



**KANSER HÜCRELERİNİN APTAMER VE ANTİBADI  
TAŞIYAN MANYETİK NANOPARTİKÜLLER İLE  
HEDEFLENMESİ**

**TARGETING OF CANCER CELLS WITH APTAMER  
AND ANTIBODY IMMOBILIZED MAGNETIC  
NANOPARTICLES**

**LÜTFİYE TUTKUN**

**PROF. DR. TÛLİN KUTSAL**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü DOKTORA TEZİ olarak  
hazırlanmıştır.

2014

**LÜTFİYE TUTKUN**'un hazırladığı “**Kanser Hücrelerinin Aptamer ve Antibadi Taşıyan Manyetik Nanopartiküller ile Hedeflenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erhan PİŞKİN

Başkan

.....

Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Danışman

.....

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Üye

.....

Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI

Üye

.....

Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **ETİK**

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

- 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.

10/11/2014

LÜTFİYE TUTKUN

## **ÖZET**

# **KANSER HÜCRELERİNİN APTAMER VE ANTİBADİ TAŞIYAN MANYETİK NANOPARTİKÜLLER İLE HEDEFLENMESİ**

**Lütfiye TUTKUN**

**Doktora, Biyomühendislik ABD**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülin KUTSAL**

**İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa TÜRK**

**Kasım 2014, 214 sayfa**

Kanser tüm dünyada en önemli hastalık ve ölüm nedeni olma özelliğini sürdürmektedir. Meme, akciğer, bağırsak gibi birçok organda değişik kanser tiplerine rastlanmaktadır. Normal hücreler kanser hücrelerine dönüştüklerinde, bu hücrelerin yüzey özellikleri değişmekte, belli reseptör ve antijenleri eşsiz ve hızlı bir çoğalma profili sergilemektedirler.

Sağlıklı hücreler ile karşılaştırıldığında, kanser hücrelerinin kontrolsüz ve hızlı çoğalmaları "hedeflenmiş tedavi" geliştirilmesi anlamında bu hücrelere olan ilgiyi arttırmaktadır. Kanser tanı ve tedavisinde, monoklonal antikor ya da aptamer gibi küçük moleküllerin manyetik nanopartiküllere immobilize edilmesi ile tasarlanan nanopartiküler sistemler, hedeflenmiş terapi anlamında avantaj sağlamaktadır. Nanoteknolojinin kullandığı en önemli taşıyıcı moleküller olarak nanopartiküller, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler. Son yıllarda kuantum tanecikler, manyetik demir oksit nanopartiküller, altın nanopartiküller, polimer-bazlı nanopartiküller vb. olmak üzere birçok nano-sistem kanser uygulamalarında kullanılmak üzere geliştirilmiştir.

Sunulan tez kapsamında da; MDA MB 231 insan meme kanseri tümör hücrelerinin özgün tanınması ve görüntülenmesinde kullanılabilecek nanopartiküller erken tanı sistemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, MDA MB 231 insan meme kanseri hücre yüzeyinde eksprese olduğu bilinen epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin hedeflenmesi düşünülmüştür. Bu kapsamda; manyetik çekirdekli, altın kaplı süperparamanyetik demiroksit nanopartiküller (SPION) tasarlanmış ve karakterize edilmiştir. Sentezlenen SPION'ların ve altın-kaplı SPION'ların TEM ile belirlenen ortalama boyutları sırası ile  $5.62 \pm 1.49$  nm ve  $57.04 \pm 8.58$  nm olarak saptanmıştır. FITC-işaretli aptamer ve antibadi molekülleri, altın-kaplı SPION'ların yüzeyine immobilize edilmiş ve daha sonra hazırlanan taşıyıcı sistem hücre kültür ortamında MDA MB 231 meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiştir. Karşılaştırmalı hücre hattı olarak östrojen reseptör-pozitif insan fibroblast hücreleri seçilmiştir. Hücre büyüme ve farklılaşması araştırılmış ve nanopartiküller taşıyıcı sistemin sitotoksitesisi incelenmiştir. İkili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekroz oranları belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, genel olarak nanopartikül-konjugatlarının hücre canlılığı üzerinde toksik etkisinin olmadığı ve taşıyıcı sistemin hücre proliferasyonunu engellemediği belirlenmiştir. Akım Sitometri ile hücre reseptörleri ile etkileşen floresan işaretli aptamer ve antibadi oranları belirlenmiş ve en yüksek bağlanmanın %64.4 oranı ile  $108 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonundaki antibadi immobilize edilmiş SPION olduğu saptanmıştır. Hücre seçicilikleri floresan mikroskop ile de görüntülenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** nanopartikül, tümör hücre hedeflendirme, kanser tanısı, antibadi, aptamer, hücre kültürü, akım sitometri, gerçek zamanlı hücre analizi

## **ABSTRACT**

### **TARGETING OF CANCER CELLS WITH APTAMER AND ANTIBODY IMMOBILIZED MAGNETIC NANOPARTICLES**

**Lütfiye TUTKUN**

**Doctor of Philosophy, Division of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Tülin KUTSAL**

**Co-Supervisor: Doç. Dr. Mustafa TÜRK**

**November 2014, 214 pages**

Cancer is still one of the major reason of illness and death throughout the world. Wide range of cancer types occur in many organs like breast, liver, lung, colon etc. When normal cells transform into cancerous cells, surface characteristics of these cells change. Then, they display unique expression and/or over expression of certain receptors and antigens.

Overexpression of these cells compare to normal cells make them attractive for targeted therapy. Conjugation of monoclonal antibodies and/or small molecules like aptamers to the magnetic nanoparticles is a beneficial method for cancer diagnosis and treatment in terms of targeted therapy. Nanoparticles have a high surface area to volume ratio. Several types of nanoparticles including quantum dots, magnetic iron oxide, gold, polymer based nanoparticles have been developed for cancer applications in the last few years.

Within the context of this thesis, developing of an early diagnosis nanoparticulate system in order to detect and image human breast cancer cell line of MDA MB 231 is aimed. In this reason, it has been thought to target cell surface receptors of epidermal growth factor which expressed by breast tumor cells of MDA MB 231. In this regard, gold coated magnetic nanoparticles were designed and characterized. Average sizes of synthesized SPIONs' and gold-coated SPIONs' which

were determined by TEM were detected as  $5.62 \pm 1.49$  nm and  $57.04 \pm 8.58$  nm, respectively. FITC-labeled aptamer and antibody molecules were immobilized onto gold-coated SPIONs and then developed carrier system was applied to MDA MB 231 breast cancer cells in the cell culture medium. Estrogen-positive human fibroblast cells were chosen as a comparative cell line. Proliferation and differentiation of cells were investigated and cytotoxicity of nanoparticulate carrier system were examined. Apoptosis and necrosis rates were quantified by double-staining of cells. Generally speaking, there were no significant toxic effect of nanoparticle-conjugates on cell viability in accordance with the data obtained and carrier system were not also inhibiting cell proliferation. Flow cytometry was used to determine the interaction rates between tumor cell receptors and fluorescently labeled aptamer and antibody molecules and antibody-immobilized SPION in the concentration of 108  $\mu\text{g/mL}$  have had the highest conjugation rate by the 64.4%. Tumor cell selectivity was also imaged by the technique of Fluorescent Microscopy.

**Keywords:** nanoparticle, tumor targeting, cancer diagnosis, antibody, aptamer, cell culture, flow cytometry, real time cell analyzing



## TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübesiyle bana örnek olan, yol açan ve hiç bir konuda desteğini esirgemeyen çok değerli hocam, Tez Danışmanım Sayın Prof.Dr.Tülin Kutsal'a,

Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik ABD'da eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana her zaman yol gösteren ve ilham kaynağı olan çok değerli hocam, Ana Bilim Dalı Başkanı' mız Sayın Prof.Dr.Erhan Pişkin'e,

Özellikle laboratuvar çalışmalarımda bana her türlü desteği veren ve imkanlarını sonuna kadar açarak bana rahat bir çalışma ortamı sağlayan, bilgi ve birikimleri ile bilimsel anlamda da desteğini esirgemeyen çok değerli hocam, Yardımcı Tez Danışmanım Sayın Doç.Dr.Mustafa Türk'e,

SPION sentezi çalışmalarımda bana yol gösteren Sayın Prof.Dr.Hofmann, Lionel ve Gaby'e,

Özellikle hücre kültürü çalışmalarımda her zaman yanımda olarak tecrübelerini benimle paylaşan ve her türlü desteğini hissettiğim, beni yalnız bırakmayan arkadaşım Esra'ya,

Laboratuvarda gerek analizler esnasında, gerekse arkadaşlıklarıyla yanımda olan Aslı, Ümit, Ogün, Damla, Gamze, Canan, Rumeysa ve Sema'ya,

Doktora eğitim sürecimde sevgi ve dostluklarıyla yanımda olan tüm arkadaşlarıma ve büyüklerime,

Varlıklarından sonsuz mutluluk duyduğum çok sevgili eşime ve aileme teşekkür ederim.

Lütfiye TUTKUN

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.2. Meme Kanseri.....	6
2.3. Nanoteknoloji.....	8
2.4. Fonksiyonel Manyetik Nanomalzemeler.....	10
2.4.1. Biyomedikal Uygulamalar Açısından Temel Gereklilikler.....	10
2.4.1.1. Manyetik Partiküller ve Ferrosivılar.....	10
2.4.1.1.1. Manyetik Partiküller.....	11
2.4.1.1.2. Ferrosivılar.....	12
2.4.1.2. Biyoyumluluk ve Kimyasal Kararlılık.....	13
2.4.1.3. Fiziksel Özellikler.....	13
2.4.1.4. Manyetik Özellikler.....	13
2.4.2. Nanomanyetizma.....	14
2.4.2.1. Nanoyapısal Morfolojilerin Sınıflandırılması.....	14
2.4.2.2. Temel Manyetik Uzunluklar.....	16
2.4.2.3. Multi-domeyn ve Tek-domeyn Nanopartiküller.....	16
2.4.2.4. Manyetik Materyaller ve Manyetizma.....	17
2.4.2.5. Süperparamanyetizma.....	20
2.4.2.6. Histerezis Çevrimleri.....	20
2.5. Manyetik Nanopartikül Tasarım Stratejileri.....	24
2.5.1. Fizikokimyasal Etkenler.....	24
2.5.1.1. Şekil.....	25

2.5.1.2. Hidrodinamik Çap.....	25
2.5.1.3. Yüzey Özellikleri.....	26
2.5.2. Fizyolojik Bariyerler.....	27
2.5.3. Toksikite.....	28
2.6. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi.....	30
2.6.1. Kimyasal İkili-Çöktürme Yöntemi.....	30
2.6.2. Suni Ortamlarda Gerçekleştirilen Reaksiyonlar.....	34
2.6.3. Hidrotermal ve Yüksek-Sıcaklık Yöntemleri.....	34
2.6.4. Sol-jel Yöntemi.....	35
2.6.5. Polyol Yöntemi.....	36
2.6.6. Akış Enjeksiyon Yöntemi.....	36
2.6.7. Elektrokimyasal Yöntemler.....	37
2.6.8. Püskürtme/Buhar Yöntemleri.....	37
2.7. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri.....	38
2.7.1. Mikroskopik Analizler.....	38
2.7.2. Spektroskopik Analizler.....	39
2.7.3. Saçılma Analizleri.....	40
2.7.4. Termal Gravimetrik Analizler.....	42
2.8. Manyetik Nanopartiküllerin Biyomedikal Uygulama Alanları.....	42
2.8.1. Kontrollü İlaç ve Gen Aktarımı ve Spesifik Hedeflendirme.....	43
2.8.2. Hipertermi.....	44
2.8.3. MRI Kontrast Ajan.....	45
2.8.4. Doku Mühendisliği.....	45
2.8.5. Manyetik Biyosensör.....	45
2.8.6. Manyetik Cımbızlar.....	46
2.8.7. Manyetik Hücre Ayırma ve Saflaştırma.....	46
2.9. Hedeflendirme Stratejileri.....	47
2.9.1. Pasif ve Aktif Hedeflendirme.....	47
2.9.1.1. Hedeflendirilmiş Terapi ve Görüntüleme İçin Multifonksiyonel Nanopartiküller.....	50
2.9.2. Hedeflendirme Ajanı Tipleri.....	50
2.9.2.1. Antibadi-bazlı Hedeflendirme.....	51

2.9.2.2. Peptid-bazlı Hedeflendirme.....	53
2.9.2.3. Küçük Molekül-bazlı Hedeflendirme.....	56
2.9.2.4. Aptamer-bazlı Hedeflendirme.....	57
2.9.2.5. Diğerleri.....	58
2.9.3. Nanopartiküler Taşıyıcı Sistem Tasarımı için Fonksiyonel Ajanların Konjugasyon Teknikleri.....	59
2.9.3.1. Konvansiyonel Yöntemler.....	60
2.9.3.1.1. Direk Konjugasyon.....	60
2.9.3.1.2. Bağlayıcı Molekül Kimyası.....	63
2.9.3.1.3. Fiziksel Etkileşimler.....	65
2.9.3.2. Klik Kimyası.....	67
2.9.3.3. Hibridizasyon Yöntemi.....	69
2.9.4. In-vivo Uygulamalar Açısından Yüzey Modifikasyon Stratejileri.....	71
2.9.4.1. "Koruyucu" Kaplama Molekülleri.....	72
2.9.4.2. Hedeflendirme Ligandları ve Koruma Materyallerinin Optimizasyonu.....	77
2.10. Aptamerler.....	81
2.11. Antibadiler.....	86
2.12. Hücre Kültürü.....	90
2.13. Apoptoz ve Nekroz.....	93
2.14. Hücre Proliferasyonu ve Hücre Canlılık Testleri.....	97
2.14.1. Tetrazolyum Redüksiyon Testleri.....	98
2.14.2. Resazurin Redüksiyon Testi.....	100
2.14.3. Proteaz Belirteç Testi.....	101
2.14.4. ATP Miktar Ölçüm Testi.....	101
2.15. Akım Sitometrisi.....	102
2.16. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi.....	104
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	107
3.1. Kullanılan Maddeler.....	110
3.2. SPION Sentez Çalışmaları.....	110
3.3. SPION' ların Altın Tabaka ile Kaplanması.....	112

3.4. SPION'ların Karakterizasyon Çalışmaları.....	115
3.5. Antibadi İmmobilizasyonu.....	120
3.6. Aptamer İmmobilizasyonu.....	123
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	124
3.8. Sitotoksisite Çalışmaları.....	125
3.9. Hedeflemenin Floresan Mikroskop ile Gösterilmesi.....	126
3.10. Akım Sitometri Analizleri.....	126
3.11. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Gösterilmesi....	127
3.12. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	128
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	130
4.1. SPION'ların Karakterizasyon Çalışmaları.....	130
4.2. Antibadi ve Aptamer İmmobilizasyonu.....	139
4.3. Sitotoksisite Çalışmaları.....	141
4.4. Hedeflemenin Floresan Mikroskop ile Gösterilmesi.....	143
4.5. Akım Sitometri Analizleri.....	154
4.6. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Gösterilmesi.....	162
4.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	166
5. SONUÇLAR.....	172
KAYNAKLAR.....	182
EK 1. Bağlanma Etkinliği Örnek Hesaplama.....	212
EK 2. SPION Başına İmmobilize Edilen Aptamer Sayısının Örnek Teorik Hesaplaması.....	213
ÖZGEÇMİŞ.....	214

## ÇİZELGELER

### **Sayfa**

Çizelge 2.1. Farklı manyetizasyon formlarında manyetizma özellikleri.	19
Çizelge 2.2. Onaylanmış ya da klinik çalışmaları hala devam etmekte olan nanopartikül-bazlı bazı ilaçlar.....	49
Çizelge 4.1. Sentezlenen SPION'ların içeriğindeki ICP-MS ile belirlenen demir konsantrasyonu değerleri.....	130
Çizelge 4.2. Manyetik demir oksit nanopartiküllerin FTIR Spektrum pikleri.....	131
Çizelge 4.3. SPION ve AuSPION'ların ESR Spektrumu'ndan elde edilen G, $\Delta H$ ve HR değerleri.....	139
Çizelge 4.4. MDA MB 231 hücre hattına 3 farklı konsantrasyonda (27.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 54.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 108.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) uygulanan manyetik nanopartiküllerin %nekroz ve apoptotik indeksleri.....	166
Çizelge 4.5. Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücre hattına 3 farklı konsantrasyonda (108.6, 54.3 ve 27.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) uygulanan manyetik nanopartiküllerin % nekroz ve apoptotik indeksleri.....	166

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Nanoölçekli materyaller.....	9
Şekil 2.2. Çeşitli nanomateryallerin yapısal görünümü.....	9
Şekil 2.3. Nanoyapısal morfolojilerin sınıflandırılması.....	15
Şekil 2.4. (a) Multi-domeyn manyetik bir nanomateryalin tipik histerezis çevrimi, (b) Durgun bir manyetik nanopartikül içerisindeki manyetizasyonun Neel rotasyonu şematik gösterimi (c) Manyetik bir nanopartikülün Brown rotasyonu.....	17
Şekil 2.5. Ferromanyetik bir materyalin tipik manyetizasyon-manyetik alan şiddeti (M-H) histerezis çevrimi.....	22
Şekil 2.6. Küresel maghemit partiküllerin boyutunun ve sıcaklığın manyetik davranış üzerine etkisi.....	24
Şekil 2.7. LaMer Diyagramı.....	33
Şekil 2.8. SPION fonksiyonelliğinin şematik gösterimi.....	42
Şekil 2.9. Nanopartikül yüzeyinde PEG zincirlerinin boy ve yükseklikleri arasındaki bağıın şematik gösterimi.....	78
Şekil 2.10. SELEKS Çevrimi.....	84
Şekil 2.11. (A) EGFR'ü ile EGF ve EGFR Aptameri arasındaki etkileşim, (B) Trombin Aptamer dizisinin üç boyutlu şekli.....	85
Şekil 2.12. Antibadi molekülünün yapısal görünümü.....	89
Şekil 2.13. Hücre kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği steril kabin, otomatik hücre sayım cihazı ve 48 kuyucuklu plakalar.....	93
Şekil 2.14. Apoptoz ve nekroz oluşumunda hücrelerin yapısal değişimi.....	95
Şekil 2.15. WST-1 tetrazolyum tuzunun formazan boyasına dönüşüm reaksiyonu.....	99
Şekil 2.16. Akım Sitometrisi genel çalışma prensibi.....	103
Şekil 2.17. RTCA sistemi plakaları tabanında yer alan mikroelektrod sistemi.....	105
Şekil 2.18. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi.....	106

Şekil 3.1. (A) SPION'ların altın kaplama esnasında reaktör içerisindeki görünümleri (B) Altın kaplı SPION'ların mıknatıs ile görüntüleri.....	114
Şekil 4.1. Sentezlenen SPION'ların FTIR Spektrumu.....	131
Şekil 4.2. Sentezlenen ve altın tabaka ile kaplanan SPION'ların VIS Spektrumu.....	132
Şekil 4.3. (A, B) Sentezlenen SPION'ların TEM Görüntüleri (20 nm skala bar), (C, D) Altın kaplı SPION'ların TEM ve HR-TEM görüntüsü (100 nm ve 20 nm skala bar).....	134
Şekil 4.4. (A) Standard maghemit XRD (X-Işını Kırınımı) deseni (B) Sentezlenen SPION'ların elektron kırınım deseni.....	135
Şekil 4.5. SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile boyut ölçüm grafiği ve partikül büyüklüğü dağılımı değerleri.....	135
Şekil 4.6. Altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile boyut ölçüm grafiği ve partikül büyüklüğü dağılımı değerleri.....	136
Şekil 4.7. SPION'ların Zeta Potansiyel ölçüm grafiği ve değerleri.....	137
Şekil 4.8. Altın tabaka ile kaplı SPION'ların Zeta Potansiyel ölçüm grafiği ve değerleri.....	137
Şekil 4.9. SPION ve AuSPION'ların ESR Spektrumu.....	138
Şekil 4.10. SPION ve AuSPION'ların M-H eğrisi.....	139
Şekil 4.11. Yüzeyinde SAMs oluşturulmuş altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile boyut ölçüm grafiği ve partikül büyüklüğü dağılımı değerleri.....	140
Şekil 4.12. Yüzeyinde SAMs oluşturulmuş altın kaplı SPION'ların Zeta Potansiyeli ölçüm grafiği ve değerleri.....	141
Şekil 4.13. MDA MB 231 insan meme kanseri hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan partiküllerin WST-1 Testi ile belirlenen % hücre canlılığı grafiği.....	142
Şekil 4.14. Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan partiküllerin WST-1 Testi ile belirlenen % hücre canlılığı grafiği.....	142



Şekil 4.15. MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri.....	143
Şekil 4.16. Östrojen pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri.....	144
Şekil 4.17. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilen SPION (A) ve Kar.SPION'ların (B) ışık ve floresan (C) mikroskop görüntüleri.....	144
Şekil 4.18. AbSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri.....	145
Şekil 4.19. ApSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri.....	146
Şekil 4.20. Östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirilen SPION (A) ve Kar.SPION'ların (B) ışık ve floresan (C) mikroskop görüntüleri.....	148
Şekil 4.21. AbSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri.....	149
Şekil 4.22. ApSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri.....	150
Şekil 4.23. AbSPION ve ApSPION'ların (54.3 µg/mL), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri.....	151
Şekil 4.24. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş anti-EGFR antibadilerinin ışık (A,B) ve floresan (C,D) mikroskop görüntüleri.....	151

Şekil 4.25. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş anti-EGFR aptamerlerinin ışık (A,B) ve floresan (C,D,E,F) mikroskop görüntüleri.....	153
Şekil 4.26. FITC floresan boya ile işaretlenmiş MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri....	154
Şekil 4.27. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count).....	155
Şekil 4.28. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count).....	156
Şekil 4.29. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count).....	157
Şekil 4.30. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count).....	158
Şekil 4.31. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count).....	159
Şekil 4.32. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count).....	160
Şekil 4.33. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş 108.6, 54.3	

ve 27.15 µg/mL konsantrasyonlarındaki SPION'ların akım sitometri analizlerinden elde edilen verilerinin grafiksel görüntüleri.....	161
Şekil 4.34. MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz (A) ve nekroz (B) görüntüleri.....	162
Şekil 4.35. Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz (A) ve nekroz (B) görüntüleri.....	163
Şekil 4.36. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION (A), (B) ve Kar.SPION'ların (C), (D) ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz ve nekroz görüntüleri.....	163
Şekil 4.37. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine antibadi (A), (B) ve aptamer (C), (D) immobilize edilmiş 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz ve nekroz görüntüleri.....	164
Şekil 4.38. Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun 102 saat süre ile "Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi" ile gösterildiği analiz grafikleri. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş (A) SPION (B) Kar.SPION, (C) AbSPION, (D) ApSPION.....	168
Şekil 4.39. Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun 102 saat süre ile "Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi" ile gösterildiği karşılaştırmalı analiz grafikleri (A) SPION/AbSPION, (B) SPION/ApSPION, (C) SPION/AbSPION ve ApSPION, (D) AbSPION/ApSPION.....	171

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

A	Adenin
Au	Altın
B	Manyetik indüksiyon / Manyetik akı yoğunluğu
C	Sitozin
C	Antibadi Yapısında Sabit Altbirim
$C_r$	Curie sabiti
Cu	Bakır
$CuSO_4$	Bakır sülfat
Co	Kobalt
$CO_2$	Karbondioksit
COOH	Karboksil
Da	Dalton
emu	Elektromanyetik birim
eV	Elektronvolt
Fab	Antibadinin Antijene Bağlanma Fragmanı
Fc	Antibadinin Biyolojik Aktivitesini Sağlayan Fragmanı
Fe	Demir
$Fe_2O_4$	Ferrit
$Fe_3O_4$	Magnetit
$\gamma Fe_2O_3$	gama-Maghemit
G	Guanin
H	Manyetik alan şiddeti
HCl	Hidroklorik asit
$H$	Uygulanan manyetik alan şiddeti
Hc	Koersif alan
J	Tanecik içerisindeki değişim parametresi
K	Anizotropi sabiti
$K$	Kristalin anizotropi uzunluğu
$K_B T$	Isı enerjisi
M	Manyetizasyon

MAL	Maleimid
Mg	Magnezyum
Mr	Artık mıknatıslanım
Ms	Doygunluk mıknatıslığı
Ni	Nikel
nm	Nanometre
Oe	Oersted
OH	Hidroksil
O <sub>2</sub>	Oksijen
Psi	Basınç birimi (lb/inç <sup>2</sup> )
pM	Pikomolar
$\lambda$	Manyetostatik uzunluk
S	Kükürt
SiO <sub>2</sub>	Silisyum dioksit (silika)
Tc	Curie sıcaklığı
T <sub>N</sub>	Neel sıcaklığı
T	Timin
U	Urasil
V	Antibadi Yapısında Değişken Altbirim
W	Weiss sabiti
$\chi$	Hacimsel manyetik alınganlık
Zn	Çinko
$\tau$	Neel relaksasyon süresi
$\tau_0$	Pre-eksponansiyel faktör
$\Delta E$	Enerji bariyeri
$\mu_0$	Boşluğun manyetik geçirgenliği

## Kısaltmalar

AbSPION	Yüzeyine anti-EGFR Antibadi İmmobilize Edilmiş SPION
ApSPION	Yüzeyine anti-EGFR Aptamer İmmobilize Edilmiş SPION
AuSPION	Altın Tabaka ile Kaplı Süperparamanyetik Demiroksit Nanopartikül
ASGP-R	Asyaloglikoprotein Reseptörleri
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ATRP	Atomik Transfer Radikal Polimerizasyonu
APS	Aminopropiltrioksolan
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır Serum Albumini
BOND	Biyoortogonal Nanopartikül Dedeksiyonu
BMPA	2-bromo-2-metilpropiyonik asit
BH	Bcl-2 Homoloji Domeyn
BIR	Baculovirüs Apoptoz İnhibitör Proteini
Bcl	B-Hücre Lenfoma
CED	Konveksiyon Geliştirilmiş Aktarım
c-Met	Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü
CF	Düzeltilme Faktörü
CGS	Santimetre – Gram- Saniye Birim Sistemi
Cy5.5	Siyanin5.5
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromür
CDR	Komplementer Tanıyıcı Bölge
Ced	Caenorhabditis Elegans Hücre Ölümü Geni
CD95	Antijen
CARD	Kaspaz Görevli Domeyn
CREKA	Sistein-Arjinin-Glutamik Asit-Lizin-Alanin Peptid Sekansı
c-FLIP	Selüler-FLICE inhibitör Proteini
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco Tarafından Modifiye Edilen Hücre Kültürü Besiyeri
DMSA	Dimerkaptosüksinik Asit

DMSO	Dimetil sülfoksit
DMF	Dimetilformamid
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DTA	Diferansiyel Termal Analiz
DSPE	1,2-Distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin
DOPA	3,4-dihidroksifenil-L-alanin
DTT	Ditiyotreitöl
DMSO	Dimetilsülfoksit
DCR	Dış Amniyon Zarı Hücre Reaksiyonu
DD	Ölüm Domeyni
DED	Ölüm Efektör Domeyn
ER +	Östrojen Reseptör Pozitif
EDX	Enerji Dispersif X-Ray Spektroskopisi
EPR	Arttırılmış Geçirgenlik ve Retansiyon
ELISA	Enzim Bağlı Immünosorbent Deneyi
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERBB1	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-1
EPPT	Glutamin-Prolin-Prolin-Treonin Sentetik Peptid Sekansı
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimide hidroklorür
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ESR	Elektron Spin Rezonans
EXAFS	Genişletilmiş X-Işını Soğurma İnce Yapı Spektroskopisi
FISH	Floresan in situ Hibridizasyon
FESEM	Alan-emisyon SEM
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Floresin izotiyosiyanat
FADD	Fad-ilişkili ölüm domeyni
FACS	Floresan-Aktive Hücre Ayrımı
FSC	İleri Saçılım Kanal Dedektörü
GF-AFC	Glisilfenilalanil-aminoflorokumarin

HER2/neu	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HR-TEM	Yüksek Çözünürlüklü TEM
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
IgM	İmmünglobulin M
IgD	İmmünglobulin D
IgE	İmmünglobulin E
IgG	İmmünglobulin G
IgA	İmmünglobulin A
Lyp-1	Lenfatik-1
LNCaP	Androjen-duyarlı İnsan Prostat Adenokarsinoma
MES	2-(N-morfolino) etansülfonik Asit
MPF	Maturasyon Destekleyici Faktör
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MDR	Çoklu İlaç Direnci
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum tuzu
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MWCO	Molekül Ağırlığı Ayırma Sınırı
mRNA	Haberci RNA
NHS	N-Hidroksisüksinimid
PBS	Fosfat Tampon Tuzu
PR +	Progesteron Reseptörü Pozitif
PEG	Polietilenglikol
PI	Propidium iodür
PDI	Polidispersite İndeksi
PL	Fotoluminesans
PSMA	Prostat-spesifik Membran Antijeni
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik) Asit
PEI	Polietilenimin
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil Prolidin



PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCS	Foton Korelasyon Spektroskopisi
RNA	Ribonükleik Asit
siRNA	Küçük İnterferans RNA
tRNA	Transfer RNA
RES	Retiküloendotelyal Sistem
RITC	Rodamin B izotiyosiyanat
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik Asit Peptid Sekansı
RPM	Santrifüj İşleminde Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	"Roswell Park Memorial Enstitüsü"nde geliştirilen Hücre Kültürü Besiyeri
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü
SAMs	Kendiliğinden Yerleşen Tek Tabakalar
SQUID	Süperiletken Kuantum Girişim Cihazı
SDDP	N-süksinimidil 3-(2-piridiltiyo) propionat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SELEKS	Eksponansiyel Zenginleştirme ile Sistematik Ligand Geliştirme
SATA	N-süksinimidil s-asetiltiyoasetat
SIA	N-süksinimidil iodoasetat
SMCC	Süksinimidil-4-(N-maleimidometil)siklo-hekzan-1-karboksilat
SPDP	N-süksinimidil-3-(2-piridiltiyo)-propiyonat
SSC	Yana Saçılım Kanal Dedektörü
scFv	Tek Zincirli Değişken Bölge Fragmanı
SPION	Süperparamanyetik Demiroksit Nanopartikül
SLD	Saçılma Uzunluğu Yoğunluğu
STM	Taramalı Tünelleme Mikroskobu
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
TGA	Termal Gravimetrik Analiz
TEOS	Tetraetilortosilikat
TCEP	Tris-2-Karboksietil Fosfin

TNF	Tümör Nekroz Faktör
USPION	Ultra Küçük Süperparamanyetik Demiroksit Nanopartikül
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi
uMUC-1	Tümör-ilişkili Müsin-1
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VSM	Titreşimli Örnek Manyetometresi
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid
XPS	X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi
WST1	(4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-(5-tetrazolio)-1,3-benzen-disülfonat

# 1. GİRİŞ

Kanser; modern tıptaki gelişmelere karşın, dünyada ve ülkemizde ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer alması nedeniyle hala çok önemli bir sağlık sorunu olma özelliğini sürdürmektedir [1-2]. Erken tanı ve tedavi, hasta ömrünün uzatılmasında ve yaşam kalitesinin artırılmasında çok önemli bir yere sahiptir. Günümüzde kemoterapi, radyoterapi ve hormonal terapi en sık kullanılan terapi yöntemleridir. Kemoterapötik ajanlar; kontrolsüz hücre bölünmesini bloke eden ve apoptozu indükleyen sitotoksik ilaçlardır. Günümüzde en yaygın tedavi yöntemi olarak kullanılan kemoterapi yönteminde farmakolojik olarak aktif olan bu kanser ilaçları; çoklu-ilaç direnci, tümör dokusuna spesifik hedeflemede yaşanan zorluklar ve doz oranını kısıtlayan toksisite gibi nedenlerle ideal tedavi profili oluşturamamaktadır [3-4]. Bu kemoterapötik ajanların tedavi potansiyelini artırabilmek ve konvansiyonel ilaç terapisinin olumsuz ve yetersiz etkilerini ortadan kaldırabilmek için geliştirilen en önemli yaklaşım nanoteknolojidir [5-6]. Özellikle son on yıllık dönemde bilimsel alanda yapılan çalışmalarda, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tanısında nano yapı malzemelerin kullanımında çok büyük bir gelişme yaşanmıştır. Konvansiyonel yöntemlerin eksikliklerini gidererek, yüksek duyarlılık ve seçicilikte, kullanımı kolay tanı sistemleri geliştirme yönünde yapılan bilimsel çalışmalar mevcut yöntemlere göre önemli avantajlara sahip materyallerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Çeşitli kanser türlerinin ve bazı hastalıkların varlığı, vücutta bazı proteinlerin anormal miktarlarda var olmaları ile korelasyon göstermektedir. Konvansiyonel yöntemler, sadece proteinlerin belli eşik değerlerini aşmaları sonucu tanı konmasına olanak sağlarken, daha erken evrelerde tanı konmasına olanak sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi, hastaların tedavi edilme sürecinde, yaşam süresinin uzatılmasında ve mortalitenin azaltılmasında çığır açacak yeni bir dönemin başlamasına olanak sağlamaktadır. 1-100 nm boyutları ile nanoteknolojinin kullandığı en

önemli taşıyıcı moleküller olarak nanopartiküller; yüksek yüzey alanı/hacim oranları ile ve yüzeylerinin çeşitli kimyasal ve biyolojik ajanlar ile fonksiyonize edilebilirliği ile, hem kemoterapötik ilaçlar, plazmid DNA ve siRNA gibi ajanlar için bir nevi kargo görevi görmekte, hem de erken tümör tanısında sunduğu avantajlar ile birçok kanser hastalığında görüntüleme ve terapi imkanı sunan teranostik araç olarak kabul edilmektedir [7-8]. Özellikle süperparamanyetik demiroksit nanopartiküller (SPION); biyoyumlu olmaları, hücre içine kolayca girebilmeleri, manyetik özellikleri nedeniyle manyetik alan kullanılarak uzaktan yönlendirilebilmeleri, elektromanyetik enerjiyi absorblayarak ısıya dönüştürebilmeleri nedeniyle hipertermi tedavisinde kullanılabilirmeleri gibi birçok nedenle hücre işaretleme, biyoayırma, medikal tanı ve terapi amaçlı birçok uygulama alanına sahiptirler [9-15].

In vivo tümör hücre tanısında; tümör hücrelerinin tanınmasını sağlayan kendilerine özgü reseptörlerinin, biyolojik ligandlar taşıyan nanopartiküler taşıyıcı sistemler ile hedeflenmesi ve görüntülenme ajanları ile görüntülemeyi sağlamaları beklenir. Günümüzde kullanılan ve etkinlikleri araştırılan en önemli biyolojik ligandlar arasında monoklonal antibadiler ve aptamerler sayılabilir. Monoklonal antibadiler yüksek seçicilik özelliğine sahiptirler ve bu nedenle saflaştırma (biyosorbentler), tanı (görüntüleme, tanı kitleri, biyosensörler vb.) ve tedavi amacıyla (ilaç olarak) kullanılan ve kullanımları araştırılan en önemli biyoligand grubudur [16-17]. Aptamerler ise tek zincirli kısa oligonükleotid sekanslarıdır ve hedef moleküller ile (peptid, protein, hücre, mikroorganizma vs.) etkileşirken üç boyutlu bir konfigürasyona katlanırlar ve hedef molekülün yapısını değiştirme özelliğine sahiptirler. Sentetik olarak üretilebilirler ve oldukça küçük boyutları nedeniyle hedef molekül ile hızlıca etkileşebilme kapasitesine sahiptirler [18-20].

Sunulan tez kapsamında; MDA MB 231 insan meme kanseri tümör hücrelerinin özgün tanınması ve görüntülenmesinde kullanılacak nanopartiküler erken tanı sistemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu

amaçla, MDA MB 231 insan meme kanseri hücre yüzeyinde eksprese olduğu bilinen epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin hedeflenmesi düşünülmüştür. Bu kapsamda; manyetik çekirdekli, altın kaplı, aptamer ve antibadi taşıyan nanopartiküller tasarlanmış ve karakterize edilmiştir. Tasarlanan taşıyıcı sistem daha sonra tümör hücreleri ile hücre kültür ortamlarında etkileştirilmiş, hücre büyüme ve farklılaşması incelenmiş ve sitotoksiteleri araştırılmıştır. Ayrıca ikili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekroz gelişimi incelenmiş ve floresan mikroskop ve akım sitometri cihazı ile de tümör hücre seçicilikleri araştırılmış ve tanımlanmıştır.

Sunulan Doktora Tez Çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından (Proje Numarası : 013 D06 602 001) desteklenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Organizmadaki hücreler, "yenilenebilme" özelliklerine ve hücre çevrimi ile ilişkilerine göre "kararlı olmayan (labil)", "kararlı (stabil)" ve "kalıcı (permenant)" hücreler olarak 3 gruba ayrılırlar. Kararlı olmayan hücreler, yaşam boyu rejenere olma yeteneği olan hücrelerdir. Kararlı hücreler, normal koşullarda dinlenme evresinde olup sadece uyarı aldıklarında çoğalmaya başlayan hücrelerken, kalıcı hücreler ise, hücre çevrimini terk ettikleri için çoğalma ve rejenere olma yetenekleri olmayan hücrelerdir. Hücre, uygun olmayan çevre koşullarına uyum sağlayabilmek ve canlılığını sürdürebilmek için fizyolojik ya da patolojik adaptasyon mekanizmaları kullanabilir. Hücrelerin sayılarının artışıyla oluşan "hiperplazi", hücre boyutunun artışı ile karakterize "hipertrofi" ve hücre sayısının azalması ve hücrenin küçülmesi sonucu organ ya da doku gerilemesi ile karakterize "atrofi" benign adaptasyon süreçleridir ve etkenin ortadan kalkması ile gerileyebilir ve bu adaptasyonlardaki hücre tipi orijinal hücre tipidir. "Metaplazi" ise genellikle epitelde oluşan, geri dönüşümlü de olabilmekle birlikte, hücrenin başka bir hücreye farklılaştığı hücresel adaptasyon şeklidir [21].

Kanser; hücrelerin, başta immün sistem olmak üzere baskılayıcı mekanizmaların etkisi olmaksızın, kontrolsüz, zamansız ve geri dönüşümsüz çoğalmaları ve metabolik ve davranışsal değişikliklerle, orijinal hücreden tamamen farklı bir hücreye dönüşmeleridir. Kansere dokusu; kaynaklandığı hücre yapısı, sergilediği gelişim süreci, oluşturduğu klinik değişiklikler, komşu ve uzak dokulara yaptığı metastazlar ve moleküler düzeydeki farklılıklar açısından kişiden kişiye değişen bir tablo sergiler. Normal koşullarda hücreler devamlı bir devinim içerisinde olup, normal yaşam süresini dolduran hücre ölürken, onun yerini aynı hücre doldurur ve bu denge, genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmalarını sağlarken, bazıları aşırı hücre üremesini engellerler [22]. Hücre DNA'sında ya da

genlerde, başta çevresel olmak üzere değişik nedenlerle oluşan değişiklikler bu hassas döngüyü bozarak kanser gelişimini başlatabilirler.

Normal koşullarda hücre çevrimi; DNA sentezinin gerçekleştiği S evresi, mitoz bölünmenin olduğu M evresi ve bu iki süreç arasında yer alan G1 ve G2 (duraklama evreleri) evrelerinden oluşmakta olup, hücrelerin istirahat halinde bulunduğu G0 evresi ise, uyarı sonucu çevrimin başlayacağı potansiyel evredir [23]. Bu evrelerin herhangi bir noktasında gerçekleşen bir uyarı hücreler arası ahengi bozarak kontrolsüz hücre çoğalmasını başlatabilir. Bunların dışında DNA onarımı ve apoptoz (programlı hücre ölümü) da kanser oluşumunda önemli basamaklardır. Apoptoz, normal hücre döngüsünde rol alan bir süreç olup, her saniye yaklaşık 1.000.000 hücre vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Mitozis ile apoptoz arasındaki bu uyumun bozulması neoplastik sürecin başlamasına neden olmaktadır.

Siklinler, hücre çevriminin çeşitli evrelerini aktive eden proteinler olup, kendilerine özel olan ve "siklin bağımlı kinazlar" adı verilen tirozin kinazlarla birleşerek aktive olurlar. Hücre çevrimi kontrol noktaları olan, DNA sentezinden hemen önceki ve ikinci mitozdan hemen önceki evrelerde, siklin bağımlı kinaz ve tümör süpresör genlerin aktiviteleri baskılanırlar. Bu 2 dönem hücrenin kontrol edildiği ve varsa genetik defektlerin düzeltildiği dönemdir.

Hücre bölünmesi evresi öncesinde, DNA hasarının engellendiği ya da tamir edildiği aşamalar vardır. Bu evrelerde sitokinler, büyüme faktörleri, onkogenler ve MPF ("Maturasyon Destekleyici Faktör") ile düzenlenmekte ve evrelerin herhangi birinde aksaklık sonucu DNA hasarı olduğunda, tümör baskılayıcı genler döngüyü hemen durdurmaktadır. Protoonkogenler ve onkogenler; büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz olaylarında işlev gören proteinlerin sentezinden sorumlu olup; hücre ileti yollarındaki proteinleri kodlayan protoonkogenlerin (sis, hst-1, int-2, erb-B1, erb-B2, fms, ret, ras, abl, myc, N-myc, cyclin-D, CDK4 vb.) mutasyona uğramaları durumunda,

büyüme faktörlerinin çok fazla üretimi, hücre membranı ve çekirdek arasındaki ara yolların kontrolsüz uyarılması, transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artması, hücre bölünmesine engel olunamaması gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Kanser hücrelerinin normal hücrelere benzemeyen bazı ortak özellikleri bulunmaktadır. Bu hücrelerinin çoğunluğu tek bir hücreden doğarlarken; bazıları, birden çok hücrenin kanserojen etkiye maruz kalması ya da kalıtsal etkiler nedeniyle, hücre adacıklarından gelişirler. Çoğu hücrenin bölünme ve çoğalma sayısı sınırlıyken, kanser hücreleri sınırsız ve kontrolsüz bir şekilde çoğalma potansiyeline sahiptirler. Bunun nedeni normal hücre tipinde, kromozom uçlarında bulunan telomerler hücre farklılaştıkça kısalırken, kök hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de telomerler, telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler, uzunlukları sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır. Kanser hücrelerinde bulunan ve normal hücrelerde olmayan özelliklerden biri de metastaz yeteneğidir. Metastaz etyopatogenezinde; ekstraselüler matrikse yapışmadan sorumlu hücrelerin kaybı ya da bozukluğu, hücreler arası etkileşimin bozukluğu, metalloproteaz gibi enzimlerle hücrenin bazal membranının bozulması gibi faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir [24].

## **2.2. Meme Kanseri**

Meme kanseri, çok yaygın bir kanser türü olup, tüm yaşamı boyunca her 8 kadından birinde gelişmesi beklenir. Amerikan Kanser Derneği, 2014 yılı için, ABD’de yaklaşık 233.000 kadında meme kanseri gelişebileceğini, bunlardan 44.000’inin meme kanserinden yaşamını yitirebileceğini öngörmüştür. Meme kanserlerinde % 5-10 olguda, başta BRCA1 ve BRCA2 olmak üzere ATM, TP53, CHEK2, PTEN, CDH1, STK11 gibi gen mutasyonlarının rol oynadığı bilinmektedir. En sık görülen meme kanseri türleri; “duktal karsinoma in situ”, “lobüler karsinoma in situ”, “invaziv (infiltratif) duktal karsinoma”, invaziv lobüler karsinoma” olup, “inflamatuvar meme kanseri”, “meme başının Paget Hastalığı”,



“anjiosarkom” ve “sistosarkoma filloides” ise daha nadir görülen meme kanseri tipleridir.

Bir meme kanserinin patolojik değerlendirmesi sırasında en önemli adım; dokunun, östrojen ve progesteron reseptörlerine sahip olup olmadığını belirlemektir. Tümör dokusu, eğer bu reseptörlerden birine sahipse, ER + (Östrojen reseptörü +) ya da PR + (progesteron reseptörü +) olarak nitelendirilir. Eğer her iki tip reseptör de pozitifse, “hormon reseptör +” adını alır. Meme kanserlerinin yaklaşık % 20’sinde, büyümeyi tetikleyen bir protein olan “HER2/neu” (kısaca “HER2” olarak da ifade edilir) çok fazla miktarda bulunur. HER2-pozitif meme kanseri türlerinde, bu protein çok fazla miktarda bulunur ve bu tür, klinik olarak daha agresif seyretmeye ve daha hızlı büyümeye eğilimlidir. Bununla birlikte HER2-pozitif meme kanseri, trastuzumab ve lapatinib gibi kemoterapötiklerden çok daha fazla ve hızlı yarar görme eğilimindedir. Bu nedenle, her yeni tanı konmuş meme kanseri, HER2/neu açısından mutlaka incelenmelidir. Biyopsi ya da cerrahi ile alınmış örneğin, bu protein açısından incelenmesinin 2 yolu bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, immünohistokimyasal yöntemler olup bu proteine karşı oluşmuş spesifik antikolar özel boyalarla boyanıp mikroskop altında incelendikten sonra 0, +1, +2 ve +3 olarak sınıflandırılırlar. İkinci yöntem ise FISH (Floresan in situ hibridizasyon) yöntemi olup, hücredeki HER2/neu genine yapışan floresan DNA parçacıklarının mikroskop altında sayılması temeline dayanmaktadır.

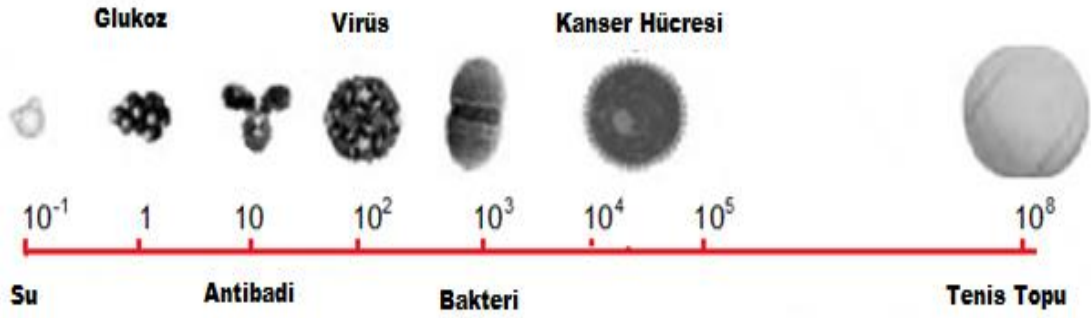
Hücre kültürü ve hücre dizisi kullanılarak yapılan deneyler ise yukarıdaki konvansiyonel tanı yöntemlerine alternatif olabilecek daha hızlı ve daha kesin tanı yöntemleri geliştirmek ve benzer yöntemlerle farklı tedavi seçenekleri oluşturmaya odaklanmışlardır. Bu hücre serilerine örnek olarak invaziv duktal karsinom için “600MPE”, “BT-20”, “BT-474”, “BT-483”, “BT-549”, MCF-7”, “MDA-MB-231” ve adenokarsinom için “AU565” verilebilir [25].

### 2.3. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji; 1 ila 1000 nm aralığındaki atomik, moleküler ve supramoleküler düzeylerdeki yapıları ölçen, tasarlayan ve işleyen bilim dalıdır. Temel amaç; boyutlarının çok küçük olmasından yararlanılarak yeni özellikler ve fonksiyonlar kazandırabilmek üzere maddesel yapı, aygıt ve sistemlerin oluşturulması, anlaşılması ve kullanılmasıdır [26].

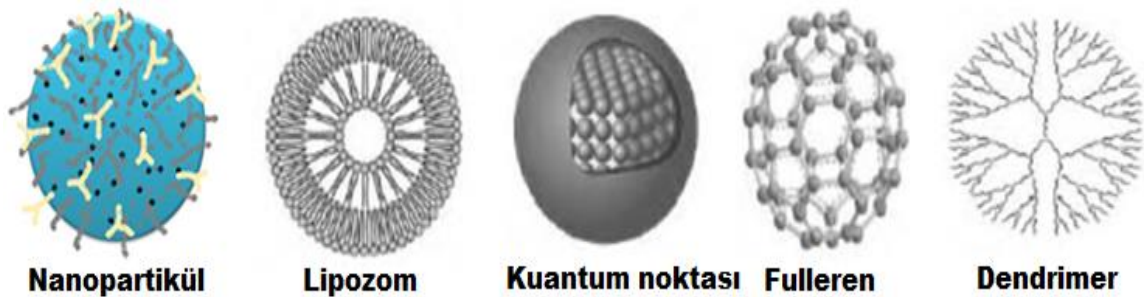
Nanoteknolojinin temel hedefi; moleküllerin, çeşitli büyüklük skalalarında hiyerarşik olarak bütünleşmiş yararlı nesnelere olarak düzenlenme işlevleri ve daha sonra nesnelere yeniden maddeye dönüşmesi kabiliyetlerinden yararlanılması olarak tanımlanabilir. Doğa, fiziksel çevre ve canlı sistemler üzerinde bu durumu başarıyla gerçekleştirmekte ve sürdürmektedir. Maddelerin nanoölçek düzeyinde yeniden düzenlenmesinde etkili olan van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve çeşitli yüzey kuvvetleri gibi "zayıf" moleküler etkileşimler düşük enerji tüketimi gerektirir ve tersine çevrilebilir.

Nanobiyotıp; ilaç sentezi, beyin anlaşılması, eksik ya da hasarlanmış vücut parçalarından birinin yerine konması, tıbbi tanı ve tedavi gibi medikal amaçlar için nanoölçek ilke ve tekniklerini uygulayarak inert materyalleri ve biyosistemleri anlamak ve dönüştürmek üzere kullanılan uygulama ve araştırma alanıdır. Nanoteknolojinin; biyotıp ve biyoloji ile ve bilgi teknolojileri ile entegre edilmesinin önümüzdeki on yıllık dönemde hızlanması beklenmektedir [27]. Nanoölçekte gerçekleştirilen bilimsel çalışmaların modern biyoloji ve tıp alanları ile uyumlu olmasının bilim karar politikalarına da yansıtılması gerektiği düşünülmektedir [28]. Şekil 2.1'de nano boyuttaki materyaller ölçeklendirmenin örneklendirilmesi açısından sunulmuştur [29]. Ortalama bir kanser hücresinin boyutu 10 ila 100 mikron arasında iken, birçok nanomateryalin boyutu hücreden 100 ila 10,000 kat daha küçüktür.



Şekil 2.1. Nanoölçekli materyaller

Nanobiyosistem bilimleri ve mühendisliği, nanoteknolojinin en hızlı gelişen alanlarından biridir. Canlı sistemleri daha iyi anlayabilmek ve tıp ve sağlık alanlarında (yeni ilaçların bulunması ve bu ilaçların hedeflendirilmiş tedavileri gibi) kullanılacak yeni malzemelerin geliştirilebilmesi için çok gerekli bir alandır. Hücre içi ve nöral sistemlerin işlevlerinin anlaşılması ve değerlendirilmesi, üstesinden gelinmesi gereken önemli başlıklardan bir tanesidir. Nanobiyosistemler, insan-yapımı nanosistem modellerinin ortaya konmasında ve bu alanda geliştirilebilecek ve insanlığın hizmetine sunulabilecek her türlü malzeme için ilham kaynağı olma özelliğini sürdürmektedir. Yapılan bilimsel araştırmalar, biyouyumluluğu çok daha fazla olan materyallerin geliştirilmesine ve endüstriyel uygulamalar için nanobiyomateryallerin oluşturulmasına öncülük etmektedir. Biyoloji ve nanobilimlerin ortak noktada buluşarak multidisipliner çalışmaları birarada yürütmelerinin; bilim, mühendislik, teknoloji, tıp ve ziraat alanlarında birleştirici unsur olarak rol oynayacağı düşünülmektedir [30]. Şekil 2.2'de çeşitli nanomateryallerin yapısal görünümü sunulmuştur.



Şekil 2.2. Çeşitli nanomateryallerin yapısal görünümü

## **2.4. Fonksiyonel Manyetik Nanomalzemeler**

### **2.4.1. Biyomedikal Uygulamalar Açısından Temel Gereklilikler**

Manyetik nanomateryaller tanı ve terapi alanındaki uygulamalar açısından çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan manyetik nanopartiküller, genellikle manyetik nanopartiküllerin uygun bir matriks içerisine yerleştirilmesi ile hazırlanan manyetik boncuk ("magnetic bead") formundaki manyetik nanopartiküllerdir. Manyetik boncuklar spesifik uygulamalarda kullanılmak üzere genellikle özel olarak tasarlanırlar [31]. Tasarımları ve sentezlerinde; biyouyumlu olmaları, biyobozunurlukları ve kararlılıkları göz önünde bulundurulmalı ve aynı zamanda boyutları ve şekilleri de kontrol edilebilmelidir. Manyetik özelliklerini belirleyen demir oksit içerikleri gibi fiziksel özellikler de dikkatle tasarlanmalıdır. Bununla birlikte, biyomoleküllerin kovalent bağlanması ya da spesifik olmayan basit adsorpsiyona olanak sağlayacak uygun yüzey modifikasyonlarının yapılabilir olması da gerekmektedir.

#### **2.4.1.1. Manyetik Partiküller ve Ferrosıvılar**

Biyomedikal uygulamalarda en çok kullanılan manyetik nanomateryaller, organik ya da sıvı taşıyıcı ortam içerisinde yer alan ve manyetik boncukların kararlı dispersiyonları olan ferrosıvı formundaki materyallerdir. Ferrosıvılar aynı zamanda manyetik boncuk çözeltileri ya da manyetik sıvılar olarak da adlandırılırlar. Manyetik partiküllerin sıvı ortamdaki kararlı dispersiyonlarını elde edebilmek için, partikül yüzey özellikleri sıvı ortam vasatına uygun olacak şekilde özenle hazırlanmalıdır. Partiküllerin kalıcı manyetik momente tabi olmaları durumunda ortaya çıkabilecek manyetik çekim kuvveti ve partiküller arası van der Waals kuvvetlerinin üstesinden gelinebilmesi için, partiküllerarası itme ve partikül-çözücü etkileşimleri yeterince güçlü olmalıdır [32].

#### **2.4.1.1.1. Manyetik Partiküller**

Manyetik partiküller manyetizmaya karşı tepki veren katı evrelerdir ve mikrometre ile nanometre boyutları arasında değişen nanopartikül ya da nanopartikül agregatları olabilirler. Dışarıdan uygulanan bir manyetik alan etkisinde manyetik partiküller eksen etrafında dönerler. Partiküllerin boşlukta tercih edilen yönde hareket ettirilebilmesi için, homojen olmayan manyetik alan şiddeti kullanılmalıdır. Sıvı süspansiyon içerisinde yer alan bu gibi partiküller üzerinde etkili olan manyetik kuvvet, partikülün manyetizasyonu, manyetik akı yoğunluğu ve manyetik alan gradienti ile orantılıdır [33]. En çok kullanılan manyetik partiküller genel bileşim olarak  $MFe_2O_4$  formundaki ferritler (M; Ni, Co, Mg ya da Zn gibi bivalent metal katyonu olabileceği gibi  $Fe_3O_4$  formundaki magnetit de olabilir) ve  $Fe_2O_3$  formundaki maghemit'tir [34].

Biyomedikal uygulamalar açısından değerlendirildiğinde manyetik nanopartiküller çok cazip avantajlar sunarlar [35]. İlk olarak; boyutları birkaç nanometre ile onlarca nanometre aralığında kontrol edilebilir ve dolayısıyla bir hücre (10–100  $\mu m$ ), virüs (20–450 nm), protein (5–50 nm) ya da genin (2 nm genişlik ve 10–100 nm uzunlukta) boyutundan daha küçük ya da farklı olmayacak şekilde ayarlanabilir. Bu nedenle istenilen, ilgilenilen biyolojik materyal içerisine girmeleri ya da yaklaşmaları sağlanabilir. Uygun biyolojik moleküller ile kaplanmaları sağlanırsa, biyolojik materyal ile etkileşebilirler ya da bu biyolojik materyale bağlanabilirler. İkinci olarak; manyetik nanopartiküller dışarıdan uygulanan manyetik alan gradientleri ile yönlendirilebilirler. Manyetik alan şiddetinin insan dokusu içerisine penetre edilebilirliği ile kombine edildiğinde, bu uzaktan yönlendirilebilirlik durumu, manyetik olarak işaretlenmiş biyolojik materyallerin ya da manyetik nanopartiküllerin immobilizasyonu ya da transportu da dahil olmak üzere birçok uygulamanın kapılarını açmaktadır. Bu nedenle; vücut içerisindeki tümör benzeri hedeflenmiş bölgelere antikanser ilaçları gibi

taşıyıcı sistemlerin aktarılmasında kullanılabilirler. Üçüncü olarak; uyarılan bölgeden nanopartiküllere enerji transferinin gerçekleşmesi ile manyetik nanopartiküller zamanla değişen manyetik alan şiddetine titreşerek karşılık verirler ve dolayısıyla nanopartiküller ısıtılabilirler. Bu nedenle manyetik nanopartiküller, tümör benzeri hedeflenen bölgelere toksik düzeyde termal enerji aktarımı yapabilirler, hipertermi ajanları olarak ya da kemoterapi ve radyoterapi iyileştirme ajanları olarak da kullanılabilirler.

Manyetik nanopartiküllerin geliştirilmesinde üç durum göz önünde bulundurulmalıdır [36]. Birincisi, manyetik nanopartiküller kristalin olmalıdır ve her bir partikül sadece tek domeynli olmalıdır. İkincisi, nanopartiküllerin boyut dağılımı olabildiğince dar olmalıdır. Üçüncüsü ise, belirli bir örnek içerisinde bulunan manyetik nanopartiküllerin tümünün şekli kendine özgü ve aynı tarzda-tek biçimde olmalıdır. En geniş kullanım alanına sahip olan küresel nanopartiküllerin yanısıra, nanotüpler ("nanotube") ve nanotel/nanokablo ("nanowire") gibi daha kompleks geometrilere sahip olan nanopartiküller de sıkça kullanılmaktadırlar.

#### **2.4.1.1.2. Ferrosivılar**

Biyomedikal uygulamalarının birçoğunda manyetik nanopartiküller kolloidal çözeltiler oluşturacak şekilde uygun bir sıvı içerisinde dağıtılmışlar ve aglomerasyonu önleyecek şekilde kararlı duruma getirilmişlerdir. Ferrosivılar ilk zamanlarda, uygun bir organik çözücü içerisinde büyük partiküllerin öğütülmesi ve nanofiltreleme yolu ile moleküler eleme gerçekleştirilerek üretilmişlerdir. Günümüzde birçok ferrosıvı kimyasal olarak hazırlanmaktadır. Fizyolojik ortam içerisinde, nötral pH değerinde ve uygun iyonik güçte kararlı bir ferrosıvı elde etmek için, partikül yüzeyi fonksiyonel hale getirilmelidir. Bu partiküller genellikle dekstran, albümin ya da metakrilatlar ve organosilanlar gibi sentetik polimerler ile kaplanırlar ve genellikle bir antibadiden oluşan efektör molekül, partikül yüzeyine kaplanan polimer ile kovalent bağ

yaparak immobilize edilir. Kaplamanın kararlılığı, efektör-partikül kompleksinin dengesini belirler [34].

#### **2.4.1.2. Biyouyumluluk ve Kimyasal Kararlılık**

Belirtilen görüşler, biyomedikal uygulamalarda kullanılan manyetik nanopartiküllerin genellikle ferrosıvı formunda olduğuna işaret etmektedir. Ferrosıvılar genellikle manyetik nanomateryallerin hidrofilik kolloidleridir. Ferrosıvılar ve ferrosıvı içerisindeki manyetik materyaller biyouyumlu ve kimyasal olarak kararlı olmalıdırlar. Bu durumun başarılabilmesi için, manyetik nanomateryallerin boyutu uygun olarak seçilmiş olmalıdır. Ayrıca manyetik nanopartiküllerin sıvı içerisinde kararlı halde asılı olmasını, kimyasal olarak kararlı olmasını ve dolayısıyla biyouyumlu olmasını sağlamak için manyetik nanopartiküllerin yüzeyleri fonksiyonelize edilmiş olmalıdır.

#### **2.4.1.3. Fiziksel Özellikler**

Ferrosıvıların yönlendirilebilmeleri ve arzu edilen biyomedikal fonksiyonları sergileyebilmeleri için, ferrosıvıların ve manyetik nanopartiküllerin fiziksel özelliklerinin belli gereklilikleri sağlaması gerekir. Biyomedikal uygulamalarda önemli rol oynayan ferrosıvıların tipik fiziksel özellikleri arasında başlıca vizkozite ve manyetik relaksasyon sayılabilir. Bazı biyomedikal uygulamalarda, özellikle biyolojik materyallere mekanik güç uygulanması düşünüldüğü durumlarda araç olarak manyetik nanopartiküllerin kullanılması söz konusu olduğunda, manyetik nanopartiküllerin mekanik özellikleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

#### **2.4.1.4. Manyetik Özellikler**

Biyomedikal uygulamalardaki en önemli anahtar noktalardan bir tanesi, biyolojik materyal ya da ilaçların yönlendirilmesi ya da uzaktan kumanda edilebilmesidir. Bu durum genellikle dışarıdan uygulanan manyetik alan şiddeti kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla ilaç ya da biyolojik materyal immobilize edilmiş manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri çok büyük önem taşımaktadır. Manyetik nanomateryaller genellikle süperparamanyetik özellik sergilerler.

## 2.4.2. Nanomanyetizma

Manyetizma ile ilgili ilk teoriler ve deneyler Gilbert, Descartes, Coulomb, Poisson, Green, Oersted, Ampere, Davy, Faraday, Maxwell ve benzeri tüm zamanların en değerli bilim adamları tarafından geliştirilmiş ve gerçekleştirilmiştir. Fakat bununla birlikte, sürdürülebilir uygun bir model geliştirilmesi açısından kuantum mekaniği gerekli görülmektedir ve manyetizma konusu henüz tam olarak çözülebilmiş bir problem olmadığından model geliştirilmeye devam etmektedir.

Atomun yapısında, çekirdek etrafında elektronların belli bir yörüngede dönmeleri sonucu içerdikleri açısal momentum ve bu açısal momentumlara karşılık gelen manyetik momentler sonucunda manyetik bir alan oluşur. CGS Birim Sistemi'nde manyetizasyon M ile ifade edilir ve birimi emu/cm<sup>3</sup>'tür. Manyetik alan şiddeti H ile ifade edilir ve birimi Oersted (Oe)'tir. Manyetik indüksiyon ya da manyetik akı yoğunluğu B ile ifade edilir ve birimi gauss'tur. Manyetik indüksiyon (B), manyetik alan şiddeti (H) ve manyetizasyon (M) arasındaki ilişki Eşitlik 2.1 ile ifade edilir. Scholten (1995) manyetik birimler ile ilgili birçok kuralı detaylı ve kolay bir anlatım ile sunmuştur [37].

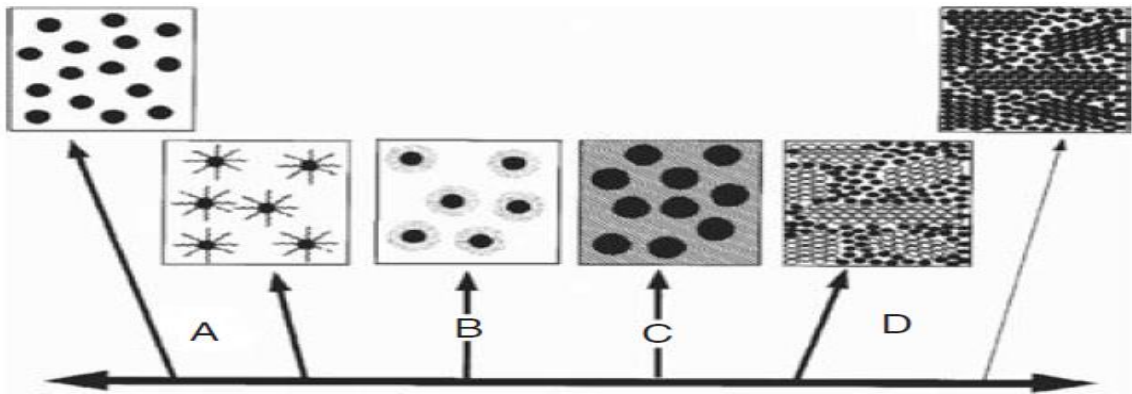
$$B = H + 4\pi M \quad (2.1)$$

### 2.4.2.1. Nanoyapısal Morfolojilerin Sınıflandırılması

Manyetik nanomateryallerin nanoyapısal morfolojileri, manyetik özellikleri ve nanoyapıları arasındaki ilişkiye bağlı olarak sınıflandırılabilir. Manyetik nanomateryallerin davranışlarından sorumlu fiziksel mekanizmalara işaret eden bir sınıflandırma burada bahsedilen yöntemlerden bir tanesidir [38]. Şekil 2.3'de gösterildiği gibi; manyetizasyonun tam anlamıyla boyutsal etkiler ile belirlendiği birbirleriyle etkileşmeyen partiküllerden (tip A), birbirleriyle olan etkileşimlerinin manyetik özelliklere etki ettiği ince-taneli nanoyapılara kadar uzanan manyetik nanoyapılı materyallerin genel olarak dört sınıfı mevcuttur. Tip A olarak belirtilen grup, nanoçapta izole partiküllerden ibarettir. Birbirleriyle etkileşmeyen bu grubun manyetik özellikleri,



bileşenlerinin boyutlarından türetilebilir ve partiküllerarası etkileşimlerden kaynaklanan herhangi bir etki söz konusu değildir. Bir diğer uçta gösterilen Tip D materyalleri ise nanoçaplı yığın materyallerdir. Yığın materyal içerisinde, hacimsel olarak önemli bir bölüm tanecik sınırları ve arayüzlerinden oluşmakta ve nanopartiküller arasındaki etkileşimler yığın materyalin manyetik özelliklerine etki etmektedir. Etkileşimlerin derecesi arayüzlerin özelliklerine önemli ölçüde bağlıdır ve birçok taneciği kapsayan düzeyde olabilir. Tip D yığın materyallerinin manyetik özellikleri tanecik sınırları ve taneciklerarası etkileşimler tarafından yönlendirildiğinden, bu materyallerin manyetik özellikleri, azaltılmış ölçek boyundaki polikristalin materyaller için türetilmiş teorilerin basitçe bu materyallere uygulanması yolu ile tahmin edilemez. Birçok durumda, manyetik nanomateryalin manyetik davranışları hem partiküllerarası etkileşimlerin hem de boyutsal etkilerin her ikisinin bir sonucudur. Tip B partikülleri, çekirdek-kabuk yapısında çok küçük partiküllerdir. Kabuk varlığı, partikül-partikül etkileşimlerinin önlenmesine yardımcı olurken, çekirdek yapı ile kabuk arasındaki etkileşimler ise materyalin toplam manyetik performansına etki edebilir.



Şekil 2.3. Nanoyapısal morfolojilerin sınıflandırılması [38]

Bazı durumlarda ise kabuk yapının kendisi manyetik özellik gösteren bir yapıda olabilir. Tip C nanokompozit materyalleri kimyasal olarak birbirinden farklı iki materyalden oluşmaktadır; manyetik partiküller bir matris içerisinde matrisin her tarafına dağıtılmış durumdadır. Bu

durumda partiküllerarası manyetik etkileşimler, temel olarak manyetik partiküllerin hacim fraksiyonu ile matriksin karakterine bağlı olarak belirlenmektedir [38].

#### **2.4.2.2. Temel Manyetik Uzunluklar**

Manyetik nanomateryallerin araştırılmasındaki temel motivasyonlardan bir tanesi, nanopartikülün boyutu ile benzer şekilde, kritik uzunluğun ayarlanması ile ortaya çıkan olağandışı olguların manyetik özelliklerde etkileyici değişim yaratmasıdır. Materyalin manyetizasyonundaki değişimler, enerji bariyerlerinin üstünde gerçekleştirilen aktivasyon mekanizması ile oluşur ve her bir fiziksel mekanizma uzunluk skalası ile ilişkilendirilmiş enerji bariyerinden sorumludur. Manyetik materyallerin temel manyetik uzunlukları büyük ölçüde kristalin anizotropi uzunluğu ( $l_K$ ), uygulanan manyetik alan şiddeti ( $J/H$ ) ve manyetostatik uzunluk ( $l_S$ ) gibi kavramları içerir ve bu kavramlar Eşitlik 2.2, 2.3 ve 2.4'de verilmiştir [38].

$$l_K = \sqrt{J/K} \quad (2.2)$$

$$l_H = \sqrt{2J/HM_S} \quad (2.3)$$

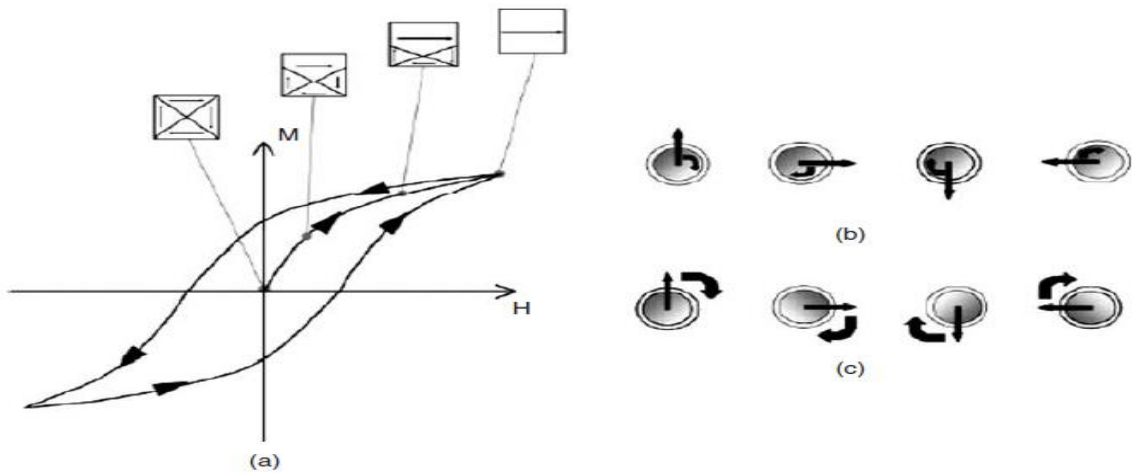
$$l_S = \sqrt{J/2\pi M^2_S} \quad (2.4)$$

Dominant anizotropiden kaynaklanan yığın materyalin anizotropi sabiti  $K$  ile, tanecik içerisindeki değişim de  $J$  ile ifade edilmektedir. Tek tip bariyerden daha fazlası mevcut ise, manyetik materyalin manyetik özellikleri en kısa karakteristik uzunluğun yönlendirme etkisi altında demektir. Birçok manyetik materyalin temel manyetik uzunluğu 1-100 nm sırasındadır. Örnek olarak; oda sıcaklığında ve 1000 Oersted'de nikel için  $l_S \approx 8$  nm,  $l_K \approx 45$  nm ve  $l_H \approx 19$  nm'dir.

#### **2.4.2.3. Multi-domeyn ve Tek-domeyn Nanopartiküller**

Manyetik nanopartiküller manyetik özellikleri dikkate alındığında iki ana kategoride incelenebilirler; multi-domeyn ve tek-domeyn nanopartiküller. Multi-domeyn nanopartiküllerin boyutları genellikle daha büyüktür ve her biri manyetizasyon yönü belli olan birçok alt-domeyn içerirler. Bir manyetik alana tabi olduklarında, "domeyn duvarı

yer değişimi” adı verilen bir fenomen meydana gelir. Şekil 2.4’deki çizimde geri-dönüşümsüz olan bu durumun grafiği sunulmuştur [39]. Artan ve azalan manyetik alan şiddeti için manyetizasyon eğrilerinin rastlaşmadığı görülmektedir. Histerezis çevriminde manyetik alan şiddeti ve yönünün sürekli değişimi, atom çekirdeğinin ısınmasına yol açar ve bu ısınmalarla oluşan enerji kayıpları “histerezis kaybı” olarak adlandırılır. Histerezis alanı ne kadar yüksek ise, histerezis kaybı da o oranda büyüktür. Tek domeynli nanopartiküller için, herhangi bir domeyn duvarı mevcut olmadığından dolayı ısınma olmamakta ve histerezis kaybı meydana gelmemektedir.



Şekil 2.4. (a) Multi-domeyn manyetik bir nanomateryalin tipik histerezis çevrimi, (b) Durgun bir manyetik nanopartikül içerisindeki manyetizasyonun Neel rotasyonu Őematizasyonu (nanopartikül bir ekseninde dönmemektedir), (c) Manyetik bir nanopartikülün Brown rotasyonu (nanopartikül tümüyle bir ekseninde dönmektedir)

Bu kavramların detayları, “histerezis çevrimleri” ve “süperparamanyetizma” konu başlıkları altında daha geniş kapsamlı olarak sunulmuştur.

