

**GÖZENEKLİ VE İÇİ BOŞ NANOYAPI FORMUNDA SiO<sub>2</sub>  
TABANLI SİNERJİSTİK TERAPİ AJANLARININ  
GELİŞTİRİLMESİ VE *İN-VİTRO* TERAPİ  
PERFORMANSLARININ BELİRLENMESİ**

**DEVELOPMENT OF SiO<sub>2</sub> BASED SYNERGISTIC  
THERAPY AGENTS IN THE FORM OF POROUS AND  
HOLLOW NANOSTRUCTURES AND DETERMINATION  
OF THEIR *İN-VİTRO* THERAPY PERFORMANCE**

**İLAYDA COŞAR**

**Prof. Dr. S. ALİ TUNCEL**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. F. ÇİĞDEM KİP**

**Tez Eş Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024



## ÖZET

### GÖZENEKLİ VE İÇİ BOŞ NANOYAPI FORMUNDA SiO<sub>2</sub> TABANLI SİNERJİSTİK TERAPİ AJANLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE *İN-VİTRO* TERAPİ PERFORMANSLARININ BELİRLENMESİ

İlayda COŞAR

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Tez Eş Danışmanı: Doç. Dr. F. Çiğdem KİP

Haziran 2024, 77 sayfa

Tez çalışması kapsamında, fotodinamik, fototermal ve açlık terapilerinden yararlanılarak kanser tedavisi için çok işlevli bir nanopartikül geliştirilmiştir. Sinerjistik terapi ajanı olarak kullanılmak üzere içi boş, mezogözenekli ve monodispers formda silika nanopartikülleri (H-SiO<sub>2</sub>), çok aşamalı sol-jel kalıplama yöntemi ile sentezlenmiştir. Nanopartiküllere polidopamin kaplanarak fototermal etki oluşturma yeteneği kazandırılmıştır. Böylece, 808 nm’de yakın kızılötesi lazer ışınlanması ile tümör mikro çevresinde oluşturulan 52°C’ye kadar çıkan sıcaklık sayesinde tümör hücrelerinde ölüm gerçekleşmiştir. Fotodinamik terapi fonksiyonunun oluşturulabilmesi için ışığa duyarlı molekül olan klorin e6, nanotaşıyıcı üzerinde oluşturulan polidopamin katmanı üzerine immobilize edilmiştir. 650 nm LED ile aktive olan nanopartiküller, hücre ölümüne yol açan <sup>1</sup>O<sub>2</sub> reaktifi üreterek tümör hücrelerinde oksidatif hasara neden olmuştur. Ardından nanopartiküllere glikoz oksidaz (GOx) ve katalaz (CAT) enzimlerini içeren bir kaskat enzim sistemi yüklenmiştir. GOx tümör hücre metabolizması için gerekli glikoz kaynaklarını tüketerek açlık terapisi oluşturmuş ve glikozun oksidasyonu sonucunda üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT tarafından oksijene dönüştürülerek fotodinamik terapi etkinliği artırılmıştır. *In-vitro* çalışmalar, sentezlenen sinerjistik terapi ajanının T98G glioblastoma hücrelerinde uygulanan fototermal, fotodinamik ve açlık terapileri ile hücre ölümünün sağlandığı göstermiştir. Kombine tedaviler, geleneksel antitümör ajanlar kullanılmadan

hücre canlılığını %21'e düşürmüştür. Bu tez çalışmasında, sentezlenen H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin kanser tedavisi için etkili bir sinerjistik terapi ajanı olarak kullanılabilceği sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Silisyum dioksit, nanopartikül, kanser, fototermal terapi, fotodinamik terapi, açlık terapisi, sinerjistik terapi

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF SiO<sub>2</sub> BASED SYNERGISTIC THERAPY AGENTS IN THE FORM OF POROUS AND HOLLOW NANOSTRUCTURES AND DETERMINATION OF THEIR *IN-VITRO* THERAPY PERFORMANCE

Master's Degree, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Co-Supervisor: Assoc. Prof. F. Çiğdem KİP

June, 2024, 77 pages

In this thesis, a SiO<sub>2</sub> based multifunctional nanoparticle was developed for cancer treatment by utilizing photodynamic, photothermal and starvation therapies. Hollow, mesoporous and monodisperse silica nanoparticles (H-SiO<sub>2</sub>) were synthesized by using a multistep shape-templating sol-gel method to be used as a synergistic therapy agent. The nanoparticles were coated with polydopamine to give them the ability to produce photothermal effect. Thus, tumor cells were killed due to the temperature increase of up to 52°C generated in the tumor microenvironment by near-infrared laser irradiation at 808 nm. To create the photodynamic therapy function, chlorine e6, a photosensitizer, was immobilized on the polydopamine layer formed on the nanocarrier. Activated under 650 nm LED light, the nanoparticles caused oxidative damage to tumor cells by producing <sup>1</sup>O<sub>2</sub> reactive leading to cell death. The nanoparticles were then loaded with a cascade enzyme system including glucose oxidase (GOx) and catalase (CAT) enzymes. GOx induced starvation therapy by consuming glucose resources required for tumor cell metabolism, and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced because of glucose oxidation was converted to oxygen by CAT, enhancing photodynamic therapy efficacy. *In-vitro* studies showed that the synthesized synergistic therapy agent significantly increased cell death by photothermal, photodynamic and starvation therapies applied in T98G glioblastoma cells. The combined treatments reduced cell viability to 21% without the use of conventional antitumor agents. In this thesis, it was concluded that the synthesized H-

SiO<sub>2</sub>@PDA@PDA@Ce6@GOx@CAT nanoparticles can be used as an effective synergistic therapy agent for cancer treatment.

**Keywords:** Silicon dioxide, nanoparticles, cancer, photothermal therapy, photodynamic therapy, starvation therapy, synergistic therapy

## TEŞEKKÜR

Bu tezin tamamlaması akademik hayatımda önemli bir yolculuktan ve minnettar olduğum birçok kişinin desteği, rehberliği ve teşviki olmadan mümkün olmazdı.

Her şeyden önce, danışmanım Sayın Prof. Dr. S. Ali TUNCEL'e, en derin minnettarlığımı ifade etmek isterim. Desteğiniz, anlayışlı geri bildirimleriniz ve sürekli teşvikiniz bu süreç boyunca paha biçilmezdi. Bilime olan bağlılığınız ve derin bilginiz, sınırlarımı zorlamam ve en iyisi için çabalamağında bana ilham verdi.

Çalışmalara başladığımız ilk günden beri desteğini ve tecrübelerini esirgemeyen eş danışmanım Sayın Doç. Dr. F. Çiğdem KİP'e teşekkürlerimi sunarım. Rehberliğiniz bu araştırmayı zenginleştirdi ve beni fikirlerimi geliştirmeye itti.

*İn-vitro* hücre çalışmalarında, laboratuvarımı açtığı, işbirlikçi bir ortam yarattığı ve çalışmalarımda yeni bir ufuk açtığı için Sayın Doç. Dr. Esin AKBAY ÇETİN'e teşekkür ederim. Canım ailem, Savaş COŞAR, Gülşah COŞAR ve Ceren COŞAR'a, akademik yolculuğumun temelinde, sonsuz fedakarlıklarınız, sarsılmaz desteğiniz ve cesaretlendirmeleriniz ile potansiyelime her zaman inandığınız için teşekkür ederim. Sizin sevginiz ve bana olan inancınız olmasaydı, bu tez mümkün olmazdı.

Berber çalıştığım laboratuvar arkadaşlarıma, laboratuvardaki uzun saatleri sadece katlanılabilir değil, aynı zamanda keyifli hale getirdikleri için teşekkür ederim. Sevgili Arş. Gör. Burcu GÖKÇAL KAPUCU'ya güler yüzü, destekleri ve sabrı için teşekkür ederim. Bu çalışmada bana ilham olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili Çağrı Zeynep SÜNGÜ AKDOĞAN'a teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan çokça keyif aldığım canım arkadaşlarım Gökçe ÇOBAN, Serhat HACİBRAHİMOĞLU ve Razan ANWAR FAHMI HAMDAN'a destekleri için çok teşekkür ederim.

Özel bir teşekkür de canım dostlarım Beril ŞİMŞEK ve Ada ÖZTÜRK'e. Kendimden şüphe ettiğim zamanlarda bile bana olan inancınız, motivasyon konuşmalarınız, sevginiz ve işler planladığım gibi gitmediğinde beni ayağa kaldırarak her zaman yanımda olduğunuz için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca 1004-MÜKEMMELİYET MERKEZİ DESTEK PROGRAMI kapsamında desteklenmiş olan 22AG004 numaralı, "Sağlıklı Yaşam İçin Yeni Nesil Biyomalzeme Teknolojileri Araştırma Ağı" isimli projenin çalışmalarında görev almamı sağladığı ve bursiyer öğrenci olarak desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

İlayda COŞAR

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanser Terapi Yöntemleri .....	4
2.2.1 Kemoterapi .....	5
2.2.2. Fototermal Terapi .....	6
2.2.3. Fotodinamik Terapi .....	8
2.2.4. Kemodinamik Terapi.....	11
2.2.5. Açlık Terapisi .....	12
2.2.6. Sinerjistik Terapi .....	13
2.3. Sinerjistik Terapi Uygulamalarında Nanotaşıyıcılar .....	13
2.3.1. Silisyum Dioksit .....	14
2.3.2. Silika Sentezi.....	16
2.4. Polidopamin .....	19
2.5. Kaskat Enzim Sistemi .....	21
2.6. Hücre Hattı Çalışmaları.....	22
2.6.1. Sitotoksosite Çalışmaları.....	22
2.6.2. MTT Testi .....	23
2.6.3. Hücre Boyama.....	23



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	24
3.1. Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar.....	24
3.2. Poli(gliserol dimetakrilat-ko-metakrilik asit) [poli(GDMA-co-MAA)] Nanokürelerin Sentezi.....	25
3.2.1. 180-200 nm Boyut Aralığında Poli(GDMA-co-MAA) Nanoküre Sentezi ..	25
3.3. İçi Boş Silika Nanokürelerin Sentezi.....	26
3.4. Polidopamin Kaplı İçi Boş Silika Nanopartiküllerin Sentezi .....	27
3.5. Glikoz Oksidaz Enziminin Nanopartikül Üzerine İmmobilizasyonu .....	28
3.5.1 Glikoz Oksidaz Aktivitesi Tayini .....	28
3.6. Katalaz Enziminin Nanopartikül Üzerine İmmobilizasyonu.....	29
3.6.1 Katalaz Aktivitesi Tayini .....	29
3.7. Nanopartiküllerin Fototermal Terapi Özelliklerinin İncelenmesi .....	30
3.8. Nanopartiküllerin Fotodinamik Terapi Özelliklerinin İncelenmesi.....	31
3.8.1. Partiküllere Ce6 Yüklenmesi .....	31
3.8.2. Partiküllerin Fotodinamik Etkisi.....	31
3.9. Hücre Deneyleri.....	32
3.9.1. Sitotoksosite Çalışmaları .....	32
3.9.2. Nanopartiküllerin <i>in-vitro</i> Kombine Fototermal, Fotodinamik ve Açlık Terapisi Çalışmaları.....	34
3.10. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	35
3.10.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi.....	35
3.10.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizi.....	35
3.10.3. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi .....	36
3.10.4. Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR).....	36
3.10.5. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis).....	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	37
4.1. Nanopartiküllerde SEM ve EDX Analizi .....	37
4.1.1. Poli(GDMA-co-MAA) Nanoküre Sentezi ve Karakterizasyonu.....	37
4.1.2. H-SiO <sub>2</sub> Sentezi ve Karakterizasyonu .....	39
4.2. Nanopartiküllerde DLS Analizi .....	41
4.3. Nanopartiküllerde BET Analizi .....	42

4.4. Nanopartiküllerde FTIR Analizi .....	46
4.5. Nanopartiküllerde GOx Aktivite Tayini .....	47
4.6. Nanopartiküllerde Katalaz Aktivitesi .....	50
4.7. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT Nanopartiküllerinin Fototermal Yanıtı .....	54
4.8. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT Nanopartiküllerinin Fotodinamik Yanıtı ....	56
4.9. <i>İn-Vitro</i> Deneyler .....	58
4.9.1 Hücre Sitotoksisite Deneyleri.....	58
4.9.2 Hücrelerde Fototermal Terapi Etkisi.....	62
4.9.3 Hücrelerde Fotodinamik Terapi Etkisi.....	64
4.9.4 Hücrelerde Kombine Terapi Etkisi .....	66
5. YORUM.....	68
6. KAYNAKLAR.....	70

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Porfirin, klorin ve klorin e6'nın moleküler yapıları.....	11
Şekil 2.2. Silika moleküler yapısı .....	15
Şekil 2.3. Stöber yöntemindeki reaksiyonların hidroliz ve kondenzasyon adımları .....	17
Şekil 3.1. H-SiO <sub>2</sub> sentez aşamaları .....	26
Şekil 3.2. H-SiO <sub>2</sub> @PDA sentezi.....	27
Şekil 3.3. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx sentezi .....	28
Şekil 3.4. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT sentezi .....	29
Şekil 3.5. Nanopartiküllerin NIR lazer ile tümör hücrelerinde oluşturduğu temsili PTT etkisi.....	30
Şekil 3.6. Nanopartiküllere Ce6 yüklenmesi .....	31
Şekil 3.7. Fotoduyarlaştırıcı yüklü nanopartiküllerin 650 nm LED altında tümör hücrelerinde oluşturduğu temsili PDT etkisi .....	32
Şekil 3.8. MTT testinin genel adımları.....	33
Şekil 4.1. Sinerjistik terapi ajanı sentezinde kalıp materyal olarak kullanılmak üzere sentezlenen poli(GDMA-co-MAA) nanokürelerin SEM görüntüleri.....	38
Büyütme: (A) X10000, (B) X25000, (C) X50000, (D) X200000. ....	38
Şekil 4.2. H-SiO <sub>2</sub> , H-SiO <sub>2</sub> @PDA ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanokürelerin SEM görüntüleri. ....	39
Büyütme: (A) X50000, (B) X50000, (C) X100000, (D) X50000, (E) X200000, (F) X200000, (G) X50000, (H) X50000, (I) X100000.....	39
Şekil 4.3. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin EDX görüntüleri (tüm elementler Si, O, C, N, S). ....	40
Şekil 4.4. H-SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerine ait yoğunluğa göre boyut dağılım grafiği. ....	41
Şekil 4.5. H-SiO <sub>2</sub> ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerine ait gözenek boyutu dağılım eğrisi. ....	43
Şekil 4.6. H-SiO <sub>2</sub> nanopartiküllerine ait N <sub>2</sub> adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi.....	44
Şekil 4.7. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerine ait N <sub>2</sub> adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi.....	45

Şekil 4.8. H-SiO <sub>2</sub> ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerine ait FTIR-ATR spektrumları.....	46
Şekil 4.9. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx nanopartiküllerinin GOx aktivitesi için Michaelis-Menten grafiği. Nanopartikül derişimi: 2 mg/mL. Sıcaklık: 37 °C. ....	48
Şekil 4.10. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx nanopartiküllerinin GOx aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği. Nanopartikül derişimi: 2 mg/mL. Sıcaklık: 37 °C.....	49
Şekil 4.11. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin CAT aktivitesi için Michaelis-Menten grafiği. Nanopartikül derişimi: 2 mg/mL. Sıcaklık: 24 °C. ....	51
Şekil 4.12. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin CAT aktivitesi için Lineweaver Burk grafiği. H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT derişimi: 2 mg/mL.....	52
Sıcaklık: 24 °C. ....	52
Şekil 4.13. 2 mM derişim için TiCl <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT + TiCl <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> komplekslerinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu. ....	53
Şekil 4.14. 808 nm lazer altında farklı H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT derişimleri ile elde edilen sıcaklık yükselme eğrileri. Lazer güç yoğunluğu: 1 W/cm <sup>2</sup> .....	54
Şekil 4.15. 808 nm lazer altında farklı H-SiO <sub>2</sub> (yeşil eğri) ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT (kırmızı eğri) derişimlerinin sıcaklık artışının değişimi.....	55
Şekil 4.16. 808 nm lazer altında 1 mg/mL derişimde H-SiO <sub>2</sub> @PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin 5'li ardışık ısıtma/soğutma eğrileri.....	56
Şekil 4.17. 650 nm'de LED ışığı altında H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikül varlığında <sup>1</sup> O <sub>2</sub> reaktifinin oluşumu.....	57
H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT derişimi: 5 mg/mL. LED ışık ışınlama süresi: 20 dk. ....	57
Şekil 4.18. Farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için AO/PI ikili hücre boyamasıyla elde edilen canlı/ölü L929 hücre görüntüleri. ....	58
L929 hücre yoğunluğu: 2x10 <sup>4</sup> hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm .....	58
Şekil 4.19. L929 hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için MTT sonuçları.....	59
Şekil 4.20. Farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için AO/PI ikili hücre boyamasıyla elde edilen canlı/ölü T98G glioblastoma hücre görüntüleri.....	60
Hücre yoğunluğu: 2x10 <sup>4</sup> hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm.....	60

Şekil 4.21. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> ve H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için MTT sonuçları. ....	61
Şekil 4.22. Farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için NIR lazer uygulama sonrası canlı/ölü T98G glioblastoma hücre görüntüleri. ....	62
T98G hücre yoğunluğu: 2x10 <sup>4</sup> hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm. NIR ışınlama süresi: 5 dakika (1 W cm <sup>-2</sup> ) .....	62
Şekil 4.23. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için NIR lazer sonrası MTT sonuçları. ....	63
Şekil 4.24. Farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için LED uygulama sonrası canlı/ölü T98G glioblastoma hücre görüntüleri. ....	64
T98G hücre yoğunluğu: 2x10 <sup>4</sup> hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm. LED ışınlama süresi: 7 dakika (1 W cm <sup>-2</sup> ) .....	64
Şekil 4.25. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için LED sonrası MTT sonuçları. ....	65
Şekil 4.26. Farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için art arda NIR lazer ve LED uygulamaları sonrası canlı/ölü T98G glioblastoma hücre görüntüleri. T98G hücre yoğunluğu: 2x10 <sup>4</sup> hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm. NIR lazer ışınlama süresi: 5 dakika, LED ışınlama süresi: 7 dakika (1 W cm <sup>-2</sup> ) .....	66
Şekil 4.27. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için NIR + LED sonrası MTT sonuçları. ....	67

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Fotoduyarlaştırıcı ajanlar ve aktive oldukları dalga boyları [40].....	10
Çizelge 4.1. Farklı boyutlarda sentezlenen poli (GDMA-co-MAA) mikro/nanokürelerin sentez koşulları .....	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

A	Absorbans
C	Derişim
$\epsilon$	Molar Absorptivite
cm	Santimetre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
mM	Milimolar
$\mu\text{M}$	Mikromolar
M	Molar
rpm	Dakikada Dönme Hızı (Rate Per Minute)
cpm	Dakikada Çalkalama Hızı (Circulation Per Minute)
dk	Dakika
s	Saniye
$C_v$	Değişim Katsayısı (Coefficient of Variation)
$D_p$	Ortalama Partikül Boyutu
W	Watt
$r_{\text{max}}$	Maksimum Reaksiyon Hızı
$k_m$	Michaelis Sabiti

## Kısaltmalar

ACN	Asetonitril
AIBN	2,2'-Azobis(2-metilpropionitril)
AO	Akridin Turuncusu (Acridine Orange)
BET	Brunauer-Emmett-Teller
CAT	Katalaz
CDT	Kemodinamik Terapi (Chemodynamic Therapy)
Ce6	Klorin e6 (Chlorin e6)
Cyt-c	Sitokrom-c (Cytochrome-c)
DLS	Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	Hücre kültür ortamı (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DOPA	Dopamin
DOPA·HCl	Dopamin Hidroklorür
DPBF	1,3-difenilizobenzofuran
EDX	Enerji Yayımlı X-Işını Analizi (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)
EtOH	Etil alkol
FBS	Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GDMA	Gliserol Dimetakrilat
HCl	Hidroklorik Asit
H-SiO <sub>2</sub>	İçi Boş Silika Nanoküre
GOx	Glikoz Oksidaz
IPA	İzopropil Alkol
L-DOPA	4-dihidroksi-L-fenilalanin
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
MAA	Metakrilik Asit



MIR	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NIR	Yakın Kızılötesi Işıma (Near Infrared Radiation)
NH <sub>4</sub> OH	Amonyum Hidroksit
NP	Nanopartikül
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlet Oksijen
·OH	Hidroksil Radikali
OPDA	O-fenilendiamin
PDA	Polidopamin
PDT	Fotodinamik Terapi (Photodynamic Therapy)
PI	Propidyum İyodür (Propidium Iodide)
Poli(GDMA-co-MAA)	Poli(gliserol dimetakrilat-ko-metakrilik asit)
PS	Fotoduyarlaştırıcı (Photosensitizer)
P/S	Penisilin/Streptomisin
PTT	Fototermal Terapi (Photothermal Therapy)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SiO <sub>2</sub>	Silika Nanoküre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
SiNP	Silika Nanopartikülü
SOD	Süperoksit Dismutaz
SSA	Özgül Yüzey Alanı (Specific Surface Area)
ST	Açlık Terapisi (Starvation Therapy)
STA	Sinerjistik Terapi Ajanı
TBAI	Tetrabütülamonyum İyodür
TiCl <sub>4</sub>	Titanyum Klorür
TEOS	Tetraetil Ortosilikat
TME	Tümör Mikro Çevresi (Tumor Microenvironment)
T98G	İnsan Glioblastoma Beyin Kanseri Hücre Hattı
UV-Vis	Ultraviyole (mor ötesi)-Görünür Işık



# 1. GİRİŞ

Anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile tanımlanan kanser, dünya çapında önde gelen bir hastalık ve ölüm nedenlerinden biridir [1]. Kemoterapi, radyasyon tedavisi, cerrahi müdahaleler gibi geleneksel kanser tedavi yöntemleri onlarca yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemoterapi, hızla bölünen kanser hücrelerini yok etmeyi amaçlar; ancak, genellikle ciddi yan etkiler ve kanser hücrelerinde direnç gelişimi gibi önemli dezavantajları da beraberinde getirmektedir [2]. Geleneksel tedavi yöntemlerindeki en büyük sorun spesifik olmamalarıdır, sadece kanser hücrelerini değil aynı zamanda sağlıklı hücreleri de hedef alırlar. Bu kısıtlamalar nedeniyle, yan etkileri azaltan ve daha düşük toksisite sunan alternatif terapötik yaklaşımlar oluşturmak için çeşitli tedavi yöntemlerini birleştiren sinerjistik terapilere olan ilgi artmaktadır [3].

Sinerjistik terapi, kanser tedavisine daha etkili ve hedefe yönelik bir yaklaşım oluşturmak için fototermal terapi, fotodinamik terapi ve açlık terapisi gibi farklı tedavilerden yararlanan kombine bir tedavi yöntemidir [4]. Fototermal terapi, özellikle kanser hücrelerini hedef alan ışığa duyarlı ajanları ısınlamak için yakın kızılötesi lazerlerin kullanımını içeren tedavidir. Bu ajanlar ışığı emer ve ısıya dönüştürerek lokalize hipertermi yoluyla kanser hücrelerini etkili bir şekilde yok eder [5]. Tedavi son derece spesifiktir ve çevredeki sağlıklı dokulara verilen zararı en aza indirerek geleneksel tedavilere göre önemli bir avantaj sunar. Fotodinamik terapi, hücre ölümüne neden olan reaktif oksijen türlerini üretmek için ışığa duyarlı moleküllerin ve belirli bir ışık dalga boyunun kullanıldığı terapi yöntemidir [6]. Işığa duyarlı moleküller ışığa maruz kaldığında kanser hücrelerini seçici olarak öldürmektedir. Bu alternatif tedavi yönteminde de sistemik toksisite minimize edilerek sağlıklı hücrelere verilen hasar geleneksel kemoterapiye göre azaltılmıştır. Açlık tedavisi, kanser hücrelerine temel besini olan glikozu keserek onları açlıktan öldürmeyi amaçlayan tedavi yöntemidir [7]. Geleneksel onkolojik tedavilerden sinerjistik tedaviye geçiş, kanser tedavisinde önemli bir ilerlemeyi temsil etmektedir. Fototermal, fotodinamik ve açlık terapisini birleştirerek ilaç kullanmadan, minimal invazif yöntemlerle daha yüksek terapötik etkinlik elde etmek mümkündür.

Bu tez kapsamında, kanser tedavisinde yenilikçi bir yaklaşım olan sinerjistik terapi yöntemlerinin kullanıldığı silika temelli çok işlevli bir nanoplatform oluşturularak kanser hücre hattında *in-vitro* terapi performansları ve alternatif terapilerin uygulanması araştırılmıştır. Çalışmada, monodispers, gözenekli, içi boş formda 180-200 nm boyut aralığında yüksek yüzey alanına ve gözenek hacmine sahip silisyum dioksit (H-SiO<sub>2</sub>) nanoküreler, kalıp materyali olarak monodispers formda poli(GDMA-co-MAA) nanoküreler kullanılarak çok basamaklı sol-jel yöntemiyle sentezlenmiştir. Nanopartiküle fototermal terapi yeteneği polidopamin kaplama sayesinde kazandırılmış, fotodinamik fonksiyon için nanopartiküle klorin e6 fotoduyarlı molekülü immobilize edilmiştir. Glikoz oksidaz ve katalaz enzimlerinin bağlandığı kaskat sistem sayesinde tümör mikro çevresinde açlık terapisi oluşturulmuş ve hipoksik ortama dirençli bir sinerjistik terapi ajanı sentezlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalması ile karakterize edilen karmaşık bir hastalık grubudur [1]. Hücresel değişiklikler, iyi huylu (kansersiz olmayan) veya kötü huylu (kansersiz) olabilen anormal dokuların büyümesine yol açmaktadır. Kötü huylu tümörler, komşu dokulara yayılabilme ve lenfatik veya dolaşım sistemleri yoluyla uzak organlara metastaz yapma potansiyelini içeren özellikler göstermektedir.

İyi huylu tümörler yavaş büyürken kötü huylu tümörler genellikle hızlı ve daha agresif bir şekilde büyür. Ayrıca, kötü huylu tümörler metastaz yaparak kanseri uzak organlara yayabilmektedir [8].

Kanserin kökeni, çevresel maruziyetler, yaşam tarzı seçimleri, kalıtsal kusurlar ve enfeksiyonlar dahil birçok çeşitli faktörden etkilenen hücrelerin DNA'sındaki genetik mutasyonlara dayanır. Mutasyona uğramış genler tipik olarak hücre çoğalmasını teşvik eden onkogenleri ve hücre büyümesini engelleyen tümör baskılayıcı genler içermektedir. Bu genler değiştiğinde hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar ve tümör adı verilen bir kitle oluşturur. Tipik olarak başladıkları organ veya hücre türüne göre kategorize edilen 100'den fazla farklı kanser türü mevcuttur [8, 9].

Kanser gelişimi üç tür gendeki değişiklikleri içerir. Bunlar, proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleridir. Proto-onkogenler, hücrelerin büyümesine yardımcı olan normal genlerdir. Mutasyona uğradıklarında onkogen olurlar ve hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesine neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise DNA hatalarını onararak ve hücrelere ne zaman ölmeleri gerektiğini söyleyerek hücre büyümesini kontrol eder. Bir tümör baskılayıcı gendeki mutasyon kontrolsüz hücre büyümesine yol açabilmektedir. DNA onarım genleri, DNA hasarını düzeltmeye yardımcı olur ve bu genlerdeki mutasyonlar, kanserin ilerlemesine sebep olabilecek güçlü mutasyonlar içerir [10].

Birincil (primer) tümör, kanser hücrelerinin ilk geliştiği ve tümör oluşturduğu bölgeyi ifade eder. Bu tümör kansersiz hücrelerin kaynağı olarak kabul edilir. Primer tümör tipi genellikle kanserin başladığı organ veya hücre tipinin adını alır. İkincil (sekonder)

tümörler kanser hücrelerinin birincil tümörden koparak vücudun diğer bölgelerinde yeni tümörler oluşturmasının sonucudur. [11]. Metastatik tümör olarak da bilinen sekonder tümörlerin, vücudun diğer bölgelerine yayılma süreci metastaz olarak bilinir [12].

İkincil tümörler, birincil tümörle aynı tip hücrelerden oluşur. Örneğin, meme kanseri hücreleri kemiğe yayılırsa, kemikteki ikincil tümör kemik hücrelerinden değil meme kanseri hücrelerinden oluşur ve kemiğe metastatik meme kanseri adı verilir. İkincil tümörler vücudun herhangi bir yerinde oluşabilir ancak en yaygın olarak akciğerlerde, karaciğerde, kemiklerde veya beyinde bulunur. Yayılma, vücudun lenfatik sistemi veya kan dolaşımı yoluyla gerçekleşir ve bu tümörler, kanseri vücuda yayma, tedaviyi zorlaştırma ve olumlu bir sonuç olasılığını azaltmaları nedeniyle daha ciddi olarak kabul edilmektedir. [13, 14].

Kanser hala tedavisi en zor hastalıklardan biridir ve insan sağlığını ciddi şekilde tehlikeye atmaktadır; bu nedenle etkili bir tedavi yöntemi bulmak büyük önem taşımaktadır.

## **2.2. Kanser Terapi Yöntemleri**

Geleneksel kanser tedavisi cerrahi müdahaleler, kemoterapi ve radyasyon terapilerini içermektedir [9]. Genellikle tedavinin ilk basamağı olan ameliyat, tümörü ve çevresindeki dokunun bir kısmını çıkarmayı amaçlar. Kanser lokalize olduğunda ve yayılmadığında en etkili yöntemdir. Radyasyon tedavisinde, kanser hücrelerini yok etmek için yüksek enerjili parçacıklar ve dalgalar kullanılmaktadır. Kemoterapi ise kanser hücrelerini öldürmek için ilaçların kullanıldığı bir tedavi türüdür. [15]. Sistemik bir tedavidir, kan dolaşımı yoluyla tüm vücudu etkiler. Genellikle yayılmış veya metastaz yapmış kanserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır.

Tümör mikro çevresi (tumor microenvironment, TME), çevrelediği kanser hücreleri ile etkileşim halinde olan bir ekosistemdir. TME, kanserle ilişkili fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, endotel hücreleri, sinyal molekülleri ve hücre dışı matris gibi çeşitli bileşenlerden oluşur. Kanser ilerlemesinde ve metastazda önemli bir rol oynayarak tümör davranışını ve tedaviye yanıtı etkiler [1].

