ilgili tüm özellikler “reolojik özellikler” olarak adlandırılır. Elastisite, plastisite ve viskozite reolojinin konularıdır.

Malzemelerin reolojik özellilerini belirleyen büyüklükler (viskozite, kayma gerilimi, kayma hızı gibi...) Newton kanunu ile tanımlanır. Akışkan tabakaların alanları A ve uygulanan kuvvetin büyüklüğü F olarak alındığında birim yüzeye düşen kuvvet F/A kayma gerilimi yada zor olarak bu tabakaların dv/dy hız gradyenti yada kayma hızı olarak tanımlanır. Kayma hızı ve kayma gerilimi arasındaki ilişkinin lineer olması durumunda akış Newtonyen akış olarak

tanımlanır. Viskozite, akışkan hareket halinde iken moleküller arasındaki sürtünmeden meydana gelen kaymaya, akmaya karşı sistemin gösterdiği dirençtir. Kısaca parçacıkların akmaya karşı gösterdikleri direncin bir ölçüsüdür.

Bir malzemenin akış davranışı kayma hızı ve kayma gerilimi ile ilişik bir diyagram olan akış eğrisi ile karakterize edilebilir. Bir çok sistemlerin akış davranışı çok karmaşıktır, Newtoniyen akışa uymazlar. Akış sadece enerji dağılımı mekanizması olarak ifade edildiği sürece τ / γ oranı sabit kalacaktır. Bu durumda orantı sabiti viskozite olacaktır. Ancak enerji akış sırasındaki başka olaylarla da kaybedilebilir. Parçacıklar arası floklarını kırmak (partiküller arasındaki bağları kırmak) ya da onlar arasındaki bağları kurmak için ekstra enerjiye gerek olabilir. Bu koşullar altında τ ve γ arasındaki lineer ilişki bozulur.



Şekil 2.3.1 Newtoniyen olmayan akışların kayma gerilimi-kayma hızı grafikleri

Dilatant akışta kayma gerilimi kayma hızından çok daha hızlı artar. Kayma hızının ya da kayma zamanının artması ile viskozite artar. Bu ilişkiler lineer değildir.

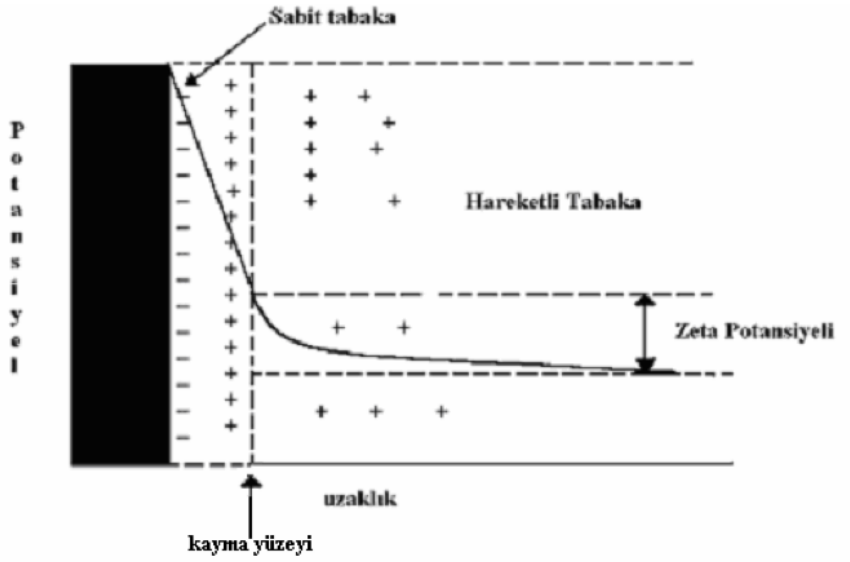
Psödo plastik yani incelen akışta görünür viskozite ve kayma gerilimi kayma hızı arttıkça lineer olamayan bir şekilde azalır.

Bingham plastik olarak bilinen plastik akış statik koşullar altında katı gibi davranırlar. Akma olayının başlaması için önce bir miktar kuvvet uygulanması gerekmektedir. Bu kuvvetin oluşturduğu kayma gerilmesi değerine akma gerilme noktası (τ_B) denir. Bu nokta lineer kısmın ekstrapolasyonu ile elde edilir. (Tadros, 2010) Bu değerden sonra kayma gerilimi/kayma hızı arasındaki oran lineer olarak değişir, orantı katsayısı plastik viskozite olarak isimlendirilir.

Akış modelleri parçacıklar arası ilişkilere, parçacıkların solvent ile ilişkisine, sıcaklığa, basınca, dış kuvvetlere kuvvetle bağlıdır.

2.4. Elektrokinetik Özellikler

Kolloidal özellik gösteren parçacıklar bir çözücü içerisinde dağıtıldığında elektriksel olarak yüklü hale geçerler. Elektriksel yükten dolayı çözücü içerisinde dağılan her yüklü parçacık zıt yüklü iyonları çeker. Parçacığın yüzeyindeki tabakaya sabit tabaka ve sabit tabakanın dışındaki zıt yüklü iyonların oluşturduğu bulutumsu yapıya elektriksel (hareketli) çift tabaka denir. Hareketli çift tabaka ile birlikte parçacık nötr haldedir. Eğer çözücü içinde dağıtılmış parçacıklara bir potansiyel uygulanırsa sabit tabakalar ve hareketli tabakaların bir kısmı kendi yüklerine zıt olan elektroda saparlar. Hareketli çift tabakanın sapmadan kalan kısmının oluşturduğu yüzeyin potansiyeline zeta potansiyeli denir. (Hunter, 1981) Zeta potansiyeli parçacıklar arasındaki itme ve çekme değerlerinin ölçümüdür ve dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir.



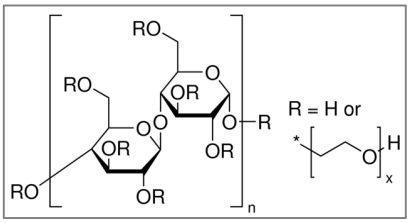
Şekil 2.4.1 Zeta potansiyelinin şematik gösterimi (Hunter, 1981).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Malzemeler

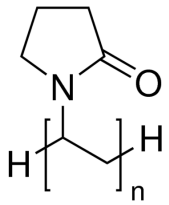
Demir oksit Fe_3O_4, nanoparçacıkları (magnetit) Sigma-Aldrich'ten alınmış ve herhangi bir saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır. Parçacık boyutları 50 ile 100 nm arasında değişen nano tozdur.

Hidroksietil selüloz (HEC) Sigma-Aldrich'ten alınmış ve saflaştırılmadan kullanılmış bir polimerdir. Kimyasal yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1.1 Hidroksietil selüloz (HEC) polimerinin kimyasal yapısı

PVP "polivinilprolidon" polimeri ilaç sanayinde yapıştırıcı olarak kullanılan bir polimerdir. Sigma-Aldrich'ten alınmış, herhangi bir saflaştırma yapılmamış ve molekül ağırlığı 360 000 g/mol'dür.



Şekil 3.1.2 PVP polimerinin kimyasal yapısı

Nanokristaller olarak adlandırdığımız ağaç fiberlerinden elde edilmiş olan polimerler Kanada IF Innovation şirketinde araştırmacı olan Dr. Ayşe Alemdar Thomson tarafından sentezlenmiştir.

Kanser ilacı olarak Doxorubicin hydrochloride (DOX; (8s-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy-alpha-l-lyxo-hexopyranosyl)oxy] - 7,8,9,10 - tetrahydro - 6,8,11 - trihydroxy – 8 - (hydroxyacetyl)-1 methoxynaphthacene-5,12-dione hydrochloride) kullanılmış ve Edqm'den alınmıştır.

3.2. Dispersiyonların Hazırlanması

Demiroksit dispersiyonları %2 w/w oranında su içerisinde hazırlanmıştır. 10^{-5} ile 1 g/L aralığında değişik konsantrasyonlarda suda çözülmüş polimerler ile karıştırılmıştır. Dispersiyonlar bir gün boyunca çalkalayıcıda bırakılmış ardından 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur.

3.3. Metodlar

Dispersiyonların viskozite, kayma hızı ($\dot{\gamma}$) ve kayma gerilimi (τ) gibi reolojik parametreleri Brookfield DVIII + model reometre ile 0-330 s^{-1} arasındaki kayma hızı değerlerinde belirlenmiştir.

Elektrokinetik özellikler Malvern Zetasizer 2000 cihazı ile 5mW He-Ne lazeri kullanılarak oda koşullarında ölçülmüştür.

Magnetoreolojik etkiler MRD 180, Anton Paar marka reometrenin magnetoreolojik aparatları kullanılarak belirlenmiştir. Dispersiyonlara 220mT manyetik alan uygulanmış ve her numunenin akış diyagramı belirlenmiştir.

SEM (taramalı elektron mikroskopu) olarak FEI Quanta Feg 250 marka cihaz 15 kV'ta kullanılmıştır. Numuneler Edwards S 150B sputter coater ile altın kaplanarak ve sıvı nitrojen altında dondurularak kullanılmıştır.

Termal analiz olarak termo gravimetrik analiz (TGA) yöntemi kullanılmış ve ölçümler Perkin Elmer Diamond cihazında of 20°C/min hızında argon atmosferinde 30 ve 300°C sıcaklık değerlerinde yapılmıştır.

