MRI KONTRAST ARTTIRICI AJAN OLARAK MAGNETOZOM VE HSA KAPLI DEMİROKSİT NANOPARTİKÜLLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF MAGNETOSOME AND HSA COATED IRON OXIDE NANOPARTICLES AS MRI CONTRAST ENHANCING AGENT

EBRU ERDAL

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin

Nanoteknoloji-Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA tezi olarak hazırlanmıştır.

2015

EBRU ERDAL'ın hazırladığı "**MRI Kontrast Arttırıcı Ajan Olarak Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Karşılaştırılması**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Necdet SAĞLAM .....
Başkan

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ .....
Üye (Danışman)

Doç. Dr. Şeyda ÇOLAK .....
Üye

Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM .....
Üye

Yrd. Doç. Dr. Berrak GÜMÜŞKAYA ÖCAL .....
Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ANNEME

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

06/02/2015

EBRU ERDAL

ÖZET

MRI KONTRAST ARTTIRICI AJAN OLARAK MAGNETOZOM VE HSA KAPLI DEMİROKSİT NANOPARTİKÜLLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

EBRU ERDAL
Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ
Şubat 2015, 76 Sayfa

Son zamanlarda tıp ve medikal alanda kullanılan malzemelerdeki dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla nanoteknolojik yaklaşımlara yönelinmiştir. Nanopartiküller organik yada inorganik malzemelerden kimyasal yöntemler ile hazırlanabileceği gibi in vivo partikül sentezleyen bakteri gibi organizmalardan ya da bitkilerden biyolojik olarak da izole edilebilir. Manyetik nanopartiküller, hücre izolasyonu, kontrollü ilaç salımı, hipertermi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi çok sayıda kullanım alanlarına sahiptirler. Bundan dolayı, sunulan tez kapsamında, kanser teşhisinde kullanılmak üzere kimyasal ve biyolojik olarak iki farklı yöntem ile nanopartiküller hazırlanmış, karakterize edilmiş ve teşhis etkinliği bakımından birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

Tez kapsamında; kimyasal ve biyolojik olarak elde edilen demiroksit nanopartiküllerin MR kontrast arttırıcı ajan olarak kullanımının etkinliği belirlenmiştir. Partiküllerden biri *Magnetospirillum gryphiswaldense* bakterisinden izole edilirken (Magnetosom) diğeri ikili çöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır. Biyouyumluluklarının arttırılması amacıyla yüzeyi insan serum albümin proteini ile kaplanmıştır. Çalışmanın bundan sonraki basamaklarında, partiküllerin morfolojik

özellikleri Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM), fizikokimyasal özellikleri Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR) ve manyetik özellikleri Elektron Spin Rezonans (ESR) ile belirlenmiştir. Meme kanserinin manyetik rezonans görüntülenmesinde kontrast madde olarak kullanılan nanopartiküllerin karşılaştırılması için in vitro ve in vivo deneylerde kullanılmak üzere MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı model olarak seçilmiştir. Kanser teşhis ve tedavisi çalışmalarında kanser hücreleri ve sağlıklı hücreler arasındaki farklılıklardan yararlanılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinin yüzeyinde EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) sağlıklı hücrelere kıyasla çok daha yüksek oranda (yaklaşık %90) ifade edilmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, partiküllerin yüzeyi MDA-MB-231 hücrelerine aktif hedeflenmesi için Anti-EGFR ile modifiye edilmiştir. İn vitro sitotoksisite çalışmaları için MTT testi yapılmıştır. Daha sonra, partiküllerin meme kanseri dokusuna in vivo aktif hedeflenmesinin belirlenmesi amacıyla Balb/c nude farelerde meme kanseri dokusu oluşturularak MR görüntüleri alınmıştır.

Anahtar Sözcükler: Manyetik Rezonans Görüntüleme, Magnetozom, Magnetospirillum gryphiswaldense, Demir oksit nanopartikül, İnsan Serum Albümin (HSA), Meme Kanseri, MDA-MB-231, Anti-EGFR

ABSTRACT

COMPARISON OF MAGNETOSOME AND HSA COATED IRON OXIDE NANOPARTICLES AS MRI CONTRAST ENHANCING AGENT

EBRU ERDAL
PhD, Department of Nanotechnology and Nanomedicine
Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAS
February 2015, 76 pages

Recently to eliminate the disadvantages of materials used in medicine and biomedical field, nanotechnological approaches were headed to. Nanoparticles can be prepared from organic or inorganic materials with chemical method as well as isolated from organisms such as bacteria or plant which express the particles in vivo. Magnetic nanoparticles have many usage area such as cell isolation, controlled drug delivery, hyperthermia, magnetic resonance imaging (MRI). Therefore, the aim of the study was to prepare the nanoparticles by two different methods as chemical and biological to be used in cancer diagnosis and to compare the nanoparticles with each other in terms of diagnostic efficacy.

In the presented thesis, the efficiency of iron oxide nanoparticles, which were prepared by two different methods and used as MRI contrast enhancing agents, were identified. While one of the iron oxide nanoparticle was isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense* bacteria (called as magnetosome), the other one was prepared by double precipitation method and to enhance the

biocompatibility of the nanoparticles, its surface was coated with human serum albumin protein. In the next step of the study, the morphological characteristics of the nanoparticles were determined by using the Scanning Transmission Electron Microscope (STEM), physicochemical properties by using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and the magnetic properties were determined by using of Electron Spin Resonance (ESR). In order to compare the magnetosome and iron oxide nanoparticle which were used as magnetic resonance contrast agents for imaging breast cancer, MDA-MB-231cell line were chosen as model for in vitro and vivo studies. In the study of cancer diagnosis and therapy, the difference between healthy and cancerous cells were exploited. The expression of EGFR (epidermal growth factor receptor) on the surface of the MDA-MB-231 cells is higher (about 90%) than the healthy cells.

In the studies conducted within the scope of the thesis, the surface of the nanoparticles were modified with the anti-EGFR for active targeting to the MDA-MB-231 cells. MTT test was carried out for in vitro cytotoxicity studies. In order to determine the in vivo active targeting of the nanoparticles to breast cancer tissue, Balb/c nude mouse model was produced with introducing the breast cancer cells and their MR images were taken.

Keywords: Magnetic Resonance Imaging, Magnetosome, *Magnetospirillum gryphiswaldense*, Iron oxide nanoparticles, Human Serum Albumin (HSA), Breast Cancer, MDA-MB-231 breast cancer cell line, Anti-EGFR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ i
ABSTRACT iii
İÇİNDEKİLER İNDEKSİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİ 2
2.1. Meme Kanseri 2
2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi 2
2.1.2. Meme Kanserinin Anatomisi 4
2.1.3. Meme Kanserinin Belirtileri 5
2.2. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri 5
2.2.1. Meme Muayenesi 6
2.2.1.1. Kendi Kendine Meme Muayene (KKMM) 6
2.2.1.2. Klinik Meme Muayenesi (KMM) 7
2.2.2. Biyopsi (Doku Örneklemesi) 7
2.2.2.1. İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi (İİAB) 7
2.2.2.2. Kor (Kalın) İğne Biyopsisi. 8
2.2.2.3. Cerrahi Ensizyonel ve Eksizyonel Biyopsi 8
2.2.3. Görüntüleme Yöntemleri 8
2.2.3.1. Mamografi. 8
2.2.3.2. Ultrasonografi 9
2.2.3.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) 10
2.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ile Memenin Görüntülenmesi 11
2.4. MRG'de Kullanılan Kontrast Maddeler 11
2.4.1. Kontrast Maddelerin Kullanıldığı Sekanslara (Puls Parametreleri) Göre 11
2.4.2. Kontrast Maddelerin Etki Ettiği Dokulara Göre (Biyodağılım) 12
2.4.2.1. Non-spesifik (Ekstraselüler) Kontrast Maddeler 12
2.4.2.2. RES'e Yönelik Kontrast Maddeler 12

2.4.2.3. Kan Havuzu Kontrast Maddeleri 13
2.4.2.4. Hepatobiliyer Sisteme Yönelik Kontrast Maddeler 13
2.4.2.5. Oral Kontrast Maddeler 14
2.4.2.6. Tümör – spesifik Kontrast Maddeler 14
2.5. Nanoteknoloji 15
2.5.1. Nanopartiküller 15
2.5.1.1. Manyetik Nanopartiküller 16
2.5.2. Manyetik Nanopartiküllerin Kaplanmasında Kullanılan Polimerler 16
2.5.2.1. İnsan Serum Albumin (HSA) 17
2.6. Magnetotaktik Bakteriler ve Magnetozom 18
2.7. Nanopartiküllerin Doku/Organ Hedeflendirilmesi-Partikül Ligand Etkileşimleri 19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 20
3.1. Kimyasallar 20
3.2. Magnetotaktik Bakterilerin (*Magnetospirillum gryphiswaldense*) kültürü 21
3.3. Magnetotaktik Bakterilerden Magnetozomların İzolasyonu 23
3.4. Demiroksit Nanopartiküllerin Hazırlanması 23
3.5. İnsan Serum Albümin (HSA) Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Hazırlanması 24
3.6. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 24
3.6.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi 24
3.6.2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi 25
3.6.3. Manyetik Özelliklerinin Belirlenmesi 25
3.6.4. Nanopartiküllerin in Vitro MR Görüntülenmesi 26
3.7. Magnetozom ve Human Serum Albümin (HSA) Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Anti-EGFR ile Modifikasyonu 26
3.8. Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri 26
3.8.1. Hücrelerin hazırlanması 26
3.8.2. Sitotoksisite Testleri (MTT) 27
3.8.3. Akım Sitometrisi ile Hücresel Alım Çalışmaları 28
3.8.4. Stokastik Optik Rekonstrüksiyon Konfokal Mikroskobu (N-STORM) ile Nanopartikül-Hücre Etkileşiminin Görüntülenmesi 29
3.9. Manyetik Nanopartiküllerin İn Vivo Değerlendirilmesi 29
3.9.1. Deney Hayvanları ve Deney Ortamı 29

3.9.2. Hücre Kültürü ve Tümör Hücrelerinin Farelere İmplantasyonu.....30
3.9.3. Deney Grupları 31
3.9.4. Farelerde Oluşan Meme Tümör Dokusunun MR ile Görüntülenmesi.....31
3.9.5. Histolojik İnceleme.....32
4. DENEYSEL BULGULAR 33
4.1. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları.....33
4.1.1. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu 33
4.1.1.1. Magnetozomların Boyut Dağılımı ve Morfolojik Özellikleri.....33
4.1.1.2. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Boyut Dağılımı ve Morfolojik Özellikleri.....36
4.1.2. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Karakterizasyon (FTIR Analizi) Çalışmalar 39
4.1.2.1. Magnetozomların FTIR Analizi 39
4.1.2.2. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin FTIR Analizi.....40
4.3. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Manyetik Özelliklerinin (ESR Analizi) Karakterizasyonu 41
4.4. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Anti-EGFR ile Modifikasyonu.....45
4.5. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Hücre Etkileşimleri.....45
4.5.1. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Sitotoksisite Çalışmaları 45
4.5.2. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Akım Sitometrisi Çalışmaları.....47
4.5.3. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Konfokal Mikroskopu Çalışmaları 49
4.6. Manyetik Nanopartiküllerin İn Vivo Değerlendirilmesi.....53
4.6.1. Nanopartikül Enjekte Edilen Farelerin MR Görüntülerinin Alınması 56
4.6.2. Histopatolojik İnceleme.....58
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....65
6. KAYNAKLAR 67
ÖZGEÇMİŞ.....75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları 2
Şekil 2.2. Meme Kanserinin Yaşa Özel Hızlarının Dağılımı..... 3
Şekil 2.3. Meme Kanseri Evrelerinin Yüzde Dağılımları 3
Şekil 3.1. MDA-MB-231 hücreleri farelerin sağ alt meme bezine enjekte edilmiştir. Enjeksiyon öncesi (sol) ve enjeksiyon sonrası (sağ).… 30
Şekil 4.1.A. Magnetozomların STEM Görüntüleri 34
Şekil 4.1.B. Magnetozomların STEM Görüntüleri 35
Şekil 4.2. HSA Nanopartiküllerin STEM Görüntüleri..... 37
Şekil 4.3. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin STEM Görüntüleri..... 38
Şekil 4.4. Magnetozomların FTIR spektrumları 39
Şekil 4.5. Fe_3O_4 ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin FTIR spektrumları 40
Şekil 4.6.A. Ticari Fe_3O_4'den elde edilen ESR Spektrumu 41
Şekil 4.6.B. İkili Çöktürme Yöntemi İle Sentezlenmiş Fe_3O_4'den elde edilen ESR Spektrumu 42
Şekil 4.6.C. Magnetozom'dan elde edilen ESR Spektrumu..... 42
Şekil 4.6.D. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerde elde edilen ESR Spektrumu 43
Şekil 4.6.E. HSA polimerinden elde edilen ESR Spektrumu.. 43
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri 46
Şekil 4.8.A. Farklı konsantrasyonlarda Anti-EGFR ile modifiye HSA kaplı demiroksit nanopartikül ve magnetozomların MDA-MB-231 hücrelerine tutunma yüzdeleri 48
Şekil 4.8.B. Farklı konsantrasyonlarda Anti-EGFR ile modifiye magnetozomların MDA-MB-231 Hücrelerine tutunma miktarı 49
Şekil 4.9.A. 10μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü..... 50
Şekil 4.9.B. 100μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile inkübe edilmiş

MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü..... 51
Şekil 4.10. Magnetozom ile inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü 52
Şekil 4.11. Nude farelerdeki tümör çapının kumpass yardımıyla ölçülmesi 53
Şekil 4.12. Fareden Alınan Tümör Dokusu Kesitleri (10X, 20X, 40X) 55
Şekil 4.13. Farelerin MR görüntülenmesi..... 56
Şekil 4.14.A .Hayvanların tümörlerinden alınan T2 ağırlıklı görüntüler..... 57
Şekil 4.14.B. Hayvanların tümörlerinden alınan T1 ağırlıklı görüntüler..... 58
Şekil 4.15.A. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin tümör dokusu 59
Şekil 4.15.B.HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin karaciğer dokusu. ... 59
Şekil 4.15.C. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin dalak dokusu 59
Şekil 4.15.D. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin böbrek dokusu..... 59
Şekil 4.15.E. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin kalp dokusu 60
Şekil 4.15.F. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin akciğer dokusu.. 60
Şekil 4.16.A. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin karaciğer dokusu..61
Şekil 4.16.B. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin dalak dokusu..... 61
Şekil 4.16.C.Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin böbrek dokusu.. ... 62
Şekil 4.16.D. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin kalp dokusu 62
Şekil 4.16.E. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin akciğer dokusu 63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. *M. gryphiswaldense* için zenginleştirilmiş besiyeri..... 22
Çizelge 3.2. *M. gryphiswaldense* için İz Element Çözeltisi……22
Çizelge 3.3. *M. gryphiswaldense* için Vitamin Çözeltisi. 23
Çizelge 3.4. ESR spektrometre koşulları … 25
Çizelge 3.5. MDA-MB-231 hücrelerinin hücre kültürü koşulları 26
Çizelge 4.1. Magnetozomların FTIR karakteristik pikleri. 39
Çizelge 4.2. Fe_3O_4 ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin FTIR karakteristik pikleri 41
Çizelge 4.3. Partiküllerin spektroskopik yarılma faktörü (g-faktörü) ve pik-tepe genişliği (ΔHpp)..... 44
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri..... 45
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Anti-EGFR ile modifiye HSA kaplı demiroksit nanopartikül ve magnetozomların MDA-MB-231 hücrelerine tutunma yüzdeleri 47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
HSA	İnsan Serum Albümin
STEM	Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
ESR	Elektron Spin Rezonans
g	Spektroskopik yarılma çarpanı
Hr	Rezonans Alanı
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
NHS	N-Hydroxysuccinimide
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PBS	Fosfat Tampon Tuzu
N-STORM	Stokastik Optik Rekonstrüksiyon Konfokal Mikroskobu
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoluim bromide

1.GİRİŞ

Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri, birçok ülkede kadınların kanserden ölümlerinin (%17–18) başlıca nedenidir. Kadınların meme kanserine yakalanma oranı her geçen yıl tahmin edilenden daha fazla artmaktadır. Meme kanseri tedavisinin etkinliği ve başarısındaki en önemli sebeplerden biri erken teşhisdir. Bunun için pek çok yöntem (elle muayene, klinik muayene, mamografi, ultrason) mevcut olmakla birlikte 1990'lı yılların başından itibaren manyetik rezonans görüntüleme (MRG) tekniği de kullanılmaktadır. Meme dokusunun görüntülenmesi hastalığın tanısında, taranmasında, tedavi öncesi değerlendirilmesinde, tedavi sürecinde ve tedavi sonrasındaki izlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. MRG meme dokusunun görüntülenmesi ve tümör varlığının teşhisindeki avantajlarından dolayı son zamanlarda daha çok tercih edilmektedir. MRG'de kontrast madde kullanımı görüntü kalitesini arttırarak daha detaylı anatomik görüntü elde edilmesini sağlamaktadır. Son zamanlarda MRG kullanılan kontrast maddelerin gelişiminde nanoteknolojik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle süperparamanyetik özelliğe sahip demiroksit nanopartiküllerin kullanımı ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmaktadır.

Tez kapsamında; *Magnetospirillum gryphiswaldense* bakterisinden izole edilen magnetozom ve insan serum albümin (HSA) kaplanmış manyetik partiküllerin, MR kontrast arttırıcı ajan olarak kullanımının etkinliği karşılaştırılmıştır. Partiküllerin morfolojik özellikleri taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM), fizikokimyasal özellikleri FTIR ve manyetik özellikleri ESR ile belirlenmiştir. Anti-EGFR ile modifiye edilen partiküllerin, in vitro sitotoksisitelerinin belirlenmesi amacıyla MTT testi yapılmıştır. Nude farelerde oluşturulan meme kanserinin MRG'sinde kullanılarak kontrast arttırıcı ajan olarak kullanımları değerlendirilmiştir. Histopatolojik inceleme ile partiküllerin vücuttaki dağılımı belirlenmiştir.

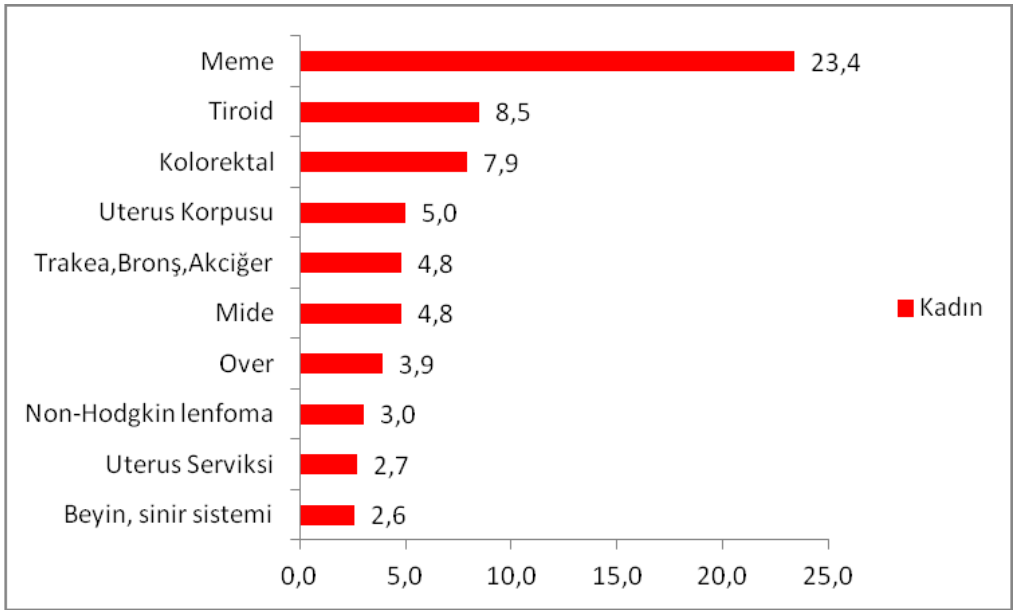
2. GENEL BİLGİ

2.1. Meme Kanseri

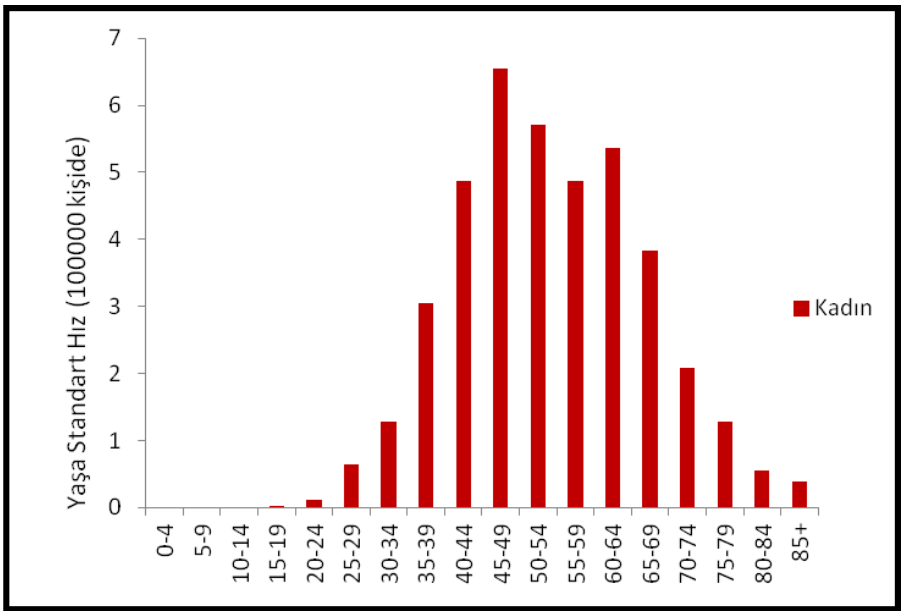
2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Pek çok kanser türü mevcut olmakla birlikte, meme kanseri hem Türkiye'de hem de tüm dünyada kadınlarda en sık görülen ve kadın sağlığını önemli ölçüde etkileyen bir kanser türü olarak ifade edilmektedir [1, 2]. Tüm dünyada yeni tanı alan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler önceki yıllara göre tahmin edilenden daha fazla artış göstermiştir. Özellikle kadınlarda meme kanserindeki artış dikkat çekicidir. Uluslararası Kanser Ajansı sonuçlarına göre, kadınlarda meme kanser vakalarının görülme sıklığı bir önceki tahminlere göre %20, meme kanserinden ölümlerin ise %14 arttığını belirtilmiştir [3].

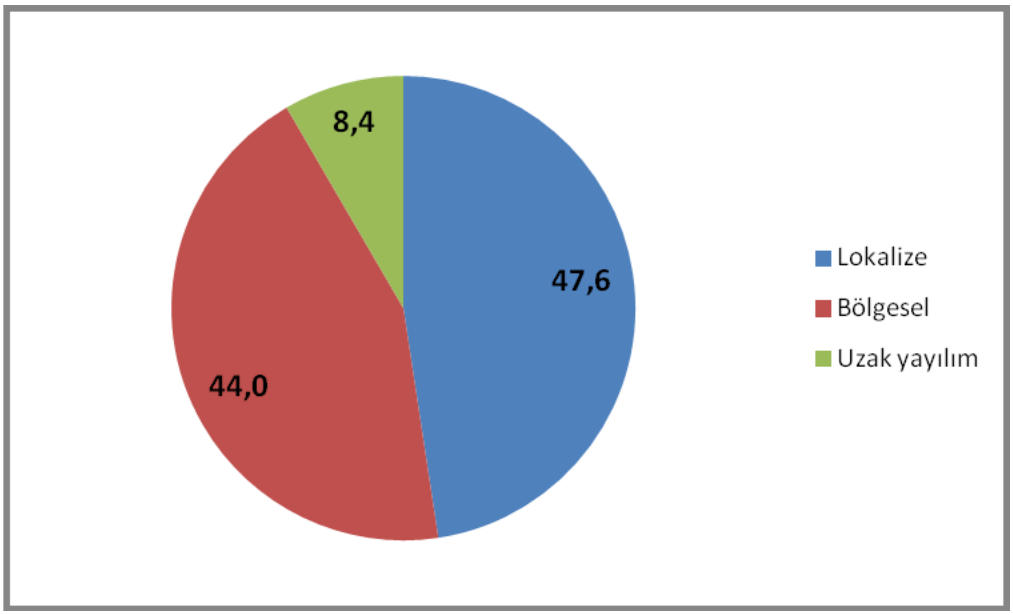
Dünyada her 4 kadından birinde görülen meme kanseri, %1 gibi bir oranla çok ender olarak erkeklerde de görülebilmektedir[4].



Şekil 2.1. Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009)[3]



Şekil 2.2. Meme Kanserinin Yaşa Özel Hızlarının Dağılımı (Birleşik Veri Tabanı, 2009)[3]



Şekil 2.3. Meme Kanseri Evrelerinin Yüzde Dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009)[3]

Uluslararası Kanser Ajansı Başkanı Dr Wild; meme kanseri görülme sıklığının gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranda olmasına rağmen, meme kanserinden ölüm oranının gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Bu

durum, az gelişmiş yada gelişmekte olan ülkelerdeki kadınların meme kanseri teşhis, tarama ve tedavi hizmetlerine ulaşma sorunlarından kaynaklanmaktadır [3].

2.1.2. Meme Kanserinin Anatomisi

Meme, süt bezleri ve üretilen sütü meme başına taşıyan kanallar olmak üzere başlıca 2 kısımdan meydana gelir. Memede, salgı yapan hücrelerin oluşturduğu lobüllerin biraraya gelmesiyle loblar meydana gelmektedir. Lobülleri birbirlerine bağlayan süt kanalları meme başına doğru birleşmektedirler. Lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin mutasyona uğrayarak kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleri sonucu meme kanseri oluşmaktadır [5]. Meme kanseri, süt kanalları (duktal karsinom) ya da lobüllerden (lobüler karsinom) kaynaklanabilir. Meme kanseri oluştuktan sonra, kaynaklandığı yerle sınırlı kalabilir (in situ) ya da yayılma eğilimi göstererek (invaziv meme kanseri) vücutta öncelikle bölgesel lenf bezlerine, daha ileriki aşamalarda da kan dolaşımı ile diğer organlara yayılabilmektedir [6, 7]. Bölgesel lenf bezlerini aşan kanser hücreleri sırasıyla akciğer, plevra (akciğer zarı), kemik (kaburga, bel omurları, kafatası, kol kemikleri), karaciğer, periton (karın zarı), böbrek üstü bezleri, beyin ve yumurtalıklara yayılma gösterebilmektedir [8].

Kanser hastalarında hastalığın vücuttaki anatomik durumunu göstermek için uluslararası derecelendirme sistemi kullanılır. TNM olarak adlandırılan evrelendirme sisteminde;

T: Primer tümörün yayılmasını
N: Kanser hücrelerinin bölgesel lenf bezlerine sıçraması
M: Hastalığın vücuttaki diğer organlara sıçraması (uzak metastaz) anlamına gelmektedir. Evrelendirme sistemi, hastalığın belirlenmesi, tedavi yaklaşımı ve sonuçlarının değerlendirilmesi ve uluslararası veri transferinin daha kolay ve etkili bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır. Bu evrelendirme sisteminde;

T0 Tümör yok
T1 Tümör çapı <2cm
T2 Tümör çapı <5cm

T3 Tümör çapı >5cm

T4 Tümör deriye yada memeyi çevreleyen dokulara sıçramış

Tx Tümörün yayılması konusunda karar verilemiyor

N0 Kanser hücreleri lenf bezlerine sıçramış

N1 Kanser hücreleri koltuk altı lenf bezlerine sıçramış

N2-3 Kanser hücreleri koltuk altı lenf bezlerine ve/veya göğüs kafesindeki büyük damarlara sıçramış

Nx Lenf bezlerinin hastalanması konusunda karar verilemiyor

M0 Başka organlara metastaz yok

M1 Kanser hücreleri başka organlara sıçramış

Mx Tümörün yayılması konusunda karar verilemiyor [9, 10].

2.1.3. Meme Kanserinin Belirtileri

Meme kanserinin belirtileri hastalığın vücuttaki dağılımı ve evresi kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Kadınlarda, hastalığın ilk evrelerinde ağrısız olmakla birlikte; ilerlemeye bağlı olarak farklı belirtiler ortaya çıkar. Genellikle bu belirtiler ilk olarak hastanın kendisi tarafından fark edilir. Bundan dolayı kadınların belirli periyotlarda düzenli olarak meme kanseri muayenesini kendileri ya da uzman birisine yaptırmaları çok önemlidir. Meme kanseri çeşitli belirtiler göstermektedir. Bunlar;

1- Memede kitle
2- Memede ya da koltuk altında sertlik, şişlik veya ödem oluşması
3- Deride kızarıklık oluşması ya da portakal kabuğu görüntüsü
4- Meme derisinde kaşıntı
5- Meme başından kanlı ya da kansız akıntı gelmesi
6- Deride ya da meme başlarında çöküntü oluşması [11-13]

2.2. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri

Meme kanserinden kaynaklanan ölümlerin azaltılabilmesi, memenin alınması ile sonuçlanan ameliyatların azaltılması ve hastaların yaşam standartlarının arttırılabilmesi için, kanserin erken evrede teşhis edilmesi önem taşımaktadır.