#### 2.4.2.4. Manyetik Materyaller ve Manyetizma

Diamanyetik materyallerde; dışarıdan uygulanan manyetik alan şiddeti varlığında eşleşmemiş elektronlar yörüngesel hareketlerini değiştirerek materyal içerisindeki toplam alanı azaltacak şekilde net bir manyetik

momenti indüklerler ve materyal içerisinde zıt yönde zayıf bir manyetik alan oluşur ve bu materyaller küçük, negatif ve sabit bir manyetik doygunluk değeriyle nitelendirilirler [40]. Tüm materyallerde gözlenen ve atomlar arasındaki doğal bir düzenlenme ile karakterize edilen diamanyetizma alan ve sıcaklıktan bağımsızdır. Diğer tüm manyetizma tipleri eşleşmemiş spin (momentler) gerektirirler ve spinler arası etkileşimler, manyetizmanın tipini belirler. Altın, gümüş, magnezyum, potasyum diamanyetik davranış sergileyen gruba örnek olarak verilebilir.

Paramanyetik materyallerde; dışarıdan uygulanan manyetik alan şiddeti varlığında momentlerin birbirlerinden bağımsız olarak manyetik alan yönünde yönelmesi ile az miktarda ve pozitif bir net manyetizasyon meydana gelirken, dışarıdan bir manyetik alan uygulanmadığında atomik momentler ısı enerjisi etkisi ile rastgele yöneldiğinden bu materyallerde net manyetizasyon sıfırdır. Eşitlik 2.5 ile ifade edilen "Curie-Weiss Yasası" ile, manyetik doygunluğun sıcaklık ile ters orantılı olarak değiştiği dolayısıyla, sıcaklığın artırılması ile manyetik momentlerin rastgele yönelim hareketlerini arttırarak manyetizasyonun azalmasına yol açtığı açıklanmıştır [41]. Materyalin yapısındaki eşleşmemiş elektronlar paramanyetik davranışı indüklerler. Alüminyum, platin ve hava paramanyetik davranış sergileyen gruba örnek olarak verilebilir.

$$\chi_p = C_r / (T - \theta) \quad (2.5)$$

$C_r$  = Curie sabiti,  $T$  = Weiss sabiti

Ferromanyetik materyallerde; elektron alışverişleri nedeniyle manyetik momentler birbirleri ile aynı yönde yönelim sergilerler ve materyalde oda sıcaklığında kalıcı bir manyetizasyon oluşur [42]. Ancak; "Curie sıcaklığı" ( $T_c$ ) olarak adlandırılan kritik sıcaklık değerinin üzerinde ferromanyetik özellik sergileyen materyalin normalde paramanyetik materyallere kıyasla daha yüksek olan manyetik doygunluk değeri azalır ve evre geçişini de kapsayan bu süreç sonunda materyal paramanyetik

özellik sergilemeye başlar. Sürekli mıknatıslar; demir, nikel, kobalt ve magnetit gibi ferromanyetik materyallerden yapılırlar. Diamanyetizm ve paramanyetizm; atomların, iyonların ya da moleküllerin tek tek durumlarını yansıtırken, ferromanyetizma katı kristal içerisindeki atom ya da moleküllerin grup halinde davranışlarını yansıtır. Demir, kobalt, nikel ferromanyetik davranış sergileyen gruba örnek olarak verilebilir.

Ferrimanyetik materyallerde; manyetik momentler birbirlerine zıt yönde olmalarına rağmen eşit büyüklükte değildir ve bu nedenle net bir kalıcı manyetizasyon söz konusudur ve bu anlamda ferromanyetik materyallere benzerler. Kalıcı bir net manyetizasyon sergileme ve "Curie sıcaklığı" ( $T_c$ ) olarak adlandırılan kritik sıcaklık değerinin üzerinde paramanyetik özellik sergileme özellikleri ferromanyetik materyallerinkine benzerdir.

Antiferromanyetik materyaller ise; ferromanyetik materyallerin aksine, komşu atomların manyetik momentleri zıt yönde birbirini yok edecek şekilde çiftler oluştururlar ve bu nedenle dışarıdan uygulanan manyetik alan şiddeti varlığında bile düşük sıcaklıklarda materyalin net manyetizasyonu sıfıra yakındır. "Neel Sıcaklığı" ( $T_N$ ) olarak adlandırılan sıcaklık değerinin üzerinde evre geçişi söz konusu olur ve paramanyetik özellik sergilemeye başlarlar. Bu materyallerde; manyetik doygunluk değeri, Neel sıcaklığının altında sıcaklıkla artan bir değer iken, Neel Sıcaklığının üzerinde Curie-Weiss Yasası gereği sıcaklık ile azalan bir değerdir [43]. Çizelge 2.1'de farklı formlardaki manyetizma özellikleri sunulmuştur [44].

**Çizelge 2.1.** Farklı manyetizasyon formlarında manyetizma özellikleri

Manyetizasyon Tipi	Dış Alana Net Hizalanma	Relatif Manyetik Alınganlık	Doygunluk Manyetizasyonu	Artık Mıknatıslanım	Sıcaklığa Bağımlılık
<b>Dia manyetizma</b>	Antiparalel	-1	Hayır	Hayır	Hayır
<b>Para manyetizma</b>	Paralel	+10	Hayır	Hayır	Evet
<b>Süper paramanyetizma</b>	Paralel	+5,000	Evet	Hayır	Evet
<b>Ferro manyetizma</b>	Paralel	+25,000	Evet	Evet	Evet

#### 2.4.2.5. Süperparamanyetizma

Süperparamanyetizma fenomenini teorik olarak açıklayan Neel (1949); çok küçük partiküllerin termal dalgalanmalarının kararlı manyetizasyon varlığını önlemesinden dolayı partiküllerin çok küçük boyutlara ulaştığında  $H_c$  değerinin sıfır değerine yaklaştığını teorik olarak kanıtlamıştır. Süperparamanyetizm için iki deneysel kriter mevcuttur [45]. Bunlardan birincisi; manyetizasyon eğrileri histerezis sergilemez ve koersivite sıfırlanır ve ikincisi farklı sıcaklıklardaki manyetizasyon eğrileri  $M$  'ye karşılık  $H/T$  çizgisi üst üste çakışmak zorundadır.

Süperparamanyetizmin temel mekanizması, manyetik partikülün net manyetizasyonunun relaksasyon süresi (Neel Relaksasyon Süresi) ( $\tau$ )'ne bağlıdır [46]. Eşitlik 2.6 ile ifade edilmektedir.

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (2.6)$$

Momenti tersine çeviren enerji bariyeri  $\Delta E$  ile, ısı enerjisi  $K_B T$  ile ifade edilmektedir. Bu eşitlikte  $k_B$  ile ifade edilen Boltzman sabitidir. Birbirleri ile etkileşmeyen partiküller için;  $\tau_0$  ile ifade edilen pre-eksponansiyel faktör  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  s büyüklüğünde ve sıcaklığa sadece çok zayıf bir düzeyde bağlıdır. Enerji bariyerinin, manyetokristalin ve şekil anizotropisi gibi iç ve dış etkiler kaynaklı çıkış noktaları mevcuttur [35]. Fakat basit durumlar için,  $\Delta E = KV$  olduğu bildirilmiştir. Burada ifade edilen  $K$  anizotropi enerji yoğunluğu ve  $V$  partikül hacmidir. Küçük partiküller için oda sıcaklığında  $\Delta E$   $K_B T$  ile birbirine çok yakın değerde, karşılaştırılabilir düzeydedir ve bu nedenle süperparamanyetizm küçük boyutlu partiküller için önem arz etmektedir.

#### 2.4.2.6. Histerezis Çevrimleri

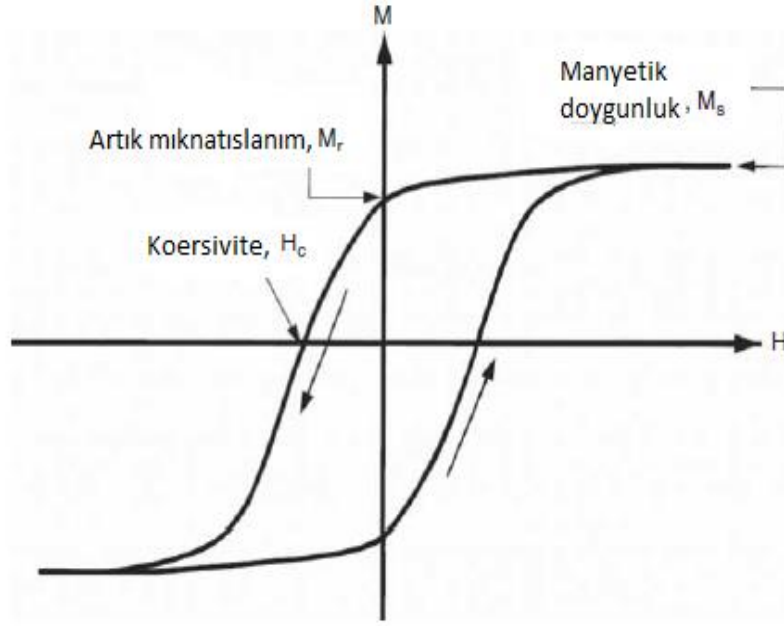
Materyallerin manyetik özelliklerinin birçoğu histerezis eğrilerinden türetilmektedir. Şekil 2.5'de manyetizasyon – manyetik alan şiddeti ( $M-H$ ) histerezis eğrisi gösterilmektedir [38]. Materyallere dışarıdan uygulanan manyetik alan yeterince büyük olduğunda, manyetik materyal içerisindeki tüm elektronlar uygulanan manyetik alan ile

hizalanırlar. Bu aşamada, materyalin manyetizasyonu maksimum değerine ulaşır ve bu değer "doygunluk mıknatıslığı" ya da "manyetik doygunluk" olarak adlandırılır ve  $M_s$  ile ifade edilir. Dışarıdan uygulanan bu manyetik alan zayıfladığında, materyal içerisindeki elektronlar dışarıdan uygulanan manyetik alan ile birlikte hizalanmaya devam etmez ve böylece materyalin toplam manyetizasyon değeri düşer. Ferromanyetik bir materyal için, dışarıdan uygulanan manyetik alan değeri sıfır değerine düştüğünde, materyal halihazırda artık bir manyetik momente sahiptir ve alansız (sıfır alan) bölgedeki bu manyetizasyon değerine "artık mıknatıslanım" adı verilir ve  $M_r$  ile ifade edilir. Artık mıknatıslanım değerinin doygunluk mıknatıslığına oranı "artık oran" olarak tanımlanır, 0 ila 1 arasında bir değerdir ve  $M_r/M_s$  ile ifade edilir. Materyalin tekrar sıfır manyetizasyon değerine geri getirilebilmesi için, ters yönde bir manyetik alan uygulanması gerekir ve bu alanın büyüklüğü "koersif alan" olarak adlandırılır ve  $H_c$  ile ifade edilir. Manyetik materyal içerisinde kendiliğinden manyetize olmuş "domeyn" adı verilen alanların yeniden oryante olmaları ve büyümeleri; boşluklar, safsızlıklar ya da çekirdek engelleri gibi mikroyapısal özelliklere ve manyetokristalin anizotropi gibi iç özelliklere bağlı olduğu gibi aynı zamanda partikülün şekli ve büyüklüğüne bağlıdır. Birçok durumda, manyetik materyalin histerezis eğrisi Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) ya da SQUID Manyetometresi (Süperiletken Kuantum Girişim Cihazı) gibi cihazlarla ölçülmelidir [47].

Eşitlik 2.7'de gösterildiği gibi; bir manyetik materyale herhangi bir manyetik alan şiddeti ( $H$ ) uygulandığında, materyal içerisindeki atomik momentlerin her biri materyalin toplam manyetik indüksiyonuna katkıda bulunur.

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (2.7)$$

Eşitlikte tanımlanan  $\mu_0$  boşluğun manyetik geçirgenliğini,  $M = m/V$  ise birim hacimdeki net manyetik momentini,  $m$  ise materyalin  $V$  hacmindeki manyetik momentini tanımlamaktadır.



Şekil 2.5. Ferromanyetik bir materyalin tipik manyetizasyon - manyetik alan şiddeti (M-H) histerezis çevrimi

Genel anlamda tüm materyaller manyetik materyal olarak değerlendirilebilir çünkü tüm materyaller manyetik alana karşı belli derecede bir reaksiyon verirler. Ancak; genellikle bir materyal içerisinde bir manyetik alan tarafından indüklenen manyetizasyon (M) ile manyetik alan şiddeti (H) arasındaki ilişkiyi tanımlayan ve  $\chi$  ile ifade edilen "hacimsel manyetik alınganlık" değerlerine göre sınıflandırılırlar. Manyetik alınganlık; bir materyale uygulanan manyetik alan şiddeti başına mıknatıslanma yeteneğidir. Bu ilişki Eşitlik 2.8 ile ifade edilmektedir.

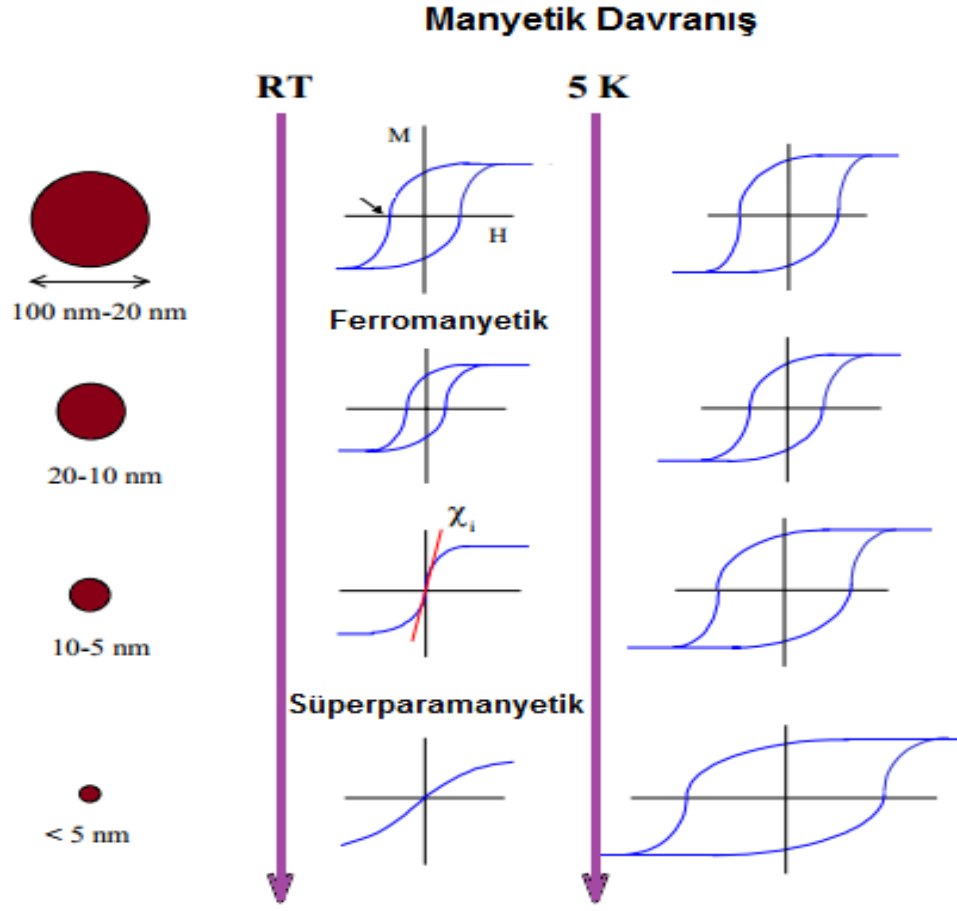
$$M = \chi H \quad (2.8)$$

SI Birim Sisteminde;  $\chi$  boyutsuz, M ve H  $\text{Am}^{-1}$  ile ifade edilirken, CGS Birim Sisteminde  $\chi$   $\text{emu cm}^{-3}$ , M ve H Oersted (Oe) ile ifade edilir. Birçok materyal çok küçük düzeyde zayıf manyetizma sergilerler ve bu materyaller ya paramagnetler ya da diamagnetler olarak sınıflandırılırlar.  $\chi$  değeri paramagnetler için  $10^{-6}$  ila  $10^{-1}$  aralığında değişirken, diamagnetler için genellikle  $-10^{-6}$  ila  $-10^{-3}$  aralığındadır. Diamagnetlerin negatif  $\chi$  değerleri, bu materyallerde manyetizasyon (M)



ve H manyetik alan şiddetinin ters yönlü olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Fakat bununla birlikte, düzenli manyetik durum sergileyen materyaller genellikle ferromagnetler, ferrimagnetler ya da antiferromagnetler olarak sınıflandırılırlar. İsimlerin başında yer alan ön ek, materyal içerisindeki elektronlar arasındaki eşleşme etkileşimlerinin doğasını işaret etmektedir [35]. Bu ve benzeri eşleşmeler büyük spontan manyetizasyonların oluşmasına öncülük eder ve bu durum genellikle düzenli manyetik durum sergileyen manyetik materyallerin paramanyetik ya da diamanyetik materyallere göre neden daha büyük  $\chi$  değerlerine sahip olduklarının temel sebebinin oluşturur.

Düzenli manyetik durum sergileyen materyallerdeki alınganlık değerinin, aynı zamanda uygulanan manyetik alan şiddeti (H)'ne bağlı olduğu da unutulmamalıdır. Bu manyetik alan şiddeti; yüksek manyetik alan şiddetinde saturasyon değerine yaklaşan manyetizasyon (M) ile, M-H eğrisinin karakteristik sigmodial şeklinin yükselmesine neden olur. Ferromanyetik ve ferrimanyetik materyallerde Şekil 2.5'de de görüldüğü gibi histerezis çevrimi gözlenebilir. Histerezis çevriminin şekli kısmen partikül şekli ile saptanabilir. Mikron boyutundaki ya da mikrondan daha büyük boyutlardaki partiküller genellikle multi-domeyn yapıya sahiptirler. Domeyn duvarlarını hareket ettirmek kolay olduğundan, böyle partiküllerin histerezis çevrimleri dardır. Boyutu daha küçük olan partiküllerde, tek-domeyn yapısı daha geniş histerezis çevrimi sergilenmesine yol açar. Partikül boyutu daha da küçüldükçe, hatta on nanometre ve altına indikçe süperparamanyetik davranış gözlenebilir. Süperparamanyetik partiküllerin manyetik momenti, bütün olarak bakıldığında ısı enerjisi etkisine karşılık olarak oluşabilecek değişim ve dalgalanmalardan bağımsızdır. Şekil 2.6'da küresel maghemit partiküllerin boyutunun ve sıcaklığının manyetik davranış üzerine etkisi sunulmuştur [48].



Şekil 2.6. Küresel maghemit partiküllerin boyutunun ve sıcaklığın manyetik davranış üzerine etkisi

## 2.5. Manyetik Nanopartikül Tasarım Stratejileri

Manyetik nanopartikül tasarımı için, özellikle in vivo uygulamalar açısından göz önünde bulundurulması gereken bazı konular; fizikokimyasal etkenler, fizyolojik bariyerler, toksisite başlıkları altında incelenebilir.

### 2.5.1. Fizikokimyasal Etkenler

Genel olarak manyetik nanopartiküller; manyetik olarak aktif bir çekirdek ile çekirdek etrafında kararlılığı sağlayan ve aynı zamanda hedeflendirme ligandlarının ve görüntüleme ajanlarının konjuge edildiği bir kabuk materyalinden oluşur. Terapötik ajanlar, ya kabuk yapısı içerisine enkapsüle edilir/gömülür ya da yüzey üzerine kimyasal bağlar aracılığı ile immobilize edilir. Tasarımın her bir aşamasında; şekil, yük,

boyut, hidrofobik/hidrofilik olma ve konjuge edilen materyallerin oryantasyonu gibi birçok parametrenin göz önünde bulundurulması gerekir. Nanopartikülün fizikokimyasal özellikleri arasında; morfolojisi, hidrodinamik çapı, yükü ve diğer yüzey özellikleri sayılabilir [49].

#### **2.5.1.1. Şekil**

Nanopartikül şeklinin biyodağılım üzerine etkilerinin araştırılması ile ilgili olarak gerçekleştirilmiş çok geniş çaplı çalışmalar mevcut değildir. Biyodağılımın incelenmesi açısından, küresel olmayan ve çubuk şekilli nanopartiküllerin incelendiği çalışmalar mevcuttur [50-51]. Anizotropik şekilli nanopartiküllerin küresel nanopartiküllere göre biyoeliminasyondan daha kolay korunduklarını bildirilmiştir [52]. Genç ve arkadaşları; uzunluk/genişlik oranı arttıkça, nanoyapının kan dolaşımındaki sirkülasyon süresinin uzadığını belirtmişlerdir [53].

#### **2.5.1.2. Hidrodinamik Çap**

Hidrodinamik çap; nanopartikül klirens mekanizması üzerinde, nanopartiküllerin damar dışına geçmelerinde ve permeabilite üzerinde etkilidir [54]. 20 nm'den daha küçük nanopartiküllerin renal yoldan dışarı atıldığı, 30-150 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin kemik iliği, kalp, böbrek ve midede biriktiği, 150-300 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin ise karaciğer ve dalakta saptandığı rapor edilmiştir [55-57]. Bu boyut aralıkları genel klirens mekanizması hakkında bilgi vermekle birlikte, diğer fiziksel parametreler de nanopartikül mobilitesine spontan etki etmektedir. Decuzzi ve arkadaşları; daha küçük boyutlu küresel nanopartiküllerin daha yüksek difüzyon oranına sahip olduğunu, kan damarlarının orta bölgesindeki nanopartikül konsantrasyonunun arttığını, dolayısıyla endotel hücreleri etkileşimlerinin azaldığını ve kan dolaşımındaki sirkülasyon sürelerinin de uzadığını rapor etmişlerdir [58].

Nanopartikül boyutu, aynı zamanda nanopartiküllerin damar dışına çıkma kabiliyetleri üzerinde de etkilidir. Birçok endotel bariyer, 150

nm'den daha küçük nanopartiküllerin geçmesine izin verirken, kan-beyin bariyeri gibi zorlu bariyerler çok daha kısıtlayıcıdır. Kan-beyin bariyeri; pasif difüzyon ile sadece 500 Dalton moleküler ağırlıktan daha küçük, nötral yüklü ve yağda çözünebilir moleküllerin geçmesine izin verir ve tüm potansiyel nöroterapötiklerin ve kontrast ajanların %98'inin geçmesini engeller [59]. Sonavane ve arkadaşları; 15 ila 50 nm hidrodinamik çapa sahip altın nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini geçebileceklerini, daha büyük boyutlu özellikle 100 ila 200 nm hidrodinamik çapa sahip olanların ise geçemeyeceklerini rapor etmiştir [60].

### **2.5.1.3. Yüzey Özellikleri**

Nanopartiküllerin yükü ve hidrofobik olmaları; nanopartiküllerin plazma proteinleri, ekstraselüler matriks, immün sistem ve hedeflendirilmemiş hücreler ile olan etkileşimlerini sınırlayıcı ya da arttırıcı etki yaparak nanopartikül biyodağılımına etki edebilir [61]. Özellikle hidrofobik ve yüklü nanopartiküller; plazma proteinlerinin adsorpsiyonu (opsonizasyon) nedeni ile daha kısa sirkülasyon süresine sahip olup, Retiküloendotelial Sistem (RES) tarafından tanınmaları ve sirkülasyondan uzaklaştırılmaları daha kolaydır [62].

Pozitif yüklü nanopartiküller, ayrıca hedeflendirilmemiş hücrelere (özellikle negatif yüklü) bağlanabilirler ve spesifik-olmayan etkileşimlere neden olabilirler.

Nanopartiküllerin yüzeyindeki hidrofobik gruplar, enjeksiyon sonrası nanopartiküllerin aglomere olmalarını indükleyebilir ve bu nedenle RES tarafından hızlıca uzaklaştırılabilirler. Bu tip sınırlamalara engel olabilmek amacı ile, yüzey mühendisliği teknikleri ile "görünmez (stealth)" nanopartikül geliştirilme çalışmaları üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmaların en önemli sonuçlarından bir tanesi; polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik yapıdaki moleküller ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonlarının, opsonizasyon potansiyelini azalttığı ve nanopartikül sirkülasyon sürelerini arttırdığıdır [63].

### 2.5.2. Fizyolojik Bariyerler

Hem tanı hem de terapötik amaçlı olarak yaşayan organizmalar ile etkileştirilen ya da etkileştirilecek olan manyetik nanopartiküllerin fizyolojik etkileri biyolojik uygulamalar açısından çok büyük önem taşımaktadır. Öncelikle manyetik nanopartiküller hayvan ve insan çalışmalarında kullanılmak üzere güvenilir ve etkin olmak zorundadırlar.

Ferrosıvıların biyolojik ve teknik detaylarına ilave olarak, fizyolojik parametreler de terapötik tedavilerin etkinliğini belirleyebilir. Fizyolojik parametreler; ferrosıvı/ilaç kompleksleri, manyetik alan ve hedeflenmiş organizmalar temeline dayanmaktadır. Ferrosıvı/ilaç ya da ferrosıvı/hedeflendirme ligandı kompleksleri için kritik fizyolojik parametreler arasında; partikül boyutu, yüzey özellikleri, sıvının konsantrasyonu ve hacmi, desorpsiyon karakteristikleri gibi özellikler sayılabilir. Manyetik ilaç taşıyıcı sistemlerin, bazen olası tümör embolizasyonu nedeni ile gelişmiş kollateral dolaşımda farkedilmeleri gerekir. Manyetik alan ile bağlantılı fizyolojik parametreler; geometri, uygulanan manyetik alanının gücü ve süresidir. Canlı organizmalarda gerçekleştirilecek uygulamalar açısından önemli fizyolojik parametreler ise; boyut, ağırlık, vücut yüzeyi, kan hacmi, kalp debisi ve sistemik vasküler direnç, sirkülasyon süresi, tümör hacmi ve lokasyonu, tümörün vasküler içeriği ve tümördeki kan akışı gibi parametrelerdir [47].

Kanser tedavisi için; minumum miktarda manyetik sıvıya yeterli miktarda ilaç yüklenmesi ve manyetik alanın olası en kısa süreli uygulanması ve manyetik alan şiddetinin en güvenli olacak şekilde ayarlanması gerekir. Optimal tedavi için, tüm fizyolojik parametreler en verimli ve güvenilir şekilde düzenlenmelidir.

Vücut içerisinde biyolojik bariyerlerden oluşan bir dizi vücut savunma sistemi mevcuttur. Bu savunma sistemleri; vücudu, enjekte edilen terapötikler ve kontrast ajanları da dahil olmak üzere yabancı maddelerden koruma ve uzaklaştırma görevi görürler [7]. Bu bariyerler, nanopartiküllerin hareketini engelleyerek, fiziksel değişimlerine yol

açarak ya da biyokimyasal sinyaller ile yabancı cisim reaksiyonu vererek nanopartiküllerin fonksiyonlarını engelleyebilirler [64].

Biyolojik bariyerler ekstraselüler boşluklara özgü değildir ve bu nedenle intraselüler bariyerler birçok ilaç ve ilaç taşıyıcı sistemin başarısız olmasının kritik nedenlerinden biridir. Nanopartiküler sistemler için de bu durum aynı şekilde geçerlidir. Hücre-spesifik bir nanopartikül hedeflendirildiği hücrenin membranına bağlandıktan hemen sonra, tipik olarak reseptör-aracılı endositoz aracılığı ile o hücre tarafından hücre içine alınır. Birçok endozom daha sonra lizozomlar içerisine taşınırlar ve makromoleküller tamamen metabolize oluncaya kadar hidrolitik ve enzimatik bir dizi reaksiyonlar oluşur. DNA ve siRNA da dahil olmak üzere birçok terapötik, lizozomal bozunmaya karşı hassastır ve bu nedenle kolayca etkisiz hale gelme riski taşırlar. İlaç taşıyıcı sistemlerin bu sonda kaçınabilmesi için, lizozomal taşınım gerçekleşmeden önce endozomal kaçışı mümkün kılacak mühendislik uygulamaları ile geliştirilmeleri gerekir [64]. Endozomal kaçış sergileyebilen nanopartiküllerin; efektif gen terapi için gerekli olan nükleer membran engeli gibi ilave birtakım biyolojik bariyerleri aşmaları gereklidir.

### **2.5.3. Toksikite**

Nanoyapılı materyallerin sağlık ve güvenlik unsurları, nanoteknolojik çalışmalar ile birlikte gelişmekte olan unsurlardandır. Nanoteknoloji; bir taraftan nanomateryaller ve nanocihazların çok büyük avantajlarından ve performanslarından yararlanmayı hedeflemekte, diğer taraftan ise insanlar ve çevre açısından potansiyel riskler ve tehlikeler oluşturabilecek nanomateryal-iliskili güvenilirlik problemleri ile yüzleşmek zorunda kalmaktadır.

Günümüzde modern kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanarak birçok nanomateryal hazırlamak mümkündür. Son yıllarda; geçiş metalleri, karbon, silikon ve metal oksitlerden birçok nanomateryal sentezlenmektedir ve bu materyallerin insan vücudu tarafından solunması ya da yutulmasından sonra ve deri ya da enjeksiyon yolu ile

alınmasından sonra oluşabilecek birçok güvenlik sorunu mevcuttur. Geniş yüzey alanı/hacim oranı ile nanopartiküllerin istenmeyen biyolojik reaksiyonlar oluşturdukları bilinmektedir. Solunduklarında akciğerler tarafından ve yutulduklarında gastrointestinal yol boyunca absorblanabilirler [65]. Fakat yine de nanopartiküllerin toksisitesi genellenemez çünkü; kimyasal içerik, partikül boyutu, çözünürlük, yüzey kimyası, şekil ve yapı, kristalinite gibi yapılarındaki birçok materyalin özellikleri ile birlikte incelenmeleri ve aynı zamanda doz, uygulama yöntemi, biyobozunur olma, farmakokinetikler, biyodağılım ve benzeri birçok fizyolojik faktörün de göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Nanopartiküller hava yolu ile deri ile temas ettiğinde, deriye tutunurlar ve lenfatik kanallardan yayılırlar. Solunduklarında ise, solunum sisteminin tüm bölgelerinde difüzyon yolu ile birikirler. Ultra küçük boyutları nedeni ile, hücreler tarafından hücre içine alınırlar. Bu esnada da; epitelyal ve endotelyal hücrelerden de kan ve lenf dolaşımlarına taşınırlar ve kalp, dalak ve benzeri hassas hedef organlara ulaşırlar. Nöronal deneyler; nanopartiküllerin nöritler boyunca ilerlediğini ve santral sinir sistemi ve ganglialara kadar ulaştıklarını göstermiştir. Genel anlamda nanopartiküllerin yüzey kimyası ve yüzey modifikasyonları ile belirlenen endositoza ve biyokinetiklere dikkat çekmek yerinde olur. Nanopartiküllerin yüzeylerinin biyoyumlu materyaller ile kaplanması yolu ile toksikolojik etkileri önemli ölçüde azaltılabilir. İlave olarak, uygun doz/konsantrasyon seçimi yapmak da büyük önem taşımaktadır.

Manyetik nanopartiküller çok geniş kapsamlı in vivo biyoygulama alanına sahip oldukları için, toksik etkileri üzerinde yapılan çalışmalar da son yıllarda artmıştır. Elde edilen sonuçlardan bir tanesi; daha büyük boyuta sahip manyetik nanopartiküllerin daha küçük boyutlu olanlara göre daha yüksek düzeyde toksisite sergilemeleri olmuştur [65]. Birçok durumda manyetik nanopartiküller canlı organizmaya enjekte edilmiş ve ya tanı amaçlı ya da terapötik amaçlı olarak bir süreliğine vücut içinde

kalması sağlanmıştır. Bu nedenle akut toksisiteye ek olarak, bozunma ve inflamatuvar medyatörlerin takiben oluşan salınımı ile hücrelerin stimülasyonu gibi uzun-dönem toksisitenin ciddiyle dikkate alınması gerekir.

Nanotoksikoloji alanında doğru risk değerlendirmesi yapılabilmesi ve uygun yöntemler ve protokoller geliştirilebilmesi için; malzeme bilimi, kimya, toksikoloji, tıp, moleküler biyoloji ve biyoinformatik alanlarındaki araştırmacıların ortak çalışması gerekmektedir.

## **2.6. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi**

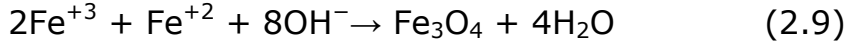
Manyetik nanopartikül sentezi için; sol-jel yöntemi, hidrotermal reaksiyonlar, hidroliz ve termoliz prekürsörleri, akış enjeksiyon yöntemi ve elektro spray yöntemi gibi birçok kimyasal sentez yöntemi mevcuttur [66-72]. Süperparamanyetik nanopartiküllerin sentezi ise kolloidal yapısı nedeni ile daha komplekstir. Sentez yöntemi ile ilgili olarak kritik noktalardan bir tanesi, uygun boyutta manyetik çekirdekli monodispers popülasyon elde edilmesini sağlayacak deneysel koşulların tanımlanmasıdır. İkinci kritik nokta ise; endüstrileşme potansiyeli göz önünde bulundurularak; ultrasantifügasyon, büyüklükçe ayırma kromatografisi, manyetik filtrasyon gibi herhangi bir kompleks saflaştırma prosedürü gerektirmeyecek şekilde tekrarlanabilir bir proses seçilmesidir [73-75]. Bu yöntemler, nanopartiküllerin homojen yapıda ve dar boyut dağılımı ile hazırlanmasında kullanılan yöntemlerdir. Ancak bununla birlikte; manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan en yaygın yöntem, demir tuzları ile kimyasal ikili-çöktürme yöntemidir [76-80].

### **2.6.1. Kimyasal İkili-Çöktürme Yöntemi**

İkili-çöktürme tekniği, manyetik nanopartiküllerin elde edilmesinde kullanılan en basit ve en etkin kimyasal yollardan biri olarak kabul edilmektedir. Demiroksitler (Magnetit/ $Fe_3O_4$  ya da  $\gamma$ -maghemit/ $\gamma Fe_2O_3$ ) genellikle ferrik ve ferröz tuzların sulu çözeltilerde stokiyometrik oranlarda karışımı ile hazırlanırlar.

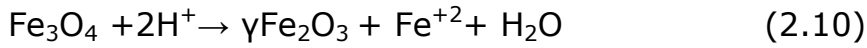


Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> formasyonunun kimyasal reaksiyonu Eşitlik 2.9 ile gösterilebilir:



Bu reaksiyonun termodinamiklerine göre optimum koşullar; pH'ın 8 ile 14 arasında olması, okside edici olmayan ortamda stokiyometrik oranın 2:1 (Fe<sup>+3</sup>/ Fe<sup>+2</sup>) olmasıdır [81].

Ancak; magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) kararlı değildir ve oksidasyona karşı oldukça duyarlıdır. Oksijen varlığında magnetit formu maghemit (γFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) formuna dönüşür ve bu dönüşüm Eşitlik 2.10 ile gösterilmektedir:



Magnetit formunun maghemit formuna dönüşümünde tek yol hava oksijeninin etkisiyle oluşan oksidasyon değildir, süspansiyon pH'ına bağlı olabilecek bazı elektron ve iyon transferlerinin de oksidasyona neden olabileceği bildirilmiştir.

Asidik ve anaerobik koşullar altında; yüzey Fe<sup>+2</sup> iyonları çözeltide hegzasulu kompleksler olarak dezorbe olur, bazik koşullar altında ise, magnetitin oksidasyonu, maghemit yüzeyinin oksidasyon-redüksiyon basamaklarını içerir. Ferröz iyonların oksidasyonu; yük dengesini sağlayacak katyonik boşluklar oluşturacak şekilde her zaman katyonların kristal kafese göçü doğrultusundadır ve maghemit yapısında; demir iyonları spinel yapının oktahedral ve tetrahedral bölgelerine yerleşmiştir.

İkili-çöktürme yönteminin en önemli avantajı, büyük miktarlarda nanopartikül sentezine olanak sağlamasıdır. Ancak; sadece kinetik faktörler ile kristal büyümesi kontrol edilebildiğinden, partikül boyut dağılımının dar sınırlarda tutulması zordur. İkili-çöktürme yönteminde iki aşama söz konusudur; türlerin konsantrasyonu kritik süper-doygunluk noktasına ulaştığında meydana gelen kısa nükleasyon patlaması ve daha sonra çözünen maddelerin kristal yüzeyine difüzyonu ile gerçekleşen çekirdeğin yavaş büyüme aşaması [82-87]. Monodispers demiroksit nanopartiküllerin üretilmesi için, bu iki aşamanın birbirinden ayrı tutulması gerekir yani, nükleasyon basamağının,

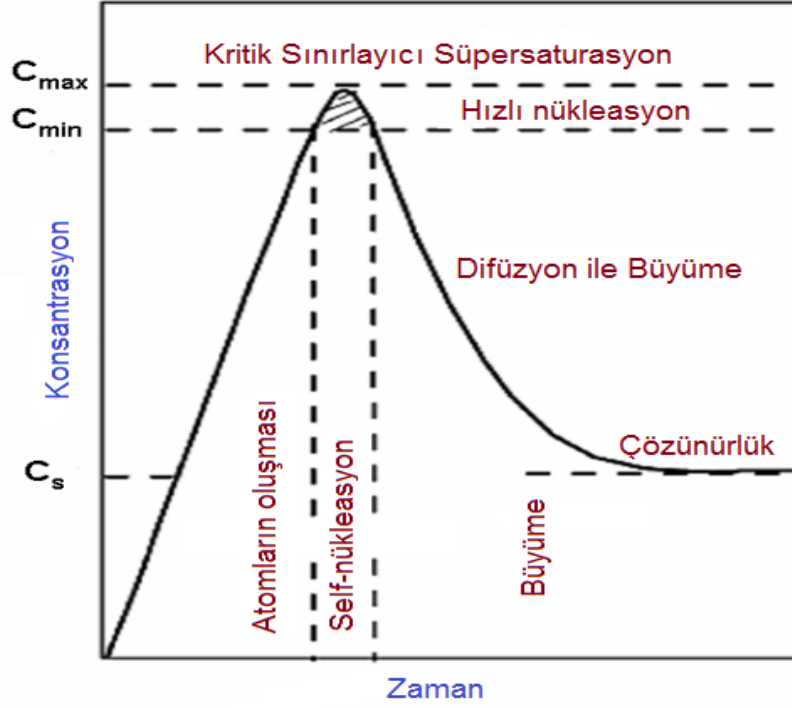
büyüme periyodu esnasında gerçekleşmesi engellenmelidir [88]. Şekil 2.7'de görülen LaMer Diyagramı, monodispers nano ve mikropartiküllerin nükleasyon ve kristal büyüme mekanizması ile oluşumunu göstermektedir [89]. Sonuç olarak; monodispers nanopartiküllerin boyut kontrolü, çok kısa süren nükleasyon periyodunda gerçekleşmek zorundadır, çünkü son partikül sayısı nükleasyon aşaması bitiminde belirlenmektedir ve partikül büyüme aşamasında değişmemektedir.

Demiroksit nanopartiküllerin sentezinde; boyut, manyetik özellikler ya da yüzey özellikleri gibi birçok parametre ayarlaması yapmak mümkündür.

Bu parametrelerin değişik şekillerde ayarlanabilmesi için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir [90-92]. Nanopartiküllerin boyut ve şekilleri; pH, iyonik güç, sıcaklık, kullanılan tuzlar (perkloratlar, sülfatlar, nitratlar gibi) ya da  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  konsantrasyonu parametrelerinde yapılacak değişimler ile kontrol edilebilir.

Yapılan çalışmalar; asidite ve iyonik güç modülasyonlarının, partikül boyutunun 2-15 nm arasında olacak şekilde kontrol edilmesine yardımcı olan parametreler olduğunu ve şekil varyasyonlarının, nanopartiküllerin elektrostatik yüzey dansitesi değişimleri ile bağlantılı olduğunu göstermiştir [93-95]. Partiküller; manyetik emülsiyon, kapsül ya da taşıyıcı formları oluşumuna olanak sağlayacak şekilde sulu çözeltilerde ya da yağ, organik çözücüler gibi polar-olmayan sıvılar içerisinde dispers edilebilirler [96-98].

Homojen  $\gamma Fe_2O_3$  nanopartiküllerin hızlı sentezi için Massart tarafından geliştirilen proses, nanopartiküllerin amino asitler, R-hidroksiasitler (sitrik, tartarik ve glukonik asitler), hidroksamat (arjinin hidroksamat), dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ya da fosforil kolin gibi birçok monomerik madde ile kaplanmasına olanak sağlamıştır [99-103].



Şekil 2.7. LaMer Diyagramı

Babes ve arkadaşları, demir konsantrasyonu etkisini incelemişlerdir [104]. Çalışmalarını tasarlarken en önemli faktör olarak  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  molar oranını seçmişlerdir.  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  oranının artması ile ortalama boyutun arttığını, hazırlama verimliliğinin düştüğünü bildirmişler ve literatür ile uyumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Magnetit partiküllerin ortalama boyutu; yüksek oranda çöktürme ortamının asiditesine ve iyonik gücüne bağlıdır [105-107]. İyonik güç ve pH ne kadar büyük ise, partikül boyutu ve boyut dağılım aralığının o kadar küçük olduğu bildirilmiş ve bu durum, sayılan iki parametrenin, kristal yüzey kimyasal dekompozisyonunu ve sonuç olarak da partiküllerin elektrostatik yüzey yükünü belirlemesi ile açıklanmıştır.

Birçok araştırmacı; reaksiyon sıcaklığının etkisi üzerine çalışmalar yapmış ve optimal kristal formasyonu elde etmedeki önemini belirtmiştir [108]. Yapılan farklı çalışmalar, sıcaklık artışı ile manyetik nanopartikül oluşumunda azalma olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu bulgu, partikül nükleasyon ve büyüme teorisini desteklemektedir. Ayrıca; sentez esnasında çözelti içerisine azot gazı vererek ortamdaki oksijeni

uzaklaştırmanın, magnetiti kritik oksidasyondan korumakla kalmayıp, diğer yöntemlere nazaran partikül boyutunun küçülmesini sağladığı da bildirilmiştir [109-110].

### **2.6.2. Suni Ortamlarda Gerçekleştirilen Reaksiyonlar**

İkili-çöktürme yöntemi ile sentezlenen nanopartiküllerin boyut dağılımının nispeten geniş olması nedeni ile, boyutları birbirine çok daha yakın nanopartiküllerin sentezlenebilmesi amacı ile günümüze kadar yeni yöntem geliştirme çalışmaları sürmüştür. Yapılan birkaç çalışmada; demiroksit nanopartikülleri, birbirine yakın ve belirlenen boyutlarda sentezleyebilmek amacı ile sentetik ve biyolojik reaktörler kullanılmıştır. Suni ortamlar; polar olmayan çözücüler içerisinde su-emici ters misel yapılar oluşturan amfoterik sürfaktanlar, dendrimerler, siklodekstrinler ve fosfolipid membranlardan meydana gelmektedir [111-114].

Sürfaktan molekülleri; spontan olarak farklı boyutlarda nanozerrecik, misel (1-10 nm) ya da su içinde yağ emülsiyonu (10-100 nm) oluşturabilirler [115]. Sulu demir tuzu çözeltileri, nanozerre teknolojisi ile ortamdaki organik çözeltiden onları ayıran sürfaktan kaplama ile enkapsüle edilirler. Sonuç olarak; bu sistem kinetik ve termodinamik zorlama ve sınırlamalar ile partiküllerin şekillenmesinde rol oynar. Jia ve arkadaşları, in situ manyetik kitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> kompozit nanopartiküllerinin yağ-içinde-su emülsiyonu ile çok küçük su havuzu mikroreaktörlerinde sentezleyebilmek amacı ile yeni bir yöntem geliştirmişlerdir [116]. Ferröz tuz ve kitosan içeren emülsiyona NaOH ilave edildiğinde, manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve kitosan nanopartiküller sistemden çöktürülmüştür. Manyetik demiroksit nanopartiküller, kitosan nanopartiküller ile çevrelenmiştir.

### **2.6.3. Hidrotermal ve Yüksek-Sıcaklık Yöntemleri**

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül ve ultra-ince tozların hidrotermal yoldan sentezi literatürde tanımlanmıştır [117-119]. Ferritlerin hidrotermal koşullarda hazırlanması için iki temel yol vardır; hidroliz ve oksidasyon ya da metal hidroksit karışımlarının nötralizasyonu. İlk yöntemde ferröz tuzların kullanılması dışında, bu iki reaksiyon birbirine çok benzerdir [120].

Bu reaksiyonlar; sulu ortamda, 200 °C'in üzerindeki sıcaklıklarda ve 2000 psi'den daha yüksek basınçlarda, reaktörler içerisinde ya da otoklavlarda gerçekleştirilirler. Proses esnasında kullanılan çözücü, sıcaklık, zaman gibi reaksiyon koşullarının genellikle ürün üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir [121].

#### **2.6.4. Sol-jel Yöntemi**

Sol-jel teknolojisi, iyi tasarlanmış kolloidal kimya teknolojisidir. Sol-jel prosesi; nanometrik partiküllerin "sol"u orjininden gelen, çözelti içerisindeki moleküler prekürsörlerin hidrosilasyon ve kondensasyonu temeline dayanır. Sol; sıvı evrede asılı, birkaç yüz nm boyutlarında olabilen katı partiküllerden oluşmuş kolloidal çözeltilere verilen addır. Jel ise, çözücü içerisine daldırılmış katı makromoleküller olarak kabul edilir. Nano yapıda metal oksitlerin ıslak sentez yöntemi için uygun bir prosestir [122]. İleri kondensasyon ve inorganik polimerizasyon, "ıslak jel" olarak adlandırılan üç boyutlu metal oksit ağı oluşmasına neden olur. Reaksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirildiği için; son kristalin formun oluşabilmesi için ekstra ısı işlem gerektirir [123]. Sol-jel yönteminin temel avantajı; düşük sıcaklıklarda, yüksek saflıkta ve tek biçimli nanoyapıların elde edilmesini sağlamasıdır.

Literatür bilgileri; jelin özelliklerinin sol-jel işleminin sol basamağında oluşan yapıya ileri düzeyde bağlı olduğunu göstermektedir. Hidroliz, büyüme reaksiyonları, kondensasyon reaksiyonları ve dolayısıyla jelin yapısı ve özelliklerine etki eden ana parametreler; sıcaklık, çözücü, pH, karıştırma hızı ve tuz prekürsörlerinin konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır [124].

Örneğin; jelin 400 °C sıcaklık ile doğrudan muamele edilmesi sonucu, 6 ila 15 nm boyut aralığında,  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanopartiküllerin elde edilebileceği rapor edilmiştir [125].

Raileanu ve arkadaşları; sulu yöntemi kullanarak, sol-jel nanokompozit materyaller ( $\text{FexOy-SiO}_2$ ) hazırlamışlardır [126]. Elde edilen nanopartiküllerin yapısı ve özellikleri, farklı silika prekürsörleri

(tetrametoksisilan, metiltrietoksisilan, kolloidal silika çözeltisi gibi) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

### **2.6.5. Polyol Yöntemi**

Polyol prosesi; boyut ve şekli iyi tanımlanmış nano ve mikropartiküllerin sentezi için tasarlanmış bir kimyasal sentez yöntemidir [127]. Polyollar olarak çözücüler ilginç özellikler sunarlar. Yüksek dielektrik sabitleri nedeni ile, inorganik bileşiklerde çözünebilir çözücüler olarak davranırlar ve nispeten yüksek kaynama noktaları nedeni ile de, inorganik bileşiklerin hazırlanmasında geniş sıcaklık aralıklarında (25 °C' dan kaynama noktasına kadar) çalışma olanağı sağlarlar [128]. Polyollar; hem indirgeme ajanı olarak hem de dengeleyici ("stabilizatör") olarak görev yaparlar.

Bu yöntemde; prekürsör bileşik, sıvı polyol içerisinde asılı haldedir. Süspansiyon; uygun karıştırma ortamında belirtilen sıcaklığa kadar ısıtılır ve polyolun kaynama noktasına kadar ulaşması sağlanır. Reaksiyon esnasında; metal prekürsör diol içerisinde çözünebilir hale gelir ve ara ürün oluşumunu sağlar ve daha sonra metal çekirdek oluşumu için indirgenir.

Sulu yöntem ile karşılaştırıldığında, bu yöntemin sağladığı çeşitli avantajlar mevcuttur [129]. Bunlardan ilki; hazırlanan manyetik nanopartiküllerin yüzeyi, hidrofilik polyol ligandları ile in situ kaplanabilir ve böylece nanopartiküller sulu ortam içerisinde ya da diğer polar çözücülerde kolaylıkla dispers edilebilir. İkincisi; bu sistemin reaksiyon sıcaklığının nispeten daha yüksek olması, partiküllerin daha kristalin ve dolayısıyla daha yüksek manyetizasyona sahip olmasını sağlar. Üçüncü olarak ise; nanopartiküllerin boyut dağılımı, geleneksel yöntemlerle üretilen partiküllerden çok daha dar aralıktır.

### **2.6.6. Akış Enjeksiyon Yöntemi**

Farklı matrikslerde (emülsiyonlar gibi) reaksiyon bölgesinin sınırlandırılması, dar boyut dağılımlı partiküller üretebilmek amacıyla ve bazı durumlarda partikül morfolojisini daha uygun hale getirebilmek için kullanılmaktadır.

Akış enjeksiyon tekniğinin; yüksek oranda tekrarlanabilirlik, yüksek oranda homojenlik sağlama ve prosesin dışarıdan tam bir hakimiyetle kontrol edilebilir olması gibi avantajları mevcuttur.

### **2.6.7. Elektrokimyasal Yöntemler**

Reetz ve Pascal; elektrokimyasal bir yöntem kullanmışlar ve dimetilformamid (DMF) sulu çözeltisi ve katyonik sürfaktanlar içerisine daldırılmış demir elektrotlar vasıtası ile 3-8 nm boyutunda maghemit partiküller hazırlamışlardır. Akım yoğunluğu ayarlaması ile partikül boyutu kontrolü sağlanmıştır [130-131]. Okside edici koşullar altında elektrokimyasal çöktürme yöntemi kullanılarak  $Fe_2O_3$  ve  $Fe_3O_4$  nanopartiküller hazırlanmıştır [132].

### **2.6.8. Püskürtme/Buhar Yöntemleri**

Sprey ve lazer piroliz gibi püskürtme teknolojileri, yüksek üretim verimliliği sağlayan sürekli kimyasal prosesler olarak oldukça popülerdir. Sprey pirolizinde; organik çözücü içerisindeki indirgeme ajanı ve ferrik tuz çözeltileri bir seri reaktörler içerisine spreylenebilir, burada püskürtülen madde yoğunlaşırken, çözücü buharlaşır [133]. Elde edilen kurutulmuş artık, boyutları ilk orjinal damlalara bağlı olan partiküllerden oluşur. Yapılan çalışmalardan bir tanesinde, alkol bazlı çözelti içerisinde farklı demir prekürsör tuzları kullanılarak, farklı şekillerde ve 5 ila 60 nm boyutları arasında maghemit nanopartiküller elde edilmiştir [134]. Çalışmada, temel proses koşulları ile ürün özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

Julian-Lopez ve arkadaşları; süperparamanyetik nanopartiküller ile hibrid silika demiroksit kompozit mikroküreler hazırlayarak, çalışmanın sentez ve karakterizasyon detaylarını rapor etmişlerdir. Hazırladıkları hibrid nanopartiküler sistemin; Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI), hipertermi ve biyoaktif moleküllerin transportunu sağlayacak hibrid mezoporöz matriks açısından etkinliğini incelemişlerdir. Sprey kurutma yöntemi ile ve sol'un kompozisyonu ayarlanabilir şekilde hazırlanan bu multifonksiyonel platformlarda, matriks içine gömülü manyetik

nanopartiküllerin miktar ve boyutlarının kontrol edilebilir olduğunu bildirmişlerdir [135].

## **2.7. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri**

Çekirdek/kabuk yapısındaki nanopartiküllerin karakterizasyon yöntemleri; mikroskopik analizler, spektroskopik analizler, ışık-saçılması analizleri ve termal gravimetrik analizler ana başlıkları altında incelenebilir.

### **2.7.1. Mikroskopik Analizler**

Mikroskopik analizler; farklı tipte nanopartikülleri direk görüntüleme amaçlı kullanılan en yaygın ve en güvenilir analiz teknikleridir.

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), nanopartiküllerin boyut ve şekil analizi için en yaygın kullanılan mikroskopik tekniktir. Büyütme oranının  $10^5$ - $10^6$ 'lara kadar çıkma özelliği vardır. Ancak; çekirdek/kabuk yapısındaki nanopartiküller açısından incelendiğinde, bu teknik ile çekirdek ve kabuk yapılarını ayırt etmek oldukça zordur. Bu yöntem sadece yüzey görüntüsünü oluşturmaktadır. Bununla birlikte; SEM, Enerji Dispersif X-Ray Spektroskopisi (EDX) ile birleştirilerek kullanıldığında, kabuk yüzeyinin elemental analizini gerçekleştirmek de mümkün olmaktadır.

Son yıllarda, normal SEM'den çok daha yüksek oranda büyütme yapabilen alan-emisyon SEM (FESEM) adlı sistem kullanıma sunulmuştur. FESEM görüntüleri, kabuk yapının yüzeyinin pürüzlü ya da pürüzsüz olup olmadığı hakkında bilgi edinilmesini sağlayabilmektedir.

Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM), çok daha önemli ve geniş kapsamlı bilgi edinilmesini sağlar. Kontrast farklılığından çekirdek/kabuk yapı confirmasyonu, partikülün kabuk yapı ile birlikte tüm boyutunun belirlenmesi, çekirdek boyutunun saptanması, kabuk kalınlığının hesaplanması, düzgün/tek biçimli kabuk kaplama gerçekleşip gerçekleşmediği ve benzeri bilgilerin saptanmasını sağlar. Çekirdek ve kabuk materyalin kontrast farklılığından, partiküllerin boyut ve



morfolojileri kolaylıkla belirlenebilir. Moleküler düzeyleri gösterebilecek çözünürlükte çok daha yüksek büyütme gerektiren durumlar için yüksek çözünürlüklü TEM (HR-TEM) kullanılmakta ve kristalinite, kafes yapısı gibi özellikler de belirlenebilmektedir.

Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) teknikleri de, daha ilave bilgiler edinilmek istendiğinde kullanılan iki tekniktir. Partiküllerin çapı ve yüksekliği bu teknikler ile belirlenebilir. SEM tekniğine benzer olarak, yüzey topografi dataları taramalı prob mikroskopi ile saptanabilir. Elektron mikroskobunun aksine, taramalı prob mikroskopi ile analizlerin hem sıvı ortamda hem de normal hava ortamında gerçekleştirilebilme avantajı mevcuttur [136-138].

### **2.7.2. Spektroskopik Analizler**

Optik özellikler, genellikle her nanokristal yapının yüzey modifikasyonuna karşı oldukça duyarlıdır. Dolayısıyla bu özellikler; çekirdek yüzeyindeki kabuk kaplama materyalleri ile ilgili indirek fikirler edinilmesine yardımcı olurlar.

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-VIS), farklı tipte nanopartiküllerin analiz edilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. UV-VIS bölgedeki enerji absorpsiyon kapasitesi ile, bu bölgedeki absorpsiyon spektrumu ölçümü gerçekleştirilir.

Floresan ya da Fotoluminesans (PL) Spektroskopisi de; floresan özellikler taşıyan yarı iletken materyaller gibi malzemelerin karakterize edilmesinde kullanılan önemli tekniklerden bir tanesidir. Hem UV hem de PL spektrum da kaplama işleminden sonra pik dalga boyu ve şiddet (absorbe edilen ya da saçılan) değerleri değişir. Ayrıca, kabuk materyalin kalınlığı arttıkça, pik dalga boyu ve şiddet değerleri kabuk materyalin normal saf hali değerlerine göre kayma gösterir.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar ve bağ yapısının belirlenmesi yolu ile

kimyasal bileşiklerin organik yapılarını ortaya çıkaran ve ışık-madde etkileşimi temeline dayanan spektroskopik bir yöntemdir.

X-Ray Fotoelektron Spektroskopi (XPS); elementel bileşim, kimyasal durum, empirik formül, atomik bileşim ya da yüzey ligandlarının bağlanma modu gibi önemli özellikler hakkında bilgi edinilmesini sağlayan bir başka önemli spektroskopik tekniktir. XPS yönteminin en önemli dezavantajları, ultra yüksek vakum çemberi gerektirmesi ve partikül yüzeyinden itibaren sadece 10 nm derinliğe kadar karakterizasyona izin vermesidir. Aynı tekniğin biraz daha gelişmiş modifikasyonlar ile kullanılan modeli olan Genişletilmiş X-Işını Soğurma İnce Yapı Spektroskopisi (EXAFS), nanokristal yüzey ligandlarının bağlanma modu ve yapısını karakterize etmek amacı ile kullanılan bir başka yöntemdir. Raman Spektroskopi de kristalografik oryantasyonun araştırılmasında kullanılan yararlı bir analitik yöntemdir.

### **2.7.3. Saçılma Analizleri**

Materyallerden ışık, elektron ya da nötron saçılması; kolloidal yapıdaki ya da toz formundaki nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan önemli teknikler arasındadır.

Dinamik Işık Saçılması (DLS), bir başka adı ile Foton Korelasyon Spektroskopisi (PCS) ya da Kuasi-Elastik Işık Saçılması yöntemi, nanopartikül süspansiyonlarında direk partikül boyutu ölçümü için kullanılan en önemli tekniklerden bir tanesidir. Kaplama işlemi öncesi ve sonrasında yapılan partikül boyutu ölçümleri ile kabuk kalınlığının saptanabilme imkanı mevcuttur [139]. Ayrıca; çözelti içerisindeki partiküllerin zeta potansiyellerinin ölçülmesi ile partiküllerin yüzey yükleri hakkında bilgi edinilebilirken, bu yöntem ile hidrodinamik çapın belirlenmesi de mümkündür. Kullanılan cihazın tekniği; Brownian Hareketi etkisi altında hareket eden partiküllerin difüzyonunu ölçerek, bu ölçümleri Stokes-Einstein ilişkisini kullanarak boyut ve boyut dağılımı verilerine dönüştürmek üzerine kurgulanmıştır. Ölçüm prensibi olarak; ölçümü yapılacak olan çözelti/süspansiyon, monokromatik lazer ışığı ile

aydınlatılır ve kırılan ışık şiddetindeki dalgalanma zamanının bir fonksiyonu olarak ölçülür. Boyutu küçük olan parçacıkların hareketleri daha hızlı olur ("Brownian Hareketi") ve dolayısıyla ekranda parlak noktaların daha hızlı dalgalanmalarına neden olur. Bu dalgalanmaların hız oranına bağlı olarak da partikül boyutu hesaplanabilir. Partikül boyutu ile Brownian Hareketi arasındaki bu ilişki, Eşitlik 2.11 ile verilen Stokes-Einstein Eşitliği ile tanımlanır:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (2.11)$$

D= Difüzyon sabiti, k= Boltzman sabiti, T= Mutlak sıcaklık,  $\eta$ = Çözücü dinamik vizkozitesi, r= Partikül çapı olarak tanımlanır.

X-Ray Difraksiyon yöntemi de, sentezlenen kristalin materyallerin karakterizasyonunda oldukça yaygın kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Genellikle içeriği bilinmeyen materyallerin tanımlanmasında, kristalografik yapılarının, kristalin boyutlarının belirlenmesinde kullanılır. Çekirdek/kabuk yapısındaki nanopartiküller için, tam bir kaplama gerçekleşip gerçekleşmediğinin indirek kanıtı olarak sayılabilir. Çünkü, kabuk materyal ile gerçekleştirilen kaplama işlemi nedeniyle, çekirdek materyalin difraksiyon pik şiddeti azalmaktadır ve yeterli bir kalınlık derecesinden sonra pik tamamen ortadan kalkmaktadır [140]. Araştırmacılar, yapılan bazı çalışmalarda; çekirdek materyalin düşük-şiddetli difraksiyon piklerinin kaplama işlemi sonrasında da belirebileceğini ancak bu durumun yeterli düzeyde kaplamanın gerçekleşmediğine işaret edebileceğine ve aynı zamanda kabuk materyalin amorf doğası kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir [141-142].

Nötron Saçılma Yöntemi, özellikle manyetik ya da organik çekirdekli, polimer ya da metal oksit manyetik olmayan kabuk yapısına sahip nanopartiküller için bir başka önemli karakterizasyon tekniğidir [143]. Bu teknik, çekirdek/kabuk ara yüzeylerin kompozisyonu ve mikroyapısı ile ilgili değerli bilgiler edinilmesini sağlar. Bu bilgiler genellikle, örnek materyal tarafından saçılan nötron şiddetine bağlı açısal ölçüm

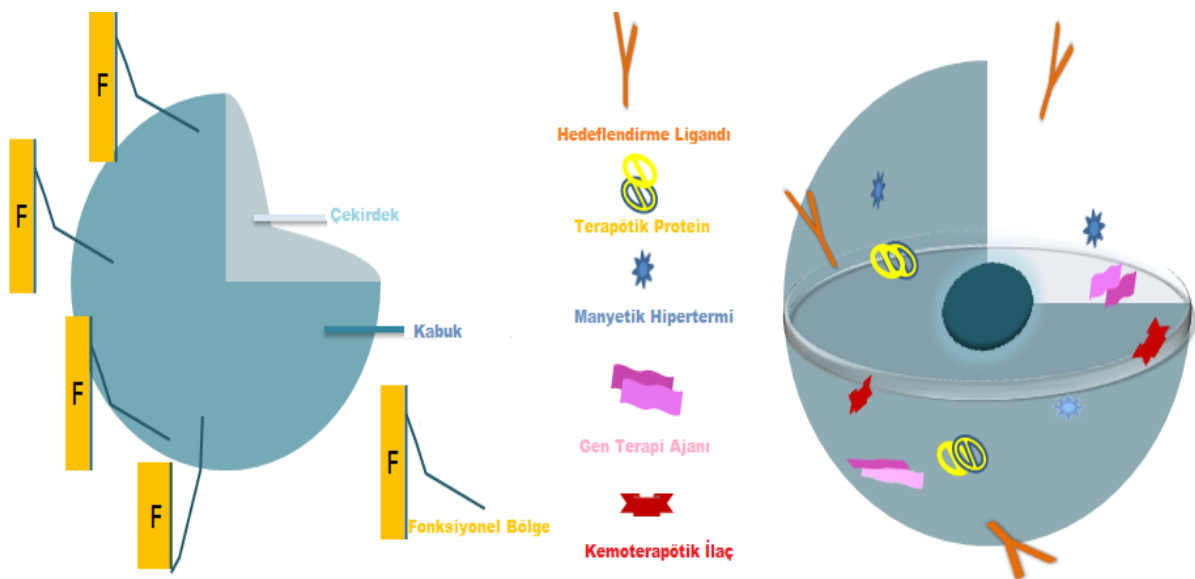
üzerinden kontrast değişiminin belirlenmesi ile edinilir. Nötron saçılımı söz konusu olduğunda; mikroyapı, saçılma uzunluğu yoğunluğu (SLD) ile, XRD söz konusu olduğunda elektron yoğunluğu ile temsil edilir.

#### 2.7.4. Termal Gravimetrik Analizler

Termal Gravimetrik Analiz, bileşiklerin termal kararlılığının belirlenmesinde kullanılan bir başka önemli karakterizasyon tekniğidir. Termal Gravimetrik Analiz (TGA), sıcaklık etkisi ile materyalde meydana gelebilecek ağırlık değişiminin ölçümüdür ve Diferansiyel Termal Analiz (DTA), materyalin sıcaklık artışı ile gerçekleşen termal profilini verir. Bu teknik aynı zamanda, çekirdek/kabuk yapısındaki partiküllerden organik çekirdeğin uzaklaştırılması ve halka şekli formasyonu elde edilmesinde kullanılan bir tekniktir [144-145].

#### 2.8. Manyetik Nanopartiküllerin Biyomedikal Uygulama Alanları

Manyetik nanopartiküller; kontrollü ilaç ve gen aktarımında, spesifik hedeflendirmede, MRI kontrast ajan olarak, hipertermi tedavisinde, manyetik hücre ayırma ve saflaştırma çalışmalarında, manyetik cımbız ve manyetik biosensör olarak ve bazı doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. Şekil 2.8'de SPION fonksiyonelliği şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8. SPION fonksiyonelliğinin şematik olarak gösterimi

### **2.8.1. Kontrollü İlaç ve Gen Aktarımı ve Spesifik Hedeflendirme**

Kontrollü ilaç salım tekniklerinin; konvansiyonel kontrolsüz salım tekniklerine göre son derece ilerleme kaydetmesi, son yıllarda ilaç taşıyıcı sistemlerin performansının artmasına neden olmuştur. Bu alandaki çalışmaların ilerlemesi, kolaylaşması ve çok daha doğru ve kesin sonuçlar elde edilebilmesi, nanoteknoloji alanında kaydedilen inanılmaz gelişmeler nedeniyledir.

İlaçların; vücut içindeki ya da spesifik bir organdaki belirli özel bir bölgeye aktarılması "Hedeflendirilmiş Terapi" adı verilen bu yöntemler nedeniyle artık mümkündür. Bu iki yaklaşımın kombine edilmesi ile, spesifik bir lokalizasyona hedeflendirme yapmak ve aynı zamanda o bölgede kontrollü salım imkanı yaratmak mümkündür. Bu nedenle; ilaç taşıyıcı sistemlerin performanslarının daha da geliştirilebilmesi için, serbest ilaçların çözünürlük, in vivo kararlılık, farmakokinetik ve biyodağılım gibi hayati önem taşıyan özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Araştırmacılar; uygun nanopartiküller ile kombine edilerek hedeflendirilmiş dokuya karşı ilaç seçiciliğinin arttırılmasının, toplam verimliliğin ve etkinliğin arttırılması anlamına geldiğini bildirmişlerdir [146].

Bu proste; ilk olarak ilaç, spesifik hücre reseptörleri ile seçici bir biçimde etkileşebilecek şekilde uygun bir kaplama materyali ile yüzey kaplaması gerçekleştirilmiş mezoporöz nanopartiküller içerisine enkapsüle edilir. İkinci olarak ise; nanotaşıyıcı, hedef hücreye ulaştıktan sonra taşıdığı ilacın aktarımını gerçekleştirebilmek amacı ile çözülür/dağılır ya da partikülün mezoporlarına yakın bir şekilde kimyasal olarak tutturulmuş moleküler geçitleri açar. Dışarıdan uygulanan ısı ya da ışık yardımı ile ya da spesifik iyonların konsantrasyonu ya da pH gibi lokal kimyasal etkenlerin uyarlanması yolu ile bu salım işlemi uyarılabilir.

Hedeflendirilmiş ilaç aktarımında, dışarıdan uygulanan manyetik alan ilaç dozajının %50 ila %80 oranlarında azalmasına neden olabilir. İlaç

hedeflendirme amaçlı kullanılan ideal manyetik partiküller biyoyumlu olmalı, kararlı süspansiyon formunda olmalı ve yeterli miktarda ilaç taşıyabilme kapasitesine sahip olmalıdır. Enkapsüle ya da yüzeye immobilize edilen ilaç molekülünün, hedeflendirilen bölgede biyobozunma yolu ile ya da ısı etkisi ile salımı gerçekleşmelidir.

Uygun bir kaplama materyali ile kaplanarak hazırlanan demiroksit, demir, nikel, kobalt ve SPION gibi manyetik nanopartiküllerin, in vivo ilaç salımında kullanılmak üzere çalışmaları gerçekleştirilmektedir [147-149]. Silika, altın ya da polimer-kaplı manyetik çekirdek/kabuk formundaki nanopartiküller; çıplak manyetik nanopartiküllere göre çok daha biyoyumlu ve yaşayan hücrelere kontrollü ilaç taşınımı gerçekleştirme açısından daha uygundur. Manyetik hedeflendirmenin; ekzojen DNA'nın hücre içerisine alımında, hücre membranı boyunca karşılaşılan difüzyon problemini aşmada yardımcı rol oynadığı bildirilmiştir.

### **2.8.2. Hipertermi**

Kanser terapisi için ümit verici yöntemlerden bir tanesi hipertemi yöntemidir. Hedef tümör hücresinin vücut sıcaklığından biraz daha yüksek bir sıcaklığa ısıtılması temeline dayanır. Manyetik nanopartiküller, manyetik hipertermi için ısı kaynağı olarak kullanılabilirler. Manyetik nanopartiküller; dışarıdan uygulanan AC manyetik alan içerisinde Neel ve Brown relaksasyonu ile ısı üretebilirler. Buradaki temel zorluk; kanser hücrelerinin, normal doku ve hücrelere zarar verilmeden in vivo ortamda kontrollü ısıtılabilmesidir. Yaklaşımlardan bir tanesi, manyetik materyalleri 42-47 °C sıcaklık aralığında tutmaktır [150].

Hipertermi ile ilgili olarak son yıllarda ilgi gören bir başka yaklaşım ise, multimodel kanser terapisi. Termo-duyarlı bir polimer kaplanan manyetik nanopartiküllerin ilaç hedeflendirme ajanı olarak kullanılması ve sonrasında da eşzamanlı ilaç salımı ve hipertermi gerçekleştirilmesidir [151].

### **2.8.3. MRI Kontrast Ajan**

MRI, en güçlü görüntüleme yöntemlerinden bir tanesidir ve dokularda protonların relaksasyonu temeline dayanır. Manyetik nanopartiküllerin, MRI kontrastını iyileştirmek amaçlı kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Görüntüleme yöntemlerinin çoğu, tek bir kontrast mekanizması sunarken, MRI kontrast lokal fizikokimyasal çevreden sağlanmaktadır [152]. Manyetik nanopartiküller; protonların manyetik rezonansını değiştirerek ve sinyal şiddetini güçlendirerek görüntü kalitesini artırma özelliğine sahiptirler. Süperparamanyetik demiroksitler; kimyasal kararlılıkları, biyobozunur olabilmeleri ve düşük toksisite özellikleri nedeniyle karaciğer, dalak, böbrek ve benzeri organlarda MRI amacı ile kullanılmaktadırlar [153]. In vivo görüntüleme tekniklerinin başarısı, moleküler görüntüleme ajanlarına oldukça bağlıdır. Örneğin; fare omiriliğindeki T hücreleri, poli-l-lizin ile konjuge edilmiş demiroksit nanopartiküller ile işaretlenmiş ve MRI ile saptanmıştır [154]. MRI'nın bir başka avantajı ise; dinamik görüntüleme yöntemi olması nedeniyle manyetik nanopartikül-yüklü hücrelerin in vivo olarak görüntülenmesine olanak sağlamasıdır.

### **2.8.4. Doku Mühendisliği**

Manyetik nanopartiküller ile işaretlenmiş hücreler, yapay doku oluşturmak amacıyla mıknatıs yardımı ile yönlendirilebilirler. Manyetik işaretli keratinositler, tabaka-şeklinde 3 boyutlu yapılar oluşturmak üzere mıknatıs yardımı ile toplanabilirler. 2 boyutlu hücre tabakasını etkileyen/çeken döner silindirik bir mıknatıs kullanılarak kültürlenmiş hücre tüpleri oluşturulabilir ve daha sonra istenen konfigürasyona çevrilebilirler. Hücre ve dokuların bu şekilde yönlendirilebilmeleri, rejeneratif tıp alanında yeni bir kapı açmaktadır [153].

### **2.8.5. Manyetik Biyosensör**

Süperparamanyetik nanopartiküller gibi manyetik nanopartiküller; kompleks biyolojik sıvılar içerisinde yönlendirilerek istenen hassasiyette tanı gerçekleştirilebilme özelliği taşıdıkları için biyomoleküler etiketler olarak kullanılırlar. Örneğin; 20 nm'den daha küçük boyutlu manyetik

nanopartiküller, DNA moleküllerinin tanısında kullanılabilirler [153]. Tanı mekanizması, manyetik nanopartiküllerin moleküler hedeflere bağlanması ve böylece proton relaksasyon oranında değişimin indüklenmesi ile gerçekleşir. Bu teknik, manyetik rezonans görüntüleme tekniğine benzer bir tekniktir [154].