Fe_3O_4 ve polimer kaplı Fe_3O_4 parçacıklarının katı hallerinin manyetik özellikleri Pacific Electric Motor Co. markalı titreşimli numune magnetometresi (VSM) ile oda sıcaklığında DC biased magnetizasyon ile 0-8000 Oe aralığında belirlenmiştir.

Demiroksitli nanoparçacıkların ve DOX yüklü ajanların sitotoksisiteleri MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] ile tahlil edilmiştir.

ELISA multiwell spectrophotometer (BIO-RAD Benchmark Plus kullanılarak MTS testleri 490nm de yapılmıştır. MTS ler Promega (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) den alınmıştır. Sitotoksisite deneyleri ATCC den alınan insan osteoblast (hFOB) ve insan göğüs adenocarcinoma (MCF-7) hücrelerinde yapılmıştır.

3.4. Hücre Kültürü Hazırlama

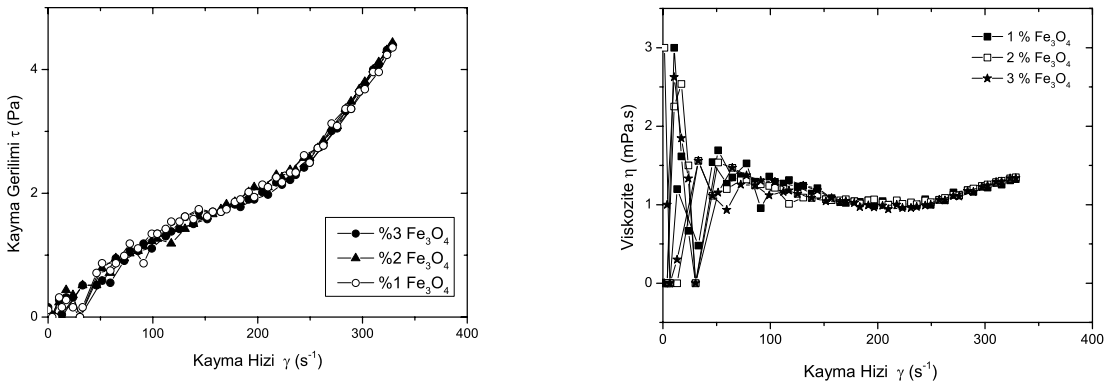
Bütün hücre kültürleri Dulbecco's modified Eagle's ortamında %10 yaşayan bovine serumunda (FBS, HyClone), 1% penicillin-streptomycin (Sigma), 1% L-Glutamine solution (Sigma) ortamında hazırlanmıştır. Tüm inkübebasyonlar nemli atmosferde %5 CO_2, 37°C (BINDER, C150 E2) içeriğinde yapılmıştır. Deneysel prosedürler gereği tüm hücrelere %0.5 Trypsin-EDTA çözeltisi (Sigma, T3924) ilave edilmiş ve DMEM'de dağıtılmıştır.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Reolojik Bulgular

Demiroksitlerin su içerisinde oluşturduğu kolloidal dispersiyonların reolojik davranışları artan demiroksit konsantrayonuna bağlı olarak belirlendi. Brookfield DVIII + type low-shear reometresi ile yapılan ölçümlerde artan kayma hızına karşılık kayma gerilimleri ölçüldü ve

görünür viskozite değerleri hesaplandı. Ağırlıkça % 1, 2 ve 3'lük demiroksit konsantrasyonları için akış diyagramları ve viskozite eğrileri belirlenmiş ve Şekil 4.1.1'de verilmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.1.1 Farklı katı oranlarında demiroksit dispersiyonlarının a) akış diyagramları b) viskozite eğrileri

Tüm konsantrasyonlarda demir oksit pdispersiyonları Non-Newtonyen akışlardan kalınlaşan akış davranışını göstermiştir. Bu tür akışlarda dispersiyona uygulanan deformasyon kolloidal parçacıkların yeniden organize olarak etkileşmesine ve akışa karşı direncin artmasına neden olmaktadır. Matematiksel olarak power law $\tau=\gamma^n$ (kuvvet yasası) ile ifade edilen kalınlaşan akışlarda verilen formülde n değerinin 1'den büyük olması kalınlaşan akış ifade edilmektir. τ akma gerilimini, γ kayma hızını ifade etmektedir.(Tadros, 2010) Artan katı miktarı ile akış modeli değişmemektedir. Çalışmaların devamında %2'lik konsantrasyon ile çalışılması uygun görülmüştür.

Polimerlerin ilavesi ile akış özellikleri tekrar belirlenmiş ve dispersiyonlardaki akış direncine polimerlerin etkileri araştırılmıştır. Kullanılan HEC, PVP, ve NK polimerlerinin konsantrasyonları 10^{-5} ile 1 g/L arasında 12 farklı konsantrasyon değerlerinde seçilmiştir.

Her bir polimer ve konsantrasyon için akış özellikleri incelendiğinde tüm polimerlerinde demiroksit parçacıklarının yüzeylerini kaplayarak parçacıklar arası etkileşimleri azalttığını, deformasyon altında yeniden organize olmalarını engelledikleri bu sayede kalınlaşan akış davranışının parçacıklar arası etkileşimlerin çok az olduğu Newtoniyen akışa dönüştüğü gözlenmiştir.



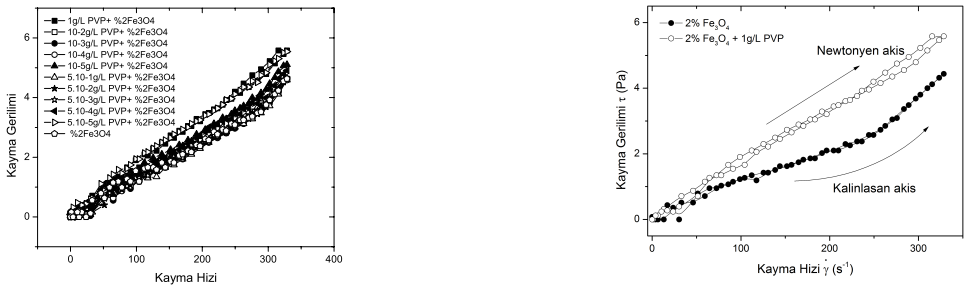
(a) (b)

Şekil 4.1.2 a) Farklı HEC konsantrasyonlarındaki demiroksit dispersiyonlarının akış eğrileri, b) 1g/L HEC ilaveli ve HEC ilavesiz demiroksit dispersiyonunun akış eğrileri



(a) (b)

Şekil 4.1.3 a) Farklı NK konsantrasyonlarındaki demiroksit dispersiyonlarının akış eğrileri, b) 1g/L NK ilaveli dispersiyon ile %2'lik NK ilavesiz demiroksit dispersiyonunun akış eğrileri



(a) (b)

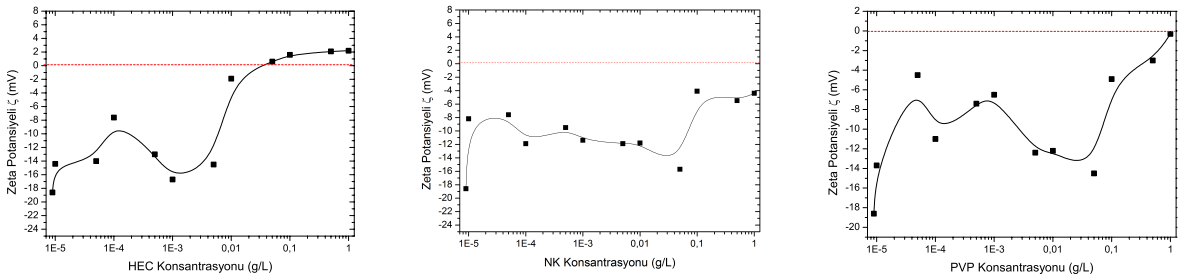
Şekil 4.1.4 a) Farklı PVP konsantrasyonlarındaki demiroksit dispersiyonlarının akış eğrileri, b) 1g/L PVP ilaveli dispersiyon ile %2'lik PVP ilavesiz demiroksit dispersiyonunun akış eğrileri

Parçacıklar arası etkileşimlerin ve akışa karşı direncin azalması ilaç ulaştırma ajanı hazırlama amacımız için çok iyi bir sonuçtur. Dispersiyonların daha akışkan olması ve birbirleri ile etkileşimlerinin azalması her bir demiroksit parçacığının yüzeyinin polimer kaplanarak parçacığın birbirinden uzaklaştığı ve kümeleşmediği anlamına gelmektedir.(Hunter, 1993; G. Lagaly & Ziesmer, 2003; Tadros, 2007; Van Olphen, 1977)

4.2. Elektrokinetik Bulgular

Demiroksitlerin su içerisindeki zeta potansiyelleri ölçüldüğünde -18,6mV olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyeli parçacıkların yüzey yüklerinin dağılımları hakkında ve parçacıklar arası elektrostatik itme ve çekmeler hakkında bilgi verebilen bir parametredir. (Hunter, 1981, 1993; Tadros, 2007; Tadros & International Association of Colloid Scientists., 1988; Van Olphen, 1977) Dispersiyonların zeta potansiyeli -25 ve +25 mV arasındaki değerlerde ise dispersiyonlar çökme eğiliminde ve kararsız yapıdadır denilmektedir. Demiroksit parçacıkları su içerisinde çökme eğilimi gösteren kararsız yapılı dispersiyonlar oluşturmaktadır.