Günümüzde kanser tedavisinde, cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi gibi pek çok tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Hastalık ne kadar erken teşhis edilirse, kullanılabilecek tedavi seçenekleri ve buna bağlı olarak da tedavi başarısı artmaktadır. Meme kanserinde tarama yöntemlerinin kullanılması hem kanserin erken evrede teşhis edilmesini hem de tedaviden sonra yapılan kontrol programlarına bağlı olarak hastalığın mortalitesi ve morbiditesinin azalmasını sağlamaktadır [8, 14, 15]. Meme taraması için çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

2.2.1. Meme Muayenesi

Meme kanserinde hasta için uygun tarama yöntemi, yaş, stres ya da sigara kullanımı gibi risk faktörlerine göre değişkenlik göstermektedir. İleriki yaşlarda erken tanı konması için kullanılan tarama yöntemi, erken yaş gruplarından daha farklıdır. Kişi meme muayenesini kendi kendine yapabileceği gibi bir klinikte bu konuda eğitim almış sağlık personeli tarafından da yapılabilir.

2.2.1.1. Kendi Kendine Meme Muayene (KKMM)

Kendi kendine meme muayenesi (KKMM), meme kanseri taramasında etkili, kolay, zararsız ve 20 yaşından sonra her kadının ayda en az bir kez yapması oldukça faydalı bir yöntemdir. Kadınların KKMM'yi düzenli olarak yapması halinde memedeki değişikleri kolayca fark etmektedirler. Yapılan çalışmalar, meme kanserinde kitleyi ilk bulan kişinin genellikle kadınların kendileri olduğunu ve KKMM yapan kadınların memedeki kitleyi erken dönemde tespit etmelerinin yapmayanlara oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir [16, 17].

Yapılan çalışmalar KKMM yapmanın ne kadar önemli olduğunu gösterse de bunun aksini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Semiglazov ve arkadaşlarının 1999 yılında yayınladıkları ve 1985-1990 yılları arasında 40-64 yaş aralığındaki 122.471 kadının Rusya'da; Thomas ve arkadaşlarının 2002 yılında yayınladıkları ve 1989-1994 yılları arasında 31-64 yaş aralığındaki 267.040 kadının Çin'de izlenerek gerçekleştirildiği çalışmalar neticesinde; KKMM'nin meme kanseri taramasında hiçbir yararı olmadığı, aksine biyopsi sayısını arttırdığı belirtilmiştir [18, 19].

Rusya ve Çin'de yapılan çalışmaların sonuçları, KKMM'nin meme kanseri mortalitesini azaltmada etkisinin olmadığını göstermesine rağmen, meme dokusundaki kitlelerin %80'inin ilk kez kadınların kendileri tarafından bulunması KKMM'nin önemini vurgulamaktadır [20].

2.2.1.2. Klinik Meme Muayenesi (KMM)

KMM, elle meme muayenesinden farklı olarak, bir hekim ya da bu konuda eğitim almış sağlık personeli tarafından koltukaltı ve tüm meme dokularının el ile muayene edilmesidir. Yapılan çalışmalar, meme dokusunun yapısından kaynaklı olarak kitleyi bulmada güçlük çekmeleri ve tam olarak neyi aradıklarını bilmemelerinden dolayı KKMM'nin çoğu zaman kadınlar tarafından etkili bir şekilde yapılmadığını göstermektedir. Bundan dolayı, KMM'yi 20 yaşından itibaren 3 yılda bir ve 40 yaşından itibaren de her yıl 1 kez kadınların yaptırması önerilmektedir. KMM, mamografi tarama programına uymayan kadınların meme kontrolü açısından önem arz etmektedir [20].

2.2.2. Biyopsi (Doku Örneklemesi)

Meme muayenesi ya da görüntüleme yöntemleri sonucunda, meme dokusunda herhangi bir anormallik saptanması ya da teşhisin tam olarak konulamayıp şüphe uyandırması sonucunda biyopsi tetkiklerine başvurulur. Meme dokusundan alınan hücrelerin mikroskop altında patolojik incelenmesi temeline dayanmaktadır. Memede biyopsi için üç farklı yöntem uygulanmaktadır. Bunlar: ince iğne aspirasyon biyopsisi, kor (kalın) iğne biyopsisi ve cerrahi eksizyonel biyopsi [21].

2.2.2.1. İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi (İİAB)

İİAB için 0,7mm'den daha küçük çapa sahip iğneler kullanılmaktadır. Buradaki amaç, meme dokusundaki kitledeki hücreleri ya da küçük doku parçalarını enjektör içindeki negatif basınç yardımıyla yerinden koparıp, iğne lümeninin ya da enjektörün içine almaktır. İİAB ucuz ve oldukça kolay bir yöntemdir. Aynı anda bir çok lezyona uygulanabilir. Ayrıca, İİAB'nin ultrasonografi ile birlikte kullanılması,

enjektör ucunun hedef dokunun içinde olup olmadığından emin olunması gibi avantajlara sahiptir [22-24].

2.2.2.2. Kor (Kalın) İğne Biyopsisi

Kor iğne biyopsi uygulamasında, İİAB'ye göre daha kalın çapta (14-18 gauge) iğneler kullanılır. Kullanılan iğnenin çapının kalın olmasından dolayı meme cildine lokal anestezi uygulanır. İİAB ile dokudan hücreler alınırken, kor iğne biyopsi ile doku örneği alınabildiği için, tümör hakkında daha fazla ve kesin bilgi elde edilebilir. Cerrahi eksizyonel biyopsiye kıyasla daha az travmatik ve daha az skar dokusu bırakması gibi avantajlara sahiptir [25].

2.2.2.3. Cerrahi Ensizyonel ve Eksizyonel Biyopsi

Ensizyonel ve eksizyonel biyopsi daha çok cerrahi bir yöntemdir. Ensizyonel biyopsi de meme cildine lokal anestezi uygulandıktan sonra, şüpheli bölgeye neşter ile kesik atılır ve doku örneği alınır. Eksizyonel biyopsi de şüpheli tüm doku alanı ve kanserin bulunduğu bölgedeki sağlıklı dokuların etrafındaki küçük bir sınır da cerrahi müdahele ile alınmaktadır. Klasik cerrahi yönteme benzeyen eksizyonel biyopsi ile memedeki tüm şüpheli dokunun çıkarılması hastayı rahatlatırken, skarlı doku kalması, iyileşme süresinin uzun olması ve hastada travmatik etkilere sebep olması gibi dezavantajlar mevcuttur. Eksizyonel biyopsi, tümör dokusunun varlığını belirlemede uygulanan en güvenilir teşhis yöntemdir [21, 22].

2.2.3. Görüntüleme yöntemleri

2.2.3.1. Mamografi

Mamografi, memelerin X ışını ile görüntülenmesidir. Noninvaziv meme taraması ve meme kanseri teşhisindeki en etkin görüntüleme yöntemlerinden biridir.

Memede yer alan farklı dokular (yağ dokusu, bağ dokusu, grandüler doku) radyolojik olarak birbirlerine benzemelerine rağmen aynı değillerdir. Bağ doku ve grandüler doku yakın dansiteye sahipken, yağ dokusu daha düşük dansiteye

sahiptir. Mamografik görüntüleme temel olarak meme lezyonlarının biçim ve sınır özelliklerini baz almaktadır. Meme dokusunda yer alan bening lezyonların mamografik görüntüleri keskin sınırlı, lobule kontürlü kitle lezyonu olarak görüntülenirken, maling lezyonlar düzensiz sınırlı ve spiküle kontürlü kitleler şeklindedir [26, 27].

Mamografi tekniği ile memenin tümü ya da belirli bir bölgesi yüksek kontrast ve optimum görüntü ayrıntısı ile görüntülenebilmektedir. Böylece, elle yada klinik muayene ile saptanamayacak kadar küçük anormalliklerin tespit edilmesi hedeflenmektedir. Mamografinin klasik röntgenle karşılaştırıldığında en önemli avantajı, düşük dozda daha yüksek görüntü kalitesi elde etmesidir. Mamografi nispeten ucuz olması, kolay ulaşılabilir olması ve yüksek lezyon saptama özelliği gibi avantajlarından dolayı meme kanseri tanısında hem tanı amaçlı hem de tarama yöntemi olarak en sık kullanılan primer görüntüleme yöntemidir.

Yaşın ilerlemesine bağlı olarak memedeki yağ dokusu oranı artmakta, bu da ileriki yaşlardaki kadınlarda kontrastı arttırarak lezyon saptama oranını arttırmaktadır. Fakat genç kadınlarda meme dokusunun daha yoğun olmasına bağlı olarak mamografinin duyarlılığı azalmakta ve meme dokusundaki lezyonların tespiti güçleşmektedir. Pek çok avantajına rağmen mamografinin meme dokusundaki malign tümörü belirlemedeki duyarlılığı pek çok araştırma sonucuna göre değişkenlik göstermekle birlikte oldukça düşüktür. Mamografi sonucuna göre malign tümör şüphesi uyandıran her 5 vakadan 1 tanesi biyopsi sonucuna göre malign çıkmaktadır. Bundan dolayı mamografi maliyeti arttırmanın yanı sıra, hastalarda gereksiz biyopsi ve cerrahi müdahaleye neden olmaktadır [28, 29].

2.2.3.2. Ultrasonografi

Ultrasonografi (US), yüksek enerjili ses dalgaları ile görüntü elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Kullanımının kolay olması ve radyasyon riski taşımaması gibi avantajlarının yanısıra mamografi ile saptanan kitle lezyonlarının iç yapısının değerlendirilmesinde oldukça etkili bir görüntüleme yöntemidir. US, ele gelmeyen kitlelerin teşhisinde yetersiz olduğu için, mamografi ile birlikte kullanımı mamografinin duyarlılığını artırmaktadır. US, özellikle 30 yaşın altındaki, az doğum

yapmış yada hiç yapmamış ya da mamografide şüpheli anormal bulguların doğrulanmasında kullanılmaktadır [30] [31].

2.2.3.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Meme dokusunun görüntülenmesinde mamografi ve ultrasonografi temel görüntüleme yöntemleri olmasına rağmen sahip oldukları dezavantajlardan dolayı meme kanserinin görüntülenmesinde yeni yöntemler geliştirilmiştir. 1990'lı yılların başından itibaten tanısal amaçlı olarak meme lezyonlarının görüntülenmesinde Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) klinik kullanıma başlamıştır. MRG, MG ve US görüntülemeden farklı olarak yüksek yumuşak doku kontrastına sahip olması, iyonize radyasyon içermemesi, lezyonların morfolojilerine ek olarak meme parankimi hakkında da bilgi vermesi gibi avantajlara sahiptir [29, 32].

MG ve US meme dokusundaki benign/malign lezyonların ayrımı her zaman yapılamayabilir ya da yalnış sonuç verebilir. Fakat MRG'nin tüm tümör dokularının görüntülenmesinde ve memenin malign lezyonlarını saptamadaki duyarlılığı %90'ın üzerindedir [33]. Eğer şüpheli dokuya MRG ile de karar verilemiyorsa, bu durumda direkt olarak biyopsi önerilmektedir. MG ve US, 2 cm'den büyük lezyonları olduğundan daha küçük gösterirken, MRG meme dokusundaki invaziv tümör boyutuna en yakın sonucu vermekte ve multiple malign odakları tespit etmede daha yüksek hassasiyet göstermektedir [34]. MRG ile iki meme de aynı anda görüntülenebilmektedir. Literatürde, meme kanserlerinin %2-3'ünde karşı memede de kanser odağı bulunduğu belirtilmekte ve MG ile görüntülemede kanser odakları gözden kaçabilmektedir.

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi, yorumlanması ve raporlanmasına yardımcı olmak amacıyla Meme MRG'si standardize edilmiştir. Bu kapsamda, ACR'nin (American Collage of Radiology) önderliğinde 'Uluslararası Meme MRG Çalısma Grubu (International Working Group on Breast MRI)' kurulmuş ve grup 1998 yılından beri faaliyet göstermektedir. Çalışmalar sonucunda, raporlamada kullanılacak terminoloji belirlenmis ve BI-RADS sınıflama sistemi geliştirilmiştir [35].

2.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme ile Memenin Görüntülenmesi

Günümüzde genellikle MRG için 1,5 tesla manyetik alan gücüne sahip cihazlar kullanılmaktadır. Kadınlarda menstruel siklusun neden olduğu hormonal değişikliklerin MRG'de yanlış pozitif sonuçlara yol açmaması için, literatürde MR görüntüleme için en uygun zamanın menstrüel siklusun 7.-17. günleri (tercihen 7.-10. günler) olduğu bildirilmiştir [36] [37].

Meme MRG'de, hasta pron posizyonda yatırılarak hareketin görüntüdeki olumsuz etkisi azaltılabilir. Meme MRG incelemeleri için, her iki memenin de içine girdiği, tercihen kompresyon uygulayabilen ve biyopsiye olanak sağlayacak şekilde yan tarafta açıklığı bulunan özel meme koilleri tercih edilmelidir [38]. MRG'de ilk olarak hastanın T1 ve T2 MR sekansları alınır, daha sonra kolda antekubital venden açılan damar yolundan kontrast madde enjekte edilerek 3 boyutlu dinamik MR sekansları elde edilir.

2.4. MRG'de Kullanılan Kontrast Maddeler

MRG'nin kullanılmaya başlandığı ilk yıllarda, MRG için kontrast maddeye gereksinim olmadığı düşünülmekteydi. Fakat yapılan çalışmalar MRG'de kontrast madde kullanımının sadece dokular arasında dinamik fizyolojik bilgileri sağlamadığı aynı zamanda yüksek anatomik detayın da elde edilebildiğini göstermektedir. MRG'de kullanılan kontrast maddeleri 2 şekilde sınıflandırmak mümkündür [39].

2.4.1. Kontrast Maddelerin Kullanıldığı Sekanslara (Puls Parametreleri) Göre

MRG kullanılan kontrast maddelerin kendileri görülmezler. Bu maddeler dokunun manyetik alan altındaki proton davranışlarını veya manyetik duyarlılığını değiştirerek etki göstermektedirler. T1 ve T2 relaksasyon sürelerini kısaltarak etki göstermektedirler [40].

T1 ajanlar: MRG'de kullanılan gadolinium ve mangan tuzları, MR T1 relaksasyon süresini etkilemektedir. Kontrast maddeler, T1 relaksasyon süresini kısaltarak T1

ağırlıklı görüntülerde sinyal artışına (Hiperintensite) neden olur ve dokuların daha parlak (beyaz) görülmesini sağlarlar. Böylece en iyi şekilde T1 ağırlıklı görüntüler elde edilmektedir. 'Gadopentetate dimeglumine' klinikte kullanılan paramanyetik özellikte T1 kontrast maddelerden biridir ve paramanyetik iyonlarda nükleusların çevresinde 7 tane çiftleşmemiş elektron içerir [41].

T2 ajanlar: MRG'de kullanılan demiroksit içeren kontrast maddelerdir. MRG'de T2 veya T2* relaksasyon süresini kısaltarak T2 ağırlıklı görüntülerde sinyal kaybına (Hipointensite) neden olurlar. T2 kontrast maddeler dokudaki manyetik homojeniteyi bozarak, dokular içerisinde negatif kontrast oluşturur ve dokuların daha siyah görülmesini sağlarlar. En çok bilineni ise ferromanyetik (süperparamanyetik) özellik gösteren 'paramanyetik iron (demir)' dir.

2.4.2. Kontrast Maddelerin Etki Ettiği Dokulara Göre (Biyodağılım)

2.4.2.1. Non-spesifik (Ekstraselüler) Kontrast Maddeler

Ekstraselüler kontrast maddeler gadolinium şelatlarından oluşmaktadır. Bu kontrast maddelerden bazıları; Gadopentat dimeglumin (Gd-DTPA) (Magnevist, Schering AG), Gadodiamid (Gd-DTPA-BMA) (Omniscan, Nycomed AS), Gadoterat meglumin (Gd-DOTA)(Dotarem, Laboratoire Guerbet), Gadoteridol (Gd-HP-DO3A) (ProHance,Bracco Diagnostics), DTPA (dietilentriaminpentaasetik asid), DTPA-BMA (dietilentriaminpentaasetikasid bis-metilamid). Serbest gadolinium oldukça toksik olmasına rağmen, doku spesifitesi olmayan bu kontrast maddeler biyolojik toksisitelerinin azaltılması için şelat halinde hazırlanırlar. Ekstraselüler kontrast maddeler vücuda damar yoluyla verildikten sonra, vücudun ekstraselüler bölgesine geçer ve yaklaşık 3 saat sonra böbrekler tarafından atılırlar [42-44].

2.4.2.2. RES'e Yönelik Kontrast Maddeler

RES (Retiküloendotelyal Sistem)'e yönelik kontrast maddeler, iv olarak uygulandıktan sonra RES organları (karaciğer, dalak, kemik iliği) tarafından elimine edilen ve demir oksit içeren partiküllerdir [45]. RES kontrast maddeler, ferromanyetik özellikte ortalama partikül çapı 50nm'den büyük olan

süperparamanyetik demir oksitler (SPIO) ve ortalama partikül çapı 50nm'den küçük olan ultrasmall süperparamanyetik demiroksit nanopartiküllerdir (USPIO) [46]. Günümüzde AMI-25 (Endorem, Guerbet) ve SHU 555A (Resovist, Schering) ticari olarak klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ferrumoksit (AMI-25)(Feridex) ve Ferrukarbotran (SHU-555A) 50nm'den büyük; Ferumokstran (AMI-227) (Sinerem,Combidex) 50nm'den küçük nanopartikülleri içermektedir. Kontrast maddeler RES dokularında sinyal relaksasyon süresini azaltarak en iyi T2 ağırlıklı görüntü elde edilmesini sağlamaktadır. Demir içeren kontrast maddelerin yarılanma ömrü karaciğerde 3 gün, dalakta ise 4 gün kadardır, daha sonra metabolize olarak birkaç gün içinde vücuttaki demir havuzuna katılır [47]. Ticari formdaki AMI-227 karaciğerin MRG, lenf nodu görüntüleme ve MR anjiyografide kullanılmaktadır.

2.4.2.3. Kan Havuzu Kontrast Maddeleri

MRG kalp hastalıkları, inme ve damar bozukluklarının tanı ve tedavisi için de kullanılabilir. MR anjiyografisi (MRA) için kullanılan kontrast maddelerinin (Kan havuzu kontrast maddeleri) kanda uzun süre sabit konsantrasyonda kalarak MRA için uygun zaman aralığı sağlaması gerekmektedir. Aynı zamanda biyouyumlu olmalı ve görüntüleme için uygun zaman aralığında kanda kaldıktan sonra yıkılıp vücuttan atılabilmelidir. MS-325 (MS-325, Epix Medical ve Mallinckrodt Medical Inc.), Gd-DTPA-polilizin, Gd-DTPAdekstran (Nycomed) ve Gd-DTPAkaskad-polimer (Gadomer-17, Bayer) kan havuzu kontrast maddesi olarak geliştirilen ve çalışmaları devan eden kontrast maddelerdir [46, 48].

2.4.2.4. Hepatobiliyer Sisteme Yönelik Kontrast Maddeler

Hepatobiliyer sisteme yönelik kontrast maddeler, hepositlere afinitesi olan ve bunlar tarafından aktif olarak tutulumu sağlanan şelatlardır. MN-DPDP ve Gd-BOPTA kontrast maddeleri klinik olarak kullanılmaktadır. 1997'den beri klinik olarak kullanılan Mn-DPDP (Teslascan, Nycomed, Norway), karaciğerde T1 relaksasyon süresini kısaltarak MRG'de hepatosit içermeyen lezyon ile karaciğer arasındaki kontrastın artmasına yol açar. Hepatositler metal iyonlarına yönelik ekskresyon yeteneğinden dolayı paramanyetik mangan (Mn) içeren Mn-DPDP'nin

karaciğer hücreleri tarafından tutulduğu düşünülmektedir. Dual kombine farmakodinamik özellik gösteren Gd-BOPTA (gadobenate dimeglumine) (Multihance, Bracco, Italy) geç fazda hepatobiliyer kontrast madde (karaciğer dokusuna spesifik) gibi davranmaktadır. Böylece erken fazda karaciğer kitlelerinin karakterizasyonu ve geç fazda ise kitlelerin görüntüleri elde edilebilmektedir [49].

2.4.2.5. Oral Kontrast Maddeler

Oral kontrast maddeler vücuda iv enjeksiyon ya da oral yolla verilebilir. Gastrointestinal sistemin MRG'nde yukarıda bahsedilen tüm kontrast maddeler oral olarak kullanıldığında daha etkili sonuç verdiği gözlenmiştir. Kontrast maddeler iv uygulama için, işlemden 30 dk. önce veya MR başladıktan birkaç dk. sonra verilebilirken, oral kontrast maddeler hastaya 24-12 ve 2 saat önce olmak üzere 3 doz uygulanmalıdır [50].

2.4.2.6. Tümör-Spesifik Kontrast Maddeler

Günümüzde kullanılan MR kontrast maddeler; başağrısı, vazodilatasyon, bulantı, enjeksiyon yerinde ağrı, başdönmesi, cillte kızarıklık gibi yan etkiler göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, süperparamanyetik kontrast maddelerin tümör dokusunu belirlemede etkili olması, ticari MR kontrast maddelerin yan etkilerini azaltması beklenmekte ve bu konuda çalışmalar yapılmaktadır.

Araştırmacıların büyük bir kısmının ilgi odağı haline gelen nanoteknoloji ve nanotıp alanında yapılan çalışmaların önemli bir bölümü hastalıkların erken teşhisini sağlayan, yüksek duyarlılıkta ve doku veya organa spesifik nanomateryallerin geliştirilmesine yöneliktir. Literatürde süperparamanyetik özellikte demiroksit nanopartiküllerin MRG'de kontrast arttırıcı madde/ajan olarak kullanımına yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu partiküller, vücuttaki toksisitesinin azaltılması için biyouyumlu bir polimer ile kaplanıp, hedeflenen doku ve/veya organa spesifik ligandlar ile modifiye edilerek tümör spesifik, biyouyumlu kontrast maddelerin hazırlanması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir [51, 52].

2.5. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji; fizik, kimya, biyoloji, tıp, mühendislik, elektronik, fizik ve malzeme bilimlerinde mikron altı veya moleküler düzeydeki üretim alanlarında kullanılan multidisipliner bir alandır. Çok eski zamanlardan beri nanoteknolojik malzemeler kullanılmasına rağmen, nanoteknoloji terimi nobel ödüllü bilim adamı Dr. Richard Philip Feynman'ın 1959 yılındaki 'There is Plenty of Room at the Bottom' adlı makalesi ile tüm dünyada kabul görmüştür [53]. Nano, metrenin biri (10^{-9} metre) anlamına gelmektedir. 1 ile 100 nanometre (nm) arasındaki büyüklük, uzunluk, genişlik veya kalınlık için nanoteknoloji terimi kullanılmaktadır [54].

Buttom-up (aşağıdan yukarıya) ve Top-down (yukarıdan aşağıya); nanoteknolojik malzeme, sistem ya da cihaz üretiminde kullanılan iki temel yaklaşımdır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı; atomları ve molekülleri tek tek işleme ve/veya yeniden düzenleme yoluyla hedeflenen özelliklere sahip yeni malzeme, sistem veya cihazların elde edilmesidir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı, çeşitli cihaz, yöntem ve malzemelerin kullanılarak istenilen yapıların nanofabrikasyonudur [55, 56].

Çok farklı kullanım alanlarına sahip olan nanoteknolojik malzemeler ve sistemler sağlık alanında da çok önemli gelişmeler sağlamışlardır. Nanoteknoloji sayesinde yeni ilaç/gen taşıyıcı sistemler (polimerik nanopartiküller), biyomedikal görüntüleme ajanları (süperparamanyetik demiroksit nanopartiküller), nanoboyutta doku iskeleleri, nanorobotların keşfi ve biyomedikal uygulama alanlarında çok önemli gelişmeler sağlanmıştır [57-59]

2.5.1. Nanopartiküller

Nanopartiküller, 10-1000 nm arasında değişen partikül büyüklüğüne sahip submikronik (<1μm) metalik ya da polimerik kolloidal sistemlerdir. Nanopartiküllerin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri kullanılan baslangıç malzemesine göre farklılık göstermektedir ve bundan dolayı farklı üretim metodları geliştirilmiştir. Nanopartiküller; kuantum boyut etkisi, yüksek yüzey/hacim oranı, elektron yapısının boyuta bağlı değişmesinden dolayı makro boyuttaki

malzemelerden farklı ve üstün özelliklere sahip olarak kabul edilmektedirler [60].

Hazırlanan nanopartiküllerin farklı kullanım alanları mevcuttur. Sentetik ya da doğal polimerlerden hazırlanan nanopartiküller özellikle farmasötik alanda kontrollü ilaç taşıyıcı sistem alarak ya da gen terapisi çalışmalarında; manyetik özelliklere sahip nanopartiküller kontrast arttırıcı madde olarak ya da sensör uygulamalarında kullanılabilmektedirler [61, 62].

2.5.1.1. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller, metal ve oksitlerinden (Ni, Co, Fe, Fe_3O_4 ve Fe_2O_3) oluşan, boyutları 1-100 nm arasında değişen ve bir sıvı içerisinde süperparamanyetik dispersiyonlar oluşturan kolloidlerdir [63]. Kullanılan yönteme bağlı olarak farklı boyut ve şekillerde sentezlenebilen manyetik nanopartiküller; in vivo uygulamalarda enjeksiyon kolaylığı, düşük toksisite, karaciğerde elemine edilmesi ve hedeflenen organ ya da dokuda birikmesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca literatürde, manyetik alan etkisi ile taşıdığı ilacı serbest bırakan akıllı nanopartiküllerin hazırlanmasında [64] ve MRG de kontrast arttırıcı ajan olarak da kullanılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur .

Metalik ve oksit esaslı nanopartikülllerin üretilmesinde, mekanik aşındırma, kimyasal buhar yoğunlastırma, ultrasonik sprey piroliz, ikili çöktürme gibi çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Aynı zamanda, doğada bakteriler gibi çeşitli canlılar demiroksit nanopartikülleri hücre içi kristal partiküller olarak sentezlenmektedirler. Magnetozom olarak adlandırılan bu partiküller bölüm 2.6.'da detaylı olarak anlatılmıştır.

2.5.2. Manyetik Nanopartiküllerin Kaplanmasında Kullanılan Polimerler

Manyetik nanopartiküller hedeflenen özelliklere sahip olabilmeleri için polimerik ya da metal malzemelerle kaplanabilirler. Kolay modifiye edilmeleri, sitotoksik etkisinin azalması, hidrofilitesinin değiştirilmesi, ilaç, gen...vb. yüklenebilmesi için genellikle polimerik bir malzemeyle kaplanırken; manyetizasyonun ve stabilizasyonunun artması ve/veya oksidasyonun engellenmesi için altın, gümüş,

silika...vb inorganik malzemelerle kaplanabilir [65, 66].

Polietilen glikol (PEG), Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), Polivinil alkol (PVA), Polihidroksibütirat (PHB), Kitosan gibi vücutta enzimatik yıkıma uğradıktan sonra sitotoksik etki meydana getirmeyen biyouyumlu polimerlerin kullanımı tercih edilmektedir [67]. Hazırlanan tez kapsamında, biyolojik olarak bozunabilen bir protein olan, insan serum albümini manyetik nanopartiküllerin kapsüllenmesinde kullanılmıştır.

2.5.2.1. İnsan Serum Albumin (HSA)

65,5 kDa moleküler ağırlığa sahip olan albümin, insan ve diğer memeli hayvanların vücudunda en çok bulunan plazma proteinidir. Kan proteinlerinin %60'ını oluşturan albümin, ayrıca doku sıvılarında, gözyaşı, ter, mide suları ve safrada bulunmaktadır [68]. Albümin vücutta çok önemli hayati birçok görevi gerçekleştirmektedir.

- Kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlar
- Dolaşım sisteminde taşıyıcı görev üstlenmektedir. Yağ asitleri, metabolitler, ilaçlar ve çeşitli başka maddelerin kanda taşımasını sağlar
- Endotelyal hücrelerde apoptozisi önler
- Lipitler ve endojen maddelerin metabolizmasında görev almaktadır [69].

