

BİRCAN DİNÇ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**FONKSİYONEL HALE GETİRİLMİŞ VE PROTEİN BAĞLANMIŞ
KARBON NANO TÜPLERİN BİYOLOJİK ORTAMDA
ARAŞTIRILMASI**

BİRCAN DİNÇ

**DANIŞMAN
PROF. DR. MUHAMMET BEKTAŞ**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programında Doktora öğrencisi Bircan Dinç tarafından Prof. Dr. Muhammet Bektaş'ın danışmanlığında hazırlanan "Fonksiyonel Hale Gelmiş ve Protein Bağlanmış Karbon Nano Tüplerin Biyolojik Ortamda Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı (Danışman)
Prof.Dr.Muhammet BEKTAŞ
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Jüri
Prof.Dr.Derviş ÖZÇELİK
İ.Ü.Cerrahpaşa-CTF Tıp Fak
Biyofizik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Jüri
Prof.Dr.Handan AKÇAKAYA
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Jüri
Doç.Dr.Başak Varol
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Jüri
Dr.Öğr.Üyesi Ayhan ÜNLÜ
Trakya Üniv.Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

**Bircan Dinç**

İTHAF

Annem Fatma Şahin'e, eşim Dinçer Dinç,
oğlum Erdem Bartu Dinç ve dostlarıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda bana verdiği destekten dolayı tez danışmanım ve İstanbul Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr. Muhammet Bektaş'a teşekkür ederim. Destekleri için Prof. Dr. Rüstem Nurten'e teşekkür ederim. Altınbaş Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Dekanı, Prof. Dr. Osman Nuri Uçan'a destekleri için teşekkür ederim. Tecrübelerini paylaştığı için ve destekleri için Prof. Dr. Handan Akçakaya'ya ve yardımları için Prof. Dr. Nilgün Karatepe Yavuz'a teşekkür ederim.

Doç. Dr. Yekbun Adıgüzel'e FTIR ölçümlerimde verdiği desteklerden ötürü teşekkür ederim. Doç. Dr. Başak Varol'a ve Dr. Bilge Özerman Edis'e ve Dr. Öğretim Üyesi Fulya Dal Yöntem'e tecrübelerini paylaştığı için teşekkür ederim. Tez dönemimde verdiği destekler nedeniyle, Altınbaş Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölüm Başkanı, Dr. Öğretim Üyesi Hakan Kaygusuz'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımdeki yardımları nedeniyle Dr. Öğretim Üyesi Ayhan Ünlü'ye teşekkür ederim. Bilgi paylaşımları, fikir alışverişleri, deneylerimdeki yardımları nedeniyle MSc Serdar Alkanlı'ya teşekkür ederim. Yardımlarından ve paylaştığı tecrübelerinden ötürü MSc Mehdi Meran'a teşekkür ederim.

Eşim Dinçer Dinç'e bu dönemde sabrından ve desteğinden dolayı teşekkür ederim. Oğlum Erdem Bartu Dinç'e, bana çalışma gücü verdiği için teşekkür ederim. Bana *Cernohebditis Elegans* 'la çalışma fırsatı verdiği için, MSc. Emine Şen'e teşekkür ederim. Dostlarım Oya Mert, Gülsemay Yiğit ve Yasin Kütük'e destekleri için teşekkür ederim.

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nin eski Aşı-Serum Merkezi Müdürü, kırım kongo kanamalı ateşine karşı ürettiği serumla bilinen, Mustafa Hacıömeroğlu'na sentezlediği difteri toksinini, çalışmalarımde kullanmak üzere benimle paylaştığı için teşekkür ederim.

“Never Give Up” şarkısı ile, her vazgeçişimde bana yeniden güç veren Sia'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 29833) ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2017/67) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Karbon Nanotüpler.....	3
2.2. Karbon Nanotüplerin Sentezlenmesi	5
2.2.3. Kimyasal Buhar Biriktirme Yöntemi.....	6
2.3. Karbon Nanotüplerin İşlevselleştirilmesi	7
2.4. Karbon Nanotüplerin Karakterize Edilmesi.....	9
2.5. KNT'lerin Hücresel Alımı	13
2.6. KNT'lerin Hücreye Alımını Etkileyen Faktörler.....	14
2.7. KNT'lerin Toksisitesi.....	16
2.8. Doksorubisin (Adriamisin- $C_{27}H_{29}O_{11}N-HCl$).....	17
2.9. Difteri Toksini.....	18
2.10. <i>C. elegans</i> 'ın Nano Toksisite Araştırmalarında Kullanılması	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereçler.....	23
3.2. Kimyasal Maddeler	24
3.3. Çalışmalarda Kullanılan Eriyikler	25
3.3.1. <i>C. elegans</i> Yumurta Senkronizasyon Karışımı	25
3.3.2. Bakteri üretimi için LB Agar ve hazırlama	25
3.3.3. <i>C. elegans</i> için NGM karışımı	26
3.3.4. Hücre Patlatma Tamponu (Lysis Buffer).....	26

3.3.5. Yükleme (Dentaürasyon) Tamponu.....	26
3.3.6. PAGE Yürütme Tamponu	27
3.3.7. PAGE Yükleme Tamponu	27
3.3.8. Transfer Tamponu.....	27
3.3.9. PBS (fosfat) Tamponu	27
3.3.10. TBST Tamponu	27
3.3.11. DT Tamponu.....	27
3.3.7. PAGE Alt Jeli	28
3.3.12. Hücre Canlılığı Solüsyonu.....	28
3.3.13. Antikorlar.....	28
3.3.14. Floresan Görüntülemeye Kullanılan Çözeltiler	28
3.4. YÖNTEMLER.....	29
3.4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	29
3.4.2. Hücrelerin Sayılması.....	29
3.4.3. Hücre Lizatı Hazırlanması	29
3.4.4. Hücre Lizatından Protein Miktarının Belirlenmesi	30
3.4.5. Elektroforez (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi.....	30
3.4.6. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile DT'nin Saflık Analizi	31
3.4.7. Moleküler Elek Kromatografisi	31
3.4.8. MTT Canlılık Deneyleri	31
3.4.9. Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Deneyleri	32
3.4.10. Kullanılacak KNT'lerin seçimi.....	32
3.4.11. KNT'lerin TEM Görüntülerinin Alınması.....	32
3.4.12. KNT'lerin İşlevselleştirilmesi.....	33
3.4.13. Raman ve FTIR Spektrumları.....	33
3.4.14. KNT ve KNT Bağlı Proteinlerin TGA Analizlerinin Yapılması	34
3.4.15. KNT'lere Protein ve İlaç bağlanması	34
3.4.16. Toksine Bağlı ADP Ribozillenme	36
3.4.17. İmmünfloresan Görüntüleme Çalışmaları	36
3.4.18. <i>C. elegans</i> ile Yapılan Çalışmalar.....	37
3.4.19. İstatistik.....	39
4. BULGULAR.....	41
4.1. KNT'lerin TEM ve SEM Görüntüleri.....	41

4.2. Serbest ve Yüklü KNT'lerin Termogravimetrik Analizi	47
4.3. FTIR ile Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları.....	53
4.4. <i>C. elegans</i> ile Yapılan Toksisite Araştırmaları	55
4.5. Raman Spektrumu ile KNT'lerin Karakterizasyonu.....	66
4.6. Farklı Hücre Hatlarında Doks'un Etkisi	67
4.7. KNT'lerin Hücrelerdeki Canlılık Değerleri ve Toksisite Araştırmaları	69
4.8. Difteri Toksininin Dirençli Hücrelere Taşınması ve Aktivitesinin Belirlenmesi ..	73
4.9. DT-KNT Uygulanan Hücrelerin Canlılık Değerleri	81
4.10. Doks-KNT Uygulanan Hücrelerin Canlılık Değerleri	82
4.11. İmmünfloresan Mikroskopi Çalışmaları	84
4.12. İstatistik.....	87
5. TARTIŞMA	89
KAYNAKLAR	100
HAM VERİLER	110
ETİK KURUL KARARI	111
PATENT HAKKI İZNİ	112
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	113
ÖZGEÇMİŞ	114