Polimer ilaveleri ile hazırladığımız dispersiyonların zeta potansiyel değerleri ölçülerek kolloidal dispersiyonların kararlılıkları ve yüzey yük dağılımları hakkında bilgi edinilmiştir. 10^{-5} ile 1 g/L konsantrasyon aralığında 12 farklı konsantrasyonda hazırlanan dispersiyonların polimer konsantrasyonu ile zeta potansiyel değişimleri Şekil 4.2.1'de verilmiştir.



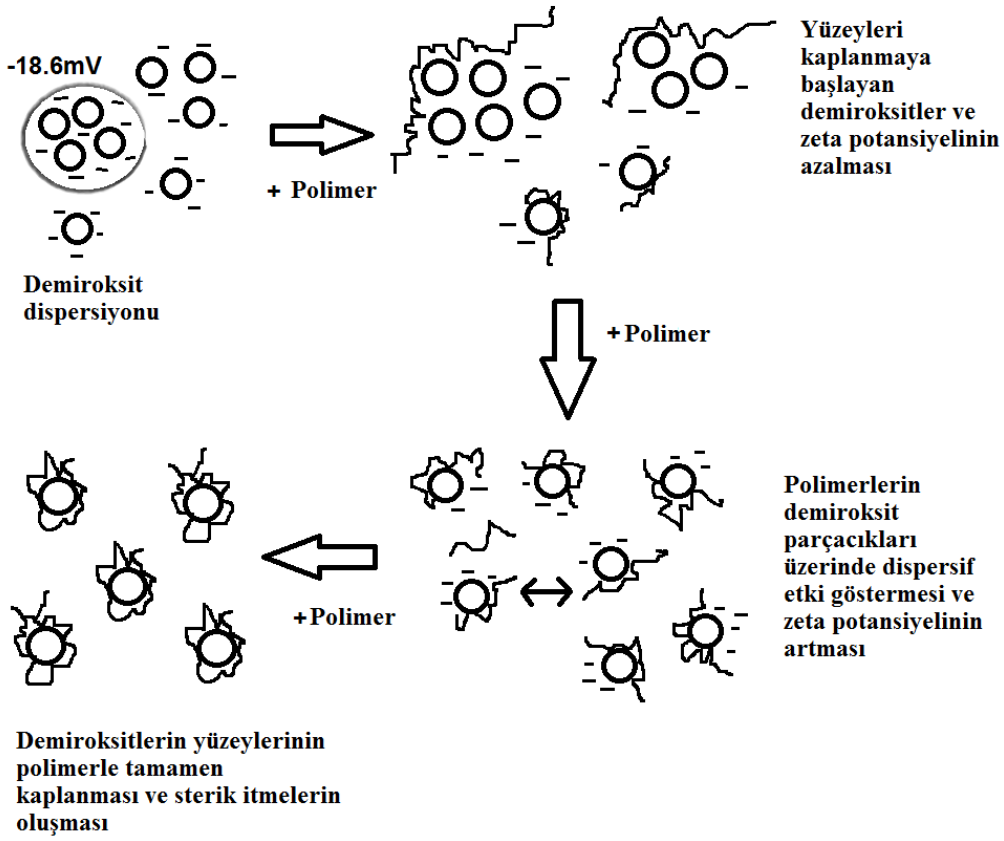
(a) (b) (c)

Şekil 4.2.1 Polimer ilaveli demiroksit dispersiyonlarının zeta potansiyelinin (a) HEC, (b) NK, (c) PVP konsantrasyonları ile değişimi

Tüm polimerler ilave edildiğinde hemen demiroksit parçacıklarının yüzeylerine tutunmuş ve demiroksitin zeta potansiyel değierlerinin azalmasına neden olmuştur. Polimerin zincir yapısına bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda (HEC için yaklaşık 5.10^{-4}, NK için yaklaşık, ve PVP için yaklaşık 5.10^{-3} g/L) zeta potansiyeli değerleri artmaya başlamıştır. Bu artış polimerlerin demiroksitler üzerine dispersif etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Polimerler kümeleşen demiroksit parçacıklarının arasına girerek parçacıkların dağılmasına

ve dispers olmasına neden olmaktadır. Dispersiyon içerisine dağılan parçacıkların yüzey yükleri ortamın zeta potansiyel değerlerini arttırmaktadır. İlerleyen konsantrasyonlarda ise demiroksitlerin HEC ve PVP ilavesi ile yüzeyleri tamamen kaplanmakta ve zeta potansiyeli olarak sıfır yük noktası elde edilmektedir. NK ilavesinde ise negatif yüklü NK polimeri demiroksitlerin beklenildiği gibi yüzeylerini tamamen kaplamamıştır. Ancak, parçacıklar arası elektrosterik itme nedeni ile son ilavelerde kararlı hale geçmiş ve polimer ilavesi ile zeta potansiyeli ve viskozite değerleri değişmemiştir.(Black, 1966; Giese, 2002; Van Olphen, 1977)

Yüzeyleri tamamen polimer ile kaplı olan demiroksit parçacıkları arasında sterik etkileşme oluşmakta ve polimerlerin birbirlerine ozmotik basınç uygulaması sonucunda parçacıklar birbirlerini itmektedir. Bu itmeler parçacıkların kümeleşip çökmesini engellemekte ve dispersiyonun kararlı olmasına neden olmaktadır. (Hunter, 1981; Gerhard Lagaly, 2007) Polimer ilavesi ile dispersiyonların zeta potansiyel değerlerinin değişimi Şekil 4.2.1'de şematik olarak gösterilmiştir.

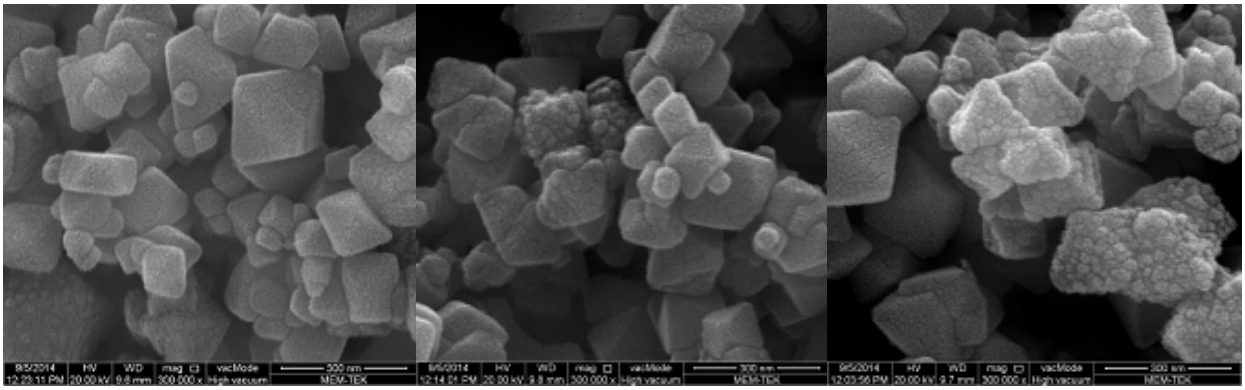


Şekil 4.2.2 Polimer ilavesi ile dispersiyonların zeta potansiyel değerlerinin değişiminin şematik gösterimi

Sterik etki ile birbirlerinden uzaklaşan parçacıklar arası etkileşimlerin azalması reolojik sonuçlarda da daha az etkileşen akış tipine Newtoniyen akışa dönmesinin nedenidir. Bu iki sonuç birbirini desteklemektedir.

4.3. SEM Resimleri

Elektrokinetik ölçümlerde yüzeylerinin tamamen kaplandığı bilgisi reolojik ölçümler ile desteklenmiştir. Bu sonuçları SEM görüntüleri ile kontrol ederek doğrulukları kontrol edilmiştir. Şekil 4.3.1'de HEC polimerinin farklı konsantrasyonlarda demiroksit parçacıklarına ilavesinin SEM görüntüleri verilmiştir.