Albüminin moleküler yapısında, oleik, linoleik, linolenik, arasidonik, palmitik ve miristik asit gibi uzun yağ asidi moleküllerinin, aromatik karboksilik asit ve negatif yüklü halkalı bileşikler gibi organik iyonların bağlanabildiği bağlanma yeri mevcuttur. İlaçlar buralardan albümine bağlanarak vücutta taşınırlar [70].

Kan plazmasındaki toplam konsantrasyonundan dolayı insan serum albümininden hazırlanan nanopartiküller biyouyumlu ve biyobozunur özelliktedirler. Asidik yapıya sahip olan albümin, kolay çözünür ve sıcaklığa dayanıklıdır. Ayrıca pH 4 ve 9 arasında stabil olması, istenilen boyutlarda partiküllerin hazırlanmasını kolaylaştırmaktadır [71]. Ayrıca yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplardan

(karboksil, amin ve hidroksil) aracılığıyla kolay modifiye edilmesinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılabilir.

2.6. Magnetotaktik Bakteriler ve Magnetozom

1975 yılında ilk kez Richard P. Blakemore tarafından keşfedilen magnetotaktik bakteriler, doğada spiral, kok, basil, çomak gibi farklı morfoloji ve boyutlarda bulunmaktadırlar. Magnetospirillum magnetotacticum, Magnetospirillum gryphiswaldense magnetotaktik bakterilerden bazılarıdır [72].

Anaerob gram negatif bakterilerdir [73]. Ortamda bulunan Fe tuzlarını hücre içine alarak in vivo manyetik nanokristallere çevirirler. Bu nano yapılar sayesinde magnetotaktik bakteriler dünyanın merkezinde bulunan manyetik alana doğru sahip oldukları kamçılar yardımıyla bir hareket göstererek oksijence zayıf alanlara doğru yollar bulabilmektedirler (magnetotaksis). Bu manyetik nanokristaller (Fe_3O_4-Manyetit veya Fe_3S_4-Greigite) bakteriyel magnetosom (BM) olarak adlandırılır [74]. Magnetozomlar bakteri hücresinin başından sonuna doğru yönelim gösteren zincir yapısındadır. Manyetitin manyetik momenti greigite ile karşılaştırıldığında üç kat daha güçlüdür. Magnetozomlar,

- Paramanyetik, stabil ve monodispers (25–55 nm) partikül yapısı
- T2 ağırlıklı görüntülemede, belirgin zayıflama sinyaline neden olması
- Membran ile çevrili olması
- Kolay modifiye edilmesi
- Magnetozom membranına ilaç yüklenmesi gibi pek çok avantaja sahiptirler [75, 76].

Magnetozomlar yüzeylerinde bulunan amino gruplar sayesinde modifiye edilebilir ve/veya doksorubisin, epirubisin, mitomisin, bleomisin gibi bazı ilaçlar yüklenebilir. Protein bazlı ilaçlar, nükleik asit, radyoaktif izotoplar ve kemoterapi ilaçları magnetozomlara yüklenebilir ya da üzerine çapraz bağlanabilir [77].

2.7. Nanopartiküllerin Doku/Organ Hedeflendirilmesi-Partikül Ligand Etkileşimleri

Yapılan çalışmalar konvansiyonel tedavi veya görüntüleme yaklaşımlarında hastaların yüksek dozda ilaç alımı, sitotoksik etki ve sağlıklı hücrelerin zarar görmesi gibi olumsuz etkilerle karşı karşıya kaldığını göstermektedir. Hedeflenen doku/organa özgü spesifik antibadiler ile modifiye edilen ilaç taşıyıcı sistem veya kontrast maddeleri hem tedavi etkinliğini arttırmakta hem de istenmeyen yan etkilerin engellenmesi sağlamaktadır [78].

Hazırlanan tez kapsamında, MRG'de kontrast arttırıcı ajan olarak magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin karşılaştırılması için model olarak meme kanseri seçilmiştir. İn vitro ve in vivo çalışmalar için farklı meme kanseri hücre hatları mevcuttur (MDA-MB-231, MCF-7, HTB-133, HTB-20). Tez çalışmaları için model olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı tercih edilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri yüzeylerinde normal hücrelere kıyasla çok daha fazla EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) bulunmaktadır. Bundan dolayı partiküllerin modifikasyonu için Anti-EGFR antibadisi kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) hem normal hem de kanserli hücrelerin hücresel iletim yolunun kontrolünde önemli bir rol oynayan tirozin kinaz aktivitesi ile karakterize edilen, hücre membranında bulunan bir reseptördür. Baş-boyun, meme, akciğer, kolorektal, prostat, böbrek, pankreas, yumurtalık, beyin ve mesane kanseri gibi pek çok kanser türünde EGFR hücreler tarafından yüksek oranda ifade edilirler [79].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar başlıca beş ana bölümden oluşmaktadır.

1. Hem kimyasal yolla sentezlenen hem de biyolojik olarak magnetotaktik bakterilerden elde edilen demiroksit nanopartiküllerin MR görüntülemede kontrast artırıcı madde olarak kullanılması için partiküller hazırlanmıştır. *M.gryphiswaldense'*nin anaerobic koşullarda kültürü yapılmış ve izolasyon işlemi sonrası magnetozomlar elde edilmiştir. Kimyasal proses ile elde edilen Fe_3O_4 nanopartiküller İnsan Serum Albümin (HSA) ile kaplanarak manyetik özelliğe sahip nanopartiküller hazırlanmıştır.

2. Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküller; STEM, FTIR, ZetaSizer, ESR ve MR kullanılarak karakterize edilmiştir.

3. Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin yüzeyi, meme kanseri hücreleri tarafından yüksek oranda eksprese edilen EGFR reseptörüne spesifik bağlanan Anti-EGFR ile modifiye edilmiştir.

4. Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartikül-hücre etkileşimleri, meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) ile değerlendirilmiştir.

5. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, optimum konsantrasyondaki nanopartiküllerin MR kontrast arttırıcı madde olarak etkinliği, farelerde oluşturulan meme kanseri dokusu ile test edilmiştir.

3.1. Kimyasallar

*Magnotospirillum gryphiswaldense'*den magnetozomların sentezi ve izolasyonu için KH_2PO_4, HEPES, Sodyum piruvat, ferric amonyum sitrat ve rezasurin (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Demiroksit nanopartiküllerin sentezlenmesi için de Demir(II) klorür ($FeCl_2$), Demir(II) klorür ($FeCl_3$) (Sigma, ABD) ve Amonyak (NH_3) (Riedel-de Haen) kullanılmıştır. Sentezlenen demiroksit nanopartiküllerin yüzeyi İnsan Serum Albumin (HSA) (AppliChem) ile kaplanmıştır. Bu işlem sırasında; desolvasyon

ajanı olarak aseton (Merck, Almanya) ve nanopartiküllerin stabilitesini artırmak için çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Nanopartiküllerin kanserli dokuya hedeflendirilmesi için partiküllerin yüzeyine takılan Anti-EGFR-Alexaflour 488 BioLegend firmasından; ayrıca yine aynı işlemde kullanılan NHS (N-Hydroxysuccinimide) ve EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) PIERCE firmasından temin edilmiştir. Hücre kültür ortamlarının hazırlanmasında DMEM/F12, FBS, Penesilin/Streptomisin, L-Glutamin, (BD Bioscience), HEPES, SodyumPiruvat, SodyumBikarbonat (invitrogen) kullanılmıştır. Çoklu kuyucuklu kültür kapları ve hücre kültür kapları Corning (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Konfokal mikroskop ile görüntülerin alınması çalışmalarında, hücre mebranının boyanması için Alexa Flour-594 (BioLegend) kullanılmıştır. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olduğundan dolayı, herhangi bir ilave saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır.

3.2. Magnetotaktik Bakterilerin (*Magnetospirillum gryphiswaldense*) Kültürü

İlk olarak *Magnetospirillum gryphiswaldense* (DSM 6361) mikroorganizma hattı anaerobik koşullarda inkübe edilerek üremeleri sağlanmış ve magnetozomlar bakterilerden izole edilmiştir. *M. gryphiswaldense* kültürü için, Yeast ekstrakt, soy bean pepton, KH_2PO_4, HEPES, Sodyum piruvat, ferric amonyum sitrat ve rezasurin içeren besi ortamı kullanılmıştır [80, 81]. Otoklavda (Trade Raypa, İspanya) steril edilmeden önce, pH'ı 7.0'e ayarlanmış ve besiyeri yaklaşık 1 dakika azot gazı ile muamele edilerek içerisindeki oksijenin azalması sağlanmıştır. Besiyerinin içeriğinde bulunan rezasurin de oksijen tutucu olarak görev yapmaktadır. Otoklavdan sonra, vitamin solüsyonu ve bakteri kültürü erlenlerin ağzı açılmadan şırınga yardımıyla besiyerine aktarılmıştır. Erlenlerin ağzı parafilm ile sıkıca kapatıldıktan sonra, tüm erlenler ışıktan koruması amacıyla alimünyum folyo ile sarılmış ve $28^{O}C$'de çalkalama olmaksızın 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca manyetik alan oluşturması için her bir erlenin altında mıknatıs bulundurulmuştur. *M. gryphiswaldense* bakterisinin üremesi ve magnetozom sentezlemesi için kullanılan besiyeri, iz element çözeltisi ve vitamin solüsyonlarının içerikleri Çizelge 3.1., 3.2. ve 3.3.'de ayrıntılı olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.1. *M. gryphiswaldense* için zenginleştirilmiş besiyeri

KH_2PO_4	0,1 g/L
Yeastextract	0,2 g/L
Soy BeanPepton	3 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,15 g/L
$NaNO_3$	0,34 g/L
HEPES	2,38 g/L
Sodyum Piruvat	3 g/L
Ferrik Amonyum Sitrate	0,4 g/L
Rezasurin	1 mg/L
Vitamin Çözeltisi	2 ml
İz elemen Çözeltisi	1 ml

Çizelge 3.2. *M. gryphiswaldense* için İz Element Çözeltisi [82]

Nitrilotriasetikasit	1,5 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,3 g/L
$MnSO_4.7H_2O$	0,5 g/L
NaCl	1 g/L
$FeSO_4.7H_2O$	0,1 g/L
$CoSO_4.7H_2O$	0,18 g/L
$CaCl_2.2H_2O$	3 g/L
$ZnSO_4.7H_2O$	0,18 g/L
$CuSO_4.5H_2O$	0,01 g/L
$KAl(SO_4)_2.12H_2O$	0,02 g/L
H_3BO_3	0,01 g/L
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,01 g/L
$NiCl_2.6H_2O$	0,025 g/L
$Na_2SeO_3.5H_2O$	0,3 mg/L

Çizelge 3.3. *M. gryphiswaldense* için Vitamin Çözeltisi [83]

Biotin	2 mg/L
Folic acid	2mg/L
Pyridoxine-HCl	10 mg/L
Thiamine-HCl x 2 H2O	5 mg/L
Riboflavin	5 mg/L
Nicotinic acid	5 mg/L
D-Ca-pantothenate	5 mg/L
Vitamin B12	0.10 mg/L
p-Aminobenzoic acid	5 mg/L
Lipoicacid	5 mg/L

3.3. Magnetotaktik Bakterilerden Magnetozomların İzolasyonu

Magnetozomların izolasyonu için; anaerobik fermentasyon ortamında çoğalan bakteriler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Centrifuge 5810 R, ABD) edilerek toplanıp ve pH 7,4; 0,1M PBS ile süspanse edilmiştir. Bakteri süspansiyonu, 1 hafta oda sıcaklığında PBS içerisinde bekletilmiştir. 1 hafta sonra süspansiyona, 300 W'lık ultrasonik hücre parçalayıcı prob (Bransonic, ABD, 250 W; 50 Hz) 15 dakika uygulanarak, bakterilerin hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Magnetozomlar 0,4 Tesla manyetik alana sahip mıknatıs yardımıyla tüpün dibine toplandıktan sonra bakteri artıklarının bulunduğu üst faz atılmış; magnetozomlar tekrar 0,1M PBS ile süspanse edilip, mıknatıs yardımıyla yıkanmıştır. Magnetozomların bakteri hücre debrisinden tam olarak uzaklaşması için yıkama işlemi 8-10 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen magnetozomlar daha sonra kullanılmak üzere, -80°C'de (Legaci Refrigeration System, U.S.A.) dondurulduktan sonra liyofilize (Christ Alpha 2-4 LD, Almanya) edilmiştir [84].

3.4. Demiroksit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Demiroksit nanopartiküller (Fe_3O_4) ikili çöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır. Bunun için ilk olarak $FeCl_2.4H_2O$ (1,26g) ve $FeCl_3.6H_2O$ (3,24g) tuzları ½ oranında 10 ml deionize su içerisinde çözünmüş ve manyetik karıştırıcı üzerindeki çözeltiye 4M

NH_3 çözeltisi damlatılarak eklenmiştir. Reaksiyon süresince oksidasyonu engellemek amacıyla reaktör kabından azot gazı geçirilmiştir. 1 saat 2000 rpm'de karıştırıldıktan sonra, elde edilen çözelti 9000 rpm'de 30 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen üst faz petri kaplarına yayılarak $37^{O}C$ vakumlu etüvde kurutulmuştur [67, 85].

3.5. İnsan Serum Albümin (HSA) Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Hazırlanması

İnsan serum albümin (HSA) kaplı demiroksit nanopartiküllerin hazırlanmasında desolvasyon yöntemi kullanılmıştır [86]. Bunun için, 50mg albumin 1ml distile suda çözünmüş ve 1M NaOH ve 1M HCl ile pH'ı 8,5'e ayarlanmıştır. 20mg demiroksit nanopartikülleri 1ml distile suda çözünmüştür. İki solüsyon karıştırılmış ve yaklaşık 10ml aseton karışıma sabit karıştırma altında (550 rpm) damlatılarak eklenmiştir. Solüsyonun rengi bulanıklaştıktan sonra çözeltiye çapraz bağlayıcı ajan olarak %8 Glutardehit eklenmiştir. Çözelti oda sıcaklığında 8 saat 600 rpm sabit karışma hızı ile karıştırılmıştır. Son aşamada, elde edilen süspansiyon 12000 rpm'de 25 dakika santrifüj ile 3 kez yıkanmıştır. Böylece, çözeltide bulunan fazla glutaraldehit ve aseton uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminden sonra nanopartiküller dondurularak liyofilize edilmiş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere $+4^{O}C$'de saklanmıştır.

3.6. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.6.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) tekniğinden yararlanılmıştır. Elde edilen STEM görüntüleri, partiküllerin yüzey yapısının yanı sıra kesit yapısının da incelemesine imkân vermiştir.

Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) ile Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin hem boy ve boy dağılımları belirlenmiş hem de elde edilen

sonuçlar SEM çalışmalarından elde edilen bulgular ile karşılaştırılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller deionize su ile seyreltilmiş ve yaklaşık 1 ml örnek çözeltisi polistiren küvet içerisine konularak, çözelti içerisinden lazer ışığının geçirilmesi ile partikül boyutu belirlenmiştir.

3.6.2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Magnetozomların, demir oksit ve HSA kaplı demir oksit nanopartiküllerin sahip oldukları kimyasal yapıları belirlemek için FTIR (Nicolet iS10, ABD) ile moleküler bağ karakterizasyonuyapılmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları değerlendirilerek, test edilen örneklerin içerdikleri fonksiyonel gruplar ve yapıdaki bağların durumu belirlenerek planlanan kimyasal yapıya ulaşıp ulaşmadığı incelenmiştir.

3.6.3. Manyetik Özelliklerinin Belirlenmesi

Magnetozomların, demir oksit ve HSA kaplı demir oksit nanopartiküllerin manyetik özelliklerini belirlemek amacıyla Elektro Spin Rezonans (ESR, Varian E-L X Bandspectrometer, Almanya) sonuçlarından yararlanılmıştır. Bu amaçla, vakum etüvünde kurutulmuş olan örneklerin 1000-5000 Gaussluk bir manyetik alanda altında ESR spektrumları çekilmiştir. Nanopartiküllerin ESR spektrumları elde edilirken, uygulanan mikrodalga frekansı 9.78 GHz'de sabit tutulurken manyetik alan değiştirilerek ESR eğrisi elde edilmiştir. Örneklerin yerleştirildiği elektromıknatısın oluşturduğu dış manyetik alan doğrusal olarak değişmektedir. ESR spektrumlarının alındığı koşullar çizelge 3.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. ESR spektrometre koşulları

Merkezi Alan	270 mT
Süpürme Alanı	500 mT
Mikrodalga Frekansı	9.78 GHz
Mikrodalga Gücü	0.159 mW
Modülasyon Frekansı	100 kHz
Modülasyon Genliği	1 G
Sıcaklık	Oda Sıcaklığı

3.7. Magnetozom ve İnsan Serum Albümin (HSA) Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Anti-EGFR ile Modifikasyonu

Nanopartiküllerin yüzeyine Anti-EGFR, NHS (N-Hydroxysuccinimide) ve EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) kullanılarak kovalent olarak bağlanmıştır. Her iki partikül için de aynı prosedür kullanılmıştır.

5mg nanopartikül ve 0,25mg EDC, 1ml PBS içinde süspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyon, 2 saat +4°C'de, ardından da 2 saat oda sıcaklığında (25 ^{O}C) sürekli sabit hızda karıştırılmıştır. 4 saat sonra nanopartikül solüsyonu 14.000 rpm, +4°C'de 25 dakika santrifüj edilerek, nanopartiküllerin yüzeyine tutunmamış olan EDC uzaklaştırılmıştır. EDC bağlı nanopartiküller PBS ile süspanse edilip, 0,2mg NHS eklenmiştir. Aynı şekilde 4 saat karıştırıldıktan sonra yüzeye tutunmayan NHS'in uzaklaştırılması için partiküller santrifüj edilmiştir. Son olarak, PBS ile süspanse edilen partiküllere 15µg Anti-EGFR AlexaFlour488 eklenerek 4 saat karıştırılmıştır. Nanopartiküller, santrifüjden sonra PBS ile süspanse edilerek daha sonraki işlemlerde kullanılmak için +4°C'de saklanmışlardır. Süpernatant, nanopartiküllere Anti-EGFR bağlanma veriminin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 519nm Emission, 488nm excitation dalga boyunda ölçüm yapılarak bağlanma yüzdesi hesaplanmıştır.

3.8. Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri

3.8.1. Hücrelerin Hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı) hücreleri çizelge 3.5.'de verilen koşullarda hücre kültür ortamlarında çoğaltılmıştır. İki günde bir kültür kabındaki eski besi yeri değiştirilmiş ve hücreler hücre kültür kabı zeminini kapladıklarında 1/5 oranında pasaj yapılmıştır.

Çizelge 3.5. MDA-MB-231 hücrelerinin hücre kültürü koşulları

Hücre Türü: MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı)

Kültür kabı: 75 cm^{3}'lük polistrenflask

MDA-MB-231 için kültür vasatı:

DMEM/F12

%10 FBS

%1 L-Glutamin

%1 Penesilin/Streptomisin

Rutin sub-kültür:	1/5
Kültür özelliği:	Monolayer
Toplam hacim:	14 ml
pH:	7,2-7,5
Sıcaklık:	37±0,5ºC
İnkübasyon ortamı:	% 5'lik CO_2 etüvü

3.8.2. Sitotoksisite Testleri (MTT)

M. gryphiswaldense bakterisinden izole edilen magnetozomların ve HSA ile kaplanan demiroksitnanopartiküllerin in vitrositotoksik etkileri MDA-MB-231 hücreleri üzerinde MTT testi ile belirlenmiştir. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolylblue) testi indirekt olarak hücre canlılığının ve böylelikle malzemelerin sitotoksisitesinin kolorimetrik olarak ölçülebildiği , hücre kültürü esasına dayanan bir testtir [92]. Hazırlanan malzeme, ilaç...vb. sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksisite oranları bulunabilir.

MTT testi için, MDA-MB-231 hücreleri 200µl besiyeri içinde $5x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ekilmiş ve bir gece etüvde inkübe edilmiştir. 30 dk. UV ışık altında bekletilerek steril edilen nanopartiküller, hücre kültür besiyeri ile farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 100, 250 ve 500µg/ml) seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu plaktaki besiyeri ve tutunmayan hücreler uzaklaştırılmış, hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlarda nanopartikül içeren besiyeri 200µl pipetlenmiş ve bir gece 37°C, %5 CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. İlk sıradaki 8 kuyucuk kontrol

olarak kullanılmış, buradaki hücrelere sadece besiyeri eklenmiştir. MTT, PBS içinde 5mg/ml olacak şekilde fenol-red içermeyen RPMI 1640 ile seyreltilmiştir. Hücrelere 200µl MTT solüsyonu eklenmiş, 4 saat karanlıkta inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri ve MTT solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 200µl 0,04M HCl içeren saf izopropanol ilave edilip, 30 dk. bekletildikten sonra plak 570nm'de okutulmuştur.

Partikül eklenmeyen kontrol amaçlı kullanılan sütundaki hücre absorbsiyonu %100 kabul edilir ve test kuyucuklarından elde edilen absorbansların ortalamaları ile karşılaştırılarak, sitotoksisite oranı belirlenmiştir.
Bunun için; OD(Test Kuyucuğu)x100/OD(Kontrol Kuyucuğu) formülü kullanılmıştır.

3.8.3. Akım Sitometrisi (Flow Sitometri) ile Hücresel Alım Çalışmaları

Flow Sitometri; akışkan bir sıvı içerisinde hücrelerin veya biyolojik yapıların, fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak belirlenmesi veya bu yapıların tespit edilmesi için kullanılmaktadır. Akan bir sıvı içindeki hücrelerin, alıcı bir cihaz tarafından tek sıra kolondan geçirilmesi ve bu sırada hücrelerin özelliklerinin ölçüldüğü bir yöntemdir. Son zamanlarda; flow sitometri floresan özelliğe sahip nanopartiküller ile etkileştirilen hücrelere bu partiküllerin bağlanma yüzdesini belirlemek amacıyla da kullanılmaktadır.

Bunun için HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ve magnetozomlar Anti-EGFR ile modifiye edilerek meme kanseri için spesifik hale getirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin hücrelere tutunma aktivitesi MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde denenmiştir. Bunun için;

Hücre kültür flaskına tutunmuş olan hücreler 5ml cellstripper kullanılarak yüzeyden kaldırılmıştır. Flaska 5ml cellstripper eklenip, 30 dk. $37^{O}C$'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı ışık mikroskobu ile kontrol edildikten sonra 8 ml besi yeri eklendikten sonra hücreler 600g'de 4 dk. santrifüj edilmiştir. Hücre sayımından sonra her bir tüpe 10^5 hücre ve farklı konsantrasyonlarda nanopartiküller eklenmiştir. Negatif kontrol olarak sadece hücre, pozitif kontrol olarakta 0,2 µg Anti-EGFR kullanılmıştır.

Hücreler ve nanopartiküller 30 dk. +4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 2 kez 600g'de 4 dk. santrifüj ile yıkanır ve en son 100µl besiyeri ile süspanse edildikten sonra FACS cihazında (BD Biosciences FACSCALIBUR) sonuçlar belirlenmiştir.

3.8.4. Stokastik Optik Rekonstrüksiyon Konfokal Mikroskobu (N-STORM) ile Nanopartikül-Hücre Etkileşiminin Görüntülenmesi

STORM (PALM olarak da adlandırılır), tek bir molekül floresan sinyalinin stokastik anahtarlama yöntemine göre tespit edilip görüntülenmesini temel alan süper çözünürlüklü optik mikroskopi tekniğinin bir türüdür. Lateral çözünürlükte 20nm, axial çözünürlükte ise 50nm çözünürlüğe ulaşabilmesi ile normal optik mikroskoplardan 10 kat yüksek çözünürlülük elde edilmesine olanak sağlamaktadır [87].

Anti-EGFR ile modifiye edilen nanopartiküllerin hücre yüzeyine tutunmasının daha yüksek çözünürlülükte görüntülenmesi için N-STORM mikroskobu kullanılmıştır. Bunun için; öncelikli olarak $3x10^4$ hücre/500µl cam lamel üzerine eklenmiş ve 37°C'de bir gece inkübe edilerek hücrelerin cam yüzeye tutunması sağlanmıştır. İnkübasyon bitiminde, hücreler 3 kez PBS ile yıkanır ve ardından farklı konsantrasyonlarda partiküller eklenir. Pozitif kontrol olarak sadece Anti-EGFR, negatif kontrol olarak sadece MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler 30 dk. 4°C'de inkübe edildikten sonra, yıkanıp %4 Paraformaldehit eklenmiştir. 20 dk. oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, yıkanan hücrelere hücre zarını boyamak amacıyla AlexaFlour 594 eklenmiştir. Ardından, yıkanan hücrelerin görüntüleri N-STORM ile alınmıştır.

3.9. Manyetik Nanopartiküllerin İn Vivo Değerlendirilmesi

3.9.1. Deney Hayvanları ve Deney Ortamı

Hazırlanan Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin MR kontrast arttırıcı ajan olarak kullanımı hayvan deneyleri ile değerlendirilmiştir. Hayvan çalışmaları için, Kobay Debey Hayvanları Laboratuvarı Yerel Etik Kurulu'nun 04.

03. 2014 tarihli toplantısında 106 nolu onay numarası ile etik kurul izni alınmıştır. Bu incelemede 20-25 gram ağırlığında, 6-8 haftalık yaşta yerli üretim Balb-c nude dişi farelerin kullanımı onaylanmıştır. Çalışmada toplam 30 hayvan kullanılmıştır. Deney hayvanları, 10'arlı kaferlerde 12 saat gece 12 saat gündüz olmak üzere %40 nem ve 20°C sıcaklığa sahip ortamda tutulmuştur.

3.9.2. Hücre Kültürü ve Tümör Hücrelerinin Farelere İmplantasyonu

Tümör hücreleri (MDA-MB-231) 3.8.1' de anlatıldığı gibi kültüre edilmiştir. Hücreler 75 cm^2 flaskın %85-90'ını kapladıktan sonra tripsin ile muamele edilmiş, mikroskopta sayımı yapıldıktan sonra antibiyotik içermeyen DMEM/F12 ile son hacim 4.10^6 hücre/150 µl olacak şekilde süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu, farelerin sağ alt meme bezi içerisine 30G iğneli 1 ml'lik enjektör (BD micro-fineplus) ile enjekte edilmiştir (Şekil 3.1.).

Şekil 3.1. MDA-MB-231 hücreleri farelerin sağ alt meme bezine enjekte edilmiştir. Enjeksiyon öncesi (sol) ve enjeksiyon sonrası (sağ).

Tüm gruplardaki fareler, çalışmanın başlangıcından sakrifikasyon işlemine kadar tümör gelişimi, hastalık ve sağkalım açısından takip edilmişlerdir. İlk hücre enjeksiyonunu takiben farelere 3 günde 1 hücre enjeksiyonuna devam edilmiştir. Tümör oluşumu saptandıktan sonra, her enjeksiyondan önce tümör çapları kumpas yardımı ile ölçülmüştür.

Tümör hacmi (mm^3) = (kısa kenar)^2 x uzun kenar / 2 formülü ile hesaplanmıştır [88].

3.9.3. Deney Grupları

Deney hayvanları çalışmalarında, 5'er hayvandan oluşan 6 grupta toplam 30 hayvan kullanıldı.

Kontrol grubu (n=5), farelere tümör oluşumundan 1 hafta sonra intravasküler olarak 3 ml PBS (fosfat tampon tuzu) enjekte edilmiştir. Tümör kontrol grubundaki farelere (n=5), tümör oluşumundan sonra herhangi bir işlem uygulanmamış ve pozitif kontrol olarak görüntülenmiştir. Diğer 4 gruptaki farelere (n=5), tümör oluşumundan 1 hafta sonra intraperitonel olarak, toplam hacim 200µl içerisinde 300µg nanopartikül enjekte edilmiştir. Bunun için; magnetozom, magnetozom-anti-EGFR, HSA-Fe_3O_4 ve HSA-Fe_3O_4-anti-EGFR hazırlanıştır. Operasyonların tamamı aseptic koşullar altında yapılmıştır.

3.9.4. Farelerde Oluşan Meme Tümör Dokusunun Manyetik Resonans ile Görüntülenmesi

MDA-MB-231 tümör hücrelerinin enjeksiyonundan 1 hafta sonra oluşturulan tümörlerin varlığı ve nanopartiküllerin kontrast arttırıcı ajan olarak kullanımının değerlendirilmesi için hayvanlar 3 tesla magnetik rezonans görüntüleme aleti (Tim Trio System, Siemens, Erlangen, Almanya) ile görüntülenmiştir.

