T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOUYUMLU MANYETİK DEMİR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE TERANOSTİK UYGULAMALARI

Muhammed GÜNGÖREN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
TEMMUZ 2021

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Muhammed GÜNGÖREN tarafından yapılan "Biyouyumlu Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Teranostik Uygulamaları" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL

Üye : Prof. Dr. Fırat AYDIN

Üye : Prof. Dr. Veysel TOLAN

Üye : Prof. Dr. Mustafa KARATEPE

Üye : Prof. Dr. Abdurrahman DÜNDAR

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 07/07/2021

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2021

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince tecrübelerinden faydalandığım, her aşamada beni destekleyen, süreci çok iyi bir şekilde planlayan, Biyokimya-Analitik Kimya alanlarında bilmediğim çok şeyi öğreten ve güler yüzlerini hiç esirgemeyen Danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL ve Sayın Prof. Dr. Ersin KILINÇ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Emekliliğine kadar Tez İzleme Komitesi üyesi olan, Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden emekli Sayın Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımda ve derslerimde çok kıymetli katkıları olan, Tez İzleme Komitesinde yardım ve hoşgörülerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Veysel TOLAN ve Sayın Prof. Dr Fırat AYDIN hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bana farklı bakış açıları kazandıran ve deneysel sürecin içinde önemli katkıları olan Harran Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. İsmail KOYUNCU'ya teşekkür ederim.

Hücre çalışmalarımızda önemli katkı ve yardımları olan Sayın Doç. Dr. Lokman VARIŞLI ve doktora arkadaşlarım Feysel ÇAKMAK ve Ahmet İsmail ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Projemize verdiği destekten ötürü Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine (FEN.19.010) ve doktoramı yapmam konusunda bana destek olan Mardin Artuklu Üniversitesi'ne, Mardin Artuklu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarının Müdürü olan Sayın Dr. Öğretim Üyesi Aziz KORKMAZ'a katkı ve ilgisinden dolayı çok teşekkür ederim.

Varlığı ve ilgisinin katkısı sonsuz olan, beni yalnız ve sevgisiz bırakmayan canım annem Bilsen GÜNGÖREN ve sevgili eşim Oya GÖKÜSTÜN GÜNGÖREN'e ve doğdukları andan itibaren mutluluk kaynağım olan küçük kuzularım Merve Melis GÜNGÖREN ile Defne GÜNGÖREN'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR……		I
İÇİNDEKİLER…….....		II
ÖZET…….....		V
ABSTRACT…….....		VI
ÇİZELGE LİSTESİ…….....		VII
ŞEKİL LİSTESİ…….....		VIII
KISALTMA VE SİMGELER……..		XI
1.	**GİRİŞ**…….....	1
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**……...	7
2.1.	Nanoteknoloji ve Nanopartiküller …….....	7
2.2.	Manyetizma ……..…….....	9
2.3.	Manyetik Nanopartiküller…….	12
2.3.1.	Süper Paramanyetik Demir Oksit Nanopartiküller (SPION)……	15
2.4.	Nanopartiküllerin Sentezlenmesi……..……...	17
2.4.1.	Birlikte Çökeltme……...……...	18
2.4.2.	Mikroemülsiyon Yöntemi…….	19
2.4.3.	Termal Ayrıştırma Yöntemi……..	19
2.4.4.	Sol-Jel Tekniği.…….	20
2.4.5.	Hidrotermal Reaksiyon……...……...	20
2.4.6.	Kimyasal Buharlaştırma……...…….	21
2.4.7.	Sonokimyasal Yöntem…….....	21
2.4.8.	Mikrodalga Destekli Sentez……..	21
2.5.	Manyetik Nanopartiküllerin Uygulama Alanları……..	21
2.5.1.	Manyetik Rezonans Görüntüleme…….	22
2.5.2.	İlaç Taşıma Sistemleri……...	24
2.5.3.	Magnetofeksiyonda Nanopartikül Kullanımı……	28
2.5.4.	Manyetik Hipertermi…….	28

2.6. Kanser…… 30
2.6.1. Prostat Kanseri…….. 34
2.6.1.1. Prostat Kanseri Epidemiyoloji……... 34
2.6.1.2. Prostat Kanseri Risk Faktörü……. 35
2.6.1.3. Prostat Bezi…… 36
2.6.2. Kanser Hastalığında Polimer Tedavisi…….. 38
2.6.3. Kanser Hücrelerinde Polimer – İlaç Konjugasyonu…….. 40
2.6.4. Kanser Hücrelerinde Misel Polimerik Nanopartikül Kullanımı…… 41
2.7. Sitotoksisite Testleri…….. 44
2.7.1. MTT Testi…….. 44
2.7.2. Apoptoz Testi…… 45
2.7.3. Hücre İçi ROS Üretimi Ölçümü…… 47
3. MATERYAL ve METOT……... 49
3.1. Materyal……..... 49
3.1.1. Alet ve Cihazlar……. 49
3.1.2. Reaktifler ve Kimyasallar…….. 50
3.2. Metotlar..……..... 51
3.2.1. Sentez Prosedürleri…… 51
3.2.1.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Sentezi……. 51
3.2.1.2. Sitrik Asit (CA) Kaplanması …… 52
3.2.1.3. Nanopartiküllerin Dipeptit ve Pluronik F127 ile Kaplanması……... 52
3.2.1.4. Docetaxel Bağlanması ……..... 55
3.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları……..... 56
3.2.2.1. X-Işını Kırınım Difraktometresi ile Karakterizasyon……..... 57
3.2.2.2. ICP-MS ile Karakterizasyon……. 57
3.2.2.3. Titreşimli Örnek Manyetometre ile Karakterizasyon…… 58
3.2.2.4. Zeta Potansiyel ……...……...……... 59
3.2.2.5. Mikroskopik Karakterizasyon…….. 59
3.2.3. Antimikrobiyal ve Antioksidan Çalışmaları…….. 60

3.2.4. Hücre Çalışmaları…….. 61
3.2.4.1. Hücre Kültürü Çalışması……... 61
3.2.4.2. Hücre Sayılarının Belirlenmesi…… 63
3.2.4.3. Hücrenin Yaşayabilirliği Testi…….. 64
3.2.4.4. Apoptoz Testi…… 65
3.2.4.5. Hücre İçi ROS Üretiminin Ölçümü……... 66
4. BULGULAR VE TARTIŞMA…… 67
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları…….. 67
4.1.1. X-Işını Kırınım Difraktometresi Analizi…… 67
4.1.2. ICP-MS Analizi……. 68
4.1.3. Titreşimli Örnek Manyetometre Sonuçları…… 69
4.1.4. Zeta Potansiyeli Analizi …..…… 70
4.1.5. Elektron Mikroskopu (SEM ve TEM) Analizleri……. 71
4.2. Antimikrobiyal ve Antioksidan Çalışmaları…….. 75
4.3. Hücre Çalışmaları…….. 77
4.3.1. Hücrenin Yaşayabilirliği…… 77
4.3.2. Apoptoz Testi…… 86
4.3.3. Hücre İçi ROS Üretimi……... 88
5. SONUÇ VE ÖNERİLER……..…….…..... 93
6. KAYNAKLAR……..…….…..... 97
ÖZGEÇMİŞ……..... 121

ÖZET

BİYOUYUMLU MANYETİK DEMİR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE TERANOSTİK UYGULAMALARI

DOKTORA TEZİ

Muhammed GÜNGÖREN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2021

Bu çalışmada, dünyada en fazla ölüme neden olan hastalığın, kanserin, tedavisine yönelik araştırmalara bir yenisi eklenmiştir. Docetaxel, dünya genelinde en çok can kaybı yaşanan kanser türlerinden olan prostat kanserinin tedavisinde önemli bir kemoterapötik ajandır. Ancak kemoterapötik ilaçların vücuttan hızlı elimine edilme, kanserli doku yanında sağlam dokulara da önemli zararlar verme, hidrofobik yapıda olma gibi bazı istenmeyen özellikleri vardır. Araştırmacılar, bu özelliklerden doğan olumsuzlukları minimize etmek için yıllardır uğraş vermektedir.

Çalışmamızda, Docetaxel'in eliminasyon süresini uzatma, tümörlü dokulara girişini artırarak sağlam dokuları koruma, manyetik alana tepki gösterme yeteneği katarak lokal uygulanabilme ve fonksiyonelleştirilerek terapötik etkisini iyileştirme adına yeni bir taşıyıcı sistem sentezlenmiştir.

Öncelikle nanopartiküle hedeflenebilme yeteneği kazandırma amacıyla bir Süper Paramanyetik Demir Oksit Nanopartikül (SPION) olan ɤ-Fe_2O_3 (Maghemit) sentezlenmiştir. Ardından fonksiyalize etme, agregasyon önleme ve stabilite için Sitrik Asit (CA) ile kaplanmıştır. Taşıyıcı sistem ile ilaç arasındaki etkileşim verimini artırmak için Leu-Gly dipeptiti bağlanan nanopartiküle son olarak amfifilik bir polimer olan Pluronik F127 eklenmiştir. Böylece manyetik hedeflenebilir, biyouyumlu-biyoparçalanabilir, amfifilik yapıya sahip, sağlam dokudan ziyade tümörlü dokuyu geçişi ve vücutta kalış süresi artmış, süper paramanyetik çekirdekli polimer misel yapıdaki taşıyıcı malzeme sentezlenmiştir.

Sentezlenen taşıyıcı XRD, ICP-MS, SEM, TEM ve VSM analizleri ile karakterize edilip yapı aydınlatılmıştır. Ardından nanopartiküle Docetaxel bağlanıp MTT, Apoptoz ve ROS ölçümü testleri ile sistemin terapötik uygunluğu araştırılmıştır.

Sonuçlar, sentezlenen nanopartikülün uygun dozlarda sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Docetaxel bağlanması sonucunda tümörlü hücrede sağlam hücreye göre canlılık, doza ve zamana bağlı şekilde, önemli düzeyde azalmıştır. Bu nedenlerle, sentezlenen nanopartikülün Docetaxel taşıma sistemi olmak için kullanışlı bir aday olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: SPION, Docetaxel, polimer miselleri, ilaç taşıma sistemi, prostat kanseri, MTT testi, Apoptoz, ROS üretimi

ABSTRACT

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION and THERANOSTIC APPLICATIONS of BIOCOMPATIBLE MAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES

PhD THESIS

Muhammed GÜNGÖREN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY of DICLE

2021

In this study, a new research has been added to the treatment of cancer, the disease that causes the most deaths in the world. Docetaxel is an important chemotherapeutic agent in the treatment of prostate cancer, which is the one of most deadly cancer types in the world. However, chemotherapeutic drugs have some undesirable properties such as rapid elimination from the body, causing significant damage to healthy tissues as well as cancerous tissue, and being hydrophobic. Researchers have been trying for years to minimize the negative effects of these features.

In our study, a new carrier system was synthesized for Docetaxel in order to extend the elimination time, to protect healthy tissues by increasing its entry into tumor tissues, to be applied locally by adding the ability to react to the magnetic field, and to improve its therapeutic effect by functionalization.

First, ɤ-Fe_2O_3 (Maghemit), a Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION), was synthesized so that the nanoparticle has the ability to be targeted to the desired tissue. It was then coated with Citric Acid (CA) for functionalization, aggregation prevention and stability. Afterwards, Leu-Gly dipeptide was attached to increase the interaction efficiency between the carrier system and the drug, and finally, Pluronic F127, an amphiphilic polymer, was added to the nanoparticle. Thus, a magnetically targetable, biocompatible-biodegradable polymer carrier material with an amphiphilic structure has been synthesized.

The synthesized carrier was characterized by XRD, ICP-MS, SEM, TEM and VSM analyzes and the structure was elucidated. Then, Docetaxel was bound to the nanoparticle and the therapeutic suitability of the system was investigated by MTT, Apoptosis and ROS measurement tests.

The results showed that the synthesized nanoparticle did not have a cytotoxic effect at appropriate doses and that the viability of the tumor cell was significantly reduced, depending on the dose and time, as a result of Docetaxel binding. For these reasons, it can be said that the synthesized nanoparticle is a useful candidate to be a Docetaxel transport system.

Keywords: SPION, Docetaxel, polymer micelles, drug delivery system, prostate cancer, MTT assay, Apoptosis, ROS generation

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	2020 yılı kanser hastalığı istatistik bilgiler	31
Çizelge 2.2.	Kanser bölgesine göre insidans, ölüm ve yaygınlık	32
Çizelge 2.3.	Yaşa göre standartlaştırılmış (Dünya) insidans ve ölüm oranları	33
Çizelge 2.4.	Dünya geneli prostat kanseri insidans ve ölüm değerleri	35
Çizelge 2.5.	Kanser tedavisi klinik safhadaki bazı misel nanopartiküller	42
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan cihazlar	49
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan kimyasallar	51
Çizelge 4.1.	ɤ-Fe_2O_3, ɤ-Fe_2O_3-CA, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartiküllerinin 50x300 kat seyreltme sonrasında ICP-MS sonuçları	69
Çizelge 4.2.	ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin DPPH süpürme aktivitesi tayini absorbans değerleri ortalaması	77
Çizelge 4.3.	PC3 hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 24. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri	78
Çizelge 4.4.	PC3 hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 48. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri	78
Çizelge 4.5.	PC3 hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 72. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri	79
Çizelge 4.6.	PNT1A hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 24. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri	79
Çizelge 4.7.	PNT1A hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 48. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri	80
Çizelge 4.8.	PNT1A hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 72. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri	80
Çizelge 4.9.	Apoptoz analizi sonuçlarının yüzdelik değerleri	86

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	Zeolit üzerindeki karbon nanotüpler ve uçlarındaki metalik parçacıkların taramalı elektron mikroskobu ile görselleştirilmesi	8
Şekil 2.2.	Manyetik kutupların momentleri	10
Şekil 2.3.	Ferromanyetik ve süpeparamanyetik nanoparçacıkların manyetik alanda ve manyetik alan yokluğundaki davranışları	12
Şekil 2.4.	Sistemik yolla uygulanan ilacın (solda) kan dolaşımı ile tüm vücuda yayılırken, spesifik uygulanan bir ilacın (sağda) hedeflenmiş bölgede kalması	14
Şekil 2.5.	Hematit, magnetit ve maghemitin kristal yapıları	16
Şekil 2.6.	Protonların manyetik alandaki (B_0) dönme ve dizilmeleri	23
Şekil 2.7.	PEG-SPION'ların (a1–a7) ve PEG/PEI-SPION'ların (b1–b7) intravenöz enjeksiyonundan önce ve sonra MR görüntüleri	24
Şekil 2.8.	Bazı nanopartikül ilaç taşıma sistemleri	25
Şekil 2.9.	Lipozom taşıyıcı sistem	26
Şekil 2.10.	Misel taşıyıcı sistem	27
Şekil 2.11.	Hidrojellerin temsili ve SEM görüntüleri	28
Şekil 2.12.	Fare kanser hücrelerinde 35 günlük uygulama sonucundaki farklılık	29
Şekil 2.13.	Normal ve kanser hücrelerinin bölünmesi	30
Şekil 2.14.	Anti-anjiyojenik ajanların tümör üzerine etkisi	34
Şekil 2.15.	Dünya geneli prostat kanseri insidansı	34
Şekil 2.16.	Normal ve benign prostatik hiperplazi	37
Şekil 2.17.	Normal ve kanserli prostat hücresinin gösterimi	37
Şekil 2.18.	Normal prostatın kanserli prostata ilerlemesi	38
Şekil 2.19.	Suda çözünen, yaygın kullanımlı polimerler	39
Şekil 2.20.	Polimer tedavi ediciler için EPR etkisi	39
Şekil 2.21.	Polimerik misel	42
Şekil 2.22.	Combretastatin-A4 ekli çiçek tipi triblok miseller ve hücre içselleştirilmesi	43
Şekil 2.23.	Misel oluşumu ile kombine ilaç salınımı	44
Şekil 3.1.	Maghemite önce sitrik asit sonrasında Leu/Gly dipeptiti bağlanması sonucu oluşan nanopartikülün muhtemel yapısı	53

Şekil 3.2. SPION-CA-Leu/Gly nanopartikülüne Pluronik F127 bağlanması sonucu oluşan nanopartikülün muhtemel yapısı 54

Şekil 3.3. Sentezlenen nanopartikülün muhtemel yapısı 55

Şekil 3.4. Sentezlenen nanopartiküllerin mıknatıs ile ayrılması ve toz halinde depolanması 56

Şekil 3.5. PC3 hücre hattının mikroskop merceğinden, harici Sony® IMX363 flagship sensor ile alınmış görüntüsü 62

Şekil 3.6. Neubauer sayım bölmesi detayı 63

Şekil 4.1. γ-Fe_2O_3 nanopartiküllerinin XRD desenleri 67

Şekil 4.2. ICP-MS cihazı Fe:56 standart kalibrasyon grafiği 68

Şekil 4.3. γ-Fe_2O_3 partiküllerinin manyetik histeresis döngüsü 70

Şekil 4.4. γ-Fe_2O_3'in SEM görüntüleri 72

Şekil 4.5. γ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 'nin SEM görüntüleri 73

Şekil 4.6. γ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin TEM görüntüsü 74

Şekil 4.7. a) *E.coli*, b) *S.aureus*, c) *P.aeruginosa*, d) *S.pyogenes* ve e) *C.albicans* bakterileri üzerinde kuyucuk uygulaması ile antimikrobiyal özellik gözlemlenmesi 75

Şekil 4.8. a) *E.coli,* b) *S.aureus,* c) *P.aeruginosa,* d) *S.pyogenes* ve e) *C.albicans* bakterileri üzerinde antimikrobiyal özellik gözlemlenmesi 76

Şekil 4.9. Farklı nanopartikül konsantrasyonlarında canlı hücre yüzdelerindeki değişim (24. saat) 81

Şekil 4.10. Farklı nanopartikül konsantrasyonlarında canlı hücre yüzdelerindeki değişim (48. saat) 81

Şekil 4.11. Farklı nanopartikül konsantrasyonlarında canlı hücre yüzdelerindeki değişim (72. saat) 82

Şekil 4.12. 48. saat morfoloji görüntüleri A) NP-PC3, B) NPD-PC3, C) NP-PNT1A, D) NPD- PNT1A 84

Şekil 4.13. 72. saat morfoloji görüntüleri A) NP-PC3, B) NPD-PC3, C) NP-PNT1A, D) NPD- PNT1A 85

Şekil 4.14. Flowsitometri sonuçları a) Negatif, b) 10 µg/mL NPD-PC3, c) 15 µg/mL NPD-PC3 86

Şekil 4.15. İnsan prostat kanser hücresinin (PC3) Annexin V-FITC ve PI kullanarak tespit edilmiş apoptotic yüzdelik değerleri karşılaştırması. 87

Şekil 4.16. 24. saatte acridine orange ile boyandıktan sonraki fluorecent görüntüleri. A) Kontrol, B) 10 µg/mL NPD-PC3, C) 15 µg/mL NPD-PC3 87

Şekil 4.17. ROS üretimi analizi sonuçları, A01: Negatif, A02: 10 µg/mL NPD-PC3, A03: 15 µg/mL NPD-PC3 88

KISALTMA VE SİMGELER

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AKM	: Atomik kuvvet mikroskobu
ATP	: Adenozin trifosfat
BPH	: Benign prostat hiperplazisi
CA	: Sitrik asit
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 1,1-difenil–2-pikrilhidrazil
Dtxl	: Docetaxel
EDTA	: Etilen diamin tetra asetikasit
EL4	: Fare lenfoma tümör hücresi
EMS	: Electron microscopy Sciences
EPR	: Arttırılmış geçiş ve alıkonma
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Amerika gıda ve ilaç idaresi
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
FT-IR	: Fourier transform - infrared
G-CSF	: Granulocyte-colony stimulating factor
HPMA	: Hidroksipropil metakrilat
IBM	: International Business Machines
IC50	: Tümör hücresi proliferasyonunu %50 inhibe etmek için gerekli derişim
ICP-MS	: İndüktif eşleşmiş plazma–Kütle spektrometresi
ION	: Demir oksit nanopartiküller
IR	: Kızılötesi
Leu-Gly	: Lözin-Glisin dipeptiti
LEV	: Levulik asit
LNCaP	: Prostat kanseri hücresi
MCF7	: Meme kanseri hücresi
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme

MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NA : Nutrient agar
NB : Nutrient broth
NdFeB : Neodimyum mıknatıs
NP : Nanopartikül
NPD : Docetaxel bağlanmış nanopartikül
OD : Optik yoğunluk
PBS : Fosfat tamponu
PC3 : İnsan kanserli prostat hücresi
PEG : Poli etilenglikol
PEI : Polietilenimin
PGA : Poly(glycolic acid)
PI : Propidium iyodür
PLA : Polilaktik asit
PLGA : Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)
PNT1A : İnsan normal prostat hücresi
PSA : Prostat spesifik antijen
PSMA : Prostat spesifik membran antijen
RF : Radyo frekansı
ROS : Reaktif oksijen türleri
SAR : Spesifik absorpsiyon oranı
SEM : Taramalı elektron mikroskobu
SPION : Süper paramanyetik demiroksit nanopartikül
TEM : Geçirimli elektron mikroskobu
TİM : Tarayıcı iğne mikroskobu
TNF : Tümör nekroz faktörü
TTM : Taramalı tünelleme mikroskobu
UV : Ultraviyole
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VSM : Titreşimli örnek manyetometresi
WHO : Dünya sağlık örgütü
XRD : X- ışınları toz kırınımı yöntemi

1. GİRİŞ

Nanobilim, ilk kez 1965 yılında Nobel Fizik Ödülü'nü kazanan Richard Feynman tarafından 1959 yılında öne çıkarılmış bir kavramdır. Bu tarih nanoteknoloji için başlangıç noktası olarak değerlendirilir. Feynman bu tarihlerde, molekül ve atomun kontrolünün sağlanacağını ve bunun için yeni materyallere ihtiyaç olduğunu söylemiştir. Nanoteknoloji terimi, ilk olarak 1974'te bir bilim insanı olan Norio Taniguchi'nin 'Nanoteknolojinin Temel Kavramı Üzerine' isimli yazısında yer almıştır.

Heinrich Rohrer ve Gerd K. Binning, 1981 yılında Taramalı Tünellemeli Mikroskobu buluşları sayesinde, atom boyutlarında görüntü alınabilmesini sağlamışlar ve bu buluşları ile Nobel Fizik Ödülü almışlardır. 1985 yılında 'bucky ball' adı verilen ve yuvarlak bir topa benzeyen, 60 karbondan meydana gelmiş yeni bir form bulunmuştur.

Moleküler yapıdaki nanoteknoloji hakkındaki düşünceler 1986 yılında Drexler ile gündemdeki yerini artırmıştır. Dr. Drexler 'Yaratılış motorları: Nanoteknolojinin yaklaşan çağı' adındaki kitabıyla nanoteknolojiyi daha iyi açıklamayı başarmıştır. Drexler, kitabında biyolojik sistemlerden faydalanarak nano ölçekte makineler yapılabileceğini söylemiştir. Yine aynı yıl içerisinde Gerd Binnig, Calvin Forrest Quate ve Christoph Gerber Atomik Kuvvet Mikroskopunu icat etmiş ve nanoteknoloji alanında önemli ilerlemelerin önünü açmıştır. 1989'da D. Eigler ve E. Schweizer IBM (International Business Machines) firmasının logosunu, bir noktanın 350 milyonda biri kadar alan içerisine, 35 tane Xenon atomu kullanarak yapmıştır. Japon bilim insanı Sumino Iijima 1991 yılında karbon nanotüp olarak adlandırdığı materyalleri keşfetmiştir ve çalışmaları sayesinde 2002 yılında, Fizikte Benjamin Franklin Madalyası ile ödüllendirilmiştir.

Başlangıcı 63 yılı bulan bu teknoloji, son 20 yıl içerisinde oldukça büyük önem kazanmış ve çok önemli araştırmalara konu olmuştur. Nanoteknoloji, sağlık, bilim, mühendislik, teknoloji ve endüstri gibi sayısız alanda çok büyük ölçekte ilerleme sağlamıştır. Kuşkusuz bu alanlardan en önemlisi sağlıktır ve yıllardır büyük araştırmalara konu olmaktadır.

Nanopartiküller, en çok araştırıldıkları alanlardan biri olan sağlık alanında, birçok hastalığın tanı ve tedavisi için yaygın düzeyde kullanılan materyallerdir. Hali hazırda sıkça karşılaşılan teranöstik (teşhis ve tedavi) uygulamaları yanında yeni uygulamalar ve araştırmalar ile umut verici ilerlemeler kaydedilmektedir.

Nanopartikülleri sentezlemek için fiziksel, sıvı fazlı kimyasal ve mikrobiyal yöntemler uzun yıllardır uygulanmaktadır. Sıvı faz kimyasal yöntemler olarak sınıflandırılan birlikte çökeltme, termal ayrışma, mikroemülsiyon ve hidrotermal yöntemler, boyut ve yüzey özellikleri üzerinde daha iyi kontrol nedeniyle sentez için sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu için ise genellikle Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), X-Işınları Toz Kırınımı Yöntemi (XRD), Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR), Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM), İndüktif Eşleşmiş Plazma–Kütle Spektrometre (ICP-MS), Zeta Potansiyel-Zetasizer, Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) tekniklerinden faydalanılır. Nanopartiküller için daha çok elektronik, kimya ve mühendislik dallarında kullanılan tek boyutlu ince film halindeki nanopartiküller; fiziksel, mekanik ve elektriksel avantajları için sıklıkla tercih edilen iki boyutlu nanopartiküller; fulleren, dendrimer ve quantum dot olarak adlandırılan 3 boyutlu yapısal sınıflandırmalar yapılmaktadır (Wiener ve ark. 1994, Tomalia 2004).

Dendrimerler, yapısal kontrolü sağlanabilen ve ilaç taşımada ideal, yüzeyleri farklı moleküllerle fonksiyonalize edilmiş polimerik nanopartiküllerdir (Wiener ve ark. 1994). Bu polimerik nanoyapılar aynı zamanda metalik nanopartiküllerle beraber kullanım açısından elverişli yapılardır (Fu ve ark. 2007). Dendrimerler, DNA gibi organik yapılarla biyouyumludurlar ve bu sayede sağlık alanında kullanışlı materyallerdir. Antikanser, antimikrobiyal, antiviral ve steroid olmayan antiinflamatuvar içeren dendrimerler farmasötik alanda önemli ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Cheng ve ark. 2008).

Süper paramanyetik demiroksit nanopartiküller (SPIONs), dışarıdan uygulanan manyetik alan sayesinde hedefe yönlendirilmesi kontrol edilebilir malzemelerdir. Polimerler ile kaplanarak biyouyumlu ve biyoparçalanır nanopartiküller oluştururlar. Nanopartikül dış yüzeylerinin polimerlerle kaplanması sayesinde hidrofilik dış kabuk ve hidrofobik iç kısım meydana gelir. Bu sayede antikanser ilaçlar hidrofobik kısma bağlanabilir.

Anti kanser ajan olarak kullanılan birçok ilaç hidrofobik yapıdadır. Bu özellik ilacın etki alanını ve süresini kısıtlamaktadır. Taxel grubu ilaçlar (Docetaxel, Paklitaxel, Cabazitaxel vb.) ve Doxorubicin gibi antikanser ajanlar ileri düzey katı tümörler, prostat, göğüs, akciğer, rahim ağzı, baş ve boyun gibi kanser tümörleri üzerine etkili olmalarına rağmen yarı ömürleri oldukça kısadır. Hidrofobik yapıdaki bu ilaçların, polimer

nanopartikülünün hidrofobik iç kısmına, polimerik, dipeptit, oligopeptit veya polimerik zayıf asidik özellikli maddelerin de yardımıyla bağlanması sağlanarak ilaç salınımında daha iyi seviyelere gelinmiştir. Arttırılmış geçiş ve alıkonma (EPR) etkisiyle, ilacın tümör hücresi içerisinde daha uzun süre kalması sağlanır. Miseller çekirdek yapıları sayesinde hidrofobik ilaç taşınması adına, bu ilaçların kana geçen yüzdelerini yüksek tutmaktadırlar (Saman ve Iqbal 2012). PEG (poli etilenglikol)-adenozin deaminaz, Poli-HPMA doxorubicin, Linear PEG-interferon a2b, PEG–büyüme hormonu reseptörü antagonisti, PEG–G-CSF (Granülosit-koloni uyarıcı faktör), dallanmış PEG–anti-VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) aptameri, PEG–anti-TNF (Tümör nekroz faktörü), PEG-naloxol, PEG-irinotecan, PEG-docetaxel, PEG-asparajinaz, Fleximer camptothecin, karboksimetil dekstran, siklodekstrin kampotesin, poliglutamik asit-paclitaxel, poliglutamik asit camptothecin gibi ilaçlar; akciğer, göğüs, kolon, kalın bağırsak, ovül, mide kanserleri ve katı tümör üzerinde ticari olarak kullanılmakta veya faz çalışmaları yapılmaktadır (Rohini ve ark. 2013, Pang ve ark. 2013).

Kanser, kısaca hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ve farklı bölgelere yayılma özelliği ile neoplaziyi devam ettirmesidir. Kanser, uzun yıllardır dünya genelinde en fazla can kaybı yaşanmasına neden olan hastalıklar grubudur. Sadece 2020 yılında dünya genelinde kadın ve erkeklerde toplam 19 292 789 yeni vaka tahmin edilmiştir. Bu vakaların içerisinde göğüs kanseri 2 261 419 kişiyle birinci, akciğer kanseri 2 206 771 kişiyle ikinci, prostat kanseri 1 414 259 kişiyle üçüncü sırada yer almaktadır. Dünya geneli için insidansı 30.7 olan prostat kanseri Türkiye'de de dünyada olduğu gibi üçüncü sıradadır ve 2020 yılında yeni prostat vaka sayısı tahmini 19 444 kişi, ölüm sayısı ise tahmini 5 464 kişi olarak bildirilmiştir (Globocan 2020).

Yaş ve genetik özelliklerle üst derecede bağlantılı olan prostat kanseri, ileri yaştaki erkeklerde gençlere göre, siyah ırkta beyaz ırka göre, Avrupalılar ve Amerikalılarda Asyalılara göre daha yaygın görülmektedir (Grönberg 2003, Delongchamps ve ark. 2006).

Prostat kanserinin başlangıç noktası ve kaynağı prostat bezidir. Tümör, prostat bezini tamamen kapladıktan sonra, üretra, rektum, mesane, kalça gibi yakın bölgelere metastaz gerçekleştirir. Aynı anda birden fazla bölgede görülebilen, aniden ivme kazanabilen ve tedavi edilmezse ölümcül olabilen bu hastalık dünyadaki erkeklerin büyük bölümü için önemli bir sorundur (Testa ve ark. 2019).

Prostat kanserinin tedavi edilmesi için, FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından da onaylanmış ilaç taşıyıcı sistemde yer alan süper paramanyetik demiroksit nanopartikülleri bulunmaktadır (Ventola 2017). Nanopartiküllerin verimliliğini artırmak için biyouyumlu-biyoparçalanabilir amfifilik blok kopolimerler kullanılarak tümör hücrelerine geçiş artırılmakta ve hidrofobik ilaçların taşınması kolaylaştırılmaktadır (Xu ve ark. 2012).

İlaç taşıyıcı nanopartiküller in vitro ve in vivo çalışmalara sıklıkla konu olmuştur. Deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalara ek olarak hücre ve doku kesitleri üzerinde de nanopartiküllerin ya da oluşturulan ilaç taşıma sisteminin etkinliği araştırılmıştır. Hücre çalışmalarında, sentezlenmiş malzemenin sitotoksik özelliklerinin araştırılması için Hücrenin Yaşayabilirliği Testi (MTT testi) etkili, doğru ve yaygın kullanılan bir spektrofotometrik yöntemdir. Hücrenin yaşayabilirliği testi, kullanılan malzemenin sitotoksik olup olmadığını veya hangi dozlarda sitotoksik özellik gösterebileceğini belirlemeye yarayan kantitatif bir testtir. Ayrıca, ilaç taşıma sistemlerinin canlı hücreler üzerindeki etkinliğini ölçmek için Apoptoz ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimi testleri de kullanılan analizlerdir. Apoptoz testi ile malzemenin kontrollü hücre ölümü üzerindeki etkisi ölçülür. Genel bir ifadeyle apoptoz, hücrelerin kendini yok ettiği, gen kontrollü, enerji kullanan ve organizmadaki dengeleri bozmayan doğal bir olaydır. ROS testi ile hücre içindeki reaktif oksijen türü oluşumundaki artış tespit edilir. Hücre içinde ROS üretimi, DNA üzerinde etkilidir ve 20'den fazla mutasyona uğramış baz meydana gelmesine neden olur. Bu bazlardan, hasar sonucu oluşan, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) hücre içi ROS oluşumu tespitinde oldukça sık kullanılır.

Bu çalışmada, biyouyumluluğu artırmak ve fonksiyalizasyon amaçlı sitrik asit ile kaplanmış, Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzları kullanarak süper paramanyetik demiroksit nanopartikülleri sentezlendi. Sentezde birlikte çöktürme yöntemi kullanıldı. Daha sonra sentezlenmiş sitrik asit kaplı Süper Paramanyetik Demir Oksit Nanopartiküller (SPION), ilaç bağlama kapasitesini artırma odaklı Leu-Gly dipeptiti ile kaplanarak daha kararlı nanopartiküller elde edildi. Son olarak Pluronic F127 ile kaplanarak sentezlenen nano malzeme, ilaç taşınması ve ilaç salınımına hazır hale getirildi. Elde edilen bu nanopartikülün antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri de test edilmiştir.

İlaç olarak taxel grubu yarı sentetik bir antikanser ajan olan ve prostat, yumurtalık, göğüs, akciğer, baş, boyun ve mide kanserlerinde kullanılan Docetaxel tercih edildi. Docetaxel hem Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı kullanımda olan polimerik nanopartikül ilaçlarda hem de klinik safhadaki polimerik nanopartikül ilaçlarda yer almış bir onkolojik ilaçtır. Her safhada sentezlenmiş malzemenin gerekli karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Elde edilen ilaç taşıma sistemi ile insan kanserli prostat hücresi (PC3) ve insan normal prostat hücresi (PNT1A) üzerinde MTT, Apoptoz ve ROS ölçümleri yapıldı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nano sözcüğü ilk olarak Yunancada "cüce" anlamında kullanılmıştır. Bu sözcük günümüzde, herhangi bir ölçü biriminin önüne eklendiğinde milyarda bir anlamını katmaktadır. Örneğin; 1 nanometre (nm) metrenin milyarda biri (10^{-9} metre) anlamına gelmekte ve sadece birkaç küçük atomun yan yana dizilmesiyle oluşan bir uzunluğu ifade etmektedir. Bir insan saç telinin çapının yaklaşık 10^5 nm boyutunda olması verilebilecek daha somut bir örnektir (Whitesides 2003).

En az bir boyutta 100 nm' ye kadar uzunluğa sahip materyaller Nanoteknoloji' nin konusu dahilindedir. Nanoteknoloji, bu yapıların sentezlenmesi, karakterize edilmesi, atomların farklı sıralanması sonucunda meydana gelen nanoyapıların dizaynı ve farklılaşan özelliklerden ileri gelen avantajları inceleyen bir teknolojidir. Bu teknoloji sayesinde oluşan nanoyapıların uygulamaları da Nanoteknoloji' nin araştırma konusudur (Emerich ve Thanos 2003).

Yıllar içerisinde Nanoteknoloji ile ilgili çok sayıda önemli gelişme meydana gelmiştir. Bunlar arasında en önemlilerinden biri kuşkusuz Taramalı Tünelleme Mikroskopu'nun icadı olmuştur. 1981 yılında icat edilen bu mikroskop, partikülleri atomik boyutlarda gözlemlemeye ve bu sayede üst düzey bir madde kontrolüne kapı açmıştır. Ardından mikroskobik inceleme alanındaki ilerlemeler ile kullanıma giren diğer araçlar (Atomik kuvvet mikroskopu, SEM, TEM gibi) atom boyutlarındaki çalışmaların kimya disiplininden mühendisliğe bağlantı kurmasını sağlamıştır. Bu araçlar sayesinde çok küçük ölçeklerde gözlemler yapılabilmekte, tanecik boyutunda madde etkileşimleri incelenebilmekte ve bu boyutlarda taneciklere müdahale edilerek kontrol sağlanabilmektedir.

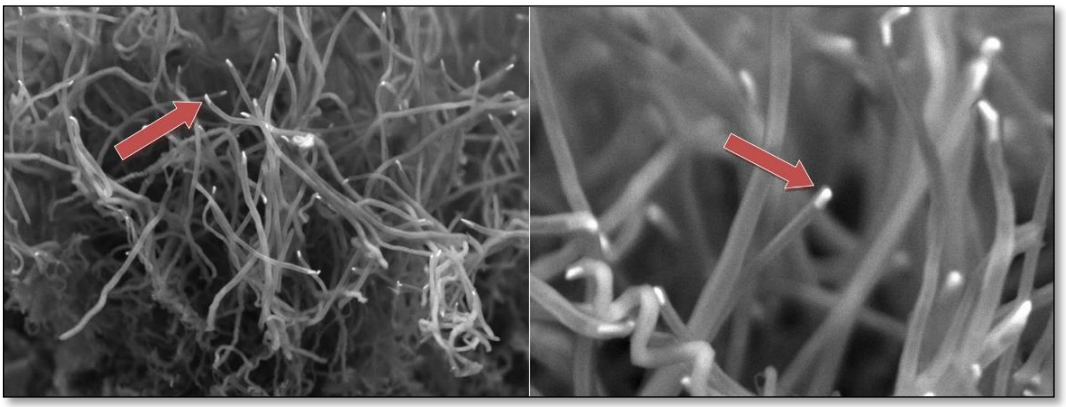
Nanoteknoloji alanında gerçekleşen bir başka önemli sıçrayış 1985'te Fullerenler'in keşfedilmesi ile olmuştur. Karbon atomlarının bir araya getirilmesi ile oluşturulan bu yapı 'Buckyball' ismini almıştır. Bundan altı yıl sonra futbol topu biçimindeki fullerenler üzerindeki çalışmalar, nanoteknoloji alanına grafit tabakalardan oluşan silindire benzer bir görünümle karbon nanotüpleri kazandırmıştır.

Atomların nanoboyutlarda dizilmeleri, makro boyutlardaki dizilimlerinden çok daha farklı özellikler sergilemektedir. Örneğin; manyetik özellikleri, iletkenlikleri, optik ve kimyasal özellikleri klasik anlamdan daha çok kuantum anlamda değerlendirilmektedir. Bu bağlamda atomların dizilimleri önemli bir değer sahiplenmektedir. Nanoteknoloji atomların düzenlenmesine müdahale edebilmeyi ve böylece endüstriyel, teknolojik vb. birçok alanda üst düzey ürünler oluştururken aynı zamanda doğa dostu olmayı başarabilecek bir teknolojidir (Özdoğan ve ark. 2006).

Nanoteknoloji sayesinde elde edilen nanoyapılar, gösterdikleri olağandışı davranışlar sayesinde yüksek aktivite gösteren kimyasal ajanların, dayanıklılık artırıcı katkı maddelerinin, ilaç taşımada rol oynayan taneciklerin, hem teşhis hem de tedavi edici farmakolojik ürün ve teknolojilerin ortaya konmasına katkıda bulunmuştur. Nanoboyutlara sahip ve kontrol edilebilen taşıyıcı aygıtlar tıp ve teknoloji alanında önemli araçların geliştirilmesini sağlamaktadır. Ayrıca nanoboyutlarda çalışılabilmenin, ürünlerin ekonomik bir şekilde elde edilmesine etkisi yüksektir.

Nanopartiküllerin yapılarına ve öne çıkan özelliklerine göre sınıflandırmalar yapılabilmektedir. Bu sınıflandırmalardan en sık kullanılanları karbon temelli nanopartiküller, metal nanopartiküller, polimer nanopartiküller, zeolit ve manyetik nanopartiküllerdir (Chen ve ark. 2008, Kadlečíková ve ark. 2021).

Karbon temelli nanopartiküller, tek ve çok duvarlı (single wall - multi wall) karbon nanotüpler olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. Bu malzemeler nanotüp olarak da adlandırılır ve silindirik bir yapıya sahiptirler (Şekil 2.1.) (Ihsanullah ve ark. 2015, Kadlečíková ve ark. 2021).



Şekil 2.1. Zeolit üzerindeki karbon nanotüpleri ve uçlarındaki metalik parçacıkların taramalı elektron mikroskobu ile görselleştirilmesi (Kadlečíková ve ark. 2021)

Karbon temelli nanopartiküller, bakterilerin hücre zarını tahrip ettikleri ve oksidasyona neden oldukları için antimikrobiyal özelliktedirler. Antimikrobiyal olarak kullanıldıklarında klasik dezenfeksiyon yöntemlerine göre (klorlama, ozonlama vb.) zehirleyici yan etkilerinin olmaması tercih edilmelerinin avantajlarından biridir (Liu ve ark. 2013).

Polimer yapıdaki nanopartiküller, ilaç salımı, protein salımı gibi medikal uygulamalarda kullanılmaları yanında organik maddeler ve ağır metallerin uzaklaştırılmasında da rol oynarlar (Chen ve ark. 2008, Gehrke ve Somborn-Schulz 2015).

Metal temelli nanoyapıların, iletkenlik, fotokatalitik özellik ve adsorpsiyon gibi kabiliyetleri ön plana çıkmaktadır. Alüminyum, çinko, demir, titanyum, magnezyum, altın metallerinin oksitleri araştırmalara sıkça konu olan nanopartiküllerdir. Özellikle demir elementinin oksit bileşikleri, manyetik özelliğe de sahip oldukları için bu alandaki çalışmalarda önemli bir nanomateryal olmuştur (Suanon ve ark. 2016).

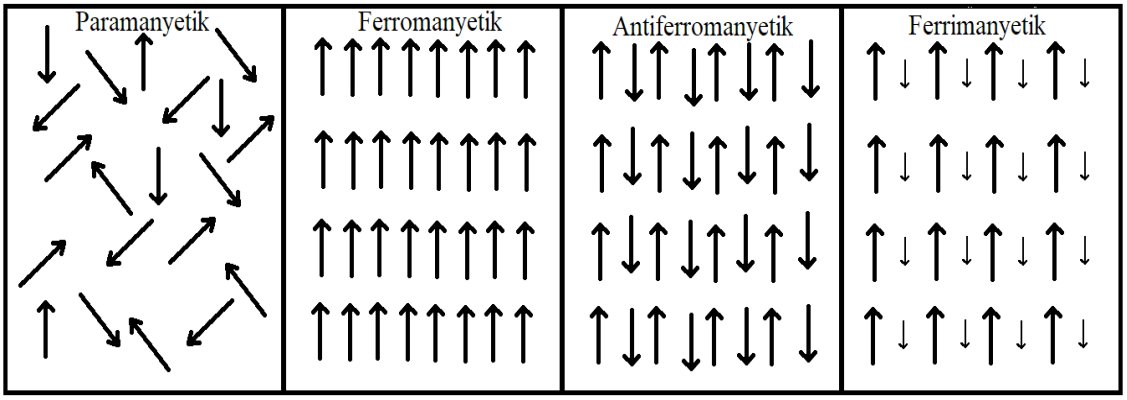
2.2. Manyetizma

Manyetizma, elektrik yüklerinin hareketi sonucunda meydana gelmektedir. Tüm malzemeler sahip oldukları atomik yapılarına ve sıcaklıklarına bağlı olarak manyetik özellik gösterirler (Marghussian 2015). Teknolojik olarak önemli ferromanyetik ve ferrimanyetik metaryallerin uygulamaları ve özellikleri onların manyetik mikro yapıları, manyetizasyon prosesleri, manyetik anizotropileri, şekil ve boyuta bağlı etkileri tarafından kontrol edilir.

Manyetizmanın farklı tiplerini tanımlamanın en iyi yolu manyetik alanda metaryallerin nasıl davrandıklarının tanımlanmasıdır. Aslında bütün maddelerin manyetik özelliğe sahip olması söz konusudur. Ancak maddelerin manyetik özellikleri ve kuvvetleri birbirinden farklıdır. Maddelerin manyetik tutumları için farklı sınıflandırmalar yapılmaktadır. Diamanyetizma, Paramanyetizma, Ferrimanyetizma Antiferromanyetizma, Ferromanyetizma şeklindeki sınıflandırma en yaygın kullanılanlarıdır (Clemons ve ark. 2019).