(a) (b) (c)

Şekil 4.3.1 a) polimer ilavesiz demir oksitlerin, b) 5.10^{-3} g/L konsantrasyonundaki, c) 1g/L konsantrasyonundaki HEC polimerinin demiroksit parçacıklarına ilavesinin SEM görüntüleri

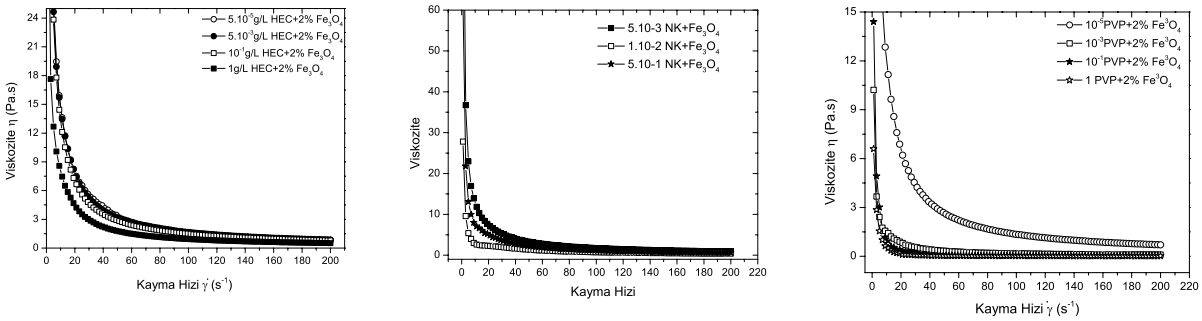
SEM resimleri polimerin demiroksit yüzeylerini kapladığının görsel kanıtıdır. HEC polimerleri küpler şeklinde görünen demiroksitlerin üzerinde noktalar olarak görünmektedir. Zeta potansiyeli değerlerine göre kısmen kaplanmış olan 5.10^{-3} g/L konsantrasyonundaki dispersiyonlarda sadece bazı demiroksit parçacıklarının üzerlerinin HEC polimeri ile kaplandığı görülmektedir. Ancak tüm parçacık yüzeylerinin kaplandığı belirlenen 1 g/L HEC konsantrasyonunda tüm parçacıkların yüzeylerinin HEC ile kaplandığı açıkça görülmektedir.

4.4. Magnetoreoloji

Manyetik özellik gösteren parçacıklar manyetik alan uygulandığında sıvı gibi olan formları katı gibi davranmaktadır. Bu reolojik özelliklerini ve parametrelerini çok ciddi şekilde değiştirmektedir. Dispersiyonların viskozite değerleri yüzlerce kat artmaktadır. Bu etkiye magnetoreolojik etki denilmektedir.(Park, B.J., F.F. Fang, and H.J. Choi, *Magnetorheology: materials and application.* Soft Matter, 2010. **6**(21): p. 5246-5253.)

Magnetoreolojik etkiler hazırlanan demiroksit parçacıklarının vücud içerisinde ilerlemesinin azlamasına hatta damarlarda tıkanmaya neden olabileceklerdir. Bu etkiyi azaltmak çalışmamızın en özgün amaçlarından biridir.

220mT manyetik alan demiroksit dispersiyonlarına uygulanmış ve magnetoreolojik etkiler belirlenmiştir. Manyetik alan uygulandığında dispersiyonların viskozite değerleri 100 kat artmıştır. Ancak, yüzeyleri tamamen kaplı olan parçacıkların viskozite değerleri kısmen kapı olan parçacıklara oranla daha az artmıştır. Şekil 4.4.1'de farklı konsantrasyonlardaki a) HEC, b) NK, c) PVP ilaveli demiroksit dispersiyonlarının magnetoreolojik ölçüm sonuçları görülmektedir. Viskozite değerleri artan yüzey kaplaması sonucu polimer ilavesi ile azalmaktadır.

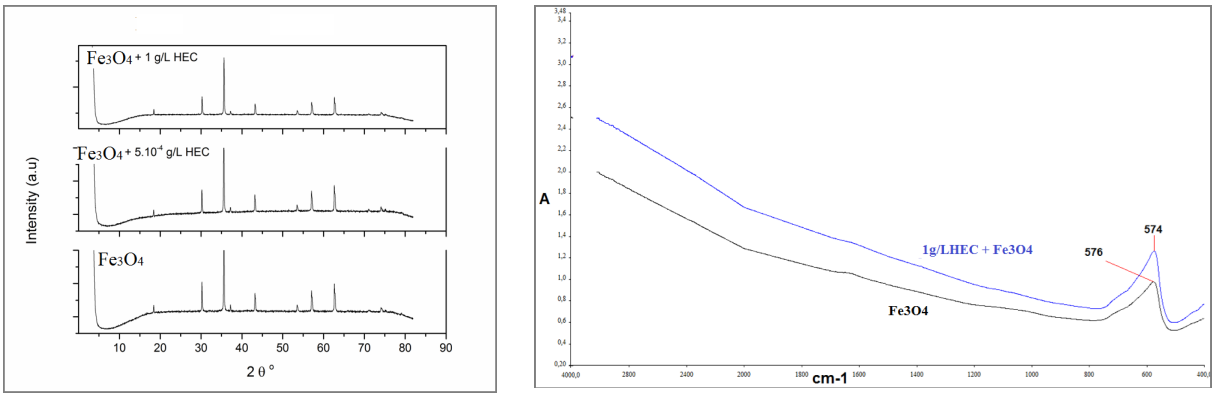


(a) (b) (c)

Şekil 4.4.1 a) HEC b) NK c) PVP polimer ilaveli demiroksitlerin farklı konsantrasyonlardaki manyetik alan altında viskozite - kayma hızı grafikleri

4.5. XRD ve FTIR ile karakterizasyon

Üretmeyi planladığımız ilaç ajanlarımızın geleneksel karakterizasyonlarla karşılaştırmayı planlamıştık. Ancak, demiroksitlerin kafes yapısında herhangi bir değişiklik olmadığı ve kimyasal bir değişikliğe uğramadıkları için bu geleneksel yöntemlerden XRD ve FTIR yöntemlerini kullanamamaktayız. Elde edilen sonuçlarda biyopolimer katkıları çok az olduğu için XRD ve FTIR sonuçlarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Şekil 4.5.1'de sonuçlardan HEC'li olanlar örnek olarak verilmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.5.1. HEC ilaveli demiroksitlerin a) XRD diyagramları, b)FTIR spektrumları

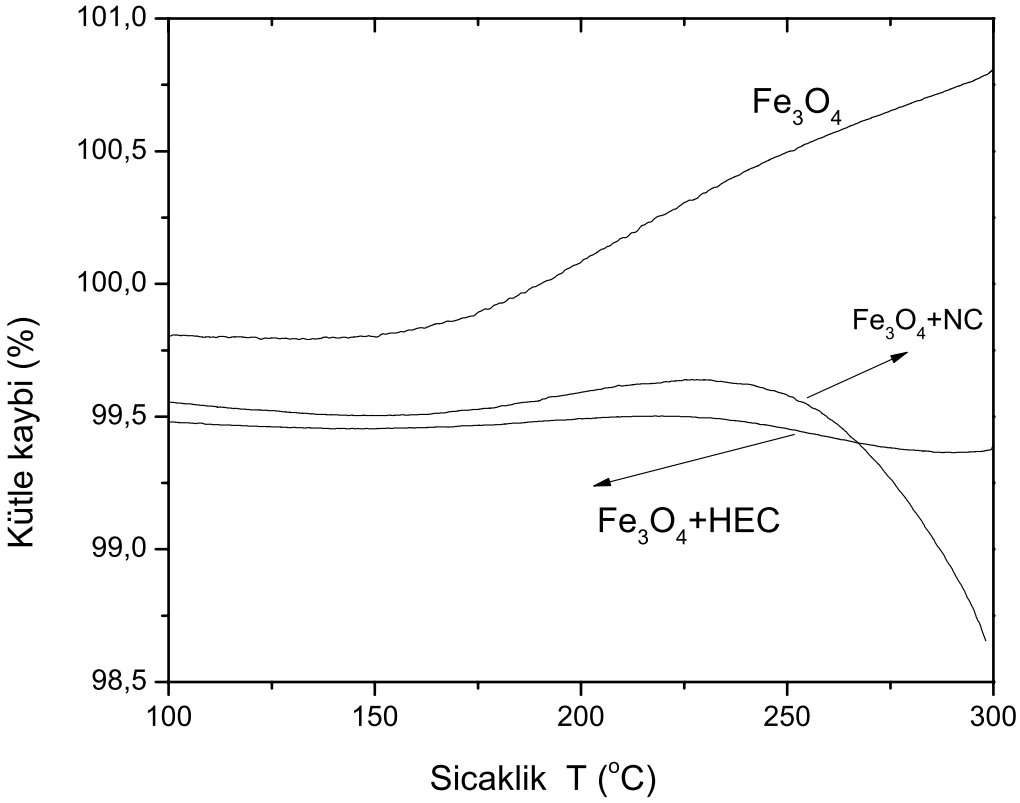
4.6. İlaç Ulaştırma

Kolloidal karakterizasyon sonuçlarına bakıldığından kullanılan polimerlerin üçü içinde ortak olarak 1g/L konsantrasyonları seçilmiştir. HEC ve PVP polimerleri bu konsantrasyonda Fe_3O_4 parçacıklarını tamamen kaplamış, NK polimerinde ise kararlı durum elde edilmiştir. 1g/L konsantrasyonlu polimerler ile kaplanan Fe_3O_4 parçacıklarının ilaç ulaştırma ajanı olarak kullanılmıştır. İlaç ulaştırma ajanı olarak hazırlanan parçacıkların termal, manyetik ve sittoksisite özellikleri belirlenmiş ardından kanser ilacı olarak DOX (doxorubicin) yüklenmiştir. İlaç yüklenen ajanların kanser hücrelerine ilaç ulaştırma başarıları belirlenmiştir.

4.6.1. Termal Özellikler

Termal testler (TGA-termo gravimetrik analiz) manyetik alan etkisi ile yüksek sıcaklıklara çıkabilen demiroksitlerin polimerler ile kaplandığında sıcaklıkların etkilerini belirlemek amacı ile yapılmıştır.