TME; düşük pH, hipoksi (düşük oksijen), yüksek glutatyon derişimi ve aşırı hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üretimi gibi özelliklere sahiptir [16, 17]. TME'nin bu özelliklerinden faydalanarak yeni tedaviler geliştirilmektedir. Bu tedaviler, yalnızca TME'nin koşulları içinde aktive olacak şekilde tasarlanmakta böylece sağlıklı dokuların korunması amaçlanmaktadır.

Kanser hücreleri, oksijen varlığında bile (Warburg etkisi) mitokondride oksidasyon yerine glikoliz ve sitozolde laktik asit fermantasyonu yoluyla enerji üretir [18]. Bu metabolik değişim aşırı laktik asit üretimine yol açar. Bu nedenle TME, düşük pH değerine sahiptir. Bu asidik koşullar ilaç yapısını değiştirerek kemoterapiye veya diğer tedavilere karşı direnç oluşturabilmektedir [19]. Tümörler anormal ve verimsiz vasküler yapılarla sahiptir, bu da hipoksiye ve kan akışının azalmasına neden olmaktadır. Hızlı büyüyen tümörler, mevcut kan damarlarının sağladığı miktarı aşan oranda oksijen tüketmekte ve düşük oksijen koşullarına uyum sağlamaktadır [20].

Geleneksel onkolojik tedavi yöntemleri, cerrahi müdahaleler, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri kanser tedavisinde hala önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, bu yöntemler genellikle ciddi sistemik toksisiteye yol açmakta ve yan etkileri minimize etmek ve kanser hastalarının yaşam kalitesini artırmak amacıyla çeşitli yenilikçi ve etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yönelik önemli çalışmalar devam etmektedir [21].

Son dönemde, reaktif oksijen türlerine (reactive oxygen species, ROS) dayalı bir dizi ileri kanser tedavisi, özellikle fotodinamik terapi, fototermal terapi, kemodinamik terapi ve açlık terapisi gibi yöntemler geniş çapta kabul görmüştür [7]. Kombinasyon tedavisi, farklı tedavi yöntemlerinin bir araya getirilmesiyle oluşturulan güçlü bir anti-kanser stratejisi olarak kabul edilmekte ve çeşitli avantajlar sunmaktadır [22, 23].

### **2.2.1 Kemoterapi**

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini engellemek için kimyasal maddeler, özellikle sitotoksik ve antineoplastik ilaçlar kullanan bir kanser tedavisidir [9]. Sistemiktir, vücuttaki hücreleri hedef alarak hem yerel tümör bölgelerine hem de orijinal tümör konumundan yayılan metastatik kansere etki edebilmektedir.

Kemoterapi ilaçları, hızlı bölünen kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma yeteneğini kısıtlar. Etkinliğini artırmak için genellikle cerrahi, radyasyon tedavisi ve immünoterapi gibi diğer tedavilerle birlikte tercih edilmektedir [11, 24]. Bu multimodal yaklaşım, cerrahi müdahale veya radyasyon terapisinden önce tümörleri küçültmek, ameliyat sonrası kalan kanser hücrelerini ortadan kaldırmak veya vücudun diğer bölgelerine yayılmış kanserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır.

Kemoterapi, etkisine rağmen dezavantajları nedeniyle her zaman tercih edilmemektedir. Kemoterapide kanser hücreleri seçici olarak hedef alınmaz, aynı zamanda sağlıklı hücreleri de etkileyerek sistemik toksisiteye ve komplikasyonlara yol açar [25]. Ciddi yan etkiler arasında bulantı, kusma, saç dökülmesi, yorgunluk ve beyaz kan hücresi sayısının düşmesine bağlı olarak enfeksiyon riskinin artması yer almaktadır. Toksikite hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Ayrıca, kanser hücreleri kemoterapi ilaçlarına karşı direnç geliştirebilir ve bu da ilaçları zamanla daha az etkili hale getirebilmektedir [2, 9].

Bu dezavantajlar, normal dokuları etkilemeden kanser hücrelerine daha spesifik olarak odaklanarak yan etkileri azaltmayı amaçlayan hedefe yönelik alternatif tedavilerin araştırılmasına ve geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır.

Kemoterapi, radyasyon ve ameliyat gibi geleneksel tedavilerle ilişkili sınırlamalar ve yan etkiler nedeniyle alternatif ve sinerjistik kanser tedavileri giderek daha önemli hale gelmiştir.

### **2.2.2. Fototermal Terapi**

Fototermal terapi (photothermal therapy, PTT), kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkları tedavi etmek amacıyla lokalize hipertermiyi sağlayan ve ışık enerjisini ısıya dönüştüren minimal invazif bir tedavi yöntemidir [6]. Minimal invazif yöntem, sadece küçük kesiler gerektiren veya hiç kesi gerektirmeyen, geleneksel cerrahi tekniklere kıyasla vücuda fiziksel müdahaleyi önemli ölçüde azaltan yöntemdir [11]. PTT, tümör bölgesine dışarıdan veya optik fiberler kullanılarak çok küçük kesiler yoluyla yönlendirilebilen lazerlerin kullanımını içermektedir [5]. Bu yaklaşım, çevre dokulara verilen zararı önemli ölçüde azaltmaktadır. Minimal invazif yöntemler daha az fiziksel travma içerdiğinden, hastalar daha hızlı iyileşme süreci yaşamaktadır.



PTT'nin temel prensibi, fototermal ajanlar olarak bilinen belirli malzemelerin ışığı emdiği ve ısıya dönüştürdüğü fototermal etkiye dayanmaktadır [4]. PTT'deki fototermal ajanlar, yüksek penetrasyon yeteneği olan yakın kızılötesi (near infrared radiation, NIR) spektrumunda (700-1100 nm) güçlü emilime sahip malzemelerden oluşur [26]. Yaygın malzemeler arasında altın, gümüş, bakır, sülfür, polidopamin veya indosiyenin yeşili bulunur [27]. Bu biyouyumlu ajanlar, emilen ışığı verimli bir şekilde termal enerjiye dönüştürürler. Görünür ışığa kıyasla biyolojik dokulara daha derin nüfuz edebildiğinden NIR yaygın olarak kullanılır. Ayrıca çevredeki sağlıklı dokuya zarar vermeden cildin birkaç santimetre altında bulunan tümörlere ulaşabilir.

Normal hücreler en fazla 44°C'ye dayanabilirken tümör hücreleri 42,5°C'de ölmektedir. Tümör hücrelerine etkili bir şekilde zarar vermek için sıcaklıkların tipik olarak 41-45°C'ye ulaşması gerekir [4, 26]. Oluşan ısı, hücrelerdeki proteinlere ve yapılara doğrudan zarar vererek apoptoza yol açmaktadır [6].

Lokalize ısı, normal dokuları korurken tümör hücrelerini etkili bir şekilde yok eder ve kemoterapi gibi sistemik tedavilere kıyasla daha az yan etki ile sonuçlanır.

PTT tek başına etkili olsa da etkisini artırmak için diğer tedavilerle birleştirilebilir. Bu sinerjistik yaklaşım kombinasyon tedavisi olarak adlandırılır. PTT'nin kemoterapi veya diğer hedefe yönelik tedavilerle kombinasyonunun terapötik sonuçları önemli ölçüde artırdığı kanıtlanmıştır [28, 29]

Nanoteknolojideki son gelişmeler PTT'nin ilerlemesinde etkili olmuştur. Polidopaminden yapılan veya polidopaminle kaplanan nanopartiküllerin, yüksek fototermal dönüşüm verimlilikleri ve biyouyumlulukları sayesinde PTT'de etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır [30-32].

Ayrıca bu nanopartiküller, terapötik ajanların salınımını tetiklemek ve sistemik toksisiteyi en aza indirmek için tümör mikro çevresine yanıt verecek şekilde tasarlanmaktadır [5]. Sonuç olarak, fototermal tedavi, diğer kanser tedavi yöntemleriyle birlikte uygulandığında, geleneksel yöntemlere kıyasla daha hedefli, verimli ve daha az toksik bir tedavi seçeneği sunarak onkolojide umut verici bir ilerlemeyi temsil etmektedir.

### 2.2.3. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi (photodynamic therapy, PDT), kanser hücrelerini yok etmek için fotoaktif dalga boyunda ışık gücünden yararlanan tıbbi bir tedavidir. Yüzyılı aşkın bir süredir kullanılan bu terapi yöntemi, kanser hücrelerinde seçici olarak biriken ve ışığa hassas kimyasal ajan (fotoduyarlaştırıcı) kullanımına dayanır. Hedef bölge belirli bir dalga boyundaki ışığa maruz kaldığında, ışığa duyarlı hale gelerek aktive olur ve kanser hücrelerini öldüren, tümörü besleyen kan damarlarına zarar veren ve tümöre karşı bağışıklık sistemini harekete geçiren bir tür ROS üretir [33].

PDT, bir fotoduyarlaştırıcı, belirli bir dalga boyunda ışık ve oksijen bileşenlerini içeren bir tedavi yöntemidir [34]. Kanserli dokularda seçici olarak biriken ışığa duyarlı bir bileşik olan bir fotoduyarlaştırıcının uygulanmasıyla başlar. Fotoduyarlaştırıcılar ağızdan verilebilir, damar içine enjekte edilebilir veya kanserin konumuna bağlı olarak bölgesel olarak uygulanabilmektedir.

Fotoduyarlaştırıcılar, belirli bir dalga boyunda ışığa (genellikle lazerler veya LED ışıklar) maruz bırakılana kadar pasif kalmaktadır [35]. Bu dalga boyu, fotoduyarlaştırıcının emilim spektrumuna karşılık gelir ve fotoduyarlaştırıcının maksimum enerji emilimini ve aktivasyonunu sağlar. Işıkla aktivasyon üzerine, fotoduyarlaştırıcı temel halden uyarılmış hale geçer. Temel hale geri döndüğünde, fotoduyarlaştırıcıdan çevredeki oksijene enerji transferi gerçekleşir ve başta tekli (singlet) oksijen ( $^1O_2$ ) olmak üzere ROS üretir. Bu ROS oldukça reaktiftir ve tümör hücrelerindeki lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel bileşenlerde oksidatif hasara neden olur [6]. ROS oluşumu hem ışığın hem de ışığa duyarlaştırıcının mevcut olduğu alanlara bağlıdır, böylece yalnızca hedeflenen kanser hücrelerini etkilemektedir. Hem sağlıklı hem de kanserli hücreleri etkileyen sistemik tedavilerin aksine, PDT'nin bölgesel olması vücut bütünlüğündeki yan etkileri en aza indirmektedir. Bu lokalize tedavi yaklaşımı, sağlıklı dokuların daha iyi korunmasını sağlar ve hastanın maruz kaldığı genel toksisiteyi azaltır [36].

Geleneksel tedavilerle karşılaştırıldığında, PDT minimal invazif bir yöntemdir. Kesilere gerek kalmadan ayakta yapılabilen ve radyasyon tedavisinde karşılaşılan riskler olmadan aynı bölgede birden fazla kez tekrarlanabilmektedir.

Son alışmalarda PDT ile PTT'nin birlikte uygulamaları yer almaktadır; fototermal ajanlar tarafından üretilen ısı, fotoduyarlaştırıcının aktivasyonunu destekleyerek tedavinin etkisini artırmaktadır [37].

PTT ile PDT arasında bazı farklar mevcuttur. PDT'de belirli dalga boylarında ışıkla aktivasyon üzerine hücre ölümüne yol açan ROS üreten fotoduyarlaştırıcılar kullanılır ve verimi oksijen varlığına bağlıdır [38]. PTT ise emilen ışığı ısıya dönüştüren fototermal ajanlar içermektedir. PDT'de penetrasyon derinliği ışığın etkili bir şekilde ulaşabildiği yere (genellikle dokuya birkaç milimetre) bağlıdır. Bu yüzden PDT daha yüzeysel veya endoskopik olarak erişilebilir tümörler için uygundur. PTT'de, kullanılan görünür ışıktan daha derine nüfuz eden NIR kullanılmaktadır [4, 11, 32, 39].

PDT'nin temel mekanizmasında, başlangıçta fotoduyarlaştırıcı temel durumda bulunur. Belirli bir dalga boyunda ışığa maruz kaldığında, foton enerjisini absorbe ederek uyarılmış bir singlet duruma geçiş yapar. Bu singlet durumdan floresan yayarak tekrar temel duruma geri döner ya da daha kararlı olan triplet uyarılmış duruma sistemler arası geçiş yapar. Bu triplet durumda fotoduyarlaştırıcı iki tür fotokimyasal reaksiyona girer. Tip I reaksiyonda, triplet haldeki fotoduyarlaştırıcı enerjiyi doğrudan substratlara aktararak serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Tip II reaksiyonda ise enerjiyi moleküler oksijene ( $O_2$ ) aktararak son derece reaktif bir oksijen formu olan singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oluşturur. Hem serbest radikaller hem de tekli oksijen, hücre ölümüne yol açan güçlü reaktif oksijen türleridir [6, 40].

### **2.2.3.1. Fotoduyarlı Moleküller**

Fotoduyarlaştırıcılar PDT'deki merkezi kimyasal ajanlardır. Bunlar porfirin bazlı bileşiklerdir, ancak klorinler, ftalosiyeninler ve purpurinler gibi porfirin olmayan fotoduyarlaştırıcılar da izelge 2.1'de görüldüğü gibi derin doku penetrasyonuna izin veren kırmızı ve yakın kızılötesi bölgedeki (650-800 nm) güçlü absorpsiyonları nedeniyle kullanılmaktadır [41, 42]. Uygulama için ışık kaynağının (lazerler, LED) dalga boyu fotoduyarlaştırıcıların absorpsiyon pikiyle eşleşmelidir. Ek olarak, dokuyu aşırı ısıtmadan fotoduyarlaştırıcının yeterli aktivasyonunu sağlamak için ışık yoğunluğu ve ışınlama süresi hesaplanmalıdır. PDT'nin etkinliği, tümör mikro çevresindeki oksijen derişimi ile sınırlıdır. Tümörler genellikle düşük oksijen seviyelerine (hipoksik alanlara) sahiptir. Bu

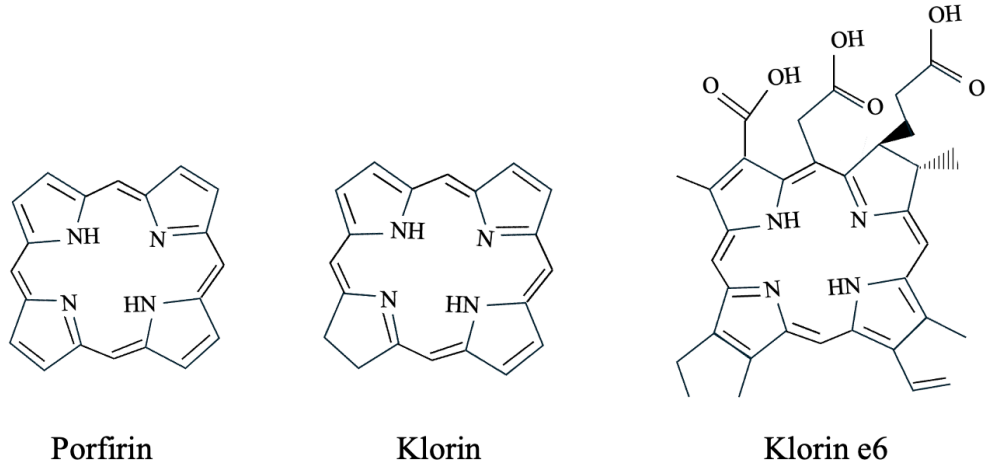
da PDT'nin etkisini azaltacağından tedavi öncesinde tümör mikro çevresindeki oksijen seviyelerini artırmak gereklidir [4, 35].

Çizelge 2.1. Fotoduyarlaştırıcı ajanlar ve aktive oldukları dalga boyları [42]

<b>PDT Ajanları</b>		<b>Aktivasyon Dalga Boyu (nm)</b>
	Hematoporfirinler	350–420, 620–650
	Protoporfirinler	405, 500–505, 630–635
	Metalloporfirinler	400–435, 500–520, 550–560, 590–630
	Feoforbiter	750–790
Porfirinler	Purpurinler	350–440, 500–550, 600–700
	Benzoporfirinler	360–500, 550–600, 670–700
	Klorinler	380–420, 480–550, 590–660
	Ftalosiyeninler	350–400, 600–700
	Porfikener	350–400, 550–600, 630–730
	Squarinler	550–600, 650–800
	Siyeninler	750–900
Porfirin olmayanlar	Ksantenler	500–570
	Fenotiyazinler	620–700
	Kurkuminoidler	420–580
	Bor-dipirometen	500–580

Fotoduyarlaştırıcılar, ışık absorpsiyon özelliklerine, kimyasal stabilitelere ve ROS üretme kabiliyetlerine göre seçilirler. Birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil olmak üzere sınıflandırılırlar. Birinci nesil fotoduyarlaştırıcılar, daha uzun aktivasyon dalga boylarına sahiptir ve uzun süreli cilt ışığı duyarlılığına ve yetersiz ışık geçişine sebep olabilirler. İkinci nesil fotoduyarlaştırıcılar, ışığı daha uzun dalga boylarında absorbe ederek daha derin doku penetrasyonuna izin verir ve daha az yan etkiye sahiptir. Üçüncü nesil fotoduyarlaştırıcılar, antikor-fotoduyarlaştırıcı konjugatları gibi spesifik tümör komplekslerini içerir. Sağlıklı dokuya verilen zararı en aza indirirken PDT'nin verimini artırmayı amaçlar [33, 39, 40, 43, 44].

Tez kapsamında seçilen FDA onaylı bir fotoduyarlatıcı türü olan klorin e6'nın kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Porfirin, klorin ve klorin e6'nın moleküler yapıları

Klorin e6 (Ce6), PDT'de kullanılan ikinci nesil bir fotoduyarlatıcıdır [33]. Birçok biyolojik pigmentin temeli olan porfirinlerle yakından ilişkili olup Şekil 2.1'de gösterildiği gibi klorofilden türetilmiş bir tetrapirolik bileşiktir [45].

Yapısı dolayısıyla 660-680 nm civarında güçlü bir absorpsiyon pikine sahiptir, ışığa maruz kaldığında fotonları soğurur ve temel halden uyarılmış singlet hale geçer. Sistemler arası geçiş sayesinde, daha uzun ömürlü bir triplet duruma geçebilmektedir.

Kırmızı ve yakın kızılötesi spektral bölgelerde güçlü emilime sahiptir, bu da birinci nesil fotoduyarlatıcılara kıyasla daha derin doku penetrasyonuna izin verir. Vücuttan hızlı bir şekilde temizlenir ve uzun vadeli fototoksisite risklerini azaltır. Tümör hücreleri tarafından seçici olarak alınarak ışıkla kontrollü aktive olur [4, 6, 34]. Tüm bu avantajları ile Ce6, PDT çalışmalarında sıklıkla kullanılan fotoduyarlatıcılardan biridir.

#### 2.2.4. Kemodinamik Terapi

Kemodinamik terapi (chemodynamic therapy, CDT), PDT ve PTT gibi tedavilerde gerekli olan ışık veya ısı gibi uyaranlara ihtiyaç duymadan kanser tedavisi için Fenton kimyasının nanoteknoloji ile birleşmesinden ortaya çıkmıştır [46]. Bu süreç, geçiş metal iyonları (demir veya bakır gibi) tarafından katalize edilir ve tümör hücrelerinde bulunan yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerinden yararlanır. CDT'nin amacı, TME içinde Fenton veya Fenton

benzeri reaksiyonlar yoluyla hidroksil radikalleri ( $\cdot\text{OH}$ ) üretmektir. Bu güçlü oksidatif radikaller DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrel bileşenlere zarar vererek kötü huylu tümör hücrelerinin apoptozuna yol açmaktadır [47].

Fenton reaksiyonu, ferröz demir ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeren bir redoks sürecidir. Bu reaktanlar etkileşime girdiklerinde ferrik demir ( $\text{Fe}^{3+}$ ), su ve oldukça reaktif  $\cdot\text{OH}$  ortaya çıkarır. [43, 47].

Literatürde benzer uygulamalar için Fenton ve Fenton benzeri reaksiyonlarda yaygın kullanılan demir meteline ek olarak başka geçiş metal iyonları da araştırılmıştır [46, 48]. Bu metaller  $\text{H}_2\text{O}_2$  ayrışmasını katalize eder ve geleneksel Fenton reaksiyonuna benzer mekanizmalarla ROS üretir. Bakır, manganez, kobalt, titanyum, vanadyum, paladyum, gümüş, molibden, rutenyum, tungsten, seryum ve çinko dahil olmak üzere diğer birçok metal elemente dayanan CDT terapileri önerilmiştir [46].

Demir (Fe), Fenton reaksiyonlarında birincil ve en geleneksel katalizördür. Klasik Fenton süreçlerinde  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  kullanır [49]. Bakır (Cu),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ayrışmasını demire benzer şekilde katalize eder.  $\text{Cu}^{1+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları belirli koşullar altında  $\cdot\text{OH}$  üreterek redoks döngüsüne katılır [50, 51]. Manganez iyonları (Mn) da  $\text{H}_2\text{O}_2$  ayrışmasını katalize ederek ROS oluşumuna yol açar [52-54]. Gümüş iyonları için de aynı şekilde  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den ROS üretimi araştırılmaktadır. Bakteri hücrelerine karşı güçlü oksidatif yetenekleri sayesinde genellikle antimikrobiyal uygulamalarda kullanılmıştır [55].

CDT, PTT ve PDT kanser tedavisinde kullanılan modern terapötik yaklaşımlardır. Bu yöntemlerin her birinde tümör hücre ölümünü tetikleyen farklı mekanizmalar kullanılmaktadır.

### **2.2.5. Açlık Terapisi**

Açlık terapisi (starvation therapy, ST), kanser hücrelerini çoğalmaları için gerekli temel besinlerden mahrum bırakarak tümör büyümesini engellemeyi amaçlayan bir kanser tedavisi yaklaşımıdır [7]. Bu yöntem, kanser hücrelerinin hayatta kalmak için birincil enerji kaynağı glikoza olan bağımlılıklarından faydalanır. ST, hücreleri glikozdan yoksun bırakarak hücre ölümüne neden olur [19].

ST'de glikozun glukonik aside oksidasyonunu katalize eden ve aynı zamanda oksijeni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye indirgeyen bir enzim olan Glikoz Oksidaz (GOx) kullanılır. Bu süreç sadece glikozu tüketerek tümör hücrelerini aç bırakmakla kalmaz, aynı zamanda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimini artırarak tümör ortamındaki stresi artırır [56].

### **2.2.6. Sinerjistik Terapi**

Sinerjistik terapi, iki veya daha fazla tedavinin birlikte kullanılarak bireysel tedavilerin etkilerinden daha fazla etki elde edildiği bir tedavi yaklaşımıdır. Sinerjistik tedavide, tedavilerin kombinasyonu sadece tedavi etkisini artırmakla kalmaz, aynı zamanda oluşabilecek potansiyel yan etkileri de azaltır. Bunun nedeni, daha düşük dozlar ile sinerjistik etkileşim sayesinde daha yüksek terapötik etkiler elde edilebilmesidir [3, 4, 19, 27, 38, 48, 57-60].

### **2.3. Sinerjistik Terapi Uygulamalarında Nanotaşıyıcılar**

Nanotaşıyıcılar, hedefe yönelik tedaviler sunduğundan kanser tedavilerinde oldukça önemlidir. Bu nano ölçekli araçlar, ilaçları doğrudan hastalık bölgesine iletmek üzere tasarlanmış olup sistemik yan etkileri en aza indirirken terapötik etkileri en üst düzeye çıkarmaktadır [61]. Nanotaşıyıcılar, yapılarına ve yapımında kullanılan malzemelere göre çeşitli türlere ayrılırlar. Bunlar lipozomlar, miseller, dendrimerler, silika nanopartiküller, altın nanopartiküller, süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller, karbon nanotüpler ve kuantum noktalarıdır [62].

Lipozomlar, üzerinde en çok çalışılan nanotaşıyıcı türlerinden biridir. Bir veya daha fazla fosfolipid çift tabakadan oluşan küresel veziküllerdir. Biyouyumlulukları ve hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları kapsülleme yetenekleri sayesinde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [63].

Miseller, amfifilik kopolimerlerden oluşan koloidal partiküllerdir. Hidrofobik çekirdeğin hidrofobik ilaçları çözebildiği ve koruyabildiği, sulu ortamlarda çözünürlüklerini ve stabilitelerini artırdığı bir çekirdek-kabuk yapısına sahiptirler. Miseller özellikle suda az çözünen ilaçların verilmesi için kullanışlıdır [64].

Dendrimerler, yüksek moleküler homojenliğe, boyuta, şekle ve yüksek yoğunlukta fonksiyonel uç gruplara sahip çok dallanmış makromoleküllerdir. Bu yüksek oranda

dallanmış, ağaç benzeri yapılar, ilaç bağlanması için kullanılabilir çoklu fonksiyonel gruplar sunar [65].

Mezogözenekli silika nanopartiküller, ilaç yüklemesi için yüksek yüzey alanı sağlayan oldukça düzenli gözenekli bir yapıya sahiptir. Gözeneklerine terapötik ajanlar yüklenerek kontrollü bir şekilde salınır. Bu partiküller özellikle hedefli ve sürekli salım uygulamaları için kullanışlıdır [21].

Altın nanopartiküller, hedeflenen kanser hücrelerini yok etmek için ışık enerjisini ısıya dönüştüren PTT'de kullanılır [61].

Süperparamanyetik demir-oksit nanopartiküller (Superparamagnetic iron-oxide nanoparticles, SPION), hem terapötik hem de teranostik amaçlarla kullanılmaktadır. Harici manyetik alanlar kullanılarak manipüle edilirler, bu da onları hedefli ilaç dağıtımı ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için uygun kılar [66].

Elektriksel, termal ve mekanik özellikleriyle bilinen karbon nanotüpler hücre zarlarına nüfuz ederek ilaç ve gen iletimi dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanılırlar.

Kuantum noktaları, boyuta göre ayarlanabilen ışık emisyonu gibi elektronik ve optik özellikler sergileyen yarı iletken nanoparçacıklardır ve bu da onları hücresel görüntüleme ve diğer biyomedikal uygulamalar için uygun hale getirir [67, 68].

Nanotaşıyıcılar, birden fazla terapötik ajanı tek bir platformda birleştirerek sinerjistik tedavilere olanak tanır, bu da tedavi etkinliğini artırır [3].

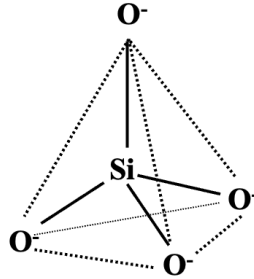
### **2.3.1. Silisyum Dioksit**

Silisyum evrendeki en yaygın yedinci elementtir. Yerkabuğunda yaygındır ve oksijenden sonra en bol bulunan ikinci elementtir. Ayrıca Merkür, Venüs ve Mars'ta, Ay'da ve Jüpiter'in uydularında ve meteoritlerin yaklaşık %96'sında da silisyum yoğun olarak bulunur.

Silisyum bol miktarda bulunmasına rağmen temel formu ile nadiren karşılaşılır. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi silisyum oksijenle bağlanarak silikayı oluşturur. Dört oksijen atomu ile çevrili bir silisyum atomu ile dörtyüzlü olarak temsil edilir, bu da molekülün kararlı ancak reaktif doğasını gösterir. Bu konfigürasyon çoğu silikat mineralinin temelini oluşturur. Tetrahedron yapısı, silikonun dört bağı doldurma ihtiyacı ve oksijen atomları



arasındaki itme kuvveti tarafından belirlenir ve bir piramit şekli oluşturur. Genellikle bu tetrahedralar birleşerek daha büyük silisyum dioksit yapıları oluşturur; burada ek bağlar arayan dış oksijen atomları hidroksil grupları oluşturmak üzere sudan gelen hidrojen atomlarıyla birleşerek yapıyı stabilize ederler [69-71].



Şekil 2.2. Silika moleküler yapısı

Genel olarak silika olarak adlandırılan silisyum dioksit ( $\text{SiO}_2$ ), dünyada en bol bulunan bileşiktir. İnorganik bir malzeme olarak silika nanopartikülleri (SiNP) tek tip gözenek boyutuna, kontrol edilebilir partikül boyutuna, geniş yüzey alanına ve silanol gruplarının ( $\text{Si-OH}$ ) varlığı sayesinde kolayca modifiye edilebilen yüzeylere ve yüksek biyoyumluluğa sahiptir [72]. Bu özelliklere dayanarak inorganik silika yapısı, sıcaklık dalgalanmaları, organik çözücüler ve asidik koşulların varlığında bile yüksek stabiliteye sahiptir [71].

SiNP'ler dünya çapında en fazla üretilen ikinci nanomateryaldir. Böylece SiNP'lerin toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar da artmıştır [73].

SiNP'lerin sentezi, partikül boyutlarını, gözenekliliğini ve yüzey işlevselliğini belirlediği için çok önemlidir ve bunların tümü biyolojik sistemlerle etkileşimlerini doğrudan etkiler. SiNP'lerin iki baskın türü olan gözeneksiz silika nanopartiküller ve mezogözenekli silika nanopartiküllerin her biri yapısal farklılıklarına bağlı olarak farklı amaçlara hizmet etmektedir.

Gözeneksiz SiNP'ler amorf yapıdadır ve belirli yapısal özellikleri yoktur, bu da onları yüksek biyoyumluluk ve stabilite gerektiren uygulamalar için uygun hale getirir. Öte yandan, mezogözenekli SiNP'ler, kontrollü ilaç salınımı ve kataliz gibi yüksek yüzey alanları ve ayarlanabilir gözenek boyutları gerektiren uygulamalar için avantajlıdır [72, 74].

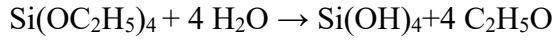
### 2.3.2. Silika Sentezi

SiNP sentezi için sol-jel yöntemi, mikroemülsiyon, hidroliz ve yoğunlaştırma yöntemi gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır [72]. Her yöntem belli avantajlar sunar ve istenen özelliklere ve uygulamaya göre seçilir. Örneğin, geleneksel bir sol-jel tekniği olan Stöber yöntemi, sınırları belli küresel SiNP'ler üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve kontrollü gözenek boyutlarına ve yüzey işlevlerine sahip mezogözenekli SiNP'ler üretmek için uyarlanmıştır [75].