#### **2.8.6. Manyetik Cımbızlar**

Manyetik cımbızlar, DNA ya da RNA moleküllerini yönlendirmede kullanılan ileri bir tekniktir. Manyetik cımbızlarda, cam yüzeyin bir ucuna DNA zincirleri diğer ucuna da süperparamanyetik boncuklar tutturulmuştur [156-157]. Manyetik boncuklar, moleküllerin yönlendirilmesinde kontrol sağlarlar ve moleküller arası etkileşimler araştırılır [150]. Manyetik alan kullanılarak DNA molekülüne lineer ya da torsiyonel kuvvetler uygulanabilir ve molekülün elastikliği araştırılabilir [158].

#### **2.8.7. Manyetik Hücre Ayırma ve Saflaştırma**

Metastaz araştırmalarında; bazen tümör hücre popülasyonlarının, periferik kan ya da kemik iliği gibi diğer hücre karışımlarından ayrılması gerekir. Manyetik boncuk ayırma teknolojileri bu amaç doğrultusunda kullanılmak üzere son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir.

İmmünomanyetik ayırma yöntemleri; küçük manyetik partiküllerin antibadi, lektin ve benzeri moleküller vasıtası ile hücrelere bağlanması temeline dayanır. Değişik hücre popülasyonları manyetik bir alan içerisine yerleştirildiklerinde, manyetik boncuklar ile konjuge edilmiş bu hücreler mıknatıs ile etkileşime girerler ve işaretlenmemiş hücrelerden ayrılırlar.

Heterojen hücre popülasyonu içerisinde eğer istenen hücre tipini tanıyacak ve hücre ile etkileşime girecek herhangi bir antibadi mevcut değil ise, hücreler bu durumda "negatif hücre ayırımı" yöntemine göre sınıflandırılabilirler. Bu yöntemde, istenmeyen tüm hücre tipleri immünomanyetik olarak işaretlenirler ve bu durumda birden fazla antibadi çeşidini içeren bir antibadi kokteyli gerekebilir. İşaretleme prosedürü, pozitif ayırma prosedürünün aynısıdır ancak bu defa hücre



popülasyonu içerisinde işaretlenmemiş olan fraksiyon alıkonur ve işaretli hücreler uzaklaştırılır.

Ticari olarak mevcut olan birkaç manyetik boncuk çeşidi vardır, bunlardan bir kısmı hücre ayırımı ve sınıflandırma amaçlı, diğerleri de moleküllerin (özellikle nükleik asitlerin) saflaştırılması amacıyla yönelik olarak tasarlanmıştır. "Dyna" ve "MACS", bu sistemlere örnek verilebilir [159].

## **2.9. Hedeflendirme Stratejileri**

Kanserin günümüzde hala ölümcül bir hastalık olma özelliğini sürdürmesi nedeniyle; kanser-spesifik belirteçlere dayalı hedefe yönelik terapinin öncülük ettiği kişiye-yönelik tedavi anlamında erken kanser tanı ve tedavi prosedürlerinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Sağlıklı dokulara etkiyen ve istenmeyen toksisitenin sınırlandırılması ve tümör-içi ilaç konsantrasyonlarının artırılması amacıyla aktif ve pasif hedeflendirme konuları nanomateryallerin son araştırma konularından bir tanesi olmuştur [160]. Hedeflendirme ajanlarının kullanıldığı nanomateryallerin, birer taşıyıcı sistem olarak, konvansiyonel antikanser ilaçlarının karşı karşıya kaldığı sulu ortamda çözünmeme, kandan ve dolaşımdan hızlı klirens, seçicilikten yoksun olma gibi sorunların üstesinden gelebileceği düşünülmektedir [161-162].

### **2.9.1. Pasif ve Aktif Hedeflendirme**

Birçok nanopartikülün, tümör kan damarlarının patofizyolojik karakteristikleri nedeni ile tümör içinde birikmeleri beklenir. 2 mm<sup>3</sup>'den büyük hacme sahip ve aktif olarak büyüyen tümörlere besin maddelerinin aktarılması difüzyon ile sınırlı kalmakta ve oksijen ve besin maddelerinin aktarılması için yeni kan damarı oluşumuna gereksinim duyulmaktadır [163]. Tamamlanmamış tümör vaskülarizasyonu; tümör tipine bağlı olarak kavşak açıklık boşlukları 100 nm'den 2 µm'ye kadar genişlemiş olan sızdıran damar yapıları ile sonuçlanır ve böylelikle makromoleküller tümör aralıklarından kolayca geçebilirler [164-166].

Tümörler ayrıca normal dokulardan daha yüksek retansiyon süresine sahiptir, çünkü iyi-belirlenmiş lenfatik sisteme gereksinim duyarlar [167-168]. Bu özellikler, pasif hedeflendirme için önemli mekanizmaların tesis edilmesini sağlayan "EPR Etkisi" adı verilen ve "Arttırılmış Geçirgenlik ve Retansiyon Etkisi" olarak ifade edilen etkilerin oluşmasını ve tümör aralıklarında nanopartiküllerin selektif bir şekilde birikmelerini sağlarlar. Doksorubisin aktarımı için sentezlenmiş PEG kaplı lipozomal bir sistem olan Dox-il® ve meme kanseri tedavisi için hazırlanmış albümin-bağlı paklitaksel nanopartiküllerden oluşan Abraxane®, kanser tedavisi için tasarlanmış Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış nanotaşıyıcı-bazlı ilaçlara birer örnek olarak verilebilir. Bu ajanlar; konvansiyonel serbest anti-kanser ilaçlarına göre 100 kat daha uzun yarılanma süresi ile vücutta daha uzun süre sirküle olurlar ve eşzamanlı olarak sistemik toksisitenin de azalmasına neden olurlar [169-173]. Fakat bununla birlikte pasif hedeflendirmenin içerdiği birçok sınırlama nedeniyle yeterli bir yaklaşım olmadığı düşünülmektedir. EPR etkisi kullanılarak kanser hücrelerinin hedeflendirilmesi tüm tümörler için gerçekleştirilmesi uygun olmayan bir durumdur çünkü, tümör vaskülarizasyon derecesi ve gözenekliliği tümör cinsine ve durumuna göre değişkenlik gösterebilir [174]. Ayrıca nanopartiküller ile opsoninler arasındaki etkileşimi önlemek, hücre yüzeyleri ile nanopartiküller arasındaki etkileşimleri azaltabilmek için PEG ile kaplanmış yüzeylerin kullanılması öngörülmektedir [175-178]. Kontrol ve hedeflendirme yapılmadan uygulanan yaklaşımlar, ilaçların hücre sınırları dışına kaçmasını ya da hücre dışında kalmasını ve kanser hücrelerinin birçok ilaca karşı direnç geliştirmesini ("Çoklu İlaç Direnci", MDR) indüklemekte ve terapötik etkileri kaçınılmaz olarak ortadan kaldırmaktadır [179].

Tüm bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek amacı ile uygulanan yaklaşımlardan bir tanesi, hedeflendirme ajanlarının nanopartikül yüzeylerine immobilize edilmesi, bir başka deyişle bağlanması, tutturulmasıdır. Hedeflendirme ajanlarının immobilize edildiği

nanopartiküller, hedef hücrelere ligand-reseptör etkileşimleri üzerinden bağlanabilir ve böylelikle reseptör-aracılı endositoz ve hücre içerisine ilaç salımı indüklenmiş olur. İdeal durumda etkin bağlanma ve internalizasyon için reseptörlerin normal hücrelere göre sadece hedeflendirilmiş kanser hücrelerinde bulunması ve hedeflendirilmiş tüm kanser hücrelerinde homojen dağılımlı olması gerekmektedir [180]. Bu hedeflendirme stratejisi yüksek spesifiklikte hedefleme ve seçici taşıma etkinliğini başarılı, spesifik-olmayan bağlanma ve çoklu ilaç direnci mekanizmasını zayıf kılmaktadır [181].

**Çizelge 2.2.** Onaylanmış ya da klinik çalışmaları hala devam etmekte olan nanopartikül-bazlı bazı ilaçlar

Ticari Adı	Platform	Hedeflendirme Ligandı	Aktif Farmasötik İçerik	Endikasyon
<b><i>Hedeflendirme Ligandı Taşımayan Nanopartiküler Sistemler</i></b>				
<b>DaunoXome</b>	Lipozom		Daunorubisin	Kaposi sarkom
<b>Myocert</b>	Lipozom		Doksorubisin	Tekrarlayan meme ve over kanseri kombine tedavisi
<b>Doxil/Caelyx</b>	PEG-Lipozom		Doksorubisin	Tekarlayan meme ve over kanseri ve kaposi sarkom
<b>Onco TCS</b>	Lipozom		Vinkristin	Agresif seyreden non-hoçkin lenfoma
<b>Abraxane</b>	Albümin-bağlı paklitaksel nanopartikül		Paklitaksel	Metastatik meme kanseri
<b>Genexol-PM</b>	PLA-PEG misel		Paklitaksel	Metastatik meme kanseri
<b><i>Hedeflendirme Ligandı Taşıyan Nanopartiküler Sistemler</i></b>				
<b>CALAA-01</b>	Siklodekstrin içeren polimerik nanopartikül	Transferin	siRNA	Katı tümör
<b>MBP-426</b>	Lipozom	Transferin	Oxaliptin	Gastrik, özofagiyal adenokarsinoma
<b>MCC-465</b>	Lipozom	İnsan Ab GAH F(ab') <sub>2</sub> fragmanı	Doksorubisin	Metastatik mide kanseri
<b>BIND-014</b>	PLGA-PEG nanopartikül	PSMA-spesifik peptid	Doksataksel	Katı tümör
<b>SOT53-01</b>	Lipozom	Transferin reseptör-spesifik scAb	p53 geni	Katı tümör

Günümüzde; transferin reseptörlerine hedeflendirilmiş, lipozom içerisinde platin-bazlı oksaliptin içeren, yine transferin reseptörlerine

hedeflendirilmiş siklodekstrin-içeren siRNA yüklü nanopartiküller ya da prostat-spesifik membran antijenlerine (PSMA) hedeflendirilmiş, dozetaksel içeren polimerik nanopartiküller gibi birçok seçici taşıma sisteminin klinik çalışmaları yürütülmektedir. Çizelge 2.2’de onaylanmış ya da klinik çalışmaları halen devam etmekte olan nanopartikül-bazlı bazı ilaçların listesi sunulmuştur [162]. Ligand-aracılı hedeflendirme teknolojileri insan sağlığı üzerinde henüz hatırı sayılır düzeyde klinik etki yapmamış olsa da, yakın gelecekte hedeflendirilmiş nanopartikül örneklerinin geliştirilmesi kliniksel dönüşüm açısından mümkün olacaktır [182].

### **2.9.1.1. Hedeflendirilmiş Terapi ve Görüntüleme İçin Multifonksiyonel Nanopartiküller**

Nanopartiküllerin multifonksiyonel özellikleri, kanser-spesifik görüntüleme ve terapötik ajanlarının aktarımında benzersiz avantajlar sunar [12]. Terapi ya da tanı amaçlı kullanılacak birçok ligand, geniş nanopartikül yüzey alanı boyunca tek bir nanopartikül sistemi içerisine yerleştirilebilir. Multivalen hedeflendirme, partikülün hedef hücreye bağlanma afinitesini artırır [183]. Manyetik demiroksit nanopartiküllerin, MRI kapsamında tanı kapasiteleri açısından değerlendirildiklerinde teranostik ajan olarak kullanımlarının uygun olduğu gösterilmiştir. Hedeflendirme ajanlarının (antibadiler, peptidler, küçük moleküller ya da aptamerler gibi), kombine fonksiyonelleştirme yaklaşımı ile floresan boyalar, genler ya da ilaçlar ile konjuge edilmesi ile yüzey modifikasyonları gerçekleştirilebilir ve fonksiyonellikleri artırılabilir [184-187].

### **2.9.2. Hedeflendirme Ajanı Tipleri**

Hedeflendirme ajanları proteinler (temel olarak antibadiler ve fragmanları), peptidler, nükleik asitler (aptamerler), küçük moleküller ya da diğerleri (vitaminler ya da karbonhidratlar) olarak sınıflandırılırlar. Monoklonal antibadiler (mAbs) nanopartiküllerin hedeflendirilmelerinde yaygın bir biçimde taşıyıcı moleküller olarak kullanılmalarına rağmen,

boyutlarının büyük olması ve nanopartiküllere konjuge edilmelerinde yaşanan zorluklar ve kısıtlamalar kullanımlarını zayıflatmaktadır. Bu amaçla peptidler de dahil olmak üzere daha küçük boyutlu ligandlar son zamanlarda çok daha büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Bu nedenle multifonksiyonel nanopartikül tasarımında kullanılabilir antitadi-bazlı, peptid-bazlı, küçük molekül-bazlı, aptamer-bazlı hedeflendirme stratejilerinin potansiyel faydaları ve dezavantajları detaylı bir şekilde incelenmiştir.

### **2.9.2.1. Antitadi-bazlı Hedeflendirme**

Hedeflenmiş ligand geliştirme yaklaşımı son bir kaç on yıllık sürede antitadi sınıfına odaklanmıştır. Tek bir molekülde iki epitop bağlanma bölgesinin bulunması, oldukça yüksek seçicilik imkanı ve hedeflenecek moleküle bağlanma afinitesini artırma olanağı sunar. Non-hoçkin lenfoma tedavisi için Rituksimab (Rituxan®), meme kanseri tedavisi için Transtuzumab (Herceptin®), anjiyogenezin inhibisyonu için Bevacizumab (Avastin®) ve ileri kolorektal kanser tedavisi için Setuksimab (Erbix®) terapötik antitadiler olarak geliştirilmiş ve FDA tarafından onaylanmıştır [188-191]. Bununla birlikte; boyutları büyük, üretimleri pahalıdır ve belli düzeyde seriden seriye üretimde bazı farklılıklar sergileyebilmektedirler. Antitadilerin potansiyel olarak immünojenik yanıtı tetikleme olasılıkları vardır. İmmunolojik yanıtı tetikleme olasılıklarını azaltabilmek amacıyla, antitadi alanında gerçekleştirilen teknik gelişmeler kimerik, fragmanlarına ayrılmış ya da insana uyumlu antikör üretimi ile sonuçlanmıştır.

Hadjipanayis ve arkadaşları; glioblastomanın hedeflendirilmiş terapötik tedavi ve görüntülemesinin gerçekleştirilebilmesi amacıyla anti-epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) delesyon mutant antitadilerinin kullanıldığı demiroksit nanopartiküller üretmişlerdir [192]. EGFR varyant III (EGFRvIII) delesyon mutanı, spesifik olarak malign glioma hücrelerinde eksprese olur fakat normal beyin hücrelerinde olmaz. Saflaştırılmış tavşan poliklonal antitadilerinin

amfifilik triblok kopolimer kaplı demiroksit nanopartiküllere kovalent bağlanması ile, glioblastoma-hedeflendirilmiş kararlı teranostik ajan (EGFRvIIIAb-IONPs) elde edilmiştir. Bu teranostik ajan; beyin içerisindeki intratümöral ve peritümöral bölgelere, terapötik ajan içeren bir sıvı ile şekillendirilen basınç gradiyenti altında sürekli bir enjeksiyon yöntemi olarak uygulanan "konveksiyon geliştirilmiş aktarım (CED)" yolu ile etkin bir şekilde iletilmiştir [193]. İntravenöz uygulamadan sonra CED genellikle nanopartiküllerin karaciğer, dalak ya da dolaşımdaki makrofajlarda tutulmalarını engeller ve kan-beyin bariyerinin geçilmesine yardımcı olur, ki bu nedenle malign gliomaların tedavisinde tedavi edici ajan olarak kullanımları artmış ve yaygınlaşmıştır [194-196].

Wei, Gao ve arkadaşları; prostat kanserinin hedeflendirilmiş tedavi ve görüntülemesinin gerçekleştirilebilmesi amacıyla tek zincirli anti-prostat kök hücre antijen antibadisi kullanmışlardır [197]. Prostat kök hücre antijeni, az miktarda normal prostat hücrelerinde ve çok miktarda prostat kanseri hücrelerinde eksprese olan prostat-spesifik glikozil fosfatidil-inozitol-bağlı bir glikoproteindir [198]. Tek zincirli anti-prostat kök hücre antijen antibadisi; anti-prostat kök hücre antijen antibadisinin merkaptotilenamin kullanılarak fragmanlarına ayrılması yolu ile hazırlanmıştır. Daha sonra maleimid-PEG-karboksil (MAL-PEG-COOH) molekülleri antibadi fragmanlarına bağlanmıştır. Doseksel moleküllerinin amin terminal uçtan polilaktik-ko-glikolik asit molekülleri ile bağlanarak SPION'lara hapsedilmesi yolu ile oluşturulan multifonksiyonel polimerik taşıyıcı sisteme, maleimid-PEG-COOH molekülleri bağlanan antibadi fragmanları kovalent bağ aracılığıyla immobilize edilmiştir. Dinamik Işık Saçılması yöntemi ile hazırlanan bu sistemin boyutu 147 nm olarak belirlenmiş ve polimerik matriks içerisindeki süperparamanyetik demiroksit ve doseksel miktarları ağırlıkça sırası ile %23 ve %6.02 olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar; hazırlanan bu taşıyıcı sistemin, MRI'de kontrast ajanı olarak

ve terapötik etkilerin gerçek-zamanlı monitorizasyonunda ve prostat-hedeflendirilmiş görüntülemelerde kullanılabileceğini gösterilmiştir.

İmmünolipozomlar (antibadi ile hedeflendirilmiş lipozomlar), kolay hazırlanabilir olmaları ve hem hidrofilik hem de hidrofobik terapötik ajanları enkapsüle edebilme özellikleri nedeniyle hedeflendirilmiş ilaç aktarımında yaygın olarak kullanılan farmasötik taşıyıcılardır. Wu ve arkadaşları, anti-c-Met antibadisi kullanarak akciğer kanserine in vivo hedeflendirilmiş immünolipozom geliştirmişlerdir [199]. Hepatosit büyüme faktörü reseptörü (c-Met) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının %25'inde çok fazla sayıda eksprese olmaktadır ve bu proteinin aktivasyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu tetikleyici etkenlerden biri olduğu rapor edilmiştir [200-201]. Wu ve arkadaşları, bu amaca yönelik olarak hedeflendirilmiş terapötik taşıyıcı sistem ve görüntüleme problemleri hazırlamışlardır. İlk olarak; anti-c-Met tek zincirli değişken bölge fragman (scFv) antibadisi faj gösterim yöntemi ile belirlenmiş ve sistein artıkları, maleimid-modifiyeli PEG-terminalli lipozomal doksorubisin ile birleştirilmiştir. Elde edilen lipozomal-doksorubisin terapötik taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. Hedeflendirilmiş tanı araçları hazırlamakta ayrıca inorganik kuantum noktalarından da yararlanılmıştır. Hepatosit büyüme faktörü reseptörü ekspresyonunun tümör hücrelerinin yanısıra anjiyogenik endoteliumda da belirmesi nedeni ile; ikili hedeflendirme yaklaşımı ile, tümör büyümesinin inhibe edildiği ve anjiyogenezin önlediği fare zenograft modellerinde gösterilmiştir. Bu model ile katı tümöre in vivo olarak selektif aktarım gerçekleştirilebildiğinden dolayı, akciğer kanserine hedeflendirilmiş teranostik ajan olarak potansiyel kullanım olanağı taşıdığı bildirilmiştir.

### **2.9.2.2. Peptid-bazlı Hedeflendirme**

Peptidler; boyutlarının küçük olması, immünojenitelerinin düşük olması ve düşük maliyetlerle kolay üretilebilir olmaları sebebi ile cazip hedeflendirme molekülleri olarak kabul edilirler [202]. Peptid-bazlı

hedeflendirme ligandları birçok yöntem ile belirlenebilir. Genel olarak, ilgilenilen proteinin bağlanma bölgelerinden elde edilirler. Faj gösterim teknikleri de peptid-hedeflendirilmiş ligandların belirlenmesinde kullanılabilirler. Faj gösterim teknolojisinde; hedeflendirilmiş çeşitli peptid sekansları faj gösterim kütüphanelerinde (yaklaşık olarak  $10^{11}$  farklı sekans) bakteriyofajlar tarafından oluşturulurlar ve hedef peptidler bağlanma deneyi ile seçilirler [203].

İntegrin bağlanma afinitesi bulunan cilengitide, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve pankreas kanseri tedavisinde kullanılmak üzere evre II klinik çalışma aşamasında araştırmaları devam etmekte olan bir siklik peptid'dir [204].

İleri safha katı tümör ve non-hoçkin lenfoma tedavisi için vasküler endotelyal büyüme faktör (VEGF) reseptörü II antagonisti olan Angiocept bir adnektindir ve 2006 yılında evre I klinik çalışmaları başlamıştır. Adnektinler; antijenlere bağlanma kapasiteleri olan genetik olarak işlenmiş proteinlerdir, monobadiler olarak da anılmakla birlikte antibadilerin bir parçası değildirler ancak mimetik antibadiler olarak kabul edilebilirler.

Peptidlerin; hedef moleküllere bağlanma afinitelerinin düşük olması ve proteolitik ayrılma hassasiyeti taşımaları gibi çeşitli dezavantajları olmakla birlikte, bu olumsuzlukların peptidlerin multivalen olarak gösterilmesi yolu ile ya da D-amino asitler kullanılarak sentezlenmeleri yolu ile iyileştirilebileceği düşünülmektedir. Peptidler son zamanlarda hedeflendirilmiş terapi ve görüntüleme amacına yönelik hazırlanan multifonksiyonel nanopartiküllerin üretiminde kullanılmaktadırlar.

Medarova ve arkadaşları; insan meme kanseri hücrelerine spesifik olarak siRNA taşıyan ve eşzamanlı olarak siRNA aktarım prosesini non-invazsv görüntüleyen meme tümörü-hedeflendirilmiş nanoilaç sentezlemişlerdir [205]. Bu nanoilaç; MRI için SPION, yakın-kızılötesi optik görüntüleme için Cy5.5 floresan boya ve tümör-spesifik anti-apoptik gene hedeflendirilmiş siRNA'dan oluşmaktadır. Manyetik



demiroksit nanopartiküller; optik görüntüleme imkanı ile optik floresan boyalar ile kombine olarak multimodel görüntüleme problemleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Tümör-ilişkili müsin-1 (uMUC-1) antijen; insan meme kanserlerinin yaklaşık %90'ından ve tüm kanser tiplerinin yaklaşık %50'sinden fazlasında yüksek oranda eksprese olduğundan, araştırmacılar selektif tümör hedefleme amacı ile nanoilaçları uMUC-1-hedeflendirilmiş EPPT sentetik peptidleri (Glutamin-Prolin-Prolin-Treonin) ile dekore etmişlerdir [206]. Yüzeyinde amin fonksiyonel grupları oluşturulmuş ve çapraz bağlı dekstran ile yüzeyi kaplanmış SPION'lar hazırlanmış ve nanopartiküllerin Cy5.5 ile etiketlenmiştir. Daha sonra; tiyol-modifiyeli, FITC ile işaretlenmiş EPPT peptidleri ve siRNA, MN-Cy5.5 ile, heterofonksiyonel bir çapraz-bağlayıcı olan N-süksinimidil 3-(2-piridiltiyo) propionat (SDDP) aracılığıyla bağlanmıştır. Süperparamanyetik ve floresan özellikler sergileyen, terapi ve tanı amaçlı kullanılan bu nanoilaç, daha sonra meme tümörlü farelere intravenöz enjeksiyon yolu ile verilmiş ve T2 MRI ve yakın-kızılötesi optik görüntüleme yöntemleri ile tümör görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; tümör-hedeflendirilmiş, görüntüleme kapasiteli bu nanoilaçın, MRI eşliğinde tümör tedavisinde kullanılabilme potansiyeli taşıdığı bildirilmiştir.

Ruoslahti ve arkadaşları; hedef tümörü bulabilen nanopartiküler sistemler ile ilgili yararlı bilgiler vermişlerdir [207]. Sistem; tümör damar duvarları ya da tümör stroma etrafındaki pıhtılaşmış plazma proteinlerini tanıyabilen ve aynı zamanda lokalize tümör pıhtılaşmasını indükleyebilen CREKA (sistein-arjinin-glutamikasit-lizin-alanin) peptid temeline dayandırılmıştır [208-210]. Floresan etiketli peptidler, amino dekstran-kaplı demiroksit nanopartiküller üzerine immobilize edilmiştir ve in vivo deneyler için her bir nanopartikül başına en az 8000 peptid molekülü olacak şekilde hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin hedef bölgeye ulaşmalarındaki en önemli engellerden bir tanesini oluşturan RES blokajını düşürebilmek amacı ile, Ni<sup>+2</sup> şelate edilmiş lipozomlar, yanıltıcı partiküller olarak, hazırlanan nanosistemden önce enjekte edilmiştir.

Genel anlamda; SPION'lar, intravenöz uygulama sonrasında, RES tarafından karaciğer, dalak, lenf ve kemik iliğinde spesifik-olmayan bir şekilde fagositoza ya da endositoza uğrarlar. CREKA-nanosistem uygulamasından sonra ise, nanopartiküllerin tümör damarlarında lokalize olduğu ve çok azının karaciğerde biriktiği gösterilmiştir. Tümör-hedeflendirilmiş nanopartiküllerin, fibrinler tarafından oluşturulduğu tahmin edilen pıhtı ağ örgüsü boyunca dağıldığı görülmüş ve nanopartiküllerin pıhtı derinliklerine infiltre olduğu bildirilmiştir. SQUID ile tümör manyetizasyonu analiz edilmiş ve elde edilen veriler doğrultusunda, CREKA-nanosistem uygulamasından önce enjekte edilen heparinin, intravasküler pıhtılaşma eliminasyonu ile nanopartiküllerin tümörlerde birikmesini %50 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle; hazırlanan nanopartikül sisteminin tümör damarlarına bağlanmasının pıhtılaşma aktivitesi gerektirmediği fakat bununla birlikte intravasküler pıhtılaşmanın daha fazla nanopartikülü tümör bölgesine çektiği bildirilmiştir.

### **2.9.2.3. Küçük Molekül-bazlı Hedeflendirme**

Küçük-moleküller; son derece çeşitlilik sergileyen özellik ve yapıları ile ve üretim maliyetlerinin düşük olması ile hedeflendirme ajanları olarak çok büyük potansiyel taşımaktadırlar.

Hedeflendirme ajanı olarak üzerinde en yaygın çalışılan küçük-moleküllerden bir tanesi folik asit yani folat'tır. Folat, suda çözünebilen B6 vitamindir ve özellikle embriyonik gelişimde hızlı hücre bölünmesi ve büyümesinde insanlar için gereklidir. Kanselerde tümör hücreleri üzerinde folat reseptörleri çok fazla eksprese olur ve folat reseptörlerine bağlanma afinitesi ( $K_d = 10^{-9}$  M) oldukça yüksek olan folat, hedeflendirilmiş terapide görüntüleme ve terapötik ajanların aktarımı için önemli bir rol oynar. Folat, teranostik ajanların hedeflendirilmiş aktarımı için üretilen inorganik nanopartikül ya da ilaç taşıyıcı sistemler ile kombine edilerek kullanılmaktadır.

Karbonhidratlar; lektin gibi, hücre yüzey reseptörlerini selektif olarak tanıyan küçük-molekül hedeflendirme ligandlarının bir başka sınıfını oluşturmaktadır [211]. Glikoproteinlerden terminal sialik asit artıkları uzaklaştırıldığında, geriye kalan proteinlere "asyaloglikoproteinler" denmektedir. Asyaloglikoprotein reseptörleri (ASGP-R), hücre başına 500,000 reseptör gibi çok yüksek bir yoğunlukta olmak üzere sadece hepatositler üzerinde mevcuttur ve galaktoz, mannoz, arabinoz gibi karbonhidratlara hızla bağlanabilme özelliği gösterirler ve karaciğer-hedeflendirilmiş in vivo ilaç aktarımında etkin rol oynarlar [212-215].

Riboflavin, hücre metabolizma açısından esansiyel vitaminlerden bir tanesidir ve riboflavin taşıyıcı protein metabolik olarak aktif olan hücrelerde oldukça artış göstermektedir [216-217]. Bu nedenle; endojen bir riboflavin taşıyıcı protein ligandı olan flavin mononükleotid, metabolik olarak aktif olan kanser ya da endotel hücreleri açısından küçük-molekül hedeflendirme ligandı olarak kullanılmıştır. Kiessling ve arkadaşları, flavin mononükleotid kaplı ultra küçük süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (USPION) sentezlemişler ve bu partikülleri kanser tanısı için MRI/optik dual probolar olarak kullanmışlardır [218].

#### **2.9.2.4. Aptamer-bazlı Hedeflendirme**

Aptamerler, hedef moleküllere yüksek spesifikte bağlanma özelliğine sahip genellikle 15-40 baz uzunluğunda küçük nükleik asit ligandlarıdır [219]. Aptamer seleksiyon prosesi, faj gösterim prosesininkine benzer bir yaklaşım ile ve SELEKS "Exponansiyel Zenginleştirme ile Sistemik Ligand Geliştirme" adı verilen yöntem ile belirlenir [220]. Yaklaşık  $10^{14}$  random oligonükleotid kütüphanesinden, hedef moleküllere yüksek afinite ve seçicilikte bağlanabilme özelliğine sahip aptamerlerin seçimi gerçekleştirilir. Aptamerlerin; antibadilere göre boyutlarının küçük olması (yaklaşık 15 kDa), düşük immünöjenite sergilemeleri, seriden seriye farklılık göstermeyecek şekilde ve kolay sentezlenebilir olmaları gibi birçok avantajları mevcuttur. Günümüze kadar yaklaşık 200 aptamer izole edilmiştir [221-222]. VEGF<sub>165</sub> -hedeflendirilmiş aptamer

olan pegaptanib; neovasküler maküler dejenerasyon tedavisi için FDA tarafından 2004 yılında onaylanmıştır. Nükleolin-hedeflendirilmiş aptamer olan AS1411, klinik çalışmalarda evre II aşamasındadır [223-225]. Nükleaz bozunması nedeniyle aptamerler kandan hızlıca temizlenirler ve 2'-florin pozisyonuna pirimidin modifikasyonu ya da PEG ile kimyasal modifikasyon gerçekleştirilerek bu olumsuzluk giderilmeye ve farmakokinetik özellikler ve biyoyararlanım iyileştirilmeye çalışılır [226]. Hedeflendirilmiş aktarım için en iyi karakterize edilen aptamerler, ekstraselüler domeyn PSMA'ya karşı seçilen 2'-floro-piridin-RNA aptamerleri'dir [227]. Son günlerde; 3' ucu, siRNA'nın antisens dizisine yönelik komplementer nükleotid sekansı içeren PSMA aptamer-siRNA kimerik sistemi üretilmiştir [228].

Ellington ve arkadaşları tarafından; spesifik "taşıyıcı" ve yapısal iç özellikleri altın nanopartiküller ile konjuge edilerek gerçekleştirilen çalışmalar ile belirlenen anti-EGFR aptamerler, son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [229]. Yapılan çalışmada; EGFR spesifik aptamerler, RNA havuzlarından 12 döngü sonrasında elde edilmiş ve J18 aptamerleri 20 nm boyutundaki altın nanopartiküller ile konjuge edildikten sonra, A431 kanser hücreleri ile etkileştirilmiştir. Akım sitometri ve floresan mikroskop analizleri; reseptör-spesifik nükleik asitlerin, altın nanopartiküllerin spesifik-olmayan absorpsiyon ve internalizasyonunu bloke ettiğini ve terapi esnasında karşılaşılan bu kronik dezavantajı ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir.

#### **2.9.2.5. Diğerleri**

Hedeflendirilecek geni eksprese eden organ ve spesifik dokulara intraselüler aktarım yapma gereksinimi memelilerde siRNA'nın kullanımını başlatmıştır. siRNA'nın tek başına hücrelere gönderimi; bu moleküllerin dolaşım sistemindeki nükleazlar ile parçalanması ve dolayısıyla hedef organ, doku ve hücrelere siRNA moleküllerinin ulaşamaması ya da istenen oranda hücre içine alınamaması gibi zorluklar barındırmaktadır. Bu nedenle çeşitli taşıyıcı sistemler ile

konjuge edilerek hedef bölgeye aktarımı son yıllarda üzerinde çalışılan konulardandır. İnsanlarda siRNA-aracılı gen susturma çalışmasının ilk gösterimi Davis ve arkadaşları tarafından hedeflendirilmiş nanopartikül taşıyıcı sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [230]. Bu sistemde, malign hücrelerde artış gösteren transferrin reseptörüne bağlanması istenen hedeflendirme ligandı olarak insan transferrin proteini kullanılmıştır [231]. Nanopartiküller; sterik kararlılığın sağlanabilmesi için siklodekstrin içeren katyonik polimerlerden ve hedeflendirmenin gerçekleştirilebilmesi amacı ile de transferrin ile konjuge edilmiş PEG yapısından hazırlanmıştır. Ribonükleaz redüktaz ekspresyonunu azaltmak için tasarlanan nanopartiküller siRNA aktarımı gerçekleştirmişlerdir [232].

Bir N-asetil D-glukozaminaz ve D-glukuronik asit kopolimeri olan hyalüronik asit, çeşitli tümörlerde yüksek oranda eksprese olan CD44 proteinlerine bağlanabilen bir makromoleküldür [233-235]. Zhou ve arkadaşları bu hedeflendirme ligandını kullanarak; kanser hücrelerinin hedeflendirilmesi, floresan görüntüleme ve kombine kemo-fototerml tedavi ile eş zamanlı olarak sıcaklık ölçümü yapabilecek termo-duyarlı hibrid nanojeller geliştirmişlerdir [236]. Küresel hibrid nanojel; gümüş nanopartikül etrafında termo-duyarlı lineer olmayan PEG-bazlı hidrojel kaplama, hyalüronik asidin yüzey üzerine immobilizasyonu (PEG oligomerleri ile hyalüronik asit arasında hidrojen bağları ile) ve son olarak hibrid nanojele tetrakloroaurat ilave edilmesi ile gümüş-altın bimetalik çekirdek oluşumu modeli ile hazırlanmış ve nanojellerin sinerjistik etki ile kombine terapide yüksek terapötik etki gösterdiği bildirilmiştir.

### **2.9.3. Nanopartiküler Taşıyıcı Sistem Tasarımı için Fonksiyonel Ajanların Konjugasyon Teknikleri**

Nanopartikül yüzeylerine hedeflendirme ajanlarının, terapötik moleküllerin ya da kontrast ajanlarının konjuge ya da immobilize edilebilmesi için geniş spektrumlu kimyasal yaklaşımlar sözkonusudur.

Bu yöntemler; konvansiyonel yöntemler [direk konjugasyon, bağlayıcı molekül (ya da uzatma kolu) kimyası, fiziksel etkileşimler], klik kimyası ve hibridizasyon yöntemleri olarak sınıflandırılabilir. Hedeflendirilmiş ligand konjugasyonunda temel amaç, nanopartikülle immobilize edildikten sonra fonksiyonelliğini kaybetmeden hedef moleküle bağlanmasını sağlamaktır. Örneğin antibadi molekülleri, aktif bağlanma bölgeleri dikkate alınmadan nanopartiküllere immobilize edildiğinde, fonksiyonel bölgeleri inaktive olur ve dolayısıyla hedeflendirme özellikleri azalır. İlaçlar ve siRNA gibi terapötik konjugasyon ajanları; terapötik etkilerini gösterebilmeleri açısından, selüler alım gerçekleştikten sonra yani hücre içine girdikten sonra nanopartiküler sistemden ayrılacak ya da salımı gerçekleşecek şekilde tasarlanmalıdır.

### **2.9.3.1. Konvansiyonel Yöntemler**

#### **2.9.3.1.1. Direk Konjugasyon**

Direk reaksiyon stratejileri; nanopartiküllerin yüzeylerinin amin, aldehid, aktif hidrojen ve benzeri gruplar ile fonksiyonelleştirilmesini kapsar. Nanopartikül yüzeylerindeki fonksiyonel gruplar, çoğunlukla nanopartiküllerin sentez basamakları sırasında uygulanan yüzey kaplama tabakasına bağlıdır. Bu stratejiler özellikle floresan boya, nükleer görüntüleme amaçlı şelatörlerin ya da ilaçların konjuge edilmesinde uygundur. Genel olarak konjugasyon öncesi herhangi bir modifikasyon yapılmayan antibadi-bazlı ya da peptid-bazlı hedeflendirme ajanları bu nanopartiküllere karşı kendiliğinden reaktif değildirler. Bununla birlikte, yüzeylerinde maleimid grupları barındıran lipozomlar ve altın nanopartiküller, antibadi, peptid ya da oligonükleotidler gibi tiyol fonksiyonel grubu barındıran biyomoleküller ile direk olarak konjuge edilebilirler.

Amin grupları ile fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller, floresein izotiyosiyanat (FITC) ve Cy5.5 NHS ester gibi ticari olarak piyasada mevcut olan floresan boyalar ile kolayca reaksiyona girerler. Gu ve arkadaşları, floresan boya ile modifiye edilmiş kitosan kaplı manyetik

nanopartikülleri, kanser hücresi etkin görüntüleme problemleri olarak tanımlamışlardır [237]. Nanopartiküllerin optik işaretlenmesi, kitosanın primer amin grupları ile FITC'nin izotiyosiyanat grupları etkileştirildikten sonra, manyetik nanopartiküllerin yüzeylerinin FITC-işaretlenmiş kitosan ile kaplanması ile başarılmıştır. Son yıllarda; cyanin gibi yakın-kızılötesi floresan boyalar biyomedikal uygulamalarda en çok kullanılan kontrast ajanlarıdır. Jon ve arkadaşları; kanser amaçlı in vivo dual görüntüleme problemleri geliştirebilmek amacıyla, nanopartikül yüzeyindeki karboksil fonksiyonel grupları içeren polimer kaplama materyali ile 2,2'-(etilendioksi)bis-(etilamin) arasındaki reaksiyondan yararlanarak amin-modifiyeli demiroksit nanopartiküller sentezlemişlerdir [238]. Daha sonra Cy5.5 NHS ester bu nanopartiküller ile eşleştirilmiş ve MRI ve optik mikroskop ile tümör in vivo olarak görüntülenmiştir. MRI ve yakın-kızılötesi floresan görüntüleme teknikleri ile Cy5.5-işaretlenmiş nanoprobun kombine kullanımının cerrahi rezeksiyon öncesi hastalık bölgesinin haritalandırılmasına olanak sağlayabileceği ve ameliyat esnasında tümör sınırlarını ayrıntılı bir şekilde gösteren floresan görüntüleme tekniği ile de gerçek-zamanlı görüntüleme tekniğinin başarı ile gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir [239].

Aldehid-fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller, bir başka deyişle yüzeyinde aldehid fonksiyonel grupları oluşturulmuş nanopartiküller, hidrazid grubu içeren fonksiyonel ajanlar ile hidrazon ligasyon kimyası aracılığıyla direk olarak etkileşebilirler. Dawson ve arkadaşları; hidrazon ligasyon reaksiyonu ile tümör-hedeflendirilmiş multifonksiyonel viral nanopartiküller sentezlemişlerdir [240].

Hidrazid-fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller, karbonil grubu içeren anti-kanser ilaçları ile konjuge edilebilirler. Misra ve arkadaşları; term-duyarlı akıllı polimerler ile enkapsüle edilmiş manyetik ilaç-hedeflendirme taşıyıcı sistemi geliştirmişlerdir [241]. pH-duyarlı ilaç salımı için ilaç taşıyıcı sistemde hidrazon bağından yararlanmışlardır. Manyetik nanopartiküllerin yüzeyi 3-merkaptopropionik asit hidrazid ile

Fe-S kovalent bağı aracılığı ile fonksiyonelleştirilmiştir. Kimyasal bağlanma, doksorubisinin karbonil grubu ile manyetik nanopartiküllerin yüzeyindeki hidrazon bağı üzerinden gerçekleştirilmiştir. Doksorubisin-yüklü manyetik nanopartiküller daha sonra termo-duyarlı biyobozunur bir polimer ile enkapsüle edilmiştir. Uygulamada; termo-duyarlı polimerin yıkılması ve hidrazon bağının açılması sonrasında ilaç salımı gerçekleşmiştir. Sıcaklık ve pH değişiminin dışarıdan kontrol edilebilir olduğu bu taşıyıcı sistem, ilaç salım profili ile manyetik ilaç hedeflendirme sistemi olarak kullanıma uygun bulunmuştur.

Biyomoleküllerin lipozomal yüzeyler ile kaplanması, kompleks kaplama basamakları gerektirmeden fonksiyonel grup immobilize edilmiş lipozomlar ile gerçekleştirilebilir. Tiyol-reaktif maleimid grupları ile fonksiyonelleştirilmiş lipozomlar, ticari olarak mevcut olan maleimid-modifiyeli fosfolipidlerin lipozom hazırlama basamaklarında kullanılması ile hazırlanabilir. İmmunolipozomlar; yaygın olarak maleimid-modifiyeli lipozomlar ile tiyol fonksiyonel grubu içeren antibadi fragmanları arasındaki direk biyokonjugasyon yöntemi ile sentezlenirler. Akciğer kanseri hedeflendirilmiş ve anti-c-Met antibadisi kullanılarak üretilen lipozomlar; anti-c-Met scFv antibadisinin sistenin artıkları ile maleimid-modifiyeli PEG-terminal uçlu lipozomal doksorubisinin konjuge edilmesi ile hazırlanmıştır [199]. Bir başka çalışmada; Mulder ve arkadaşları, integrin  $\alpha\beta3$ -hedeflendirilmiş, çekirdek yapısı kuantum noktalarından oluşan paramanyetik lipid-kaplı silika nanopartiküller ile yeni bir kontrast ajan platformu hazırlamışlardır [242]. Kuantum noktaları, ters misel yöntemi ile silika kabuk ile enkapsüle edilmiş ve silika yüzey hidrofobik oktadekanol ile kaplanmıştır. Fosfolipid karışımının (PEG-DSPE, maleimid-modifiyeli PEG-DSPE) ilave edilmesi ile lipid monotabakaları ile çevrelenmiş suda çözünebilir kuantum noktaları/silika elde edilmiştir ve integrin-hedeflendirilmiş multimodel görüntüleme problemleri hazırlanmıştır.



Altın nanopartiküller, herhangi bir ek modifikasyona gereksinim olmaksızın tiyol-modifiyeli fonksiyonel ajanlar ile konjuge edilebilirler. Altın molekülünün tiyol gruplarına karşı oldukça reaktif olması ve çok güçlü altın-sülfür bağı (Au-S) oluşması nedeni ile, yüzeyinde tiyol fonksiyonel grupları barındıran birçok biyomolekül ile altın nanopartikül yüzeyine direk olarak immobilize edilebilir. siRNA gibi oligonükleotid-bazlı moleküller; daha sonra altın nanopartiküller ile konjuge edilebilecek şekilde, kimyasal yollardan genellikle sülfidril grupları içerecek şekilde sentezlenirler. Li ve arkadaşları; siRNA taşıyan, folat-reseptör hedeflendirilmiş altın nanopartiküller sentezlemişler ve tiyol-modifiyeli siRNA'ları altın nanopartiküllerin yüzeyine direk olarak konjuge etmişlerdir [243].

### **2.9.3.1.2. Bağlayıcı Molekül Kimyası**

Bağlayıcı moleküller, ligandların oryantasyonunu kontrol edebilirler ve bu nedenle nanopartiküller ile hedeflendirme ajanlarının konjuge edilebilmesi için, bağlayıcı molekül kimyası ile konjugasyon stratejisi tercih edilir. Antiadiler, peptidler ve küçük moleküller nanopartiküllere çok çeşitli bağlanma molekülleri kullanılarak konjuge edilebilirler. En yaygın kullanılan model, amin-modifiyeli nanopartiküller ile sülfidril fonksiyonel grubu içeren biyomoleküller arasındaki reaksiyona dayalı bağlanma molekülü kimyasıdır. Sistein artıkları peptid ya da proteinlerde mevcut olabilir ya da bu fonksiyonelliğin kazandırılabilmesi için kimyasal yollardan modifiye edilebilir. Örneğin, lizin artıklarının primer amin gruplarına, SATA (N-süksinimidil s-asetiltiyoasetat) molekülü ile tiyol fonksiyonel grubu kazandırılabilir. Bu biyokonjugasyon stratejisi; SIA (N-süksinimidil iodoasetat), SMCC [süksinimidil-4-(N-maleimidometil) siklo-hekzan-1-karboksilat], SPDP [N-süksinimidil-3-(2-piridiltiyo)-propiyonat] ya da heterobifonksiyonel PEG molekülleri (NHS-PEG-MAL) gibi birçok bağlanma molekülü kullanılarak gerçekleştirilebilir. Heterobifonksiyonel bağlanma molekülleri; molekülün bir terminal ucunda amin-reaktif süksinimidil esterler diğer

terminal ucunda da tiyol-reaktif iodoasetat, maleimid ya da piridiltiyolu grupları içerebilirler. Nanopartiküller ile bağlanma molekülleri arasında gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda kovalent bağlı kompleks yapılar oluşabilir ve dolayısıyla bağlanma moleküllerinin konjuge edilmesinden önce birkaç basamak nanopartikül modifikasyonu ya da her bir işlem öncesinde saflaştırma adımı gerekli olabilir [63].

Nanopartiküller ile fonksiyonel ajanlar arasında iyodoasetat bağlanma molekülleri ile kararlı bir bağ yapısı oluşturulabilir. Zhang ve arkadaşları bu bağlanma molekülünü kullanılarak, klorotoksin-aracılı beyin tümörü-hedeflendirilmiş manyetik/optik nanoprob sentezlemişlerdir [244]. Klorotoksin, 36 aminoasitten oluşan bir peptiddir ve tümör-hedeflendirilmiş bir ligand gibi işlev görmektedir. Amin-fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller, PEG ile modifiye edilmiş kitosan polimerlerinin sentezlenmesi yolu ile hazırlanmıştır. Metoksi-PEG oksidasyonu ile PEG-aldehid elde edilmiş ve daha sonra Schiff bazı formasyonu ile depolimerize kitosan molekülünün primer amin fonksiyonel grupları ile etkileştirilmiştir. Ardından, demiroksit nanopartiküller PEG'lenmiş ve dallanmış yapıdaki kitosan polimerleri ile kaplanmıştır. Daha sonra, SATA molekülü ile ön işleme tabi tutulmuş klorotoksin molekülü, nanopartiküller ile, heterobifonksiyonel bir protein çapraz bağlayıcısı olan SIA (N-süksinimidil iodoasetat) molekülü aracılığı ile konjuge edilmiştir. Son olarak; demiroksit nanopartiküller, yüzeylerinde kalan amin grupları üzerinden Cy5.5 NHS ester floresan görüntüleme boyası ile etiketlenmişler ve böylelikle beyin tümörüne hedeflendirilmiş manyetik/optik nanoprob elde edilmiştir.

Karboksil fonksiyonel grupları taşıyan nanopartiküller amin fonksiyonel grupları barındıran biyomoleküller ile EDC/NHS (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimide hidroklorür)/N-hidroksisüksinimid kimyası kullanılarak amid bağı oluşturacak şekilde bağlanabilirler. Küçük moleküllerin, peptidlerin ve oligonükleotid gibi moleküllerin EDC/NHS kimyası kullanılarak amin fonksiyonel grupları üzerinden konjuge

edilmesi pratik bir yaklaşımdır. EDC, nanopartiküllerin karboksil grupları ile aktif esterler oluşturur fakat bu reaktif kompleks sulu ortamlarda hızlı bir şekilde hidrolize maruz kalır. Sulfo-NHS ester ara ürün oluşumu ise hidrolizi önler ve fonksiyonel ajanların primer amin grupları ile reaksiyona girmesine olanak sağlayan aktive edilmiş karboksilatların yarı-ömrünü uzatır. Jeong ve arkadaşları; EDC/NHS kimyası kullanarak, primer amin grupları barındıran dopamin-modifiye SPION'lar ile laktabiyonik asit arasında amid bağı oluşumundan yararlanarak, hepatosit-hedeflendirilmiş laktabiyonik asit-immobilize edilmiş SPION'lar sentezlemişlerdir [245]. Jon, Farokhzad ve arkadaşları; karboksil fonksiyonel grupları barındıran kuantum noktaları ile 5' terminal ucu amin fonksiyonel grupları ile modifiye edilmiş prostat spesifik membran antijen aptamerleri arasındaki reaksiyondan EDC/NHS kimyası aracılığı ile yararlanarak, prostat-hedeflendirilmiş kuantum noktaları-aptamer konjugatlarından oluşan teranostik ajan geliştirmişlerdir [246].

### **2.9.3.1.3. Fiziksel Etkileşimler**

Fiziksel konjugasyon stratejisi, nanopartiküllerin etrafını terapötik ajanlar ile kaplamak açısından en elverişli yaklaşımlardan bir tanesidir. Fiziksel etkileşimler; elektrostatik, hidrofobik ve afinite etkileşimlerini ihtiva eder. Elektrostatik etkileşimler, katyonik polietilenimin (PEI) kaplı nanopartiküllere siRNA yüklemek açısından elverişlidir. Hidrofobik antikanser ilaçları, hidrofobik kaplama materyali ile kaplı nanopartiküller üzerine hidrofobik etkileşimler ile adsorbe edilebilirler ve kaplama materyalinin bozunur olması sonrasında hücre içinde ilaç salımı gerçekleşebilir. Bu etkileşimlerin; hızlı bağlanma, modifikasyon basamağı gerektirmeme gibi birçok avantajı olmasına rağmen, fiziksel etkileşimler ile bağlı ligandların moleküler oryantasyonlarını kontrol etmek oldukça zordur. Bu bağlanma modu, hedeflendirme ajanlarını immobilize etmek açısından bu nedenle doğru bir yaklaşım değildir. Buna karşılık; hedeflendirme ligandlarının nanopartiküller ile konjuge edilmesinde afinite etkileşimleri etkin bir rol oynar. Afinite

etkileşimlerine temsili bir örnek olarak streptavidin-biyotin etkileşimi verilebilir. Streptavidin-biyotin bağı oldukça kararlı bir bağıdır ve non-kovalent bağlanma reaksiyonları arasında, bilinen en güçlü bağlanma afinitesi olarak kabul edilir ( $K_d = 10 \times 10^{-14} \text{ M}$ ) [247].

Labhasetwar ve arkadaşları; suda çözünebilir oleik asit-pluronik kaplı demiroksit nanopartikül formülasyonu kullanarak hidrofobik bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmişlerdir [248]. Çalışmalarında; sulu çözelti içerisinde dağılımlarını kolaylaştırmak amacıyla pluronik F-127, oleik asit kaplı demiroksit nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve hidrofobik dokсорubisin molekülleri, hidrofobik etkileşim ile, demiroksit nanopartikülleri çevreleyen oleik asit ile etkileştirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, yüklenen dokсорubisin miktarının %8.2 olabileceği ve uygulanan bu yöntemin ilaç yükleme prosesini kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Wei ve Gao, bu yaklaşımı, tek zincirli anti-prostat kök hücre antijen antibadisi konjuge edilmiş multifonksiyonel polimerik veziküller içerisine prostat tümör hedeflendirilmiş hidrofobik bir antikanser ilacı olan dosetaksel kullanarak uyarlamışlardır [197]. Bu çalışmada öncelikle polilaktik-ko-glikolik asit sentezlemişler ve süperparamanyetik demiroksit ve dosetakseli bu polimer içerisine hapsetmişlerdir. Dosetaksel, nanopartiküllerin kabuk yapısını oluşturan oleik asit/oleyilamin molekülleri ile etkileştirilmiş ve ilaç yükleme kapasitesi ağırlıkça %6 olarak bildirilmiştir. İlaç moleküllerinin hidrofobik etkileşimler aracılığı ile kabuk yapısı içerisinde bölümlenmesinin, multifonksiyonel veziküllerden yavaş ve kontrollü ilaç salım profili sağladığı görülmüştür.

HER2/neu (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2/neu) proteini, insan meme kanserlerinin yaklaşık %25'inde oldukça yüksek oranda eksprese olmaktadır ve proteinin ekspresyon derecesi meme kanseri ya da diğer insan kanserleri için zayıf prognoz ile korelasyon göstermektedir [249]. Artemov ve arkadaşları, ticari olarak mevcut olan streptavidin konjuge edilmiş SPION'ları kullanarak HER2/neu seviyelerini

incelemişlerdir [250]. Çalışmada; değişik seviyelerde HER2/neu reseptörleri eksprese eden meme kanseri hücreleri, biyotinlenmiş herceptin molekülleri ile ön işleme tabi tutulmuşlar ve daha sonra nanopartiküller bu reseptörlere hedeflendirilmiştir. In vitro T2-ağırlıklı MRI kontrast, meme hücre membranı üzerindeki HER2/neu ekspresyon seviyeleri ile korelasyon göstermiş ve sonuçlar akım sitometri analizleri ile de doğrulanmıştır.

### **2.9.3.2. Klik Kimyası**

“Klik kimyası” olarak da bilinen “Huisgen 1,3-dipolar siklo katılma reaksiyonu”; yaklaşık on yıl önce Sharpless ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [251]. Cu(I) katalizörlüğünde azid-alkin siklik katılma reaksiyonu, biyoyumlu ve suda çözünebilir kararlı triazol bağı oluşumu ile sonlanır. Bu reaksiyonlar oldukça spesifiktir ve ılımlı reaksiyon koşullarında sulu çözeltilerde yüksek verimlilikte gerçekleşir. Diğer fonksiyonel gruplar ile oluşabilecek istenmeyen reaksiyonlar, reaksiyon spesifikliğı nedeniyle gerçekleşmez ve biyomolekül üzerindeki arzu edilen lokasyonda istenen spesifik konjugasyonun gerçekleşmesi sağlanır. Bu özellikler; aynı zamanda bağlanma oryantasyonunun oldukça düzgün bir şekilde gerçekleşmesini sağlar ve bu nedenle hedeflendirme ajanlarının nanopartiküllerin yüzeyine konjuge edilmesinde klik reaksiyonları özellikle uygundur. Ancak tüm bu olumlu özelliklerin yanısıra, reaksiyonda katalizör görevi gören ve reaksiyonun tamamlanmasında gerekli bir madde olan Cu(I)'in; in vivo ortamda hepatit, nörolojik bozukluklar, böbrek hastalığı ya da alzhemier hastalığı gibi hastalıklara yol açma ve toksik etki gösterme gibi riskleri söz konusudur [252]. Weissleder ve arkadaşları; son yıllarda alternatif eşleşme mekanizması olarak, 1,2,4,5-tetrazin ve trans-siklookten arasında kovalent biyoortogonal reaksiyon geliştirmişlerdir [253]. Bu reaksiyon daha hızlı, katalizör gerektirmeyen ve serum içerisinde verimliliğini sürdürebilen bir reaksiyon olarak gözlenmiş ve dolayısıyla

hücresele seviyede moleküler görüntüleme uygulamaları açısından uygun olduğu bildirilmiştir.

Klik kimyasının son yıllarda özellikle biyokonjugasyon yöntemleri üzerindeki etkisi çok artmıştır. Biyokonjugasyon amaçlı kullanılan reaksiyonlar için esas zorluk, *in vitro* ve *in vivo* deneylerin her ikisinde de uygulanabilir olup olmadığıdır. Bhatia ve arkadaşları, *in vivo* uygulamalar açısından "klik" nanopartikül kullanımını ilk gösteren gruptur [254]. Mitokondriyal P32 proteinini fazlaca eksprese eden tümör hücrelerine bağlanabilecek bir peptid (süksinimidil 4-azidobütirat ve alkin içeren Lyp-1 peptidi) sentezlemişlerdir [255]. Süksinimidil 4-azidobütirat, tiyol-PEG5000-amin molekülleri ile konjuge edilmiş ve elde edilen ürün N-[gama-maleimidobütiriloksi] süksinimid ester-aktive edilmiş manyetofloresan nanopartiküller (Vivo Tag 680 siyanin boya ile etiketlenmiş, amin-fonksiyonelleştirilmiş demiroksit nanopartiküller) ile eşleştirilmiş ve azido-PEG grupları ile fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller elde edilmiştir. Alkin-bağlı Lyp-1 peptidleri, nanopartiküller ile CuSO<sub>4</sub> ve sodyum askorbat varlığında eşleşmiştir. Bakır katalizör ve peptid fazlası büyüklükçe ayırma kromatografisi kullanılarak uzaklaştırılmıştır. İnsan MDA MB 435 tümör hücreleri barındıran farelere, Lyp-1-demiroksit nanopartiküller intravenöz yoldan enjekte edilmiş ve *in vivo* tümör hedeflendirmenin gerçekleşip gerçekleşmediğini test edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra fareler sakrifiye edilmiş ve immünohistokimyasal analizler ve floresan analizler için organları alınmıştır. Lyp-1 konjuge edilmiş "klik" nanopartiküllerin, tümör damar bölgesinden dışarı kaçtıkları ve tümör gözenek boşluklarına penetre oldukları ve p32-eksprese eden hücrelere bağlanmış oldukları görülmüştür. Buna karşılık; hedeflendirilmemiş-azido-PEG nanopartiküllerinin pasif akümülyasyon ile kan damarlarının en dış bölgesinde lokalize oldukları saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile tümör-spesifik teranostik nanopartikül geliştirme yaklaşımında, "klik" ataçman stratejisi kullanımının başarılı olabileceğini göstermiştir.

Perez ve arkadaşları, folat moleküllerinin multifonksiyonel demiroksit nanopartiküller ile konjuge edilmesinde klik reaksiyonundan faydalanmışlardır [256]. Poliakrilik asit kaplı demiroksit nanopartiküller sentezlemişler ve bu nanopartikülleri lipofilik floresan bir boya olan dialkylkarbosiyanin florofor ile enkapsüle etmişlerdir. Nanopartikülleri öncelikle propargilamin ve EDC/NHS reaksiyonu ile alkin grupları ile fonksiyonelleştirmişler ve daha sonra klik kimyasından faydalanarak azid içeren folat ile reaksiyon gerçekleştirmişlerdir. Hidrofobik bir antikanser ilaç olan Taksol enkapsülasyonu ile de multifonksiyonel teranostik nanopartiküller elde edilmiştir.

Klik reaksiyona alternatif olarak biyoortogonal kimya-bazlı nanopartikül hedeflendirme platformu Weissleder ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [257]. Bu yöntem; nanopartiküler sensörlere hedeflendirme amaçlı gerçekleştirilen konjugasyon stratejilerinin yeniden yapılandırılmasına olanak sağlamıştır. Teknik "biyoortogonal nanopartikül dedeksiyonu" (BOND) adı ile tanımlanmaktadır. Weissleder ve arkadaşları, kanser hücrelerine spesifik hedeflendirme kabiliyetinin belirlenmesi amacı ile iki BOND çalışması tasarlamışlar ve bu çalışmalarını birbirleri ile karşılaştırmışlardır. Çalışmalardan bir tanesinde; manyetofloresan nanopartiküller, hücreler ile etkileştirilmeden önce, üç değişik tipte monoklonal antibadi ile direk olarak konjuge edilmiştir. Diğer çalışmada ise; iki-basamaklı strateji uygulanmış ve TCO-fonksiyonelleştirilmiş monoklonal antibadiler ilk önce hücrelere bağlanmada aracılık etmiş, daha sonra Tz-immobilize manyetofloresan nanopartiküller ile kovalent biyoortogonal reaksiyon ile eşleştirilmiştir.

### **2.9.3.3. Hibridizasyon Yöntemi**

Richards-Kortum ve arkadaşları, nanopartiküller ile aptamerlerin konjuge edilmesinde yeni bir yaklaşım ortaya koymuştur [258]. Aptamer; komplementer oligonükleotid-kaplı nanopartiküller için bir hibridizasyon bölgesi sağlaması açısından uzatma kolları ile uzatılmıştır. Altın nanopartiküller (20 nm), aptamer ekstensiyonu için bir

komplementer sekans ile ve tiyol fonksiyonel grupları ile modifiye edilmiş oligonükleotid içeren hekzaetilen glikol uzatma kolu ile kaplanmışlar ve uzatma kolları ile uzatılmış anti-PSMA aptamer, oligonükleotid-kaplı altın nanopartiküller ile hibridize edilmiştir. Elde edilen aptamer-altın nanopartikül kompleksinin androjen-duyarlı insan prostat adenokarsinoma (LNCaP) (PSMA+) hücrelerine hedeflendirildiği gösterilmiştir. Bu konjugasyon stratejisinin birçok avantajı vardır. Bunlardan bir tanesi; oligonükleotidlerin negatif yüklü fosfat gruplarının, elektrostatik itme etkisi ile nanopartiküllerin agrege olmalarını önlemesi ve nanopartiküllerin kararlı kalmalarını sağlamasıdır. İkinci olarak; aptamerler, oligonükleotidlerin komplementer sekans hibridizasyonu aracılığı ile nanopartikül yüzeylerine kolayca immobilize olurlar. Tiyol fonksiyonel grupları ile komplementer oligonükleotid sekans arasındaki PEG uzatma kolu ile sterik engellerin en aza indirilmesi ile, hibridizasyon bölgesi ile altın yüzey arasındaki hibridizasyon etkinliği arttırılmış olur. Üçüncü olarak; tiyol fonksiyonel grupları ile fonksiyonelleştirilmiş aptamerleri hazırlarken, nanopartiküllerin yüzeyini kaplamak ve kararlılığı sağlamak için yüksek konsantrasyonlarda aptamere ihtiyaç duyulurken, bu yöntem ile nanopartikül yüzeyine bağlanma gerçekleştirilirken ucuz ve kısa oligonükleotid zincirleri üzerinden daha düşük konsantrasyonlarda aptamere ihtiyaç duyulur. Son olarak; nanopartiküller ile farklı tipte moleküller (hedeflendirme, görüntüleme, terapötik ajanlar gibi) aynı anda konjuge edilebilir ve böylece multifonksiyonellik özelliği arttırılmış olur.

Ellington ve arkadaşları; bu yöntemi kullanarak anti-EGFR aptamerleri altın nanopartiküller üzerine immobilize etmişler ve yeni belirlenen bir aptamerin hedeflendirme spesifikliğini belirlemiş ve sunmuşlardır [229]. Çalışmalarında; altın nanopartiküller üzerine tiyol-modifiyeli oligonükleotidler immobilize etmişler ve bu oligonükleotidler ile anti-EGFR aptamerleri hibridizasyon yöntemi ile eşleştirmişler ve böylece anti-EGFR aptamer konjuge edilmiş altın nanopartiküller elde etmişlerdir. Jon ve arkadaşları da; hibridizasyon yönteminden,



demiroksit nanopartiküllerin yüzeyine anti-PSMA aptamerleri immobilize ederek yararlanmışlardır [259]. Çalışmalarında; aptamer sekanslarının sonunu CG'ce zengin dupleksler ile yapılandırmışlar ve nanopartiküllerin yüzeyinde çoklu doksorubisin-bağlanma bölgeleri oluşturmuşlardır. Oligonükleotidleri amin grupları ile fonksiyonelleştirmişler ve daha sonra yüzeylerinde karboksil fonksiyonel grupları barındıran demiroksit nanopartiküller üzerine immobilize etmişler ve manyetik saflaştırma basamakları sonucunda oligonükleotid-kaplı demiroksit nanopartiküller elde edilmiştir.

#### **2.9.4. In-vivo Uygulamalar Açısından Yüzey Modifikasyon Stratejileri**

Genel olarak; nanopartiküller yüzey enerjilerini minimize edebilmek için agregate olmaya meyillidirler. Nanopartiküllerin opsonin proteinleri ile çevrenmesi ve RES gibi mononükleer fagositik sistem elemanlarına daha görünür hale gelmesi sonucu bu agregatlar kan akımında opsonizasyonu tetikleyebilirler. Fagositik mekanizmalar, nanopartiküllerin etrafını çevreleyerek kan dolaşımından uzaklaşmalarını sağlarlar ve teranostik araçlar olarak etkinliklerini kaybetmelerine yol açarlar [260]. Bu nedenle klinik uygulamalar açısından teranostik nanopartiküllerin geliştirilmesindeki en büyük engellerden biri RES tarafından alımı geciktirmek ve kan dolaşımındaki yarı-ömrünü uzatabilmektir [261]. Nanopartiküllerin bu kamuflejlerini sağlayabilmek amacı ile gerçekleştirilen çalışmalar mononükleer fagositik sistem açısından "görünmez" nanopartiküller geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Nanopartiküllere görünmezlik özelliği kazandırmak amacı ile kullanılan en önemli molekül FDA tarafından da onaylanmış olan PEG'dür. Nanopartiküllerin yüzeylerinin kaplanmasında ya da fonksiyonelleştirilmesinde doğal ya da sentetik polimerlerden, küçük organik moleküllerden ve çekirdek-kabuk yapılardan da yararlanılmaktadır. Ancak yüksek düzeyde yüzey kaplamaları kanser hücreleri tarafından alımı ve bağlanma etkinliğini düşürebilir. Bu

nedenle "koruyucu" materyal anlamında kaplama molekülleri ve hedeflendirme ligandları ile kaplama materyallerinin optimal yüzey dansitesi büyük önem taşımaktadır.

#### **2.9.4.1. "Koruyucu" Kaplama Molekülleri**

PEG; değişik boyutlarda sentezlenebilen ve çeşitli terminal fonksiyonel gruplar ile modifiye edilebilen, biyouyumlu, lineer bir sentetik polimerdir. PEG; hidrofilik yapısı, biyolojik sıvılardaki nötral yükü ve genellikle görünmezlik özelliği nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu özellikleri ile nanopartiküllerin dispersiyonuna yardımcı olmakta ve kan dolaşımındaki sirkülasyon süresini uzatmaktadır [262-263]. Manyetik nanopartiküllerin yüzeyine PEG moleküllerinin immobilize edilebilmesi için; sulu ortamda in situ kaplama, silanlanmış PEG kaplama, amin-fonksiyonelleştirilmiş 6-kollu PEG türevleri, nanopartikül yüzeylerinin polimerizasyonu, sol-jel yöntemleri gibi pek çok yöntem kullanılmıştır [264-268]. Heterobifonksiyonel PEG'ün, bir ucu ile manyetik nanopartiküllerin yüzeyine kovalent bağ ile bağlanacak şekilde, diğer bir ucunun ise hedeflendirme ligandları, görüntüleme problemleri ya da terapötik ajanlar ile fonksiyonelleştirilerek kullanılması en yaygın uygulama şekillerinden birini oluşturmaktadır [269-271]. İstenilen özelliklere sahip diğer ajanlar ile PEG'ün özelliklerinin kombine edilmesi amacıyla PEG artıkları içeren kopolimerler geliştirilmektedir. Shuai ve arkadaşları; PEG-g-PEI (polietilenimin) kopolimerleri sentezlemişler ve gen transferini mümkün kılmak amacı ile kondens DNA, in vivo uygulamalarda gerekli olan görünmezlik profilinin sağlanabilmesi amacı ile de PEG kullanmışlardır. Kopolimerler; MRI-görülebilir gen taşıyıcıları olarak kullanılacak PEG-g-PEI-SPION yapısının oluşturulabilmesi amacıyla sentezlenmişlerdir [272]. Ayrıca; demiroksit çekirdek yapısının korunabilmesi ve beyin tümör hedeflendirilmiş manyetik/optik nanoprob hazırlanabilmesi amacı ile, PEG ile kaplanmış kitosan-dallı kopolimerlerinin sentezlendiği çalışmalar da mevcuttur. Kitosan, hidrofilik, biyouyumlu ve teranostik nanotaşıyıcı materyal

olarak popüler olan bir doğal polimerdir [273]. Zheng ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada; PEG ile fonksiyonelleştirilmiş kitosan kopolimer, PEG-aldehid ve amin-içeren depolimerize kitosan arasında gerçekleştirilen Schiff baz reaksiyonu kullanılarak hazırlanmış ve nanopartiküller de, ferröz ve ferrik klorürlerin amonyum hidroksit ile ikili çöktürme yöntemi yöntemi kullanılarak kopolimer varlığında sentezlenmiştir. Nanopartiküllerin yüzeyinde yer alan kitosanın amin grupları, beyin tümörü hedeflendirme ligandı olan klorotoksin ile konjuge edilmiştir. Yüzeyde yer alan kitosan; fizyolojik koşullar altında nanopartiküllerin agrege olmasını önleyerek sterik olarak kararlı olmalarını sağlar. Ayrıca; pozitif yüklü kitosan katyonları; kan-beyin bariyeri boyunca adsorptif-aracılı transportu harekete geçiren elektrostatik etkileşimler ile negatif yüklü beyin endoteli ile etkileşime girebilir.

Polisakkarid dekstran, in vivo uygulamalar için yüzey koruma materyali olarak oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Dekstranın biyouyumluluğu ve polar etkileşimler nedeni ile demiroksit yüzeylere afinitesinin yüksek olması, SPION'ların kaplama materyali olarak önemli özellikler sergilemesini sağlar ve bu nedenle klinik olarak onaylanmış dektran kaplı SPION formülasyonları mevcuttur [274-276]. Konvansiyonel dektran polimeri kaplama yöntemleri, hidrojen bağlarının kararlı olmamaları nedeni ile nanopartikül yüzeyinden bir miktar ayrılma ve kopmaları beraberinde getirmiştir. Weissleder ve arkadaşları, dekstran polimerini epiklorohidrin ya da amonyak kullanarak çapraz bağlama yöntemini uygulamışlar ve çapraz-bağlı demiroksit nanopartiküller elde etmişlerdir. Amonyak ile muamele etme, çapraz-bağlı demiroksit nanopartiküllerin yüzeyinde primer amin grupları oluşmasına ve bu sayede diğer fonksiyonel ajanların konjuge edilmesine olanak sağlamıştır. Elde edilen nanopartiküller MRI ile ve teranostik uygulamalar açısından incelenmiş ve çapraz-bağlı demiroksit nanopartiküllerin herhangi bir akut toksisite sergilemeden kan dolaşımındaki sirkülasyon sürelerinin uzadığı görülmüştür [277-278].

Ancak; klinik uygulamalar açısından bakıldığında, epiklorohidrin reaktantına eser miktarlarda rastlanması da dahil olmak üzere kararlılık ve sürdürülebilirlik açısından problem sergilemesi, bu ajanların bu uygulamalar açısından kullanımlarını yavaşlatmıştır [279].

Atomik transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi de, demiroksit nanopartikülleri kaplama yöntemlerinden bir tanesidir [280]. Li ve arkadaşları; ATRP yöntemi ile, çapraz bağlayıcı olarak divinilbenzen kullanarak, polistiren-kaplı demiroksit nanopartiküller sentezlemişlerdir [281]. Polivinil alkol (PVA), polivinil pirolidin (PVP), poliakrilik asit gibi birkaç polimer çeşidi de demiroksit nanopartikülleri kaplama materyali olarak kullanılmıştır [282-284]. Bu polimerler, nanopartikül aglomerasyonunu önleyen sterik bariyer görevi görürler ve kan dolaşımındaki sirkülasyon süresinin uzamasına yardımcı olurlar. Ayrıca; DMSA, bisfosfanatlar ve alkoksisilanlar gibi çeşitli monomerik maddeler de polimerlerin nanopartikül yüzeyine konjuge edilmesinde kullanılan maddelerdendir [285-286].

Lipozomlar ve miselar dispersiyonlar bir başka koruma stratejisi materyalleridir. Amfifilik moleküllerin küresel küme formları, hidrofilik ya da hidrofobik çekirdek yapıları ile nanopartiküllere dahil edilerek manyetik nanopartiküllerin kaplama materyali olarak kullanılabilir ve kan dolaşımındaki sirkülasyon süreleri uzatılabilir. Amfifilik yapılar, diğer terapötik ajanlar ya da fonksiyonel moleküller ile enkapsüle edilebilir ve multifonksiyonel nanopartiküler sistemler tasarlanabilir.

Organik kaplama materyallerine ek olarak; çekirdek-kabuk yapısında, silika ya da altın ile kaplanmış manyetik nanopartiküller de görünmez nanopartiküllerin geliştirilmesinde cazip yaklaşımlardan birini oluşturmaktadır. Silika kabuk yapısı, sulu ortam koşullarında kararlı nanopartiküllerin hazırlanmasında koruyucu bir görev üstlenmektedir. Bu nanoyapıların önemli özelliklerinden bir tanesi, nanopartikül matriksi içerisine fonksiyonel moleküllerin enkapsüle edilebilmesidir. Hyeon ve arkadaşları; çekirdek yapısı  $Fe_3O_4$  nanokristallerden oluşan, kabuk

yapısı mezoporöz silika olan nanopartiküller geliştirmişler ve MR/optik görüntüleme ve ilaç aktarımında bu nanopartiküllerin multifonksiyonel uygulamalarını sergilemişlerdir [287]. Bu çalışmada; silika nanopartiküllerin boyutunun tam bir kontrol mekanizması ile 100 nm'nin altında tutulmasını sağlayan bir yöntem önerilmiştir. Sürfaktan olarak kullanılan setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), mezoporöz silika kabuk yapısının oluşmasında organik bir şablon oluşturmuş ve hidrofobik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokristallerin sulu ortamda kararlı olmasını sağlamıştır. Tetraetilortosilikat (TEOS) ve rodamin B izotiyosiyanat (RITC)-işaretlenmiş aminopropiltrioksolan (APS) kullanarak sol-jel prosesi gerçekleştirilmiş ve amin grupları içeren silika kabuk yapısı oluşturulmuştur. Ayrıca biyouyumluluğun sağlanabilmesi amacı ile süksinimidil uç grubundan kovalent bağ ile PEG konjuge edilmiş ve terapötik etkinin sağlanabilmesi amacı ile de doksorubisin molekülleri hazırlanan nanopartiküler sisteme yüklenmiştir. Sonuç olarak; çekirdek-kabuk yapısında, manyetik ve floresan özellik ile birlikte terapötik etki sergileyen, biyomedikal teranostik uygulamalar için nanopartiküler bir sistem tasarlanmıştır.