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Doks-KNT bağlanma denemesinde, karışımların oranları.....	35
Tablo 2: C70P ve İC70P'nin sıcaklığa bağlı ağırlık değişimleri.....	48
Tablo 3: C150P ve İC150P'nin sıcaklığa bağlı ağırlık değişimleri.....	50
Tablo 4: Sefakril S-100 kalibrasyon tablosu.....	78
Tablo 5: C. elegans'a ait boy ve en değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler (1.gün).....	89
Tablo 6: ilk güne ait kalınlık değerlerinin ortalama eşitliği testi sonuçları.....	90
Tablo 7: ilk güne ait uzunluk değerlerinin ortalama eşitliği testi sonuçları.....	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 : Tek ve çok duvarlı KNT'ler. Tek duvar (sol), çok duvarlı (SAĞ).....	3
Şekil 2: Dönme açlarına bağlı KNT çeşitleri.....	4
Şekil 3: Yay boşalma sistemi.....	5
Şekil 4: Laser ablasyon yöntemi.....	6
Şekil 5: Kimyasal buhar biriktirme yöntemi sistemi.	7
Şekil 6: Çözünmüş KNT görünümü..	7
Şekil 7: KNT'lerin kovalent işlevselleştirilmesi.....	8
Şekil 8: KNT'lerin non-kovalent işlevselleştirilmesi.	9
Şekil 9: Tek ve çok duvarlı KNT'lerin TEM görüntüleri.....	9
Şekil 10: İşlevselleştirilmiş KNT'lerin Raman spektrumu.....	10
Şekil 11: İşlevselleştirilmiş KNT'lerin FTIR Spektrumu.....	11
Şekil 12: Sığır serum albümin termogravimetrik analizi.....	12
Şekil 13: KNT'lerin hücre içine giriş yolları.	13
Şekil 14: Uyarıcı varlığında KNT'lerin kontrollü ilaç salınımı.....	15
Şekil 15: Doksoerubisin yapısı.....	17
Şekil 16: Difteri toksininin yüzey yapısı (sol), katlanma yapısı (sağ).....	18
Şekil 17: <i>C. elegans</i> 'ın yaşam döngüsü.....	20
Şekil 18: <i>C. elegans</i> 'ın vücut kısımlarının ışık mikroskobu görüntüsü.....	21
Şekil 19 : Yukarıdan aşağıya, erkek, hermafrodit <i>C. elegans</i> 'ın vücut kısımları ve kesit alanı görüntüsü.....	22
Şekil 20 : BSA kalibrasyon eğrisi.....	30
Şekil 21: KNT'lerin reflüks işlemi ile işlevsel hale getirilmesi.....	33
Şekil 22 : Doks'un kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 23: <i>E. coli</i> 'nin OP50 izolatının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	38
Şekil 24: KNT'lerin uygulanması öncesi <i>C. elegans</i> 'ın çoğaltıldığı petri kaplarının hazırlanması.....	38
Şekil 25: İTÜ3M ÇDNT'lerin TEM görüntüleri.....	41
Şekil 26: KNT duvar yapısının TEM görüntüsü.....	42
Şekil 27: C150P 'nin SEM görüntüsü (84).....	43
Şekil 28:C150P TEM görüntüsü (84).....	43
Şekil 29: C70P SEM görüntüsü (84).....	44

Şekil 30: C70P'nin 200 nm çözünürlükte TEM görüntüsü (84).....	44
Şekil 31: Nanografiden temin edilen saf ÇDNT'lerin SEM görüntüsü.....	45
Şekil 32: Saf KNT'lerin yüksek çözünürlükteki TEM görüntüsü.	46
Şekil 33: İKNT'lerin TEM görüntüsü.	46
Şekil 34: C70P ve İC70P'nin sıcaklığa bağlı kütle değişimi.....	47
Şekil 35: C70P ve İC70P'nin, sıcaklığa bağlı kütle değişiminin türev eğrisi.....	48
Şekil 36: C150P ve İC150P'nin sıcaklığa bağlı kütle değişimi.....	49
Şekil 37: C150P ve İC150P'nin, sıcaklığa bağlı kütle değişiminin türev eğrisi.....	50
Şekil 38: Nanografiden elde edilen ÇDNT'lerin TGA analizleri.	50
Şekil 39: Nanografiden alınan İKNT'lerin termogravimetrik türev eğrisi.	51
Şekil 40: KNT-BSA ve İKNT-BSA komplekslerinin termal bozunma eğrileri.	52
Şekil 41: Doks-İKNT komplekslerinin termal bozunma eğrileri.	52
Şekil 42: DT-İKNT komplekslerinin termal bozunma eğrileri.	53
Şekil 43: C-70P ve C-150P'nin FTIR Spektrumları.....	53
Şekil 44: BSA'nın toz numunelerinden elde edilen FTIR spektrumları.....	54
Şekil 45: Nanografi KNT'lerin FTIR spekturumu.	54
Şekil 46: KNT'lerin petri kabındaki görünümü.....	55
Şekil 47: <i>C. elegans</i> 'ın petri kabındaki görünümü	56
Şekil 48: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın canlılık oranları.	57
Şekil 49: E.Coli-KNT süspansiyonunun hazırlanışı	57
Şekil 50: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın ilk gün görüntüleri	58
Şekil 51: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın 3. gün görüntüleri	59
Şekil 52: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın 6. gün görüntüleri	60
Şekil 53: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın 8. gün görüntüleri	61
Şekil 54: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın 10. gün görüntüleri	62
Şekil 55: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın 12. gün görüntüleri	63
Şekil 56: KNT uygulanan <i>C. elegans</i> 'ın 15. gün görüntüleri	64
Şekil 57: <i>C. elegans</i> 'ın yaşam süresi analizi.....	64
Şekil 58: <i>C. elegans</i> 'ın 15 günlük periyotta kalınlık değişimleri.	65
Şekil 59: <i>C. elegans</i> 'ın 15 günlük periyotta uzunluk değişimleri.....	65
Şekil 60: C70P ve İC70P'nin Raman Spektrumu.....	66
Şekil 61: C150P ve İC150P'nin Raman Spektrumu.....	66
Şekil 62: Nanografi KNT ve İKNT'nin Raman spektrumu.....	67

Şekil 63: MDA-MB-231 hücrelerinde Doks'un hücre canlılığına etkisi.....	68
Şekil 64: HUVEC Hücrelerinde Doks'un hücre canlılığına etkisi.	68
Şekil 65: HT-29 Hücrelerinde Doks'un hücre canlılığına etkisi.	69
Şekil 66: ÇDNT'lerin HT-29 hücrelerindeki toksisite sonuçları.....	70
Şekil 67: Farklı hücre soylarında, KNT ve İKNT'lerin canlılığa etkisi.	70
Şekil 68: NIH-3T3 hücrelerinde İKNT'lerin canlılık değerleri.....	71
Şekil 69: İKNT'lerin MDA-MB-231 hücrelerinde hücre indeksi değerleri.	72
Şekil 70: KNT'lerin MDA-MB-231 hücrelerinde 70 saatlik hücre indeksi değerleri....	72
Şekil 71: Sigma ve R. Saydam'da üretilen DT'lerinin Raman Spektrumları.	73
Şekil 72: Farklı iki kaynaktan sağlanan difteri toksininin SDS/PAGE analizi.....	74
Şekil 73: DT'nin Western Blot Görüntüsü	74
Şekil 74: Sefakril S-100 kabilrasyon grafiği.....	75
Şekil 75: Sefakril S-100 kalibrasyon dağılım grafiği.	76
Şekil 76: R. Saydam DT'nin kromatogramı	76
Şekil 77: KNT ile NIH-3T3 hücrelerine taşınan DT'nin FTIR analizi.....	78
Şekil 78: NIH-3T3 lizatında DT'nin varlığı	79
Şekil 79: NIH-3T3 lizatlarında DT varlığında ADP ribozillenme.	80
Şekil 80: DT'nin canlılığa etkisi.....	81
Şekil 81: DT-KNT'nin canlılığa etkisi.	81
Şekil 82: MDA-MB-231 Hücreleri Canlılık Değerleri.....	82
Şekil 83: HUVEC Hücreleri canlılık değerleri.	83
Şekil 84: HT-29 Hücreleri canlılık değerleri.	83
Şekil 85: MDA-MB-231 Kontrol hücreleri.	84
Şekil 86: Çalışmanın başlangıcında uzun 100 µg/ml TDNT uygulanan MDA-MB-231 hücreleri.	84
Şekil 87: 50 µg/ml KNT uygulanan MDA-MB-231 hücreleri.	85
Şekil 88: HUVEC Kontrol hücreleri.....	86
Şekil 89: 50 µg/ml ÇDNT (Nanografi İKNT) uygulanan HUVEC hücreleri.	86