Monodispers (tekil dağılımlı) silika partiküllerinin sentezlenmesine yönelik fizikokimyasal bir yöntem olan Stöber sentezi, ilk olarak Werner Stöber tarafından keşfedilmiştir ve metalik tuzlardan, alkol eklenerek oluşturulan metal alkoksitlerden veya hidroliz ve yoğunlaştırma yoluyla diğer organometalik silikon öncüllerinden çok çeşitli sol-jeller üretmek için kullanılır [76].

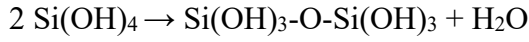
Kolloidal SiNP'ler Stöber yöntemine dayalı sol-jel prosesleri ile sentezlenebilir. Reaksiyonda katalizör olarak amonyak, hidroliz ajanı olarak alkil silikatlar ve alkol çözeltilerinde yoğunlaştırma için silisik asit kullanılır. Monodispers ve 50-2000 nm çapında küresel SiNP'lerin kontrollü büyümesiyle sonuçlandığı bir kimyasal reaksiyondur. İşlem sırasında, Si-OR ve Si-OH içeren türler, siloksan bağları (Si-O-Si) oluşturarak siloksan bileşiklerine yoğunlaşır. Yoğunlaşma ya alkol ya da su eliminasyonu ile gerçekleşir (Şekil 2.3). Elde edilen sol-jel daha sonra santrifüjleme ile izole edilir, yıkanır ve kurutulur. Stöber sentezi yoluyla oluşturulan gözeneksiz SiNP'lerde alkil silikatlar ve tetraetil ortosilikat (tetraetoksisilan, TEOS) bulunur [77]. Sol-jel yönteminde sentezin basit, ölçeklenebilir ve kontrol edilebilir olması avantajdır. Partikül boyutu, dağılımı ve morfolojisi reaksiyon parametreleri değiştirilerek kontrol edilebilmektedir [78].

TEOS, hidroliz ve yoğunlaşma reaksiyonları yoluyla silika (SiO<sub>2</sub>) mikro/nanokürelerin sentezinde sıklıkla kullanılan kimyasal bir öncüdür. Hidroliz aşamasında, TEOS su ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon sırasında, TEOS'taki etoksi grupları (OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) hidroksil grupları (OH) ile yer değiştirilerek silanol (Si(OH)<sub>4</sub>) oluşumunu sağlar [74].



Bu reaksiyon katalizör görevi görecek bir asit veya bazın varlığını gerektirir.

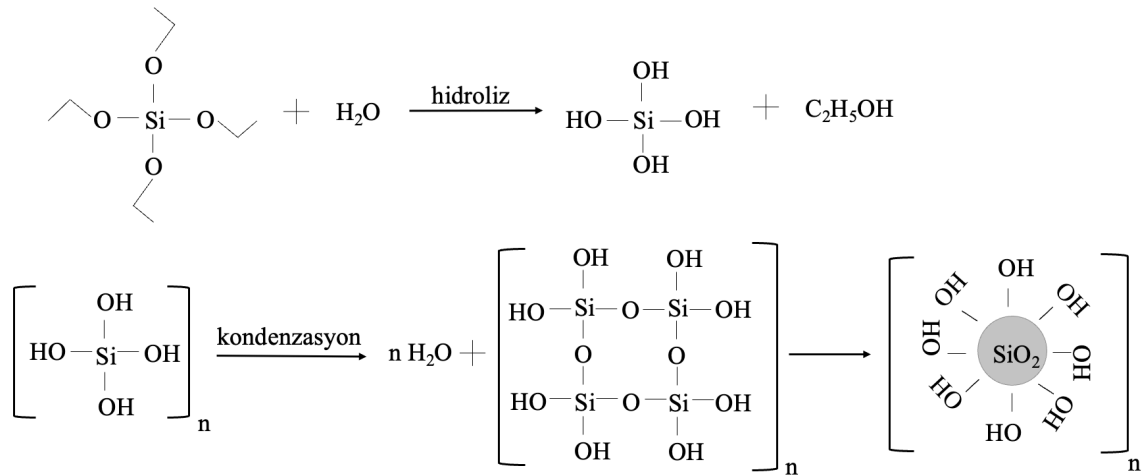
Hidrolizi takiben, silanol grupları yoğunlaşma reaksiyonlarına girer. İki silanol molekülü, su salınımı ile bir siloksan bağı (Si-O-Si) oluşturmak üzere reaksiyona girer [79].



Daha fazla siloksan bağı oluştuğça  $\text{SiO}_2$  partikülleri de büyür. Nanokürelerin boyutu ve şekli, TEOS derişimi, su, katalizör tipi, reaksiyon sıcaklığı ve zaman gibi faktörler ayarlanarak kontrol edilir.

Son olarak, elde edilen  $\text{SiO}_2$  nanoküreler, reaksiyona girmemiş TEOS, etanol veya diğer yan ürünleri uzaklaştırmak için santrifüjleme, yıkama ve kurutma gibi tekniklerle stabilize edilir.

TEOS'tan  $\text{SiO}_2$  nanokürelerin sentezi, kimyasal stabilite, geniş yüzey alanı ve gözeneklilik gibi silikanın güçlü özellikleri nedeniyle kaplamalar, dolgu maddeleri ve katalizörler için destek materyalleri dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [80].



Şekil 2.3. Stöber yöntemindeki reaksiyonların hidroliz ve kondenzasyon adımları

Mikroemülsiyon sentez metodunda, gözeneksiz SiNP'ler yağ içinde su mikroemülsiyonlarında üretilir [81]. Başlangıçta, yüzey aktif maddenin etkisi altında, su fazı ve yağ fazı bir mikroemülsiyon oluşturmak için birleşir.

Alkil silikat daha sonra mikroemülsiyon sistemine eklenir. Alkil silikat yağ fazına yerleşir ve yavaşça yüzey aktif madde katmanından su katmanına difüze olur ve burada kademeli olarak hidrolize olur [78]. Hidrolitik yoğunlaşma süreci pH ile ilişkilidir. Alkali koşullar yoğunlaşma için daha elverişlidir. Sol-jel reaksiyonunun baz katalizörü yoğunlaşmayı ve çözünmeyi teşvik eder. Buna karşılık, asit katalizörü hidrolizi teşvik eder ancak hem yoğunlaşmayı hem de çözünmeyi engeller. Mikroemülsiyon sentezi kolayca kontrol edilebilmektedir fakat organik çözücüler ve pahalı yüzey aktif maddeler kullanılır. Bu da büyük ölçekli sentezler için saflaştırma ve nanopartikül geri kazanımı gerektirir. Buna karşın, Stöber sentezi daha yaygın olarak kullanılmaktadır ve optimizasyon için daha geniş bir potansiyele sahiptir [82].

Mezogözenekli silika nanopartiküller, 2-50 nm arasında değişen ayarlanabilir gözenek boyutları, 1000 m<sup>2</sup>/g'ı aşan yüksek yüzey alanları ve yüksek ilaç yükleme kapasitelerine izin veren büyük gözenek hacimleri ile karakterize edilir [83].

Mezogözenekli SiNP'lerin sentezinde genellikle yüzeylerine fonksiyonel grupların eklenmesini kolaylaştıran sol-jel teknikleri kullanılır. Bu özelleştirme, hedef kanser hücreleri için spesifik bir afiniteye sahip birden fazla molekül veya grubun (ligand) bir taşıyıcı sisteme bağlanmasını sağlar [84].

Nanosilikalar, ilaç dağıtımını ve görüntüleme sistemlerinde sıkça kullanılan inorganik malzemelerdir. SiNP'ler biyomedikal alanda ilaç dağıtımını, hedefleme, uyarılara yanıt verme ve görüntüleme için kullanılırlar. Fonksiyonelleştirilerek belirli hücrelerin veya dokuların hassas bir şekilde hedeflenmesini sağlarlar.

SiNP'ler pH değişiklikleri, redoks koşulları, ışık ve sıcaklık gibi dış uyaranlara yanıt verme özelliğine sahiptir. Bu akıllı salım mekanizması, tümörlerin asidik mikro ortamı gibi hedef ortamın koşullarında çalışmaktadır [78].

SiNP'ler terapötik uygulamaların yanı sıra tıbbi teşhis alanında da kullanılmaktadır. MRI ve optik görüntüleme gibi teknikleri geliştirerek eş zamanlı tedavi ve teşhise olanak sağlamaktadır.

## 2.4. Polidopamin

Doğa olaylarının gözlemlenmesi ve araştırılması, yeni malzemelerin keşfedilmesine ve altta yatan fiziksel süreçlerin daha iyi anlaşılmasına olanak tanır. Son yıllarda, midyeden esinlenen polidopamin (PDA) ve kopolimerleri, biyouyumluluk ve yapışkanlık gibi özellikleri bir araya getirdikleri için literatürde ilgi görmüştür [85]. Omurgasız midyelerin katı yüzeylere yapışmasının gözlemlenmesi, malzeme bilimi alanında önemli bir ilerlemeye yol açmıştır. Midyeler, ıslak yüzeylerde bile yüksek bağlanma gücüne sahip olup çeşitli yüzeylere güçlü bir şekilde yapışır. Bu sağlam yapışmanın, plak-substrat ara yüzeyine yakın 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) ve lizinele zenginleştirilmiş proteinlerden kaynaklandığı bulunmuştur [86]. Bu durum, katekol ve amin gruplarının eş zamanlı varlığının güçlü yapışma için gerekli olabileceği hipotezine yol açmıştır.

Bu bulgulara dayanarak, DOPA ile benzer bir moleküler yapıya sahip olan polidopaminin kullanılabilirliği sonucuna ulaşılmıştır. PDA, süperhidrofobik yüzeyler de dahil olmak üzere hemen hemen her tür inorganik ve organik substrat üzerinde kolayca birikebilmektedir. Bu avantaj, PDA'yı çeşitli yüzeylerin modifikasyonunda ve işlevselleştirilmesinde sıklıkla kullanılan bir malzeme haline getirmiştir [87].

PDA'nın bir diğer değerli özelliği de katekol, amin ve imin gibi birçok fonksiyonel grubu içeren kimyasal yapısıdır. Bu fonksiyonel gruplar, istenen moleküllerle ve metal iyonlarıyla bağlantı noktaları sağlar [88].

Çözelti oksidasyon yöntemi, polidopamin sentezi için en yaygın kullanılan protokoldür. Monomeri olan dopamin, oksijen ile alkali koşullar altında ( $\text{pH} > 7,5$ ) oksitlenerek kendiliğinden polimerleşir. Bu kendiliğinden polimerizasyon reaksiyonu sert reaksiyon koşullarına ihtiyaç duymadan gerçekleşir. Dopamin monomeri olan dopamin hidroklorür ( $\text{DOPA} \cdot \text{HCl}$ ) alkali bir çözeltiye eklendiğinde, polimerizasyon hemen gerçekleşir ve geçen zamanla renksizden koyu kahverengiye dönüşen bir renk değişimi ile sonuçlanır. Substratlar üzerinde bir PDA filmi elde etmek için,  $\text{DOPA} \cdot \text{HCl}$  derişimi 2 mg/mL'den yüksek olmalıdır. PDA filminin kalınlığı, dopamin monomerlerinin derişimi ve polimerizasyon süresi ayarlanarak kontrol edilir [31].

Sentez, dopaminin oksidasyonu ile başlar. Sentezin ilk adımında benzen halkasına bağlı iki hidroksil grubuna sahip olan dopamin, oksijene maruz kaldığında, hidroksil grupları kinon yapılarına oksitlenerek dopaminkinon oluşur. Benzen halkasındaki hidroksil grupları oksitlenerek karbonil gruplarına (C=O) dönüşür. Bu reaksiyon, benzen halkasını daha elektrofilik hale getirerek kinon yapısını oluşturur. Oluşan yapı, iki karbonil grubu içeren ve kimyasal reaktivitesi yüksek olan bir kinon türüdür. Bu adım, hidrojen atomlarının çıkarılmasını ve halkada çift bağların oluşumunu içerir, halkanın reaktivitesini artırır. Sonraki adımda amin grubu (-NH<sub>2</sub>) kinon yapısı ile reaksiyona girerek siklik bir bileşik olan lökodopaminkromu oluşturur. Bu reaksiyon yeni bir halkanın oluşumunu içerir, burada azot bir karbonil grubuna saldırır. Daha sonraki aşamada, lökodopaminkrom, daha kararlı bir molekül olan dopakroma oksitlenir. Burada, iki hidrojen atomu kaybolur ve çift bağlar oluşur. Dopaminkrom, 5,6-dihidroksiindole tautomerize olur. Tautomerizasyon, bir bileşik içindeki bağların yeniden düzenlenmesi olup genellikle bir hidrojenin kayması ve yeni bir çift bağın oluşumunu içerir, daha kararlı bir aromatik yapı oluşur. Sonunda polimerizasyonla PDA sentezi tamamlanır.

Bu polimerizasyon mekanizması, PDA kaplı malzemelere artırılmış stabilite, biyoyumluluk ve fonksiyonel çok yönlülük sağlar [87, 88].

PDA, yüksek biyoyumluluğa, suda çözünürlüğe ve özellikle *in-vitro* PTT için NIR bölgesinde fototermal özellik sağlayan güçlü absorpsiyon kapasitesine sahiptir [89]. PDA'nın moleküler yapısındaki çeşitli aromatik halkalar ve bu halkalardaki gruplar, NIR ışığını emme kabiliyetini artırır. Emilen NIR ışığı, moleküler titreşimler ve diğer enerji transfer mekanizmaları yoluyla hızla ısı enerjisine dönüştürülür. Bu dönüşüm, kanser hücrelerini hedef alarak onları yok etmek için kullanılabilir ısı üretir. PDA, sahip olduğu bu özellik sayesinde fototermal ajan olarak kullanılmaktadır [30].

## 2.5. Kaskat Enzim Sistemi

Kaskat (basamaklı) enzim sistemleri, özellikle kanser terapötikleri alanında, sinerjistik terapi için kullanılmaktadır. Bu enzim sistemleri, nano ölçekte spesifik ve verimli reaksiyonlar oluşturmak için doğal enzimatik yolların taklit edilmesinden yararlanmaktadır. Birden fazla enzimi veya enzim benzeri nanomalzemeyi sıralı bir şekilde kullanan kaskat sistemler, terapötik etkileri artıran bir dizi reaksiyonu tetikleyerek kanser hücrelerinin daha etkili bir şekilde yok edilmesini sağlarken sağlıklı dokuya verilen zararı en aza indirmeyi amaçlar [90, 91]. Doğal enzimatik işlevleri taklit etmek için “nanozimler” olarak bilinen çeşitli enzimler ve enzim benzeri nanomalzemeler kullanılır [92].

Glikoz oksidaz enzimi, glikozun glukonik asit ve hidrojen peroksite dönüşümünü sağlar. Üretilen  $H_2O_2$ , sitotoksik etkiler uygulamak veya diğer terapötik reaksiyonları tetiklemek için kaskat sistemindeki diğer enzimler tarafından kullanılmaktadır [93].

Peroksidaz enzimi, glikoz oksidaz tarafından üretilen  $H_2O_2$ 'yi, renksiz bir substratı renkli bir ürüne oksitlemek için kullanır. Renk değişiminin yoğunluğu,  $H_2O_2$  miktarı ve dolayısıyla başlangıçtaki glikoz derişimi ile doğru orantılıdır [94].

Nanozimler tarafından taklit edilen süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerini  $H_2O_2$  ve  $O_2$  gibi daha az zararlı moleküllere dönüştürmek için kullanılır. SOD, tümör hücrelerindeki oksidatif stresi terapötik seviyelerde tutarken normal hücrelerdeki oksidatif stresi azaltmak için önemlidir [95].

Glikoz Oksidaz (GOx) ve Katalazın (CAT) kanser tedavisine yönelik kaskat enzim sistemleri içinde birlikte kullanılması, tedavinin etkinliğini artıran sinerjistik bir etkileşim sağlamaktadır [94]. GOx glikozun glukonik aside oksidasyonunu katalize ederek  $H_2O_2$  üretir. CAT ise  $H_2O_2$ 'yi su ve oksijene ayrıştırır. Bu reaksiyon, aşırı  $H_2O_2$ 'nin sağlıklı hücrelere verebileceği potansiyel zararı azaltmaya yardımcı olurken tümör mikro çevresindeki oksijen içeriğini de artırır [96]. Düşük oksijen seviyeleri yüzünden hipoksik tümör ortamlarında kısıtlanan PDT etkinliğini ilave oksijen sayesinde daha etkili hale getirir [97, 98].

## **2.6. Hücre Hattı Çalışmaları**

Beyin tümörleri, bulunduğu konum ve sıklıkla lokal büyümeleri nedeniyle yüksek ölüm oranına sebep olan tümör türlerindedir. Glioblastoma en agresif ve yaygın beyin tümörüdür. Glioblastomadan kaynaklı kanser hastasının hayatta kalma süresi uzun olmamaktadır [99].

T98G hücre hattı, yetişkinlerde primer beyin tümörlerinin en yaygın ve agresif formu olan insan glioblastomundan türetilmiştir. Bu hücre hattı, yüksek malignitesi (kötü huylu tümör), tedavi direnci, hızlı çoğalması ve sağlamlığı nedeniyle farklı terapötik ajanların etkinliğini değerlendirmek için kanser araştırmalarında kullanılmaktadır [100-102].

Farenin deri altı bağ dokusundan türetilen L929 hücre hattı, çeşitli araştırma ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir fibroblast hücre hattıdır. L929 hücre hattı kanser kökenli değildir, bu da onu doğrudan kanserle ilgili olmayan çalışmalar için de uygun hale getirmektedir. L929 hücreleri fibroblastiktir, yani iğ şeklindedirler ve kültür substratına güçlü bir şekilde yapışırlar. L929 hücreleri, hücre canlılığını ve sitotoksitesiyi değerlendirmek için MTT deneylerinde sıklıkla kullanılır [103-105].

### **2.6.1. Sitotoksitesite Çalışmaları**

Hücre canlılığı, bir popülasyon içindeki canlı, sağlıklı hücrelerin oranının bir ölçüsüdür. Hücre canlılığı analizleri, çeşitli tedavilere yanıt olarak hücrelerin genel sağlığını ve hayatta kalmasını belirlemek için oldukça önemlidir. Sitotoksitesite, hücreler için toksik olma niteliğini ifade eder. Belirli maddelerin veya ajanların hücreleri öldürme veya zarar verme kapasitesidir. Sitotoksitesite testleri, bir maddenin hücreler üzerindeki doğrudan etkileri hakkında bilgi verir ve canlı hücreler üzerindeki zararlı etkilerin belirlenmesini sağlar [106]. Hücre canlılığını ve sitotoksitesitesini ölçmek için boyama yöntemleri ve metabolik aktiviteye dayalı yöntemler kullanılmaktadır [107].



### **2.6.2. MTT Testi**

3-(4, 5-dimetiltiyazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), suda çözünebilen sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur ve sitotoksik analizlerde hücre canlılığını belirlemek için yaygın olarak kullanılır. Hücre çoğalması sırasında, mitokondriyal dehidrojenaz enzimi tarafından indirgenerek enzim aktivitesinde bir artışa yol açar ve suda çözünmeyen mor bir kristal yapı olan formazanı oluşturur. MTT deneyi hücrelerin MTT ile inkübasyonundan birkaç saat sonra (1-4 saat) gerçekleştirilir. [108, 109]. Oluşan formazan kristalleri ya dimetil sülfoksitte (DMSO) ya da izopropanolde (IPA) çözüldükten sonra çok kuyucuklu bir spektrofotometre kullanılarak 570 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenir. Çözelti ne kadar koyu olursa, canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı da o kadar fazla olur. Elde edilen formazan kristal ürün miktarı, kullanılan canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. İşlem görmemiş kontrol grubunun hücresel canlılık oranı %100 olarak alınır ve oransal hesaplamalar bu kontrol grubuna göre yapılır [110, 111].

### **2.6.3. Hücre Boyama**

Akridin turuncusu (acridine orange, AO) ve propidyum iyodür (propidium iodide, PI), floresan mikroskobu yoluyla canlılığı ve hücresel bileşenleri değerlendirmek üzere hücreleri boyamak için yaygın olarak kullanılan boyalardır. AO, 510-550 nm dalga boyunda canlı hücreler için yeşil renkte floresan verirken PI, 460-490 nm dalga boyunda yalnızca ölü veya hasarlı hücreleri belirtmek için kırmızı renkte floresan verir [112].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

Tez kapsamında, toluen ISOLAB'tan, 2,2'-Azobis(2-metilpropionitril) (AIBN, 97%) Matrix Scientific (Amerika Birleşik Devletleri)'ten, gliserol dimetakrilat (GDMA, 85%), metakrilik asit (MAA, 99%), asetonitril (ACN), teknik etanol (EtOH, 95%-99%), mutlak etanol, 2-propanol (IsoPr-OH), tetrabütülamonyum iyodür (TBAI, 98%), amonyum hidroksit (25-30% NH<sub>3</sub>), tetraetilortosilikat (TEOS, ≥99.0%), tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS, ≥99.8%), dopamin hidroklorür, hidroklorik asit (HCl, 37%), sodyum hidroksit (NaOH, 98-100.5%, pelet), sodyum dodesil sülfat (SDS), trisodyum sitrat, o-fenilendiamin (OPDA), hidrojen peroksit (%50 w/w), titanyum (IV) klorür (TiCl<sub>4</sub>), Glikoz oksidaz (GOx, Katalog No: G6125, Tip II, >15.000 birim /g katı, Aspergillus niger), cytochrome-c from bovine heart (Cyt-C, ≥95%), fosfat tamponlu salin (PBS), akridin turuncusu (AO), propidyum iyodür (PI), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT), 1,3-difenilizobenzofuran (DPBF) ve penisilin/streptomisin (P/S) kimyasalları Sigma-Aldrich Inc., MERCK'ten (St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri), Klorin e6 (Ce6) Medkoo, ABD'den temin edilmiştir. T98G insan glioblastoma hücreleri ve L929 deri altı bağ dokusu hücreleri) American Type Culture Collection'dan (ATCC, Manassas, VA, ABD) temin edilmiştir. Yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F12, %10 (w/w) fetal bovine serum (FBS) ve DMEM-F12 Biochrom AG, Berlin, Almanya'dan satın alınmıştır.

Tüm sentez çalışmaları ve *in-vitro* deneylerde, kimyasal malzemelerin tartımı için hassas terazi (Sartorius, Entris® 224- 1S), kimyasal direnci 18 MΩ cm olan deiyonize su için Millipore Direct-Q® 3 UV marka cihaz, partiküllerin kurutulması için Memmert UN55 marka etüv, manyetik karıştırma için IKA RO-10 (Germany), ısıtıcılı karıştırma için IKA C-MAG HS (Germany) marka karıştırıcı, mekanik karıştırma için IKA RW-20 digital (Germany) marka karıştırıcı, vortex karıştırıcı (SCI FINETECH ve IKA GENIUS 3), ultrasonik banyo (ISOLAB sonikatör), prob sonikatör (Bandelin Sonopuls), pH metre (İstek NeoMet pH/SE Meter pH-240L), partiküllerin santrifüjleme-dekantasyon yöntemi ile yıkanması için Hermle Z 326 K Soğutmalı Santrifüj, çalkalamalı su banyosu (Memmert, Almanya), kül fırınları (CLS CLMF-1205 ve Mikrotek Dental, MFX-1010) kullanılmıştır. UV-Vis spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) absorbans ölçümleri için kullanılmıştır. Fototermal terapi ve fotodinamik terapi deneyleri için CNI

(Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co., Ltd., PSU-III-LED, China) 808 nm NIR ve 650 nm LED lazer kullanılmıştır. Optik mikroskop görüntüsü için Nikon, Eclipse E200, gözenek boyutu ve yüzey alanı ölçümleri için Quantochrome, Nova 2200e, (ABD) cihazı, boyut özellikleri için Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'teki GAIA3+Oxford XMax 150 EDS Model Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılmıştır. *İn-vitro* deneylerde, MTT testleri için mikropilaka spektrofotometresi ( $\mu$ Quant<sup>TM</sup>, BiotekW Instruments Inc, USA), hücre görüntülemeleri için inverted floresan mikroskobu (Olympus IX70, Japonya) kullanılmıştır.

### **3.2. Poli(gliserol dimetakrilat-ko-metakrilik asit) [poli(GDMA-co-MAA)] Nanokürelerin Sentezi**

Tez kapsamında, 180-1000 nm aralığında ortalama boy değerine sahip çıkış materyali olarak kullanılmak üzere monodispers (tekil dağılımlı) formda poli(GDMA-co-MAA) nanoküreler sentezlenmiştir. Bu amaçla istenilen boyutlarda poli(GDMA-co-MAA) nanokürelerin sentezi için optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. 180-200 nm boy dağılımına sahip sentezlenen kalıp materyalleri, ilgili monomerlerin asetonitril/toluen ortamında dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır.

#### **3.2.1. 180-200 nm Boyut Aralığında Poli(GDMA-co-MAA) Nanoküre Sentezi**

Sentez ortamı için 42,3 mL toluen ve 22,7 mL asetonitril (ACN) oda sıcaklığında T şekilli sızdırmaz cam polimerizasyon reaktöründe soniklenmiştir. Monomer olarak sırasıyla 0,15 mL metakrilik asit (MAA) ve çapraz bağlayıcı monomer 0,64 mL gliserol dimetakrilat (GDMA), hazırlanan çözeltiliye eklenerek soniklenmiştir. Başlatıcı olarak 0,09 g 2,2'-Azobis(2-metilpropionitril) AIBN çözünene kadar ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutulmuştur. Çalkalama hızı 120 cpm olan sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosu 70 °C'ye kadar ısıtılmış ve polimerizasyon bu koşullar altında 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra, sızdırmaz cam polimerizasyon reaktörü sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosundan alınıp oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Poli(GDMA-co-MAA) çıkış lateksi santrifüjleme (10000 rpm, 10 dakika) ile izole edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra partiküller sırasıyla mutlak etanol, teknik

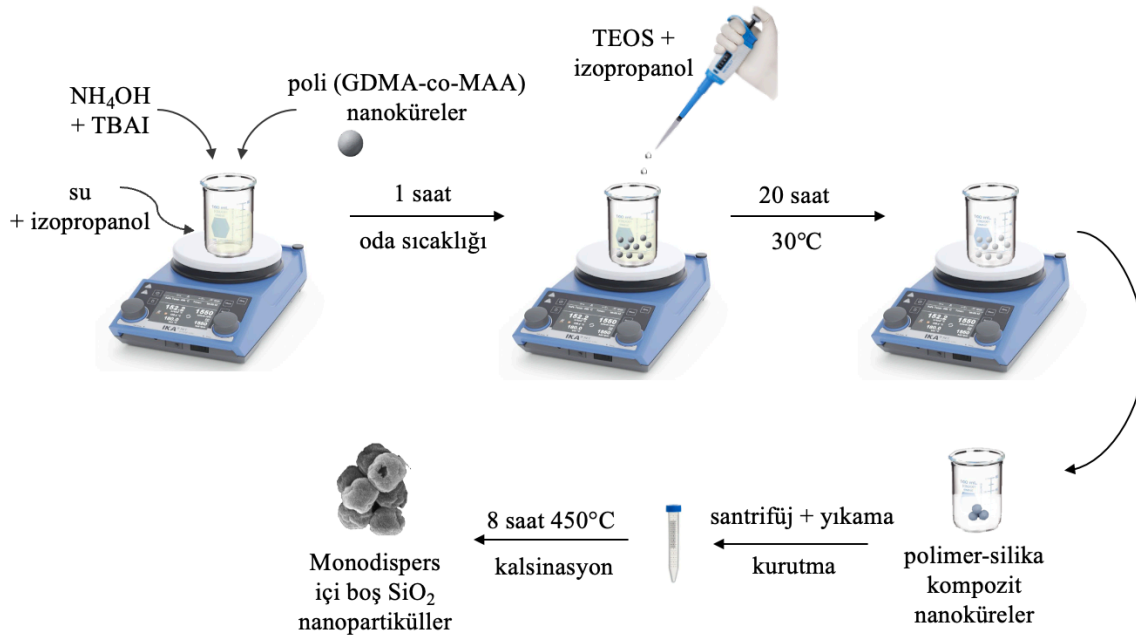
etanol ve distile su ile birkaç kez yıkanmıştır. Sulu ortamda belirli bir hacimdeki poli(GDMA-co-MAA) tohum lateks miktarı gravimetrik analiz ile elde edilmiştir.

### 3.3. İçi Boş Silika Nanokürelerin Sentezi

Çıkış materyali olarak, istenen boyutlardaki monodispers-gözenekli poli(GDMA-co-MAA) nanoküreler kullanılarak içi boş H-SiO<sub>2</sub> nanoküreler çok basamaklı sol-jel kalıplama yöntemi ile sentezlenmiştir. Hangi boyutlarda silika sentezlenecekse o boyutta üretilmiş poli(GDMA-co-MAA) polimerik nanokürelerin yüzeyinde NH<sub>4</sub>OH çözeltisi ve TBAI içeren IPA/su ortamında TEOS'un hidroliz-kondenzasyon reaksiyonu ile SiO<sub>2</sub> katmanı oluşumu sağlanmıştır.

TEOS'un hidrolizi ve kondenzasyonu ile SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin sentezi iki aşamalı olarak gerçekleşir. İlk olarak, TEOS su ve bir katalizör (NH<sub>4</sub>OH) varlığında hidrolize uğrayarak silanol (Si-OH) grupları oluşturur. Daha sonra, bu silanol grupları yoğunlaşarak siloksan (Si-O-Si) bağları oluşturur ve SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin oluşumunu sağlar.

Şekil 3.1'de, kalıp materyali içeren ve basamaklı hidroliz-kondenzasyon protokolü kullanılarak sentezlenen içi boş mezogözenekli SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin sentezi gösterilmektedir.