Altın; son derece inert bir molekül olması ve yakın-kızılötesi ışınları mükemmel şekilde absorblama özelliği nedeni ile kaplama materyali olarak birçok avantaja sahiptir. Hyeon ve arkadaşları; tanı ve termal terapi amaçlı gerçekleştirdikleri çalışmalarında, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> yapısındaki manyetik nanopartikülleri altın tabakası ile kaplamışlar ve nanomedikal bir platform elde etmişlerdir [288]. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> yapısında, monodispers, 2-bromo-2-metilpropiyonik asit (BMPA) ile kararlı duruma getirilmiş 7 nm boyutundaki nanopartiküller, bromo grupları ile amino grupları arasındaki nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu üzerinden amino-modifiyeli silika küreler ile kovalent bağlanmıştır. Daha sonra; altın çekirdekli nanopartiküller, silika kürelerin kalan amino grupları ile konjuge edilmiştir. Son olarak da; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküller 15 nm boyutunda kalın altın tabakası ile çevrelenmiş ve silika küreler içerisine gömülmüştür. SKBR3 meme kanseri hücrelerine hedeflendirme amacı ile

de, hazırlanan nanopartiküler sistem yüzeyine anti-HER2/neu antipadisi immobilize edilmiş ve yakın-kızılötesi ışınları ve MRI çalışmaları tamamlanmıştır.

Son yıllarda, biyokirillik oluşturmeyan zwitteriyonik materyaller yeni bir sınıf olarak geliştirilmiştir [289]. Biyokirillik, kabaca ıslak-nemli yüzeylerde mikroorganizmaların akümülyasyonu olarak tanımlanabilir. Biyokirillik; mikrokirillik (biyofilm oluşumu ve bakteriyel adezyon) ve makrokirillik (daha büyük organizmaların adezyonu) olarak 2 başlık altında incelenmektedir. Biyofilm tabakaları hem canlı hem de cansız yüzeylerde oluşabilir ve mikroorganizmaların kendi ürettikleri polisakkarid matriks içerisinde gömülü halde yaşamalarıdır. Anti-kirillik ise, bu akümülyasyonların oluşmasını önleyici ya da oluştuktan sonra ortadan kalkmasını sağlayıcı proseslere verilen addır. Zwitteriyonik materyaller, birbirinden farklı yükte iki grup içerirler. Her durumda geçerli olmamasına rağmen, genellikle amonyum pozitif yük kaynağını, karboksilatlar ise negatif yük kaynağını oluştururlar. Kan serumu ya da plazma göz önünde bulundurulduğunda, düşük-kirillik özellikleri, zwitteriyonlar ile komşu su molekülleri arasındaki güçlü etkileşimlere mal edilir ve sonuçta kolloidal kararlılık sağlanmış olur. Zwitter-iyonik durum, makroskopik olarak net sıfır-yüklü nötral bir haldir ve kirillik-oluşturmeyan yüzey sağlar [290-292]. Jiang ve arkadaşları; altın nanopartikülleri kararlı duruma getirmek amacı ile, ATRP yöntemini kullanarak polikarboksibetain akrilamid-fonksiyonelleştirilmiş yüzey platformu geliştirmişlerdir [293]. Geliştirilen bu yüzey platformunun spesifik-olmayan protein adsorpsiyonuna karşı oldukça dirençli ve biyomolekül immobilizasyonu için karboksil grupları içeren bir platform olduğu bildirilmiştir. Ancak; ATRP reaksiyonları, yüzey-aşılmiş başlatıcılar ve oksijensiz ortam gerektirmektedir ki bu faktörler pratik uygulamalarda oldukça kısıtlayıcı faktörler olarak kabul edilmektedir. Bu kısıtlayıcı faktörler, yüzeye-aşılama yöntemi gibi bir başka stratejiyi gündeme getirmiştir [294]. Zwitteriyonik polikarboksibetain metakrilat polimeri, iki 3,4-dihidroksifenil-L-alanin (DOPA) adeziv molekülü ile

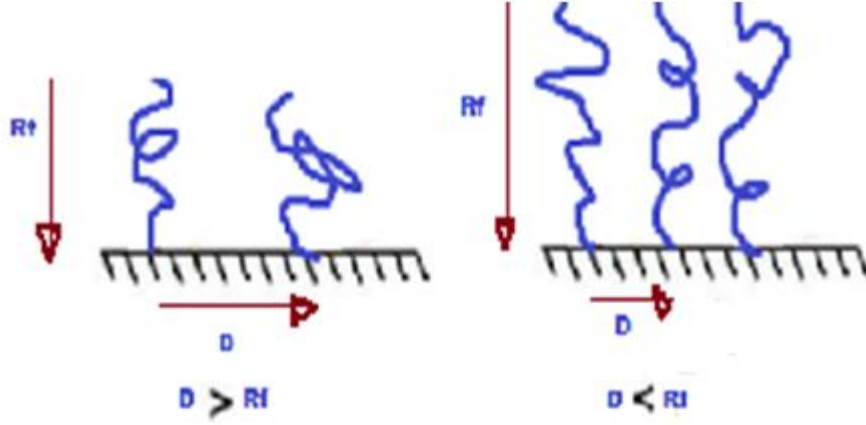
yüzey üzerine aşılınmış ve demiroksit nanopartiküller sentezlenmişlerdir. Nanopartiküllerin yüzeyine EDC/NHS kimyası kullanılarak amin grupları içeren arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) peptid sekansları immobilize edilmiştir. Çalışmanın sonunda; polikarboksibetain metakrilat-DOPA2 ile dekore edilmiş manyetik nanopartiküllerin dekstran-kaplı manyetik nanopartiküllere göre daha düşük makrofaj alımı sergiledikleri bildirilmiştir.

#### **2.9.4.2. Hedeflendirme Ligandları ve Koruma Materyallerinin Optimizasyonu**

Biyokirillik oluşturmeyen koruma materyalleri; spesifik-olmayan protein absorpsiyonunu önleyici sterik bariyer oluşturmakla kalmayıp, nanopartiküllerin yüzey özelliklerini, RES tarafından tanınmasını engelleyecek şekilde düzenlerler. Nanopartiküler sistemlerin in vivo ortamlardaki başarılı performansları; kirlilik-oluşturmama özellikleri, moleküler ağırlıkları, yapısal yüzey özellikleri ve yüzey kaplama oranları gibi kriterlere dayalıdır [295-296]. Yüzey dansitesi ve konformasyon, hedeflendirme etkinliği ve görünmezlik özelliklerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi anlamında önemli faktörlerdir.

Lipozomal formülasyonundaki PEG-lipidlerin; nanopartikül yüzeyi üzerinde yüksek oranda ve yüksek konsantrasyonda kaplı olması, iki PEG molekülü arasındaki mesafeyi (D) azaltır. PEG moleküllerinin boyu  $R_f$  ile ifade edilecek olursa;  $D < R_f$  olduğunda, yüzey üzerindeki çok fazla miktardaki PEG zincirleri arasındaki lateral basınç artar. Genel anlamda;  $D < R_f$  olduğunda nanopartiküllerin kan dolaşımındaki sirkülasyon süresi uzar ve daha fazla protein repülsiyonu ortaya çıkar [297-299]. Bu yüzey konfigürasyonu aynı zamanda PEG zincirlerinin mobilitesini azaltır ve böylece PEG tabakanın görünmezlik fonksiyonelliğini azaltır [300]. Böylece, nanopartikül yüzeyindeki hedeflendirme ligandları ile hedef kanser hücreleri arasında bağlanma engeli oluşturur [301]. Dolayısıyla; herhangi bir teranostik sistem tasarlanacağı zaman nanopartikül yüzeyi kaplama materyalinin dansitesi optimize edilmek ve ligand boşlukları

göz önünde bulundurulmak zorundadır. Şekil 2.9'da yüzey üzerinde farklı dansitelerde PEG zincirleri görülmektedir.



Şekil 2.9. Nanopartikül yüzeyinde PEG zincirlerinin boy ve yükseklikleri arasındaki bağıntıyı şematik gösterimi

Nanopartikül yüzeylerindeki hedeflendirme ligandlarının dansitesinin oynadığı kritik role rağmen, nanopartiküler sistemlerin hedeflendirme etkinliğini artırmak üzere gerçekleştirilen çalışma sayısı azdır. Nanopartikül yüzeyindeki hedeflendirme ligandlarının yüksek konsantrasyonda olması, genellikle selüler alımı arttırmaktadır [302-303]. Hedeflendirme ligandları; nanopartikül yüzeyinde, bağlanma etkinliği açısından minimum eşik değerini aşacak şekilde tasarlanmalıdır [304].

Fakat bazı çalışmalar, ligand dansitesinin yüksek olmasının hedef kanser hücrelerine bağlanma etkinliğini arttırmadığını ve hatta endotelial ya da kanseröz-olmayan hücreler ile etkileşimlerini yükselttiğini ve bu nedenle de nanopartiküllerin opsonizasyon-aracılı atılımlarına sebebiyet verdiğini göstermişlerdir [305].

Ashley ve arkadaşları; hedef kanser hücrelerine çoklu-peptid yapısı ile hedeflendirilecek lipid-tabakalar ile desteklenmiş silika nanoporöz partiküller geliştirmişlerdir [161]. Nanopartiküllerin yüzeyindeki düşük dansiteli hedeflendirme peptidleri (nanopartikül başına 6 peptid) ile



hedef kanser hücreleri arasında yüksek afinite sergilenmiştir ve bu durumun yüzeydeki lipid tabakalarından kaynaklı akıcılık yapısı ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen spesifik hedeflendirme, spesifik-olmayan etkileşimlerin azaltılmasında ve hedef moleküllere spesifik, afinite özelliğinin arttırılmasında çok büyük önem taşımakta ve taşıyıcı molekülün selektif hedeflendirme kabiliyetinin en üst düzeye taşınmasına yardımcı olmaktadır.

Yapılan araştırmalar doğrultusunda günümüze kadar elde edilen veriler ışığında; nanopartiküllerin in vitro çalışmalar için optimize edilen tümör-hedeflendirme özelliklerinin, çoğu zaman in vivo çalışmalar açısından tahmin edildiği kadar başarılı olmadığı görülmüştür. Farokhzad ve arkadaşları; PSMA-hedeflendirilmiş, aptamer-konjuge edilmiş doksataksel-yüklü nanopartiküllerin, yüzey tasarımı koşullarını, hedeflendirme ve görünmezlik açısından maksimum verim elde edilecek şekilde sentezlemişler ve in vivo ve in vitro çalışmalar açısından performans değerlendirmesi yapmışlardır [306]. Nanopartiküller; aptamerler ve kendiliğinden-oluşan diblok kopolimerlerin farklı kompozisyonları kullanılarak hazırlanmış ve nanopartikül yüzeyindeki optimal aptamer dansitesi başlangıçta in vitro olarak saptanmıştır. Ligand dansitesinin %5 oranında artması, hedef hücreler tarafından nanopartikül alımını önemli ölçüde arttırmış ve aptamer dansitesinin daha fazla oranda arttırılması ise nanopartikül alımını orta düzeyde arttırmıştır. Bu sonuçlar; in vitro PSMA-spesifik endositoz için, optimum ligand dansitesinin  $\mu\text{mol}$  nanopartikül başına 10-80 nmol aptamer olduğunu göstermiştir. LNCaP zenograft fare modellerine enjekte edilen hedeflendirilmiş nanopartiküller ile yapılan bu çalışma; aptamer dansitesinin %0'dan %5'e yükseltilmesinin, tümörlerde nanopartikül retansiyonunu önemli ölçüde arttırdığını ancak aptamer dansitesinin %10'un üzerine çıkartılması durumunda retansiyonun azaldığını göstermiştir. Yazarlar; yüksek aptamer dansitesinin nanopartiküllerin görünmezlik özelliklerini azalttığını ve dolayısıyla karaciğer klirensini hızlandırdığını bildirmişlerdir.

Tümör hedeflendirmede nanopartikül geometrisi, hedef hücreye bağlanma afinitesinin saptanmasında çok önemli bir rol oynamasına rağmen nispeten daha az ilgi gören ve araştırılan konulardan biri olmuştur.

Sailor ve arkadaşları; nanomateryal şeklini (küre şekline karşılık daha uzatılmış versiyon), hedeflendirme ligandı tipini (hücre yüzeyine hedeflendirmeye karşılık ekstraselüler matriks hedeflendirme), ligand ile yüzey kaplama ve konjugasyon kimyası parametrelerini değiştirerek, in vivo tümör hedeflendirme çalışmalarını sistematik olarak optimize etmişlerdir [307]. Çalışmalarında 2 adet tümör-hedeflendirilmiş peptid (F3 ve CREKA) kullanmışlar ve değişik miktarlarda hedeflendirme peptidi ve değişik uzunluklarda PEG zincirleri kullanarak, bu peptidleri manyetik nanoküre ve manyetik nanosolucan ("nanoworm")'lar ile konjuge etmişlerdir. Tümör zenograft fare modellerine manyetik nanoyapıların intravenöz enjeksiyonu sonucu elde edilen veriler; nanosolucanların in vivo tümör-hedeflendirme özelliklerinin, nanokürelere göre çok daha üst seviyelerde olduğunu göstermiştir. Bu durumun, tümör hücre yüzeyindeki reseptörler ile daha uzun yapıdaki nanosolucanlar arasındaki multivalen etkileşimler sonucu geliştiği belirtilmiştir. Daha küçük olan nötral CREKA hedeflendirme ajanının, daha büyük olan pozitif yüklü F3 hedeflendirme ajanından daha efektif olduğu saptanmıştır. Bu durumun da, oldukça katyonik olan F3 peptidinin birçok kopyasının partikül yüzey yükünde büyük bir artışa yol açması ile, mononükleer fagositik sistem-ilişkili organlar tarafından atılımın daha kolay ve hızlı gerçekleşmesi sonucu oluştuğu düşünülmüştür. En efektif CREKA peptid sayısının, nanopartikül başına yaklaşık 60 peptid olduğu, nanosolucan başına 60'dan fazla peptid düştüğünde kan dolaşımındaki sirkülasyon süresinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, kısa SMCC zincirinin hedeflendirme peptidinin konformasyonunu kısıtladığı görülmüştür.

## 2.10. Aptamerler

Aptamerler, hedef antijenlere yüksek afinite ve özgüllükte bağlanabilen oligonükleotid ya da polipeptid yapıda olan moleküllerdir. Yapay nükleik asit ligandları olarak da adlandırılırlar [308]. Üç boyutlu kompleks yapıya sahiptirler. Aptamerlerin in vitro seçim metodolojisinin tanımlanmasının ardından, bu ligandlar terapi ve tanı amaçlı uygulamalar açısından önemli bir molekül sınıfı olarak kabul edilmişlerdir [309-310].

Kimyasal modifikasyonlarının çok kompleks olmaması, seleksiyonlarının in vitro gerçekleştirilebilmesi ve herhangi bir biyolojik sisteme ihtiyaç duyulmaması, hedef analitlere yüksek özgüllük ve afinite bağlanabilmeleri, DNA aptamerlerinin yüksek düzeyde kararlı olmaları, kolay ve ucuz olarak üretilebilmeleri, oda sıcaklığında saklanabilmeleri, yüksek miktarda ve saflıkta sentezlenebilmeleri gibi avantajlara sahiptirler. Ayrıca; aptamerler aktivitelerini yitirmeden birçok kez katlanabilme özelliğine sahiptirler. Antibadi ve protein-bazlı diğer sensörler ise genel olarak birden çok kullanılmazlar. Dezavantajları ise hedeflenebilecek bölgelerinin az olmasıdır.

Aptamerler; hedef moleküllere bağlanma kabiliyetlerine göre random oligonükleotid havuzlarından ( $\sim 10^{14} - 10^{15}$ ) in vitro seçimleri gerçekleştirilebilen, doğal olmayan (sentetik) oligonükleotidler ya da tek zincirli DNA, RNA dizileridir. Aptamerlerin yaklaşık 6 ila 40 kDa olan molekül ağırlıkları, yaklaşık 150 kDa olan antibadilerin molekül ağırlığından çok daha küçüktür [311]. Aptamerler; intramoleküler etkileşimler üzerinden, hedef moleküllere yüksek spesifikte ve afinite ile bağlanabilen üç boyutlu konformasyonlara katlanırlar. Üç boyutlu bu konformasyon tRNA'nın globüler şekline benzer bir yapıdadır. Antibadi moleküllerinin aksine, aptamerler büyük çaplı üretimler için kimyasal yollardan sentezlenebilirler ve bu özellikleri ile ilaç geliştirmede bu tip moleküllerin ticarileştirilmesi açısından önemli bir avantaja sahiptirler. Çok küçük boyutları ve endojen moleküllere olan benzerlikleri nedeni ile

üstün doku penetrasyonu sergilerler ve ayrıca antibadilerden daha az immünojenik olduklarına inanılmaktadır [312].

mRNA molekülleri ile hibridize edilerek hedef proteinin sentezini etkileyen tek-zincirli nükleik asitlerden meydana gelen antisens bileşiklerin aksine aptamerler, proteinlere direk olarak bağlanarak onların fonksiyonlarını inhibe edebilirler. Aptamerler; diğer nükleik asitler, proteinler, peptidler ve küçük moleküller gibi birçok hedef moleküle, tipik olarak 10 pM ve 10 µM aralığındaki denge ayrışma sabiti (Kd) ile bağlanır [219]. Aptamerler; yaklaşık 15-60 baz uzunluğunda nükleotid sekansı (A, U, T, C ve G) ile tanımlanırlar. Konformasyonları; çoklu domeynler ile etkileşimler nedeniyle aptamerlere spesifikklik özelliğini kazandırır. Hedef molekülde meydana gelebilecek en küçük değişim; aptamerler ile hedef moleküller arasındaki etkileşimleri bozabilir ve bu nedenle aptamerler, hedef moleküllere çok benzer olan fakat hedef moleküller ile birebir aynı olmayan moleküllerin dahi ayırt edilebilmesini sağlarlar. Örneğin; bronkodilatör teofilin (1,3-dimetilksantin) molekülü için yüksek afiniteye sahip ancak kafein (1,3,7-trimetilksantin) molekülü için >10,000 kez daha düşük bağlanma afinitesi sergileyen spesifik RNA'lar tanımlanmıştır [313].

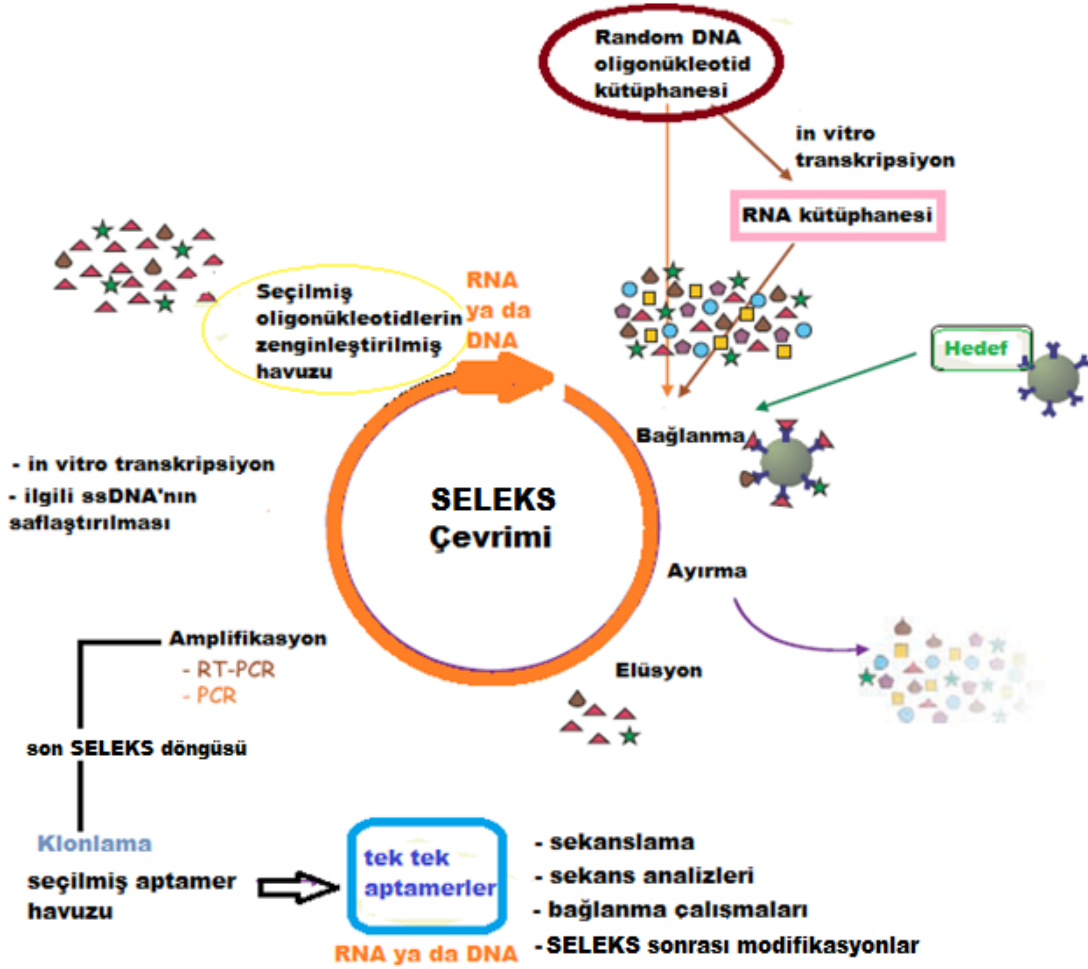
Moleküller hedefleri eşsiz tanıma özelliklerine bağlı olarak aptamerler, in vitro ve in vivo terapötik, tanı ve görüntüleme uygulamaları açısından çok yararlı moleküller olarak tanımlanmışlardır [314-315]. Oldukça kararlı olmalarına ve aktivitelerini kaybetmeden geniş sıcaklık aralıklarını, pH (~4 – 9) aralığını ve organik çözücülerini tolere edebilir olmalarına rağmen, nükleaz bozunurluğu ya da in vivo renal klirens açısından oldukça hassastırlar. Bu nedenle; in vivo uygulamalar öncesinde farmakokinetik özelliklerinin geliştirilmesi gerekebilir.

Aptamerler; random sekans havuzlarından ya da ribosviç'lerden ("riboswitch, doğal aptamerler") elde edilirler. Ribosviçler; mRNA molekülünün bir parçasıdır. mRNA bu parça sayesinde spesifik bir moleküle direk olarak bağlanabilir. Kendi aktivitesi ile birlikte bağlandığı

molekülün de gen aktivitesine etki eder. Aptamerlerin seçimi çoğunlukla SELEKS adı verilen bir yöntem ile gerçekleştirilir. SELEKS işleminin temeli; DNA ya da RNA molekül ( $\sim 1 \times 10^{14}$ ) kütüphanelerinin hedef molekül ile inkübe edilmesine dayanır. Hedef moleküle bağlanan oligonükleotidler bağlanmayan gruptan ayrılır. RNA söz konusu olduğunda; bağlı nükleik asitler ters transkribe edilir ve PCR kullanılarak çoğaltılır ve hedef molekülce zengin nükleik asit havuzu elde edilmiş olur. Yüksek afinite ve özgüllükte bağlanmış aptamerlerin izole edilebilmesi için tipik olarak 8-12 döngü gerçekleştirilir. Şekil 2.10'da SELEKS çevrimi sunulmuştur [316].

Aptamerlerin ilaç enkapsüle edilmiş nanopartiküller ile konjuge edilmesi ile, terapötik amaçlı hedeflendirilmiş taşıyıcı sistemler oluşturulmaktadır. Bu sistemlere; küçük ilaç moleküllerinin, protein-bazlı ilaçların, nükleik asit terapi (antisens oligonükleotid ya da gen terapi gibi) ajanlarının taşınımı da dahildir. Ayrıca tanı amaçlı ya da tümör metastazlarının belirlenebilmesi amacı ile aptamerlere görüntüleme ajanları da immobilize edilebilir. Örneğin küçük metastaz odaklarının saptanmasında; aptamerlerin, floroforlar ve kuantum noktaları (nanokristaller) gibi optik görüntüleme ajanları ile ya da manyetik nanopartiküller gibi MRI görüntüleme ajanları ile konjuge edilmesi yararlı olabilir [317-318].

Kanser hücrelerine hedeflendirme amaçlı aptamer seçimi gerçekleştirilirken, aptamerlerin, kanser hücrelerinin tercihen ya da sadece plazma membranı üzerinde eksprese olan reseptörlerine yönlendirilmiş olması gerekir. Alternatif olarak tümörlerde eksprese olan ekstraselüler matriks moleküllerine de yönlendirilmesi mümkündür. Şekil 2.11 (A)'da EGFR ile EGF ve EGFR Aptamerleri arasındaki etkileşim şematize edilmiş [319] ve Şekil 2.11 (B)'de trombin aptamer dizisinin üç boyutlu şekli sunulmuştur [316].

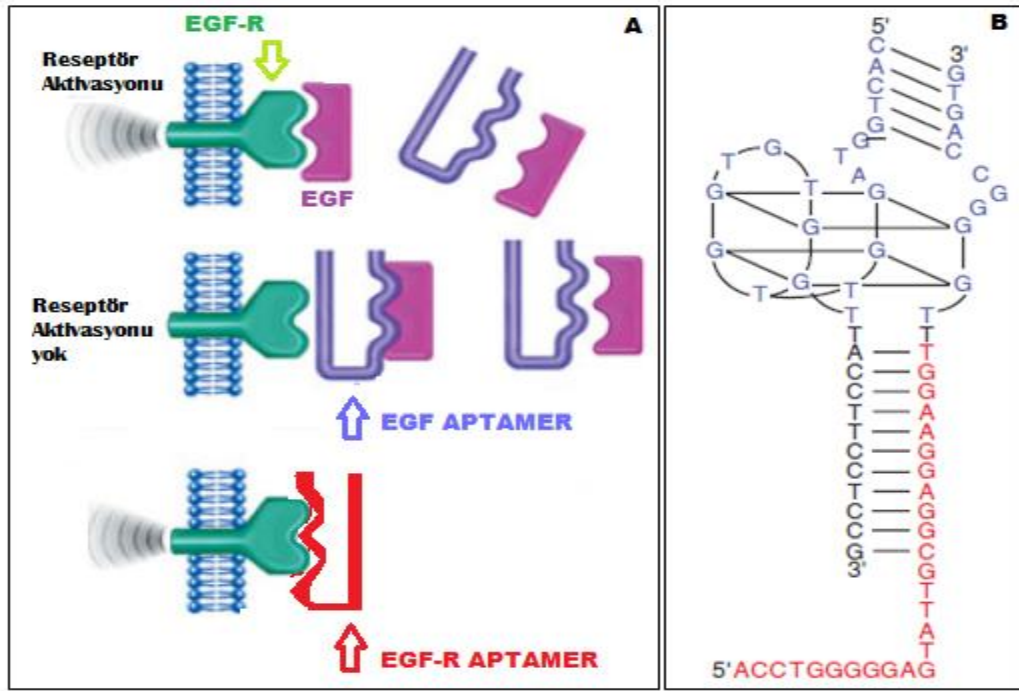


Şekil 2.10. SELEKS Çevrimi

Aptamerlerin maddelere ya da ilaç taşıyıcı sistemlere kovalent konjugasyonu çoğunlukla kararlı amid bağlarıyla sonuçlanan süksinimidil ester-amin kimyası ya da maleimid-tiyol kimyası yoluyla gerçekleşir [320]. Potansiyel non-kovalent stratejiler, afinite etkileşimleri (ör. Streptavidin-biyotin) ve metal koordinasyonunu (ör. Aptamerin sonundaki polihistidin eki ve polimer partiküllerin yüzeyindeki immobilize nitrilotriasetik asitin  $Ni^{+2}$  şelatları) içerirler. Bu kovalent ve non-kovalent stratejiler; proteinler, enzimler, peptitler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin taşıyıcı sistemlere immobilizasyonunda kullanılmaktadırlar.

Kovalent bağlı biyokonjugatların, fizyolojik tuz ve pH ortamında kararlılığı arttırdığına ve immünolojik reaksiyonları ve potansiyel toksisiteyi minimize ederek gereksiz biyolojik komponent (ör.

Streptavidin) ilavesini ortadan kaldırdığına inanılmaktadır. Kovalent konjugasyon için, aptamer tipik olarak; ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeyinde bulunan maleimid fonksiyonel grupları ya da aktive karboksilik asit N-hidroksisüksinimid (NHS) esterleri ile konjuge edilmek üzere, sırası ile bir terminal primer amin ya da tiyol fonksiyonel grubu taşıyacak şekilde modifiye edilir. Bu reaksiyonlar, sıvı ortamda ve % 80-90 verimlilikte ürün elde edilecek şekilde gerçekleştirilirler [321].



Şekil 2.11. (A) EGFR'ü ile EGF ve EGFR Aptameri arasındaki etkileşim, (B) Trombin Aptamer dizisinin üç boyutlu şekli

Maleimid-tiyol kimyası ile ilgili olarak oluşabilecek potansiyel zorluklardan bir tanesi; depolama-saklama esnasında aptamerlere bağlı tiyol gruplarının okside olması (iki tiyol-modifiye aptamer arasında S-S bağlarının oluşması) ve bu oksidasyon sonrasında, partiküller üzerindeki maleimid fonksiyonel grupları ile konjugasyon reaksiyonuna katılmayacak aptamer dimerlerinin oluşma olasılığıdır. Konjugasyon reaksiyonunda, Tris-2-karboksietil fosfin (TCEP), beta-merkaptoetanol ya da ditiyotreitol (DTT) gibi indirgeyici ajanların kullanılması ile bu problem kısmen azaltılabilir. NHS-amin kimyasının potansiyel bir avantajı; partikül yüzeyi üzerindeki reaksiyona girmemiş karboksilik asit

gruplarının partikül yüzey yükünü (zeta potansiyeli) bir miktar negatif yapması ve bu şekilde negatif yüklü aptamerler ve negatif partikül yüzeyi arasındaki spesifik-olmayan etkileşimleri azaltmasıdır. Yapılan bir çalışmada; PEG molekülüne terminal karboksilik asit grupları ile bağlı PLA-PEG blok kopolimerlerinden oluşan kontrollü salım nanopartikülleri; primer amin uç grupları barındıran aptamerler ile konjuge edilmişlerdir [322]. Çalışmanın sonunda; hidrofilik PEG grubunun, partikül üzerindeki karboksilik asitin karboksilik asit NHS esterlere dönüşümünü ve primer amin modifiye aptamerlerle konjügasyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir. Aptamerlerin nanopartiküller ile konjuge edilip edilemediği; FITC gibi floresan proplar kullanılarak, floresan mikroskopi ya da akım sitometri yöntemleri ile kalitatif olarak gösterilebilir. İmmobilizasyon yöntemini seçerken, aptamerin yeterli konformasyonel serbestliğinin sağlanması önem taşımaktadır. Bu durum yeterince uzun uzatma kollarının kullanılması ile sağlanabilir. Nanopartikül yüzeyi ile aptamer arasında bir hidrokarbon uzatma kolu grubu bulunması, aptamer ve hedef molekül arasındaki etkileşim olasılığını arttırmaktadır. Ayrıca; nanopartikül yüzeyinde yer alan aptamer dansitesinin uygunluğu, konjugasyon reaksiyonları esnasında, nanopartikül yüzeyi üzerindeki reaktif grupların molar miktarına karşın aptamer molar miktarının daha fazla tutulması ile başarılabilir. Ayrıca nanopartikül yüzeyi üzerindeki hedeflendirme molekülünün optimal yoğunluğu, deneysel olarak belirlenmelidir [323].

### **2.11. Antibadiler**

Antibadiler kanser açısından önemli terapötik ajanlardır. Antibadilerin selektif tümör hedeflendirme konusunda kullanılması, neredeyse yüzyıl önce Paul Ehrlich tarafından gündeme getirilen bir konudur. Hibridoma teknolojisinin 1975'li yıllarda ortaya çıkması ile birlikte, monoklonal antibadilerin üretimi olanaklı hale gelmiştir [324]. İlk üretimleri farelere dayandığı için, o dönem üretilen ve murin olarak adlandırılan antibadiler insanlarda immün yanıtı tetikleyici etki oluşturmuş ve klinik kullanımlarını sınırlamıştır. Antibadi mühendisliğindeki son gelişmeler;



değişken fragmanları fare, sabit fragmanları insan kaynaklı kimerik antibadilerin, çeşitli modifikasyonlar ile insanlarda kullanıma uygun hale getirilmiş "hümanize" antibadilerin ve tamamen insan sekanslarından türetilmiş monoklonal antibadilerin geliştirilebilmesi için uygun bir platform oluşturmuştur.

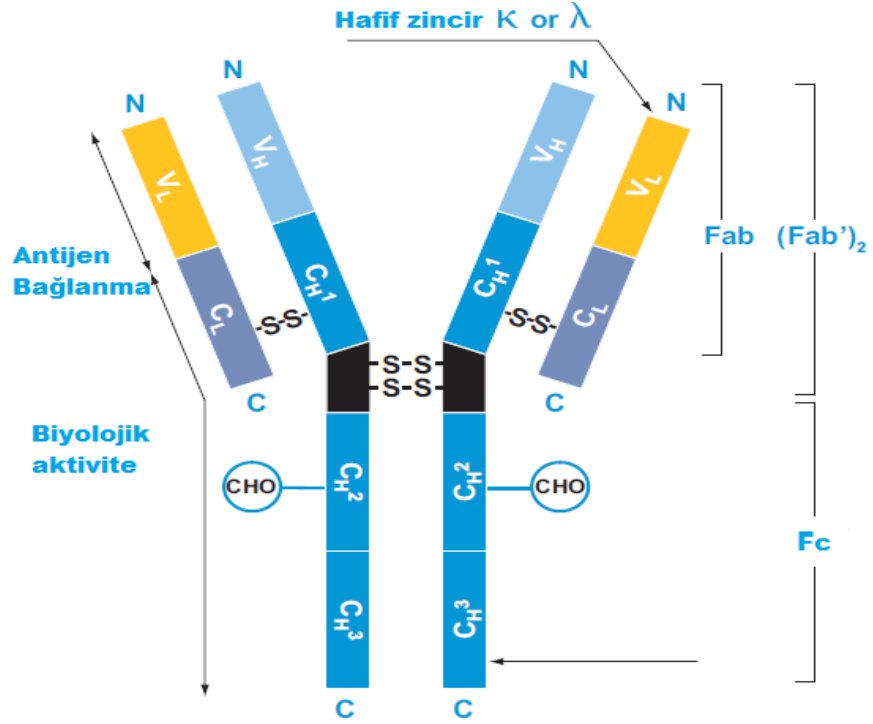
Antikorlar olarak da adlandırılan antibadiler, immün sistemin yabancı proteinlere karşı bir cevabı olarak B lenfositler tarafından üretilen proteinlerdir. Antibadilerin fonksiyonu antijenlere bağlanmaktır; bu bağlanma mekanizmasından sonra antijen molekülleri immün sistem tarafından farkedilir hale gelir ve fagositler tarafından fagosit edilir. Antibadinin bağlandığı antijen parçası "epitop" olarak adlandırılır. Epitop; antibadi molekülünün tanıyabildiği kısa amino asit sekansdır [325]. Monoklonal antibadilerin moleküler araç olarak kullanılmasında antibadi-epitop ilişkisinin iki önemli özelliği anahtar rolü oynamaktadır; spesiflik ve yeterlilik. Antibadi, sadece kendi özel epitopuna bağlanır ve bu nedenle spesifiktir. Ayrıca, antibadi molekülüne epitopun kendisi bağlanır; yani antijen molekülünün tüm parçaları ile birlikte var olması yeterli değildir ve epitopun varlığı gereklidir.

Monoklonal antibadiler yapısal olarak dört polipeptid zincirinden oluşan ve antijene bağlanma bölgeleri içeren glikoproteinlerdir. Bu dört zincir, Y şeklini andıran kuartern yapı oluştururlar. İmmünglobulin yapısındaki monoklonal antibadilerin polipeptid zincirlerinden ikisi ağır diğer ikisi de hafif zincirdir. İki ağır ve iki hafif zincir birbirleri ile disülfid bağları ile bağlıdır. Hafif ve ağır zincirler sabit (C) ve değişken (V) altbirim içerirler. Değişken altbirim antijeni tanıyan birimdir. Antijene bağlanan fragmanlar Fab birimi olarak adlandırılırlar ve kol uzantılarında yer alırlar. Fab birimi; antibadinin antijene spesifikliğini ve antijene bağlanma bölgesini oluşturan ve üç hiperdeğişken komplementertanıyıcı bölge (CDRs)'den oluşan değişken bölge içerir. İmmün efektör fonksiyonlarını ve biyolojik aktiviteyi sağlayan fragman ise, Y molekülünün alt kısmındaki sabit bölgedir ve Fc bölgesi olarak

adlandırılır. Şekil 2.12'de antibadi molekülünün yapısı sunulmuştur [326].

Antibadiler; ağır zincir sabit fragmanlarının sekanslarına bağlı olarak 5 sınıf olarak gruplandırılırlar; IgM, IgD, IgE, IgG ve IgA. Bu 5 sınıf antibadi moleülleri arasında kanser immünoterapisinde en sık kullanılan grup IgG'dir.

Hastalıklar ile mücadelede önemli rol oynayan antibadilerin saf olarak elde edilmesi ve büyük miktarlarda üretilebilmesi uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir konudur. 1975 yılında geliştirdikleri hibridoma tekniği ile tek tip epitopa özgü monoklonal antibadilerin büyük miktarlarda üretilmesini sağlayan Milstein, Köhler ve Jerne, bu çalışmaları ile 1984 yılında Fizyoloji-Tıp alanında Nobel Ödülü almaya hak kazanmışlardır. Hibridoma teknolojisi ile; iki ayrı özelliğe sahip hücre tipi birleştirilerek, bu iki özelliği sergileyen hibrid hücre elde edilir. Sonsuz bölünme yeteneği ile hızla çoğalabilen kanser hücreleri ile istenilen antibadinin üretimini sağlayan hücreler birleştirilerek hücre kültür ortamında geliştirilirler ve böylece hem saf hem de büyük miktarlarda antibadi üretimi sağlanmış olur. Bu yöntem ile antibadi üretimi için, öncelikle fareler antijen ile immünize edilir ve bu antijene karşı antibadi üretimi sağlanır. Antibadi üretimini sağlayan fare B lenfosit hücreleri dalaktan izole edilir. Sonsuz bölünme yeteneği olan insan B lenfositleri kanserli kemik iliğinden elde edilir. Daha sonra bu iki hücre tipi birleştirilerek hibrid hücreler elde edilir. Hücre kültür ortamında bu hücrelerin bölünerek çoğalmaları sağlanır. In vitro ya da in vivo ortamda büyük ölçekte üretildikten sonra antibadiler saflaştırılır. Tek tip hibrid hücreden türetilen antibadiler monoklonal olarak adlandırılırken, farklı tipte birçok hücreden elde edilen antibadiler ise poliklonal olarak adlandırılırlar. Monoklonal antibadiler, tek bir antijen epitopunu tanıma özelliğine sahip iken, poliklonal antibadiler farklı antijen epitoplarını tanıma özelliğine sahiptirler.



Şekil 2.12. Antibadi molekülünün yapısal görünümü

Son on yıllık dönemde; tümör hücre yüzeylerinde yer alan çeşitli reseptörlere yönelik tanı amaçlı tümör hedeflendirmede ve kanserli hastalarının iyileştirilmesinde antibadi kullanımının etkinliği kabul görmüştür. Herseptin olarak da bilinen Trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, gemtuzumab ve ozogamisın antibadileri; çeşitli modifikasyonlar ile insanlarda kullanıma uygun hale getirilmiş "hümanize" antibadilere, setuksimab ve rituksimab antibadileri kimerik antibadilere ve ofatumumab ve panitumumab antibadileri ise tamamen insan sekanslarından türetilmiş antibadilere örnek olarak verilebilir. Bu antibadilerin çoğu, tümörün kendisi tarafından eksprese edilen antijenlere spesifik antibadilerdir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (ERBB1 olarak da bilinen EGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (ERBB2 ya da NEU olarak da bilinen HER2) gibi büyüme faktörü reseptörlerine hedeflendirilen ve radyoaktif izotoplar ya da kemoterapötik ilaçlar ile konjuge edilen antibadilerin genellikle hematolojik malinitelerde, konjuge edilmeyen antibadilerin ise lösemi dışı kanserlerin tedavisinde terapötik etkinlik sağladıkları görülmüştür.

Tümör antijenlerine hedeflendirilmiş antibadilerin yanısıra, tümör mikro çevresine hedeflendirilmiş antibadilerin de tümör büyümesini yavaşlattığı gözlenmiştir [327].

## **2.12. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü; insan, hayvan ya da böcek hücrelerinin bir veya birden fazla hücre tipinin dokudan alınarak yapay in vitro ortamda canlılığını sürdürmesinin sağlanması ya da çoğaltılması olarak tanımlanır [328]. Hücrelerin büyüme şekli ya da kökenleri hücre kültürlerinin tanımlanmalarını sağlar. Kökenlerine göre; primer hücre hatları, devamlı hücre hatları ve transforme hücre hatları olarak tanımlanırlar. Primer hücre hatları bitki ve hayvan dokularından izole edilen, bir kez bölündükten sonra sınırlı hücre hattı haline gelen hücrelerdir. Genellikle hücre sayısı az ve hücre yaşam süresi kısadır. Devamlı hücre hatları, bölünme hızları daha yüksek olan, sürekli kültüre edilme gerekliliği nedeni ile fenotipik kaymaların meydana geldiği ve dolayısıyla kültüre edildikten sonra farklı özellikler sergileme potansiyeli taşıyan hücrelerdir. Transforme hücreler ise, normal hücre yerine kanser hücre özelliklerinin çoğunu taşıyan dönüşmüş hücrelere verilen addır. Büyüme şekillerine göre ise, süspansiyon ve tek tabakalı hücreler olarak sınıflandırılırlar. Tek tabakalı hücreler; tek tabaka halinde yüzeye tutunarak büyüyen ankoraj-bağımlı yapışkan hücrelerdir. Epitel hücreleri ve fibroblast hücreler bu grup hücreler arasında sayılabilir. Süspansiyon hücreler ise, besiyerlerinde asılı halde durabilen ve büyümek için yüzeye tutunma gibi bir gereksinimleri olmayan hücrelerdir. Kan ve kemik iliği hücreleri bu grup hücreler arasında sayılabilir [328]. Hücre kültürü kullanım alanları arasında; monoklonal antikor, hormon, enzim ve aşı üretimi, kanser araştırmaları, sitogenetik analizler, sinyal iletim mekanizmaları, ilaç ve biyoteknolojik araştırmalar, kök hücre araştırmaları ve birçok hastalığın tanısı ve araştırılması sayılabilir.

Hücreler, mekanik ya da enzimatik yöntemler kullanılarak dokulardan ayrıştırılabilirler. Hücre kültürü çalışmaları ile; hücrelerin ve hücreler ile etkileşirebilecek moleküllerin fizyolojik ortam dışında, fizyolojik ortamın beraberinde getirdiği dış etkenlerden bağımsız bir şekilde yapay ortamda incelenebilme olanağı vardır. Bu nedenle, in vivo ortamdaki çeşitli etkileşimler nedeni ile gerçekleştirilmesi çok zor olan çalışmalar in vitro ortamda hücre kültürü çalışmaları ile gerçekleştirilebilir. Ortam şartları kontrol edilebilir. Etkisi araştırılacak olan moleküllerin hücre ile birebir etkileşimi sağlandığından, bu moleküllerin hücreye olan direk etkisini araştırmak ve saptamak mümkündür. Ancak, bu moleküllerin hücrelerin doğal ortamı olan in vivo ortamda, fizyolojik diğer etkenler ve sinyal mekanizmaları devreye girdiğinde oluşabilecek diğer etkileri gözlenemez. Ayrıca, hücrelerin kültür ortamında yaşamlarını sürdürebilmeleri ve çoğalabilmeleri için in vivo ortam koşullarının benzerinin sağlanması gerekir. Hücreler; 37 °C sıcaklık, %95 nem ortamı ve %5 CO<sub>2</sub> ortamı sağlayan inkübatörler içerisinde saklanırlar. Hücrelerin fizyolojik doğal ortamlarında olduğu gibi beslenmelerini sağlayacak hücre kültürü besiyeri ortamı, fetal sığır serumu, büyüme faktörleri gibi besin maddeleri ve enfeksiyondan korunmaları için genellikle gentamisin, penisilin, streptomisin gibi antibiyotikler gereklidir [329].

Hücre kültüründe steril ortamda çalışmak çok büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle tüm çalışmalar steril çalışma kabinleri içerisinde gerçekleştirilir. Çalışmaya başlamadan önce kabin içi mutlaka %70'lik alkol çözeltisi ile sterilize edilmelidir. Çalışmalar sona erdiğinde ise UV sterilizasyon ile ortam sterilize edilmelidir. Kültürdeki hücrelerin enfekte olmaları, çoğalma hızlarını hemen azaltarak ölüm oranlarını arttırır [330]. Hücrelerin enfekte olmalarının sebebi; bakteri, mantar, küf ya da başka hücre kaynaklı kontaminasyon olabilir. Hücreler kontamine olduklarında; genellikle besiyeri rengi değişimi ve bulutsu bir görünüm söz konusu olur. Mikroskopik incelemede ise, kültür hücrelerinden farklı organizmaların varlığı kendini kolayca belli eder. Şekil 2.13'de hücre

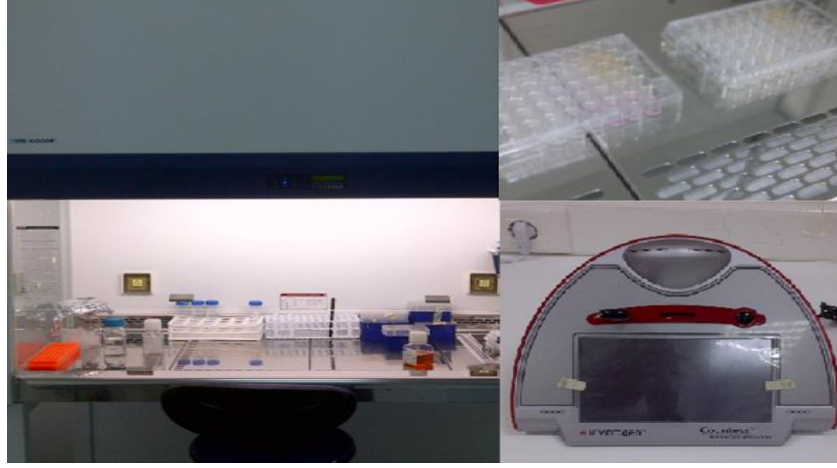
kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği steril kabin, otomatik hücre sayım cihazı ve 48 kuyucuklu plakalar görülmektedir.

Ökaryotik hücreler genellikle dimetil sülfoksit (DMSO) dondurucu ajanı ve serumlu besiyeri varlığında dondurularak  $-196^{\circ}\text{C}$ 'da sıvı azot tankları içerisinde ya da  $-80^{\circ}\text{C}$ 'da saklanırlar. Hücrelerin dondurulma ve çözülme basamaklarında dondurma çözeltisinde bulunan DMSO ile kısa süreli temas etmesine özen gösterilmelidir. DMSO, polar ve apolar bileşikleri çözen bir çözücüdür ve hücre kültürü besiyeri ortamı içerisine genellikle %10 oranında ilave edilir ve hücrelerin dondurulma aşamasında ölmeleri engellenmiş olur. DMSO, donma işleminin daha kontrollü ve yavaş olmasını sağlayarak buz formu oluşumunu yavaşlatır ve hücreler böylece korunmuş olur. Dondurulmuş hücreler genellikle kuru buz ile taşınırlar.

Hücrelerin canlılığı için hücreler taze besiyeri ile düzenli olarak beslenmelidir, kültür kabı içerisinde belli bir sıklık düzeyine ulaştıklarında da yani konfluent duruma ulaştıklarında pasajlanmalıdır. Çünkü bu durumda hücrelerin çoğalması ve beslenmesi için yeterli besiyeri ortamı kalmaz ve hücre proliferasyonu durur. Oluşan değişimlerin gözlenmesi ve gerekli işlemlerin gerçekleştirilme zamanının gelip gelmediğinin belirlenmesi ve herhangi bir kontaminasyon olup olmadığının saptanması için, hücrelerin sürekli ışık mikroskobu ile ve makroskopik olarak göz ile kontrol edilmeleri gerekir. Hücrelerin pasajlanması, çoğalma hızları ile yakından ilişkilidir.

Hücreler pasajlanmadan önce hücre sayımı yapılması gerekir. Hücre sayımı gerçekleştirmek için birçok yöntem mevcuttur. Yapışkan hücreler için genellikle tripan mavisi ile boyama yapıldıktan sonra, hemositometre denilen sayım kamaralarının toma, neubauer lamı gibi bölmeli lamları üzerine damlatıldıktan sonra mikroskop altında sayımı gerçekleştirilir. Kullanılan bu boya membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri koyu mavi renge boyar ve canlı hücreler tarafından metabolik

olarak dışarı atılır. Son yıllarda otomatik hücre sayım cihazları kullanıma sunulmuştur.



Şekil 2.13. Hücre kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği steril kabin, otomatik hücre sayım cihazı ve 48 kuyucuklu plakalar

Yüzeğe tutunma özelliği taşıyan yapışkan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilirken, kültür kabı yüzeyinden ayrılabilmesi için ekstraselüler matriksin bozunmasında rol oynayan tripsin enzimi ve yüzeğe bağlanma işleminde önemli rol oynayan kalsiyum iyonlarını bloke eden etilendiamintetraasetik asit (EDTA) kullanılır [328]. Kültür kaplarının polistirenden yapılmış yüzeyi amino grupları ile, plakalar ise pozitif yüklü poli-l-lizin ile kaplı olabilir.

Hücre kültürü tekniklerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, insan ve hayvan dokuları ile çalışmanın getirdiği potansiyel riskler nedeniyle birçok etik problem ile karşılaşmak mümkündür. Birçok ülkede biyomedikal araştırmalar alanına katı düzenlemeler getirilmiştir [328].

### **2.13. Apoptoz ve Nekroz**

Programlı fizyolojik hücre ölümünü ifade eden "apoptoz", ilk kez 1965 yılında Lockshin ve Williams tarafından tanımlanırken, hücre içerisinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler de 1975 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tariflenmiştir [331-332]. Hücrenin, kendi içerisinde gerçekleşen mekanizmaların tetiklemesinden çok, dışarıdan kaynaklanan olumsuz koşullar karşısında; hücre içi enzimlerin etkisiyle

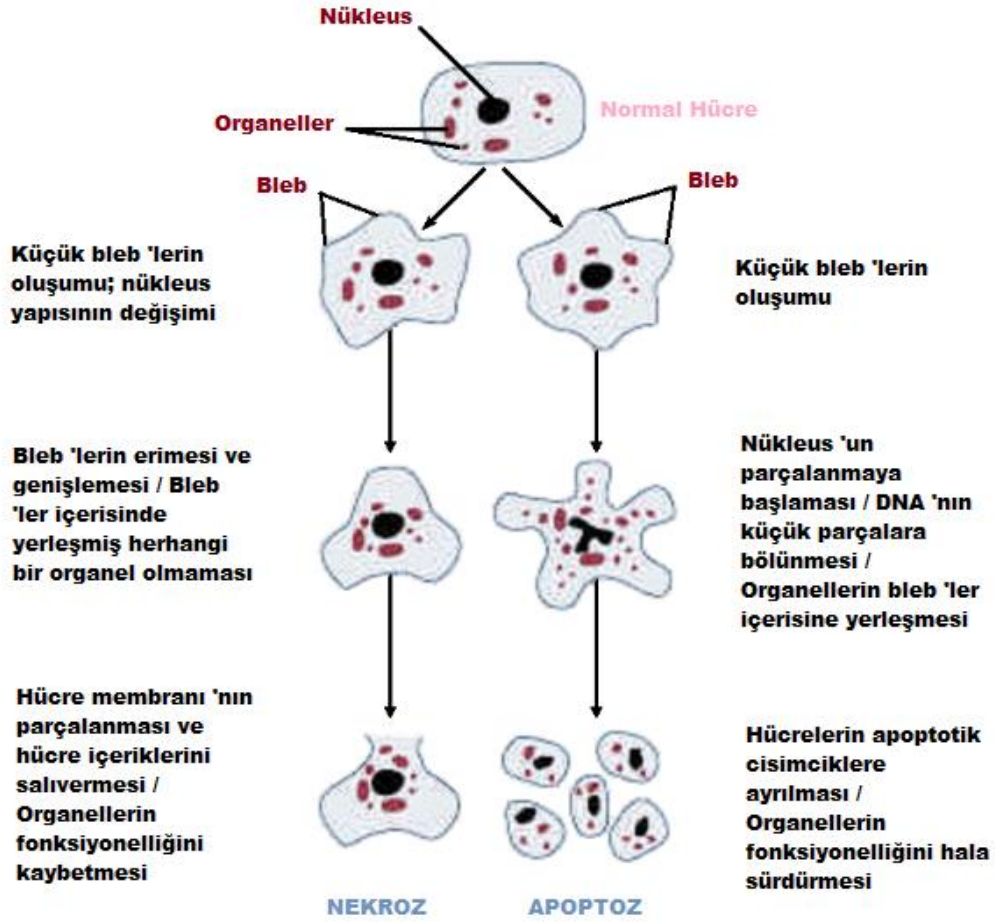
oluşan otoliz ya da lökositler aracılığıyla oluşan heteroliz ve hücre proteinlerinin denatürasyonu sonucu gerçekleşen hücre ölümü ise "nekroz" olarak tanımlanır. Nekrozda; eozinofil ve bazofil artışı, hücre içi protein denatürasyonu, vakuolizasyon, organellerin parçalanması gibi sitoplazmik ve karyoliz (piknotik çekirdeğin erimesi), piknozis (çekirdeğin büzüşmesi ve kromatin yoğunlaşması), karyoreksis (piknotik çekirdeğin parçalanması) gibi nükleus değişiklikleri ön planda iken apoptoz, inflamasyonun eşlik etmediği ve hücrenin tamamen cansız bir kitle haline dönüşmesi ile karakterize bir olgudur. Apoptozdaki hücre kalıntısı komşu hücreler tarafından fagosite edilirken, nekrozda immünojenik mekanizmaların tetiklediği bir fagositoz söz konusudur.

Menstruasyon ile endometriyal hücre yıkımı, gebeliğin ilk dönemlerinde parmaklar arasında var olan perdenin doğuma yakın evrede ortadan kalkması, DNA hasarına uğrayan hücreleri yıkımı, tümör hücrelerinin ve virüs ile enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılması insan vücudunda oluşan apoptoz örnekleridir.

Ölüm sinyalinin gelmesinden sonra morfolojik olarak kromatinde sıkışma ve hücrede parçalanmanın gerçekleşmesi sonrasında komşu hücre tarafından fagositoz apoptozun ana oluşum basamaklarıdır. Daha yapısal düzeyde incelendiğinde; kromozomal DNA'ların internükleozomal fragmanlara parçalanması, mitokondriyumun parçalanması, sitoplazmanın yoğunlaşp hücrenin hacmini kaybederek büzüşmesi apoptozun ana özellikleridir. Şekil 2.14'de apoptoz ve nekroz oluşumunda hücrelerin yapısal değişimi sunulmuştur [333].

Apoptozun tümör nekroz faktör (TNF)'den beta amiloid peptidlere kadar uzanan 30'dan fazla belirleyicisi bulunmaktadır. *Caenorhabditis elegans* isimli solucanda bulunan apoptozu kodlayan gen olan "Ced-3" geninin insandaki karşılığı olan "Bcl-2" geni apoptozda koruyucu rol oynayan önemli bir genetik belirleyicidir ve Bcl-2: Bcl-2, Bcl-xl ve Bcl-w olmak üzere 3 tipi vardır ve apoptozu önleyerek hücrenin sağkalımını gerçekleştirmeye çalışır.





Şekil 2.14. Apoptoz ve nekroz oluşumunda hücrelerin yapısal değişimi

Bunun dışında kalan önemli belirleyiciler ise şunlardır [334];

1. Hücre membranı yüzeyindeki reseptörler

- CD95 reseptörleri (Fas reseptörleri olarak da bilinir.)

- TNF-R

- Trail reseptörü (Ölüm reseptörü-4 ya da Apo-2)

2. Reseptörleri kontrol eden genler

- DcR-2, DR-3, DR-4, DR-5, DcR-3

3. Apoptozu baskılayan ve indükleyen genler

- Baskılayanlar: A1, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, Nr-13, Ced-9

- İndükleyenler: BAX, BAK, BAD, BIK, BID, Bcl-xs

3. Reseptör ligandları

- CD95L
- TNF-alfa
- Apo-2L

4. Hücre membranının alt yüzünde ve sitoplazmada bulunan inaktif proteinler

- FADD ("Fad-associated death domain")
- c-FLIP ("Cellular-FLICE inhibitory protein")
- Prokaspazlar ("zimojen")
- Perforin ve granzimler

5. Protein domeynleri

- Ölüm domeyni ("Death domain-DD")
- DED ("Death effector domain")
- CARD ("Caspase recruitment domain")
- BH domeynleri
- BIR domeynleri

Apoptozda rol oynayan kaspazlar, bir grup sistein proteaz enzimi olup sitoplazmada inaktif proenzimler olarak bulunurlar ve proteolitik parçalanmanın etkisiyle aktifleşirler. Aktive olan kaspazlar, işlevlerine göre 2 ana grupta incelenebilirler. Bu gruplardan birincisi apoptotik sinyali başlatmak için gerekli olan kaspazlarken, ikincisi proteinlerin geridönüşümsüz işlevlerinin değişiminde aspartik asit kalıntılarını koruyan düzenleyici proteinler ve çeşitli yapısal proteinlerin parçalanmasında rolü olan öldürücü kaspazlardır [335].

Tıpta yetersiz apoptozun neden olduğu hastalıklara örnek olarak otoimmün lenfoproliferatif hastalıklar ve kanser, apoptoz artışının neden olduğu hastalıklara ise nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi) ve iskemiler verilebilir.

Hücrede apoptozu belirlerken elektron mikroskopi, DNA Ladder, Tunnel Tekniği, FACS analizleri, MTT Yöntemi, Annexin yöntemi gibi direk yöntemler kullanılabilir ve immünohistokimyasal yöntemler, mRNA analizleri gibi yollarla da apoptoz ürünlerinin analizleri gerçekleştirilebilir [336].

#### **2.14. Hücre Proliferasyonu ve Hücre Canlılık Testleri**

Hücre proliferasyonu hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşir. Hücre bölünme döngüsü; hem hücre dışından gelen hücre dışı sinyallere hem de hücre döngüsü evreleri arasında gelişen olayları koordine eden hücre içi sinyallere bağlıdır. Hücre döngüsünün interfaz ve mitotik olmak üzere iki ana evresi vardır. İnterfaz; mitotik aktiviteler arasında kalan evre yani mitoz için gerekli hazırlıkların yapıldığı evredir. Mitotik evre ise, ana hücrelerin genetik olarak birbirinin aynısı olan iki yavru hücreye bölünmesi evresidir, yani bölünmenin gerçekleştiği evredir. İnterfazın üç farklı, birbirini takip eden evresi mevcuttur. Bu evreler; G1, S ve G2 evreleridir. G1 evresinde hücreler bir nevi çevre kontrolü yaparlar ve "monitör" gibi davranırlar, gerekli sinyaller ulaştığında büyümeyi indüklemek için RNA ve protein sentezlerler. Eğer G1 evresinde uygun büyüme faktörleri yoksa, hücre döngüsü kısıtlama noktası adı verilen bir noktada durur ve bu bekleme noktasında duran hücreler daha sonra G<sub>0</sub> adı verilen sessiz bir döneme girerek bir süre çoğalmadan kalabilirler. G<sub>0</sub> noktasındaki hücreler büyümeyi durdurmuş ve protein sentezini yavaşlatmış olsalar da metabolik olarak aktiftirler. Hücre dışı sinyaller ve büyüme faktörleri tarafından çoğalmak üzere uyarılmadıkça bu evrede kalmaya devam ederler. Tüm koşullar hazır olduğunda ise hücreler hücre döngüsünün S evresine geçerler ve DNA sentezi ve kromozomal DNA replikasyonu gerçekleştirirler. Son olarak da G2 evresinde hücreler büyümeye devam ederler ve mitoz için hazırlanırlar [337-338].

Bölünme döngüsüne giren hücrelerde metabolik aktivitede artış görülür. Bu nedenle, hücre proliferasyonunun belirlenmesinde kullanılan

yöntemlerden bir kısmı metabolik aktivite ölçüm temeline dayanır [339].

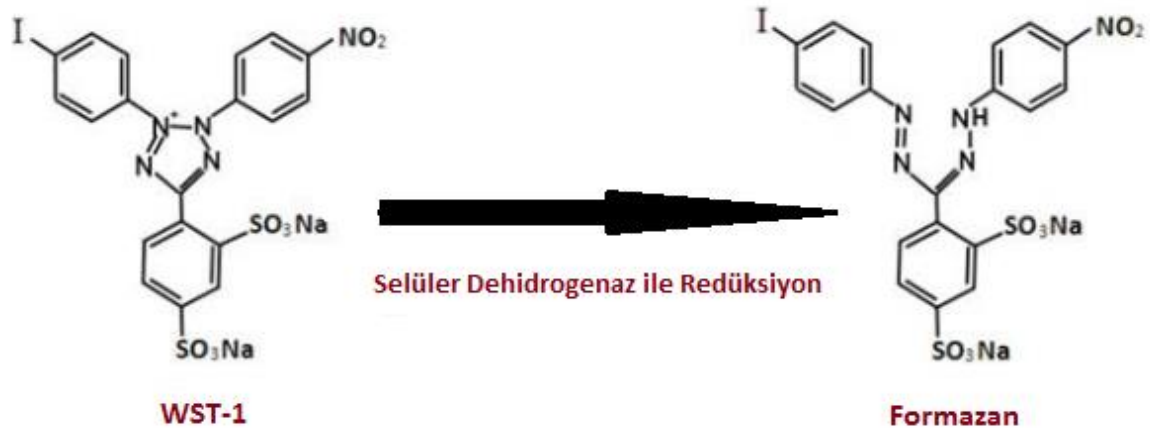
Canlı ökaryotik hücre sayısını belirlemek için çeşitli testler mevcuttur. Bu testlerden bazıları; tetrazolyum redüksiyonu, resazurin redüksiyonu, proteaz belirteçleri ("marker") ve adenozin trifosfat (ATP) miktarının ölçülmesi temeline dayanan testlerdir. Bu testler hücre proliferasyonunun bir sonucu olarak, bileşiklerin sitotoksik etkilerini ve internal kontrol olarak canlı hücre sayılarını belirlerler.

Tetrazolyum redüksiyonu, resazurin redüksiyonu ve proteaz aktivite testleri; canlı hücre belirteci olarak genel metabolizma ya da enzimatik aktivite ölçümü yapan testlerdir. Tüm bu testler; substratı, bir plaka okuyucu tarafından belirlenebilecek renkli ya da floresan bir ürüne dönüştürecek şekilde, bir reaktif madde ile canlı hücre popülasyonlarının inkübe edilmesini gerektirir. Standart hücre kültür ortamında, substrat ile canlı hücrelerin inkübe edilmesi ile birlikte, mevcut canlı hücre sayısı ile orantılı bir sinyal oluşacaktır. Hücreler öldüğünde, substratı ürüne dönüştürme kabiliyetleri hızla ortadan kalkacaktır. Bu farklılık, kullanılan birçok hücre canlılık testi için ana prensibi oluşturmaktadır.

#### **2.14.1. Tetrazolyum Redüksiyon Testleri**

Canlı hücreleri belirlemek için çok çeşitli tetrazolyum bileşikleri mevcuttur. En yaygın kullanılan bileşikler ise, (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-(5-tetrazolio)-1,3-benzen-disülfonat (WST1), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT) ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum tuzu (MTS)'dir. Bu bileşikler iki temel kategoride incelenirler; birincisi; pozitif yüklü olan ve canlı ökaryotik hücrelere kolaylıkla ve hızlıca penetre olabilen MTT, ikincisi de; negatif yüklü olan ve ökaryotik hücrelere hızlıca penetre olmayan MTS, XTT ve WST-1'dir. MTS, XTT ve WST-1; tetrazolyumu indirgeyip renkli formazan ürününe dönüştürecek olan ve sitoplazmadan ya da plazma membranından

elektronları transfer eden elektron akseptörü ara ürün ile birlikte kullanılır [340]. Şekil 2.15'de WST-1 tetrazolyum tuzunun formazan boyasına dönüşüm reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.15. WST-1 tetrazolyum tuzunun formazan boyasına dönüşüm reaksiyonu

MTT redüksiyon testi; 96-plaka formatında yüksek verimli görüntüleme için geliştirilmiş ilk homojen hücre canlılık testidir. MTT substratı fizyolojik olarak dengelenmiş çözelti içerisinde hazırlanır ve kültürdeki hücreler üzerine genellikle son konsantrasyon 0,2-0,5 mg/mL olacak şekilde ilave edilir ve daha sonra 1 ila 4 saat inkübasyona bırakılır. Formazan miktarı (canlı hücre sayısı ile direk olarak orantılı olduğu kabul edilen); 570 nm'deki absorbands değişimleri kaydedilerek plaka-okuyucu spektrofotometre ile ölçülür. 630 nm referans dalga boyu da bazı durumlarda kullanılmaktadır.

Canlı hücreler aktif metabolizmaları ile MTT'yi 570 nm maksimum absorbands ile mor renkli formazan ürününe çevirirler. Hücreler öldükten sonra, MTT'yi formazan ürününe çeviremezler ve dolayısıyla sadece canlı hücreler için bir belirteç görevi gören renk değişimi gözlenmez. MTT redüksiyonu ile formazan oluşumunun tam selüler mekanizması çok iyi anlaşılmış olmamakla birlikte, NADH ya da benzer indirgeyici moleküllerin MTT'ye elektron transferi gerçekleştirildikleri düşünülmektedir [341].

MTT redüksiyonunun hücre proliferasyonunu değil, canlı hücre metabolizmasını yansıtan bir belirteç olduğu unutulmamalıdır [342].

Son geliştirilen tetrazolyum reaktifleri; hücre kültürü besiyeri ortamı içerisinde direk çözünen formazan ürünleri oluşturabilen canlı hücreler tarafından indirgenebilir. MTS, XTT ve WST-1 bu kategorideki testlerdir.

WST-1 testinde; tetrazolyum tuzu, yalnızca canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondriyal solunum zincirinde yer alan süksinat-tetrazolyum redüktaz tarafından suda çözünebilen formazan boyasına dönüştürülmektedir. Örnekteki mitokondriyal dehidrogenazın total aktivitesi, canlı hücrelerin artmasıyla yükselmektedir. Enzim aktivitesinin artması ile hücre kültürü besiyeri ortamındaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile direk orantılı olarak formazan üretimi ve miktarı da artmaktadır. WST-1 testi ile canlı hücrelerde sarı renk oluşumu gözlenmekte, ölü hücrelerde ise renk değişimi gözlenmemektedir.

#### **2.14.2. Resazurin Redüksiyon Testi**

Resazurin; tetrazolyum bileşiklerine benzer protokoller ile, canlı hücre sayısını görüntülemeye kullanılan, hücre geçirgen bir redoks indikatörüdür [343]. Fizyolojik tamponlar içerisinde çözünebilir (mavi renkli çözelti oluşur) ve kültür içerisindeki hücrelere direk olarak ilave edilebilir. Canlı hücreler aktif metabolizmaları ile resazurini, pembe renkli ve floresan olan rezorufin ürününe indirgerler.

Selüler resazurin indirgenme reaksiyonunun oluşabilmesi için ara elektron akseptörü ilave edilmesi gerekmez ancak ilave edilirse sinyal oluşumunu hızlandırabilir. Üretilen rezorufin miktarı; 560 nm eksitasyon/590 nm emisyon filtre donanımlı mikropilaka florometresi kullanılarak ölçülen canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Rezorufin miktarı absorbans değişimi ile de ölçülebilir ancak absorbans değişiminin ölçülmesi, floresans ölçümünden çok daha az hassas bir yöntemdir ve bu nedenle bu ürün için pek tercih edilmez.

Bu testin en büyük avantajı; nispeten daha ucuz bir yöntem olması ve tetrazolyum redüksiyon testine göre biraz daha fazla hassas sonuçlar elde edilmesini sağlamasıdır. Dezavantajı ise; test edilen bileşiklerden kaynaklanabilecek floresan girişim olasılığı ve hücreler üzerinde toksik etki yaratma riskidir.

### **2.14.3. Proteaz Belirteç Testi**

Yaşayan hücrelerde korunan proteaz aktivitesi ölçümünün, hücre canlılığının bir belirteci olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir. Son yıllarda; canlı hücrelere özgü proteaz aktivitesini selektif olarak saptayabilen, hücre zarını geçebilen floresan proteaz substratı (glisilfenilalanil-aminoflorokumarin; GF-AFC) geliştirilmiştir [344]. Sitoplazmik aminopeptidaz aktivitesi; AFC salımı için fenilalanin ve glisin amino asitlerini ortamdan uzaklaştırırken, GF-AFC substratı canlı hücrelere penetre olabilir ve canlı hücre sayısı ile orantılı olacak şekilde floresan bir sinyal açığa çıkar. Hücreler ölür ölmez, proteaz aktivitesi hızlıca ortadan kalkar ve bu nedenle proteaz aktivitesi canlı hücre popülasyonunun selektif bir belirtecidir. Bu yöntemin genel olarak avantajı; yeterli sinyalin alınabilmesi için gereken inkübasyon süresinin (30 dakika ila 1 saat), tetrazolyum testleri ile karşılaştırıldığında (1 ila 4 saat) çok daha kısa olmasıdır.

### **2.14.4. ATP Miktar Ölçüm Testi**

Yüksek verimli görüntüleme uygulamalarında canlı hücre sayısının belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntem; ateş böceği lusiferazı (biyoluminesans amaçlı kullanılan oksidatif enzim sınıfı için kullanılan jenerik isim) kullanılarak yapılan ATP ölçümüdür. ATP'nin, geçerli bir canlı hücre belirteci olduğu bilinmektedir. Hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğunda, ATP sentezleme kabiliyetlerini de kaybederler ve endojen ATPaz'lar kalan ATP'leri de sitoplazmadan hızlıca boşaltırlar.

ATP algılayıcı reaktif; hücreleri parçalayan bir deterjan, parçalanan hücrelerden salınan ATP'yi dengeleyen ATPaz inhibitörleri, substrat

olarak lusiferaz ve ışık fotonları üreten reaksiyonu katalizleyen lusiferaz formu içerir.

ATP testi; hücre canlılığının tespit edilmesinde kullanılan en hızlı ve en hassas yöntemdir. Son geliştirilen ticari kitler ile birlikte luminesan sinyal, reaktifin uygulanmasından 10 dakika sonra denge konumuna ulaşır ve ışıma yapar. Böylece, canlı hücre popülasyonunun, substratı renkli bileşiğe dönüştürmesi için uzun bir inkübasyon basamağına ihtiyaç olmaz [340].