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	Adenozin difosfat
BSA	Sığır serum albümini
BSA-KNT	BSA yüklenmiş karbon nanotüp
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis Elegans
CVD	Kimyasal buhar biriktirme yöntemi
ÇDNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
Dak.	Dakika
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenil indol
DMSO	Dimetil sülfoksit
Doks	Doksorubisin
Doks-KNT	Doksorubisin yüklenmiş karbon nanotüp
DT	Difteri toksini
DTG	Termogravimetrik türev analizi
DT-KNT	Difteri toksini yüklenmiş karbon nanotüp
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia Coli
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
eEF1	Ökaryotik elongasyon faktör 1
eEF2	Ökaryotik elongasyon faktör 2
FA	Fragment A
FB	Fragment B
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floreseinizotiyosiyanat
HPLC	Yükek basınç likit kromatografisi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HRTEM	Yüksek Çözünürlüklü Taramalı Elektron Mikroskobu
HT-29	İnsan kolon kanseri hücre hattı
HUVEC	İnsan göbek kordonu damar endotel hücresi
KNT	Karbon nanotüp
LB	Luria-Bertani
MDA-MB231	İnsan meme kanseri hücre hattı

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NGM	Nematode Growth Medium
NIH-3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
P/S	Penisilin/Streptomisin
PBS	Fosfat Tamponu
PBS-T	Fosfat Tamponu-Tween 20
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TAE	Tris- asetat etilen diamin tetra asetik asit
TBST	Tris tuz çözeltisi
TCA	Triklorasetik asit
TDNT	Tek duvarlı karbon nonotüp
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEMED	Tetrametilendiamin
TGA	Termogravimetrik analiz
TRITC	Tetra metil rodamin izotiyosiyanat
UV	Mor ötesi

ÖZET

Son yılların popüler nano parçacıklarından nanotüpler, ilaç veya molekül taşıma, tümör tedavisi, doku mühendisliğinde nano boyutta iskeletler oluşturma ve biyosensörlerde kullanılmaya başlanmıştır. Grafen yapı, tek bir silindirik tüp şeklini almışsa, tek duvarlı, iç içe silindirik tüplerden oluşuyorsa, çok duvarlı karbon nanotüp olarak tanımlanır. Biyouyumluluk testlerinde çok duvarlı karbon nanotüpler, daha olumlu sonuçlar verdiğinden, çalışmamızda çok duvarlı nanotüpler molekül/ilâç bağlanma-salınım mekanizmalarında kullanılmıştır. Nanotüpler farklı hücre soylarında toksisite testlerine tabi tutulmuştur. Toksisite testleri sırasında, MTT ve XCelligence gerçek zamanlı hücre analiz yöntemi deneyleri, floresan mikroskobu görüntüleri alınmış ve kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Toprakta yaşayan *Ceanorhabditis Elegans*'ta kısa ve uzun dönemde toksisite araştırması yapılmıştır. Toksik etki gösteren malzemelerden kaçma eğilimi gösteren nematodların, nanotüplerden kaçmadığı, üzerine yumurtalarını bıraktığı, hatta besi ortamında bulunan nanotüpleri yediği gözlemlenmiştir. Yüksek miktarda nanotüp uygulanan nematodların kalınlaştıkları ve yaşam süresinin değişmediği görülmüştür. Nanotüplerin, taramalı elektron mikroskonu ve yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu, Raman spektroskopisi, Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometresi, termogravimetrik analiz yöntemleri kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır. Sonrasında sığır serum albumin, difteri toksini ve doksorubisin yüklenerek, farklı memeli hücre hatlarında (MDA-MB-231, HT-29, HUVEC ve NIH-3T3) etkileri incelenmiştir. Karbon nanotübe bağlı toksinin, reseptör içermeyen fare kökenli 3T3 hücrelerine taşındığı, western blot ve ADP-ribozillenme deneyleri ile doğrulanmıştır. Karbon nanotüp-difteri toksini kompleksinin endositoz ile hücre içersine alındığı toksinin enzimatik aktivitesi olan A fragmentinin ökaryotik elongasyon faktörü 2'yi NAD varlığında ADP-ribozillediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Sığır serum albumin, difteri toksini, doksorubisin, karbon nanotüp, toksisite

Dinç B. Fonksiyonel Hale Getirilmiş ve Protein Bağlanmış Karbon Nano Tüplerin Biyolojik Ortamda Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. Doktora Tezi, İstanbul 2019. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 29833) ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2017/67) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Dinç B. Investigation of Functionalized and Protein Loaded Carbon Nano Tubes in Biological Environment. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Biophysics. Ph.D. Thesis, Istanbul 2019

Keywords: Bovine Serum Albumin, Diphtheria Toxin, Doxorubicin, Multi-Walled Carbon Nanotubes, Toxicity