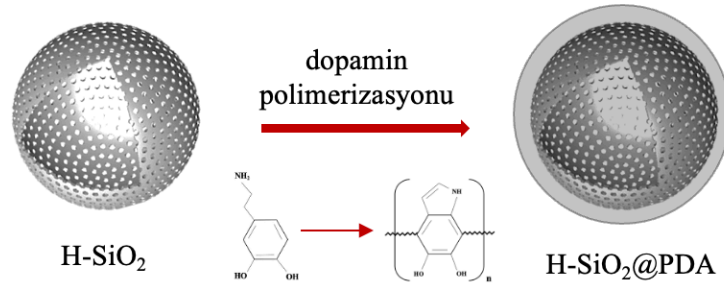


Şekil 3.1. H-SiO<sub>2</sub> sentez aşamaları

Nanopartiküllerin sentezi için sürekli ortam olan 50 mL IPA ile 5 mL distile su oda sıcaklığında soniklendikten sonra 0,25 g TBAI ardından 0,25 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  eklenmiştir. 0,4 g önceden sentezlenen poli(GDMA-co-MAA) nanoküreleri çözeltide dağıtılmış ve dispersiyon 1 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırılmıştır. Homojen dispersiyon ortamına 1,25 mL TEOS ve 3,75 mL IPA karışımı 1 saat sonra enjektör şırınga ile damla damla eklenerek tekrar 20 saat boyunca  $30^\circ\text{C}$ 'de su banyosunda manyetik karıştırılmıştır. Sentez tamamlandıktan sonra oluşan poli(GDMA-co-MAA)/ $\text{SiO}_2$  kompozit yapı 10000 rpm'de 5 dakika çöktürülüp IPA ve distile su ile yıkanmıştır. Partiküller etüvde  $70^\circ\text{C}$ 'de bir gece kurutulduktan sonra hava atmosferinde  $450^\circ\text{C}$ 'de,  $2^\circ\text{C}$  artışla 8 saat kül fırınında kalsine edilerek monodispers içi boş formda gözenekli  $\text{SiO}_2$  (H- $\text{SiO}_2$ ) nanopartiküller Şekil 3.1'deki gibi elde edilmiştir.

### 3.4. Polidopamin Kaplı İçi Boş Silika Nanopartiküllerin Sentezi

İçi boş silisyum dioksit nanopartiküllere fototermal terapi özelliği kazandırmak amacıyla polidopamin kaplaması yapılmıştır (Şekil 3.2).



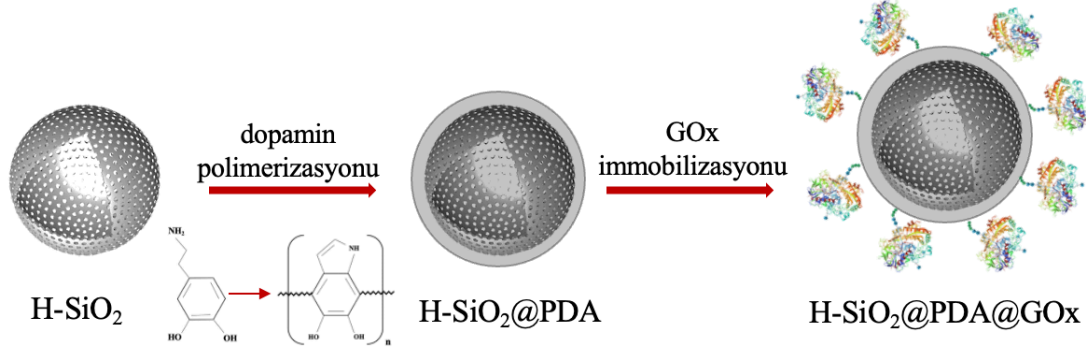
Şekil 3.2. H-SiO<sub>2</sub>@PDA sentezi

Şekil 3.2'de, 30 mg H-SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri 15 mL 10 mM pH: 8,5 Tris-HCl tamponu içinde ultrasonikasyon ile dağıtılmıştır. Hemen sonrasında 30 mg DOPA·HCl ilave edilerek dispersiyon tekrar pH: 8,5'e getirilmiş ve sentez oda sıcaklığında 6 saat boyunca 350 rpm'de mekanik olarak karıştırılmıştır.

PDA kabuk kaplı H-SiO<sub>2</sub> NP'ler santrifüjleme-dekantasyon yoluyla distile su ile yıkanmış ve su içinde süspansiyon halinde  $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmıştır.

### 3.5. Glikoz Oksidaz Enziminin Nanopartikül Üzerine İmmobilizasyonu

Tümör mikro çevresindeki glikozun oksidasyonu ile sağlanacak açlık terapisi için nanopartiküllere GOx enzimi immobilize edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx sentezi

Şekil 3.3'te, polidopamin kaplı içi boş silika nanopartiküllerine GOx enziminin immobilizasyonu için 2 mg GOx; 2 mL, 25 mM, pH 7,0 fosfat tamponu içinde (1 mg/mL) 10 mg H-SiO<sub>2</sub>@PDA nanopartiküllerin üzerine fiziksel olarak adsorbe edilmiştir. Dispersiyon, karanlık ortamda 2 saat boyunca 50 rpm'de rotatorda döndürülmüştür. Elde edilen H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx nanopartiküller, santrifüjlenerek distile su ile yıkanmıştır.

#### 3.5.1 Glikoz Oksidaz Aktivitesi Tayini

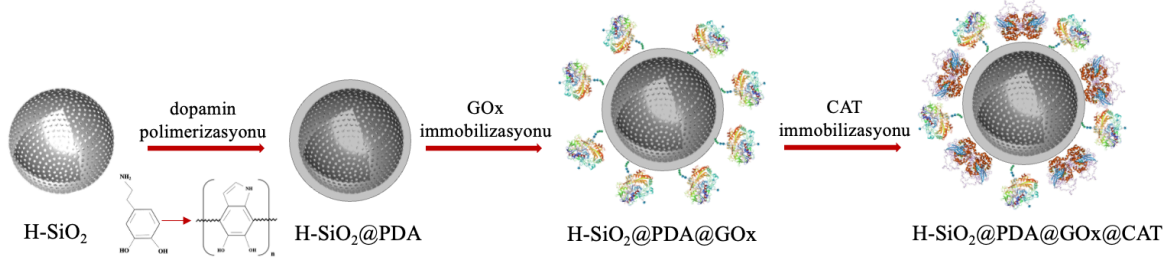
12 mg H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx NP'ler 550-22200 µM (0,1-4 mg/mL) arasında değişen derişimlerden glikoz içeren 3 mL'lik 100 mM, pH:5,0 sitrat tamponu içinde dağıtılmıştır. Elde edilen dispersiyon, karanlıkta 37°C'de 1 saat boyunca 120 cpm hızında çalkalanmalı su banyosunda çalkalanmıştır. 1 saatin sonunda partiküller çöktürülüp süpernatant tekrar yeni bir şişeye alınmış ve pH:5,0 sitrat tamponu ile OPDA çözeltisi (2,0 mM, 3 mL) hazırlanıp OPDA çözeltisi ile aynı anda 2 mg/mL'lik sitokrom-c (cyt-c) (15 µL) dispersiyona eklenmiştir. OPDA ve cyt-c eklendikten hemen sonra kronometre açılarak zamana karşı absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Süpernatantın absorbansı, UV-Vis spektrofotometresinde 446 nm'de ölçülmüştür. Başlangıç glikoz tüketim oranları, farklı başlangıç glikoz derişimlerinin glikoz oksidasyonlarından elde edilen örneklerle OPDA derişiminin zamanla değişimine

dayanarak hesaplanmıştır. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx NP'lerin GOx aktivitesi, Michaelis-Menten model parametreleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.6. Katalaz Enziminin Nanopartikül Üzerine İmmobilizasyonu

Tümör mikro çevresindeki hipoksik ortamın eliminasyonu için nanopartiküllere katalaz enzimi immobilize edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT sentezi

Şekil 3.4'te, 10 mg H-SiO<sub>2</sub>@PDA nanopartiküller 5 mL 25 mM pH:7,0 fosfat tamponunda ultrasonikatör ile dağıtılmıştır. Sırasıyla 2 mg GOx ve 1 mg CAT enzimi eklenmiştir. Enzimlerin bağlanması için ortam 50 rpm'de 2 saat boyunca karanlıkta rotatorda karıştırılmıştır. Santrifüjleme yoluyla H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT NP'ler elde edilmiştir.

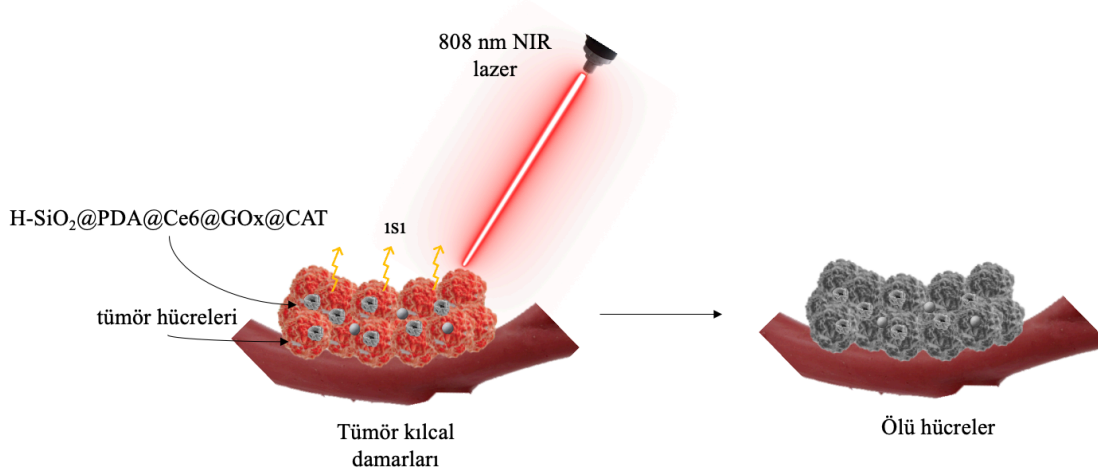
#### 3.6.1 Katalaz Aktivitesi Tayini

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT NP'lerin yapay katalaz aktivitesi, kolorimetrik bir yöntem kullanılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bozunması (dekompozisyon) izlenerek değerlendirilmiştir. 10 mg H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT NP'ler 0,5 ile 15 mM aralığında değişen 5 mL'lik farklı başlangıç H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi ile hazırlanan sulu bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi içinde dağıtılmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin fotobozunmasını önlemek için reaksiyon ortamı oda sıcaklığında (22°C) 30 dakika boyunca karanlıkta 50 rpm'de rotatorda inkübe edilmiştir. 30 dakika boyunca belirli zaman aralıklarında (0, 1, 2, 5, 10, 30 dakika) reaksiyon karışımından 1 mL çekilerek nanopartiküller santrifüjlenmiştir. Kolorimetrik tespit için alınan numuneden elde edilen süpernatanttaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi, TiCl<sub>4</sub>/HCl kompleksi ile karıştırılarak 414 nm'deki absorbansı UV-Vis spektrofotometresinde ölçülerek belirlenmiştir. Tüm zaman noktaları ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimleri için absorbans değerleri kaydedilmiştir. H-

SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT NP'lerin yapay katalaz aktivitesi için absorbans değerleri zamana karşı çizilerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bozunmasının başlangıç hızı hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak Michaelis-Menten sabiti belirlenmiştir.

### 3.7. Nanopartiküllerin Fototermal Terapi Özelliklerinin İncelenmesi

H-SiO<sub>2</sub> ve nihai partikül olan H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT NP'lerinin fototermal yanıtı bir NIR lazer (808 nm) kullanılarak ölçülmüştür. Şekil 3.5'te PTT etkisi şematize edilmiştir.



Şekil 3.5. Nanopartiküllerin NIR lazer ile tümör hücrelerinde oluşturduğu temsili PTT etkisi.

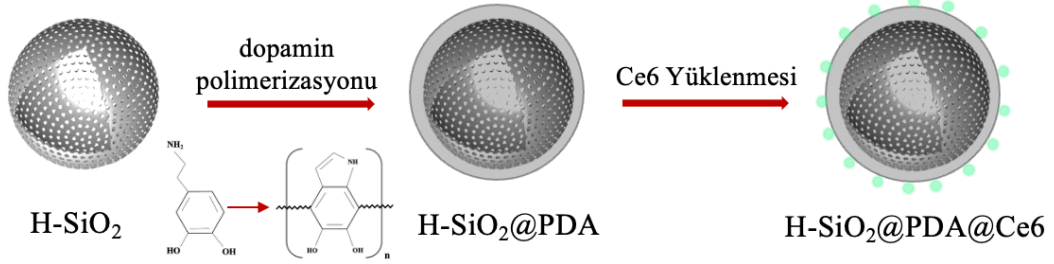
Nanopartiküllerin 200 µL'lik sulu dispersiyonu, 1 W/cm<sup>2</sup> güç yoğunluğunda 5 dakika boyunca NIR lazere maruz bırakılmıştır. Dispersiyonlar 0,1 ile 2 mg/mL arasında değişen nanopartikül derişimlerinde hazırlanmıştır. Sulu dispersiyonun sıcaklığı, kabın merkezine sabitlenen bir ısı çift aracılığıyla her 20 saniyede bir değer alınarak 5 dakika boyunca ölçülmüştür. Isıtma-soğutma grafiği için her 5 dakikada bir beşli döngü olacak şekilde NIR lazer kapatılarak soğutma işlemi sırasında sulu dispersiyonun sıcaklığı zamana karşı tekrar kaydedilmiştir ve dispersiyon başlangıç sıcaklığına geldiği andan itibaren lazer tekrar açılmıştır. Nanopartiküllerin termal kararlılığını değerlendirmek için ardışık ısıtma/soğutma işlemleri bu sayede beş kez tekrarlanmıştır.



### 3.8. Nanopartiküllerin Fotodinamik Terapi Özelliklerinin İncelenmesi

#### 3.8.1. Partiküllere Ce6 Yüklenmesi

Klorin e6 (Ce6), fiziksel adsorpsiyon yoluyla polidopamin kaplı içi boş silika (H-SiO<sub>2</sub>@PDA) nanopartiküllere yüklenmiştir (Şekil 3.6).

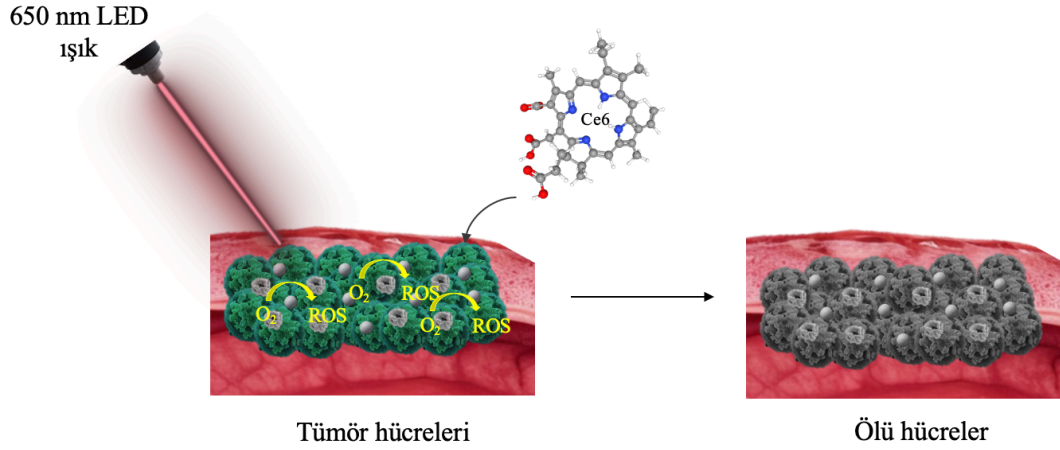


Şekil 3.6. Nanopartiküllere Ce6 yüklenmesi

10 mg/mL H-SiO<sub>2</sub>@PDA nanopartiküller 1 mg/mL derişimde 2 mL Ce6-metanol çözeltisi ile 30 dakika boyunca rotatorda karıştırılmıştır. Adsorpsiyon oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirilmiştir. 30 dakika sonunda çözelti santrifüjlenerek su ile yıkanmıştır.

#### 3.8.2. Partiküllerin Fotodinamik Etkisi

10 mg/mL H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT NP'ler karanlıkta 30 µg/mL DPBF/ACN çözeltisi içinde dağıtılmıştır. Çözelti, 650 nm dalga boyunda (0,8 W) bir LED ile ışınlanmıştır. Çeşitli ışınlama sürelerinde (0, 1, 5, 10 dakika) alınan numunelerin santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatantların absorpsiyon spektrumları bir UV-Vis spektrofotometresinde 410 nm'de ölçülmüştür. Kontrol çalışmasında, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT NP'leri dahil edilmeden sadece DPBF çözeltisi aynı koşullarda LED ile ışınlanmış ve absorpsiyon spektrumları aynı yöntemle kaydedilmiştir. Şekil 3.7'de PDT etkisi şematize edilmiştir.



Şekil 3.7. Fotoduyarlaştırıcı yüklü nanopartiküllerin 650 nm LED altında tümör hücrelerinde oluşturduğu temsili PDT etkisi

Şekil 3.7’de, nanopartiküle yüklenen Ce6, 650 nm dalga boyunda LED ışıktta aktive olarak hücre ölümüne yol açan ROS üretmektedir.

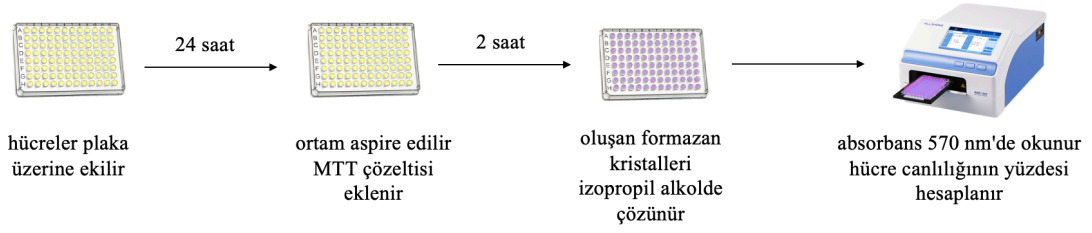
### 3.9. Hücre Deneylei

#### 3.9.1. Sitotoksisite Çalışmaları

H-SiO<sub>2</sub> ve türevlendirilmiş formu olan H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin sitotoksik etkilerini değerlendirmek için T98G insan glioblastoma hücreleri ve L929 fare fibroblast hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler, 96 kuyucuklu kültür plakalarına kuyu başına 2x10<sup>4</sup> hücre yoğunluğunda ekilmiş ve bir gece boyunca tutunmalarına izin verilmiştir. Her iki hücre hattı da 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren atmosferde, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin (P/S) ile desteklenmiş yüksek glikozlu DMEM ortamında 24 saat inkübe edilmiştir.

Hücrelere daha sonra %2 FBS, %1 P/S ve %1 DMEM içeren 200 µL’lik kültür ortamında 0,1 ile 1,0 mg/mL arasında değişen derişimlerde H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT verilerek 24 saat karanlıkta inkübe edilmiştir.

24 saat sonunda hücre canlılığı, floresan mikroskop ve MTT testi (Şekil 3.8) ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.8. MTT testinin genel adımları.

Şekil 3.8, hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir test olan MTT test sürecini göstermektedir. MTT testi için kültür ortamı 200  $\mu$ L, ağırlıkça %10'luk MTT (500  $\mu$ L MTT ve 4,5 mL besiyeri) ile değiştirilmiş ve hücreler karanlıkta 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda formazan kristallerini çözmek için ortam uzaklaştırılarak tekrar aynı ortama izopropil alkol eklenmiştir. Her bir kuyucuğun absorbansı her derişim grubu için mikroparka spektrofotometresi (EZ Read 400 ELISA) Galapagos yazılımı üzerinden ile 570 nm'de ölçülerek hücrelerin yüzde canlılık oranı hesaplanmıştır.

Besiyerleri uzaklaştırılan ve MTT uygulanmayan hücre gruplarındaki hücreler 2 dakika boyunca AO/PI boya çözeltisi (100  $\mu$ L, hacimce 1:1) ile inkübe edilmiştir. 2 dakika sonunda boya çözeltisi uzaklaştırılarak hücreler iki kez fosfat tamponlu salin ile yıkanmıştır. Canlı (yeşil floresan) ve ölü (kırmızı floresan) hücreleri değerlendirmek için hücreler floresan mikroskobu altında 460-490 nm ve 510-550 nm dalga boylarında görüntülenmiştir. Kontrol deneyleri için de aynı prosedür ortama nanopartikül eklenmeden uygulanmıştır.

### 3.9.2. Nanopartiküllerin *in-vitro* Kombine Fototermal, Fotodinamik ve Açlık Terapisi Çalışmaları

Sitotoksosite testlerinin ardından, lazer tedavisi prosedürü, hücresel ortamdaki nanopartikül inkübasyonundan sonra, T98G hücrelerini içeren her bir kuyucuktaki kültür ortamı 808 nm ve 650 nm dalga boylarındaki lazerlere maruz bırakılmıştır.

Farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub>@PDA nanopartikül içeren kuyucuklar 5 dakika boyunca 808 nm dalga boyunda bir NIR lazerle etkileştirilmiştir. Bu adımda, nanopartiküller üzerindeki PDA kaplama aktive edilerek lokalize ısıtma yoluyla fototermal tedaviyi artırma amaçlanmıştır.

Ce6 aracılığıyla fotodinamik terapi etkinleştirmek üzere sentezlenmiş H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6 nanopartiküller 7 dakika boyunca 650 nm dalga boyunda bir LED ışık kaynağına maruz bırakılmıştır. Bu ışınlama aşamasında, hücre hattında reaktif oksijen türlerinin oluşumu kolaylaştırılarak hücresel oksidatif stresi artırma hedeflenmiştir.

Kombine fototermal, fotodinamik ve açlık terapisinde ölüm oranı, ek hidrojen peroksit üretmek için glikozun oksidasyonunu katalize eden nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş glikoz oksidaz (GOx) ile daha da artırılma hedeflenmiştir. GOx enzimine ek olarak yüklenen katalaz ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksijene ayrıştırılarak hipoksi hafifletilmiş ve fotodinamik terapinin etkisi artırılmıştır. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nihai nanopartikül üzerine sırasıyla 5 dakika 808 nm ve 7 dakika 650 nm lazer ışınlanarak kombine terapi gerçekleştirilmiştir. Lazer tedavisinin ardından, hücreler inkübatöre geri gönderilmiş ve terapötik etkilerin ortaya çıkmasını sağlamak için 24 saat daha standart kültür koşulları (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) altında tutulmuş ve daha sonra canlılık testi ve görüntüleme testleri aynı prosedürler uygulanarak değerlendirilmiştir.

### **3.10. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

#### **3.10.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Analizi**

H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin özgül yüzey alanları (specific surface area-SSA) ve gözenek boyutu Brunauer-Emmett-Teller (BET) denklemi kullanılarak analiz cihazı (Quantachrome, Nova 2200E, UK) ile belirlenmiştir. 0,1 g tartılmış numuneler adsorpsiyon analizörünün giriş bölümünde 6 saat boyunca 250°C'de vakum altında adsorbe olmuş kirleticileri gidermek için gazdan arındırılmıştır. Gaz giderme işleminden sonra analizler bir inert gaz olan azot ile sabit ve düşük sıcaklıkta sıvı azot kullanılarak numunenin yüzeyine 77 K'de adsorbe edilmiştir. Farklı bağıl basınçlarda (P/P<sub>0</sub>) adsorbe edilen azot miktarı ölçülerek SSA hesaplanmıştır. Gazın malzemeden nasıl adsorbe edildiği ve desorbe edildiği incelenerek ise gözeneklilik türü (örneğin, küçük, orta, büyük gözenekler) belirlenmiştir. Buna ek olarak nanopartiküllerin fizisorpsiyon izotermi çıkarılmıştır.

#### **3.10.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizi**

Kanser tedavilerinde sinerjistik terapi ajanı olarak kullanılmak üzere türevlendirilen içi boş gözenekli silika nanopartiküllerinin ayrıntılı yüzey morfolojileri, yüzey yapıları, yüzey dokuları ve ortalama boyut dağılımını belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) (Tescan, GAIA3+Oxford XMax 150 EDS, HÜNİTEK) kullanılmıştır.

Numune hazırlama için, yaklaşık 0,1 g 70°C'de etüvde kurutulmuş nanopartiküller ağırlıkça %0,05'lik sulu bir SDS çözeltisinde birkaç dakika boyunca prob sonikasyonla buz banyosu içinde dağıtılmıştır. Daha sonra dispersiyon, disk üzerine yapıştırılan bir çift taraflı karbon bant üzerindeki lamele damlatılmış ve oda sıcaklığında bir gün boyunca kurutulmuştur. İletken olmayan numuneler, analizi etkileyebilecek elektron ışını altında yüklenmeyi önlemek için iletken bir kaplama gerektirdiğinden kurutulmuş numuneler fiziksel buhar biriktirme yöntemiyle 5 nm altınla kaplanmıştır.

SEM ile kullanılan diğer bir analitik teknik Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS veya EDX), sentezlenen malzemelerin element bileşimini ve dağılımını belirlemek için aynı örnek üzerinden kullanılmıştır.

### 3.10.3. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi

Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS), kolloidal süspansiyon halindeki H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin boyut dağılımını karakterize etmek için kullanılmıştır. Kuru haldeki H-SiO<sub>2</sub> nanoküreler deiyonize su içinde prob sonikatörde dağıtılarak 0,1 mg/mL'lik derişimde hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon tek kullanımlık küvete 2 mL kadar eklenmiştir. Ölçüm oda sıcaklığında alınmıştır. DLS cihazı, nanopartiküllerin Brownian hareketiyle ışık saçılma yoğunluğundaki dalgalanmaları kaydetmiştir. DLS yazılımı kullanılarak Z-ortalaması (yoğunluk ağırlıklı ortalama çap), boyut dağılımının genişliğini gösteren polidispersite indeksi (PDI), yoğunluk, hacim ve sayıya göre boyut dağılımı verileri alınmıştır. Bu verilere göre partikül boyutuna karşı ortalama yoğunluk yüzdesi grafiği çizilerek silika nanopartiküllerinin çözeltideki boyut dağılımı tayin edilmiştir. Analizde Malvern Instruments Zetasizer Nano-S Particle Analyzer ZEN1600 cihazı kullanılmıştır.

### 3.10.4. Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR)

Sinerjistik terapi ajanı olarak kullanılmak üzere sentezlenen H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerindeki fonksiyonel grupları ve kimyasal bağları tanımlamak için FTIR spektrumu alınmıştır. Yaklaşık 2 mg katı toz haldeki nanopartikülün analizi FTIR spektrofotometresinde (Thermo Fisher Scientific, Nicolet 6700, A.B.D.) gerçekleştirilmiştir. FTIR-ATR spektrumları elde edildikten sonra çeşitli fonksiyonel gruplara ve bağlara karşılık gelen pikler analiz edilmiştir.

### 3.10.5. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis)

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx nanopartiküller üzerindeki immobilize GOx'un aktivitesini değerlendirmek, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin yapay katalaz aktivitesi için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ayrışma hızını değerlendirmek ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülünde Ce6 fotoduyarlaştırıcının yüklendiğini doğrulamak için belirli dalga boylarında UV-Vis spektrumları (Thermo Scientific, ABD) incelenmiştir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında, sentezlenmiş nanopartiküllerin morfolojik özellikleri, yüzey alanı, gözenekliliği, yüzey yapısı, ortalama boyutu, elementel dağılımı, N<sub>2</sub> fizisorpsiyon izotermeleri, fonksiyonel grupları, kimyasal bağları, enzim aktiviteleri, fototermal ve fotodinamik yanıtları, *in-vitro* sitotoksiteleri, sinerjistik terapi uygulamalarında hücre canlılık oranları araştırılmıştır.

### 4.1. Nanopartiküllerde SEM ve EDX Analizi

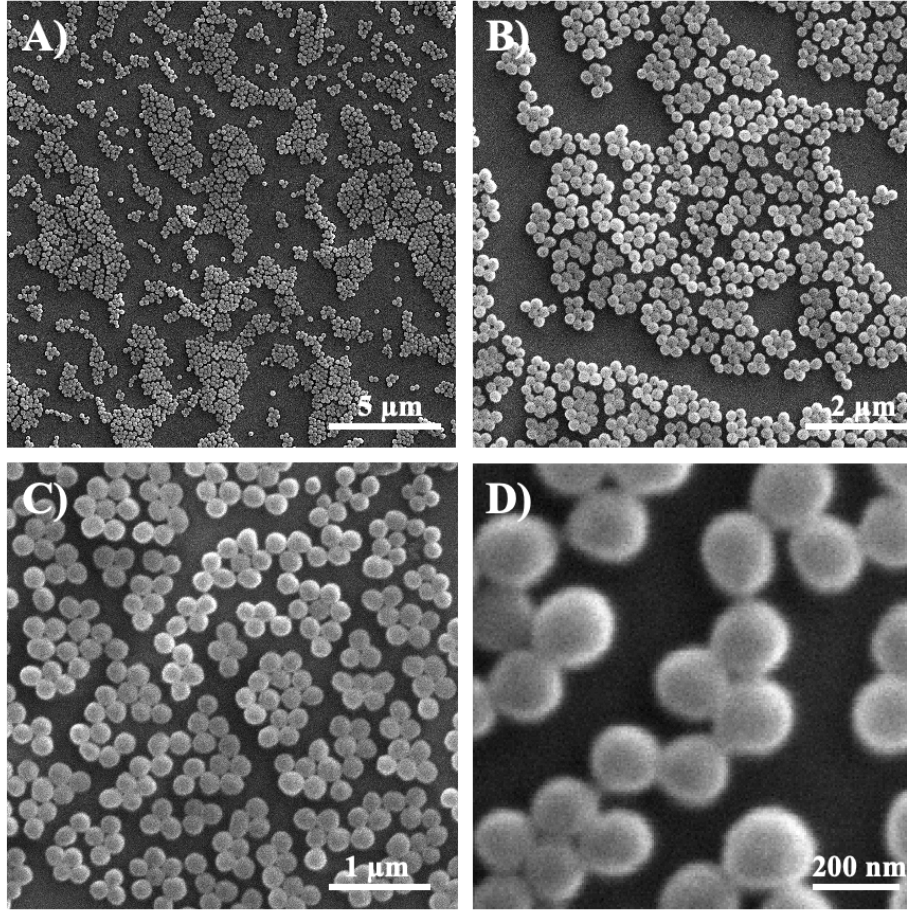
#### 4.1.1. Poli(GDMA-co-MAA) Nanoküre Sentezi ve Karakterizasyonu

180-1000 nm aralığında ortalama boy değerine sahip monodispers formda poli(GDMA-co-MAA) nanoküreler dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Nanokürelerin boyutu toluen/ACN oranı, monomer miktarları ve termal başlatıcı miktarları değiştirilerek belirlenmiştir. Sürekli ortamda azalan polarite yani artan toluen derişimi ile partikül boyutunda belirgin bir artış gözlenmiştir [113]. Farklı boyutlarda sentezlenen çıkış latekslerinin sentez koşulları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı boyutlarda sentezlenen poli (GDMA-co-MAA) mikro/nanokürelerin sentez koşulları

Malzeme Miktarları	Poli (GDMA-co-MAA) Mikro/Nanokürelerin Boyutu					
	1 µm	500 nm	400-500 nm	350 nm	300-350 nm	200-180 nm
Toluen (mL)	48,7	42,3	48,7	97,4	45,5	42,3
ACN (mL)	16,3	22,7	16,3	32,6	19,5	22,7
GDMA (mL)	1,50	0,65	0,64	1,00	0,64	0,64
MAA (mL)	0,40	1,50	0,15	0,27	0,15	0,15
AIBN (g)	0,16	0,16	0,16	0,08	0,09	0,09

Tez kapsamında seçilen 180-200 nm boyutlarındaki latekslerin SEM görüntüleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Sinerjistik terapi ajanı sentezinde kalıp materyal olarak kullanılmak üzere sentezlenen poli(GDMA-co-MAA) nanokürelerin SEM görüntüleri.