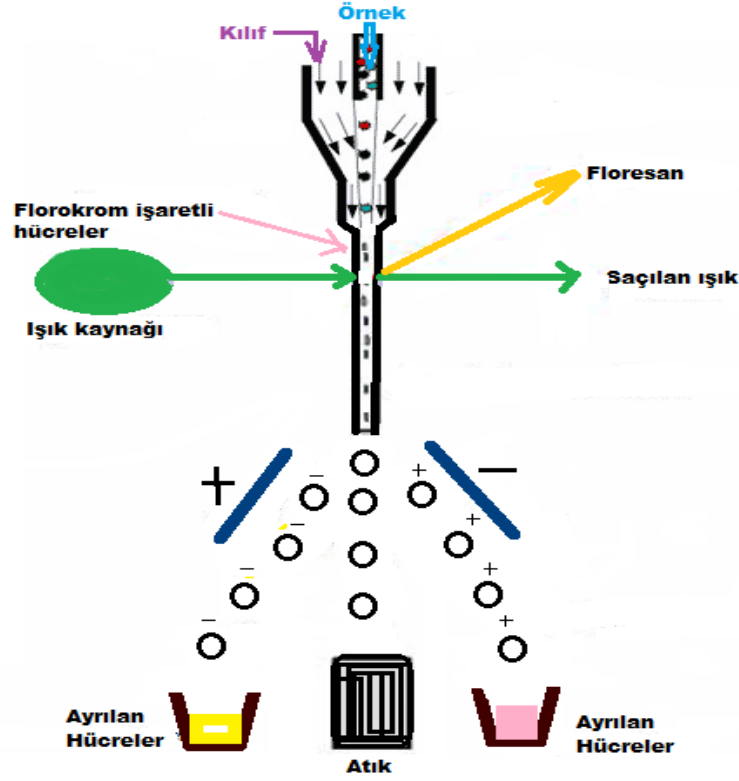
### **2.15. Akım Sitometrisi**

Akım sitometrisi; canlı hücrelerin ya da diğer biyolojik partiküllerin, akmakta olan bir sıvı içerisinde geçerken fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirleyen bir yöntemdir. Her bir partikül ya da hücre, bir veya birden fazla lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bölümden geçer ve sistem yansıtılan ışığın derecesi ve yönünün ölçümünü yaparak, hücre ya da partikülün boyutu, şekli ve yapısı hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Akım Sitometrisi; hücre ya da partikül yüzeyindeki kimyasalların varlığına çok bağlıdır. Hücreler çok küçük oldukları için güçlü floresan sinyal veren molekülleri bulunmaz. Bu nedenle florokromlar olarak bilinen floresan boyalar ile etiketlenebilirler [345]. Partiküller bir ya da daha fazla floresan boya ile işaretlenmiş ise; ışık kaynağı, her bir partikül hakkında metabolik aktivite, DNA içeriği ve spesifik yüzey varlığı ve intraselüler belirteçler gibi ek biyolojik bilgi sağlayan bu boyaları uyarır. Optik ve elektronik öğeler; floresan emisyonu ve ışık saçılımlarını filtre ve dedektörlerde toplar, dijital veriler haline dönüştürür ve analiz edilmeleri için bilgisayar sistemine gönderir.

Akım Sitometrisinde kullanılan üç ana dedektör vardır. Her bir dedektör ve filtre farklı bilgiler edinilmesini sağlar. Bunlardan ilki; "ileri saçılım kanal dedektörü (FSC)"dür ve hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. İkincisi; "yana saçılım kanal dedektörü (SSC)"dür ve partikül granül yapısını gösterir. Üçüncüsü ise; floresan dedektördür ve florokromlar ile işaretlenmiş yüzeyler hakkında bilgi verir [346]. Yüksek performanslı



akım sitometrileri saniyede 70.000 hücre sayımı gerçekleştirebilme potansiyeline sahiptir [347]. Şekil 2.16'da akım sitometrisinin genel çalışma prensibi şematik olarak sunulmuştur [348].



Şekil 2.16. Akım Sitometrisi genel çalışma prensibi

Akım Sitometrisinin en önemli özelliği, her bir canlı hücrede birden fazla parametreyi çok hızlı ve kantitatif olarak ölçebilmesi ve daha sonra bu hücreleri gruplandırarak izole edebilmesidir.

Akım Sitometrisi tıp alanında; otoimmün, hematolojik, immün yetmezlik gibi birçok hastalığın tanısında kullanılır. En çok lösemi, myeloma ve lenfoma hastalarında kullanılır; çünkü sağlıklı bir insanda kan profili belli ve nettir. Bu hastalıkları taşıyan kişilerde ise kan profili değişkenlik gösterir ve tanı akım sitometrisi ile kolayca konur. Ayrıca kök hücre çalışmalarında da tedavide yönlendirici rol oynar [346].

Akım Sitometrisi özellikle son yıllarda, in vitro ortamda hedef proteine bağlanan moleküllerin saptanmasında ya da hücre-bazlı deneylerde özel bir davranış sergileyen moleküllerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır [349].

## 2.16. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

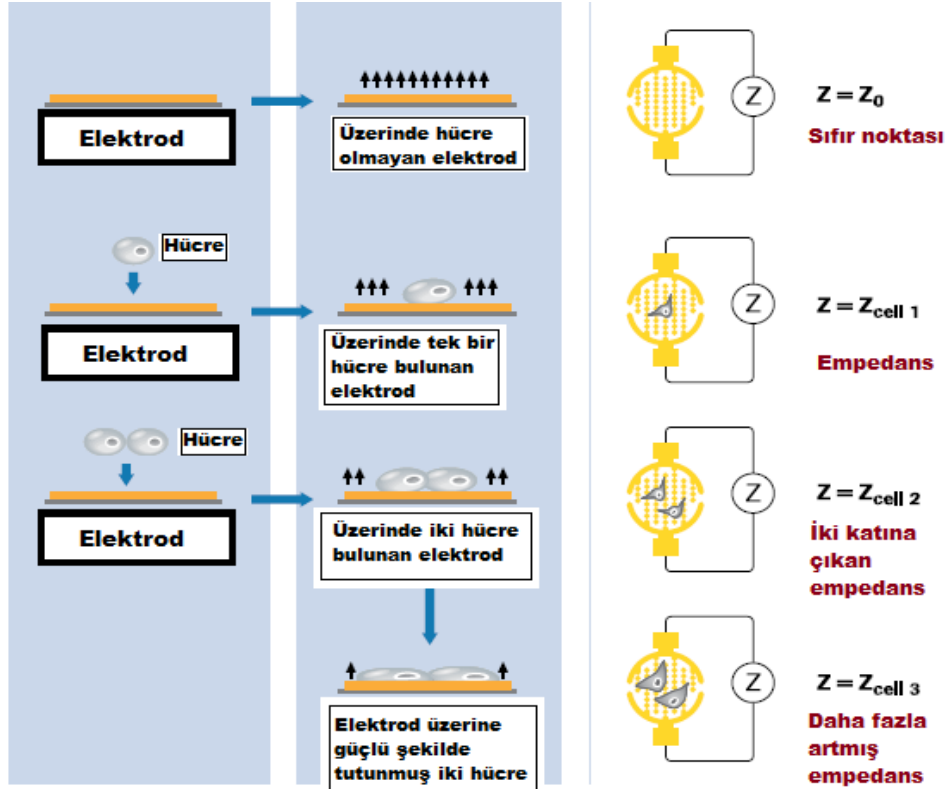
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA); hücre-bazlı deneyler için tasarlanmış mikroelektronik bir biyosensör sistemidir. Sistem dinamik, gerçek-zamanlı, etiketleme gerektirmeyen hücre analizler gerçekleştirir.

RTCA; kendine özgü özel hücre kültürü plakalarının en alt kısmına yerleştirilmiş altın mikroelektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçümü yapabilen ve herhangi bir etiketleme ya da işaretleme gereksizdir. Selüler olayları gerçek-zamanlı olarak görüntüleyebilen bir cihazdır. Empedans ölçümleri; hücrelerin sayısı, adezyon, canlılıkları ve morfolojileri gibi biyolojik durumları hakkında kantitatif bilgi edinilmesini sağlar. Sistem; hem kısa süreli (yaklaşık 30 dakika), hem uzun süreli (2-3 gün) selüler etkilerin incelenmesini, hem de deney süresince hücrelerin durumlarının görüntülenmesini mümkün kılar.

RTCA sistemi; tabanının yüzde seksen oranındaki bölümü özel altın mikroelektrotlar ile kaplı 96 kuyucuklu plaka sistemi ile birlikte standard hücre kültürü inkübatörü içerisine yerleştirilerek, deney süresince hücreler için uygun sıcaklık, nem, karbondioksit kontrollü çevresel ortamı sağlar. Kontrol ünitesi, analizör tarafından ölçümü gerçekleştirilen veri sinyallerini alarak, RTCA yazılım sistemi ile görüntülenmelerini sağlar.

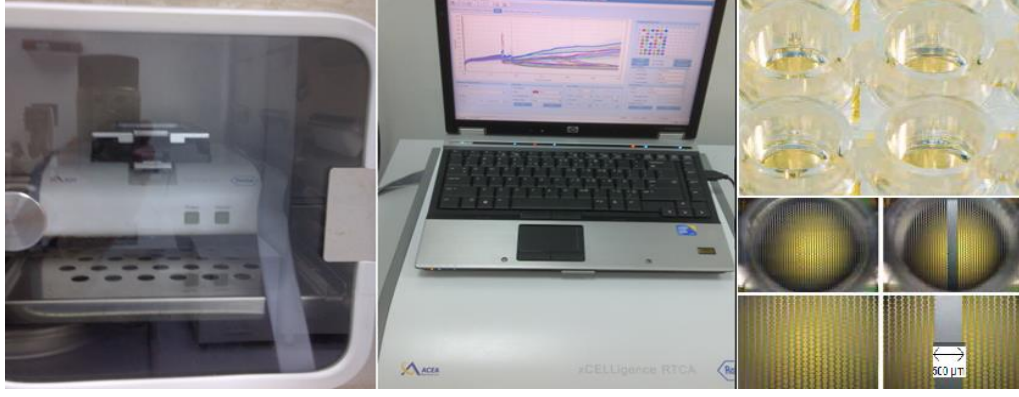
96 kuyucuklu plakaların tabanına yerleştirilmiş altın elektrotların en üst kısmında bulunan hücrelerin varlığı; elektrot/çözelti arayüzündeki lokal iyonik çevreye etki eder. Elektrotların yüzeyine ne kadar çok hücre tutunursa, elektrot empedansındaki artış o oranda büyür. Ayrıca; hücrelerin elektrotlar ile etkileşimine bağlı olarak empedans kalitesi de değişiklik gösterir. Örneğin; hücre adezyonundaki artış ve yayılım, elektrot empedansında daha büyük değişim olmasını sağlar. Bu nedenle; hücre indeks (CI) değeri olarak gösterilen elektrot empedansı; hücre-bazlı birçok deneyde hücre canlılığının, sayısının, morfolojisinin ve adezyon derecesinin görüntülenmesinde kullanılabilir. Şekil 2.17'de

RTCA sistemi plaka tabanında yer alan mikroelektrod sistemi şematik olarak sunulmuştur [350].



Şekil 2.17. RTCA sistemi plakaları tabanında yer alan mikroelektrod sistemi

Hücre indeksi; hücrelerin deney süresi boyunca hangi durumda olduklarını (büyüme, yayılma, şekil değiştirme, ölme) saptamak için oldukça iyi bir belirteçdir. Kuyucuk ortamında hücre yok ise ya da hücreler elektrotlar üzerine iyi yapışmamışsa, CI değeri sıfırdır. Aynı fizyolojik koşullarda, elektrotlar üzerine daha çok hücre yapışmışsa, CI değeri daha büyük bir değer olur. Bu nedenle CI, kuyucuk içerisindeki hücre sayısının kantitatif bir ölçümüdür. Ayrıca; hücre morfolojisi, yapışması ya da canlılığı gibi, hücre statüsündeki herhangi bir değişim CI değerinin de değişmesini sağlayacaktır. Şekil 2.18'de RTCA sunulmuştur [350].



Şekil 2.18. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

RTCA; yaşam bilimlerinde, ilaç geliştirme, toksikoloji, medikal mikrobiyoloji, viroloji ve kanser gibi pek çok araştırma alanında kullanılabilen bir sistemdir [350].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan Doktora Tez Çalışması 6 Ana Bölümden (AB) oluşmaktadır. Bu ana bölümler aşağıda tanımlanmış ve gerekli açıklamalar verilmiştir.

#### **AB1. Nanosorbentler**

AB1 üç adımda gerçekleştirilmiştir: Birinci adım; SPION'ların sentezini, ikinci adım bu partiküllerin altın tabaka ile kaplanmasını ve üçüncü adım ise altın kaplı olan ve altın kaplı olmayan nanopartiküllerin karakterizasyon işlemlerini kapsamaktadır.

SPION'lar, ferrik ( $Fe^{+3}$ ) ve ferröz ( $Fe^{+2}$ ) klorürlerin sulu ortamda azot atmosferi altında "ikili çöktürme" yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. İkinci adımda manyetik nanopartiküller altın tabakası ile kaplanmıştır.

Son olarak; hazırlanan manyetik ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen SPION'ların konsantrasyonu ICP-MS Cihazı ile, kimyasal yapıları FT-IR Spektroskopi ile, şekil ve boyutları TEM ile, hidrodinamik çapları ve polidispersite indeksleri Zeta Sizer Ölçüm Cihazı ile, yüzey yükleri Zeta Potansiyel Ölçüm Cihazı ile, manyetik özellikleri VSM ve ESR cihazları ile ve son olarak altın ile kaplanıp kaplanmadıkları UV-VIS Spektrofotometre ile ölçülmüş ve yorumlanmıştır.

#### **AB2. Antibadi ve Aptamerlerin İmmobilizasyonu**

Tümör hücrelere hedeflemeyi sağlayacak aptamer ve monoklonal antibadiler altın kaplı nanopartiküllere immobilize edilerek nanosorbentler üretilmiştir. Sunulan tez kapsamında, hedeflenecek tümör hücresi olarak MDA MB 231 insan meme kanseri hücre hattı seçilmiştir. MDA MB 231 meme kanseri hücre yüzeylerinde epidermal büyüme faktörü ve transforme edici büyüme faktörü reseptörlerinin eksprese olduğu bilinmektedir. Bu amaçla, hedefleme bölgesi olarak MDA MB 231 meme kanseri hücre yüzeylerindeki epidermal büyüme faktörü reseptörleri seçilmiştir. Seçilen tümör hücresine özgün antibadi ve aptamerler satın alma yoluyla temin edilmiştir. Modifiye aptamerlerin

altın yüzeylere "kendiliğinden yerleşmesini" (self-assembling") sağlamak üzere, bağlanacakları uçlarında bir uzatma kolu (6 karbonlu alifatik zincir) ve altına bağlanmayı sağlayacak -SH grubu taşıyacak şekilde sentez edilmiş ve daha sonra SPION yüzeyine immobilize edilmişlerdir. Prob antibadi molekülünün ise, hem yüzey konsantrasyonunu optimize etmek (sterik engelleri ortadan kaldırmak amacı ile) hem de yüzeye doğru yönlendirilmiş şekilde yerleşmelerini sağlamak için (hedefle etkileşmelerini sağlamak amacı ile) SH-PEG-COOH gibi yardımcı moleküller kullanılmıştır. Bu moleküllerin önce -SH gruplarıyla altın yüzeylere tek tabaka oluşturacak şekilde yerleşmeleri, daha sonra diğer uçlarındaki -COOH grupları nedeniyle, antibadilerin -NH<sub>3</sub> grupları ile etkileşerek peptid bağı oluşturmaları ve böylelikle antibadilerin nanopartiküller üzerine immobilize olmaları öngörülmüştür. Hazırlanan altın kaplı manyetik yüklü, yüzeylerinde kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAMs) oluşturulmuş nanopartiküllerin Zeta Potansiyel ile yüzey yükleri tayin edilmiştir. Boyut ve UV-vis absorpsiyon spektrum ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

AB2 kapsamında; MDA MB 231 insan meme kanseri hedef tümör hücrelerini özgün olarak tanıma özelliğine sahip olarak satın alınma yolu ile temin edilmiş olan antibadilerin ve aptamerlerin, altın kaplı nanopartiküllerin yüzeylerinde floresan mikroskop ile izlenmesini sağlamak amacı ile, ışımaya yapan floresan etiketler (FITC vb.) takılmıştır.

### **AB3. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite Çalışmaları**

Hedef hücre hattı olarak MDA MB 231 insan meme kanseri hücre hattı ve karşılaştırma sağlamak için bir fibroblast hücre hattı (Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücreleri) kullanılmıştır.

MDA MB 231 hücreleri kültür ortamında çoğaltılmış ve daha sonra üç ayrı konsantrasyonda nanopartiküller ile etkileştirilen hücrelerin sitotoksisiteleri belirlenmiştir.

Sitotoksosite çalışmaları WST-1 testi ile gerçekleştirilmiştir. MDA MB 231

meme kanseri hücrelerinin hücre kültür kaplarına ekimi gerçekleştirilmiş ve farklı miktarlarda yüzeyinde herhangi bir modifikasyon yapılmamış SPION, altın kaplı yüzeyinde SAMs oluşturulmuş SPION, yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION ve yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'lar hücrelere ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sadece hücre kültürü besiyeri ortamı kullanılmıştır. Hücre canlılığının tespiti için plakaların absorbans yoğunluk değerleri ELISA plaka okuyucuda 440 nm'de okunmuştur. Canlı hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmemiştir.

#### **AB4. Hedeflemenin Akım Sitometri ve Floresan Mikroskop İle Gösterilmesi**

MDA MB 231 hücrelerinin 6 kuyucuklu plakalar içerisine ekimi yapıp bir gün süre ile hücreler çoğaltıldıktan sonra, nanopartiküllere floresan işaretlenmiş aptamer ve antibadi immobilizasyonu gerçekleştirilmiş; yalnız SPION, yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION ve yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'lar olarak farklı oranlarda MDA MB 231 hücreleri ile etkileştirilmiştir. Akım sitometri analizleri için; hücre yüzeyindeki EGFR reseptörlerine, yüzeyine FITC-işaretli anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların bağlandığı hücrelerin sayımı yapılmıştır.

#### **AB5. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi**

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan nanopartiküller, farklı oranlarda MDA MB 231 hücreleri ile etkileştirildikten sonra floresan boyama yapılmıştır. Bu şekilde apoptoz ve nekroz değerleri ve nekroz ve apoptotik indeksler belirlenmiştir. Boyama esnasında sadece DNA'nın boyanması için, ribonükleaz A hücreler ile muamele edilerek sitoplazmik RNA yok edilmektedir. Hoechst boyama hücrelerin çekirdeklerini maviye boyamaktadır. Bütün hücreleri boyamasına rağmen apoptotik hücreler daha parlak ve çekirdek homojenliği kaybolmuş ve parçalanmış olarak gözükürler. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler normal hücrelerden ayrılırlar. İkili boyamada kullanılan diğer boya Propidium Iodid'tir (PI).

DNA'yı kırmızıya boyayarak nekrozu göstermektedir. PI normal hücrelerin zarlarından geçmediği için, sadece hücre zarı hasar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçerek nekroza uğramış hücreleri göstermektedir. Floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptotik hücrelerin ve İ3 (480-520nm dalga boyunda) filtresi kullanılarak nekrotik hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

## **AB6. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi**

10000/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapılan MDA MB 231 hücrelerinin bir gün süre ile RTCA sistemine bağlı inkübatör proliferasyonu takip edilmiştir. 24 saatin sonunda farklı miktarlarda yüzeyinde herhangi bir modifikasyon yapılmamış SPION, altın kaplı yüzeyinde SAMs oluşturulmuş SPION, yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION ve yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'lar hücreler ile etkileştirilmiş ve 102 saat süre ile gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alınmış ve gerçek zamanlı olarak hücre proliferasyonu belirlenmiştir.

### **3.1. Kullanılan Maddeler**

Sunulan Doktora Tez Çalışması kapsamında kullanılan; anti-EGFR monoklonal antibadi Creative Diagnostics (ABD) Firmasından, anti-EGFR aptamer Metis Biyoteknoloji (Türkiye) Firmasından ve fosfolipid-PEG-COOH Avanti Polar Lipids (ABD) Firmasından satın alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasalların tümü, Sigma-Aldrich Firmasından temin edilmiştir.

### **3.2. SPION Sentez Çalışmaları**

Sunulan tez kapsamında SPION sentezi; ferrik ( $Fe^{+3}$ ) ve ferröz ( $Fe^{+2}$ ) klorürlerin sulu ortamda "ikili çöktürme" yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ferrik ve ferröz klorürlerin sulu ortamda stokiyometrik oranlarda karışımı küresel magnetit partiküllerin oluşumuna olanak sağlamaktadır. Oluşan nanopartiküllerin boyut ve şekilleri;



- a) pH
- b) İyonik güç
- c) Sıcaklık
- d) Karıştırma Hızı
- e) Kullanılan tuzların doğası (perkloratlar, klorürler, sülfatlar ve nitratlar)
- f) Fe(II)/Fe(III) konsantrasyon oranı gibi parametrelerin kontrol edilmesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen manyetik nanopartiküllerin oluşumu Eşitlik 2.9'da sunulan reaksiyon ile belirtilmiştir. Bu reaksiyon için optimum koşullar:

1. pH: 8 ila 11
2.  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  oranı: 2:1
3. Karıştırma Hızı: 750 rpm
4. Sıcaklık: Oda sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

Sentezlenen nanopartiküller, Hofmann ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak sentezlenmiştir [351-352]. Bu amaçla; 3.458 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (0.086 M) ve 1.272 g  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  (0.043 M) karışımı 148 ml distile suda çözelti haline getirilmiştir. Daha sonra hızlı karıştırma ortamı altında 30 ml amonyak ilave edilerek çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan siyah çökelti 3 kez ultra saf su ile yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra güçlü bir mıknatıs (Neodymium Magnet) yardımıyla, fraksiyonlarına ayrılan çözelti içerisinde dibe çöken pellet kısmı manyetik ayırma işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmış ve 12 mL 0.5 M nitrik asit ve 8 mL 0.21 M  $Fe(NO_3)_3$  karışımı içerisinde 1 saat süresince geri soğutucu takılarak ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem esnasında, başlangıçtaki siyah çökeltinin kahverengi renge dönüştüğü ve nitrik oksit oluşumu gözlenmiştir. Oksidasyona (okside

olmaya) bir hayli yatkın olan magnetit ( $Fe_3O_4$ ), ortamdaki oksijen varlığında maghemite ( $\gamma Fe_2O_3$ ) dönüşür ve bu dönüşüm Eşitlik 2.10'da belirtilmiştir. Sistemin oda sıcaklığına soğuması sağlandıktan sonra, ortamdaki sıvı kısım uzaklaştırılmış ve 100 mL ultra saf su ilave edilmiştir. Daha sonra kahverengi çözelti 3 gün süresince 0.01 M nitrik asit içerisinde diyaliz işlemine tabi tutulmuş ve 3. günün sonunda diyaliz işlemi durdurulmuştur. Son olarak; elde edilen örnek 10 dakika süresince 10000 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve böylece manyetik demir oksit küresel nanopartiküller elde edilmiştir. Sentezlenen SPION'lar ileriki aşamalarda kullanılmak üzere  $+4\text{ }^\circ C$ 'da saklanmışlardır.

### **3.3. SPION'ların Altın Tabaka ile Kaplanması**

Sentezlenen SPION'ların, manyetik çekirdek yapısını korumak ve aynı zamanda manyetik özelliğini kaybetmeyecek şekilde çekirdek yapı etrafında bir dış kabuk oluşturmak amacıyla altın tabaka ile kaplanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Altının manyetik çekirdek yapı etrafında kabuk malzemesi olarak seçilmesinde en önemli etkenler biyoyumlu olması, toksisitesinin düşük olması, kimyasal yönden kararlı olması ve yüzey plazmon özelliğinden dolayı UV-görünür bölgede absorpsiyon bandı vermesi olarak sayılabilir.

Demirin altın ile direk olarak kaplanmasının zor olması ve demir oksit çekirdek yapının korunması amacıyla sentezlenen SPION'lar öncelikle oleik asit ile kaplanmıştır. Oleik asit, uzun bir hidrokarbon zinciri ve bu zincirin uç kısmında da karboksil grubu bulunan organik bir moleküldür. Oleik asit, polar özellik sergileyen karboksil uç grubu sayesinde nanopartikül yüzeyine tutunarak nanopartikülün yüzeyini kaplar ve üzerinde bir kabuk yapısı oluşturur. Bu sayede hem nanopartiküllerin birbirleriyle etkileşip, topaklanmaları engellenerek aglomerasyondan kaçınılmış olur hem de su ya da organik çözücülerde homojen dağılımlı sorbentler oluşması sağlanır. Bu amaçla; 354  $\mu L$  oleik asit 5 mL (10.86 mg/mL) nanopartikül süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra, 3 gün

boyunca 37 °C'da çalkalamalı etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Karışım daha sonra yağ banyosu içerisine yerleştirilen tek boyunlu yuvarlak tabanlı bir reaktör içerisinde hızlı karıştırma ortamında 80 °C'a ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 1 saat süresince bekletilmiştir. Yağ banyosundan çıkartılan reaktör içerisindeki süspansiyon, oda sıcaklığına soğutulmuştur. Mıknatıs yardımıyla 5 kez manyetik ayırma ve yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra nanopartiküller aynı miktarda ultra saf su içerisinde dağıtılmıştır.

SPION'ların altın ile kaplanması; literatürde Jin ve arkadaşlarının ve aynı zamanda Mahmoudi ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir [353-354]. Sunulan tez kapsamında; oleik asit kaplı nanopartiküller; poli-L-histidin, fosfolipid-PEG-COOH ve sodyum borhidrür indirgeyici ajanı yardımıyla altın tabakası ile kaplanmaya çalışılmıştır. Fosfolipid-PEG-COOH yapısındaki polietilenglikol segmenti hidrofilik yapısı gereği nanopartiküllerin suda-çözünür olabilmelerine olanak sağlar. Fosfolipid segmenti, hidrofobik doğası gereği oleik asit ile hidrofobik bir etkileşim içerisine girer. Karboksil fonksiyonel grup, negatif yük sağlar. Altın kabuk yapının oluşmasını sağlamak için de, pozitif yüklü olduğu bilinen (+1) poli-L-histidin kullanılmıştır. Yöntemi uygulamak amacıyla; 0.1 mL oleik asit kaplı SPION ve 1.5 mg fosfolipid-PEG-COOH 1 mL kloroform içerisinde 2 gün süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiş, kloroform ortamından tamamen uzaklaştırılması amacı ile 5 dakika süresince 80 °C'a ısıtılmış ve 1 mL distile su içerisinde dağıtılmışlardır. Daha sonra ortamdaki artık lipidlerin uzaklaştırılması amacıyla nanopartiküller mıknatıs yardımıyla 3 kez manyetik ayırma ve yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Lipid kalıntılarından arındırılan nanopartiküller daha sonra 1.1 mg PLH içeren 4 mL distile su içerisine ilave edilmiştir. Çözeltinin pH'ı kontrol edilmiş ve 0.1 N HCl kullanılarak pH= 5 olacak şekilde ayarlanmıştır. 1 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edilen partiküller, daha sonra mıknatıs yardımıyla 3 kez manyetik ayırma ve yıkama işlemine tabi tutulmuşlar ve 5 mL distile su içerisinde dağıtılmışlardır. Hazırlanan çözeltiden 100 µL alınarak, 890 µL

distile su ve 10  $\mu$ L tetrakloraurik asit (%1 w/w) içeren çözelti içerisine ilave edilmiş ve 20 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra, 0.15 M 0.15 mL sodyum borhidrür damla damla reaktör içerisine ilave edilmiş ve nanopartikül süspansiyonu renginin kahverengiden morumsu-kırmızı bir renge döndüğü gözlenmiştir. Son olarak 3 kez manyetik ayırma ve yıkama işlemi yapılmış, süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve nanopartiküller distile su içerisinde dağıtılarak, ileriki basamaklarda kullanılmak üzere +4 °C'da karanlık ortamda saklanmışlardır. Şekil 3.1 A'da nanopartiküllerin altın ile kaplanması esnasında çekilen fotoğraflar ve B'de altın kaplı SPION'ların mıknatıs ile görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 3.1. (A) SPION'ların altın kaplama esnasında reaktör içerisindeki görünüşleri (B) Altın kaplı SPION'ların mıknatıs ile görüntüleri

### 3.4. SPION'ların Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen tüm analizler için nanopartiküllerin konsantrasyonu; 0.1 mg/mL olarak ayarlanmıştır.

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen manyetik demir oksit nanopartiküllerin ilk olarak konsantrasyonlarının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, Thermo Electron X7 model İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanılmıştır. Çalışma prensibi olarak; analiz edilmek istenen örnekteki elementler elektromanyetik indüksiyonla 10,000 K sıcaklığa ulaştırılan argon plazması tarafından iyonize edilirler. ICP'de iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektroskopisine gönderilirler ve burada kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılırlar ve son olarak da elektron çoklayıcı bir dedektör yardımı ile konsantrasyon ölçülür. ICP-MS'deki plazma, optik emisyon spektrometresinde kullanılan argon plazması ile aynıdır. Periyodik tablodaki birçok elementin birinci iyonlaşma enerjileri argonun iyonlaşma enerjisinden (15.76 eV) küçük olduğu için elementler plazma içerisinde pozitif iyonlara dönüşürler. Ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi amacıyla; ICP analizine gönderilecek olan örnekler 1 gece öncesinden 6 M HCl içeren falkon tüpü içerisinde bekletilmişlerdir.

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen manyetik demir oksit nanopartiküllerin kimyasal yapısının belirlenebilmesi amacıyla FTIR Spektrometresi kullanılmıştır. Kızılötesi absorpsiyon spektrometresi, titreşim spektrometresinin bir türüdür ve kızılötesi ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulur. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi ile de, ışın şiddeti zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Işın örnek ile etkileştikten sonra dedektör tarafından algılanır ve anlamlı sinyallere dönüştürülür. Böylece; molekül yapısındaki bağların titreşim frekansları ölçülerek, moleküllerdeki mevcut fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinilmiş olur.

Sentezlenen manyetik oksit nanopartiküllerin altın ile kaplanıp kaplanmadıklarını doğrulamak için UV-VIS Spektrofotometre (Perkin

Elmer, UV\_Visible Lambda 35) kullanılmıştır. UV-Vis Spektrofotometre, hem UV (ultraviyole-200-400 nm) hem de VIS (görünür bölge-380-800 nm aralığı) bölgede ölçüm yapabildiğinden iki farklı ışık kaynağı kullanılır. Çalışma prensibi olarak; ışık demetleri bir prizmadan geçirilir ve içerdikleri dalga boylarına göre ayrılırlar. Her bir monokromatik ışın bir ayna yardımıyla iki eşit parçaya ayrılır. Işın demetlerinden bir tanesi sadece çözücü içeren UV geçirgen bir küvetten, diğeri ise referans olarak kullanılan aynı çözücü içerisinde bulunan ölçümü yapılacak olan örneğin bulunduğu çözelti içerisinde geçirilir. Sadece çözücünün bulunduğu küvet içerisinde geçirilen ışık şiddeti  $I_0$ , ölçümü yapılacak olan örneğin bulunduğu küvet içerisinde geçirilen ışığın şiddeti ise  $I$  olarak adlandırılır ve her iki ışık şiddeti de dedektörlerce okunarak veri formatına dönüştürülür.  $I = I_0$  olduğu durumlar; çözücü ile örnek çözelti arasında herhangi farklı bir absorpsiyonun gözleendiği bir dalga boyu bulunmadığına işaret eder ve herhangi bir grafik-pik gözlenmez.  $I/I_0$  ışığın geçme miktarı,  $\log I_0/I$  absorblama miktarı,  $\lambda_{max}$  ise soğurma pikinin tepe noktası olarak ifade edilir.

Nanopartiküllerin ortalama partikül boyutları ve şekilleri JEOL marka JEM-3010 TEM ile 22 °C'da belirlenmiştir. Görüntüler 300 kV elektron hızlandırma gerilimi kullanılarak parlak alan modunda çekilmiştir. TEM'in çalışma prensibi; elektromanyetik mercekler yardımıyla bir elektron demetinin odaklanıp hızlandırılması ve bir örnek üzerine düşürülüp, örnekten geçen elektronların dedektörler aracılığı ile algılanıp işlenerek görüntü verilerine dönüştürülmesi temeline dayanır. Elektronlar örneğin diğer tarafına geçerken kırınımına uğrayarak bir kırınım deseni oluştururlar. Bu kırınım deseni örneğin ters uzaydaki görüntüsüne eşittir. Örneğin gerçek uzay görüntüsü ise, Fourier dönüşümü yardımıyla elde edilir. Ölçüm için; kağıt havlu üzerine yerleştirilen karbon kaplı bakır gridler üzerine görüntüsü alınacak örnekten 20 µL damlatılmış ve örnekler grid üzerinde oda sıcaklığında kurutularak ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen SPION ve altın tabaka ile kaplı SPION'ların boy ve boy dağılımlarının belirlenmesi amacıyla, Zeta Sizer (Malvern, Zeta Sizer Nano Zs) cihazı kullanılmıştır. Cihaz; partikül boyut ölçüm yöntemi olarak dinamik ışık saçılması prensibi ile çalışmaktadır. DLS ya da diğer adıyla PCS; polimerler, proteinler ya da çözelti içerisindeki kolloidlerin hidrodinamik çaplarının karakterize edilmesinde kullanılan spektroskopik bir tekniktir. Partikül boyut ölçümü, örnek içerisindeki partiküllerin Brownian Hareketi'nin saptanması temeline dayanır. Nanopartiküller ortama saçıldıklarında, sıvı moleküllerin Brownian Hareketi gereği etkilenirler ve düzensiz hareketler sergilerler. Boyutu küçük olan parçacıkların hareketleri daha hızlı olacağından hareket ettikleri mesafe aralığı daha büyük olur. Boyutu büyük olan parçacıkların hareketleri daha yavaş olacağından, hareket ettikleri mesafe aralığı da daha küçüktür. Ölçüm prensibi olarak; ölçümü yapılacak olan çözelti/süspansiyon, monokromatik lazer ışığı ile aydınlatılır ve kırılan ışık şiddetindeki dalgalanma zamanının bir fonksiyonu olarak ölçülür. Boyutu küçük olan parçacıkların hareketleri daha hızlı olur (Brownian Hareketi) ve dolayısıyla ekranda parlak noktaların daha hızlı dalgalanmalarına neden olur. Bu dalgalanmaların hız oranına bağlı olarak da partikül boyutu hesaplanabilir. Ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi amacıyla, sentezi gerçekleştirilen SPION'lar 100 kat seyreltilmiştir. Kullanılan distile su, ölçümlerin kirliliğe karşı çok hassas olması nedeni ile filtreden geçirilmiştir. Ölçümü yapılacak olan nanopartiküllerin seyreltme oranı çok büyük önem taşımaktadır. Örneklerin gereğinden yüksek oranda seyreltilmeleri sedimantasyona, az seyreltilmeleri ise partikül hareketlerinin ölçümleri yanıltması sebebiyle sağlıklı ölçüm yapılamamasına neden olmaktadır. Bu nedenle; ICP-MS ölçümlerine dayanarak konsantrasyonu belirlenen SPION'lardan (10.86 mg/ml) 13.81 µl alınarak 1.5 mL distile su içerisinde örnek çözelti hazırlanmıştır. Analiz öncesinde partiküllerin çözelti içerisinde homojen dağılımının sağlanabilmesi ve aglomerasyondan olabildiğince kaçınabilmek amacıyla, hazırlanan örnek çözelti 5 dakika süresince

ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuş ve polistiren küvet içerisine aktarılmıştır. Partiküllerin refraktif indeksi 2.420 olarak, örneklerin içerisinde dağıtıldığı çözücü su olduğu için çözücü refraktif indeksi 1.330 olarak işaretlenmiştir. Sıcaklık 25 °C ve ölçüm süresi 70 saniye olarak saptanmıştır.

Sentezi gerçekleştirilen nanopartiküllerin zeta potansiyelleri de aynı cihaz ile ölçülmüştür. Lazer Doppler Mikroelektroforez, zeta potansiyeli ölçmek için kullanılmaktadır. Cihaz; partikül dispersiyonuna bir elektrik akım uygulamakta ve uygulanan bu akım ile partiküller zeta potansiyellerine bağlı bir hız ile hareket etmektedirler. Bu hız; M3-PALS ("Evre Analizi Işık Saçılımı") olarak adlandırılan lazer interferometrik tekniği kullanılarak ölçülmektedir. Bu ölçüm; elektroforetik mobilite ve dolayısıyla zeta potansiyel ve zeta potansiyel dağılımı hesaplamalarına olanak sağlamaktadır. Zeta Potansiyel, partikülün yüzeyi üzerindeki net etkili yükü göstermektedir, birimi milivolttur. Kolloidal yapıların kararlılığının değerlendirilmesinde, süspansiyon içerisinde bulunan partiküller arasındaki etkileşimlerin tahmin edilmesi ve anlaşılmasında önem taşımaktadır. Ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi amacıyla; nanopartiküllerden (10.86 mg/ml) 27.62 µl alınarak 3 mL distile su içerisinde örnek çözelti hazırlanmıştır. Analiz öncesinde partiküllerin çözelti içerisinde homojen dağılımının sağlanması amacıyla, hazırlanan örnek çözelti 5 dakika süresince ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuş ve polistiren küvet içerisine aktarılmıştır. Ayrıca; örnekler analiz için cihaz içerisine yerleştirilmeden önce pH ölçümleri gerçekleştirilmiş ve daha sonra cihaz içerisine yerleştirilerek analizler tamamlanmıştır. Hazırlanan örneklerin seyreltme öncesi ve seyreltme sonrası pH ölçümleri sırası ile; pH = 2.34 ve pH= 4.16 olarak belirlenmiştir.

Sentezi gerçekleştirilen SPION'ların manyetik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ESR Spektrometresi kullanılmıştır. ESR; eşleşmemiş spinleri olan elektronların manyetik enerji seviyeleri arasındaki geçişlere yol açan elektromanyetik radyasyonla (genellikle mikrodalga frekansı



kullanılarak) ilgili spektroskopik bir ölçüm gerçekleştirmektedir. Eşleşmemiş spinleri olan maddelere genelde paramanyetik maddeler denir. Bu tür maddelere dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında mıknatıslanma özelliğine sahiptirler. Bu mıknatıslanma olayının sebebi de eşleşmemiş elektronların spinleridir. Rezonans gerçekleştiğinde enerji kaybı çok küçük olduğundan farkedilebilir durumdadır ve incelenen madde ile ilgili yapısal bilgiler elde edilir. Bu kapsamda ölçümler; Bruker EMX-131 ESR Spektrometre ile gerçekleştirilmiştir. Manyetik Rezonans Spektrum; cihaz işletim/ölçüm koşulları mikrodalga frekansı 9.6 GHz, merkez alan 3300 G, tarama aralığı 4000 G, modülasyon frekansı 100 kHz, modülasyon genişliği 2 G ve tarama süresi yaklaşık 1.5 dakika olacak şekilde kaydedilmiştir. Sıvı formdaki örneklerin ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen SPION'ların manyetik özellikleri ayrıca VSM olarak adlandırılan Titreşimli Manyetometre Cihazı ile de belirlenmiştir. Ölçümler Fiziksel Özellikler Ölçüm Düzeneği (Kuantum Tasarım PPMS) cihazının VSM opsiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler; oda sıcaklığında,  $\pm 20000$  Oersted aralığında 100 Oe/sn hızında gerçekleştirilmiştir. Manyetik özellik sergileyen bir partiküldeki manyetik momentlerin tümü uygulanan alan yönünde yönlendiğinde ölçülen toplam manyetik moment sabit kalır. Bu noktaya "doygunluk noktası" ve doygunluk noktasında ölçülen manyetik momente de "doygunluk mıknatıslığı" adı verilir. Doygunluk mıknatıslığına ulaşıldığındaki alan ise "doygunluk manyetik alanı" olarak adlandırılır.

Sonuç olarak; AB1 kapsamında; SPION'ların ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenmesi, sentezlenen SPION'ların altın tabakası ile kaplanması ve sentezi gerçekleştirilen altın kaplı ve altın kaplı olmayan SPION'ların karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen SPION'ların konsantrasyonu ICP-MS Cihazı ile, kimyasal yapıları FT-IR Spektroskopi ile, şekil ve boyutları TEM ile, hidrodinamik çapları ve polidispersite indeksleri Zeta Sizer Ölçüm Cihazı ile, yüzey yükleri Zeta Potansiyel

Ölçüm Cihazı ile, manyetik özellikleri VSM ve ESR cihazları ile ve son olarak altın ile kaplanıp kaplanmadıkları UV-VIS Spektrofotometre ile ölçülmüş ve yorumlanmıştır.

Böylece; tez kapsamında gerçekleştirilmesi planlanan MDA MB 231 meme kanseri tümör hücrelerine hedefleme gerçekleştirebilecek "taşıyıcı sistem" oluşturulmuştur.

### **3.5. Antibadi İmmobilizasyonu**

MDA MB 231 meme kanseri hücrelerine özgün anti-epidermal büyüme faktörü reseptör antibadileri (anti-EGFR antibadi) satın alma yoluyla temin edilmiştir. Satın alınan anti-EGFR monoklonal antibadi öncelikle FITC floresan boya ile etiketlenmiştir. Bu amaçla; satın alınma yolu ile temin edilen antibadi, sodyum azid içerdiği için, öncelikle pH'ı 7.4 olan PBS tampon içerisinde bir gece süre ile +4°C'da diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra anti-EGFR monoklonal antibadi; sodyum karbonat tampon içerisinde (her 1 mg/mL konsantrasyondaki antibadi için 0.05 M sodyum karbonat tampon, pH=8 olacak şekilde) hazırlanmıştır. FITC floresan boya ise, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda çözünmüştür. 1 mL protein çözeltilisine, hazırlanan FITC çözeltilisinden 5 µL'lik parçalar halinde yavaş yavaş olacak şekilde toplam 50 µL ilave edilmiştir. FITC çözeltilisinin ilave edilme işlemi tamamlandıktan sonra reaksiyon 8 saat süresince +4°C'da karanlık ortamda inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. 8 saatlik inkübasyon işlemi sonrasında, son konsantrasyon 50 mM olacak şekilde çözeltiye amonyum klorür ilave edilmiş ve 2 saat süresince +4°C'da inkübe edilmiştir. Daha sonra, antibadiye bağlanmamış olan FITC moleküllerinin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla, 40K MWCO (Molekül Ağırlığı Ayırma Sınırı) iyon değiştirici reçine içeren spin kolon yardımı ile bağlanmayan FITC molekülleri çözeltiden uzaklaştırılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, FITC molekülleri ile işaretlenmiş olan antibadi kolon tampon içerisine %1 oranında BSA ("sığır serum albumini") ilave edilerek +4°C'da saklanmıştır.

FITC/Antibadi Bağlanma Derecesi Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2 ile hesaplanmıştır:

$$\text{Protein Konsantrasyonu (M)} = \frac{A_{280} - (A_{\max} \times CF)}{\epsilon} \times \text{seyreltme faktörü} \quad (3.1)$$

$$\frac{(\text{FITC mol})}{(\text{Antibadi mol})} = \frac{\text{İşaretlenen antibadi'nin } A_{\max} \text{ değeri}}{\epsilon' \times \text{Protein konsantrasyonu (M)}} \times \text{seyreltme faktörü} \quad (3.2)$$

$A_{\max}$  = Floresan boya çözeltisi için maksimum dalga boyunda ölçülen absorbands değeri

$A_{280}$  = 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbands değeri

$\epsilon$  = Antibadi molar ekstinksiyon katsayısı;  $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\epsilon'$  = FITC floresan boya ekstinksiyon katsayısı;  $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

CF = Düzeltme Faktörü (FITC molekülünden kaynaklanan 280 nm' deki absorbands değeri düzeltme faktörü)

Seyreltme Faktörü = Absorbans ölçümleri için yapılan antibadi/FITC örneği seyreltme oranı

Doğru ve optimal floresan boya/antibadi oranı belirlenebilmesi için, antibadi molekülleri ile bağlanmayan boya moleküllerinin tamamen ortamdan uzaklaştırılması şarttır. Bu amaçla, ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle çözelti içerisindeki bağlanmayan FITC floresan boya molekülleri ortamdan spin kolon yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra ölçümü yapılacak olan antibadi/FITC çözeltisi pipet yardımı ile 1 cm boyundaki spektrofotometre küveti içerisine aktarılmıştır.

Anti-EGFR monoklonal antibadilerin altın kaplı SPION'ların yüzeyine immobilize edilebilmesi amacı ile SH-PEG-COOH moleküllerinden yararlanılmış ve literatürde yer alan Qian ve arkadaşları, Dinish ve arkadaşları ve Wang ve arkadaşları vb. araştırmacıların kullandığı yöntem uygulanmıştır [355-357].

Prob antibadi moleküllerinin hem yüzey konsantrasyonunu optimize edebilmek hem de yüzeye doğru yönlendirilmiş şekilde yerleşmelerini sağlayabilmek için (hedefle etkileşmelerini sağlamak amacı ile), sentezi gerçekleştirilen altın kaplı SPION'ların yüzeylerinde SAMs oluşturulmuştur.

Altın kaplı SPION'ların yüzeyinde SAMs oluşturabilmek için; bir ucunda altın kaplı nanopartiküllerin yüzeylerindeki tiyol grupları ile etkileşebilecek -SH uç grupları barındıran, diğer ucunda da monoklonal antibadilerin amin grupları etkileşerek peptid bağı oluşturabilecek karboksil uç grupları barındıran SH-PEG-COOH (Mn ~ 3,500) ve sterik engelleri ortadan kaldırmak amacı ile metoksiPEG-SH (Mn ~ 2,000) molekülleri kullanılmıştır. Bu amaçla; 1  $\mu$ M 450  $\mu$ L SH-PEG-COOH molekülü 50  $\mu$ L 0.1 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartiküle ilave edilmiştir. Karışım 24 saat inkübe edilmiş ve daha sonra SH-PEG-COOH molekülleri ile etkileşmeyen nanopartikül yüzeylerinin kararlı duruma getirilmesi amacıyla 10  $\mu$ M 1.8 mL metoksiPEG-SH molekülleri çözelti ortamına ilave edilmiştir. Son olarak bağlanmayan moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması amacı ile, nanopartiküller 3 kez manyetik ayırma işlemine tabi tutulup son olarak PBS tampon, pH 7,4 içerisinde disperse edilmişlerdir.

Partikül yüzeylerindeki COOH gruplarının aktive edilebilmesi amacıyla; 50  $\mu$ L 0.1 mg/mL SPION, taze olarak hazırlanmış 10  $\mu$ L 30 mg/mL konsantrasyonunda EDC (N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür) ve 20  $\mu$ L 30 mg/mL sulfo-NHS (Hidroksi-2,5-dioksopirolidin-3-sulfonikasıit sodyum tuzu) içerisinde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karboksil gruplarının aktive edilmesinin ardından, bağlanmayan moleküllerin çözelti ortamından uzaklaştırılması amacı ile nanopartiküller 3 kez manyetik ayırma işlemine tabi tutulmuşlardır. Karboksil grupları ile aktive edilmiş nanopartikül çözeltisine 10  $\mu$ g anti-EGFR monoklonal antibadi ilave edilmiş ve son hacim 500  $\mu$ L olacak şekilde oda sıcaklığında rotator üzerinde 2 saat

süresince karıştırma işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen nanopartikül-antibadi konjugasyonundan bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla 2 kez manyetik ayırma işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra PBS tampon çözeltisi (500 µL, 10 mM) ile yıkanmıştır. Nanopartikül-antibadi konjugasyonu daha sonra yeniden manyetik ayırma işlemine tabi tutulmuş ve son olarak %1 BSA içeren PBS tampon çözeltisi (500 µL, 10 mM) ile bloke edilmiştir. Elde edilen konjugat daha sonra 2 dakika süresince ultrasonikasyon işlemine tabi tutularak aglomere olan agregatların ayrılması sağlanmış ve 37°C'da 60 dakika süresince inkübe edilmiştir. Son olarak elde edilen nanopartikül-antibadi konjugatı +4°C'da saklanmıştır.

### **3.6. Aptamer İmmobilizasyonu**

MDA MB 231 meme kanseri hücrelerine özgün aptamerler satın alma yoluyla temin edilmiştir. Modifiye aptamerlerin altın yüzeylere "kendiliğinden yerleşmesini" sağlamak üzere, bağlanacakları uçlarında bir uzatma kolu (6 karbonlu alifatik zincir) ve altına bağlanmayı sağlayacak -SH grubu taşıyacak şekilde ve aynı zamanda floresan mikroskop altında floresan ışığa sağlayacak olan FITC ile etiketlenmiş olarak sentez edilmeleri sağlanmıştır. Aptamer dizisi aşağıdaki şekildedir:

5'-Thiol-C6-XGC CGC XAX AAX GCA CCG AXX XAA XCG CCG XAG AAA AGC AXG XCA AAG CGG-Fam-3' X Uridin

Anti-EGFR aptamerlerin altın kaplı SPION'ların yüzeyine immobilize edilebilmesi için, literatürde yer alan Li ve arkadaşlarının kullandığı yöntem uygulanmıştır [358]. Bu amaçla; 50 µL 0.1 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartikül manyetik ayırma yöntemi ile 3 kez PBS tampon, pH 7,4 ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Son yıkama işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve nanopartiküller 1 mL PBS tampon, pH 7.4 içerisinde dağıtılmışlardır. 100 µM konsantrasyonunda 8.1 µL anti-EGFR aptamer öncelikle disülfid bağlarının indirgenmesi amacı ile 100 µM TCEP ile oda sıcaklığında 1

saat süresince inkübe edilmiş ve daha sonra hazırlanan nanopartikül çözeltisine ilave edilmiştir. Karışım 12 saat süresince oda sıcaklığında karanlık ortamda rotator üzerinde karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 2 dakika süresince ultrasonike edildikten sonra tekrar 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda, manyetik ayırma yardımı ile %0.01 Tween 20 içeren PBS tampon, pH 7.4 içerisinde yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve nanopartiküllere bağlanmayan aptamerlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son olarak; nanopartikül-aptamer konjugatı PBS tampon pH 7.4 içerisinde disperse edilerek +4 °C'da saklanmıştır.

SPION'ların yüzeyine anti-EGFR monoklonal antibadi ve aptamerlerinin bağlanma etkinliği, Nanodrop Cihazı (Nanodrop 1000, Thermo&Scientific) kullanılarak yapılan ölçümler ile belirlenmiştir. Bu amaçla; anti-EGFR antibadi ve aptamer molekülleri SPION yüzeyine immobilize edildikten sonra, Nanodrop Cihazı ile yaklaşık 2 µL örnek damlatılarak, 260/280 nm'de sırası ile protein ve nükleik asit seçenekleri kullanılarak her bir konjugat için ölçümler gerçekleştirilmiş ve örnek içerisindeki antibadi ve aptamer konsantrasyonları belirlenmiş ve başlangıç konsantrasyonları ile oluşan fark ile bağlanma etkinliği hesaplanmıştır.

### **3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları**

Hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi amacıyla; -80 °C'lik derin dondurucu da saklanan östrojen reseptör pozitif insan fibroblast ve MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin kültür kapları içerisinde ekim yapılmak üzere oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra kriyotüpte bulunan hücreler falkon tüpe aktarılmıştır. Üzerine 1 mL hücre kültürü besiyeri ortamı (MDA MB 231 hücreleri için: RPMI 1640 + %10 Fetal Siğir Serumu + %1 Antibiyotik {penisilin-streptomisin} ve Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücreleri için: DMEM/F12 + %10 Fetal Siğir Serumu + %1 Antibiyotik) ilave edilmiştir. Daha sonra 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı

dökülmüştür. Dipte kalan hücrelerin üzerine her bir kültür kabı için 3 mL hücre kültürü besiyeri ortamı ilave edilip homojen hale getirildikten sonra kültür kapları içerisinde ekim yapılmış ve 37 °C'da %5 CO<sub>2</sub> ortamında 2 gün inkübe edilmiştir. 2 günün sonunda hücrelerin yeterli sayıda çoğaldığı görülmüş ve 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır. Hücrelerin yeterli sayıya ulaşip ulaşmadığını belirlemek için otomatik hücre sayım cihazından (Invitrogen-Countess) yararlanılmıştır. Bu amaçla 10 µL örnek 10 µL tripan mavisini ile karıştırılmış ve hücre sayım cihazı slaytı üzerine damlatılmıştır. Daha sonra slayt, otomatik hücre sayım cihazı içerisine yerleştirilmiş ve hücre sayısı belirlenmiştir. Hücrelerin yeterli sayıya ulaştığı belirlendikten sonra kültür kaplarındaki hücre kültürü besiyeri ortamı atılmıştır. Her bir kültür kabına 0,5 mL enzim (tripsin EDTA ) ilave edilmiştir. Kültür kabının tüm yüzeyine enzim temas edecek şekilde aşağı yukarı hareketlerle hücreler yıkanmış ve daha sonra 3-4 dakika süresince inkübatörde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda ışık mikroskobu yardımı ile hücrelerin kültür kabının yüzeyinden kalkıp kalkmadığına bakılmıştır. Hücreler tamamıyla kalktıktan sonra enzim aktivitesinin durdurulması için hücrelerin üzerine 1 mL hücre kültürü besiyeri ortamı ilave edilmiştir. Enzim ve hücre kültürü besiyeri ortamı karışımı falkon tüplere aktarılıp, 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılıp, dipte kalan hücrelerin üzerine 1 mL hücre kültürü besiyeri ortamı eklenip hücre sayımı yapılmıştır. 10 mL'ye seyreltilen falkon tüpteki hücre ve hücre kültürü besiyeri ortamı çözeltilerinden her bir kuyucuğa 100 µL konmuş ve 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.8. Sitotoksosite Çalışmaları**

Sitotoksitenin belirlenebilmesi amacı ile WST-1 testi kullanılmıştır. Bu prosedürde WST-1 tetrazolyum tuzu, yalnızca canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondrial solunum zincirinde yer alan süksinat-tetrazolyum redüktaz tarafından suda çözünebilen formazan boyasına dönüştürülmektedir. Bu yöntemde bir örnekteki bu mitokondriyal dehidrogenazın total aktivitesi, canlı hücrelerin artmasıyla

yükselmektedir. Enzim aktivitesinin artması, kültür ortamındaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile direkt ilişkili olarak formazan boyasının üretiminde ve miktarında artışa neden olmaktadır. WST-1 toksisite testinde; yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmemektedir.

Toksisitenin belirlenebilmesi amacıyla; 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her bir plakada  $10 \times 10^3$  hücre olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakada her bir kuyucuğa 100 µL hücre-besiyeri ortamı süspansiyonundan koyulup, 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri ortamı boşaltılmıştır. Serum fizyolojik ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra, ilk kuyucuklar boş kalacak şekilde diğer kuyucuklara 100'er µL hücre kültürü besiyeri ortamı ilave edilmiştir.

Daha sonra farklı oranlarda (108.6, 54.3 ve 27.15 µg/mL) nanopartiküller ([SPION] / yüzeyinde karboksil fonksiyonel grupları ile SAMs oluşturulmuş altın tabaka ile kaplı SPION [Kar.SPION] / yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION [AbSPION] / yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION [ApSPION]) mıknatıs yardımı ile gerçekleştirilen manyetik alan uygulaması ile birlikte hücrelere ilave edilerek, 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece besi ortamı hücrelere uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ortamı kullanılarak hazırlanan DMEM/F-12 besiyeri ortamından kuyucuklara 200 µL koyularak, üzerlerine 10 µL WST-1 çözeltisi ilave edilmiştir. 37 °C'da %5 CO<sub>2</sub> ortamında 4 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığının belirlenebilmesi için 96 kuyucuklu plakanın absorbans değerleri ELISA plaka okuyucuda 420-480 nm'de okunmuştur.

### **3.9. Hedeflemenin Floresan Mikroskop ile Gösterilmesi**

MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilen FITC işaretli anti-EGFR monoklonal antibadi-SPION ve FITC işaretli anti-EGFR



aptamer-SPION konjugatları ile tümör hücrelerinin hedeflendiği LeicaDM4000 marka floresan mikroskop (Almanya) ile gösterilmiştir.

### **3.10. Akım Sitometri Analizleri**

Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast ve MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin, her bir kuyucuğa  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekimi yapılmıştır. Ekimi gerçekleştirilen hücreler 24 saat süre ile 37 °C'da %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra farklı oranlarda (27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL) nanopartiküller (AbSPION/ApSPION) hücrelere ilave edilerek 24 saat süre ile 37 °C'da %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri ortamı atılıp, hücreler tripsin EDTA ile muamele edilerek hücrelerin plaka kuyucuk yüzeylerinden kalkması sağlanmıştır. Kaldırılan hücreler 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet kısmı 500 µL akım kılıf sıvısı ile sulandırılan ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanopartikül-antibadi ve nanopartikül-aptamer konjugatları (AbSPION/ApSPION) ile etkileştirilmiş olan hücrelerin akım sitometri analizleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.11. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Gösterilmesi**

İkili boyama yöntemi ile hücre çekirdeği boyanmakta ve bu sayede apoptoz ve nekrozun belirlenmesi sağlanmaktadır. Ribonükleaz A, RNA'yı boyamaz bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. Hoechst boyama ile, apoptotik hücreler boyanır ve bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidiumiodid, DNA'yı ve RNA'yı kırmızı renge boyayarak sekonder nekrozu gösterir.

İkili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekrozun belirlenebilmesi amacı ile ilk olarak ikili boyama çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle ribonükleaz A, hoechst ve propidiumiodid stok çözeltileri hazırlanmıştır. 1ml PBS' de 10 mg RNA olacak şekilde ribonükleaz A, 1 ml PBS'de 200

$\mu\text{g}$  olacak şekilde hoechst ve 1ml PBS'de 100  $\mu\text{g}$  olacak şekilde propidiumiodid stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Daha sonra; 10 mL PBS içerisine; hazırlanan stok çözeltilerinden 100  $\mu\text{L}$  RNAaz, 500  $\mu\text{L}$  Hoechst ve 100  $\mu\text{L}$  propidiumiodide çözeltilerinden ilave edilerek çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

İkili boyama yönteminin uygulanabilmesi için 48 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Hücre sayımı gerçekleştirildikten sonra canlı hücre sayısına göre her plakada  $10 \times 10^3$  hücre olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Hücreler 24 saat süre ile  $37^\circ\text{C}$ 'da %5  $\text{CO}_2$  ortamında inkübe edildikten sonra, plaka içerisindeki kuyucukların yüzeylerine tutunup tutunmadıkları kontrol edildikten sonra, kuyucuklardaki besiyeri ortamı ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Daha sonra; farklı konsantrasyonlarda (108.6, 54.3 ve 27.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nanopartiküller (SPION/Kar.SPION/AbSPION/ApSPION) hücrelere ilave edilerek, hücreler 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 1 saat inkübasyonun ardından, ilk kuyucuklar boş kalacak şekilde kuyucuklara 100'er  $\mu\text{L}$  besiyeri ilave edilip inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubuna sadece hücre kültürü besiyeri ortamı koyulmuştur. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri ortamı boşaltılmış ve her kuyucuğa 70  $\mu\text{L}$  ikili boyama çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra 48 kuyucuklu plaka hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve İ3 (480-520nm dalga boyunda) filtresi kullanılarak nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

### **3.12. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi**

MDA MB 231 insan meme kanseri ve östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücrelerinin, her biri 5000/plaka olacak şekilde, yüzeyi altın elektrotlar ile kaplı 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapılmıştır. Hücrelerin bir gün süre ile Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü (RTCA) sistemine bağlı

olarak proliferasyonu takip edilmiştir. 24 saat sonrasında farklı oranlarda (108.6, 54.3 ve 27.15 µg/mL) nanopartiküller (SPION/Kar.SPION/AbSPION/ApSPION) hücrelerin üzerine ilave edilerek hücreler ile etkileşmeleri sağlanmıştır. 5 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı olarak empedans ölçümü alınmıştır. 102 saat süre ile gerçekleştirilen ölçümler sonucunda zamana bağlı hücre proliferasyonunu gösteren grafikler elde edilmiştir.

Sonuç olarak; tez önerisinde tanımlanan tüm çalışmalar tez önerisinde belirtildiği şekilde gerçekleştirilerek tez çalışması sonuçlandırılmış ve elde edilen veriler ve değerlendirilen analiz sonuçları 4. Sonuçlar ve Tartışma bölümünde ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur.

## 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

### 4.1. SPION'ların Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezi gerçekleştirilen manyetik demir oksit nanopartiküllerin içeriğindeki ICP-MS ile belirlenen demir konsantrasyonu Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.1.** Sentezlenen SPION'ların içeriğindeki ICP-MS ile belirlenen demir konsantrasyonu değerleri

ICP-MS Sonuçları		Konsantrasyon
<b>20 Kat Seyreltme</b>	(ppmFe)	(mgFe/ml)
1. Okuma	9145	9.145
2. Okuma	9156	9.156
3. Okuma	9366	9.366
Ortalama Konsantrasyon	9222	<b>9.222</b>
Hata (%)	1.35	1.35
<b>40 Kat Seyreltme</b>	(ppmFe)	(mgFe/ml)
1. Okuma	8879	8.879
2. Okuma	8925	8.925
3. Okuma	8923	8.923
Ortalama Konsantrasyon	8909	<b>8.909</b>
Hata (%)	0.291	0.291
<b>100 Kat Seyreltme</b>	(ppmFe)	(mgFe/ml)
1. Okuma	7204	7.204
2. Okuma	7539	7.539
3. Okuma	8054	8.054
Ortalama Konsantrasyon	7599	<b>7.599</b>
Hata (%)	5.638	5.638

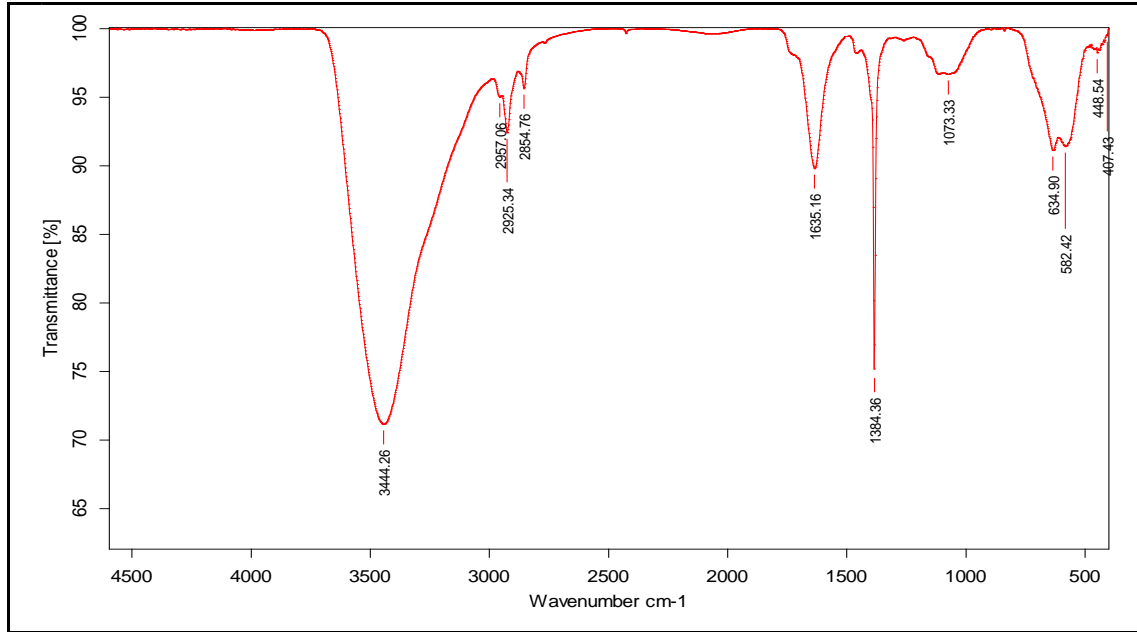
Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen manyetik demir oksit nanopartiküllerin kimyasal yapısının belirlenebilmesi amacıyla FTIR Spektrometresi kullanılmıştır. Sentezlenen SPION'ların FTIR Spektrumu Şekil 4.1'de ve spektrumda görülen karakteristik pikler ise Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Şekil 4.1'de sunulan FT-IR Spektrumunda; tetrahedral ve oktahedral bölgelerdeki Fe-O deformasyonlarına  $\{\nu(\text{Fe-O})\}$  karşılık gelen maghemit karakteristik absorpsiyon bantları  $634.90 \text{ cm}^{-1}$ ,  $582.42 \text{ cm}^{-1}$  ve  $448.54 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir. Örneğin adsorpladığı su nedeni ile karakteristik OH gerilme titreşim bandı  $\nu(\text{OH})$   $3444.26 \text{ cm}^{-1}$ 'de ve HOH ( $\delta \text{ OH}$ ) eğilimi titreşim bandı  $1635.16 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir.  $\gamma$ -Maghemit sentezi esnasında kullanılan nitrata karşılık

gelen  $\{v(O-N-O)\}$  siddetli gerilme titreşim bandı da  $1384.36\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir.

**Çizelge 4.2.** Manyetik demir oksit nanopartiküllerin FTIR Spektrum pikleri

Pik	Dalga Sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ )
$v(\text{Fe-O})$	634.90
	582.42
	448.54
$v(\text{OH})$	3444.26
$\text{HOH} (\delta \text{OH})$	1635.16
$v(\text{O-N-O})$	1384.36
$v(\text{C-H})$	2925.34
$v(\text{C-C})$	1073.33

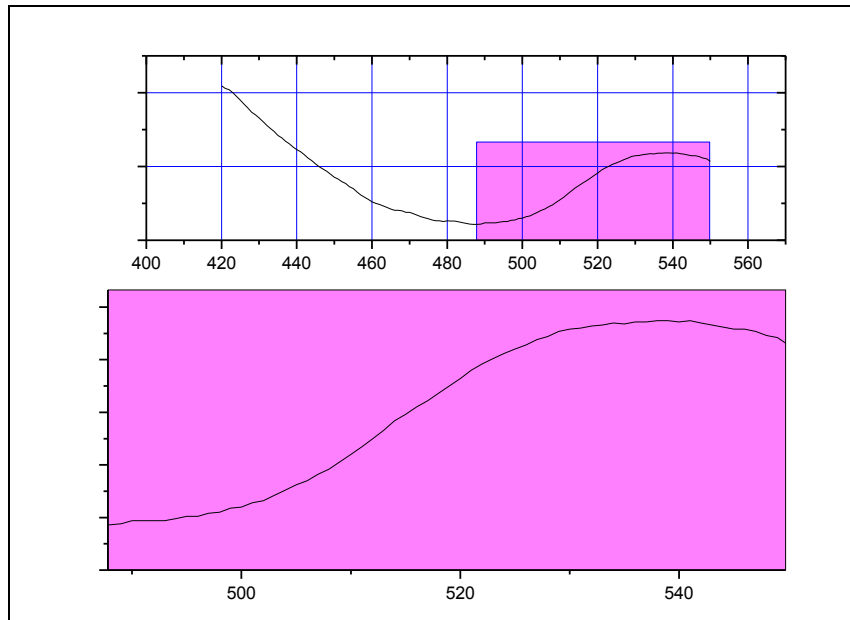
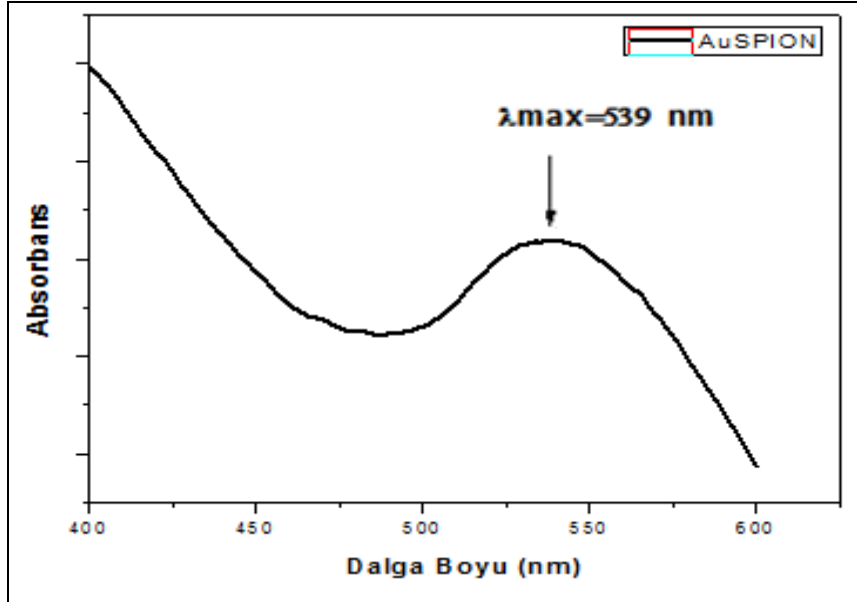
Ayrıca;  $2925.34\text{ cm}^{-1}$  ve  $1073.33\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen absorpsiyon pikleri sırası ile  $v(\text{C-H})$  ve  $v(\text{C-C})$  gerilimi titreşim bantlarına karşılık gelmektedir.



**Şekil 4.1.** Sentezlenen SPION'ların FTIR Spektrumu

Sentezlenen manyetik oksit nanopartiküllerin altın ile kaplanıp kaplanmadıklarını doğrulamak için UV-VIS Spektrofotometre kullanılmıştır. Altın kaplı SPION'ların UV-VIS Spektrofotometre ile elde edilen verileri Şekil 4.2'de sunulmuştur. Altının görünür bölgede plazmon dalga boyunun  $530\text{ nm}$  civarında olduğu bilinmektedir. Şekil

4.2'de sunulan verilere göre; 539 nm'de pik gözlenmiştir. Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen manyetik demir oksit nanopartiküllerin, altın ile kaplandıktan sonra UV-VIS Spektrofotometrede gözlenen pik değeri dikkate alındığında, altın ile kaplama prosedürünün başarılı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. Sentezlenen ve altın tabaka ile kaplanan SPION'ların  
VIS Spektrumu

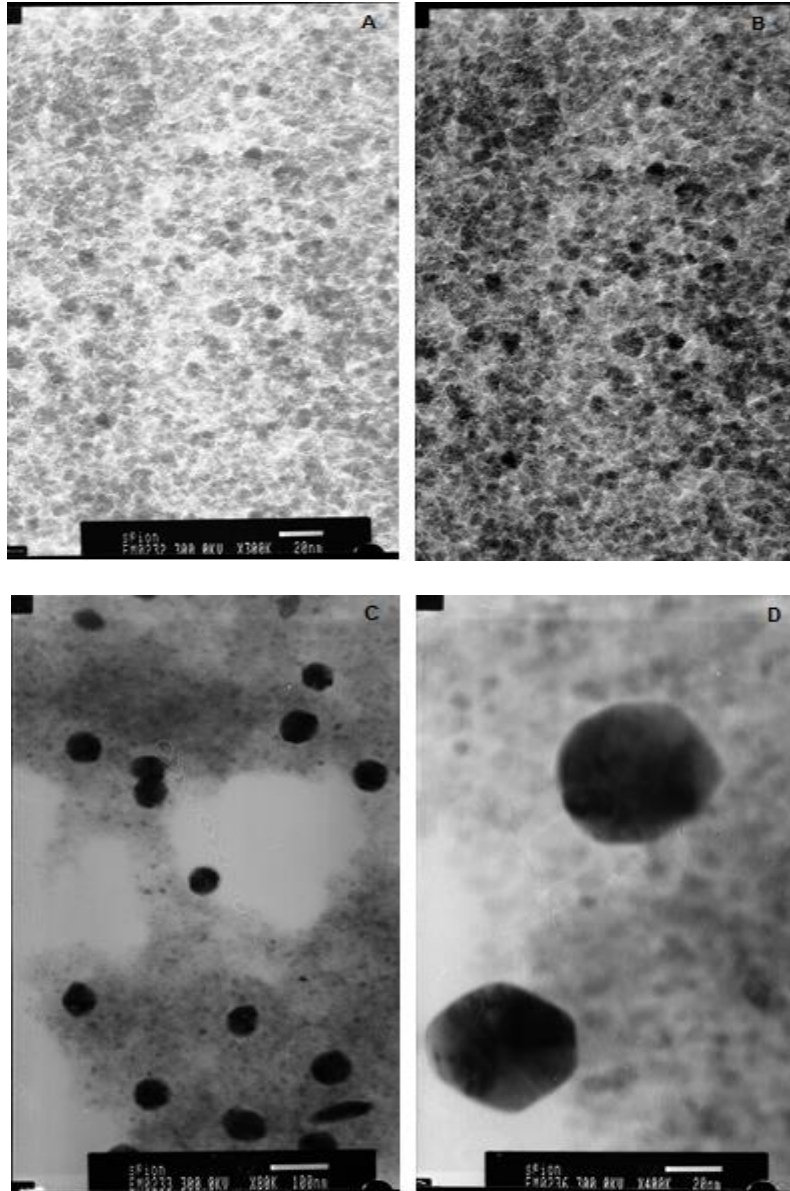
Nanopartiküllerin ortalama partikül boyutları ve şekilleri JEOL marka JEM-3010 TEM ile 22 °C'da belirlenmiştir. Sentezlenen manyetik demir oksit ve altın kaplı manyetik demir oksit nanopartiküllerin TEM ile elde edilen görüntüleri Şekil 4.3'de sunulmuştur. TEM görüntülerinden nanopartiküllerin küresel yapıda oldukları ve ortalama çekirdek çaplarının  $5.62 \text{ nm} \pm 1.49$  olduğu belirlenmiştir. Altın kaplı nanopartiküllerin ortalama çekirdek çaplarının ise  $57.04 \text{ nm} \pm 8.58$  olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.3.D'den görüldüğü gibi, ortalama 5.62 nm boyuta sahip nanopartiküllerin kümelenerek bir araya geldikleri, ara yüzey oluşumu sonrasında altın tabaka ile kaplandıkları ve altın ile kaplandıktan sonra boyutlarının ortalama 57.04 nm'ye ulaştığı gözlenmektedir.