Carbon nanotubes which are the popular nanoparticles of recent years have started to be used in drug or molecule transport, tumor treatment, nano-size skeletons in tissue engineering and in biosensors. The formation of a tubular graphene structure is single-walled carbon nanotube and nested graphene tubes are multi-walled carbon nanotubes. Since multi-walled carbon nanotubes gave more positive results in biocompatibility tests, molecular / drug binding-release mechanisms and biocompatibility of these structures were investigated in our study for multi-walled carbon nanotubes. The nanotubes were tested for toxicity in different cell lines. During toxicity tests, MTT and XCelligence real-time cell analysis assays were performed; fluorescence microscopy images were taken and compared with control groups. Short-term and long-term toxicity have been investigated in *Ceanorhabditis Elegans*. It has been observed that nematodes, which tend to escape from toxic materials, do not escape from nanotubes, lay their eggs on them, and even eat nanotubes in the medium. It was observed that the nematodes applied with high amount of nanotubes thickened and their survival did not change. Nanotubes were characterized by scanning electron microscope and high resolution transmission electron microscopy, Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectrophotometer, thermogravimetric analysis methods. The effects of bovine serum albumin, diphtheria toxin and doxorubicin on different mammalian cell lines (MDA-MB-231, HT-29, HUVEC and NIH-3T3) were investigated. Diphtheria toxin loaded carbon nanotubes was transported into receptor-free mouse-derived 3T3 cells, cellular uptake confirmed by western blot and ADP-ribosylation experiments. It was corrected that diphtheria toxin were carried into the cell and fragment-A which is enzymatically active part of the toxin was ADP-ribosylated the NAD in the presence of eukaryotic elongation factor 2.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbon nanotüpler (KNT) kimyasal dayanıklılıkları, doku ve kemikler için iskelet oluşturma potansiyelleri, geniş yüzey alanları, hücreye kolay girebilen yapıları ve üstün biyoelektriksel özellikleri sayesinde ilaç taşıma uygulamalarında ve biyosensör geliştirme araştırmalarında çok tercih edilen nano moleküller haline gelmişlerdir. Yaygın araştırmalar ve uygulama alanlarına rağmen, KNT'lerin hücresel olaylardaki etkileri, molekül taşıma işlemleri ve canlılardaki etkilerine yönelik çalışmalar hala oldukça önemli bir çalışma konusudur (1). Canlılarda uzun dönem etkileri ve toprağa yönelik etkileri konusunda oldukça az çalışma vardır. İlaç veya molekül taşıma için kullanılabilen KNT'lerin, tümör tedavisi, doku mühendisliğinde nano boyutta iskeleler oluşturma gibi kullanım alanları ortaya çıkmış ve biyosensör çalışmalarında önemli ilerlemeler sağlamışlardır. KNT'lerin araştırma ve uygulamalarda kullanılabilmesi için çözünürlükleri ve biyouyumlulukları arttırılmaya çalışılmıştır. Bunun için kovalent ve non-kovalent işlevselleştirme yöntemleri denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (2,3). Bu sonuçlar elde edilirken TEM ve SEM görüntüleri alınmış, Raman ve FTIR spektroskopisi ile karakteristik özellikleri belirlenmiştir (4,5). Termogravimetrik analiz yöntemleri sayesinde KNT'lerin yapılarında kullanılan metaller ya da farklı malzemeler, dayanıklılıkları, çok ya da tek duvarlı olmaları değerlendirilebilmiştir (6). Bu değerlendirmeler sonucunda, kanser ilaçları, vitaminler, proteinler, DNA plazmitleri gibi çok sayıda farklı molekülün KNT'lere yüklenmesi ve hücreye iletilmesi çalışmaları hız kazanmıştır (7). Çok duvarlı KNT'lerin (ÇDNT) tek duvarlı KNT'lerden (TDNT) daha az toksik özellik gösterdiği, molekül bağlama kapasitelerinin daha yüksek olduğu ve kısa ÇDNT'lerin de uzunlardan daha az toksik etki gösterdiği yapılmış bir çok araştırmada gösterilmiştir (8). Bu nedenle bu tez kapsamındaki çalışmada, kısa ve uzun TDNT'lerin biyouyumlulukları denenmesi sonrasında daha az toksik özellikte olan kısa ÇDNT'lerle devam etmesi amaçlanmıştır. KNT'lerin toksik etkilerinin, topraktaki yaşayan canlı bir organizmada belirlenmesine yönelik çalışmalar da önem arz etmektedir. Bu çalışmalar sayesinde KNT'lerin çevresel toksisiteleri, canlı davranışları üzerine etkileri, organlardaki birikimleri ve vücuttan atılımının gözlemlenmesi mümkün olmakla birlikte yumurta sayılarındaki değişikliklerin, hem üreme hem de topraktaki sayılarındaki azalmaya yönelik sonuçların da elde edilmesini sağlar. Bir nano parçacık olan KNT'lerin yaygınlaşması ve toprağa karışması halinde ne gibi etkilere yol açacağı

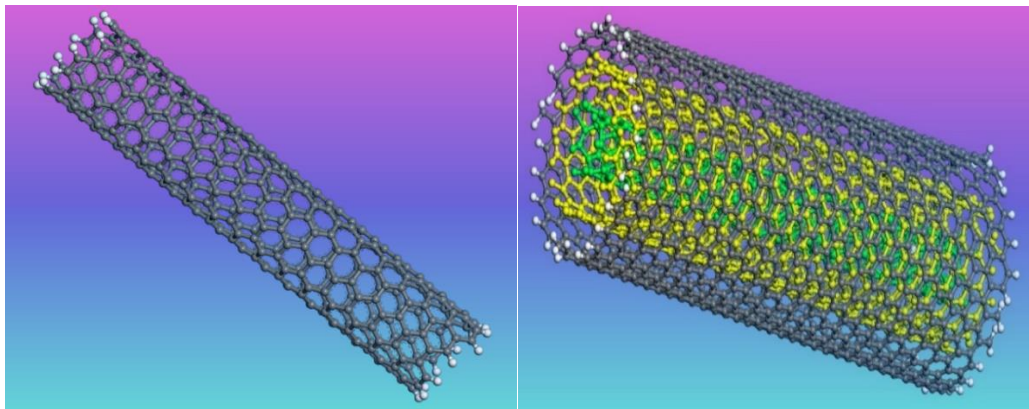
bilgisini de elde etmek mümkün olacaktır. Toprakta yaşayan bir canlı olan *Ceanorhabditis elegans*'da (*C. elegans*) bu tip çalışmalar için kullanılarak üzerinde benzer toksik etki araştırmaları yapılmıştır (9). *C. elegans*'da ÇDNT'lerin değişimlerinin incelenmesi de bu tez kapsamında gerçekleştirilecek, çoğalma, yumurtlama, boy ve enlerindeki değişimler değerlendirilecektir. Kanseri ilaçlarının tümörlü dokulara iletilmesinde en önemli sorun, ilacın dokulara verimli bir şekilde iletilememesi ve sağlıklı dokularda toksik etkilere yol açmasıdır. Bu nedenle KNT'ler ilaç taşıma araştırmalarında geleceğe yönelik hedef ilaç tasarımlarında yeni bir umut olarak karşımıza çıkmıştır. Farklı özelliklerdeki KNT'ler sayesinde ilacı bazik ortamda daha iyi bağlayıp, tümör hücrelerinin asidik ortamında salabilmeleri, sıcaklığa bağlı olarak ilaç salınımı veriminin artması bu alana yönelik araştırmaların artmasına sebep olmuştur (10). Ayrıca KNT'lerin molekül bağlama çalışmaları, biyosensör araştırmalarının da temelini atmıştır. KNT'lerin ilaç yükleme oranları spektroskopik yöntemlerle ve termogravimetrik analiz (TGA) yöntemi ile çözünme sıcaklığına bağlı olarak saflık ve kalite ile ilgili de bilgi verebilmektedir. Bu yöntemler saf ve işlevselleştirilmiş KNT'lere (iKNT) ayrı ayrı uygulanıp, birbirleri ile karşılaştırılmalarını ve işlevselleştirme işleminin başarısını da doğrulamaktadır (11,12). Bu çalışma kapsamında da hem KNT'lerin hem de molekül bağlanmış KNT'lerin spektroskopik, mikroskopik ve termal yöntemler kullanılarak karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. KNT'ler kontrollü ilaç taşımada, yeni bir umut olarak karşımıza çıkmıştır. Dayanıklı yapıları, hücreye girebilme kabiliyetleri, ilaç taşıma ve bağlayabilme kapasiteleri, sıcaklık, pH, manyetik alan gibi etkenlerle, ilaçların yönlendirilebiliyor ve salınabiliyor olmaları, akıllı ilaç tasarımları alanında araştırmacıları cezbetmiştir. Çok geniş bağlanma yüzeylerine sahip çok iyi bir taşıyıcı olan KNT'leri toksik özelliklerini azaltarak biyoyumlu bir hale getirebilmek bu alandaki çalışmalar için oldukça önemlidir. Bu sebeple hücre, doku ve organ düzeyinde toksik etkilerine yönelik çok sayıda araştırma yapılmaya devam etmektedir. Birçok çalışmada yapılan hayvan deneylerinde, KNT'lerin vücutta birikmediği ve vücuttan renal yollarla atıldığı belirlenmiştir (13).