TGA sonuçlarına göre polimer kaplanmış ve kaplanmamış demiroksitler 30 ile 300 °C arasında birbirlerinden farklı kütle kaybı davranışları göstermektedir (Şekil 4.5.1). Fe_3O_4 parçacıkları artan sıcaklık değerleri ile birlikte kütle değerleri artmaktadır. Bu sonuç demiroksitlerin sıcaklık arttığında oksitlendiği anlamına gelmektedir. Polimer kaplı parçacıklar ise artan sıcaklık ile kütle kaybetmektedirler. Parçacıkların yüzeylerini kaplayan polimerler oksitlenmeyi engellemektedir. Bu bizim uygulamamız için çok olumlu bir sonuçtur.

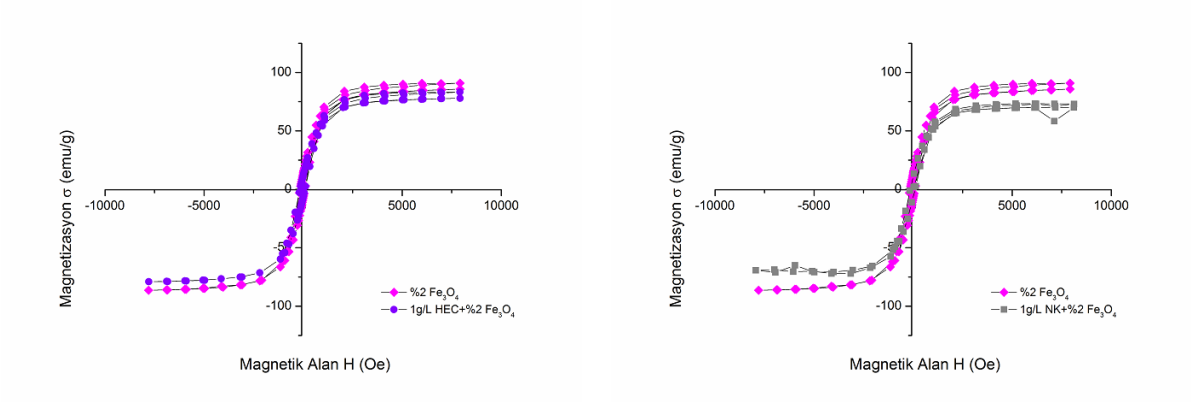


Şekil 4.6.1.1 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L HEC ve NK kaplı Fe_3O_4 parçacıklarının TGA eğrileri

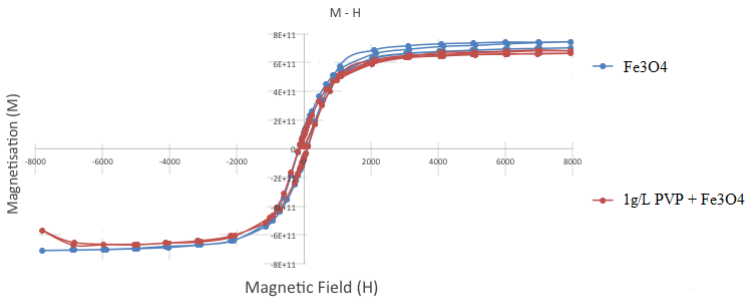
4.6.2. Manyetik Özellikler

ilaç ulaştırma ajanı olarak kullanılacak olan nanoparçacıklar biyo uyumlu, küçük ve süperparamanyetik parçacıklar olmalıdırlar. Süperparamanyetik parçacıklar manyetik alan uygulandığında mangetize olurlar ancak bu etki manyetik alan kaldırıldığında kalıcı bir magnetizasyon olmamalıdır. Bu yüzden süperparamanyetik parçacıklar sıfır koersiviti ve histeriz gösterirler. Başka türlü olması durumunda, manyetik alan etkisi ile tümörlü bölgeye ulaştırılan parçacıklar kümeleşir ve vücuttan atılamazlar. (Chomoucka et al., 2010; Drbohlavova et al., 2009; Pankhurst, Connolly, Jones, & Dobson, 2003).

Şekil 4.6.1'de görüldüğü gibi Fe_3O_4 parçacıkları manyetik alana süperparamanyetik tepki vermektedirler. Polimer ilavesi ile bu etki çok küçük oranlarda azalmaktadır ancak halen karakteristik özelliklerini korumaktadırlar.



(a) (b)



(c)

Şekil 4.6.2.1 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L HEC, NK ve PVP kaplı Fe_3O_4 parçacıklarının magnetizasyon eğrileri

4.6.3. *In Vitro* Özellikler

Hazırlanan Fe_3O_4 parçacıklarının anti-kanser ilaç potansiyellerini ve toksisitelerini, biyo uyumlulukları, canlılara zarar verip vermediği ve kanser uygulamalarında ilaç ulaştırma başarıları *In vitro* (canlı dışı hücre deneyleri) deneyler tasarlanmış ve belirlenmiştir.

4.6.3.1. Sitotoksisite Deneyleri

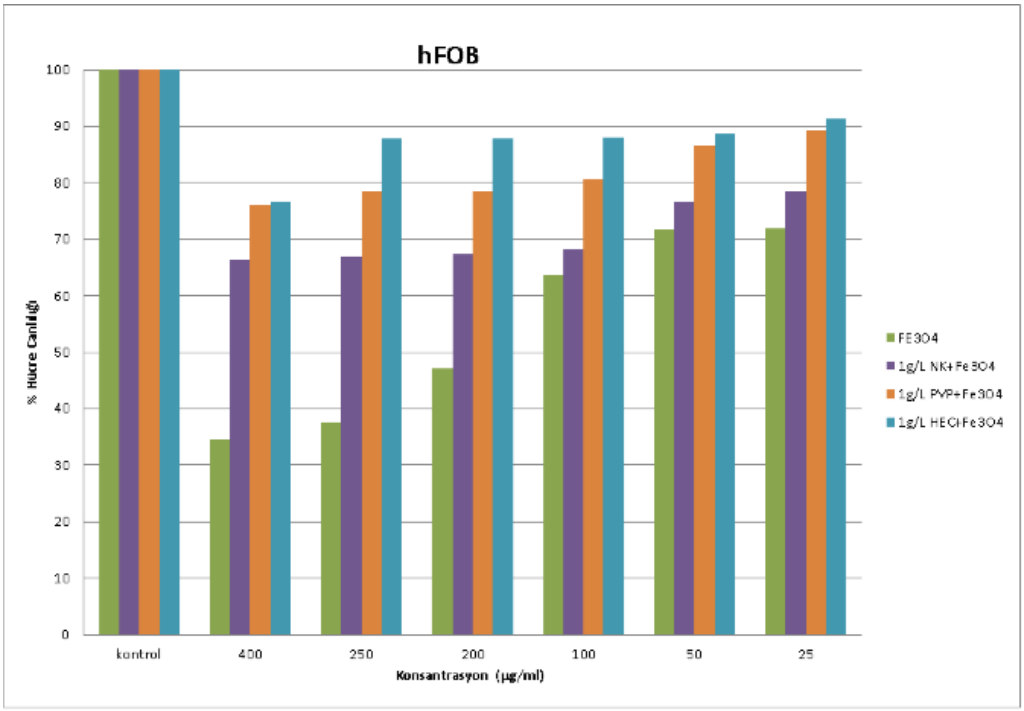
Manyetik nanoparçacıkların sitotoksisitesi MTS tetrazolyum bileşiği (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H–tetrazolyum) kullanılarak yapılmıştır. Hücre kültür koşulları sitotoksisite deneylerinden once optimize edilmiştir. (LesliePelecky & Rieke, 1996). Formazan miktarı, 490nm absorbans değeri (OD) ile ELİSA spektrofotometre ile

ölçülmüştür (arka plan absorbansı 680 nm iken). Deneyler en az 3 kez tekrarlanmış ve Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapılmıştır.

Kontrole kıyasla hücre canlılıgı yüzdeleri aşagıdakı formülle hesaplanmıştır;

$$Hücre\ Canlılığı\ (\%) = \frac{OD_{490}}{avg(OD_{490}C')} \times 100$$

Sitotoksisite Deneyleri için hFOB (insan fetal osteoblast) ve MCF-7 (insan meme adenokarsinom) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler 96 Kuyu elisa plakalara 10,000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücre kültürü için Fetal sığır serumlu(%10) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmıştır. Nanoparaçacıkların sitotoksisite tayini için ekilmiş hücreler değişik konsantrasyonlarda nanoparçacıklarla birlikte ekilmiştir (400, 250, 200, 100, 50, 25 l/ml). 48 saat 37 ^{0}C, % 5 CO_2 'li etüvde inkübasyon sonrası her kuyu iki kez PBS (fosfat tampon) ile yıkanmış ve MTS ile muamele edilmiştir. Formazan miktarı ölçülerek hücre canlılıgı yüzdeleri hesaplanmıştır. (LesliePelecky & Rieke, 1996)



Şekil 4.6.3.1 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L HEC, NK ve PVP kaplı parçacıkların hücre canlılığı grafikleri