Şekil 4.4'de sentezlenen maghemit formundaki SPION'ların elektron kırınım deseni, standard maghemit x-ışını kırınım deseni ile karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Elektron kırınım deseninde yer alan örüntülerin literatürdeki ile uyumlu olduğu ve nanopartiküllerin oldukça yüksek oranda kristalimsi bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. Spinel yapıdaki demir oksitin iki farklı formu olan maghemit ve magnetitin kırınım desenleri birbirinin tamamen aynısıdır. Dolayısı ile, sadece X-ışını kırınım deseni göz önünde bulundurularak, söz konusu nanopartikülde demir oksitin hangi evresinin daha baskın olduğu gibi bir değerlendirme yapmak mümkün değildir.

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen SPION ve altın tabaka ile kaplı SPION'ların hidrodinamik çaplarının belirlenmesi amacıyla, Zeta Sizer (Malvern, Zeta Sizer Nano Zs) cihazı kullanılmıştır. Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen SPION ve altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer cihazı ile belirlenen hidrodinamik çapları sırası ile Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sunulmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda sentezlenen nanopartiküllerin ortalama boyutu 29,49 nm olarak belirlenmiştir. Partikül büyüklüğü dağılımını ifade eden polidispersite indeksi (PDI)

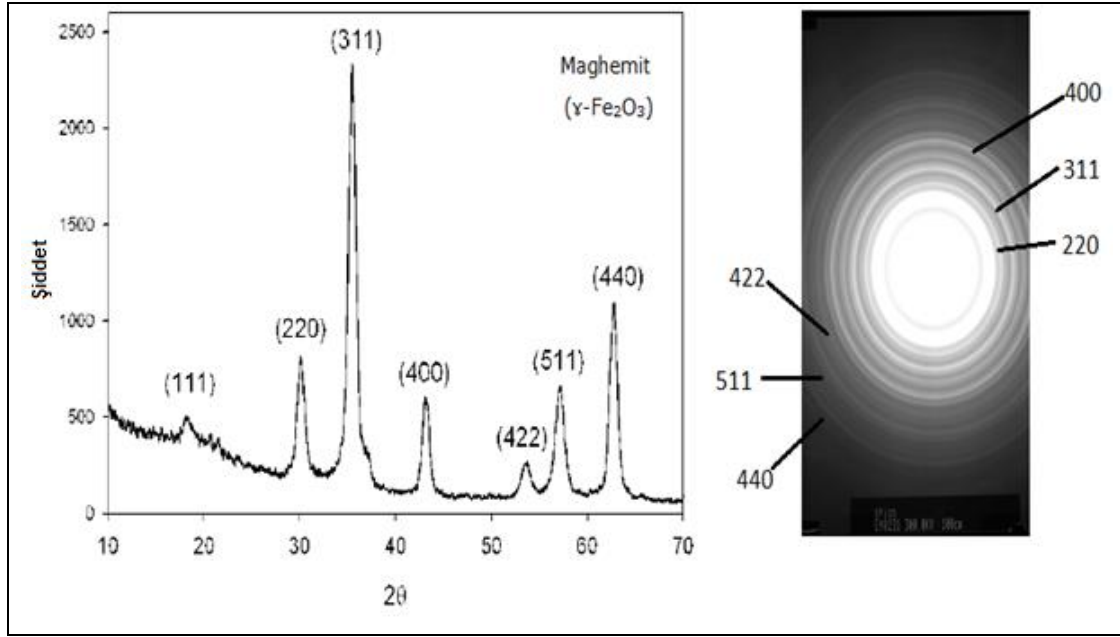
değeri ise 0.166 olarak saptanmış ve dağılımın yüksek oranda monodispers olduğu gözlenmiştir.

Altın kaplı nanopartiküllerin Zeta Sizer cihazı ile hidrodinamik çapları; 78.36 nm, polidispersite indeks değeri ise; 0.203 olarak belirlenmiştir. Altın kaplı nanopartiküllerin polidispersite indeksinin altın ile kaplı olmayan nanopartiküllere göre daha büyük bir değer olması, daha az monodispers olduklarına işaret etmektedir.



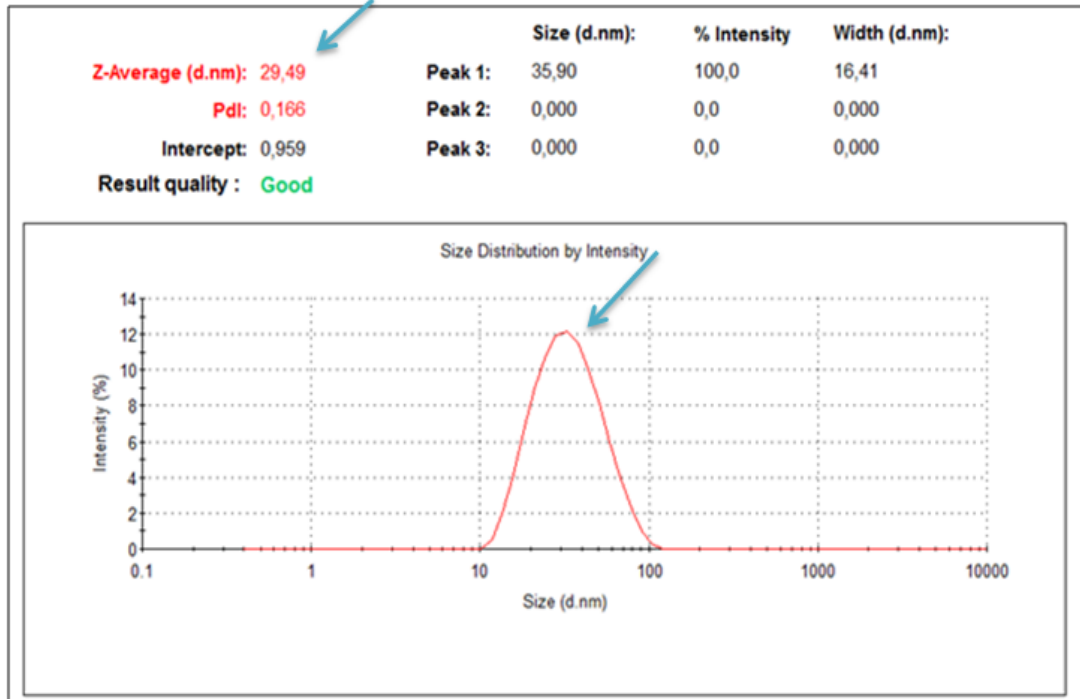
Şekil 4.3. (A, B) Sentezlenen SPION'ların TEM Görüntüleri (20 nm skala bar), (C, D) Altın kaplı SPION'ların TEM ve HR-TEM görüntüsü (100 nm ve 20 nm skala bar)



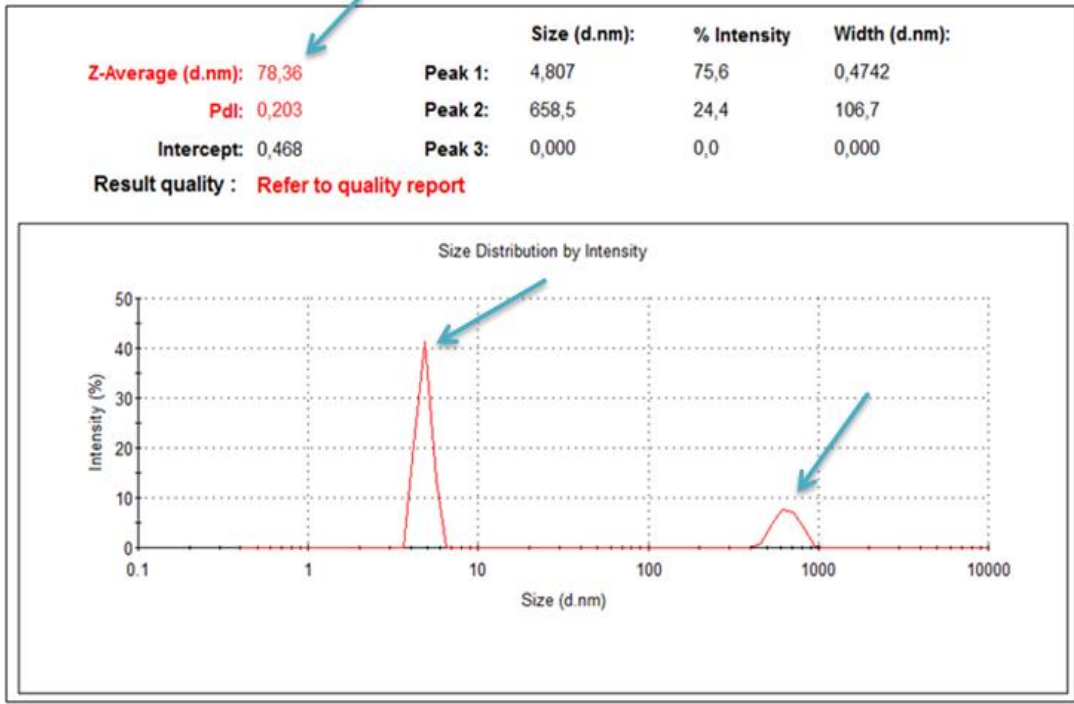


Şekil 4.4. (A) Standard maghemit XRD (X-Işını Kırınımı) deseni (B) Sentezlenen SPION'ların elektron kırınım deseni

Ayrıca; altın kaplı nanopartiküllerin hidrodinamik çaplarının ölçümü esnasında aglomerasyon eğilimlerinin olduğu ve bu nedenle ikinci bir pikin daha grafikte gözlemlendiği görülmüştür.



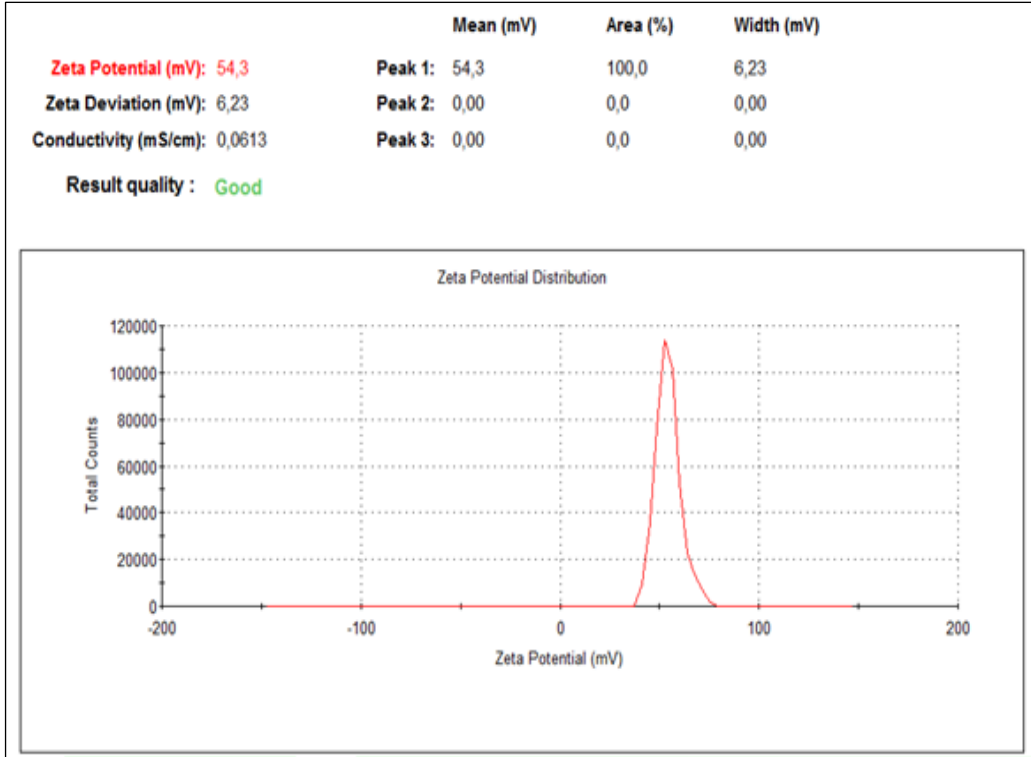
Şekil 4.5. SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile boyut ölçüm grafiği ve partikül büyüklüğü dağılımı değerleri



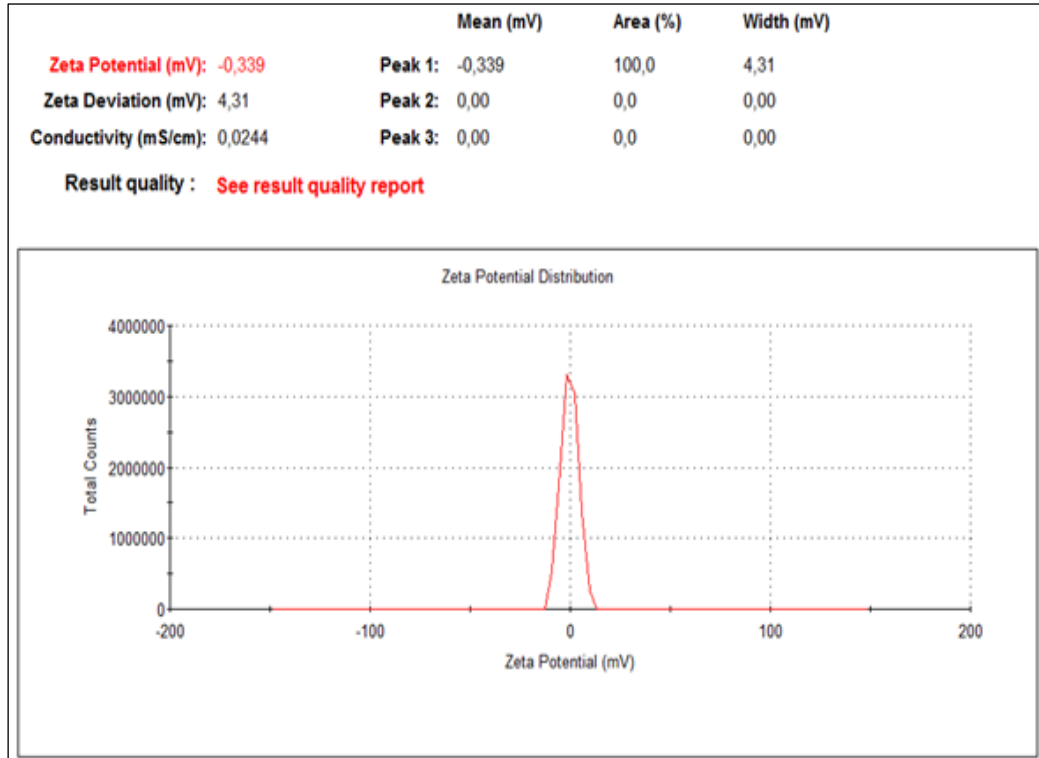
Şekil 4.6. Altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile boyut ölçüm grafiği ve partikül büyüklüğü dağılımı değerleri

Sentezi gerçekleştirilen nanopartiküllerin zeta potansiyelleri de aynı cihaz ile ölçülmüştür. Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen SPION ve altın tabaka ile kaplı SPION'ların zeta potansiyel değerleri sırası ile Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de sunulmuştur. Yapılan ölçümler sonucunda SPION'ların zeta potansiyel değeri, +54.3 mV olarak bulunmuştur. Bu değer, sentezi gerçekleştirilen SPION'ların herhangi bir dengeleyici ajan kullanımına gerek olmaksızın, kararlı halde olduklarının göstergesidir. Altın tabaka ile kaplı SPION'ların zeta potansiyel değeri ise, -0.339 mV olarak bulunmuştur.

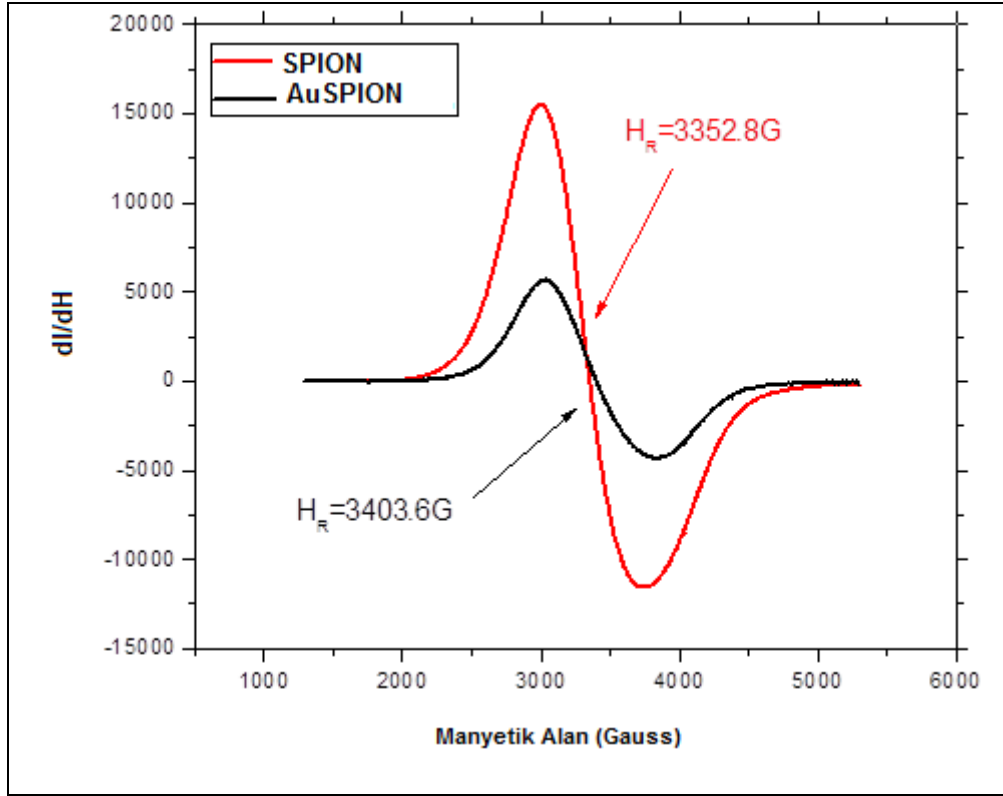
Sentezi gerçekleştirilen SPION'ların manyetik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ESR Spektrometresi kullanılmıştır. Sıvı formdaki örneklerin ölçümleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ESR Spektrumu Şekil 4.9'da, spektrumdan elde edilen değerler ise Çizelge 4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. SPION'ların Zeta Potansiyel ölçüm grafiği ve değerleri



Şekil 4.8. Altın tabaka ile kaplı SPION'ların Zeta Potansiyel ölçüm grafiği ve değerleri



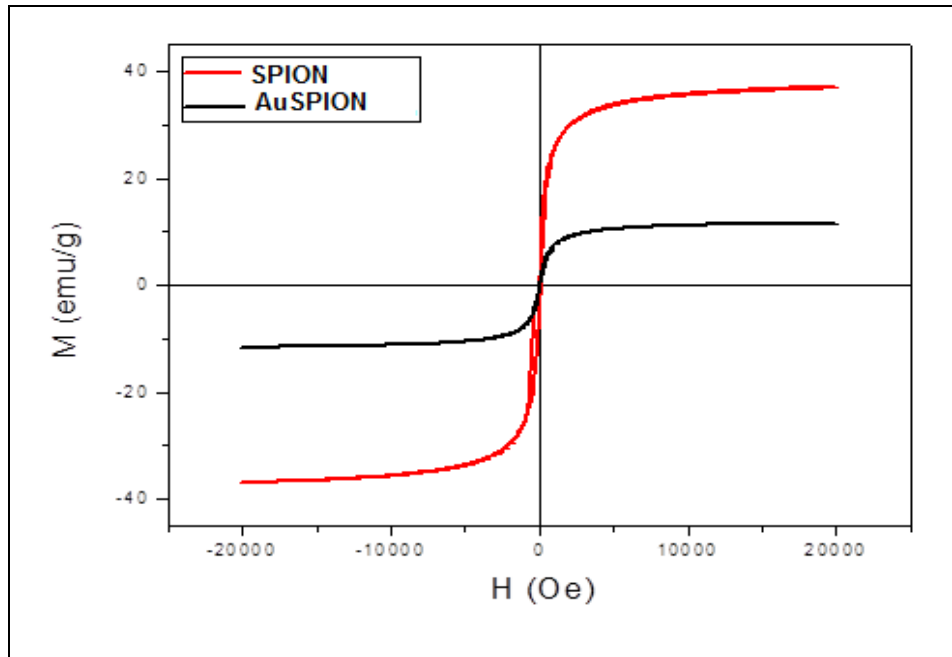
Şekil 4.9. SPION ve AuSPION'ların ESR Spektrumu

Sentezlenen SPION'ların manyetik özellikleri ayrıca VSM olarak adlandırılan Titreşimli Manyetometre Cihazı ile de belirlenmiştir. Şekil 4.10'da sentezlenen manyetik demir oksit nanopartiküllerin Manyetizasyon–Manyetik Alan Eğrisi (M-H) sunulmuştur. Şekil 4.10'da sunulan M-H eğrisi'nde sentezlenen nanopartiküllerin 19998.3915 Oe manyetik alanda 36.89963 emu/g manyetizasyon sergilediği gözlenmiştir. Altın kaplı manyetik demir oksit nanopartiküllerin ise; 19998.199 Oe manyetik alanda 11.59965 emu/g manyetizasyon sergilediği görülmüştür. Altın tabaka ile kaplanma sonucunda, manyetik çekirdek demir oksit yapının etrafında bir kabuk yapısı oluşturmakta bu nedenle, manyetik nanopartiküllerin doygunluk mıknatıslığı azalmaktadır. Uygulanan manyetik alan altında histerezis eğrisi oluşturmadığından, sentezlenen altın kaplı ve altın kaplı olmayan manyetik demir oksit nanopartiküllerin "süperparamanyetik" davranış sergilediği görülmektedir.

**Çizelge 4.3.** SPION ve AuSPION'ların ESR Spektrumundan elde edilen G,  $\Delta H$  ve HR değerleri

Maghemit ( $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	G	$\Delta H$	HR
SPION	2.10044G	740.2G	3352.8G
AuSPION	2.06805G	793.7G	3403.6G

Yığın haldeki maghemitin 60-80 emu/g doygunluk mıknatıslığı sergilediği bilinmektedir. Bu değer yığın haldeki maghemitin sergilediği değerden oldukça düşük bir değer olduğu görülmektedir. Bu sonucun toz örneğe göre daha düşük konsantrasyona sahip sıvı formdaki örnek ile ölçüm yapılmasına bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Şekil 4.10'daki eğrilere bakıldığında; altın kaplı ve altın kaplı olmayan her iki nanopartikülün de sıfır koersivite ile süperparamanyetik davranış sergiledikleri görülmektedir.



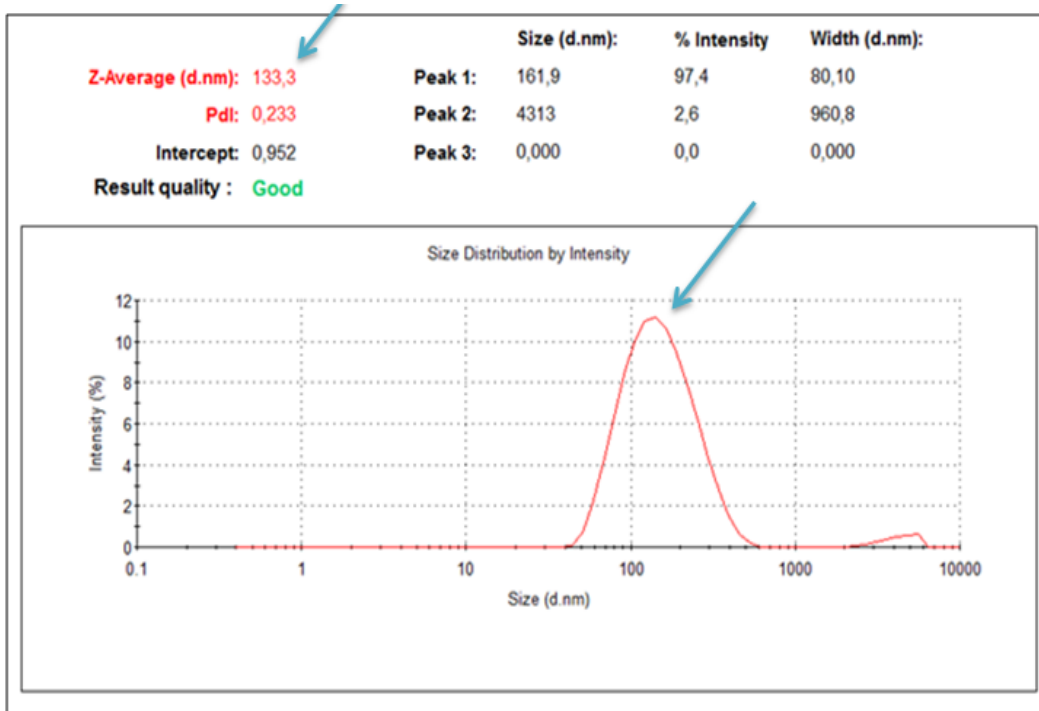
Şekil 4.10. SPION ve AuSPION'ların M-H eğrisi

## 4.2. Antibadi ve Aptamer İmmobilizasyonu

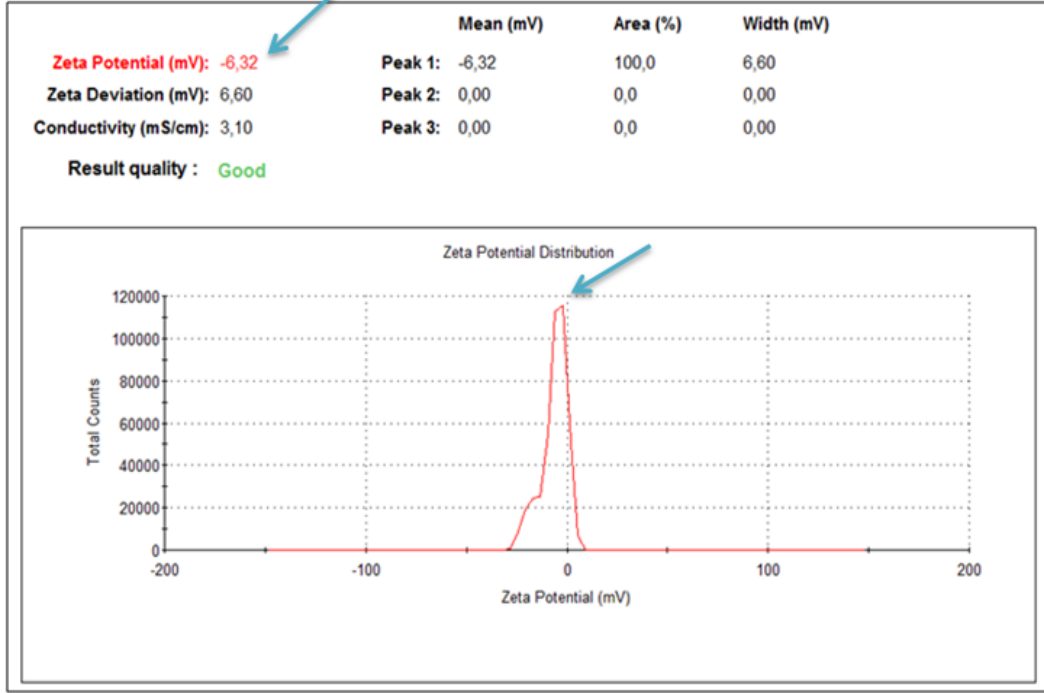
280 nm dalga boyundaki ve FITC için maksimum dalga boyu olan 495 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiş ve bağlanma derecesi 9.57 mol FITC'ye karşılık 1 mol antibadi olarak hesaplanmıştır.

Sentezlenen SPION'ların altın tabaka ile kaplanmasının ardından, altın tabaka üzerindeki yüzey üzerine anti-EGFR monoklonal antibadilerin immobilize edilebilmesi için, öncelikle SH-PEG-COOH moleküllerinin yüzey üzerinde "kendiliğinden yerleşmeleri" sağlanmıştır. Antibadi immobilizasyonu öncesinde gerçekleştirilen son modifikasyon işlemi olan bu aşamadan sonra, hazırlanan SPION'ların yüzey yükleri ve boyutları Zeta Sizer Cihazı ile belirlenmiş ve elde edilen veriler Şekil 4.11 ve 4.12'de sunulmuştur.

Antibadi ve aptamer immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra yapılan hesaplamalar sonucunda; "teorik olarak" her bir SPION'a yaklaşık olarak sırası ile 33 adet anti-EGFR antibadi ve 40 adet anti-EGFR aptamer immobilize edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Yüzeyinde SAMs oluşturulmuş altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile boyut ölçüm grafiği ve partikül büyüklüğü dağılımı değerleri



Şekil 4.12. Yüzeyinde SAMs oluşturulmuş altın kaplı SPION'ların Zeta Potansiyeli ölçüm grafiği ve değerleri

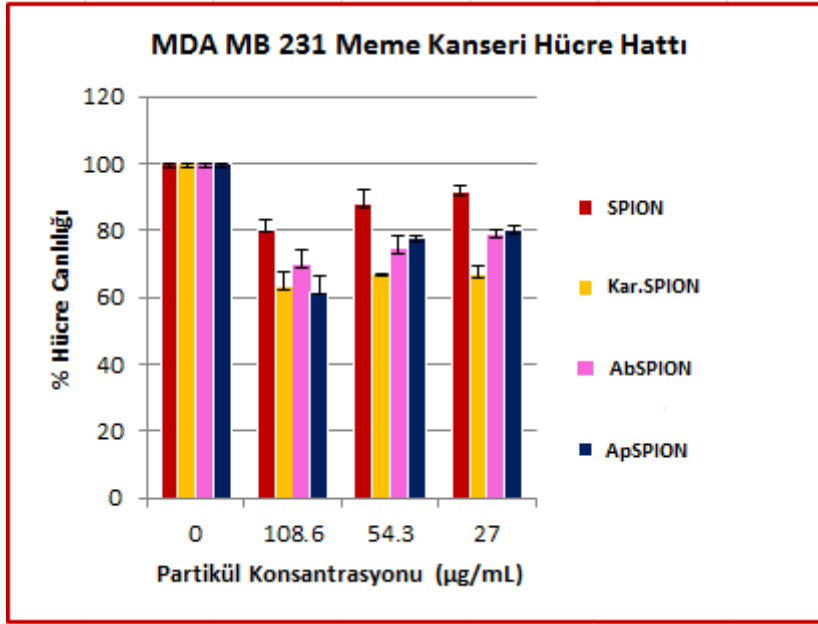
SPION'ların yüzeyine anti-EGFR monoklonal antibadi ve aptamerlerinin bağlanma etkinliği, Nanodrop Cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler ile; AbSPION için %71 ve ApSPION için %82.59 olarak bulunmuştur.

### 4.3. Sitotoksosite Çalışmaları

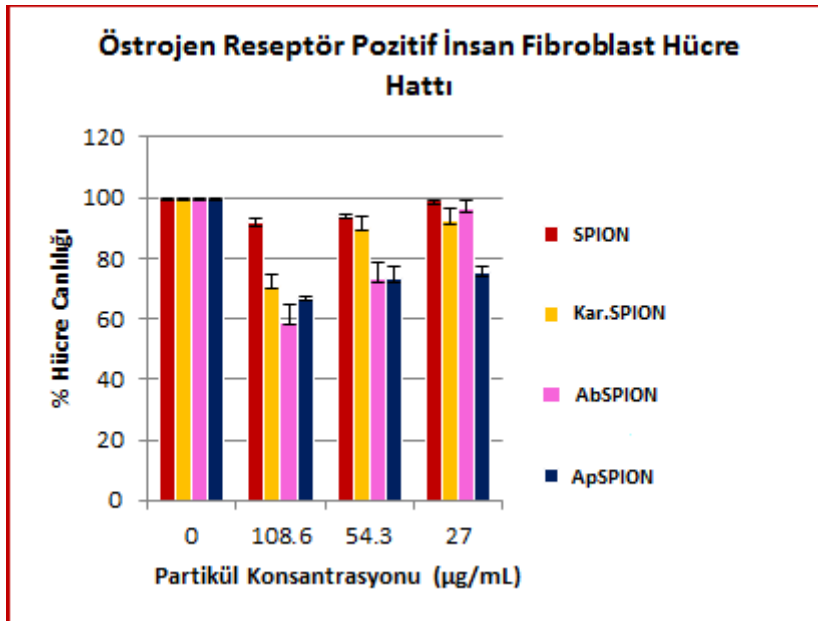
Hücre canlılığının belirlenebilmesi amacı ile gerçekleştirilen WST-1 Testi sonunda, 96 kuyucuklu plakanın absorbans değerleri ELISA plaka okuyucuda 420-480 nm'de okunmuş ve analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.13 ve 4.14'de sunulmuştur.

WST-1 Testi ile elde edilen veriler doğrultusunda; MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerine uygulanan nanopartiküllerden, 27.15 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere uygulanan SPION'ların %92 oranı ile en yüksek hücre canlılığı sergileyen nanopartikül grubu olduğu, 108.6 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere uygulanan yüzeyine aptamer

immobilize edilmiş SPION'ların ise %62.3 oranı ile en düşük hücre canlılığı sergileyen nanopartikül grubu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.13. MDA MB 231 insan meme kanseri hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan partiküllerin WST-1 Testi ile belirlenen % hücre canlılığı grafiği



Şekil 4.14. Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan partiküllerin WST-1 Testi ile belirlenen % hücre canlılığı grafiği

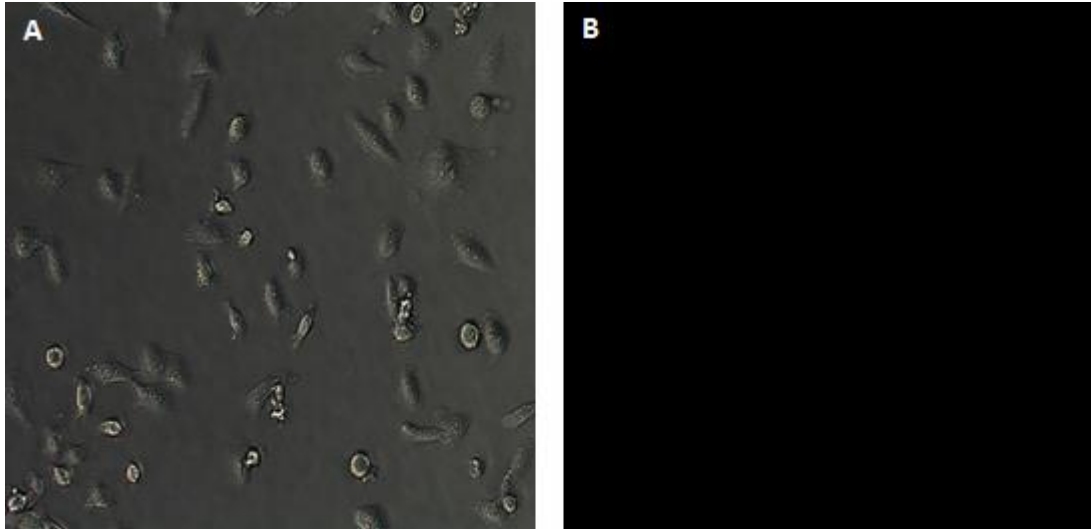


Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücrelerine uygulanan nanopartiküllerden, 27.15 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere uygulanan SPION'ların %99.2 oranı en yüksek hücre canlılığına sahip olduğu, 108.6 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere uygulanan yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'ların ise %59.2 oranı ile en düşük hücre canlılığı sergilediği görülmüştür.

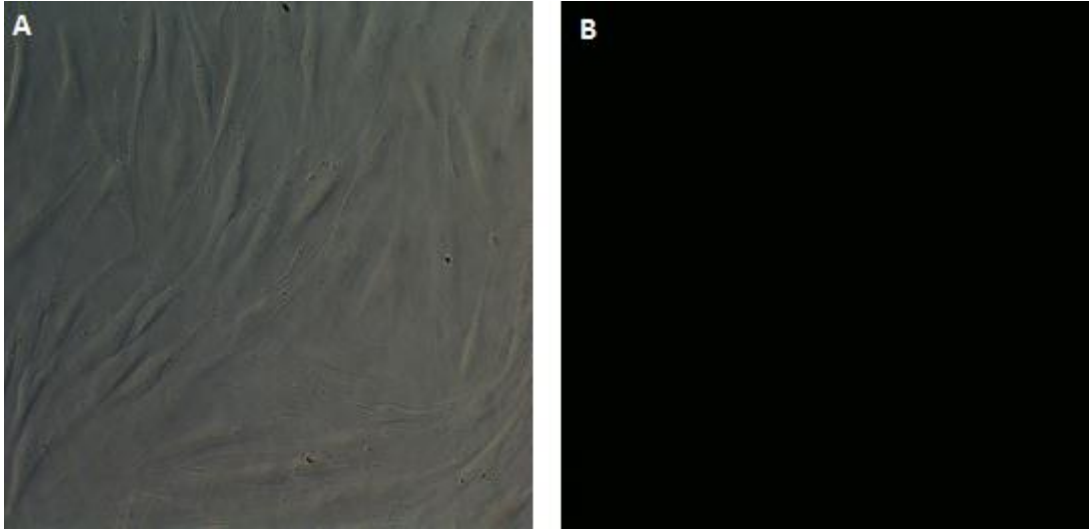
WST-1 Testi ile elde edilen veriler doğrultusunda, genel olarak nanopartikül ve nanopartikül-konjugatlarının hücre canlılığı üzerinde toksik etkisinin olmadığı ve hücre proliferasyonunu engellemediği belirlenmiştir.

#### **4.4. Hedeflemenin Floresan Mikroskop ile Gösterilmesi**

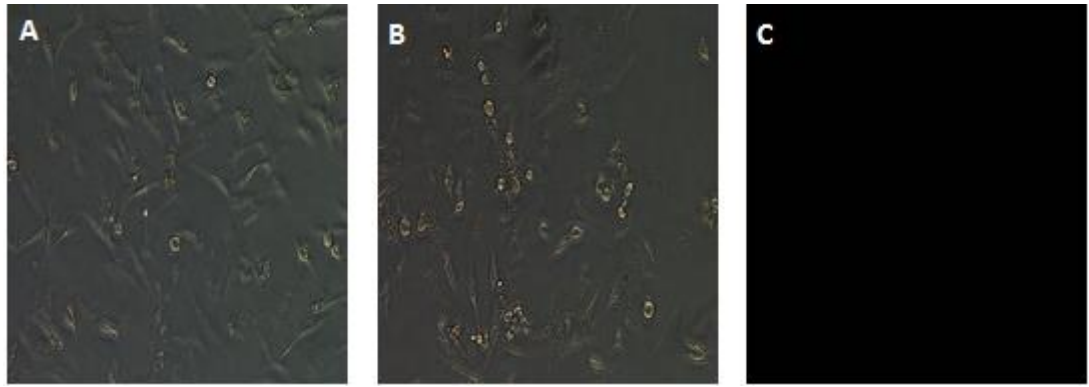
MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin Şekil 4.15'de, östrojen pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ışık ve floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.16'da sunulmuştur.



Şekil 4.15. MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)

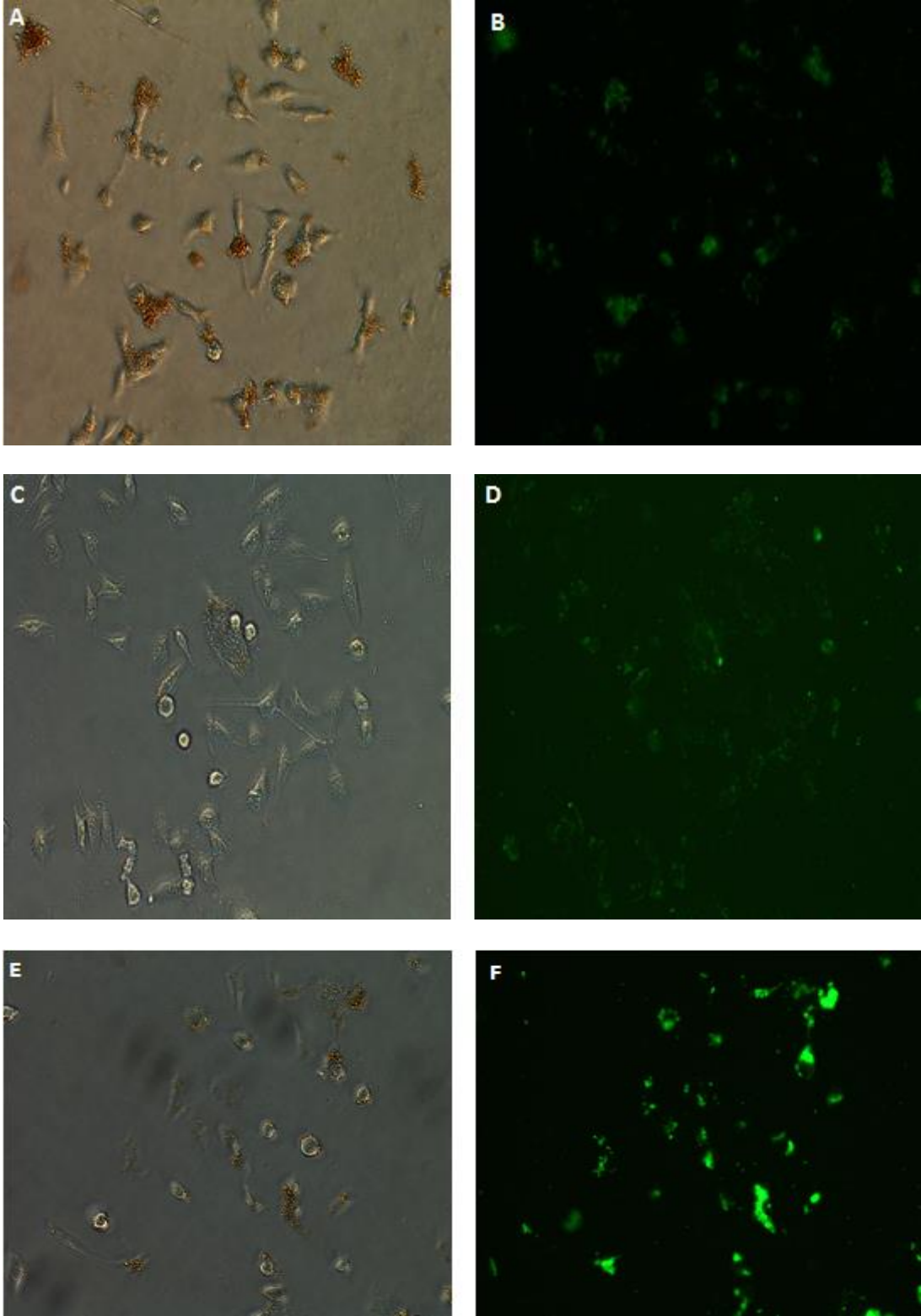


Şekil 4.16. Östrojen pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri (50  $\mu$ m ve 200X büyütme)

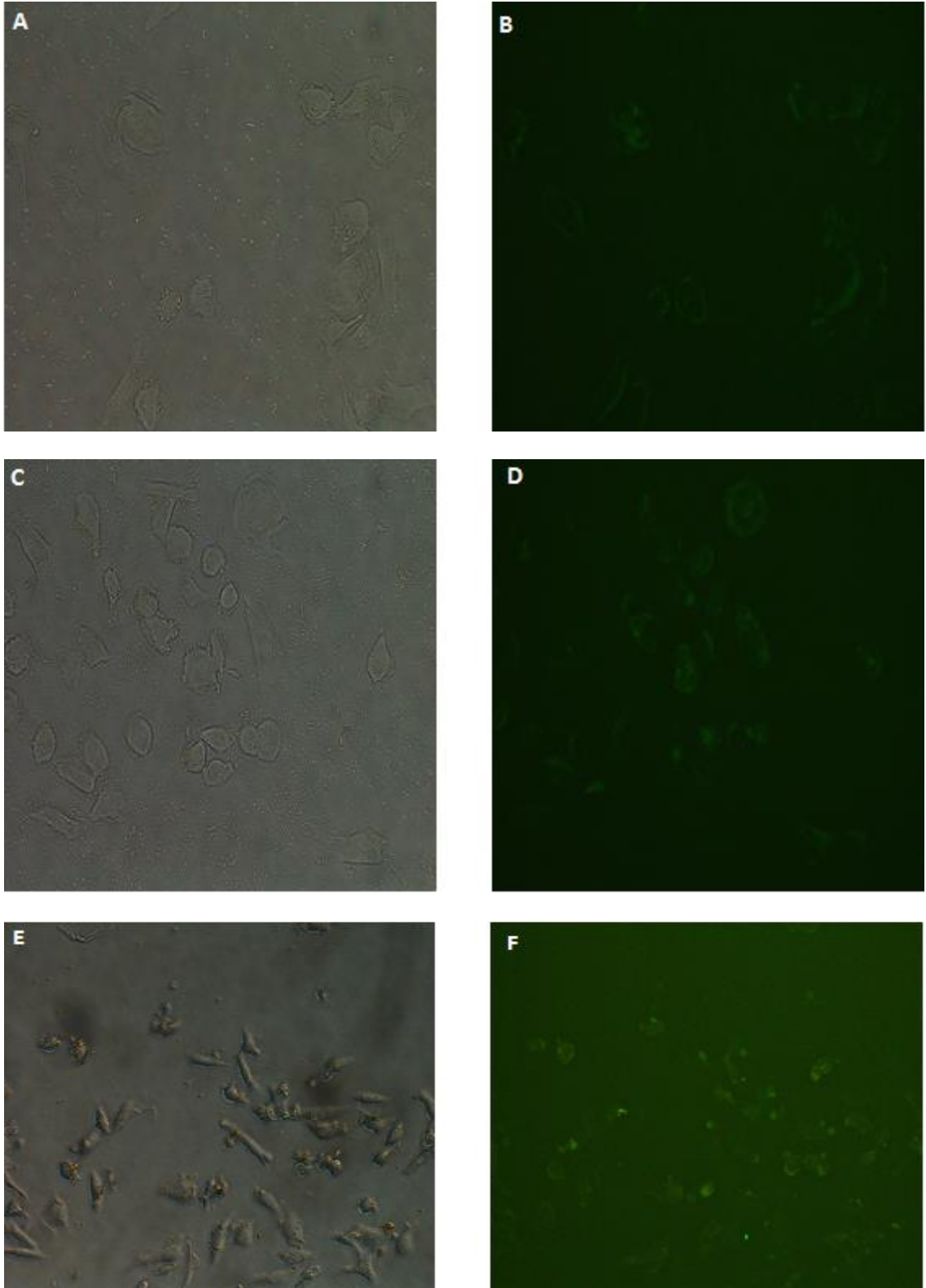


Şekil 4.17. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilen SPION (A) ve Kar.SPION'ların (B) ışık ve floresan (C) mikroskop görüntüleri (50  $\mu$ m ve 200X büyütme)

MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilen SPION ve Kar.SPION'ların ışık ve floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.17'de, gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında üretilen FITC işaretli anti-EGFR monoklonal antibadi-SPION ve FITC işaretli anti-EGFR aptamer-SPION konjugatları ile tümör hücrelerinin hedeflendiğini gösteren ışık ve floresan mikroskop görüntüleri de Şekil 4.18 ve 4.19'da sunulmuştur.



Şekil 4.18. AbSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)



Şekil 4.19. ApSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)

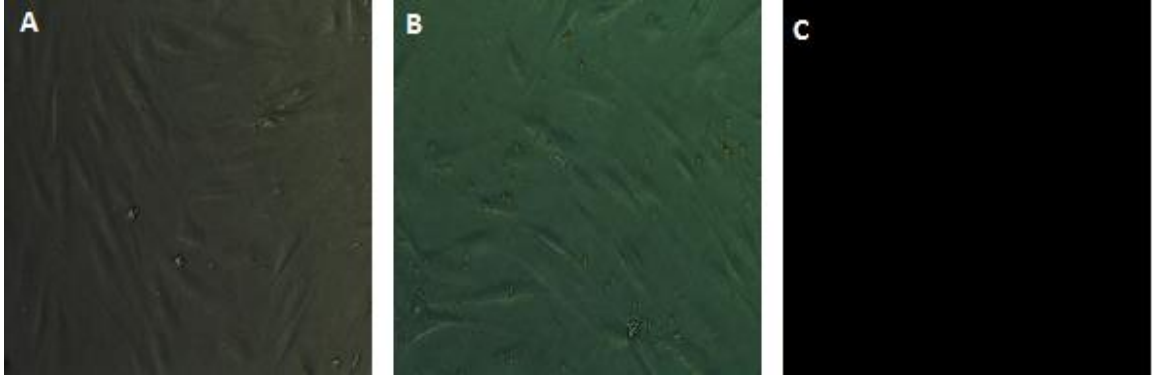
Şekil 4.15'de MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin, Şekil 4.16'de östrojen pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri görülmektedir. Kontrol hücreleri herhangi bir molekül ile etkileştirilmedikleri için, floresan mikroskopta herhangi bir floresan ışımaya görülmemektedir.

Şekil 4.17'de SPION (A) ve karboksil fonksiyonel grupları ile modifiye edilmiş SPION'ların (B) MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık ve floresan (C) mikroskop görüntüleri görülmektedir. SPION ve Kar.SPION'ların yüzeyine anti-EGFR antibadi ya da aptamer immobilize edilmemiş olduğu için, floresan mikroskopta herhangi bir floresan ışımaya görülmemiştir.

Şekil 4.18'de yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş ve Şekil 4.19'da yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş SPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri görülmektedir. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'daki ışık mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri karşılaştırıldığında; ışık mikroskopta lokasyonları tam olarak görülen hücrelerin floresan mikroskop altında net bir şekilde floresan ışımaya yaptıkları gözlenmektedir. Hücrelerin olmadığı bölümlerde floresan ışımaya yoktur. Dolayısıyla, sentezi ve tasarımı gerçekleştirilen yüzeyine antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların, MDA MB 231 insan meme kanseri hücre yüzeylerindeki epidermal büyüme faktörü reseptörlerine net bir şekilde bağlandıkları ve hedeflemenin doğru bir şekilde gerçekleştirildiği görülmüş ve görüntülenmiştir.

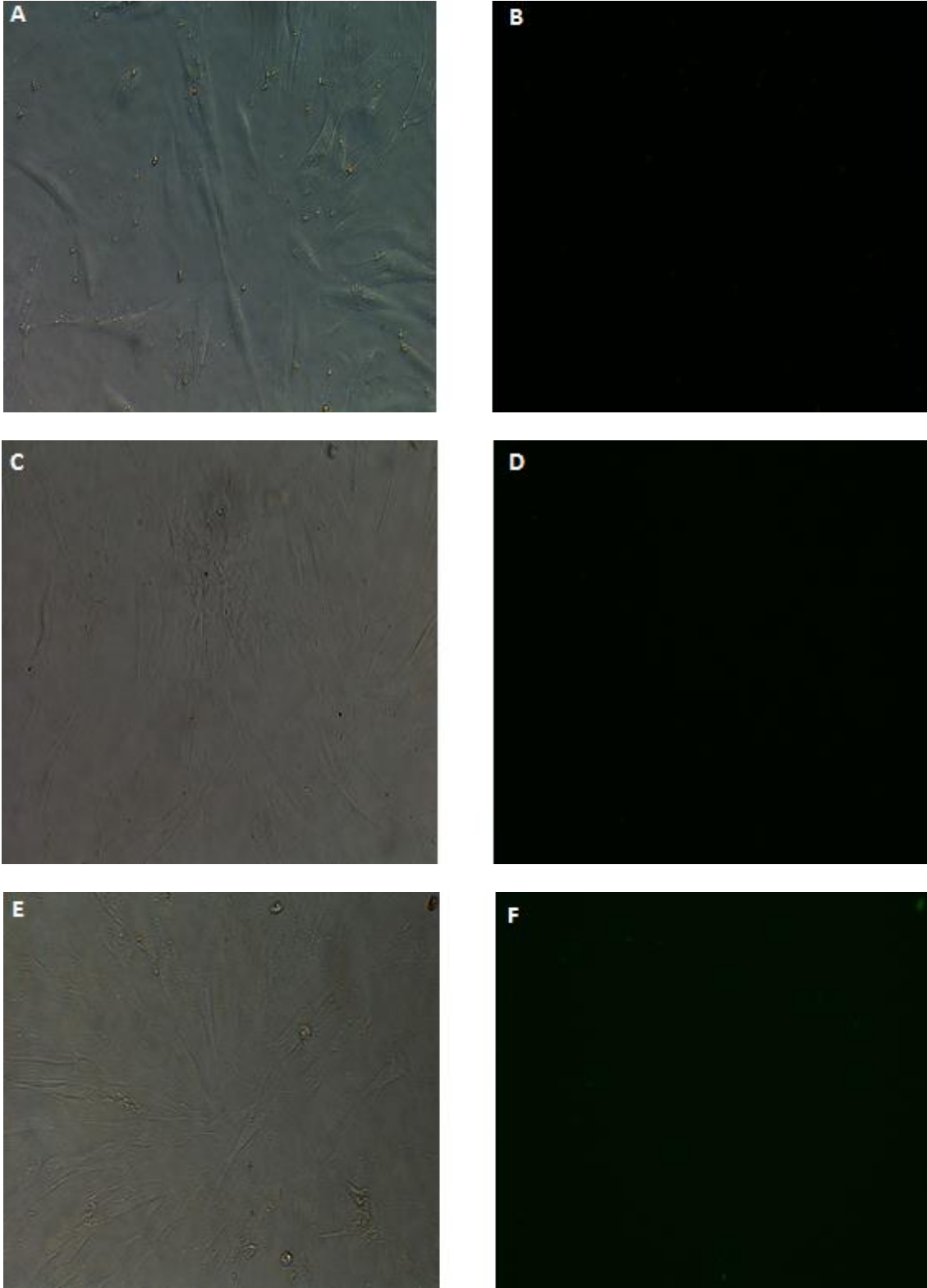
Şekil 4.20'de SPION (A) ve karboksil fonksiyonel grupları ile modifiye edilmiş SPION'ların (B) östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık ve floresan (C) mikroskop görüntüleri verilmiştir. Östrojen pozitif insan fibroblast hücrelerinin yüzeyinde EGFR reseptörleri bulunmamaktadır ve ayrıca bu hücreler ile etkileştirilen SPION ve Kar.SPION'ların yüzeyine anti-EGFR antibadileri ya da

aptamerleri immobilize edilmemiştir. Bu nedenle, floresan mikroskopta herhangi bir floresan ışımaya görülmemektedir.



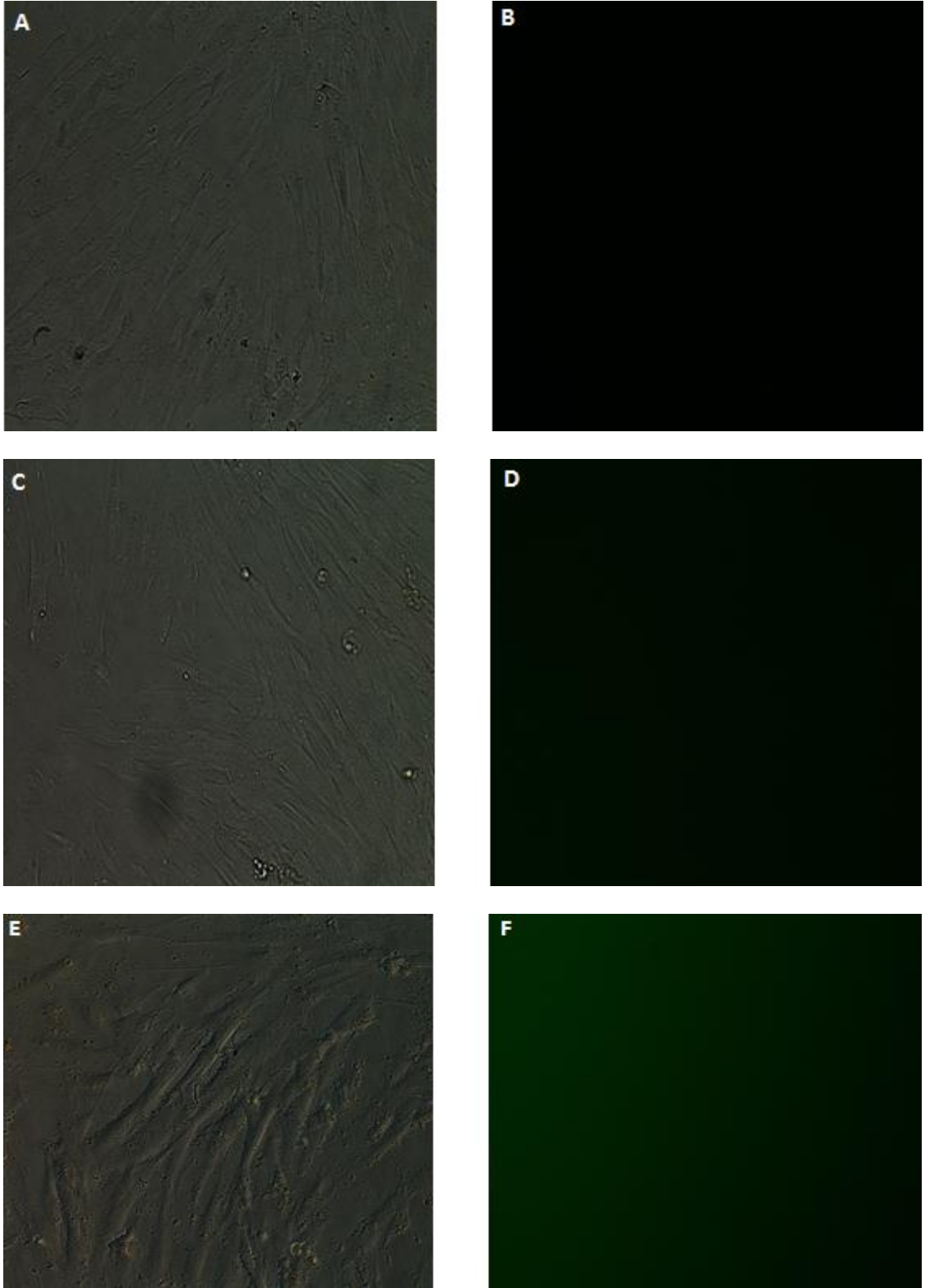
Şekil 4.20. Östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirilen SPION (A) ve Kar.SPION'ların (B) ışık ve floresan (C) mikroskop görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)

Şekil 4.21'de yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş ve Şekil 4.22'de yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş SPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri görülmektedir. Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'deki ışık mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri karşılaştırıldığında; floresan mikroskopta herhangi bir ışımaya olmadığı görülmektedir. Östrojen pozitif insan fibroblast hücrelerinin yüzeyinde EGFR reseptörleri bulunmamaktadır ve bu hücreler ile etkileştirilen anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların etkileşecekleri EGFR reseptörleri hücre yüzeyinde mevcut olmadığı için floresan mikroskopta herhangi bir floresan ışımaya yoktur. Işık mikroskop görüntüleri incelendiğinde de, partiküllerin östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücrelerinin yüzeyinde gelişigüzel bir şekilde dağıldıkları, hücrelerin aralarında yer alan boşluklardan da gözlemlendiği üzere, hücre yüzeyine spesifik bir yerleşim sergilemedikleri görülmektedir.



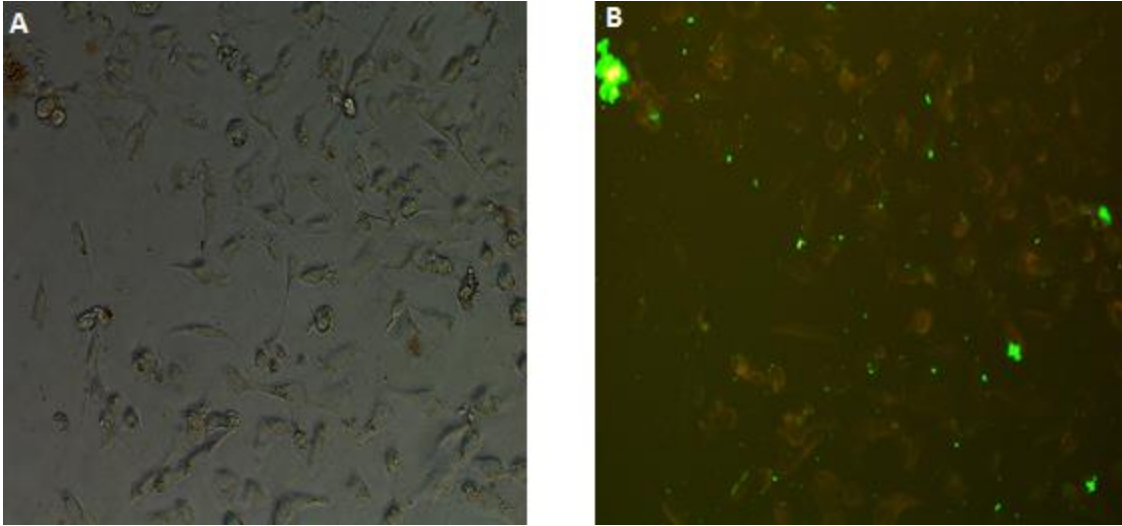
Şekil 4.21. AbSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)



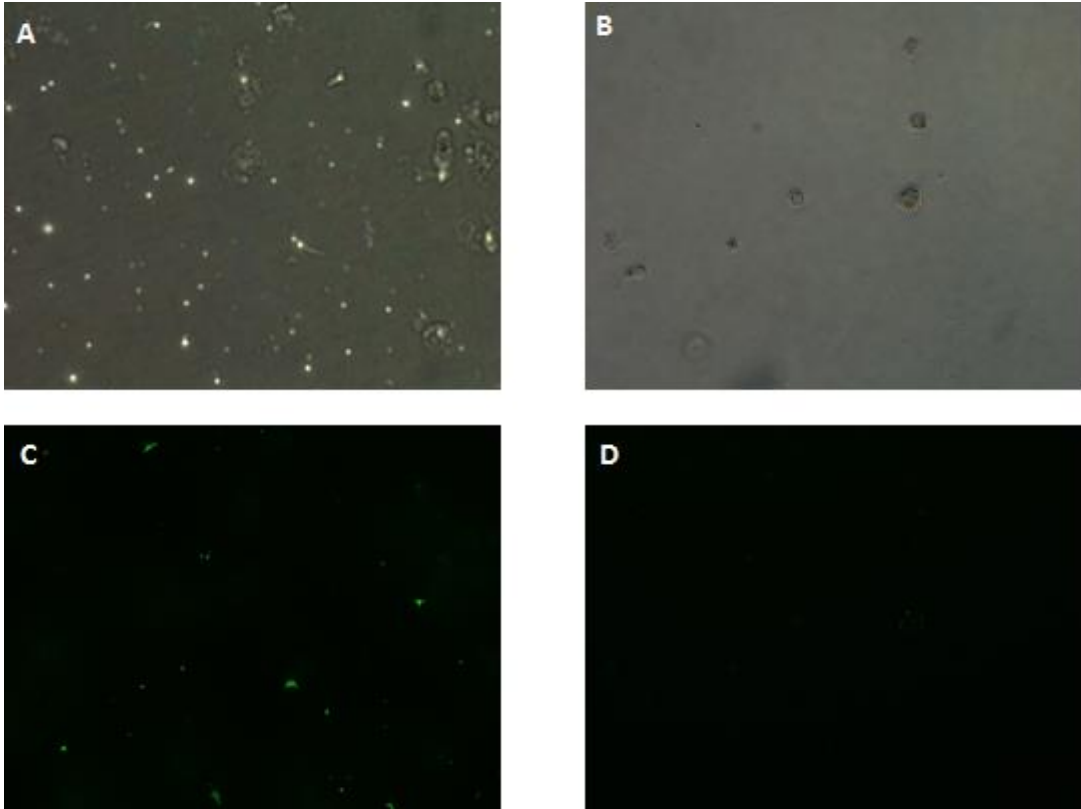


Şekil 4.22. ApSPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A,C,E) ve floresan (B,D,F) mikroskop görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)





Şekil 4.23. AbSPION ve ApSPION'ların ( $54.3 \mu\text{g/mL}$ ), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri ( $50 \mu\text{m}$  ve  $200\text{X}$  büyütme)



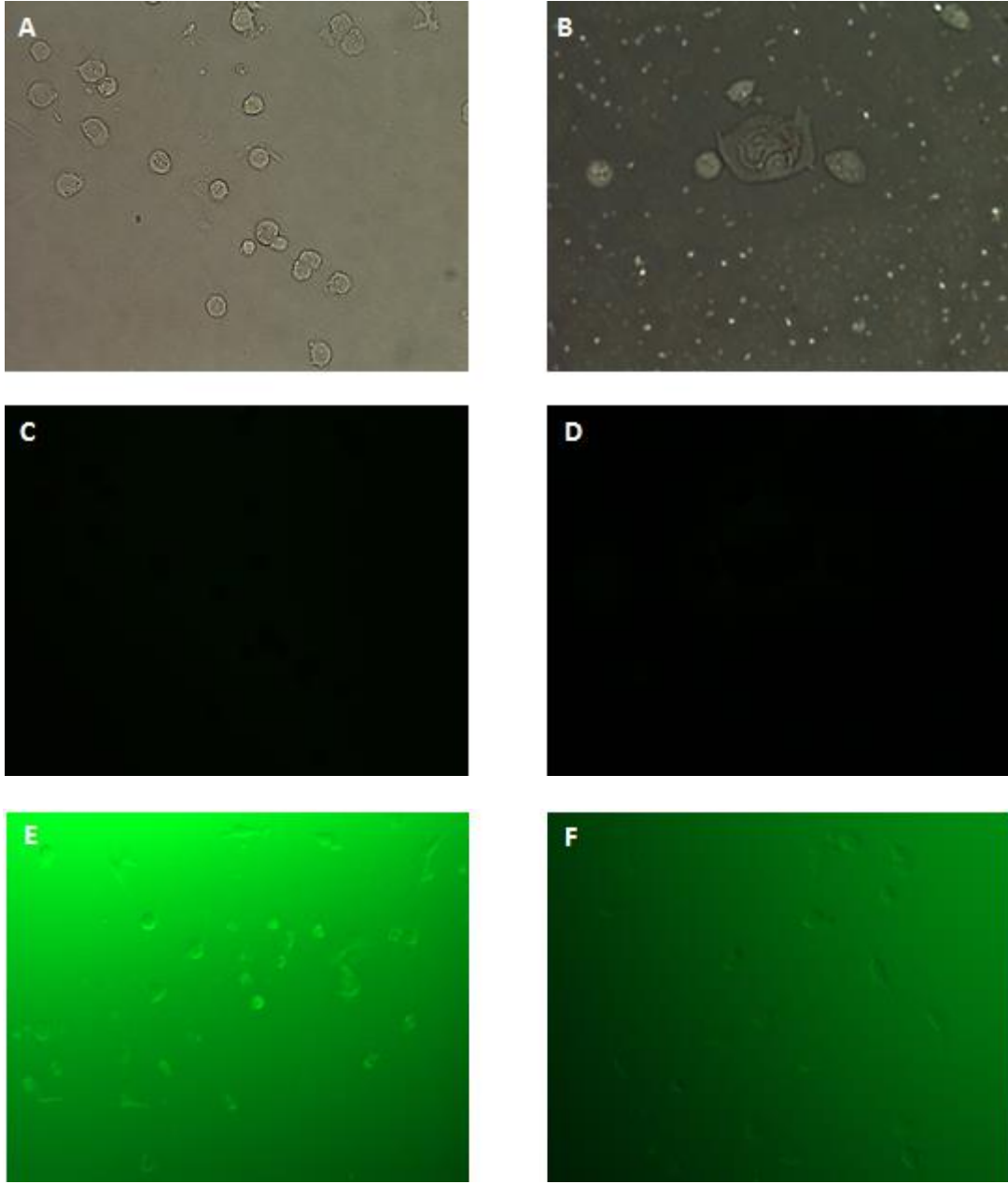
Şekil 4.24. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş anti-EGFR antibadilerinin ışık (A,B) ve floresan (C,D) mikroskop görüntüleri ( $50 \mu\text{m}$  ve  $200\text{X}$  büyütme)

Şekil 4.23'deki çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için, ApSPION'lar FITC'den farklı bir floresan boya olan ve kırmızımsı-turuncu renkte ışımaya yapan TAMRA floresan boya ile, AbSPION'lar yine aynı şekilde yeşil renkte ışımaya yapan FITC boya ile etiketlenmişlerdir.

Burada amaç, MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile aynı anda etkileştirilen anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların hücre kültür kuyucuğunda tümör hücre seçiciliklerinin karşılaştırılabilmesidir. Sadece ışık ve floresan mikroskop görüntülerine bakarak floresan ışımaya açısından değerlendirme yapıldığında; yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION'ların, yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'lara göre tümör seçiciliklerinin çok daha yüksek olduğu Şekil 4.23'de görülmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; aptamerlerin antibadi moleküllerine göre çok daha küçük moleküller olmaları ve antibadi molekülleri ile karşılaştırıldığında aptamerlerin daha az sterik engel ile karşılaşmaları sonucu hücre yüzeyinde yer alan reseptörler ile daha kolay etkileştikleri ve bu nedenle tümör seçiciliklerinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Şekil 4.24'de; MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş anti-EGFR antibadilerinin ışık (A,B) ve floresan (C,D) mikroskop görüntüleri sunulmuştur. MDA MB 231 meme kanseri hücreleri ile, herhangi bir taşıyıcı sistem olmadan etkileştirilen anti-EGFR antibadilerinin çok zayıf floresan ışımaya sergiledikleri görülmektedir.

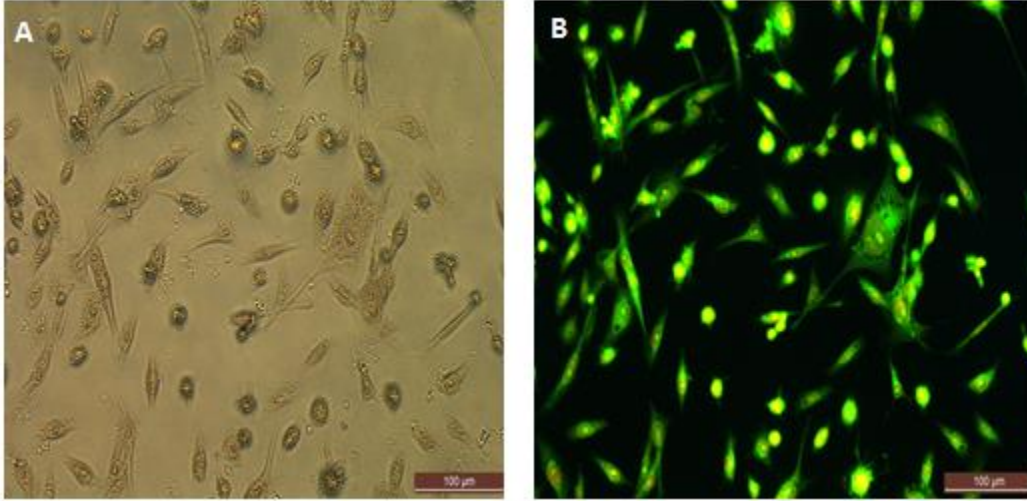
Şekil 4.25'de de MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş anti-EGFR aptamerlerinin ışık (A,B) ve floresan (C,D,E,F) mikroskop görüntüleri görülmektedir. MDA MB 231 meme kanseri hücreleri ile, herhangi bir taşıyıcı sistem olmadan etkileştirilen anti-EGFR aptamerlerinin yok denecek kadar zayıf floresan ışımaya sergilemektedirler. Özellikle Şekil 4.25 (E,F)'de floresan ışığı arttırılmış görüntülerde, aptamerlerin hücrelerin üzerini ve kuyucuk ortamını tamamen kapladıkları görülmüştür.