İlk iki grup malzemeler manyetik olarak düzenli değildir. Son üç gruptaki malzemeler ise belli bir kritik sıcaklığın altında uzun menzilli manyetik dizilim gösterirler.

Genel olarak, manyetik malzemeler multimanyetik alan yapısına sahiptir (Clemons ve ark. 2019). Bununla birlikte, nano boyuta indirgendiklerinde, paramanyetizma gösterebilirler. Etki alanları ve indüklenen manyetik momentlerin yönelimi Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Manyetik kutupların momentleri

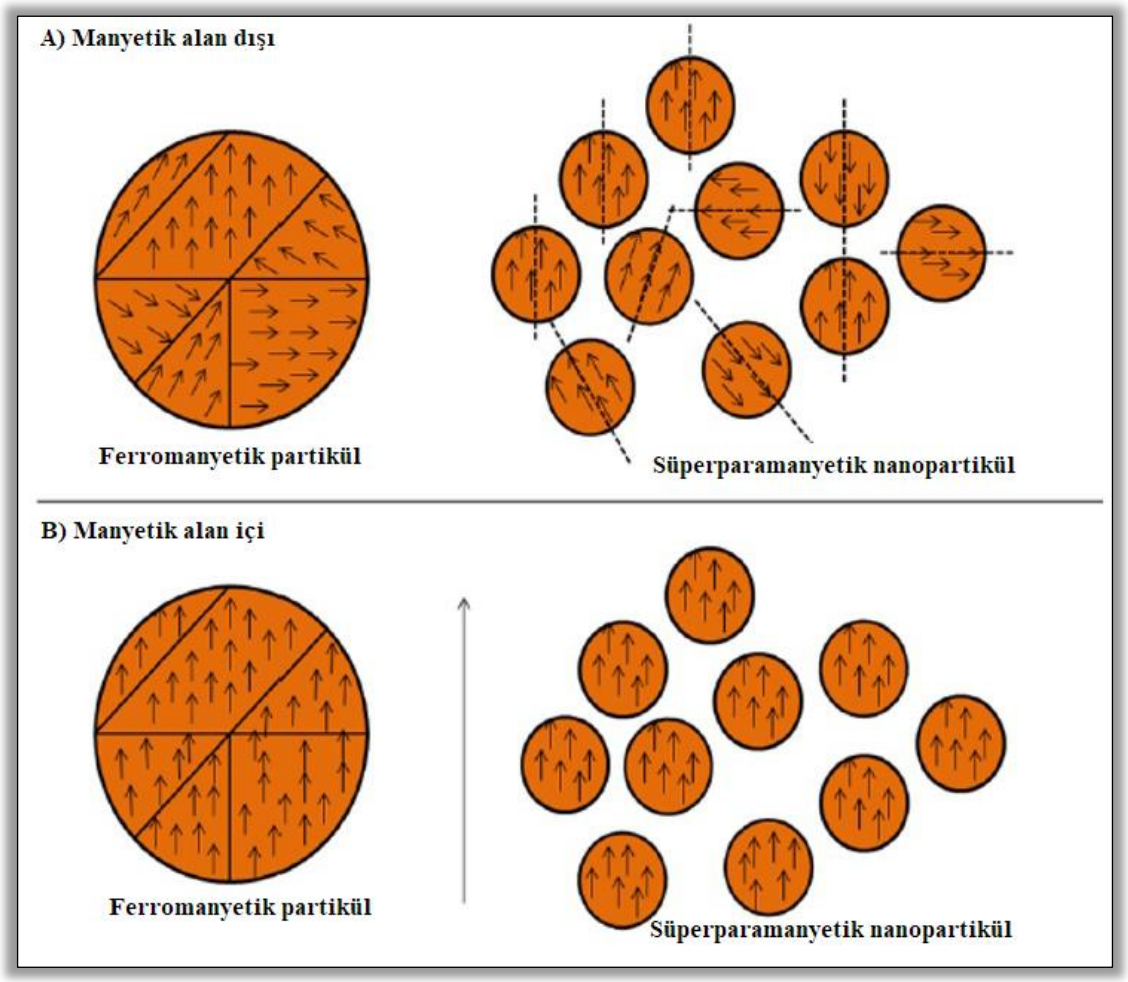
Diyamanyetizma, çok zayıf bir manyetizma durumudur. Net manyetik dipol momentleri yoktur. Diyamanyetik malzemelerin bağıl geçirgenlik değerleri 1'den küçük olup negatif manyetik duyarlılığa sahiptirler. Süperiletken malzemeler, uygun sıcaklık koşullarında üstün bir diyamanyetizma biçimine sahiptir. Diyamanyetizmanın kaynağı elektronların yörüngesel hareketidir. Bakır, kurşun, bizmut, karbon, gümüş, civa gibi malzemeler diyamanyetiktir. Bu maddelerin manyetik özelliklerinin mıknatıslanmanın zıttı olduğu söylenebilir (Palagummi ve Yuan 2016).

Paramanyetik özellik gösteren maddelerdeki taneciklerin bir kısmının orbitallerindeki elektron boşluğu nedeniyle sahip oldukları bir manyetik moment vardır. Fakat bu manyetik momentler örgü içerisinde rastgele yönlenmiştir. Bireysel manyetik momentler, manyetik olarak etkileşim içinde değildir. Dışarıdan herhangi bir manyetik alan uygulanmadığı zaman, manyetizasyon sıfırdır. Manyetik alan içerisine girdiklerinde ise maruz kaldıkları manyetik alana uyumlu şekilde dizilirler. Bu dizilim uygulanan alana paralel şekildedir ve sonuç olarak aynı yöne oluşan moment, mıknatıslanmanın meydana gelmesini sağlar (Kotnala ve Shah 2015).

Ferromanyetik malzemeler bir dış alan olmaksızın, mıknatıslanma gösterirler. Malzeme içerisinde manyetik momentler aynı yönde ve birbirine paralel düzenlenirler. Dışarıdan uygulanan manyetik etki çok düşük seviyede olsa dahi uygulanan alana paralel

bir doğrultuda yönelme gerçekleşir. Ayrıca içinde bulundukları manyetik alan sayesinde daha düzenli bir hal alırlar ve mıknatıslanma özelliklerini de artırırlar (Şekil 2.3.). Uygulanan manyetik alan şiddeti artırıldığında manyetik özellikte artar ancak tüm atomlar düzenlendikten sonra doyum mıknatıslanması söz konusu olur ve manyetik kuvvet sabitlenir (Glover 2015).

Nano boyutlu ferromanyetik malzemeler süperparamanyetizma gösterebilir. Ferromanyetik özellik gösteren maddelerin kritik bir sıcaklığın altında manyetik özellikleri değişir. Yalnızca sıcaklık nedeniyle mıknatıslanma yönü rastgele değişebilir. Bu sırada malzemenin paramanyetik görünmesi söz konusu olur. Bu özel duruma süperparamanyetizma denir. Dış manyetik alan uygulandığında, bu malzemelerin manyetik duyarlılığı paramanyetik malzemelerden çok daha yüksektir (Mayo-Smith ve ark. 1996). Süperparamanyetizmaya sahip maddeler bazı şartlar altında ferromanyetik özellik gösterirken farklı şartlar altında paramanyetik özellik gösterir (Şekil 2.3.). Maghemit (γ-Fe_2O_3) için örnek vermek gerekirse; tanecik büyüklüğünün 20 nm'den daha düşük olması söz konusu iken süperparamanyetik özellik gösterir, tanecik büyüklüğünün 20 nm'den büyük olması durumunda ise ferromanyetik özellik gösterir. Bir malzemeyi süperparamanyetik olarak adlandırabilmek için, koersivite (manyetik alan kalıcılığı) sıfır olmalıdır.



Şekil 2.3. Ferromanyetik ve süpeparamanyetik nanoparçacıkların manyetik alanda ve manyetik alan yokluğundaki davranışları (Demas ve Lowery 2011)

2.3. Manyetik Nanopartiküller

Genel olarak manyetik nanopartiküller, metal oksitler ve metal alaşımları şeklindedir. Demir içeren manyetik bileşikler, manyetik doygunluklarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartikül sentezinin doğası gereği, bu nanopartiküllerin manyetik özellikleri sentezlenen boyutlara göre değişir. Böylelikle boyutları ve şekilleri sentezleme yollarıyla kolaylıkla kontrol edilebilir. Birlikte çökeltme, solvo-termal, miseller ve termal ayrışma gibi teknikler sentez yöntemleri olarak kullanılır. Bu teknikler manyetik özellikleri değiştirir ve küçük partikül boyutlarını elde etmek mümkündür (Reiss ve Hütten 2005, Iida ve ark. 2006, Mishra ve ark. 2014, Campos ve ark. 2015). Düşük ölçekteki nanopartiküllerin manyetik özellikleri önemli ölçüde daha baskındır ve

bu özellik parçacığı daha eşsiz ve kullanışlı kılar (Priyadarshana ve ark. 2015, Faivre ve Bennet 2016).

Manyetik nanoparçacıklar biyomedikal yöntemlerde, tıbbi alanlarda önemli bir rol oynamaktadır. Bu sayede araştırmacılar arasında popüler bir kaynak haline gelmiştir (Priyadarshana ve ark., 2015).

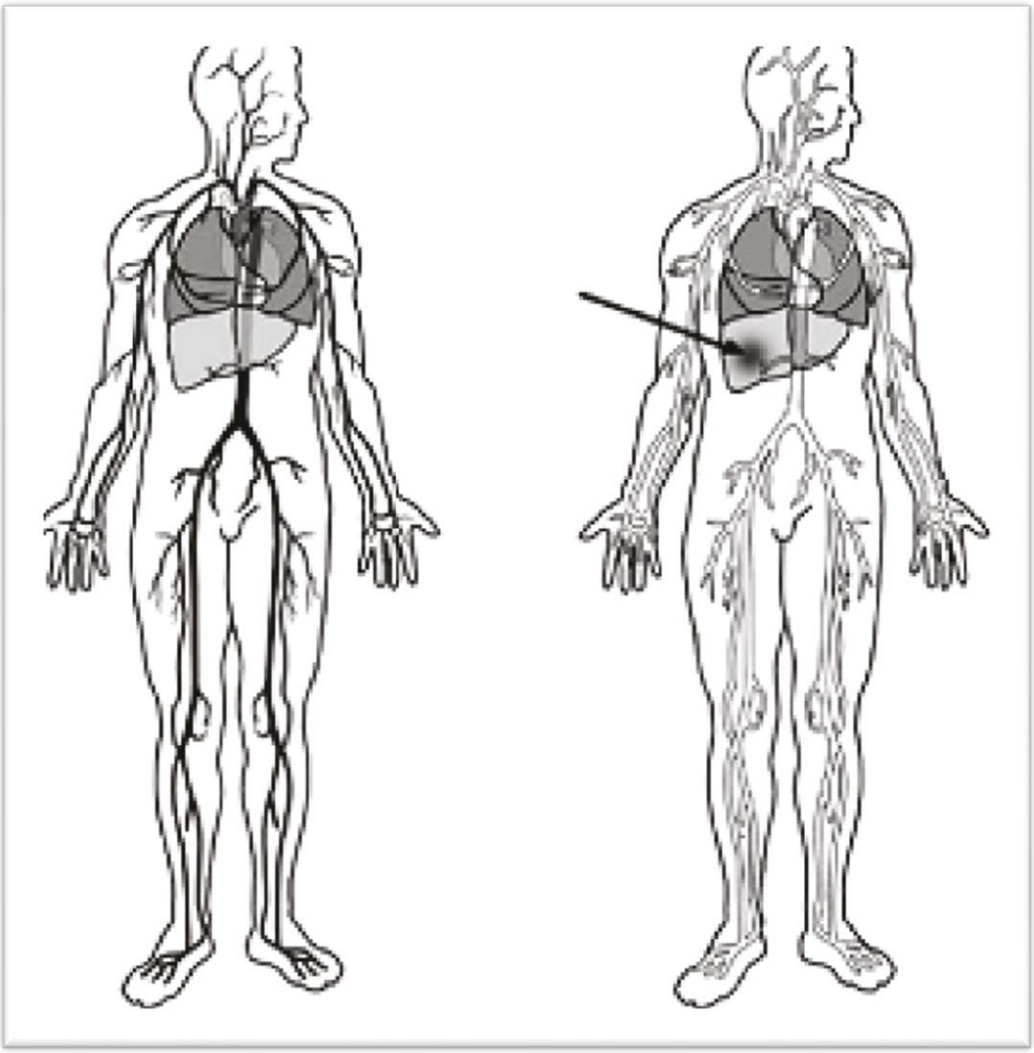
Manyetik nanopartiküller, kullanılmakta olan klinik tanı ve tedavi yöntemlerinde bir devrim oluşturma potansiyeline sahip önemli bir nanomateryal sınıfıdır. Eşsiz fiziksel özellikleri ile biyolojik etkileşimlerin hücresel ve moleküler seviyesinde işlevsel olabilme yetenekleri sayesinde, manyetik nanopartiküller, yeni nesil manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanları ve hedeflenen ilaç dağıtımı için taşıyıcılar olarak aktif bir şekilde araştırılmaktadır (Akbarzadeh ve ark. 2012a).

Manyetik nanopartiküller, yüksek seçicilik ve ilgiye sahip ligandların bağlanması ve ilaç hedeflenmesi açısından yaygın bir şekilde değerlendirilmiştir. Manyetik çekim kuvveti ya da hastalığın biyolojik belirteçlerinin spesifik bir şekilde hedeflenmesini kullanabilme yeteneği sayesinde, manyetik nanopartiküller, terapötik maddeleri hastalığın oluştuğu bölgeye uzaktan hedefleyerek ulaştırabilmek için cazip bir yol sunmaktadır. Aynı zamanda dozaj kontrolünün sağlanması ve sağlıklı dokuların görebileceği zararları önemli ölçüde azaltması da söz konusu olmuştur (Kwon ve ark. 1995, Eatock ve ark. 2000).

Manyetik hedefli taşıyıcılar olarak da anılan demir oksit nanopartikülleri, erken klinik çalışmalarda başarı göstermiş ve hastalarda dikkate değer etkiler oluşturmuşlardır (Mitra ve ark. 2001, Na ve ark. 2003). Ancak manyetik nanopartiküllerin hedef dokuya ulaşmadan önce retiküloendoteliyal sistem tarafından temizlenmesi ve bazı biyolojik bariyerleri aşamaması gibi sıkıntılar vardır. Bu bariyerler kan damarları endotel hücreleri ve kan-beyin engelidir. Bu nedenlerden ötürü de manyetik nanopartiküllerin in vivo uygulamalarının geleceği, boyutlarına, morfolojilerine ve yüzey fonksiyonel gruplarına büyük ölçüde bağlıdır. Bu bağlamda, nanopartiküllerin daha küçük boyutlara sahip olması ve biyouyumlu polimerler ile yüzey kimyasal fonksiyonlarının kullanımı, kan dolaşım sürelerinin artırılması ve hedefine ulaşmadan parçalanmasının engellenmesi olasılıklarının artırılması için hayatidir (Stubbs ve ark. 2000, Sledge ve Miller 2003).

Hedefli taşıyıcılar, kanserin, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıkların tespiti, teşhisi ve tedavisinde çeşitli uygulamalarla sağlık hizmeti ihtiyaçlarının karşılanmasında önemli bir rol oynayabilir (Gref ve ark. 1994, Li ve ark. 2001).

Kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu sistemik olarak vücuda uygulanır. Kan dolaşımına giren ilaç, vücudun her yerini dolaşabildiği için kanser ilaçlarının bilinen ağır yan etkilerine yol açar (Şekil 2.4.). Spesifik olmayan bu ilaç kullanım tekniği önemli bir olumsuzluktur (Stubbs ve ark. 2000).



Şekil 2.4. Sistemik yolla uygulanan ilacın (solda) kan dolaşımı ile tüm vücuda yayılırken, spesifik uygulanan bir ilacın (sağda) hedeflenmiş bölgede kalması (Akbarzadeh ve ark. 2012b)

Sistemik yolla uygulanan bir kanser tedavisi asıl hedef hücrelerin yanında sağlıklı hücrelere de saldırmaktadır. Bu olumsuzluğun üstesinden gelmek için manyetik nanopartiküllerden yararlanılmaktadır.

Nanopartiküller, kanser tedavisinde farklı yaklaşımlarla kullanılabilirler. Bunlardan biri, spesifik antikorların nanopartiküle bağlanması ile ilgili reseptörlere seçici olarak ulaşması ve tümörün büyümesinin yavaşlatılmasıdır. Başka bir yöntem olarak, hedeflenmiş manyetik nanopartiküllerin tümörlerin ortadan kaldırılması için hipertermiyi kullanabilmesidir. Bir diğer tedavi tekniği de ilaçların, manyetik nanopartiküllere bağlanması ile hedefe taşınması esasına dayanmaktadır (Beletsi ve ark.1999, Yoo ve ark. 2000, Krízová ve ark. 2005).

Manyetik nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan antikanser ajanların kontrollü şekilde istenen dokulara hedeflenmesi, klasik kemoterapi yöntemlerine kıyasla umut verici bir alternatiftir. İlaçla yüklenmiş nanopartiküller, dışarıdan oluşturulan bir manyetik alan yardımıyla hedef bölgeye yönlendirilir ve ilaçlar daha sonra istenen alanda salınır. 4 μm'den küçük manyetik partiküller, retiküloendotelyal sistem hücreleri tarafından, özellikle karaciğer (%60-%90) ve dalakta (%3-%10) elimine edilir. 200 nm'den büyük partiküller genellikle dalağa süzülürken, 100 nm'ye kadar olan partiküller esas olarak karaciğer hücreleri yoluyla etkisizleştirilir. Genel olarak, parçacıklar ne kadar büyükse, plazma yarı ömürleri o kadar kısadır (Kataoka ve ark. 1992).

Manyetik nanopartiküllerin organik bileşiklerle fonksiyonelleştirilmesi genellikle daha iyi fizikokimyasal özellikler elde etmek için yapılır. Ayrıca oksidasyon önleyici ve işe yarar miktarda ilaç yüklenebilen polimerler iyi birer kabuk yapısı oluştururlar. Yine bu polimerler, farklı özellikler elde edebilmek için, bol miktarda fonksiyonel grup çeşidi bağlanması için elverişlidirler. Yüzey işlevselleştirmesinin nanopartikül toksisitesinde anahtar bir rol oynadığı bulunmuştur (Kwon ve Okano 1996).

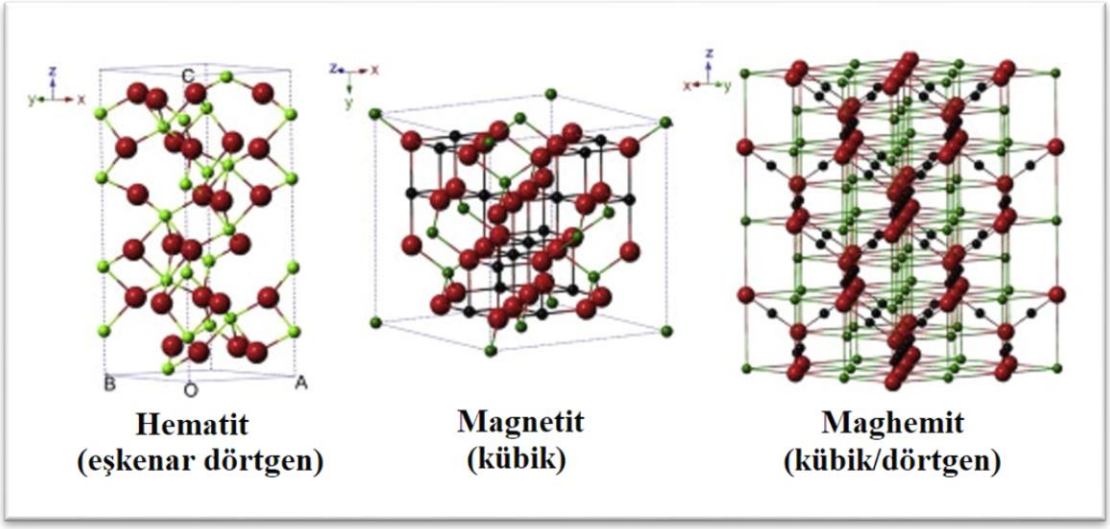
2.3.1. Süper Paramanyetik Demir Oksit Nanopartiküller (SPION)

Metal oksitler arasında demir oksitler, önemli derecede manyetik özelliğe sahiptir. Laboratuvar ortamında sentezlenme maliyetleri düşüktür ve diğer sentezlere göre çok da zor olmayan bir elde edilme prosedürleri vardır. Bu tür özellikleri sayesinde, merkezinde demir bulunan nanopartiküller biyomedikal alanda araştırmalar için kusursuz adaylar olmuşlardır (Zhu ve ark. 2016).

Laboratuvarda sentezlenmelerinin yanısıra, bu metal oksitleri doğada bulabilmek de mümkündür. Manyetit (Fe_3O_4), maghemit (γ-Fe_2O_3) ve hematit (α-Fe_2O_3) gibi demir oksitler nano boyutlarda taneciklere dönüştüklerinde süperparamanyetik özellik

gösterirler. Bu üç demir oksit bileşiğinin laboratuvarda sentezlenmesinde; hidrotermal, sol-jel, mikro emülsiyon, katı hâl reaksiyon yöntemi, birlikte çöktürme ve termal parçalama yöntemleri sıklıkla kullanılır (Karaağaç 2011, Patsula ve ark. 2016). Manyetit, maghemit ve hematit kimyasal, manyetik ve fiziksel özelliklerinden ötürü biyomedikal ve teknoloji gibi alanlarda bir hayli önemlidir. Araştırmalara en çok konu olan ve en genel demir oksitler manyetit ve maghemittir (Karaağaç 2011, Karaağaç ve Koçkar 2012).

Demir oksitler, hidroksitler ve oksit hidroksitler, Fe iyonları ve O^{2-} ya da OH^{-} iyonlarının düzenlenmesi ile oluşur. Anyonların düzenlenmesi açısından (paketleme) ve her bir merkez katyon ile ona en yakın komşu anyonlardan oluşan tetrahedral veya oktahedral bağlantılar tarafından olmak üzere demir oksitlerin yapısını gösteren temel iki yol vardır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Hematit, magnetit ve maghemitin kristal yapıları (Pissuwan 2017)

Hematitte tüm demir iyonları +3 değerliklidir (Fe^{3+}) ve rhombohedral kristal yapısına sahiptir. Manyetit nanopartiküllerin sıcaklığı artırılırsa yapılarının değişerek hematite dönüşebilmesi olasıdır (Xu ve ark. 2007). Maghemitin (γ-Fe_2O_3), demir oksit olarak oda sıcaklığında tam stabil olduğu söylenemez ancak kararsız da değildir. Maghemit yalnızca sıcaklık 450°C'nin altında ise manyetitin oksidasyonu ile yahut demir hidroksitlerin dehidrasyonu ile meydana gelebilir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise γ-Fe_2O_3, daha kararlı α-fazına yani hematite dönüşür. Hematit (α-Fe_2O_3), kısıtlı ferromanyetik veya antiferromanyetik özellik gösterirken maghemit (γ-Fe_2O_3), ferrimanyetik manyetik alan özellikleri gösterir (Wu ve ark. 2008).

Nanomalzemelerin kimyasal veya biyolojik moleküllerle fonksiyonelleştirilmesi, çeşitli uygulama olasılıkları ortaya çıkarmaktadır. Olağanüstü biyomoleküler tanıma yetenekleriyle birlikte kullanıldığında, bu malzemelerin ayırt edici fiziko-kimyasal özellikleri, minyatür biyolojik, optik ve elektronik cihazlara değer katabilmektedir (Akbarzadeh ve ark. 2012a,b).

Bununla birlikte, in vivo uygulamalar için biyouyumluluk önemli bir sıkıntıdır. Bu sorunun üstesinden gelmenin ana odak noktası, agregasyonu önlemek ve nanomateryaller ile biyosistem arasındaki bağlantıları kontrol altında tutmak için nanomalzemelerin yüzey modifikasyonudur. İnorganik nanomateryaller arasında, demir oksit nanopartiküller (IONs) birçok in vitro ve in vivo uygulamada kullanım için yüksek bir potansiyele sahiptir.

Eşsiz fiziksel, kimyasal, termal ve mekanik özelliklerine dayalı olarak ION'lar, hücresel tedavi, hücre etiketleme ve hücre biyolojisi araştırması için bir araç olarak hedefleme, doku onarımı, ilaç taşıma ve uygulama, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), hipertermi vb. çeşitli biyomedikal uygulamalar için yüksek bir potansiyel sunar (Shikata ve ark. 2002, Akbarzadeh ve ark. 2012a). Bu uygulamalar için nanopartiküllerin organik (ör. polimerler) veya inorganik (ör. altın) malzeme veya oksit yüzeyler (ör. silika veya alümina) oluşturarak yüzey modifikasyonu, çeşitli biyoaktiflerle daha fazla işlevselleştirme için mükemmel bir iş olabilir. ION'ların yakında yarının sağlık hizmeti gereksinimlerinin karşılanmasında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Akbarzadeh ve ark. 2012a). ION'ların kaplama ile yeterli hidrofilikliği korumaları, retiküloendotelyal sistem tarafından hızlı klirensi önlemek için boyut olarak 100 nm'yi geçmemesi tercih edilir. Yüzey işlevselleştirmesinin nanopartikül toksisitesinde de anahtar rol oynadığı bulunmuştur (Kwon ve Okano 1996, Kwon ve ark. 1997).

2.4. Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

SPION'ları sentezlemek için fiziksel, sıvı fazlı kimyasal ve mikrobiyal yöntemler uzun yıllardır uygulanmaktadır. Sıvı faz kimyasal yöntemler, birlikte çökeltme, termal ayrışma, mikroemülsiyon, hidrotermal ve sonokimyasal yöntemler, boyut ve yüzey özellikleri üzerinde daha iyi kontrol nedeniyle SPION sentezi için oldukça tercih edilir. Bunlar arasında termal ayrışma yöntemi yüksek sıcaklık reaksiyonları arasındadır (Gupta ve Wells 2004, Karaağaç 2011, Karaağaç ve Koçkar 2012).

2.4.1. Birlikte Çökeltme

Birlikte çökeltme yöntemi, oksitleyici olmayan bir ortamda, orta sıcaklıklarda demir (Fe^{+3}) ve demir (Fe^{+2}) tuzları ve baz karışımı kullanılarak nanopartiküllerin hazırlandığı basit ve etkili bir yaklaşımdır. Toplam reaksiyon aşağıdaki gibi tanımlanır (Akbarzadeh ve ark. 2012b).

$$2FeCl_3 + FeCl_2 + 4H_2O + 8NH_3 \rightarrow Fe_3O_4 + 8NH_4Cl$$

$$Fe_3O_4 + \text{Oksidasyon} \rightarrow \gamma\text{-}Fe_2O_3$$

Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları ihtiva eden bir çözelti gaz ile tepkime vermeyecek şekilde, kuvvetli karıştırma sağlanmış, tepkime ortamına alınır. Bir baz çözeltisi ile reaksiyona sokularak demir oksit nanopartikülleri sentezlenir (Massart ve Cabuil 1987). Birlikte çöktürme yöntemi ile manyetit ve maghemit (Fe_3O_4, γ-Fe_2O_3) hazırlanabilmektedir. Manyetitin oksitlenmesi ile maghemit oluşmaktadır (Sun ve ark. 2010, Karaağaç 2011, Karaağaç ve Koçkar 2012).

Maliyetinin düşük olması karmaşık prosedürler ve zorlu tepkime şartları gerektirmeyen birlikte çöktürme işleminin en büyük avantajlarından biri fazlaca nanoparçacık sentezlenebilmesidir. Ancak parçacık boyutlarının kontrolü nispeten daha zordur. Birlikte çöktürme yönteminde karıştırılan Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları ihtiva eden tuzların reaksiyon vermesi için uygun ortam pH'ının pH: 8.0-14.0 arasında bir değere sahip olması gerekir (Lu ve ark. 2007). Birlikte çöktürme tek basamaktan oluşan bir tepkime değildir. Bu yüzden demir oksitin oluşumu yeterli baz konsantrasyonuna bağımlıdır. Yeteri kadar hidroksil iyonu bulunmaması demir oksit nanopartiküllerinin oluşumunu da etkileyecektir (Alibeigi ve Vaezi 2008).

Tepkime süresince önce nanoparçacıklardan oluşan çekirdek kısımların meydana gelmesi söz konusudur. Ardından devam eden mekanizma ile çekirdeklerin büyümesi ve kristal yapıların oluşması beklenir. Nanopartiküllerin dispersiyonları için bu iki basamağın düzenli yürümesi önemlidir (Tartaj ve ark. 2003). Oluşan kristallerin monodispers olmasında iyon derişimleri, pH, karıştırma sisteminin dakikadaki dönüş sayısı, sistem sıcaklığı ve reaksiyonun süresi etkilidir. Bu etkenler nanopartiküllerin fiziksel özelliklerini de etkilemektedir (Zhao ve ark. 2008, Valenzuela ve ark. 2009).

Maghemit oluşumunda oksidasyon önemli bir sorun olarak görülmez. İstendiği taktirde Fe^{+3} iyon tuzu kasıtlı olarak oksitlendirilir ve maghemit nanopartiküllerine dönüştürülebilir. Bu işlemler asidik ortamda gerçekleştirilir ve bu şekilde oluşturulan nanoyapılar pH' ya göre yüzeylerinde yük barındırabilirler (Lu ve ark. 2007).

2.4.2. Mikroemülsiyon Yöntemi

Mikroemülsiyon, emülsiyon oluşturan iki sıvının (su-yağ gibi) ortamda bulunan yüzey aktif madde yardımıyla nanometre boyutlarında damlacıklar oluşturması sonucu elde edilen kararlı bir karışımdır. SPION'lar, stabilize edici bu iki faz yardımıyla sentezlenebilir.

Organik faz (örneğin yağ) ile su yüzeyleri arasında düşük yüzey gerilimi bulunur. Nanopartiküllerin oluşabilmesi için mikro boyutlarda su damlacıkları işlev görür ve bu damlacıkların büyüklüğü oluşacak olan nanopartiküllerin büyüklüğünü etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Tavakoli ve ark. 2007). Yüzeyler arasında boşluklar olması nanoparçacık boyutunu olumsuz etkiler ve partiküllerin birleşerek büyümesine yol açar (Pileni 1993).

Reaksiyonun oluşma şartları zor değildir ve deneysel ölçümlerle nanopartiküllerin boyutları ve kristal yapıları çeşitli şekillerde oluşturulabilir. Bu kolaylık yöntemin ana avantajlarından biridir (Curri ve ark. 2000).

2.4.3. Termal Ayrıştırma Yöntemi

Nanoparçacık sentezlenmesi için oldukça önemli avantajlara sahip bir yöntem olan termal ayrıştırma, parçacıkların monodispers özellikleri ve boyutlarının küçük tutulması gibi problemlerin üstesinden gelebilmektedir. Yöntem miktar olarak da oldukça fazla nanopartikülün elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Cebeci 2020).

Bu yöntem, oleik asit ve oleil-amin gibi yüzey aktif maddeler ve yüksek kaynama noktalarında organik çözücüler kullanarak kristalli ve monodispers süper paramanyetik demir oksit nanopartiküllerin oluşumunu sağlar. Diğer taraftan, bu süper paramanyetik demir oksit nanopartiküllerin suyu sevmeyen yapısı, biyomedikal kullanımlarını azaltmaktadır. Bundan ötürü, ligand değişim yöntemi ve iki tabakalı yüzey aktif madde stabilizasyon yöntemi, bunları sulu faza transfer etmek için kullanılır (Maity ve ark. 2009). Maity ve ark. (2008), oleat ve oleaminin hidrofobik kaplamasıyla Fe_3O_4

nanoparçacıklarını oluşturmuştur. Ardından manyetik görüntüleme çalışması yapmak için polietilen glikol (PEG) ve dopamin karışımı ile ligand değişim yöntemi sayesinde işlevselleştirilmiştir. Öte yandan, süper paramanyetik demir oksit nanopartiküllerin manyetik özellikleri ve koloidal stabilite gibi birçok özelliği faz değişimi sırasında ortaya çıkmıştır (Xu ve ark. 2008). Bu sebeple, Maity ve ark. bu sorunları önlemek için poliol bazlı yüzey aktif maddeler kullanan tek kap termoliz yöntemini önermiştir (Maity ve ark. 2010).

2.4.4. Sol-Jel Tekniği

Sol-jel yöntemi, ferrimanyetik nanopartikül sentezlemek için uygun bir sıvı faz kimyasal yöntemdir. 'Sol' nanometrik partikülleri oluşturmak üzere, bu yöntem, malzemenin hidroksilasyonu ve yoğunlaşması esasına dayanarak metal oksit nanopartikül sentezlemeyi sağlar. Metal oksit ağının ıslak bir jel formatında oluşması, yoğunlaşmanın artması ve inorganik polimerleşmeye bağlıdır. Sıcaklık laboratuvar şartlarında iken reaksiyon gerçekleştirilir. Ardından yüksek sıcaklıklara çıkılarak nanopartikülün son kristal yapısı oluşturulur. Son aşamada elde edilen yapı jelin özelliklerini üst düzeyde etkiler ve bu yapı da sıcaklık, tuzların derişimi, pH gibi sistem faktörlerinden etkilenir. Çeşitli özellikte nanopartiküller elde edilebilen bu yöntemde tanecik boyutu sıcaklık ile farklılaştırılabilir (Pacakova ve ark. 2016).

Yöntemin maliyetinin yüksek olması ve uygulanabilirlik zorluğu gibi sıkıntılarının yanında nanopartiküllerin üretimi konusunda yüksek kontrol avantajına sahiptir. Verimin az olması da bir dezavantaj oluşturmaktadır. Yine de saf katı metal oksit nanopartiküllerin sentezlenmesi ve monodispers özellik katabilmesi açısından avantajlı bir yöntemdir (Xu ve ark. 2007).

2.4.5. Hidrotermal Reaksiyon

Genellikle yüksek basınçta uygulanan bir yöntem olan hidrotermal reaksiyon yöntemi, çok iyi kristal özellik gösteren nanopartiküllerin sentezlenmesini sağlar (Pacakova ve ark. 2016).

Yöntem, sulu sistem içinde sabit basınç ve sıcaklık ortamında gerçekleşen bir reaksiyondur. Çoğu yöntemde olduğu gibi bu yöntemde de sıcaklık, derişim ve süre faktörleri oluşan nanopartiküllerin yapısı üzerinde etkilidir ve parçacık boyutu, topaklanma gibi özellikleri doğrudan etkiler. Bu reaksiyonda derişimin artması parçacık

boyutunu büyütürken reaksiyon süresinin kısa tutulması monodispers yapıyı olumlu etkiler (Hao ve Teja 2003).

2.4.6. Kimyasal Buharlaştırma

Yöntem, yüksek sıcaklıklarda gaz halindeki bir maddenin nanomateryale dönüştürülmesi esasına dayanır. Dönüşüm bir plaka üzerinde gerçekleştirilir ve katalizör kullanılır. Piroliz, homojen çekirdekleşme, kristalleşme ve toplama olmak üzere dört farklı basamaktan meydana gelen bu yöntem ile verimli nanomateryaller elde edilebilir.

Metot kapsamında, öncelikle yüksek sıcaklık oluşturulur ve plakanın bu molekülleri soğurarak plaka yüzeyine dağılması sağlanır. Ardından moleküller ayrışır ve tekrar birleşir. Oluşan yan ürünler, moleküler halde, gaz tarafından absorbe edilerek yöntem tamamlanır. Ancak nanoparçacıklar çoğu zaman bir termal prosedürde daha işlenerek manyetik kabiliyetlerinin artması sağlanır.

Yöntem küçük boyutlarda nanopartikül sağlaması, çoğu madde için kullanılabilir olması ve ağır bir maliyet gerektirmemesi açısından avantajlıdır (Cebeci 2020).

2.4.7. Sonokimyasal Yöntem

Ultrason yöntemi, SPION'ların boyut ve şekillerinin yeniden doldurma süresine, ışınlama süresine ve güce bağlı olduğu ortam sıcaklıklarında kabarcıkların kavitasyonu yoluyla SPION'lar üretir (Dolores ve ark. 2015).

2.4.8. Mikrodalga Destekli Sentez

Bu yöntemde yüksek kristalli ve tek dağılımlı nanopartiküller, mikrodalgalar ile homojen ısı sağladığından daha az enerji tüketimi ile çok kısa sürede üretilir. Bu yöntemde üretilen SPION'lar, düşük yüzey reaktiviteleri nedeniyle büyük bir stabilite sergilemektedir. Manyetik özelliklerdeki modifikasyon, yüzey aktif maddelerin konsantrasyonuna, mikrodalga gücüne ve reaksiyon süresine bağlı olarak gerçekleştirilebilir (Pascu ve ark. 2012, Carenza ve ark. 2014).

2.5. Manyetik Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Son yıllarda, nano boyuttan mikron boyuta kadar hazırlanabilen manyetik nanopartiküller biyomedikal alandaki uygulamalarda kullanılmaktadır (Curtis ve Wilkinson 2001, Moghimi ve ark. 2001, Panyam ve Labhasetwar 2003, Lu ve ark. 2007,

Jun ve ark. 2008, Teja ve Koh 2009). Manyetik alan içerisinde kontrol edilebilecek ve dolayısıyla hedefe yönlendirilebilecek nanopartiküllerin birçok faydası bulunmaktadır (Kahraman ve ark. 2011).

Fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi adına, manyetik nanopartiküller üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Geniş yüzey alanları ve kuantum özellikleri, nano manyetik partiküllerin süperparamanyetik özellik göstermesini sağlar. Nanopartiküllerin bu özelliği sağlayabilmesi, bireysel olarak manyetik özellik gösteren yapıya sahip olmalarından kaynaklanır (Babes ve ark. 1999, Maity ve Agrawal 2007, Kahraman ve ark. 2011).

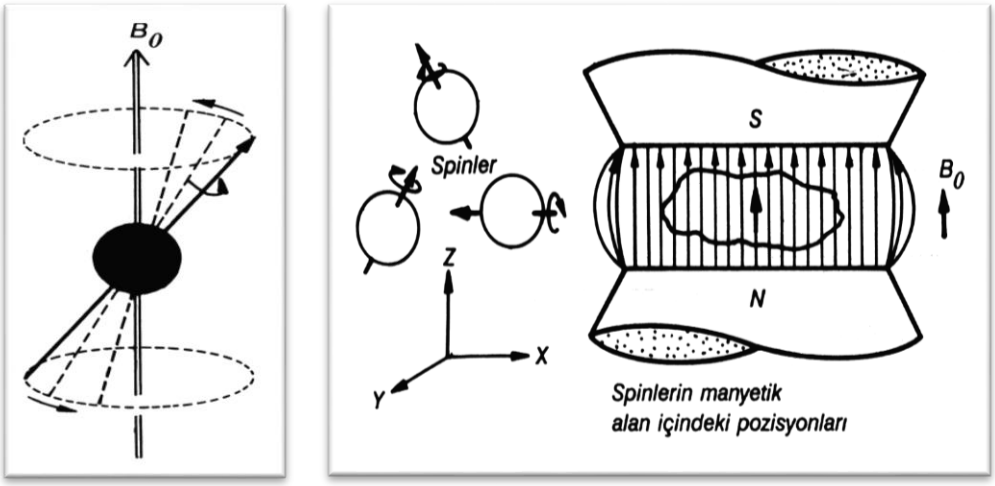
Süperparamanyetik nanopartiküller sahip oldukları kimyasal, fiziksel, termal ve mekanik özellikleri ile birlikte işlemlere getirdikleri kolaylıklardan ötürü oldukça popülerdir. Ek olarak biyomedikal uygulamalarda sağladıkları nitelikler sayesinde araştırmalara sıklıkla konu olan ve gittikçe yaygınlaşan nanopartiküllerdir (Tartaj ve ark. 2003, Scherer ve Figueiredo 2005).

2.5.1. Manyetik Rezonans Görüntüleme

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI), su kütlesini kullanarak canlıdan alınan bir görüntülemedir. MRI ölçümlerinde radyo dalgaları enerji olarak kullanılır ve radyo frekansı (RF) denilen bu enerji elektromanyetik dalgalar arasındadır.

MRI yapılırken öncelikle hasta güçlü bir manyetik alan içerisine alınır ve manyetik etki sayesinde hedef bölgede bulunan protonların manyetik alana uygun dizilmeleri sağlanır. Böylece RF ile uyarılabilecek hale getirilir (Şekil 2.6.). Hedef bölgeye radyo dalgaları gönderilir ve bu enerji ile protonlar konumlarından sapma gösterirler. Radyo frekansı protonların çekirdek frekansı ile rezonans halde bulunmalıdır. Radyo frekansı kesildiğinde, protonlar tekrar eski durumlarına dönerler ve bu geri dönüş sırasında radyo dalgalarını aldıkları gibi yayarlar. Yani protonlar sinyali alan ve geri yayan antenler gibi davranırlar. Bu dalgalar MRI cihazı ile tespit edilerek görüntü oluşturulur. Hidrojen çekirdeklerinin yeniden eski konumlarına gelmesi relaksasyon (gevşeme) olarak tanımlanır ve T1 (boyuna, dönme-çapraz) – T2 (enine, dönme-dönme) gevşeme zamanları olarak ölçülür. Nanopartiküller, bu işlem dahilinde elde edilen görüntülerin kontrastında artış sağlarlar. T1 etkili nanopartiküller parlak kontrast artırıcı

gevşeme zamanları oluşmasını sağlarken T2 etkili nanopartiküller koyu kontrast artırıcı gevşeme zamanı değerleri oluştururlar (Brown ve Semelka 2011).



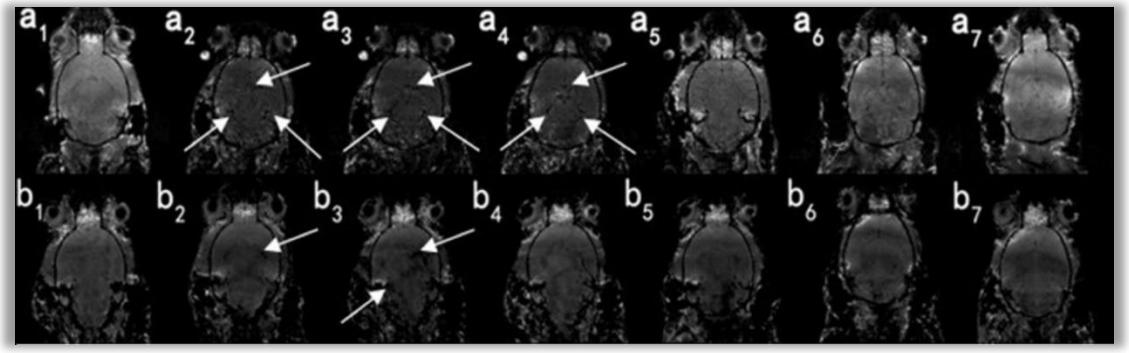
Şekil 2.6. Protonların manyetik alandaki (B_0) dönme ve dizilmeleri (https://docplayer.biz.tr/amp/5779023-Manyetik-rezonans-mr.html)

MR görüntülemede kontrast artırıcı madde olarak gadolinyum türevleri hali hazırda kullanılmaktadır. Yine manganez kompleksleri de tercih edilen kontrast artırıcı maddelerdendir. Ancak bu maddelerin düşük stabilite, toksisite, hücresel girişkenliğin düşük olması gibi bazı dezavantajları vardır (Kandasamy ve Maity 2015).

SPION'lar, T2 etkili kontrast artırıcılar olan gadolinyum ve manganın yerine kullanılan ajanlar olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır. Nanopartiküller, manyetik özellikleri, daha stabil olmaları, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir özellikleri nedeniyle bu konuda daha ön plana çıkabilecektir (Gossuin ve ark. 2009, Yang ve ark. 2009). Magnetoferritin, Sinerem, Endorem, Resovist T2 ajanları olarak kullanılan birkaç manyetik nanopartiküldür (Berry ve ark. 1996, Reimer ve Balzer 2003, Grootendorst ve ark. 2013).