Çalışma sonunda hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Hayvanların meme tümör dokusu, kalp, akciğer, karaciğer, dalak ve böbrekleri

alınarak sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra histopatolojik incelemeler için -80°C'de saklanmıştır.

3.9.5. Histolojik İnceleme

Taze gönderilen dokular, frozen cihazında kesit alınarak floresan mikroskopta herhangi bir boyama yapılmaksızın incelenip ve görüntülenmiştir. Frozen (Thermo) kesit alındıktan sonra çözdürülen dokular, rutin paraffin takip işlemi sonrasında hematoksilen eosin boyanarak ışık mikroskobunda (Olympus BX51-Floresan) incelenmiştir.

DENEYSEL BULGULAR

4.1. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu

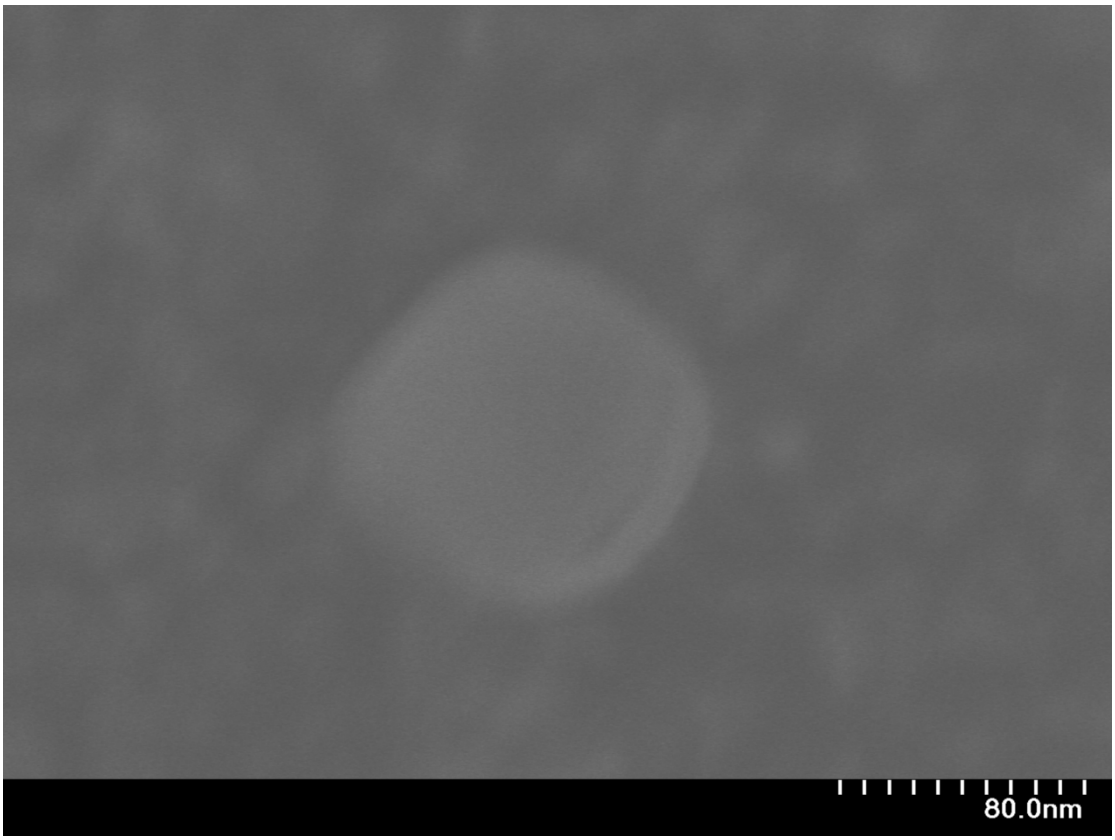
4.1.1.1. Magnetozomların Boyut Dağılımı ve Morfolojik Özellikleri

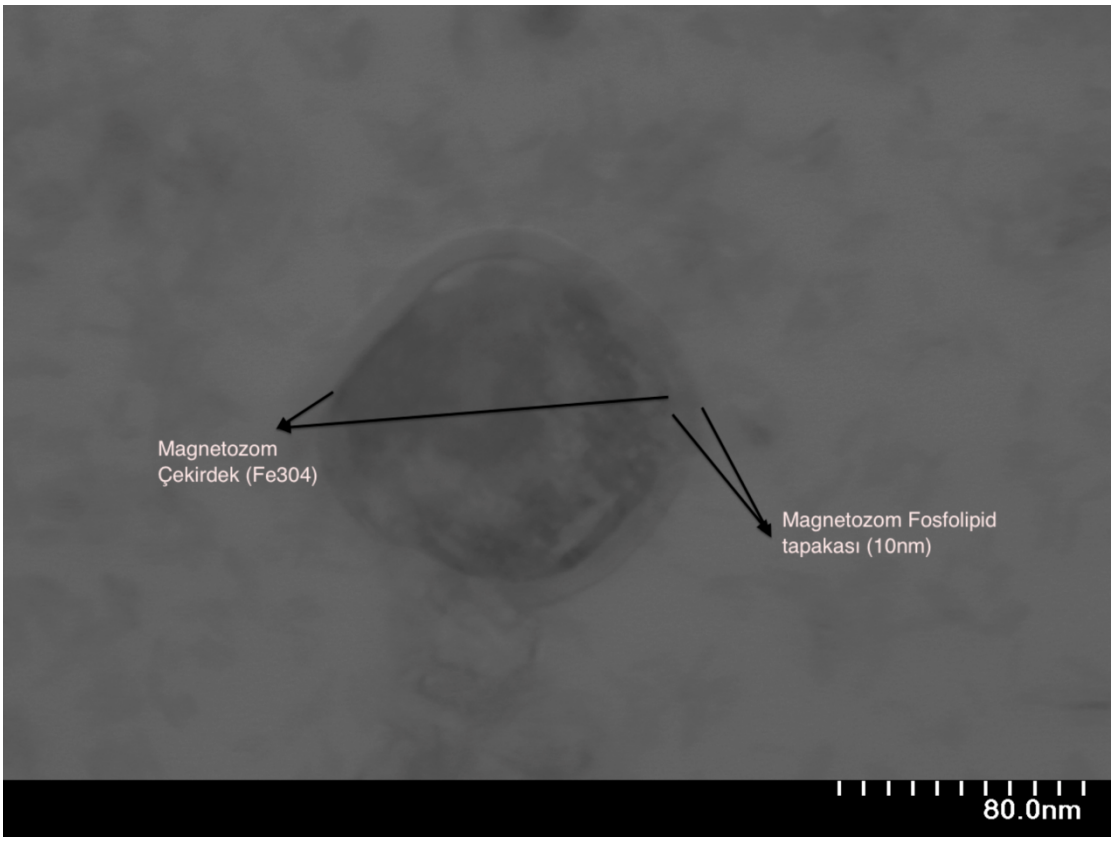
Hazırlanan tez kapsamında, *M. gryphiswaldense* bakterisinden izole edilen magnetozomların yüzey yüklerinin belirlenmesi amacıyla Zeta Sizer ölçümleri ve morfolojik özellikleri için de STEM görüntüleri alınmıştır.

Zeta sizer sonuçlarına göre magnetozomların pH 7,4 PBS içindeki yük potansiyeli -19,47±4,5mV olarak bulunmuştur. Buradaki yük potansiyeli sonuçlarından elde edilen veriler literatür ile uyuşmaktadır [77, 89].

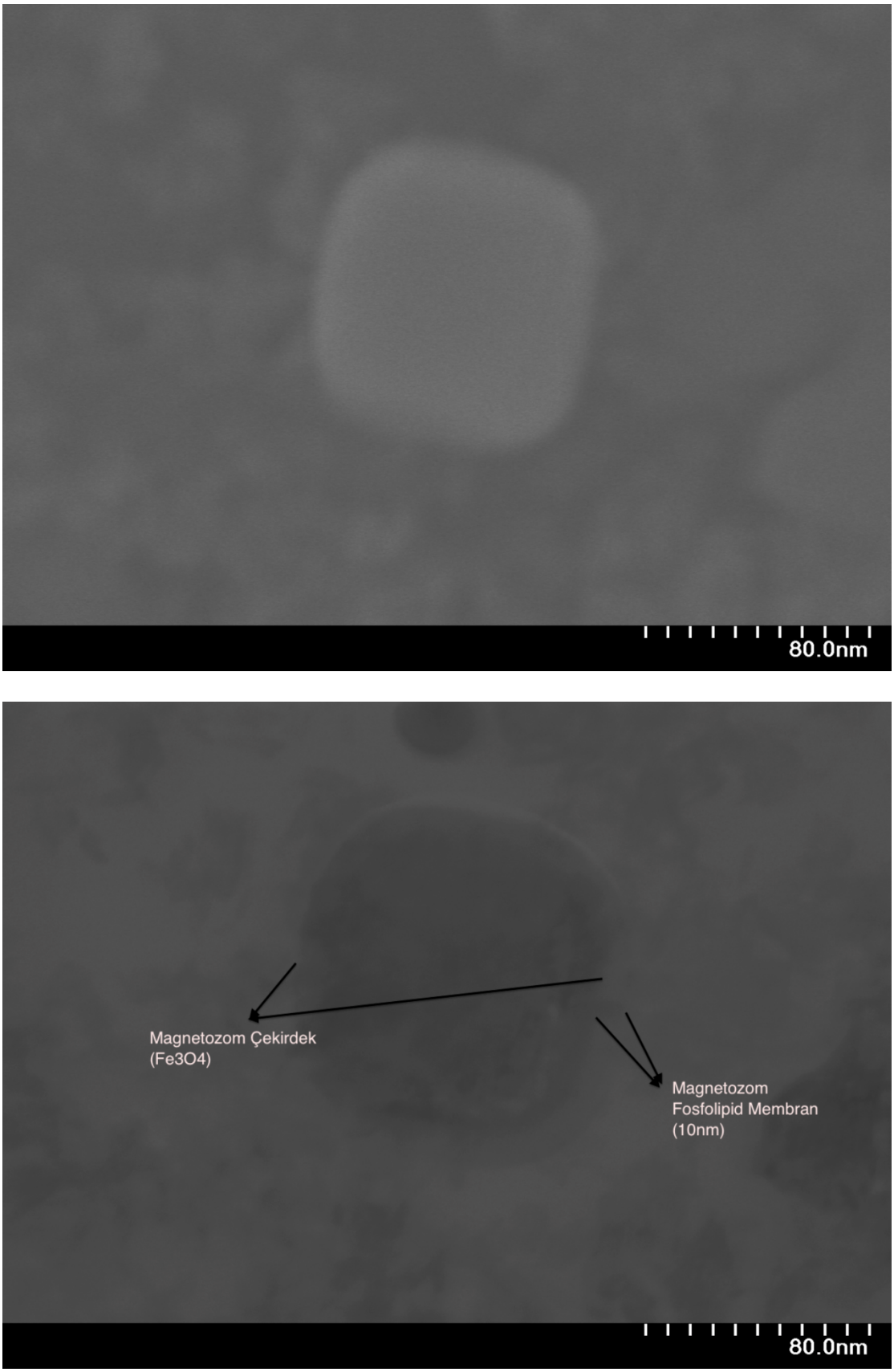
Elde edilen STEM görüntüleri, magnetozomların ortalama büyüklüklerinin yaklaşık olarak 100±10nm dolayında olduğunu göstermektedir. STEM ile partiküllerin hem SEM hem de TEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, magnetozomların çekirdek kısmı yaklaşık 90±10nm ve bunu çevreleyen fosfolipid tabakası da 10±1nm'dir.

Elde edilen magnetozomlara ait STEM görüntüleri Şekil 4.1. A. ve B.'de sunulmuştur.





Şekil 4.1. A Magnetozomların STEM Görüntüleri



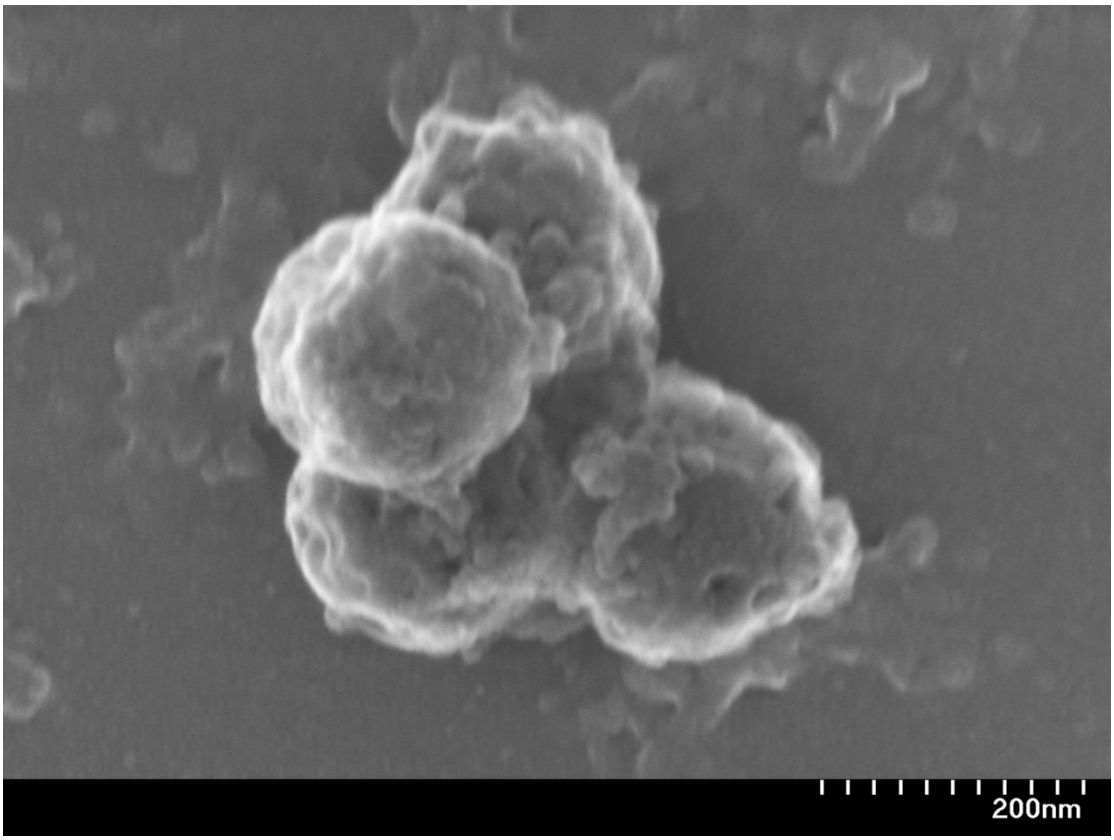
Şekil 4.1. B Magnetozomların STEM Görüntüleri

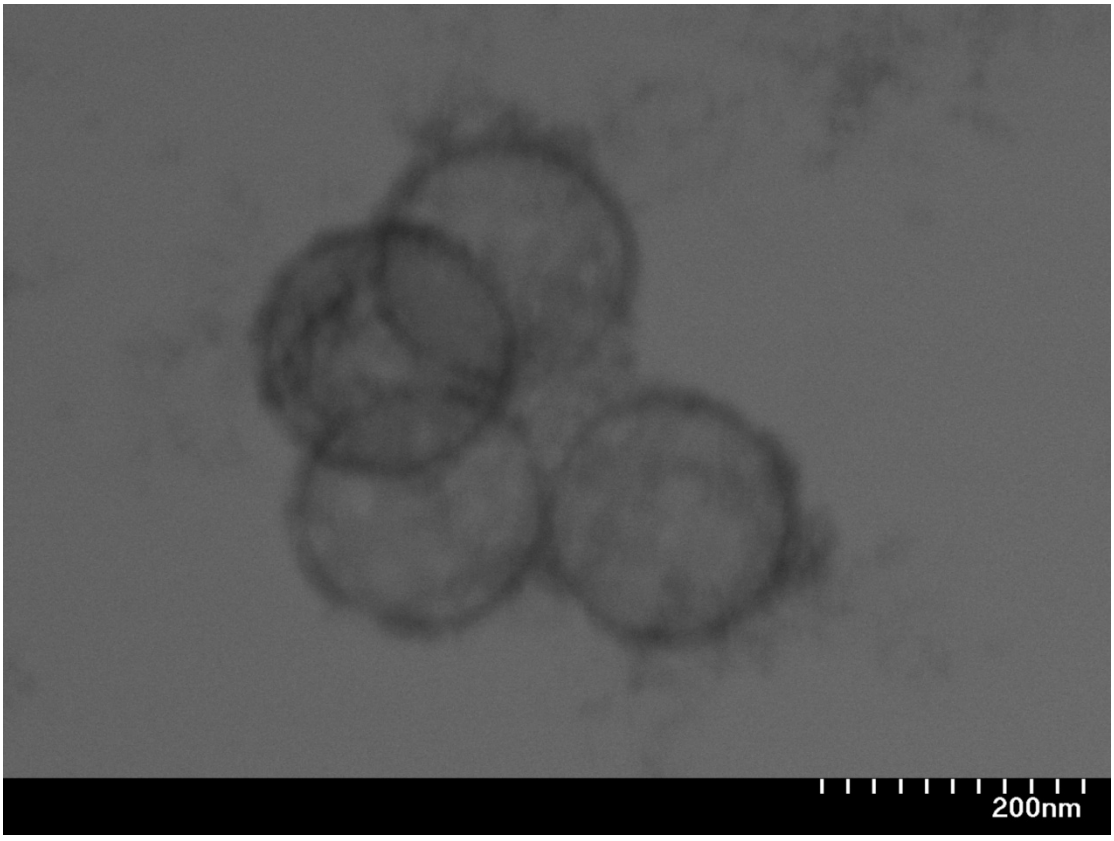
4.1.1.2. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Boyut Dağılımı ve Morfolojik Özellikleri

Hazırlanan tez kapsamında, ikili çöktürme yöntemiyle elde edilip HSA ile kaplanan nanopartiküllerin yüzey yüklerinin belirlenmesi amacıyla Zeta Sizer ölçümleri ve morfolojik özellikleri için de STEM görüntüleri alınmıştır.

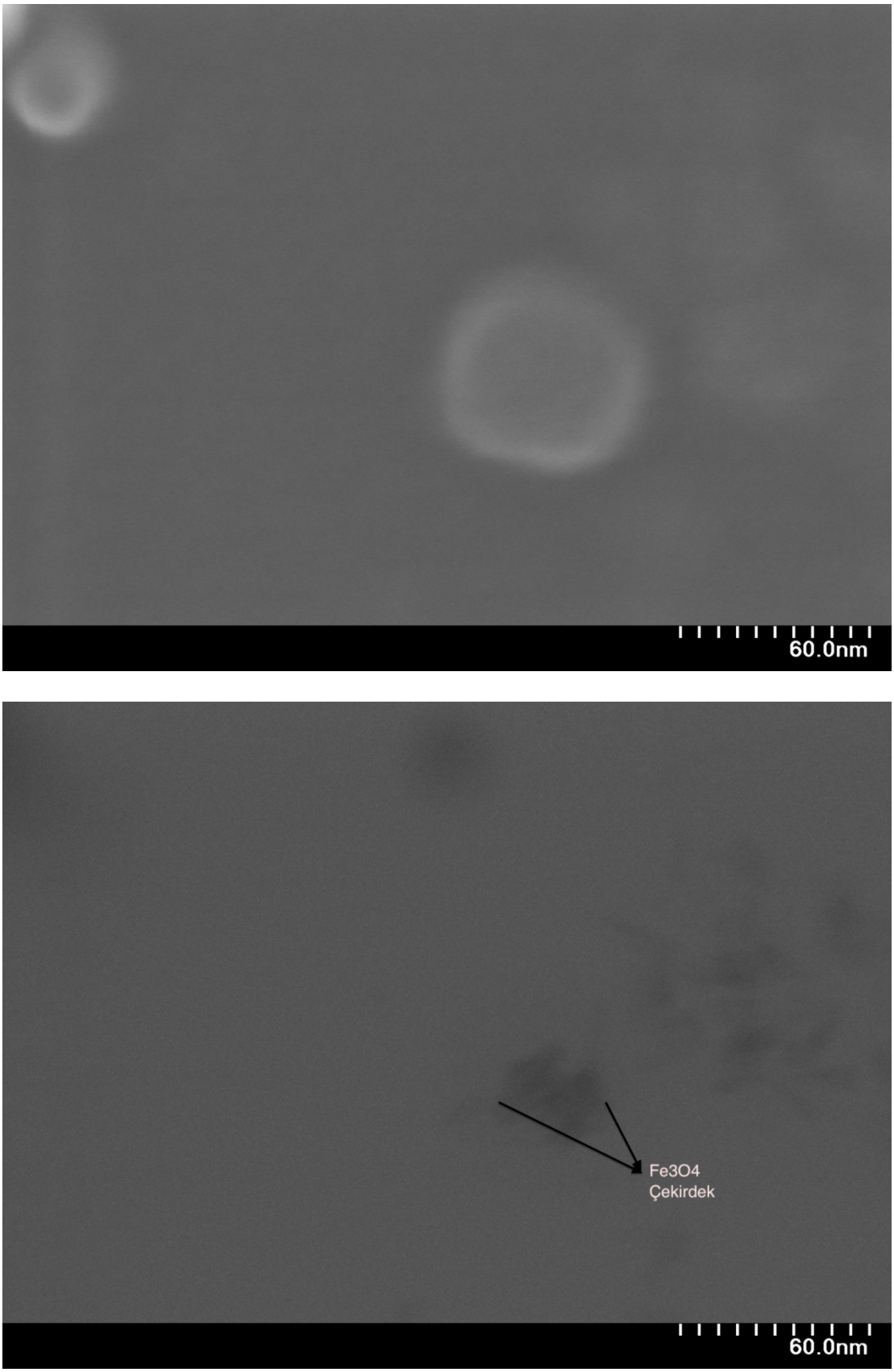
Zeta sizer sonuçlarına göre HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin pH 7,4 PBS içindeki yük potansiyeli -8,39±0,173mV olarak bulunmuştur. Buradaki yük potansiyeli sonuçlarından elde edilen veriler literatür ile uyuşmaktadır [90].

Tez kapsamında kullanılan HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerinden STEM görüntüleri alınmıştır. HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin içte yer alan çekirdek kısmının net görüntülenebilmesi için; hem boş HSA nanopartiküllerin hem de HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin STEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen STEM görüntülerinden, boş nanopartiküllerin iç kısmı açık renkte görüntülenirken; HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin iç kısmındaki koyu renkli bölge çekirdek kısmında demiroksitlerin olduğunu ispatlamaktadır. Boş HSA nanopartiküllerin ortalama büyüklükleri yaklaşık 200±15nm iken; HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin ortalama büyüklükleri yaklaşık olarak 70±10nm dolayındadır. Partiküllerin çekirdek kısmı yaklaşık 25±10nm ve bunu çevreleyen HSA tabakası da 50±10nm'dir. Boş HSA ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin STEM görüntüleri şekil 4.2. ve şekil 4.3.'de gösterilmektedir.





Şekil 4.2. HSA Nanopartiküllerin STEM Görüntüleri

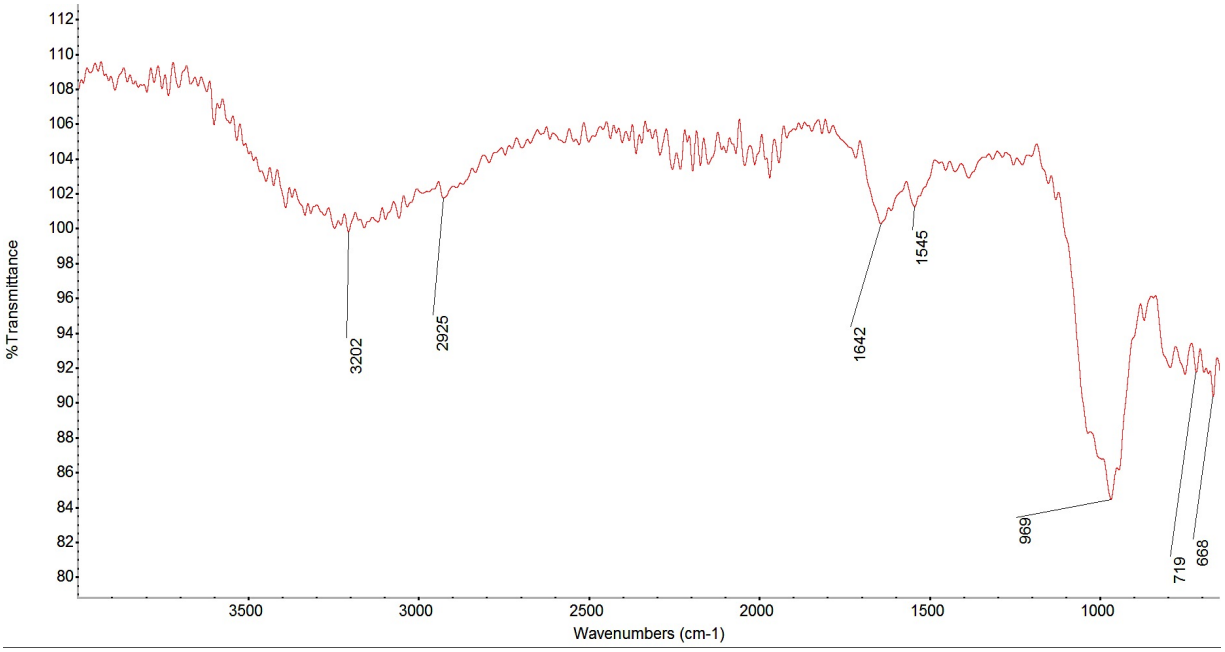


Şekil 4.3. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin STEM Görüntüleri

4.1.2. Magnetozomve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Karakterizasyon (FTIR Analizi) Çalışmaları

4.1.2.1. Magnetozomların FTIR Analizi

M. gryphiswaldense bakterisinden izole edilen magnetozomların fizikokimyasal karakterizasyonu için FTIR spektrumları çekilmiş ve sonuçlar hem literatür hem de ticari Fe_3O_4'den elde edilen pikler ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.4.'de verilmiştir. Spektrumlarda görülen karakteristik pikler çizelge 4.1.'de sunulmuştur.



Şekil 4.4. Magnetozomların FTIR spektrumları

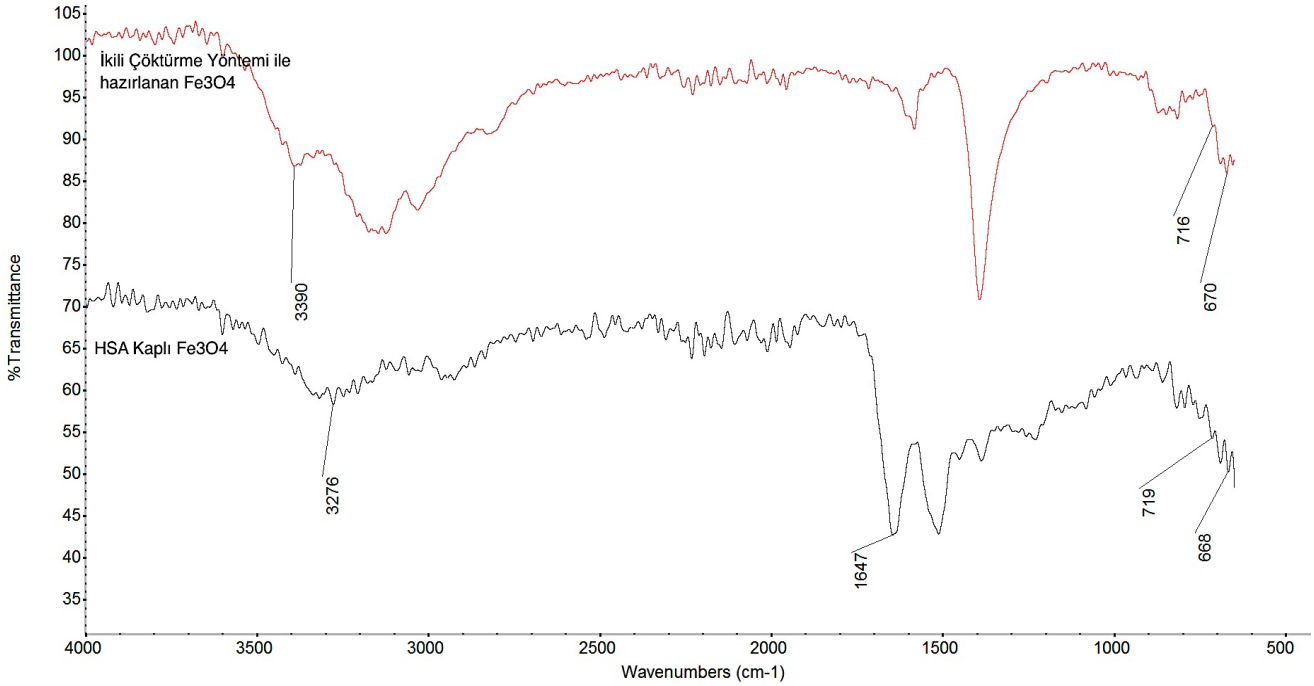
Çizelge 4.1. Magnetozomların FTIR karakteristik pikleri

Karakteristik Pik	**Dalga Sayısı (cm^{-1})**
C-H gerilimi (doymamış)	3222 cm-1
C-H gerilimi (doymuş)	< 3000 cm-1
C = O ve C = C gerilimi	1642 cm-1; 1545 cm-1
Fe-O gerilimi	670 cm-1

Fe-O geriliminini oluşturduğu 670cm^{-1} dalga sayısındaki pik magnetozomların demir çekirdek bölgesinden kaynaklanmaktadır. C=O, C=C ve C-H gerilimleri magnetozomun etrafındaki fosfolipit tabakasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyuşmaktadır [91].