Şekil 4.25. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş anti-EGFR aptamerlerinin ışık (A,B) ve floresan (C,D,E,F) mikroskop görüntüleri (50  $\mu$ m ve 200X büyütme)

Şekil 4.26'da FITC floresan boya ile işaretlenmiş MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri incelendiğinde, hücrelerin çekirdekleri ile birlikte tüm yüzeylerinin yani hücrelerin tamamının yeşil floresan FITC boya ile boyandığı görülmektedir. Şekil 4.18 ve 4.19'daki MDA MB 231 insan

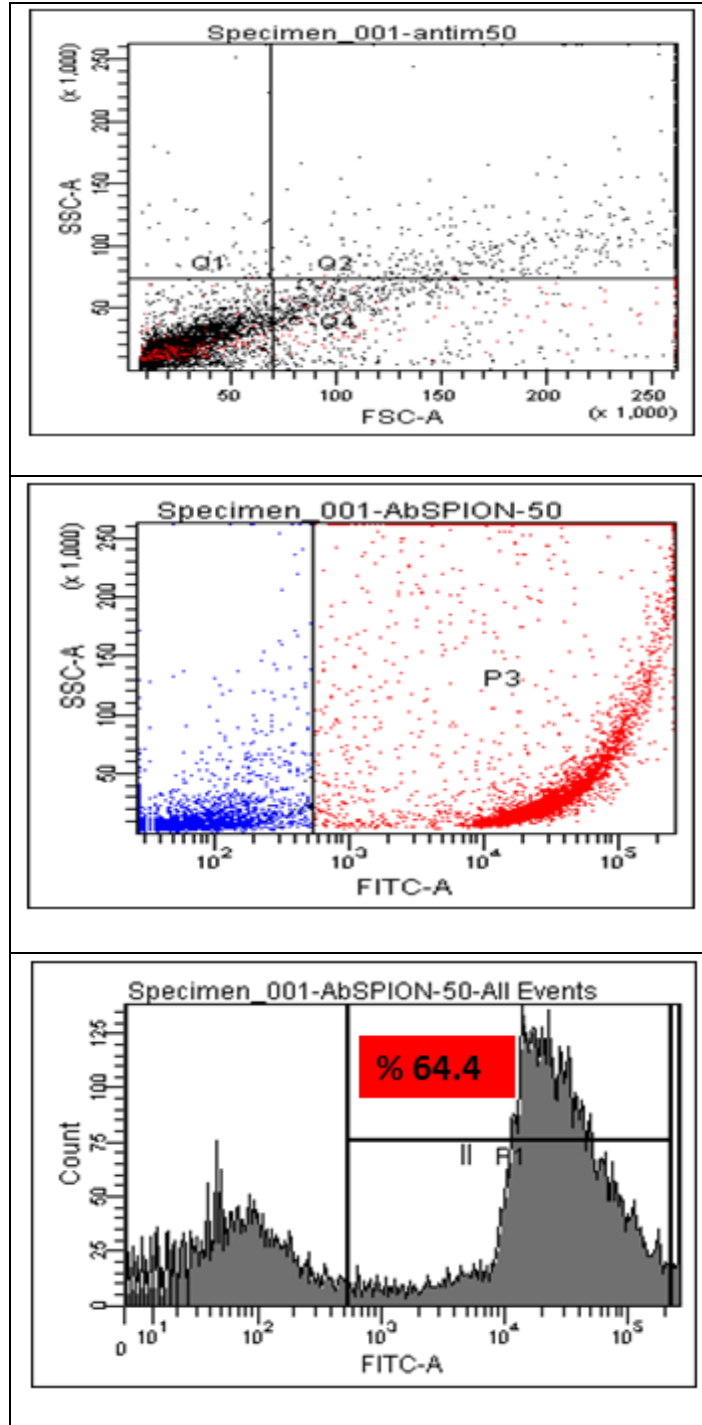
meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş AbSPION ve ApSPION ışık ve floresan mikroskop görüntüleri ile karşılaştırıldığında; birbirlerinden tamamen farklı oldukları, FITC işaretli-antibadi ve aptamer ile hedeflendirilmiş SPION'lar ile etkileştirilen hücrelerin yüzeylerinde, yeşil FITC boyası "lekeli" gibi bir görünüm sergilerken, sadece FITC floresan boya ile etkileştirilen hücrelerin, çekirdekleri de dahil olmak üzere tamamının parlak yeşil renkte boyandığı görülmektedir. Lekeli görünümün; yüzeyine anti-EGFR antibadi ve anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş SPION'ların, hücre yüzeylerinin değişik bölgelerinde yer alan EGFR reseptörleri ile etkileşmesi sonucu oluştuğu çok net olarak görülmektedir.



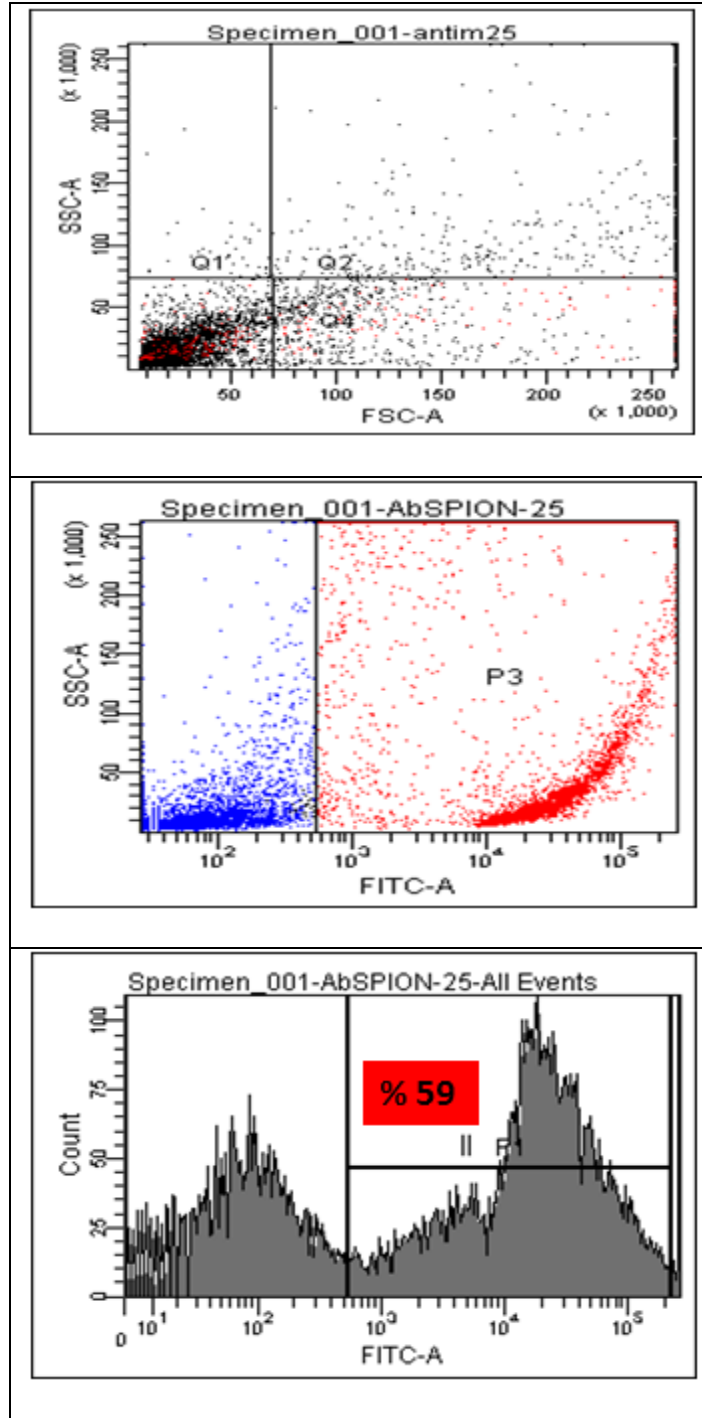
Şekil 4.26. FITC floresan boya ile işaretlenmiş MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri

#### 4.5. Akım Sitometri Analizleri

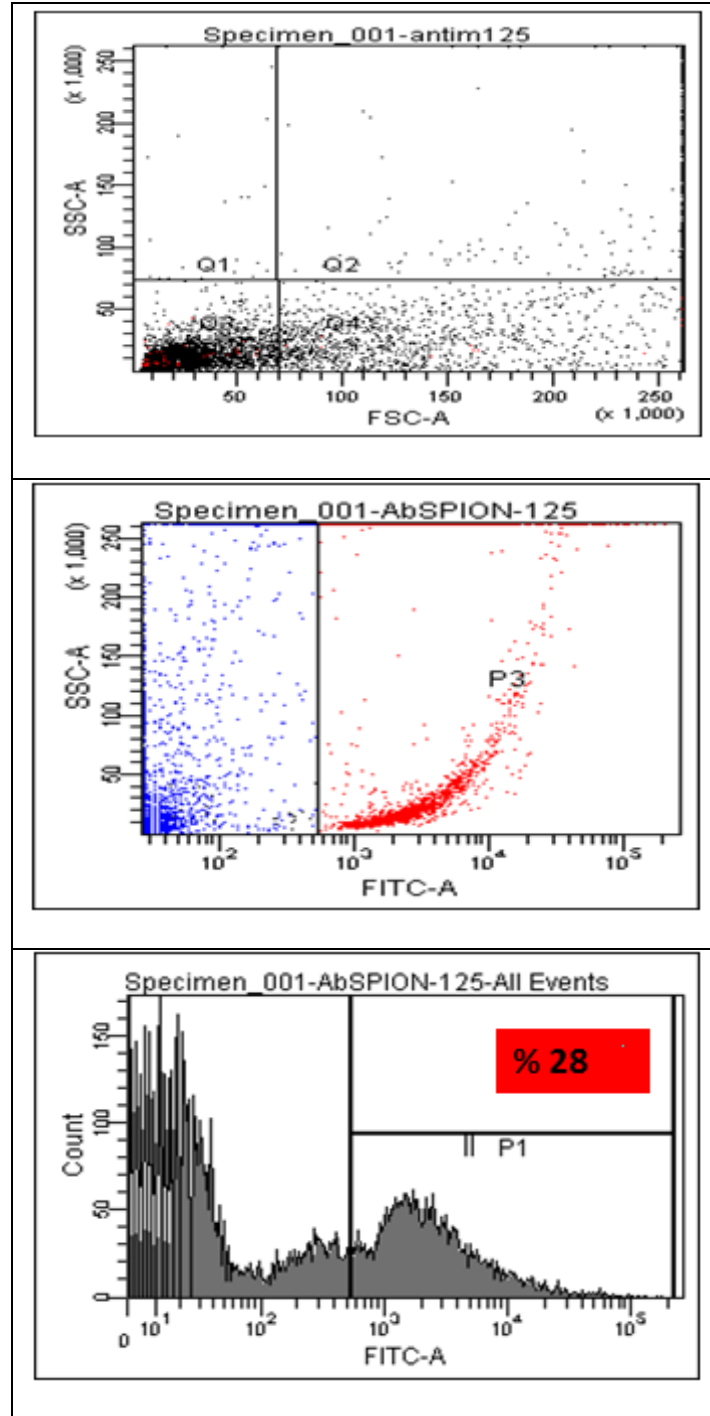
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan SPION-antibadi ve SPION-aptamer konjugatları (yüzeyine anti-EGFR monoklonal antibadi immobilize edilmiş SPION ve yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş SPION) ile etkileştirilmiş olan hücrelerin akım sitometri analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32 ve 4.33'de sunulmuştur.



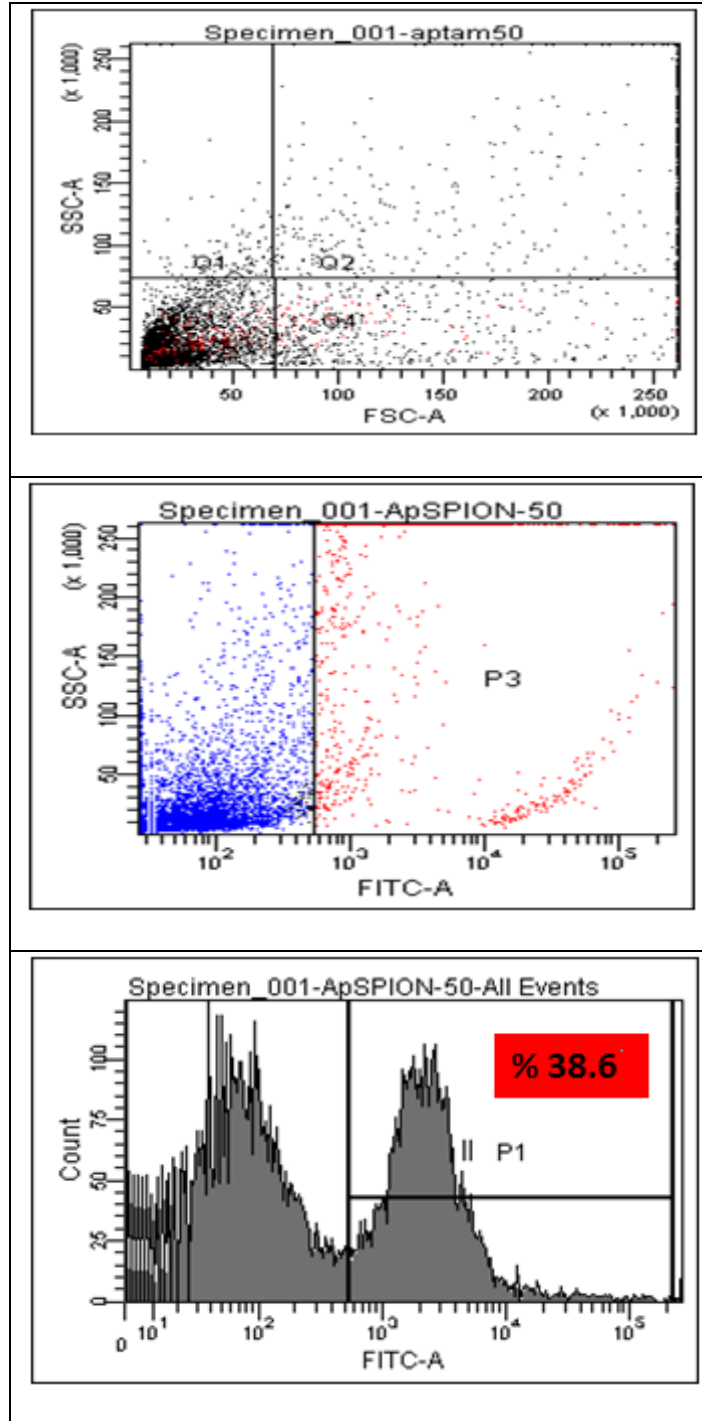
Şekil 4.27. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count)



Şekil 4.28. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count)

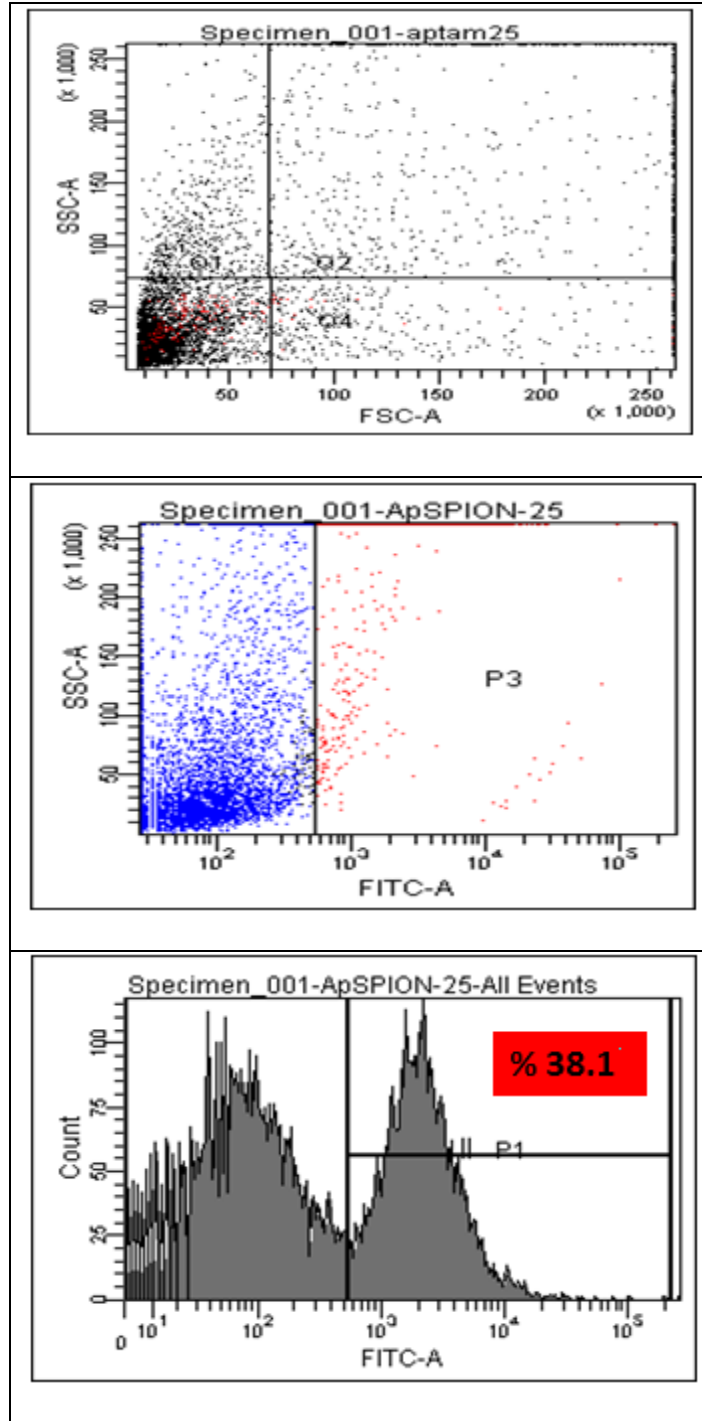


Şekil 4.29. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count)

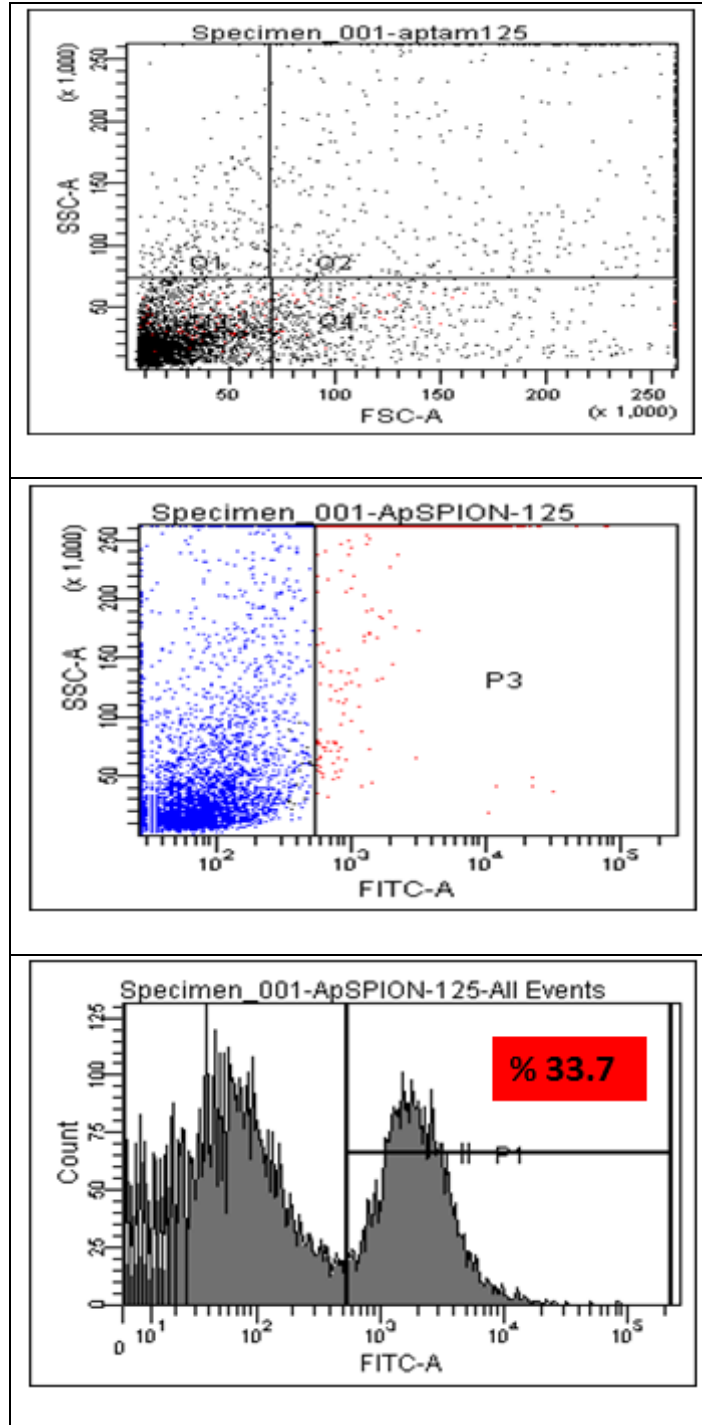


Şekil 4.30. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count)



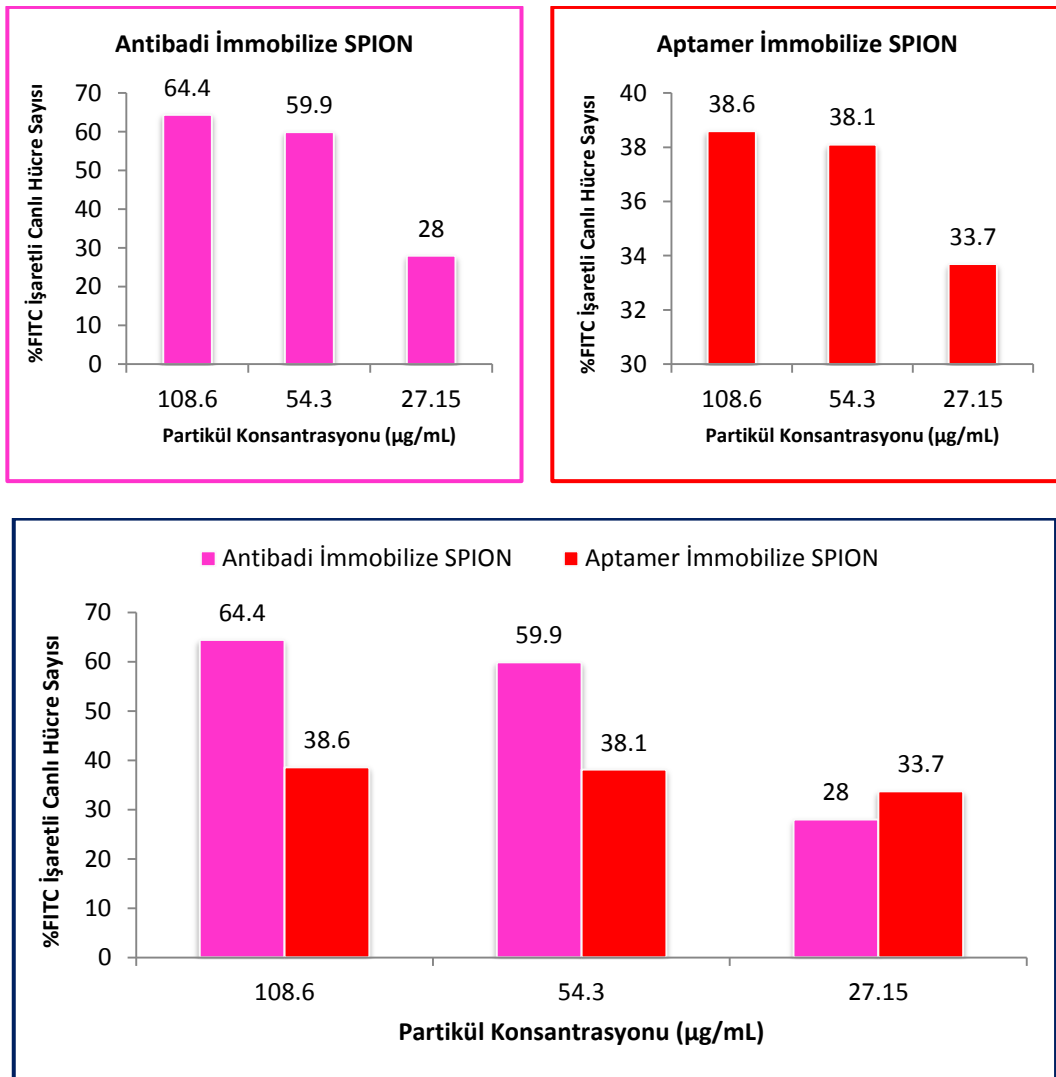


Şekil 4.31. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count)



Şekil 4.32. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların akım sitometri analiz görüntüleri (SSC-A/FSC-A, SSC-A/ FITC-A, FITC-A/Count)

Akım sitometri analizi sonucunda; Şekil 4.27-29'dan görüldüğü gibi, MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine FITC-işaretli anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %64.4'ünün, 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %59'unun ve 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'lar ile gerçekleştirilen akım sitometri analizi sonucunda hücrelerin %28'inin FITC floresan boya ile işaretlendiği belirlenmiştir.



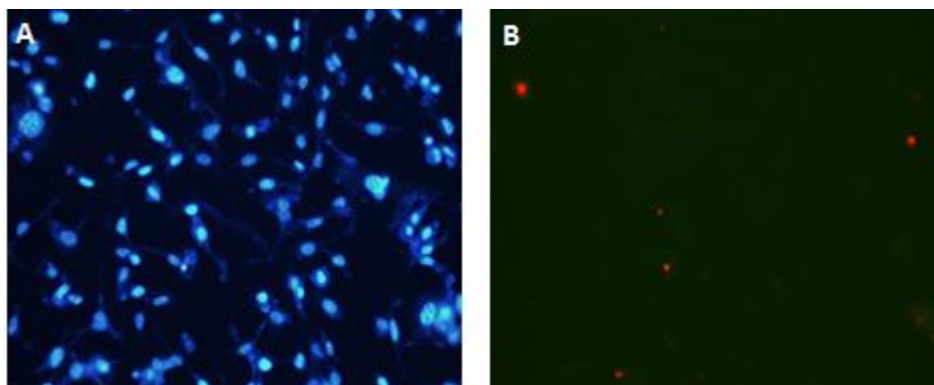
Şekil 4.33. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş 108.6, 54.3 ve 27.15 µg/mL konsantrasyonlarındaki SPION'ların akım sitometri analizlerinden elde edilen verilerinin grafiksel görüntüleri

Akım sitometri analizi sonucunda; Şekil 4.30-32'de görüldüğü gibi, MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine FITC-ışaretleli anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %38.6'sının, 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %38.1'inin ve 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %33.7'sinin FITC floresan boya ile işaretlendiği belirlenmiştir.

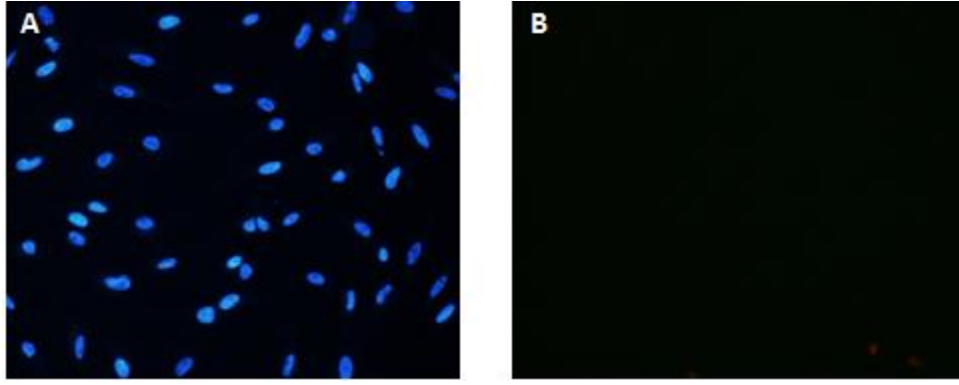
Şekil 4.33'de görüldüğü gibi; MDA MB 231 hücreleri ile etkileştirilen, yüzeyine FITC-ışaretleli anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların uygulama konsantrasyonları arttıkça, hücrelere bağlanan aptamer ve antibadi miktarının da arttığı saptanmıştır. Ancak bu artış oranının, aptamer immobilize edilmiş SPION'larda çok daha az olduğu görülmüştür.

#### **4.6. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Gösterilmesi**

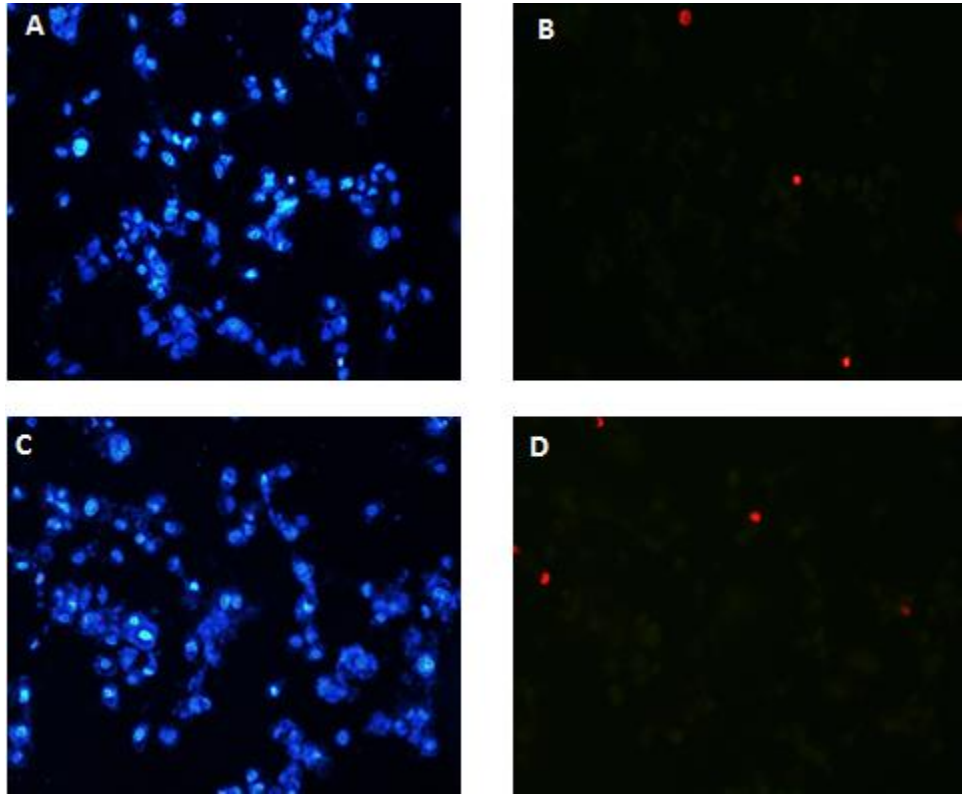
Farklı konsantrasyonlarda (108.6, 54.3 ve 27.15 µg/mL) nanopartiküller (SPION/ Kar.SPION/ AbSPION/ ApSPION) ile gerçekleştirilen ikili boyama yöntemi sonrasında, floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve İ3 (480-520nm dalga boyunda) filtresi kullanılarak nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.34, 4.35, 4.36 ve 4.37'de sunulmuştur.



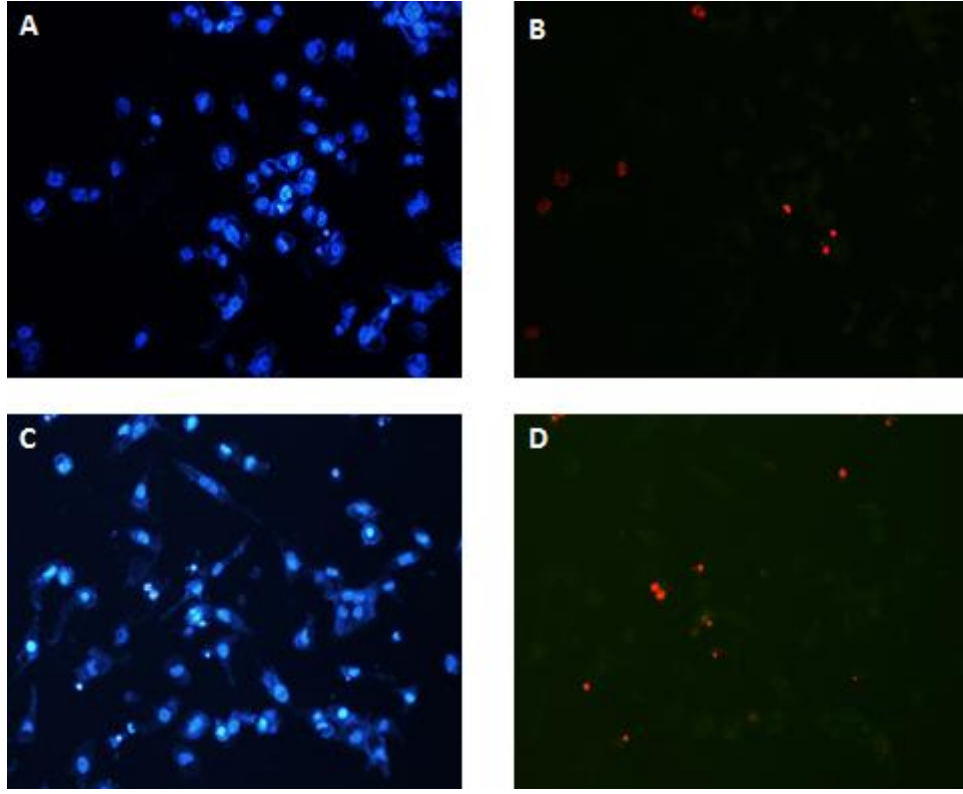
Şekil 4.34. MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz (A) ve nekroz (B) görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)



Şekil 4.35. Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz (A) ve nekroz (B) görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)



Şekil 4.36. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION (A), (B) ve Kar.SPION'ların (C), (D) ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz ve nekroz görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)



Şekil 4.37. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine antibadi (A), (B) ve aptamer (C), (D) immobilize edilmiş 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların ikili boyama yöntemi ile gösterilen apoptoz ve nekroz görüntüleri (50 µm ve 200X büyütme)

Şekil 4.34'de MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin ve Şekil 4.35'de östrojen reseptör pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ikili boyama yöntemi ile apoptoz (A) ve nekroz (B) görüntüleri görülmektedir.

Şekil 4.36'da MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, SPION (A), (B) ve yüzeyinde SAMs oluşturulmuş altın tabaka ile kaplı SPION'ların (C), (D) ikili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekroz görüntüleri görülmektedir.

Şekil 4.37'de MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine antibadi (A), (B) ve aptamer (C), (D) immobilize edilmiş 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların ikili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekroz görüntüleri görülmektedir.

**Çizelge 4.4.** MDA MB 231 hücre hattına 3 farklı konsantrasyonda (27.15 µg/mL, 54.3 µg/mL, 108.6 µg/mL) uygulanan manyetik nanopartiküllerin %nekroz ve apoptotik indeksleri

Nekroz ve Apoptotik İndeks								
Partikül Kon. µg/mL	SPION		Kar.SPION		AbSPION		ApSPION	
	%Apoptoz	%Nekroz	%Apoptoz	%Nekroz	%Apoptoz	%Nekroz	%Apoptoz	%Nekroz
0	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1
27.15	7±0.5	3±1	6±0.5	4±1	3±0.7	7±2	5±1.4	4±0.7
54.3	9±1	4±0.5	13±1	4±0.5	4±1.4	4±0.7	11±2	6±1
108.6	10±1.4	5±0.7	15±0.7	5±1.4	7±0.5	7±1	12±1	9±0.5

**Çizelge 4.5.** Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücre hattına 3 farklı konsantrasyonda (108.6, 54.3 ve 27.15 µg/mL) uygulanan manyetik nanopartiküllerin % nekroz ve apoptotik indeksleri

Nekroz ve Apoptotik İndeks								
Partikül Kon. µg/mL	SPION		Kar.SPION		AbSPION		ApSPION	
	%Apoptoz	%Nekroz	%Apoptoz	%Nekroz	%Apoptoz	%Nekroz	%Apoptoz	%Nekroz
0	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1
27.15	3±1.4	2±1	1±1	2±1	1±1	3±0.5	2±1	1±1.4
54.3	4±0.7	5±1.4	2±0.7	2±0.7	2±2	5±0.7	3±1.4	3±1
108.6	6±1	6±0.5	2±2	4±2	4±0.5	7±1.4	3±0.7	5±0.7

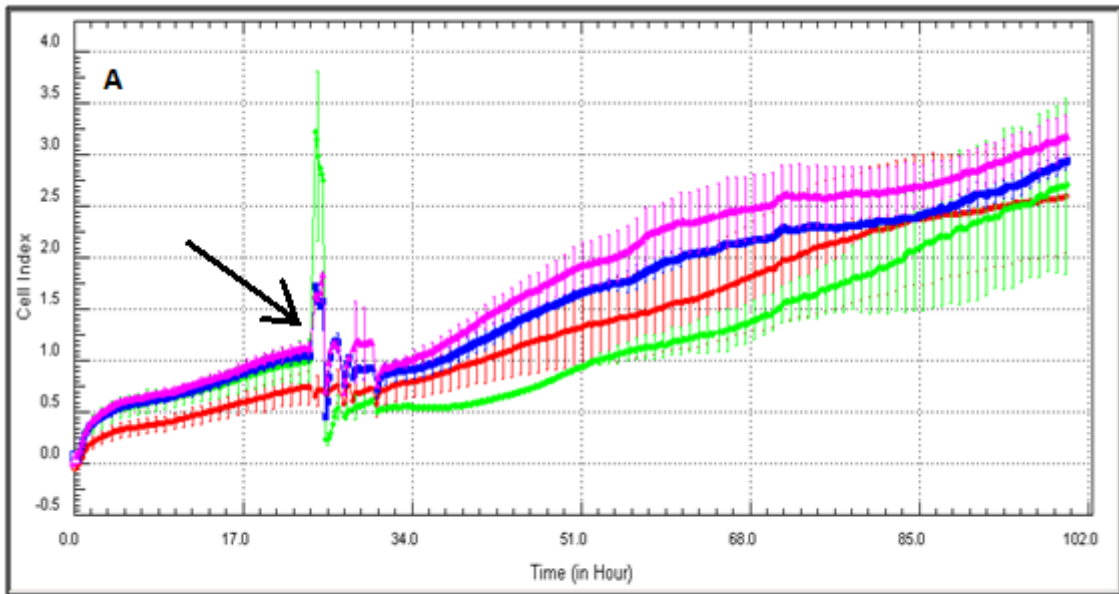
Elde edilen veriler doğrultusunda; MDA MB 231 insan meme kanseri hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan manyetik nanopartiküllerin %nekroz ve apoptotik indeksleri belirlenmiş ve Çizelge 4.4'de sunulmuştur. Veriler değerlendirildiğinde; en yüksek apoptoz oranının 15±0,7 yüzde apoptotik indeks değeri ile 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki Kar.SPION'a ait olduğu ve en yüksek nekroz oranının 9±0,5 yüzde nekrotik indeks ile 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION'a ait olduğu görülmektedir.

Aynı şekilde östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan manyetik nanopartiküllerin %nekroz ve apoptotik indeksleri de belirlenmiş ve Çizelge 4.5'de sunulmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda; en yüksek apoptoz oranının 6±1,4 yüzde apoptotik indeks ile 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan SPION olduğu ve en yüksek nekroz oranının da 7±1 yüzde

nekrotik indeks ile 108.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonunda hücelere uygulanan yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION olduğu belirlenmiştir.

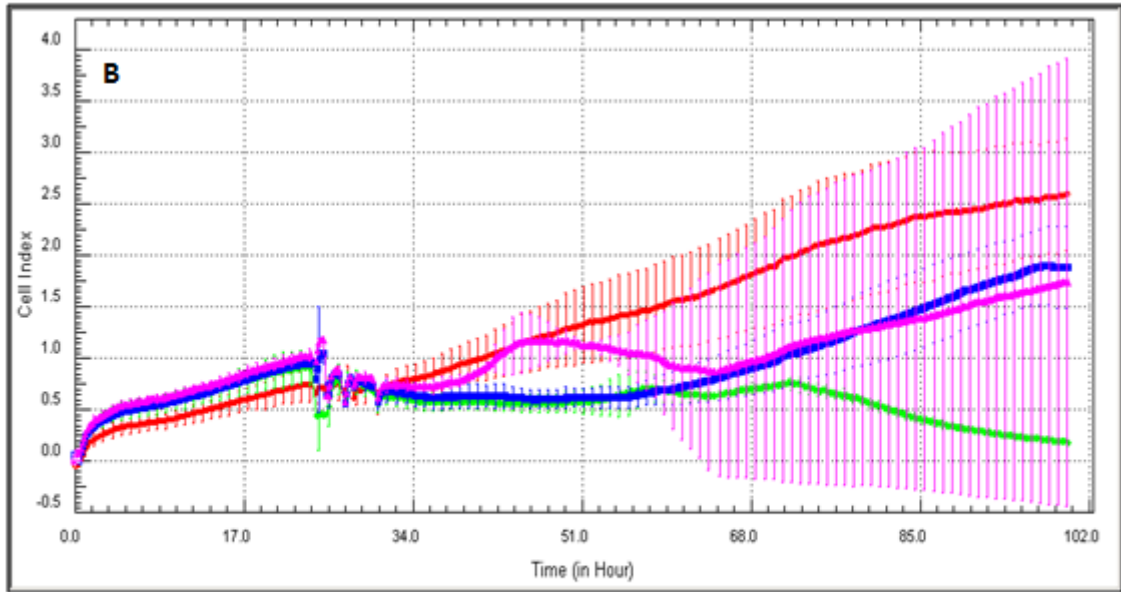
#### 4.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

102 saat süre ile gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü (RTCA) sistemi ile zamana bağlı hücre proliferasyonunu gösteren grafikler elde edilmiş ve veriler Şekil 4.38'de sunulmuştur.

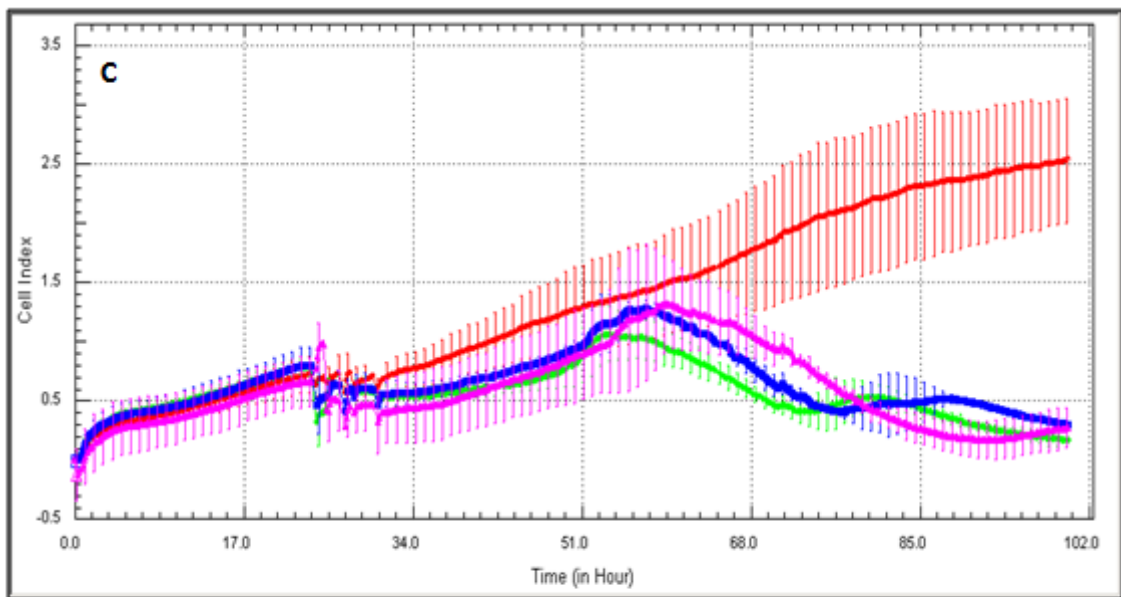


--- : Kontrol      --- : 108.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$       --- : 54.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$       --- : 27.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$

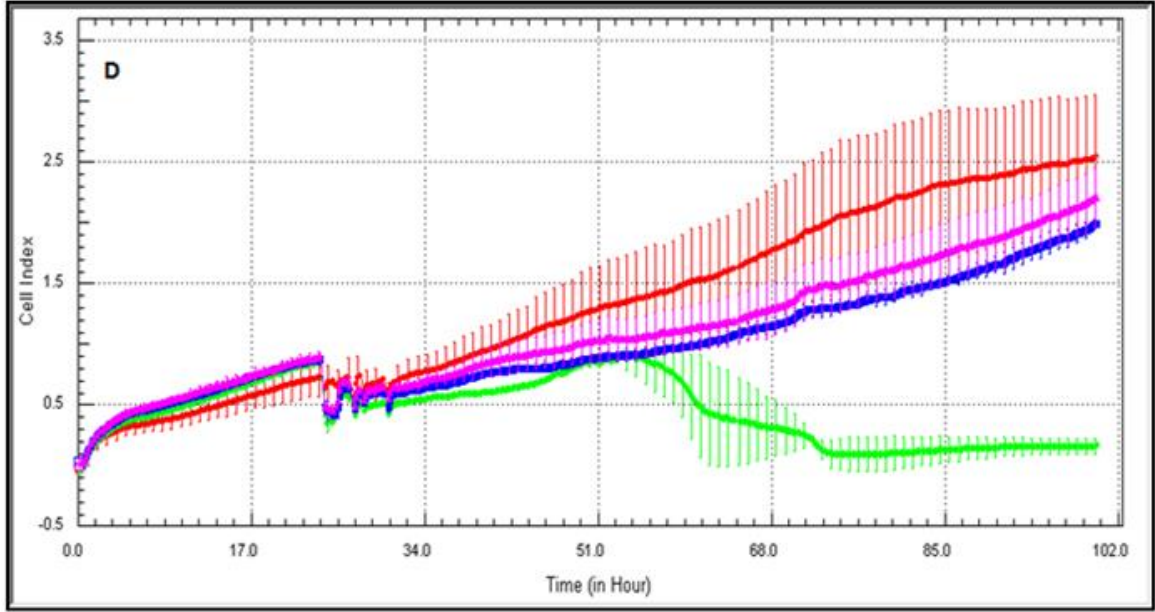




--- : Kontrol      --- : 108.6 µg/mL      --- : 54.3 µg/mL      --- : 27.15 µg/mL



--- : Kontrol      --- : 108.6 µg/mL      --- : 54.3 µg/mL      --- : 27.15 µg/mL



--- : Kontrol    --- : 108.6 µg/mL    --- : 54.3 µg/mL    --- : 27.15 µg/mL

Şekil 4.38. Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun 102 saat süre ile “Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi” ile gösterildiği analiz grafikleri. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş (A) SPION (B) Kar.SPION, (C) AbSPION, (D) ApSPION

Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun 102 saat süre ile “Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi” ile gösterildiği analiz grafikleri incelendiğinde; MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş SPION’ların 102 saat süresince hücrelere uygulanan her üç konsantrasyon değerinde de hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunu hiçbir şekilde düşürmediği ve hatta hücre canlılığını arttırıcı yönde etki ettiği görülmektedir. Dolayısıyla, yüzeyinde hiç bir modifikasyon yapılmamış olan SPION’ların hücreler üzerinde herhangi bir toksisitesinin bulunmadığı saptanmıştır. Şekil 4.38 (A)’da görüldüğü gibi; 27.15 ve 54.3 µg/mL konsantrasyonlarında hücreye uygulanan nanopartiküllerin, kırmızı renk ile temsil edilen kontrol grubuna göre hücre canlılığını daha fazla arttırıcı yönde etki gösterdiği görülmüştür.

Şekil 4.38 (B)’de görüldüğü gibi; yüzeyinde SAMs oluşturulmuş altın kaplı SPION’lar MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile

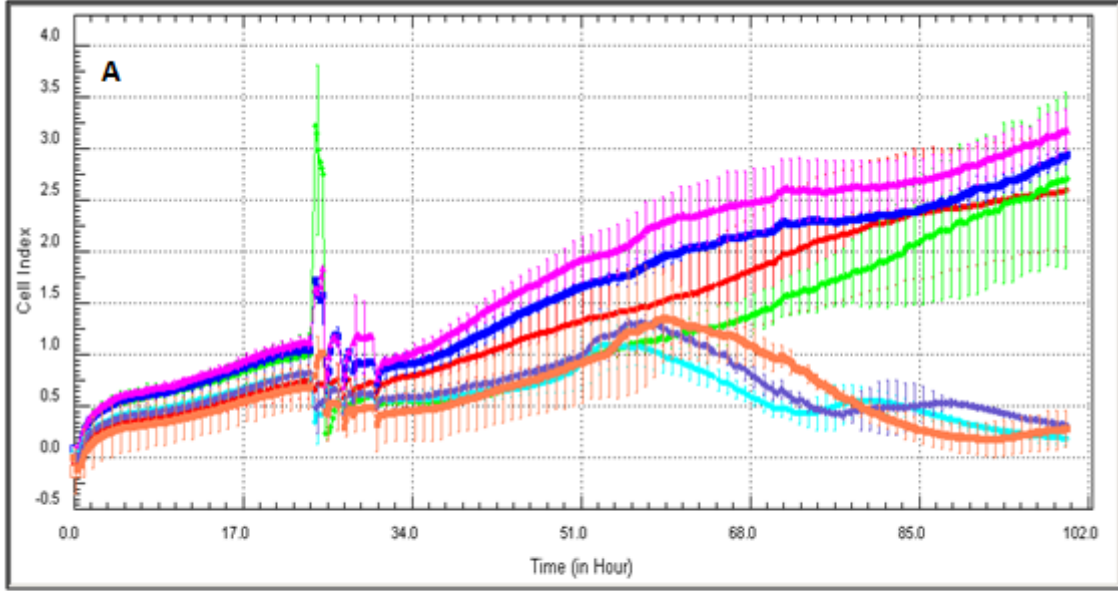
etkileştirilmiş; RTCA'dan elde edilen veriler doğrultusunda genel olarak 27.15 ve 54.3 µg/mL konsantrasyonlarında hücrelere uygulanan nanopartiküllerde 102 saat süresince hücre canlılığının kırmızı renk ile temsil edilen kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde de olsa artarak devam ettiği gözlenmiş, ancak 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartiküllerin bulunduğu kuyucukta, 70. saatten itibaren hücre canlılığının azalarak devam ettiği görülmüştür.

Şekil 4.38 (C)'de görüldüğü gibi; MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION' lardan 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartikülün 53. saatten, 54.3 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartikülün yaklaşık olarak 60. saatten ve 27.15 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartikülün 62. saaten itibaren hücre canlılığını azaltma yönünde etki yaptığı görülmüştür.

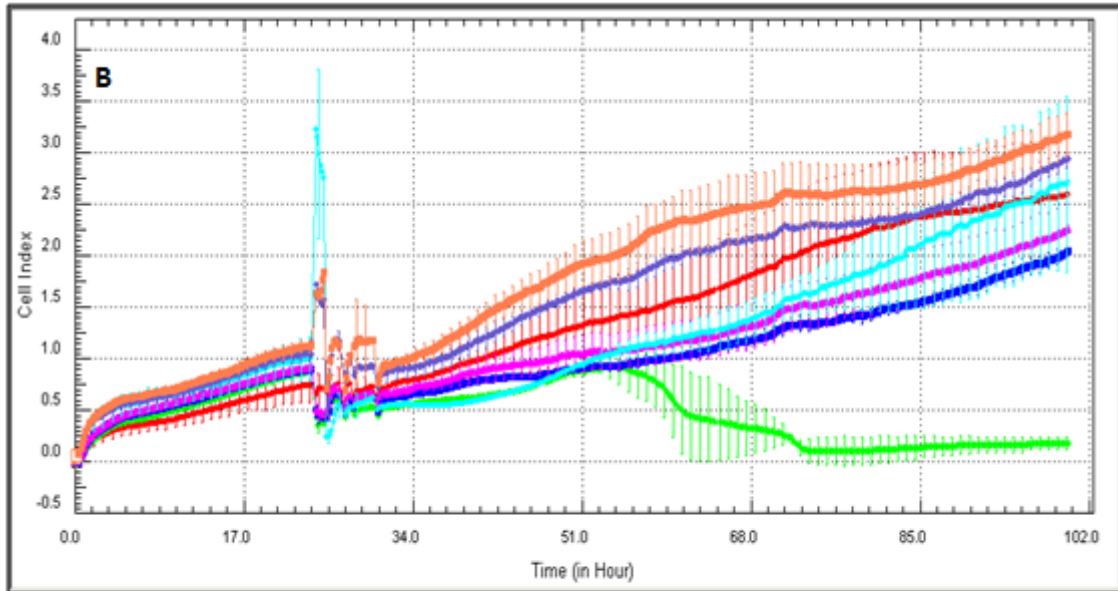
Şekil 4.38 (D)'de görüldüğü gibi; MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION' lardan 54.3 ve 27.15 µg/mL konsantrasyonlarında uygulanan nanopartiküllerin 102 saat kontrol grubu ile birlikte hücre canlılığını arttırdığı, 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartikülün ise yaklaşık olarak 51. saatten 74. saate kadar hücre proliferasyonunu azaltıcı yönde etki yaptığı, 74. saatten itibaren ise sabit kalarak hücre canlılığını olumlu ya da olumsuz yönde etkilemediği görülmüştür.

Şekil 4.39'da hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun 102 saat süre ile "Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi" ile gösterildiği karşılaştırmalı analiz grafikleri [(A) SPION/AbSPION, (B) SPION/ApSPION, (C) SPION/AbSPION ve ApSPION, (D) AbSPION/ApSPION] sunulmuştur. Yüzeyinde hiçbir modifikasyon yapılmamış SPION'lar, MDA MB 231 meme kanseri hücreleri üzerinde kontrol grubu ile benzer etki sergilemiş ve herhangi bir toksik etki yaratmamıştır. Yüzeyine anti-EGFR antibadilerin immobilize edildiği SPION'lar ise; yüzeyine anti-EGFR

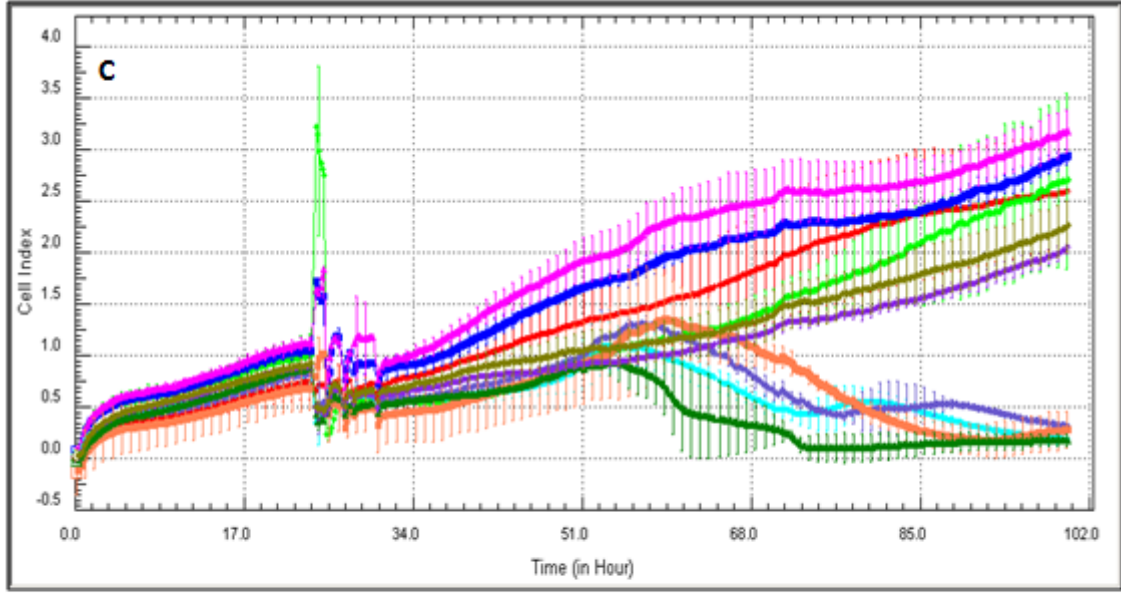
aptamerlerin immobilize edildiği SPION'lara ve yüzeyinde herhangi bir modifikasyon yapılmamış olan SPION'lara göre hücre canlılığı üzerinde özellikle 53. Saatten itibaren olumsuz etki sergilemiştir. 53. saatten itibaren hücrelerin canlılığını hızla yitirmeye başladıkları görülmüştür.



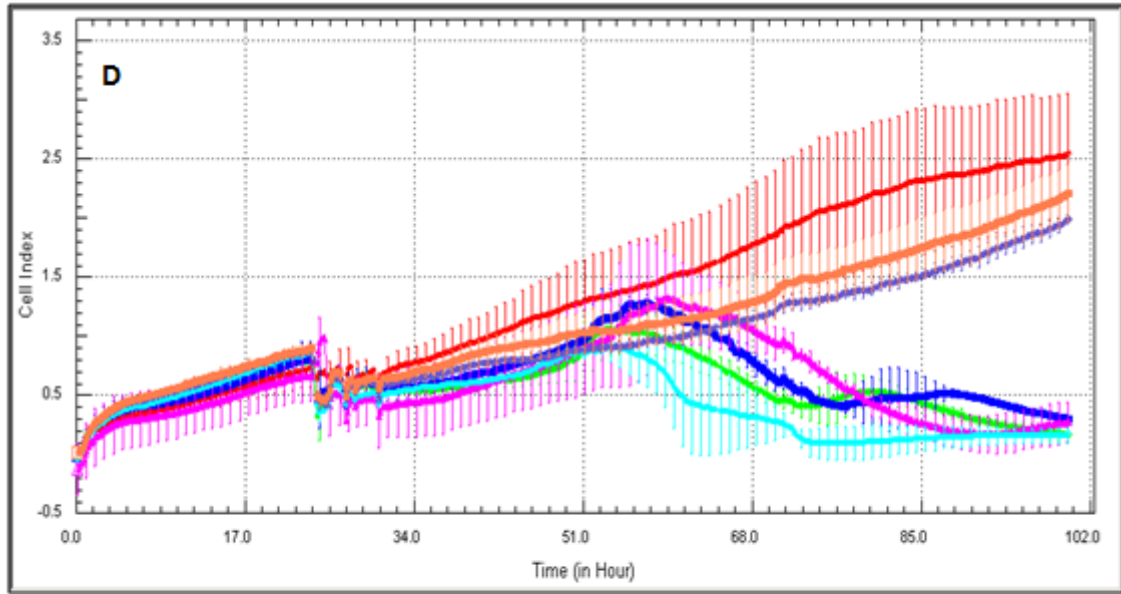
— : Kontrol — : 108.6 µg/mL SPION — : 54.3 µg/mL SPION — : 27.15 µg/mL SPION  
— : 108.6 µg/mL AbSPION — : 54.3 µg/mL AbSPION — : 27.15 µg/mL Ab SPION



— : Kontrol — : 108.6 µg/mL SPION — : 54.3 µg/mL SPION — : 27.15 µg/mL SPION  
— : 108.6 µg/mL ApSPION — : 54.3 µg/mL ApSPION — : 27.15 µg/mL ApSPION



— : Kontrol — : 108.6 µg/mL SPION — : 54.3 µg/mL SPION — : 27.15 µg/mL SPION  
 — : 108.6 µg/mL AbSPION — : 54.3 µg/mL AbSPION — : 27.15 µg/mL AbSPION  
 — : 108.6 µg/mL ApSPION — : 54.3 µg/mL ApSPION — : 27.15 µg/mL ApSPION



— : Kontrol  
 — : 108.6 µg/mL AbSPION — : 54.3 µg/mL AbSPION — : 27.15 µg/mL AbSPION  
 — : 108.6 µg/mL ApSPION — : 54.3 µg/mL ApSPION — : 27.15 µg/mL ApSPION

Şekil 4.39. Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun 102 saat süre ile "Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi" ile gösterildiği karşılaştırmalı analiz grafikleri (A) SPION/AbSPION, (B) SPION/ApSPION, (C) SPION/AbSPION ve ApSPION, (D) AbSPION/ApSPION

## 5. SONUÇLAR

- Sunulan Doktora Tez Çalışması kapsamında; ferrik ( $Fe^{+3}$ ) ve ferröz ( $Fe^{+2}$ ) klorürlerin sulu ortamda "ikili çöktürme" yöntemi kullanılarak SPION'lar sentezlenmiştir.
- SPION'ların konsantrasyonu ICP-MS cihazı ile belirlenmiş ve 10.86 mg/mL değerinde olduğu saptanmıştır.
- SPION'ların ortalama çekirdek çapları TEM cihazı ile belirlenmiş ve  $5.62 \pm 1.49$  nm değerinde olduğu saptanmıştır.
- SPION'ların yüzeyi altın tabakası ile kaplanmış ve altın kaplı SPION'ların TEM ile ortalama boyutları  $57.04 \pm 8.58$  nm olarak belirlenmiştir.
- Altın kaplı SPION'ların UV-VIS Spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde 539 nm'de altın piki verdikleri görülmüş ve altın tabaka ile kaplandıkları doğrulanmıştır.
- SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile DLS yöntemi kullanılarak hidrodinamik çapları ve polidispersite indeksleri belirlenmiş ve hidrodinamik çaplarının 29.49 nm ve polidispersite indekslerinin ise 0.166 olduğu saptanmıştır.
- Altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile DLS yöntemi kullanılarak hidrodinamik çapları ve polidispersite indeksleri belirlenmiş ve hidrodinamik çaplarının 78.36 nm ve polidispersite indekslerinin ise 0.203 olduğu saptanmıştır.
- SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile zeta potansiyelleri ölçülmüş ve yüzey yüklerinin 54.3 mV olduğu belirlenmiştir.
- Altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile zeta potansiyelleri ölçülmüş ve yüzey yüklerinin -0.339 mV olduğu belirlenmiştir.
- Sentezlenen SPION'ların VSM cihazı ile yapılan ölçümlerde 19998.3915 Oe manyetik alanda 36.89963 emu/g manyetizasyon sergilediği gözlenmiştir.

- Altın kaplı SPION'ların ise; 19998.199 Oe manyetik alanda 11.59965 emu/g manyetizasyon sergilediği gözlenmiştir.
- Uygulanan manyetik alan altında histerezis eğrisi oluşturmadığından, sentezlenen altın kaplı ve altın kaplı olmayan manyetik demir oksit nanopartiküllerin "süperparamanyetik" davranış sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca altın kaplı ve altın kaplı olmayan her iki nanopartikülün de, sıfır koersivite ile süperparamanyetik davranış sergiledikleri görülmüştür.
- SPION'ların FTIR Spektrumu yardımı ile kimyasal yapıları belirlenmiştir.
- Sentezlenen SPION'ların elektron kırınım deseni, standard maghemit x-ışını kırınım deseni ile karşılaştırmalı olarak sunulmuş ve elektron kırınım deseninde yer alan örüntülerin literatürdeki ile uyumlu olduğu ve nanopartiküllerin oldukça yüksek oranda kristalimsi bir yapıya sahip oldukları görülmüştür.
- Altın kaplı SPION'ların yüzeyinde karboksil fonksiyonel grupları barındıran "kendiliğinden yerleşen tek tabakalar" oluşturulmuş ve Zeta Sizer Cihazı ile hidrodinamik çapları 133.3 nm ve polidispersite indeksleri 0.233 olarak ölçülmüştür.
- Yüzeyinde karboksil fonksiyonel grupları barındıran altın kaplı SPION'ların Zeta Sizer Cihazı ile zeta potansiyelleri ölçülmüş ve yüzey yüklerinin -6.32 mV olduğu belirlenmiştir.
- Satın alma yolu ile temin edilen anti-EGFR monoklonal antibadi, FITC floresan boya ile etiketlenmiştir.
- 280 nm dalga boyundaki ve FITC için maksimum dalga boyu olan 495 nm'deki absorpsiyon değerleri belirlenmiş ve bağlanma derecesi 9.57 mol FITC'ye karşılık 1 mol antibadi olarak hesaplanmıştır.
- SH-PEG-COOH molekülleri ile yüzeyinde karboksil uç grupları oluşturulan altın kaplı SPION'ların yüzeyine anti-EGFR monoklonal antibadiler immobilize edilmiştir.

- Yapılan hesaplamalar sonucunda; "teorik olarak" her bir SPION başına yaklaşık olarak 33 adet anti-EGFR monoklonal antibadi immobilize edildiği kabul edilmiştir.
- Altın kaplı SPION'ların yüzeyine 5' uç grubunda tiyol grupları barındıran, FITC floresan boya ile işaretlenmiş anti-EGFR aptamerler immobilize edilmiştir.
- Yapılan hesaplamalar sonucunda; "teorik olarak" her bir SPION başına yaklaşık olarak 40 adet anti-EGFR aptamer immobilize edildiği kabul edilmiştir.
- SPION'ların yüzeyine anti-EGFR monoklonal antibadilerin ve aptamerlerin bağlanma etkinliği, Nanodrop Cihazı kullanılarak yapılan ölçümlerden elde edilen veriler ile; AbSPION için %71 ve ApSPION için %82.59 olarak bulunmuştur.
- MDA MB 231 insan meme kanseri hücre hattı, hücre kültür ortamında çoğaltılmıştır.
- Karşılaştırmalı hücre grubu olarak seçilen östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücre hattı, hücre kültür ortamında çoğaltılmıştır.
- WST-1 Testi ile elde edilen veriler doğrultusunda; MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerine uygulanan nanopartiküllerden, 27.15 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere uygulanan SPION'ların %92 oranı ile en yüksek hücre canlılığına sahip olduğu, 108.6 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere uygulanan yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION'ların ise %62.3 oranı ile en düşük hücre canlılığı sergilediği görülmüştür.
- WST-1 Testi ile elde edilen veriler doğrultusunda; östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücrelerine uygulanan nanopartiküllerden, 27.15 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere uygulanan SPION'ların %99.2 oranı en yüksek hücre canlılığına sahip olduğu, 108.6 µg/mL konsantrasyonu ile hücrelere



uygulanan yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'ların ise %59.2 oranı ile en düşük hücre canlılığı sergilediği görülmüştür.

- WST-1 Testi ile elde edilen veriler doğrultusunda, genel olarak nanopartikül ve nanopartikül-konjugatlarının hücre canlılığı üzerinde toksik etkisinin olmadığı ve hücre proliferasyonunu engellemediği belirlenmiştir.
- MDA MB 231 insan meme kanseri kontrol hücrelerinin ve östrojen pozitif insan fibroblast kontrol hücrelerinin ışık (A) ve floresan (B) mikroskop görüntüleri incelendiğinde; hücrelerin herhangi bir molekül ile etkileştirilmedikleri için, floresan mikroskopta da floresan ışımaya sergilemedikleri görülmüştür.
- SPION ve karboksil fonksiyonel grupları ile modifiye edilmiş SPION'ların MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık ve floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde; SPION ve Kar.SPION'ların yüzeyine anti-EGFR antibadi ya da aptamer immobilize edilmemiş olduğu için, floresan mikroskopta herhangi bir floresan ışımaya sergilemedikleri görülmüştür.
- Yüzeyine anti-EGFR antibadi ve anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş SPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında), MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri karşılaştırıldığında; ışık mikroskopta lokasyonları tam olarak görülen hücrelerin floresan mikroskop altında net bir şekilde floresan ışımaya yaptıkları görülmüştür. Hücrelerin olmadığı bölümlerde floresan ışımaya gözlenmemiştir. Dolayısıyla, sentezi ve tasarımı gerçekleştirilen yüzeyine antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların, MDA MB 231 insan meme kanseri hücre yüzeyindeki epidermal büyüme faktörü reseptörlerine net bir şekilde bağlandıkları ve hedeflemenin doğru bir şekilde gerçekleştirildiği görülmüş ve görüntülenmiştir.

- SPION ve karboksil fonksiyonel grupları ile modifiye edilmiş SPION'ların östrojen pozitif insan fibroblast hücreleri ile etkileştirildikten sonra ışık ve floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde; östrojen pozitif insan fibroblast hücrelerinin yüzeyinde EGFR reseptörleri bulunmadığı için ve bu hücreler ile etkileştirilen SPION ve Kar.SPION'ların yüzeyine anti-EGFR antibadileri ya da aptamerleri immobilize edilmemiş olduğu için floresan mikroskopta herhangi bir floresan ışıma gözlenmemiştir.
- Yüzeyine anti-EGFR antibadi ve anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş SPION'ların (sırası ile 27.15, 54.3 ve 108.6 µg/mL konsantrasyonlarında) ışık mikroskop ve floresan mikroskop görüntüleri karşılaştırıldığında; floresan mikroskopta herhangi bir ışıma olmadığı görülmüştür. Östrojen pozitif insan fibroblast hücrelerinin yüzeyinde EGFR reseptörleri bulunmamaktadır ve bu hücreler ile etkileştirilen anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların etkileşecekleri EGFR reseptörleri hücre yüzeyinde mevcut olmadığı için floresan mikroskopta herhangi bir floresan ışıma görülmemiştir. Işık mikroskop görüntüleri incelendiğinde de; partiküllerin östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücrelerinin yüzeyinde gelişigüzel bir şekilde dağıldıkları, hücrelerin aralarında yer alan boşluklarda da görüldükleri ve hücre yüzeyine spesifik bir yerleşim sergilemedikleri saptanmıştır.
- MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile aynı anda etkileştirilen anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların tümör hücre seçiciliklerinin karşılaştırılabilmesi amacı ile; ApSPION'lar FITC'den farklı bir floresan boya olan ve kırmızımsı-turuncu renkte ışıma yapan TAMRA floresan boya ile etiketlenmiş, AbSPION'lar yine aynı şekilde yeşil renkte ışıma yapan FITC boya ile etiketlenmişlerdir. Sadece ışık ve floresan mikroskop görüntülerine bakarak floresan ışıma açısından

değerlendirme yapıldığında; yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION'ların, yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'lara göre tümör seçiciliklerinin çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Aptamerlerin antibadi moleküllerine göre çok daha küçük moleküller olmaları ve antibadi molekülleri ile karşılaştırıldığında aptamerlerin daha az sterik engel ile karşılaşmaları sonucu hücre yüzeyinde yer alan reseptörler ile daha kolay etkileştikleri ve bu nedenle tümör seçiciliklerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

- FITC floresan boya ile işaretlenmiş MDA MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin ışık ve floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, hücrelerin çekirdekleri ile birlikte tüm yüzeylerinin yani hücrelerin tamamının yeşil floresan FITC boya ile boyandığı görülmüştür. MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş AbSPION ve ApSPION ışık ve floresan mikroskop görüntüleri ile karşılaştırıldığında; birbirlerinden tamamen farklı oldukları, FITC işaretli-antibadi ve aptamer ile hedeflendirilmiş SPION'lar ile etkileştirilen hücrelerin yüzeylerinde, yeşil FITC boyası "lekeli" gibi bir görünüm sergilerken, sadece FITC floresan boya ile etkileştirilen hücrelerin, çekirdekleri de dahil olmak üzere tamamının parlak yeşil renkte boyandığı görülmüştür. Lekeli görünümün; yüzeyine anti-EGFR antibadi ve anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş SPION'ların, hücre yüzeylerinin değişik bölgelerinde yer alan EGFR reseptörleri ile etkileşmesi sonucu oluştuğu çok net olarak görüntülenmiştir.
- Akım sitometri analizi sonucunda; MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine FITC-işaretli anti-EGFR antibadi immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %64.4'ünün, 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %59'unun ve 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'lar ile gerçekleştirilen akım sitometri

analizi sonucunda hücrelerin %28'inin FITC floresan boya ile işaretlendiği belirlenmiştir.

- Akım sitometri analizi sonucunda; MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, yüzeyine FITC-işaretli anti-EGFR aptamer immobilize edilmiş 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %38.6'sının, 54.3 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %38.1'inin ve 27.15 µg/mL konsantrasyonundaki SPION'ların %33.7'sinin FITC floresan boya ile işaretlendiği belirlenmiştir.
- Akım sitometri ile; MDA MB 231 hücreleri ile etkileştirilen, yüzeyine FITC-işaretli anti-EGFR antibadi ve aptamer immobilize edilmiş SPION'ların uygulama konsantrasyonları arttıkça, hücrelere bağlanan aptamer ve antibadi miktarının da arttığı saptanmıştır.
- MDA MB 231 insan meme kanseri hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan manyetik nanopartiküllerin %nekroz ve apoptotik indeksleri belirlenmiş ve veriler değerlendirildiğinde en yüksek apoptoz oranının  $15 \pm 0,7$  yüzde apoptotik indeks değeri ile 108.6 µg/mL konsantrasyonundaki Kar.SPION'a ait olduğu ve en yüksek nekroz oranının  $9 \pm 0,5$  yüzde nekroz indeksi ile 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION'a ait olduğu görülmüştür.
- Östrojen reseptör pozitif insan fibroblast hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan manyetik nanopartiküllerin %nekroz ve apoptotik indeksleri de belirlenmiş ve veriler değerlendirildiğinde en yüksek apoptoz oranının  $6 \pm 1,4$  yüzde apoptotik indeks ile 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan SPION olduğu ve en yüksek nekroz oranının da  $7 \pm 1$  yüzde nekroz indeksi ile 108.6 µg/mL konsantrasyonunda

hücrelere uygulanan yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION olduğu belirlenmiştir.

- Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun 102 saat süre ile "Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi" ile gösterildiği analiz grafikleri incelendiğinde; MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş SPION'ların 102 saat süresince hücrelere uygulanan her üç konsantrasyon değerinde de hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunu hiçbir şekilde düşürmediği ve hatta hücre canlılığını arttırıcı yönde etki ettiği görülmektedir. Dolayısıyla, yüzeyinde hiç bir modifikasyon yapılmamış olan SPION'ların hücreler üzerinde herhangi bir toksisitesinin bulunmadığı saptanmıştır. 27.15 ve 54.3 µg/mL konsantrasyonlarında hücreye uygulanan nanopartiküllerin, kontrol grubuna göre hücre canlılığını daha fazla arttırıcı yönde etki gösterdiği görülmüştür.
- Yüzeyinde SAMs oluşturulmuş altın kaplı SPION'lar MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş; RTCA'dan elde edilen veriler doğrultusunda genel olarak 27.15 ve 54.3 µg/mL konsantrasyonlarında hücrelere uygulanan nanopartiküllerde 102 saat süresince hücre canlılığının kırmızı renk ile temsil edilen kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde de olsa artarak devam ettiği gözlenmiş, ancak 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartiküllerin bulunduğu kuyucukta, 70. saatten itibaren hücre canlılığının azalarak devam ettiği görülmüştür.
- MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, RTCA'dan elde edilen veriler doğrultusunda yüzeyine antibadi immobilize edilmiş SPION'lardan 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartikülün 53. saatten, 54.3 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartikülün yaklaşık olarak 60. saatten ve 27.15 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere

uygulanan nanopartikülün 62. saaten itibaren hücre canlılığını azaltma yönünde etki yaptığı görülmüştür.

- MDA MB 231 insan meme kanseri hücreleri ile etkileştirilmiş, RTCA'dan elde edilen veriler doğrultusunda yüzeyine aptamer immobilize edilmiş SPION'lardan 54.3 ve 27.15 µg/mL konsantrasyonlarında uygulanan nanopartiküllerin 102 saat süresince kontrol grubu ile birlikte hücre canlılığını arttırdığı, 108.6 µg/mL konsantrasyonunda hücrelere uygulanan nanopartikülün ise yaklaşık olarak 51. saatten 74. saate kadar hücre proliferasyonunu azaltıcı yönde etki yaptığı, 74. saatten itibaren ise sabit kalarak hücre canlılığını olumlu ya da olumsuz yönde etkilemediği görülmüştür.
- RTCA'dan elde edilen veriler doğrultusunda; yüzeyinde hiçbir modifikasyon yapılmamış SPION'ların, MDA MB 231 meme kanseri hücreleri üzerinde kontrol grubu ile benzer etki sergilediği ve herhangi bir toksik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Yüzeyine anti-EGFR antibadilerin immobilize edildiği SPION'lar ise; yüzeyine anti-EGFR aptamerlerin immobilize edildiği SPION'lara ve yüzeyinde herhangi bir modifikasyon yapılmamış olan SPION'lara göre hücre canlılığı üzerinde özellikle 53. Saatten itibaren olumsuz etki sergilemiştir. 53. saatten itibaren hücrelerin canlılığını hızla yitirmeye başladıkları görülmüştür.
- Doktora Tezi kapsamında gerçekleştirilmesi öngörülen tüm çalışmalar gerçekleştirilmiş ve Tez Çalışması başarı ile tamamlanmıştır.
- Sentezi ve tasarımı gerçekleştirilen nanopartiküler taşıyıcı sistem, kanser hücrelerinin hedeflenmesinde tanı amaçlı olarak kullanılabilir bir sistemdir. Ancak, nanopartiküler sistemlerin vücut içerisinde oluşturdukları morfolojik, fizyolojik ve toksikolojik değişimler henüz tam olarak saptanamadığı için nanopartiküllerin insan vücuduna uygulanmaları ve FDA ve diğer sağlık kuruluşları

tarafından onaylanmaları henüz yaygınlaşmamıştır. Günümüzde; transferin reseptörlerine hedeflendirilmiş, lipozom içerisinde platin-bazlı oksaliplatin içeren, yine transferin reseptörlerine hedeflendirilmiş siklodekstrin-içeren siRNA yüklü nanopartiküller ya da prostat-spesifik membran antijenlerine (PSMA) hedeflendirilmiş, dosetaksel içeren polimerik nanopartiküller gibi birçok seçici taşıma sisteminin klinik çalışmaları yürütülmektedir. Ligand-aracılı hedeflendirme teknolojilerinin insan sağlığı üzerinde henüz hatırı sayılır düzeyde klinik etki yapmamış olduğu bilinse de, yakın gelecekte hedeflendirilmiş nanopartikül örneklerinin geliştirilmesinin kliniksel dönüşümü sağlayacağı düşünülmektedir. Önümüzdeki yıllarda nanopartiküler sistemlerin özellikle hayvan çalışmaları ile birlikte tanı ve terapi alanında güvenli kullanımının araştırılması konusunda büyük yol katedilmesi umut edilmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Boyle, P., Levin B., *World Cancer Report*, World Health Organization Press, **2008**.
- [2] Jemal A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E., Cancer statistics, *CA A Cancer Journal for Clinicians.*, 60, 277-300, **2010**.
- [3] Liu, S.Q., Wiradharma, N., Gao, S.J., Tong, Y.W., Yang, Y.Y., Bio-functional micelles selfassembled from a folate-conjugated block copolymer for targeted intracellular delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 28(7), 1423–33, **2007**.
- [4] Park, E.K., Kim, S.Y., Lee, S.B., Lee, Y.M., Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 109(1-3),158–68, **2005**.
- [5] Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today*, 8(24), 1112–20, **2003**.
- [6] Sahoo, S.K., Parveen, S., Panda, J.J., The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 20–31, **2007**.
- [7] Ferrari, M., Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature Reviews: Cancer*, 5, 161-171, **2005**.
- [8] Chatterjee, J., Haik, Y., Chen, C., Size dependent **magnetic** properties of iron oxide nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 257, 113, **2003**.
- [9] Wilhelm, C., Gazeau, F., Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles, *Biomaterials*, 29, 3161–3174, **2008**.
- [10] Sebastianelli, A., Sen, T., Bruce, I., Extraction of DNA from soil using nanoparticles by magnetic bioseparation, *Letters in Applied Microbiology*, 46(4), 488–491, **2008**.
- [11] Yang, L., Ren, X., Tang, F., Zhang, L., A practical glucose biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and chitosan/nafion composite film, *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 889–895, **2009**.
- [12] Kumar, C., *Nanomaterials for Medical Diagnosis and Therapy*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH, **2007**.
- [13] Dilnawaz, F., Singh, A., Mohanty, C., Sahoo, S.K., Dual drug loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy, *Biomaterials*, 31(13), 3694–3706, **2010**.
- [14] Sanvicens, N., Marco, P., Multifunctional nanoparticles properties and prospects for their use in human medicine, *Trends in Biotechnology*, 26(8), 425–433, **2008**.



- [15] Bao, F., Yao, J.L., Gu, R.A., Synthesis of magnetic Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Au core/shell nanoparticles for bioseparation and immunoassay based on surface-enhanced raman spectroscopy, *Langmuir*, 25, 10782-10787, **2009**.
- [16] Gura, T., Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target, *Nature*, 417, 584–586, **2002**.
- [17] Van Dijk, M.A. and Van de Winkel, J.G.J., Human antibodies as next generation therapeutics, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 368–374, **2001**.
- [18] Jayasena, S.D., Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clinical Chemistry*, 45, 1628-1650, **1999**.
- [19] Mairal, T., Ozalp, V.C., Sanchez, P.L., Mir, M., Katakis, I., O'Sullivan, C.K., Aptamers: Molecular tools for analytical applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 989-1007, **2008**.
- [20] Chiu, T.C., Huang, C.C., Aptamer-functionalized nano-biosensors, *Sensors*, 9, 10356-10388, **2009**.
- [21] Huether, S. E. & McCance, K. L., *Understanding Pathophysiology*, Ed 4, **2008**.
- [22] Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., eds *Basic Pathology*. 8th W.B. Saunders Company, **2007**.
- [23] Yokus, B. ve Ülker D.Ü., Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(2), 7-18, **2012**.
- [24] Casciato, D.A., Lowitz, B.B. (Eds.), *Manual of Clinical Oncology* (3<sup>rd</sup> ed.) Brown, Boston MA, **1995**.
- [25] Lacroix, M., Leclercq, G., . Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update, *Breast Cancer Research and Treatment*, 83 (3): 249–289, **2004**.
- [26] Roco, M.C., Williams, R.S., and Alivisatos, P., Eds. *Nanotechnology Research Directions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2000**.
- [27] Roco, MC and Bainbridge, W.S., Eds. *Converging Technologies for Improving Human Performance*. National Science Foundation–U.S. Department of Commerce Report, Washington, D.C., **2002**.
- [28] Roco, M.C., Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 337–346, **2003**.
- [29] Craighead, H., *Microfluidics: The Flow of Innovation Continues, Nanotechnology in Cancer*, National Cancer Institute, August, **2005**

- [30] Neelina, H. M., *Biomedical Nanotechnology*, Taylor & Francis Group, **2005**.
- [31] Gijs, M.A.M., Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications, *Microfluidics and Nanofluidics*, 1, 22–40, **2004**.
- [32] Connolly, J. and St Pierre T.G., Proposed biosensors based on time-dependent properties of magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225, 156–60, **2001**.
- [33] Plank, C., Schillinger, U., Scherer, F., Bergemann, C., R´emy, J.S., Krotz, F., Anton, M., Lausier, J. and Rosenecker, J., The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biological Chemistry*, 384, 737–47, **2003**.
- [34] Halbreich, A., Roger, J., Pons, J.N., Geldwerth, D., Da Silva, M.F., Roudier, M. and Bacri, J.C., Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie*, 80, 369–90, **1998**.
- [35] Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. and Dobson, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, R167–R181, **2003**.
- [36] Parak, W.J., Gerion, D., Pellegrino, T., Zanchet, D., Micheel, C., Williams, S.C., Boudreau, R., Le Gros, M.A., Larabell, C.A. and Alivisatos, A.P., Biological applications of colloidal nanocrystals, *Nanotechnology*, 14, R15–R27, **2003**.
- [37] Scholten, P.C., Which SI. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 149, (1–2), 57–9, **1995**.
- [38] Leslie-Pelecky, D.L., Rieke, R.D., Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials*, 8(8), 1770–83, **1995**.
- [39] Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F. and Duguet, E., Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 2161–75, **1995**.
- [40] Langevin, P., Magnetisme et theorie des electrons, *Annales de Chimie et de Physique*, 5, 70-127, **1905**.
- [41] Weiss, P., L’hypothese du champ moleculaire et la propriete ferromagnetique, *Journal de Physique*, 6, 66-690, **1907**.
- [42] Weiss, P., La variation du ferromagnetisme avec la temperature, *Comptes Rendus des Sceances de l’Academie des Sciences*, 143, 1136-1139, **1906**.
- [43] Neel, L., Influence des fluctuations des champs moleculaires sur les proprietes magnetiques des corps, *Annales de Physique*, 18, 5, **1932**.

- [44] Saini, S., Frankel, R.B., Stark, D.D., Ferrucci, J.T., Magnetism: A Primer and Review, *American Journal of Roentgenology*, 150, April, **1988**.
- [45] Bean, C.P., Jacobs, I.S., Magnetic granulometry and superparamagnetism. *Journal of Applied Physics*, 27, 1448–52, **1956**.
- [46] Brown, W.F. Jr., Thermal fluctuations of a single-domain particle. *Physical Review*, 130, 1677–86, **1963**.
- [47] Varadan, V.K., Chen, L., Xie, J., *Nanomedicine: Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems*, Wiley, **2008**.
- [48] C.J. Serna and M.P. Morales, *Surface and Colloid Science*, Ed. Matijevic, E., Borkovec, M., Kluwer Academic / Plenum Publishers, Vol. 17, Chap. 2, pp. 27-81, **2001**.
- [49] Dobrovolskaia, M.A., Aggarwal, P., Hall, J.B., McNeil, S.B., Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution, *Molecular Pharmaceutics*, 5, 487–495, **2008**.
- [50] Gratton, S.E.A., PohhauS, P.D., Lee, J., Guo, I., Cho, M.J., DeSimone, J.M., Nanofabricated particles for engineered drug therapies: A preliminary Biodistribution study of PRINT (TM) nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 121, 10–18, **2007**.
- [51] Son, S.J., Bai, X., Nan, A., Ghandehari, H., Lee, S.B., Template synthesis of multifunctional nanotubes for controlled release, *Journal of Controlled Release* 114, 143–152, **2006**.
- [52] Liu, Z., Cai, W.B., He, L.N., Nakayama, N., Chen, K., Sun, X.M., Chen, X.Y., Dai, H.J., In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice, *Nature Nanotechnology* 2, 47–52, **2007**.
- [53] Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S.S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., Discher, D.E., Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nature Nanotechnology* 2, 249–255, **2007**.
- [54] Chavanpatil, M.D., Khair, A., Panyam, J., Nanoparticles for cellular drug delivery: Mechanisms and factors influencing delivery, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2651–2663, **2006**.
- [55] Banerjee, T., Mitra, S., Singh, A.K., Sharma, R.K., Maitra, A., Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 243, 93–105, **2002**.

- [56] Moghimi, S.M., Exploiting bone-marrow microvascular structure for drug delivery and future therapies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17, 61–73, **1995**.
- [57] Moghimi, S.M., Mechanism of splenic clearance of blood cells and particles-towards development of new splenotropic agents, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17, 103–115, **1995**.
- [58] Decuzzi, P., Causa, F., Ferrari, M., Netti, P.A., The effective dispersion of nanovectors within the tumor microvasculature, *Annals of Biomedical Engineering*, 34, 633–641, **2006**.
- [59] Koo, Y.E.L., Reddy, G.R., Bhojani, M., Schneider, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A., Ross, B.D., Kopelman, R., Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplateforms, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1556–1577, **2006**.
- [60] Sonavane, G., Tomoda, K., Makino, K., Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 66, 274–280, **2008**.
- [61] Davis, M.E., Non-viral gene delivery systems, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 128–131, **2002**.
- [62] Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J.J., Jallet, P., Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution, *Journal of Microencapsulation*, 13, 245–255, **1996**.
- [63] Veisheh, O., Gunn, J.W., Zhang, M., Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 284–304, **2010**.
- [64] Belting, M., Sandgren, S., Wittrup, A., Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 505–527, **2005**.
- [65] Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R. and Santamaría, J., Magnetic nanoparticles for drug delivery, *Nano Today*, 2, 22–32, **2007**.
- [66] Chin, A. B., Yaacob, I. I., Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure, *Journal of Materials Processing Technology*, 191, 235–237, **2007**.
- [67] Albornoz, C., Jacobo, S. E., Preparation of biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 305, 12, **2006**.
- [68] Kim, E. H., Lee, H. S., Kwak, B. K., Kim, B. K., Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method

- for MRI contrast agent, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289, 328-330, **2005**.
- [69] Wan, J., Chen, X., Wang, Z., Yang, X., Qian, Y., A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanorods, *Journal of Crystal Growth*, 276, 571, **2005**.
- [70] Kimata, M., Nakagawa, D., Hasegawa, M., Preparation of monodisperse magnetic particles by hydrolysis of iron alkoxide, *Powder Technology*, 132, 112, **2003**.
- [71] Alvarez, G. S., Muhammed, M., Zagrodni, A., Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution, *Chemical Engineering Science*, 61, 4625-4633, **2006**.
- [72] Basak, S., Chen, D.R., Biswas, P., Electro spray ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: Modified scaling law, *Chemical Engineering Science*, 62, 1263-1268, **2007**.
- [73] Sjogren, C. E., Johansson, C., Naevestad, A., Sontum, P. C., Briley- Saebo, K., Fahlvik, A. K., Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles, *Magnetic Resonance Imaging*, 15, 55-67, **1997**.
- [74] Nunes, A. C., Yu, Z., C., Fractionation of a water-based ferrofluid, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 65, 265, **1987**.
- [75] Thurm, S.; Odenbach, S., Magnetic separation of ferrofluids, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252, 247-249, **2002**.
- [76] Martinez-Mera, I., Espinosa, M. E., Perez-Hernandez, R. Arenas-Alatorre, J., *Materials Letters*, Synthesis of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles without surfactants at room temperatures, 61, 4447-4451, **2007**.
- [77] Morisson, S. A., Cahill, C. L., Carpenter, E., Calvin, S., Harris, V. G., Atomic engineering of mixed ferrid and core-shell nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5, 1323-1344, **2005**.
- [78] Sun, Y.K., Ma, M., Zhang, Y., Gu, N., Synthesis of nanometers-size maghemite particles from magnetite, *Colloids and Surfaces A*, 245, 15-19, **2004**.
- [79] Qiu, J., Yang, R., Li, M., Jiang, N., Preparation and characterization of porous ultrafine Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles, *Materials Research Bulletin*, 40, 1968-1975, **2005**.
- [80] Lee, S.J., Jeong, J.R., Shin, S.C., Kim, J.C., Kim, J.D., The effects of Ag underlayer and Pt intermediates layers on the microstructure and magnetic properties of epitaxial FePt thin films, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 147, 282-294, **2004**.

- [81] Jolivet, J. P., Chaneac, C., Tronc, E., Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks, *Chemistry Communications*, 5, 481-7, **2004**.
- [82] Cornell, R. M., Schwertmann, U., *The Iron Oxides*; VCH Publishers: Weinheim, Germany, **1996**.
- [83] Boistelle, R., Astier, J. P., *Journal of Crystal Growth*, Crystallization mechanisms in solution, 90, 14-30, **1988**.
- [84] Sugimoto, T., Formation of monodispersed Nano- and Micro-particles controlled in size, shape and internal structure, *Chemical Engineering Technology*, 26, 313-321, **2003**.
- [85] Schwarzer, H.C., Peukert, W., Tailoring particle size through nanoparticle precipitation, *Chemical Engineering Communications*, 191(4), 580-606, **2004**.
- [86] Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*; VCH Publishers: Weinheim, Germany, 1991.
- [87] Gribanow, N. M.; Bibik, E. E.; Buzunov, O. V.; Naumov, V. N., Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 85, 7, **1990**.
- [88] Tartaj, P.; Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Gonzalez-Carreno, T.; Serna, C. J. Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Handbook of Magnetic Materials*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; p 403.
- [89] LaMer, V. K., Dinegar, R. H., Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *Journal of the American Chemical Society*, 72, 4847-48, **1950**.
- [90] Tominaga, M., Matsumoto, M., Soejima, K., Taniguchi, I., Size control of two-dimensional iron oxide nanodots derived from biological molecules, *Journal of Colloid and Interface Science*, 299(2), 761-5, **2006**.
- [91] Weissleder, R. U.S. Patent 5,492,814, 1996; *Chemical Abstracts*, 124, 283285, **1997**.
- [92] Sjogren, C. E., Briley-Saebo, K., Hanson, M., Johansson, C., Magnetic characterization of iron oxides for magnetic resonance imaging, *Magnetic Resonance in Medicine*, 31(3), 268-72, **1994**.
- [93] Jolivet, J. P., Froidefond, C., Pottier, A., Chaneac, C., Cassaignon, S., Tronc, E., Euzen, P., Size tailoring of oxide nanoparticles by precipitation in aqueous medium. A semi-quantitative modelling, *Journal of Materials Chemistry*, 14 (21), 3281-3288, **2004**.

- [94] Jolivet, J. P.; Vayssieres, L.; Chaeneac, C.; Tronc, E., Precipitation of spinel iron oxide: Nanoparticle size control, *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 432, 145 **1997**.
- [95] Jolivet, J. P., Tronc, E., Chaeneac, C., Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites, *Comptes Rendus Chimie*, 5(10), 659-664, **2002**.
- [96] Bacri, J. C., Perzynski, R., Salin, D., Cabuil, V., Massart, R., Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 85, 27-32, **1990**.
- [97] Massart, R., Roger, J., Cabuil, V., New trends in chemistry of magnetic colloids: Polar and non-polar magnetic fluids, emulsions, capsules and vesicles, *Brazilian Journal of Physics*, 2, 135-141, **1995**.
- [98] Neveu-Prin, S., Cabuil, V., Massart, R., Escaffre, P., Dussaud, J., Encapsulation of magnetic fluids, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 42-45, 122, **1993**.
- [99] Massart, R., Cabuil, V., Effect of some parameters on the formation of colloidal magnetite in alkaline-medium-yield and particle size control, *Journal de chimie physique et de physico-chimie biologique*, 84, 967-973, **1987**.
- [100] Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J., Pons, J. N., Adsorption of gluconic and citric acids on maghemite particles in aqueous medium, *Progress in Colloid and Polymer Science*, 100, 212-6, **1996**.
- [101] Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J., Pons, J. N., Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface complexation of maghemite nanoparticles, *Journal of Molecular Liquids*, 83, 233-242, **1999**.
- [102] Fauconnier, N., Pons, J. N., Roger, J., Bee, A., Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid, *Journal of Colloid and Interface Science*, 194, 427-433, **1997**.
- [103] Roger, J., Pons, J. N., Massart, R., Halbreich, A., Bacri, J. C., Some biomedical applications of ferrofluids, *The European Physical Journal-Applied Physics*, 5, 321, **1999**.
- [104] Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le Jeune, J. J., Jallet, P., Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study, *Journal of Colloid and Interface Science*, 212 (2), 474-482, **1999**.
- [105] Vayssières, L., Chaneac, C., Tronc, E., Jolivet, J.P., Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: An example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 205, 205-212, **1998**.

- [106] Jiang, W., Yang, H.C., Yang, S. Y., Horng, H. E., Hung, J. C., Chen, Y. C., Hong, C.Y., Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 283, 210-214, **2004**.
- [107] Jolivet, J. P. *Metal Oxide Chemistry and Synthesis. From Solution to Solid State*; Wiley: Chichester, U.K., **2000**.
- [108] Sun, S., Zeng, H., Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 124(28), 8204-5, **2002**.
- [109] Gupta, A. K., Wells, S., Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization and cytotoxicity studies, *IEEE TransNanobioscience*, 3(1), 66-73, **2004**.
- [110] Kim, D. K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K. V., Muhammed, M., Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 30-36, 225, **2001**.
- [111] Santra, S., Tapeç, R., Theodoropoulou, N., Dobson, J., Hebard, A., Tan, W., Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: the effect of nonionic surfactants, *Langmuir* 17, 2900-2906, **2001**.
- [112] Wong, K. K. W., Douglas, T., Gider, S., Awschalom, D. D., Mann, S., Biomimetic synthesis and characterization of magnetic proteins (magnetoferritin), *Chemistry of Materials*, 10, 279-285, **1998**.
- [113] Strable, E., Bulte, J. W. M., Moskowitz, B., Vivekanandan, K., Allen, M., Douglas, T., Synthesis and characterization of soluble iron oxide-dendrimer composites. *Chemistry of Materials*, 13, 2201, **2001**.
- [114] Bonacchi, D., Caneschi, A., Dorignac, D., Falqui, A., Gatteschi, D., Rovai, D., Sangregorio, C., Sessoli, R., Nanosized iron oxide particles entrapped in pseudo-single crystals of  $\gamma$ -cyclodextrin, *Chemistry of Materials*, 16, 2016, **2004**.
- [115] Pileni, M. P., Duxin, N., Micelle technology for magnetic nanosized alloys and composites, *Chemical Innovation*, 30, 25, **2000**.
- [116] Jia, Z., Yujun, W., Yangcheng, L., Jingyu, M., Guangsheng, L., In situ preparation of magnetic chitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion, *Reactive and Functional Polymers*, 66, 1552-1558, **2006**.
- [117] Hyeon, T., Seong Lee, S., Park, J., Chung, Y., Na, H. B., Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites



- without a size-selection process, *Journal of American Chemical Society*, 123 (51), 12798-12801, **2001**.
- [118] Butter, K., Kassapidou, K., Vroege, G. J., Philipse, A. P., Preparation and properties of colloidal iron dispersions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 287, 485-495, **2005**.
- [119] Mao, B., Kang, Z., Wang, E., Lian, S., Gao, L., Tian, C., Wang, C., Synthesis of magnetite octahedrons from iron powder through a mild hydrothermal method, *Materials Research Bulletin*, 41, 2226-2231, **2006**.
- [120] Willard, M. A., Kurihara, L. K., Carpenter, E. E., Calvin, S., Harris, V. G., *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Nalwa, H. S., Ed., American Scientific Publishers: Valencia, CA, Vol. 1, p 815, **2004**.
- [121] Chen, D., Xu, R., Hydrothermal synthesis and characterization of nanocrystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> powders, *Materials Research Bulletin*, 33, 1015-1021, **1998**.
- [122] Dai, Z., Meiser, F., Möhwald, H., Nanoengineering of iron oxide and iron oxide/silica hollow spheres by sequential layering combined with a sol-gel process, *Journal of Colloid and Interface Science*, 28 (1), 298-300, **2005**.
- [123] Kojima, K., Miyazaki, M., Mizukami, F., Maeda, K., Selective formation of spinel iron oxide in thin films by complexing agent-assisted sol-gel processing, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 8, 77-81, **1997**.
- [124] Cannas, C., Gatteschi, D., Musinu, A., Piccaluga, G., Sangregorio, C., Structural and magnetic properties of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry*, 102 (40), 7721-7726, **1998**.
- [125] Del Monte, F., Morales, M. P., Levy, D., Fernandez, A., Ocana, M., Roig, A., Molins, E., O'Grady, K., Serna, C., Formation of  $\gamma$ -Fe<sub>3</sub>O<sub>3</sub> isolated nanoparticles in a silica matrix, *Langmuir*, 13 (14), 3627-3634, **1997**.
- [126] Raileanu, M., Crisan, M., Petrache, C., Crisan, D., Zaharescu, M., Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> nanocomposites obtained by different sol-gel routes, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 5 (3), 693, **2003**.
- [127] Chow, G. M., Kurihara, L. K., Kemner, K. M., Schoen, P. E., Elam, W. T., Ervin, A., Keller, S., Zhang, Y.D., Budnick, J., Ambrose, T., Structural, morphological and magnetic study of nanocrystalline cobalt-copper powders synthesized by the polyol process, *Journal of Materials Research*, 10 (6), 1546-1554, **1995**.
- [128] Jezequel, D., Guenot, J., Jouini, N., Fievet, F., Submicrometer zinc oxide particles: Elaboration in polyol medium and morphological

- characteristics, *Journal of Materials Research*, 10 (01), 77-83, **1995**.
- [129] Merikhi, J., Jungk, H.O., Feldmann, C., Sub-micrometer  $\text{CoAl}_2\text{O}_4$  pigment particles-synthesis and preparation of coating, *Journal of Materials Chemistry*, 10, 1311-1314, **2000**.
- [130] Reetz, M. T., Helbig, W., Quasick, S. A., *Active Metals, Preparation, Characterization, Applications*; Furster, A., Ed.; VCH: Weinheim, Germany, **1996**.
- [131] Pascal, C., Pascal, J. L., Favier, F., Elidrissi Moubtassim, M. L., Payen, C., Electrochemical synthesis for the control of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticle size. Morphology, Microstructure and Magnetic Behavior, *Chemistry of Materials*, 11, 141-147, **1999**.
- [132] Kahn, H. R., Petrikowski, K., Anisotropic structural and magnetic properties of arrays of  $\text{Fe}_{26}\text{Ni}_{74}$  nanowires electrodeposited in the pores of anodic alumina, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 215- 216, 526-528, **2000**.
- [133] Pecharroman, C., Gonzalez-Carreno, T., Iglesias, J. E., The infrared dielectric properties of maghemite,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , from reflectance measurement on pressed powders, *Physics and Chemistry of Minerals*, 22 (1), 21-29, **1995**.
- [134] Gonzalez-Carreno, T., Morales, M. P., Gracia, M., Serna, C. J., Preparation of uniform  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  particles with nanometer size by spray pyrolysis, *Materials Letters*, 18, 156-158, **1993**.
- [135] Julian-Lopez, B., Boissiere, C., Chaneac, C., Grosso, D., Vasseur, S., Miraux, S., Duguet, E., Sanchez, C., Mesoporous maghemite-organosilica microspheres: a promising route towards multifunctional platforms for smart diagnosis and therapy, *Journal of Materials Chemistry*, 17, 1563-1569, **2007**.
- [136] Qian, L., Sha, Y., Yang, X., Simple and convenient preparation of Au-Pt core-shell nanoparticles on surface via a seed growth method, *Thin Solid Films*, 515, 1349-1353, **2006**.
- [137] Lu, L., Sun, G., Zhang, H., Wang, H., Xi, S., Hu, J., Tian, Z., Ray, C., Fabrication of core-shell Au-Pt nanoparticle film and its potential application as catalysis and SERS substrate, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 1005-1009, **2004**.
- [138] Chavez, J. L., Wong, J. L., Duran, R. S., Core-shell nanoparticles: characterization and study of their use for the encapsulation of hydrophobic fluorescent dyes, *Langmuir*, 24(5), 2064-71, **2008**.
- [139] Cui, X., Zhong, S., Yan, J., Wang, C., Zhang, H., Wang, H., Synthesis and characterization of core-shell  $\text{SiO}_2$ -fluorinated polyacrylate nanocomposite latex particles containing fluorine in the shell, *Colloids and Surfaces A*, 360, 41-46, **2010**.

- [140] Song, C., Wang, D., Gu, G., Lin, Y., Yang, J., Chen, L., Fu, X., Hu, Z., Preparation and characterization of silver/TiO<sub>2</sub> composite hollow fibers, *Journal of Colloid and Interface Science*, 272, 340-344, **2004**.
- [141] Grasset, F., Labhsetwar, N., Li, D., Park, D. C., Saito, N., Haneda, H., Cador, O., Roisnel, T., Mornet, S., Duguet, E., Portier, J., Etourneau, J., Synthesis and magnetic characterization of zinc ferrite nanoparticles with different environments: Powder, colloidal solution and zinc ferrite-silica core-shell nanoparticles, *Langmuir*, 18(21), 8209-8216, **2002**.
- [142] Xuan, S., Wang, Y. X. J., Yu, J. C., Leung, K. C. F., Preparation, characterization and catalytic activity of core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanocomposites, *Langmuir*, 25(19), 11835-11843, **2009**.
- [143] Riley, T., Heald, C. R., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., Davis, S. S., King, S. M., Heenan, R. K., Purkiss, S. C., Barlow, R. J., Gellert, P. R., Washington, C., Core-shell structure of PLA-PEG nanoparticles used for drug delivery, *Langmuir*, 19(20), 8428-8435, **2003**.
- [144] Song, C., Yu, W., Zhao, B., Zhang, H., Tang, C., Sun, K., Wu, X., Dong, L., Chen, Y., Efficient fabrication and photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> hollow spheres, *Catalysis Communications*, 10, 650-654, **2009**.
- [145] Sgraja, M., Bertling, J., Kummel, R., Jansens, P. J., Inorganic and hybrid hollow spheres by coating of microcapsules as templates, *Journal of Material Science*, 41, 5490, **2006**.
- [146] De, M., Ghosh, P. S., Rotello, V. M., Applications of nanoparticles in biology, *Advanced Materials*, 20(22), 4225-4241, **2008**.
- [147] Lien, Y. H., Wu, T. M., Preparation and characterization of thermosensitive polymers grafted onto silica-coated iron oxide nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 326, 517-521, **2008**.
- [148] Lee, W. R., Kim, M. G., Choi, J. R., Park, J.I., Ko, S. J., Oh, S. J., Cheon, J., Redox-transmetalation process as a generalized synthetic strategy for core-shell magnetic nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 127(46), 16090-16097, **2005**.
- [149] Bai, Y., Teng, B., Chen, S., Chang, Y., Li, Z., Preparation of magnetite nanoparticles coated with an amphiphilic block copolymer: A potential drug carrier with a core-shell-corona structure for hydrophobic drug delivery, *Macromolecular Rapid Communications*, 27(24), 2107-2112, **2006**.
- [150] Sellmyer, D., Skomski, R., *Advanced Magnetic Nanostructures*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2006**.

- [151] Purushotham, S., Ramanujan, R.V., Thermo-responsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy, *Acta Biomaterialia*, 6, 502–510, **2010**.
- [152] Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 1–11, **2005**.
- [153] C.S.S.R. Kumar, *Magnetic Nanomaterials*, Wiley, Weinheim, **2009**.
- [154] Anderson, S.A., Shukaliak-Quandt, J., Jordan, E.K., Arbab, A.S., Martin, R., McFarland, H., Frank, J.A., Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis, *Annals of Neurology*, 55, 654–659, **2004**.
- [155] Haun, J.B., Yoon, T.J., Lee, H., Weissleder, R., Magnetic nanoparticle biosensors, *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 291–304, **2010**.
- [156] Liebesny, P., Goyal, S., Dunlap, D., Family, F., Finzi, L., Determination of the number of proteins bound nonspecifically to DNA, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 22, 414104, **2010**.
- [157] Celedon, A., Wirtz, D., Sun S., Torsional mechanics of DNA are regulated by small-molecule intercalation, *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 16929–16935, **2010**.
- [158] Robert Vajtai (Ed.), *Springer Handbook of Nanomaterials*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [159] "Catherine Clarke and Susan Davies, "Immunomagnetic Cell Separation", *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo* Edited by: Brooks, S. A., Schumacher, U., © Humana Press Inc., Totowa, NJ, **2008**.
- [160] Allen, T.M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy, *Nature Reviews Cancer*, 2, 705-63, **2002**.
- [161] Ashley, C.E., Carnes, E.C., Phillips, G.K., Padilla, D., Durfee, P.N., Brown PA, et al. The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers, *Nature Materials*, 10, 389-97, **2011**.
- [162] Yu, M.K., Park, J., Jon, S., Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy, *Theranostics*, 2(1), 3-44, **2012**.
- [163] Jones, A., Harris, A.L., New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *The Cancer Journal from Scientific American*, 4, 209-17, **1998**.
- [164] Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., et al. Regulation of transport pathways in tumor

- vessels: role of tumor type and microenvironment, *Proceedings of National Academy Sciences*, 95, 4607-12, **1998**.
- [165] Shubik, P., Vascularization of tumors: a review. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 103, 211-26, **1982**.
- [166] Yaun, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P., et al., Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size, *Cancer Research*, 55, 3752-56, **1995**.
- [167] Allen, T.M., Cullis, P.R., Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science*, 303, 1818-22, **2004**.
- [168] Byrne, J.D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L., Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1615-26, **2008**.
- [169] Gabizon, A., Martin, F., Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours, *Drugs*, 54, 15-21, **1997**.
- [170] Gabizon, A., Shmeeda, H., Barenholz, Y., Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies, *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 419-36, **2003**.
- [171] Allen, T.M., Martin, F.J., Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines, *Seminars in Oncology*, 31, 5-15, **2004**.
- [172] Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A. et al., Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel, *Clinical Cancer Research*, 12, 1317-24, **2006**.
- [173] Miele, E., Spinelli, G.P., Tomao, F., Tomao, S., Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer, *International Journal of Nanomedicine*, 4, 99-105, **2009**.
- [174] Bae, Y.H., Drug targeting and tumor heterogeneity, *Journal of Controlled Release*, 133, 2-3, **2009**.
- [175] Mishra, S., Webster, P., Davis, M.E., PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles, *European Journal of Cell Biology*, 83, 97-111, **2004**.
- [176] Romberg, B., Hennink, W., Storm, G., Sheddable Coatings for Long-Circulating Nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 25, 55-71, **2008**.
- [177] Hong, R.L., Huang, C.J., Tseng, Y.L., Pang, V.F., Chen, S.T., Liu, J.J., et al., Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice:

- Is surface coating with polyethylene glycol beneficial. *Clinical Cancer Research*, 5, 3645-52, **1999**.
- [178] Gullotti, E., Yeo, Y., Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery, *Molecular Pharmacology*, 6, 1041-51, **2009**.
- [179] Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E., Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters, *Nature Reviews Cancer*, 2, 48-58, **2002**.
- [180] Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2, 751-60, **2002**.
- [181] Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D.J., Kreitman, R.J., Immunotoxin therapy of cancer, *Nature Review Cancer*, 6, 559-65, **2006**.
- [182] Shi, J., Xiao, Z., Kamaly, N., Farokhzad, O.C., Self-Assembled Targeted Nanoparticles: Evolution of Technologies and Bench to Bedside Translation, *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 1123-1134, **2011**.
- [183] Montet, X., Funovics, M., Montet-Abou, K., Weissleder, R., Josephson L., Multivalent effects of RGD peptides obtained by nano-particle display. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 6087-93, **2006**.
- [184] Gao, J., Gu, H., Xu, B., Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications, *Accounts of Chemical Research*, 42, 1097-107, **2009**.
- [185] Das, M., Mishra, D., Dhak, P., Gupta, S., Maiti, T.K., Basak, A., et al., Biofunctionalized, Phosphonate-Grafted, Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles for Combined Targeted Cancer Therapy and Multimodal Imaging, *Small*, 5, 2883-93, **2009**.
- [186] Pan, D., Caruthers, S.D., Hu, G., Senpan, A., Scott, M.J., Gaffney, P.J., et al., Ligand-directed nanobialys as theranostic agent for drug delivery and manganese-based magnetic resonance imaging of vascular targets, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 9186-7, **2008**.
- [187] Bae, K.H., Lee, K., Kim, C., Park, T.G., Surface functionalized hollow manganese oxide nanoparticles for cancer targeted siRNA delivery and magnetic resonance imaging, *Biomaterials*, 32, 176-84, **2011**.
- [188] James, J.S., Dubs, G., FDA approves new kind of lymphoma treatment, *AIDS Treatment News*, 284, 2-3, **1997**.

- [189] Albanell, J., Baselga, J., Trastuzumab. A humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer, *Drugs Today*, 35, 931-46, **1999**.
- [190] Ferrara N., VEGF as a therapeutic target in cancer, *Oncology*, 69, 11-6, **2005**.
- [191] Van Cutsem, E., Köhne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.R., Makhson, A, et al., Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer, *New England Journal of Medicine*, 360, 1408-17, **2009**.
- [192] Hadjipanayis, C.G., Machaidze, R., Kaluzova, M., Wang, L., Schuette, A.J., Chen, H. et al., EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma, *Cancer Research*, 70, 6303-12, **2010**.
- [193] Raghavan, R., Brady, M.L., Rodríguez-Ponce, M.I., Hartlep, A., Pedain, C., Sampson, J.H., Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurgical Focus*, 20, E12, **2006**.
- [194] Bobo, R.H., Laske, D.W., Akbasak, A., Morrison, P.F., Dedrick, R.L., Oldfield, E.H., Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain, *Proceeding of National Academy of Sciences*, 91, 2076-80, **1994**.
- [195] Hadjipanayis, C.G., Fellows-Mayle, W., Deluca, N.A., Therapeutic efficacy of a herpes simplex virus in combination with radiation or temozolomide for intracranial glioblastoma after convection-enhanced delivery. *Molecular Therapy*, 16, 1783-8, **2008**.
- [196] Morrison, P.F., Laske, D.W., Bobo, H., Oldfield, E.H., Dedrick, R.L., High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *American Journal of Physiology*, 266, R292-305, **1994**.
- [197] Ling, Y., Wei, K., Luo, Y., Gao, X., Zhong, S., Dual docetaxel/superparamagnetic iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy, *Biomaterials*, 32, 7139-50, **2011**.
- [198] Wentz, M.N., Jain, A., Kono, E., Berberat, P.O., Giese, T., Reber, H.A., et al., Prostate stem cell antigen is a putative target for immunotherapy in pancreatic cancer. *Pancreas*, 31, 119-25, **2005**.
- [199] Lu, R.M., Chang, Y.L., Chen, M.S., Wu, H.C., Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor-targeted imaging and drug delivery. *Biomaterials*, 32, 3265-74, **2011**.

- [200] Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G.F., Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 915-25, **2003**.
- [201] Cappuzzo, F., Marchetti, A., Skokan, M., Rossi, E., Gajapathy, S., Felicioni, L., et al., Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 1667-74, **2009**.
- [202] Wang, A.Z., Gu. F., Zhang. L., Chan. J.M., Radovic-Moreno. A., Shaikh. M.R., et al., Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications, *Expert Opinion on biological Therapy*, 8, 1063-70, **2008**.
- [203] McCarthy, J.R., Bhaumik, J., Karver, M.R., Sibel Erdem, S., Weissleder, R., Targeted nanoagents for the detection of cancers, *Molecular Oncology*, 4, 511-28, **2010**.
- [204] Beekman, K.W., Colevas, A.D., Cooney, K., Dipaola, R., Dunn, R.L., Gross, M., et al., Phase II evaluations of cilengitide in asymptomatic patients with androgen-independent prostate cancer: scientific rationale and study design. *Clinical Genitourinary Cancer*, 4, 299-302, **2006**.
- [205] Kumar, M., Yigit, M., Dai, G., Moore, A., Medarova, Z., Image-guided breast tumor therapy using a small interfering RNA nanodrug, *Cancer Research*, 70, 7553-61, **2010**.
- [206] Perey, L., Hayes, D.F., Maimonis, P., Abe, M., O'Hara, C., Kufe, D.W., Tumor selective reactivity of a monoclonal antibody prepared against a recombinant peptide derived from the DF3 human breast carcinoma associated antigen, *Cancer Research*, 52, 2563-8, **1992**.
- [207] Ruoslahti, E., Bhatia, S.N., Sailor, M.J., Targeting of drugs and nanoparticles to tumors, *The Journal of Cell Biology*, 188, 759-768-6, **2010**.
- [208] Simberg, D., Duza, T., Park, J.H., Essler, M., Pilch, J., Zhang, L., Derfus, A.M., Yang, M., Hoffman, R.M., Bhatia, S., Sailor, M.J., Ruoslahti, E., Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors, *Proceedings of the National Academy of Science*, 104, 932-936-3, **2007**.
- [209] Abe, K., Shoji, M., Chen, J., Bierhaus, A., Danave, I., Micko, C., et al., Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor, *Proceeding of National Academy of Sciences*, 96, 8663-8, **1999**.
- [210] Pilch, J., Brown, D.M., Komatsu, M., Jarvinen, T.A., Yang, M., Peters, D., et al. Peptides selected for binding to clotted plasma accumulate in tumor stroma and wounds, *Proceeding of National Academy of Sciences*, 103, 2800-4, **2006**.



- [211] Zhang, H., Ma, Y., Sun, X.L., Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug/gene delivery, *Medicinal Research Reviews*, 30, 270-89, **2010**.
- [212] Shen, Z., Wei, W., Tanaka, H., Kohama, K., Ma, G., Dobashi, T., et al., A galactosamine-mediated drug delivery carrier for targeted liver cancer therapy, *Pharmacological Research*, 64, 410-9, **2011**.
- [213] Kim, E.M., Jeong, H.J., Moon, M.H., Asialoglycoprotein receptor targeted gene delivery using galactosylated Polyethylenimine-graft -Poly (ethylene glycol): In vitro and in vivo studies, *Journal of Controlled Release*, 108, 557-67, **2005**.
- [214] Yang, Y., Zhang, Z., Chen, L., Gu, W., Li, Y., Galactosylated poly(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)phosphazene/DNA complex nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation for gene delivery, *Biomacromolecules*, 11, 927-33, **2010**.
- [215] Cho, C.S., Park, I.K., Cho, C.S., Galactosylated Poly (ethylene glycol)-Chitosan - graft- Polyethylenimine as a gene carrier for hepatocyte-targeting, *Journal of Controlled Release*, 131, 150-7, **2008**.
- [216] Foraker, A.B., Khantwal, C.M., Swaan, P.W., Current perspectives on the cellular uptake and trafficking of riboflavin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1467-83, **2003**.
- [217] Karande, A.A., Sridhar, L., Gopinath, K.S., Adiga, P.R., Riboflavin carrier protein: a serum and tissue marker for breast carcinoma, *International Journal of Cancer*, 95, 277-81, **2001**.
- [218] Mertens, M.E., Frese, J., Bolukbas, D.A., Hrdlicka, L., Golombek, S., Koch, S., Mela, P., Jockenhövel, S., Kiessling, Fabian., Lammers, T., FMN-coated fluorescent USPIO for cell labeling and non-invasive MR Imaging in Tissue Engineering, *Theranostics*, 10, 1002-1013-4, **2014**.
- [219] Wilson, D.S., Szostak, J.W., In vitro selection of functional nucleic acids, *Annual Review of Biochemistry*, 68, 611-47, **1999**.
- [220] Tuerk, C., Gold, L., Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, 249, 505-10, **1990**.
- [221] Lee, J.F., Hesselberth, J.R., Meyers, L.A., Ellington, A.D., Aptamer database, *Nucleic Acids Research*, 32, D95-100, **2004**.
- [222] Lee, J.F., Stovall, G.M., Ellington, A.D., Aptamer therapeutics advance, *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 282-9, **2006**.
- [223] Bates, P.J., Kahlon, J.B., Thomas, S.D., Trent, J.O., Miller, D.M., Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with

- protein binding, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 26369-77, **1999**.
- [224] Bates, P.J., Laber, D.A., Miller, D.M., Thomas, S.D., Trent, J.O., Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer, *Experimental and Molecular Pathology*, 86, 151-64, **2009**.
- [225] Mongelard, F., Bouvet, P.. AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 12:,107-14, **2010**.
- [226] Bouchard, P.R., Hutabarat, R.M., Thompson, K.M., Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 237-57, **2010**.
- [227] Lupold, S.E., Hicke, B.J., Lin, Y., Coffey, D.S., Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research*, 62, 4029-33, **2002**.
- [228] Dassie, J.P., Liu, X.Y., Thomas, G.S., Whitaker, R.M., Thiel, K.W., Stockdale, K.R., et al.. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat Biotechnology*, 27, 839-49, **2009**.
- [229] Li, N., Larson, T., Nguyen, H.H., Sokolov, K.V., Ellington, A.D., Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells. *Chemical Communications*, 46, 392-4, **2010**.
- [230] Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., et al., Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature*, 464: 1067-70, **2010**.
- [231] Gatter, K.C., Brown, G., Trowbridge, I.S., Wollston, R.E., Mason, D.Y., Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance, *Journal of Clinical Pathology*, 36, 539-45, **1983**.
- [232] Cerqueira, N.M., Pereira, S., Fernandes, P.A., Ramos, M.J., Overview of ribonucleotide reductase inhibitors: an appealing target in anti-tumor therapy, *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1283-94, **2005**.
- [233] Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haubmann, I., et al., A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells, *Cell*, 65,13-24, **1991**.
- [234] Platt, V.M., Szoka, Jr F.C., Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor, *Molecular Pharmaceutics*, 5, 474-86, **2008**.

- [235] Bhang, S.H., Won, N., Lee, T., Jin, H., Nam, J., Park, J., et al., Hyaluronic acid-quantum dot conjugates for in vivo lymphatic vessel imaging, *ACS Nano Letters*, 3, 1389-98, **2009**.
- [236] Wu, W., Shen, J., Banerjee, P., Zhou, S., Core-shell hybrid nanogels for integration of optical temperature-sensing, targeted tumor cell imaging, and combined chemo-photothermal treatment, *Biomaterials*, 31, 7555-66, **2010**.
- [237] Ge, Y., Zhang, Y., He, S., Nie, F., Teng, G., Gu, N., Fluorescence Modified Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles for High-Efficient Cellular Imaging, *Nanoscale Research Letters*, 4, 287-95, **2009**.
- [238] Lee, H., Yu, M.K., Park, S., Moon, S., Min, J.J., Jeong, Y.Y., Kang, H.W., Jon, S., Thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and application as a dual imaging probe for cancer in vivo, *Journal of American Chemical Society*, 129, 12739-45, **2007**.
- [239] Talanov, V.S., Regino, C.A., Kobayashi, H., Bernardo, M., Choyke, P.L., Brechbiel, M.W., Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging, *Nano Letters*, 6, 1459-63, **2006**.
- [240] Brunel, F.M., Lewis, J.D., Destito, G., Steinmetz, N.F., Manchester, M., Stuhlmann, H., Dawson, P.E., Hydrazone ligation strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles for cell imaging and tumor targeting, *Nano Letters*, 10, 1093-7, **2010**.
- [241] Zhang, J., Misra, R.D., Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: core-shell nanoparticle carrier and drug release response, *Acta Biomaterialia*, 3, 838-50, **2007**.
- [242] Koole, R., van Schooneveld, M.M., Hilhorst, J., Castermans, K., Cormode, D.P., Strijkers, G.J., Donega, C.M., Vanmaekelbergh, D., Griffioen, A.W., Nicolay, K., Fayad, Z.A., Meijerink, A., Mulder, W.J.M., Paramagnetic lipid-coated silica nanoparticles with a fluorescent quantum dot core: a new contrast agent platform for multimodality imaging, *Bioconjugation Chemistry*, 19, 2471-9, **2008**.
- [243] Lu, W., Zhang, G., Zhang, R., Flores, L.G., Huang, Q., Gelovani, J.G., Li, C., Tumor site-specific silencing of NF-kappaB p65 by targeted hollow gold nanosphere-mediated photothermal transfection, *Cancer Research*, 70, 3177-88, **2010**.
- [244] Veiseh, O., Sun, C., Fang, C., Bhattarai, N., Gunn, J., Kievit, F., Du, K., Pullar, B., Lee, D., Ellenbogen, R.G., Olson, J., Zhang, M., Specific targeting of brain tumors with an optical/magnetic resonance imaging nanoprobe across the blood-brain barrier, *Cancer Research*, 69, 6200-7, **2009**.

- [245] Lee, C.M., Jeong, H.J., Kim, E.M., Kim, D.W., Lim, S.T., Kim, H.T., et al., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a dual imaging probe for targeting hepatocytes in vivo, *Magnetic Resonance in Medicine*, 62, 1440-6, **2009**.
- [246] Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P.W., Langer, R., et al., Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer, *Nano Letters*, 7, 3065-70, **2007**.
- [247] Green, N.M., Avidin and streptavidin, *Methods in Enzymology*, 184, 51-67, **1990**.
- [248] Jain, T.K., Morales, M.A., Sahoo, S.K., Leslie-Pelecky, D.L., Labhasetwar, V., Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anti-cancer agents, *Molecular Pharmacology*, 2, 194-205, **2005**.
- [249] Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science*, 244, 707-12, **1989**.
- [250] Artemov, D., Mori, N., Okollie, B., Bhujwala, 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, 403-8, **2003**.
- [251] Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 40, 2004-21, **2001**.
- [252] Hein, C.D., Liu, X.M., Wang, D., Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences, *Pharmaceutical Research*, 25, 2216-30, **2008**.
- [253] Devaraj, N.K., Upadhyay, R., Haun, J.B., Hilderbrand, S.A., Weissleder R., Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 48, 7013-6, **2009**.
- [254] von Maltzahn, G., Ren, Y., Park, J.H., Min, D.H., Kotamraju, V.R., Jayakumar, J., et al., In vivo tumor cell targeting with "click" nanoparticles, *Bioconjug Chemistry*, 19, 1570-8, **2008**.
- [255] Rubinstein, D.B., Stortchevoi, A., Boosalis, M., Ashfaq, R., Ghebrehiwet B., Peerschke, E.I., et al., Receptor for the globular heads of C1q (gC1q-R, p33, hyaluronan-binding protein) is preferentially expressed by adenocarcinoma cells, *International Journal of Cancer*, 110, 741-50, **2004**.

- [256] Santra, S., Kaittanis, C., Grimm, J., Perez, J.M., Drug/dye-loaded, multifunctional iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and dual optical/magnetic resonance imaging, *Small*, 5, 1862-8, **2009**.
- [257] Haun, J.B., Devaraj, N.K., Hilderbrand, S.A., Lee, H., Weissleder, R., Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection, *Nature Nanotechnology*, 5, 660-5, **2010**.
- [258] Javier, D.J., Nitin, N., Levy, M., Ellington, A., Richards-Kortum, R., Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular-specific contrast agents for reflectance imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 1309-12, **2008**.
- [259] Yu, M.K., Kim, D., Lee, I.H., So, J.S., Jeong, Y.Y., Jon, S., Image-Guided Prostate Cancer Therapy Using Aptamer-Functionalized Thermally Cross-Linked Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, *Small*, 7, 2241-9, **2011**.
- [260] Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R., Biodegradable long-circulating polymeric nano-spheres, *Science*, 263, 1600-3, **1994**.
- [261] Berry, C.C., Curtis, A.S.G., Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, R198-206, **2003**.
- [262] Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C., Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 53, 283-318, **2001**.
- [263] Xie, J., Xu, C., Kohler, N., Hou, Y., Sun, S., Controlled PEGylation of monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. *Advanced Materials*, 19, 3163-6, **2007**.
- [264] Lutz, J.F., Stiller, S., Hoth, A., Kaufner, L., Pison, U., Cartier, R., One-pot synthesis of PEGylated ultrasmall iron-oxide nanoparticles and their in vivo evaluation as magnetic resonance imaging contrast agents, *Biomacromolecules*, 7, 3132-8, **2006**.
- [265] Larsen, E.K., Nielsen, T., Wittenborn, T., Birkedal, H., Vorup-Jensen, T., Jakobsen, M.H., et al., Size-Dependent Accumulation of PEGylated Silane-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Murine Tumors. *ACS Nano*, 3, 1947-51, **2009**.
- [266] Chung, H.J., Lee, H., Bae, K.H., Lee, Y., Park, J., Cho, S.W., et al., Facile synthetic route for surface-functionalized magnetic nanoparticles: cell labeling and magnetic resonance imaging studies, *ACS Nano*, 5, 4329-36, **2011**.
- [267] Flesch, C., Unterfinger, Y., Bourgeat-Lami, E., Duguet, E., Delaite, C., Dumas, P., Poly(ethylene glycol) surface coated magnetic

- particles *Macromolecular Rapid Communications*, 26, 1494-8, **2005**.
- [268] Lu, Y., Yin, Y.D., Mayers, B.T., Xia, Y.N., Modifying the surface properties of Superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach, *Nano Letters*, 2, 183-6, **2002**.
- [269] Veiseh, O., Sun, C., Gunn, J., Kohler, N., Gabikian, P., Lee, D., et al., Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas, *Nano Letters*, 5, 1003-8, **2005**.
- [270] Gunn, J., Wallen, H., Veiseh, O., Sun, C., Fang, C., Cao, J.H., et al., A multimodal targeting nanoparticle for selectively labeling T cells, *Small*, 4, 712-5, **2008**.
- [271] Sun, C., Veiseh, O., Gunn, J., Fang, C., Hansen, S., Lee, D., et al., In vivo MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated super-paramagnetic nanoprobe, *Small*, 4, 372-9, **2008**.
- [272] Chen, G., Chen, W., Wu, Z., Yuan, R., Li, H., Gao, J., Shuai, X., MRI-visible polymeric vector bearing CD3 single chain antibody for gene delivery to T cells for immunosuppression, *Biomaterials*, 30, 1962-70, **2009**.
- [273] Kumar, M., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chemical Reviews*, 104, 6017-84, **2004**.
- [274] Weissleder, R., Stark, D.D., Engelstad, B.L., Bacon, B.R., Compton, C.C., White, D.L., et al., Superparamagnetic iron oxide - pharmacokinetic and toxicity. *AJR American Journal of Roentgenology*, 152, 167-73, **1989**.
- [275] Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Lee, A.S., Josephson, L., Brady, T.J., Ultrasmall superparamagnetic iron oxide - an intravenous contrast agent for assessing lymph-nodes with MR imaging, *Radiology*, 175, 494-8, **1990**.
- [276] Stark, D.D., Weissleder, R., Elizondo, G., Hahn, P.F., Saini, S., Todd, L.E., et al., Superparamagnetic iron oxide - clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver, *Radiology*, 168, 297-301, **1988**.
- [277] Josephson, L., Tung, C.H., Moore, A., Weissleder, R., High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates, *Bioconjugate Chemistry*, 10, 186-91, **1999**.
- [278] Wunderbaldinger, P., Josephson, L., Weissleder, R., Cross-linked iron oxides (CLIO): A new platform for the development of targeted MR contrast agents. *Academic Radiology*, 9, S304-6, **2002**.

- [279] McCarthy, J.R., Weissleder, R., Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1241-51, **2008**.
- [280] Wang, Y., Teng, X.W., Wang, J.S., Yang, H., Solvent-free atom transfer radical polymerization in the synthesis of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ polystyrene core-shell nanoparticles. *Nano Letters*, 3, 789-93, **2003**.
- [281] Li, G.F., Fan, J.D., Jiang, R., Gao, Y., Cross-linking the linear polymeric chains in the ATRP synthesis of iron oxide/polystyrene core/shell nanoparticles, *Chemistry of Materials*, 16, 1835-7, **2004**.
- [282] Chastellain, M., Petri, A., Hofmann, H., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications: a focus on PVA as a coating. *Quantum Dots, Nanoparticles and Nanowires*, 789, 269-72, **2004**.
- [283] Liu, H.L., Ko, S.P., Wu, J.H., Jung, M.H., Min, J.H., Lee, J.H., et al., One-pot polyol synthesis of monosize PVP-coated sub-5 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 310, E815-7, **2007**.
- [284] Ma, Y.H., Wu, S.Y., Wu, T., Chang, Y.J., Hua, M.Y., Chen, J.P., Magnetically targeted thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator bound to polyacrylic acid-coated nanoparticles, *Biomaterials*, 30, 3343-51, **2009**.
- [285] Portet, D., Denizot, B., Rump, E., Lejeune, J.J., Jallet, P., Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as magnetic resonance imaging contrast agents, *Journal of Colloid and Interface Science*, 238, 37-42, **2001**.
- [286] Zhang, C., Wangler, B., Morgenstern, B., Zentgraf, H., Eisenhut, M., Untenecker, H., et al., Silica- and alkoxysilane-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging, *Langmuir*, 23, 1427-34, **2007**.
- [287] Kim, J., Kim, H.S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., Song, I.C., Moon, W.K., Hyeon, T., Multifunctional uniform nanoparticles composed of a magnetite nano-crystal core and a mesoporous silica shell for magnetic resonance and fluorescence imaging and for drug delivery, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 47, 8438-41, **2008**.
- [288] Kim, J., Park, S., Lee, J.E., Jin, S.M., Lee, J.H., Lee, I.S., Yang, I., Kim, J.S., Kim, S.K., Cho, M.H., Hyeon, T., Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photo-thermal therapy. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 45, 7754-8, **2006**.

- [289] Zhang, Z., Chao, T., Chen, S.F., Jiang, S.Y., Superlow fouling sulfobetaine and carboxybetaine polymers on glass slides. *Langmuir*, 22, 10072-7, **2006**.
- [290] Ostuni, E., Chapman, R.G., Liang, M.N., Meluleni, G., Pier, G., Ingber, D.E., et al., Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells, *Langmuir*, 17, 6336-43, **2001**.
- [291] Ladd, J., Zhang, Z., Chen, S., Hower, J.C., Jiang, S., Zwitterionic polymers exhibiting high resistance to nonspecific protein adsorption from human serum and plasma, *Biomacromolecules*, 9, 1357-61, **2008**.
- [292] Holmlin, R.E., Chen, X.X., Chapman, R.G., Takayama, S., Whitesides, G.M., Zwitterionic SAMs that resist nonspecific adsorption of protein from aqueous buffer, *Langmuir*, 17, 2841-50, **2001**.
- [293] Yang, W., Zhang, L., Wang, S., White, A.D., Jiang, S., Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly(carboxybetaine) in undiluted blood serum, *Biomaterials*, 30, 5617-21, **2009**.
- [294] Zhang, L., Xue, H., Gao, C., Carr, L., Wang, J., Chu, B., et al., Imaging and cell targeting characteristics of magnetic nanoparticles modified by a functionalizable zwitterionic polymer with adhesive 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine linkages, *Biomaterials*, 31, 6582-8, **2010**.
- [295] Sun, C., Lee, J.S., Zhang, M., Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery, *Advanced Drug Delivery Research*, 60, 1252-65, **2008**.
- [296] Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 49, 6288-308, **2010**.
- [297] Szleifer I., Polymers proteins: interactions at interfaces, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2, 337-44, **1997**.
- [298] Owens, D.E. 3rd, Peppas, N.A., Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 307, 93-102, **2006**.
- [299] Gbadamosi, J.K., Hunter, A.C., Moghimi, S.M., PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance, *FEBS Letters*, 532, 338-44, **2002**.
- [300] Storm, G., Belliot, S.O., Daemen, T., Lasic, D.D., Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the



- mononuclear phagocyte system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17, 31-48, **1995**.
- [301] Wang, M., Thanou, M., Targeting nanoparticles to cancer, *Pharmacological Research*, 62, 90-9, **2010**.
- [302] Garg, A., Tisdale, A.W., Haidari, E., Kokkoli, E.. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide, *International Journal of Pharmaceuticals*, 366, 201-10, **2009**.
- [303] Gindy, M.E., Ji, S., Hoye, T.R., Panagiotopoulos, A.Z., Prud'homme, R.K., Preparation of poly(ethylene glycol) protected nanoparticles with variable bioconjugate ligand density, *Biomacromolecules*, 9, 2705-11, **2008**.
- [304] Olivier, V., Meisen, I., Meckelein, B., Hirst, T.R., Peter-Katalinic, J., Schmidt, M.A., et al., Influence of targeting ligand flexibility on receptor binding of particulate drug delivery systems, *Bioconjugate Chemistry*, 14, 1203-8, **2003**.
- [305] Ferrari, M., Nanogeometry: beyond drug delivery, *Nature Nanotechnology*, 3, 131-2, **2008**.
- [306] Gu, F., Zhang, L., Teply, B.A., Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., Farokhzad, O.C., Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 105, 2586-91, **2008**.
- [307] Park, J.H., von Maltzahn, G., Zhang, L., Derfus, A.M., Simberg, D., Harris, T.J., Ruoslahti, E., Bhatia, S.N., Sailor, M.J., Systematic surface engineering of magnetic nanoworms for in vivo tumor targeting, *Small*, 5, 694-700, **2009**.
- [308] Hoppe-Seyler, F., Butz, K., Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine, *Molecular Medicine*, 78, 426-30, **2000**.
- [309] Ellington, A.D., Szostak, J.W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346, 818-22, **1990**.
- [310] Gold, L., Janjic, N., Jarvis, T., Schneider, D., Walker, J.J., Wilcox, S.K., Ellington, A.D., Szostak, J.W., Zichi, D., Aptamers and the RNA world, past and present, *Cold Spring Harbor Perspect Biology*, 1, 4-3, **2012**.
- [311] White, R.R., Sullenger, B.A., Rusconi, C.P., Developing aptamers into therapeutics, *Journal of Clinical Investigations*, 106, 929-34, **2000**.
- [312] Drolet, D.W., Nelson, J., Tucker, C.E., Zack, P.M., Nixon, K., Bolin, R., Judkins, M.B., Farmer, J.A., Wolf, J.L., Gill, S.C., Bendele, R.A., Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection

- into the vitreous humor of rhesus monkeys, *Pharmaceutical Research*, 17, 1503-10, **2000**.
- [313] Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., Polisky, B., High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science*, 263, 1425-9, **1994**.
- [314] Charlton, J., Sennello, J., Smith, D., In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase, *Chemistry and Biology*, 4, 809-16, **1997**.
- [315] Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M., Analytical applications of aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2424-34, **2005**.
- [316] Massini, M., *Aptamers in Bioanalysis*, New Jersey, Wiley Publication, **2009**.
- [317] German, I., Buchanan, D.D., Kennedy, R.T., Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 70, 4540-5, **1998**.
- [318] Chan, W.C., Nie, S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science*, 281, 2016-8, **1998**.
- [319] Klussmann, S., *The Aptamer Handbook*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [320] Farokhzad, O.C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T.N., Lavan, D.A., Langer, R., Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells, *Cancer Research*, 64, 7668-72, **2004**.
- [321] Sehgal, D., I.K. Vijay., A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Analytical Biochemistry*, 218, 87-91, **1994**.
- [322] Farokhzad, O.C., Khademhosseini, A., Jon, S., Hermmann, A., Cheng, J., Chin, C., Kiselyuk, A., Teply, B., Eng, G., Langer, R., Microfluidic system for studying the interaction of nanoparticles and microparticles with cells, *Analytical Chemistry*, 77, 5453-9, **2005**.
- [323] Takae, S., Akiyama, Y., Otsuka, H., Nakamura, T., Nagasaki, Y., Kataoka, K., Ligand Density Effect on Biorecognition by PEGylated Gold Nanoparticles: Regulated Interaction of RCA(120) Lectin with Lactose Installed to the Distal End of Tethered PEG Strands on Gold Surface, *Biomacromolecules*, 6, 818-824, **2005**.
- [324] Kohler, G., Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256, 495-497, **1975**.
- [325] Campbell, N.A. *Biology*, 4th Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, **1996**.
- [326] Abcam *Antibody Protocols Book*, First Edition, **2010**.

- [327] Weiner, L.M., Surana, R., Wang, S., Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy, *Nature Immunology*, 10, 317, **2010**.
- [328] Anju Verma; *Animal Tissue Culture: Principles and Applications*; Animal Biotechnology, Models in Discovery and Translation, 211-231, **2014**.
- [329] Freshney, R.I., *Culture of animal cells*. 3rd Ed. USA. Chapter: 1, 7, 9., 1-7, 71-103, **1994**.
- [330] Yazır, Y., Dalçık, H., Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü, *Koşuyolu Kalp Dergisi*, 15(3), 137-142, **2012**.
- [331] OrrenLockshin, R.A., Williams, C.M. Programmed cell death–I. ius, S., Cytochrome c release from mitochondria proceeds Cytology of degeneration in the intersegmentalmuscles of the pernyi by a two-step process, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 99, 1259–1263, **1965**.
- [332] Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-57, **1972**.
- [333] Goodlett, C.R., Horn, K.H., Mechanism of Alcohol-Induced Damage to the Developing Nervous System; *Alcohol Research&Health*; 25, 3, **2001**.
- [334] Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E., New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies, *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 36(2), 120-30, **2008**.
- [335] Şimşek, F., Vatansever, H.S., Apoptotik ve otofajik ölümlerde hücre içi organizasyon, *Yeni Tıp Dergisi*, 31, 6-11, **2014**.
- [336] Altınkaynak, B.Z., Özbek, E., Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2), 93-104, **2008**.
- [337] Lüleyap, H.Ü., *Moleküler Genetiğin Esasları*, Nobel Kitabevi, **2008**.
- [338] Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Demirel, G.Y., Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması, *Turkish Journal of Immunology*, 1(3), 74-89, **2013**.
- [339] Rode H.J., *Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation*, 4th ed. Mannheim, Roche Diagnostics GmbH, **2008**.
- [340] Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Benink, H., Worzella, T., Minor, L., *Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays*, [Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences](#), **2013**.

- [341] Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J., A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function, *Growth Regulation*, 5(2), 69–84, **1995**.
- [342] Huyck, L., Ampe, C., Van Troys, M., The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix, *Assay and Drug Development Technologies*, 10(4), 382–392, **2012**.
- [343] Denizot, F., Lang, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *Journal of Immunological Methods*, 89, 271–277, **1986**.
- [344] Niles, A.L., Moravec, R.A., Hesselberth, P.E., Scurria, M.A., Daily, W.J., Riss, T.L., A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers, *Analytical Biochemistry*, 366, 197–206, **2007**.
- [345] Jaroszeski, M.J., Heller, R., *Flow Cytometry Protocols, Volume 91*, Humana Press Inc, Totowa, Nj, **1998**.
- [346] Taneli, F., "Flow" Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 5(2), 75-82, **2007**.
- [347] Wulff, S., *Principles of Flow Cytometry; Educational Guide*, 2nd Edition, **2006**.
- [348] Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S., Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, *Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(2), 01-18, **2008**.
- [349] Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D.H., Johnson, D. et al., Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing on microbead arrays, *Nature Biotechnology*, 18, 630, **2000**.
- [350] The xCELLigence System; Published by ACEA Biosciences, Inc., [http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product\\_info/RTCA\\_SP\\_MP\\_ACEA\\_LoRes.pdf](http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product_info/RTCA_SP_MP_ACEA_LoRes.pdf) , 2013
- [351] Chastellain, M., Petri, A., Hofmann, H., Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 278, 353–360, **2004**.
- [352] Fink, A.P., Chastellain, M., Jeanneret, J.L., Ferrari, A., Hofmann, H., Development of functionalized superparamagnetic ironoxide nanoparticles for interaction with human cancer cells, *Biomaterials*, 26, 2685-2694, **2005**.
- [353] Jin, Y., Jia, C., Huang, S., O'Donnell, M., Gao, X., Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents, *Nature Communications*, 1: 41, **2011**.

- [354] Mahmoudi, M., Amiri, H., Shokrgozar, M.A., Sasanpour, P., Rashidian, B., Laurents, S., Casula, M.F., Lascialfari, A., Raman active jagged-shaped gold-coated magnetic particles as novel multimodal nanoprobe, *Chemistry Communications*, 47, 10404-10406, **2011**.
- [355] Qian, X., Peng, X., Ansari, D.O., Goen, Q., Chen, G.Z., Shin, D.M., Yang, L., Young, A.N., Wang, M.D., Nie, S., In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags, *Nature Biotechnology*, 26, 83 – 90, **2008**.
- [356] Dinish, U.S., Balasundaram, G., Chang, Y.T., Olivo, M., Actively Targeted In Vivo Multiplex Detection of Intrinsic Cancer Biomarkers Using Biocompatible SERS Nanotags, *Scientific Reports*, 4, 4075, **2014**.
- [357] Wang, X., Qian, X., Beitler, J.J., Chen, Z.G., Khuri, F.R., Lewis, M.M., Shin, H.J., Nie, S., Shin, D.M., Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles, *Cancer Research*, 71(5), 1526-32, **2011**.
- [358] Li, F., Zhang, H., Dever, B., Li, X.F., Le, C.X., Thermal Stability of DNA Functionalized Gold Nanoparticles, *Bioconjugate Chemistry*, 24, 1790–1797, **2013**.

## EK 1

### Bağlanma Etkinliği Örnek Hesaplama:

ApSPION Başlangıç Konsantrasyonu= 132.4 µg/81 µL

ApSPION Nanodrop Ölçümü= 284.4 ng/µL

Bağlanma Etkinliği=  $\frac{\{(132.4 \mu\text{g}/81 \mu\text{L}) - [(284.4 \text{ ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-3}]\}}{(132.4 \mu\text{g}/81 \mu\text{L})} \times 100$

Bağlanma Etkinliği= %82.59

## EK 2

### **SPION Başına İmmobilize Edilen Aptamer Sayısının Örnek Teorik Hesaplaması:**

SPION Konsantrasyonu=10.86 mg/mL

50 µL'deki SPION Sayısı=  $1.22 \times 10^{13}$

50 µL'deki Aptamer Sayısı=  $4.86 \times 10^{14}$

$(4.86 \times 10^{14}) / (1.22 \times 10^{13}) = 39.83 \sim 40$  aptamer

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Lütfiye Tutkun

Doğum Yeri : Aydın

Medeni Hali : Evli

E-posta : [lutfiyetutkun@hacettepe.edu.tr](mailto:lutfiyetutkun@hacettepe.edu.tr)

Adresi : Ümit Mah. 2518 Sok. Kapı No: 1A 06810 Ümitköy/Ankara

### Eğitim

Lise : Nazilli Lisesi, 1992

Lisans : Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 1997

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik ABD, 2010

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik ABD, 2014

**Yabancı Dil ve Düzeyi** : İngilizce : Çok iyi

**İş Deneyimi** : Eczacıbaşı-Warner Lambert İlaç San.ve Tic.

**Deneyim Alanları** : İlaç Tanıtım ve Pazarlama, İlaç Ana Dosyası Hazırlama ve İlaç Ana Dosyası Çevirileri

**Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi** : Hacettepe Üniversitesi BAP Projesi (Proje Numarası : 013 D06 602 001) / Toplam: 18702.23 TL (12552,23 TL ve 6150 TL (Hizmet Alımı))

**Tezden Üretilmiş Yayınlar** : (Yazım aşamasında)

**Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar** : NanoBioTech 2014 isimli toplantıya tebliğ gönderilmiştir.