Bu tezde ÇDNT'lerin toksik etkileri hücre hatlarında yapılacak olan deneyler kapsamında, *in vivo* ve *in vitro* taşıma mekanizması ve kapasiteleri, *in vivo* etki mekanizmaları, canlı bir organizma olan ve bir organ sistemine sahip olan *C. elegans* üzerinde organ ve çevresel toksite üzerindeki etkileri deneysel ve kuramsal yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

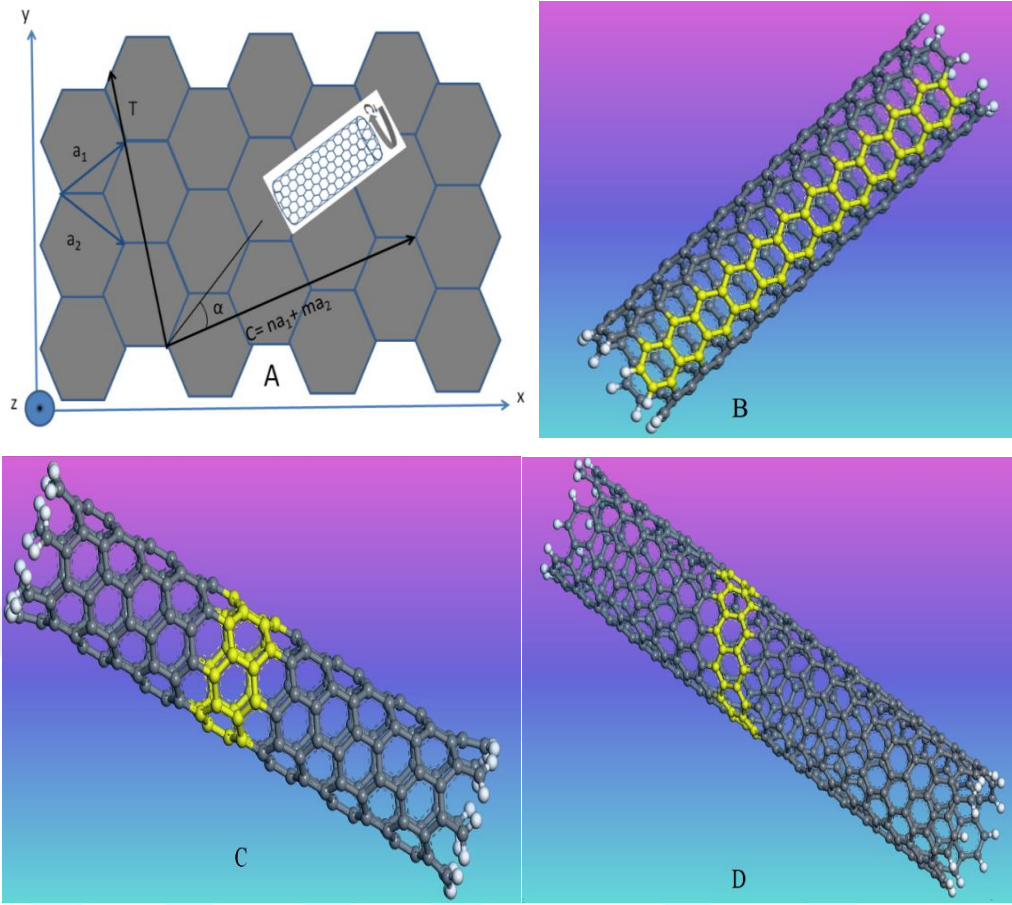
2. GENEL BİLGİLER

2.1.Karbon Nanotüpler

Yaşam elementi karbon, tarihten bu yana enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Karbonun yeni ve özel bir formu olan karbon nanotüpler (KNT) son 30 yılda medikal ve endüstriyel alanlarda yaygınlık kazanmış ve geniş araştırmacı kitlelerine hitap etmiştir. Karbon atomlarının bal peteği benzeri yapıda örülmesi ile oluşan bu yapı çelikten daha sağlamdır (14). Fulleren molekülü silindirik yapıya bürünerek KNT'leri oluştururlar (15). KNT'lerin dünya pazarındaki payı 2014'te 159, 2016'da 168, 2019'da 670 milyon dolara ulaşmıştır (16). KNT'ler yüksek elektriksel iletkenlik değerleri ile biyosensör uygulamalarında, üstün optik özellikleri ile yeni görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesinde, geniş yüzey alanları ve hücresel alımları nedeni ile ilaç taşıma araştırmalarında geniş yer edinmişlerdir. Kovalent ve non-kovalent işlevselleştirme işlemleri sonrası biyouyumlulukları değiştirilebilmekte ve sulu ortamdaki çözünürlükleri arttırılabilmektedir. İlaç taşıma araştırmalarında, KNT'lere apoptik ajanlar yüklenerek biyolojik ortamda denemeleri yapılmıştır. KNT'lerin diğer ilaç taşıyıcılara olan üstünlüğü, lipozom ve nanoparçacıklarla kıyaslandığında çok daha fazla molekülü yüklenebilme kapasitesine sahip olmalarıdır. İğne benzeri yapıları ile hücreye farklı mekanizmalarla kolayca girebilmeleri, ilacın ulaştırılmak istendiği hedef bölgeye, çevre dokulara minimum hasar vererek ulaşabilmesini sağlamaktadır (17). Karbon örgüsünün tüp benzeri silindirik yapısı eğer tek bir yaprağın örgüsünden oluşuyorsa, yapısal olarak tek duvarlı KNT (TDNT) olarak, üst üste birden fazla yaprağın farklı yarıçaplarda, iç içe tüp yapısı oluşturması ile oluşuyor ise çok duvarlı KNT (ÇDNT) olarak gruplandırılır (Şekil 1). TDNT'lerin çapları 0,4-2 nm aralığındayken ÇDNT'lerinki ise 2-100 nm aralığındadır (18).



Şekil 1 : Tek ve çok duvarlı KNT'ler. Tek duvar (sol), çok duvarlı (Sağ).



Şekil 2: Dönme açılarına bağlı KNT çeşitleri. (A) Kiral vektörün açı ve birim vektörleri, (B) koltuk, (C) zikzak ve (D) kiral KNT.

Karbon örgünün tüp yapısı oluştururken, farklı dönme açılarına sahip olmalarıyla koltuk, zikzak ve kiral olarak bilinen KNT çeşitleri elde edilir (Şekil 2). Kiral vektör $\vec{C}$, dönme açısındaki değişiklikleri ifade etmek için kullanılır ve latis örgünün sarmal yapısını gösterir. T latis vektörü, a_1 ve a_2 kiral vektörün birim vektörleri, α dönme açısı ve kiral vektör $\vec{C} = na_1 + ma_2$ olmak üzere; m ve α sıfır ise koltuk yapıda, n ve m birbirine eşit ve $=30^\circ$ ise koltuk ve $0 < |\alpha| < 30^\circ$ ise kiral yapıdadır. Ayrıca “ n ve m ” sayıları KNT’lerin yapısal özelliklerini de belirler. Denklem (2-1) kullanılarak, bu tam sayılardan KNT’lerin yarıçapları hesaplanabilmektedir.

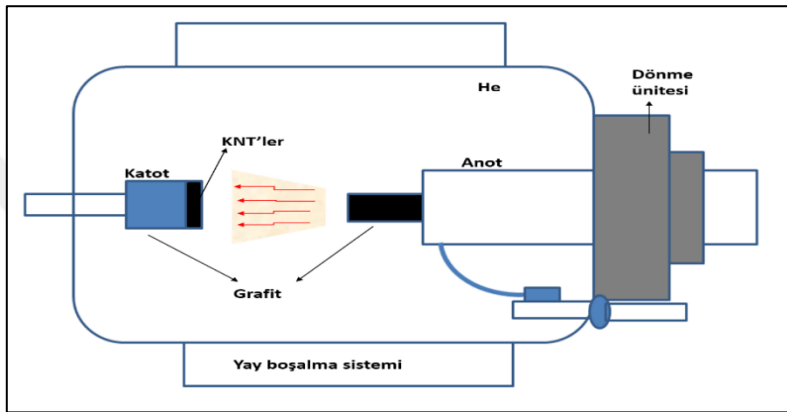
$$d_t = a_{cc} \sqrt{3} \frac{\sqrt{m^2 + mn + n^2}}{\pi} \quad (2-1)$$

“ a_{cc} ” karbon-karbon bağının uzunluğudur ve 0,142 nm olarak bilinir. $n-m$ farkı 3’e tam bölünüyorsa iletken KNT, tam bölünmüyorsa yarı iletken KNT yapıyı ifade eder (19).