4.1.2.2. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin FTIR Analizi

İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen ve insan serum albümini (HSA) ile kaplanan nanopartiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonu için FTIR spektrumları çekilmiş ve sonuçlar hem literatür karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.4.'de verilmiştir. Spektrumlarda görülen karakteristik pikler çizelge 4.2.'de sunulmuştur.



Şekil 4.5. Fe_3O_4 ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin FTIR spektrumları

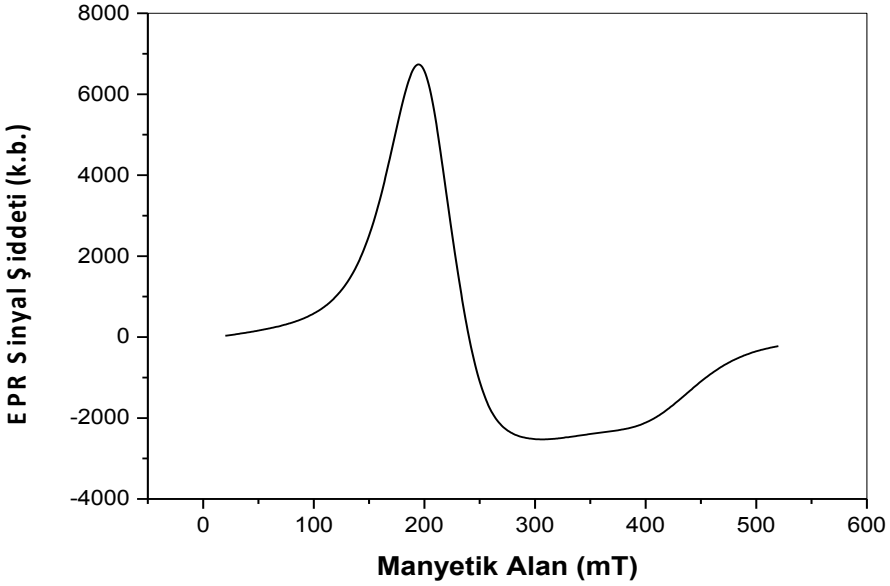
Çizelge 4.2. Fe_3O_4 ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin FTIR karakteristik pikleri

Karakteristik Pik	**Dalga Sayısı (cm $^{-1}$)**
OH gerilimi	3455 cm-1
C-H gerilimi	1600 cm-1
Fe-O gerilimi	670 cm-1

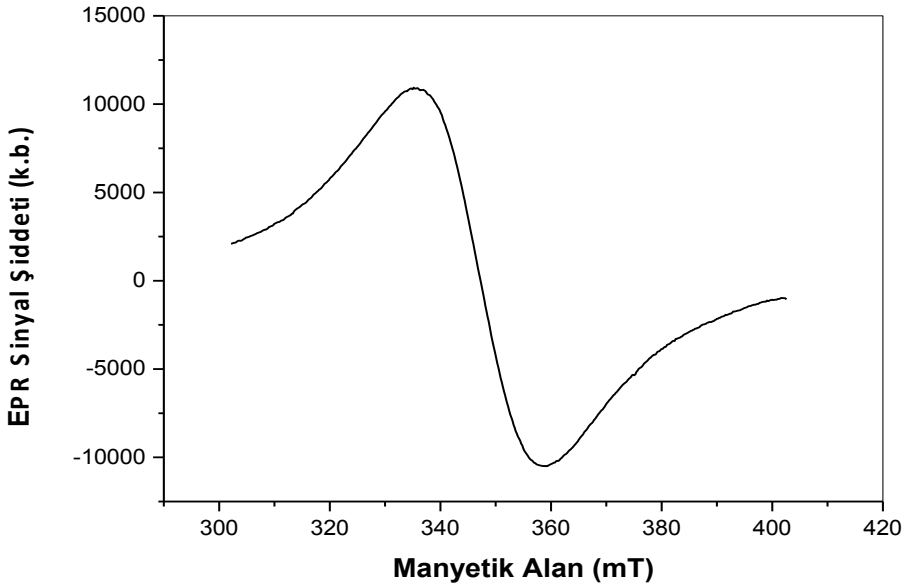
670 cm-1 dalga sayısı Fe-O geriliminden kaynaklanmaktadır. Bu pik ikili çöktürme yöntemi ile hazırlanan ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin çekirdek bölgesindeki demirden kaynaklanmaktadır. Bu da yapıda demirin olduğunu ispat etmektedir. 1600 cm-1'de pik veren C-H gerilimi de insan serum albümininden gelmektedir.

4.3. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Manyetik Özelliklerinin (ESR Analizi) Karakterizasyonu

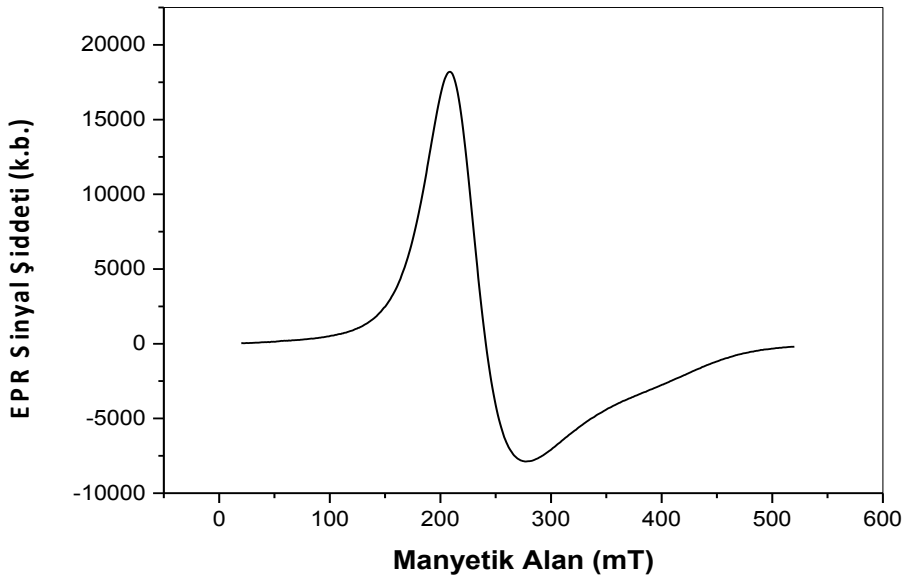
ESR spektrumlarından elde edilen verilen şekil 4.6.'da verilmiştir. ESR spektral parametreleri olarak; spektroskopik yarılma çarpanı (g-faktörü) ve tepeden-tepeye genişlik (ΔHpp) Çizelge 4.3.'de özetlenmiştir.



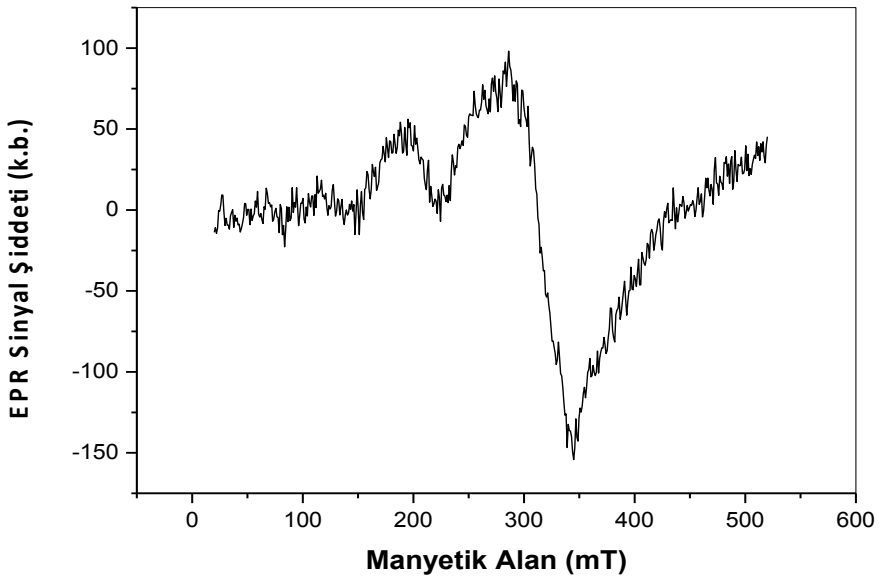
Şekil 4.6.A. Ticari Fe_3O_4'den elde edilen ESR Spektrumu



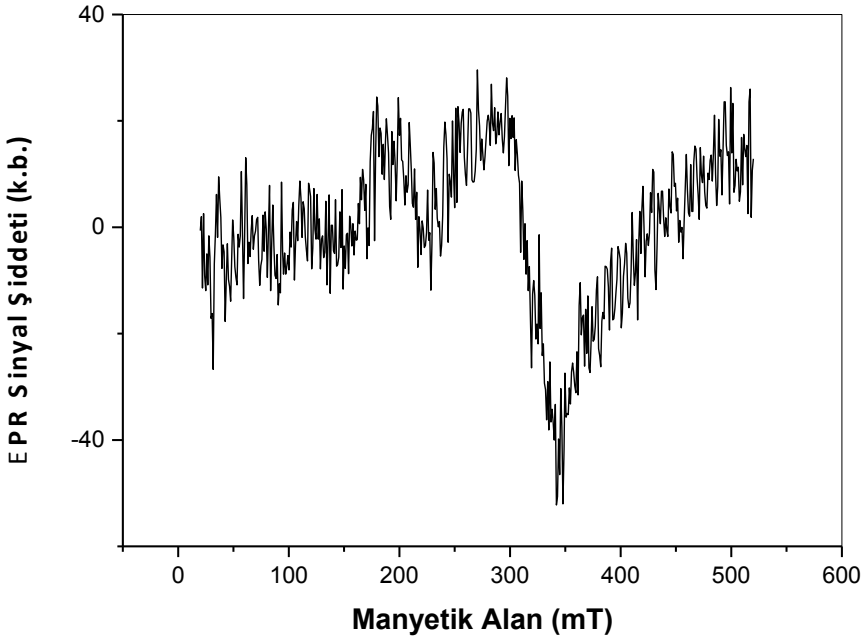
Şekil 4.6.B. İkili Çöktürme Yöntemi İle Sentezlenmiş Fe_3O_4'den elde edilen ESR Spektrumu



Şekil 4.6.C. Magnetozom'dan elde edilen ESR Spektrumu



Şekil 4.6.D. HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerde elde edilen ESR Spektrumu



Şekil 4.6.E. HSA polimerinden elde edilen EPR Spektrumu

Çizelge 4.3. Partiküllerin spektroskopik yarılma çarpanı (g-faktörü) ve tepeden-tepeye genişlik (ΔHpp)

Örnekler	g - factor	ΔH_{pp} (mT)	Yorum
Fe_3O_4	2.95	150	**Fe3O4** Geniş bir manyetik alan aralığına yayılmış, şiddetli, iyi çözünmemiş ve izotropik olmayan tekli ESR spektrumu gözlenmiştir. Bu ferrites için beklenen bir ESR sinyaldir.
İkili Çöktürme Yöntemi İle Sentezlenmiş Fe_3O_4	2.0087	25	**Synthesized Fe_3O_4** Görece dar bir manyetik alan aralığına yayılmış, şiddetli, izotropik tekli bir EPR spektrumu kaydedilmiştir.
Magnetozom	2.89	67	**Magnetozom** Şiddetli, iyi çözünmemiş ve izotropik olmayan tekli EPR spektrumu kaydedilmiştir. Gözlenen spektrum (g = 2.89), örneğin ferrit yapıda olduğunun göstergesidir.
HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküller	2.22 (spektrumun ortası)	63 (spektrumun ortası)	**HSA- Fe3O4** Örneğin EPR spektrumu; 400 mT manyetik alan değerine yayılmış, spektrumun orta değeri için spektroskopik parametreleri g = 2.22 ve ΔH_{pp} = 63 mT olarak belirlenmiş, iyi çözünmemiş, düşük şiddetli tekli spektrum şeklindedir. EPR sinyal şiddetinin düşük olması, örneğin kaplanmış olması nedeni ile, beklenen bir sonuçtur.
HSA	2.22 (midpoint)	63 (midpoint)	**HSA** Örneğin EPR spektrumu; 400 mT manyetik alan değerine yayılmış, spektrumun orta değeri için belirlenen spektroskopik parametreler g = 2.22 ve ΔH_{pp} = 63 mT olan, iyi çözünmemiş ve çok düşük şiddetli tekli bir sinyalden oluşmaktadır. Örneğin EPR spektrumunun gürültüden güçlükle ayırt edilecek şekilde düşük sinyal şiddetine sahip olması, beklentiye uygun olarak, kaplama malzemesinde ihmal edilebilir düzeyde manyetik birim olduğunun göstergesidir.

4.4. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Anti-EGFR ile Modifikasyonu

Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan Anti-EGFR miktarı; bağlanma öncesi reaksiyona sokulan Anti-EGFR miktarı ve reaksiyon sonunda nanopartiküllerin yüzeyine bağlanmayan Anti-EGFR'ın UV spektrofotometrede eksitasyon 499nm ve emisyon 519nm'de ölçülen absorbans değerleri farkından yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\textbf{\% Bağlanma*}: \frac{\text{Abs "bağlanma öncesi örnek" - Abs "bağlanma sonrası örnek"}}{\text{Abs "bağlanma öncesi örnek"}} \times 100$$

**Anti-EGFR bağlanm akapasitesi her 5 miligram manyetik nanopartikül için geçerlidir.*

Yapılan çalışmalar sonucunda; Anti-EGFR'ın HSA kaplı demiroksit nanopartiküllere bağlanma oranı %50 iken magnetozomlara bağlanma oranı %65 bulunmuştur.

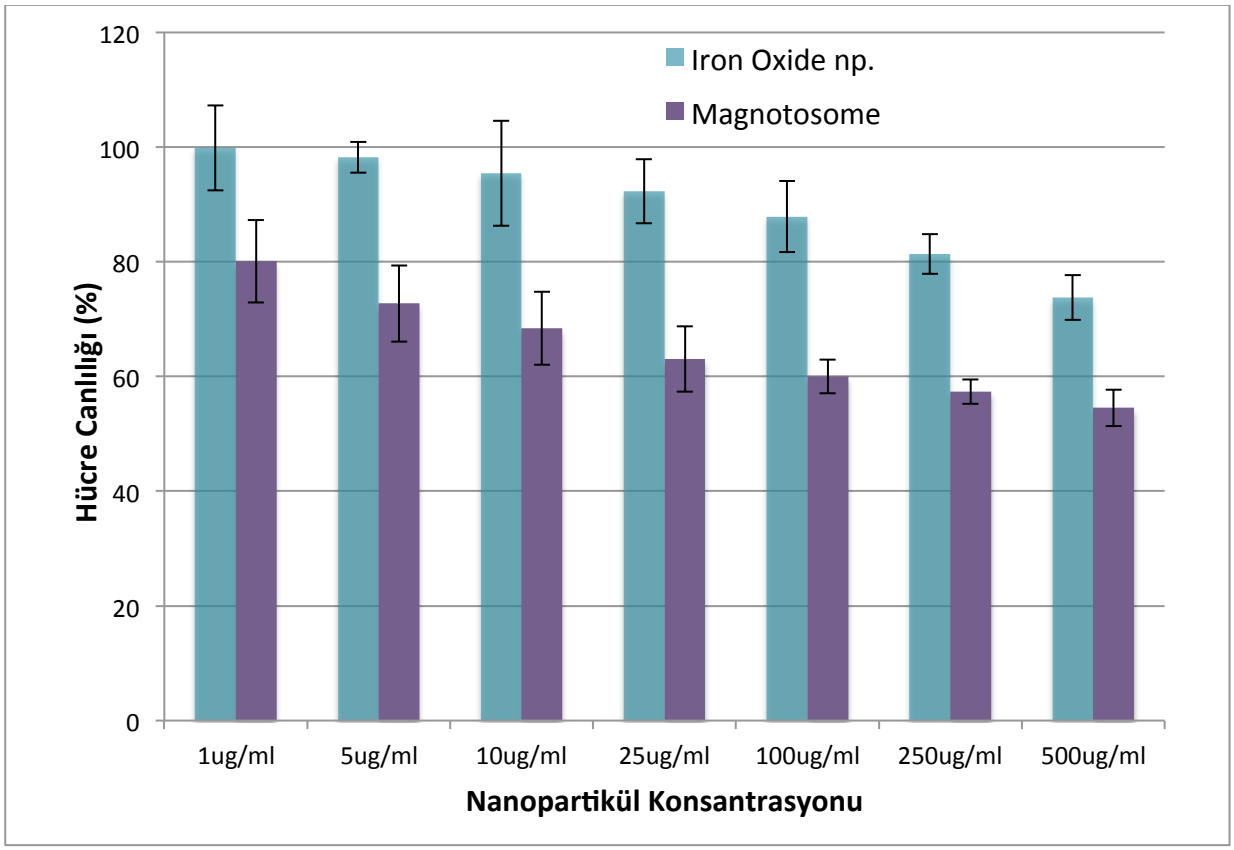
4.5. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Hücre Etkileşimleri

4.5.1. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Sitotoksisite Çalışmaları

Tez kapsamında kullanılan partiküllerin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlardaki magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bunun için; 1, 5, 10, 25, 100, 250 ve 500µg/ml konsantrasyonlarda, Anti-EGFR ile modifiye nanopartiküller kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plağın herbir kuyucuğuna $5x10^3$ MDA-MB-231 hücre ekilmiş ve bir gece $37^{O}C$ etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler ışık mikroskobunda kontrol edilmiş ve farklı konsantrasyonlardaki modifiye magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartikülleri içeren besiyeri hücrelerin üzerine eklenmiştir. Bir gece etüvde inkübe edildikten sonra bölüm 3.8.2'de anlatıldığı gibi sitotoksisite testi yapılmış ve sonuçlar çizelge 4.4. ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

	HSA Kaplı Demiroksit np. %	**Magnetozom %**
1µg/ml	99,732±7,427	79,991±7,209
5µg/ml	98,046±2,672	72,602±6,636
10µg/ml	95,313±9,171	68,265±6,36
25µg/ml	92,152±5,575	62,962±5,731
100µg/ml	87,717±6,205	59,943±2,96
250µg/ml	81,216±3,435	57,273±2,142
500µg/ml	73,636±3,875	54,452±3,179



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

Sitotoksisite sonuçlarına göre; modifiye magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküller karşılaştırıldığında, magnetozomların MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde daha yüksek oranda toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Örneğin; 500µg/ml konsantrasyondaki magnetozom ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin %54,452'si canlı iken, aynı konsantrasyonda HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile inkübe edilen hücrelerin %73,636'sı canlı kalmıştır. Aynı zamanda, her iki partikülde de konsantrasyon miktarı arttıkça hücreler üzerindeki sitotoksik etki artmaktadır. Örneğin; 1µg/ml konsantrasyondaki HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin %99,732'si canlı iken, 500µg/ml ile inkübe edilen hücrelerin %79,991'i canlıdır.

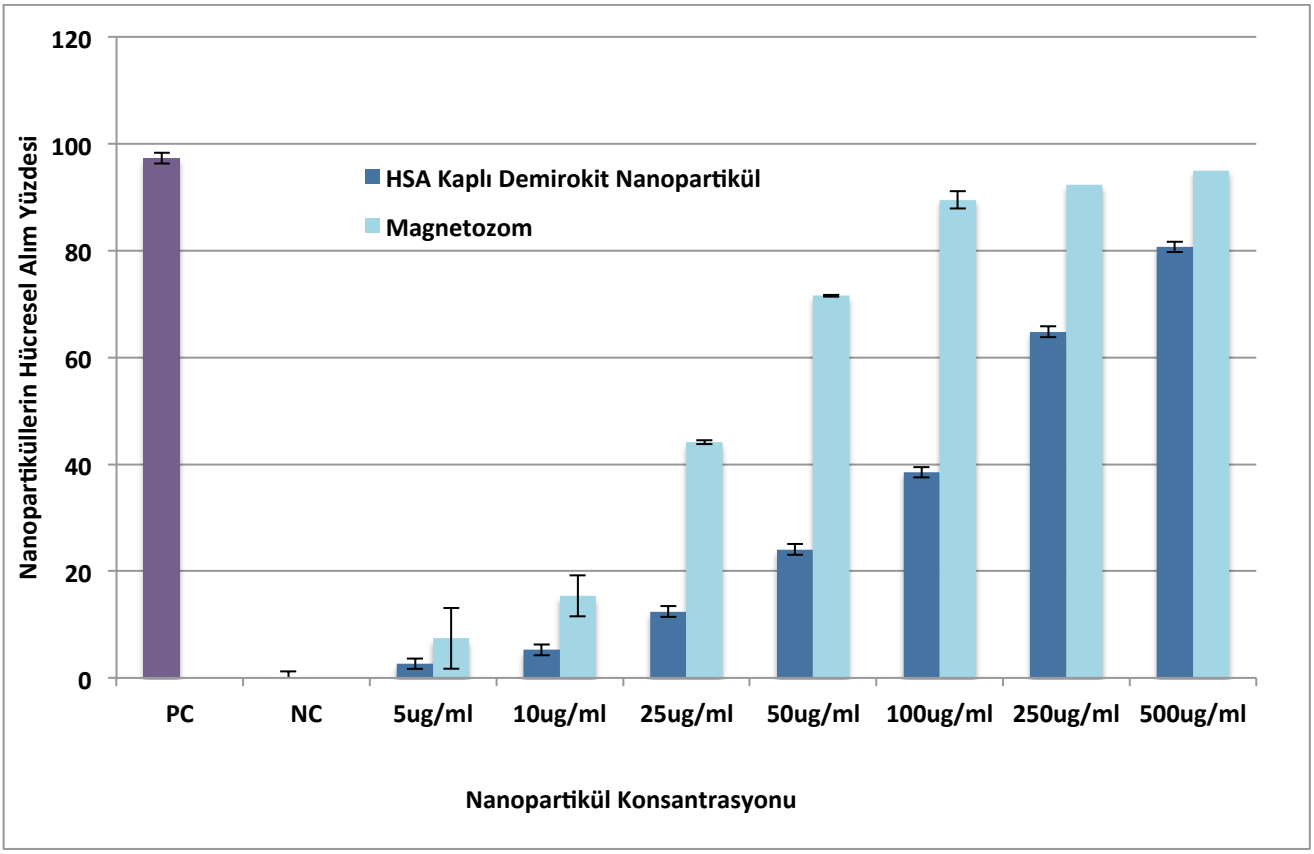
4.5.2. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Akım Sitometrisi Çalışmaları

Tez kapsamında kullanılan partiküllerin MDA-MB-231 hücrelerine tutunma oranının belirlenmesi akım sitometrisi ile belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile akım sitometri çalışmaları yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki partiküller hücreler ile inkübe edilerek (5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500µg/ml) hücresel tutunmaları belirlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.5. ve şekil 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Anti-EGFR ile modifiye HSA kaplı demiroksit nanopartikül ve magnetozomların MDA-MB-231 hücrelerine tutunma yüzdeleri

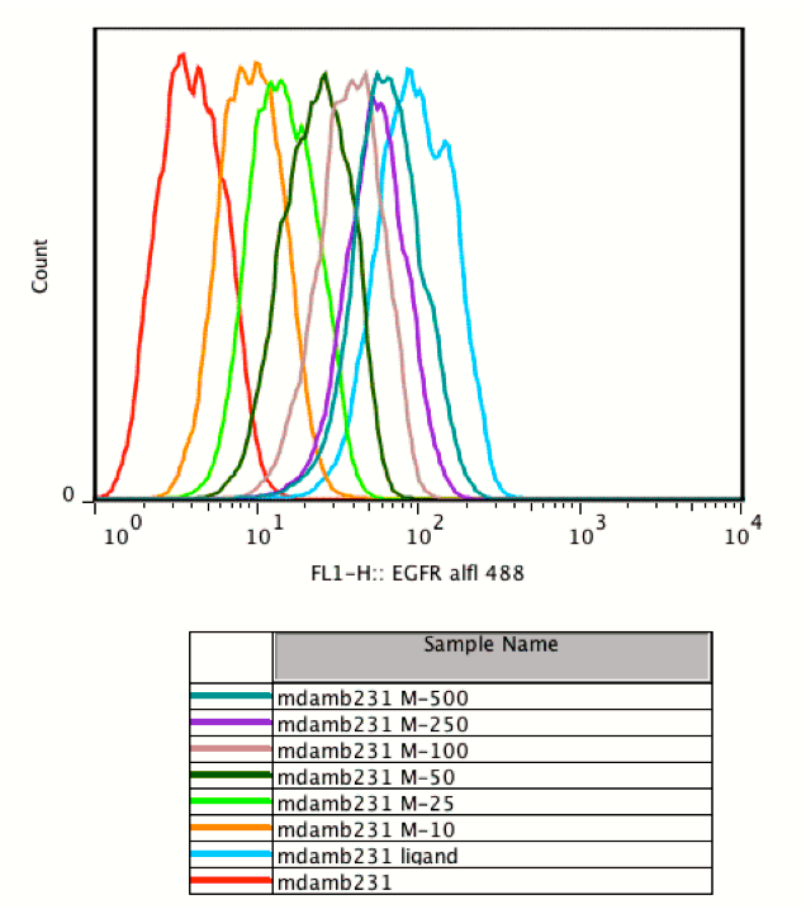
	HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküller %	**Magnetozom %**
PC (Anti-EGFR)	97,333±0,499	97,333±0,499
NC (Hücre-MDA-MB-231)	0,176±0,135	0,176±0,135
5µg/ml	2,667±0,312	7,400±0,294
10µg/ml	5,243±0,720	15,367±0,873
25µg/ml	12,433±1,893	44,133±5,681

50µg/ml	24,067±3,321	71,567±3,866
100µg/ml	38,500±4,940	89,500±0,374
250µg/ml	64,800±4,907	92,300±0,163
500µg/ml	80,700±4,859	95,000±1,594



Şekil 4.8.A. Farklı konsantrasyonlarda Anti-EGFR ile modifiye HSA kaplı demiroksit nanopartikül ve magnetozomların MDA-MB-231 hücrelerine tutunma yüzdeleri

Akım sitometri sonuçlarına göre; magnetozomların MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine tutunma oranı HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerden daha yüksektir. Örneğin; 100µg/ml ve üzeri konsantrasyonlardaki magnetozomların hücrelere tutunma oranı %90'ın üzerindeyken, 500µg/ml konsantrasyondaki HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin tutunma oranı %80'dir.