Ticari kullanımının yanında manyetik nanopartiküllerin manyetik rezonans görüntüleme alanındaki etkileri üzerine çalışmalar da yapılmaktadır (Strable ve ark. 2001, Maity ve ark. 2012). Polietilen glikol (PEG) ile kaplanmış manyetik nanopartiküllerin MR görüntülerinden, bu nanopartikülün in vivo alımını doğrulayan araştırmalar yapılmıştır (Chakravarty ve ark. 2014). Başka bir çalışmada da polietilen glikolün (PEG) yalnız ve polietilenimin (PEI) ile beraber süperparamanyetik demiroksitlere kaplanarak MR görüntüleri araştırılmıştır. Bu çalışmada farelerin vücut ağırlıklarına göre kilogram

başına 10 mg Fe dozunda enjeksiyon yapılmış ve fare beyinlerinin MR'ında kontrast artışı gözlemlenmiştir (Şekil 2.7.) (Wang ve ark. 2015a).

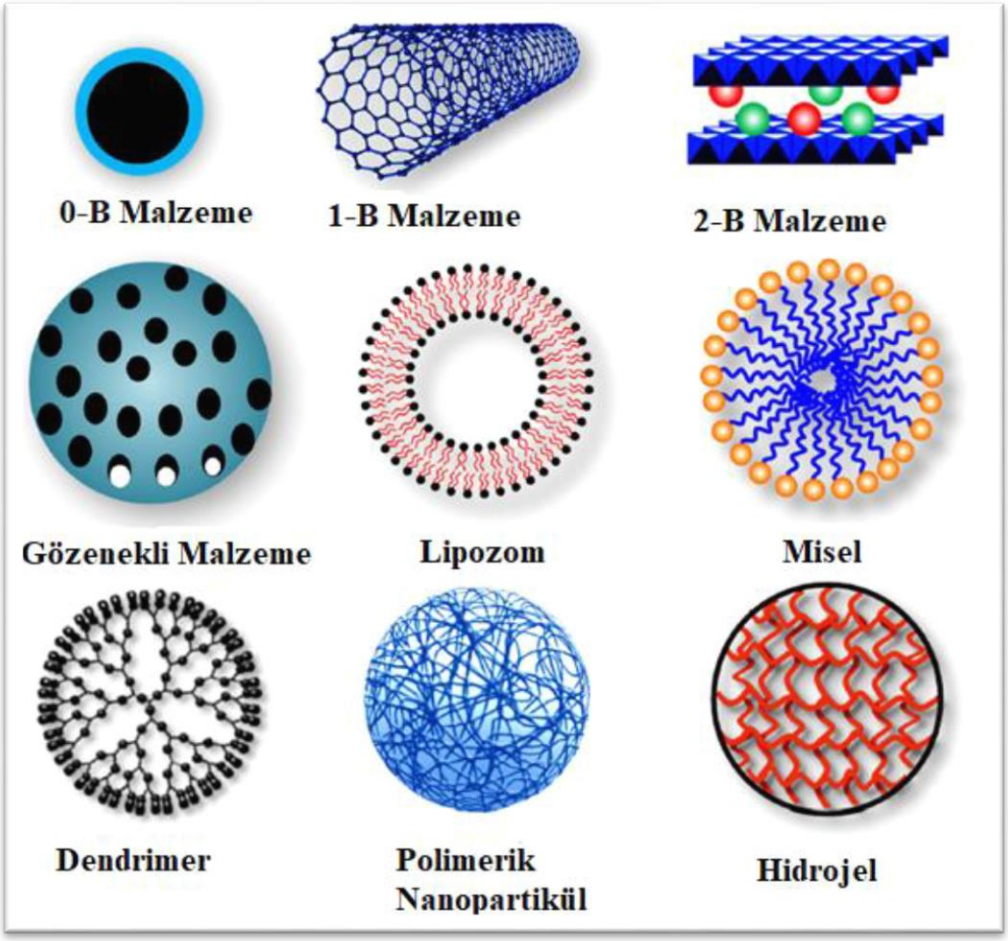


Şekil 2.7. PEG-SPION'ların (a1–a7) ve PEG/PEI-SPION'ların (b1–b7) intravenöz enjeksiyonundan önce ve sonra MR görüntüleri (Wang ve ark. 2015a)

2.5.2. İlaç Taşıma Sistemleri

İlaç taşıma sistemlerinde nanopartiküller sıklıkla tercih edilmektedir. Nanopartiküllere stabilite, kontrollü salınıma elverişli olma, hedefe yönlendirilebilir olma, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olma özellikleri kazandırılabilir. İlaç taşıyacak nanopartiküller için bu özellikler ön plandadır ve bu özelliklere göre seçim yapılır (Singh ve Lillard 2009, Bamrungsap 2012, Borawake ve ark. 2017). Farklı ilaç taşıyıcı sistemler arasında: protein temelli sistemler, nanopartikül kristalleri, lipozomlar, hidrojel sistemler ve polimer kaynaklı miseller ile konjuge sistemlerin yaygın olduğu söylenebilir (Şekil 2.8.). Ayrıca seramik, karbon nanotüpler, karbon temelli nanopartiküller, altın gibi taşıyıcı malzemeler de kullanılmaktadır (Borawake ve ark. 2017).

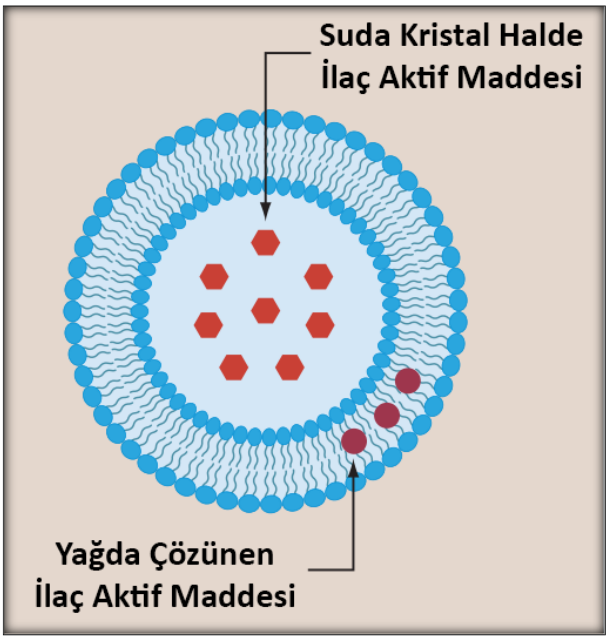
İlaç taşıma sisteminden ana beklentiler biyouyumlu olması, kolay tepkime vermemesi, kararlı olması, hasta için kullanımının rahat olması, ilaç taşıma kapasitesinin yeterli olması, eliminasyonunun ve üretiminin kolay olmasıdır (Peppas ve Brannon 2001).



Şekil 2.8. Bazı nanopartikül ilaç taşıma sistemleri (Yeniyurt 2019)

Polimer esaslı ilaç taşıyıcı sistemlerde, ilaç fiziksel bağlanma veya kovalent bağlanma ile polimere bağlanmaktadır. Oluşturulan yapılar kapsül veya polimerik misel yapılarında olabilmektedir. Kullanılan polimerler, heparin, kitosan ve albümin gibi doğal yapılarda olabileceği gibi sentetik polimerler de olabilirler. Bu polimerler biyouyumlu ve biyoparçalanabilir yapıda olduklarından tercih edilme oranları yüksektir. Polilaktik asit, polietilen glikol, poliglikolik asit, poli (metil metakrilat) gibi bazı polimerler ilaç taşıma sistemleri yanında gen salınımı için de kullanılmıştır (Pandey 2017).

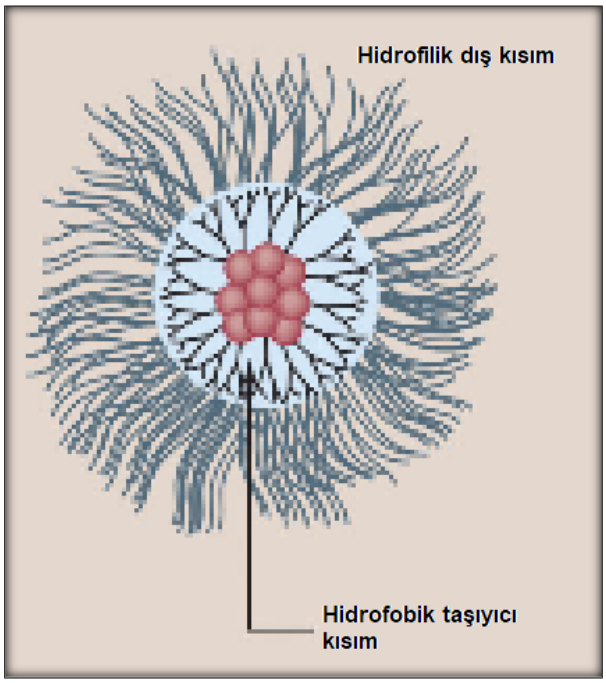
Lipozomlar, bir çekirdek ve sulu bir fazın ikili lipit tabakasıyla kaplandığı lipit yapıdaki biyolojik maddelerdir. Taşıyıcı olarak ilaç ve aşılar gibi biyolojik etkili maddelerde kullanılırlar (Şekil 2.9.). Biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması yanında hidrofilik ve hidrofobik maddelerin çözündürülmesini sağlayabilmesinden ötürü popüler bir ilaç taşıma sistemi aracıdır (Alkan 1983).



Şekil 2.9. Lipozom taşıyıcı sistem (Bamrungsap 2012)

Diğer taraftan lipozomlar verimin düşük olması, ilaç salımının erken olması, düşük stabilite gibi istenmeyen şartlara açıktır (Mohanraj ve Chen 2007). Başka bir deyişle lipozomlar, hücre içine giremediği için ilacı hücre duvarının dışında salıverir (Laverman 2001).

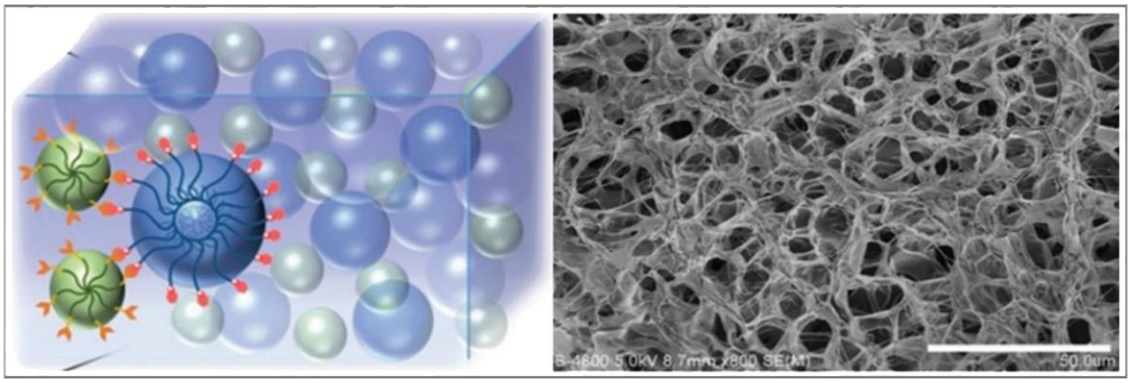
Miseller, hidrofobik bir merkez ve hidrofilik bir dış yapıdan oluşan küresel yapılardır. Sulu bir çözelti içerisinde, amfifilik kopolimerlerin birleşmesiyle oluşan nanoyapılardır. Belirli sıcaklık ve derişimlerde kendiliğinden oluşurlar. Sistem, hidrofobik ilaçları çekirdek kısmında muhafaza eder ve hidrofilik dış yüzey iç kısmın stabilizasyonunu sağlar (Şekil 2.10.). Bu sayede polimerlerin ve hidrofobik ilaçların suda çözünmesini sağlayarak ilaç taşıyıcı görevini görür. Hidrofobik maddeler çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle misel içerisine alınabilmektedir (Senapati ve Mahanta 2018).



Şekil 2.10. Misel taşıyıcı sistem (Bamrungsap 2012)

Misellerin boyları nanometre boyutlarındadır. Eliminasyon süresini artırmak sebebiyle dar spektruma sahiptir ve tümör hücrelerinde, arttırılmış geçiş ve alıkonma (EPR) etkisiyle, uzun süre kalması sağlanır. Miseller çekirdek yapıları sayesinde hidrofobik ilaç taşınması adına önemlidir ve bu özellik ilaçların kana geçen yüzdelerini yüksek tutmaktadır (Saman ve Iqbal 2012).

Polimer zincirlerinin su içerisinde çözünerek çapraz bağlarla oluşturduğu yapılara hidrojeller denir (Şekil 2.11.). Hidrojel sisteminde oluşan stabiliteye etkili ağ yapısı ve ilaç salınımını sağlayan şişme özellikleri sayesinde araştırmalara sıklıkla konu olan bir ilaç taşıma tekniği olmuştur. Kontrol edilebilen bu özellikleriyle, nano boyutlarda hazırlanan hidrojeller sayesinde, tepki süresinin kısaltması sağlanmış ve tedavi amaçlı kullanılabilir hale getirilmişlerdir (Hamidi ve ark. 2008, Zubris ve ark. 2012).



Şekil 2.11. Hidrojellerin temsili ve SEM görüntüleri (Wang ve ark. 2015b)

2.5.3. Magnetofeksiyonda Nanopartikül Kullanımı

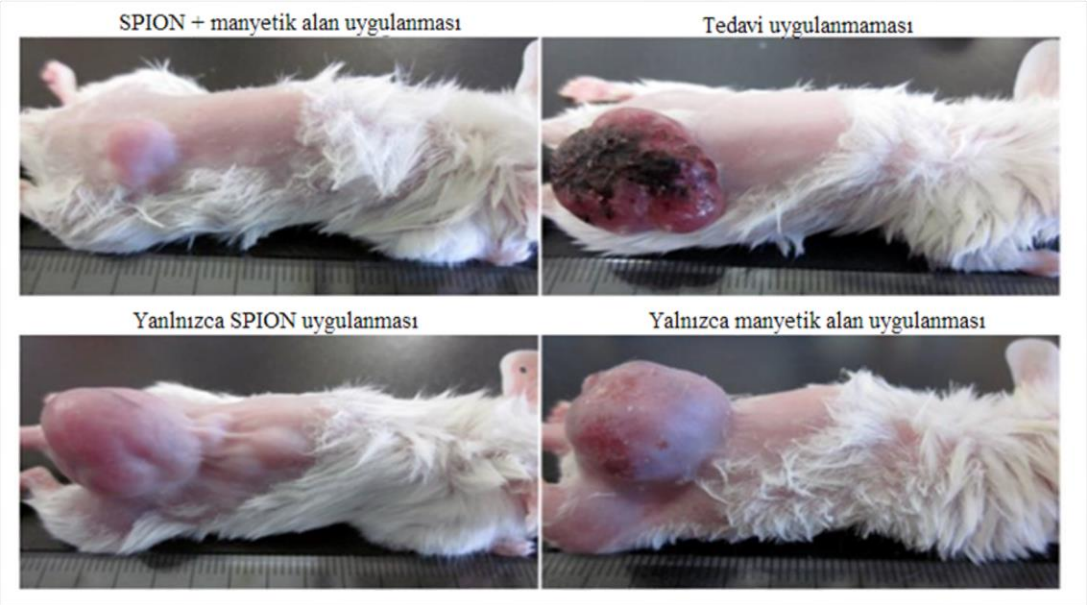
Manyetofeksiyon, nükleik asitlerin hücre girişini artıran bir metottur (Scherer ve ark. 2002). Yöntemde polimer kaplı biyoparçalanabilir manyetik nanopartiküller elektrostatik etkileşimler yoluyla nükleik asitler (deoksiribonükleik asit, mikro ribonükleik asit, küçük interfering nükleik asit) üzerinde kullanılır (Toub ve ark. 2006). Dış kaynaklı manyetik alan sayesinde manyetik nanopartiküller nükleik asitlerin hücre içine giriş yapmasını sağlayabilmektedir (Goodwin ve ark. 2001). Hem viral hem de viral olmayan gen vektörleriyle uygulanan klasik prosedürlerin etkisini artıran bu yöntemin başarılı olması için nükleik asit nanopartikül ile kompleks oluşturmalıdır. Yöntem, transfeksiyon ile ilgili in vitro sistemlerde oldukça etkili sonuçlar vermektedir, in vivo olarak ise sindirim sistemi ve vasküler sistemde etki ettiği bildirilmiştir (Scherer ve ark. 2002).

2.5.4. Manyetik Hipertermi

Manyetik hipertermi, süperparamanyetik demiroksit nanopartiküllerin manyetik momentinden faydalanarak manyetik enerjiyi ısı enerjisine çeviren ve tümör tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Nanopartiküllerin fiziksel ve manyetik özellikleri ile birlikte Spesifik Absorpsiyon Oranı (SAR) da tedavinin etkinliği için önemlidir (Kandasamy ve Maity 2015). Bu konuda frekans, manyetik alan, SAR gibi şartlar değiştirilerek yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bu alandaki çalışmalarda sıcaklık artışının derişim ve zamana bağlı olduğu (Maity ve ark. 2011), MCF7 hücrelerinde canlılığın %26-38'e düşebildiği, pankreas tümöründe büyüme hızının azaldığı ve deney hayvanlarının yaşam sürelerinin uzadığı (Basel ve ark. 2012), 1 saat

süreyle demir oksit manyetik nanopartikülü kullanarak hipertermi yöntemiyle kanser hücrelerinde %50'ye kadar bir ölüm oranı sağlandığı görülmüştür (Guardia ve ark. 2012).

Başka bir çalışmada, polietilenglikol-folik asit birleşimli manyetik nanopartiküller hazırlanarak manyetik hipertermi uygulaması yapılmıştır. 10 dakikalık bir manyetik hipertermi sonucunda kanserli hücrelerin çoğalması önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 2.12.) (Hayashi ve ark. 2013).



Şekil 2.12. Fare kanser hücrelerinde 35 günlük uygulama sonucundaki farklılık (Hayashi ve ark. 2013)

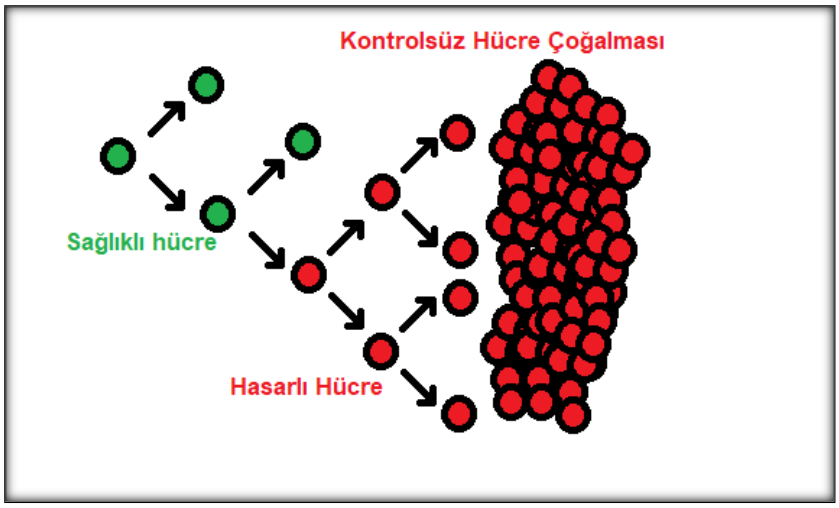
Hayashi ve ark. (2014), Fe_3O_4 ile SPION hazırlamış ve Doxorubisin ile konjugasyon ürününü sentezlemiştir. Manyetik hipertermi uygulamasını 25 dakika gerçekleştirmiş ve %60-90 Doxorubisin salınımını 44-46^oC sıcaklıklarda sağladığını bildirmiştir.

Manyetik hipertermi tedavisinin, yapılan çalışmalar sayesinde, kanserli hücre büyümesini azalttığı, kemoterapi ile beraber uygulandığında ise kontrolsüz hücre çoğalmasını tamamen durdurduğu gösterilmiştir. Klinik uygulamalara dair çalışmalarda, aminosilan ile örtülü manyetik demir oksit nanopartiküllerin prostat tümörünü büyük ölçüde baskılamayı sağladığı rapor olarak belirtilmiştir (Johannsen ve ark. 2005).

SPION'ların tedavi süresince tümörün içinde kalması, halsizlik ve eliminasyon problemleri oluşturabilmesine rağmen, aminosilan ile kaplanmış nanopartiküllerin ısı tedavisinde güvenilir olup önemsenecek hiçbir yan etkisinin olmadığı da gösterilmiştir (Maier-Hau ve ark. 2007).

2.6. Kanser

Gerçekte bir hastalıklar grubu olan kanser, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ve farklı dokulara yayılarak yeni bölgelerde bu neoplaziyi devam ettirmesi ile karakterize edilen bir vakadır. Günlük hayatta gerçekleşen biyolojik rutinler ve çevreden alınan radyasyon ile kimyasal veya biyolojik etki yapan, kansere neden olabilen (karsinojen) dış kaynaklı maddeler DNA'da hasar oluşturabilir. Bu faktörler ise günlük milyona yakın hücre başına lezyon oluşturabilir. DNA'da meydana gelen hasarlar çoğu zaman onarılır ancak yüksek derecedeki hasarlar apoptozu stimüle ederek hücre ölümüne neden olur. Bu süreçte, hasar almış DNA'ya sahip hücrelerde apoptoz oluşması ve DNA'nın onarımının gerçekleşememesi gibi fonksiyon bozuklukları sonucunda geri dönüşümsüz DNA hasarları oluşabilmektedir. Sonuçta hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve tümör meydana gelmesi söz konusu olacaktır (Şekil 2.13.). Bu kontrolsüz çoğalma sonucunda oluşan tümör dokularının gelişimi çok aşamalıdır ve bu süreçte hücre çoğalmasını aktif tutma, hücre çoğalmasını engelleyici sistemlerden kaçınma, tümör hücre ölümlerine karşı koyma, kendini kopyalama ile ölümsüzlüğe ulaşma, anjiyogenez oluşturma ve yayılım sağlama gibi tehlikeli sonuçlar oluşur (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 2.13. Normal ve kanser hücrelerinin bölünmesi

Geçtiğimiz yüzyılda kanser hala en fazla ölüme neden olan hastalık olmaya devam etmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerinde, son on yıl içerisinde hem yeni olgular hem de kanser nedenli ölümlerde genellikle artış oluştuğu görülmüştür. 2020 yılına gelindiğinde 7 794 798 844 nüfusa sahip dünya genelinde 19 292 789 yeni vaka meydana gelmiştir. Dünya genelinde kanser nedenli yaşanan can kaybı 9 958 133 kişidir (Çizelge 2.1. ve 2.2.) (Globocan 2020).

Çizelge 2.1. 2020 yılı kanser hastalığı istatistik bilgiler (Globocan 2020)

	Erkekler	**Kadınlar**	**Toplam**
Nüfus	3 929 973 836	3 864 824 712	7 794 798 844
Yeni kanser vakaları	10 065 305	9 227 484	19 292 789
Yaşa bağlı insidans oranı	222.0	186.0	201.0
75 Yaş altı kanser riski (%)	22.6	18.6	20.4
Kanserden gerçekleşen ölüm sayısı	5 528 810	4 429 323	9 958 133
Yaşa bağlı ölüm oranı	120.8	84.2	100.7
75 Yaş altı kanser nedenli ölüm riski oranı (%)	12.6	8.9	10.7
Son 5 yılda genel vaka sayısı	24 828 480	25 721 807	50 550 287
Melanom harici cilt kanseri dışında en sık görülen 5 kanser (vakalara göre)	Akciğer, Prostat, Kalın Bağırsak, Mide, Karaciğer	Göğüs, Kalın Bağırsak, Akciğer, Rahim Ağzı, Tiroid	Göğüs, Akciğer, Kalın Bağırsak, Prostat, Mide

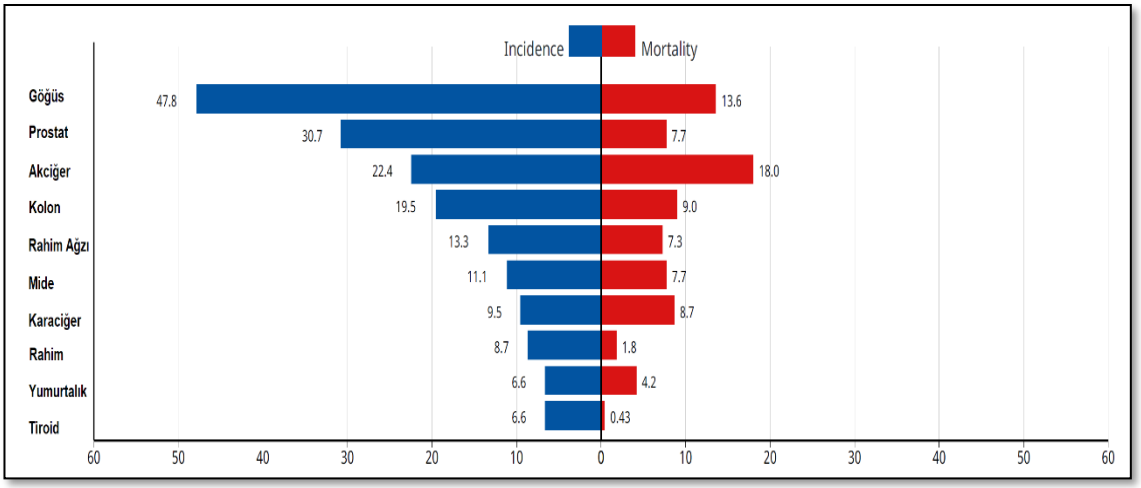
Çizelge 2.2. Kanser bölgesine göre insidans, ölüm ve yaygınlık (Globocan 2020)

	Yeni Vaka				Ölüm				5 Yıldaki Yaygınlık
Kanser	**Sayı**	**Sıra**	**(%)**	**Risk**	**Sayı**	**Sıra**	**(%)**	**Risk**	**Sayı**
Göğüs	2 261 419	1	11.7	5.20	684 996	4	6.9	1.49	7 790 717
Akciğer	2 206 771	2	11.4	2.74	1 796 144	1	18.0	2.18	2 604 791
Prostat	1 414 259	3	7.3	3.86	375 304	8	3.8	0.63	4 956 901
Kolon	1 148 515	4	6.0	1.30	576 858	5	5.8	0.55	3 045 225
Mide	1 089 103	5	5.6	1.31	768 793	3	7.7	0.90	1 805 968
Karaciğer	905 677	6	4.7	1.11	830 180	2	8.3	1.01	994 539
Rektum	732 210	7	3.8	0.91	339 022	10	3.4	0.37	2 066 732
Rahim ağzı	604 127	8	3.1	1.39	341 831	9	3.4	0.82	1 495 211
Özofagus	604 100	9	3.1	0.78	544 076	6	5.5	0.68	666 388
Tiroid	586 202	10	3.0	0.68	43 646	25	0.44	0.05	1 984 927
Mesane	573 278	11	3.0	0.64	212 536	14	2.1	0.18	1 720 625
Non-Hodgkin lenfoma	544 352	12	2.8	0.62	259 793	12	2.6	0.27	1 544 488
Pankreas	495 773	13	2.6	0.55	466 003	7	4.7	0.51	379 958
Lösemi	474 519	14	2.5	0.50	311 594	11	3.1	0.32	1 340 506
Böbrek	431 288	15	2.2	0.52	179 368	16	1.8	0.20	1 207 547
Rahim	417 367	16	2.2	1.05	97 370	20	0.98	0.22	1 415 213
Ağız- dudak	377 713	17	2.0	0.46	177 757	17	1.8	0.22	959 248
Melanoma	324 635	18	1.7	0.37	57 043	23	0.57	0.06	1 092 818
Ovül	313 959	19	1.6	0.73	207 252	15	2.1	0.49	823 315
Beyin	308 102	20	1.6	0.35	251 329	13	2.5	0.30	837 152
Gırtlak	184 615	21	0.96	0.25	99 840	19	1.0	0.13	518 380
Myelom	176 404	22	0.91	0.21	117 077	18	1.2	0.13	450 579
Nazofarenks	133 354	23	0.69	0.16	80 008	22	0.80	0.10	382 507
Safra kesesi	115 949	24	0.60	0.13	84 695	21	0.85	0.09	137 466
Orofarenks	98 412	25	0.51	0.13	48 143	24	0.48	0.06	258 543
Hipofarenks	84 254	26	0.44	0.11	38 599	26	0.39	0.05	132 717
Hodgkin Lenfoma	83 087	27	0.43	0.09	23 376	28	0.23	0.02	281 112
Testis	74 458	28	0.39	0.14	9 334	34	0.09	0.02	296 686
Tükürük bezi	53 583	29	0.28	0.06	22 778	29	0.23	0.03	160 292
Anüs	50 865	30	0.26	0.06	19 293	30	0.19	0.02	141 378
Vulva	45 240	31	0.23	0.09	17 427	31	0.18	0.03	135 892
Penis	36 068	32	0.19	0.09	13 211	33	0.13	0.03	102 157
Kaposi sarkomu	34 270	33	0.18	0.03	15 086	32	0.15	0.01	82 033
Mezotelyoma	30 870	34	0.16	0.03	26 278	27	0.26	0.03	37 047
Vajina	17 908	35	0.09	0.04	7 995	35	0.08	0.02	44 613
Toplam	19 292 789	-	-	20.44	9 958 133	-	-	10.65	50 550 287

Erkeklerde en sık karşılaşılan kanser vakaları akciğer (%14.3) ve prostat (%14.1) kanserleri iken kadınlarda göğüs (%24.5) ve kalın bağırsak (% 9.4) kanserleri olmuştur. Erkeklerde en sık görülen akciğer kanserinin insidansı 31.5, prostat kanserinin insidansı 30.7 olmuştur. Kadınlarda en sık görülen göğüs kanserinin insidansı 47.8 ve kolon

kanserinin insidansı 16.2’ dir. Dünya genelinde en sık görülen 10 kanser türünün insidans ve ölüm oranları aşağıda (Çizelge 2.3.) verilmiştir (Globocan 2020).

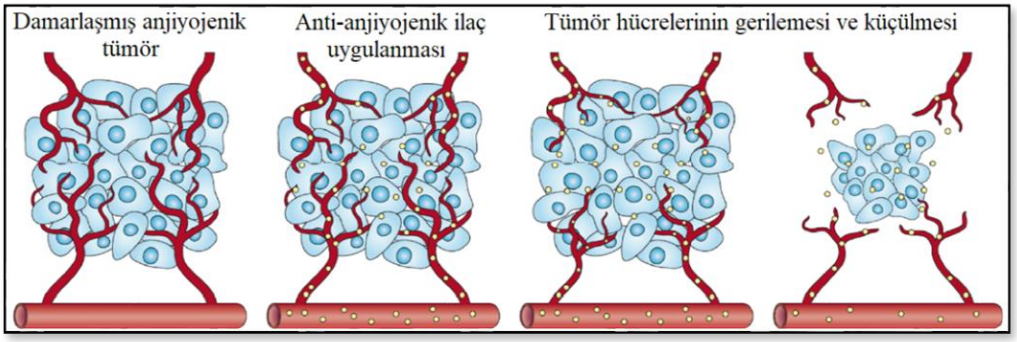
Çizelge 2.3. Yaşa göre standartlaştırılmış (Dünya) insidans ve ölüm oranları (her 100 000 de)



Kanser iyileştirilmesinde cerrahi yöntem, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi, hedefe yönelik tedavi ve bağışıklık sistemi geliştirme sık uygulanan tedavi türleridir. Bu tedavilerden bazıları beraber kullanılarak da iyileştirme çalışmaları yapılmaktadır.

Kemoterapi bu yöntemler arasında en çok tercih edilen tedavi yöntemidir ve kanser hücrelerine öldürücü etki yaparak işlevini gerçekleştirir. Bu tedavide kemoterapötik ajanlar çoğunlukla DNA kopyalamasını engeller. Doxorubicin, meme kanserinde; Camptothecin, kolon, akciğer, mide kanserlerinde; Gemcitabine, prostat ve akciğer kanserlerinde; Methotrexate, çocuklarda görülen lösemide; Cyclophosphamide, göğüs kanserinde; Paclitaxel,göğüs ve akciğer kanserlerinde; Docetaxel, göğüs, akciğer, baş ve boyun, prostat ve mide kanserlerinde; Cabazitaxel, prostat kanserinde kullanılan bazı kemoterapötik ajanlardır (Pommier ve Robert 2001).

Kanser tedavisinde kullanılan anjiyojen önleyici ilaçlar da tümörün büyümesi ve yayılmasını engelleyici bir yol izler. Anjiyojenez, dokuda yeni kılcal damarların oluşmasıdır ve bu metastaz oluşumuna neden olmaktadır. Kanser hücreleri, oksijen azlığı durumunda yeni kılcal damarlar oluşturmak üzere normal hücreleri uyarır ve böylece metastaza yol açar (Giuliano ve Pages 2013). Anti-anjiyojenik ilaçlar bu şekilde damarlaşmayı engeller ve kanser tedavisi için kullanılan bir uygulama halini alır (Şekil 2.14.).

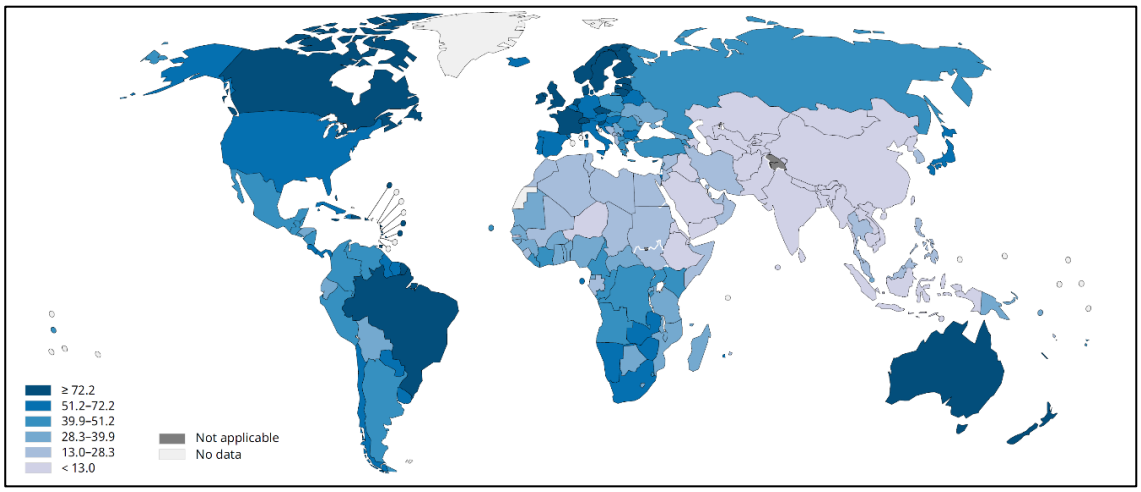


Şekil 2.14. Anti-anjiyojenik ajanların tümör üzerine etkisi

2.6.1. Prostat Kanseri

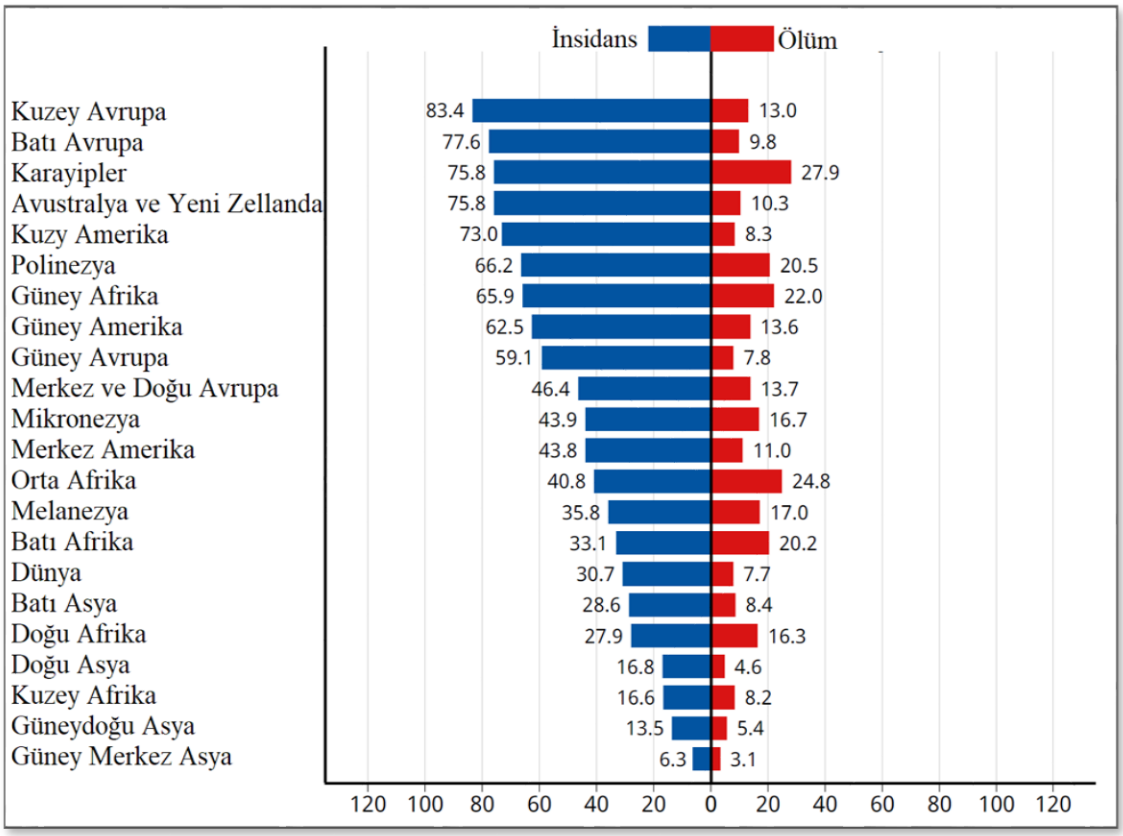
2.6.1.1.Prostat Kanseri Epidemiyoloji

Prostat kanseri, erkeklerde en sık karşılaşılan ikinci, genelde ise en yaygın görülen üçüncü kanser hastalığıdır. 2020 yılında dünya genelinde 1 414 259 yeni vaka olarak tespit edilmiş ve 375 304 kişi hastalıktan hayatını kaybetmiştir. Dünya genelinde ölüm sayısı olarak 8. sıradaki kanser türüdür. Prostat kanserinin önlenmesi ve tedavisi için doğal gıdaların tüketilmesi faydalı olarak görülmektedir. Türkiyede 2020 yılında yeni prostat vaka sayısı tahmini 19 444 kişi, ölüm sayısı ise tahmini 5 464 kişi olarak bildirilmiştir. Son yıllardaki araştırma ve tahminlere göre prostat kanseri insidansının ve mortalite oran değerlerinin, Asyalı erkeklerde daha düşük görüldüğü bildirilmiştir (Şekil 2.15 ve Çizelge 2.4) (Globocan 2020).



Şekil 2.15. Dünya geneli prostat kanseri insidansı (Globocan 2020)

Çizelge 2.4. Dünya geneli prostat kanseri insidans ve ölüm değerleri (her 100 000 de)



Prostat kanserinin tedavi edilmesi için SPION'lar günümüzde onaylanmış ilaç taşıyıcı manyetik nanopartiküller olarak yer almakta ve kullanılmaktadır (Gupta ve Gupta 2005, Ventola 2017). Nanopartiküllerin verimliliğini artırmak için biyouyumlu-biyoparçalanabilir amfifilik blok kopolimerler kullanılarak tümör hücrelerine geçiş artırılmakta ve hidrofobik ilaçların taşınması kolaylaştırılmaktadır (Xu ve ark. 2012). Polimer ile kaplı süperparamanyetik demir oksit nanopartikül ilaç sistemleri kontrol edilebilme ve araştırmalara uygunluğu açısından umut vadeden tedavi edici malzemelerdir.

2.6.1.2.Prostat Kanseri Risk Faktörü

Prostat kanserinin yaş ile ilişkisi oldukça belirgindir ve 40'lı yaşlara gelmeden kendisini gösterip sonraki yaşlarda hızlı ilerlemektedir. 65-74 yaşlarında ise malignitesi en yüksek seviyelere çıkar (Delongchamps ve ark. 2006). Prostat kanseri güçlü kalıtsal temellere dayanmakta ve nesiller arası aktarımı yüksek oranda gerçekleşmektedir. Sigara,

androjen konsantrasyonu, büyüme faktörleri ve obezitenin riski artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (MacInnis ve English 2006).

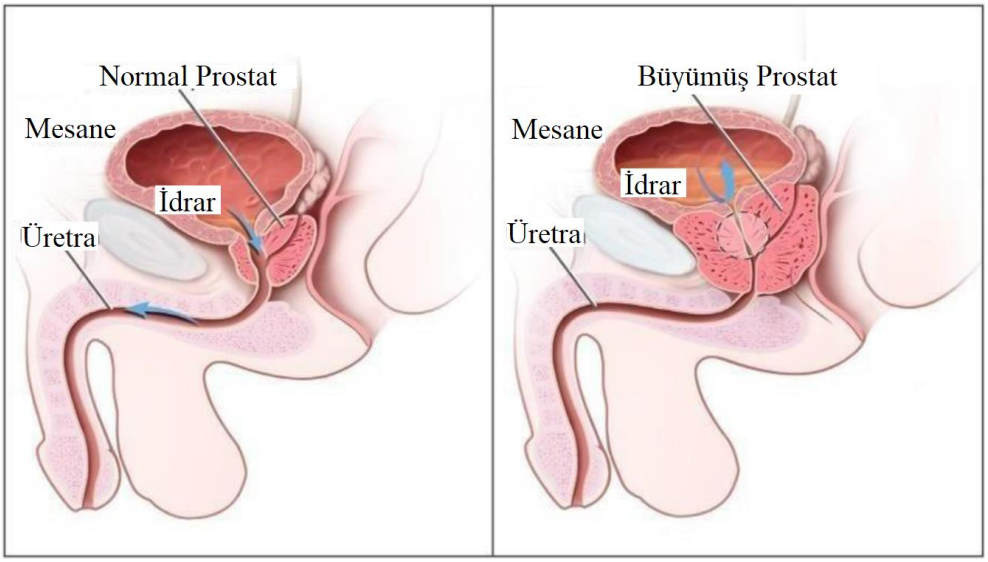
Yapılan bir çalışmada, farelere bir süre testosteron verildiğinde prostat kanserinin daha da ilerlediği (Noble 1977), başka bir çalışmada ise hayvanlar üzerinde kastrasyon ile salgıların azalması sağlandığı ve prostat kanserli hastalarda prostat büyüklüğünün olumlu etkilendiği (Kyprianou ve Isaacs 1988) bildirilmiştir. Bu türdeki çalışmalar androjen yoğunluluğunun prostat kanseri üzerine etkili olduğunu göstermiştir.

Prostat kanseri, coğrafi bölgelere, etnik gruplara ve ırklara göre farklılık gösterebilmektedir. Amerikalılar ve Avrupalılarda daha sık görülen bu hastalık Asyalılarda daha nadir olması yanında siyah ırkta da beyaz ırka göre daha yaygındır (Grönberg 2003). Bu oranların Asyalı erkeklerde düşük olmasının asıl nedenlerinden biri beslenme alışkanlıklarının ağırlıklı olarak doğal gıdalardan oluşmasıdır (Chen ve ark. 2014, Rodriguez-Casado 2016). Özellikle flavanoid içeren doğal gıdalar antiproliferatif ve antianjiyogenez özellikleriyle kansere karşı etkili olabilmektedir (Doleckova 2012). Ancak her ne kadar bu doğal maddelerin kanser üzerine olumlu etkileri bilinse de toplum tarafından yeterince kullanımı nadirdir. Flavanoidlerin zayıf emilimleri, çabuk elimine edilmeleri gibi özellikleri biyoyararlanımlarını da azaltmış ve uygun olmayan farmakokinetik şartlar oluşturmuştur (Siddiqui ve Sanna 2016, Kashyap ve ark. 2019).