Büyütme: (A) X10000, (B) X25000, (C) X50000, (D) X200000.

Şekil 4.1’deki SEM görüntülerine dayalı boyut dağılımı için ortalama partikül boyutu ( $D_p$ ) ve değişim katsayısı ( $C_v$ ) ImageJ yazılımı üzerinden hesaplanmıştır. poli(GDMA-co-MAA) nanokürelerin 180-200 nm boyut aralığında,  $C_v$ 'leri %5'ten düşük, monodispers formda ve nano boyutta partiküller şeklinde sentezlendiği gösterilmiştir.

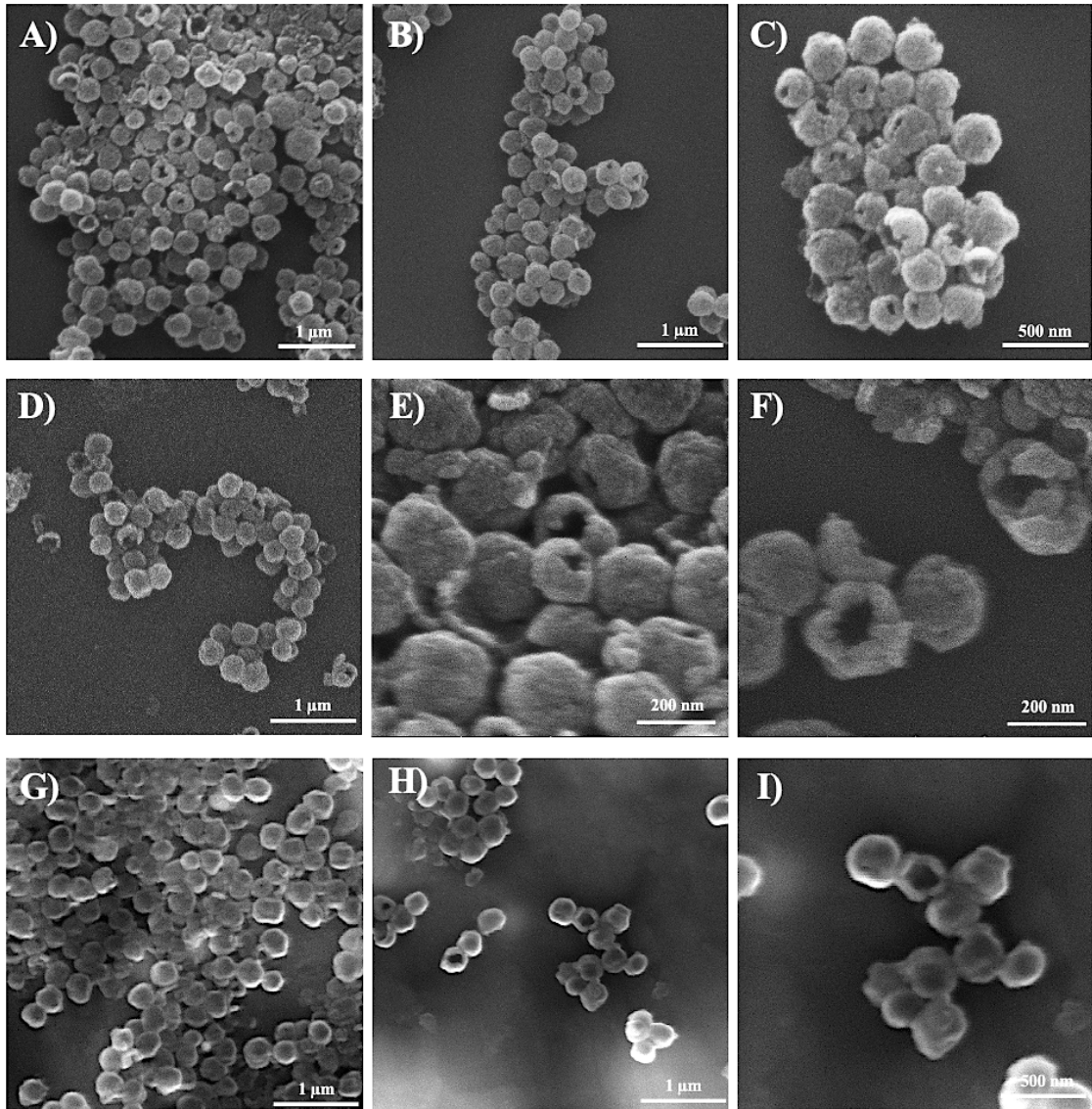
Sinerjistik terapi ajanı olarak en küçük çıkış nanopartikülünün seçilme sebebi boyutları nedeniyle hücreler içine taşınımının daha kolay olmasıdır. Nanopartiküllerin yüzey hacim oranları boyutlarıyla değişir. Boyut küçüldükçe yüzey alanı artar. Böylece hedef dokuyla etkileşimlerinin artması hedeflenmiştir.



#### 4.1.2. H-SiO<sub>2</sub> Sentezi ve Karakterizasyonu

H-SiO<sub>2</sub>'lerin yüzey morfolojisi ve boyutu SEM görüntüleri üzerinden değerlendirilmiştir. Silikaların boyutları çıkış lateksine göre ayarlanmıştır. Yüksek boş hacme sahip olması için silika nanoküreler içi boş formda sentezlenmiştir.

H-SiO<sub>2</sub>, H-SiO<sub>2</sub>@PDA ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin SEM görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



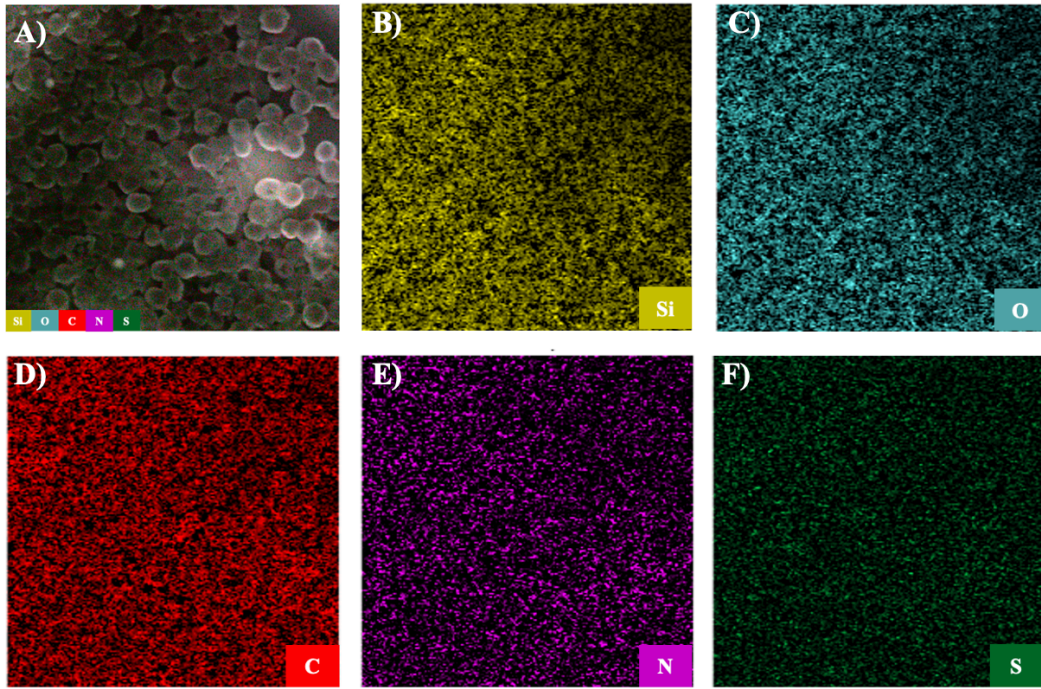
Şekil 4.2. H-SiO<sub>2</sub>, H-SiO<sub>2</sub>@PDA ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanokürelerinin SEM görüntüleri.

Büyütme: (A) X50000, (B) X50000, (C) X100000, (D) X50000, (E) X200000, (F) X200000, (G) X50000, (H) X50000, (I) X100000

Şekil 4.2 (A), (B), (C)'de görüldüğü üzere, H-SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri oldukça dar boyut dağılımı (C<sub>v</sub> %4,7) ile sentezlenmiştir. H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin ortalama boyutu 220 nm olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.2 (D), (E), (F) ve Şekil 4.2 (G), (H), (I)'da sırasıyla H-SiO<sub>2</sub>@PDA ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri gösterilmektedir. Her iki sentezde de H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin hem ortalama boyutunun hem de homojenliğinin değişmesi beklenmemekte olup ortalama boyuttaki hafif artış silikaların üzerine kaplanan PDA kabuğundan kaynaklanmaktadır. H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin içi boş formu açıkça görülmektedir.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin EDX görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir.



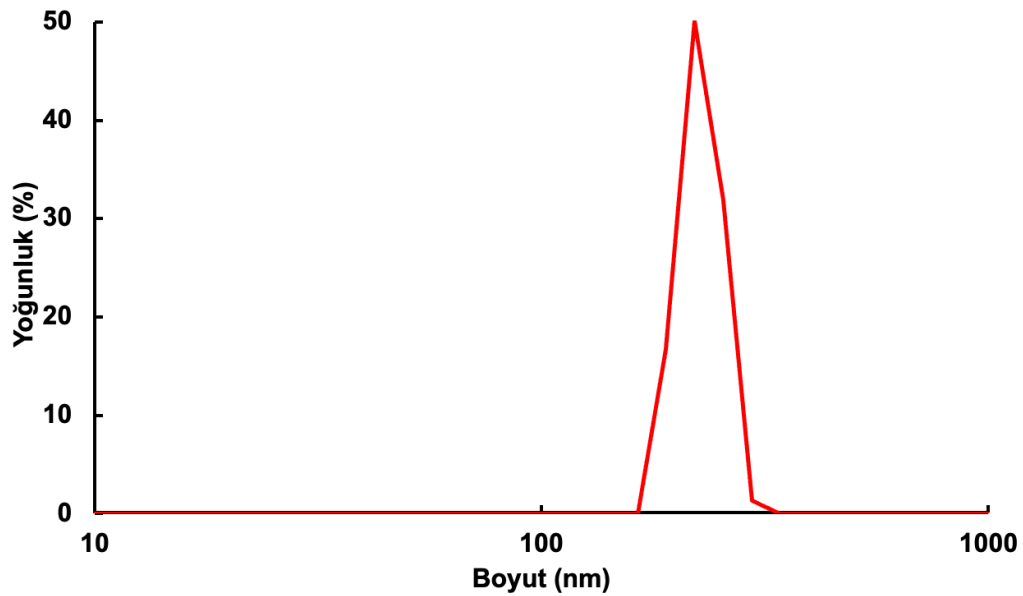
Şekil 4.3. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin EDX görüntüleri  
A) Taranan bölgenin ham görüntüsü, B) Si, C) O, D) C, E) N, F) S elementel dağılımı

EDX analizi, beklendiği gibi H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinde Şekil 4.3 (B), (C), (D)'de Si, O ve C atomlarının varlığını doğrulamaktadır ve görüntüler nanopartiküllerin homojen dağılımını göstermektedir. Ayrıca, EDX görüntülerinde sırasıyla PDA kabuğundan ve ona bağlı GOx enziminden kaynaklanan N ve S atomları gözlenmektedir (Şekil 4.3 (E),

(F)). Sülfür, GOx enzimindeki bazı amino asitlerden kaynaklanmaktadır. Polidopaminde ise azot içeren bir amin grubu (-NH<sub>2</sub>) vardır. Ek olarak, gözlenen C sinyali, kalsinasyon sırasında polimetakrilat kalıbının ayrışmasından kaynaklanan artık karbondan gelmektedir.

#### 4.2. Nanopartiküllerde DLS Analizi

Dinamik Işık Saçılımı (DLS) grafiği ile sinerjistik terapi ajanı olarak kullanılacak H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin boyut dağılım verileri saptanmıştır.



Şekil 4.4. H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerine ait yoğunluğa göre boyut dağılım grafiği.

Şekil 4.4'te H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin boyutu logaritmik bir ölçekte nanometre cinsinden gösterilmiştir. Yaklaşık 219,2 nm'lik en yüksek tepe, çoğu partikülün bu boyuta yakın olduğunu göstermektedir. Birden fazla pik bulunmadığı için çeşitli partikül boyutlarına sahip (polidispers) bir partikül olmadığı grafikten açıkça görülmektedir.

DLS analiz sonuçlarına göre polidispersite indeksi (PDI) 0,535 çıkmıştır. PDI, belirli bir numunedeki moleküler kütle dağılımının bir ölçüsüdür. Bu indeks 0 ile 1 arasında değişir; 0 değeri monodispersiteyi (tüm partiküller aynı boyuttadır), 1'e yakın değerler ise polidispersiteyi (partiküller geniş bir boyut aralığında) gösterir. 0,535'lik bir PDI ile partikül nispeten geniş bir partikül boyutu dağılımına sahiptir. Bu durum grafikten de görüldüğü üzere geniş bir pik ile sonuçlanmıştır.

### 4.3. Nanopartiküllerde BET Analizi

H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için özgül yüzey alanı, gözenek hacmi ve çapı belirlenmiştir.

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere, H-SiO<sub>2</sub> için yapılan BET sonuçlarına göre özgül yüzey alanı 434 m<sup>2</sup>/g, gözenek hacmi 1,23 cm<sup>3</sup>/g, ortalama gözenek çapı 26,9 nm olarak ölçülmüştür. SEM görüntülerine dayanarak hesaplanan ortalama partikül boyutu (220 nm) ve varyasyon katsayısı (%4,7) da çizelgeye eklenmiştir.

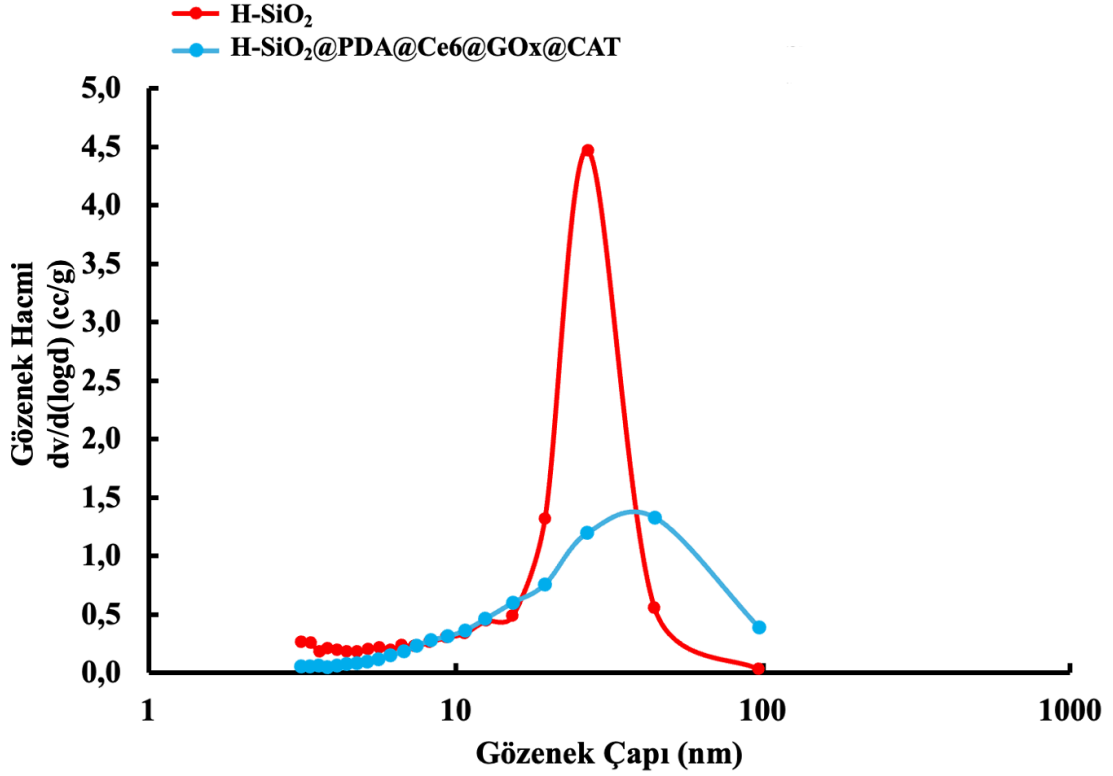
Ortalama gözenek çapı (26,9 nm), nanopartiküller içindeki gözeneklerin mezogözenekli olduğunu göstermektedir. Özgül yüzey alanı (434 m<sup>2</sup>/g), nanopartiküllerin etkileşimler için yüksek yüzey alanına sahip olduğunu göstermektedir. Düşük varyasyon katsayısı nanopartiküllerin monodispers (eş boyut dağılımlı) olduğunu göstermektedir.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT için çekilen SEM görüntülerine göre ortalama partikül boyutu 240 nm ve varyasyon katsayısı %4,9 olarak hesaplanmıştır. Ortalama boyuttaki bu küçük artış, H-SiO<sub>2</sub> üzerinde bir PDA kabuğunun oluşmasından kaynaklanmaktadır.

BET sonucuna göre, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin özgül yüzey alanı 238 m<sup>2</sup>/g, gözenek hacmi 0,96 cm<sup>3</sup>/g ve ortalama gözenek çapı 26,8 nm olarak ölçülmüştür. Yalın haldeki H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerine göre özgül yüzey alanı ve gözenek hacmi düşmüştür. H-SiO<sub>2</sub> üzerine immobilize edilen enzimler ve PDA kaplama gözenekleri doldurarak gözenek boyutunda değişikliklere yol açmıştır. Ortalama gözenek çapında önemli bir değişiklik olmamıştır.

Çizelge 4.2. H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri

Nanopartikül Türü	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Özgül Yüzey Alanı (m <sup>2</sup> /g)	Gözenek Hacmi (cm <sup>3</sup> /g)	Ortalama Gözenek Çapı (nm)	%C <sub>v</sub>
H-SiO <sub>2</sub>	220	434	1,23	26,9	4,7
H-SiO <sub>2</sub> @PDA@Ce6@GOx@CAT	240	238	0,96	26,8	4,9

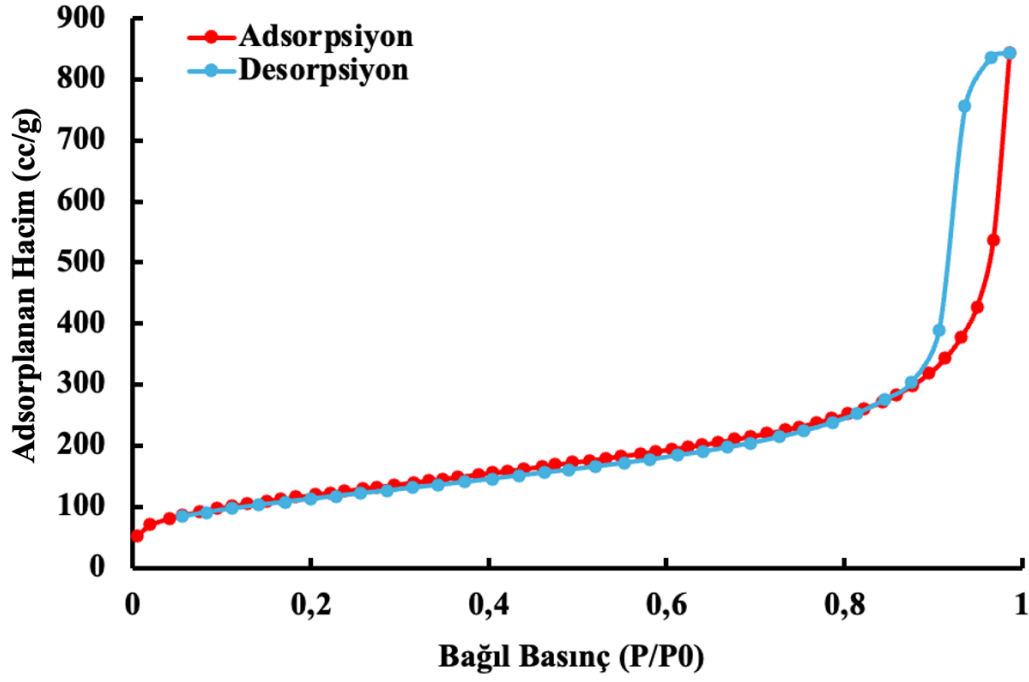


Şekil 4.5. H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerine ait gözenek boyutu dağılım eğrisi.

Şekil 4.5'te kırmızı eğri H-SiO<sub>2</sub>'nin gözenek boyutu dağılımını, mavi eğri ise H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerini göstermektedir. X eksenini logaritmik ölçekte gözenek çapını temsil etmektedir. Eksen, mikro gözenekleri (2 nm'den küçük), mezogözenekleri (2-50 nm) ve makrogözenekleri (50 nm'den büyük) kapsayan 1 nm ile 1000 nm arasında değişmektedir. Y eksenini, malzemenin gramı başına düşen gözenek hacmini temsil etmektedir. H-SiO<sub>2</sub> için 26,9 nm etrafında belirgin bir tepe noktası görülmektedir. Bu da malzemenin mezogözenekli yapısını doğrulamaktadır.

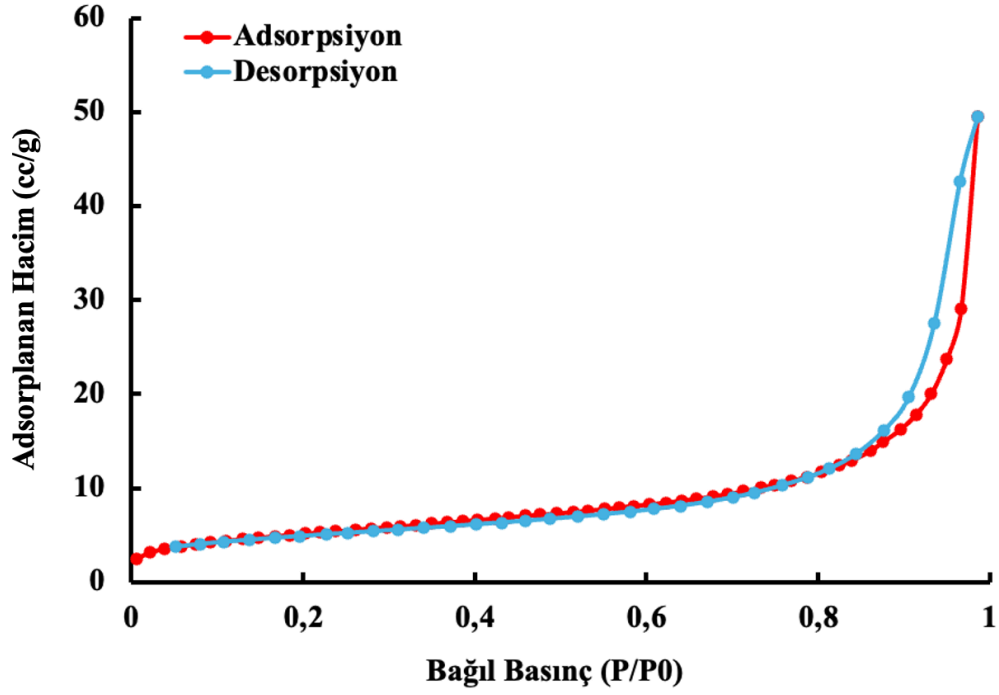
Keskin pik, gözenek boyutunda dar bir dağılıma işaret eder, yani gözeneklerin çoğu boyut olarak oldukça homojendir.

Mavi eğriye bakıldığında gözenek çapında yaklaşık 10 nm ile 100 nm arasında değişen daha geniş bir tepe noktası görülmektedir. H-SiO<sub>2</sub>'ye kıyasla nihai partikülün daha geniş bir gözenek boyutu dağılımına sahip olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.6. H-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerine ait N<sub>2</sub> adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi.

Şekil 4.6'da verilen adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi, Tip IV izotermin karakteristiği olan daha yüksek bağıl basınçlarda (P/P<sub>0</sub>) belirgin bir histerezis döngüsü göstermektedir. Tip IV izoterm mezogözeneklerin varlığını göstermekte olup önceki verileri doğrulamaktadır.

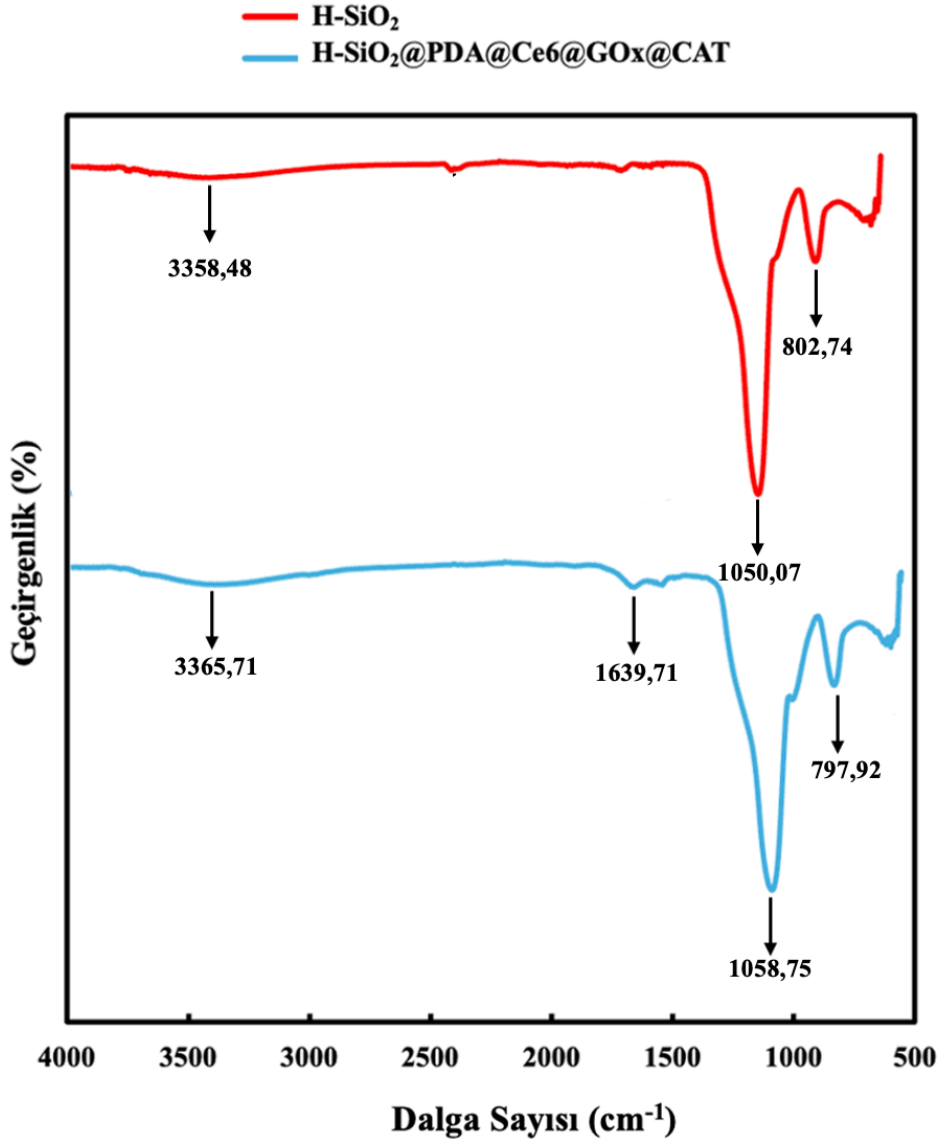


Şekil 4.7. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerine ait N<sub>2</sub> adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi

Şekil 4.7, Şekil 4.6 ile kıyaslanarak H-SiO<sub>2</sub> ile H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT'ın adsorpsiyon-desorpsiyon eğrileri incelenmiştir. Şekil 4.6'ya benzer şekilde, eğriler 0,4'lük bir bağıl basınçtan sonra yükselmeye başlamış ve bağıl basıncın 1 olmasına yakın dik bir artış olmuştur. Şekil 4.7'de daha az belirgin bir histerezis döngüsü vardır, bu da Şekil 4.6'ya kıyasla daha düşük bir gözenek hacmine işaret etmektedir. Her iki grafik de mezogözenekli malzemelerin göstergesi olan Tip IV izotermi göstermektedir.

#### 4.4. Nanopartiküllerde FTIR Analizi

IR spektrumunu oluşturmak için farklı frekanslarda kızılötesi ışık iki farklı partikülden geçirilerek her frekanstaki ışığın yüzde geçirgenliği ölçülmüştür.



Şekil 4.8. H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerine ait FTIR-ATR spektrumları

Şekil 4.8’de biri kırmızı diğeri mavi olmak üzere, her biri etiketli piklere sahip iki farklı spektrum gösterilmektedir. X eksenini, dalga boyu ile ters orantılı olan ve belirli bağ titreşimlerinin göstergesi olan dalga sayısını (cm<sup>-1</sup>) temsil ederken y eksenini, numuneden ne kadar ışık geçtiğini gösteren geçirgenliği (%) temsil etmektedir.