2.2. Karbon Nanotüplerin Sentezlenmesi

2.2.1.Yay Boşaltma Yöntemi

KNT'lerin sentezlenmesinde kullanılan ilk yöntem yay boşaltma yöntemidir. Bu yöntemle ilk üretimi Japon bilim insanı Iijima tarafından yapılmıştır. Yöntemde elektrik akımı kullanılmakta ve ortamdaki gaz plazma oluştururken elektriksel olarak boşalmaktadır. Yöntem ismini bu elektriksel boşalma durumundan almaktadır. Sonrasında kimyasal sentez yöntemleri ve laser ablasyon yöntemleri geliştirilmiştir (20).

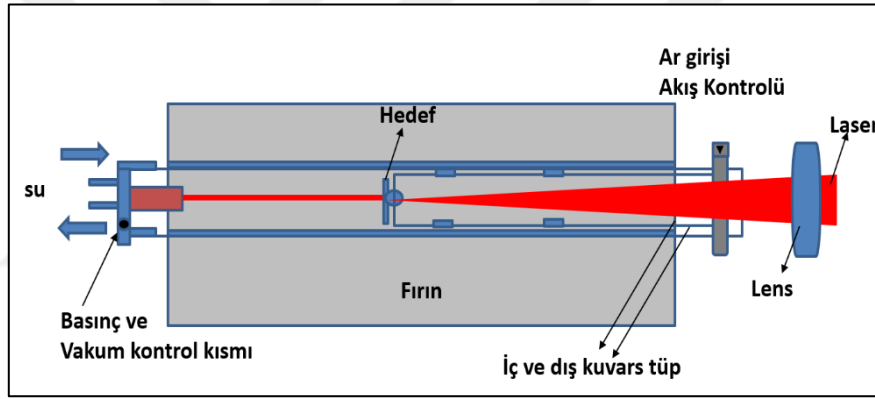


Şekil 3: Yay boşaltma sistemi.

Yay boşaltma sisteminde, çelik bir gövde içerisinde, dönme ünitesi, anot ve katot uçları görülmektedir (Şekil 3). Sistemde elektrotların doğrultusu yataydır ancak sistem dikey doğrultuda da çalıştırılabilmektedir. Anotta grafit elektrot yer alır, ayrıca bu kısım hareketli bir dönme ünitesine bağlıdır. Grafit ucunda, öncül olarak kullanılan karbon toz yer alır. Katot kısmında ise saf grafit çubuk bulunur, burada sabit basınçta gaz da yer alır. Elektrik akımı uygulandıktan sonra, dönme ünitesi hareket eder, anot ve katot birbirine 2 mm'ye kadar yaklaştırılarak, elektriksel yay benzeri bir boşalma sağlanır. Bu boşalma sırasında ortaya çıkan akım, öncül karbon tozlarının doğrudan gaz fazına dönüşmesini sağlayan 1000 °C'nin üzerinde sıcaklıklarda bir plazma oluşturur. Buharlaşan karbon, katoda ilerler ve elektriksel boşalma sonrası oluşan bu buhar boşalması, soğutma sistemi de barındıran katoda sürüklenir. Siyah is olarak toplanan yapılar KNT'lerdir (21,22).

2.2.2. Laser Ablasyon Yöntemi

Laser ablasyon sisteminde, gövdenin içinde grafit ve metalden oluşan bir hedef vardır ve sistemde uygulanan basamaklar yay boşalma ile benzerdir. Buharlaşıma, elektriksel bir boşalma ile değil, hedefe uygulanan laserin enerjisi ile sağlanır. Daha kontrollü bir üretim yapılmasını ve daha iyi kalitede KNT'ler üretilmesini sağlayan bir sistemdir. Grafit ve metalden oluşan hedefte, % 1-2 gibi düşük oranlarda Ni ya da Co metal parçacıklar bulunur. 6000 Pascal'ın üzerinde sabit basınç değerinde, sabit inert gaz akışı sağlayan kuvars tüpler, 1200 °C'ye kada yüksek sıcaklıkta fırın gibi işlev gören gövdeye sabitlenmiştir. Grafit hedefe düşen laser ışınları, inert gas aracılığı ile bölgeden uzaklaştırılır. Soğutma sistemi bulunan kısma ulaştırılan malzemeler, sentezlenen KNT'lerdir (Şekil 4) (23,24).

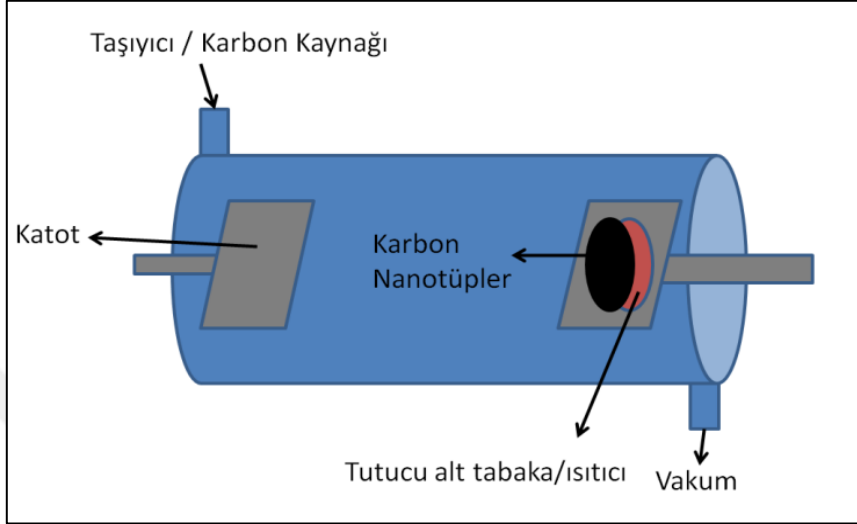


Şekil 4: Laser ablasyon yöntemi.

2.2.3. Kimyasal Buhar Biriktirme Yöntemi

Kimyasal sentez yöntemlerinden biri olan kimyasal buhar biriktirme (CVD) yönteminde diğer yöntemlerde olduğu gibi, gövdenin içinde katot ve diğer uçta karbon kaynağının olduğu kısım yer alır. Diğer yöntemlerde olduğu gibi bu yöntemde de, hedef, katalizör, karbon kaynağı ve sentez süresi, KNT yapısını ve miktarını etkiler (Şekil 5). CVD yönteminde, % 1-2 gibi düşük yüzdelerde, tutucu alt tabakayı oluşturan, Fe, Co ve Ni benzeri metal katalizörler kullanılır. İşlem atmosferik basınçta gerçekleştirilir. 1200 °C'yi bulan yüksek sıcaklıklarda, taşıyıcı olarak asitilen ve metan gibi hidrokarbon gazları kullanılır. ÇDNT'ler, 900-1200 °C sıcaklıklarda ve TDNT'ler ise 600-900 °C sıcaklıklarında elde edilir. Katalizörde öncü olarak bulunan parçacıklar ile, KNT'lerin yarıçapları arasında uyum vardır. Üretim sistemlerinin yapısı KNT'lerin tür, boyut ve yarıçaplarının kontrol altında tutabilmemizi sağlar.