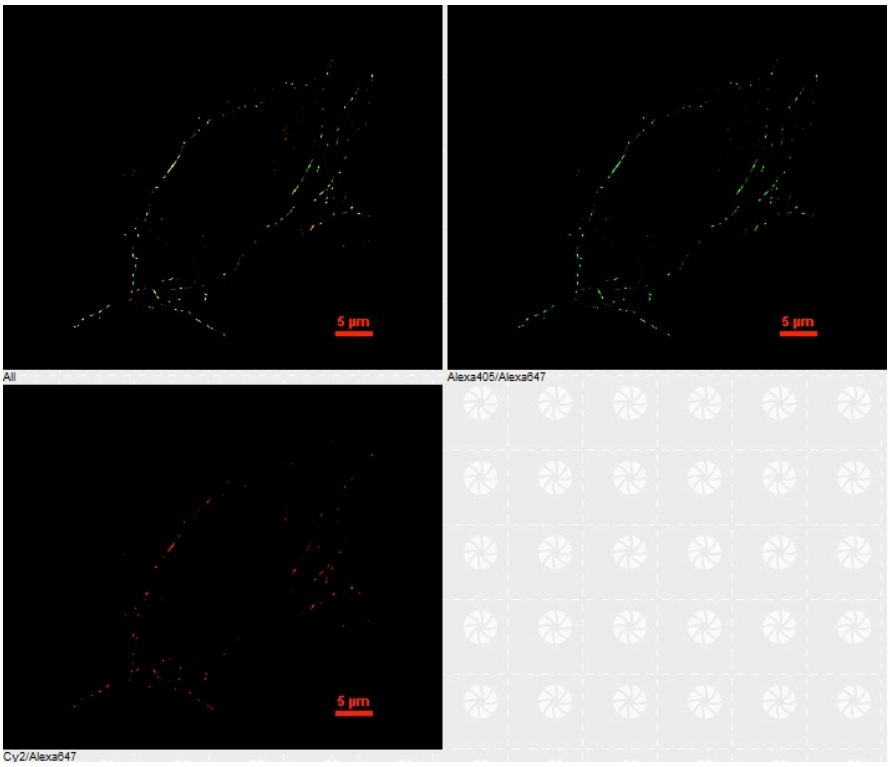


Şekil 4.8.B. Farklı konsantrasyonlarda Anti-EGFR ile modifiye magnetozomların MDA-MB-231 Hücrelerine tutunma miktarı

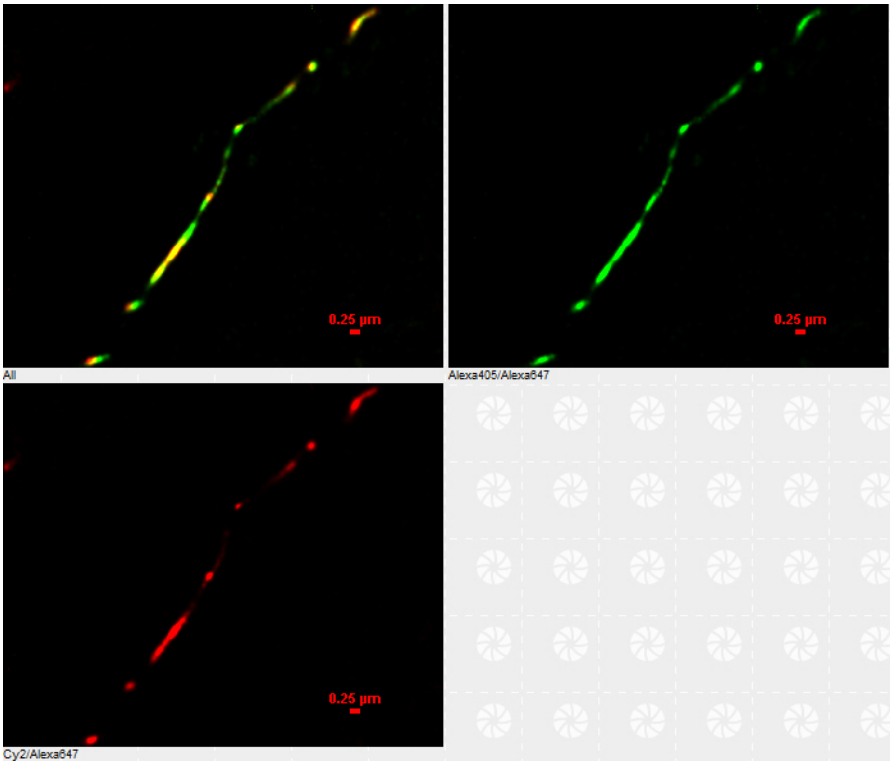
4.5.3. Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı ile Konfokal Mikroskopu Çalışmaları

HSA kaplı demiroksit ve magnetozom nanopartiküllerinin MDA-MB-231 hücrelerine spesifik hedeflenmesi N-STORM konfokal mikroskobu görüntüleri ile kanıtlanmıştır. Hücreler 488nm ve 590nm lazer eksitasyon dalga boyları kullanılarak N-STORM konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Nanopartikülleri (alexafluor 488) ve hücre membranını (alexafluor 594) işaretlemek için kullanılan floresans emisyonları farklı kanallarda toplanmış ve herbir taramadan elde edilen görüntülerdeki yeşil (alexafluor 488) ve kırmızı (alexafluor 594) renkler üstüste yerleştirilerek nanopartiküllerin hücre membranına tutunduğu yerlerde sarı renk elde edilmiştir. 10 ve 100μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü şekil 4.7.A. ve B.'de

verilmiştir. 10 ve 100μg magnetozom ile inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü şekil 4.8.'de verilmiştir.

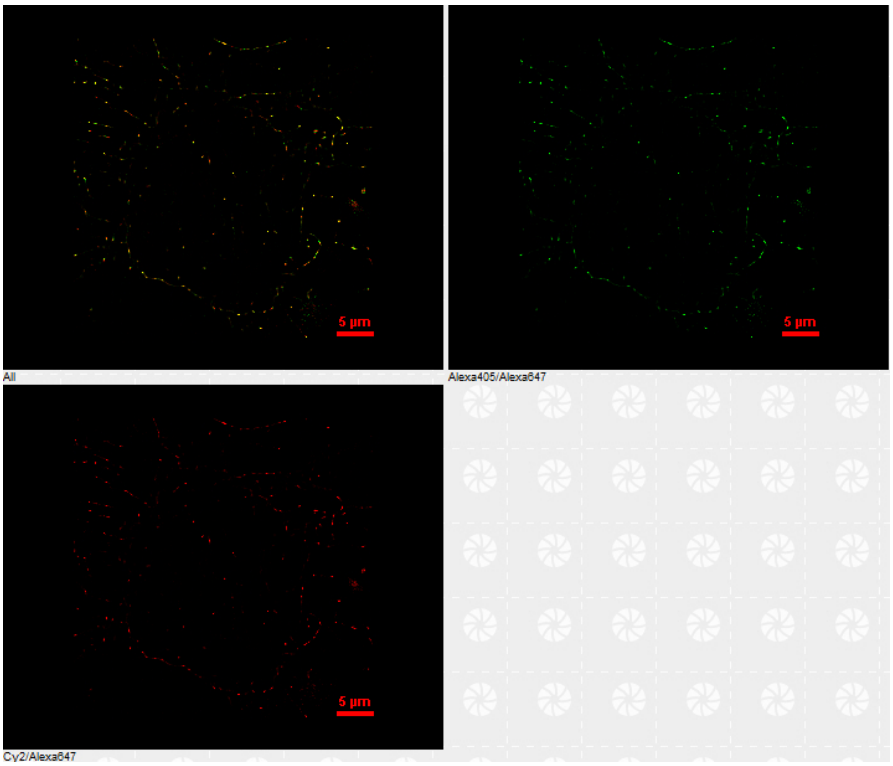


10μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller

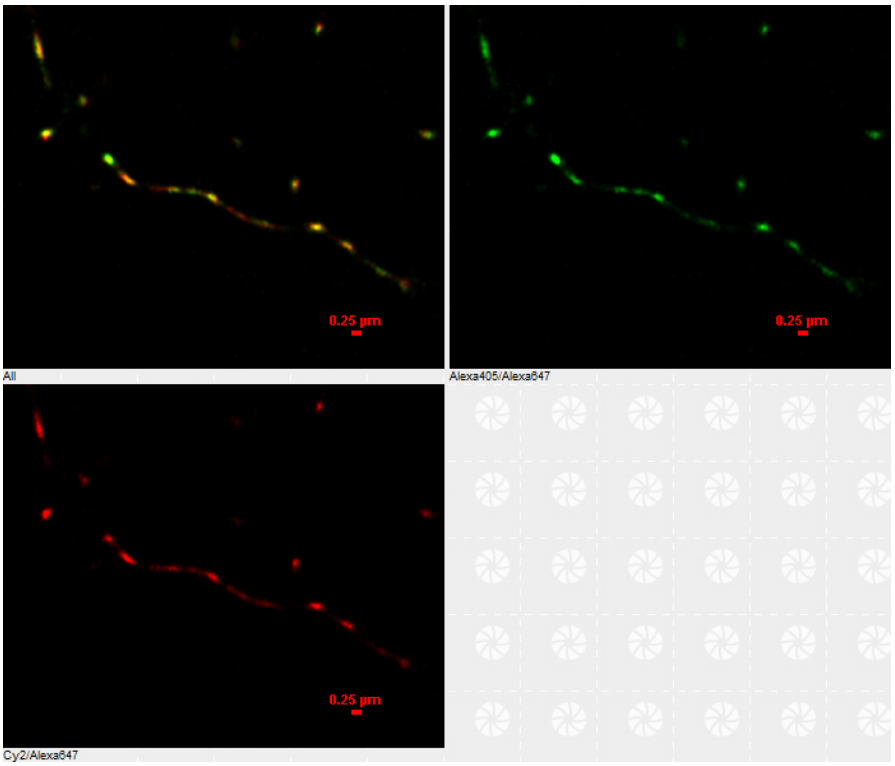


10μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller

Şekil 4.9.A. 10μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü

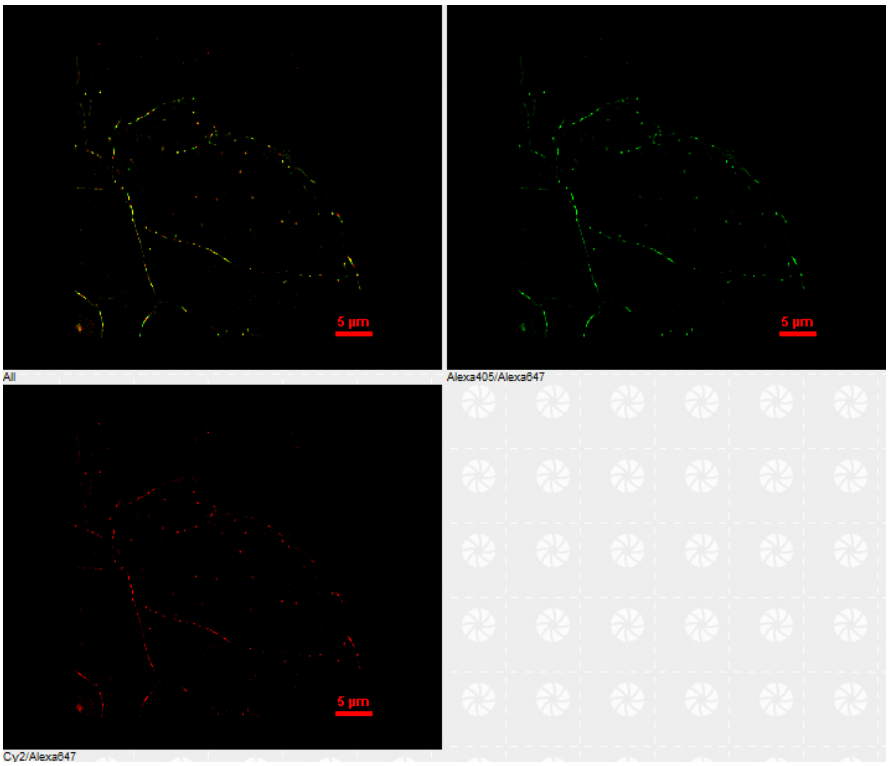


100μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller

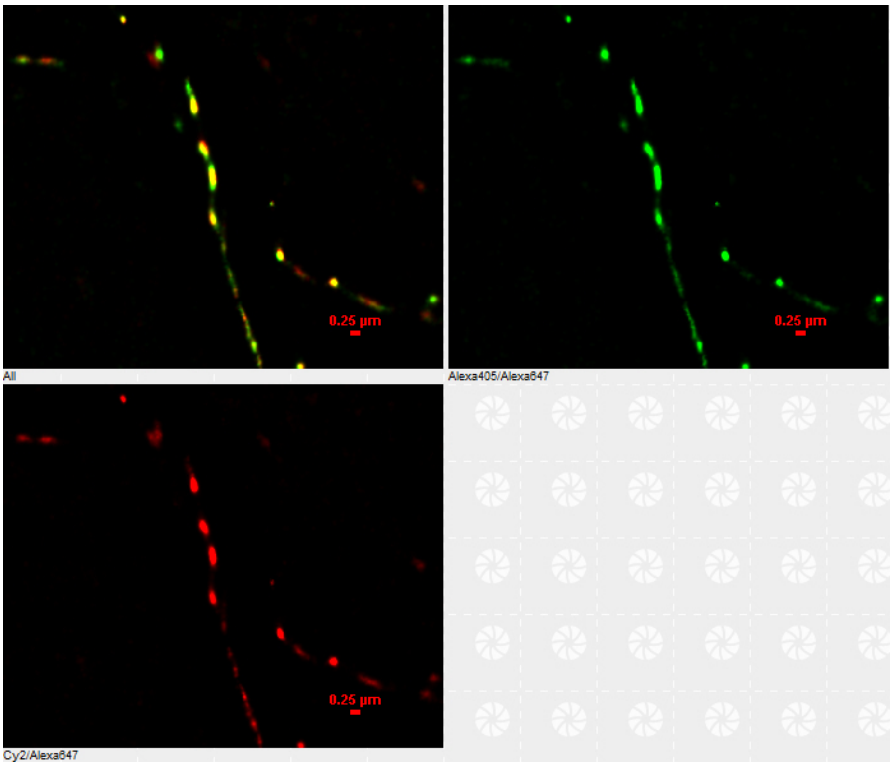


100μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller

Şekil 4.9.B. 100μg HSA kaplı demiroksit nanopartiküller ile inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü



10μg Magnetozom



10μg Magnetozom

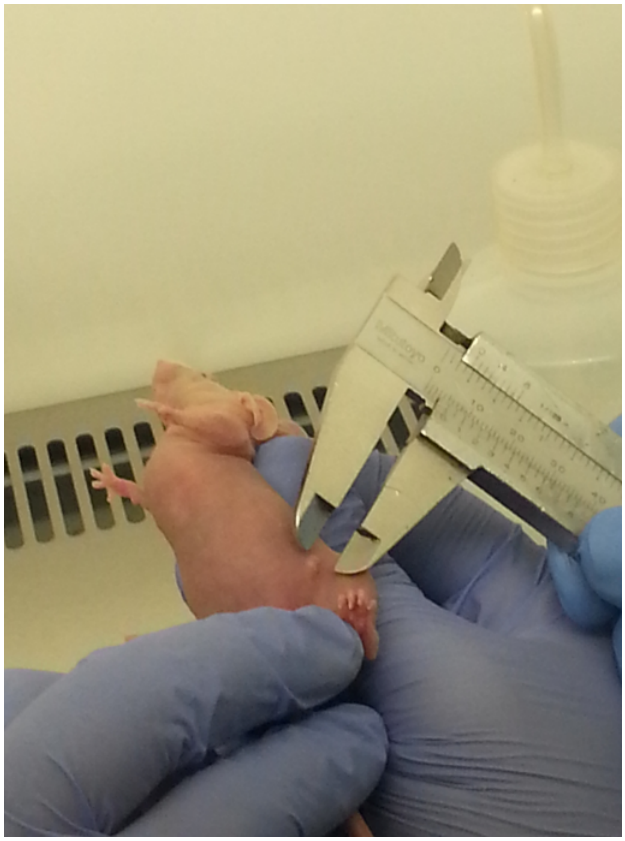
Şekil 4.10. Magnetozom ile inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü

Hem HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin hem de magnetozomların Anti-EGFR (AlexaFlour 488) ile modifiye edilmeleri EGFR+ olan MDA-MB-231 hücrelerine

hedefli hale getirmiş ve tutunma yüzdesini arttırdığı konfokal mikroskop görüntüleri ile kanıtlanmıştır (şekil 4.7.A., 4.7.B. ve 4.8.). Konfokal mikroskop görüntülerini incelediğimizde, her iki nanopartikül ile yapılan çalışmalarda; nanopartiküllerin yüksek oranda hücre membranında biriktiği ve konsantrasyon miktarının artmasına bağlı olarak tutunma yüzdesinin arttığı gözlenmiştir. Magnetozomların MDA-MB-231 hücrelerine tutunma oranı HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerle kıyaslandığında daha fazladır.

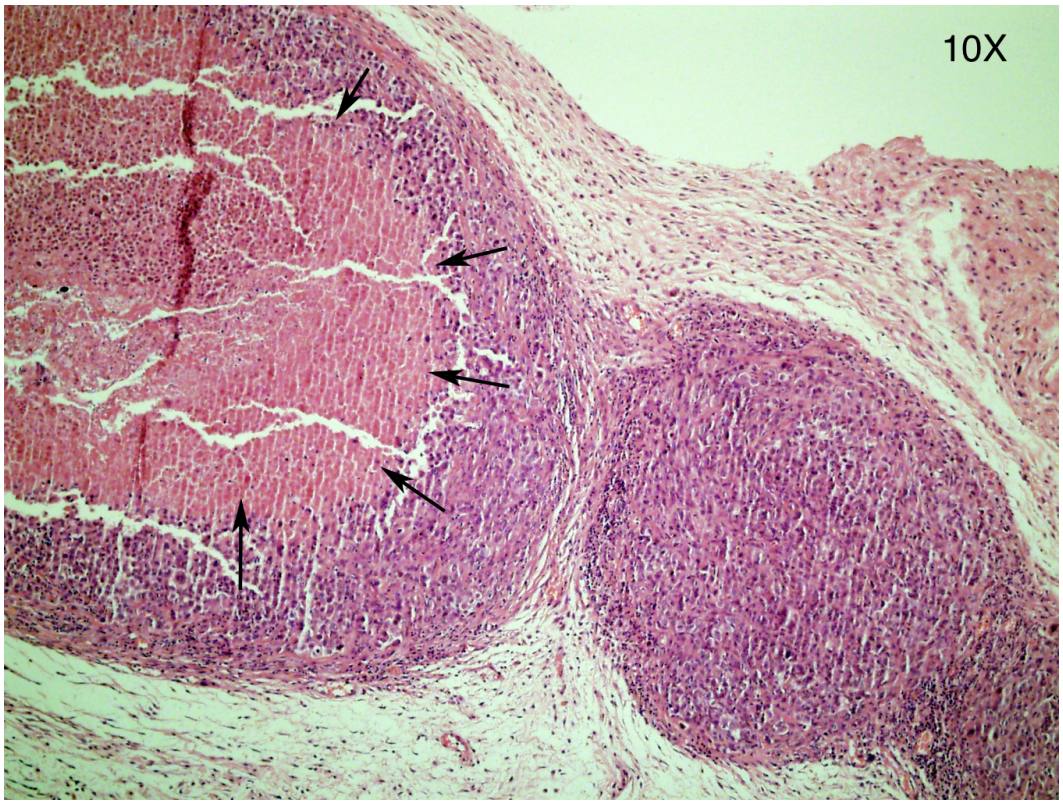
4.6. Manyetik Nanopartiküllerin İn Vivo Değerlendirilmesi

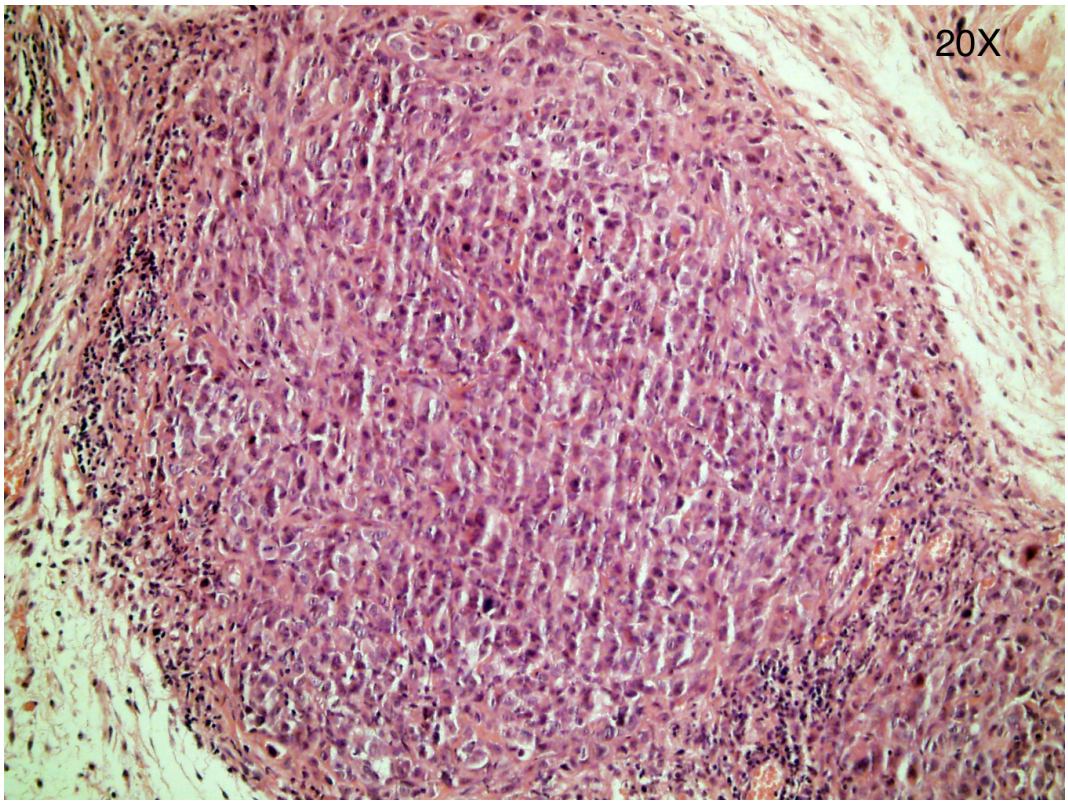
Hazırlanan nanopartiküllerin MR kontrast arttırıcı ajan olarak kullanım etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla öncelikli olarak Balb/c nude farelerde meme tümör dokusu bölüm 3.9.2.'de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur. İlk hücre enjeksiyonunu takiben farelere 3 günde 1 hücre enjeksiyonuna devam edilmiş ve her enjeksiyondan önce tümör çapları kumpas yardımı ile ölçülmüştür (Şekil 4.9.). Tümör çapları ilk enjeksiyondan sonraki 3. gün 0,525±0,156cm ve 7. gün 0,65±0,147cm'dir.

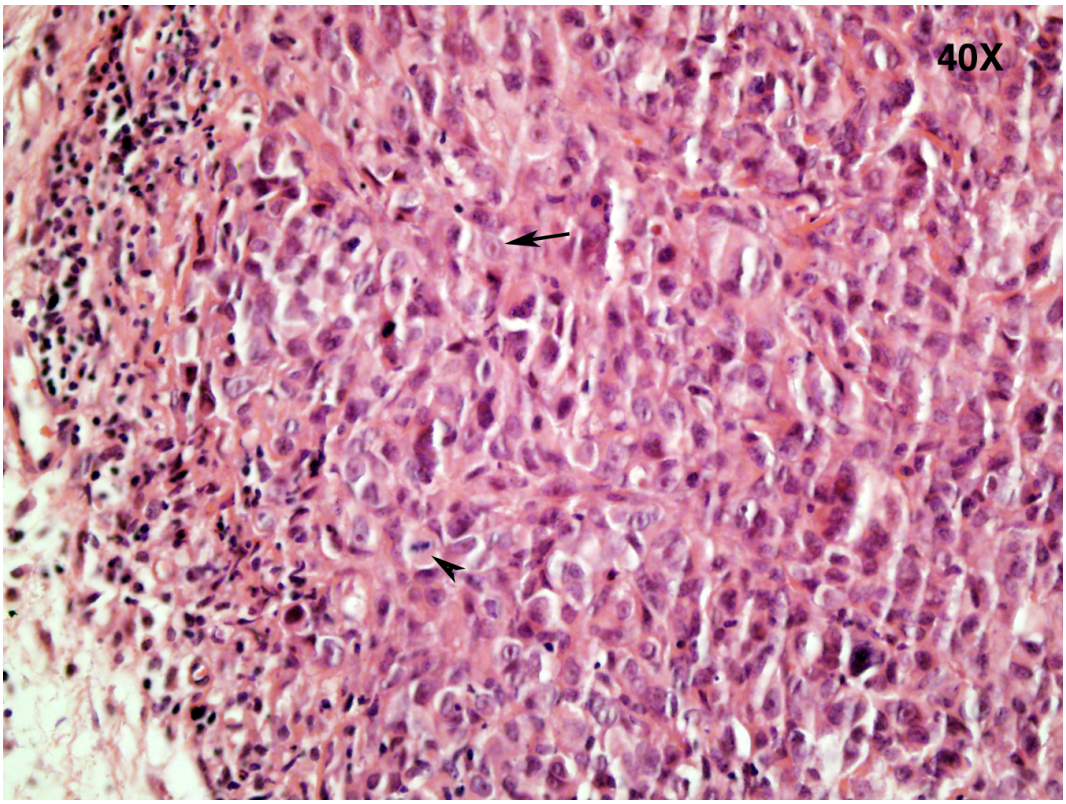


Şekil 4.11. Nude farelerdeki tümör çapının kumpass yardımıyla ölçülmesi

Farelerde oluşan dokunun tümör dokusu olup olmadığı histopatolojik inceleme ile değerlendirilmiştir. Kesitlerde birinin ortasında nekroz bulunan nodüler yapı oluşturmuş tümoral yapılar izlenmiştir (X10). Bu nodüler yapıların içlerinde tabakalar halinde inflamatuar hücrelerin de eşlik ettigi tümoral hücreler tespit edilmiştir (X20). Bu alanlara daha yakından baktığımızda hücrelerde nükleer/sitoplazmik oranda artış, hiperkromazi, atipik mitoz ve apopitoz ile iri eozinofilik nükleollerin varlığı dikkat çekicidir (X40). Tüm bu veriler farelerde MDA-MB-231 hücrelerinin enjeksiyonu sonucu oluşan yapının tümör dokusu olduğunu ispatlamaktadır.







Şekil 4.12. Fareden Alınan Tümör Dokusu Kesitleri (10X, 20X, 40X)

4.6.1. Nanopartikül Enjekte Edilen Farelerin MR Görüntülerinin Alınması

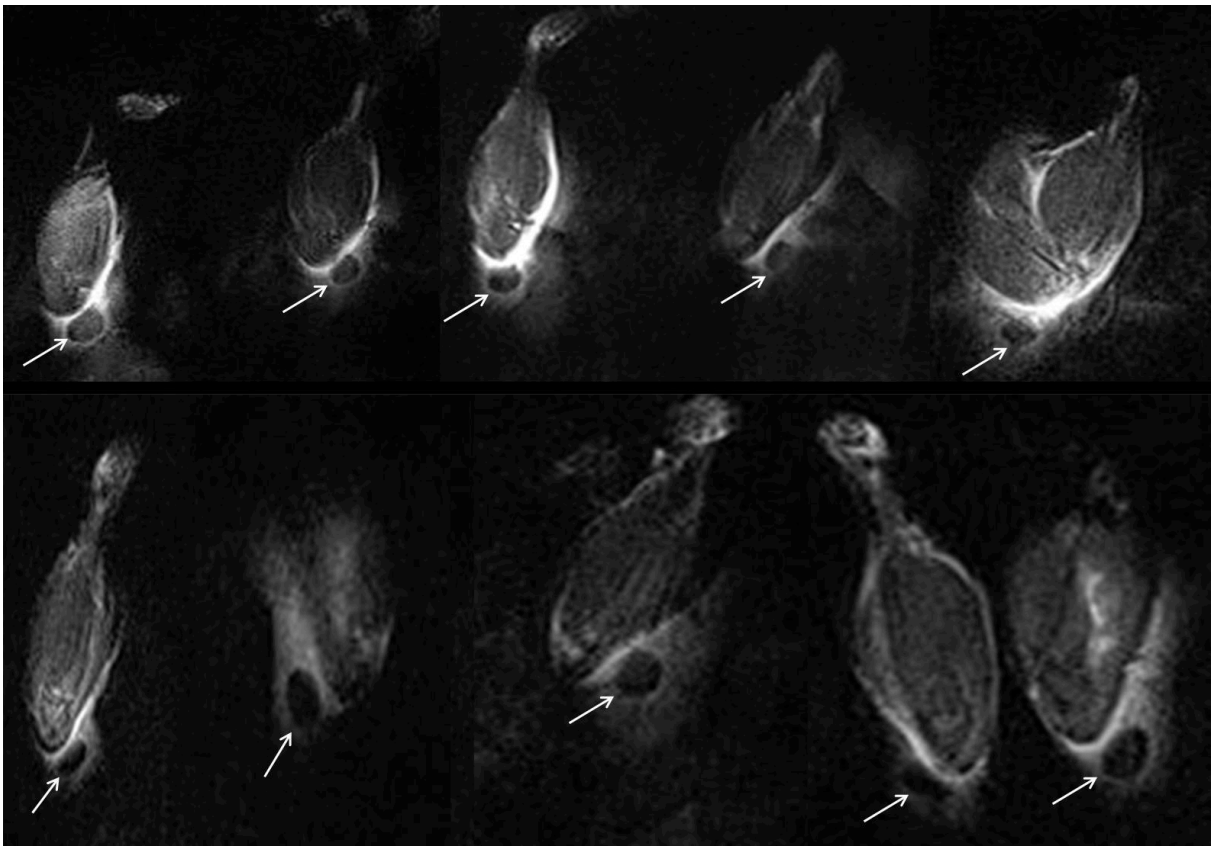
Meme bezlerinde tümör oluşturulan farelerin partikül enjeksiyonundan önce MR görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.10.).