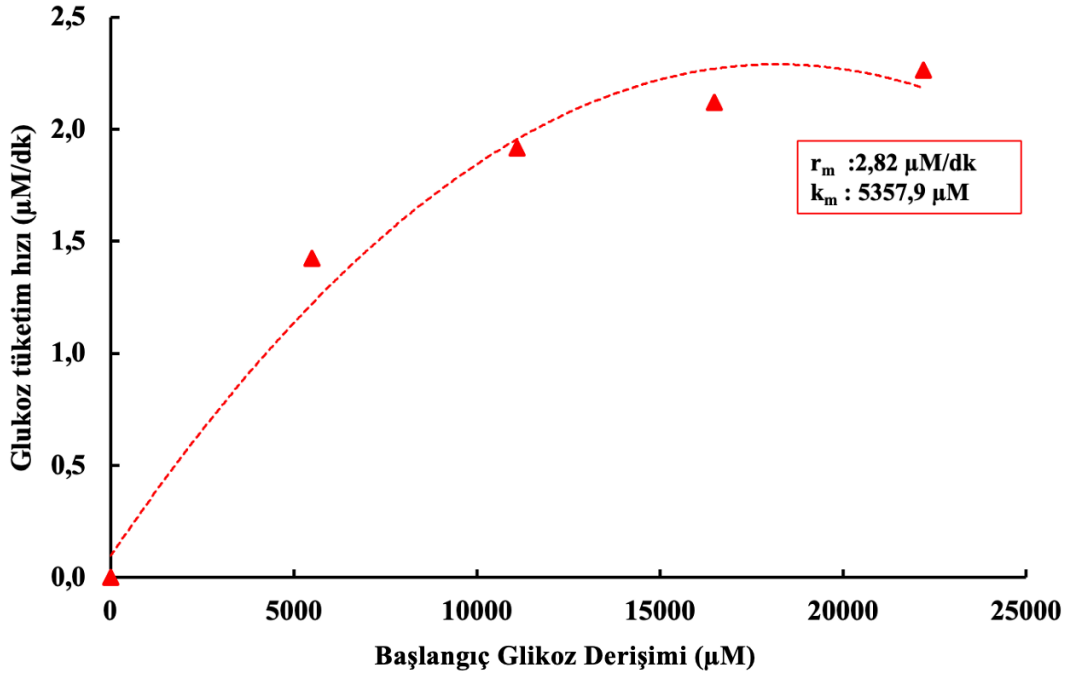
Her iki spektrumda da hidroksil gruplarının varlığına işaret eden  $3365,71 \text{ cm}^{-1}$  ve  $3358,48 \text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bandı O–H gerilme titreşimleriyle ilişkilidir. Silika yüzeyleri doğal olarak silika nanopartiküllerinin sentezi sırasında oluşan silanol gruplarına (Si–OH) sahiptir [114].  $1639,71 \text{ cm}^{-1}$  piki tipik olarak C=O gerilmesine karşılık gelir. PDA, polimerizasyon ve oksidasyon işlemleri sırasında oluşan kinon benzeri yapılarda olduğu gibi yapısının bir parçası olarak karbonil grupları (C=O) içerir. Hem GOx hem de CAT, peptit yapılarında ve belirli yan zincirlerinde C=O bağları içerir [115]. FTIR spektrumundaki Si–O gerilme titreşimi  $1000$  ila  $1100 \text{ cm}^{-1}$  aralığında görünür.  $1050,07 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1058,75 \text{ cm}^{-1}$ 'deki güçlü yoğun sinyaller, bu aralığa çok iyi uymaktadır ve asimetrik Si–O–Si gerilmesinin göstergesidir [114, 116]. Si–O'nun simetrik gerilme titreşimine karşılık gelen  $797,92 \text{ cm}^{-1}$  ve  $802,74 \text{ cm}^{-1}$ 'de pikler gözlenmiştir [116].

#### 4.5. Nanopartiküllerde GOx Aktivite Tayini

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx nanopartiküllerinin GOx aktivitesi, nanopartiküllerin değişen derişimlerde glikoz içeren bir sitrat tamponu içinde dağıtılmasıyla değerlendirilmiştir. Nanopartiküle bağlı Ce6, GOx aktivitesinin belirlenmesi için yapılan absorbans ölçümlerinde bir interferansa sebep olduğundan deney, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx partikülü için gerçekleştirilmiştir.

GOx tarafından katalize edilen glikoz oksidasyonu sonucunda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi izlenmiştir. OPDA, GOx tarafından üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi tespit etmek için kromojenik bir substrat olarak kullanılmıştır. Silika nanopartikülünün peroksidaz aktivitesi olmadığından ortama sitokrom-c eklenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> daha sonra sarı-turuncu bir renk üretmek için peroksidaz görevi gören sitokrom-c varlığında OPDA ile reaksiyona girmiştir. Bu renk değişimi GOx tarafından oksitlenen glikozun varlığını ve miktarını göstermektedir. Rengin yoğunluğu ölçülerek glikoz derişiminin kantitatif bir okuması sağlanmıştır. OPDA oksidasyonuna bağlı absorbans değişiklikleri (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı) UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak glikoz tüketim oranları ve Michaelis-Menten model parametreleri hesaplanmıştır.

Çeşitli derişimlerde enzimin substratı ürüne ne kadar verimli bir şekilde dönüştürdüğünü kanıtlayan  $r_{\max}$  ve  $k_m$  kinetik parametreleri bulunmuştur.



Şekil 4.9. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx nanopartiküllerinin GOx aktivitesi için Michaelis-Menten grafiği. Nanopartikül derişimi: 2 mg/mL. Sıcaklık: 37 °C.

Şekil 4.9’da Michaelis-Menten grafiği, substrat derişimi (glikoz) ile GOx reaksiyon hızı (glikoz tüketim hızı) arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Eğri, enzimin maksimum reaksiyon hızını gösteren bir platoya ulaşmaktadır. Maksimum reaksiyon hızı ( $r_{max}$ ) 2,82 µM/dk olarak bulunmuştur. Michaelis sabiti ( $k_m$ ) 5357,9 µM olarak bulunmuştur.

Veriler, UV ışığın madde tarafından emilimini tanımlayan Beer-Lambert yasası ile bulunmuştur.

$$A = \epsilon \cdot L \cdot C$$

Denklemden, A absorbans değeri,  $\epsilon$  molar absorptivitedir (molar sönüm katsayısı), L küvetin yol uzunluğudur (cm cinsinden), C analitin derişimidir.

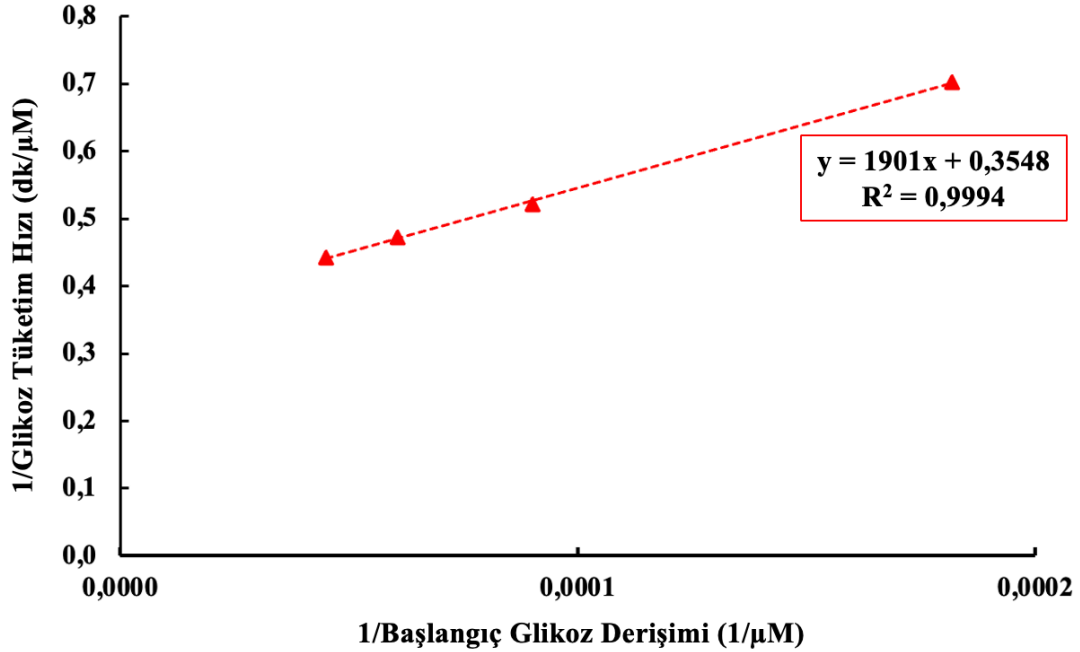
Derişimi (C) çözmek için denklemleri yeniden düzenlersek,

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot L}$$

$$\epsilon = 0,0167 \mu M^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Absorbans (A), H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx tarafından emilen ışık miktarı 446 nm’de pik vermiştir. Molar absorptivite ( $\epsilon$ ) analitin belirli bir dalga boyundaki ışığı ne kadar güçlü absorpladığını gösteren sabit OPDA için 0,0167 µM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>’dir [117]. Yol uzunluğu (L)

ışığının H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx boyunca kat ettiği mesafe 1 cm olarak alınmıştır. Beer-Lambert yasası bağlamında OPDA, derişimi ölçülen analittir ve doğrudan reaksiyon hızıyla ilişkilendirilmiştir. Michaelis-Menten grafiği her derişim için 5.dk'da 446 nm'de alınan absorbands değerlerine göre çizilmiştir.



Şekil 4.10. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx nanopartiküllerinin GOx aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği. Nanopartikül derişimi: 2 mg/mL. Sıcaklık: 37 °C.

Şekil 4.10'da verilen Lineweaver-Burk grafiği ile reaksiyon hızının tersi ( $1/r_{max}$ ) substrat derişiminin tersine ( $1/[C]$ ) karşı çizilmiştir.

$$\frac{1}{r_{max}} = 1901 \cdot \frac{1}{[C]} + 0,3548$$

Yüksek R<sup>2</sup> değeri (0,9994) doğrusal regresyon için iyi bir uyum olduğunu göstermekte ve doğru deneysel verilere işaret etmektedir. Lineweaver-Burk grafiği, Michaelis-Menten grafiğinden elde edilen verilerle tutarlıdır.

Y kesişiminden;

$$r_{max} \approx \frac{1}{0,3548} \approx 2,82 \mu M / dk$$

Eğimden,

$$K_m \approx 1901 \cdot r_{\max} \approx 1901 \cdot 2,82 \approx 5357,9 \mu M.$$

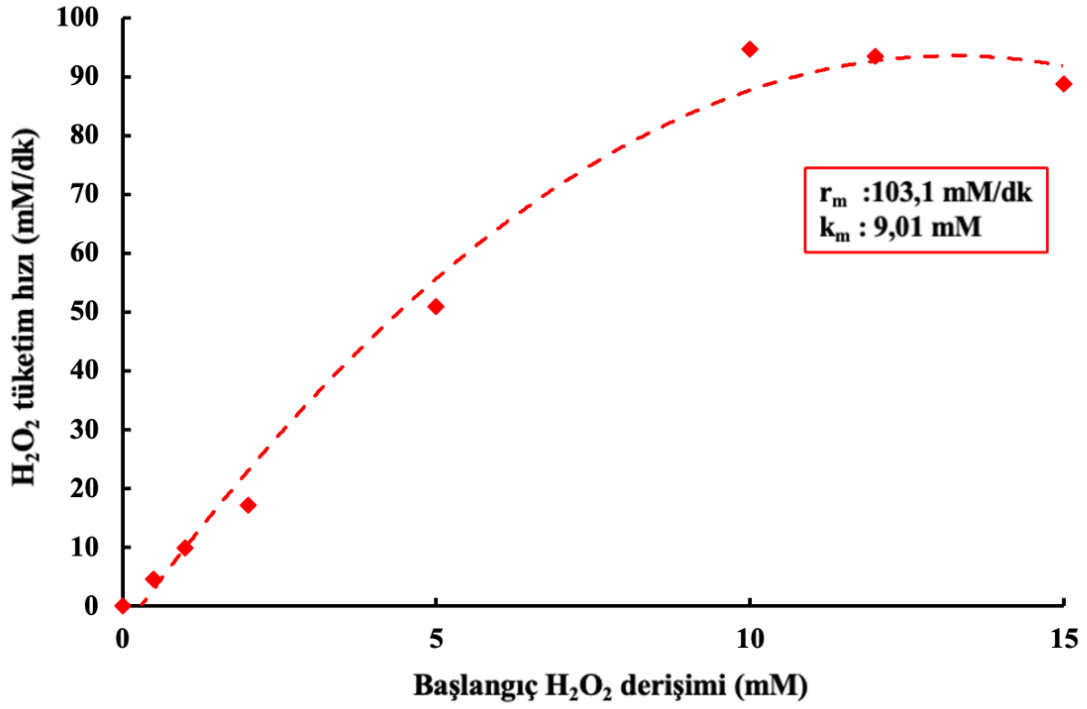
Maksimum reaksiyon hızı ( $r_{\max}$ ) yaklaşık  $2,82 \mu M/dk$ , Michaelis sabiti ( $k_m$ ) ise yaklaşık  $5357,9 \mu M$  olarak bulunmuştur. Bu parametreler, enzimin substrat için verimliliğini ve afinitesini göstermektedir.

#### 4.6. Nanopartiküllerde Katalaz Aktivitesi

Katalaz aktivitesi, PDT'de yaygın bir zorluk olan tümör mikro çevresindeki hipoksiyi hafifletmek için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, katalaz immobilize edilmiş içi boş silika nanopartiküllerinin yapay katalaz aktivitesi değerlendirilmiştir.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin yapay katalaz aktivitesinin değerlendirilmesi için kolorimetrik bir yöntem kullanılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin bozunması UV spektrofotometresi ile izlenmiştir. CAT tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksijene dönüştüğünden, kısa bir süre içinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorbansında önemli bir düşüş olduğu gözlemlenmiş ve nanopartikülün yapay katalaz aktivitesi kanıtlanmıştır.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT için başlangıç H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketim hızı, reaksiyon süresinin ilk 1 dakikası için derişiminin zamanla değişimine dayanarak hesaplanmıştır. Şekil 4.11 ve 4.12'de Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafikleri çizilmiştir.

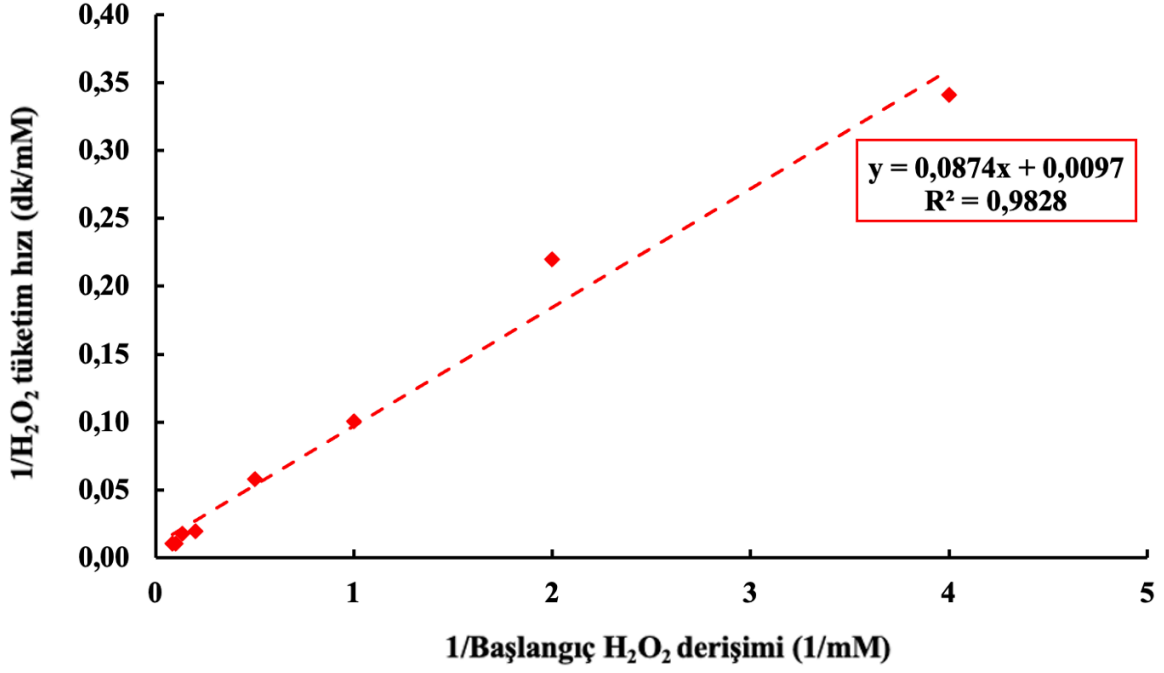


Şekil 4.11. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin CAT aktivitesi için Michaelis-Menten grafiği. Nanopartikül derişimi: 2 mg/mL. Sıcaklık: 24 °C.

Şekil 4.11’de, Michaelis-Menten grafiği substrat derişimi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin yapay katalaz aktivitesinin reaksiyon hızı (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketim hızı) arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Absorbans (A), H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT tarafından emilen ışık miktarı 414 nm’de pik vermiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TiCl<sub>4</sub> kompleksinin molar absorptivitesi 0,029 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>’dir [118]. L değeri 1 cm olarak alınmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TiCl<sub>4</sub> kompleksi, derişimi ölçülen analit olup reaksiyon hızıyla ilişkilendirilmiştir. Michaelis-Menten grafiği 1.dk’da 414 nm’de alınan absorbans değerine göre çizilmiştir.

Lineweaver-Burk grafiğinde Michaelis-Menten grafiğini doğrulayan verilere ulaşılmıştır.



Şekil 4.12. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin CAT aktivitesi için Lineweaver Burk grafiği. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT derişimi: 2 mg/mL. Sıcaklık: 24 °C.

Doğrudan elde edilen denkleme göre,

$$\frac{1}{r_{\max}} = 0,0874 \cdot \frac{1}{[C]} + 0,0097$$

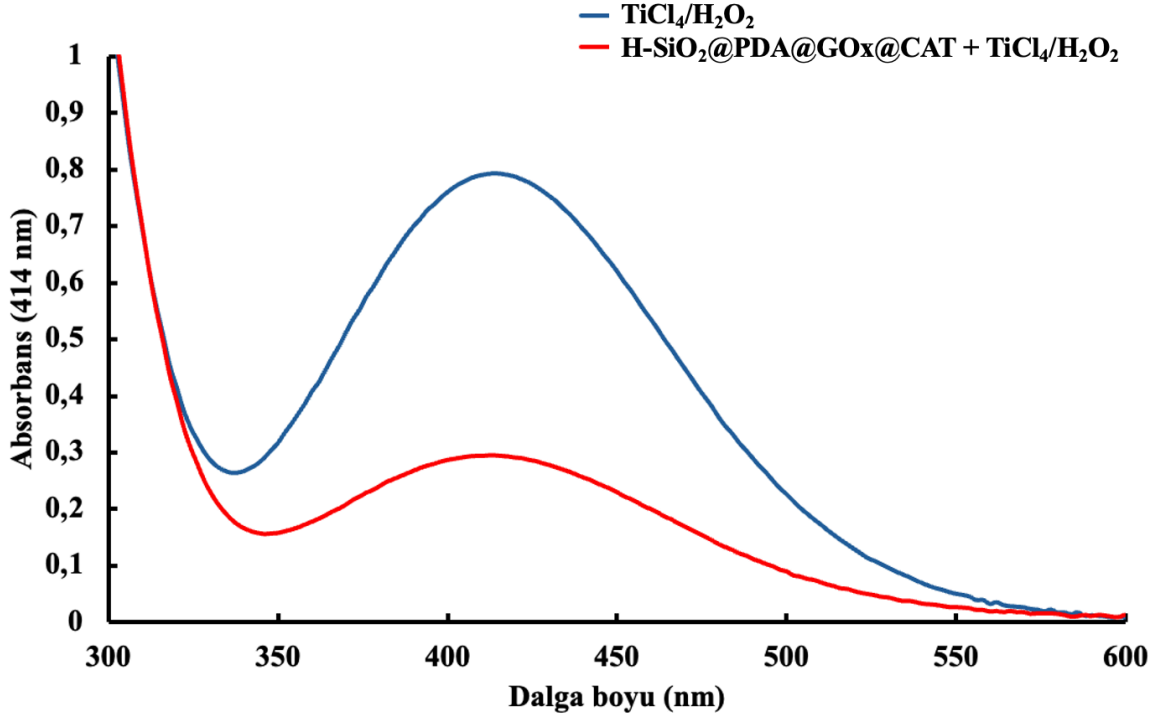
1/ r<sub>max</sub> değeri y-kesişimine (0,0097) karşılık gelirken eğim (0,0874) k<sub>m</sub>/r<sub>max</sub> değerine karşılık gelmektedir.

$$r_{\max} \approx \frac{1}{0,0097} \approx 103,1 \text{ mM/dk.}$$

$$K_m \approx 0,0874 \cdot r_{\max} \approx 0,0874 \cdot 103,1 \approx 9,01 \text{ mM.}$$

Maksimum reaksiyon hızı r<sub>max</sub> 103,1 mM/dk olarak, Michaelis sabiti (k<sub>m</sub>) 9,01 mM olarak bulunmuştur.

Düşük k<sub>m</sub> değeri, nanopartiküllerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için yüksek bir afiniteye sahip olduğunu gösterirken yüksek r<sub>max</sub> değeri, yapay katalaz aktivitesini yansıtan yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ayrışma hızını göstermektedir. Bu da H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerini, tümör mikro çevresindeki hipoksinin hafifletilmesi için etkili kılmaktadır.



Şekil 4.13. 2 mM derişim için  $\text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{H-SiO}_2@\text{PDA}@\text{GOx}@\text{CAT} + \text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  komplekslerinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu.

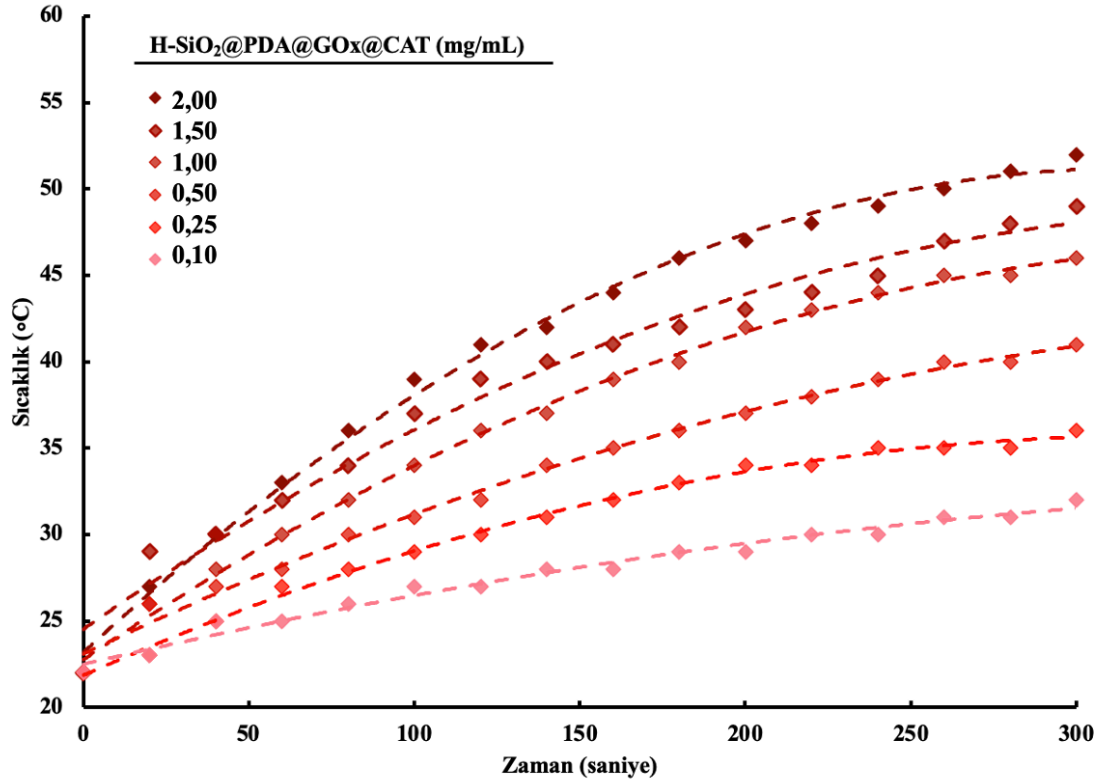
Şekil 4.13'te UV-Vis absorpsiyon spektrumları  $\text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  kompleksi (mavi eğri) ile  $\text{H-SiO}_2@\text{PDA}@\text{GOx}@\text{CAT} + \text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  kompleksi (kırmızı eğri) arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir. Her iki eğride de  $\text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  kompleksinin karakteristiği olan 414 nm civarında bir pik görülmektedir [119]. Partikül etkisi  $\text{H-SiO}_2@\text{PDA}@\text{GOx}@\text{CAT} + \text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  için yine aynı dalga boyunda azalmış bir pik gözlenmiştir. Partikülsüz ortamda  $\text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  kompleksi için absorbands yoğunluğu,  $\text{H-SiO}_2@\text{PDA}@\text{GOx}@\text{CAT} + \text{TiCl}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  için olandan daha yüksektir.

$\text{H-SiO}_2@\text{PDA}@\text{GOx}@\text{CAT}$  varlığında 414 nm'de absorbandsın azalması,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin ayrıştığını ve yapay katalaz aktivitesini göstermektedir. Kırmızı eğrideki düşük absorbands, immobilize enzim kompleksinin ( $\text{H-SiO}_2@\text{PDA}@\text{GOx}@\text{CAT}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin ayrışmasını katalize etmede etkili olduğunu doğrulamaktadır.

#### 4.7. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT Nanopartiküllerinin Fototermal Yanıtı

Tez kapsamında silika bazlı nanopartiküllerin ışık emilimini ve ısı dönüştürme kabiliyetlerini artırmak için PDA kaplaması yapılmıştır. PDA kaplı nanopartiküller NIR bölgede geniş ve güçlü bir emilime sahiptir [120]. PDA kaplama yapılmasının en önemli sebeplerinden biri de son derece biyoyumlu olması ve potansiyel sitotoksisiteyi en aza indirmesidir. Böylece partikülün fototermal özellikleri geliştirilmiştir.

Şekil 4.14'teki grafik, NIR altında nanopartiküllerin sıcaklık yükselme profillerini göstermektedir. Dispersiyonlar 0,1 ile 2,0 mg/mL arasında değişen H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartikül derişimlerinde hazırlanmıştır. Sulu dispersiyonun sıcaklığı her 20 saniyede bir zamana karşı ölçülmüştür.



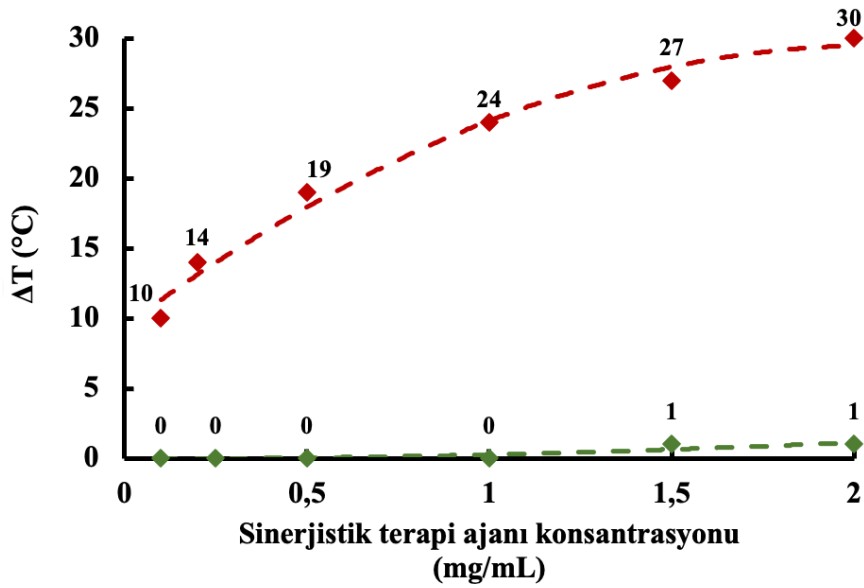
Şekil 4.14. 808 nm lazer altında farklı H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT derişimleri ile elde edilen sıcaklık yükselme eğrileri. Lazer güç yoğunluğu: 1 W/cm<sup>2</sup>

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT dispersiyonlarının sıcaklığı NIR lazer ışınlamasıyla önemli ölçüde artmıştır. Lazer ışınlaması altındaki sıcaklık artışı, bu nanopartiküllerin tümör



hücrelerinde hipertermiyi etkili bir şekilde artırabileceğini ve bunun da kanser hücrelerinin ölümüne yol açabileceğini göstermektedir.

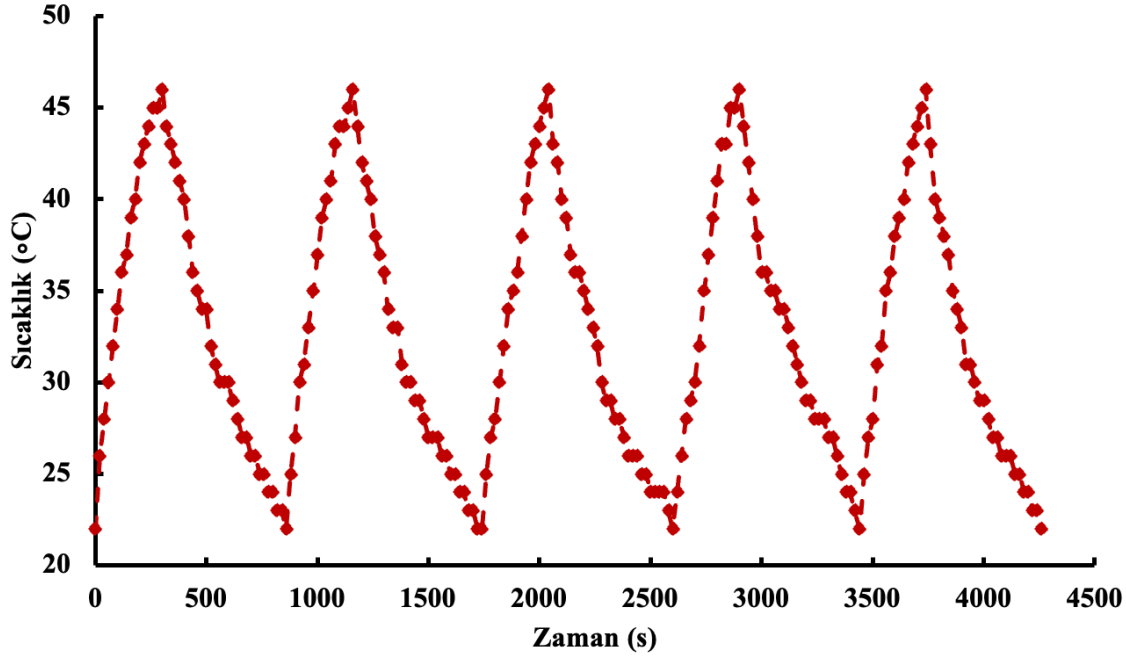
Nanopartikül derişimi 0,1 mg/mL'den 2,0 mg/mL'ye arttıkça elde edilen maksimum sıcaklık da artmaktadır. En yüksek derişimde (2,0 mg/mL) ulaşılan maksimum sıcaklık, tümör hücrelerinde hipertermi için yeterli olan ve hücre ölümüne yol açan 52°C'ye kadar çıkmıştır.