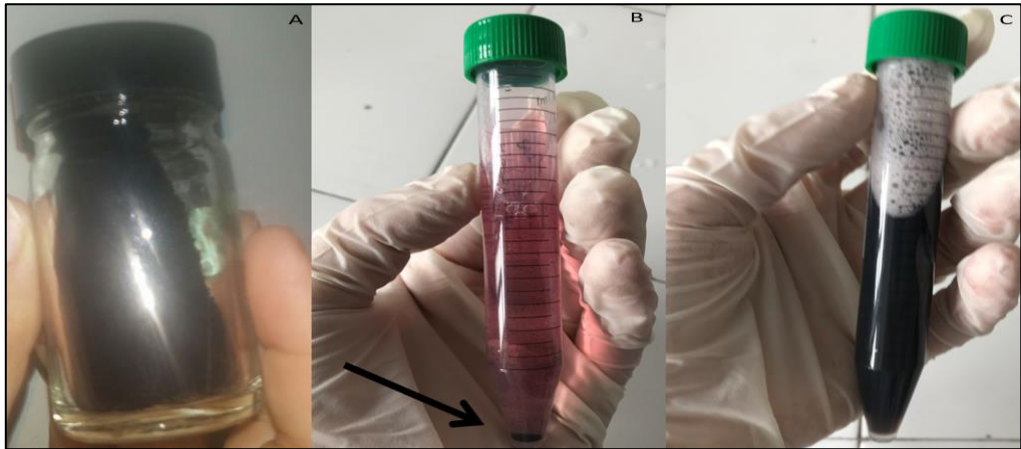
Kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için, gövdede öncü gazlar ve katalizörler dışında, tutucu alt tabakada öncü karbon da yer alır. Katalizör türü, karbon kaynak, ortamdaki gaz ve sıcaklığa bağlı olarak farklı özelliklerde, tutucu tabakanın yüzeyinde toz formda KNT'ler oluşur (22,25).



Şekil 5: Kimyasal buhar biriktirme yöntemi sistemi.

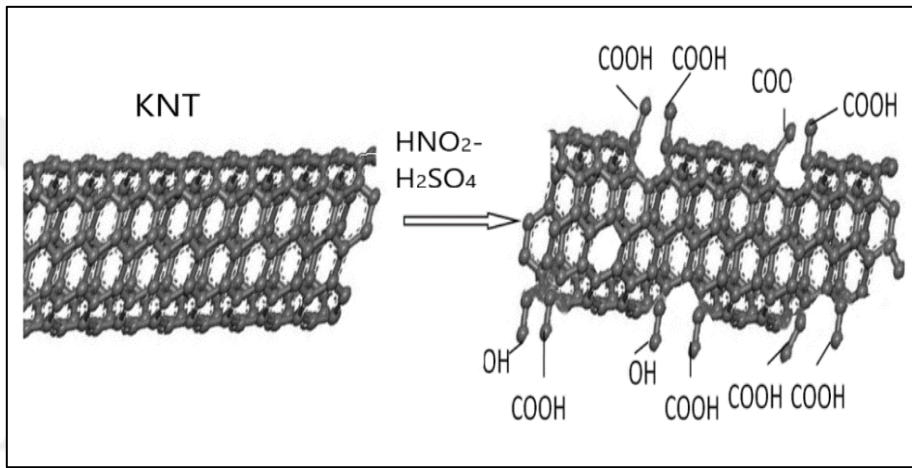
2.3. Karbon Nanotüplerin İşlevselleştirilmesi

KNT'ler biyoyumluluk ve çözünürlüklerinin artırılmak istenmesi nedeniyle, işlevselleştirme işlemlerine tabii tutulmaktadır. Üstün fiziksel ve kimyasal özellikleri olan bu yapıların işlevselleştirilmesi, biyomedikal araştırmalarda ve uygulamalarda kullanımını mümkün kılmıştır. İşlevselleştirme işlemleri kovalent ve non-kovalent olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilir (26,27).



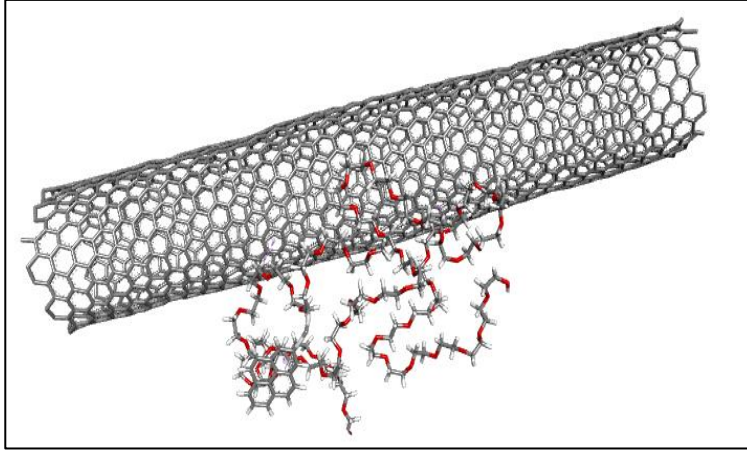
Şekil 6: Çözünmüş KNT görünümü. (A) Toz KNT'lerin görünümü, (B) KNT'lerin hücre mediumunda görünümü, (C) sonikasyon sonrası İKNT'lerin görünümü.

İşlevselleştirme işlemleri KNT'lerin boylarının da ksalmasını sağlar. Saf ve işlevselleştirilmiş ÇDNT'lerin 10 dakika boyunca eşit güç ve sürede sonikasyon sonrası 30 dak. bekletilmiş görüntüsü yer almaktadır (Şekil 6). Saf KNT'lerin tekrar agreg oldukları, işlevselleştirilmiş olanların mediumdaki homojen dağılımlarını sürdürdükleri görülmüştür. Kovalent işlevselleştirmede, KNT'lerin farklı asit karışımları ile yüksek sıcaklıklarda farklı sürelerde muamele edilmesi ile gerçekleşir. Bu işlevselleştirme işlemi sonrası, KNT'lerin yüzeyinde karboksil (-COOH) grupları oluşur ve kapalı olan uçlar açılır (Şekil 7). Karboksil gruplarına, peptitler, hidrofilik polimerler ve nükleik asitler bağlanabilir.



Şekil 7: KNT'lerin kovalent işlevselleştirilmesi.

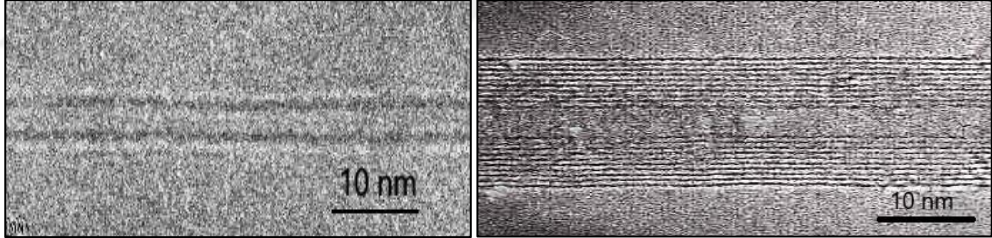
Non-kovalent işlevselleştirme işlemlerinde KNT'lerin yapısı bozulmadan, yüzeylerine ve uçlarına, çözünürlük ve biyouyumluluklarını arttıran moleküller yüklenir. Bu moleküller küçük moleküllerden polimerlere kadar değişebilen amfifilik moleküllerdir (Şekil 8). Non-kovalent işlevselleştirme işlemleri, yüklenmek istenen molekül çeşidine göre, +4 °C, oda sıcaklığı veya daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir. Yüklenmek istenen moleküllerle KNT'ler farklı pH değerlerinde sonikatörde veya çalkalayıcıda birlikte muamele edilir (28).



Şekil 8: KNT'lerin non-kovalent işlevselleştirilmesi.