Şekil 4.13. Farelerin MR görüntülenmesi

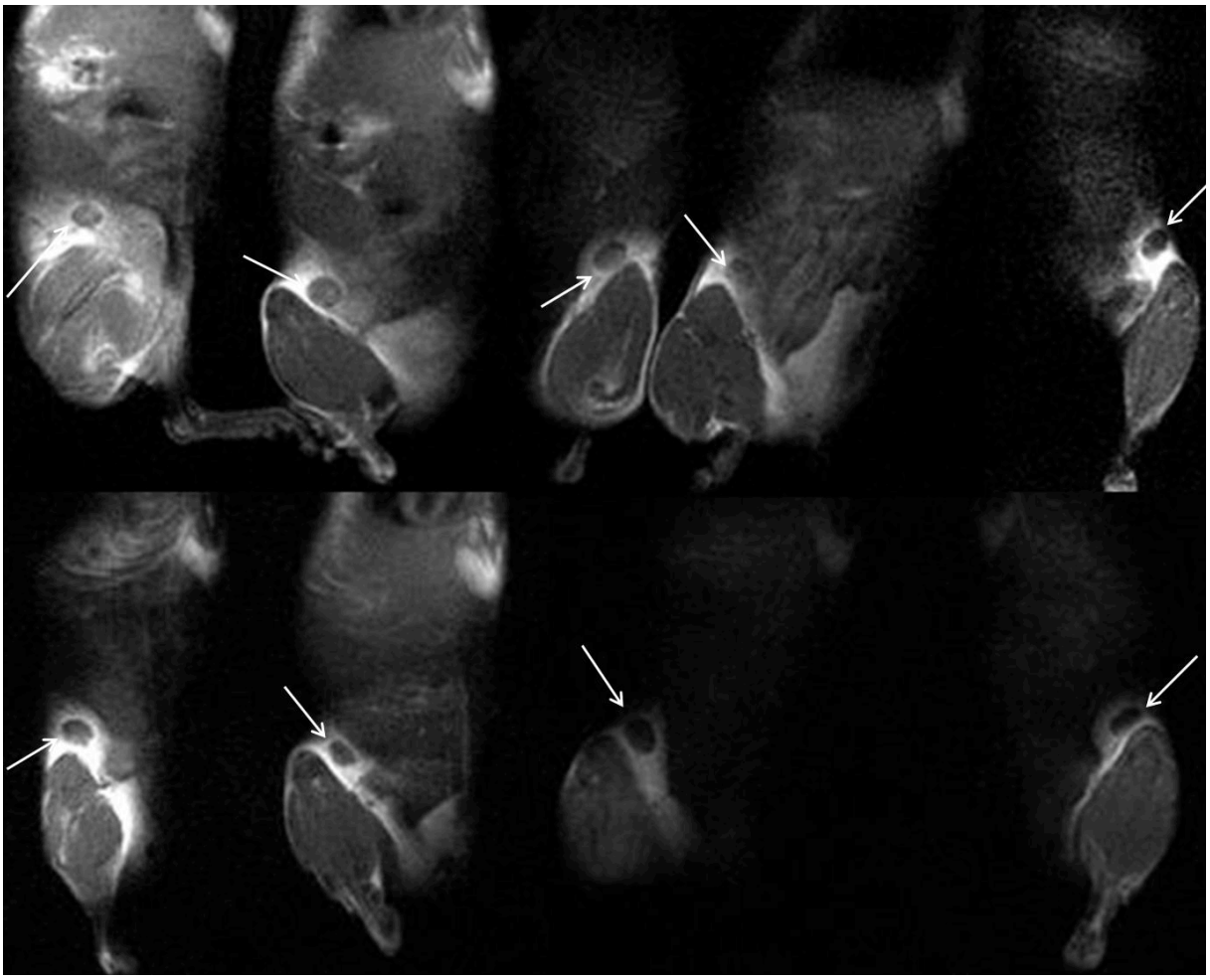
Daha sonra farelere toplam hacim 200µl içerisinde 300µg magnetozom, magnetozom-anti-EGFR, HSA-Fe_3O_4ve HSA-Fe_3O_4-anti-EGFR enjekte edilmiştir. MRG sonuçlarına göre; Farelerde oluşturulan meme tümörünün görüntülerindeki kontrast oluşumu derecelendirilmiştir.

1. Derece: Orta; 2. Derece: İyi; 3. Derece: Çok iyi

Alınan MR görüntüleri sonucunda, kontrol grubu, PBS enjekte edilen, magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartikül enjekte edilen farelerden elde edilen tümör dokusunun MR görüntüleri 1. Derece (orta) olarak değerlendirilmiştir. Magnetozom-anti-EGFR ve HSA-Fe_3O_4-anti-EGFR enjekte edilen farelerdeki tümörün MR görüntülenmesi 2. Derece (iyi) olarak değerlendirilmiştir. Sadece magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartikül enjekte edilen farelerden alınan görüntülerde kontrast farkı saptanamazken; magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküller, görüntülemede kontrast farkı oluşturmuştur (Şekil 4.14.A. ve B.).



Şekil 4.14.A. Hayvanların tümörlerinden alınan T2 ağırlıklı görüntüler. Üst sıra soldan sağa; kontrol; PBS; HSA-Fe_3O_4, Magnetozom, Magnetozom-anti-EGFR, HSA-Fe_3O_4-anti-EGFR ve Tekrarlar



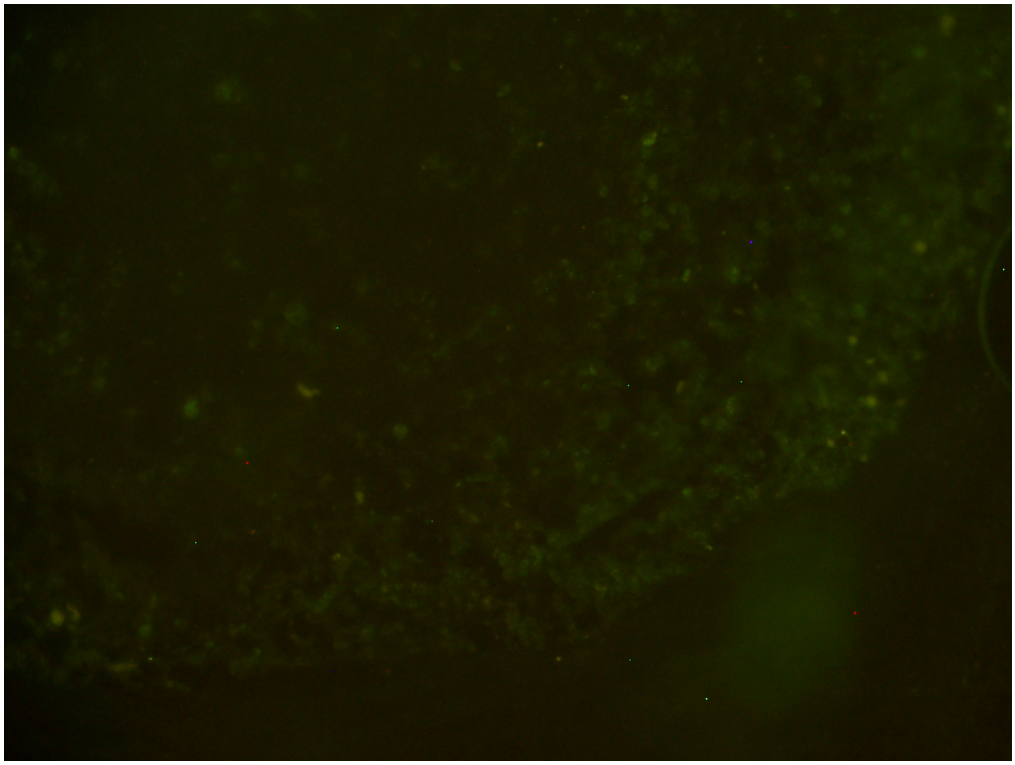
Şekil 4.14.B. Hayvanların tümörlerinden alınan T1 ağırlıklı görüntüler. Üst sıra soldan sağa; kontrol; PBS; HSA-Fe_3O_4, Magnetozom, Magnetozom-anti-EGFR, HSA-Fe_3O_4-anti-EGFR ve Tekrarlar

4.6.2. Histopatolojik İnceleme

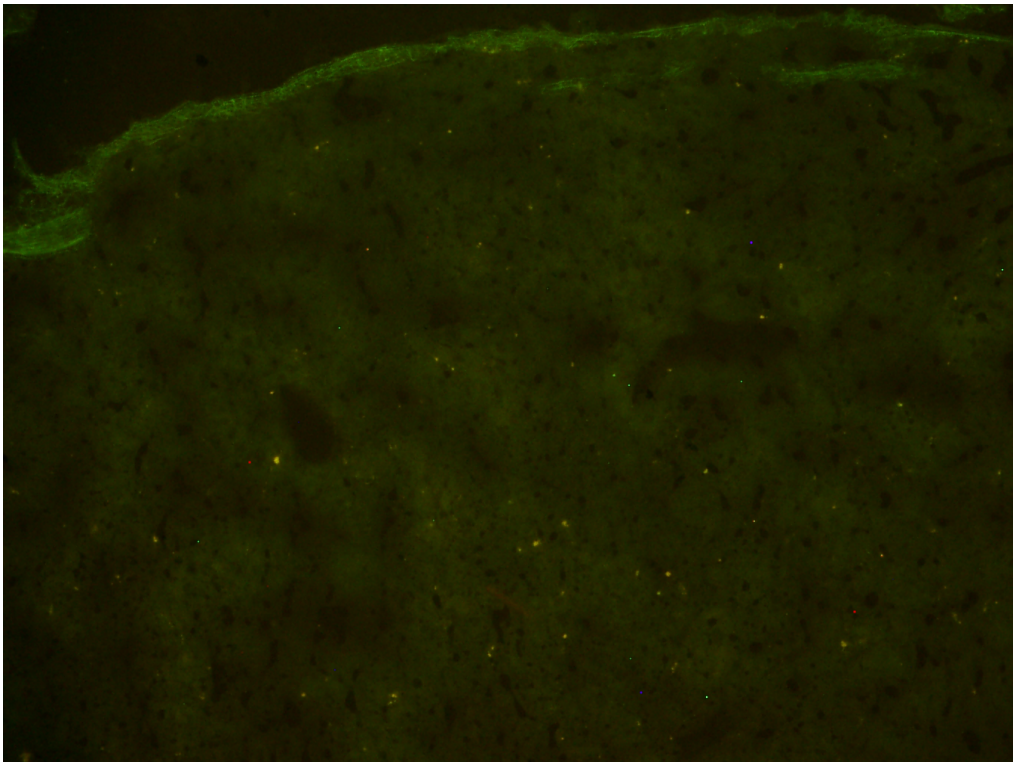
Meme kanserine aktif hedeflenmesi için partiküllerin yüzeyi Anti-EGFR ile modifiye edilmiştir. Kullanılan Anti-EGFR floresan özellikte olup 499nm'de yeşil renkte ışıma yapmaktadır. Bundan dolayı, magnetozom-anti-EGFR ve HSA-Fe_3O_4-anti-EGFR enjekte edilen farelerin dokuları (tümör, kalp, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek) floresan mikroskobunda incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin tümör dokusu, karaciğer, dalak ve böbreğinde floresans partiküller tespit edilmiştir. Kalp ve akciğer dokusunda floresan görüntü alınamamıştır (Şekil 4.15). Magnetozom-

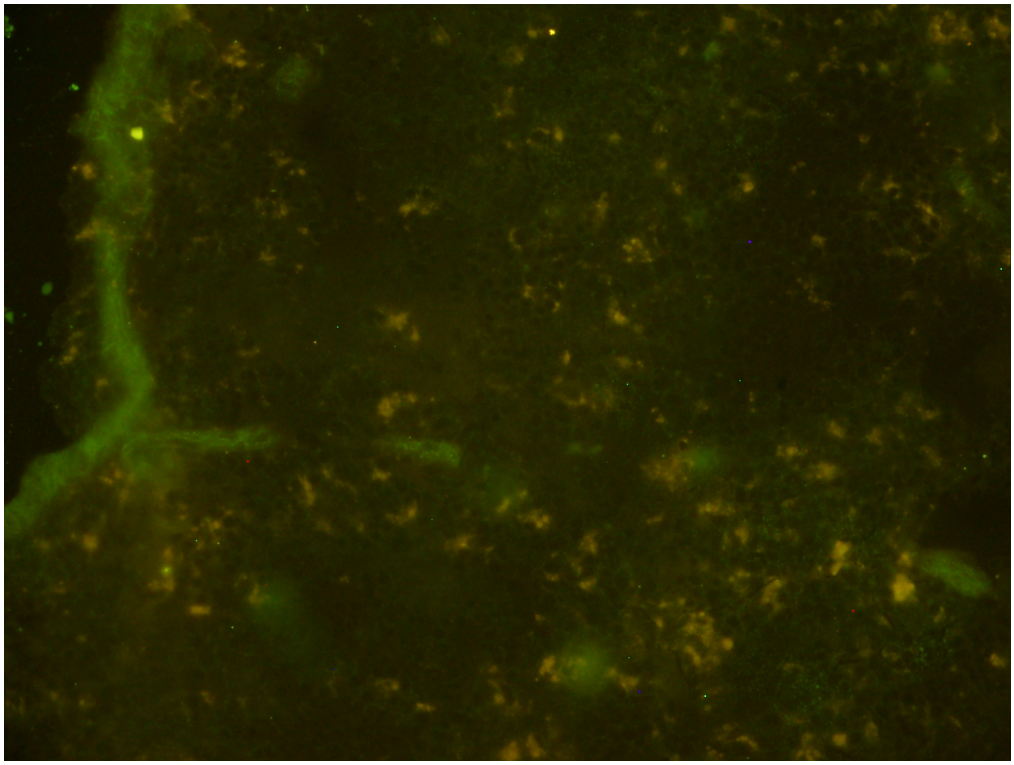
anti-EGFR enjekte edilen farelerin de karaciğer ve dalağında floresans görüntüler elde edilmiştir. Kalp, akciğer ve dalak dokusunda floresan görüntü alınamamıştır (Şekil 4.16.)



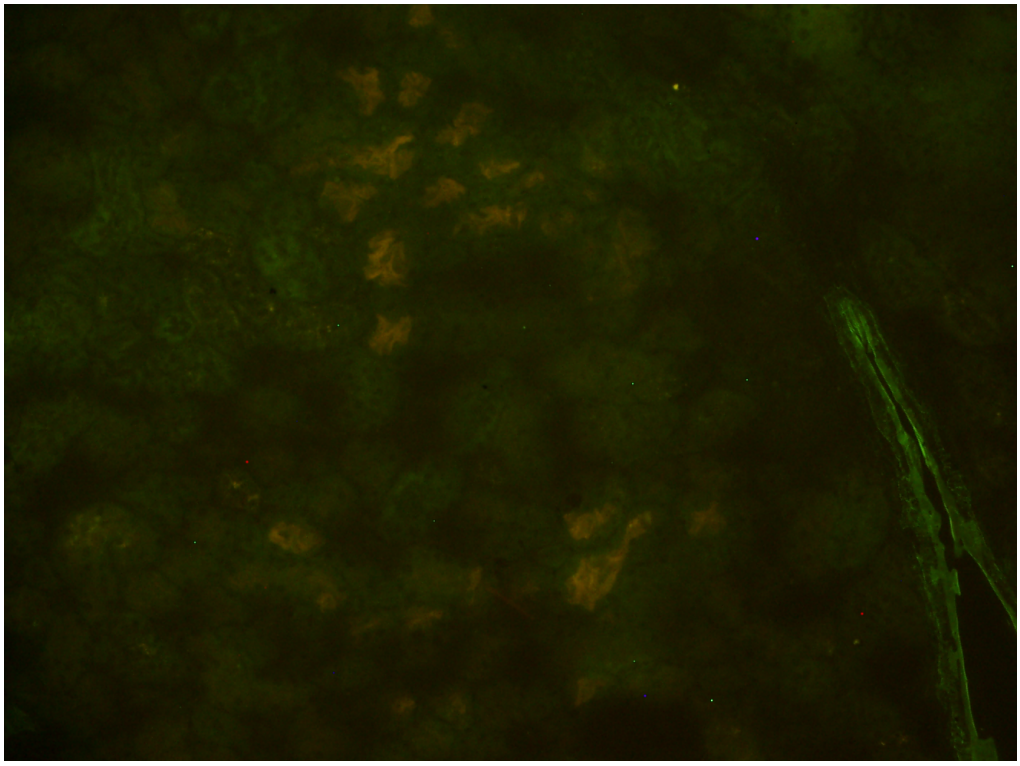
Şekil 4.15.A. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin tümör dokusu



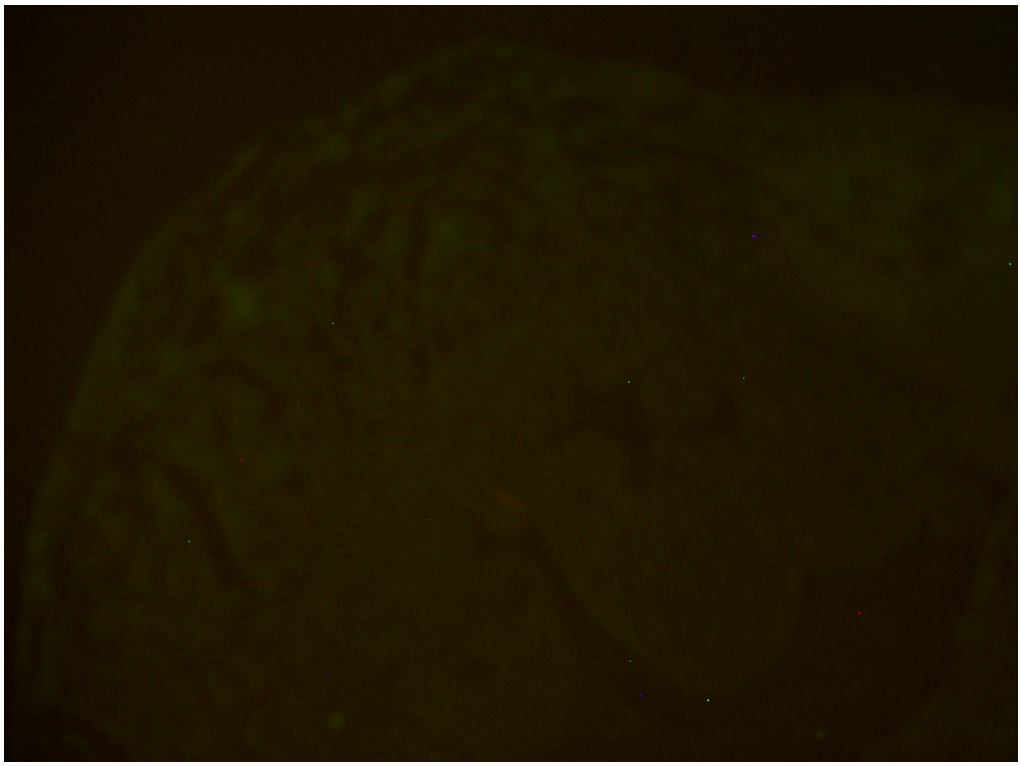
Şekil 4.15.B. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin karaciğer dokusu



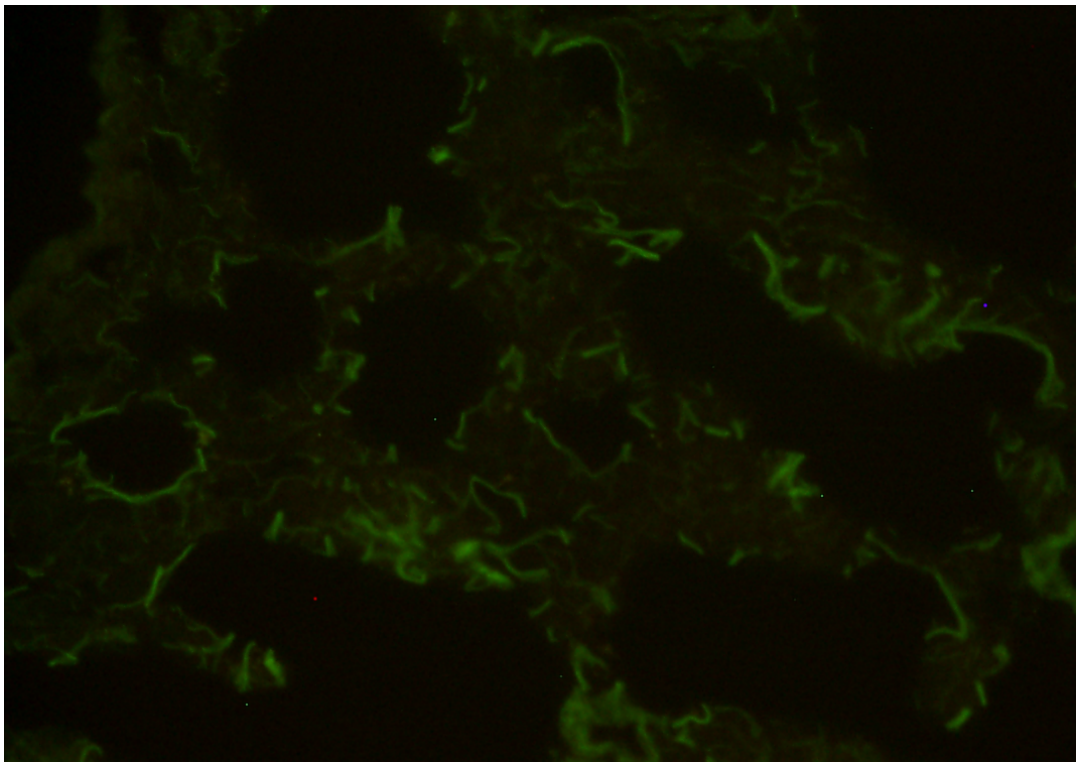
Şekil 4.15.C. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin dalak dokusu



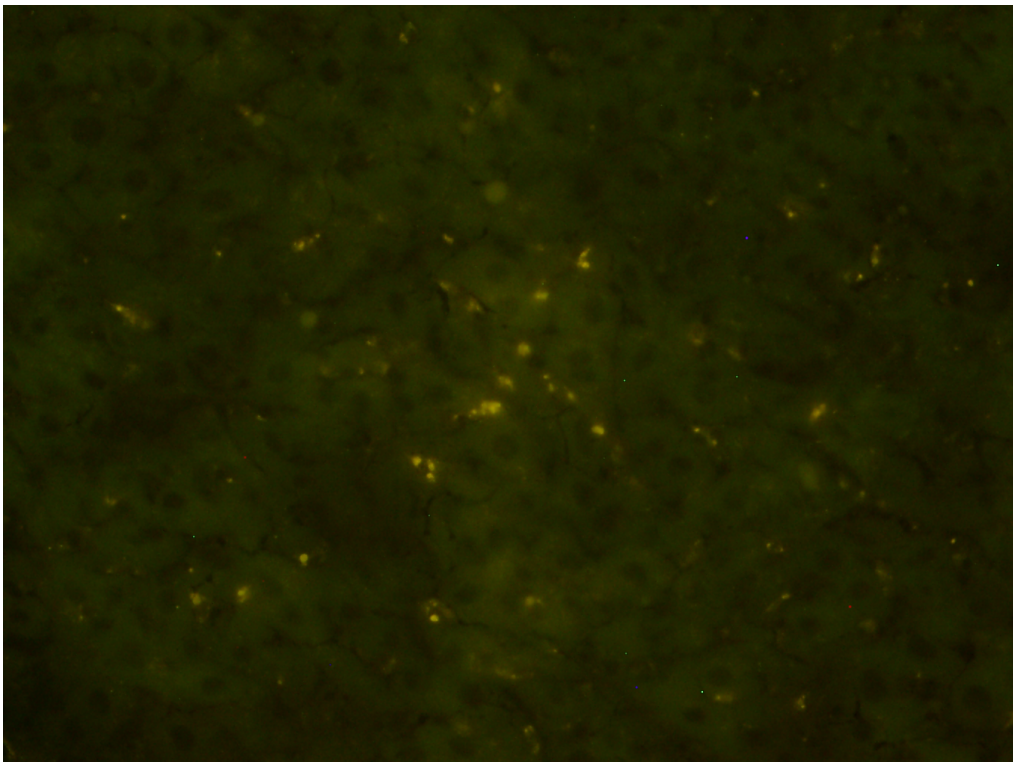
Şekil 4.15.D. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin böbrek dokusu



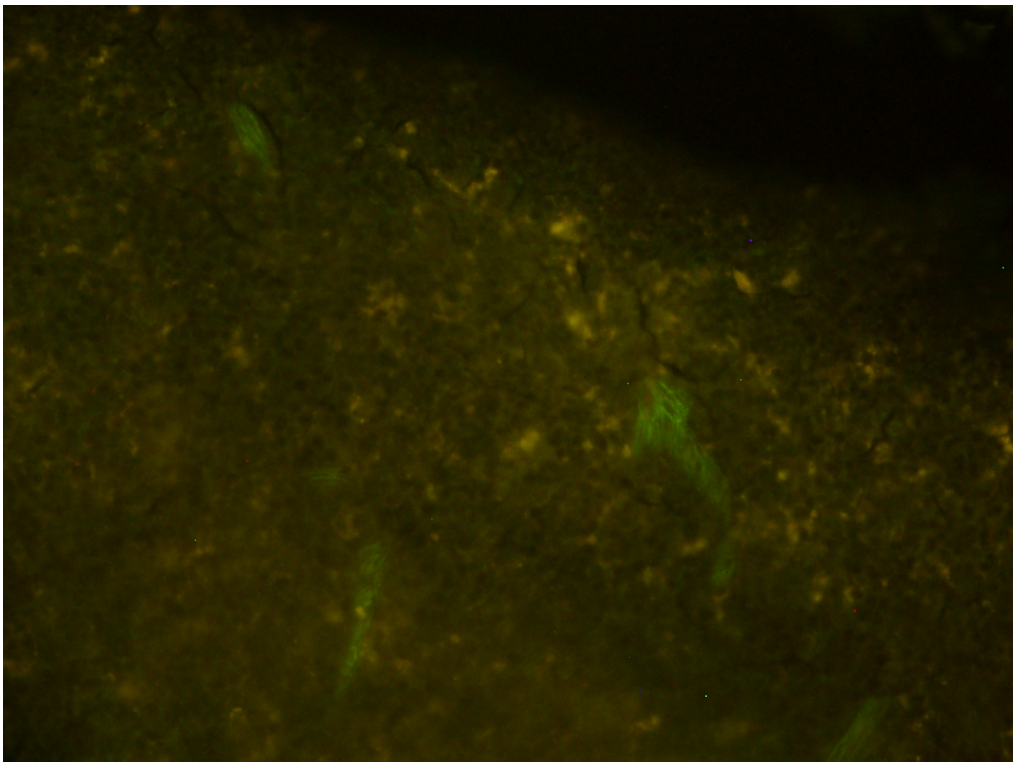
Şekil 4.15.E. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin kalp dokusu



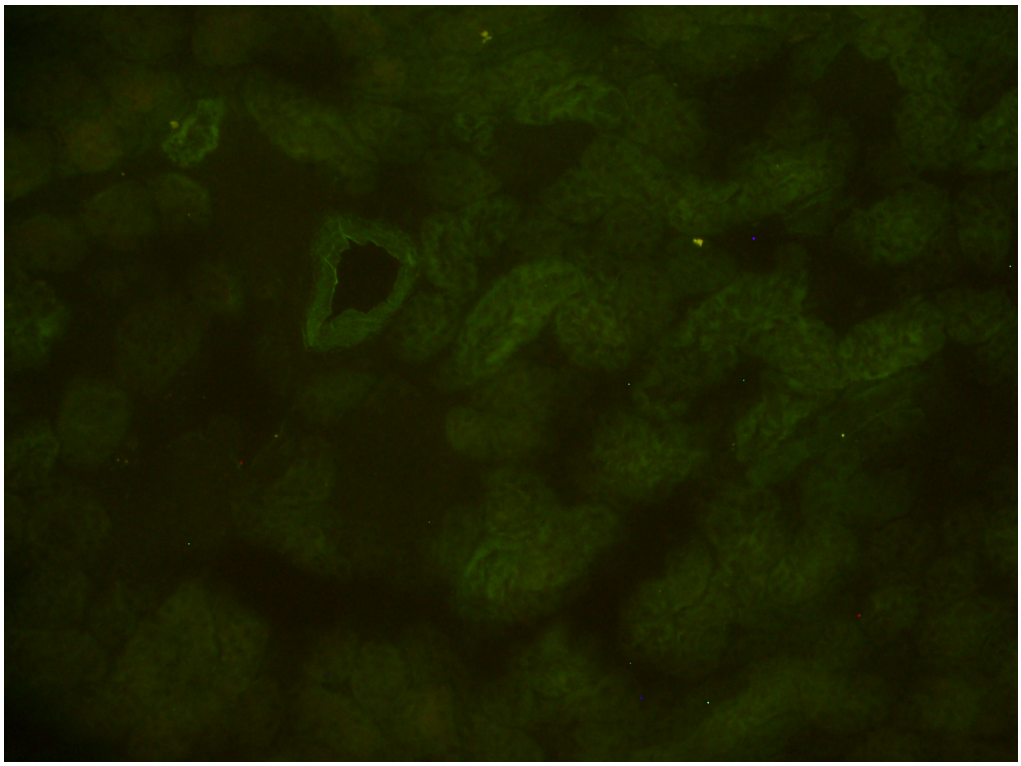
Şekil 4.15.F. HSA-Fe_3O_4-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin akciğer dokusu