Şekil 4.15. 808 nm lazer altında farklı H-SiO<sub>2</sub> (yeşil eğri) ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT (kırmızı eğri) derişimlerinin sıcaklık artışının değişimi.

Şekil 4.15'teki grafik, H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT derişiminin bir fonksiyonu olarak 5 dakika içindeki sıcaklık artışını göstermektedir.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT, tek başına H-SiO<sub>2</sub> ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir sıcaklık artışı sergileyerek fototermal özellik kazandığına işaret etmektedir.



Şekil 4.16. 808 nm lazer altında 1 mg/mL derişimde H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin 5'li ardışık ısıtma/soğutma eğrileri.

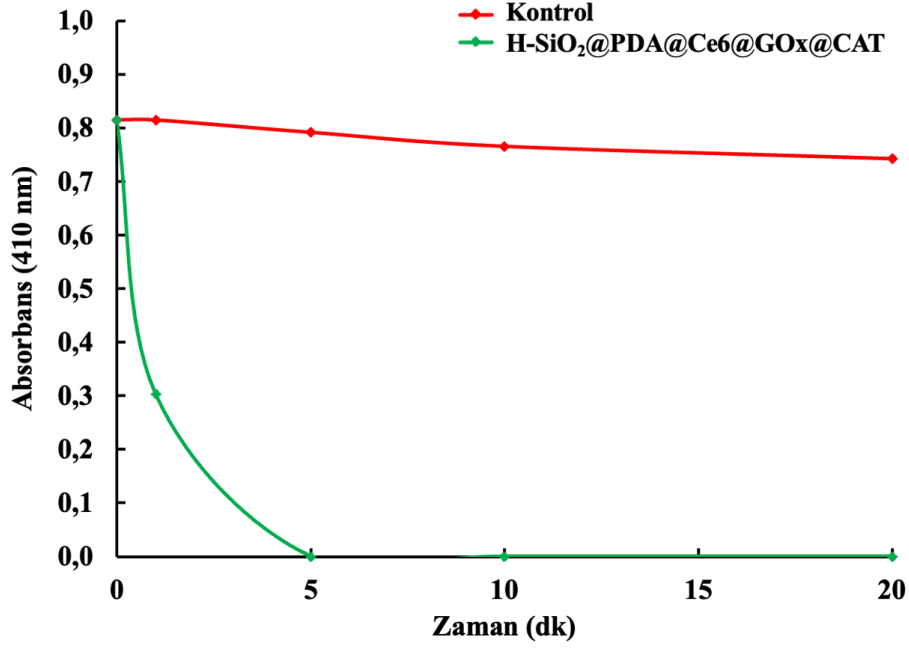
Şekil 4.16'da H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartikülleri çoklu ısıtma/soğutma döngülerinde termal stabilite göstererek tekrarlanan PTT uygulamaları için uygun olduklarını doğrulamıştır. Bu kararlılık, nanopartiküllerin birden fazla PTT seansı için yeniden kullanılabilceğini göstermektedir.

#### 4.8. H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT Nanopartiküllerinin Fotodinamik Yanıtı

Bu çalışmada, polidopamin kaplı içi boş, gözenekli silika bazlı nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş Ce6 kullanılarak fotodinamik, fototermal ve açlık tedavisi işlevlerine sahip bir sinerjistik tedavi ajanı (STA) geliştirilmiştir. Bu sisteme GOx ve CAT eklenmesi, hipoksiyi hafifleterek bir kaskat reaksiyon sistemi aracılığıyla tedavinin etkisini artırmayı amaçlamıştır.

PDT etkisi, O<sub>2</sub> üretmek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi ayrıştırarak hipoksiyi hafifleten ve böylece PDT sırasında ROS üretimini artıran silika bazlı partiküllerin yapay katalaz aktivitesi sayesinde önemli ölçüde artırılmıştır.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin zaman içinde ayrışması, kimyasal prob olan 1,3-difenilzobenzofuran (DPBF) kullanılarak tekli oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) reaktifinin üretimi spektrofotometrik bir protokolle takip edilmiştir.



Şekil 4.17. 650 nm'de LED ışığı altında H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikül varlığında <sup>1</sup>O<sub>2</sub> reaktifinin oluşumu.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT derişimi: 5 mg/mL. LED ışık ışınlama süresi: 20 dk.

Absorpsiyon spektrumları, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT varlığında, 650 nm LED ışığı altında ROS'a duyarlı bir prob olan DPBF'nin fotodegradasyonu ile kanıtlanarak ışık ışınlaması altında ROS üretimi olduğunu göstermiştir.

Kırmızı eğri (kontrol), H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri içermeyen kontrol numunesini temsil etmektedir. Yeşil eğri ise H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri içeren numuneyi temsil etmektedir.

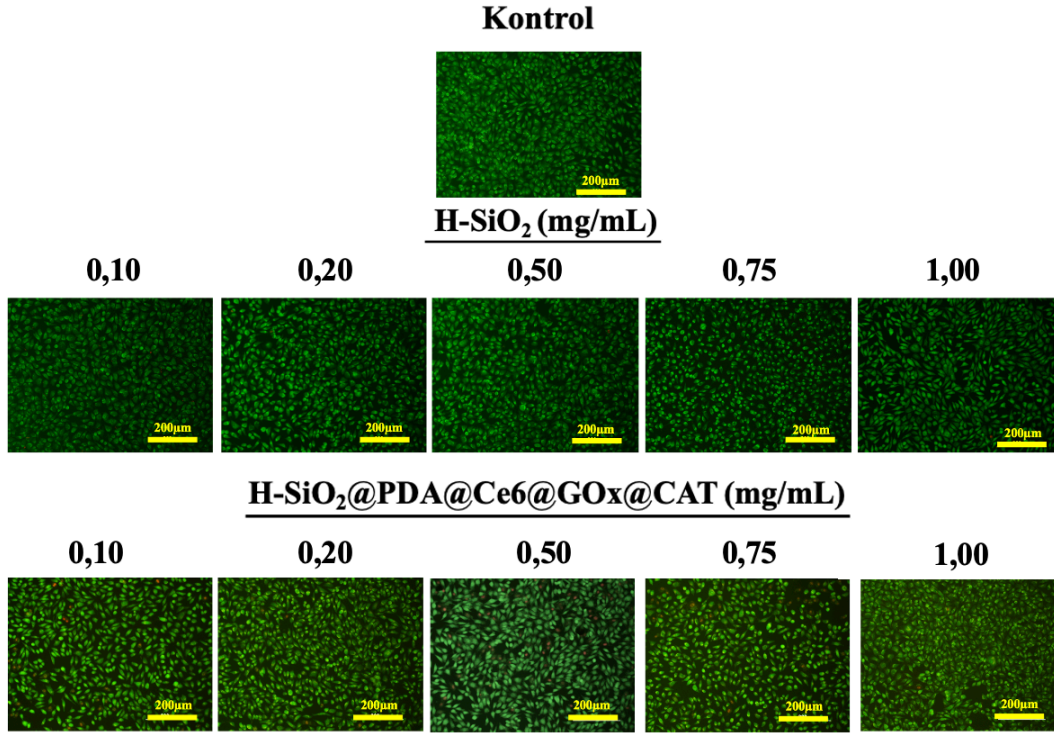
Hem kontrol hem de H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT numunesi 0. dakikada yaklaşık 0,8'lik benzer bir absorbansla başlamıştır.

Kontrol numunesi (partikül olmayan ortam) aynı ışık ışınlama koşulları altında minimum absorbans değişikliği göstererek nanopartiküllerin yokluğunda ihmal edilebilir <sup>1</sup>O<sub>2</sub> üretimine işaret etmektedir. Buna karşılık, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin varlığında, ilk 5 dakika içinde 410 nm'de DPBF absorbansındaki hızlı düşüş DPBF'nin neredeyse tamamının ayrıştığını göstermiş ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri tarafından yüksek oranda <sup>1</sup>O<sub>2</sub> reaktifi üretildiğini kanıtlamıştır.

## 4.9. *In-Vitro* Deneyler

### 4.9.1 Hücre Sitotoksosite Deneyleri

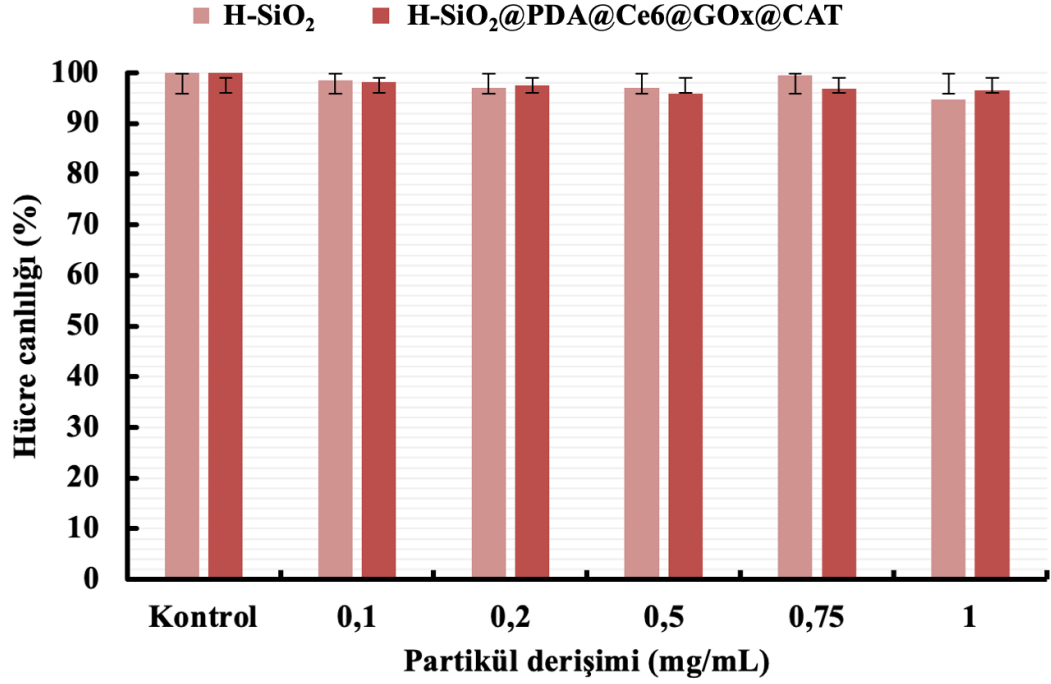
Sitotoksosite testleriyle, ilk (H-SiO<sub>2</sub>) ve son (H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT) partikülün canlı hücreler üzerindeki potansiyel toksik etkileri değerlendirilmiştir. Sinerjistik terapi ajanı olarak kullanılacak partiküllerin biyoyumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.18. Farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için AO/PI ikili hücre boyamasıyla elde edilen canlı/ölu L929 hücre görüntüleri.

L929 hücre yoğunluğu:  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm

Şekil 4.18'de L929 hücre hattında floresan mikroskobu altında canlı ve ölu hücreleri ayırt etmek için AO/PI kullanılarak ikili hücre boyaması yapılmış ve hücre görüntüleri alınmıştır. Görüntüler yüksek canlılık oranını göstermektedir.



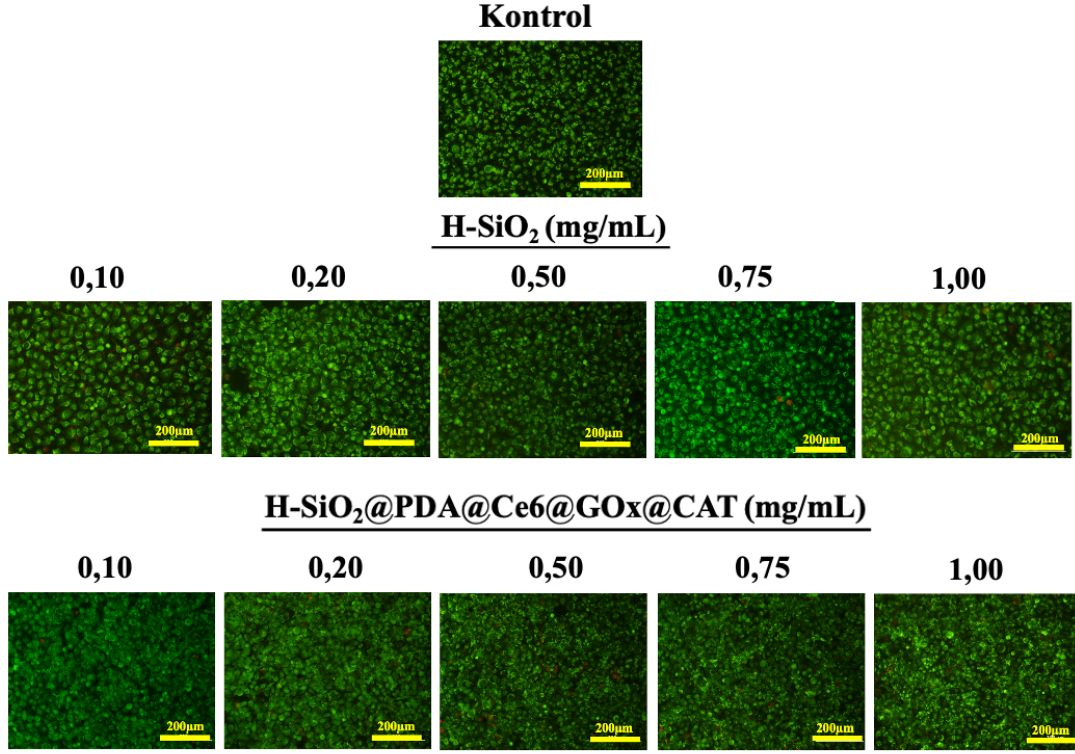
Şekil 4.19. L929 hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için MTT sonuçları.

Şekil 4.19’da nanopartiküllerin sitotoksitesini MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol deneyleri L929 fibroblast hücreleri kullanılarak partiküllere maruz kalmadan ve ışık ışınlanması olmadan gerçekleştirilmiştir.

MTT protokolü izlenerek elde edilen çözeltinin absorbansı mikropilaka spektrofotometresinde 570 nm’de ölçülmüştür [121]. Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre canlılığı yüzdesi (\%)} = \frac{\text{İşlem grubu absorbansı}}{\text{Kontrol grubu absorbansı}} \times 100$$

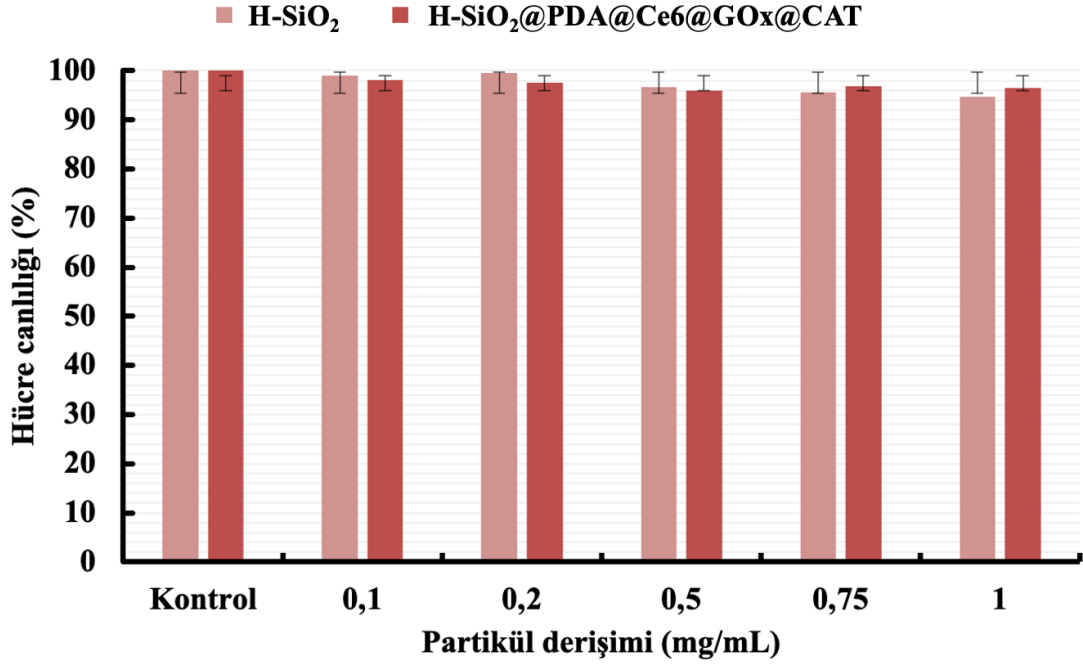
Bu hesaba göre yüksek hücre canlılıkları (>%94) elde edilmiştir. Bu da ışınlanmamış koşullar altında nanopartiküllerin minimal doğal sitotoksitesini göstermektedir.



Şekil 4.20. Farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için AO/PI ikili hücre boyamasıyla elde edilen canlı/ölü T98G glioblastoma hücre görüntüleri.

Hücre yoğunluğu:  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 μm

T98G glioblastoma hücrelerinin ışınlanma olmadığı koşullarda partikül ortamında sitotoksik etkilerinin gözlenmediği Şekil 4.20'deki floresan mikroskop görüntülerinde kanıtlanmıştır.



Şekil 4.21. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için MTT sonuçları.

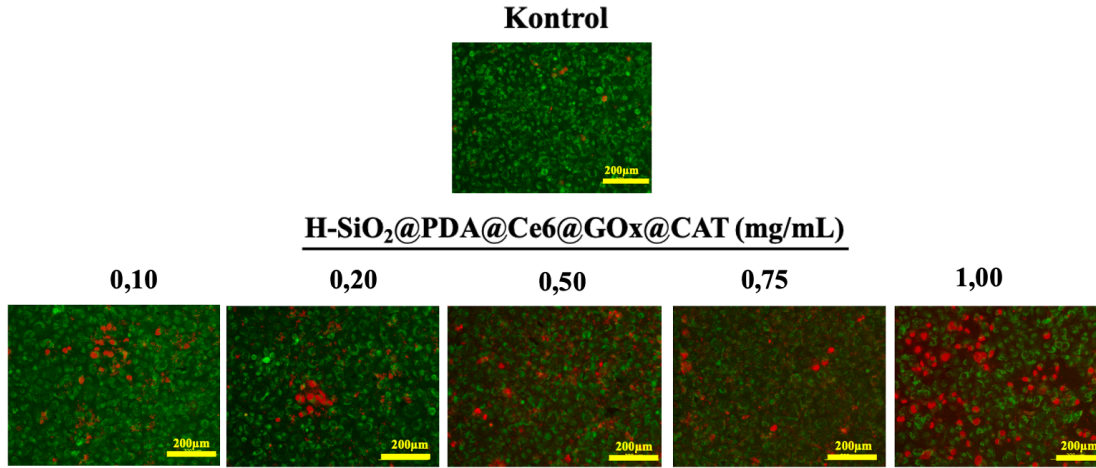
Şekil 4.21'de Sitotoksisite, T98G hücre hattında MTT sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Her iki nanopartikül için de derişim 1 mg/mL'ye kadar artırılrsa bile hücre canlılığı %96'nın üzerinde gözlenmiştir.

Işık kaynağı yokluğunda farklı H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT derişimleriyle elde edilen hücre canlılıkları %98'in üzerinde olmuştur. Sonuç olarak, STA'nın immobilize GOx aracılığıyla glikoz tüketimine dayanan açlık fonksiyonunun bu koşullar altında hücre ölümü için çok etkili olmadığını göstermiştir.

#### 4.9.2 Hücrelerde Fototermal Terapi Etkisi

T98G hücreleri 808 nm'de NIR lazer kullanılarak H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile etkileştirilmiştir.

AO/PI ile boyanan T98G hücrelerinin canlı/ölü hücre görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir.



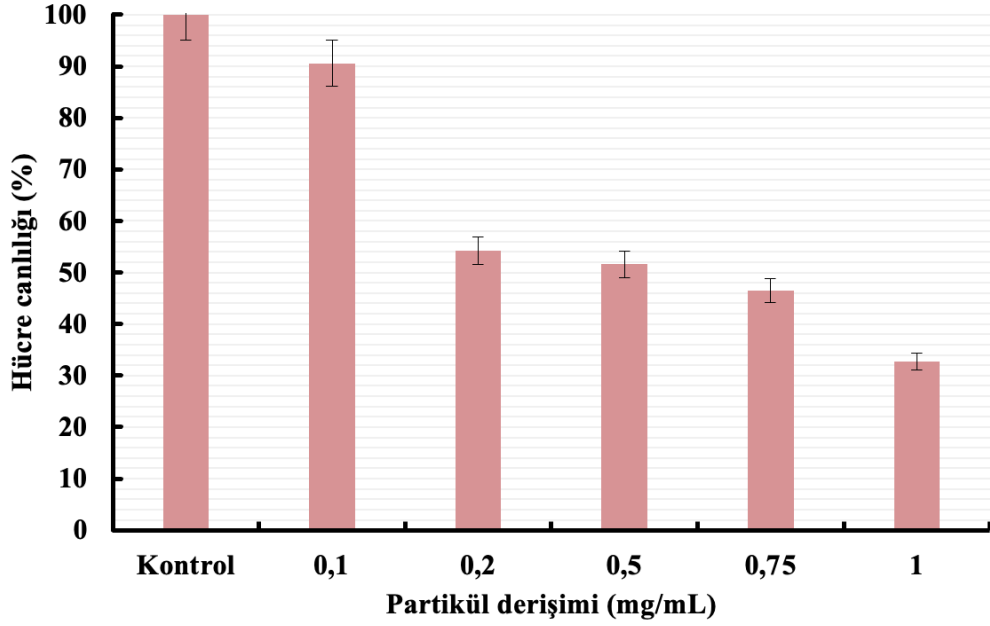
Şekil 4.22. Farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için NIR lazer uygulama sonrası canlı/ölü T98G glioblastoma hücre görüntüleri.

T98G hücre yoğunluğu:  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm. NIR ışınlama süresi: 5 dakika ( $1 \text{ W cm}^{-2}$ )

Şekil 4.22'deki görüntülerde canlı ve ölü hücreler hücre içi yeşil ve kırmızı floresan emisyonları ile gözlemlenmiştir. PTT etkisinin partikül derişimi ile arttığı görülmektedir.

Bu çalışmalarda elde edilen MTT sonuçları Şekil 4.23'te yer almaktadır.





Şekil 4.23. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için NIR lazer sonrası MTT sonuçları.

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile 808 nm'de NIR lazer ışınlanmasıyla gerçekleştirilen çalışmada, nanopartiküllerin fototermal etkisi gözlemlenmiş ve bu etki hücrelerin bulunduğu ortamın sıcaklığını artırarak 5 dakika içinde hücre ölümüne sebep olmuştur.

Kontrol grubu nanopartiküllere maruz bırakılmadan yalnızca NIR lazer uygulanmış olup ihmal edilebilir bir ölüm oranı olduğundan canlılık %100 kabul edilmiştir.

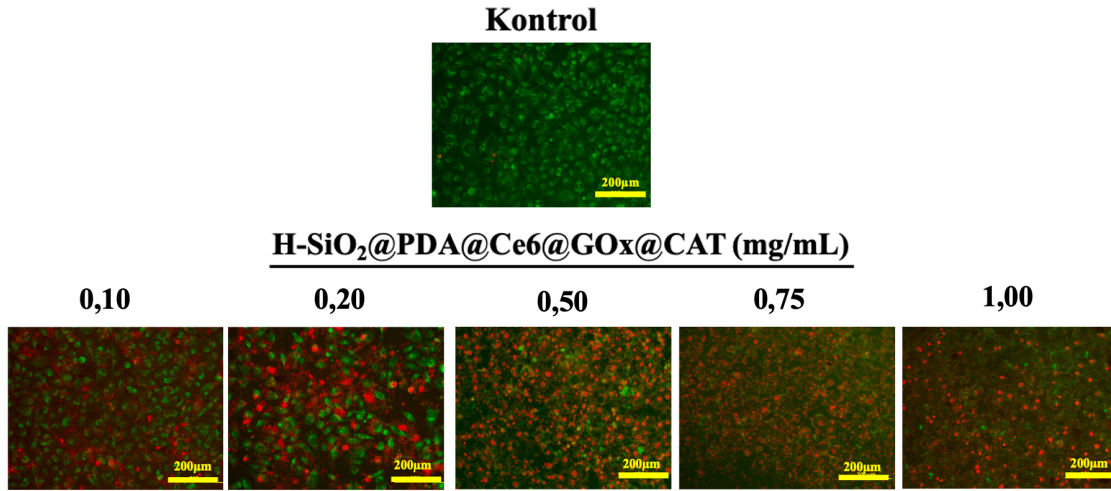
T98G hücreleri, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile 808 nm'de NIR lazere maruz bırakıldığında canlılık sırasıyla azalan derişimlerde %90,59, %54,21, %51,64, %46,54 ve %32,63 olarak bulunmuştur.

Ayrıca, STA'nın fototermal etkisiyle elde edilen yüksek sıcaklıklarda daha yüksek glikoz oksidasyon hızından kaynaklanan açlık fonksiyonunun artması, hücre ölümünün artmasını sağlamıştır.

### 4.9.3 Hücrelerde Fotodinamik Terapi Etkisi

T98G hücreleri 650 nm'de kırmızı LED kullanılarak H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile etkileştirilmiştir.

Etkileşimden sonra AO/PI ile boyanan T98G hücrelerinin canlı/ölü hücre görüntüleri Şekil 4.24'te verilmiştir.

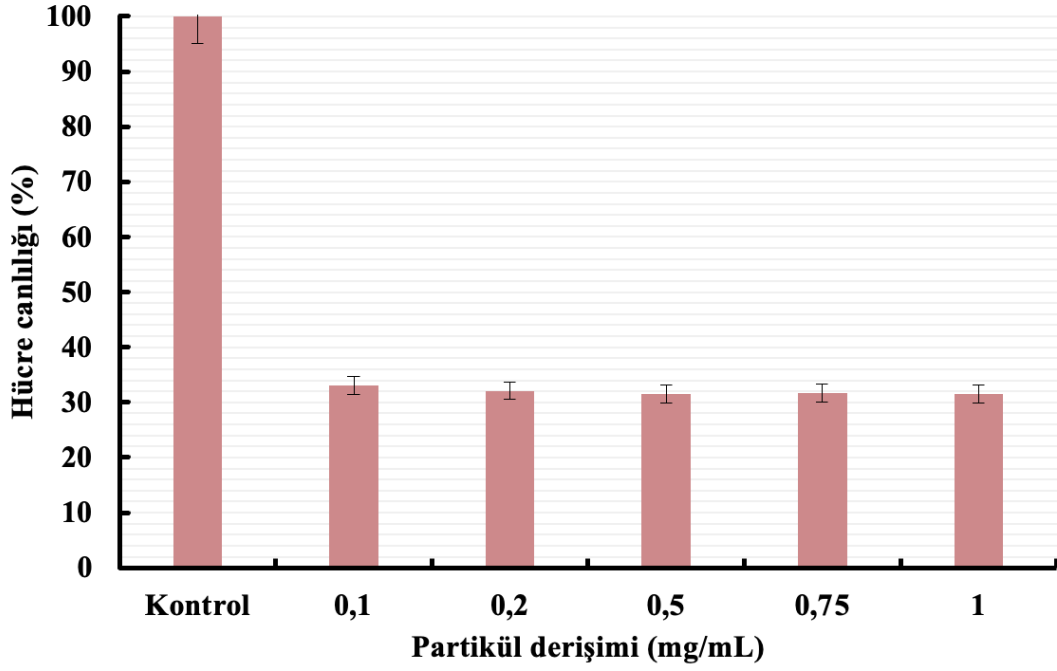


Şekil 4.24. Farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için LED uygulama sonrası canlı/ölü T98G glioblastoma hücre görüntüleri.

T98G hücre yoğunluğu:  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm. LED ışınlama süresi: 7 dakika ( $1 \text{ W cm}^{-2}$ )

H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile 650 nm'de kırmızı LED kullanılarak yapılan çalışmada hücre ölümü, Ce6'nın görünür ışıkla etkileşimi sonucu oluşan <sup>1</sup>O<sub>2</sub>'den kaynaklanmaktadır. Ayrıca, H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri üzerindeki kaskat enzim sistemi tarafından O<sub>2</sub> oluşumu tetiklendiği için hücre ölüm yüzdesi yüksektir.

T98G hücrelerinin farklı derişimlerdeki H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile kırmızı LED kullanılarak etkileştirilmesinden elde edilen MTT sonuçları Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.25. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için LED sonrası MTT sonuçları.

Şekil 4.25, Şekil 4.24 ile karşılaştırıldığında floresan mikroskop görüntülerinin MTT sonuçlarıyla desteklendiği görülmektedir.

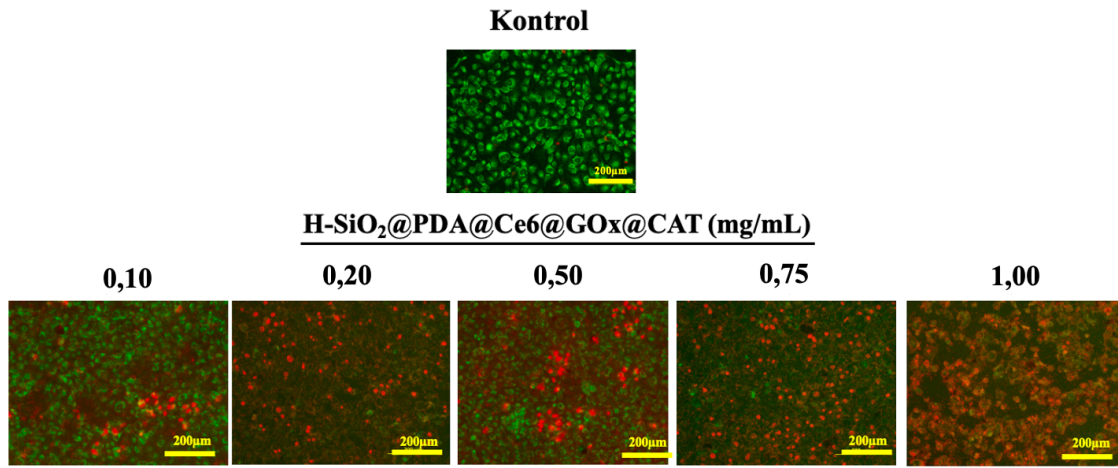
LED ışık uygulanan hücre ortamında H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için her derişimde neredeyse aynı oranda hücre ölümü (%33,08, %32,09, %31,54, %31,69, %31,54) görülmüştür. Derişim, ölüm oranını etkilememiştir.

#### 4.9.4 Hücrelerde Kombine Terapi Etkisi

Fototermal terapi (PTT), fotodinamik terapi (PDT) ve açlık terapisinin (ST) sinerjistik etkileri T98G hücre hattı üzerinde değerlendirilmiştir.

T98G hücreleri hem 808 nm'de NIR lazer hem de 650 nm'de kırmızı LED kullanılarak H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile etkileştirilmiştir.

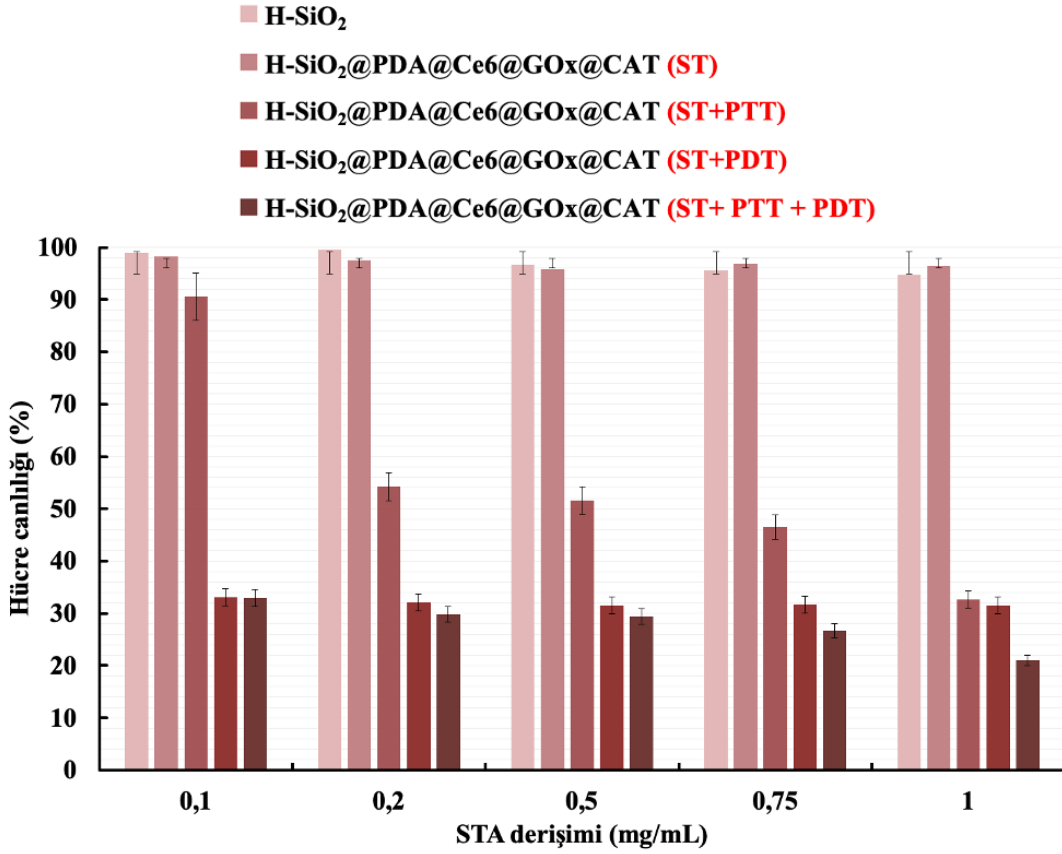
Etkileşim sonrası AO/PI ile boyanan T98G hücrelerinin görüntüleri Şekil 4.26'te verilmiştir.



Şekil 4.26. Farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için art arda NIR lazer ve LED uygulamaları sonrası canlı/ölu T98G glioblastoma hücre görüntüleri. T98G hücre yoğunluğu:  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu. Ölçek çubuğu: 200 µm. NIR lazer ışınlama süresi: 5 dakika, LED ışınlama süresi: 7 dakika ( $1 \text{ W cm}^{-2}$ )

Şekil 4.26'da gösterildiği üzere, NIR lazer (808 nm) ve kırmızı LED (650 nm) ışınlama kombinasyonuna maruz bırakıldığında 0,5-1,0 mg/mL aralığındaki H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT derişimlerde hücre içi kırmızı hücre floresan emisyonları baskın olmuştur. Canlılık önemli ölçüde azalmış ve kombine terapötik yaklaşımın etkisi kanıtlanmıştır.

T98G hücrelerinin H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri ile NIR ve LED kullanılarak etkileştirilmesinden elde edilen MTT sonuçları Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.27. T98G hücre hattında farklı derişimlerde H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartikülleri için NIR + LED sonrası MTT sonuçları.

Kombine ışınlama koşulları altında 1 mg/mL H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT derişiminde hücre canlılığı %21'e düşmüştür.

Şekil 4.27, Şekil 4.26 ile karşılaştırıldığında floresan mikroskop görüntülerinin MTT sonuçlarını desteklediği görülmektedir.

Çalışmada önce NIR lazer ile tümör mikro çevresindeki sıcaklık artırılarak hücrelerin ölmesine sebep olan lokalize ısıtma sağlanmış, daha sonra LED ışık ile Ce6 aktive edilerek hücrelerde oksidatif hasara neden olan ROS türünün oluşması sağlanmıştır. Tedavi, her iki ışık kaynağını da kullanarak termal hasar, oksidatif stres ve apoptoz gibi çeşitli hücre ölümü mekanizmalarını tetikleyerek kanser hücrelerinin direnç gelişmesini zorlaştırmıştır. Bunun yanı sıra, STA'nın kaskat enzim sistemi sayesinde ortamdaki oksijen miktarı artırılarak hipoksi hafifletilmiş ve böylelikle <sup>1</sup>O<sub>2</sub> üretimi artırarak PDT'nin etkisi artırılmıştır.

## 5. YORUM

Tez kapsamında, SiO<sub>2</sub> tabanlı nanotaşıyıcı kullanılarak, fototermal, fotodinamik ve açlık terapisi fonksiyonlarını bir araya getiren, aynı zamanda hipoksik ortama dirençli bir sinerjistik terapi ajanı sentezlenmiştir.

- 180-200 nm aralığında ortalama boy değerine sahip tekil dağılımlı, mezogözenekli, yüksek yüzey alana sahip içi boş silisyum dioksit (H-SiO<sub>2</sub>) nanoküreler, kalıp malzeme olarak poli(GDMA-co-MAA) nanoküreler kullanılarak sentezlenmiştir.
- Fototermal terapiye yönelik olarak, çekirdek-kabuk yöntemiyle H-SiO<sub>2</sub> nanoküreler polidopamin ile kaplanmıştır.
- Fotodinamik terapi özelliği kazandırmak amacıyla ışığa duyarlı molekül (Ce6), nanopartikül üzerinde oluşturulan polidopamin katmanı üzerine immobilize edilmiş ve nanopartiküle reaktif oksijen türleri üretme yeteneği kazandırılmıştır.
- Silika nanopartikül üzerine açlık terapisine imkan veren ve hipoksik ortamın eliminasyonu ile oksijen üretim yeteneğine sahip glikoz oksidaz (GOx) ve katalaz (CAT) enzimlerini içeren bir kaskat enzim sistemi yerleştirilmiştir.
- SEM görüntülerinden, sentezlenen silika partiküllerinin içi boş formda olduğu, nanometre boyutlarında ve eş boyut dağılımına sahip olduğu (%4,7-%4,9), PDA kaplamanın ve yüklenen enzimlerin partikülün morfolojisini değiştirmedeği sonucuna ulaşılmıştır. Elementlerin homojen dağılımı EDX görüntüleri ile gösterilmiştir.
- BET analizinde, H-SiO<sub>2</sub> nanopartikülünün özgül yüzey alanı 434 m<sup>2</sup>/g, gözenek hacmi 1,23 cm<sup>3</sup>/g ve ortalama gözenek çapı 26,9 nm olarak ölçülürken, sinerjistik terapi ajanı olarak kullanılmak üzere sentezlenen H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin özgül yüzey alanı 238 m<sup>2</sup>/g, gözenek hacmi 0,96 cm<sup>3</sup>/g ve ortalama gözenek çapı 26,8 nm olarak ölçülmüştür. Yüzey alanı ve gözenek hacmindeki bu düşüş gözeneklerin kaplamadan kaynaklanan PDA ile dolması ve immobilize enzimler ile ilişkilendirilmiştir.
- H-SiO<sub>2</sub> ve H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin N<sub>2</sub> fizisorpsiyon izoterminden elde edilen veriler, Tip IV izotermilerin tipik özelliği olan mezogözenekli yapıyı doğrulamaktadır.
- FTIR-ATR spektrumlarına göre, silika nanopartiküllerindeki PDA katmanının ve immobilize enzimlerin varlığı doğrulanmıştır.

- GOx aktivitesi tayini için enzimin glikoz oksidasyonu sonucunda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi izlenerek Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafikleri çıkarılmıştır. Grafiklerden elde edilen verilere göre, glikoz tüketim hızı  $r_{max}$  2,82  $\mu$ M/dk olarak ve  $k_m$  5357,9  $\mu$ M olarak bulunmuştur.
- CAT aktivitesi tayini için Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafiklerinden elde edilen verilere göre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketim hızı  $r_{max}$  103,1 mM/dk olarak,  $k_m$  9,01 mM olarak bulunmuştur.
- H-SiO<sub>2</sub>@PDA@GOx@CAT nanopartiküllerinin fototermal yanıtı, 808 nm NIR lazer ışınlamasıyla değerlendirilmiştir. Lazer ışınlaması altında 52°C'ye kadar ulaşan sıcaklık artışı ve termal stabilite gözlenmiştir.
- H-SiO<sub>2</sub>@PDA@Ce6@GOx@CAT nanopartiküllerinin fotodinamik yanıtı, 650 nm LED ışık ile değerlendirilmiştir. STA varlığında <sup>1</sup>O<sub>2</sub> reaktifinin oluşumu DPBF absorbansında gerçekleşen düşüş ile kanıtlanmıştır.
- *In-vitro* ortamda T98G glioblastoma hücrelerine, sentezlenen STA verilerek PTT, PDT ve ST için hücre canlılığı bireysel olarak değerlendirilmiştir.
- Kombine terapi ile *in-vitro* ortamda T98G hücrelerinin canlılığında önemli bir azalma olduğu ve herhangi bir geleneksel kemoterapötik ajana ihtiyaç duymadan kombine tedavi ile hücre canlılığının %21'e kadar düştüğü bulunmuştur.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Cell*, 100 (2000) 57–70.
- [2] W. M. C. van den Boogaard, D. S. J. Komninos, W.P. Vermeij, *Cancers*, 14 (2022) 627.
- [3] W. Fan, B. Yung, P. Huang, X. Chen, *Chem Rev*, 117 (2017) 13566-13638.
- [4] X. Li, J.F. Lovell, J. Yoon, X. Chen, *Nat Rev Clin Oncol*, 17 (2020) 657-674.
- [5] D. Jaque, L. Martinez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J.L. Plaza, E. Martin Rodriguez, J. Garcia Sole, *Nanoscale*, 6 (2014) 9494-9530.
- [6] M. Overchuk, R.A. Weersink, B.C. Wilson, G. Zheng, *ACS Nano*, 17 (2023) 7979-8003.
- [7] Y. Kou, Z. Dai, P. Cui, Z. Hu, L. Tian, F. Zhang, H. Duan, Q. Xia, Q. Liu, X. Zheng, *J Mater Chem B*, 9 (2021) 8480-8490.
- [8] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Cell*, 144 (2011) 646-674.
- [9] P. L. Adams, V. Aguilar, L. Anderson-Shaw, L. M. Bellury, J. C. Clark, G. M. Decker, D. Drake, *Cancer Basics J. Eggerts (Eds.), 2nd Ed.*, Oncology Nursing Society, Pennsylvania, 2017.
- [10] B.T. Teh, E.R. Fearon, *Genetic and Epigenetic Alterations in Cancer*, 6th Ed., Chapter 14, 209-224, 2020.
- [11] P. Wang, S. Sun, H. Ma, S. Sun, D. Zhao, S. Wang, X. Liang, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 108 (2020) 110198.
- [12] I.J. Fidler, D.M. Gersten, I.R. Hart, *Adv Cancer Res*, 28 (1978) 149-250.
- [13] G. Poste, I.J. Fidler, *Nature*, 283 (1980) 139-146.
- [14] C. L. Chaffer, R.A. Weinberg, *Science*, 331 (2011) 1559-1564.
- [15] O.M. Al-Quteimat, M.A. Al-Badaineh, *J Oncol Pharm Pract*, 20 (2014) 369-380.
- [16] Y. Zhu, M. Deng, N. Xu, Y. Xie, X. Zhang, *Front Chem*, 9 (2021) 650899.
- [17] N.M. Anderson, M.C. Simon, *Curr Biol*, 30 (2020) R921-R925.
- [18] J. Huang, Y. Li, L. Zhang, J. Wang, Z. Xu, Y. Kang, P. Xue, *Biomaterials*, 286 (2022) 121572.
- [19] W. Li, S. Liu, S. Dong, S. Gai, F. Zhang, Y. Dong, D. Yang, F. He, L. Zhong, P. Yang, *Chemical Engineering Journal*, 405 (2021).



- [20] H. Hao, M. Sun, P. Li, J. Sun, X. Liu, W. Gao, *ACS Appl Mater Interfaces*, 11 (2019) 9756-9762.
- [21] Slowing, II, J.L. Vivero-Escoto, C.W. Wu, V.S. Lin, *Adv Drug Deliv Rev*, 60 (2008) 1278-1288.
- [22] B. Li, X. Ye, Y. Fu, L. Feng, J. Xu, X. Niu, H. Ye, Z. You, *Pharm Res*, 40 (2023) 1271-1282.
- [23] S. Li, Q. Wang, Z. Jia, M. Da, J. Zhao, R. Yang, D. Chen, *Heliyon*, 9 (2023) e20407.
- [24] K. Zhang, C. Qi, K. Cai, *Adv Mater*, 35 (2023) e2205409.
- [25] B. Chen, L. Mei, R. Fan, D. Chuan, Y. Ren, M. Mu, H. Chen, B. Zou, G. Guo, *Asian J Pharm Sci*, 18 (2023) 100781.
- [26] F. Jabeen, M. Najam-ul-Haq, R. Javeed, C.W. Huck, G.K. Bonn, *Molecules*, 19 (2014) 20580-20593.
- [27] H. Chen, H. Chen, Y. Wang, Y. Bai, P. Yuan, Z. Che, L. Zhang, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 200 (2021) 111596.
- [28] H.M. Kang, L.M. Chen, Q. Li, H. Chen, L.K. Zhang, *Acs Applied Materials & Interfaces*, 15 (2023) 15129-15139.
- [29] M.Y. He, T. Yang, Y.H. Wang, M.Y. Wang, X.Y. Chen, D.W. Ding, Y.R. Zheng, H.B. Chen, *Advanced Healthcare Materials*, 10 (2021).
- [30] Y. Li, Y. Cheng, Y. Wu, Z. Wang, X. Ma, J. Zhao, Z. Yang, Y. Ji, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 63 (2024) 3140-3151.
- [31] S. Rajasekar, K. Santhi, M.I. Farheena, K. Sampath, R. Madhankumar, C. Vetrivel, *Journal of Cluster Science*, 34 (2023) 2931-2940.
- [32] P. Zhang, X.F. Li, Q.A. Xu, Y.X. Wang, J. Ji, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 208 (2021).
- [33] H. Abrahamse, M.R. Hamblin, *Biochem J*, 473 (2016) 347-364.
- [34] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, *CA Cancer J Clin*, 61 (2011) 250-281.
- [35] X. Li, L. Chen, M. Huang, S. Zeng, J. Zheng, S. Peng, Y. Wang, H. Cheng, S. Li, *Asian J Pharm Sci*, 18 (2023) 100775.
- [36] U. Chilakamarthi, L. Giribabu, *Chem Rec*, 17 (2017) 775-802.
- [37] Z. Zhou, J. Song, L. Nie, X. Chen, *Chem Soc Rev*, 45 (2016) 6597-6626.

- [38] S.F. Yan, L.Y. Dong, Z.Y. Hu, Y.C. Zhang, W. Xu, J.H. Xing, J.C. Zhang, *Molecules*, 28 (2023).
- [39] K. C. Sadanala, P. K. Chaturvedi, Y. M. Seo, J. M. Kim, Y. S. Jo, Y. K. Lee, W.S. Ahn, *Anticancer Res*, 34 (2014) 4657-4664.
- [40] S.S. Lucky, K.C. Soo, Y. Zhang, *Chem Rev*, 115 (2015) 1990-2042.
- [41] R. Fekrazad, A. Nejat, K.A.M. Kalhori, *Antimicrobial Photodynamic Therapy With Nanoparticles Versus Conventional Photosensitizer in Oral Diseases*, 237-259, 2017.
- [42] A.M. Udrea, A. Smarandache, A. Dinache, C. Mares, S. Nistorescu, S. Avram, A. Staicu, *Pharmaceutics*, 15 (2023).
- [43] B. Yang, Y. Chen, J. Shi, *Chem Rev*, 119 (2019) 4881-4985.
- [44] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, 1st Ed., CRC Press., 2000.
- [45] A. Hak, M.S. Ali, S.A. Sankaranarayanan, V.R. Shinde, A.K. Rengan, *ACS Appl Bio Mater*, 6 (2023) 349-364.
- [46] C. Jia, Y. Guo, F.G. Wu, *Small*, 18 (2022) 2103868
- [47] Z. Tang, P. Zhao, H. Wang, Y. Liu, W. Bu, *Chem Rev*, 121 (2021) 1981-2019.
- [48] L. Zhang, C.X. Li, S.S. Wan, X.Z. Zhang, *Adv Healthc Mater*, 11 (2022) e2101971.
- [49] P. Zhao, H. Li, W. Bu, *Angew Chem Int Ed Engl*, 62 (2023) 202210415.
- [50] Y. Bian, B. Liu, S. Liang, B. Ding, Y. Zhao, F. Jiang, Z. Cheng, A.A.A. Kheraif, P.a. Ma, J. Lin, *Chemical Engineering Journal*, 435 (2022).
- [51] C. Li, W. Jia, Z. Guo, Y. Kang, C. Zhou, R. Zhao, X. Cheng, N. Jia, *J Mater Chem B*, 12 (2024) 800-813.
- [52] L. Huo, S. Zhu, J. Zeng, R. Lin, W. Chen, M. Li, X. Sun, M. Tan, G. Huang, K. Xu, Z. Zhao, *ACS Materials Letters*, 6 (2024) 885-895.
- [53] J. Wu, M. Wang, Y. Pan, Y. Pang, Y. Tang, C. Song, J. Zhu, X. Zhang, Q. Huang, *RSC Adv*, 12 (2022) 23786-23795.
- [54] L. Zhu, T. Gui, P. Song, W. Li, J. Wang, C. Hu, Y. Sun, F. Ge, W. Zhang, *ACS Applied Nano Materials*, 6 (2023) 7446-7455.
- [55] L.Y. Duan, Y.J. Wang, J.W. Liu, Y.M. Wang, N. Li, J.H. Jiang, *Chem Commun*, 54 (2018) 8214-8217.
- [56] Z. Wang, B. Liu, Q. Sun, S. Dong, Y. Kuang, Y. Dong, F. He, S. Gai, P. Yang, *ACS Appl Mater Interfaces*, 12 (2020) 17254-17267.
- [57] H. Cheng, X.Y. Jiang, R.R. Zheng, S.J. Zuo, L.P. Zhao, G.L. Fan, B.R. Xie, X.Y. Yu, S.Y. Li, X.Z. Zhang, *Biomaterials*, 195 (2019) 75-85.

- [58] B. Ma, Y. Nishina, A. Bianco, Carbon, 178 (2021) 783-791.
- [59] S. Wu, Q. Zhang, Q. Zhao, Y. Jiang, X. Qu, Y. Zhou, T. Zhao, F. Cang, Y. Li, Biomater Adv, 154 (2023) 213593.
- [60] W.D. Zhang, L. Dai, N. Wang, Y.H. Liu, Z.N. Hao, Y.Q. He, S. Ni, Y.M. Wang, D.W. Gao, Cancer Nanotechnology, 15 (2024).
- [61] D. Chen, X. Liu, X. Lu, J. Tian, Front Pharmacol, 14 (2023) 1111991.
- [62] S. Hossen, M.K. Hossain, M.K. Basher, M.N.H. Mia, M.T. Rahman, M.J. Uddin, J Adv Res, 15 (2019) 1-18.
- [63] S. Parvanian, S.M. Mostafavi, M. Aghashiri, Sensing and Bio-Sensing Research, 13 (2017) 81-87.
- [64] D.H. Shin, Y.T. Tam, G.S. Kwon, Frontiers of Chemical Science and Engineering, 10 (2016) 348-359.
- [65] L. Palmerston Mendes, J. Pan, V.P. Torchilin, Molecules, 22 (2017).
- [66] S. Laurent, A.A. Saei, S. Behzadi, A. Panahifar, M. Mahmoudi, Expert Opin Drug Deliv, 11 (2014) 1449-1470.
- [67] Z. Liu, J.T. Robinson, S.M. Tabakman, K. Yang, H. Dai, Materials Today, 14 (2011) 316-323.
- [68] S.Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, A.M. Seifalian, Int J Nanomedicine, 6 (2011) 2963-2979.
- [69] C. De La Rocha, D.J. Conley, Silica Stories, 1st Ed., Springer, 2017.
- [70] S. Barua, S. Gogoi, R. Khan, N. Karak, Silicon-Based Nanomaterials and Their Polymer Nanocomposites, 261-305, 2019.
- [71] R. Diab, N. Canilho, I.A. Pavel, F.B. Haffner, M. Girardon, A. Pasc, Adv Colloid Interface Sci, 249 (2017) 346-362.
- [72] Y. Huang, P. Li, R. Zhao, L. Zhao, J. Liu, S. Peng, X. Fu, X. Wang, R. Luo, R. Wang, Z. Zhang, Biomed Pharmacother, 151 (2022) 113053.
- [73] S.Y. Hsu, R. Morris, F. Cheng, Molecules, 26 (2021).
- [74] M.W. TM, K.W. Ng, W.M. Lau, V.V. Khutoryanskiy, Pharmaceutics, 12 (2020).
- [75] S.D. Karande, S.A. Jadhav, H.B. Garud, V.A. Kalantre, S.H. Burungale, P.S. Patil, Nanotechnology for Environmental Engineering, 6 (2021).
- [76] W. Stöber, A. Fink, J. Colloid Sci., (1968) 62-69.
- [77] M.M. Algaradah, American Journal of Analytical Chemistry, 12 (2021) 446-457.

- [78] A.M. Mebert, C.J. Baglolo, M.F. Desimone, D. Maysinger, *Food Chem Toxicol*, 109 (2017) 753-770.
- [79] V. Selvarajan, S. Obuobi, P.L.R. Ee, *Front Chem*, 8 (2020) 602.
- [80] Z. Shi, Y. Zhou, T. Fan, Y. Lin, H. Zhang, L. Mei, *Smart Materials in Medicine*, 1 (2020) 32-47.
- [81] K. S. Finnie, J. R. Bartlett, C. J. A. Barbe', L. Kong, *Langmuir*, 23 (2007) 3017-3024.
- [82] J. Wang, A. Sugawara-Narutaki, M. Fukao, T. Yokoi, A. Shimojima, T. Okubo, *ACS Appl Mater Interfaces*, 3 (2011) 1538-1544.
- [83] M. Gisbert-Garzarán, D. Lozano, M. Vallet-Regí, *Int J Mol Sci*, 21 (2020).
- [84] B. Guleryuz, A. Isik, M. Gulsoy, *Lasers Med Sci*, 39 (2024) 91.
- [85] F. Chen, Y. Xing, Z. Wang, X. Zheng, J. Zhang, K. Cai, *Langmuir*, 32 (2016) 12119-12128.
- [86] Q. Lin, D. Gourdon, C. Sun, N. Andersen, T.H. Anderson, J.H. Waite, J.N. Israelachvili, *PNAS*, 104 (2007) 3782-3786
- [87] Y.H. Ding, M. Floren, W. Tan, *Biosurf Biotribol*, 2 (2016) 121-136.
- [88] Y. Liu, K. Ai, L. Lu, *Chem Rev*, 114 (2014) 5057-5115.
- [89] B. Poinard, S.Z.Y. Neo, E.L.L. Yeo, H.P.S. Heng, K.G. Neoh, J.C.Y. Kah, *ACS Appl Mater Interfaces*, 10 (2018) 21125-21136.
- [90] Y. Sun, X. Ma, H. Hu, *Int J Mol Sci*, 22 (2021).
- [91] C. Liu, J. Xing, O.U. Akakuru, L. Luo, S. Sun, R. Zou, Z. Yu, Q. Fang, A. Wu, *Nano Lett*, 19 (2019) 5674-5682.
- [92] Q. Li, T. Wu, X. Fan, X. Guo, W. Jiang, K. Fan, *Materials & Design*, 224 (2022).
- [93] M. Mishra, M. Misra, S. Dutta, *Chemistry*, (2024) e202400195.
- [94] Q. Qiao, J. Wang, K. Long, L. Li, J. Chen, Y. Guo, Z. Xu, Y. Kuang, T. Ji, C. Li, *Nano Today*, 54 (2024).
- [95] M. Zheng, Y. Liu, G. Zhang, Z. Yang, W. Xu, Q. Chen, *Antioxidants (Basel)*, 12 (2023).
- [96] H. Wu, Q. Jiang, K. Luo, C. Zhu, M. Xie, S. Wang, Z. Fei, J. Zhao, *J Nanobiotechnology*, 19 (2021) 203.
- [97] L.H. Fu, C. Qi, J. Lin, P. Huang, *Chem Soc Rev*, 47 (2018) 6454-6472.
- [98] R. He, P. Yang, A. Liu, Y. Zhang, Y. Chen, C. Chang, B. Lu, *J Mater Chem B*, 11 (2023) 9798-9839.

- [99] M. Weller, W. Wick, K. Aldape, M. Brada, M. Berger, S.M. Pfister, R. Nishikawa, M. Rosenthal, P.Y. Wen, R. Stupp, G. Reifenberger, *Nat Rev Dis Primers*, 1 (2015) 15017.
- [100] A. Brodbelt, D. Greenberg, T. Winters, M. Williams, S. Vernon, V.P. Collins, G. National Cancer Information Network Brain Tumour, *Eur J Cancer*, 51 (2015) 533-542.
- [101] Y. Li, Y. Matsumoto, L. Chen, Y. Sugawara, E. Oe, N. Fujisawa, M. Ebara, H. Sakurai, *Nanomaterials (Basel)*, 13 (2023).
- [102] C.Z. Sungu Akdogan, E. Akbay Cetin, M.A. Onur, S. Onel, A. Tuncel, *ACS Appl Bio Mater*, 7 (2024) 2781-2793.
- [103] K.G. Ozdemir, H. Yilmaz, S. Yilmaz, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 90 (2009) 82-86.
- [104] R.S. Ray, N. Agrawal, A. Sharma, R.K. Hans, *Toxicol In Vitro*, 22 (2008) 1775-1781.
- [105] Lynne A. Murray, Darryl A. Knight, G.J. Laurent, *Asthma and COPD 2nd Ed.*, 193-200, 2009.
- [106] D.F. Williams, *Biomaterials*, 29 (2008) 2941-2953.
- [107] A. Sukumaran, M.A. Mansour, *Cytotoxicity and Cell Viability Assessment of Biomaterials*, A. Sukumaran, V. K. Sweety, B. Vikas, B. Josephs (Eds.), 2022.
- [108] H. Garn, H. Krause, V. Enzmann, K. Drössler, *J. Immunol Methods*, 168 (1994) 253-256.
- [109] M. Shoemaker, I. Cohen, M. Campbell, *J Ethnopharmacol*, 93 (2004) 381-384.
- [110] S. R. Kim, M. J. Park, M. K. Lee, S. H. Sung, E. J. Park, J. Kim, S. Y. Kim, T. H. Oh, G. J. Markelonis, Y.C. Kim, *Free Radic Biol Med.*, 32 (2002) 596-604.
- [111] P. Kumar, A. Nagarajan, P.D. Uchil, *Cold Spring Harb Protoc*, 2018 (2018).
- [112] H.L. Bank, *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 24 (1988) 266-273.
- [113] B. Saracoglu, E. Uguzdoğan, C. Golgelioglu, A. Tuncel, *Ind. Eng. Chem. Res.* , (2009) 4844-4851.
- [114] M. Mohammadi, M. Khanmohammadi Khorrami, H. Vatanparast, H. Ghasemzadeh, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 255 (2021) 119697.
- [115] C. Yao, A. Xie, Y. Shen, J. Zhu, T. Li, *J. Chil. Chem. Soc.*, 58, (2013) 2235-2238.
- [116] V. Bm, V. M, *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 05 (2015).
- [117] H. Yu, H. Wu, X. Tian, Y. Zhou, C. Ren, Z. Wang, *RSC Adv*, 11 (2021) 26963-26973.

- [118] Ç. Kip, G. Çolak, M. Polat, A. Tuncel, *Journal of Molecular Structure*, 1301 (2024).
- [119] C.Z. Sungu Akdogan, B. Gokcal, M. Polat, K.O. Hamaloglu, C. Kip, A. Tuncel, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10 (2022) 9492-9505.
- [120] H. Hu, X. Liu, J. Hong, N. Ye, C. Xiao, J. Wang, Z. Li, D. Xu, *J Colloid Interface Sci*, 612 (2022) 246-260.
- [121] S. Erfen, E. Akbay Cetin, *Neurotox Res*, 40 (2022) 2027-2045.