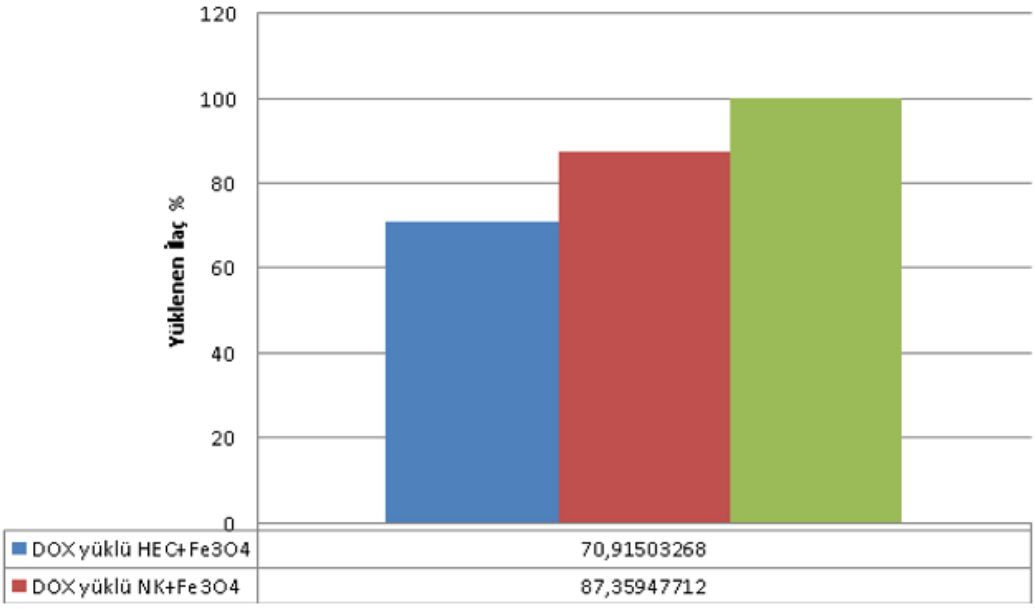
Şekil 4.5.4.1'de görüldüğü gibi polimer kaplı nanoparçacıkların sitotoksisiteleri, kaplanmamış nanoparçacıklara kıyasla önemli ölçüde azalmıştır (İstatistik analiz tüm numuneler için $P < 0.05$ göstermektedir). Fe_3O_4 nanoparçacıklarının polimerle kaplandığında biyouyumlulugunun arttığı ve hücre üzerindeki toksisitesinin önemli miktarda azaldığı görülmektedir. Bu özellik

biyopolimer kaplanmış Fe_3O_4 nanoparçacıkların kanser ilacı ulaştırmak için kullanılabileceğini göstermektedir.(Chomoucka et al., 2010; Gupta & Gupta, 2005; McCarthy & Weissleder, 2008; Rivera Gil et al., 2010)

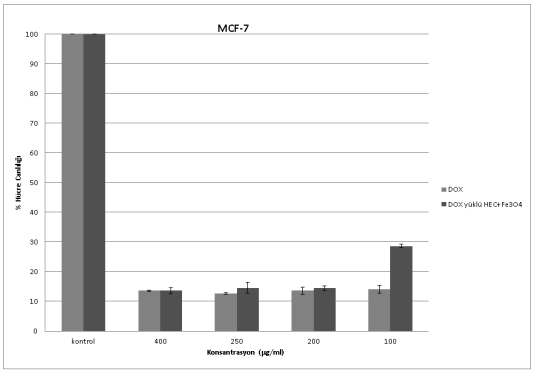
Tüm polimer kaplamaları demiroksitin toksik etkisini azaltmış ve canlı kalan hücre miktarını arttırmıştır. Polimerleri kendi aralarında karşılaştırırsak, demiroksitleri kısmen kaplayan NK diğer iki polimere oranla daha başarısızdır. Bunun nedeni demiroksitlerin yüzeylerini tamamen kaplamamış olması ve demiroksitin toksik etkisini kısmen azaltmış olmasıdır. Demiroksitlerin yüzeylerini tamamen kaplayan HEC ve PVP polimerleri ise %80-90 olarak canlılığı korumuştur. Demiroksitlerin yüzeylerinin tamamen kaplanması savunduğumuz gibi demiroksitin toksik etkisini ciddi oranda azaltmıştır. HEC ve PVP arasındaki fark ise katyonik polimerin noniyonik polimere göre daha toksik olmasından kaynaklanmaktadır.

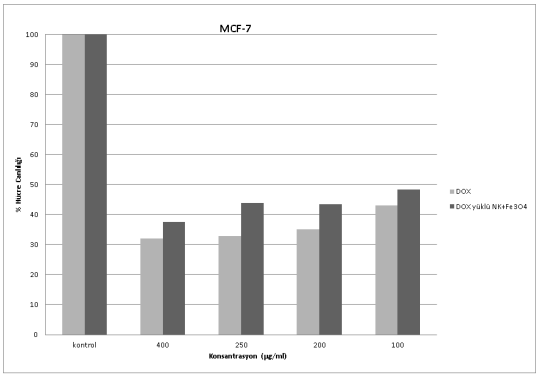
4.6.3.2. Kanser Hücrelerine İlaç Ulaştırma Deneyleri ve In Vitro Çalışmaları

Doksorubisin (DOX), antitümor ilacı 1g/L HEC+2% Fe_3O_4 ve 1g/L NK+2% Fe_3O_4 nanoparçacıklarına PBS kullanılarak karıştırıcıda yüklenmiştir ve süpernatanttaki DOX miktarı ölçülerek ilaç yükleme verimi hesaplanmıştır (Şekil 4.5.5.1). Daha sonra DOX yüklü parçacıklar MCF-7 hücre hattı üzerinde değişik konsantrasyonlarda test edilmiş ve hücre canlılığına etkisi hesaplanmıştır. (Şekil 4.5.5.2) İstatistik analizler numuneler için kontrole kıyasla $p < .0001$ değerini göstermiştir.(Hafelli et al., 2009; Mosmann, 1983)



Şekil 4.6.3.2 1g/L HEC, ve NK kaplı parçacıkların DOX yükleme verimlilikleri





(a) **(b)**

Şekil 4.6.3.3 Fe_3O_4 parçacıkları ve 1g/L a)HEC ve b) NK kaplı parçacıkların kanser hücreleri canlılığı grafikleri

Sonuçlara göre parçacıklara önemli miktarda DOX yüklemesi yapılabilmiş ve *in vitro* testlerde ilacın salındığı ve MCF-7 hücrelerinin canlılığını ciddi miktarda azalttığı görülmüştür. Nanoparçacıklara yüklenmiş DOX'un toksisitesinin belirli konsantrasyonlarda (400, 250, 200 g/ml) çok yüksek ve neredeyse saf DOX ile aynı olduğunu sonuçlarda görülmektedir. DOX yüklü parçacıkların ve saf DOX un kanser hücreleri üstünde aynı etkiyi yaptığı söylenebilmektedir. Aynı konsantrasyondaki DOX'u kanserli hücrelere ulaştırmak için vücuda verilecek olan çok yüksek miktarlardaki ilacın yerine, yeterli miktarda demiroksit ajanlarına yüklenmiş anti-tümör ilaçları ile tedavi etmek mümkün görünmektedir.

5. SONUÇLAR

Projemizin amacı kolloidal özellik gösteren demiroksit parçacıklarının kolloidal özellikleri kontrol ederek yüzeylerini biyo uyumlu hale getirmek ve ilaç yükleyerek anti tümör ajanı olarak kullanımlarını sağlamaktır. Demiroksitler ilaç taşıyıcı ajanlar olarak son zamanlarda araştırılmakta ve yan etkileri çok fazla olan kemoterapi için alternatif bir yöntem olabileceği için umut vermektedir.(Chomoucka et al., 2010; McBain et al., 2008; McCarthy & Weissleder, 2008; Pankhurst et al., 2003; Rivera Gil et al., 2010; C. Sun, Lee, & Zhang, 2008) Bizim projemizin özgün tarafı ise kullandığımız biyopolimerlerimiz ve bu biyopolimerlerin demiroksitleri kaplarken izlenmesi gereken yolu demiroksit parçacıkları arasındaki etkileşimleri anlayarak, en uygun konsantrasyonu belirlenmesidir. Demiroksitleri kaplarken kullanılabilecek olan yanlış konsantrasyonların sonuçları nasıl etkileyebileceğini ve verimi düşürebileceğini göstermektir. Bunların yanı bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılan, pahalı ve zahmetli olan geleneksel karakterizasyon yöntemleri yerine kolloidal karakterizasyon ile çok

daha hızlı, kesin, ve kolay sonuç alınabileceğini göstermektir. Kolloidal karakterizasyon ile parçacıklar arası ilişkiler anlayarak, elde edilecek olan ürünleri yorumlamaktır.

Çalışmalarımızda ilk olarak reolojik ve elektrokinetik ölçümler ile dispersiyonların kolloidal özellikleri belirlenmiştir. Demiroksitlerin akış diyagramlarına bakıldığında kalınlaşan akış gösterdikleri belirlenmiştir. Kalınlaşan akışlar karıştırmalar sırasında parçacıkların birbirleri ile etkileşimlerinin artmasından meydana gelmektedir.(Tadros, 2010) Bu akış türü uygulamamız için çok elverişsiz bir akış türüdür. Matematiksel olarak power law $\tau=\gamma^n$ (kuvvet yasası) ile ifade edilen kalınlaşan akışlarda verilen formülde n değerinin 1'den büyük olması kalınlaşan akış ifade edilmektir. τ akma gerilimini, γ kayma hızını ifade etmektedir. Artan katı miktarı ile akış modeli değişmemektedir. Çalışmaların devamında %2'lik konsantrasyon ile çalışılması uygun görülmüştür.