Obezite, doymuş yağ asitleri, trans yağlar, beslenmede yüksek miktarda kalsiyum alımı prostat kanseri için risk faktörü olarak belirtilmiş; nar ve omega-3 yağ asitleri ise karsinojen maddelerin etkisini azaltması, bağışıklığı güçlendirmesi gibi özellikleri sayesinde prostat kanserini engelleyici gıdalar olarak bildirilmiştir (Chan ve Giovannucci 2001, Patel 2014).

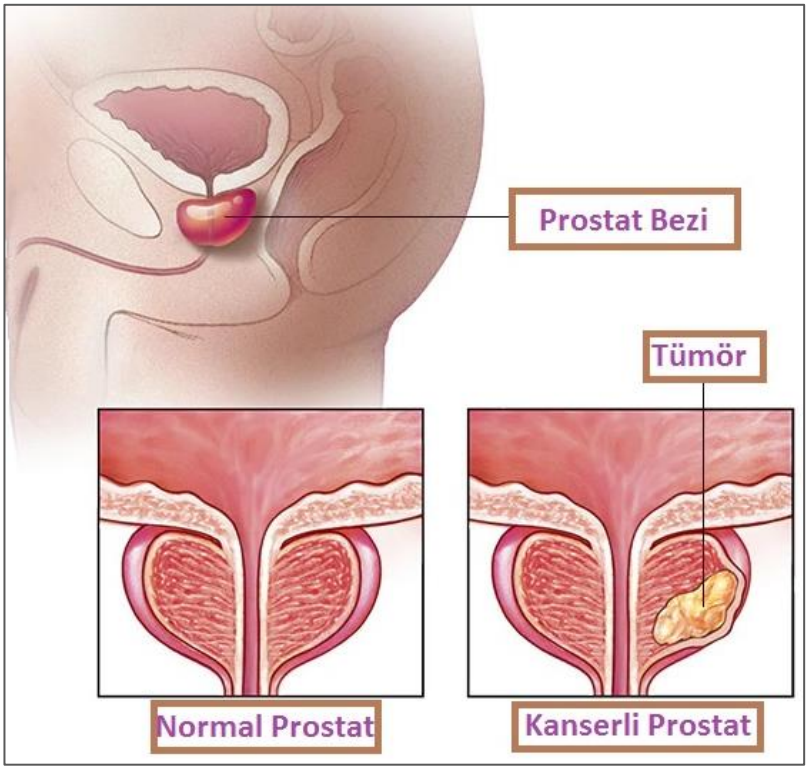
2.6.1.3.Prostat Bezi

Prostat, beyaz bir sıvı üreten ve sadece erkeklerde bulunan, oval şekilde, 3 cm uzunluk, 4 cm genişlik, 2 cm kalınlığa sahiptir küçük bir organdır. Prostat bezi 18 ila 20 gr arasında bir ağırlığa sahiptir ve ergenlikten sonra ceviz şeklini alır. Prostatik üretranın etrafına sarılı durumdadır. Bir erkekte 45 yaş prostatın büyümesi açısından önemli bir yaştır ve sonrasında yine büyümeye devam edebilir. Ancak bu büyüme Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) ismiyle bilinen doğal bir büyüme olarak ta gerçekleşebilir (Şekil 2.16) (Elmi 2020, Özsaraç 2020).



Şekil 2.16. Normal ve benign prostatik hiperplazi (Elmi 2020)

Prostat bezi yapısal olarak rektumun önünde, üretra prostatın ortasındadır ve idrarın vücuttan dışarı akmasına izin verir. Bu nedenle yaşla birlikte prostat bezinin büyüklüğündeki büyüme prostat kanseri riskini artırabilir (Şekil 2.17.) (Elmi 2020).

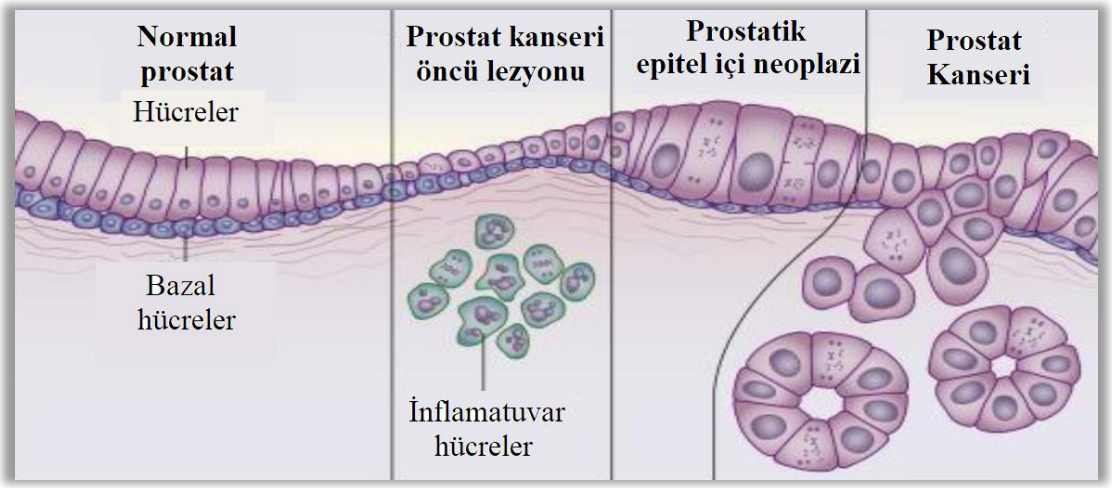


Şekil 2.17. Normal ve kanserli prostat hücresinin gösterimi (Bakır 2021)

Prostat kanserinin başlangıç noktası ve kaynağı prostat bezidir. Tümör, prostat bezini tamamen kapladıktan sonra, üretra, rektum, mesane, kalça gibi yakın bölgelere

metastaz gerçekleştirir. Aniden ivme kazanabilen ve tedavi edilmezse ölümcül olabilen bu hastalık dünyadaki erkeklerin büyük bölümü için önemli bir sorundur (Testa 2019).

Prostat bezinin farklı ve birden fazla yerlerinde eş zamanlı oluşabilen prostat kanseri, gelişme safhasını tamamladıktan sonra aktif olarak büyüyecek ve prostat sınırlarını aşarak yayılma gösterecektir. Bunun devamında vücuttaki sıvı organlarıyla tedavi edilemez etkileşimlere girecektir (Şekil 2.18) (Elmi 2020).



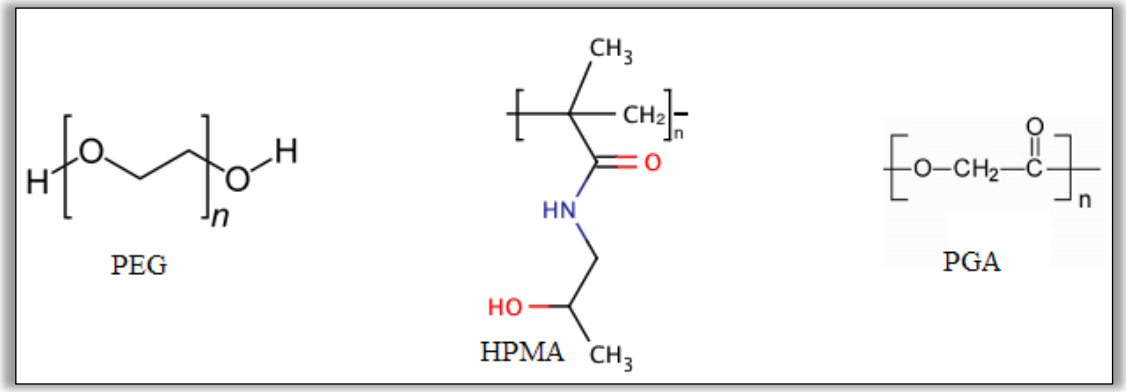
Şekil 2.18. Normal prostatın kanserli prostata ilerlemesi (Elmi 2020)

2.6.2. Kanser Hastalığında Polimer Tedavisi

Kemoterapi yaygın kullanılan bir kanser tedavi yöntemidir ve sistemik uygulanmasının sonucu olarak tüm vücut üzerinde etki gösterebilir. Dolayısıyla bu tedavi yöntemi sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Bu etkiler daha çok kan hücrelerinde, kalp, sindirim sistemi ve saç hücrelerinde ortaya çıkmaktadır. Bu hücrelerde ortaya çıkan yan etkiler büyük bir dezavantaja yol açmakta ve kullanılan ilaçlarda doz artırımına gidilmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca bu ilaçların çoğu hidrofobik yapıda olduğundan yardımcı ilaçlar kullanılmakta ve yardımcı ilaçların da yan etkilerinden dolayı sorunlar oluşmaktadır (Yanasarn ve ark. 2009, Zhang ve ark. 2010).

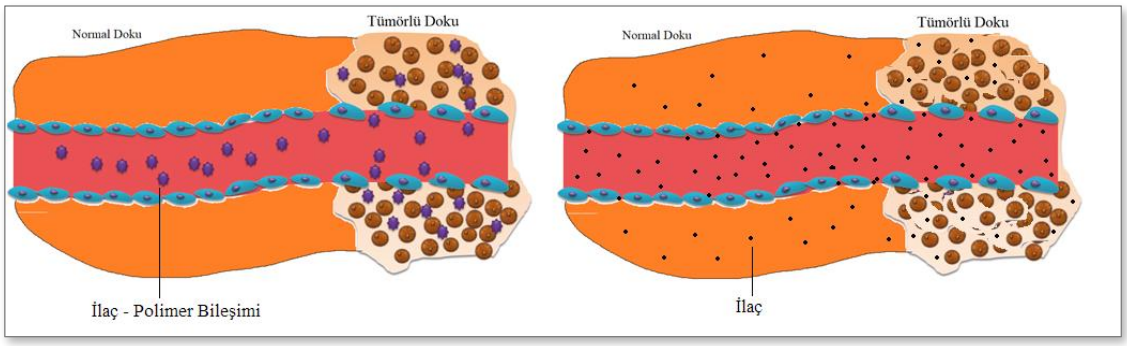
Böyle dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla biyouyumlu ve biyoparçalanabilir polimerler yardımıyla ilaçların taşınması tercih edilen bir yöntem olmuştur. Polimerlerden faydalanılarak hidrofobik yapıdaki ilacın sudaki çözünmesi

artırılır ve etkinliği iyileştirilir. Dahası, ilacın dış kısmında bulunan polimerler stabiliteyi ve yarı ömrü de artırarak biyolojik kalkan oluşturur. En yaygın kullanılan polimerler arasında polietilen glikol (PEG), poli(hidroksipropil metakrilat) (pHPMA), poli(glikolik asit) gibi hidrofilik polimerler yer alır (Şekil 2.19.).



Şekil 2.19. Suda çözünen, yaygın kullanımlı polimerler

Saf kemoterapi ajanları küçük moleküllü olduklarından endotel dokudan geçişleri ve sağlıklı hücreleri etkilemeleri daha kolaydır. Polimerler ise büyük moleküllerdir ve sağlıklı endotel yapılardan geçişleri zor iken kanserli dokulara geçişleri hasarlı yapılarından ötürü daha kolaydır (Şekil 2.20.). Bu olay Gelişmiş Geçirgenlik ve Tutma Etkisi (EPR) olarak adlandırılır (Maeda ve ark. 2000).



Şekil 2.20. Polimer tedavi ediciler için EPR etkisi

Kemoterapötik ajanların polimer yapısına konjugasyonu ile oluşan polimer ilaçlar kan dolaşımında iken inert özelliktedir ve bu sayede dokular bazı yan etkilere maruz kalmamış olur. Polimer ile ilaç arasındaki yapı kovalenttir ve ilacın hedef dokuya bırakılması önemlidir (Polyak ve ark. 2013). Bunun için polimer ilaç taşıma sistemlerinde

pH'a duyarlı ve enzimle parçalanabilen ara yapılar tercih edilir (Leriche ve ark. 2012, Ulbrich ve ark. 2004). Bu bağlayıcılar arasında enzimlerle parçalanabilen dipeptit veya oligopeptit yapıları da (ALAL, GFLG…vb) yaygın olarak kullanılan yapılardır (Sun ve ark 2013).

2.6.3. Kanser Hücrelerinde Polimer – İlaç Konjugasyonu

Kanser ilaçlarının boyutları çok küçük olduğu için sağlıklı dokulara yayılıp zarar verebildiği gibi, yine bu özelliğinden ötürü klirensi de düşüktür ve kullanılan dozun çok az bir miktarı tümörlü dokuya ulaşabilmektedir. Polimerlerle bağlanması sonucunda ise bu ilaçların sudaki çözünürlüğü, biyoyararlanımı, stabilitesi ve etkinliği iyileştirilmektedir. Son yıllarda araştırmacılar tarafından bu konuda yapılmış olan ve yapılan çalışmalar daha da popüler hale gelmiştir. Bu çalışmalar ışığında hali hazırda kullanılmakta olan ve klinik çalışmaları devam eden ilaçlar bulunmaktadır. Büyüme hormonu reseptor antagonisti, PEG - naloxol, PEG-irinotecan, PEG-docetaxel, PHPMA, camptothecin, karboksimetil dekstran, siklodekstrin camptothecin, poliglutamik asit-paclitaxel, poliglutamik asit camptothecin gibi ilaçlar; akciğer, göğüs, kolon, kalın bağırsak, ovül, mide kanserleri ve katı tümör üzerinde ticari olarak kullanılmakta veya faz çalışmaları yapılmaktadır (Rohini ve ark. 2013, Pang ve ark. 2013).

Birçok araştırma, polimerlerin molekül büyüklüğünün, ilaç etkisini önemli seviyede artıran özelliklerden biri olduğunu göstermiştir. Polimer ilaçlarının sağlıklı hücre epitel dokusundan geçmemesi yanında özellikle kanda kalış süresinin yani yarı ömrünün artması ilaç etkisi için oldukça önemlidir. Yüksek molekül ağırlığının bahsedilen farmakokinetik özelliğinden ötürü yarı ömürler en az 1000 kat artmıştır (Mehvar 2000). Bu sayede kan dolaşımında daha uzun süre kalabilmekte ve EPR etkisi yoluyla iyileştirmesi artmaktadır (Tomlinson ve ark. 2003).

Hidrofobik ilaç moleküllerinin polimerlere bağlanması konusunda ilaç yükleme kapasitesi dikkat edilmesi gereken bir konudur. Anti kanser ajanı sarmak için kullanılacak olan polimer miktarı arttıkça ilacın yüzde miktarı ve dolayısıyla da etkisi olumsuz değişmektedir. Çoğu polimer ilaç sisteminde bu değer %10'un altındadır.

Polimer ilaç uygulamalarında Docetaxel antitümör ajanı ile yapılmış çalışmaların birinde polimerin molekül ağırlığının DU-145 prostat kanser hücresi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan Docetaxel, N-(2-Hidroksipropil) metakrilamid

(HPMA) ile GFLG (Gly-Phe-Leu-Gly) oligopeptit bağlayıcısı kullanılarak konjuge edilmiştir ve bileşimin kütlece %6.80-%7.15 arasında ilaç içerdiğini bildirmişlerdir (Ray ve ark. 2011). Çalışmada molekül ağırlığı yüksek olan (87.1 kDa) hedeflenmemiş konjugatın serbest Docetaxel'e göre daha fazla anti tümör etki gösterdiğini ancak düşük molekül ağırlıklı (32.6 kDa) konjugatın Docetaxel'den (20-40 mg/kg) daha az etkin olduğunu bulmuşlardır.

HPMA-Docetaxel konjugatlarını içeren bir başka çalışmada ise pH'a duyarlı Levulik asit (LEV) bağlayıcı kullanılmış ve fizyolojik ortamda (pH 7.4) kararlı iken pH azalınca (pH 5.0) bozunabilen bir polimer ilaç sentezlenmiştir (Etrych ve ark. 2010). Çalışılan in vivo modelde EL4 T lenfoma hücresi üzerinde anti tümör özellikler tespit edilmiştir.

Bu gibi örneklerin yanısıra kütlece %37'ye yakın ilaç içeren PGA-Paclitaxel polimer ilaç çalışması yapılmıştır. Çalışmada, kütlece yüksek ilaç içeriğine rağmen suda çözünürlüğünün yüksek olduğu ve yarı ömrün serbest paclitaxele göre daha uzun olduğu bildirilmiştir (Singer 2005).

2.6.4. Kanser Hücrelerinde Misel Polimerik Nanopartikül Kullanımı

Biyouyumlu nanopartiküller, en genel ifadeyle vücuttaki tümör spesifik yayılımlarından ötürü, kanser hastalıklarında, ilaç taşıma ve salınımında önemli bir yer edinmiştir.

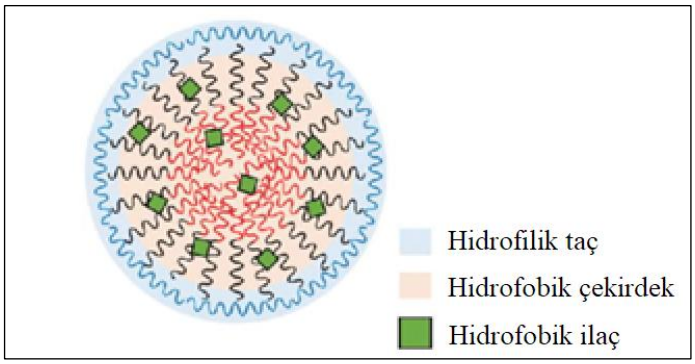
Asimetrik kopolimerlerin kendiliğinden birleşmesi (self–assembly) misel polimerik nanopartiküllerin oluşumunda önemli bir yöntemdir. Kendi kendine birleşme ile ilgili çalışmalar 1990'lı yıllarda başlamış ve sonrasında farklı özelliklere sahip polimer zincirleri ile amfifilik blok kopolimer çalışmaları artış göstermiştir (Zhang ve Eisenberg 1995, Blanazs ve ark. 2009, Mai ve Eisenberg 2012).

Misel polimer nanopartikül ilaçları arasında klinik çalışmaları devam eden bazı örnekler Çizelge 2.5.'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Kanser tedavisi klinik safhadaki bazı misel nanopartiküller (Anselmo ve Mitragotri 2016)

Nanopartikül	Yapısı	Kullanım	Klinik Aşama
AZD2811	Aurora B kinase inhibitor	Gelişmiş katı tümör	Faz I
BIND-014	PSMA hedefli Docetaxel PEG-PLGA veya PLA-PEG	Prostat, akciğer, rahim ağzı, baş ve boyun kanserleri	Faz I/II
Cynviloq IG-001	Paclitaxel polimerik misel nanopartikül	Göğüs kanseri	Faz I
Genexol- PM	Paclitaxel polimerik misel nanopartikül	Göğüs kanseri, baş ve boyun kanserleri	Faz II/IV
NC-6004 Nanoplatin	Poliamino acit, PEG ve cisplatin türevi misel NP	Gelişmiş katı tümör, akciğer, safra kesesi, pankreas kanserleri	Faz I/II/III
NC-4016 DACH-Platin micelle	Poliamino acit, PEG ve oxaliplatin NP	Gelişmiş katı tümör veya lenfoma	Faz I
NK105	Paclitaxel misel	Göğüs kanseri	Faz III
Docetaxel- PM DOPNP201	Docetaxel misel	Gelişmiş katı tümör, baş ve boyun kanserleri	Faz I/II
CriPec	Docetaxel misel	Katı tümörler	Faz I
CRLX301	Siklodextrin temelli NP Docetaxel konjugasyonu	Gelişmiş katı tümör	Faz I/II

Klinik safhadaki bu ilaçların dışında, onaylanmış Doxil/Caelyx, DaunoXome, Myocet, Abraxane, Marqibo, MEPACT, Onivyde MM-398 gibi kullanılmakta olan bazı ilaçlar da polimerik misel nanopartiküllerden oluşmaktadır (Anselmo ve Mitragotri 2016).

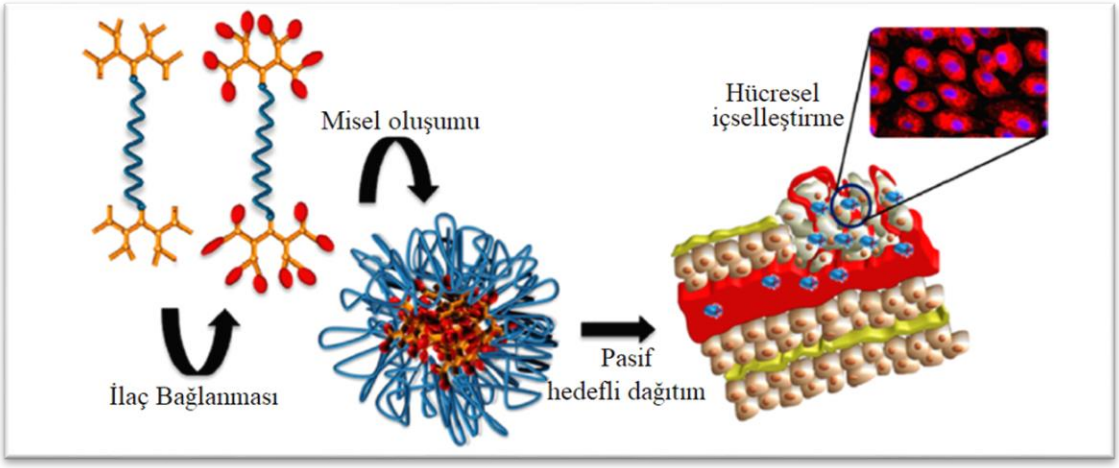


Şekil 2.21. Polimerik misel (Keum ve ark. 2018)

Polimerik miseller, hidrofobik ilacın yüklendiği hidrofobik bir çekirdek ve suda çözünmeyi sağlayacak hidrofilik kabuktan oluşur (Şekil 2.21). Bu misel polimer

nanopartiküller, ikili veya üçlü amfifilik blok kopolimerlerin kendiliğinden birleşmesi sonucu oluşur. Hidrofobik çekirdeğin içine hidrofobik ilacın yüklenmesi, kendiliğinden oluşum reaksiyonu sırasında gerçekleştirilebileceği gibi polimerin oluşumu sonrasında da gerçekleştirilebilir. Diğer nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajlarını sağlayan polimer misel nanopartiküllerin karaciğer, dalak ve böbrekte birikmesi gibi dezavantajları vardır. Bu zorluğun üstesinden gelinmesi için PEG-b-poli-(L-glutamik asit) ve oksaliplatinin konjugasyonu ile tasarlanmış misel çalışmaları bulunmaktadır (Miura ve ark. 2013).

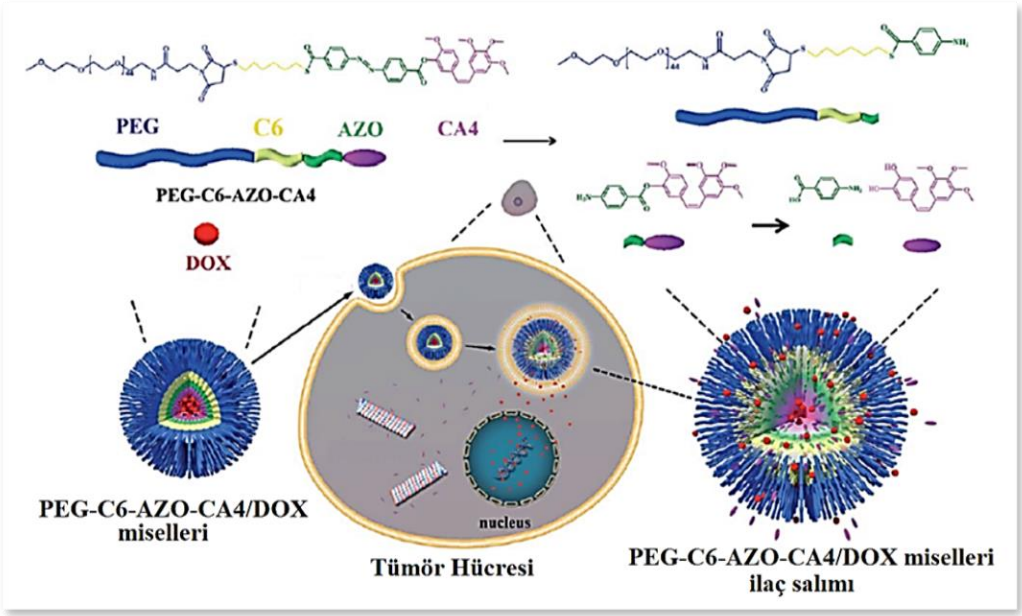
Nanopartikül ilaç tasarımlarında etken maddenin kontrollü bir şekilde salınım yapması ve bunun devamlılığı dikkat edilmesi gereken bir noktadır. Bağlayıcı olarak kullanılan yapılar bu konuda etkili olmakta ve önem teşkil etmektedir. Bu konuda ilaç içeriğini zengin tutmak için ester yapısındaki bağlayıcı kullanarak kovalent bağlanma sağlanmış sistemlerde de ilaç salınımının sürekliliği adına başarı sağlanmıştır (Şekil 2.22) (Bolu ve ark. 2016).



Şekil 2.22. Combretastatin-A4 ekli çiçek tipi triblok miseller ve hücre içselleştirilmesi (Bolu ve ark. 2016)

Polimerik nanopartiküller, ikili tedavi uygulanmasına yatkın malzemelerdir. Bu sayede ilaçların sinerjizma oluşturma özelliklerinden faydalanılabilmekte ve tümör üzerinde daha etkin sonuçlar elde etmeyi sağlayabilmektedir. Liu ve ark. (2015), Combretastatin-A4 ve doksorubisin ilaçlarını kullanarak hipoksiye duyarlı miseller oluşturmuştur. Bu ilaçlar antianjiyojenik ve antimitotik etkili olup misel sentezinde bağlayıcı olarak azobenzen kullanılmış ve PEG polimerine bağlanmıştır. Dimetil

sülfoksit (DMSO) içindeki Doxorubicin hidrofobik çekirdeğe kapsüllenmiştir. Sonuç olarak başarılı Doxorubisin salınımı gerçekleştirmiş ve mekanizmanın kanser tedavisinde faydalı olacağını ileri sürmüşlerdir (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Misel oluşumu ile kombine ilaç salınımı (Liu ve ark. 2015)

Kendinden birleşme yoluyla polimerik nanopartikül oluşturma, farklı morfolojik özelliklere sahip farklı nanopartiküllerin sentezinde kullanılan faydalı bir yöntemdir. Kendiliğinden birleşme yöntemiyle hazırlanan ve Doxorubicin bağlanan bir başka çalışmada da misel, solucan, çubuk ve vezikül tipi nanopartiküller sentezlenebilmiştir ve ilaç yüklü polimerik nanopartiküllerin sitotoksisite özelliklerinin de etki sonuçları ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Karagöz ve ark. 2014).

2.7. Sitotoksisite Testleri

2.7.1. MTT Testi

Hücrenin yaşayabilirlik testi, araştırılan maddenin sitotoksik özellik gösterip göstermediği ile eğer sitotoksik ise bu özelliğin hangi dozlarda ve ne düzeyde görüldüğünün tespit edilmesine yarayan bir testtir. En yaygın tercih edilen hücre canlılığı testlerinin başında MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testi gelmektedir. Zamanla çoğalan hücrelerin mitokondriyel dehidrojenaz enzimleri vasıtasıyla sarı renkteki tetrazolyum tuzları formazana dönüştürülür. Bu formazan

kristalleri DMSO (dimetil sülfoksit) içerisinde çözünerek negatif kontrole karşı hücre canlılığı, spektrofotometre ile ölçülerek, yüzdelik değerinde belirlenir (Mosmann 1983).

MTT testi dışında; nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetil-amino-2-metilfenazin hidroklorür) alımı (NRU) testi, kristal viyole testi, MTS [5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3-(4-sülfofenil)] testi, XTT [2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid] testi ve Wst (suda çözünen tetrazolyum tuzları testi de kolorimetrik olarak sitotoksisite ölçümünde kullanılabilen testlerdir. MTT testi dışındaki bu testlerin hücre içinde kristal oluşması, iyi çözünememe, şartlardan kolay etkilenme, pahalı olma gibi olumsuzlukları bulunmaktadır. Buna karşın MTT testi güvenirliği ve tekrarlanabilirliği yüksek, sitotoksisitenin ve proliferasyonun belirlenebildiği bir testtir (Erkekoğlu ve Baydar 2021). Farklı hücre tipi ve hücre sayılarında, kemoterapötik ajana verilen yanıtı ölçmek için kullanılabilen MTT testinin, sadece yapışkan hücre hatlarında uygulanabilmesi ise bu testin olumsuz yanıdır (Loosdrecht ve ark. 1994).

2.7.2. Apoptoz Testi

Nekroz ve Apoptoz başlıca iki hücre ölüm şeklidir ve hücre ölümü normal fizyolojik bir olaydır. Nekroz hücrenin şişip parçalanması şeklinde gerçekleşir ve hücrenin denetimi altında gerçekleşmez. Yani hücrenin kendi isteği ile ölmediği patalojik bir süreçtir (Kane 1995). Apoptozda ise hasarlı hücrelerin denge ve canlılığı sürdürmek için fizyolojik ölümü gerçekleşir (Hockenbery 1995). Bu süreç genetik düzenlenmeye sahip, programlanmış aktif bir süreçtir.

Eski Yunancada yaprak dökümü anlamına gelen ‘apoptoz’, hücrelerin genellikle makrofajlar vasıtasıyla fagosite edilmeleri ve hücrenin konumundan ayrılması şeklinde gerçekleşir (Cummings ve ark. 1997). Apoptoz, belirli bir dokudaki tüm hücreler üzerinde değil, daha çok farklı bölgelerdeki hasarlı hücreler üzerinde etki gösterir. Hücre çekirdeğindeki DNA'nın, küçük bazik proteinler ile beraber oluşturduğu kromatinin altında gerçekleştirdiği değişiklikler apoptozun oluşturduğu ilk morfolojik farklılıklardır. Aynı anda hücre bağlantı noktalarını koparark ortamdan ayrılır. Makrofajlar veya komşu hücreler tarafından parçalanan apoptotik hücre, intraselüler kalıntı bırakmadığından, komşu hücrelere zarar vermez (Kerr ve ark. 1994, Cummings ve ark. 1997).

Apoptoz, embriyonik dönemde parmak aralarındaki hücrelerin yok olması ve sinir sisteminin oluşması, kemik iliğinde üretilen kan miktarının dengede tutulması, emzirmeyi tamamlayan dişilerde süt bezlerinin değişimi gibi fizyolojik olaylarda rol oynar. Bunun yanında diyabet, Alzheimer, AIDS, oksidatif stres gibi patalojik olaylarda da apoptoz meydana gelmektedir. Genellikle kalsiyum, Bcl-2 molekülleri, p53, kaspazlar, sitokrom-c proteinleri ve mitokondriyonlar apoptozun programlanmasında etkilidir (Coşkun ve Özgür 2011).

Apoptozu hücre içi ve hücre dışı sinyaller başlatabilir. DNA'da hasar oluşması, kalsiyum iyonlarının veya asitliğin artması, metabolik hatalar ve hipoksi hücre içi sinyallerdendir. Hücre çoğalması etkenlerinin yetersizliği, radyasyon ve toksinler gibi dış etkenler, ölüm reseptör sinyalleri ise hücre dışı sinyallerdir (Danial ve Korsmeyer 2004).

Apoptozun değerlendirilmesi için hücre boyutlarının küçülmesi ve DNA kapsamının azalması vasıtasıyla, akan hücre ölçer (akış sitometrisi-flow sitometri) kullanılır (Cummings ve ark. 1997). Akış sitometrisinin temelinde, hücrelerin elektron deteksiyonu içerisinden hareketi söz konusudur. Bu sayede karakteristik özellikler birçok parametrede ölçülebilir. Floresans ile aktive edilen hücre sıralama (FACS) güvenilir, spesifik ve kantitatif ölçüm yapılabilen bir akış sitometri tekniğidir. FACS apoptoz tespitini, DNA parçalanması, mitokondriyal membran stabilitesi, kaspaz aktivitesi gibi ölçümleri kullanarak yapabilmektedir (Tuchin ve ark. 2011).

Fosfatidilserin, apoptoz sırasında zarın iç kısmından dış kısmına doğru taşınır. Annexin V fosfatidilserin ile kalsiyum bağımlı olarak etkileşir. Bu sayede Annexin V'nin floresan ölçümü ile apoptotik hücreler belirlenir. Nekrotik hücrelerde benzer durumun oluşması sonucunda hatalı ölçüm yapılmaması için propidyum iyodür ile de boyama yapılır (Taatjes ve ark. 2008, Demchenko 2012).

Akış sitometrisi dışında, kaspazların (-3, -8 ve -9) ölçümleri, terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP uç işaretleme (TUNEL) tekniği de kullanılmaktadır. Apoptoza etki eden proteinlerin ekspresyonu da iyi bir biyogöstergedir. Ancak hücre bilgisini kontrole göre oranlayarak, yüzde verisi elde etmek sadece akış sitometrisi ile mümkündür (Erkekoğlu ve Baydar 2021).

2.7.3. Hücre İçi ROS Üretimi Ölçümü

Dış orbitallerinde bulunan eşlenmemiş elektron taşıma nedeniyle etrafındaki maddelerle reaksiyona girme aktiflikleri fazla olan yüksek enerjili atom veya moleküllere serbest radikal denir. Serbest radikalin oksijen kaynaklı olanlarına Reaktif Oksijen Türleri (ROS) adı verilir (Bast ve ark. 1991, Halliwell ve Gutteridge 1999, Valko ve ark. 2007).

Oksijen, oksijenli solunum yapan canlılarda, vücut fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için gerekli olan biyo-organik moleküllerin vazgeçilmez bir yapıtaşıdır. Metabolik aktivitelerin sürdürülmesinde yer alan oksijenin büyük çoğunluğu mitokondride harcanır ve %1-3'ü ROS'a dönüşür. ROS vücutta düşük yoğunlukta bulunduğunda fagositoza, lenfositlere ve makrofajlara destek olarak enfeksiyon ve kansere karşı olumlu etkiler oluşturabilir. ATP üretimi, hücre büyümesi ve Ca salınımı gibi hücresel aktiviteleri indükleme özellikleri de faydalı olabilecekleri fonksiyonlar arasındadır (Lander 1997, Fang ve ark. 2002, Devasagayam ve ark. 2004, Valko ve ark. 2007).

Ancak, lipitler, proteinler, DNA ve karbonhidratlar üzerinde olumsuz etkileri söz konusudur. Hücre içi membranlarda yer alan lipitler, peroksidasyonu sonucu son derece zararlı maddelere dönüşebilen hassas yapılardır. Proteinlerin fonksiyonlarında ve enzimlerde oksidasyon oluşması ile de protein hidroperoksitler oluşur. Bu yapılar oldukça kararlı, reaktif moleküllerdir ve metal iyonları ile reaksiyon vererek tehlikeli radikaller meydana getirebilirler. OH^- gibi reaktifler DNA'da parçalanmaya neden olabilir ve poli sentetaz enziminin indüklenmesiyle apoptoz oluşumu meydana gelebilir. Yine bu gibi reaktifler, karbonhidrattaki karbon zincirinde dehidrojenasyona neden olarak radikaller üretebilirler (Fang ve ark. 2002, Devasagayam ve ark. 2004).

Reaktif oksijen türlerinden biri olan süperoksit (O^{2-}) genellikle mitokondride oluşan ve çeşitli hastalıkların fizyolojisinde yer alan bir radikaldir (Valko ve ark. 2007).

Yapı itibariyle serbest radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2), membranlar üzerine etki ederek, Fe^{+2} ve Cu^+ veya diğer geçiş metallerinin oksidasyonu sonucunda, OH^- reaktif oksijen türünün oluşmasına neden olur (Sundaresan ve ark. 1995). Hidroksil radikali yüksek kimyasal aktivitesi nedeniyle diğer ROS'lardan daha tehlikeli olabilir. Fenton reaksiyonu denilen bu oluşumda süper oksit de rol alır. Böylelikle Haber-Weiss reaksiyonu meydana gelir (Lloyd ve ark. 1997, Halliwell ve Gutteridge 1999, Betteridge 2000).

Oksidatif stres DNA hasarı oluşmasında önemli rol oynar. Hidroksil radikalleri DNA bazlarında bulunan doymamış karbonlara hidrojen ekleyerek veya metil gruplarında dehidrojenasyona neden olarak reaksiyona girer (Breen ve Murphy 1994). Oksidatif DNA hasarını belirlemek için, en kolay oksidasyona maruz kalan guaninin mutasyona uğrayarak oluşturduğu, 8-OHdG kullanılır (De Martinis ve De Lourdes 2002).

8-OHdG, hücre içi ROS oluşumundan ötürü modifiye olmuş bir baz ürünüdür ve ROS oluşumu kaynaklı 20'den fazla DNA hasarı ürününden en kolay oluşanıdır (Dizdaroğlu 1998). Hidroksil radikalinin guanin molekülünün 8. karbonu ile etkileşmesi sonucunda oluşan radikal, bir H^+ ve elektron kaybederek 8- hidroksiguanin (8-OHGua) oluşturur (De Martinis ve De Lourdes 2002). Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA hasarının miktarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir metot halini almaktadır (Helbock ve ark. 1999).

DNA lezyonlarının tespitinde analitik yöntemler; immunokimyasal yöntemler, elektroforez, ve kromatografik yöntemler (Kütle spektroskopi dedektörlü sıvı ve gaz kromatografileri) kullanılmaktadır (Dizdaroglu ve ark., 2002).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmalar süresince gerekli cihaz ve kimyasal madde açısından ticari örneklerin en geçerli olanları kullanılmaya çalışılmıştır.

3.1.1. Alet ve Cihazlar

Bu çalışmanın büyük çoğunluğu Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında bir kısmı ise Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Mardin Artuklu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Süper paramanyetik demir oksit nanopartiküllerin su ve NH_3 ortamında sentezi, sitrik asit, dipeptit ve pluronik F127 ile kaplanması, Docetaxel bağlanması safhaları, karakterizasyon hazırlıkları ve sitotoksisite deneyleri için numunenin uygun hale getirilmesi işlemleri Dicle Üniversitesinde yapıldı. Ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan ölçümleri, Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Kanser, Nanobilim ve Toksikoloji Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı. Çizelge 3.1.'de çalışma süresince faydalanılan araç-gereç ve cihaz listesi verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Markası
ICP-MS	Bruker Aurora M90, Quadrupole ICP-MS
Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı	Heidolph
VSM	Model P525 Ölçüm Sistemi - Quantum Design
SEM	LEO-Evo 40 XVP
XRD	Panalytical Emryria
Ultra Saf Su Cihazı	Sartorius Arium Comfort
Etüv	Protherm
Derin dondurucu	Uğur Ev Tipi Buzdolabı ve Dondurucu
Sonikatör	Sonics
TEM	Jeol /JEM-1010 (MegaScan model 794).
Mikroplate Okuyucu	SpektramaxM5
Floresan Mikroskopu	Olympus CKX 51, DP73
Flowsitometri	BD FACSVia
Mikropipetler	Eppendorf
UV Spektrofotometre	Varian
Otoklav	Hirayama
CO_2 İnkübatör	New Brunswick Galaxy 170s
Laminar Kabin	Telstar, Class II Tip
Vorteks	Isolab
Mantolu Manyetik Isıtıcı	Electrothermal Ema0500

Karakterizasyon işlemlerinin büyük kısmı için hizmet alımı yapıldı, ICP-MS ile kantitatif Fe analizi Mardin Artuklu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan insan kanserli prostat hücresi (PC3) ve insan normal prostat hücresi (PNT1A) ile ilgili uygulamalar, Dicle ve Harran Üniversitelerinde iş birliği içinde yürütülmüştür. Hücre taşınması gerektiği durumlarda laboratuvarların sıvı azot tankları kullanıldı ve elden taşındı. Hücrenin yaşayabilirliği testi çalışmaları her iki üniversitede, apoptozis ve ROS analizleri ise Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne ait laboratuvarlarda yapıldı.

3.1.2. Reaktifler ve Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıkta olup çoğu Merck ve Sigma Aldrich firmalarından temin edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal ve Biyokimyasal Malzemeler	Markası
$FeCl_3.6H_2O$	Sigma-Aldrich (S.A)
$FeCl_2.4H_2O$	(S.A)
Sitrik Acit	(S.A)
Pluronic F127 (PEG-PPG-PEG)	(S.A)
LEU-GLY (lözin-glisin dipeptit)	(S.A)
***Escherichia coli* (ATCC 25922)**	Refik Saydam Sağl. Mer.
***Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)**	Refik Saydam Sağl. Mer.
***Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)**	Refik Saydam Sağl. Mer.
***Candida albicans* (ATCC10231)**	Refik Saydam Sağl. Mer.
PC3 Hücre Hattı	Rockville, MD
PNT1A Hücre Hattı	Rockville, MD
DMEM/F12	(S.A)
RPMI-1640	(S.A)
Fetal Sığır Serumu (FBS)	(S.A)
Penisilin – Streptomisin	(S.A)
Trypan Blue	(S.A)
MTT Formazan	(S.A)
Docetaxel	(S.A)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	(S.A)
Annexin V Apoptosis Det. Kit I (556547)	BD Biosciences
Muse Oxidative Stress Fit MSDS-MHC100111	Millipore-Merck
Acridine Orange	(S.A)
NH_4OH	(S.A)
1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH)	(S.A)
Nutrient Broth (NB)	(S.A)
Aseton	(S.A)
N-Hidroksisüksinimid (NHS)	(S.A)
1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid	(S.A)
Etanol	(S.A)
Trypsin EDTA	(S.A)
Hekzafloro izopropanol (HFIP)	(S.A)
Diklorometan	(S.A)
$NaHSO_3$	(S.A)
Agar	Difco
Fosfat tamponu (PBS)	(S.A)

3.2. Metotlar

3.2.1. Sentez Prosedürleri

Nanopartiküllerin sentezlenmesinde uluslararası geçerliliği olan metotlardan faydalanılmıştır.

3.2.1.1. Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Sentezi

Manyetik demir oksit nanopartiküllerinin sentezi için $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, mol oranı 2:1 olacak şekilde kütle hesaplaması yapılarak tartıldı. Tuzları çözmek için 40 mL saf su kullanıldı. Daha sonra 10 dakika ultrasonikasyona tabi

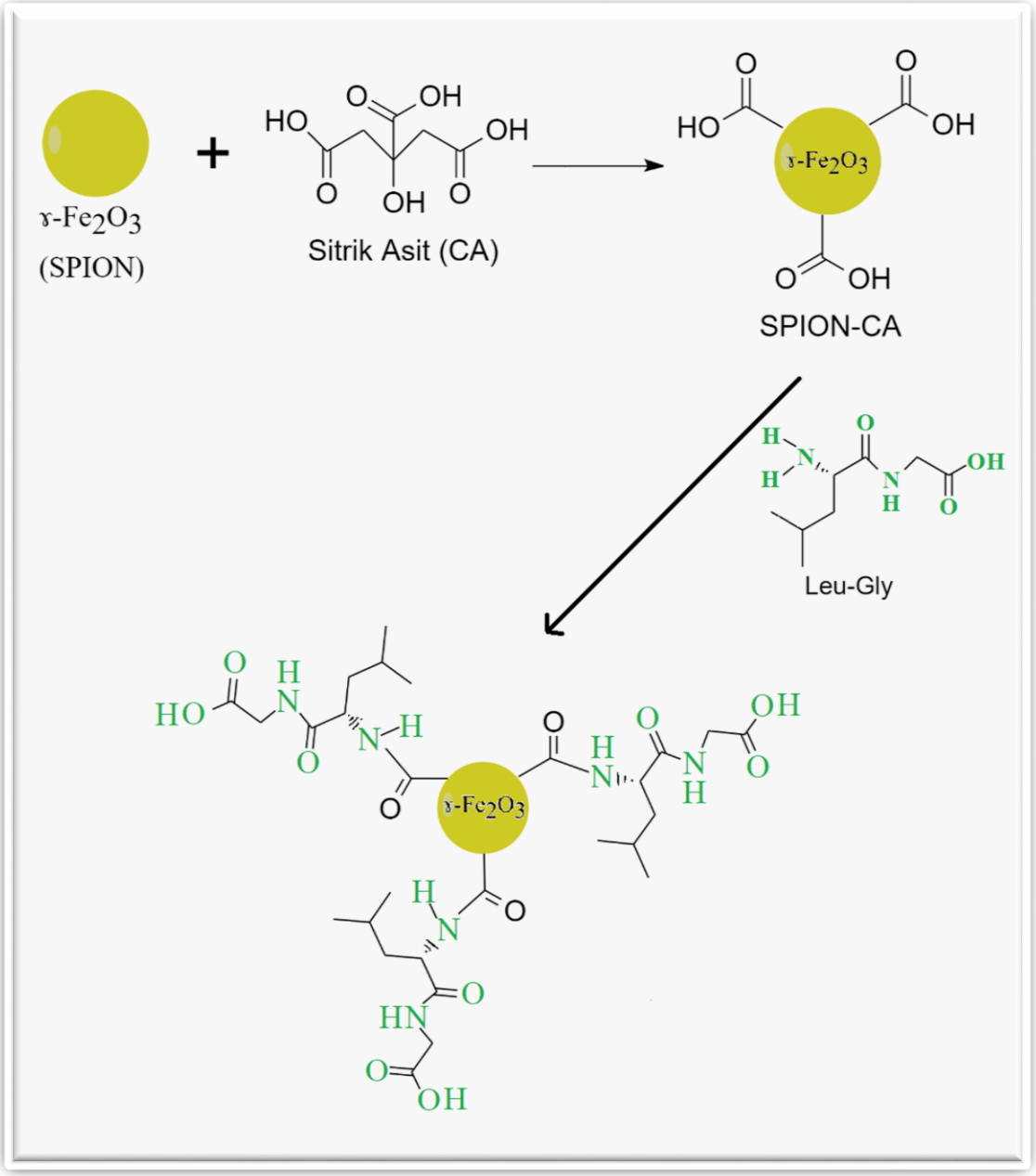
tutuldu. 70°C'de manyetik karıştırma yapılırken 0.1 mL/dak. akış hızında üzerine 10mL NH_4OH (%5, v/v) eklendi (Darezereshki 2010, Kılınç 2016a). Bu aşamada Süper Paramanyetik Demir Oksit Nanopartiküllerinin (SPION) oluşumu siyah çökelti ile gözlenmiştir (Kılınç 2016a,b, Özdemir ve ark. 2018).

3.2.1.2. Sitrik Asit (CA) Kaplanması

Manyetik karıştırıcıda oluşturulan SPION'lar üzerine biyouyumluluk, biyoparçalanabilirlik ve aglomerasyon önleme katkılarından ötürü, karıştırma devam ederken, sitrik asit eklendi. Aynı zamanda sitrat ile kaplanmış demir oksit nanopartiküller, oksitlenmeye karşı daha stabildir (Bee ve ark. 1995). Oluşan karışıma 100 mg sitrik asit (CA) eklenerek 70ºC'de manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı (Sousa ve ark. 2013). Bir gece inkübe edilen sitrik asit kaplı ɤ-Fe_2O_3 (ɤ-Fe_2O_3–CA), magnet yardımıyla ayrılarak nötral süzüntü elde edilene kadar sırasıyla saf su, etil alkol ve aseton ile yıkandı. Nötral hale getirilen örnek etüvde 70ºC'de kurutuldu.

3.2.1.3. Nanopartiküllerin Dipeptit ve Pluronik F127 ile Kaplanması

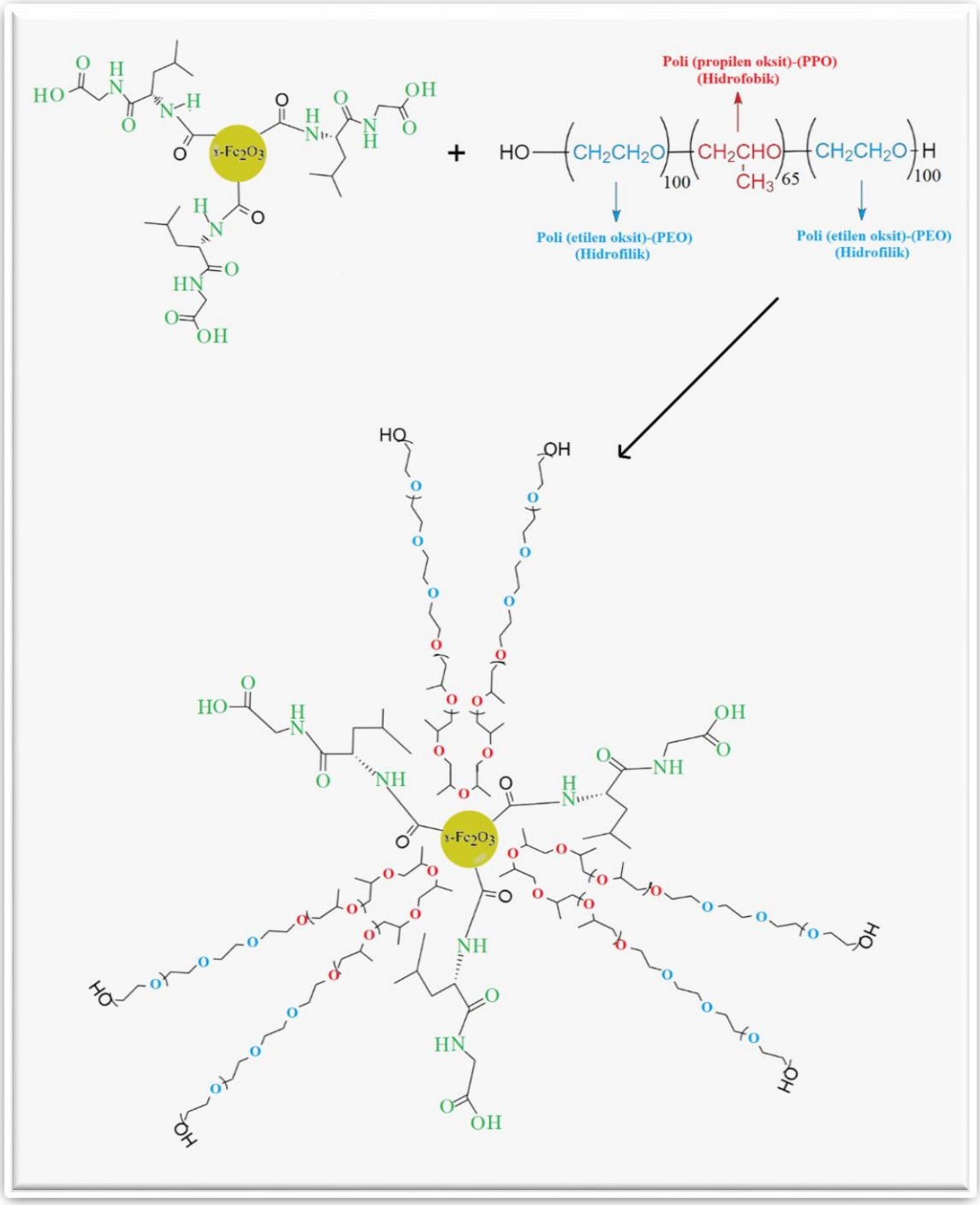
Hazırlanan nanopartikülün 400 mg'ı 20 mL saf su içerisinde ultrasonik banyoda homojen hale getirildi. Sonra üzerine 100 mg Leu-Gly dipeptidinin 1 mL 0.01 M PBS içerisinde çözülmesi ile hazırlanan çözelti ilave edildi. Oluşan karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla 37ºC sıcaklıkta gece boyunca karıştırılmaya bırakıldı. Fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller Neodimyum mıknatıs (NdFeB) ile ayrıldı ve saf su ile yıkandı. Sentezlenen nanopartikülün muhtemel yapısı belirlenmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Maghemite önce sitrik asit, sonrasında Leu/Gly dipeptiti bağlanması sonucu oluşan nanopartikülün muhtemel yapısı

Leu-Gly ile bağlanmış nanopartiküller diklorometan ile dispers edildi ve %10' luk $NaHSO_3$ ile yıkandı. Manyetik nanopartiküller mıknatıs yardımıyla tekrar ayrıldıktan sonra 20 mL distile suda, ultrasonik su banyosu yardımıyla, homojenize edildi. Ardından 3 mL distile su içerisinde 100 mg Pluronik F127 çözeltisi hazırlandı ve nanopartiküllerin su içerisindeki karışımlarına eklendi. Karışım gece boyunca manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı (Yallapu ve ark. 2012, Yiu ve ark.

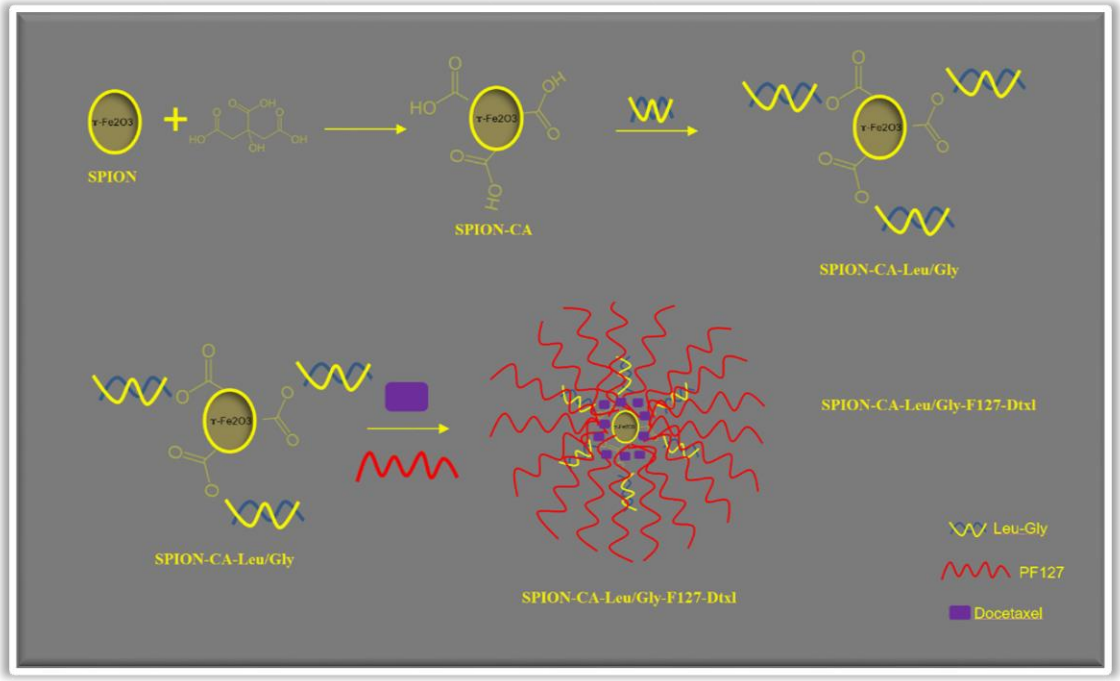
2012, Prashanth ve ark. 2016). Sentezlenen nanopartikülün muhtemel yapısı belirlenmiştir (Şekil 3.2.) (Zhaoyang ve ark. 2009, Cheraghipour ve ark. 2012).



Şekil 3.2. SPION-CA-Leu/Gly nanopartikülüne Pluronik F127 bağlanması sonucu oluşan nanopartikülün muhtemel yapısı

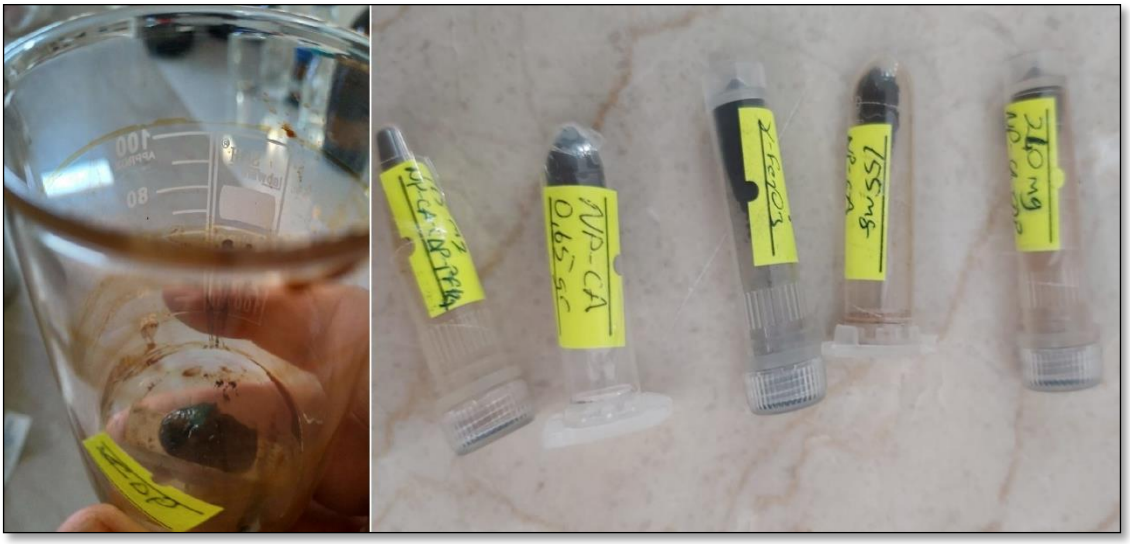
3.2.1.4. Docetaxel Bağlanması

Sitrik asit, dipeptit ve pluronik F127 ile kaplanmış süper paramanyetik demir oksit nanopartiküller (SPION-CA-Leu/Gly-PF127) NdFeB mıknatıs ile ayrılıp etüvde kurutuldu. Polimer kaplı 10 mg nanopartikül tartıldı ve literatürdeki ilaç yükleme protokolüne göre 1:10 oranında Docetaxel yüklemek için hazırlandı. Bunun için tartımı yapılan nanopartiküller 2.75 mL distile suda homojenize edildikten sonra üzerine 250 µL asetonda çözünmüş 1 mg Docetaxel eklendi ve gece boyunca ışıksız ortamda çalkalanmaya bırakıldı (Prashanth ve ark. 2016). Sentezlenen nanopartikülün muhtemel yapısı belirlenmiştir (Şekil 3.3.) (Zhaoyang ve ark. 2009, Cheraghipour ve ark. 2012).



Şekil 3.3. Sentezlenen nanopartikülün muhtemel yapısı

Sentezlenen nanopartiküller, her safhadan sonra mıknatıs yardımıyla ayrılmış ve kurutularak toz halinde depolanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Sentezlenen nanopartiküllerin mıknatıs ile ayrılması ve toz halinde depolanması

3.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları

Nanopartiküllerin karakterizasyonu için daha çok boyut, yapı ve elektriksel yük analizleri yapılır. Genellikle Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM), Atomik Kuvvet Mikroskopu (AKM) gibi ileri düzey optik yöntemler tercih edilir. Nanopartiküllerin karakteristik özellikleri onların kararlılığını ve canlı yapılarındaki işlevselliğini doğrudan etkiler ve bahsi geçen elektron mikroskopları nanopartiküller hakkında önemli bilgiler sağlar. Nanopartiküllerin ortalama büyüklüğü ve yapıları, karakterizasyon açısından en önemli parametrelerdendir ve elektron mikroskopları yardımıyla tespit edilir. Asıl uygulama alanları ilaç taşıma ve ilaç salınımı olan nanopartiküller için boyutun küçük olması, yüzey alanının artması ve bu sayede daha fazla ilaç taşıyıp daha fazla ilaç salınımı yapabilmesi anlamına gelir. Ancak, nanopartikülün parçacık boyutu küçüldükçe topaklanma meydana gelme riski de artar. Yine poli (laktik-co-glikolik asit) için partikül boyutu büyüdükçe degragasyonun arttığı da bildirilmiştir. Dolayısıyla nanopartiküllerin kararlılığı ile boyutu arasında da denge kurmak gereklidir (Redhead ve ark. 2001).

Çalışma süresince ɤ-Fe_2O_3, ɤ-Fe_2O_3-CA, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Docetaxel maddeleri sentezlenmiştir.

Bu nanopartiküllerin demir içerikleri, yüzey özellikleri, boyutları, optik özellikleri, fiziksel ve kimyasal yapıları çeşitli karakterizasyon yöntemleri ile analiz edildi.

3.2.2.1. X-Işını Kırınım Difraktometresi ile Karakterizasyon

X-ışınları kırınımı yöntemi, her bir kristal yapının üzerine x ışını düştüğünde bu ışınların kristalin karakteristik özelliklerine göre farklı kırınım, yansıma ve saçılma oluşturması esasına dayanır. Her bir kristal yapı sadece kendine özgü bir kırınım verir ve bu olay Bragg kanunu ile açıklanır. Kanun, kısaca saçılan ışının açısı ile gelen x ışınının dalga boyu arasındaki ilişkidir. X ışınının dalga boyu atomlar arası mesafe ile yaklaşık aynı değerde olduğundan görünür ışık yerine tercih edilir. Gönderilen X ışınlarının çarpma sırasında oluşturduğu açı, gelen ışının dalga boyu ve uzaklık arasında tam kat cinsinden bir korelasyon vardır. Kristal yapısı öğrenilecek numune üzerine X ışınları gönderilir ve numunenin kırınıma uğrattığı X ışınları film üzerine toplanır. Gelişmiş cihazlarda bulunan ileri düzey sayaçlar sayesinde kırınım desenleri oluşturulur. Bu sayede kristal yapı ile ilgili daha fazla bilgi sahibi olunabilir (Ashkhası 2017).

Bu yöntem uygulanırken numune genellikle zarar görmez. İnorganik maddeler, metaller, çimento, polimerler gibi birçok kristal haldeki maddenin aydınlatılması için kulanılan ve çok az miktarda numune ile çalışılabilen bir yöntemdir.

X-ışınları kırınımı yöntemi (XRD) ile sentezlenen nanopartiküllerin yapıları karakterize edildi. Bu çalışmada ɤ-Fe_2O_3 nanopartikülleri için XRD analizi yapıldı. Numune üzerine X-ışını düştüğünde bu ışınlar, kristalin karakteristik özelliklerine göre, farklı kırınım, yansıma ve saçılma oluşturur. Bu esasa dayanarak nanopartikülün XRD izleri 0.02º adım boyutu ile 2º-80º 2Ɵ açısında kaydedildi.

3.2.2.2. ICP-MS ile Karakterizasyon

Bu yöntemde hem katı hem de sıvı haldeki numunelerle çalışılabilir. Öncelikle örnek HNO_3 gibi bir asit yardımıyla çözülür, ardından cihaza zarar vermemesi ve saflaştırma için filtreden geçirilir. Seyreltilmiş numune cihaza alınır ve cihazda hidrojen, helyum, karbon, azot, oksijen, flor ve soy gazlar dışında hemen her elementin kalitatif ve kantitatif ölçümleri hassas bir şekilde yapılabilir. Tekniğin temelinde numuneler, çoğu zaman argon takviyesinde, plazma haline getirilmiş yüksek sıcaklığa

püskürtülerek parçalanır ve iyonlaştırılır. Bu işlem basamaklarında, örnek manuel ya da otomatik örnekleyici yardımıyla sisteme alınır. Pompa yardımıyla aerosol oluşturma üzere bölmeye alınır ve genellikle bu kısımda da gaz olarak argon kullanılır. Numunenin gereksiz miktarı analize sokulmaz. Aerosol halinde plazmaya gönderilen örnek, sıcaklık nedeniyle gaz ve iyona dönüşür. Dedektör olarak kütle spektroskopisi (MS) kullanılarak kütle/yük değerinden faydalanılan sonuçlara ulaşılır. Çok hızlı ve duyarlı bir şekilde eser haldeki birçok ağır metalin nitel ve nicel analizini sağlayabilen bir yöntemdir (Ha ve ark. 2011).

Çalışmada, yaklaşık 0.01 g manyetik nanopartikül tartılıp bir behere alındı ve 3.0 mL derişik HCl ilave edildi. Ardından 0.5 mL H_2O_2 ve 1 mL HNO_3 karışımı eklenerek manyetik karıştırma özellikli ısıtıcıda karıştırma olmadan ısıtıldı. Isıtma işlemine malzeme kuruyana kadar devam edildi ve elde edilen kalıntı 50 mL 1.0 mol/L HNO_3 içerisinde çözündürüldü. Bu işlemler her bir ɤ-Fe_2O_3, ɤ-Fe_2O_3-CA, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülüne ayrı ayrı uygulanarak Bruker Aurora M90, Quadrupole ICP-MS cihazı ile ölçümler alındı.

Bu karakterizasyon yöntemi ile sentezlenmiş nanopartiküllerin demir (Fe) konsantrasyonu tespit edildi ve hazırlanan nanopartiküller içerisindeki demirin ağırlıkça yüzdesi belirlendi.

3.2.2.3. Titreşimli Örnek Manyetometre ile Karakterizasyon

Titreşimli örnek manyetometresi (VSM), maddenin manyetik özelliğini hata derecesini minimuma indirerek ölçer. Örnek, homojen bir manyetik alan içerisine konumlandırılır ve numune titreştirilir. Böylece dedektör bobinleri üzerinde, numunenin manyetik alanından etkilenen, manyetik akım değişiminden kaynaklı bir voltaj oluşur. Bu yöntemle sıcaklık, açı, manyetik alan ve zaman değişimleri vasıtasıyla mıknatıslanma ve doyum mıknatıslanma özellikleri tespit edilir (Foner 1959).

Bu çalışmada ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülünün manyetik doygunluğu Model P525 measurement system-Quantum Design cihazı ile oda sıcaklığında ölçüldü.

3.2.2.4. Zeta Potansiyel

Zeta potansiyeli bilimsel bir terimdir ve kolloidal dağılımlardaki potansiyelin ölçümünde kullanılır. Bu değer milivolt (mV) ya da volt (V) birimleriyle hesaplanır. Bu potansiyel değeri, dispersiyon alanı tarafından belirlenmiş bölgede bulunan akışkan ve bu kayma düzleminin arasındaki potansiyel farkı olarak tanımlanabilir. Bahsedilen sistemdeki net elektrik yükünden kaynaklıdır ve malzemelerin konumları önemlidir. Yük miktarını ölçmek için yaygın kullanılır ve çift katman karakterizasyonunda çok önemli bir yöntemdir (White ve ark. 2007).

3.2.2.5. Mikroskopik Karakterizasyon

Taramalı elektron mikroskopu, katı haldeki nanopartikül yüzeyinin doğrudan görselleştirme ile morfolojik analizini yapar. Böylece SEM, boyutu ve morfolojisi hakkında önemli bilgiler verirken boyut dağılımı hakkında net bir bilgi sağlamaz. Analizde, nanopartikül ince kuru toz haline getirilir ve sonrasında bir numune tutucuya yerleştirilen örnek, ince tabakalar halinde taranır. Tarama yapılırken çok iyi odaklanmış elektron demeti kullanılır ve kesitler halinde tarama tekrarlanır (Jores ve ark. 2004).

Yöntemde numune yüzeyinden yayılan ikincil elektronlar sayesinde ölçüm yapılır ve numunenin iletken olması gereklidir. İletken özellik göstermeyen maddeler için uygun değildir ancak bu tür maddelerde vakum yardımıyla yüzeyin çok ince bir tabaka halinde iletken bir malzeme ile kaplanması tekniği kullanılarak ölçüm yapılır. Bu tekniğin avantajları yanında uzun sürmesi ve maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajları da vardır. Çoğu zaman karakterizasyon hakkında yeterli bilgi veremez ve özellikle boyutlandırma dağılımı hakkında yardımcı analizler gerekir (Molpeceres ve ark, 2000).

Bu ölçümde ɤ-Fe_2O_3 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly nanopartikülleri ile çalışılmıştır. 200 nm ile 20 μm ölçek değerleri arasında ve 20 kV voltaj değerinde LEO-Evo 40 XVP cihazıyla farklı görüntülemeler yapıldı.

Geçirimli elektron mikroskopu (TEM), SEM'den farklı bir prensibe sahip olsa da sonuçlar SEM'dekine benzer türdedir. Ultra ince bir tabaka halinde numune hazırlanması gerektiğinden uzun sürebilir ve karmaşık bir ölçümdür. Nanopartikül numunesi destek tabakaları üzerine yerleştirilir ve vakumdan etkilenmemesi için

fosfotungstik asit türevleri, uranil asetat gibi malzemelerden faydalanılarak sabit hale getirilir. Numune içerisinden yüksek enerjili elektronlar geçirilir ve bu elektronların görüntülenmesi ile ölçüm yapılarak atomik yapı ve malzeme kusurları hakkında da bilgi verir (Molpeceres ve ark. 2000).

Bu ölçümde ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülünün 200 nm ölçekte görüntüleri Jeol /JEM-1010 (100 kV, 1k x 1k Gatan CCD camera (MegaScan model 794) ile alınmıştır.

3.2.3. Antimikrobiyal ve Antioksidan Çalışmaları

Toz halindeki ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartiküllerinin 25, 50, 100 ve 200 µg/mL derişimlerinde saf su içerisindeki karışımları ultrasonik banyo yardımı ile dispers edildi. Mikroorganizma olarak *Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Candida albicans (ATCC 10231), Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) ve Streptococcus pyogenes (ATCC 12344)* bakteri suşları ile çalışıldı. Bakteriyel suşlar, 30° C'de kültürlenen *C. albicans* dışında 37° C'de Nutrient Broth (NB) sıvı besiyeri içinde gece boyunca kültürlendi. Buradan 100 µL alınarak (10^8 hücre/mL), Nutrient Agar (NA) katı besiyerine yayıldı ve 6 mm çapında kuyucuklar oluşturularak hazırlanmış nanopartiküller ile dolduruldu. Plakalar bakteriler için 37° C'de 24 saat ve maya için 30° C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Kılınç 2016a). 25, 50, 100 ve 200 µg/mL derişimlerinde nanopartiküller yumuşak agar içinde karıştırılarak petri kabında yayılarak da uygulama yapıldı ve 24 saat 37ºC' de inkübe edildi.

Antioksidan özellik testinde, DPPH (1,1-difenil–2-pikrilhidrazil) radikali giderme aktivitesi metodu ile çalışılmıştır. Bu metoda göre, DPPH içeren çözelti ile ölçümü yapılan numune karıştırılır. Numune antioksidan özellik gösteriyorsa DPPH radikalini indirger. Bu arada DPPH çözeltisinin mor renginde açılma olur ve UV spektrometresi yardımıyla absorbanstaki düşüş tespit edilir (Bondet ve ark. 1997). Hazırlanmış olan 25, 50, 100 ve 200 µg/mL derişimlerindeki nanopartiküllerin birer mililitresi 4 mililitre DPPH'ın etanoldeki çözeltisine (0.1 mM) eklendi. Örnekler karıştırılıp ardından oda şartlarında ışıksız ortamda yarım saat bekletilerek 517nm' de UV spektrofotometre cihazı ile absorbans değerleri 5 tekrarlı ölçüldü.

3.2.4. Hücre Çalışmaları

Bu çalışmada insan sağlıklı prostat hücresi (PNT1A) ve insan kanserli prostat hücreleri (PC3) ile deneyler yapılmıştır. Hücre hatları Dicle, Dokuz Eylül ve Harran Üniversitelerinde sıvı azot içerisinde korunan stoklardan çözündürülerek kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları Dicle Üniversitesi Mol. Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarında gerçekleştirildi ve laboratuvarların UV kabinleri ile CO_2 inkübatörlerinden faydalanıldı. Ayrıca yeni stoklar oluşturularak sıvı azot içerisinde muhafaza edilmeye devam edildi.

3.2.4.1. Hücre Kültürü Çalışması

Sıvı azot içerisinde stokta bulunan dondurulmuş hücreler ile hücre kültürü çalışmaları yapıldı. Yaklaşık -80ºC sıcaklıkta bulunan kriyotüpler, sıvı azot tankından çıkarılıp birkaç dakika 37ºC'deki su banyosunda bekletilerek çözünmesi sağlandı. PC3 ve PNT1A hücreleri, çözünmenin ardından içinde uygun besiyeri bulunan (PC3 için DMEM/F12, PNT1A için RPMI-1640) T75 hücre kültürü kaplarına alındı. Besiyerlerine %5 FBS ve %1 penisilin-streptomisin ilave edildi. Bu şekilde şişe yüzeyine tutunan hücreler 37ºC'de %5'lik CO_2 ortamında 24 saat inkübe edildi.

Çözünmesi sağlanan hücre hatları 25 ml'lik şişelerde %5'lik CO_2 ortamında 37ºC'de yeterli sayıda hücre oluşana kadar inkübe edildi ve günlük olarak mikroskobik gözlemlemeleri yapıldı (Şekil 3.5.).



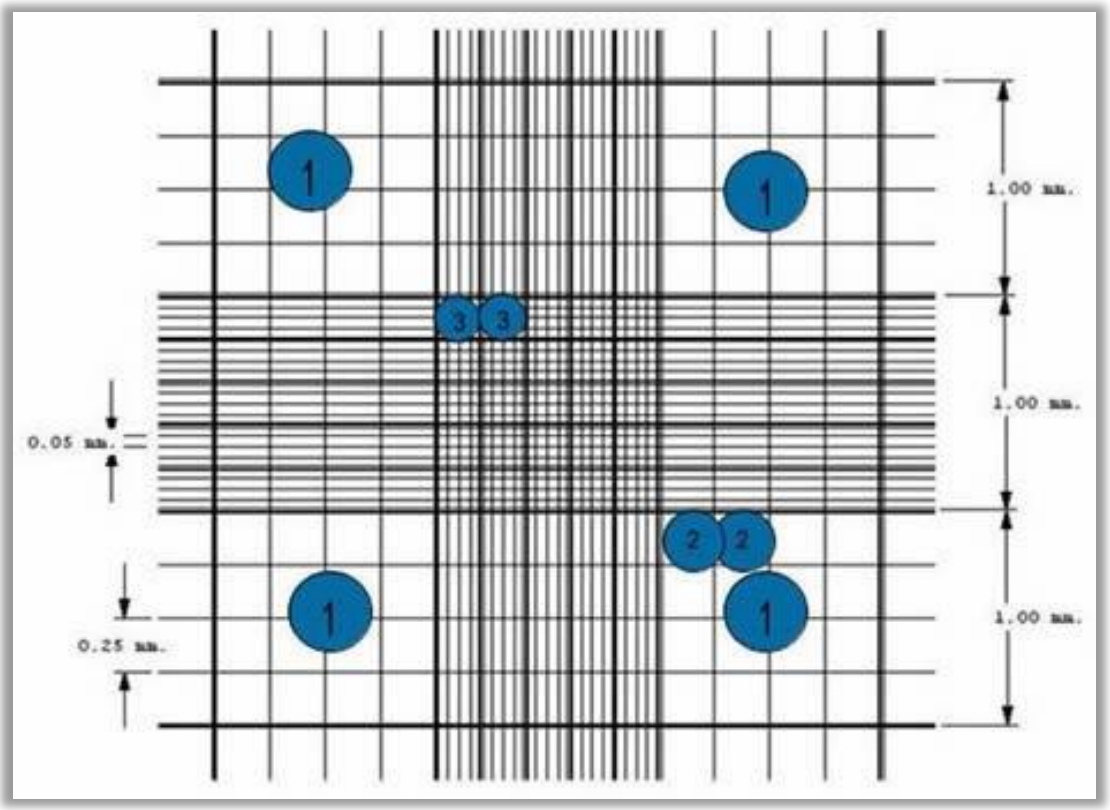
Şekil 3.5. PC3 hücre hattının mikroskop merceğinden, harici Sony® IMX363 flagship sensor ile alınmış görüntüsü

Bulundukları kabın kapasitesine göre, hücre çoğalmasına bağlı olarak, yüzeydeki hücre sayısı yeterli görüldüğünde (yüzey alanının yaklaşık %80'i) pasajlama yapıldı. Çalışmanın bu safhasında, inkübatörden çıkarılan şişelerin öncelikle besiyeri kısmı pipet yardımıyla alınıp atıldı ve şişenin içi yaklaşık 3 mL PBS ile yıkandı. Ardından canlı hücreleri şişe yüzeyinden zarar vermeden kaldırmak için 500 µL Trypsin-EDTA çözeltisi (0.05% trypsin, 0.02% Etilen diamin tetra asetikasit) yavaşça eklendi ve bir süre %5'lik CO_2 ortamında 37ºC'de bekletildi. Bu sırada, yeni şişe içerisine yaklaşık 2 mL uygun besiyeri (PC3 için DMEM/F12, PNT1A için RPMI-1640) konuldu. İnkübasyonda yeterli süre bekletilen hücrelerin, yüzeyden ayrılmaları mikroskop ile de doğrulandıktan sonra üzerine yaklaşık 3mL besiyer (PC3 için DMEM/F12, PNT1A için RPMI-1640) ilave edilerek pipet yardımıyla dispers edildi. Tüm bu işlemlerin ardından, hücre bulunan şişeden 1 mL alınarak yeni şişe içerisine aktarıldı.

3.2.4.2. Hücre Sayılarının Belirlenmesi

Canlı hücre sayısı yeterli seviyelere geldiğinde hücre ile ilgili deneylere başlandı. Kültür çalışmaları ile sayısı artırılıp 75 mL hacimdeki şişelerde çoğaltılmış hücreler, CO_2 inkübatöründen çıkarıldı ve besiyeri kısmı alındı. Şişe PBS ile yıkandı ve ardından 1 mL Trypsin-EDTA çözeltisi ile hücreler yüzeyden ayrıldı. Sonrasında 3 mL besiyeri ilavesi yapılan şişelerdeki hücreler tüpe alındı. Sayım için tüpteki hücrelerden 10 µL alınıp 90 µL trypan blue eklendi ve dispers edildi. Oluşan karışımın 10 µL'si ile sayım yapıldı. Bu deneylerde kullanılan hücre sayısı önemli olduğundan, hücreler Neubauer sayım bölmesi kullanılarak mikroskop altında prosedürde uygun şekilde sayıldı (Şekil 3.6.) (EMS Catalog: https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx). Hücre sayısı, prosedürde yer alan, aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Hücre Sayısı/mL= (Sayılan Hücre Sayısı/Sayılan Kare Sayısı) X 10000 X Seyreltme Oranı



Şekil 3.6. Neubauer sayım bölmesi detayı (EMS Catalog 2021)

Şekil 3.6.'da "1" ile numaralandırılmış 4 büyük karesinde toplam 23 hücre sayıldı.

Hücre sayısı/mL= (23/4) x10000x10

Formülü ile mL'de 575 000 hücre sayıldı ve toplam hacim 4 mL olduğu için toplam hücre sayısı 2 300 000 olarak hesaplandı (54 625 hücre / 95 µL). Toplam hacim 10.925 oranında seyreltilerek MTT çalışması için 95 µL hacimde 5000 hücre elde edildi. Apoptoz ve ROS üretimi analizlerinde de benzer uygulama yapıldı.

3.2.4.3. Hücrenin Yaşayabilirliği Testi

Sentezlenen ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Docetaxel nanopartiküllerinin sitotoksisite çalışmaları Mosmann (1983)'ın yöntemi modifiye edilerek yapıldı. Bu çalışmada, PC3 ve PNT1-A hücre hatları kullanıldı. Çalışma aralığı belirlenmesi için öncelikle PBS içinde 1-400 µg nanopartikül/mL derişim aralığında deneyler yürütülüp asıl deneyler 1-100 µg nanopartikül/mL derişim aralığında gerçekleştirildi. Ayrıca IC50 değerlerinin karşılaştırılması amacıyla 0.5-25 µg/mL derişimde Docetaxel ile hücreler üzerinde test gerçekleştirildi.

Kültür çalışmaları yapılıp çoğaltılmış hücreler, CO_2 inkübatöründen çıkarıldı ve besiyeri kısmı alındı. Şişe PBS ile yıkandı ve ardından Trypsin-EDTA ile hücreler yüzeyden ayrıldı. Sonrasında besiyeri ilavesi yapılan şişelerdeki hücreler tüpe alındı. Kullanılan hücre sayısı Neubauer sayım bölmesi kullanılarak mikroskop altında prosedüre uygun şekilde sayıldı (https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/68052-14.aspx).

PC3 ve PNT1A hücrelerinin yaşayabilirlik testi için 96 oyuklu elisa plakaları kullanıldı ve her bir oyuğa yaklaşık 5000 hücre içeren 95 µL hacimli süspansiyon konuldu. 24, 48 ve 72. saatlerde ölçüm yapılmak üzere her bir hücre hattı için 3 plaka hazırlandı. 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL derişimlerde hazırlanan ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Docetaxel nanopartikül örneklerinin 5'er µL'si her bir kuyucuğa eklendi. Her kuyucuk 3 tekrarlı hazırlanmış ve plakalar 37 ° C'de %5'lik CO_2 ortamında inkübe edildi. İnkübasyon başlangıcını izleyen 24, 48 ve 72. saatlerde birer plaka alınarak, sitotoksisite ölçümü için MTT deneyi gerçekleştirildi.

25 mg MTT bileşiği 5 mL PBS içinde hazırlanarak, inkübasyondan çıkarılan plakada bulunan kuyucukların hepsine ayrı ayrı 10 µL eklendi. Ardından 37° C'de % 5'lik CO_2 ortamında 4 saat daha inkübe edildi. 4 saat sonrasında tekrar UV kabine alınan plakaların kuyucuklarında bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerini çözmesi için her kuyucuğa 100 µL DMSO ilave edildi. 15 dakika ışıksız ortamda hafif çalkalama sonrasında 570 nm'de absorbansları ölçüldü.

3.2.4.4. Apoptoz Testi

Apoptotik hücre ölümü testleri Annexin V-FITC (Floresan izotiyosiyanat) ve PI (Propidium İyodür) kullanılarak flow sitometrik olarak tespit edilmiştir. Metot çalışılırken, üretici firmanın verdiği prosedürde inkübasyon süresi modifiye edilerek çalışma gerçekleştirilmiştir. (https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/annexin, https://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/556547.pdf). Prosedürde hücre üzerine madde eklendikten sonra 4 saat inkübe edileceği belirtilmiştir. Ancak literatürde 8, 24 veya 48 saat inkübasyon süreleri daha çok tercih edilmektedir (Akkafa ve ark. 2018, Saravanakumar ve ark. 2021, Temiz ve ark. 2021). Bu nedenle nanopartiküller, hücreler ile 24 saat inkübe edildi.

Kültür çalışmaları yapılıp çoğaltılmış hücreler, CO_2 inkübatöründen çıkarıldı ve besiyeri kısmı alındı. Şişe PBS ile yıkandı ve ardından Trypsin-EDTA ile hücreler yüzeyden ayrıldı. Sonrasında besiyeri ilavesi yapılan şişelerdeki hücreler tüpe alındı. Kullanılan hücre sayısı Neubauer sayım bölmesi kullanılarak mikroskop altında prosedüre uygun şekilde sayıldı.

Yaklaşık $1x10^6$ PC3 hücresi içeren süspansiyon 990 µL hacimde 6 oyuklu plaka içerisine konuldu. DMSO içinde hazırlanmış, 10 ve 15 µg/mL derişimdeki ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Docetaxel nanopartikülü karışımından 10'ar µL hücrelerin üzerine eklenip 37° C'de %5'lik CO_2 ortamında 24 saat inkübe edildi. Ardından iki kez soğuk PBS (10 gr/L, pH=7,2-7,6) ile yıkandı ve her seferinde süpernatant kısımları alınarak farklı bir tüpte santrifüjlenip pellet elde edildi. Elde edilen hücreler, kit içerisindeki 1 mL 1X Annexin V bağlama tamponu içerisinde çözündü ve bunun 100 µL'si (yaklaşık $1x10^5$ hücre) 5 mL'lik tüpe aktarıldı. Tüpe 5 µL Annexin V-FITC (component no. 51-

65874X) ve 5 µL PI (component no. 51-66211E) eklendi. Ardından hafifçe vortekslenen hücreler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında (25ºC) ve karanlıkta inkübe edildi. Son olarak her bir tüpe 400 µL 1X Annexin V bağlama tamponundan ilave edildi ve akış sitometrisi ile analizi yapıldı.

3.2.4.5. Hücre İçi ROS Üretiminin Ölçümü

Hücre içi serbest radikal türleri, oksidatif stres analiz kiti (Millipore-Merck, Muse oxidative Stress Kit- MSDS-MHC100111) kullanılarak ölçüldü ve çalışmalar kit protokolüne uygun gerçekleştirildi. 0, 10 ve 15 µg/mL ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl ile 24 saat inkübe edilen PC3 hücreleri, CO_2 inkübatöründen çıkarıldı ve besiyeri kısmı alındı. Şişe PBS ile yıkandı ve ardından Trypsin-EDTA ile hücreler yüzeyden ayrıldı. Sonrasında hücrelerin sayımı yapıldı ve 1 mL-1X test tamponunda $1x10^6$ hücre hazırlandı.

Oksidatif Stres Reaktifi stok çözeltisinden 1 µL alınarak üzerine 1X test tamponundan 99 µL eklendi ve Oksidatif Stres Reaktifi ara çözeltisi hazırlandı. Elde edilen ara solüsyondan 23.75 µL alınıp üzerine 1876.25 µL 1X test tamponu eklenip 80 kat daha seyreltilerek Oksidatif Stres Reaktifi çalışma solüsyonu hazırlandı. Solüsyonlar için oda sıcaklığında ve düşük ışık altında çalışıldı.

Test tamponu içindeki PC3 hücre süspansiyonundan 10 µL (yaklaşık 10^4 hücre) tüplere alındı ve üzerine 190 µL Oksidatif Stres Reaktifi çalışma solüsyonu eklendi. Pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra 37° C karanlıkta 30 dakika inkübe edilip flow sitometri ile ölçüm yapıldı.

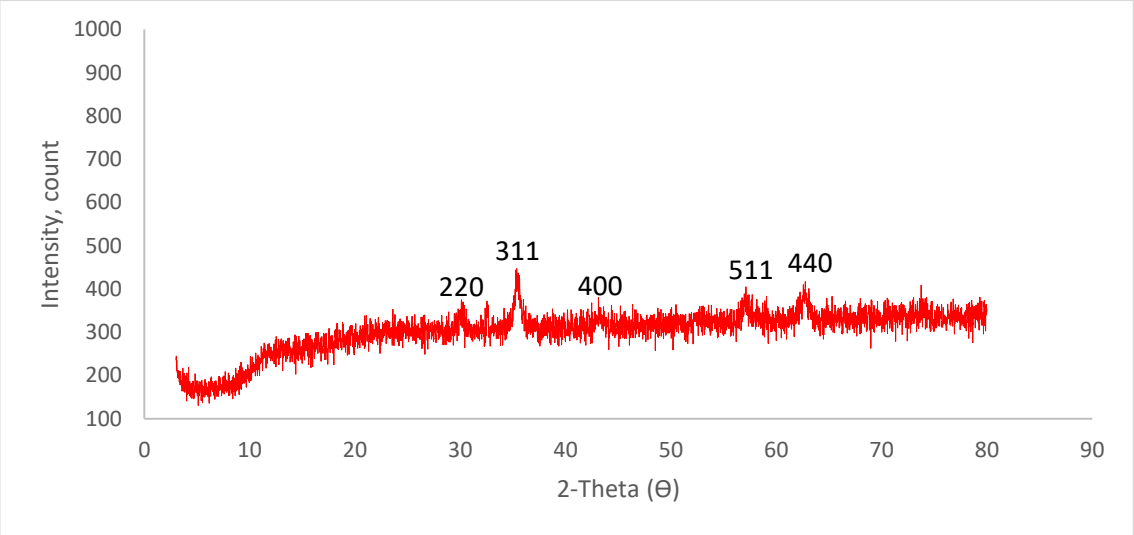
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları Mardin Artuklu, İnönü ve Dicle üniversitelerinde, çoğunlukla hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. X-Işını Kırınım Difraktometresi Analizi

Manyetik nanopartikülün yapısını belirlemek için XRD kullanıldı. XRD desenleri Şekil 4.1.'de verilmiştir. 2θ = 30.5°, 35.8°, 43.8°, 57.7° ve 62.9 kırınımda alınan karakteristik pikler ile sırasıyla karşılık gelen (220), (311), (400), (511) ve (440) Bragg yansımaları, standart maghemit (γ-Fe_2O_3) XRD desenleri (Maghemite-Q, Kart No. 25-1402) ile uyumlu bulundu.



Şekil 4.1. γ-Fe_2O_3 nanopartiküllerinin XRD desenleri

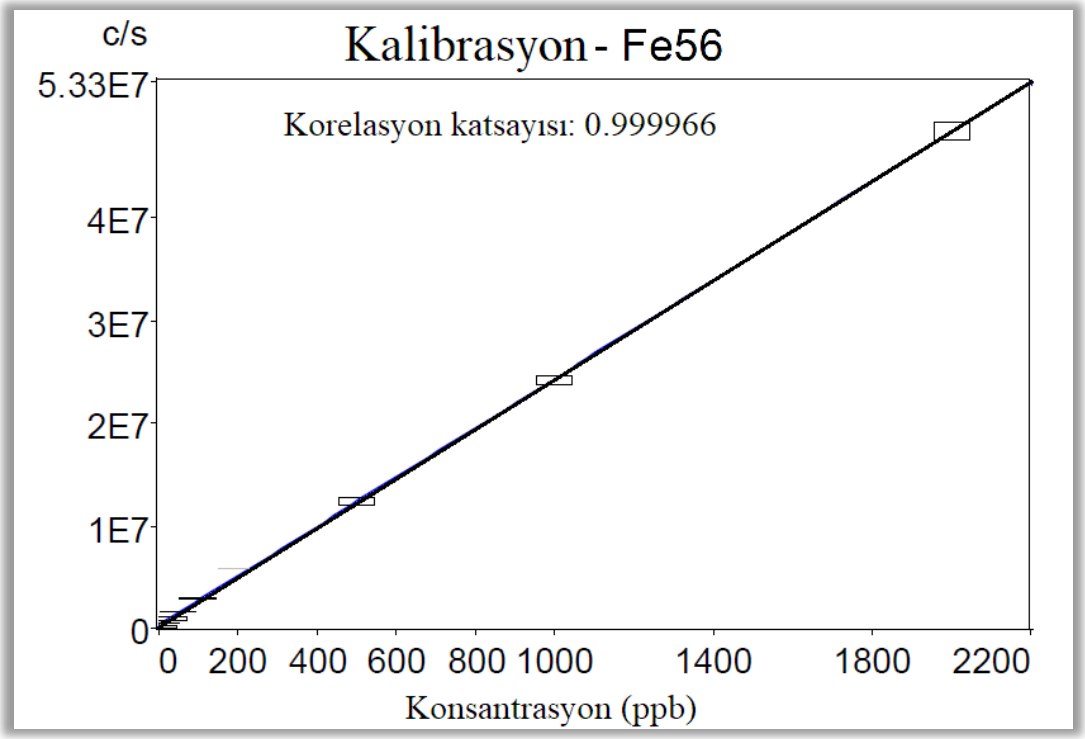
Sun ve ark. (2004), γ-Fe_2O_3 ile gerçekleştirdikleri deneyde XRD pik değerlerini 220, 311, 222, 400, 422, 511 olarak bulmuşlar ve bunun maddeyi açıkça kanıtladığını söylemişlerdir. Kim ve ark. (2012), maghemit ile yaptıkları XRD ölçümünde 220, 311, 400, 422 ve 511 piklerini görmüştür. Lazzarini ve ark. (2021), 311 yansıması elde ettiği maghemit nanopartikülleri üzerinde durmuştur ve partikül boyutunu 10.2 nm hesapladığını belirtmiştir. Tadic ve ark. (2014) sentezledikleri γ-Fe_2O_3 ile yaptıkları 2 teta XRD analizinde 220, 311, 400, 422, 511 piklerini almıştır. Kralj ve ark. (2019) da kendi sentezlemiş oldukları aynı nanopartikül ile XRD yöntemini kullanarak yaptıkları

çalışmada aynı pikleri görmüştür. Başka bir çalışmada ise Fe_3O_4 kristal yapısında 2θ = 30.1°, 36.2°, 42.4°, 52.5°, 57.5° ve 62.2°'de sırasıyla 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 pikleri alınmıştır (Nagesh ve ark. 2016).

XRD spektrumlarını literatür ile karşılaştırarak, sentezlenmiş çekirdek manyetik nanopartikülün kristal yapısının γ-Fe_2O_3 olarak doğrulanması açık şekilde yapılabilmiştir.

4.1.2. ICP-MS Analizi

ICP-MS cihazı ile sentezlenen nanopartiküllerin kantitatif demir (Fe:56) ölçümleri Mardin Artuklu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Ölçümler 15 L/dk plazma akışı, 0.11 L/dk gaz akışı, peak hopping tarama modu, 1.40 kW güç şartlarında gerçekleştirildi. 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ve 2000 ppb derişiminde standartlar okutularak kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. ICP-MS cihazı Fe:56 standart kalibrasyon grafiği

Sentezlenmiş ɤ-Fe_2O_3, ɤ-Fe_2O_3-CA, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülleri metotta verilen ön hazırlığının ardından önce 50 kat ve

sonrasında 300 kat seyreltmesi yapıldı. Analizler 5 tekrar şeklinde çalışıldı ve Fe:56 konsantrasyonları tespit edildi. Seyreltme katsayıları hesaba katılarak kütlece demir yüzdeleri hesaplandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. ɤ-Fe_2O_3, ɤ-Fe_2O_3-CA, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartiküllerinin 50x300 kat seyreltme sonrasında ICP-MS sonuçları

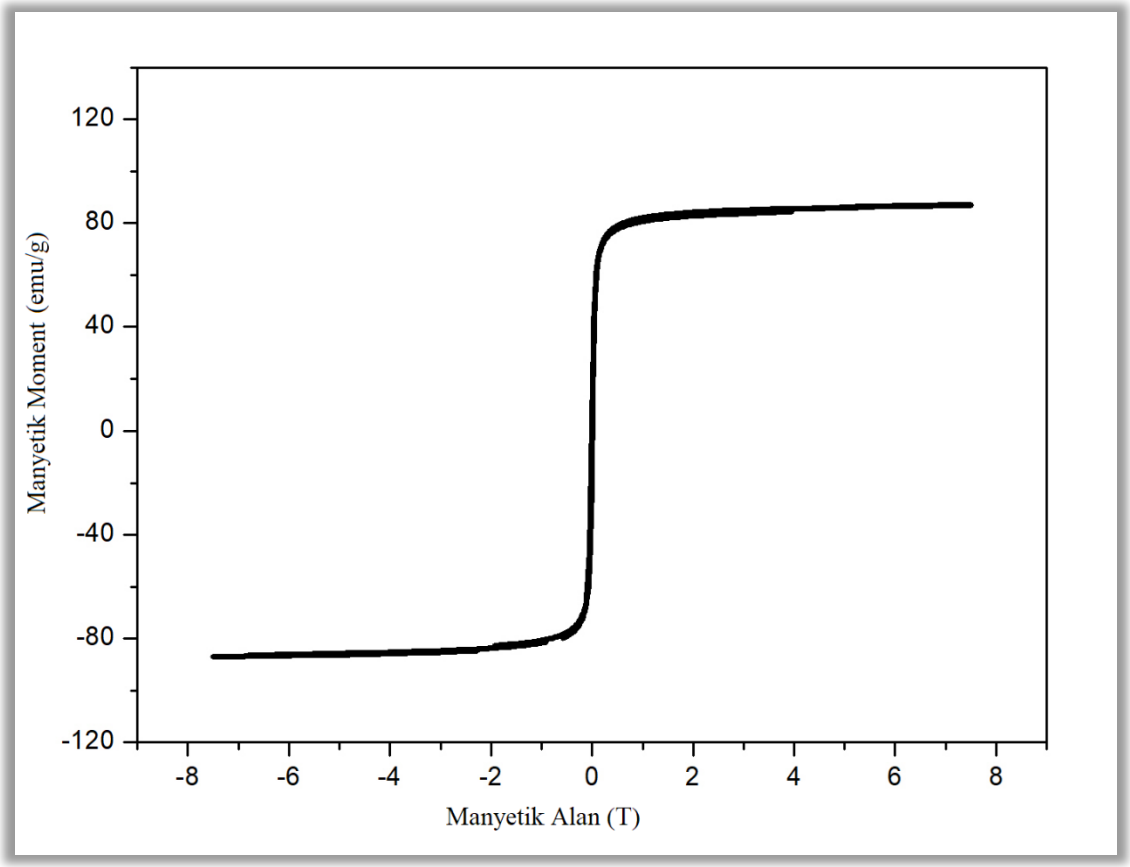
Nanopartikül	Konsantrasyon (ppb)	Fe:56 Kütlesi (%)
ɤ-Fe_2O_3	452.40	67.86
ɤ-Fe_2O_3-CA	224.09	33.76
ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly	140.97	21.15
ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127	127.89	19.18

ɤ-Fe_2O_3 bileşiğindeki teorik demir kütlesi %70'tir ve elde edilen sonuç (%67.86) bu teorik değere oldukça yakındır. Bu sonuç sentezlenen nanopartikülün Fe_2O_3 bileşiği olduğuna dair kanıt sunmaktadır. Maghemit (ɤ-Fe_2O_3), sırasıyla sitrik asit (CA), Leu/Gly dipeptit ve Pluronik F127 ile kaplandıkça yapıdaki demir yüzdesi de azalma göstermiştir. Bu sonuç her kademede bağlanmanın verimli bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Lazzarini ve ark. (2021), ICP-MS ile ɤ-Fe_2O_3 içerisindeki Fe miktarını ölçmek için yapmış oldukları analizde %69.5 oranında Fe tespit etmiş ve SiO_2 ile kaplanması sonucu %36'ya kadar düştüğünü görmüştür. Çalışmamızda da ɤ-Fe_2O_3 bileşiği CA ile kaplandığında %33.76 demir kütlesine sahip olup diğer bağlanmalarda da bu yüzdelik değeri azalmaya devam etmiştir.

4.1.3. Titreşimli Örnek Manyetometre Sonuçları

Oda sıcaklığında γ-Fe_2O_3 'in manyetik davranışını izlemek için titreşimli numune manyetometresi (VSM) kullanıldı. Toz halinde ölçülen γ-Fe_2O_3 'in histeresis döngüsü Şekil 4.3.'te gösterilmektedir. γ-Fe_2O_3 'in doygunluk manyetizasyon değeri 69.8 emu/g olarak bulundu. Bu değer yığın maghemit değerinden (73.5 emu/g) (Sarkar ve Sarkar 2011) daha düşüktür. Mıknatıslanma değerindeki bu azalma, yığın malzemeyle kıyaslandığında partikül boyutunun azalmasına bağlıdır.



Şekil 4.3. γ-Fe_2O_3 partiküllerinin manyetik histeresis döngüsü

Spepi ve ark. (2016), maghemit kristallerinin boyutlarının da etkisiyle 60-68 emu/g arasında değişen bir manyetizasyona sahip olduğunu söylemiştir. Tadic ve ark. (2014), sentezledikleri γ-Fe_2O_3 'in manyetik özellikleri üzerine yaptıkları araştırmada manyetik özelliği Langevin fonksiyonu kullanarak 66 emu/g olarak hesaplamıştır. Lazzarini ve ark. (2021), yaptıkları çalışmada yaklaşık 10 nm boyundaki maghemitin VSM ölçümlerinin, yığın maghemit ölçümüne göre düşük olduğunu bulmuştur. Bulunan değerin 75 emu/g'dan küçük olduğunu ve bu değerin normal aralıklarda olduğunu söylemiştir. Literatürdeki bulgular ile karşılaştırıldığında, sentezlediğimiz nanopartikülün 69.8 emu/gr manyetizasyonu uygun bir değerdedir.

4.1.4. Zeta Potansiyeli Analizi

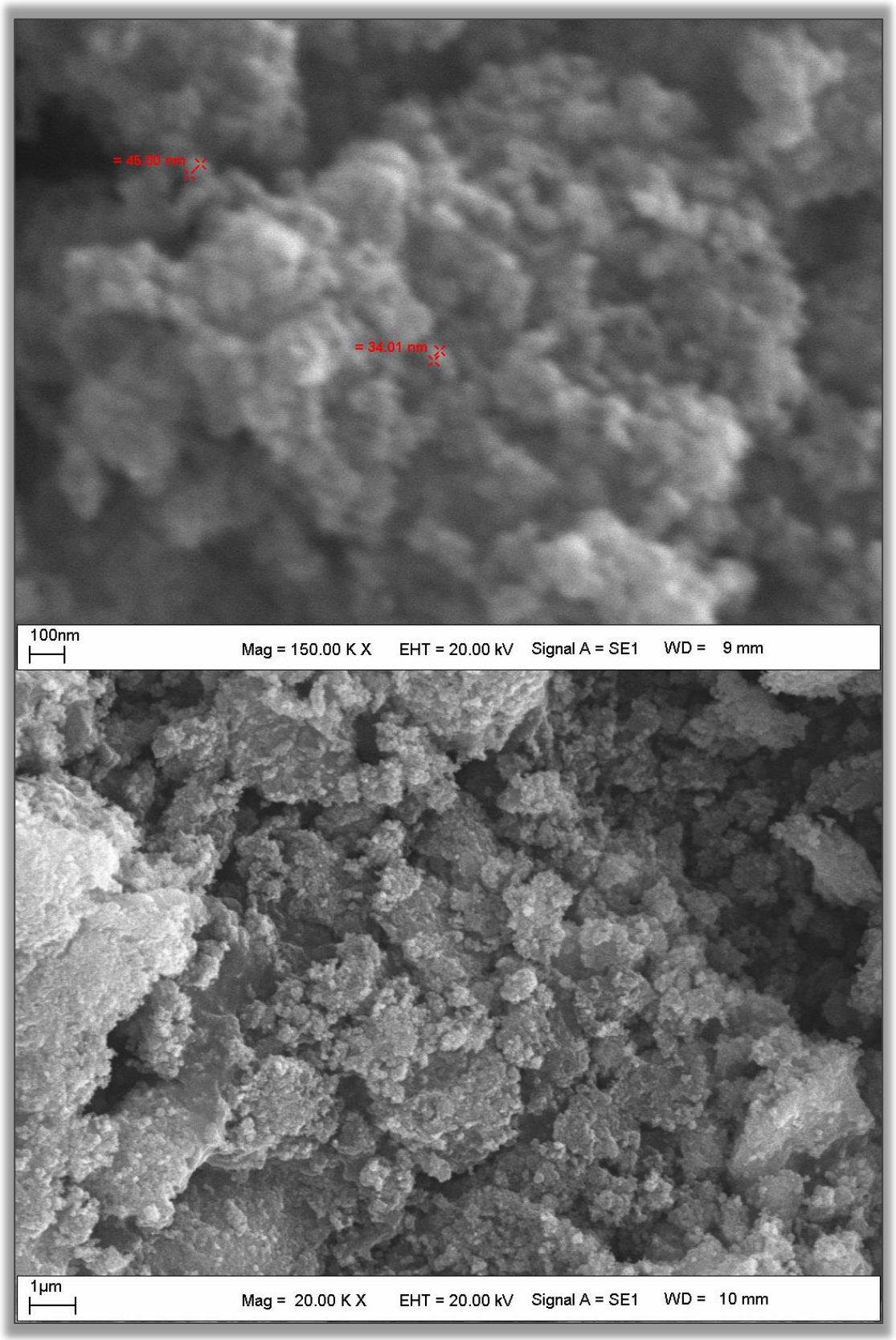
Nanopartiküllerin yüzey yükünü ve kararlılığını belirlemek için nanopartiküllerin zeta potansiyeli ölçüldü. ɤ-Fe_2O_3 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin zeta potansiyelleri pH 7.4'te -5.11 ve -28.1 mV olarak ölçüldü. Prashanth ve ark. (2016) Docetaxelin

terapötik uygulamasında prostat kanseri için çok benzer nanoparçacık formülasyonu ile -7.58 mV zeta potansiyeli elde etmişlerdir. Maghemit sentezlenerek üzerinin silika kaplanması ile yapılan bir çalışmada ise zeta potansiyel değeri (pH>7) -25 mV ölçülmüştür (Kralj ve ark. 2019). Nagesh ve ark. (2016) maghemit ve SPION-Docetaxel ölçümlerinde sırasıyla -11.2 ve -10.9 mV zeta potansiyel sonuçlarına ulaşmıştır.

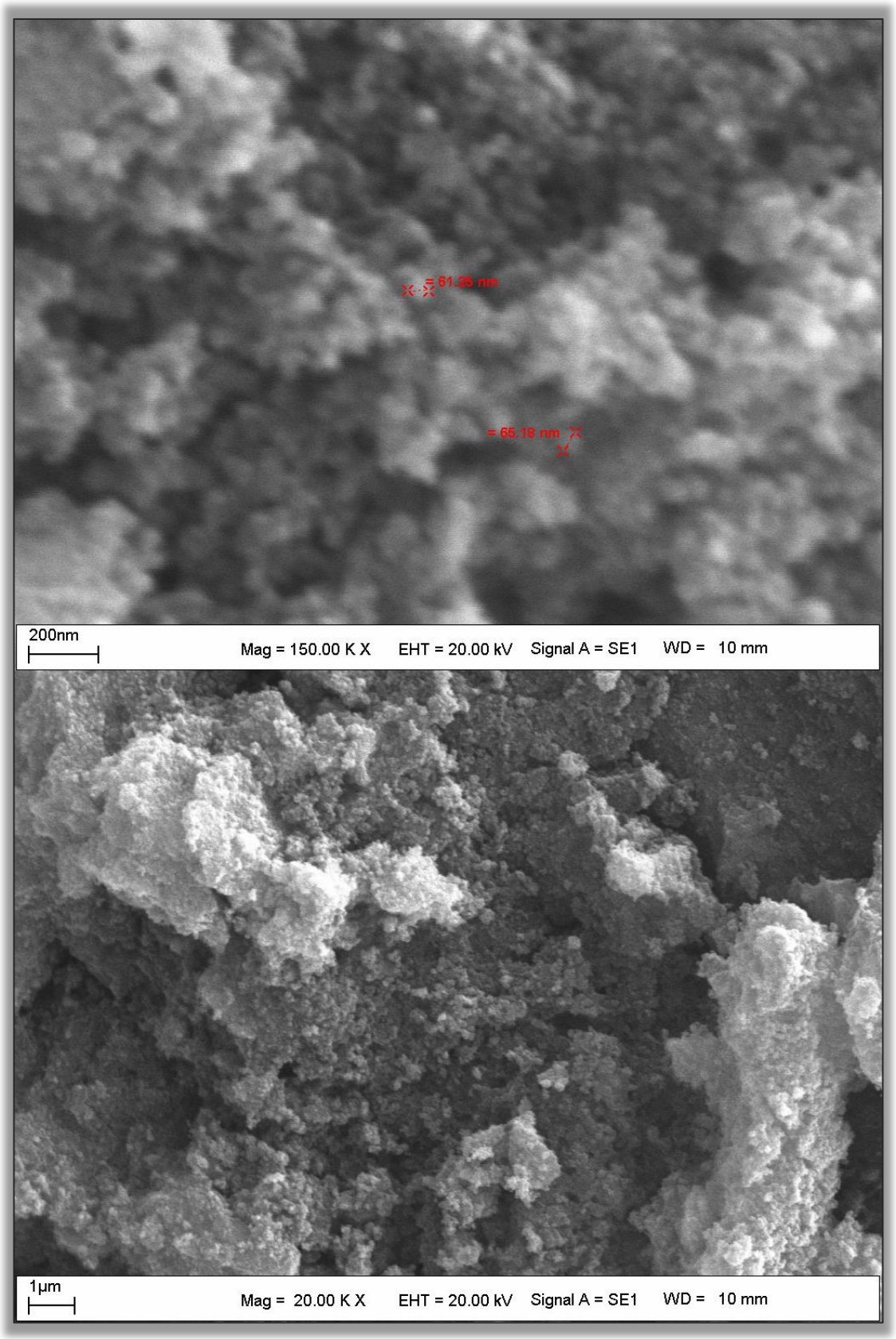
Nanopartiküllerin negatif yükünün, kan plazması üzerindeki düşük etkileşim süresinden ve dolayısıyla dolaşım sürelerinin artmasından dolayı arzu edildiği iyi bilinmektedir (Sukhanova ve ark. 2018). Öte yandan, sentezlenen bazı pozitif yüklü nanopartiküllerin daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu, zarlara etkili bir şekilde nüfuz ettiği ve negatif yüklü DNA'ya güçlü bir şekilde bağlandığı bildirilmiştir. Negatif yüklü nanopartiküllerin hücre döngüsü üzerine hiçbir etkisi yoktur (Liu ve ark. 2011). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda sentezlenmiş olduğumuz ɤ-Fe_2O_3'in nötr, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin ise kararlı ve hücre döngüsüne zararlı etkisi olmadığı söylenebilir.

4.1.5. Elektron Mikroskopu (SEM ve TEM) Analizleri

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile farklı çözünürlükte γ-Fe_2O_3 ve γ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartiküllerinin makro yapıları Şekil 4.4. ve 4.5.'te verilmektedir.

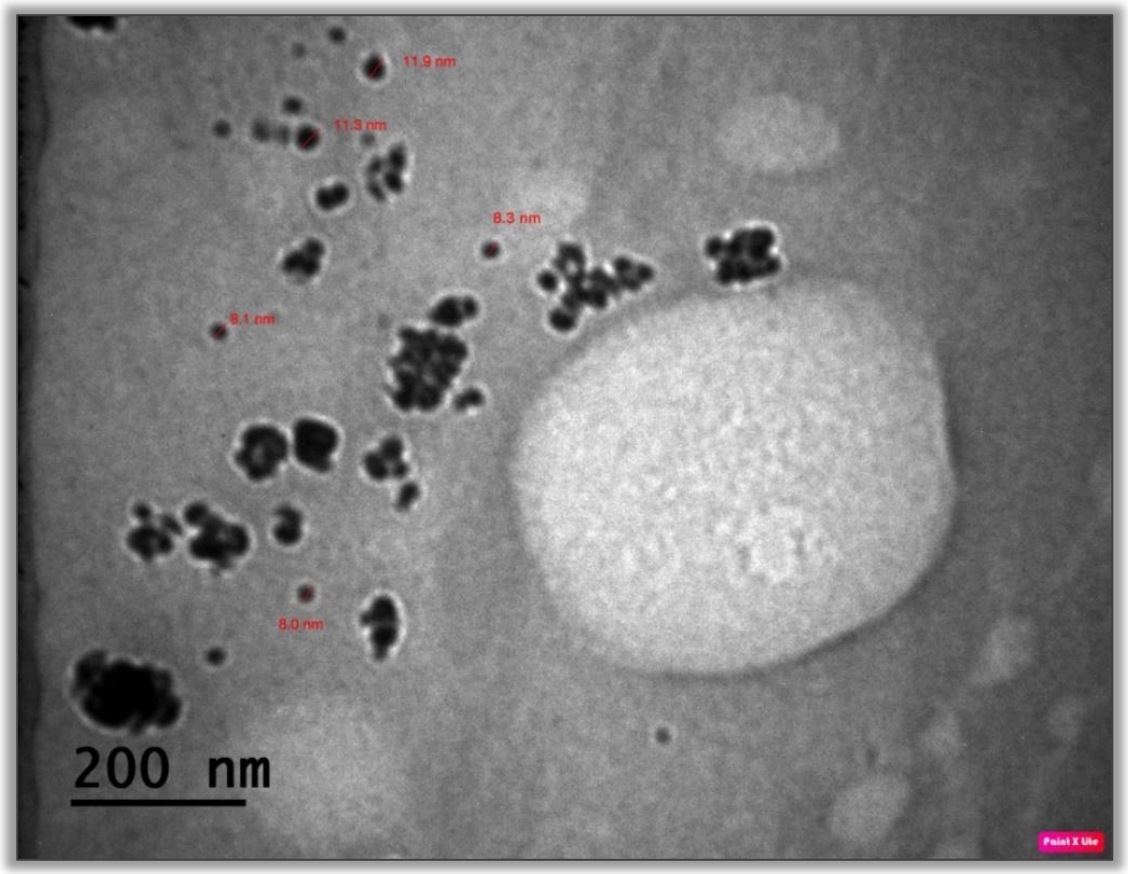


Şekil 4.4. γ-Fe_2O_3'in SEM görüntüleri



Şekil 4.5. γ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 'nin SEM görüntüleri

Geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile de γ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin mikroyapısı ve morfolojisi araştırıldı. Nanopartiküllerin yapısı, ortamala 10 nm partikül boyutu ve yaklaşık 120 nm'lik agregasyon boyutu ile küresel olarak kabul edilebilir (Şekil 4.6.). Bulduğumuz boyutlar, Prashanth ve ark. (2016)'nın çalışmasındaki ß-siklodekstrin ve pluronik F127 ile demir oksit çekirdekten oluşan SPION formülasyonunun değerlerine benzerdi.



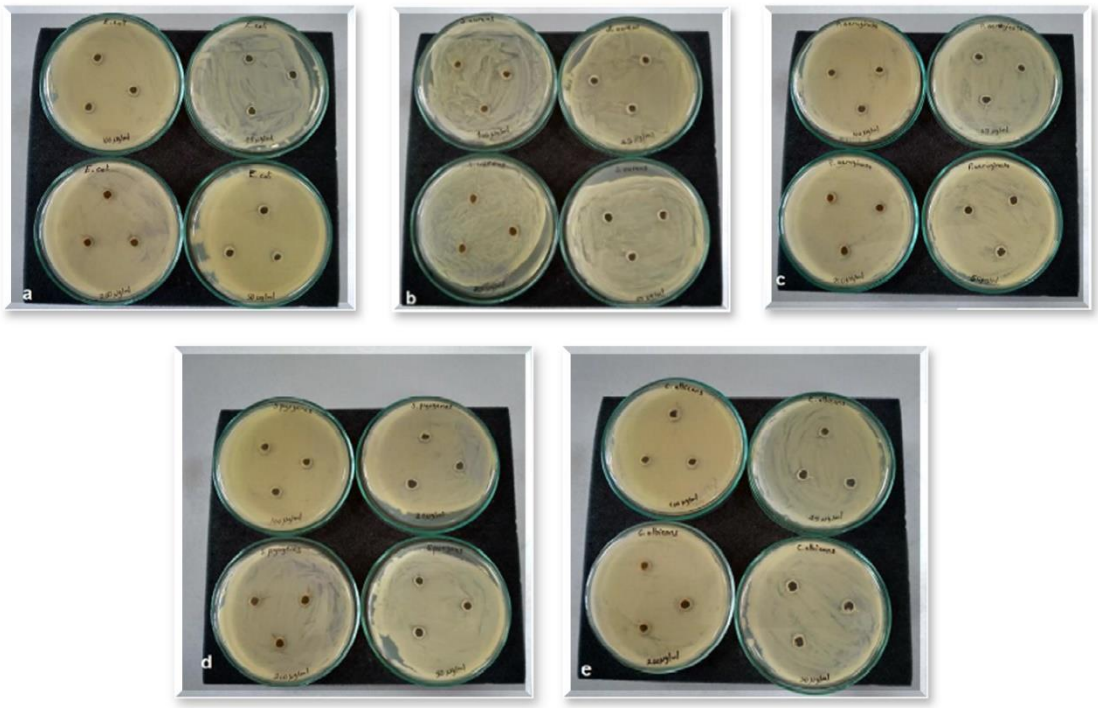
Şekil 4.6. γ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin TEM görüntüsü

Nagesh ve ark. (2016) maghemiti pluronik F127 ile kaplamıştır. Bu çalışmada alınan TEM görüntüleri ışığında, demir oksit nanopartiküllerin 8-10 nm arasında boyutlandığından ve yaklaşık 127 nm'ye kadar kaplanmış agregasyon boyutundan bahsetmiştir. Sun ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada, γ-Fe_2O_3'in TEM görüntüleri sayesinde boyutunun yaklaşık 7.1 nm ve küresel olduğunu söylemiştir. Tadic ve ark. (2014), TEM görüntüsünü aldıkları maghemitin boyunu yaklaşık 10 nm olarak bulmuştur. Kralj ve ark. (2019) sentezlemiş oldukları nanopartikülün boyutlarını

geçirimli elektron mikroskobu ile 8-12 nm arasında bulduklarını göstermiştir. Gill ve ark. (2007) çalışmalarında sentezledikleri nanopartiküllerin 6-8 nm boyutunu TEM görüntüleri ile tespit etmiş ve silika kaplamalı agregasyonun 50-1000 nm boyutunda oluşabildiğini belirtmiştir. Sentezlemiş olduğumuz nanopartikülün boyutları literatüre benzerdir ve bu boyutlardaki nanopartiküller ilaç taşıma sistemleri için uygundur.

4.2. Antimikrobiyal ve Antioksidan Çalışmaları

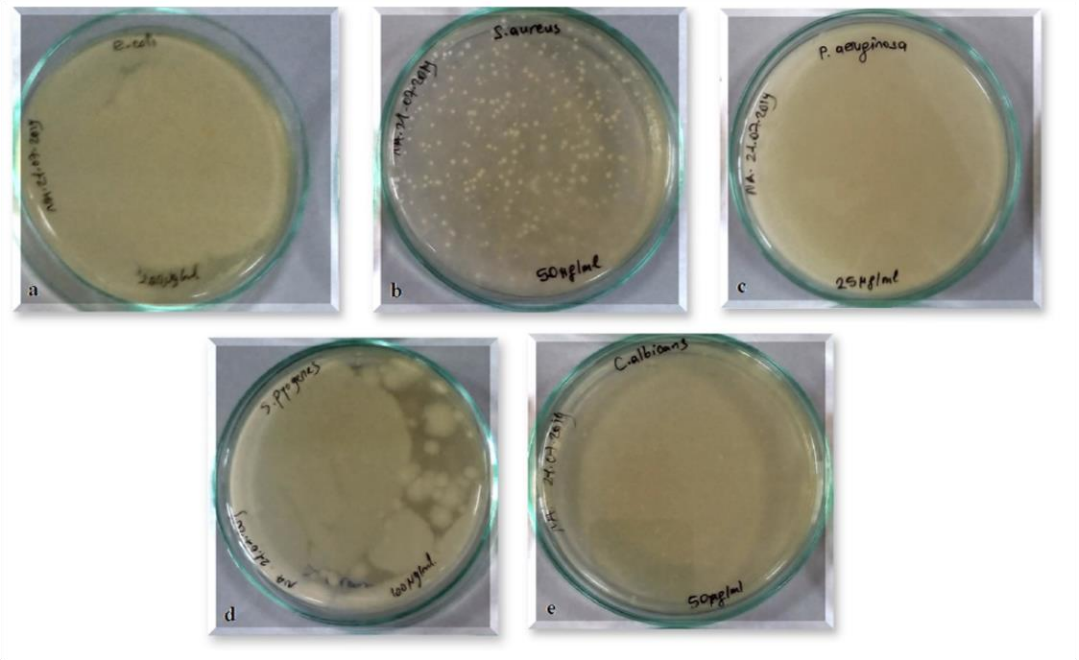
Toz halindeki nanopartiküller ile hazırlanan ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin 25, 50, 100 ve 200 µg/mL derişimlerindeki çözeltileri, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa ve Streptococcus pyogenes* ile inkübe edildikten sonra incelendi ancak anlamlı bir antimikrobiyal aktivite gözlenemedi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. a) *E.coli,* b) *S.aureus,* c) *P.aeruginosa, d) S.pyogenes ve e) C.albicans* bakterileri üzerinde kuyucuk uygulaması ile antimikrobiyal özellik gözlemlenmesi

Farklı bir deneme olması ve doğrulama açısından, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin 25, 50, 100 ve 200 µg/mL derişimlerindeki nanopartiküller, maya ve bakterilerle yumuşak agar içinde karıştırıldı ve petri kabında uygulama yapıldı.

24 saat 37ºC' de inkübe edilen petri kaplarında da antimikrobiyal aktivite okunamadı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. a) *E.coli,* b) *S.aureus,* c) *P.aeruginosa, d) S.pyogenes ve e) C.albicans* bakterileri üzerinde antimikrobiyal özellik gözlemlenmesi

Shahbazi ve ark. (2019) demir oksit nanopartiküllerin, *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkilerinin olmadığını bulmuştur. Hoppens ve ark. (2014) yaptığı çalışmada, gümüşün maghemit ile bağlanması sonucunda gümüşten ileri gelen antimikrobiyal etkilerden bahsetmiştir. Aynı zamanda bu bağlanmanın, gümüşün ortama yayılımını artırdığı için, antimikrobiyal etkiyi de artırdığı söylenmiştir ve maghemitin antimikrobiyal özelliğinden bahsetmemiştir. Shan ve ark. (2010) çok duvarlı karbon nanotüp ile *Escherichia coli* bakterisi üzerinde yaptığı çalışmada antimikrobiyal etkiden bahsetmiştir. 2021 yılında yapılan bir araştırmada (Biswas ve ark.) Fe_3O_4 nanopartiküllerinin agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi üzerinde antimikrobiyal etkileri test edilmiş ve 0.25 mM nanopartikülün antimikrobiyal etkisi gözlenememiştir. Yüksek konsantrasyon (0.5 mM veya 3 mg/mL gibi) ve farklı sentez yöntemleri ile Fe_3O_4'ün antimikrobiyal özellikleri gözlenmiş olsa da (Tran ve ark. 2010, Biswas ve ark. 2021) bu derişimlerde toksik etki oluşturması büyük bir olasılıktır.

Nanopartiküllerin antioksidan özelliklerinin analizi için yapılan DPPH radikalini süpürme aktivitesi 5 tekrarlı olarak ölçüme tabi tutuldu. Mor renkte gözlenen değişim üzerinde anlamlı absorbans değerleri ölçülemedi. Ölçüm sonucunda alınan absorbans değerlerinin ortalamaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin DPPH süpürme aktivitesi tayini absorbans değerleri ortalaması

	Kör	**25 µg/mL**	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**	**200 µg/mL**
Absorbans	0,6456	0,6474	0,6974	0,7045	0,7095

Demir oksit nanopartiküllerinin, 'Yeşil Metot' olarak adlandırılan, yeşil çay, aloe vera (Phumying ve ark. 2013), kurkumin (Noha ve ark. 2021), okaliptüs yaprakları (Wang ve ark. 2014) ve hurma (Amin ve ark. 2020) gibi doğal maddeler kullanılarak sentezlenmesi literatürde yer almıştır. Bu çalışmaların bazılarında kimyasal yolla ve yeşil metotla sentezlenen nanopartiküllerin antioksidan özellikleri karşılaştırılmış ve çok az antioksidan özellik gösteren kimyasal senteze karşı yeşil metot sentezinin antioksidan özellikleri yüksek bulunmuştur (Noha ve ark. 2021).

Yüksek konsantrasyon (0.5 mM veya 3mg/mL gibi) ve farklı sentez yöntemleri ile Fe_3O_4 veya Fe_2O_3'ün antimikrobiyal özellikleri gözlenmiş olsa da (Tran ve ark. 2010, Biswas ve ark. 2021) bu derişimlerde toksik etki oluşturması büyük bir olasılıktır. Bu sebeplerden ötürü çalışmamızda yüksek konsantrasyonda nanopartiküller ile deneme yapılmadı. Literatür bilgileri incelendiğinde en fazla 200 µg/mL derişimde hazırlanan nanopartiküllerin antimikrobiyal ve antioksidan özellikler göstermemiş olması, ilaç taşıma sistemleri için beklenen bir durumdur.

4.3. Hücre Çalışmaları

4.3.1. Hücrenin Yaşayabilirliği

Hücrelerin hayatta kalma yüzdeleri, hücre üzerine ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 ve Docetaxel (Dtxl) bağlanmış ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 eklenmiş her bir oyuğun OD (Optical density) değerinin, hücre üzerine nanopartikül olmadan DMSO eklenmiş oyuktaki negatif kontrolün OD değerlerine oranlanması ile hesaplandı.

$$\text{Hücrenin yaşayabilirliği (\%)} = \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Kontrolün Absorbansı}} \text{x} 100$$

24. saatte PC3 hücre hattı ile yapılmış olan çalışmanın sonucunda 570 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanmış olan hücrenin yaşayabilirliği (%) Çizelge 4.3'te verilmiştir. PC3 hücre hattında kullanılan, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülü NP-PC3 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl nanopartikülü NPD-PC3 ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. PC3 hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 24. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri

Doz (µg/mL)	NP-PC3	NP-PC3 %	NPD-PC3	NPD-PC3 %
0 (Kontrol)	0.129	100	0.147	100
1	0.127	98	0.132	90
2.5	0.123	95	0.121	83
5	0.118	91	0.100	68
10	0.115	89	0.067	46
25	0.108	84	0.043	29
50	0.105	81	0.041	28
100	0.098	76	0.033	22

48. saatte PC3 hücre hattı ile yapılmış olan çalışmanın sonucunda 570 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanmış olan hücrenin yaşayabilirliği (%) aşağıda (Çizelge 4.4.) verilmiştir.

Çizelge 4.4. PC3 hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 48. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri

Doz (µg/mL)	NP-PC3	NP-PC3 %	NPD-PC3	NPD-PC3 %
0 (Kontrol)	0.776	100	0.684	100
1	0.767	99	0.224	33
2.5	0.761	98	0.185	27
5	0.745	96	0.163	24
10	0.691	89	0.135	20
25	0.685	88	0.130	19
50	0.684	88	0.127	19
100	0.656	85	0.126	18

72. saatte PC3 hücre hattı ile yapılmış olan çalışmanın sonucunda 570 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanmış olan hücrenin yaşayabilirliği (%) aşağıda (Çizelge 4.5.) verilmiştir.

Çizelge 4.5. PC3 hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 72. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri

Doz (µg/mL)	NP-PC3	NP-PC3 %	NPD-PC3	NPD-PC3 %
0 (Kontrol)	0.869	100	0.890	100
1	0.853	98	0.303	34
2.5	0.834	96	0.287	32
5	0.820	94	0.275	31
10	0.824	95	0.208	23
25	0.808	93	0.203	23
50	0.792	91	0.205	23
100	0.745	86	0.202	23

24. saatte PNT1A hücre hattı ile yapılmış olan çalışmanın sonucunda 570 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanmış olan hücrenin yaşayabilirliği (%) Çizelge 4.6'da verilmiştir. PNT1A hücre hattında kullanılan, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülü NP-PNT ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl nanopartikülü NPD- PNT ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. PNT1A hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 24. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri

Doz (µg/mL)	NP-PNT	NP-PNT %	NPD-PNT	NPD-PNT %
0 (Kontrol)	0.302	100	0.363	100
1	0.299	99	0.321	89
2.5	0.290	96	0.305	84
5	0.287	95	0.277	76
10	0.275	91	0.228	63
25	0.274	91	0.199	55
50	0.270	90	0.192	53
100	0.264	88	0.184	51

48. saatte PNT1A hücre hattı ile yapılmış olan çalışmanın sonucunda 570 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanmış olan hücrenin yaşayabilirliği (%) aşağıda (Çizelge 4.7) verilmiştir.

Çizelge 4.7. PNT1A hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 48. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri

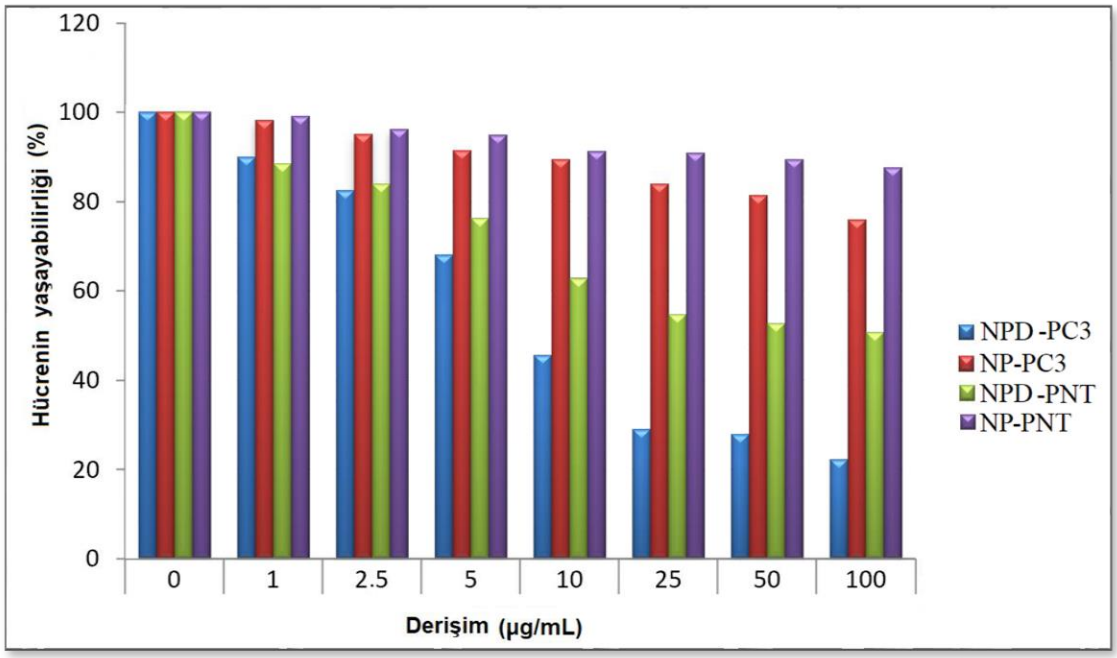
Doz (µg/mL)	NP-PNT	NP-PNT %	NPD-PNT	NPD-PNT %
0 (Kontrol)	0.971	100	1.030	100
1	0.919	95	0.563	55
2.5	0.889	92	0.548	53
5	0.876	90	0.525	51
10	0.856	88	0.489	48
25	0.863	89	0.451	44
50	0.855	88	0.446	43
100	0.840	86	0.426	41

72. saatte PNT1A hücre hattı ile yapılmış olan çalışmanın sonucunda 570 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalaması ve bu değerler kullanılarak hesaplanmış olan hücrenin yaşayabilirliği (%) aşağıda (Çizelge 4.8) verilmiştir.

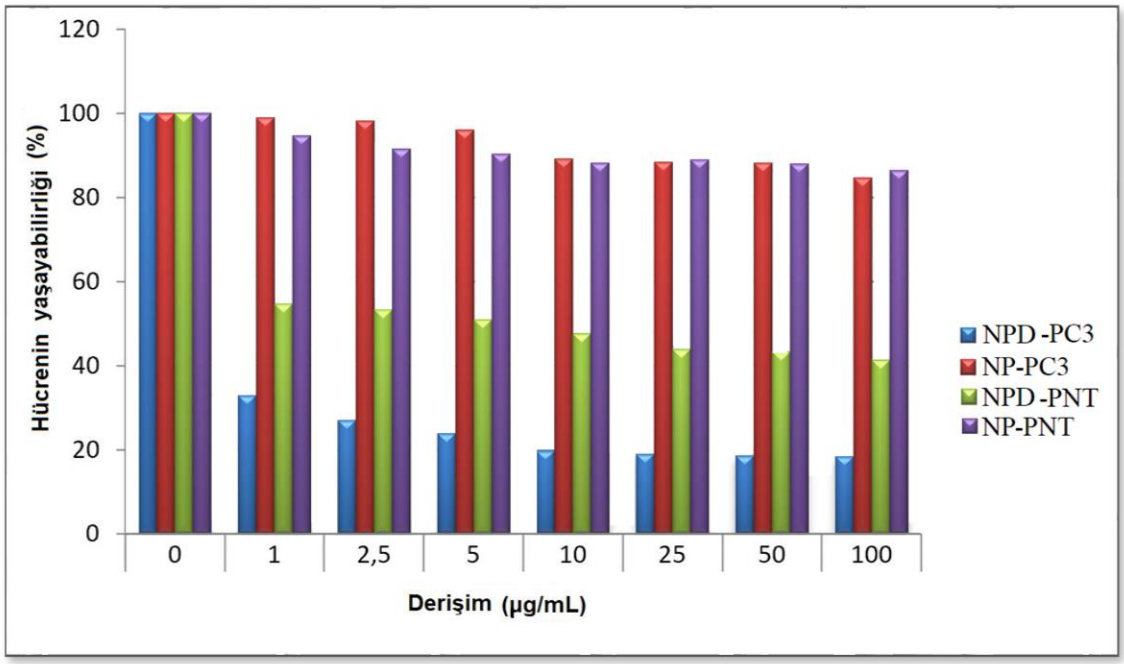
Çizelge 4.8. PNT1A hücre hattı üzerinde yapılmış çalışmanın 72. saatinde alınan absorbans değerleri ve canlı hücre yüzdeleri

Doz (µg/mL)	NP-PNT	NP-PNT %	NPD-PNT	NPD-PNT %
0 (Kontrol)	1.596	100	1.600	100
1	1.586	99	0.518	32
2.5	1.556	98	0.465	29
5	1.500	94	0.418	26
10	1.477	93	0.381	24
25	1.485	93	0.326	20
50	1.480	93	0.315	20
100	1.463	92	0.305	19

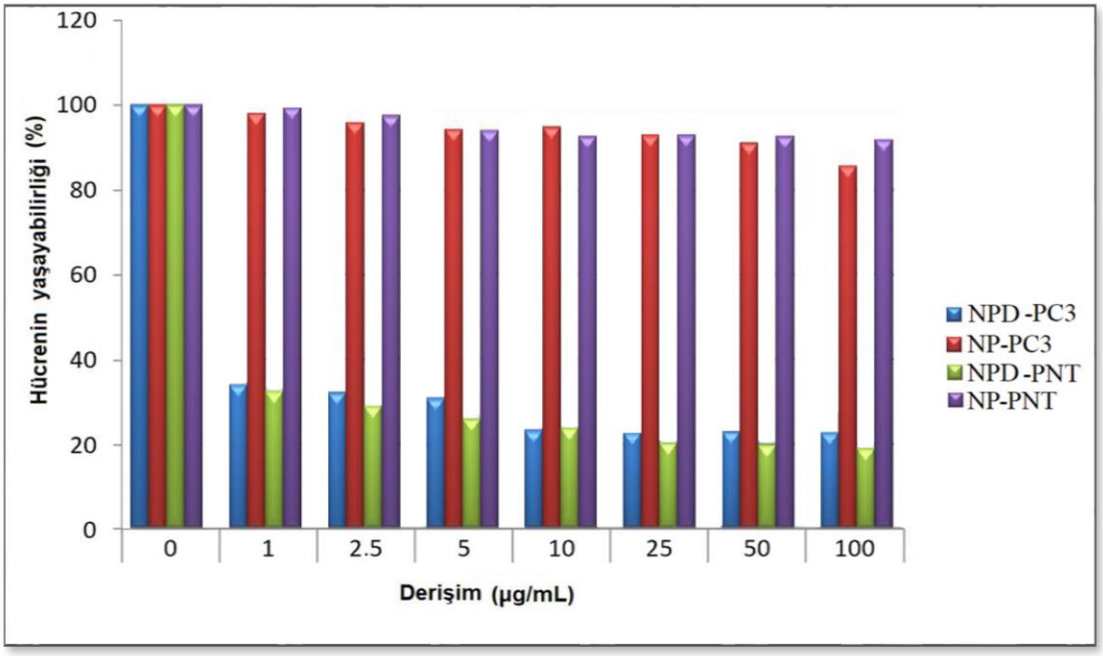
PC3 ve PNT1A hücrelerine uygulanmış olan ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dxtl nanopartiküllerinin derişimine karşı canlı hücre yüzdeleri karşılaştırılarak grafiğe geçirildi (Şekil 4.9- 4.11).



Şekil 4.9. Farklı nanopartikül konsantrasyonlarında canlı hücre yüzdelerindeki değişim (24. saat)



Şekil 4.10. Farklı nanopartikül konsantrasyonlarında canlı hücre yüzdelerindeki değişim (48. saat)



Şekil 4.11. Farklı nanopartikül konsantrasyonlarında canlı hücre yüzdelerindeki değişim (72. saat)

Bileşiklerin sitotoksik etkilerinin doza ve zamana bağlı olduğu tespit edildi. Elde edilen veriler ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 partikülünün düşük dozlarda toksik etkisinin çok az olduğu ve zamanla derişime bağlı etkisinin nispeten azaldığı görüldü. Ayrıca kanserli prostat hücre hattı üzerine olan toksik etkisinin sağlam prostat hücre hattı üzerindeki toksik etkisinden daha fazla olduğu gibi olumlu bir sonuç verilerden gözlemlendi. Diğer yandan, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl partikülüne bakıldığında her iki hücre hattında da doza bağımlı şekilde sitotoksik etkisinin arttığı ve PC3 hücre hattı üzerindeki hücre yaşayabilirliği oranına en yüksek etkisinin 48. saatte, PNT1-A hücre hattı üzerine en yüksek etkisinin ise 72. saate meydana geldiği görüldü. Ayrıca yine Docetaxel içermeyen nanopartikülde olduğu gibi, sağlam insan prostat hücresindeki sitotoksik etkinin kanserli insan prostat hücresindeki sitotoksik etkiden genellikle daha az olduğu olumlu bir veri olarak gözlemlenmiştir.

Ölçülen % canlılık değerlerinin dozlara karşı dağılım (sigmoidal) grafikleri çizildi ve doğru denklemlerinden IC_{50} (tümör hücresi proliferasyonunu %50 inhibe etmek için gerekli konsantrasyon) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

Doğru denklemi: $y = a.x + b$ $\qquad$ $IC_{50} = \frac{50-b}{a}$

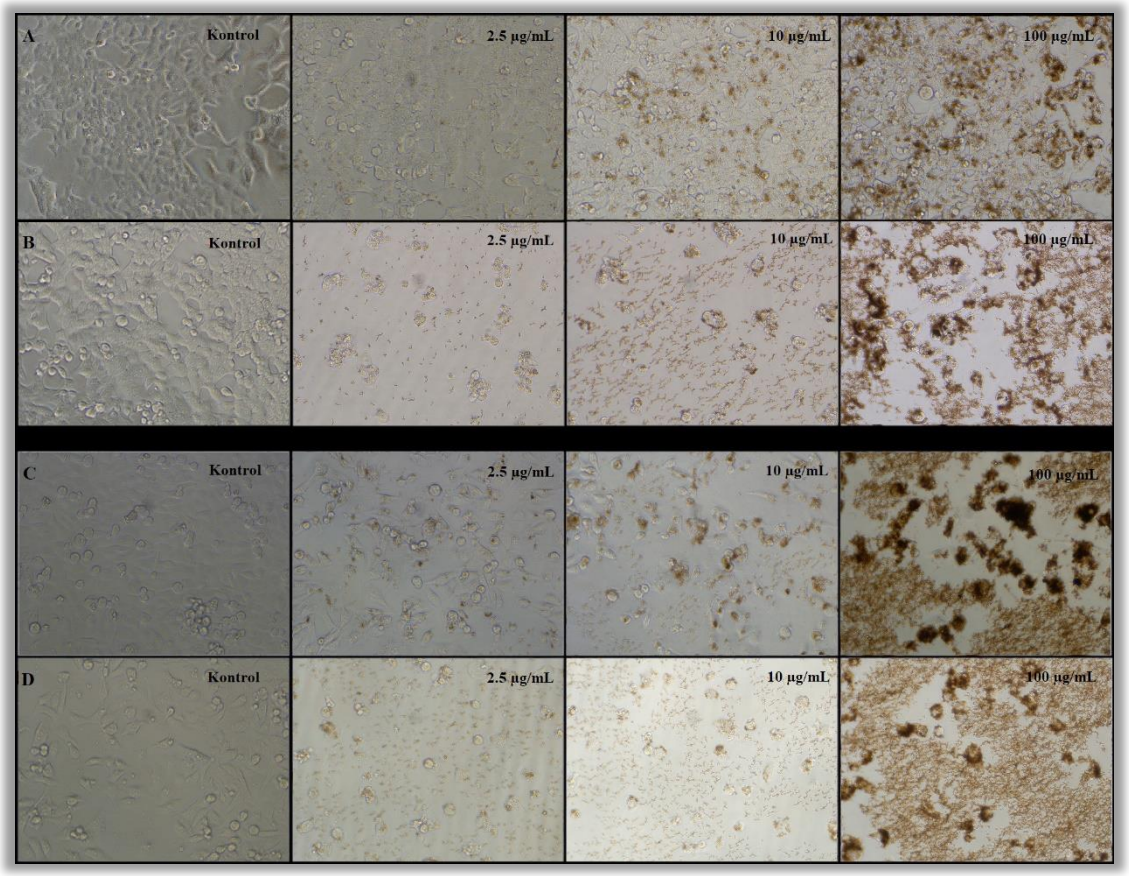
Formül kullanılarak, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl nanopartikülü ile çalışılmış PC3 hücresinde 24, 48 ve 72. saatlerde IC50 değerleri sırasıyla 12.2188, 0.0014 ve 0.0032 µg/mL olarak hesaplandı. ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl nanopartikülü ile çalışılmış PNT1A hücresinde ise 24, 48 ve 72. saatlerde IC_{50} değerleri sırasıyla 68.3491, 5.3227 ve 0.0022 µg/mL olarak hesaplandı.

IC_{50} değerlerine bakıldığında en yüksek antiproliferatif (çoğalma önleyici) etki PC3 hücre hattında 48. saatte meydana gelmiştir (0,0014 µg/mL). En düşük antiproliferatif etki PNT1-A hücre hattında 24. saatte meydana gelmiştir (68.3491 µg/mL).

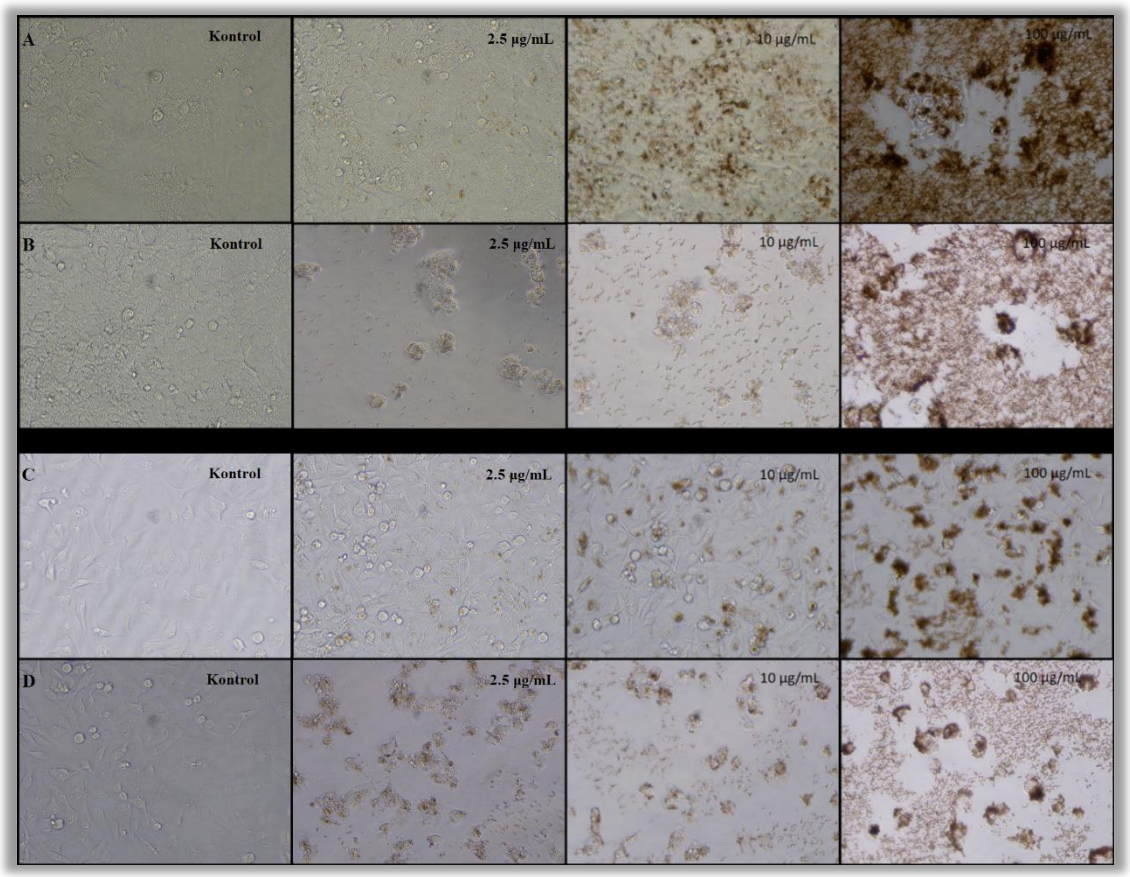
Docetaxel eklenmemiş nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etki yüzdeleri (NP-PC3 ve NP-PNT) ile de IC_{50} değerleri hesaplandı ve 206.7593-751.7742 µg/mL arasında değerler tespit edildi. IC_{50} değerleri Docetaxel eklenmemiş nanopartiküllerin her iki hücre hattı üzerinde de sitotoksik etkisinin çok az olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra Docetaxel içeren nanopartiküller, özellikle 48. saatte, Docetaxel içermeyen nanopartiküllere nispeten oldukça yüksek antiproliferatif etki gerçekleştirdi ve bu etkinin PC3 hücre hattı üzerinde PNT1-A'ya göre çok daha fazla olduğu görüldü.

Nanopartiküle bağlanmadan kendi başına Docetaxel uygulaması sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri ise PC3 hücresi için 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 12.5929, 0.0214 ve 0.0007 µg/mL, PNT1A hücresi için 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 15.6621, 3.3343 ve 0.0277 µg/mL olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar NPD-PC3 ve NPD-PNT değerleri ile karşılaştırıldığında, özellikle 24 ve 48 saat sonrası için, Docetaxelin nanopartiküle bağlandığında PC3 hücresi canlılığını daha fazla PNT1A hücresi canlılığını daha az düşürdüğü söylenebilir.

ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 eklenmiş PC3 ve PNT1A hücreleri ile ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl eklenmiş PC3 ve PNT1-A hücrelerinin MTT çalışmaları öncesinde 48. ve 72. saatlerde floresans görüntülemesi yapıldı (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Bu görüntüler de ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 partikülün (NP) sitotoksik etkisinin çok az olduğunu ve Docetaxel bağlanmış ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl (NPD) partiküllerin yüksek etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır.



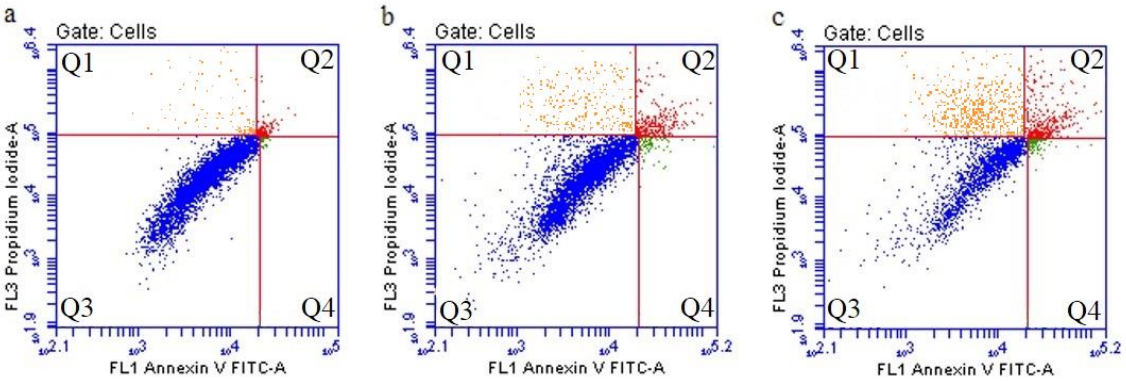
Şekil 4.12. 48. saat morfoloji görüntüleri A) NP-PC3, B) NPD-PC3, C) NP-PNT1A, D) NPD- PNT1A



Şekil 4.13. 72. saat morfoloji görüntüleri A) NP-PC3, B) NPD-PC3, C) NP-PNT1A, D) NPD- PNT1A

4.3.2. Apoptoz Testi

Nanopartikül içermeyen negatif örnek ile 10 ve 15 µg/mL ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl içeren örneklerin apoptotik hücre ölümü testleri Annexin V-FITC ve Propidium İyodür kullanılarak flowsitometrik olarak tespit edildi (Şekil 4.14). Q1: nekrotik, Q2: geç apoptotik, Q3: canlı, Q4: erken apoptotik hücreleri göstermektedir.

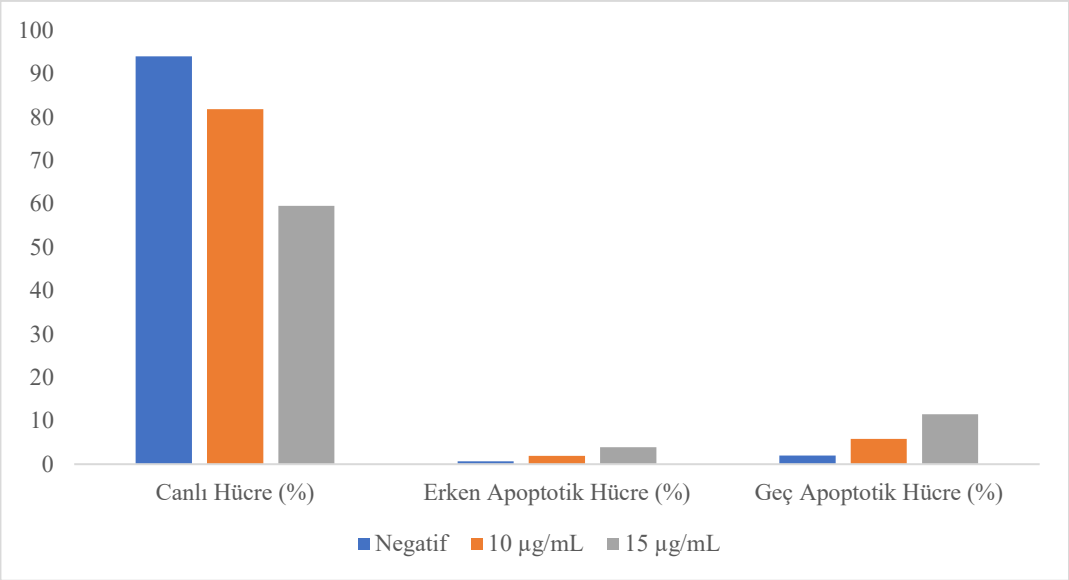


Şekil 4.14. Flowsitometri sonuçları a) Negatif, b) 10 µg/mL NPD-PC3, c) 15 µg/mL NPD-PC3

Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmekte olup Şekil 4.15.'te karşılaştırma grafiği oluşturulmuştur. Sonuçlar, sentezlenmiş ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl nanopartikülünün doza bağımlı olarak apoptozu indüklediğini gösterdi. Negatif örnekte apoptoz oranı %2.7 iken 10 ve 15 µg/mL ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl içeren örneklerdeki apoptoz oranları sırasıyla %7.7 ve %15.4 olarak tespit edildi. Özellikle 15 µg/mL derişiminde uygulanan ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl (Şekil 4.14-C) geç apoptotik yüzdelerini önemli ölçüde artırmıştır.

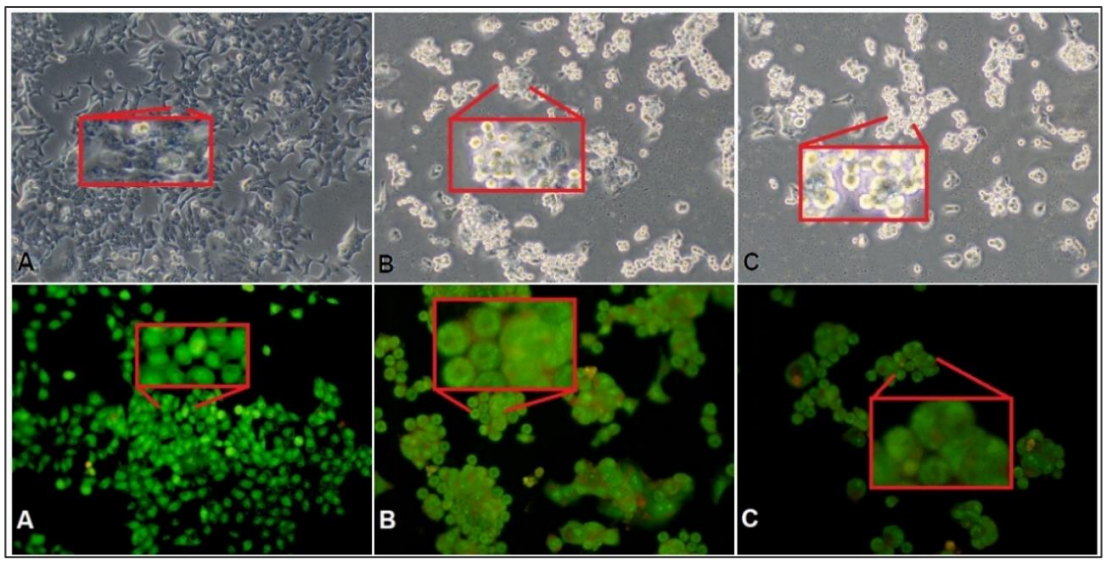
Çizelge 4.9. Apoptoz analizi sonuçlarının yüzdelik değerleri

Nanopartikül Derişimi	Apoptotik Hücre (%)	Geç Apoptotik Hücre (%)	Toplam Apoptotik hücre (%)
0 (Negatif)	0.7	2.0	2.7
10 µg/mL	1.9	5.8	7.7
15 µg/mL	3.9	11.5	15.4



Şekil 4.15. İnsan prostat kanser hücresinin (PC3) Annexin V-FITC ve PI kullanarak tespit edilmiş apoptotic yüzdelik değerleri karşılaştırması

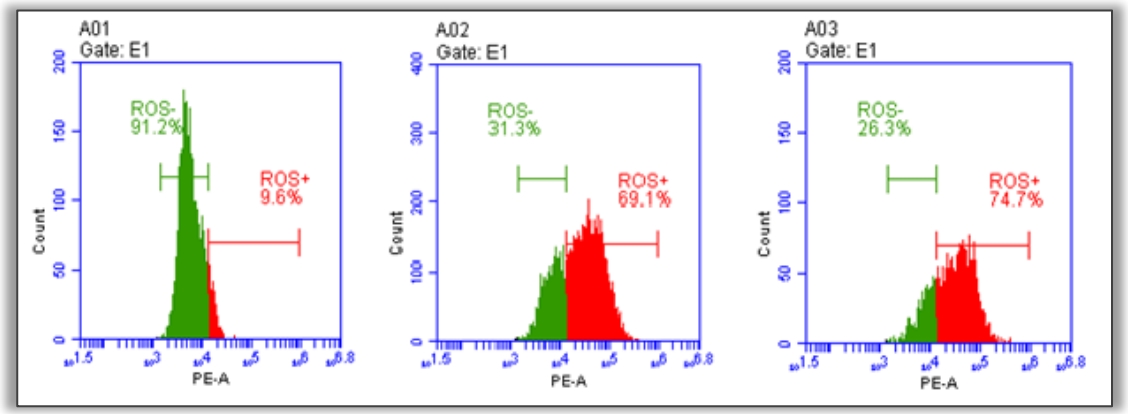
PC3 kanser hücreleri, IC_{50} değerlerine göre 10 ve 15 µg/mL ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl ile inkübe edildikten sonra acridine orange ile boyandı. Örnekler floresan mikroskobu kullanılarak morfolojik olarak görüntülendi (Şekil 4.16). Apoptotik hücrelerin çekirdeklerinde turuncu partiküller varken, canlı hücreler yeşil renkte gözlendi. 15 µg/mL derişimindeki ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl diğerlerine göre daha fazla apoptotik etkiye neden oldu.



Şekil 4.16. 24. saatte acridine orange ile boyandıktan sonraki fluorecent görüntüleri. A) Kontrol, B) 10 µg/mL NPD-PC3, C) 15 µg/mL NPD-PC3

4.3.3. Hücre İçi ROS Üretimi

Hücre içi ROS oluşumu ölçümleri, metodu verilen kit protokolüne uygun şekilde Docetaxel içeren NP'ler (ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl) kullanılarak, PC3 hücresi üzerinde gerçekleştirilerek, sonuçlar karşılaştırıldı (Şekil 4.17). Histogramdaki sağa doğru oluşan kayma ROS üretiminin arttığını göstermektedir.



Şekil 4.17. ROS üretimi analizi sonuçları, A01: Negatif, A02: 10 µg/mL NPD-PC3, A03: 15 µg/mL NPD-PC3

Hücre içi reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin artması hücre içi homeostazı bozmuştur. Bu durum da apoptozu indüklemiştir. Demir oksit nanopartiküller kendi başlarına ya da başka bir maddeyle bağlanarak ROS üretimini artırabilir. Bu süreçte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NAPDH) aktiflenerek O_2'nin süperoksit radikaline (O_2^-) ve hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşmesine yol açar. Sonuç olarak toksik olan OH^- radikali meydana gelir (Saikia ve ark. 2016, Ma ve ark. 2017). Aynı zamanda taksanlar (docetaxel, paclitaxel vb.) tedavi amaçlı kullanıldıklarında, ROS un aşırı üretimi ve antioksidan enzim düzeylerinde de düşmelere sebebiyet verdiğinden oksidatif stress gelişir (Pieniazek ve ark. 2013). Çalışmamızdaki ROS artışının demir oksit nanopartiküllerinden ileri gelme ihtimali kaplanmış halde olduğu için düşüktür.

Rivero-Buceta ve ark. (2019) PC3 hücreleri üzerinde DMSO stok çözeltisi içinde docetaxel kullanarak MTT çalışması yapmıştır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre 0.005, 0.05, 0.5, 5, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonda docetaxel uygulanması ile 72 saat sonra hücre yaşayabilirlik değerleri grafik vasıtasıyla verilmiş ancak tam değerlere yer verilmemiştir. Grafiklerden değerlerin %50'nin üzerinde olduğu açıktır. Bu değerler sentezlemiş olduğumuz ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl nanopartikülünde aynı saat ve

hücre için 5, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonda sırasıyla %31, %23 ve %23'tür. ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülü için ise bu değerler en düşük %86 dır. Bu sonuçlar gözönünde bulundurulduğunda sentezlemiş olduğumuz ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülün, verilen şartlarda saf Docetaxel'den çok daha az sitotoksik olduğunu ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl'in ise PC3 üzerinde çok daha fazla sitotoksik etki yaptığını göstermektedir.

Vig ve ark. (2013), docetaxel yükledikleri süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri kullanarak MTT deneyi gerçekleştirmiş ve 48. saat sonunda SPION ve SPION-Docetaxel'in 100 µg/mL konsantrasyonunda HeLa (rahim ağzı kanseri) hücresi üzerindeki yaşayabilirlik etkilerini incelemiştir. Bulunan sonuçlara göre HeLa hücresinin yaşayabilirlik değerleri SPION için %80 ve SPION-Docetaxel için %20'dir. Çalışmamızda buna benzer SPION-Docetaxel değerlerini 48. saat için PC3 hücresi üzerinde 10 µg/mL konsantrasyonunda görebildik ve bu şartlarda SPION'un etkisi yaşayabilirliği sadece %89'a indirmişti.

Demir oksit manyetik nanopartiküllerinin polimer ve docetaxel bağlanmaları ile elde edilen benzer bir çalışma Nagesh ve ark. (2016) tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmada SPIONların hücre proliferasyonunu etkilemediği ancak Dtxl ve SPION-Dtxl malzemelerin doza bağlı bir önleyici etki yaptığı vurgulanmıştır. 48 saat sonunda yaptıkları ölçüm sonucu IC_{50} değerlerini SPION-Dtxl için 8.5-9.2 nM aralığında ve Dtxl için ise 13.5-15.6 nM aralığında buldukları belirtilmiştir. Bu değerler, docetaxel'in, süperparamanyetik demir oksit-polimer nanopartikülüne bağlanması sonucu daha düşük dozlarda terapötik etkisini gösterdiğine işarettir. SPION-Dtxl'in, apoptotik proteinlerin yukarı regülasyonu yoluyla, prostat kanseri hücrelerinde güçlü anti-kanser etkileri uyardığını bildirmiştir.

Comparetti ve ark. (2020), karbon nanotüpler ile docetaxel gibi bir taxol grubu ilaç olan Paclitaxel kullanarak nanopartikül sentezlemiştir. 1 µg/mL konsantrasyonda ve 48 saat sonunda, karbon nanotüplerin prostat kanser hücresinin proliferasyonunu inhibe etmediğini ancak Paclitaxel ile bağlanınca hücre canlılığını %80'e düşürdüğünü söylemiştir.

Poly (lactic-co-glycolic acid) ve poli(etilen glikol) (PLGA-PEG) blok kopolimer tabanlı aptamer bağlantılı Docetaxel nanopartikül sentezleyen Chen ve ark. (2016), LNCaP prostat kanseri hücresi üzerinde benzer çalışma yapmıştır. Bu prostat kanser

hücresinin yaşayabilirliğini MTT testiyle ve hücre ölümünü de Anexin-V kiti kullanarak flow sitometrik olarak ölçmüştür. Nanopartiküle bağlı docetaxel ile 24 ve 48. saatlerde MTT ölçümü sonuçlarına göre; Docetaxel bağlı nanopartiküller her iki zamanda da doza bağımlı bir şekilde hücrenin yaşayabilirliği yüzdelerini ilaçsız nanopartiküle göre büyük oranda değiştirmiştir. Docetaxel bağlı nanopartiküllerin en büyük etkisi 48. Saatte 100 µg/mL derişimde yaklaşık %7'lik hücre canlılığı ile göstermiştir. Çalışma sonucunda hesaplanan serbest docetaxel IC_{50} değeri, NP-Docetaxel IC_{50} değerinden düşük çıkmış ve bunu ilginç olarak tanımlayarak sebebi hücresel alım farkına atfetmiştir. Chen ve ark. (2016) bu olayı "Topikal yüksek konsantrasyona ve hücre zarı ile geniş temas alanına bağlı olarak, serbest DTX (Docetaxel), pasif bir taşıma mekanizması yoluyla kolayca sitoplazmaya yayılabilir ve böylece daha fazla hücre ölümüne neden olmak için hücrelere giren daha fazla DTX molekülünü harekete geçirir. DTX-NP'ler gibi geleneksel nanopartiküller için, bunlar yalnızca bir membran mobil taşıma ile içselleştirilebilir" şeklinde açıklamıştır. Aynı çalışmada, 24 saatlik uygulama ardından apoptoz testi yapılmış ve 25 µg/mL derişimdeki DTX-NP'ler için erken ve geç apoptoz değerlerini toplam %9.19 olarak bulmuştur.

Luo ve ark. (2020) yaptıkları bir çalışmada Annexin V-PE/ 7-AAD apoptoz kiti ile 10nM Docetaxel'in 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra PC3 hücresi üzerindeki apoptoz oranlarını sırasıyla %36 ve %67.2 olarak bulmuştur. Luo ve ark. (2010) oleik asit kaplı hidroksiapatit nanopartikülüne docetaxel bağlayarak (5nM) PC3 hücresinde 24 saat ardından yaptığı analizde apoptoz oranını %23.47 olarak belirtmiştir.

Çalışmamızda apoptoz ölçümü testinde, apoptoz artışı yanında, nekroz oluşumunda bir miktar artış görülmüştür. Paul ve ark. (2013) HeLa ve PC3 hücresi üzerinde yaptıkları çalışmada benzer bir nekroz oluşumu gözlemiş ve bunun ihmal edilebilir olduğunu söylemiştir. Rieger ve ark. (2011) bir çalışma yaparak bu türdeki nekroz oluşumunun kit üzerine RNaz eklenerek engellenebileceğini belirtirken, Samy ve ark. (2020)'nın epinomektin ile PC3 üzerindeki araştırmalarında doz artışıyla beraber nekroz artışı oluşmuştur. Saravanakumar ve ark. (2021) araştırmalarında çitosan temelli nanopartiküller ile PC3 hücresi üzerinde 8 saat inkübasyon sonrası nekroz ve apoptoz çalışması yapmış ve IC25 dozunda %25.11, IC50 dozunda %36.35 nekroz oluşumu tespit etmiştir. Sawai ve Domae (2011) nekroz ve apoptoz arasındaki ayırım ile ilgili çalışmalarında 1-5 saatler arasında inkübasyon sonucu nekrozda önemli artış

kaydetmiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, oluşan nekrozun apoptozdan daha net ayırımı için daha kısa zaman aralıklarında veya RNaz ilavesiyle test yapılmasının uygun olabileceği söylenebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasında Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzları kullanarak birlikte çökelme yöntemiyle süper paramanyetik demir oksit nanopartikül sentezlendi. Sentezlenen nanopartikül sırasıyla sitrik asit, Leu-Gly dipeptit ve pluronik F127 ile kaplanarak ilaç taşımaya uygun bir nanopartikül elde edildi. Nanopartikül ɤ-Fe_2O_3 sayesinde manyetik özellik kazanarak hedeflenebilir hale geldi. Ardından, biyouyumlu özellikte olan sitrik asit ilavesiyle daha stabil hale getirilen ve fonksiyonelleştirilen nanopartikül Leu-Gly bağlanması ile taşıyıcı ve ilaç salıcı özellik kazanmaya başladı. Son olarak pluronik F127 sayesinde amaçlanan ilaç taşıyıcı nanopartikülün sentezi tamamlanmış oldu.

Sentezlenen nanopartikülün özelliklerini açıklığa kavuşturmak adına karakterizasyon çalışmaları yapıldı. ɤ-Fe_2O_3'ün kristal yapısı XRD ile analiz edildi ve 2θ =30.5°, 35.8°, 43.8°, 54.2° ve 57.7° kırınımlarındaki, sırasıyla, (220), (311), (400), (422) ve (511) yansımaları Maghemite-Q, Kart No. 25-1402 ile uyumlu bulundu. Nanopartikülün karttaki ve literatürdeki değerler ile uyumlu desenlere sahip olması yapının doğru sentezlediğini gösterdi.

Nanopartikülün dışarıdan uygulanacak manyetik alanın etkisiyle tümörlü dokuya hedeflenebilmesi, sağlam dokuların zarar görmemesi ve ilacın uygulanan dozundan alınan verimin artması için oldukça önemliydi. Bu amaçla nanopartikülün manyetik özellikleri VSM analizi ile tespit edildi. Yığın haldeki maghemitin doygunluk mıknatıslanma değeri 73.5 emu/g iken ɤ-Fe_2O_3 nanopartikülün doygunluk mıknatıslanma değeri 69.8 emu/g olarak tespit edildi. Nanopartikülün doygunluk değerinin yığın maghemitinkinden küçük olması boyutları ile alakalıdır. ɤ-Fe_2O_3 ile önceden yapılmış çalışmalara benzer olan mıknatıslanma değeri hedeflenmiş ilaç taşıma için uygun bir değer olarak nitelendirilir.

ICP-MS elementel analizi ile sentezlenen yapıların demir içeriği analiz edildi ve ɤ-Fe_2O_3 için demirin kütlesel yüzdesinin % 67.86 olduğu hesaplandı. Bu değer teorik değere (%70) çok yakın olduğu için sentez başarılı bulundu. ɤ-Fe_2O_3-CA, ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartikülleri için de demir içeriği analiz edildiğinde demir kütle yüzdesinin gittikçe küçüldüğü görüldü. Bu değerler her basamakta verimli bağlanmalar ile sentezin devam ettiğini göstermektedir.

Malzemenin negatif yüzey yükü onun eliminasyonu ve sitotoksisitesi hakkında bilgi verir. Bu çerçevede ɤ-Fe_2O_3 ve ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri analiz edilerek sırasıyla -5.11 ve -28.1 mV (pH 7.4) olarak tespit edildi. Literatür ile uyumlu bu değerler nanopartikülün kararlı, eliminasyonunun yüksek ve sitotoksisitesinin düşük olduğunu gösterdi.

Nanopartikülün tanecik görüntüsü ve büyüklüğü SEM ve TEM ile gözlendi. Farklı çözünürlüklerde alınan görüntülerden ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin ortalama 10 nm partikül ve 120 nm agregasyon boyutuna sahip olan küresel bir nanopartikül olduğu anlaşılmaktadır. Bu boyutlar ilaç taşıma sistemleri için uygun kabul edilmiş ve benzer boyutlardaki nanopartiküller ile önemli çalışmalar yapılmıştır.

Docetaxel bağlanması için hazırlanmış olan ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127 nanopartiküllerinin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri de bu çalışmada incelendi. Nanopartikülün, kullanılması planlanan dozlarda anlamlı bir antimikrobiyal ve antioksidan özellik göstermediği tespit edildi. Bu beklenen bir durumdur, literatürde nanopartiküle benzer malzemelerin ancak yüksek dozlarda anlamlı antimikrobiyal ve antioksidan özellik gösterdiği bulunmuştur. Ancak yüksek dozlar ilaç taşıma sistemleri için sitotoksik etki gösterebilmektedir.

İlaç taşınmasında kullanılacak nanopartikülün karakteristik özelliklerinin belirlenmesi ardından docetaxel bağlanarak çalışmalara hücre üzerinde devam edildi. PC3 ve PNT1A hücreleri üzerinde hücre canlılığı, PC3 hücreleri üzerinde apoptoz ve ROS ölçümleri yapıldı.

Hücre yaşayabilirliği analizi için MTT testi yapıldı ve 24, 48 ve 72. saatlerde ölçümler alındı. Test sonuçları ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127'nin çalışılan derişimlerinde önemli toksik özellik göstermediği tespit edildi. Docetaxel bağlanması sonucunda ise doza ve zamana bağlı sitotoksik etki görüldü. Özellikle 24 ve 48. saatlerde elde edilen veriler ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl'nin PC3 üzerinde PNT1A'ya göre çok daha fazla toksik etki oluşturduğunu gösterdi. Bu veriler ilacın kanserli dokuya daha fazla nüfuz ettiğini ve sağlam dokunun nispeten korunduğunu göstermektedir. Ancak yine de PNT1A hücresi üzerine toksik etki söz konusudur. Özellikle 72 saat ardından yapılan ölçümler tümörlü PC3 dokusunun yanında sağlam dokunun da azımsanamayacak ölçüde zarar görebildiğini öne çıkarmaktadır. Bunun sebebi önceki benzer çalışmalarda olduğu gibi topikal yüksek konsantrasyona bağlanabilir. Daha net sonuçlar elde edebilmek için

daha fazla hücre grubu ve daha uzun süreçlerde deneyler yapılmasının doğru olacağı düşünülmektedir.

Sentezlenen nanopartikülün hücre canlılığına etkisi saf docetaxel'in etkisi ile karşılaştırıldı. Nanopartiküle bağlanmış docetaxel'in, saf haline göre PC3 üzerinde çok daha fazla sitotoksik etkisi olduğu, PNT1A üzerinde ise daha az sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Bu sonuçlar da sentezlenen nanopartikülün kullanışlı bir ilaç taşıma sistemi adayı olduğunu göstermektedir.

PC3 hücre hattı üzerinde ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl kullanarak apoptoz indükleme ve hücre içi ROS üretimi analizleri yapıldı. Nanopartikülün 10 ve 15 µg/mL derişimindeki örnekleri ile yapılan çalışmada doz artışıyla beraber apoptozun ve ROS üretiminin arttığı görüldü.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara geniş bir perspektiften bakılarak özetlendiğinde, sentezlenen docetaxel yüklü nanopartikülün yalnız kullanılan docetaxele göre kanserli dokuda daha fazla, sağlam dokuda ise daha az sitotoksik etkiye neden olduğu ve bu etkinin doz ile zamana bağımlı olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar, dünyada en fazla can kaybına neden olan kanser hastalığı tedavisi için önemli bir adımdır. Ancak ideal düzeyde bir nanopartikül olduğunu söylemek için yeterli değildir.

Kemoterapötik ilaçların eliminasyon sürelerinin uzatılması, sağlıklı doku üzerindeki zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması, tümör üzerindeki tedavi edici etkisinin artırılması yani; daha az ilaç ile daha fazla terapötik etki kazandırılması için hala araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar düşünüldüğünde, ilaç yüklü nanopartikülün sağlam dokudan ziyade kanserli dokuya daha fazla yönelmesini sağlamak amacıyla, farklı yapıda veya miktar ve şartlarda polimer kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılması faydalı olabilir. Ayrıca ilacın taşınma ve salınım verimliliğini artırıcı fonksiyonelleştirme araştırmaları da oldukça önemlidir.

Sentezlenen ɤ-Fe_2O_3-CA-Leu/Gly-PF127-Dtxl nanopartikülü ile daha düşük metastatik özelliğe sahip DU145, LNCaP gibi prostat kanseri hücreleri ve CRPC (kastrasyon dirençli prostat kanseri), PC3R (direnç geliştirmiş prostat kanseri) gibi dirençli kanser hücreleri üzerinde de çalışma yapılarak incelenmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Akbarzadeh, A., Samiei, M., Davaran, S. 2012a. Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Res Lett,** 7, Article number: 144.

Akbarzadeh, A., Mikaeili, H., Zarghami, N., Mohammad, R., Barkhordari, A., Davaran, S. 2012b. Preparation and in vitro evaluation of doxorubicin loaded Fe_3O_4 magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers. **Int J Nanomed**, 7: 511–526

Akkafa, F., Koyuncu, İ., Temiz, E., Dagli, H., Dilmec, F., Akbas, H. 2018. miRNA-mediated apoptosis activation through TMEM 48 inhibition in A549 cell line, **Biochem Bioph Res Co**, 503(1): 323-329.

Alibeigi, S., Vaezi, M. R. 2008. Phase transformation of iron oxide nanoparticles by varying the molar ratio of Fe^{2+}:Fe^{3+}. **Chem Eng Technol,** 31(11): 1591–1596.

Alkan, H. 1983. Lipozomlar. 1. Özellikleri ve Hazırlama Yöntemleri. **Fabad J Pharm Sci,** 8: 181–196.

Amin, J.A.A., Eddine, L.S., Bouafia, A., Alonso-González, M., Guerrero, A., Romero, A. 2020. Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by *Pheonix dactylifera* leaf extract and evaluation of their antioxidant activity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy,** 17: 100280, ISSN 2352-5541.

Anselmo, A. C., Mitragotri, S. 2016. Nanoparticles in the clinic. **Bioengineering & Translational Medicine,** 55: 10-29.

Ashkhasi, A. 2017. GaSe ve GaSe:Cd Yarı iletkeninin büyütülmesi, yapısal, optik ve elektriksel özeliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 24-26.

Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le, Jeune JJ., Jallet, P.1999. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. **J Colloid Interf Sci,** 212(2): 474–482.

Bakır, B. 2021. Prostat Kanseri. Erişim [https://www.barisbakir.com/prostat-kanseri.aspx]. Erişim tarihi: 05.05.2021

Bamrungsap, S. 2012. Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, 7(8):1253–1271.

Basel, M.T., Balivada, S., Wang, H., Shrestha, T.B., Seo, G.M., Pyle, M., Abayaweera, G., Dani, R., Koper, O.B., Tamura, M. 2012. Cell-delivered magnetic nanoparticles caused hyperthermia-mediated increased survival in a murine pancreatic cancer model. **Int J Nanomed,** 7: 297-306.

Bast, A., Haenen, G., Goelmen, J.A. 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. **Am J Med,** 91(3 / 3): 2-13.

Beletsi, A., Leontiadis, L., Klepetsanis, P., Ithakissios, D.S., Avgoustakis, K. 1999. Effect of preparative variables on the properties of PLGA-mPEG copolymers related to their applications in controlled drug delivery. **Int J Pharm.,** 182:187–197.

Berry, I., Benderbous, S., Ranjeva, J., Gracia- Meavilla, D., Manelfe, C., Bihan, D.L. 1996. Contribution of sinerem R used as blood-pool contrast agent: Detection of cerebral blood volume changes during apnea in the rabbit. **Magn Reson Med,** 36(3):415-419.

Bee, A., Massart, R., Neveu, S. 1995. Synthesis of very fine maghemite particles. **J Magn Magn Mater,** 149(1–2): 6-9.

Betancor, L., Luckarift, H.R. 2008. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis **Trends Biotechnol,** 26(10): 566-572.

Betteridge, D.J. 2000. What is oxidative stress? **Metabolis,** 49(2 Suppl 1): 3-8.

Biswas, A., Vanlalveni, C., Lalfakzuala, R., Nath, S., Rokhum, L. 2021. *Mikania mikrantha* leaf extract mediated biogenic synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: Characterization and its antimicrobial activity study. **Mater Today-Proc**, 42(2) 1366-1373.

Blanazs, A., Armes, S. P., Ryan, A. J. 2009. Self-assembled block copolymer aggregates: From micelles to vesicles and their biological applications. **Macromol Rapid Comm,** 30: 267–277.

Bolu, S.B., Manavoglu, E.G., Sanyal, R. 2016. Combretastatin A-4 conjugated antiangiogenic micellar drug delivery systems using dendron-polymer conjugates. **Mol Pharm,** 13: 1482–1490.

Borawake, M.A., Pande, D.D., Giri, V.V. 2017. Mesoporous silica nanoparticles as theranostic platform for smart drug delivery: A review. **Nanomedicine Nanosci Researc,** 1–11.

Breen, A.P., Murphy, J.A. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radic Biol Med,** 18:1033-1077.

Brown, M.A., Semelka, R.C. 2011. MRI.: Basic principles and applications. John Wiley & Sons.

Campos, E.A., Pinto, D.V.B.S., Oliveira, J.I.S.D., Mattos, E.D.C., Dutra, R.D.C.L. 2015. Synthesis, characterization and applications of iron oxide nanoparticles-a short review. **Journal of Aerospace Technology and Management,** 7(3):267-276.

Carenza, E., Barcelo, V., Morancho, A., Montaner, J., Rosell, A., Roig, A. 2014. Rapid synthesis of water-dispersible superparamagnetic iron oxide nanoparticles by a microwave-assisted route for safe labeling of endothelial progenitor cells. **Acta Biomater,** 10(8): 3775-3785.

Cebeci, T.B.S. 2020. Zn^{2+} katkılı spion'lar ve demir oksit spinel ferrit sistemlerinin biyomedikal görüntüleme için optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze. 29.

Chakravarty, R., Valdovinos, H.F., Chen, F., Lewis, C.M., Ellison, P.A., Luo, H., Meyerand, M.E., Nickles, R.J., Cai, W. 2014. Intrinsically germanium-69-labeled iron oxide nanoparticles: Synthesis and in-vivo dual-modality pet/mr imaging. **Advanced Materials,** 26(30):5119-5123.

Chan, J.M., Giovannucci, E.L. 2001. Dairy products, calcium and vitamin D and risk of prostate cancer. **Epidemiol Rev,** 23(1): 87–92.

Chen, P. C., Mwakwari, S. C., Oyelere, A. K. 2008. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. **Nanotechnology, Science and Applications,** 1:45-65. doi: 10.2147/nsa.s3707.

Chen, R., Ren, S., Yiu, M.K. 2014. Prostate cancer in Asia: a collaborative report. **Asian J Urol,** 1: 15-29.

Chen, Z., Tai, Z., Gu, F., Hu, C., Zhu, Q., Gao, S. 2016. Aptamer-mediated delivery of docetaxel to prostate cancer through polymeric nanoparticles for enhancement of antitumor efficacy. **Eur J Pharm Biopharm**, 107: 130-141.

Cheng, Y., Wang, J., Rao, T., He, X., Xu, T. 2008. Pharmaceutical applications of dendrimers: Promising nanocarriers for drug delivery. **Front Biosci**,13: 1447-1471.

Cheraghipour, E., Javadpour, S., Mehdizadeh, A. 2012. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. **J Biomed Sci Eng,** 5: 715-719.

Clemons, T.D., Kerr, R.H., Joos, A. 2019. Multifunctional magnetic nanoparticles: Design, synthesis, and biomedical applications, Editors: Andrews, D.L., Lipson, R.H., Nann, T., Goreham, R.V. In Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology, Volume 3: Biological Nanoscience, 193-210. Elsevier BV

Comparetti, E.J., Romagnoli, G.G., Gorgulho, C.M., Pedrosa, V.A., Kaneno, R. 2020. Anti-PSMA monoclonal antibody increases the toxicity of paclitaxel carried by carbon nanotubes. **Mater Sci Eng: C**, 116: 111254, ISSN 0928-4931.

Coşkun, G., Özgür, H. 2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. **Arşiv Kaynak Tarama Dergisi,** 20(3): 145-158.

Cummings, M.C., Winterfold, C.M., Walker, N.I. 1997. Apoptosis. **Am J Surg Pathal**, 21:88-101

Curri, M.L., Agostiano, A., Manna, L., Monica, M.D., Catalano, M., Chiavarone, L., Spagnolo, V., Lugarà, M. 2000. Synthesis and characterization of CdS nanoclusters in a quaternary microemulsion: The role of the cosurfactant. **J Phys Chem-US B,** 104 (35): 8391-8397.

Curtis, A., Wilkinson, C. 2001. Nanotechniques and approaches in biotechnology. **Trends in Biotechnology,** 19 (3): 97–101.

Çağlar, M. Y., Demirci, M., Şahiner, A., Çakır, B., Çağlar, A. F. 2019. Gıda analizlerinde kullanılan spektroskopik teknikler. **Akademik Gıda,** 17(1): 121–130.

Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. 2004. Cell death: Critical control points. **Cell**, 116:205-219.

Darezereshki, E. 2010. Synthesis of maghemite (γ-Fe2O3) nanoparticles by wet chemical method at room temperature. **Mater Lett,** 64: 1471–1472.

De Martinis, B.S., De Lourdes, P.B.M. 2002. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by hplc with electrochemical detection. **Pharmacol Res,** 46(2): 129-131.

Delongchamps, N.B., Singh, A., Haas, G.P. 2006. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. **Cancer Control,**13(3): 158–68.

Demas, V., Lowery, T.J. 2011. Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: Superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. **New J Phys,** 13(2):24. Article Id: 025005.

Demchenko, A.P. 2012. The change of cellular membranes on apoptosis: Fluorescence detection. **Exp Oncol,** 34(3): 263-268.

Deras, I.L., Aubin, S.M., Blase, A., Day, J.R., Koo, S., Partin, A.W. 2008. PCA3: A molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. **J Urol,** 179(4):1587-1592.

Devasagayam, T.P.A, Tilak, J.C., Boloor, K.K. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **J Assoc Physicians India,** 52: 794-804.

Dizdaroğlu, M. 1998. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. **Free Radic Res,** 29(6): 551-563.

Dizdaroğlu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: Mechanism and measurement. **Free Radic Biol Med,** 32(11): 1102-1115.

Doleckova, I., Rarova, L., Grúz, J. 2012. Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves. **Fitoterapia,** 83: 1000-1007.

Dolores, R., Raquel, S., Adianez, G.L. 2015. Sonochemical synthesis of iron oxide nanoparticles loaded with folate and cisplatin: Effect of ultrasonic frequency. **Ultrason Sonochem,** 23: 391-398.

Eatock, M.M., Schätzlain, A., Kaye, S.B. 2000. Tumor vasculature as a target for anticancer therapy. **Cancer Treat Rev,** 26:191–204.

Elmi, S.M. 2020. Investigation of catechol-o-methyl transferase (Comt) gene Val158met polymorphism and its relationship with prostate cancer. Master Thesis, Yeditepe University Institute of Health Sciences Department of Molecular Medicine. İstanbul. 3-4.

Emerich, D. F., Thanos, C. G. 2003. Nanotechnology and medicine. **Expert Opin Biol Th,** 3(4): 655-663. doi:10.1517/14712598.3.4.655

Erkekoğlu, P., Baydar, T. 2021. Güncel in vitro sitotoksisite testleri. **Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi,** 41(1): 45-63.

Etrych, T., Sirovae, M., Starovoytova, L., Riehovae, B., Ulbrich, K. 2010. HPMA copolymer conjugates of paclitaxel and docetaxel with pH-controlled drug release. **Mol Pharm,** 7: 1015–1026.

Faivre, D., Bennet, M. 2016. Magnetic nanoparticles line up. **Mater Sci+,** 535: 235–236.

Foner, S. 1959. Versatile and sensitive vibrating sample magnetometer. **Rev Sci Instrum,** 30: 548-557.

Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition,** 18(10), 872-879.

Fu, H.L., Cheng, S.X., Zhang, X.Z., Zhuo, R.X. 2007. Dendrimers/DNA complexes encapsulated in a water soluble polymer and supported on fast degrading star poly (DL-lactide) for localized gene delivery. **J Control Release**, 124:181-188.

Gehrke, I., Somborn-Schulz, A. 2015. Innovations in nanotechnology for water treatment. **Nanotechnology, Science and Applications**, 8: 1–17.

Gill, C.S., Price, B.A., Jones, C.W. 2007. Sulfonic acid-functionalized silica-coated magnetic nanoparticle catalysts. **J Catal**, 251(1): 145-152.

Giuliano, S. ve Pages, G. 2013. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. **Biochimie**, 95: 1110–1119.

Gjertson, C.K., Albertsen, P.C. 1995. Use and assessment of PSA in prostate cancer. **Med Clin North Am.,** 1:191-200.

Globocan. 2020. International agency for research on cancer/world health organisation. Erişim: [https://gco.iarc.fr/today/home]. Erişim Tarihi: 10.05.2021

Glover, P.W.J. 2015. Geophysical properties of the near surface earth: Electrical properties. **Treatise on Geophysics,** 89-137.

Goodwin, S.C., Bittner, C.A., Peterson, C.L., Wong, G. 2001. Single dose toxicity study of hepatic intraarterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier. **Toxicol Sci,** 60(1): 177-83.

Gossuin, Y., Gillis, P., Hocq, A., Vuong, Q.L., Roch, A. 2009. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. **Wires Nanomed Nanobi,** 1(3):299-310.

Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T. 1994. Biodegradable long circulating polymeric nanosphers. **Science,** 263:1600–1630.

Grootendorst, D.J., Jose, J., Fratila, R.M., Visscher, M., Velders, A.H., Haken, B.T., Leeuwen, T.G.V., Steenbergen, W., Manoha,r S., Ruers, T.J.M. 2013. Evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (endorem R) as a photoacoustic contrast agent for intra-operative nodal staging. **Contrast Media Mol I,** 8(1):83-91.

Grönberg H. 2003. Prostate cancer epidemiology. **Lancet,** 8;361(9360): 859-64.

Guardia, P., Corato, R.D., Lartigue, L., Wilhelm, C., Espinosa, A., Garcia-Hernandez, M., Gazeau, F., Manna, L., Pellegrino, T. 2012. Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. **ACS nano,** 6(4):3080-3091.

Gupta, A.K., Wells, S. 2004. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. **IEEE T Nanobiosci,** 3(1):66-73.

Gupta, A.K., Gupta, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials,** 26: 3995-4021.

Ha, Y., Tsay, O.G., Churchill D.G. 2011.A tutorial and mini-review of the ICPMS technique for determinations of transition metal ion and main group element

concentration in the neurodegenerative and brain sciences. **Monatsh Chem,** 142: 385–398.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. **New York: Oxford University Press,** 3: 10-121.

Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P. 2008. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv Drug Deliver Rev,** 60/15:1638–1649.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell,** 144: 646–674.

Hao, Y., Teja, A.S. 2003. Continuous hydrothermal crystallization of α– Fe_2O_3 and Co_3O_4 nanoparticles. **J Mater Res,** 18 (02): 415–422.

Hayashi, K., Nakamura, M., Sakamoto, W., Yogo, T., Miki, H., Ozaki, S., Abe, M., Matsumoto, T., Ishimura, K. 2013. Superparamagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment. **Theranostics,** 3(6):366-76.

Hayashi, K., Nakamura, M., Miki, H., Ozaki, S., Abe, M., Matsumoto, T., Sakamoto, W., Yogo, T., Ishimura, K. 2014. Magnetically responsive smart nanoparticles for cancer treatment with a combination of magnetic hyperthermia and remote-control drug release. **Theranostics,** 4(8):834-44.

Helbock, H.J., Beckman, K.B., Ames, B.N. 1999. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage. **Methods Enzymol,** 300:156-166.

Hockenbery, D. 1995. Defining apoptasis. **Am J Pathal**, 146:16-9.

Hoppens, M.A., Wheeler, Z.E.W., Qureshi, A.T., Hogan, K., Wright, A., Stanley, G.G., Young, D., Savage, P., Hayes, D. 2014. Maghemite, silver, ceragenin conjugate particles for selective binding and contrast of bacteria. **J Colloid Interf Sci**, 413: 167-174.

Ihsanullah, F., Al-Khaldi, A., Abusharkh, B., Khaled, M., Atieh, M. A., Nasser, M. S., Laoui, T. 2015. Adsorptive removal of cadmium(II) ions from liquid phase using acid modified carbon-based adsorbents. **J Mol Liq,** 20:425–563.

Iida, H., Nakanishi, T., Takada, H., Osaka, T. 2006. Preparation of magnetic iron-oxide nanoparticles by successive reduction–oxidation in reverse micelles: Effects of reducing agent and atmosphere. **Electrochim Acta**, 52(1):292-296.

Johannsen, M., Gneveckow, U., Eckelt, L., Feussner, A., Waldöfner, N., Scholz, R., Deger, S., Wust, P., Loening, S.A., Jordan, A. 2005. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. **Int J Hyperther,** 21(7):637-647.

Jores, K., Mehnert, W., Drecusler, M., Bunyes, H., Johan, C., Mader, K. 2004. Investigation on the stricter of solid lipid nanoparticles and oil-loaded solid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field flow fractionasition and transmission electron microscopy. **J Control Release,**17: 217- 227.

Jun, Y., Seo, J., Cheon, J. 2008. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. **Accounts Chem Res**,41(2): 179–189.

Kadlečíková, M., Breza, J., Dekan, J., Jesenák, K., Vančo, L., Bédiová, K. 2021. A study of catalyst particles encapsulated inside multiwalled carbon nanotubes on zeolite and montmorillonite. **Microelectron Eng,** 111556, ISSN 0167-9317. doi: 10.1016/j.mee.2021.111556.

Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., Tuncel, A. 2011. Cellular interactions of monodisperse poly(GDMA) latex particles-containing DMAEM brushes. **Colloid Surface A**, 384(1–3): 90–97.

Kandasamy, G. ve Maity, D. 2015. Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (spions) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. **Int J Pharm,** 496(2):191-218.

Kane, A.B. 1995. Redefining cell death. **Am J Pathal,** 146:1-2.

Karaağaç, Ö. 2011. Optimum doyum manyetizasyonlu süperparamanyetik nanoparçacıkların sentezi, karakterizasyonu ve enzim immobilizasyon uygulaması. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabili Dalı, 139. Balıkesir.

Karaağaç, Ö., Kockar, H. 2012. Effect of synthesis parameters on the properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **J Supercond Nov Magn,** 25(8):2 777–2781.

Karagoz, B., Esser, L., Duong, H. T., Basuki, J. S., Davis, T. P. 2014. Polymerization-induced self-assembly (PISA) – control over the morphology of nanoparticles for drug delivery applications. **Polym Chem-UK,** 5: 350–355.

Karatzas, I., Shreve, S. E. 1998. Brownian motion. In: Brownian Motion and Stochastic Calculus. Sayfa: 47-127. Springer, New York, NY.

Kashyap, D., Tuli, H.S., Yerer, M.B. 2019. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. **Semin Canc Biol,** 1-19.

Kataoka, K., Kwon, G., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y. 1992. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. **J Control Release,** 24:119–132.

Kerr, J.F.R., Winterfold, C.M., Harmon, B.V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, 73: 2013-2026.

Keum, N.G., Seo, T., Choi, J., Bastola J., Lamichhane R., Park, S., Choi, B., Lee, Y. 2018. Development and evaluation of a water soluble fluorometholone eye drop formulation employing polymeric micelle. **Pharmaceutics,** 10. 208. 10.3390/pharmaceutics10040208.

Kılınç, E. 2016a. Fullerene C60 functionalized γ-Fe_2O_3 magnetic nanoparticle: Synthesis, characterization and biomedical application. **Artif Cell Nanomed B,** 44: 298-304.

Kılınç, E. 2016b. γ-Fe_2O_3 magnetic nanoparticle functionalized with carboxylated multiwalled carbon nanotube: Synthesis, characterization, analytical and biomedical application. **J Magn Magn Mater,** 401: 949-955.

Kim, W., Suh, C., Cho, S., Roh, K., Kwon, H., Song, K., Shon, I. 2012. A new method for the identification and quantification of magnetite–maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique. **Talanta,** 94: 348-352,

Kotnala, R.K., Shah, J. 2015. Ferrite materials: Nano to spintronics regime. **Handbook of Magnetic Materials:** 23:291-379.

Kralj, S., Tadic, M., Kopanja, L. 2019. Synthesis, particle shape characterization, magnetic properties and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanochains. **Mater Charact**, 148: 123-133.

Krízová, J., Spanová, A., Rittich, B., Horák, D. 2005. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. **J Chromatogr A,** 1064: 247–253.

Kwon, G.S., Naito, M., Yokoyama, M., 1995. Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelle. **Pharm Res,** 12: 192–195.

Kwon, G.S., Okano, T. 1996. Polymeric micelle as new drug carriers. **Adv Drug Del Rev,** 16:107–116.

Kwon, G., Naito, M., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. 1997. Block copolymer micelles for drug delivery: Loading and release of doxorubicin. **J Control Release,** 48:195–201.

Kyprianou, N., Isaacs, J.T. 1988. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. **Endocrinology,** 122/2: 552–562.

Lander, H.M. 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **Faseb J,** 11(2): 118-124

Laverman, P. 2001. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. **J Pharmacol Exp Ther,** 298/2:607–612.

Lazzarini, A., Colaiezzi, R., Passacantando, M., D'Orazio, F., Arrizza, L., Ferella, F., Crucianelli, M. 2021. Investigation of physico-chemical and catalytic properties of the coating layer of silica-coated iron oxide magnetic nanoparticles. **J Phys Chem Solids,** 110003, ISSN 0022-3697.

Leriche, G., Chisholm, L., Wagner A. 2012. Cleavable linkers in chemical biology. **Bioorganic and Medicinal Chemistry,** 20: 571–582.

Li, Y.P., Pei, Y.Y., Zhang, X.Y., 2001. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: Synthesis, preparation and biodistribution in rats. **J Control Release,** 71:203–211.

Liu, Y., Li, W., Lao, F., Liu, Y., Wang, L., Bai, R. 2011. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. **Biomaterials**, 32(32):8291–8303.

Liu, X., Wang, M., Zhang, S., Pan, B. 2013. Application potential of carbon nanotubes in water treatment: A review. **J Environ Sci,** 25(7): 1263-1280.

Liu, H., Zhang, R., Niu, Y., Li ,Y. ve Qiao, C. 2015. Development of hypoxia-triggered prodrug micelles as doxorubicin carriers for tumor therapy. **RSC Advances,** 5: 20848–20857.

Lloyd, R.V., Hanna, P.M., Mason, R.P. 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. **Free Radic Biol Med.**, 22(5): 885-888.

Loosdrecht, A.A., Beelen, R.H., Ossenkoppele, G.J., Broekhoven, M.G., Langenhuijsen, M.M. 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. **J Immunol Methods**, 174(1-2): 311-320.

Lu, A., Salabas, E.L. Schüth, F. 2007. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization and application. **Angew Chem Int Edit,** 46(8): 1222–1244.

Luo, Y., Ling, Y., Guo, W., Pang, J., Liu, W., Fang, Y., Wen, X., Wei, K., Gao, X. 2010. Docetaxel loaded oleic acid-coated hydroxyapatite nanoparticles enhance the docetaxel-induced apoptosis through activation of caspase-2 in androgen independent prostate cancer cells. **J Control Release,** 147(2):278-88.

Luo, S., Shao, L., Chen, Z., Hu, D., Jiang, L., Tang, W. 2020. NPRL2 promotes docetaxel chemoresistance in castration resistant prostate cancer cells by regulating autophagy through the mTOR pathway. **Exp Cell Res**, 390(2): 111981.

Ma, P., Xiao, H., Yu, C., Liu, J., Cheng, Z., Song, H., Zhang, X., Li, C., Wang, J., Gu, Z., Lin, J. 2017. Enhanced cisplatin chemotherapy by iron oxide nanocarrier-mediated generation of highly toxic reactive oxygen species. **Nano Lett,** 17: 928-937.

MacInnis, R.J., English, D.R. 2006. Body size and composition and prostate cancer risk: Systematic review and meta-regression analysis. **Cancer Causes and Control,** 17(8): 989-1003.

Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K. 2000. Tumor vascular permeability and the epr effect in macromolecular therapeutics: A review. **J Control Release,** 65: 271–284.

Mai, Y., Eisenberg, A. 2012. Self-assembly of block copolymers. **Chem Soc Rev,** 41: 5969.

Maier-Hau, K., Rothe, R., Scholz, R., Gneveckow, U., Wust, P., Thiesen, B., Feussner, A., Deimling, A., Waldoefner, N., Felix, R. 2007. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. **J Neuro-Oncol,** 81(1):53-60.

Maity, D., Agrawal, D. C. 2007. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. **J Magn Magn Mater,** 308(1): 46–55.

Maity, D., Ding, J., Xue, J.M. 2008. Synthesis of magnetite nanoparticles by thermal decomposition: Time, temperature, surfactant and solvent efects. **Funct Mater Lett,** 1(03):189-193.

Maity, D., Choo, S.G., Yi, J., Ding, J., Xue, J.M. 2009. Synthesis of magnetite nanoparticles via a solvent-free thermal decomposition route. **J Magn Magn Mater,** 321(9):1256-1259.

Maity, D., Chandrasekharan, P., Yang, C.T., Chuang, K., Shuter, B., Xue, J., Ding, J., Feng, S. 2010. Facile synthesis of water-stable magnetite nanoparticles for clinical MRI and magnetic hyperthermia applications. **Nanomedicine,** 5(10):1571-1584.

Maity, D., Chandrasekharan, P., Pradhan, P., Chuang, K., Xue, J., Feng, S., Ding, J. 2011. Novel synthesis of superparamagnetic magnetite nanoclusters for biomedical applications. **J Mater Chem,** 21(38):14717-14724.

Maity, D., Zoppellaro, G., Sedenkova, V., Tucek, J., Safarova, K., Polakova, K., Tomankova, K., Diwoky, C., Stollberger, R., Machala, L. 2012. Surface design of core-shell superparamagnetic iron oxide nanoparticles drives record relaxivity values in functional MRI contrast agents. **Chem Commun,** 48(93):11398-11400.

Marghussian, V.M. 2015. Magnetic properties of nano-glass ceramics. Nano-glass ceramics. **William Andrew Publishing, Oxford,** 181-223.

Massart, R., Cabuil, V. 1987. Alkaline synthesis of colloidal magnetite: control of particle yield and particle size. **J Chem Phys**, 84: 967-973.

Mayo-Smith, W.W., Saini, S., Slater, G., Kaufman, J.A., Sharma, P., Hahn, P.F. 1996. MR contrast material for vascular enhancement: Value of superparamagnetic iron oxide. AJR. **Am J Roentgenol,** 166(1): 73-77.

Mehvar, R. 2000. Modulation of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of proteins by polyethylene glycol conjugation. **J Pharm Pharm Sci,** 3: 125–136.

Mishra, D., Arora, R., Lahiri, S., Amritphale, S.S., Chandra, N. 2014. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by solvothermal method. **Prot Met Phys Chem,** 50(5): 628-631.

Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P.C. 2001. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **J Control Release**, 74: 317–323.

Miura, Y., Takenaka, T., Toh, K., Wu, S., Nishihara, H., Kano, M. R., Ino, Y., Nomoto, T., Matsumoto, Y., Koyama, H., Cabral, H., Nishiyama, N., Kataoka, K. 2013. Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. **ACS Nano,** 7: 8583–8592.

Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C. 2001. Long-circulating and targets pecific nanoparticles: Theory to practice. **Pharmacol Rev,** 53(2): 283–318.

Mohanraj, V.J., Chen, Y. 2007. Nanoparticles - A review. **Trop J Pharm Res,** 5(1): 561–573.

Molpeceres, J., Aberturas, M.R., Guzman, M. 2000. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: Preparation and characterization. **J Microencapsul**, 17: 599-614.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods,** 65 (1–2), 55–63.

Nagesh, P.K.B., Johnson, N.R., Boya, V.K.N., Chowdhury, P., Othman, S.F., Khalilzad-Sharghi, V., Hafeez, B.B., Ganju, A., Khan, S., Behrman, S.W., Zafar, N., Chauhan, S.C., Jaggi, M., Yallapu, M.M. 2016. PSMA targeted docetaxel-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for prostate cancer. **Colloid Surface B,** 1(144):8-20.

Na, K, Lee, ES, Bae, YH. 2003. Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity. **J Control Release**, 87: 3–13.

Noble, R.L. 1977. The development of prostatic adenocarcinoma in NB rats following prolonged sex hormone administration. **Cancer Res,** 37: 1929-1933.

Noha, M., Omnia, E.A.H., Haitham, S.M. 2021. Thermal stability, paramagnetic properties, morphology and antioxidant activity of iron oxide nanoparticles synthesized by chemical and green methods. **Inorg Chem Commun**, 128: 108572, ISSN 1387-7003.

Özdemir, S., Mohamedsaid, S.A., Kılınç, E., Yıldırım, A., Soylak, M. 2018. Application of magnetized fungal solid phase extractor with Fe_2O_3 nanoparticle for determination and preconcentration of Co(II) and Hg(II) from natural water samples. **Microchem J,** 143:198-204.

Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N. 2006. Nanotechnology and its applications in textile industry. **Textile and Apparel,** 16 (3): 159-168.

Özsaraç, Ö. 2020. Prostat kanserli hastalarda kemik metastazlarının saptanmasında Ga-68 Psma Pet/Bt ile kemik sintigrafisinin etkinliğinin karşılaştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul. 3-4.

Pacakova, B., Kubickova, S., Reznickova, A., Niznansky, D., Vejpravova, J. 2016. Spinel ferrite nanoparticles: Correlation of structure and magnetism. IntechOpen, Erişim: [https://www.intechopen.com/books/magnetic-spinels-synthesis-properties-and-applications/spinel-ferrite-nanoparticles-correlation-of-structure-and-magnetism/]. Erişim Tarihi: 10.05.2021. DOI: 10.5772/66074

Palagummi, S., Yuan, F.G. 2016. Magnetic levitation and its application for low frequency vibration energy harvesting. **Struct Hlth Monit,** 213-251.

Pandey, A. 2017. An overview on advances in the nanocarriers drug delivery systems. **Adv Struct Mater,** 62: 65–76.

Pang, X., Du, H. L., Zhang, H. Q., Zhai, Y. J., Zhai, G. X. 2013. Polymer-drug conjugates: Present state of play and future perspectives. **Drug Discov Today,** 18: 1316–1322.

Paul, A., Das, S., Das, J., Samadder, A., Bishayee, K., Sadhukhan, R., Khuda-Bukhsh, AR. 2013. Diarylheptanoid-myricanone isolated from ethanolic extract of *Myrica cerifera* shows anticancer effects on HeLa and PC3 cell lines: Signalling pathway and drug-DNA interaction. **J Integr Med,** 11(6):405-415.

Panyam, J., Labhasetwar, V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Adv Drug Deliver Rev,** 55(3): 329–347.

Pascu, O., Carenza, E., Gich, M., Estrade, S., Peiro, F., Herranz, G., Roig, A. 2012. Surface reactivity of iron oxide nanoparticles by microwave-assisted synthesis; comparison with the thermal decomposition route. **J Phys Chem C,**116(28):15108-15116.

Patel, V.H. 2014. Nutrition and prostate cancer: An overview. **Expert Rev Anticancer Ther,** 14(11): 1295–1304.

Patsula, V., Moskvin, M., Dutz, S., Horák, D. 2016. Size-dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. **J Phys Chem Solids,** 88: 24-30.

Peppas, N.A., Brannon-Peppas, L. 2001. Drug delivery biomaterials. **Encyclopedia of Mater Sci Tech,** 2351–2355.

Phumying, S., Labuayai, S., Thomas, C. 2013. Aloe vera plant-extracted solution hydrothermal synthesis and magnetic properties of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles. **Appl Phys A** 111: 1187–1193.

Pieniazek, A., Czepas, J., Piasecka-Zelga, J., Gwozdzinski, K., Koceva-Chyla, A. 2013. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. **Adv Med Sci,** 58: 104-111.

Pileni, M. P. 1993. Reverse micelles as microreactors. **J Phys Chem,** 97 (27): 6961–6973.

Pissuwan, D. 2017. Monitoring and tracking metallic nanobiomaterials in vivo. **Woodh Publ,** 1:135-149.

Polyak, D., Eldar-Boock, A., Baabur-Cohen, H., Satchi-Fainaro, R. 2013. Polymer conjugates for focal and targeted delivery of drugs. **Polym Advan Technol,** 24: 777–790.

Pommier, Y., Robert, D. 2001. Pharmacological and therapeutics agents that target DNA replication. Editor: Melvin L. DePamphilis, DNA replication in eukaryotic cells (2nd Edition), Cold Spring Harbor Press, USA.

Prashanth, K.B., Nagesh, N.R., Johnson, V.K.N., Boya, P.C., Shadi, F.O., Khalilzad-Sharghi, V., Hafeez, B.B., Ganju, A., Khan, S., Behrman, S.W., Zafar, N., Chauhan, S.C., Jaggi, M., Yallapu, M.M. 2016. PSMA targeted docetaxel-loaded superparamagnetic iron oxidenanoparticles for prostate cancer. **Colloid Surface B,** 144: 8–20.

Priyadarshana, G., Kottegoda, N., Senaratne, A., Alwis, A., Karunaratne, V. 2015. Synthesis of magnetite nanoparticles by topdown approach from a high purity ore. **J Nanomater,** 8: 312–317.

Ray, A., Larson, N., Pike, D.B., Gruner, M., Naik, S., Bauer, H., Malugin, A., Greish, K. ve Ghandehari, H. 2011. Comparison of active and passive targeting of docetaxel for prostate cancer therapy by HPMA copolymer-RGDfK conjugates. **Mol Pharm,** 8:1090–1099.

Redhead, H. M., Davis, S.S., Illum, L. 2001. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. **J Control Release,** 70: 353-363.

Reimer, P., Balzer, T. 2003. Ferucarbotran (resovist): A new clinically approved resspecific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: Properties, clinical development, and applications. **Eur Radiol,** 13(6):1266-1276.

Reiss, G., Hütten, A. 2005. Applications beyond data storage. **Nat Mater,** 4 (10): 725–26.

Rieger, A., Nelson, K., Konowalchuk, J., Barreda, D. (2011). Modified annexin v/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **JOVE-J Vis Exp,** 50. Doi:10.3791/2597.

Rivero-Buceta, E., Vidaurre-Agut, C., Vera-Donoso, C. D., Benlloch, J. M., Moreno-Manzano, V., Botella, P. 2019. PSMA-targeted mesoporous silica nanoparticles for selective intracellular delivery of docetaxel in prostate cancer cells. **Am Chem S**, 4(1): 1281- 1291

Rodriguez-Casado, A. 2016. The health potential of fruits and vegetables phytochemicals: Notable examples. **Crit Rev Food Sci Nutr,** 56: 1097-1107.

Rohini, N., Joseph, A., Mukerji, A. 2013. Polymeric prodrugs: Recent achievements and general strategies. **Journal of Antivirals & Antiretrovirals,** 15: 2-12.

Saikia, C., Das, M.K., Ramteke, A., Maji, T.K. 2016. Effect of crosslinker on drug delivery properties of curcumin loaded starch coated iron oxide nanoparticles. **Int J Biol Macromol,** 93:1121-1132.

Saman, R.A., Iqbal, M. 2012. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Past, Present and Future,** 175–185.

Samy, A., Bakthavachalam, V., Vudutha, M., Vinjamuri, S., Chinnapaka, S., Munirathinam, G. 2020. Eprinomectin, a novel semi-synthetic macrocylic lactone is cytotoxic to PC3 metastatic prostate cancer cells via inducing apoptosis. **Toxicol Appl Pharm,** 401: 115071

Saravanakumar, K., Mariadoss, A.V.A., Sathiyaseelan, A., Venkatachalam, K., Hu, X., Wang, M-H. 2021. pH-sensitive release of fungal metabolites from chitosan nanoparticles for effective cytotoxicity in prostate cancer (PC3) cells, **Process Biochem**, 102: 165-172.

Sarkar, Z.K., Sarkar F.K. 2011. Synthesis and magnetic properties investigations of Fe_3O_4 nanoparticles. **Int J Nanosci Nanotechnol,** 7(4): 197-200

Sawai, H., Domae, N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. **Biochem Biophys Res Commun,** 411(3):569-573.

Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A. 2002. Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. **Gene Ther,** 9(2): 102-109.

Scherer, C., Figueiredo, N.A.M. 2005. Ferrofluids: Properties and applications. **Brazilian J Phys,** 35(3): 718–727.

Senapati, S., Mahanta, A.K. 2018. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Signal Transduct Target Ther,** 3(1): 1–19.

Shahbazi, E., Morshedzadeh, F., Zaeifi, D. 2019. Bacteriostatic potency of Fe_2O_3 against *Enterococcus faecalis* in synergy with antbiotics by DDST method. **Avicenna J Med Biotechnol,** 11: 176-179.

Shan, Y., Chen, K., Yu, X., Gao, L. 2010. Preparation and characterization of biocompatible magnetic carbon nanotubes. **Appl Surf Sci**, 257(2): 362-366.

Siddiqui, I.A., Sanna, V. 2016. Impact of nanotechnology on the delivery of natural products for cancer prevention and therapy. **Mol Nutr Food Res,** 60: 1330-1341.

Singer, J. W. 2005. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX, CT-2103): A macromolecular taxane. **J Control Release,** 109: 120–126.

Singh, R., Lillard, J.W. 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology,** 86(3): 215–223.

Sledge, G., Miller, K. 2003. Exploiting the hallmarks of cancer: The future conquest of breast cancer. **Eur J Cancer,** 39: 1668–1675.

Sousa, M.E.D., Raap M.B.F.V., Rivas, P.C., Zélis, P.M., Girardin, P., Pasquevich, G.A., Alessandrini, J.L., Muraca, D., Sánchez, F.H. 2013. Stability and relaxation mechanisms of citric acid coated magnetite nanoparticles for magnetic hyperthermia. **J Phys Chem C,** 117(10): 5436-5445.

Spepi, A., Duce, C., Ferrari, C., González-Rivera, J., Jagličić, Z., Domenici, V., Pineider, F., Tiné, M.R. 2016. A simple and versatile solvothermal configuration to synthesize superparamagnetic iron oxide nanoparticles using a coaxial microwave antenna. **RSC Advances**, 6(106): 104366-104374.

Strable, E., Bulte, J.W.M., Moskowitz, B., Vivekanandan, K., Allen, M., Douglas, T. 2001. Synthesis and characterization of soluble iron oxide dendrimer composites. **Chem Mater,** 13(6): 2201-2209.

Stubbs, M., Mcsheely, P.M.J., Griffiths, J.R. 2000. Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment. **Mol Med Today,** 6: 15–19.

Suanon, F., Sun, Q., Mama, D., Li J., Dimon, B., Yu, C. P. 2016. Effect of nanoscale zero-valent iron and magnetite (Fe_3O_4) on the fate of metals during anaerobic digestion of sludge. **Water Res,** 88: 897–903.

Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., Nabiev, I. 2018. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. **Nanoscale Res Lett,** 13: 44.

Sun, Y., Ma, M., Zhang, Y., Gu, N. 2004. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. **Colloid Surface A,** 245(1–3):15-19,

Sun, J., Jiang, Y., Zhou, L., Gao, J. 2010. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. **New Biotechnology,** 27(1): 53–58.

Sun, Q., Wang, J., Radosz, M., Shen, Y. 2013. Polymer-based prodrugs for cancer chemotherapy. **Functional Polymers for Nanomedicine,** 245–260.

Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., Finkel, T. 1995 Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science**, 270 296–299.

Taatjes, D.J., Sobel, B.E., Budd, R.C. 2008. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. **Histochem Cell Biol**, 129(1): 33-43.

Tadic, M., Kralj, S., Jagodic, M., Hanzel, D., Makovec, D. 2014. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment. **Appl Surf Sci,** 322: 255-264.

Tartaj, P., Morales, M. P., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzales-Carreno, T., Serna, C.J. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J Phys D,** 36(13): 182–197.

Tavakoli, A., Sohrabi, M., Kargari, A., 2007. A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds. **Chem Papers,** 61 (3): 151–170.

Teja, A.S., Koh, P.Y. 2009. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Prog Cryst Growth CH,** 55 (1-2): 22-45.

Temiz, E., Koyuncu, İ., Sahin, E. 2021. CCT3 suppression prompts apoptotic machinery through oxidative stress and energy deprivation in breast and prostate cancers. **Free Radic Biol Med**, 165:88-99

Testa, U., Castelli, G., Pelosi, E. 2019. Cellular and molecular mechanisms underlying prostate cancer development: Therapeutic ımplications. **Medicines,** 6(3): 82.

Thompson, I.M., Pauler, D.K., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Parnes, H.L. 2004. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level≤4.0 ng per milliliter. **New Engl J Med,** 350(22): 2239-2246.

Tomalia, D.A. 2004. Birth of a new macromolecular architecture: Dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. **Aldrichimica Acta,** 37(2): 39-57

Tomlinson, R., Heller, J., Brocchini, S., Duncan, R. 2003. Polyacetal-doxorubicin conjugates designed for pH-dependent degradation. **Bioconjugate Chem,** 14: 1096–1106.

Toub, N., Malvy, C., Fattal, E., Couvreur, P. 2006. Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. **Biomed Pharmacother,** 60(9):607-620.

Tran, N., Mir, A., Mallik, D., Sinha, A., Nayar, S., Webster, T.J. 2010. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Int J Nanomed,** 5: 277-283.

Tuchin, V.V., Tárnok, A., Zharov, V.P. 2011. In vivo flow cytometry: A horizon of opportunities. **Cytom Part A**, 79(10): 737-745.

Ulbrich, K., Etrych, T., Chytil, P., Pechar, M., Jelinkova, M., Rihova, B. 2004. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. **Int J Pharm,** 277: 63–72.

Valenzuela, R., Cecilia Fuentes, M., Para, C., Baeza, J., Duran, N., Sharma, S.K., Knobel, M., Freer, J. 2009. Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) by the co-precipitation method. **J Alloy Compd,** 488(1): 227–231.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol,** 39: 44-84.

Ventola, C.L. 2017. Progress in nanomedicine: Approved and investigational nanodrugs. **P T,** 42: 742-755.

Vig, K., Casey, K., Tiwari, P., Miller, M., & Samant, R., Singh, S.R. 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as drug delivery vehicles. Technical Proceedings of the 2013 NSTI Nanotechnology Conferenc e and Expo**,** NSTI-Nanotech, 3: 407-410.

Wang, T., Lin, J., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R. 2014. Green synthesized iron nanoparticles by green tea and eucalyptus leaves extracts used for removal of nitrate in aqueous solution. **J Clean Prod**, 83: 413-419.

Wang, J., Zhang, B., Wang, L., Wang, M., Gao, F. 2015a. One-pot synthesis of water-soluble superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their MRI contrast effects in the mouse brains. **Mater Sci Eng:** C, 48:416-423.

Wang, Y., Zhao, Q., Luo, Y., Xu, Z., Zhang, H., Yang, S., Wei, Y., Jia, X. 2015b. A high stiffness bio-inspired hydrogel from the combination of a poly(amido amine) dendrimer with DOPA. **Chem Commun,** 51:16786–16789.

White, B., Banerjee, S., O'Brien, S., Turro, N. J., Herman, I. P. 2007. Zeta potential measurements of surfactant-wrapped individual single-walled carbon nanotubes. **J Phys Chemc,** 111(37): 13684-13690.

Whitesides, G. M. 2003. The 'right' size in nanobiotechnology. **Nat Biotechnol,** 21(10): 1161-1165. doi:10.1038/nbt872.

WHO-World Health Organization. 2010. Global Status Report On Noncommunicable Diseases 2010. **W H O,** 176.

Wiener, E.C., Brechbiel, M.W., Brothers, H., Magin, R.L., Gansow, O.A. 1994. Dendrimer-based metal chelates: A new class of magnetic resonance imaging contrast agents. **Magn Reson Med,** 31:1-8.

Wu, W., He, Q., Jiang, C. 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Res Lett,** 3 (11): 397-415.

Xu, J., Yang, H., Fu, W., Du, K., Su, Y., Chen, J., Zeng, Y., Li, M., Zou, G. 2007. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by Sol–Gel method. **Aip Conf Proc,** 309 (2): 307-311.

Xu, C., Xie, J., Kohler, N., Walsh, E.G., Chin, Y.E., Sun, S. 2008. Monodisperse magnetite nanoparticles coupled with nuclear localization signal peptide for cell-nucleus targeting. **Asian J Chem,** 3(3):548-552.

Xu, C., Miranda-Nieves, D., Ankrum, J.A. 2012. Tracking mesenchymal stem cells with iron oxide nanoparticle loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles. **Nano Lett,** 12: 4131-4139.

Yallapu, M.M., Othman, S.F., Curtis, E.T., Bauer, N.A., Chauhan, N., Kumar, D., Jaggi, M., Chauhan, S.C. 2012. Curcumin-loaded magnetic nanoparticles for breast cancer therapeutics and imaging applications. **Int J Nanomed,** 7: 1761-1779.

Yanasarn, N., Sloat, B. R., Cui, Z. 2009. Nanoparticles engineered from lecithin-inwater emulsions as a potential delivery system for docetaxel. **Int J Pharm,** 379: 174–180.

Yang, C., Tai, M., Chen, S., Wang, Y., Chen, Y., Hsiao, J., Wang, J., Liu, H. 2009. Labeling of human mesenchymal stem cell: Comparison between paramagnetic and superparamagnetic agents. **J Appl Phys,** 105(7):07B314.

Yeniyurt Y. 2019. Kanser tedavisinde ilaç taşıma amacıyla kullanılacak karbon nanotüplerin fonksiyonelleştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniv. Fen bilimleri Enst., İstanbul. 8.

Yiu, H.H.P., Keane, M.A. 2012. Enzyme–magnetic nanoparticle hybrids: New effective catalysts for the production of high value chemicals. **Chem Technol Biotechnol**, 87: 583–594.

Yoo, H.S., Lee, K.H., Oh, J.E., Park, T.G. 2000. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. **J Control Release,** 68: 419–431.

Zhang, L., Eisenberg, A. 1995. Multiple morphologies and characteristics of ‘crew-cut’ aggregates of polystyrene-B-poly (acrylic acid) block copolymers. **Science**, 268: 1728–1731.

Zhang, W., Shi, Y., Chen, Y., Yu, S., Hao, J., Luo, J., Sha, X., Fang, X. 2010. Enhanced antitumor efficacy by paclitaxel-loaded pluronic P123/F127 mixed micelles against non-small cell lung cancer based on passive tumor targeting and modulation of drug resistance. **EUR J Pharm Biopharm,** 75: 341–353.

Zhao, Y., Qiu, Z., Huang, J. 2008. Preparation and analysis of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles used as targeted-drug carriers. **Chinese J Chem Eng**, 16(3): 451–455.

Zhaoyang, L., Jun, D., Junmin, X. 2009. A new family of magnetic nanoparticles, silica cross-linked pluronic F127 micelles loaded with iron oxides having the properties of high biocompatibility, physical and chemical stability, high magnetism, and low-cost production, have been synthesized. **New J Chem,** 33: 88-92.

Zhu, S., Xu, X., Rong, R., Lia, B., Wang, X. 2016. Evaluation of zinc-doped magnetite nanoparticle toxicity in the liver and kidney of mice after subchronic intragastric administration. **Toxicol Res-UK**, 5: 97-106.

Zubris, K.A.V., Colson, Y.L., Grinstaff, M.W. 2012. Hydrogels as intracellular depots for drug delivery. **Mol Pharm,** 9(1), 196–200.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı **:** Muhammed GÜNGÖREN

Yabancı Dili **:** İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise **:** Elazığ Mehmet Akif Ersoy Lisesi /1993–1996

Lisans **:** Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü /1997–2001

Yüksek Lisans **:** Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü /2011–2016

Doktora **:** Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü / 2017–

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Batman Final Dershanesi / 2003-2006

Elazığ Yöntem Dershanesi / 2006-2011

Mardin Artuklu Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü / 2011-

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Muhammed GÜNGÖREN
ÖĞRENCİ NO	17803505
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2020-2021
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Doktora
TEZ KONUSU	Biyouyumlu Manyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Teranostik Uygulamaları
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	135
BENZERLİK ORANI	% 4
RAPORLAMA TARİHİ	26/07/2021

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 135 sayfalık kısmına ilişkin, 26/07/2021 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☐Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Muhammed GÜNGÖREN
(İMZA/TARİH)

Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL **Tez Danışmanı** (İMZA/TARİH)	Prof. Dr. Sait ERDOĞAN **Anabilim Dalı Başkanı** (İMZA/TARİH)

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.