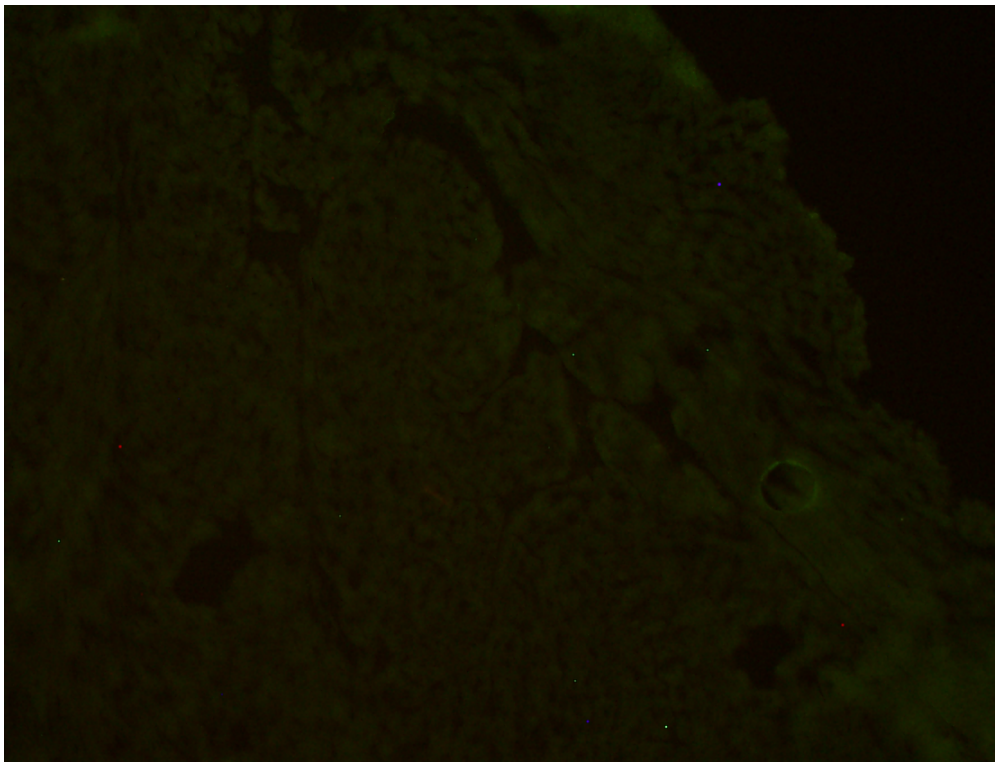
Şekil 4.16.A. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin karaciğer dokusu



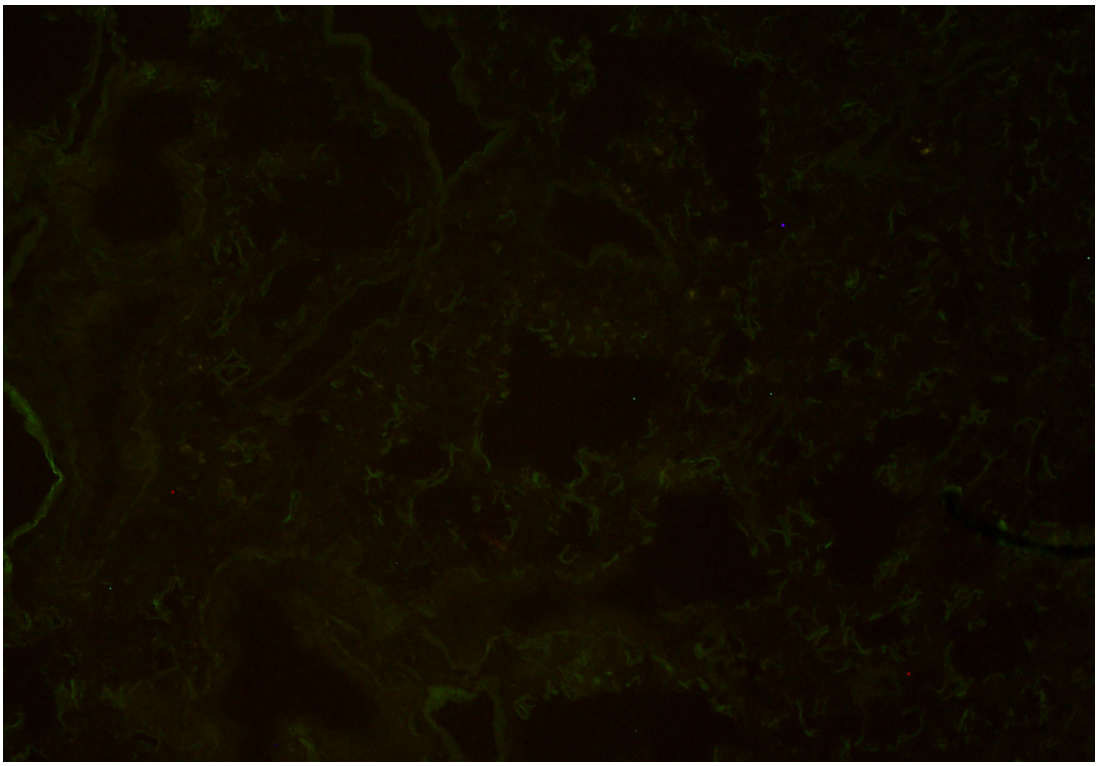
Şekil 4.16.B. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin dalak dokusu



Şekil 4.16.C. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin böbrek dokusu



Şekil 4.16.D. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin kalp dokusu



Şekil 4.16.E. Magnetozom-Anti-EGFR enjekte edilen farelerin akciğer dokusu

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- ✓ Çalışmaların ilk basamağında magnetotaktik bir bakteri olan *Magnetospirillum gryphiswaldense* bakterisinin magnetozomları in vivo sentezlemesi sağlanmış ve izole edilmiştir. STEM sonuçlarına göre, ortalama boyutları 100±10 nm'dir. Yüzey yükleri; pH 7,4 PBS'de -19,47±4,5 mV'dur.

- ✓ Demiroksit nanopartiküller ikili çöktürme yöntemi ile hazırlanmış ve toksisitesinin azaltılması amacı ile insan serum albümin (HSA) ile kaplanmıştır. STEM sonuçlarına göre, ortalama büyüklükleri 70±10 nm ve yüzey yükleri de pH 7,4 PBS içindeki -8,39±0,173 mV olarak tespit edilmiştir.

- ✓ Hazırlanan partiküllerin yüzeyleri meme kanser hücrelerinin (MDA-MB-231) yüzeyinde sağlıklı hücrelerden daha yüksek oranda bulunan EGFR reseptörüne spesifik Anti-EGFR ile modifiye edilmiştir. Anti-EGFR'ın HSA kaplı demiroksit nanopartiküllere bağlanma oranı %50; magnetozomlara bağlanma oranı %65 bulunmuştur. Magnetozomlar iki farklı yapıdan meydana gelmektedir. İçerdiği manyetik çekirdek yapısının etrafı fosfolipid tabakası ile kaplıdır. Bu da magnetozomların daha yüksek oranda ve kolay modifiye edilmelerini sağlamaktadır.

- ✓ Nanopartiküllerin sitotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla MTT testi yapılmıştır. Magnetozom ve HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin toksisiteleri karşılaştırıldığında, magnetozomların MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksisitesi HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerden daha yüksektir. Fakat hayvan çalışmaları sonucu bu toksisitenin tolere edilebileceği gözlenmiştir. Ayrıca flow sitometri ile yapılan çalışmalar sonucunda; 100µg/ml magnetozomun hücrelere %90 oranında tutunduğu, aynı konsantrasyondaki HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin ise %40 oranında tutunduğu belirlenmiştir. Hedeflenen sonuç için magnetozomların,

HSA kaplı demiroksit nanopartiküllerin yarısı kadar kullanılması yeterli olacaktır.

- ✓ İn vivo deneyler için immün sistemi baskılanmış Balb/c nude fareler kullanılmıştır. Farelerin meme bezlerine enjekte edilen MDA-MB-231 hücreleri 7. günün sonunda 0,65±0,147 cm büyüklüğünde meme tümör dokusunun oluşmasını sağlamıştır. Histopatalojik inceleme ile dokunun tümör dokusu olduğu ispatlanmıştır.

- ✓ Farelerin MR görüntülerinde, Anti-EGFR ile modifiye nanopartiküller tümör dokusuna tutnarak, dokunun daha iyi görüntülenmesinde etkili bir rol oynadığı belirlenmiştir.

- ✓ Floresan görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre, partiküller, tümör dokusu, karaciğer, dalak ve böbreklerde de tutunum göstermektedir.

- ✓ Çalışmaların bundan sonraki bölümlerinde nanopartiküllere ilaç yüklenerek hem kemoterapi hem de MR kontrast arttırıcı ajan olarak etkinlikleri değerlendirilecektir.

KAYNAKLAR

1. Ondrusek, N., Warner, E., Goel, V., Development of a knowledge scale about breast cancer and heredity (BCHK). *Breast cancer research and treatment*, 53, 1, 69-75, **1999.**

2. Williams, T., Clarke, V.A., Savage, S., Women's perceptions of familial aspects of breast cancer. *Health Education*, 102, 2, 50-59, **2002.**

3. Gültekin, M., Boztaş, G., Türkiye Kanser İstatistikleri, **2014.**

4. Doğan, M., Meme kanserinde farklı tedavi tekniklerinin psikososyal etkileri: mastektomiye karşı meme koruyucu tedavi. *Türk Psikoloji Bülteni*, 16-17, **2000.**

5. Society, C.C., *What is Breast Cancer?,* 2004; Available from: http://www.cancer.ca

6. Vatansev, H., *Timokinon'un Meme Kanseri Hücresine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya, **2014**.

7. Society, A.C., *Breast cancer facts & figures 2007-2008*, American Cancer Society, Atlanta, **2007**.

8. Smith, R.A., Cokkinides, V., Eyre, H.J., American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, *CA cancer journal for clinicians*, 52, 1, 8-22, **2002.**

9. Veronesi, U., Viale, G., Rotmensz, N., Goldhirsch A., Rethinking TNM: breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research, *The Breast*, 15, 1, 3-8, **2006.**

10. Egehan, İ., Arda, K., Meme Kanseri Kemik Metastazları Tanı ve Araştırılması. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, 14, 3, 209-213, **1994.**

11. Parlar, S., Kaydul, N., and Ovayolu, N., Meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesinin önemi, *Journal of Anatolia Nursing and Health Sciences*, 8, 1, **2005.**

12. Kutluk, T., Kars, A., *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Ankara, **1992**.

13. M, A., Meme hastalıkları. *Actual Medicine,* 7, 8, 67-73, **1999.**

14. Siahpush, M., Singh, G.K., Sociodemographic variations in breast cancer screening behavior among Australian women: results from the 1995 National Health Survey, *Preventive medicine*, 35, 2, 174-180, **2002.**

15. Somunoğlu, S., Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri*, Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 4, 10, 103-122, **2009.**

16. Epstein, S., Bertell, R., Seaman, B., The Dangers and Unreliability of Mammography*, International Journal of Health Services*, 31, 3, 605-615, **2001.**

17. Stillman, M.J., Women's health beliefs about breast cancer and breast self-examination*, Nursing research*, 26, 2, 121-127, **1977.**

18. Semiglazov, V., Moiseenko, V.M., Manikhas, A.G., Protsenko, S.A., Kharikova, R.S., Popova, R.T., Migmanova, N., Orloy, A.A., Barash, N., Ivanova, O.A., Ivanov, V.G., Interim results of a prospective randomized study of self-examination for early detection of breast cancer (Russia/St. Petersburg/WHO), *Voprosy onkologii*, 45, 3, 265-271, **1998.**

19. Thomas, D.B., Gao, D.L., Ray, R.M., Wang, W.W., Allison, C.J., Chen, F.L., Porter, P., Hu, Y.W., Zhao, G.L., Pan, L.D., Li, W., Wu, C., Coriaty, Z., Evans, I., Lin, M.G., Stalsberg, H., Self, S.G., Randomized trial of breast self-examination in Shanghai: final results*, Journal of the National Cancer Institute*, 94, 19, 1445-1457, **2002.**

20. Akyolcu, N., Uğraş, G.A., Kendi Kendine Meme Muayenesi: Erken Tanıda Ne Kadar Önemli?, *The Journal of Breast Health*, 7, 1, 10-12, **2011.**

21. Rezanko, T., Meme Tümörlerinde Tanısal Algoritma ve Üçlü Test*, Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 4, 3, **2008.**

22. Ünal, M., *Meme Kanserindeki Klinik Bulgular, Evreleme ve Biyopsi*, ed. Topuz, E., 2003, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 124-131, **2003**.

23. Uygun, N., *İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi ve Sitopatolojik Değerlendirme*, ed. Unal, G., Nobel Tıp Kitabevi, 187-214, İstanbul, **2013.**

24. Polat, F.R., Yıldız, E., Polat, S., Ultrasonografi Eşliğinde Memede İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi: 132 Olgunun Retrospektif Analizi*, Bozok Tıp Dergisi*, 3, 2, 12-16, **2013.**

25. Ballo, M.S., Sneige, N., Can core needle biopsy replace fi ne-needle aspiration cytology in the diagnosis of palpable breast carcinoma. A comparative study of 124 women, *Cancer,* 78, 4, 773-777, **1996.**

26. Leung, J.W., Screening mammography reduces morbidity of breast cancer treatment*, American Journal of Roentgenology*, 184, 5, 1508-1509, **2005.**

27. Mahesh, M., AAPM/RSNA Physics Tutorial for Residents: Digital Mammography: An Overview 1*. Radiographics*, 24, 6, 1747-1760, **2004.**

28. Sarı, O., Serdengeçti, M., Meme Kanserinde Sintimamografinin Yeri. *Genel Tıp Dergis,* 11, 1, 45-52, **2001.**

29. Duygulu, D.G., *Meme Kanserinin Cerrahi Tedavi Planlamasında Meme Manyetik Rezonans Görüntülemenin Etkinliğinin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı*, İzmir, **2009**.

30. Taşkın, F., Ünsal, A., Meteoğlu, İ., Akdilli, A., Memenin Benign Lezyonlarında Sonografik Arka Akustik Gölgelenme Bulgusu*, The Journal of Breast Health*, 3, 1, 19-25, **2007.**

31. Öztürk, E. and Demirkazık, F.B., Meme Ultrasonografisi (Teknik, Raporlama, Tanı Kriterleri)*, Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 3, 44, 25-38, **2007.**

32. Kuhl, C., The Current Status of Breast MR Imaging Part I. Choice of Technique, Image Interpretation, Diagnostic Accuracy, and Transfer to Clinical Practice 1*, Radiology*, 244, 2, 356-378, **2007.**

33. Öztekin, P.S., Kosar, P.N., Magnetic Resonance Imaging of the Breast as a Problem‐solving Method: To Be or Not to Be?, *The breast journal*, 20, 6, 622-631, **2014.**

34. Van Goethem, M., Tjalma, W., Schelfout, K., Verslegers, I., Biltjies, I., Parizel, P., Magnetic resonance imaging in breast cancer*, European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 32, 9, 901-910, **2006.**

35. American Collage of Radiology, *Breast imaging reporting and data system (BIRADS)*, **2003**.

36. Lee, C.H., Problem solving MR imaging of the breast*, Radiologic Clinics of North America*, 42, 5, 919-934, **2004.**

37. Müller-Schimpfle, M., , Ohmenhaüser, K., Stoll, P., Dietz, K., Claussen, C.D., Menstrual cycle and age: influence on parenchymal contrast medium enhancement in MR imaging of the breast*, Radiology*, 203, 1, 145-149, **1997.**

38. Schnall, M.D., Rosten, S., Englander, S., Orel, S.G., Nunes, L.W., A combined architectural and kinetic interpretation model for breast MR images*, Academic radiology*, 8, 7, 591-597, **2001.**

39. Kirchin, M.A., Runge, V.M., Contrast agents for magnetic resonance imaging: safety update*, Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 14, 5, 426-435, **2003.**

40. Tuncel, E., *Klinik radyoloji*, 2. baskı, Bursa, Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri, **2008.**

41. Adam, G., Dammer, M., Bohndorf, K., Christoph, R., Fenke, F., Günther, R.W., Rheumatoid arthritis of the knee: value of gadopentetate dimeglumine-enhanced MR imaging, *American journal of roentgenology*, 156, 1, 125-129, **1991.**

42. Caravan, P., Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents, *Chemical Society Reviews*, 35, 6, 512-523, **2006.**

43. Cacheris, W.P., Quay, S.C., Rocklage, S.M., The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes, *Magnetic resonance imaging*, 8, 4, 467-481, **1990.**

44. Zoarski, G.H., Lufkin, R.B., Bradley, W.G., Flanders, A.E., Gale, D.R., Harms, S.E., Haughton, V.M., Joy, S.E., Kanal, E., Rosa, L., Multicenter trial of gadoteridol, a nonionic gadolinium chelate, in patients with suspected head and neck pathology, *American journal of neuroradiology*, 14, 4, 955-961, **1993.**

45. Rummeny, E.J., Peters, P.E., MR Imaging of the Liver, Spleen and Pancreas: Imaging Techniques and MR Contrast Agent, *Clinical MRI*, 5, 115-120, **1995.**

46. Earls, J.P., Bluemke, D.A., New MR Imaging Contrast Agents, 7, 255-273, **1997.**

47. Wang, Y.X., Hussain, S.M., Krestin, G.P., Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging, *European radiology*, 11, 11, 2319-2331, **2001.**

48. Rinck, P., Some future perspectives of contrast agent development, *Clinical MRI*, 5, 129-139, **1995.**

49. Kirchin, M.A., Pirovano, G.P., Spinazzi, A., Gadobenate dimeglumine (Gd-BOPTA): an overview, *Investigative radiology*, 33, 11, 798-809, **1998.**

50. Giovagnoni, A., Fabbri, A., Maccioni, F., Oral contrast agents in MRI of the gastrointestinal tract, *Abdominal imaging*, 27, 4, 367-375, **2002.**

51. Artemov, D., Mori, N., Okollie, B., Bhujwalla, Z.M., MR molecular imaging of the Her−2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles, *Magnetic Resonance in Medicine*, 49, 3, 403-408, **2003.**

52. Sun, C., Sze, R., Zhang, M., Folic acid−PEG conjugated super-paramagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 78, 3, 550-557, **2006.**

53. Feynman, R.P., There's plenty of room at the bottom, *Engineering and science*, 23, 5, 22-36, **1960.**

54. Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug discovery today*, 8, 24, 1112-1120, **2003.**

55. Teo, B.K., Sun, X., From top-down to bottom-up to hybrid nanotechnologies: road to nanodevices, *Journal of cluster science*, 17, 4, 529-540, **2006.**

56. Mijatovic, D., Eijkel, J., Van Den Berg, A., Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up—a review, *Lab on a Chip*, 5, 5, 492-500, **2005.**

57. Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C., Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacological reviews*, 53, 2, 283-318, **2001.**

58. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen Z.G., Shin, D.M., Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clinical cancer research*, 14, 5, 1310-1316, **2008.**

59. Zhang, R. Ma, P.X., Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures,*J Biomed Mater Res., 52, 430-438,* **2000.**

60. Alivisatos, A.P., Birth of a nanoscience building block, *ACS nano*, 2, 8, 1514-1516, **2008.**

61. Duncan, R., The dawning era of polymer therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 5, 347-360, **2003.**

62. Lavan, D.A., McGuire, T., Langer, R., Small-scale systems for in vivo drug delivery, *Nature biotechnology*, 21, 10, 1184-1191, **2003.**

63. Pekdemir, M.E., *Manyetik Nanopartiküller Kullanılarak Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektrometrisi İle İmmunoassay Sisteminin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat, **2011**.

64. Zhang, J., Srivastava, R., Misra, R., Core-shell magnetite nanoparticles surface encapsulated with smart stimuli-responsive polymer: synthesis, characterization, and LCST of viable drug-targeting delivery system, *Langmuir*, 23, 11, 6342-6351, **2007.**

65. Salzman, E.W., Polyethyleneglycol oxide as a biomaterial, *Am J Soc Artif Intern Organs*, 6, 60–72. **1983.**

66. Yu, J., Lee, C.W., Im, S.S., Lee, J.S., Structure and magnetic properties of SiO2 coated Fe2O3 nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation process, *Rev Adv Mater Sci*, 4, 55–59, **2003.**

67. Gupta, A.K., Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials*, 26, 18, 3995-4021, **2005.**

68. He, X.M., Carter, D.C., Atomic structure and chemistry of human serum albumin*, Nature,* 358, 209-215, **1992.**

69. Bhattacharya, A.A., Curry, S., Franks, N.P., Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin high resolution crystal structures*, Journal of Biological Chemistry*, 275, 49, 38731-38738, **2000.**

70. Ghuman, J., Zunszain, P.A., Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Otagiri, M., Curry, S., Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin*, Journal of molecular biology*, 353, 1, 38-52, **2005.**

71. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K., Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*, Protein engineering*, 12, 6, 439-446, **1999.**

72. Xie, J., Chen, K., Chen, X., Production, modification and bio-applications of magnetic nanoparticles gestated by magnetotactic bacteria*, Nano research*, 2, 4, 261-278, **2009.**

73. Bazylinski, D.A., Controlled biomineralization of magnetic minerals by magnetotactic bacteria*, Chemical Geology*, 132, 1, 191-198, **1996.**

74. Balkwill, D., Maratea, D., Blakemore, R., Ultrastructure of a magnetotactic spirillum*, Journal of Bacteriology*, 141, 3, 1399-1408, **1980.**

75. Sun, J.B., Zhao, F., Tang T., Jiang, W., Tian, J., Li, Y., Li, J., High-yield growth and magnetosome formation by Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air*, Applied microbiology and biotechnology*, 79, 3, 389-397, **2008.**

76. Liu, Y., Li, G.R., Guo, F.F., Jiang W., Li Y., Li L.J., Large-scale production of magnetosomes by chemostat culture of Magnetospirillum gryphiswaldense at high cell density*, Microbial cell factories*, 9, 1, 99, **2010.**

77. Sun, J., Li, Y., Liang, X.J., Wang P.C., Bacterial magnetosome: a novel biogenetic magnetic targeted drug carrier with potential multifunctions*, Journal of nanomaterials*, 2011, 9, **2011.**

78. Gürsoy, A., *Kontrollü Salım Sistemleri,* 1. Baskı, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları, İstanbul, **2002**.

79. Woodburn, J.R., The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy*, Pharmacology & therapeutics*, 82, 2, 241-250, **1999.**

80. Moisescu, C., Bonneville, S., Staniland S., Iron uptake kinetics and magnetosome formation by Magnetospirillum gryphiswaldense as a function of pH, temperature and dissolved iron availability, *Geomicrobiology Journal*, 28, 7, 590-600, **2011.**

81. Heyen, U., Schüler, D., Growth and magnetosome formation by microaerophilic Magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor, *Applied microbiology and biotechnology*, 61, 536-544, **2003.**

82. Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Jiang, W., Li, Y., Li, J., Semicontinuous culture of Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies, *Applied and environmental microbiology*, 77, 17, 5851-5856, **2011.**

83. Philipse, A.P., Maas, D., Magnetic colloids from magnetotactic bacteria: chain formation and colloidal stability, *Langmuir*, 18, 25, 9977-9984, **2002.**

84. Sun, J.B., Duan, J.H., Dai, S.L., Ren, J., Guo, L., Jiang, W., Li, Y., Preparation and anti−tumor efficiency evaluation of doxorubicin−loaded bacterial magnetosomes: Magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from Magnetospirillum gryphiswaldense, *Biotechnology and bioengineering*, 101, 6, 1313-1320, **2008.**

85. Reimers, G.W., Khalafalla, S., Preparing magnetic fluids by a peptizing method, *US Dept. of the Interior*, 59, **1972**.

86. Lin, W., Coombes, A., Davies, M., Davis, S., Illum, L., Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method, *Journal of Drug Targeting*, 1, 3, 237-243, **1993.**

87. Chi, K.R., Microscopy: ever-increasing resolution, *Nature*, 462, 7273, 675-678, **2009.**

88. Schiffelers, R.M., Ansari, A., Xu, J., Zhou, Q., Tang, Q., Storm, G., Molema, G., Lu, P.Y., Scaria, P.V., Woodle M.C., Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle, *Nucleic acids research*, 32, 19, 149-149, **2004.**

89. Xu, J., Hu, J., Liu, L., Li, L., Wang, X., Zhang, H., Jiang, W., Tian, J., Li, Y., Li, J., Surface expression of protein A on magnetosomes and capture of pathogenic bacteria by magnetosome/antibody complexes, *Frontiers in microbiology*, 5, **2014.**

90. Xie, J., Wang, J., Niu, G., Huang, J., Chen, K., Li, X., Chen, X., Human serum albumin coated iron oxide nanoparticles for efficient cell labeling, *Chem. Commun.,* 46, 3, 433-435, **2010.**

91. Xiang, L., Wei, J., Jianbo, S., Guili, W., Feng, G., Ying, L., Purified and sterilized magnetosomes from Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 were not toxic to mouse fibroblasts in vitro, *Letters in Applied Microbiology*,

45, 75–81, **2000**.

92. Mossman, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J Immunol Method,* 65, 55-63, **1983**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ebru Erdal

Doğum Yeri : Kızılcahamam-TÜRKİYE

Medeni Hali : Bekar

E-posta : ebrue@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Beytepe Kampüsü, 06800, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : 1997-2001 Prof. Dr. Şevket Raşit Hatipoğlu Lisesi, Ankara

Lisans : 2002-2006 Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü, Ankara

Yüksek Lisans : 2006-2009 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji-Nanotıp Anabilimdalı

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji-Nanotıp Anabilimdalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : Orta

Almanca : Orta

İş Deneyimi

2008- 2009 : Araştırma Görevlisi, Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, (Araştırma Görevlisi)

2009 - 2015: Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji Nanotıp Anabilimdalı, (Araştırma Görevlisi)

Deneyim Alanları

Nanopartiküller: Polimerik ya da metal bazlı nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu, modifikasyonu ve biyolojik uygulamaları.

Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler: İlaç taşıyıcı sistemler için kontrol edilebilir özelliklere sahip polimer matriks yapılarının hazırlanması ve karakterizasyonu.

Hücre Kültürü: Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması, hazırlanan malzemelerin biyouyumluluk testlerinin yapılması.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

''MRI Kontrast Arttırıcı Ajan Olarak Magnetozom ve HSA Kaplı Demiroksit Nanopartiküllerin Karşılaştırılması'' (014BİYB604002, Bütçe: 28.354,95 TL, Yardımcı Araştırmacı) Hacettepe Üniversitesi, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Destek Projesi.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Ebru Erdal, Murat Demirbilek, Yasan Yeh, Laura Ruff, Damla Bozkurt, Ahmet Çabuk, Sadık Esener, Emir Baki Denkbaş

Comparison of Magnetosome and HSA Coated Iron Oxide Nanoparticles for Targeting to Breast Cancer Cell Line

ICBN 2014, 7. XII International Conference on Biotechnology and Nanotechnology (Uluslararası Biyoteknoloji ve Nanoteknoloji Konferansı)

New York, Amerika, 5-6 Haziran 2014

- Ebru Erdal, Murat Demirbilek, Yasan Yeh, Laura Ruff, Damla Bozkurt, Ahmet Çabuk, Sadık Esener, Emir Baki Denkbaş

Magnetic Nanoparticles For the Diagnosis of Breast Cancer

ICCEA 2014: Uluslararası Bigisayar, Fen, Mühendislik ve Mimarlıktaki Yenilikler Konferansı

Vancouver, Kanada, 19-20 Aralık 2014