Hazırlanan %2'lik demiroksit dispersiyonları kullandığımız biyopolimerlerin (HEC, NK, PVP) farklı konsantrasyonları ile karıştırılmış ardından reolojik ve elektrokinetik özellikleri belirlenmiştir. Her bir polimer ve konsantrasyon için akış özellikleri incelenmiş tüm polimerlerinde demiroksit parçacıklarının yüzeylerini kaplayarak parçacıklar arası etkileşimleri azalttığını, deformasyon altında yeniden organize olmalarını engelledikleri bu sayede kalınlaşan akış davranışının parçacıklar arası etkileşimlerin çok az olduğu Newtoniyen akışa dönüştüğü gözlenmiştir. Demir oksitlere polimerler ilave edildiğinde hemen demiroksit parçacıklarının yüzeylerine tutunmuş ve demiroksitin zeta potansiyel değierlerinin azalmasına neden olmuştur. Polimerin zincir yapısına bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda (HEC için yaklaşık 5.10^{-4}, NK için yaklaşık, ve PVP için yaklaşık 5.10^{-3} g/L) zeta potansiyeli değerleri artmaya başlamıştır. Bu artış polimerlerin demiroksitler üzerine dispersif etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Polimerler kümeleşen demiroksit parçacıklarının arasına girerek parçacıkların dağılmasına ve dispers olmasına neden olmaktadır. Dispersiyon içerisine dağılan parçacıkların yüzey yükleri ortamın zeta potansiyel değerlerini arttırmaktadır. İlerleyen konsantrasyonlarda ise demiroksitlerin HEC ve PVP ilavesi ile yüzeyleri tamamen kaplanmakta ve zeta potansiyeli olarak sıfır yük noktası elde edilmektedir. NK ilavesinde ise negatif yüklü NK polimeri demiroksitlerin beklenildiği gibi yüzeylerini tamamen kaplamamıştır. Ancak, parçacıklar arası elektrosterik itme nedeni ile son ilavelerde kararlı hale geçmiş ve polimer ilavesi ile zeta potansiyeli ve viskozite değerleri değişmemiştir.(Black, 1966; Giese, 2002; Van Olphen, 1977) Yüzeyleri tamamen polimer ile kaplı olan demiroksit parçacıkları arasında sterik etkileşme oluşmakta ve polimerlerin birbirlerine ozmotik basınç uygulaması sonucunda parçacıklar birbirlerini itmektedir. Bu itmeler parçacıkların kümeleşip çökmesini engellemekte ve dispersiyonun kararlı olmasına neden olmaktadır. (Hunter, 1981; Gerhard Lagaly, 2007)

Sterik etki ile birbirlerinden uzaklaşan parçacıklar arası etkileşimlerin azalması reolojik sonuçlarda da daha az etkileşen akış tipine Newtoniyen akışa dönmesinin nedenidir. Bu iki sonuç birbirini desteklemektedir.

Reolojik ve elektrokinetik özellikler birlikte yorumlanarak kullanılan konsantrasonların demiroksit parçacıkları üzerindeki etkiler ve etkileşimler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar geleneksel karakterisazyon yöntemleri ile karşılaştırılmış ve doğrulukları kontrol edilmiştir. Kolloidal özellikler parçacıklar arasındaki ilişkileri açıklayarak nano boyutlu parçacıkların etkileşimlerini resimlememizde sadece kolloidal özelliklerin kontrolünün yeterli olduğu bilgisini doğrulanmıştır. SEM resimleri bu sonucumuzu desteklemiş ve demir oksitlerin yüzeylerinin polimer ile tamamen kaplandığı ve zeta potansiyel yorumlarımızı desteklediği gözlenmiştir.

Yüzeyleri tamamen kaplı veya kısmen kaplı parçacıkların manyetik alan altındaki akışları ve magnetoreolojik etkiler araştırılmıştır. Bu çalışma yine bizim projemize özgü bir çalışmadır. Manyetik alan etkisi ile viskozitesi yüzlerce kat artan viskozite değerleri (magnetoreolojik etki) uygulamada büyük sıkıntı oluşturabilecek bir durumdur.(Park, Fang, & Choi, 2010) Yüzey kaplamasının magnetoreolojik etkiler üzerindeki etkisinin önemi belirlenmiştir. Yüzeyleri tamamen kaplı demiroksitlerin maruz kaldığı magnetoreolojik etkilerin kısmen kaplı olanlara kıyasla çok daha küçüktür. Bu sonuç projemizin önemini gösteren en önemli sonuçlarımızdan biridir.

Kolloidal karakterizasyon sonuçlarından elde edilen bilgiler ışığında demiroksitlerin yüzeylerini tamamen kaplayan polimer konsantrasyonları belirlenmiş ve ilaç taşıma ajanı olarak hazırlanmıştır. 1 g/L'lik polimer ilavelerinin demiroksit parçacıklarının yüzeylerini tamamen kapladıkları ve ilaç ulaştırma ajanı olarak uygun kolloidal özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir.(Gupta & Gupta, 2005; Mahmoudi et al., 2010; Rivera Gil et al., 2010; Sonvico, Dubernet, Colombo, & Couvreur, 2005) Hazırlanan biyopolimerlerin uygulamada kullanıma uygun olup olmadığını belirlemek için termal, manyetik özellikleri belirlenmiş ve biyo uyumlulukları *in vitro* hücre testleri ile belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında biyopolimer kaplamaları yüksek sıcaklıklarda oksitlenen demiroksit parçacıklarının yüzeylerinin biyopolimerler ile kaplandığında oksitlenmediği, süperparamagnetik özelliğinin ise kaplamalar sonrası çok az azaldığı ancak karakteristik olarak değişmediği belirlenmiştir. Hücre testlerinde ise tüm biyopolimerlerin demiroksitlere kıyasla çok daha az toksik özellik gösterdiği ve iddia ettiğimiz gibi yüzeyleri tamamen kaplı olan parçacıkların toksitisisinin çok daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Üretiğimiz biyodemiroksitlerin antikanser ilaçları tutma kapasiteleri belirlenmiş ve ilaçların kanser hücreleri üzerine etkisi yine *in vitro* hücre deneyleri ile belirlenmiştir.(Chertok et al., 2008; Corchero & Villaverde, 2009; Hafelli et al., 2009; Hu, Neoh, & Kang, 2006; Kumar et

al., 2010; Mosmann, 1983) Ürettiğimiz ajanların kanser hücrelerine ilaç iletimleri herhangi bir ajan olmadan ilave edilen saf ilaçlar kadar başarılı olmuştur. İlaç ajanlarımızın kanser hücrelerini büyük oranda öldürdüğü ve başarılı oldukları belirlenmiştir.

Başlangıç projemiz sayesinde daha önce çalışmadığımız ilaç ajanları üretme, test etme, biyomalzeme çalışma konusunda birçok deneyim elde edebilme şansı bulduk. Projemizden elde ettiğimiz deneyimler ışığında konu ile ilgili yeni çalışmalar yapmayı planlamaktayız. İlerleyen çalışmalarda literatürde olmayan ve çalışmalarına başladığımız uzun süreli birden fazla kere ilaç ulaştırabilen ajanlar üretmeyi ve bu konuda patent başvurusunda bulunmayı planlamaktayız.

6. KAYNAKLAR

Bhattarai, S. R., Badahur, K. C. R., Aryal, S., Khil, M. S., & Kim, H. Y. (2007). N-Acylated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a novel nano-matrix and ceramic modification. *Carbohydrate Polymers, 69*(3), 467-477. doi:DOI 10.1016/j.carbpol.2007.01.006

Black, A. P. B., F.P.; Morgan, J.J. (1966). The Effect Of Polymer Adsorption On The Electrokinetic Stability Of Dilute Clay Suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science, 21*, 626-648.

Chan, W. C. W., Maxwell, D. J., Gao, X. H., Bailey, R. E., Han, M. Y., & Nie, S. M. (2002). Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology, 13*(1), 40-46. doi:Doi 10.1016/S0958-1669(02)00282-3

Chertok, B., Moffat, B. A., David, A. E., Yu, F. Q., Bergemann, C., Ross, B. D., & Yang, V. C. (2008). Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials, 29*(4), 487-496. doi:DOI 10.1016/j.biomaterials.2007.08.050

Chomoucka, J., Drbohlavova, J., Huska, D., Adam, V., Kizek, R., & Hubalek, J. (2010). Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research, 62*(2), 144-149. doi:DOI 10.1016/j.phrs.2010.01.014

Corchero, J., & Villaverde, A. (2009). Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology, 27*(8), 468-476. doi:10.1016/j.tibtech.2009.04.003

Drbohlavova, J., Hrdy, R., Adam, V., Kizek, R., Schneeweiss, O., & Hubalek, J. (2009). Preparation and Properties of Various Magnetic Nanoparticles. *Sensors, 9*(4), 2352-2362. doi:Doi 10.3390/S90402352

Giese, R. F. v. O., C.J. (2002). Colloid And Surface Properties Of Clays And Related Minerals.

Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials, 26*(18), 3995-4021. doi:DOI 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012

Hafelli, U. O., Riffle, J. S., Harris-Shekhawat, L., Carmichael-Baranauskas, A., Mark, F., Dailey, J. P., & Bardenstein, D. (2009). Cell Uptake and in Vitro Toxicity of

Magnetic Nanoparticles Suitable for Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics, 6*(5), 1417-1428. doi:Doi 10.1021/Mp900083m
Hoare, T., Santamaria, J., Goya, G. F., Irusta, S., Lin, D., Lau, S., . . . Kohane, D. S. (2009). A Magnetically Triggered Composite Membrane for On-Demand Drug Delivery. *Nano Letters, 9*(10), 3651-3657. doi:Doi 10.1021/Nl9018935
Hu, F. X., Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2006). Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. *Biomaterials, 27*(33), 5725-5733. doi:DOI 10.1016/j.biomaterials.2006.07.014
Hunter, R. J. (1981). *Zeta potential in colloid science : principles and applications*. London: Academic Press.
Hunter, R. J. (1993). *Introduction to modern colloid science* (1st ed.). Oxford ; New York: Oxford University Press.
Koppolu, B., Rahimi, M., Nattama, S., Wadajkar, A., & Nguyen, K. T. (2010). Development of multiple-layer polymeric particles for targeted and controlled drug delivery. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 6*(2), 355-361. doi:DOI 10.1016/j.nano.2009.07.008
Kumar, A., Jena, P. K., Behera, S., Lockey, R. F., Mohapatra, S., & Mohapatra, S. (2010). Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 6*(1), 64-69. doi:DOI 10.1016/j.nano.2009.04.002
Lagaly, G. (2007). Colloids. doi:10.1002/14356007.a07_341.pub2
Lagaly, G., & Ziesmer, S. (2003). Colloid chemistry of clay minerals: the coagulation of montmorillonite dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science, 100-102*, 105-128. doi:10.1016/s0001-8686(02)00064-7
LesliePelecky, D. L., & Rieke, R. D. (1996). Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials, 8*(8), 1770-1783. doi:Doi 10.1021/Cm960077f
Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozard, M. A., Milani, A. S., Hafeli, U. O., & Stroeve, P. (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 75*(1), 300-309. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.08.044
Matsumine, A., Takegami, K., Asanuma, K., Matsubara, T., Nakamura, T., Uchida, A., & Sudo, A. (2011). A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials. *International Journal of Clinical Oncology, 16*(2), 101-108. doi:10.1007/s10147-011-0217-3
McBain, S. C., Yiu, H. H. P., & Dobson, J. (2008). Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine, 3*(2), 169-180.
McCarthy, J. R., & Weissleder, R. (2008). Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(11), 1241-1251. doi:DOI 10.1016/j.addr.2008.03.014
Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. *Journal of Immunological Methods, 65*(1-2), 55-63. doi:Doi 10.1016/0022-1759(83)90303-4
Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics, 36*(13), R167-R181. doi:Pii S0022-3727(03)40035-1
Doi 10.1088/0022-3727/36/13/201

Park, B. J., Fang, F. F., & Choi, H. J. (2010). Magnetorheology: materials and application. *Soft Matter, 6*(21), 5246-5253. doi:10.1039/C0SM00014K
Purushotham, S., & Ramanujan, R. V. (2010). Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomaterialia, 6*(2), 502-510. doi:DOI 10.1016/j.actbio.2009.07.004
Rivera Gil, P., Huhn, D., del Mercato, L. L., Sasse, D., & Parak, W. J. (2010). Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological Research, 62*(2), 115-125. doi:10.1016/j.phrs.2010.01.009
Sivudu, K. S., & Rhee, K. Y. (2009). Preparation and characterization of pH-responsive hydrogel magnetite nanocomposite. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 349*(1-3), 29-34. doi:DOI 10.1016/j.colsurfa.2009.07.048
Sonvico, F., Dubernet, C., Colombo, P., & Couvreur, P. (2005). Metallic colloid nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutics. *Current Pharmaceutical Design, 11*(16), 2091-2105. doi:Doi 10.2174/1381612054065738
Sun, C., Lee, J. S. H., & Zhang, M. Q. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(11), 1252-1265. doi:10.1016/j.addr.2008.03.018
Sun, Y., Chen, Z. L., Yang, X. X., Huang, P., Zhou, X. P., & Du, X. X. (2009). Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy. *Nanotechnology, 20*(13). doi:Artn 135102
Doi 10.1088/0957-4484/20/13/135102
Tadros, T. F. (2007). *Colloid stability and application in pharmacy*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.
Tadros, T. F. (2010). *Rheology of dispersions principles and applications* (pp. 1 online resource (xv, 199 p.)). Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527631568
http://dx.doi.org/10.1002/9783527631568
Tadros, T. F., & International Association of Colloid Scientists. (1988). *Polymers in colloid systems : adsorption, stability, and flow : proceedings of an international conference, Veldhoven, the Netherlands, 7-9 September 1987*. Amsterdam ; New York: Elsevier.
Van Olphen, H. (1977). *An introduction to clay colloid chemistry : for clay technologists, geologists, and soil scientists* (2d ed.). New York: Wiley.
Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., . . . Lewis, J. (1989). Superparamagnetic Iron-Oxide - Pharmacokinetics and Toxicity. *American Journal of Roentgenology, 152*(1), 167-173.
Winer, J. L., Liu, C. Y., & Apuzzo, M. L. J. (2012). The Use of Nanoparticles as Contrast Media in Neuroimaging: A Statement on Toxicity. *World Neurosurgery, 78*(6), 709-711. doi:10.1016/j.wneu.2011.08.013
Zhou, L. L., Yuan, J. Y., Yuan, W. Z., Sui, X. F., Wu, S. Z., Li, Z. L., & Shen, D. Z. (2009). Synthesis, characterization, and controllable drug release of pH-sensitive hybrid magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 321*(18), 2799-2804. doi:DOI 10.1016/j.jmmm.2009.04.020

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. SEVİM İŞÇİ TURUTOĞLU
Proje No:	214M595
Proje Başlığı:	Çok Fonksiyonlu Manyetik Nanoparçacıkların Kanser Tedavisinde Kullanıma Hazırlanması
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	FATMA NEŞE KÖK
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL TEKNİK Ü. FEN-EDEBİYAT F. FİZİK MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/03/2015 - 01/03/2016
Onaylanan Bütçe:	71000.0
Harcanan Bütçe:	66000.0
Öz:	Nanoteknoloji son zamanlarda ilaç endüstrisinde, hastalık görüntülemede, vücutta kontrollü ilaç salınımı ve ulaştırmada, doku mühendisliğinde, vs. kullanılmaya başlanılmıştır. Birçok farklı nano sistemlerden özellikle çok fonksiyonlu manyetik nanoparçacıklar (MNP) bu konuda çok ilgi çekmektedir. Yeni nesil tedavi yöntemlerinde sağlıklı hücrelere zarar vermeden ilaç ulaştırma, hedef kitleye tedavi için özellikle bu MNP kullanımları araştırılmaktadır. Kanser tedavisi için kullanılan kemoterapi yönteminin en büyük dezavantajı spesifik olmaması ve bütün vücuda zarar vermesidir. Bunun üstesinden gelebilmek için çok fonksiyonlu manyetik nanoparçacıklar kullanılabilinir. MNPler vücuda alındıktan sonra dışarıdan uygulanan manyetik alanlar ile vücutta istenilen hedef bölgeye toplanabilirler. Bu yöntem ile geleneksel kemoterapinin aksine sadece tümörlü hücrelere müdahale edilebilir. Proje kapsamında yaptığımız çalışmalarda MNP olarak kullandığımız demiroksit (Fe_3O_4) parçacıklarının üzerine literatürde henüz çalışılmamış olan HEK (hidroksiletil selüloz) polimerini , PVP (polivinilprolidon) polimerini ve nanokristaller olarak bilinen ağaç fiberlerinden üretilmiş olan polimeri kullanarak parçacıkların kolloidal özelliklerini takip ederek kararlı ve MNP parçacıklarının yüzeylerini tamamen kaplanmış numuneler elde edilmiştir. Sistemlerin akış özellikleri, zeta potansiyelleri ve parçacık boyutları bilgisi ile polimer konsantrasyonuna bağlı değişimlerini ve etkileşimlerini belirlenmiştir. Numunelerin geleneksel karakterizasyonları (SEM, XRD, FTIR, VSM, DSC, TGA) yapılmış ve kolloidal karakterizasyon sonuçları ile uyumu araştırılmıştır. Biyodemirlerin sitotoksisitesi canlı dışı (in-vitro) hücre deneyleri ile araştırılmıştır. Ayrıca biyodemirlere antitümör ajanları (DOX- doksorubisin) yüklenerek ve yine in-vitro sitotoksisite deneyleriyle kanserli hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, kullandığımız polimerlerin ve yöntemlerin ilaç ulaştırma ajanları olarak demiroksit parçacıklarını uygun hale getirildiğini, sağlıklı hücrelere yüzeyleri kaplanmış demiroksitlerin zarar vermediğini, anti kanser ilaçlarının demiroksitlere bu kaplamalar sayesinde yüklenebildiğini ve kanserli hücrelerin ölümüne sebep oldukları belirlenmiştir.
Anahtar Kelimeler:	Manyetik nanoparçacıklar, biyopolimerler, ilaç ulaştırma, kanser tedavisi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK