

**İdarubisin Yüklü Manyetik Nanoparçacıkların  
Sentezlenmesi ve MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına  
Uygulanması**

**Proje No: 109T949**

Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ  
Yrd. Doç. Dr. Arzu YAKAR  
Prof. Dr. Güngör GÜNDÜZ

TEMMUZ 2012  
ANKARA

## ÖNSÖZ

“İdarubisin Yüklü Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi ve MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına Uygulanması” başlıklı çalışma Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler ve Kimya Mühendisliği Bölümlerinin ortak çabaları ile gerçekleştirilmiş ve 109T949 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir. Çalışmamızı destekleyerek tamamlanmasını sağlayan TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu'na teşekkür ederiz.

Kanser çağımızın en büyük sağlık sorunlarından biridir. Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların kanser hücreleri üzerinde etkinliğini arttırabilmek ve sağlıklı hücrelere zarar vermelerini engellemek için kontrollü ilaç sistemleri üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Nanoteknolojideki gelişmeler ilaç hedefleme ve kontrollü ilaç salımına büyük katkı sağlamaktadır. Manyetik nanoparçacıklar ilaçların istenilen miktarda istenilen bölgeye hedeflenmesinde ideal taşıyıcılar olarak rol oynamaktadırlar.

Bu projede biyomedikal uygulamalar için arzu edilen şekil, boyut ve manyetik özelliklere sahip nanoparçacıklar sentezlenmiş, yüzeyleri biyouyumlu polimer ve folik asit ile kaplanmıştır. İdarubisin elde edilen nanoparçacıklara yüklenmiş ve salım özellikleri araştırılmıştır. İlaç yüklü nanoparçacıkların MCF-7 Meme Kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve serbest ilaca göre daha etkin olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar idarubisin yüklü manyetik nanoparçacıkların ilaç salımı ve hedeflenmesi için uygulanabilirliğini göstermiştir. Bu ve benzeri çalışmalar kanser tedavisine yönelik yeni araştırmalara ışık tutacaktır.

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
TABLO LİSTELERİ.....	6
ŞEKİL LİSTELERİ.....	7
ÖZET.....	9
ABSTRACT.....	10
1. GİRİŞ.....	11
1.1 Manyetik Nanoparçacıklar.....	11
1.2 Demir Oksit Nanoparçacıkların Sentezi.....	13
1.3 Biyomedikal Uygulamaları için Manyetik Nanoparçacıkların Yüzey Modifikasyonları.....	16
1.4 Nanoparçacıkların Manyetik Özellikleri.....	17
1.5 İdarubisin (İDA).....	19
1.6 Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
2.1 Manyetik Nanoparçacık Sentezi için Gereçler.....	22
2.2 İlaç Bağlanması, Salım ve Hücre Kültürü Çalışmaları için Gereçler.....	22
2.3 Manyetik Nanoparçacıkların Kimyasal Sentezi.....	22
2.3.1 Manyetik Nanoparçacıkların Yüzey Aktif Madde ile Kaplanması.....	23
2.3.2 Manyetik Nanoparçacıkların PEG ile Kaplanması.....	23

2.3.3 PEG Kaplı Manyetik Nanoparçacıklara Folik Asit Bağlanması .....	24
2.3.4 İdarubisinin Manyetik Nanoparçacıklara Yüklenmesi .....	25
2.3.5 İdarubisin Salım Çalışmaları.....	25
2.4 Karakterizasyon Yöntemleri .....	26
2.4.1 X-Işınları Kırınımı (XRD).....	26
2.4.2 Dinamik Işık Saçılımı (DLS).....	26
2.4.3 Küçük Açılı X-ışını Saçılımı (SAXS) .....	27
2.4.4 Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM).....	27
2.4.5 Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM).....	27
2.4.6 Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) .....	27
2.4.7 Termogravimetrik Analizi (TGA) .....	28
2.4.8 Titreşimli Manyetometre (VSM).....	28
2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları .....	28
2.5.1 Hücre Sayımı.....	28
2.5.2 Sitotoksikite Analizleri.....	29
2.5.3 Işık Mikroskop Kullanımı ve Demir Boyama (Prussian Blue) Yöntemi .....	30
2.5.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Kullanımı .....	31
2.6 İstatistiksel Analiz .....	31
3. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	32
3.1 XRD Analizi.....	32
3.2 DLS Analizi .....	33

3.3 SAXS Analizi .....	35
3.4 TEM .....	37
3.5 SEM .....	43
3.6 FTIR .....	43
3.7 TGA.....	45
3.8 VSM .....	47
3.9 İdarubisin'in Nanoparçacıklara Bağlanma Etkinliği .....	49
3.10 İdarubisinin Nanoparçacıklardan Salımı.....	51
3.11 İlaç Yüklü Manyetik Nanoparçacıkların Hücre İçine Alımının Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ile İncelenmesi .....	52
3.12 Manyetik Nanoparçacıkların Hücre İçine Alımının Işık Mikroskobu ile İncelenmesi.....	54
3.13 Nanoparçacıkların MCF-7 Hücre Hattına Uygulanması .....	56
4. SONUÇ.....	59
5. REFERANSLAR .....	61

## TABLO LİSTELERİ

Tablo 1.1 Demir oksit üretim yöntemlerinin ve elde edilen nanoparçacıkların karşılaştırması.....	15
Tablo 1.2 Kansere tedavisinde kullanılan nanoteknolojiye dayalı farklı ilaç salım sistemleri.....	21
Tablo 3.1 OA-MNP'lerin SAXS analizi sonuçları.....	36
Tablo 3.2 MNP, OA-MNP, PEG-MNP, FA-PEG-MNP <sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP <sub>24</sub> örneklerinin manyetik özellikleri.....	48

## ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1.1 In vitro koşullarda manyetik nanoparçacıklarla gen hedeflenmesinin şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.2 (a) Manyetitin kristal yapısı, (b) Manyetit parçacıklarının yüzey yükü (c) Manyetik parçacıkların yüzey aktif malzeme ile kaplandıktan sonraki yüzey yükü ...	14
Şekil 1.3 Manyetik malzemelerin histerezis eğrisi.....	18
Şekil 1.4 Kanser tedavisinde kullanılan nanoteknolojiye dayalı farklı ilaç salım sistemleri .....	20
Şekil 2.1 Idarubisin kalibrasyon grafiği (idarubisin derişimine göre 484 nm dalga boyunda absorbands değerleri) .....	26
Şekil 2.2 Sitotoksisite analizinde kullanılan 96 kuyulu plaka resmi.....	30
Şekil 3.1 Farklı sıcaklıklarda sentezlenen MNP örneklerinin X-ışını kırınım deseni..	32
Şekil 3.2 90°C'de sentezlenen manyetik demir oksit ( $Fe_3O_4$ ) nanoparçacığının X-ışını kırınım deseni .....	33
Şekil 3.3 MNP'lere ait ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılım grafiği .....	34
Şekil 3.4 OA-MNP'lere ait ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılım grafiği .....	34
Şekil 3.5 H-OA-MNP'lere ait ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılım grafiği .....	35
Şekil 3.6 OA-MNP'lerin SAXS analizi grafiği.....	36
Şekil 3.7 $Fe_3O_4$ nanoparçacıkların TEM görüntüleri a)MNP, b) OA-MNP, c) H-OA-MNP ve d) OA-MNP <sub>2</sub> .....	39
Şekil 3.8 $Fe_3O_4$ nanoparçacıkların TEM/STEM görüntüleri a) PEG-MNP-0,05 (TEM), b) 0,05gr-PEGMNP (STEM) c) PEG-MNP-0,15 (TEM), d) PEG-MNP-0,15 (STEM) e) PEG-MNP (TEM) f) PEG- MNP (STEM).....	40

Şekil 3.9 TEM görüntüleri a) FA-PEG-MNP <sub>2</sub> ve b) FA-PEG-MNP <sub>24</sub> .....	42
Şekil 3.10 PEG-MNP'nin SEM görüntüsü .....	43
Şekil 3.11 MNP'lerin FTIR spektrumu.....	44
Şekil 3.12 FTIR Spektrası; a) OA-MNP b) PEG-MNP ve c) FA-PEG-MNP <sub>2</sub> and d) FA-PEG-MNP <sub>24</sub> .....	44
Şekil 3.13 TGA eğrileri a) MNP, b) OA-MNP, c) PEG-MNP, d) FA-PEG-MNP <sub>2</sub> ve e) FA-PEG-MNP <sub>24</sub> .....	46
Şekil 3.14 MNP, OA-MNP, PEG-MNP, FA-PEG-MNP <sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP <sub>24</sub> örneklerinin manyetizasyon eğrileri a) 23°C ve b)37°C .....	47
Şekil 3.15 Farklı derişimlerde idarubisinin manyetik nanoparçacıklara tutuklanma yüzdesi .....	50
Şekil 3.16 İDA, İDA-MNP, MNP ve PBS için UV absorbands spektrası .....	51
Şekil 3.17 İdarubisinin MNP'den pH: 5.4 ve pH:7.4'deki salımı .....	52
Şekil 3.18 İDA ve İDA-MNP uygulanmış MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri a) Kontrol grubu: MCF-7 hücreleri (b) Serbest idarubisinin MCF-7 hücrelerine uygulanması c) İDA-MNP'nin MCF-7 hücrelerine uygulanması .....	53
Şekil 3.20 Işık mikroskop görüntüleri (a) FA-PEG-MNP <sub>2</sub> uygulanmamış hücreler (Hücre Kontrolü), (b) FA-PEG-MNP <sub>2</sub> uygulanmış hücreler .....	54
Şekil 3.21 FA-PEG-MNP <sub>2</sub> uygulanmış MCF-7 hücrelerinin demir boyama işlemi sonrası ışık mikroskop görüntüleri .....	55
Şekil 3.22 MNP, PEG-MNP ve İDA-MNP'lerin MCF-7 hücrelerinin çoğalmasına etkisi (72 saatlik uygulama ) (p<0.05) .....	57
Şekil 3.23 İdarubisin derişimine göre MCF-7 hücrelerinin çoğalma grafiği .....	58



## ÖZET

Kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar, kanserli ve sağlıklı hücreleri ayırt edemedikleri için ciddi yan etkilere ve sistemik toksisiteye neden olmaktadır. Son yıllarda, mevcut anti-kanser ilaçların yan etkilerini azaltmak amacıyla kontrollü ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir. Yapılan bu araştırmalarla, ilacın kanser hücresine doğru zaman ve miktarda hedeflenmesi amaçlanmaktadır. Manyetik nanoparçacıklar (MNP) dışarıdan manyetik alan uygulanarak tümöre yönlendirilebilirler. Bu sebeple, kanser tedavisine yönelik ilaç salım ve hedefleme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, öncelikle manyetik nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Elde edilen parçacıkların yüzeyleri biyouyumlu bir polimer olan polietilen glikol (PEG) ve folik asit ile kaplanmışlardır. Sonrasında nanoparçacıklara idarubisin anti-kanser ilacı yükleme ve ilaç salımı çalışmaları yapılmıştır. Sentezlenen MNP'lerin şekil ve boyutları, kristal ve kimyasal yapıları, manyetik özellikleri incelenerek karakterizasyonları yapılmıştır. Çıplak MNP'lerin kümeleşme eğilimi, nanoparçacıkların sentezi sırasında oleik asidin eklenmesi ile büyük ölçüde engellenmiştir. Tüm nanoparçacıklar 23°C ve 37°C'ta süperparamanyetik özellik sergilemişlerdir. MNP'lerin sitotoksik etkileri MCF-7 meme kanseri hücre hattında incelenmiştir. İlaç yüklenmemiş nanoparçacıklar 0–500 µg/ml derişim aralığında toksik etki göstermezken, ilaç yüklü nanoparçacıkların hücreler üzerinde derişime bağılı artış gösteren önemli toksik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Nanoparçacıklara yüklenmiş idarubisin, serbest idarubisine göre hücreler üzerinde daha toksik etki göstermiştir. MNP'lerin hücre içine alımı ışık ve konfokal mikroskop kullanılarak gösterilmiştir. Sentezlenen nanoparçacıklar boyut, şekil, manyetik ve sitotoksik olmama özellikleriyle ilaç hedefleme ve diğere biyomedikal uygulamalar için uygun görülmektedir. Elde edilen sonuçlar ilerideki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: Kanser, MCF-7, ilaç hedeflemesi, manyetik nanoparçacık, idarubisin

## ABSTRACT

Conventional cancer chemotherapies cannot differentiate between healthy and cancer cells, and lead to severe side effects and systemic toxicity. In the last decades, different kinds of controlled drug delivery systems have been developed to overcome these shortcomings of chemotherapeutics. These studies aim targeted drug delivery to tumor side at the right time. Magnetic nanoparticles (MNP) are potentially important in cancer treatment since they can be targeted to tumor site by an externally applied magnetic field.

In this study, firstly MNP were synthesized. Obtained particles were covered with biocompatible polyethylene glycol (PEG); and then conjugated with folic acid. Anti-cancer drug idarubicin was loaded to nanoparticles and drug release studies were performed. Shape and size, crystal and chemical structures, and magnetic properties of synthesized nanoparticles were characterized. Agglomeration tendency of naked nanoparticles was prevented to a reasonable degree by oleic acid addition during the synthesis. All synthesized MNP have been found to exhibit superparamagnetic behavior at 23°C and 37°C. Cytotoxic effects of MNP were investigated on MCF-7 breast cancer cell line. Before drug loading, MNP did not have any toxicity in the concentration ranges of 0 – 500 µg/ml while drug loaded nanoparticles led to significant toxicity in a concentration dependent manner. Idarubicin loaded to MNP exhibited more toxicity compared to free idarubicin on MCF-7 cells. Endocytosis of MNP was illustrated by light and confocal microscopy images. The synthesized nanoparticles have been found to be suitable in terms of size, shape, magnetic and cytotoxic properties for drug targeting or other biomedical applications. The obtained results are expected to contribute to *in vitro* and *in vivo* cancer chemotherapy studies.

Keywords: Cancer, MCF-7, drug targeting, magnetic nanoparticle, idarubicin

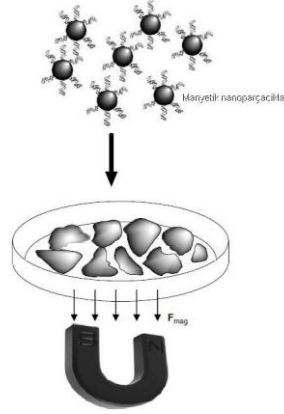
# 1. GİRİŞ

## 1.1 Manyetik Nanoparçacıklar

Son yıllarda, nanoteknolojide kaydedilen gelişmelerle nanoparçacıkların tanı ve tedaviye yönelik alanlarda kullanım çalışmaları önemli ölçüde artmıştır (MOGHIMI, 2001; CURTIS, 2001; WILKINSON, 2003; PANYAM, 2003). Özellikle, tümör bölgesine ulaşmadaki etkinliği nedeniyle manyetik özelliğe sahip nanoparçacıkların kullanımında son 10 yılda ilerlemeler kaydedilmiştir. Manyetik özelliğe sahip nanoparçacıkların biyotıpta kullanıldığı birçok alan vardır (ARBAB, 2003 ; REIMER, 1996; PANKHURST, 2003; HÄFELI, 1997). Bunlardan bazıları;

- a) hücre terapisi, hücre etiketleme, hedefleme ve hücre biyolojisi araştırmalarında hücre topluluklarının saflaştırılmasında ve ayrılmasında bir araç olarak kullanılması,
- b) doku yenilemesi,
- c) ilaç salımı,
- d) manyetik rezonans görüntüleme,
- e) hipertermi.

Örneğin, 2006 yılında yapılan bir çalışmada biyouyumlu manyetik nanoparçacıklar tedavi amaçlı gen hedeflenmesinde kullanılmıştır (DOBSON, 2006). Şekil 1.1'de biyouyumlu manyetik nanoparçacıkların, gen hedeflenmesinde kullanımı şematik olarak görülmektedir.



**Şekil 1.1** In vitro koşullarda manyetik nanoparçacıklarla gen hedeflenmesinin şematik gösterimi. Kültür kabının altına güçlü bir mıknatısın yerleştirilmesiyle oluşturulan manyetik alan etkisiyle nanoparçacıkların hücre içinde birikme hızı artmıştır.  $F_{mag}$  manyetik alan tarafından parçacıklara uygulanan kuvvet vektörüdür (DOBSON, 2006).

Biyotıp uygulamalarında kullanılacak parçacıkların manyetik doygunluğa sahip olmasının yanında biyouyumlu olması ve yüzeyinde fonksiyonel grupların bulunması gerekmektedir. Bu parçacıkların yüzeyleri etki edeceği biyomoleküle göre bazen bir organik polimerle veya inorganik metalik malzemeye değiştirilebilirler. Manyetik nanoparçacıklar uygun yüzey özelliği kazandıklarında birçok *in vitro* ve *in vivo* uygulamada kullanılabilirler. Bu nanoparçacıklar içerisinde süperparamanyetik olanlar manyetik alanın uzaklaştırılmasından sonra manyetik özelliklerini kaybettikleri için büyük ilgi görmüştür. Yüksek manyetik doygunluk, dar tane boyu aralığı, süperparamanyetik özellik ve biyotıp uygulamaları için özel yüzey kimyası parçacıkların etkinliği açısından önemlidir (TARTAJ, 2003; JORDAN, 2001; CHATTERJEE, 2003; PRATSINIS, 1996; MOGHIMI, 2001).

Süperparamanyetik parçacıklar 1-100 nm arasında değişen ebatlarda metal ve metal oksitlerden (Ni, Co, Fe,  $Fe_3O_4$  ve  $\gamma-Fe_2O_3$ ) oluşmaktadır (SHUBAYEV, 2009). Çok yüksek manyetikliğe sahip olan kobalt ve nikel gibi maddeler oksitlenme hassasiyetleri ve toksisiteleri nedeniyle biyolojik uygulamalarda fazla kullanılmamaktadırlar. Demir oksitler göreceli olarak daha düşük mıknatıslanma özelliğine sahip olmalarına rağmen oksidasyona karşı daha az duyarlılık gösterdiklerinden biyotıp uygulamalarında tercih edilen nanoparçacıklardır.

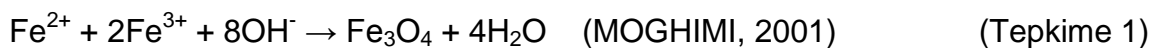
Demir oksitler (hem  $Fe_3O_4$  ve  $\gamma-Fe_2O_3$ ) baz ilavesiyle,  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$ 'ün sulu tuz çözeltilerinin birlikte çöktürülmesiyle sentezlenirler. Nanoparçacıkların ebatı, şekli ve kompozisyonu kullanılan tuzun türüne (örneğin klorür, sülfat, nitrat, perklorat vb.),  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  oranına, ortamın pH ve iyonik şiddetine bağlıdır.

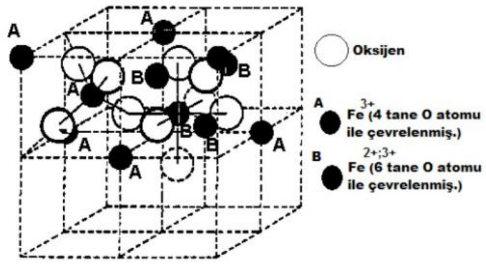
## 1.2 Demir Oksit Nanoparçacıkların Sentezi

Demir oksit nanoparçacıkların sentezinde aerosol/buhar (piroliz) yöntemi, gaz depozisyon yöntemi, çöktürme yöntemi, sol-jel ve mikroemülsiyon yöntemleri kullanılmaktadır (GUPTA, 2005). Bu yöntemlerin birbirine göre avantajları-dezavantajları ve elde edilen nanoparçacıkların özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 1.1'de görülmektedir.

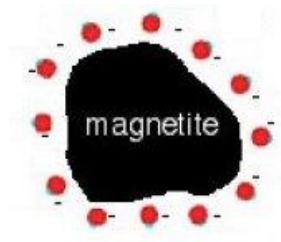
Genellikle manyetit, birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenmektedir (GUPTA, 2005). Basit, kontrolü kolay ve elde edilecek parçacıkların tane boyu, kompozisyonu ve şeklinin etkili bir şekilde ayarlanabildiği bir yöntem olduğu için çok tercih edilmektedir.

Birlikte çöktürme yönteminde 1:2 oranındaki demir (II) ve (III) klorür tuzlarının sulu karışımına baz ilave edilmesiyle manyetit nanoparçacıklar sentezlenebilmektedir. Çöken manyetit siyah renklidir.  $Fe_3O_4$ 'ün çökme reaksiyon tepkimesi Tepkime (1)'e göre gerçekleşmektedir. Elde edilen manyetitin kristal yapısı ve yüzey özelliği Şekil 1.2'de görülmektedir. Manyetitin kimyasal formülü  $Fe_3O_4$  olarak ifade edilse de aslında  $FeO.Fe_2O_3$  olarak tanımlanmaktadır. Birim hücre, 32  $O^{2-}$  anyonu, 16  $Fe^{3+}$  katyonu ve 8  $Fe^{2+}$  katyonları olmak üzere 56 atomdan oluşmaktadır. Şekil 1.2'de görüldüğü gibi kapalı küp şeklindeki oksijen atomlarının eksen boyunca düzenli olarak dizildiği ters spinel kristal yapıda,  $Fe^{3+}$  iyonlarının yarısı tetrahedral, geri kalan  $Fe^{3+}$  iyonları ve  $Fe^{2+}$  iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir.

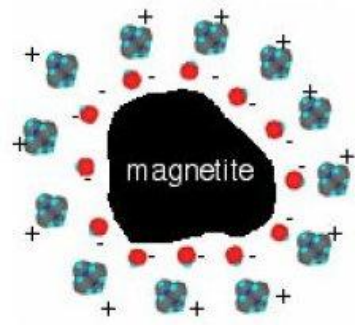




(a)



(b)



(c)

**Şekil 1.2** (a) Manyetitin kristal yapısı, (b) Manyetit parçacıklarının yüzey yükü (c) Manyetik parçacıkların yüzey aktif malzeme ile kaplandıktan sonraki yüzey yükü (BANERJEE, 1985; BERGER, 1999).

**Tablo 1.1** Demir oksit üretim yöntemlerinin ve elde edilen nanoparçacıkların karşılaştırması ( GUPTA, 2005)

Demir oksit özellikleri	Demir Oksit Sentezi				
	Aerosol/Buhar (Piroliz) Yöntemi	Gaz deposizyon Sentezi	Çöktürme Yöntemi	Sol-jel yöntemi	Mikroemülsiyon yöntemi
<b>Ebat ve ebat dağılımı</b>	Yaklaşık 5-60 nm	Yaklaşık 5-50 nm	Yaklaşık 10-50 nm	Yaklaşık 20-200 nm	Yaklaşık 4-15 nm
<b>Morfoloji</b>	Küresel	Küresel	Küresel	Küresel (yüksek porozite)	Kübik veya küresel
<b>Manyetik değeri</b>	10-50 emu/g	> 20 emu/g	20-50 emu/g (süperparamanyetik)	10-40 emu/g (paramanyetik)	> 30 emu/g (süperparamanyetik)
<b>Avantajları</b>	Yüksek üretim hızı	Koruyucu kaplama ve ince film için yararlı	Büyük miktarlarda sentezlenebilir	İstenilen şekil ve uzunlukta parçacıklar sentezlenebilir, hibrit nonoparçacık yapımında faydalıdır	Tek tip özellikler ve ebata sahip nanoparçacıklar elde edilebilir
<b>Dezavantajları</b>	Büyük kümeler oluşur	Yüksek sıcaklık gereklidir	Manyetitin maghemite oksidasyonu kontrol edilemeyebilir	Ürün genellikle sol-jel bileşenlerini yüzeyinde barındırır	Yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması zordur ve küçük miktarlarda demir oksit elde edilir

### 1.3 Biyomedikal Uygulamaları için Manyetik Nanoparçacıkların Yüzey Modifikasyonları

Nanoparçacıkların hazırlanma ve saklanma koşulları parçacıkların kararlılığı açısından çok önemlidir. Parçacıklar arasındaki etkileşimler nedeniyle parçacık boyutunda artmalar görülebilir. Oluşan bu büyük parçacıklar arasında güçlü manyetik dipol-dipol etkileşimlerin meydana gelmesi, parçacıkların ferromanyetik özellik kazanmasına yol açar (HARRIS, 2002). Bu nedenle demir oksit nanoparçacıklarının kararlılığı için yüzey kaplama işlemi kaçınılmazdır. Yüzey aktif maddeler ve polimerler gibi bazı stabilizatörler manyetik nanoparçacık hazırlama aşamasında ortama eklenerek kümelenmenin önüne geçilir.

Nanoparçacıklar için kullanılan yüzey kaplayıcılar inorganik veya polimerik malzemelerdir. Polimerik kaplayıcılar sentetik ve doğal olmak üzere iki bölüme ayrılabilir. Polimerlerin sentetik olanları poli(etilen-ko-vinil asetat), poli(vinilpirolidon) (PVP), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(etilenglikol) (PEG), poli(vinil alkol) (PVA) vb., doğal olanları ise jelatin, kitosan, vb. olabilir. Bunun yanında organik yüzey aktifleştiricilerden sodyum oleat, dodesilamin, sodyum karboksimetilselüloz en çok kullanılan yüzey kaplayıcılardır. Parçacıklar üzerindeki polimerik kaplamalar organik bileşimli maddelerle uyumluluklarını artırır ve parçacık yüzeylerini oksidasyondan korurlar. Sonuç olarak yüzeydeki polimerik malzemeler parçacıkların sıvı içinde kolay dağılımını sağlayıp kimyasal kararlılıklarını artırırken toksisitelerini de azaltırlar (BOURGEAT-LAMI, 1998). Biyolojik sistem içinde manyetik parçacıkların kümeleşmelerini önlemek için, parçacıkların biyouyumlu bir polimerle kaplanması gerekmektedir. Ayrıca yüzeydeki polimer, ilacın parçacık yüzeyine bağlanmasına olanak sağlar (DENIZOT, 1999).

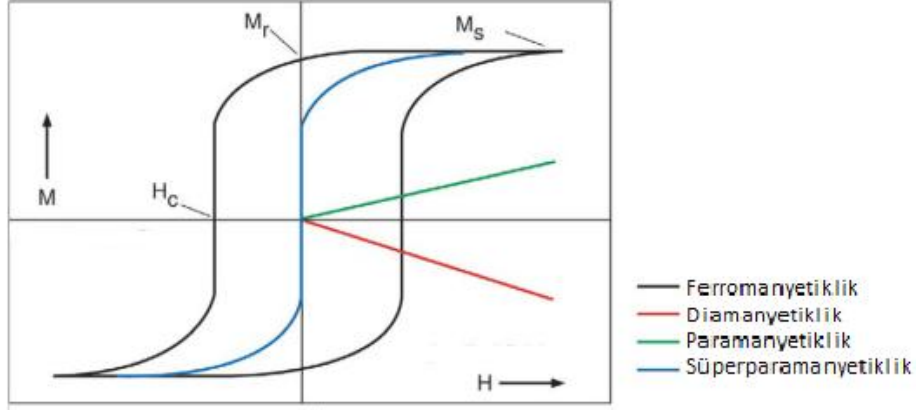
Polimer kaplı manyetik nanoparçacıkları elde etmek için izlenebilecek birkaç yöntem vardır. Bunlardan biri stabilizatör gibi davranan bir polimer varlığında manyetik malzemenin sentezlenmesidir. Polimerik manyetik nanoparçacıklar suda çözünen dekstran (BERRY, 2003), poli(vinil alkol) (SHAN, 2003), poli(etilen glikol) (GUPTA, 2004; ZHANG, 2002) gibi maddeler varlığında üretilirler.



Tüm durumlarda nanoparçacıkların yüzeyi hidrofilik polimer kabuğuyla çevrilir. En çok bilinen diğer bir yöntem ise, daha önceden hazırlanmış manyetik nanoparçacıkların, monomer yığını içerisinde dağıtılması ve polimerleşmenin manyetik parçacık yüzeyi üzerinden gerçekleşmesidir. Tercihen bir yüzey aktif madde ile kaplı manyetik nanoparçacık; süspansiyon, emülsiyon ya da çöktürme polimerizasyonu kullanılarak polimer içine hapsedilir (YANASE, 1993; KONDO, 1999). Polimerik sistemlerin biyolojik amaçlı kullanılacağı düşünüldüğünde böyle bir sistemin yaklaşık ebatının 100-200 nm arasında olması gerektiği belirlenmiştir (KAMINSKIA, 2005).

#### **1.4 Nanoparçacıkların Manyetik Özellikleri**

Maddeler manyetik alandaki mıknatıslanmalarına göre paramanyetik, ferromanyetik ya da diamanyetik özellik gösterirler. Paramanyetik maddeler dışarıdan manyetik alan uygulandığında düşük düzeyde mıknatıslanma gösterirken, bu alan kaldırıldığında mıknatıslanma özelliklerini kaybederler. Ferromanyetik malzemeler ise manyetik alanla yüksek derecede mıknatıslanırlar ve alan kaldırılrsa bile mıknatıslanmalarını sürdürürler. Ferromanyetik maddelerin boyutları küçüldükçe süperparamanyetik özellik göstermektedirler. Süperparamanyetik malzemeler manyetik alan uygulandığında ferromanyetik malzemeler gibi yüksek mıknatıslanma gösterirken, bu alan kaldırıldığında paramanyetik malzemeler gibi mıknatıslanmalarını kaybederler (ARRUEBO, 2007).



**Şekil 1.3** Manyetik malzemelerin histerezis eğrisi ( $M_s$ : Manyetik doygunluk,  $M_r$ : Artık mıknatıslanma (Remanans),  $H_c$ : Giderme kuvveti (Koersivite))

Malzemelerin manyetik özellikleri histerezis eğrisinden anlaşılabilir (Şekil 1.3). Bu eğrinin elde edilmesi için oluşturulan grafikte, manyetik alan ( $H$ ) yatay eksen, mıknatıslanma değerleri ( $M$ ) ise dikey eksen üzerinde gösterilir. Histerezis eğrisi incelendiğinde, manyetik alan şiddeti belli bir yönde artırıldıkça, mıknatıslanmanın da bir noktaya kadar artarak doygunluğa ulaştığı gözlemlenir. Bu değer Manyetik Doygunluk ( $M_s$ ) olarak adlandırılır. Manyetik alan şiddetinin azaltılıp ters yönde artırılmasıyla mıknatıslanma düşerken, daha sonra diğer yönde tekrar artar ve doygunluğa ulaşır ( $M_s$ ). Uygunlanan manyetik alan sıfıra düşürüldüğünde, malzemenin sahip olduğu mıknatıslanma değerine Artık Mıknatıslanma ( $M_r$ ) denir. Bu mıknatıslanmanın giderilmesi için gereken manyetik alan şiddetine Giderme kuvveti ( $H_c$ ) denir.

Süperparamanyetiklik ilaç hedefleme çalışmalarında kullanılan manyetik nanoparçacıklar için aranan bir özelliktir. Bu parçacıkların uygulanan manyetik alan ile istenilen bölgeye yönlendirilebilmeleri gerekmektedir. Bu sebeple yüksek mıknatıslanmaya ( $M_s$ ) sahip olmalıdırlar. Ancak manyetik alan kaldırıldığında mıknatıslanma özelliklerini kaybetmelidirler. Aksi takdirde, nanoparçacıklar kümeleşme eğilimi gösterebilir ve kan damarlarının tıkanmasına neden olabilirler. Bu nedenle, biyomedikal uygulamalarda kullanılacak olan manyetik nanoparçacıkların süperparamanyetikliğin diğer bir göstergesi olan düşük  $M_r$  ve  $H_c$  değerlerine sahip olmaları da beklenmektedir.

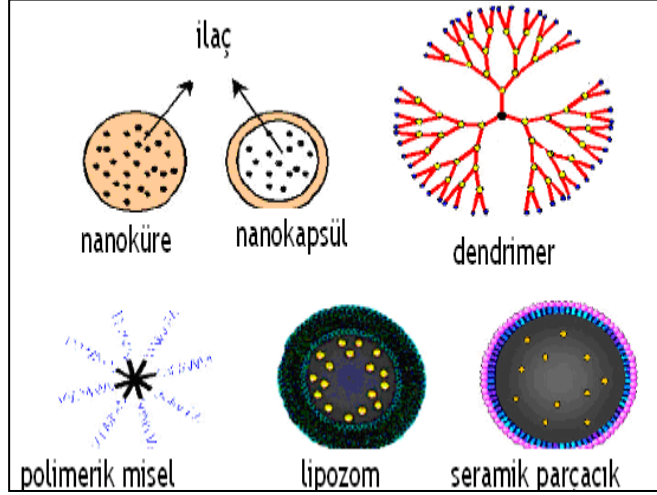
## 1.5 İdarubisin (İDA)

İdarubisin (4-demethoxydaunorubicin) lipofilik yapıda antrasiklin türevi kemoterapötik bir ilaçtır. Topoizomeraz II enziminin işlevini ve nükleik asit sentezini engeller. Ayrıca serbest radikallerin oluşmasına ve hücre döngüsünün G2 fazında durmasına neden olur. İdarubisin diğer antrasiklinlere, örneğin doksorubisine ve daunorubisine, göre daha lipofiliktir. Bu özellik onun hücre içine alınmasında kolaylık sağlar. İdarubisin meme kanseri, Hodgkin olmayan lenfoma ve akut miyeloid lösemi gibi kanserlerin tedavisinde etkili bir ilaçtır. İdarubisinin en önemli iki yan etkisi miyeloid hücrelerin baskılanması ve kardiyak toksisiteye neden olmasıdır (HOLLINGSHEAD, 1991). Yeni ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi idarubisinin yan etkilerinin azaltılmasında yardımcı olabilecektir.

## 1.6 Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Kontrollü salım, etkin maddenin bir sistem içerisinde istenilen sürede, belirlenmiş bir hızla ve gereken miktarda çıkacak şekilde tasarımının yapıldığı bir yöntemdir. Herhangi bir ilacın doğru zaman ve gerekli miktarda hedeflenen bölgeye taşınması, ilacın terapötik etkisi üzerinde önemli rol oynamaktadır. Kanser ilaçları genellikle kana kontrollü olarak karışmamakta ve tümöre hedeflenememektedir. Bu nedenle sürekli tekrarlar halinde yüksek dozda ilaç alınması gereklidir. Tek uygulamada ilacın kanda uzun süre etkin düzeyde kalması ancak kontrollü salım ile sağlanabilir. Böylece ilacın kısa sürede enzimler tarafından parçalanması ve etkisiz hale getirilmesi de önlenmiş olur.

Günümüzde çeşitli ilaç salım sistemleri FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır. Şekil 1.4 ve Tablo 1.2 de belirtildiği gibi lipozomlar, mikrokapsüller, mikroküreler, nanoparçacıklar ve dendrimerik yapılar kanser tedavilerinde kullanım amacı ile geliştirilmektedirler.



**Şekil 1.4** Kanser tedavisinde kullanılan nanoteknolojiye dayalı farklı ilaç salım sistemleri (ORIVE, 2005)

Kullanılan antikanser ilaçların yüksek toksisite göstererek ciddi yan etkilere yol açması yeni salım ve hedefleme sistemlerine olan gereksinimi ortaya çıkarmıştır. İlaç salım sistemlerinin geliştirilmesiyle mevcut kanser kemoterapisinin etkisi arttırılmıştır. Örneğin, yapılan bir çalışmada idarubisin ve tamoksifen yüklü dendrimerik polimerlerin serbest ilaca oranla daha etkili bir şekilde meme kanseri hücreleri ölümüne sebep olduğu görülmüştür (GÜÇ, 2008).

Bunun yanında ilaç salım sistemleri, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların kısa yarı ömür ve tekrarlı olarak uygulanması gibi dezavantajlarının azaltılmasında da rol oynamaktadırlar. İlaç salım sistemleri için kontrollü ve sürekli salım yapan terapötik moleküllerin tasarlanabilmesi, onların kemoterapinin klinik uygulamalarında kullanılmasını ve böylece hastanın yaşam kalitesinin yükseltilmesini sağlamıştır.

**Tablo 1.2.** Kanser tedavisinde kullanılan nanoteknolojiye dayalı farklı ilaç salım sistemleri (ORIVE, 2005).

---

<b>Nanokapsül</b>	Aktif madde polimer içine hapsedilmektedir.
<b>Nanoküre</b>	Aktif madde hazırlanan nanoparçacık yüzeyine adsorbe ettirilmekte veya polimer içinde çözünerek bir matris yapı oluşturur.
<b>Misel</b>	Aktif maddenin, hidrofilik ve hidrofobik kısımları olan polimerlerin sulu çözelti içerisinde bırakıldığı zaman oluşturduğu küçük parçacıkların içine hapsedilmesidir.
<b>Seramik nanoparçacık</b>	İnorganik molekülerden oluşan nanoparçacık sistemidir.
<b>Lipozom</b>	Hücre zarı gibi fosfolipid ve kolesterolden oluşan ve içine aktif maddenin hapsedilebildiği yapay keselerdir.
<b>Dendrimer</b>	Bir çekirdek yapı üzerine eklenen makromoleküllerin oluşturduğu dallı yapıdır.

---

Bu amaçla yapılan bir çalışmada, idarubisin lipozomların içine yüklenmiş ve idarubisine duyarlı hücre hatlarına uygulanmıştır. Lipozoma yüklenmiş idarubisinin anti-kanser etkinliğinde bir artış görülmüştür (SANTOS, 2005). Antikanser ilaçlar biyobozunur polimerlerle birleştirildiğinde farmakokinetikleri ve salım özellikleri iyileştirilebilmektedir. Böylece, bu ilaçların terapötik etkisi ve tedavi güvenliği daha da artırılmış olmaktadır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Manyetik Nanoparçacık Sentezi için Gereçler

Demir klorür tetrahidrat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Demir klorür hekzahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ve Amonyum hidroksit ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) Merck'den (Almanya) sağlanmıştır. Oleik asit, Polietilen Glikolmonooleat, Folic Acid, Disiklo hekzil karbodiimid ve Dimetil Sülfoksit Sigma Aldrich'den (ABD) temin edilmiştir. Etil Alkol Dop Organik Kimya'dan (Türkiye) sağlanmıştır.

### 2.2 İlaç Bağlanması, Salım ve Hücre Kültürü Çalışmaları için Gereçler

XTT(3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), Cell Proliferation Assay, Gentamisin Sülfat ve Tripsin-EDTA Biological Industries'den (İsrail) sağlanmıştır. Dimetil Sülfoksit ve N-Morfolino-propan-sülfonik asit Applichem'den (Almanya), Paraformaldehit Merck'ten (Almanya), RPMI 1640 Besi ortamı ve Fetal Bovin Serum Biochrom Ag'den (Almanya) temin edilmiştir. İdarubisin, Potasyum Fosfat ve Demir Boyama Seti (Iron Stain Kit) Sigma Aldrich'den (ABD) sağlanmıştır.

### 2.3 Manyetik Nanoparçacıkların Kimyasal Sentezi

Manyetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparçacıkların sentezi için birlikte çöktürme yöntemi bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (LIU, 2006). Sentez esnasında  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tuzları 1:2 oranında 150 ml sulu ortamda 5 boyunlu bir balonda yaklaşık  $90^\circ\text{C}$ 'de mekanik bir karıştırıcıyla tamamen çözününceye kadar karıştırılır. Deney süresince ortamdaki oksijenin uzaklaştırılması için sistemden azot gazı geçirilmiştir. Çözünme gerçekleştikten sonra ortama amonyum hidroksit çözeltisi damla damla ilave edilir. Amonyum hidroksit ilave edildikten sonra oluşan siyah çökelek su ile yıkanır. Ortam pH'sı 8-9'a inince yıkama işlemi sonlandırılır.

Sıcaklık (20°C-90°C), amonyak miktarı ve ekleme süresi değiştirilerek en uygun özellikteki parçacıkların elde edilme koşulları belirlenmiştir. Manyetik nanoparçacıkların kümeleşmesini engellemek için çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen çıplak nanoparçacıklar bu raporda MNP olarak adlandırılmıştır.

### **2.3.1 Manyetik Nanoparçacıkların Yüzey Aktif Madde ile Kaplanması:**

Manyetik nanoparçacıkların sentezinde karşılaşılan sorunlardan biri nanoparçacıkların kümeleşmesidir. Manyetik nanoparçacığı kaplayan yüzey aktif maddeler parçacık boyutunu azaltır, yüzey yükünü değiştirir ve nanoparçacıkların kümeleşmesini önlemeye yardımcı olurlar.

Bu çalışmada, nanoparçacıkların kümeleşmesini önlemek için üç ayrı yöntem denenmiştir. İlk olarak, sentezlenen MNP'lerin yüzeyleri, sentez tamamlandıktan sonra karışıma damla damla eklenen oleik asit ile mekanik karıştırıcı kullanılarak kaplanmıştır. Fazla oleik asit, aseton ve etil alkol yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Bu yöntemle sentezlenen nanoparçacıklar OA-MNP olarak adlandırılmıştır. İkinci yöntemde, hekzan-oleil amin ve oleik asit karışımı oda sıcaklığında (25°C) kullanılmıştır. Oleik asit ekleme işleminden önce, MNP'ler hekzan-oleil amin çözeltisi içerisinde sonikatör yardımıyla dağıtılmıştır. Karışıma oleik asit eklendikten sonra sonikasyon tekrar uygulanmıştır. Elde edilen parçacıklar H-OA-MNP olarak belirtilmiştir. Üçüncü yöntemde ise oleik asit, nanoparçacık sentezi devam ederken sisteme eklemiştir. Bu yolla elde edilen nanoparçacıklar OA-MNP<sub>2</sub> olarak isimlendirilmiştir.

### **2.3.2 Manyetik Nanoparçacıkların PEG ile Kaplanması**

Bu çalışmada, nanoparçacıkların yüzeylerinin PEG ile kaplanması için iki ayrı yöntem denenmiştir. İlk yöntemde, sentezlendikten sonra yüzeyleri oleik asit ile kaplanan nanoparçacıklar kullanılarak PEG kaplama işlemi yapılmıştır.

Bu yöntemde, sentez ardından ve gerekli yıkamalar yapıldıktan sonra, yüzeyleri oleik asit ile kaplanan manyetik nanoparçacıklar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan oleik asit ile kaplı nanoparçacıklardan 0,05 gr ve 0,15 gr alınarak ayrı ayrı çalışılmıştır. Oleik asit kaplı manyetik nanoparçacıklar sulu ortamda 1 saat süreyle sonike edilmiştir (titreşim genliği:100%, devir:1). Sonikasyon bitince, ortama PEGmonooleat eklenmiş ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında (25°C) mekanik olarak karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler PEG-MNP-0,05 ve PEG-MNP-0,15 olarak adlandırılmıştır.

İkinci yöntemde ise, PEGmonooleat ve yüzey aktif maddesi oleik asit, sentez aşamasında sisteme eklenmiştir (YALLAPU, 2010). Sentez esnasında  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  ve  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  tuzları 1:2 oranında sulu ortamda, 5 boyunlu bir balonda, 90°C'de, azotlu ortamda mekanik karıştırıcıyla 30 dakika karıştırılmıştır. Sonra ortama amonyum hidroksit çözeltisi bir sıvı pompası ile 15 dakika içinde ilave edilmiştir. Ortam sıcaklığı 80°C'ye düştüğünde ortama oleik asit eklenmiştir. Sistem, mekanik karıştırıcı ile 30 dakika boyunca 80°C'de karıştırılmıştır. Sıcaklık 25°C'ye düşürüldükten sonra, sisteme PEGmonooleat eklenmiştir. Elde edilen parçacıklar PEG-MNP ismi ile belirtilmiştir.

### **2.3.3 PEG Kaplı Manyetik Nanoparçacıklara Folik Asit Bağlanması:**

Folik asit bağlama aşamasında, disiklo heksil karbodiimid (DCC) kullanılarak folik asidin karboksil gurubu aktive edilmiştir (ZHANG, 2008). 0,4500 gr Folik asit ve 30 ml dimetil sulfoksit (DMSO) azotlu ortamda mekanik karıştırıcıyla 30 dakika karıştırılmıştır. Sonra ortama 0,2138 gr DCC eklenmiş, 2 saat karıştırmaya devam edilmiştir. 2 saat sonunda 0,200 gr PEG kaplı manyetik nanoparçacıklar sisteme eklenmiştir.

Sisteme PEG-MNP eklendikten sonra, sistem 2 saat ya da 24 saat karıştırılmaya devam edilmiştir. 2 saat ve 24 saat sonunda manyetik çöktürme yöntemi ile elde edilen örnekler deiyonize su ile yıkanmıştır.



Yıkanan örnekler 24 saat süresince dondurularak kurutulma (freeze-drying) işleminden geçirilmiştir. Parçacıklar FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> olarak adlandırılmıştır.

### 2.3.4 İdarubisinin Manyetik Nanoparçacıklara Yüklenmesi

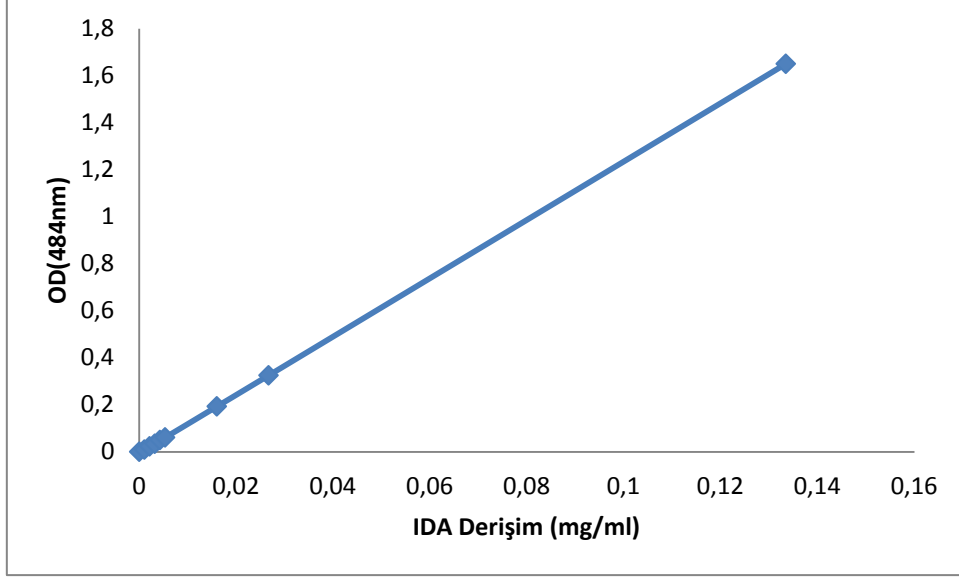
İdarubisin (IDA) DMSO ile çözülerek ana stok hazırlanmıştır. 2 ml PBS ile hazırlanan 250 µM derişimindeki IDA, 1000 µgr FA-PEG-MNP<sub>2</sub> nanoparçacıkları ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında, 24 saat süresince, 95 rpm'de çalkalanmıştır. Bağlanmayan ilaçları ortamdan uzaklaştırmak için nanoparçacıklar mıknatıs ile çöktürülüp PBS ile yıkanmıştır. Üst fazdaki PBS'ler toplanmış ve spektroda okutulmuştur. Bağlanmamış ilaç derişimi bulunarak ilaç tutuklama etkinliğini hesaplanmıştır. Son olarak yıkanan nanoparçacıklar 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

$$\text{Bağlanma Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Bağlanan İlaç Miktarı}}{\text{Yüklenen İlaç Miktarı}} \times 100$$

İdarubisin yüklü nanoparçacıklar İDA-MNP olarak isimlendirilmiştir.

### 2.3.5 İdarubisin Salım Çalışmaları

İlaç salım çalışmaları için, 1 mg ilaç yüklü MNP'ler 2 ml'lik Ependorf tüplerine yerleştirilmiş ve üstlerine 2 ml PBS (pH:7) eklenmiştir. Örnekler 72 saat süresince 90 rpm'de çalkalanmıştır. Belirli zaman aralıklarında ilaç salımı takip edilmiştir. Belirtilen zaman dilimlerinde, örnekler mıknatıs ile çöktürülmüş, üst faz alınıp yenisi ile değiştirilmiştir. Farklı derişimlerdeki IDA çözeltileri kullanılarak IDA'nın kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 2.1) ve bu grafiğe göre, salınan IDA miktarı spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir ( $\lambda_{\text{max}} = 484 \text{ nm}$ ).



**Şekil 2.1** Idarubisin kalibrasyon grafiği ( İdarubisin derişimine göre 484 nm dalga boyunda absorbens değerleri)

## 2.4 Karakterizasyon Yöntemleri

### 2.4.1 X-Işınları Kırınımı (XRD)

XRD yöntemi, X-ışınları tarafından oluşturulan kırınım deseninden atomik düzeyde bilgi edinmek için kullanılmaktadır. X-ışınları ölçümleri ile sentezlenen  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklarının kristal yapısı hakkında bilgi vermektedir.

### 2.4.2 Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

DLS yöntemi, seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışık şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. MNP'lerin, oleik asit kaplı MNP'lerin (OA-MNP) ve hekzan-oleil amin ve oleik asit karışımı kullanılarak kaplanmış MNP'lerin (H-OA-MNP) boyutları dinamik ışık saçılımı prensibiyle çalışan Zetasizer cihazı ile belirlenmiştir.

### **2.4.3 Küçük Açık X-ışını Saçılımı (SAXS)**

Küçük Açık X-ışını Saçılımı tekniği, içerisinde 1-1000 nm boyutlu tanecikler olan çeşitli örneklerin yapısını incelemeye oldukça etkin bir yöntemdir. Kristal veya kristal olmayan parçacıklar analiz edilebilmektedir. Bu yöntemle jeller, sıvı kristaller, biyopolimerler, proteinler, nano-kompozit ve amorf malzemelerin ebatları incelenebilmektedir. Sentezlenen nanoparçacıkların boyutları bu yöntem ile incelenmiştir.

### **2.4.4 Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM)**

Geçirmeli elektron mikroskobu, incelenen örneğin içinden elektron demeti geçirerek 1.000-50.000 kez büyütülmüş derinlemesine bir görüntü oluşturur. Sentezlenen nanoparçacıkların şekil ve boyutları TEM ile incelenmiştir.

### **2.4.5 Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Tarayıcı elektron mikroskobu cisimlerin yüzeyini incelemek üzere geliştirilmiştir. Bu yöntemde incelenecek yüzey, bir elektron demeti tarafından sürekli olarak taranır.

Böylece incelenen yüzeyin yapısını gösteren bir görüntü elde edilir. Sentezlenen nanoparçacıkların yüzey özellikleri SEM ile incelenmiştir.

### **2.4.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR)**

Kızılötesi (IR) Spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın, incelenen örnek tarafından soğurulmasına dayanır. Soğurulma, moleküldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için gerekli miktarda dalga enerjisinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşir. Bu yöntem içeriği bilinmeyen örneklerde kimyasal grupların belirlenmesine yardımcı olur.

Sentezlenen nanoparçacıklarda bulunan fonksiyonel grupların varlığı FTIR spektrometresi ile belirlenmiştir.

#### **2.4.7 Thermogravimetrik Analizi (TGA)**

Termogravimetrik analiz ile bir maddenin ağırlığındaki değişim, sıcaklık ve zamana bağlı olarak ölçülebilir. Sentezlenen nanoparçacıkların yüzeyindeki oleik asit ve PEG miktarının bulunması için TGA analizi kullanılmıştır.

#### **2.4.8 Titreşimli Manyetometre (VSM)**

İncelenen malzemenin manyetik karakterini gösteren manyetizasyon eğrisi titreşimli manyetometre ile elde edilmektedir. VSM, manyetik alanda titreşen malzemenin manyetik akı değişimi oluşturması ve bunun sonucunda oluşan indüksiyon elektromotor kuvvetinin ölçülmesine dayanır. Elde edilen nanoparçacıkların manyetik özellikleri VSM analizi ile belirlenmiştir.

### **2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları**

Meme Kanseri (MCF-7) hücre hattı için RPMI 1640 besi ortamı, %10 (v/v) FBS ve % 10 (w/v) gentamisin kullanılmıştır. Hücrelerin çoğalma miktarı %80-90 olduğunda besi ortamı yenilenmiş ve hücreler tripsin-EDTA kullanılarak yeni ortama pasajlanmıştır. Hücreler 37 °C'de, % 5'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe üretilmiştir.

#### **2.5.1 Hücre Sayımı**

Hücre Sayımında MCF-7 hücreleri tripsin ile kaldırılmış, taze besi ortamında homojen olarak dağıtıldıktan sonra sayılmıştır.

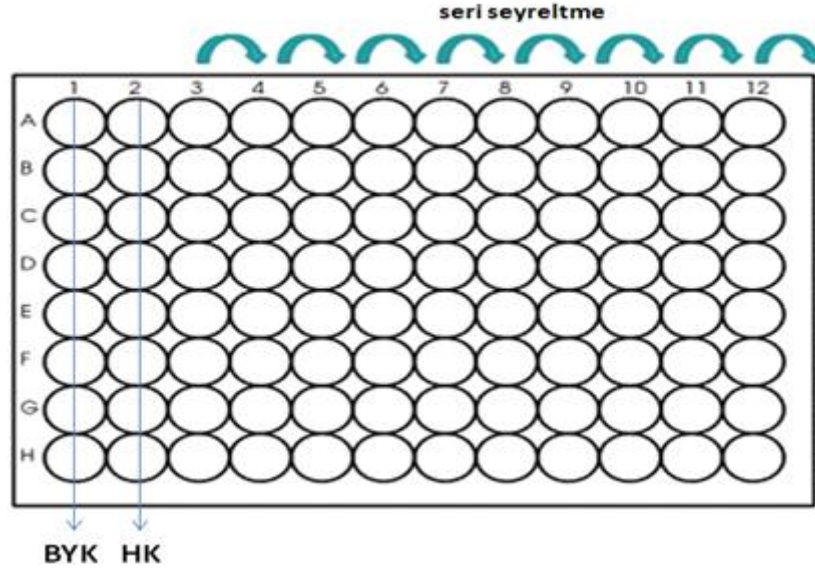
Mavi trifenolün solüsyonu ile belirli miktardaki hücreler 10 kere seyreltilmiş ve toplam 1 ml olan karışımdan örnek alınarak ışık mikroskopunda hemositometre yardımı ile sayılmıştır. 1 ml'de bulunan hücre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.  $4 \times 10^6$  sayısı hemositometrenin hacmi dikkate alınarak hesaplanan katsayıdır.

Hücre sayısı/ml = Karede bulunan ortalama hücre sayısı X Seyreltme Faktörü X  $4 \times 10^6$

### 2.5.2 Sitotoksosite Analizleri

Manyetik nanoparçacıkların ve idarubisin kanser ilacının MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri XTT sitotoksosite analizi ile belirlenmiştir. Hücre üreme analizi, formazan bileşeni kullanılarak, yaşayan hücrelerdeki mitokondri enzim aktivitesine göre belirlenir. Yaşayan hücreler, tetrazolyum bileşenini turuncu formazan tuzuna dönüştürür. Oluşan renk değişimi belirli dalga boyunda ELISA okuyucu kullanılarak ölçülür. Yaşayan hücre miktarı ne kadar fazla olursa renk değişimi, dolayısıyla ELISA okuyucuda okunan değer o kadar fazla olur (BIOLOGICAL INDUSTRIES, 2002).

Çalışmada öncelikle, 100µl RPMI-1640 besi ortamı tüm kuyulara konulmuştur. Sonra manyetik nanoparçacıklar ya da idarubisin kanser ilacı üçüncü kuyuya eklenmiş ve yatay yönde seri seyreltme yapılmıştır. Son olarak kuyulara yaklaşık 10000 adet MCF-7 hücresi ekilmiştir. İlk kuyu besi yeri kontrolü, ikinci kuyu hücre kontrolü olarak ayarlanmıştır (Şekil 2.2). Hücrelerin ekilmesinin ardından plakalar 72 saat boyunca CO<sub>2</sub> inkübatöründe bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda XTT solüsyonları her bir plakaya uygulandıktan sonra plakalar inkübatörde 4 saat boyunca bekletilmiştir. Dört saat sonunda oluşan renk değişimi ELISA okuyucu ile 492 nm dalga boyunda okunmuştur. Hücre üreme grafikleri kontrol grupları dikkate alınarak oluşturulmuştur.



**Şekil 2.2** Sitotoksosite analizinde kullanılan 96 kuyulu plaka resmi (BYK: Besi Yeri Kontrolü, HK: Hücre Kontrolü)

### 2.5.3 Işık Mikroskop Kullanımı ve Demir Boyama (Prussian Blue) Yöntemi

Folik asit kaplı nanoparçacıkların, hücre içine alımını incelemek amacı ile ışık mikroskobu kullanılmıştır. 6 kuyulu plakalarla çalışılmıştır. Her kuyuya yaklaşık 25000 adet MCF-7 hücresi ekilmiştir. İlk kuyu hücre kontrolü olarak ayarlanmıştır. Hücrelerin ekilmesinden 1 gün sonra hücrelerin üzerindeki eski besiyeri yenisi ile değiştirilmiştir. Yeni besi ortamı 500 µg/ml derişiminde FA-PEG-MNP<sub>2</sub> nanoparçacıkları içermektedir. 48 saat sonra eski besiyeri atılmış, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Hücreler ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

FA-PEG-MNP<sub>2</sub>'lerin hücre içine alımını gözlemek için demir boyama yöntemide kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerine nanoparçacıklar (200µg/ml) eklendikten 8 saat sonra, demir boyama setinde (Sigma-Aldrich) belirtilen talimatlara göre boyama işlemi yapılmıştır. Hazırlanan örnekler ışık mikroskobu ile incelenmiştir (40X).

#### **2.5.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Kullanımı**

İdarubisin yüklenmiş nanoparçacıkların, hücre içine alımını görüntülemek amacı ile lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılmıştır. Bu işlem için, MCF-7 hücreleri 6 kuyulu plakalara ekilmiş ( $7 \times 10^5$  hücre/kuyu), besi yeri içerisinde bir gece bekletilmiştir. Hücrelere serbest İDA ya da İDA-MNP eklendikten 4 veya 8 saat sonra, hücreler % 2'lik paraformaldehit çözeltisi ile lamel üzerine sabitlenmiştir. Hazırlanan örnekler lazer taramalı konfokal mikroskop ile incelenmiştir.

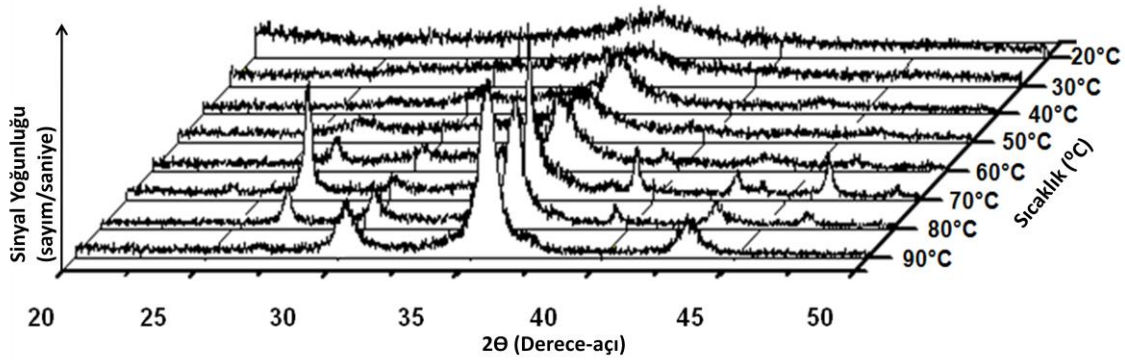
#### **2.6 İstatiksel Analiz**

“Graphpad Prism 5 Demo Software (GraphPad Software, Inc. USA), One-Way Anova test” istatiksel hesaplamalar için kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

#### 3.1 XRD Analizi

Farklı sıcaklıklarda sentezlenen (20°C - 90°C) MNP örneklerinin kristal yapıları XRD ile incelenmiştir.

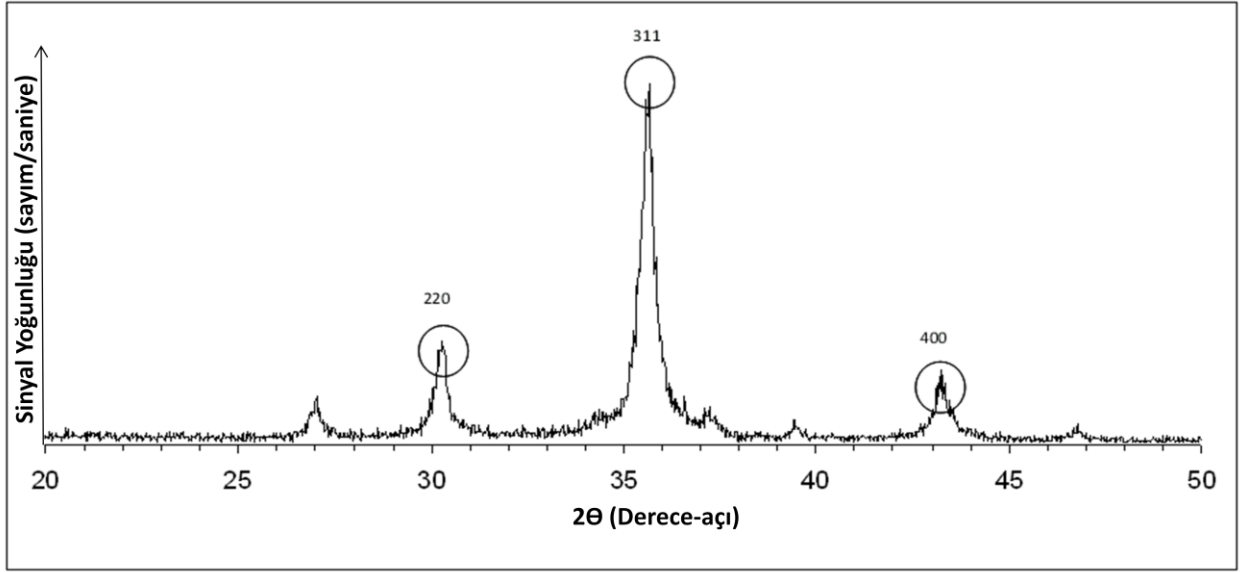


**Şekil 3.1.** Farklı sıcaklıklarda sentezlenen MNP örneklerinin X-ışını kırınım deseni

Şekilde 3.1’de görüldüğü gibi 50°C’ye kadar elde edilen çıplak manyetik nanoparçacıklar (MNP) amorf özellik göstermektedirler. 50°C üzerindeki sıcaklıklarda kristal yapı oluşmaya başlamıştır. 60°C ve 80°C sıcaklıkları arasında Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>’e ve FeO(OH)’e ait tepecikler görülmüştür. FeO(OH)’e ait tepecikler 70°C’de 60°C’ye kıyasla daha yoğundur. 70°C üzerindeki sıcaklıklarda Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>’e ait tepecikler daha yoğun ve keskin, FeO(OH)’e ait tepeciklerin sıcaklık artışıyla azaldığı görülmektedir. 90°C’de saf Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> elde edildiği anlaşılmaktadır.

90°C’de sentezlenen manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklarının X-ışını kırınım deseni; sırasıyla (220), (311) ve (400) okuma değerlerinde kırınım tepecikleri vermektedir. Bunlar kübik yapıya sahip Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (manyetit) kristalin karakteristik tepecikleridir (Şekil 3.2) (CARUNTU, 2004, SUN, 2006).



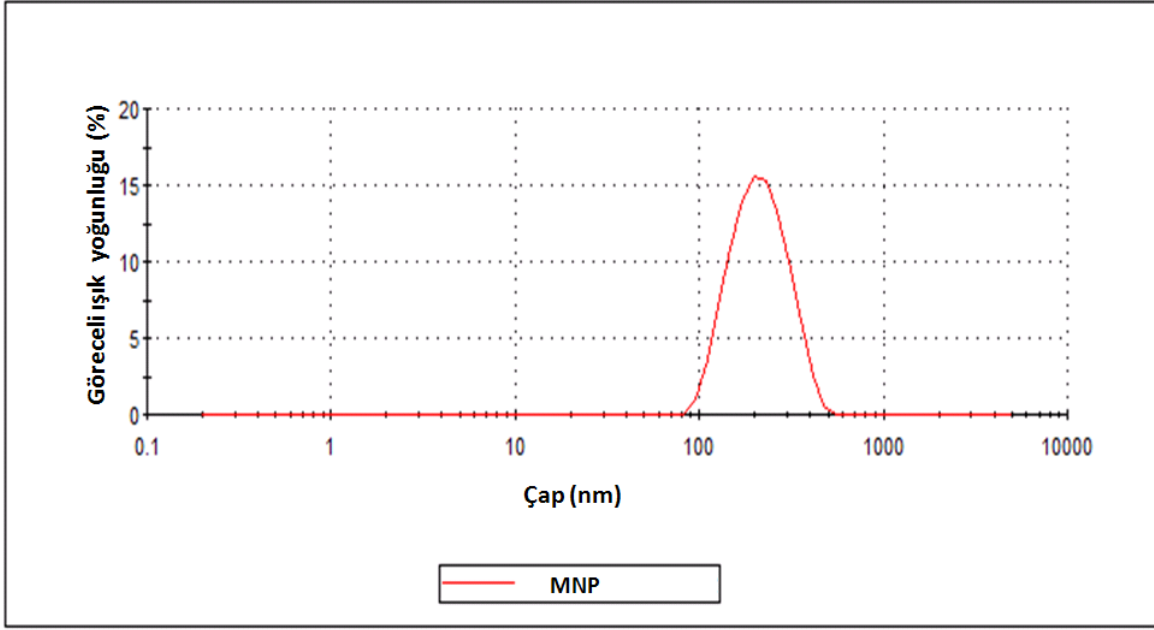


**Şekil 3.2** 90°C’de sentezlenen manyetik demir oksit ( $Fe_3O_4$ ) nanoparçacığının X-ışını kırınım deseni

### 3.2 DLS Analizi

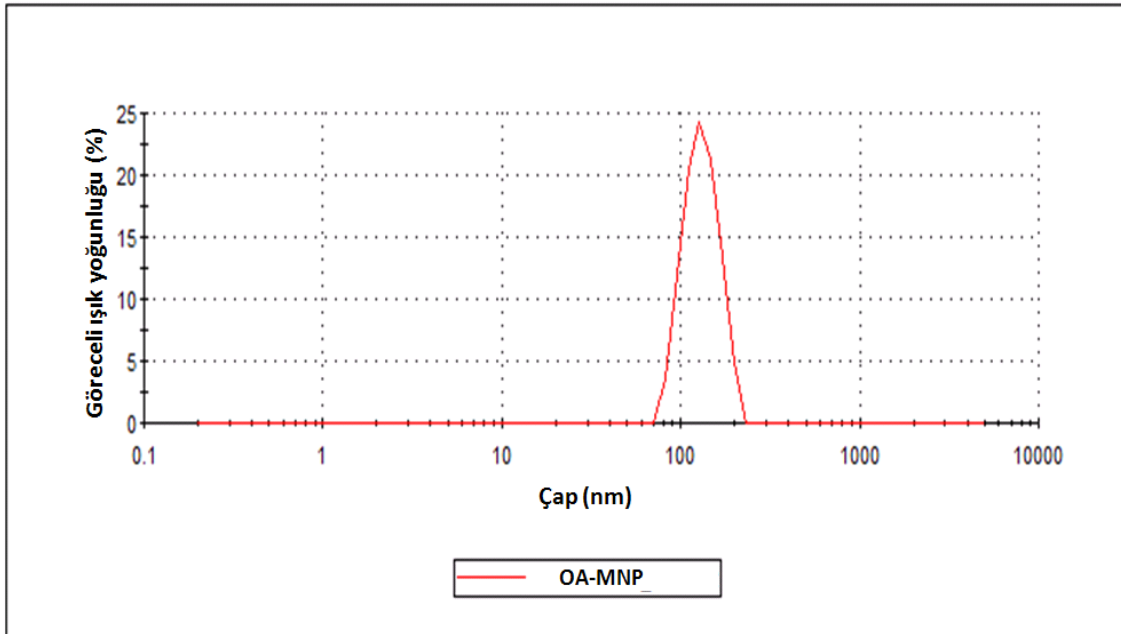
MNP, OA-MNP ve H-OA-MNP örneklerinin boyutları Zetasizer cihazı ile belirlenmiştir.

Şekil 3.3’te verilen ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılımı grafiğinde, en sık görülen MNP boyutu 221 nm olarak görülmektedir.



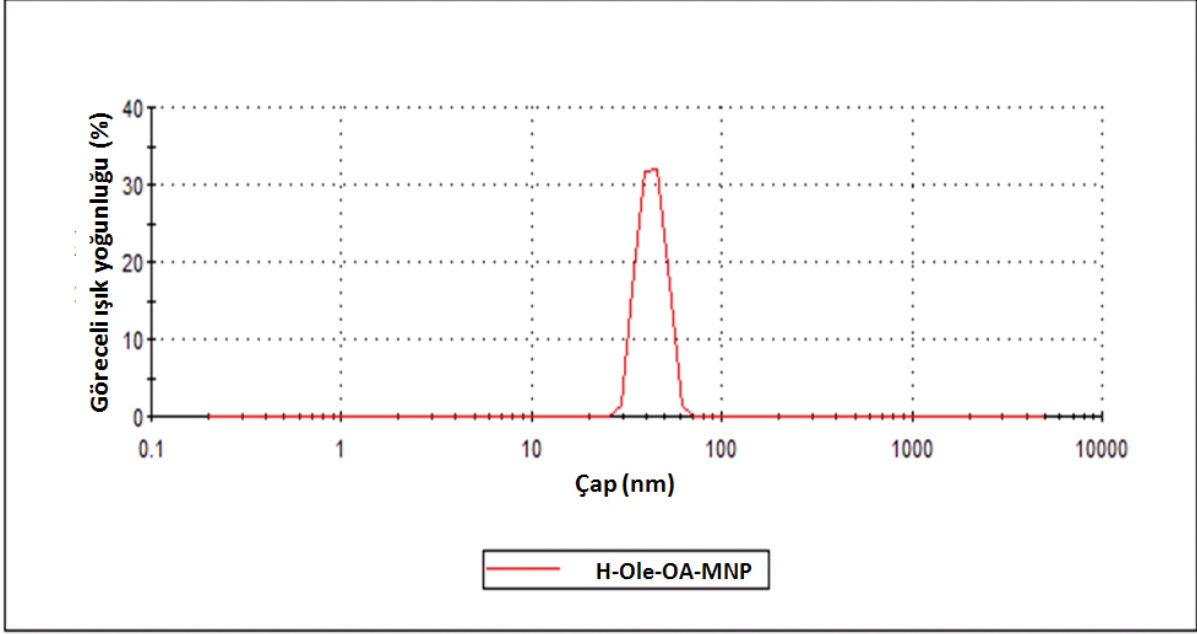
Şekil 3.3 MNP'lere ait ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılım grafiği

OA-MNP'lerde en sık karşılaşılan çap boyutu, Şekil 3.4'de verilen ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılımı grafiğinde, 131 nm olarak görülmektedir.



Şekil 3.4 OA-MNP'lere ait ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılım grafiği

H-OA-MNP'lerde en sık karşılaşılan çap boyutu, Şekil 3.5'da verilen ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılımı grafiğinde, 43 nm olarak belirlenmiştir.

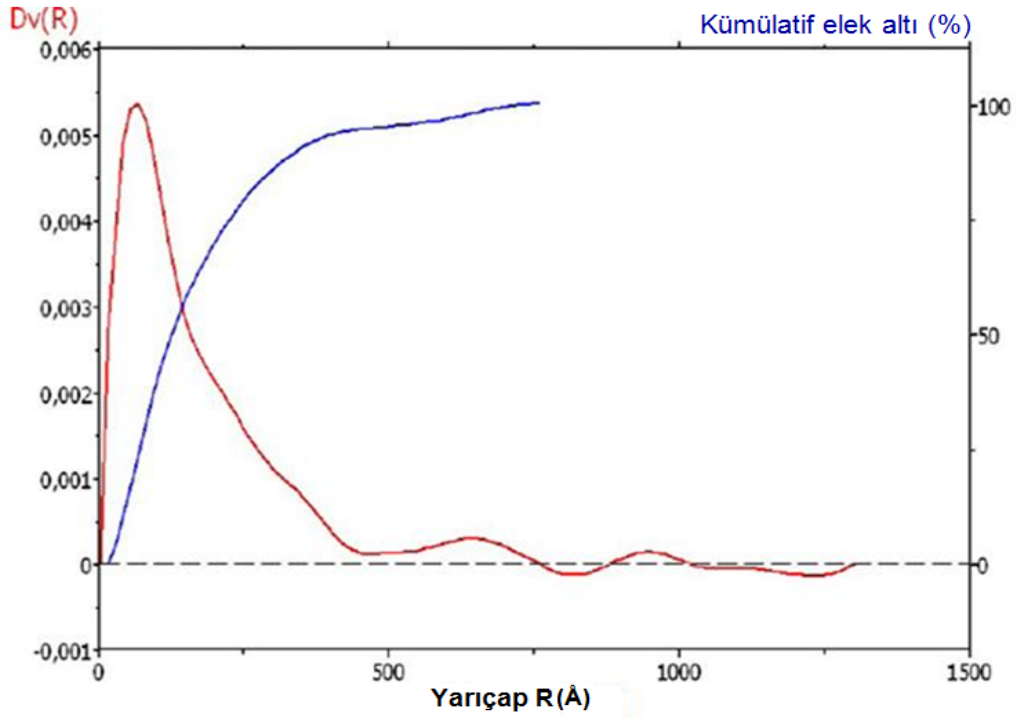


**Şekil 3.5.** H-OA-MNP'lere ait ışık yoğunluğuna bağlı boyut dağılım grafiği

MNP'lerde en sık karşılaşılan çap 221 nm iken, OA-MNP'lerde 131 nm'dir. H-OA-MNP'lerde ise en yaygın boyut 43 nm'dir. DLS analizleri sonuçlarından, MNP'lerin yüzey aktif maddelerle kaplanmasıyla parçacık boyutlarında azalma olduğu görülmüştür.

### 3.3 SAXS Analizi

Sentezlenen OA-MNP boyutları bir başka yöntem olan SAXS Analizi ile incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.6 ve Tablo 3.1'de verilmektedir.



**Şekil 3.6** OA-MNP'lerin SAXS analizi grafiği (Dv(R): Yarıçapı R olan parçacıkların hacim dağılımı)

**Tablo 3.1.** OA-MNP'lerin SAXS analizi sonuçları.

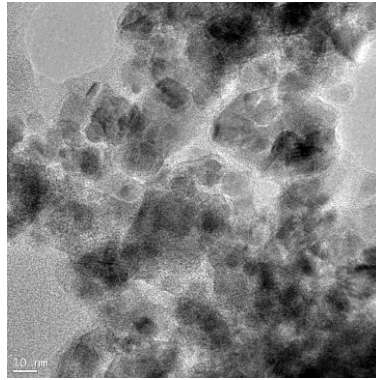
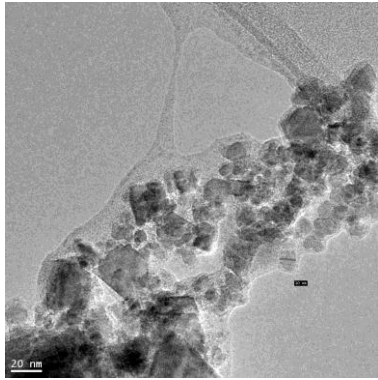
Örnek	En Sık Yarıçap (Å)	Ortalama Yarıçap (Å)	R20 (Å)	R50 (Å)	R80 (Å)
MNP	65,0	167,2	58,2	122,7	252,5

Şekil 3.6 ve Tablo 3.1 incelendiğinde, parçacıklarda en sık karşılaşılan yarıçap 65 Å (6,5 nm) olarak görülmüştür. Parçacıkların ortalama yarıçapı ise 167,2 Å (16,7 nm)'dur. Sentezlenen parçacıkların % 20'sinin yarıçapı 58,2 Å (5,8 nm)'un altında, % 50'sinin yarıçapı 122,7 Å (12,2 nm)'un altında ve % 80'ninin yarıçapı 252,5 Å (25,2 nm)'un altındadır. Sonuç olarak, parçacıkların yarı çap uzunlukları 6.5 nm ile 25.25 nm arasındadır.

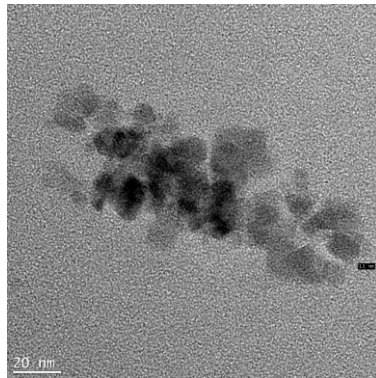
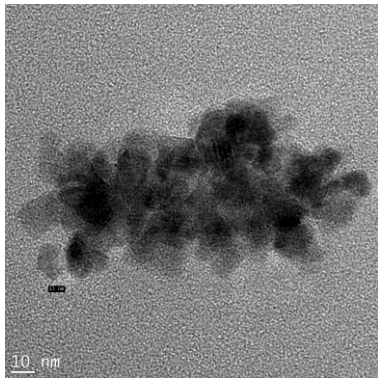
SAXS analizi ile elde edilen boyut analiz sonuçları, parçacık boyutunu yaklaşık 10-15 nm olarak gösteren Şekil 3.7'deki TEM analizi sonuçları ile örtüşmektedir. Bu sonuçlar, DLS analizi ile elde edilen OA-MNP boyutlarından farklılık göstermektedir (Şekil 3.4). Bu farklılığın nedeni DLS yöntemi ile yapılan ölçümlerin büyük ölçüde tanecik boyutundan ziyade, kümeleşmiş taneciklerin toplam boyutunu vermesidir. Bu kümeleşme TEM görüntülerinden daha iyi anlaşılmaktadır (Şekil 3.7 (b)).

### 3.4 TEM

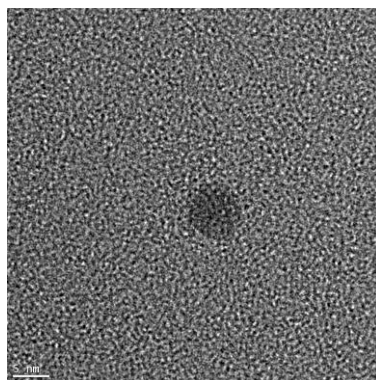
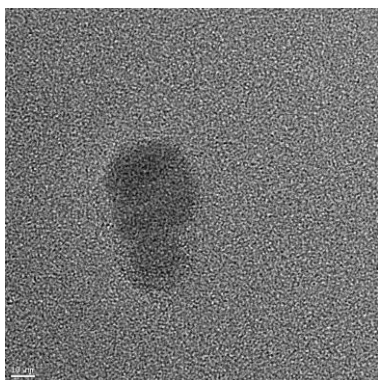
Çeşitli yöntemlerle elde edilen manyetik nanoparçacıkların optimizasyon sırasında çekilen TEM görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.7, 3.8, 3.9). Çıplak manyetik nanoparçacıkların kümeler oluşturduğu Şekil 3.7(a)'daki TEM görüntülerinden anlaşılmaktadır. Bu kümeleşmenin engellenebilmesi amacı ile üç farklı oleik asit kaplama yöntemi denenmiştir. Bunlar sırası ile 1) oleik asidin manyetik nanoparçacıkların sentezi tamamlandıktan sonra karışıma eklenmesi (Şekil 3.7(b)), 2) MNP'lerin hekzan-oleil amin çözeltisi içerisinde sonikatör yardımıyla dağıtılması (Şekil 3.7(c)) ve 3) oleik asidin manyetik nanoparçacıkların sentezi sırasında karışıma eklenmesi yöntemleridir (Şekil 3.7(d)). Şekil 3.7(b)'den anlaşıldığı gibi MNP sentezinden sonra eklenen oleik asitin kümeleşmeyi yeterince engelleyemediği gözlemlenmiştir. Kümeler içerisindeki taneciklerin boyutları 10-15 nm arasındadır. Şekil 3.7(c)'deki TEM sonuçlarından hekzan-oleil amin ve oleik asit karışımı kullanılması ile kümeleşmenin büyük ölçüde önlendiği görülmektedir. Sentezden sırasında oleik asit eklenerek sentezlenen nanoparçacıklar, sentezden sonra oleik asit eklenen nanoparçacıklara göre kümeleşmeyi daha iyi engellemiştir (Şekil 3.7(d)).



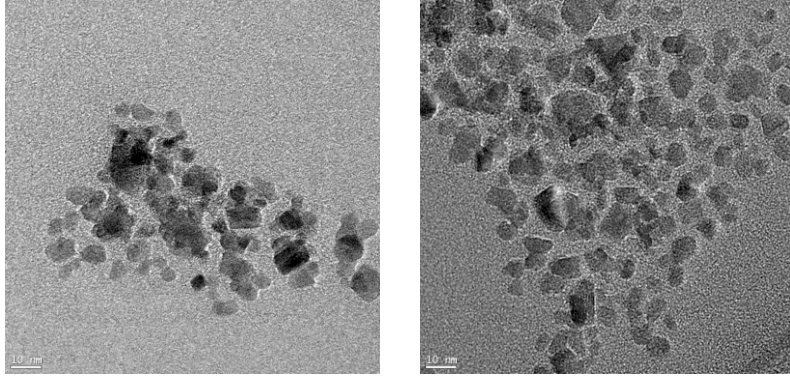
a)



b)



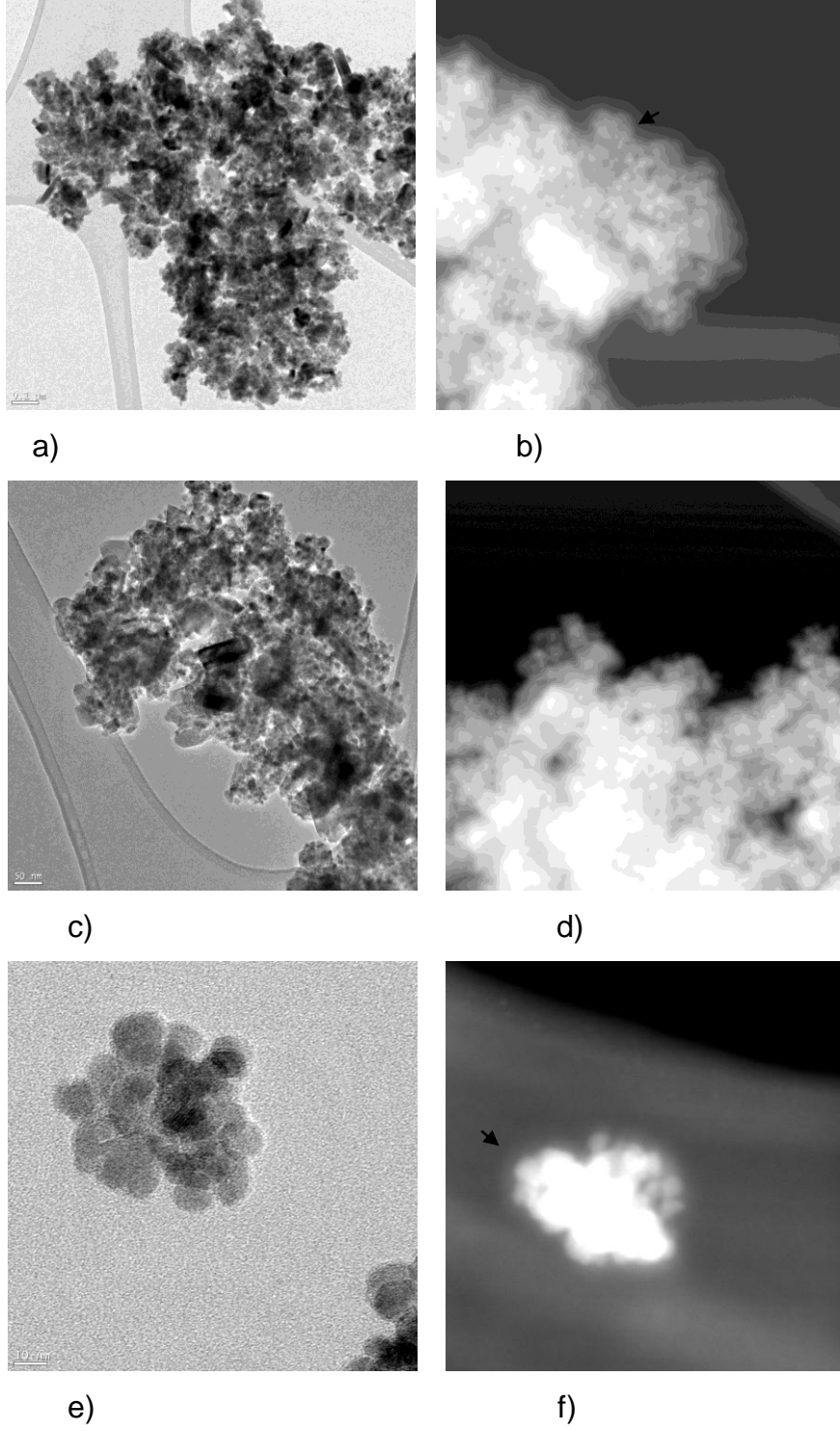
c)



d)

**Şekil 3.7** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkların TEM görüntüleri a)MNP, b) OA-MNP, c) H-OA-MNP ve d) OA-MNP<sub>2</sub>

Nanoparçacıkların PEG kaplama aşamasında üç değişik yol izlenmiştir (Bölüm:Gereç ve Yöntem 2.3.2). İzlenen birinci ve ikinci yollarda, yukarıda Şekil 3.7 (b)'de gösterilmiş olan oleik asit kaplı MNPler farklı düzeylerde kullanılmıştır ( 0,05 gr ve 0,15 gr). Bu örneklerin TEM ve (Tarayıcı Geçirmeli Elektron Mikroskobu) STEM görüntüleri aşağıda verilmektedir (Şekil 3.8 a-d). Üçüncü yol ile nanoparçacıkların elde edilmesinde ise hem oleik asit hem PEG karışıma sentez sırasında eklenmiştir. Hazırlanan bu örneğin TEM ve STEM görüntüsü Şekil 3.8 (e),(f)'de verilmektedir.



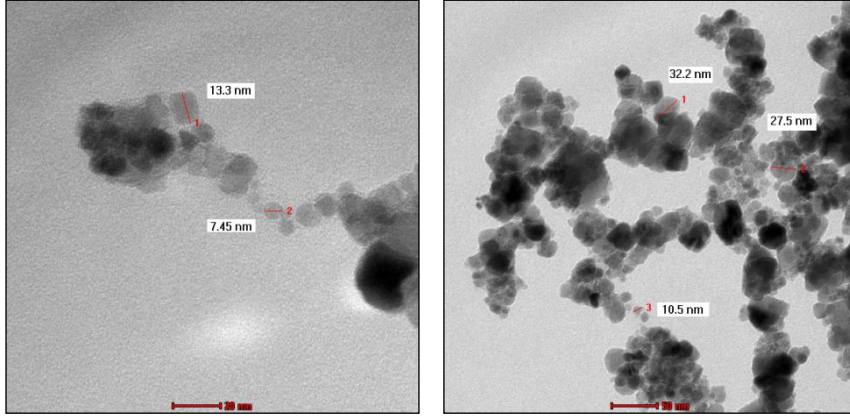
**Şekil 3.8**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparçacıkların TEM/STEM görüntüleri a) PEG-MNP-0,05 (TEM), b) 0,05gr-PEGMNP (STEM) c) PEG-MNP-0,15 (TEM), d) PEG-MNP-0,15 (STEM) e) PEG-MNP (TEM) f) PEG- MNP (STEM)



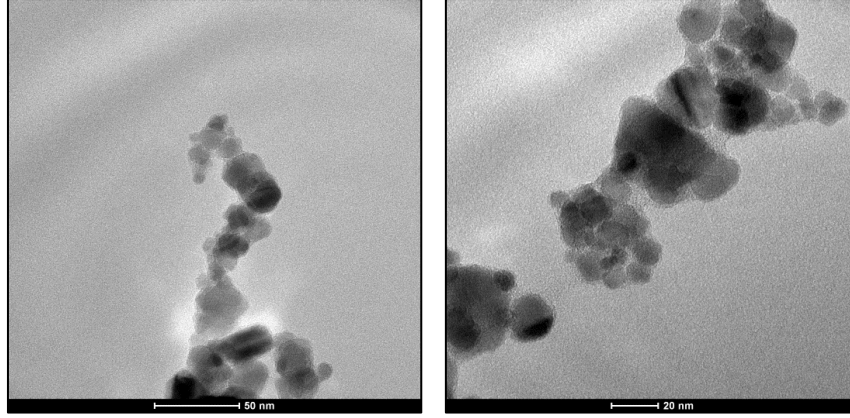
PEG kaplanılarak hazırlanan manyetik nanoparçacıklarda genel olarak kümeleşme gözlenmektedir (Şekil 3.8). Kümeler içerisindeki taneciklerin boyutları 10 nm ve 15 nm arasındadır. Şekil 3.8 (b)'deki STEM görüntülerinde PEG-MNP-0,05 örneğinin üzerinde çok ince bir tabaka gözlenmiştir (şekil üzerinde okla belirtilmiştir). Bu tabakanın PEG'e ait olduğu düşünülmektedir. Ancak bu örneğin miktarının azlığı nedeni ile FTIR analizi yapılamamıştır. Şekil 3.8(d)'deki STEM görüntülerinde PEG-MNP-0,15 örneğinin üzerinde bu tabaka belirgin değildir.

Sentez aşamasında PEG eklenilerek hazırlanan PEG-MNP'nin Şekil 3.8(e)'de verilen TEM görüntülerinde nanoparçacıkların küresel yapıda olduğu ve boyutlarının yaklaşık 10nm olduğu görülmektedir. Bu örneğe ait TEM görüntüleri literatür ile uyum içerisindedir (YALLAPU, 2010). Nanoparçacıkların kümeleşmesi belli oranda önlenbilmiştir. Şekil 3.8(f)'deki STEM görüntülerinde ise nanoparçacıkların üzerinde ince bir PEG tabakası gözlenmektedir. Bu bulgu, daha sonra FTIR analizi sonuçlarında görülen PEG'in  $954\text{ cm}^{-1}$  deki karakteristik bandı ile uyum içerisindedir (Şekil 3.12(b)).

Şekil 3.8 (e)'de TEM görüntüsü verilmiş olan PEG kaplı nanoparçacıklar biyolojik hedefleme amacıyla folik asit ile kaplanmıştır. Burada, bağlanma aşamasında iki farklı süre denenmiştir (2 saat ve 24 saat). Şekil 3.9 (a)'da 2 saatlik karıştırma süresinde elde edilen FA-PEG-MNP<sub>2</sub> örneğinin ve Şekil 3.9 (b)'de 24 saatlik karıştırma süresinde elde edilen FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneğinin TEM görüntüleri verilmektedir.



a)



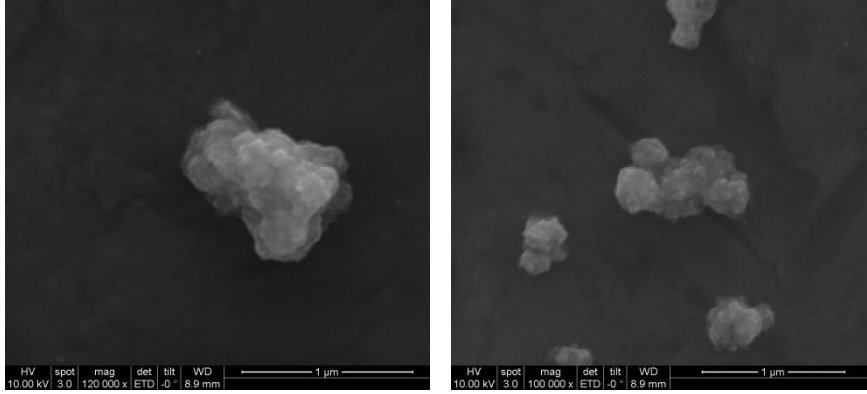
b)

**Şekil 3.9** TEM görüntüleri a) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve b) FA-PEG-MNP<sub>24</sub>

FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinin şekil ve boyutları birbirine benzer olup, belli oranda kümeleşme görülmektedir (Şekil 3.9). Nanoparçacıklar küresel yapıya sahiptirler. Kümeleşmenin PEG-MNP'ye (Şekil 3.8(e)) göre daha az olduğu gözlenmiştir. Farklı karıştırma sürelerinin tanecik boyutuna ve kümeleşme düzeyine önemli bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır. Taneciklerin boyutları 10-40 nm arasındadır.

### 3.5 SEM

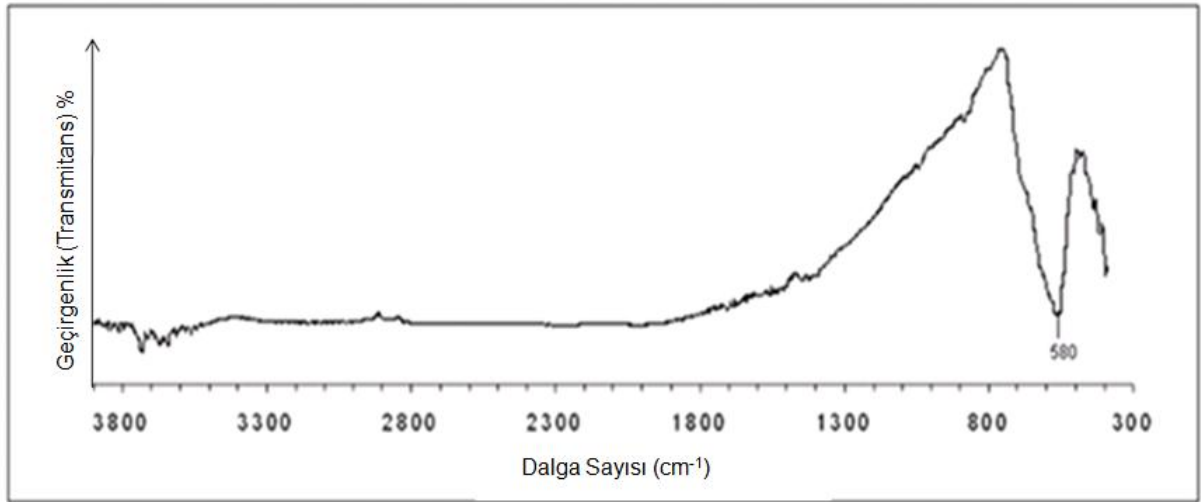
Sentezlenen PEG-MNP nanoparçacıklarının SEM görüntüleri Şekil 3.10'da verilmiştir. TEM görüntülerinden (Şekil 3.8(e)) benzer şekilde küresel yapıda olan nanoparçacıkların belli bir oranda kümeleştiği gözlemlenmiştir. Kümecik boyutları 200nm ile 500nm arasında değişmektedir. TEM analizinde örneklerin hazırlanırken sonikasyona tabi tutulması, SEM analizine göre kümeleşmeyi bir ölçüde azaltmıştır.



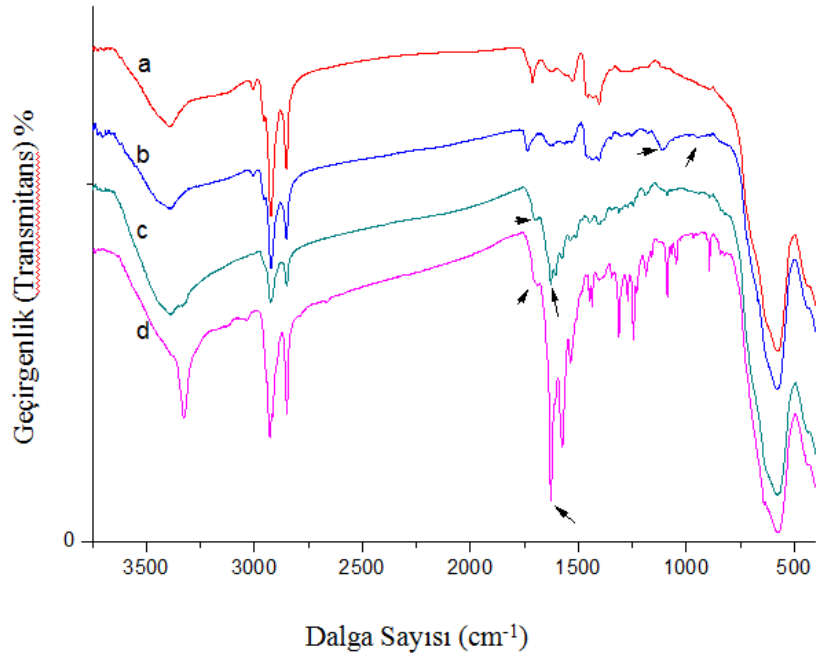
Şekil 3.10 PEG-MNP'nin SEM görüntüsü

### 3.6 FTIR

Sentezlenen  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklar, FTIR spektrometresi ile incelenmiştir. Manyetitin ( $Fe_3O_4$ ) Fe-O bağlarındaki titreşimlerine ait  $580\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş bandı Şekil 3.11'deki FTIR spektrumunda görülmektedir.



**Şekil 3.11** MNP'lerin FTIR spektrumu



**Şekil 3.12** FTIR Spektrası; a) OA-MNP b) PEG-MNP ve c) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> and d) FA-PEG-MNP<sub>24</sub>

Şekil 3.12'de verilen OA-MNP, PEG-MNP, FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerine ait FTIR spektrasında benzer ve farklı bantlar görülmektedir. Tüm örneklerde oleik aside ait karakteristik bantlar 2924 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub> asimetric), 2854 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub> simetric), ve 3005 cm<sup>-1</sup>'de (C=C-H'taki C-H titreşim bandı) bulunmaktadır. Aynı zamanda örneklerin hepsinde manyetitinin Fe-O bağlarındaki titreşimi 580 cm<sup>-1</sup>'deki geniş bantta gözlemlenmiştir. PEG'in fonksiyonel gruplarına ait bantlar 1354 cm<sup>-1</sup>(C-O-C asimetric) ve 1102cm<sup>-1</sup>'de (C-O-C simetric) görülmektedir. PEG zincirinin düzleminin dışındaki -CH gruplarına ait 954 cm<sup>-1</sup>' deki bant PEG'in FTIR spektrumundaki karakteristik bandıdır. PEG-MNP örneğinin yüzeyinin kaplandığı Tarayıcı Geçirmeli Elektron Mikroskobu (STEM) görüntüsü ile de doğrulanmıştır (Şekil 3.8(f)).

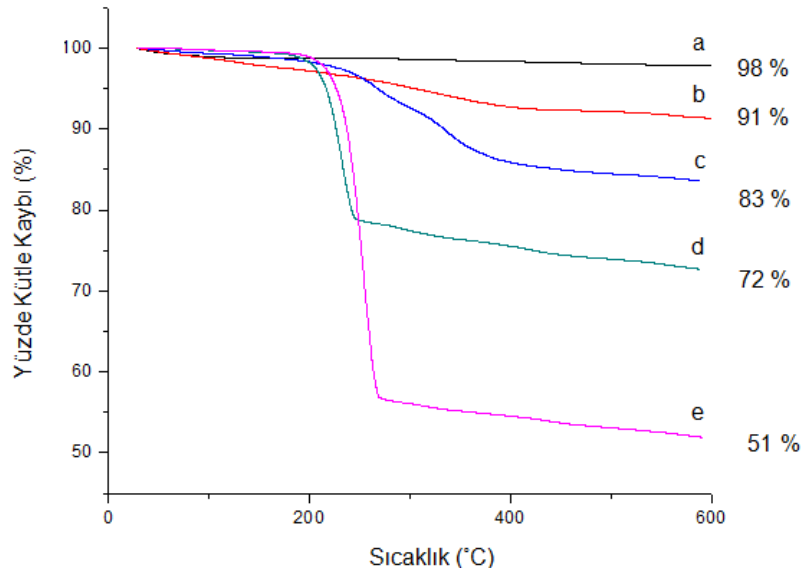
FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinde 2959 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub> grubundaki C-H), 2924 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub> asimetric), 2848 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub> simetric), 1696 cm<sup>-1</sup> (-COOH grubundaki C=O), 1638 cm<sup>-1</sup> (-CONH<sub>2</sub> grubundaki C=O), 1605 cm<sup>-1</sup> (-NH<sub>2</sub>), ve 1413 cm<sup>-1</sup>'de (fenil halkası) bantlar görülmektedir. 1626 cm<sup>-1</sup>'de (-CONH<sub>2</sub> grubundaki C=O) görülen bant folik asidin karakteristik bandıdır (Şekil 3.12(c,d)). Folik aside ait karakteristik bantların FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneğinde 2 saatlik karıştırma örneğine göre daha derin olduğu görülmektedir. Bu sonuçtan nanoparçacıklara 24 saatte daha yüksek düzeylerde folik asit bağlanmış olabileceği anlaşılmaktadır.

### 3.7 TGA

Nanoparçacıkların yüzeylerine bağlanmış oleik asit, PEG ve folik asit miktarlarının kütlece yüzdesi termogravimetrik analiz ile bulunmuştur. Şekil 3.13'de MNP, OA-MNP, PEG-MNP, FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinin, 23°C ve 600°C arasındaki TGA eğrileri verilmiştir. MNP örneği, 130°C'ye ısıtıldığında kütlelerinin %2'sini kaybetmiştir. Bu azalma, MNP'lerin yüzeyindeki su moleküllerinin kaybı nedeni ile olabilir. OA-MNP örneğinin gösterdiği %9'luk kütle kaybı ise yüzeydeki oleik asit tabakasına aittir. PEG-MNP örneği hem oleik asit hem de PEG ile kaplanmıştır. Bu örnekte görülen %17'lik kütle kaybı oleik asit ve PEG'e aittir.

Oleik asidin kütlece yüzdesi yaklaşık %8 olduğundan (Şekil 3.13 (b)), geri kalan %9'luk (17-9=8) kaybının nanoparçacıkların yüzeyindeki PEG tabakasına ait olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bulgular, literatür ile uyum içerisindedir (LAN, 2007, YAN, 2009).

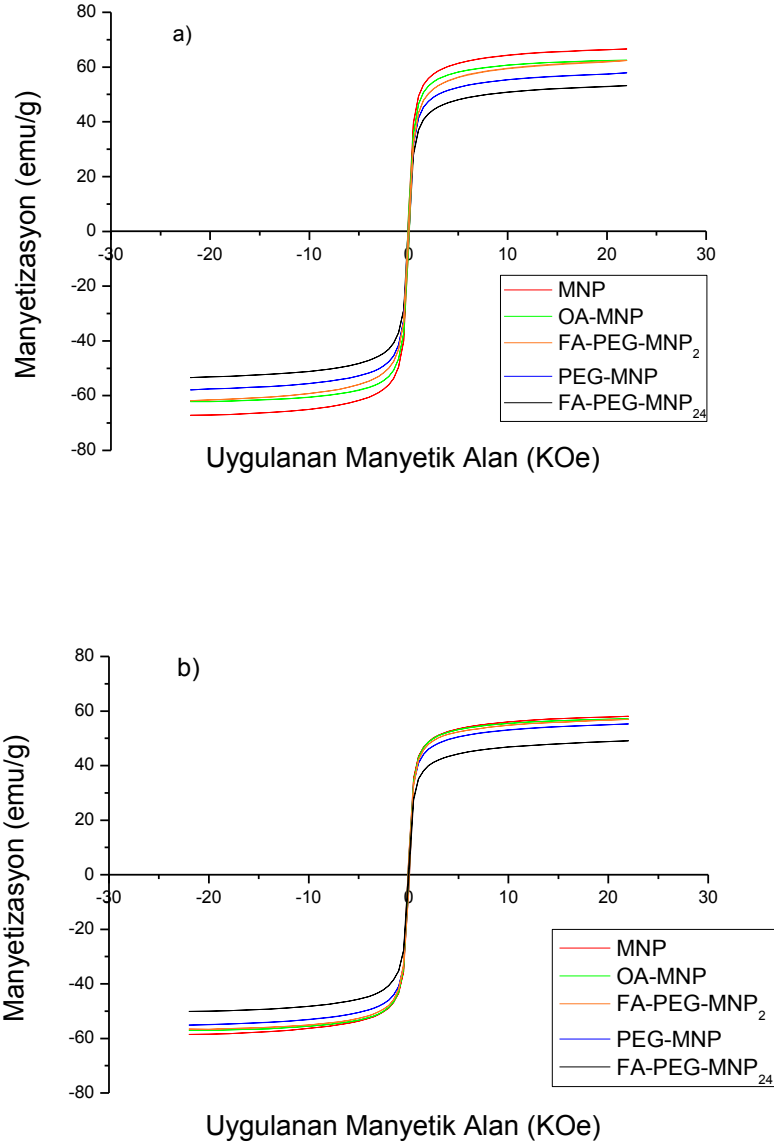
FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinin TGA eğrileri incelendiğinde ise sırası ile % 27 ve % 49'luk kütle kayıpları gözlenmiştir. Bu örneklerdeki %17'lik kütle kaybı oleik asit ve PEG'e aittir. Dolayısıyla FA-PEG-MNP<sub>2</sub> için kütlece %10'luk (27-17=10), FA-PEG-MNP<sub>24</sub> için kütlece % 32'lik (49-17=32) kaybın nanoparçacıkların yüzeyindeki folik aside ait olduğu düşünülmektedir. FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinde folik aside ait olduğu düşünülen kütle kaybı değerleri birbirinden farklıdır. FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneğinde folik asit miktarı FA-PEG-MNP<sub>2</sub> örneğine göre %22 daha fazladır. Bunun nedeni, MNP'lere folik asit bağlama aşamasında uygulanan farklı karıştırma süreleri (2 ve 24 saat) olabilir. Ayrıca bu bulgu, Şekil 3.12'de gösterilen FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub>'nin FTIR spektralleri ile de uyum içerisindedir.



**Şekil 3.13** TGA eğrileri a) MNP, b) OA-MNP, c) PEG-MNP, d) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve e) FA-PEG-MNP<sub>24</sub>

### 3.8 VSM

Sentezlenen nanoparçacıkların 23°C ve 37°C'de yapılan mıknatıslanma ölçümünden elde edilen manyetik histeresis eğrileri Şekil 3.14'de verilmektedir.



Şekil 3.14 MNP, OA-MNP, PEG-MNP, FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinin Manyetizasyon Eğrileri a) 23°C ve b)37°C

MNP, OA-MNP, PEG-MNP, FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerine ait manyetik doygunluk ( $M_s$ ), artık mıknatıslanma ( $M_r$ ), manyetik doygunluk kareselliği ( $M_r/M_s$ ) ve giderme kuvveti ( $H_c$ ) değerleri Tablo 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2** MNP, OA-MNP, PEG-MNP, FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinin manyetik özellikleri.

Örnek	$M_s$ (emu/g)		$M_r$ (emu/g)		$M_r/M_s$		$H_c$ (KOe)	
	(23°C)	(37°C)	(23°C)	(37°C)	(23°C)	(37°C)	(23°C)	(37°C)
MNP	66,50	58,34	10,50	5,54	0,16	0,09	0,083	0,07
OA-MNP	65,10	57,25	9,60	5,80	0,15	0,10	0,090	0,07
PEG-MNP	56,12	55,20	4,73	5,46	0,08	0,10	0,031	0,07
FA-PEG-MNP <sub>2</sub>	62,32	56,79	4,31	6,39	0,06	0,11	0,05	0,08
FA-PEG-MNP <sub>24</sub>	53,33	49,59	4,12	3,33	0,07	0,06	0,06	0,05

$M_s$ : Manyetik doygunluk,  $M_r$ : Artık mıknatıslanma (Remanans),  $M_r/M_s$  : Manyetik doygunluk kareselliği,  $H_c$ : Giderme kuvveti (Koersivite)

Sentezlenen nanoparçacıkların  $H_c$  ve  $M_r$  değerleri istenildiği üzere son derece düşük düzeydedir (Şekil 3.14 ve Tablo 3.2). Bu sonuca göre elde edilen nanoparçacıkların süperparamanyetik özellik taşıdığı düşünülmektedir. MNP’lerin 23°C’deki manyetik doygunluğu (66.50 emu/g) oleik asit kaplı MNP’lerin manyetik doygunluğundan (65.10 emu/g) daha yüksektir. MNP’lerin oleik asit ile kaplanması, manyetik özelliklerini çok az miktarda değiştirmiştir. Literatürde, Liu *et al.* sentezledikleri MNP ve oleik asit kaplı MNP’lerin manyetik doygunluk değerlerini sırası ile 58.0 emu/g ve 46.0 emu/g olarak vermişlerdir (LIU, 2006) . Okassa *et al.*’ın çalışmalarında ise bu değerler sırası ile 92 emu/g ve 73 emu/g’dir (OKASSA, 2007). Bu sonuçlardan nanoparçacıkların arzu edilen süperparamanyetik özelliği taşıdığı ve manyetik özelliklerinin literatür ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır (LIU, 2006; OKASSA, 2007; YALLAPU; 2010).



PEG-MNP'lerin 23°C'deki manyetik doygunluğu 56.12 emu/g'dir. MNP'lerin PEG ile kaplanması, manyetik özelliklerini çok az miktarda değiştirmiştir. Literatürde, Yallapu *et al.* sentezledikleri PEG kaplı MNP'lerin manyetik doygunluk değerlerini 66.08 emu/g olarak vermişlerdir (YALLAPU, 2010).

FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ve FA-PEG-MNP<sub>24</sub> örneklerinin 23°C'deki manyetik doygunlukları 62.33 (emu/g) ve 53.33 (emu/g)'dir. Folik asit bağlı MNP'lerin, manyetik özellikleri çıplak nanoparçacıklara göre çok az miktarda değişmiştir. Kaplamanın nanoparçacıkların manyetik özelliklerini azaltmamış olması istenilen bir özelliktir.

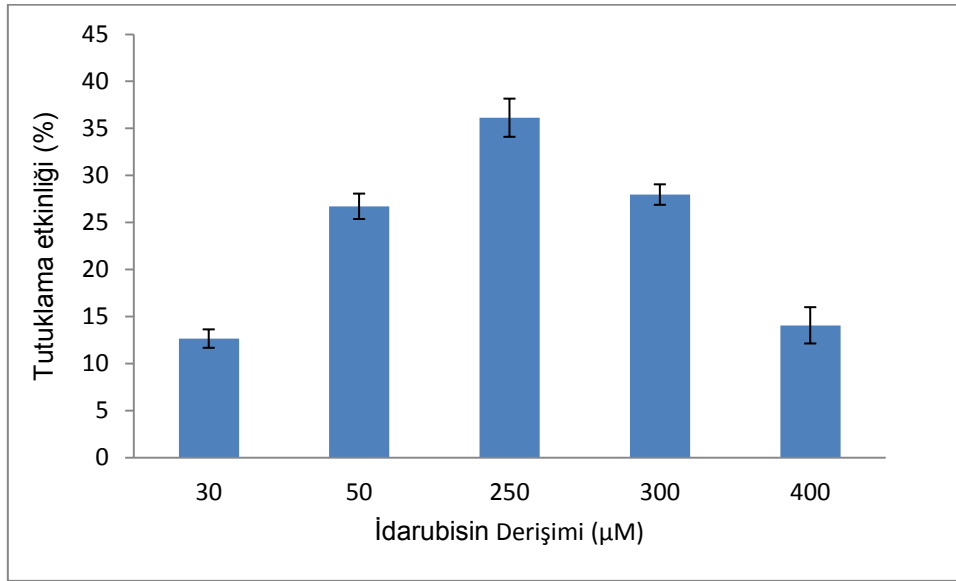
Her nanoparçacığın, 23°C ve 37°C'deki manyetizasyon eğrileri birbirine benzemektedir. Genel olarak, 37°C'deki M<sub>s</sub> değerlerinde 23°C'ye göre bir düşüş gözlemlenmektedir. Langevin Teorisinde açıklandığı üzere manyetizasyon uygulanan manyetik alan şiddeti ile doğru orantılıyken, sıcaklıkla ters orantılıdır (SPALDIN 2003). Sıcaklık artışı ile M<sub>s</sub> değerinin azalmasına literatürde de rastlanmaktadır (BEAN, 1956). Parçacıkların 37°C'de de son derece düşük Mr ve Ms değerlerine sahip olmaları, bu sıcaklıkta süperparamanyetik özelliklerini kaybetmediklerini göstermektedir (Tablo 3.2).

### **3.9 İdarubisin'in Nanoparçacıklara Bağlanma Etkinliği**

Manyetik nanoparçacıkların ilaç yüklenme etkinliğinin belirlenebilmesi için farklı derişimlerdeki idarubisin ile 1mg FA-PEG-MNP<sub>2</sub> 2ml PBS içerisinde karıştırılmıştır. FA-PEG-MNP<sub>2</sub> nanoparçacıkları, parçacık boyutu ve manyetik özellik açısından FA-MNP<sub>24</sub>'e göre önemli farklılık göstermedikleri ve deney sürecinin daha kısa tutulabilmesini sağladıkları için ilaç bağlama deneylerinde tercih edilmişlerdir. Nanoparçacıkların ilaç bağlanma etkinliği Gereç ve Yöntemler Bölüm 2.3.4'te belirtilen formül kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 3.15'te idarubisinin nanoparçacıklara yüklenme oranı (%) gösterilmektedir.

Şekilde, verilen idarubisin derişim değerleri başlangıçta kullanılan ilaç miktarını göstermekte, yüzde değerleri ise tutuklanan ilaç yüzdesini vermektedir. Sonuçlar incelendiğinde, en fazla ilaç tutuklanmasının 250µM idarubisin derişimi için %36,1 ± 3,4 olduğu görölmektedir. İlaç miktarı arttıkça tutuklama veriminde düşüş tespit edilmiştir. En yüksek idarubisin derişiminde (400µM), %14,1 ± 2.8 ilaç bağlama etkinliği belirtilmiştir.

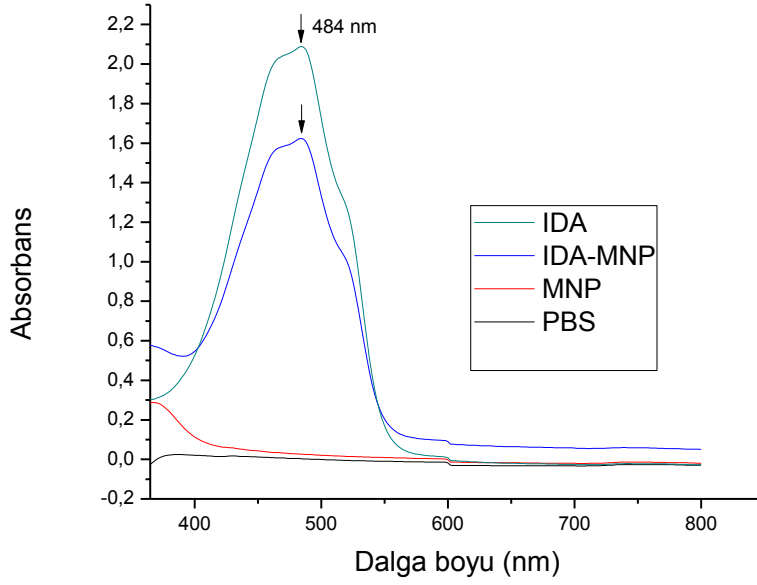
Eklenen ilaç miktarı arttıkça verimin düşmesinin nedeni nanoparçacığın doyum noktasına ulaşması ve ilacı daha fazla bağlayamamasıdır. Her ilaç derişimi için üç tekrar yapılmış, ortalama değerler kullanılmıştır. Elde edilen ilaç yüklenme yüzdeleri literatürdeki benzer çalışmalarda belirtilen değerler ile uyum içerisinde (ZHANG, 2008).



**Şekil 3.15** Farklı derişimlerde idarubisinin manyetik nanoparçacıklara tutuklanma yüzdesi

PBS içinde çözülmüş ilaç yüklü nanoparçacıklar (İDA-MNP), saf idarubisin (İDA) ve çıplak nanoparçacıklar (MNP) UV spektrofotometresi ile 350-800 nm dalga boyu aralığında incelenmiş, dalga boyu değerlerine karşı absorban eğrileri elde edilmiştir (Şekil 3.16).

Örneklere ait en yüksek absorbans değerlerinin elde edildiği dalga boylarına bakıldığında, idarubisin ve ilaç yüklü nanoparçacıkların 484 nm'de en yüksek absorbansı verdikleri belirlenmiştir. Boş MNP'ler ve PBS çözeltisi bu dalga boyunda önemli absorbans göstermemektedir. Bu sonuçlardan, idarubisinin MNP'lere yüklendiği açıkça görülmektedir.

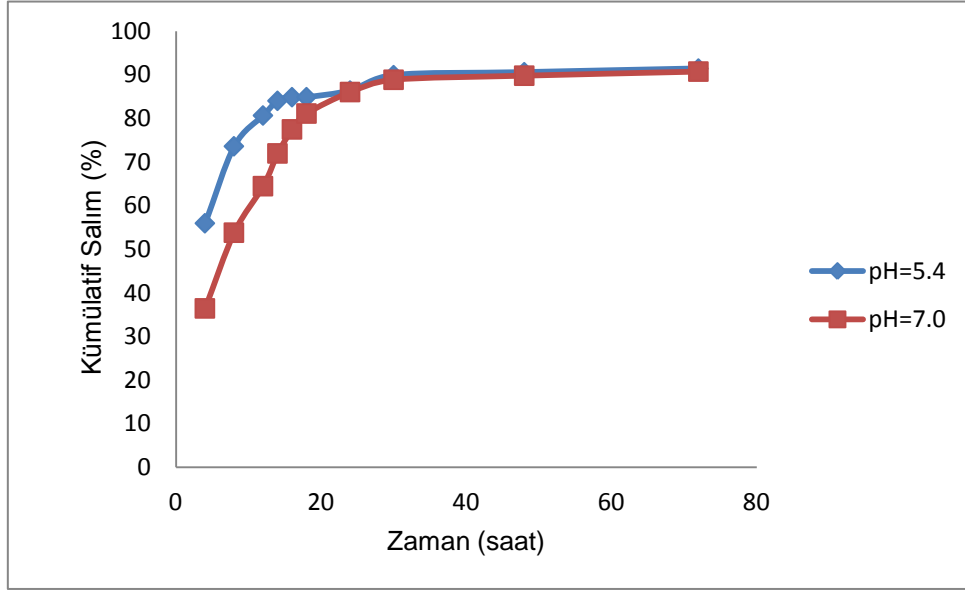


Şekil 3.16 İDA, İDA-MNP, MNP ve PBS için UV absorptans spektrasi

### 3.10 İdarubisinin Nanoparçacıklardan Salımı

İdarubisinin nanoparçacıklardan salımı hem pH 5,4'te hem de pH 7,0'de 72 saat süresince incelenmiştir (Şekil 3.17). Hücre içi pH değeri olan pH 5.4'te ilk 12 saatte ilacın %80'inin salındığı gözlemlenmiştir. İlaç salım hızının 24 saat sonra yavaşladığı görülmüştür. 72 saat içinde toplam ilacın yaklaşık %90'ı salınmıştır. pH 7,0'de ilk 12 saatlik ilaç salımının yaklaşık %60 civarında olduğu belirlenmiştir. Hücre içi ve dışındaki fizyolojik koşullar göz önüne alındığında bu değerlerin pH 5.4'teki değere göre (%80) düşük olması ilaç salımı açısından avantajlı bir durumdur.

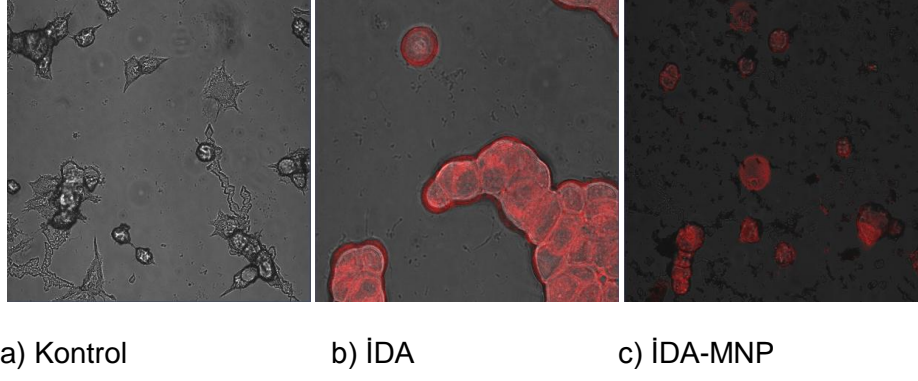
İlaç salım hızının 24 saat sonra pH 5.4'teki sonuçlara benzer şekilde yavaşladığı ve 72 saat içinde %90 salım değerine ulaştığı görülmüştür.



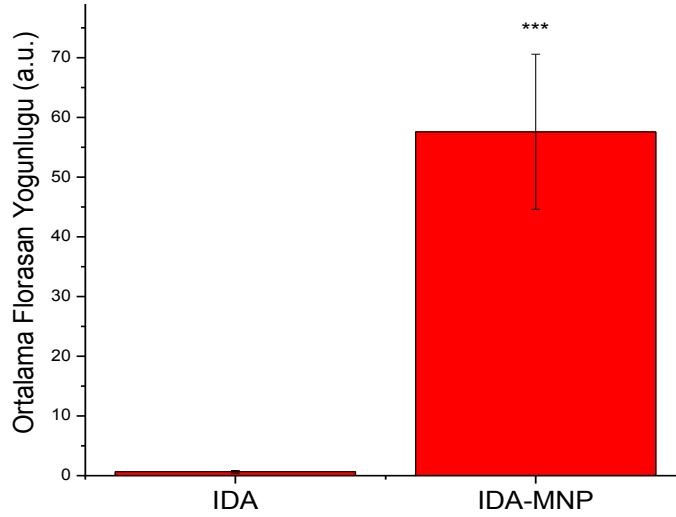
Şekil 3.17 İdarubisinin MNP'den pH: 5.4 ve pH:7.4'deki salımı

### 3.11 İlaç Yüklü Manyetik Nanoparçacıkların Hücre İçine Alımının Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ile İncelenmesi

Serbest idarubisin ve İDA-MNP ile 4 saat 37°C'de muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri, kontrol grupları ile birlikte Şekil 3.18'de verilmiştir. Kontrol grubu yalnız besiyeri ile 4 saat 37°C'de bekletilmiş MCF-7 hücrelerinden oluşmaktadır. Bu görüntülerden, serbest idarubisinin 4 saatte hücre içine etkin bir şekilde alındığı anlaşılmıştır (Şekil 3.18(b)). İdarubisin yüklenmiş nanoparçacıkların da benzer şekilde, 4 saatte hücre içine etkin bir şekilde alındığı gözlenmiştir (Şekil 3.18(c)). Bu bulgular, idarubisin yüklenmiş nanoparçacıkların, serbest idarubisine benzer şekilde ilaç aktivitesini koruyarak hücre içine alımının gerçekleştiğini göstermektedir.



**Şekil 3.18** İDA ve İDA-MNP uygulanmış MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri  
a) Kontrol grubu: MCF-7 hücreleri (b) Serbest idarubisinin MCF-7 hücrelerine uygulanması c) İDA-MNP'nin MCF-7 hücrelerine uygulanması

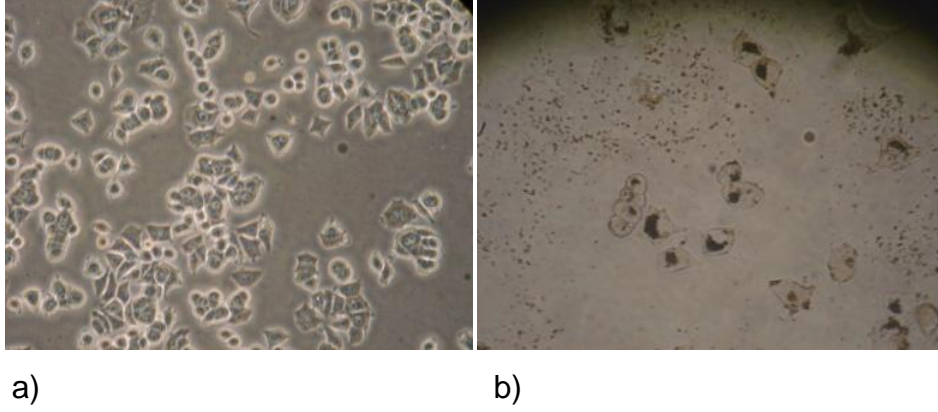


**Şekil 3.19** Serbest idarubisinle veya idarubisin yüklenmiş nanoparçacıklarla 4 saat bekletilmiş MCF-7 hücrelerinin ortalama florasan yoğunluğu

Hücelere uygulanan serbest idarubisin ve nanoparçacıklara bağlı idarubisinin, 4. saat sonrası MCF-7 hücreleri içindeki florasan yoğunlukları karşılaştırılmıştır (Şekil 3.19). Hücre içinde, dört saatte MNP'ye bağlı idarubisinin, serbest idarubisine göre yaklaşık 90 kat daha fazla biriktiği görülmüştür.

### 3.12 Manyetik Nanoparçacıkların Hücre İçine Alımının Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

Folik asit bağlı nanoparçacıkların (FA-PEG-MNP<sub>2</sub>) hücre içine alımını incelemek amacı ile ışık mikroskobu kullanılmıştır.

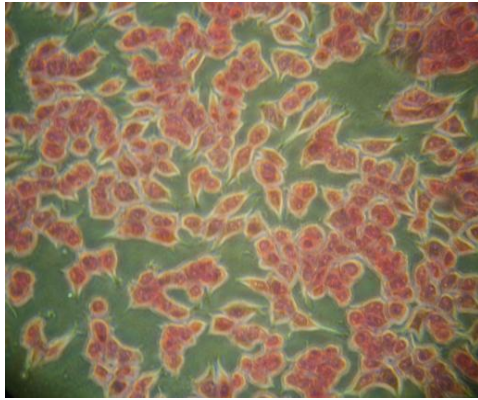


**Şekil 3.20** Işık mikroskop görüntüleri (a) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmamış hücreler (Hücre Kontrolü), (b) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış hücreler

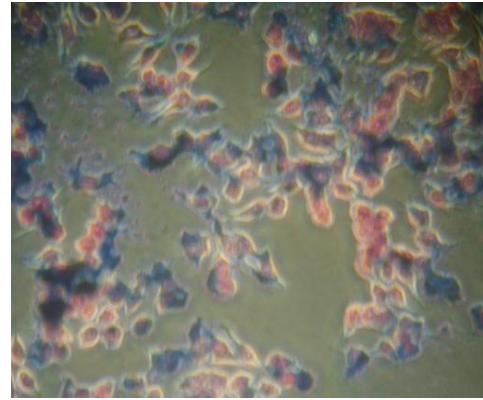
FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmamış MCF-7 hücrelerine ait ışık mikroskobu görüntüsü Şekil 3.20(a)'da verilmektedir. Şekil 3.20(b)'de, FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulandıktan sonra PBS ile yıkanan MCF-7 hücrelerine ait ışık mikroskobu görüntülerinde, hücrelerin nanoparçacıkları hücre içine aldığı ve nanoparçacıkların çekirdek zarı etrafında toplandığı fakat çekirdeğin içine giremediği görülmüştür. Elde edilen görüntüler literatür ile uyum içerisindedir (FAN, 2007, KAI, 2011).

FA-PEG-MNP<sub>2</sub> nanoparçacıklarının hücre içine alımını incelemek amacı ile demir boyama yöntemi de kullanılmıştır. Bu işlem için, MCF-7 hücrelerine nanoparçacıklar eklendikten 8 saat sonra demir boyama işlemi yapılmış ve hücreler ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Boyama işlemi sonunda hücre sitoplazmasının açık pembe, hücre çekirdeğinin koyu pembe ve demir moleküllerinin mavi renkte olması beklenmektedir (Bölüm 2.5.3). Elde edilen sonuçlardan, nanoparçacık uygulanmamış kontrol hücrelerinin görüntüleri Şekil 3.21(a)'da verilmiştir.

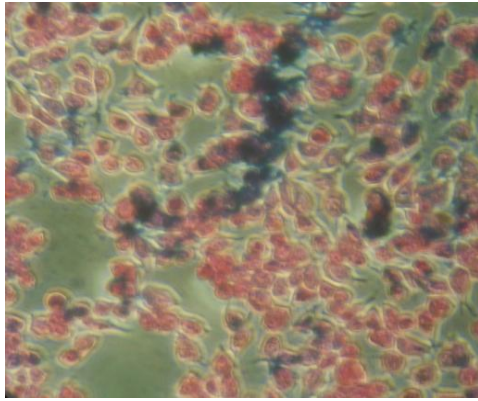
Beklendiği gibi, hücreler demirin varlığını gösteren mavi renge sahip değildirler. FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış ancak manyetik alana maruz bırakılmamış hücrelerde nanoparçacıklardaki demirin varlığından kaynaklanan mavi renk görülmektedir. (Şekil 3.21(b)). Dışarıdan uygulanan manyetik alanın, FA-PEG-MNP<sub>2</sub> ile bekletilmiş hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, hücre kültür kabının sağ alt bölümüne güçlü bir mıknatıs (Nd-Fe-B) yerleştirilmiştir.



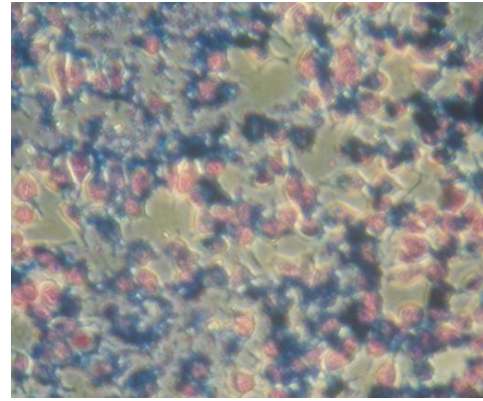
a)



b)



c)



d)

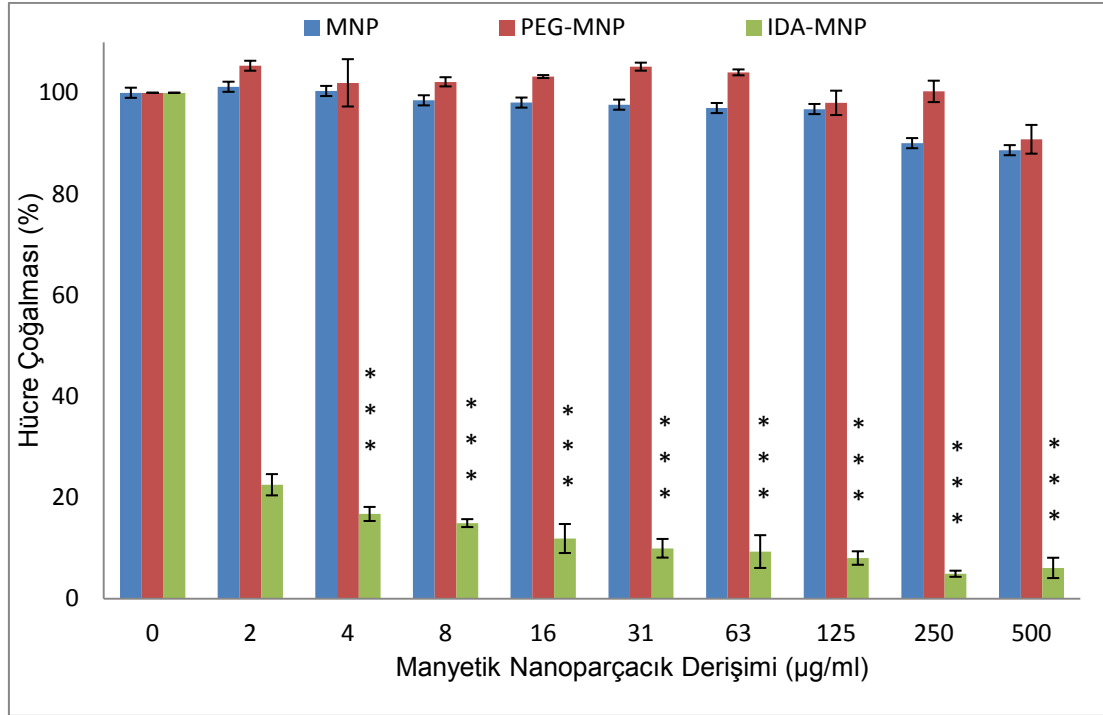
**Şekil 3.21** FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış MCF-7 hücrelerinin demir boyama işlemi sonrası ışık mikroskop görüntüleri a) Kontrol grubu: FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmamış MCF-7 hücreleri, b) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış, manyetik alana maruz bırakılmamış MCF-7 hücreleri, c) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış, manyetik alana maruz bırakılmış, mıknatıstan uzak MCF-7 hücreleri, d) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış, manyetik alana maruz bırakılmış, mıknatısa yakın MCF-7 hücreleri

Bu kültür kabı içinde bulunan, manyetik alana yakın ve uzak noktadaki hücreler mikroskop ile incelenmiş, elde edilen görüntüler sırasıyla Şekil 3.21(c) ve (d)'de verilmiştir. Manyetik alana yakın hücrelerin görüntülerinde, uzaktaki hücrelere göre daha yoğun mavi renk görülmüştür. Bunun nedeni nanoparçacıkların manyetik alana yönelmesi ve buradaki hücreler içinde daha yüksek düzeyde birikmesidir. Elde edilen nanoparçacıkların *in vitro* koşullarda dışarıdan uygulanan manyetik alan ile istenilen bölgeye yönlendirilebildikleri anlaşılmaktadır. Bu bulgu ileride yapılacak olan *in vivo* ilaç hedefleme çalışmalarına yol gösterici nitelik taşımaktadır.

### **3.13 Nanoparçacıkların MCF-7 Hücre Hattına Uygulanması**

MNP, PEG-MNP ve İDA-MNP örneklerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir (Şekil 3.22). Nanoparçacıklar 2-500 µg/ml derişim aralığında hücrelere uygulanmıştır. Çıplak MNP ve PEG kaplı nanoparçacıkların 500 µg/ml derişimine kadar önemli sitotoksik etkilerine rastlanmamıştır. Bu arzu edilen bir özelliktir. İdarubisin yüklü nanoparçacıkların ise ilaç yüklenmemiş nanoparçacıklara göre 2-500 µg/ml aralığında derişime bağlı artış gösteren önemli toksik etkiye sahip oldukları görülmüştür.



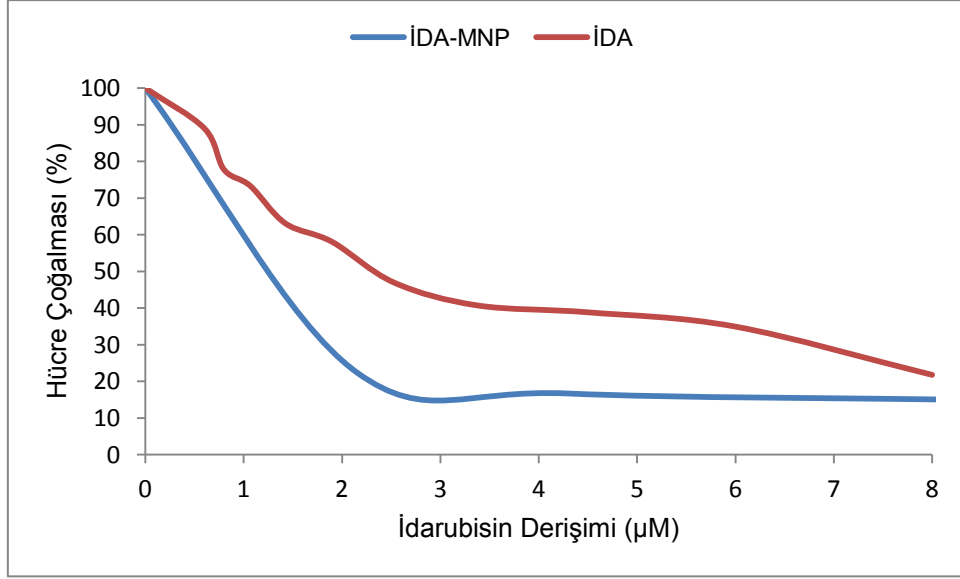


**Şekil 3.22** MNP, PEG-MNP ve İDA-MNP'lerin MCF-7 hücrelerinin çoğalmasına etkisi (72 saatlik uygulama ) ( $p < 0.05$ )

Nanoparçacıklar ile hücelere taşınan idarubisinin ve serbest idarubisinin hüceler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir (Şekil 3.23). Ortamdaki hücelerin yarısını öldüren idarubisinin derişim ( $IC_{50}$ ) değerleri hesaplanmıştır. Nanoparçacıklara bağlanan idarubisin düzeyi dikkate alınarak İDA-MNP için  $IC_{50}$  değeri hesaplanmıştır.  $IC_{50}$  değerleri, İDA-MNP ve serbest İDA için sırası ile 1,25  $\mu M$  ve 2,48  $\mu M$ 'dir. Bu bulgu nanoparçacıklara bağlanmış idarubisinin, serbest idarubisine oranla yaklaşık 2 kat daha fazla toksik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi, İDA-MNP'lerin daha aktif olarak hücre içine alınmaları olabilir. Nanoparçacıklara tutturulmuş folik asit, hüceler üzerindeki folik asit reseptörüne bağlanarak, nanoparçacıkların hücre içine aktif olarak endositoz yoluyla alınmasını arttırmış olabilir. Ayrıca, hücelerin zarında bulunan bazı pompa proteinlerinin (P-gp, BCRP, MRP-1 vb.) sitotoksik ilaçları hücre dışına attıkları bilinmektedir (COLEY, 2008). Bu pompaların nanoparçacıklara bağlı ilacı tanıyamadığı ve hücre dışına atmadığı düşünülebilir (VAULTIER, 2003).

Daha önce yapılmış bir çalışmada nanoparçacıkların ilaç dirençliliğini önemli ölçüde yenebildiği belirtilmiştir (RATMAN, 2003).

Sonuç olarak İDA-MNP'lerin, idarubisinin hücre içine girişini ve kanserli hücrelerin ölümünü etkin bir şekilde arttırdıkları görülmüştür.



**Şekil 3.23** İdarubisin derişimine göre MCF-7 hücrelerinin çoğalma grafiği (İDA-MNP ve idarubisin uygulama süresi 72 saattir)

## 4. SONUÇ

Kemoterapinin neden olduğu yan etkilerin giderilmesine yönelik ilaç hedeflenmesi ve kontrollü ilaç salımı araştırmalarında etkili taşıyıcıların çeşitliliği ve verimi önemlidir. Özellikle ilaç hedeflemesinde etkili manyetik nanoparçacıkların kullanılmasıyla bu tür araştırmalarda aşama kaydedilmiştir.

Çalışmamızda tasarlanan manyetik nanoparçacıkların ilaç hedeflenmesi ve salımında kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, manyetik ( $Fe_3O_4$ ) nanoparçacıklar birlikte çöktürme yöntemi ile farklı sıcaklıklarda sentezlenmiş, en saf kristal yapıya sahip parçacıklar  $90^\circ C$  derecede elde edilmiştir. Çıplak parçacıklarda kümeleşme eğilimi görülmüş ve sentez sırasında ortama oleik asit eklenerek bu eğilim büyük ölçüde engellenmiştir. Hazırlanan oleik asit kaplı nanoparçacıklar PEG ve folik asit ile kaplanmışlardır. Daha sonra nanoparçacılara lipofilik bir anti-kanser ilaç olan idarubisin yüklenmiştir. Elde edilen nanoparçacıkların özellikleri XRD, DLS, SAXS, TEM/SEM, FTIR, TGA ve VSM analizleri ile belirlenmiştir. Nanoparçacıklar  $Fe_3O_4$  (manyetit) kristalinin karakteristik kübik yapısını göstermektedirler. Boyutları 10 ile 40 nm arasında değişmekte olup, biyomedikal uygulamalarda aranan nanoparçacık boyutuna ( $\leq 100nm$ ) sahiptirler (BRANNON-PEPPAS, 2004). Nanoparçacıkların idarubisini etkili olarak tutuklayabildiği ve kontrollü olarak salımını yapabildiği gösterilmiştir. En fazla ilaç tutuklanmasının  $250\mu M$  idarubisin derişimi için  $\%36,1 \pm 3,4$  olduğu bulunmuş ve pH 7,0'de 72 saat içinde toplam ilacın yaklaşık  $\%90$ 'ının salındığı belirlenmiştir. İdarubisin yüklenmiş manyetik nanoparçacıkların (İDA-MNP) MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Serbest idarubisine göre, İDA-MNP'ler hücreler üzerinde daha toksik etki göstermiştir. Bu nedenle idarubisin yüklü nanoparçacıkların kanser hücreleri üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir. Işık mikroskop görüntülerinden, nanoparçacıkların hücre içine alındığı görülmüştür. Lazer taramalı konfokal mikroskop görüntülerinde ise nanoparçacıklara bağlı idarubisinin serbest idarubisine göre daha fazla hücre içine alındığı gözlemlenmiştir. Nanoparçacıkların *in vitro* koşullarda MCF-7 hücrelerinde dışarıdan uygulanan manyetik alan ile yönlendirilebildiği gösterilmiştir.

Elde edilen nanoparçacıklar sahip oldukları biyolojik ve manyetik özellikler sayesinde tümör bölgesine hedeflenebilme niteliğini taşımaktadırlar. Nanoparçacıkların manyetik alanda istenilen tümör bölgesine yönlendirilebilmelerinin yanısıra, folik asit ile kaplanmış olmaları hücre zarlarında folik asit reseptörü taşıyan birçok kanser hücresine yönlendirilebilmelerini ve etkin bir şekilde hücre içine alınmalarını sağlayabilir. Nanoparçacıkların hedefleme özellikleri *in vitro* ve *in vivo* sistemlerde daha detaylı olarak incelenmelidir. Bu projenin devamı niteliğinde, nanoparçacıkların kanser hücrelerini seçici olarak hedeflediklerini belirlemek amacıyla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar planlanmaktadır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere istenilen şekil ve boyutta, kimyasal ve manyetik özelliklere, ve sitotoksik etkiye sahip idarubisin yüklü nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Nanoparçacıkların ilaç salımı incelenmiş, hücre içine alınabilirliği ve manyetik alan içinde yönlendirilebilirliği gösterilmiştir. İlaç yüklü nanoparçacıkların serbest ilaca göre MCF-7 meme kanseri hücrelerinde daha yüksek sitotoksisiteye sahip oldukları belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımına katkıda bulunacaktır. Ancak, nanoparçacıkların canlı organizmaya verildiğinde izledikleri yol, hangi organlarda biriktikleri, vücuttan nasıl atıldıkları, biyoyumlulukları ve sistemik toksisiteleri *in vivo* çalışmalar ile belirlenmelidir.

## 5. REFERANSLAR

ARBAB A.S., Bashaw L.A., Miller B.R., Jordan E.K., Lewis B.K., Kalish H., Frank J.A., Characterization of Biophysical and Metabolic Properties of Cells Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Transfection Agent for Cellular MR Imaging, *Radiology*, 229 (3), 838–46, (2003).

ARRUEBO M., Fernandez-Pacheco R., Ibarra MR., Santamaria J., Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery, *Nanotoday*, 2(3), 22-32, (2007).

BANERJEE, S.K., Moskowitz B.M., *Ferrimagnetic Properties of Magnetite, Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Magnetism*, ed: Kirschvink, J.L. et. al., Plenum Publishing Corporation, (1985). Pp. 17-41.

BEAN J.P., Jacops I.S., Magnetic Granulometry and Super-paramagnetism., *Journal of Applied Physics*, 27, 1448, (1956).

BERGER P., Adelman N.B., Beckman K.J., Ellis A.B., Lisensky G.C., Preparation and Properties of An Aqueous Ferrofluid, *J Chem Ed*, 76, 943-948, (1999).

BERRY C.C., Curtis A.S.G., Functionalisation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine., *J Phys D: Appl Phys*, 36:R, 198–206, (2003).

BERRY CC., Wells S., Charles S., Curtis ASG., Dextran and Albumin Derivatized Iron Oxide Nanoparticles: Influence on Fibroblasts *in vitro*". *Biomaterials*, 24, 4551–7, (2003).

BIOLOGICAL INDUSTRIES. 2002. Cell Proliferation Assay with XTT Reagent Protocol.

<<http://www.bioind.com/HTMLs/article.aspx?C2004=12557&BSP=12410>>. Last accessed date: 2012, January 3.

BOURGEAT-LAMI E., Lang J., Encapsulation of Inorganic Particles by Dispersion Polymerization in Polar Media: 1. Silica Nanoparticles Encapsulated by Polystyrene, *J Colloid Interf Sci*, 197, 293-308,(1998).

BRANNON-PEPPAS L., Blanchette J. O., Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649–59, (2004).

CARUNTU D., Caruntu G., Chen Y., O'Connor C.J., Goloverda G., Kolesnichenko VL., Synthesis of Variable-Size Nanocrystals of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> with High Surface Reactivity. *Chemistry of Materials*. 16, 5527-5534, (2004).

CHATTERJEE J., Haik Y., Chen C.J., Size Dependent Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles, *J Magn Magn Mater*, 257, 113–8, (2003).

COLEY H.M., Mechanisms and Strategies to Overcome Chemotherapy Resistance in Metastatic Breast Cancer, *Cancer Treatment Reviews*, 34, 378-390, (2008).

CURTIS A.S.G., Wilkinson C., Nanotechniques and Approaches in Biotechnology, *Trends Biotech*, 19, 97–101, (2001).

DENIZOT B., Tanguy G., Hindre F., Rump E., Lejeune J.J., Jallet P., Phosphorylcholine Coating of Iron Oxide Nanoparticles, *J Colloid Interface Sci*, 209, 66-71, (1999).

DOBSON J., Gene Therapy Progress and Prospects: Magnetic Nanoparticle-Based Gene Delivery-Review, *Gene Therapy*, 13, 283–287, (2006).

FAN Q.L., Neoh K.G., Kangb E., Shuteru B., Wang S.C., Solvent-free Atom Transfer Radical Polymerization for the Preparation of Poly(poly(ethyleneglycol) monomethacrylate)-grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Cellular Uptake, *Biomaterials*, 28, 5426–5436, (2007).

GÜÇ, E., *Synthesis and Characterization of Fatty Acid Based Hyperbranched Polymers for Anti-Cancer Drug Delivery*, (Yüksek Lisans Tezi), ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2008).

GUPTA A.K., Curtis A.S.G., Surface Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Interaction Studies with Human Fibroblasts in Culture, *J Mater Sci Mater Med*, 15, 493–6, (2004).

GUPTA A.K., Gupta M., Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, *Biomaterials*, 26, 3995–4021, (2005).

GUPTA A.K., Wells S., Surface Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterisation and Cytotoxicity Studies, *IEEE Trans Nanobiosci*, 3, 66–73, (2004).

HÄFELI U., Schütt W., Teller J., Zborowski M., editors. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Plenum Press, New York, (1997).

HARRIS, L.A., *Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poy(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks*, (Ph.D. Thesis), Virginia Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, (2002).

HOLLINGSHEAD L.M., Faulds D., Idarubicin. A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in the Chemotherapy of Cancer, *Drugs*, 42,4,: 690-719, (1991).

JORDAN A., Scholz R., Maier-Hauff K., Johannsen M., Wust P., Nadobny J., Schirra H., Schmidt H., Deger S., Loening S., Lanksch W., Felix R., Presentation of a New Magnetic Field Therapy System for The Treatment of Human Solid Tumors with Magnetic Fluid Hyperthermia, *J Magn Magn Mater*, 225, 118–26, (2001).

KAI W., Xiaojun X., Ximing P., Zhenqing H., Qiqing Z., Cytotoxic Effects and the Mechanism of Three Types of Magnetic Nanoparticles on Human Hepatoma BEL-7402 cells, *Nanoscale Research*, 6,480 (2011).

KAMINSKIA M.D., Rosengartb A.J., Detoxification of Blood Using Injectable Magnetic Nanospheres: A Conceptual Technology Description, *J Magn Magn Mater*, 293, 398–403, (2005).

KONDO A., Fukuda H., Preparation of Thermo-Sensitive Magnetic Microspheres and Their Application to Bioprocesses, *Colloid Surf A*, 153, 435-438, (1999).

LAN Q., Liu C., Yang F., Liu S., Xu J., Sun D., Synthesis of Bilayer Oleic Acid Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles and Their Application in pH- Responsive Pickering Emulsions, *Journal of Colloidal and Interface Science*, 310, 260-269, (2007).

LIU X., Kaminski M.D., Guan Y., Chen H., Liu H., Rosengart A.J., Preparation and Characterization of Hydrophobic Superparamagnetic Magnetite Gel, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 306, 248-253, (2006).

MOGHIMI S.M., Hunter A.C.H., Murray J.C., Long-Circulating And Target-Specific Nanoparticles: Theory To Practice, *Pharm Rev*, 53, 283–318, (2001).

OKASSA L.N, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Herve K, Cohen-Jonathen S, Munnier E, Souce M, Linassier C, Dubois P, Chourpa I., Optimization of Iron Oxide Nanoparticles Encapsulation within Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Sub-micron Particles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67 (1), 31-38, (2007).

ORIVE G., Hernández R.M., Gascón A.R ., Pedraz J.L., Micro and Nano Drug Delivery Systems in Cancer Therapy, *Cancer Therapy*, 3, 131-138, (2005).

PANKHURST Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J., Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine, *J Phys D: Appl Phys*, 36, 167–81, (2003).

PANYAM J., Labhasetwar V., Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue, *Adv Drug Del Rev*, 55, 329–47, (2003).

PRATSINIS S.E., Vemury S., Particle Formation in Gases—A Review, *Powder Technol*, 88, 267, (1996).

RATMAN M., Hao H., Zheng H, Wang H., Qi H., Lee R., Pan X., Receptor Induction and Targeted Drug Delivery: A New Antileukemia Strategy, *Expert Opin. Biol Ther*, 3,4, 563-574, (2003).

REIMER P., Weissleder R., Development and Experimental Application of Receptor-Specific MR Contrast Media, *Radiology*, 36, 153–63, (1996 ).



SANTOS N.D., Waterhouse D., Masin D., Tardi PG., Karlsson G., Edwards K., Bally MB., Substantial Increases in Idarubicin Plasma Concentration by Liposome Encapsulation Mediates Improved Antitumor Activity, *Journal of Controlled Release*, 105, 89–105, (2005).

SHAN G.B., Xing J.M., Luo M.F., Liu H.Z., Chen J.Y., Immobilization of *Pseudomonas Delafieldii* With Magnetic Polyvinyl Alcohol Beads and Its Application in Biodesulfurization, *Biotechnol Lett*, 25, 1977–81, (2003).

SHUBAYEV V.I., Pisanic T.R., Jin S., Magnetic Nanoparticles for Theragnostics, *Adv Drug Deliver Rev*, 61, 467–477, (2009).

SPALDIN N.A., *Magnetic Materials Fundamentals and Applications*, Cambridge; New York: Cambridge University Press, (2011).

SUN J., Shaobing Z., Hou P., Yang Y., Weng J., Li X., Li M., Synthesis and Characterization of Biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles, *Journal of Biomedical Materials Research*, 80, 2, 333-341, (2006).

TARTAJ P., Morales M.P., Veintemillas-Verdaguer S., González- Carreño T., Serna C.J., The Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine, *J Phys D: Appl Phys*, 36, 182–97, (2003).

VAULTIER C., Dubernet C., Chauvierre C., Brigger I., Couvreur P., Drug Delivery to Resistant Tumors: The Potential of Poly(alkyl cyanoacrylate) Nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 93, 151-160, (2003).

WILKINSON J.M., Nanotechnology Applications in Medicine, *Med Device Technol.*, 14, 29–31,(2003).

YALLAPU M.M., Foy S.P., Jain T.K., Labhastwar V., PEG-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging Applications, *Pharmaceutical Research*, 27, 2283-2295, (2010).

YAN F., Li J., Zhang J., Liu F., Yang W., Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Polystyrene Composite Particles from Monolayer Oleic Acid Modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles via Miniemulsion Polymerization, *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 289-296,(2009).

YANASE N., Noguchi H., Asakura H., Suzuta T., Preparation of Magnetic Latex Particles by Emulsion Polymerization of Styrene in the Presence of A Ferrofluid, *J Appl Polym Sci*, 50, 765-776, (1993).

ZHANG J., Rana S., Srivastava R.S., Misra R.D.K., On the Chemical Synthesis and Drug Delivery Response of Folate Receptor-Activated, Polyethylene Glycol-Functionalized Magnetite Nanoparticles, *Acta Biomaterialia*, 4, 40-48, (2008).

ZHANG Y., Kohler N., Zhang M., Surface Modification of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles and Their Intracellular Uptake, *Biomaterials*, 23, 1553–61, (2002).

# TÜBİTAK

## PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

<b>Proje No:</b> 109T949
<b>Proje Başlığı:</b> İdarubisin Yüklü Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi ve MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına Uygulanması
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Proje Yürütücüsü – Prof.Dr. Ufuk Gündüz Araştırmacı – Yrd.Doç.Dr. Arzu Yakar Danışman – Prof.Dr. Güngör Gündüz
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Üniversiteler Mah. Dumlupınar Blv. No:1,06800 Çankaya Ankara-TÜRKİYE.
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> TÜBİTAK, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Pr., TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı Tunus Cad. No: 80, 06100 Kavaklıdere-ANKARA.
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 15.04.2010-01.07.2012
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Çalışmamızda öncelikle PEG kaplı manyetik nanoparçacıklar sentezlenmiş ve üzerine folik asit bağlanmıştır. Karakterizasyonları yapıldıktan sonra nanoparçacıklara idarubisin yüklenmiştir. İdarubisinin nanoparçacıklara etkili bir şekilde bağlandığı görülmüş ve ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İdarubisin yüklü nanoparçacıklar serbest idarubisine göre MCF-7 hücreleri üzerinde daha yüksek oranda ölüme yol açmıştır. Nanoparçacıkların manyetik alan yardımıyla istenilen bölgeye hareket ettirebildikleri demir boyama yöntemi ile gösterilmiş ve hücre içine etkili bir şekilde alındıkları konfokal mikroskop çalışmaları ile belirlenmiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Manyetik Nanoparçacık, MCF-7, Kontrollü İlaç Salımı, İlaç Hedefleme, İdarubisin, Meme Kanseri

**Fikri Ürün Bildirim Formu** Sunuldu mu? Evet  Gerekli Değil   
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

**Projeden Yapılan Yayınlar:**

1.YAKAR, A., Tansık, G., Khodadust, R., Keskin, T., Ünsoy, G., Gündüz, U., Synthesis of Magnetic Nanoparticles as a Targeting System for Drug Delivery, Nano TR VI. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, İzmir-Türkiye, (2010) pp: 476.

2. KESKİN, T., Yakar, A, Gündüz, U., Synthesis and in vitro Application of PEGylated Magnetic Nanoparticles for Anti-Cancer Drug Delivery, Nano TR VII. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, İstanbul-Türkiye, (2011) pp: P1.D. 37

3. KESKİN, T., Gündüz, U., Preparation of Folic Acid Conjugated Magnetic Nanaoparticles For Targeting of Cancer Cells, 10. Uluslararası İlaç Bilimleri Sempozyumu, Ankara-Türkiye, (2012) pp: 348

4. TANSIK, G., Yakar, A., Gündüz U., Preparation of PLGA Coated Magnetite Nanoparticles for Anti-Cancer Drug Delivery, Nano TR VII. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, İstanbul-Türkiye, (2011) pp: P1.D. 31

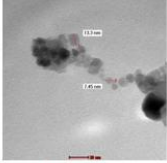
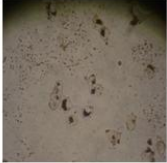
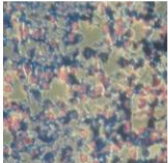
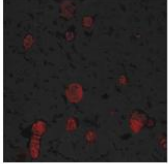

5. "Synthesis of İdarubicin Loaded PEG Coated Magnetic Nanoparticles and Their Application to MCF-7 Breast Cancer Cells" adlı makale uluslararası bir dergide yayımlanmak üzere hazırlanmaktadır.

**Tez :**

KESKİN, T., *Preparation of Polyethylene Glycol Coated Magnetic Nanoparticles for Targeting of Cancer Cells*, (Yüksek Lisans Tezi), ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2012).

**Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.**

## ARDEB BAŞARI ÖYKÜSÜ

İdarubisin Yüklü Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi ve MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına Uygulanması	Prof.Dr.Ufuk Gündüz
	109T949
	172.172,00TL
	15.04.2010-01.07.2012
	Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü
<p>1) TEM görüntüleri</p>  <p>FA-PEG-MNP<sub>2</sub>'ye ait TEM görüntüsü</p> <p>2) Işık mikroskop görüntüleri</p>  <p>a) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü</p>  <p>b) FA-PEG-MNP<sub>2</sub> uygulanmış, manyetik alana maruz bırakılmış, mıknatısa yakın MCF-7 hücreleri hücrelerinin demir boyama işlemi sonrası ışık mikroskop görüntüsü</p> <p>3) Konfokal mikroskop görüntüleri</p>  <p>IDA-MNP uygulanmış MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü</p>	
<b>Projenin Amacı ve Önemi</b> ( <i>En fazla 150 kelime</i> ) (Maddeler halinde sıralayınız)	
<p>A. Sentez ve Karakterizasyon</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi, karakterizasyonlarının (XRD, DLS, SAXS, TEM, FTIR, TGA ve VSM) yapılması,</li></ul>	

- Manyetik nanoparçacıkların yüzeyinin polimerle kaplanması ve oluşan yapının karakterizasyonlarının (SEM/TEM, FTIR, TGA ve VSM) yapılması,

#### B. İlaç Bağlama ve Salım Kinetiği

- İdarubisinin elde edilen nanoparçacıklara bağlanması,
- İdarubisinin nanoparçacıklara bağlanma düzeyinin ve parçacıklardan salımının incelenmesi,

#### C. Nanoparçacıkların Hücreler Üzerindeki Etkinliği

- Nanoparçacıkların, idarubisinin ve idarubisin yüklü manyetik nanoparçacıkların MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi,
- İdarubisinin hücre içine alınımının Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop kullanılarak gösterilmesi,
- *In vitro* koşullarda MCF-7 hücrelerine manyetik alan uygulanarak, nanoparçacıkların hücre kültüründe yönlendirilme çalışmaları.

Bu çalışma, kanser kemoterapisinde gelişmelere katkıda bulunabilecek, tümör bölgesine ilaç hedeflemede etkin ve kontrollü ilaç salımı yapabilen taşıyıcı sistemlerin tasarlanması ve uygulanması açısından önem taşımaktadır.

**Proje ile Elde Edilen veya Beklenen Bilimsel, Teknolojik, Ekonomik ve Sosyal Kazanımlar** (*En fazla 200 kelime*)

Nanoteknolojideki gelişmeler kanser ilaçlarının hücreler üzerinde etkinliğini arttırabilmek ve sağlıklı hücrelere zarar vermelerini engellemek için ilaç hedeflenmesi ve salım çalışmaları için son derece önem taşımaktadır. Manyetik nanoparçacıklar ilaçların istenilen miktarda istenilen bölgeye gönderilmesinde ideal taşıyıcılar olarak rol oynamaktadırlar. Önerilen bu projede anti-kanser ilaç yüklü manyetik nanoparçacıklar hazırlanmış, nanoparçacıklardan ilaç salımı incelenmiş ve sitotoksite analizleri MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde yapılmıştır.

Ayrıca, nanoparçacıkların manyetik alan varlığında istenilen bölgelere yönlendirilmesi *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon analizleri sonucunda, elde edilen nanoparçacıkların boyut, şekil, biyoyumluluk, kimyasal yapı, sitotoksite ve manyetik özellik açısından anti-kanser ilaç hedefleme ve salım uygulamaları için kullanılabilirliği gösterilmiştir. Manyetik nanoparçacıkların optimize edilmiş yöntemlerle sentezlenmeleri, ilaç yüklü nanoparçacıkların *in vitro* koşullarda hücreler üzerinde istenilen bölgeye yönlendirilebilmesi, hücre içine etkili bir şekilde alınması ve sitotoksik özellikleri bu çalışmaya değer katmaktadır. Laboratuvarımızda ilaç yüklü manyetik polimerik nanoyapıların yönlendirilme çalışmaları *in vitro* olarak ilk defa bu projede gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada elde edilen veriler, tasarlanan biyoyumlu manyetik nanoparçacıkların, biyolojik ve manyetik özellikleri sayesinde ilacın istenilen bölgeye yönlendirilmesinde etkili bir anti-kanser ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Çalışmalarımızın sonuçları bilimsel etkinliklerde sunulmuş ve uluslararası bir dergide yayımlanmak üzere makale hazırlanmıştır. Bu çalışma, ileride yapılacak *in vivo* ilaç hedefleme çalışmaları için yol gösterici nitelik taşımaktadır.

**Proje için TÜBİTAK Desteğinin Önemi** *(En fazla 150 kelime)*

Bu proje TÜBİTAK'ın katkıları ile yürütülmüştür. Proje TÜBİTAK'ın TBAG 1001 kodlu programı ile desteklenmiştir. Bu destek, ilaç hedeflemesi ve taşınması alanında yürütülen projemizin tamamlanmasında önemli bir rol oynamıştır. Elde edilen bulguların bilimsel kongrelerde ve toplantılarda başarı ile sunulması, proje kapsamında sağlanan seyahat destekleri ile gerçekleştirilmiştir. Proje bütçesinden karşılanan seyahat destekleri ile bursiyer öğrenciler, kongrelerde sunumlar gerçekleştirmişlerdir. Bu projeden burs alan lisansüstü ve doktora öğrencileri projeden aldıkları burs ile öğrenimlerini başarı ile sürdürmüşlerdir. Tüm bu katkılar nedeniyle TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

**1. Proje yürütücüsü iletişim bilgileri:**

Adı – Soyadı : Ufuk Gündüz

Unvanı : Prof.Dr.

Telefon : +90 312 210 51 83

E-posta adresi : ufukg@metu.edu.tr