2.4. Karbon Nanotüplerin Karakterize Edilmesi

KNT'lerin karakterize edilmesinde, elektron mikroskobu görüntülerinin alınması (Şekil 9), Raman ve FTIR gibi spektroskopik yöntemlerle karakteristik bantlar elde edilmesi, Termogravimetrik Analiz ile sıcaklığa bağlı kütle kaybı grafiklerinin elde edilmesi, Zeta potansiyellerinin ölçülmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

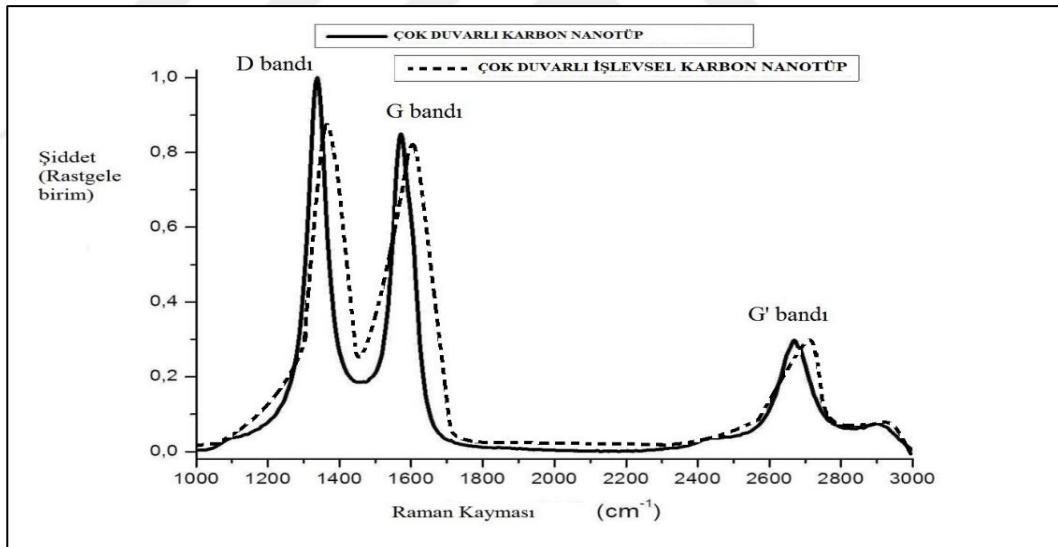


Şekil 9: Tek ve çok duvarlı KNT'lerin TEM görüntüleri. Tek duvarlı (sol), çok duvarlı (sağ)

TEM görüntüleri aracılığı ile, KNT'lerin kaç duvarlı oldukları, yüzey yapılarının düzgün olup olmadığı, işlevselleştirme işlemleri sonrası yüzeyinde ne gibi değişiklikler olduğu, ayrıca farklı bölgelerinden çok sayıda alınan görüntüler incelenerek, bu resimlerde örneğin yapısal benzerliklerine bakılarak, saflık dereceleri hakkında da bilgi elde edilebilir (29). Tek ve çok duvarlı KNT'lerin TEM görüntüsü görülmektedir (Şekil 9). Raman spektrumlarına bakarak KNT'lerle ilgili farklı karakterizasyon değerlendirmeleri yapmak mümkündür. TDNT ve ÇDNT'lerin Raman spektrumları çoğu zaman benzer dalga sayısı değerleri verirler; bu nedenle ayırmak zordur.

Raman spektrumu ile, simetrik kovalent bağlardaki değişimler, C-C bağlarının analizleri ve yapıdaki düzensizlikler hakkında bilgi sahibi olunabilir. KNT'ler grafen yapının, silindirik bir tüp oluşturması ile ortaya çıktığından, benzer bant değerleri ortaya çıkarırlar. G bandı olarak isimlendirilen bant 1582 cm^{-1} , D bandı olarak bilinen karakteristik bant ise 1332 cm^{-1} 'de tepe verir. Ayrıca bu bantlar, KNT'lerle ilgili bazı özgün bilgiler de barındırır. Örneğin yarı iletken ya da metalik KNT'lere göre değişen G bandı genişliği vardır. Asitlerle muamele edilerek yüzeylerinde karboksil grupları ve düzensizlikler oluşturulan KNT'lerde D bandı şiddeti zayıflar. Karakterizasyon aşamasında, G ve D bantları karşılaştırılarak, işlevselleştirme derecesi ile ilgili de bilgi alınır. Bu bantların oranları ile düzensizlik modu (DM) olarak adlandırılır (2-2) ve bu oran yapısal bozukluğun bir ölçüsüdür. G bant şiddeti, ÇDNT'lerde daha küçüktür (19,30).

$$DM = \frac{I_D}{I_G} \quad (2-2)$$

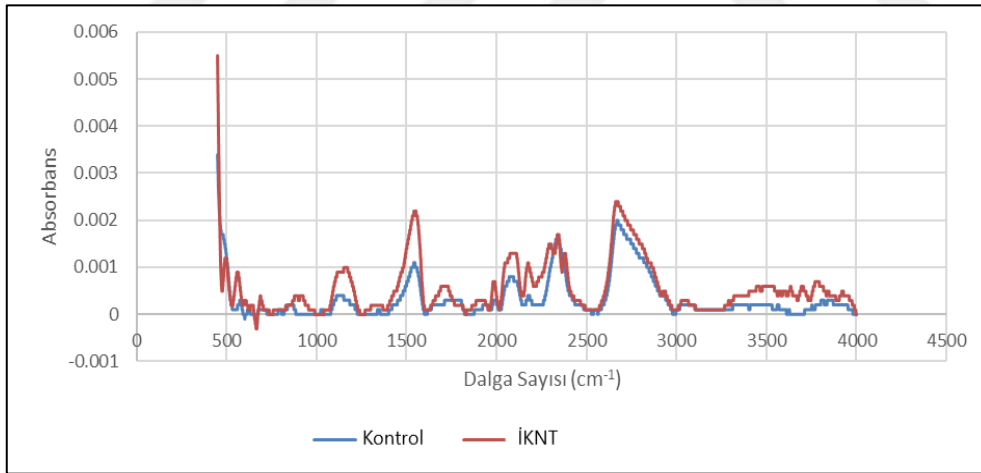


Şekil 10: İşlevselleştirilmiş KNT'lerin Raman spektrumu.

Daha öncesinde yapılan karakterizasyon çalışmaları incelendiğinde, G bandının D ve G' bantları ile kıyaslandığında daha yüksek şiddette bantlar ortaya çıkardığı görülmüştür. ÇDNT'lerde bu bantlar birbirine daha yakın şiddette ya da D bandı daha yüksek şiddette izlenmektedir. Saf ve kuvvetli asitlerle muamele edildikten sonra işlevsel hale getirilmiş KNT'lerin Raman spektrumu görülmektedir (Şekil 10). D bandı ve G bantlarında belirgin şiddet farkları olmadığı görülmektedir. Bu spektrumun ÇDNT'e ait olduğu buradan anlaşılabilir. Ancak ÇDNT'lerde sadece Raman spektroskopisi ile karakterizasyon yapmak

yerine TEM görüntüleri ile de çok duvarlı yapının ve yarıçapın doğrulanmasının daha uygun olduğu bilinmektedir (31). 1353 cm^{-1} 'deki D bandı, sp^3 bağları; 1589 cm^{-1} 'deki G bandı ise C-C germe durumunda, sp^2 bağları ile ilgili bilgi verir. D bandı KNT'nin grafen yapısındaki düzensizlik ve simetri bozukluklarının bir ölçüsüdür. DM'deki artış da işlevselleştirme işlemi sonrası yüzeydeki düzensiz ve bozuk yapıların ve hatta açık uçların arttığının göstergesidir. İşlevselleştirilmiş ÇDNT'lerin D bandının daha yüksek şiddette olması gerekirken, saf olandaki düzensizliklerin daha yüksek D bandı ortaya çıkardığı görülmektedir (Şekil 10). G bandı yarı iletken KNT'lerde metalik olanlardan daha dar bir dalga sayısı alanı ortaya çıkarır (31-35).

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), az miktarda toz KNT ile bilgi alınabilen ve KNT'lere zarar vermeyen ve kızılötesi ışığın moleküller tarafından emilimi ile atomların sırası, büyüklüğü ve şekli ile ilgili bilgi sağlayabilen bir yöntemdir. Saf ve işlevselleştirilmiş KNT'lerin FTIR spektrumları farklı tepeler verir ve karşılaştırılmalarını yapmak mümkün olur. Ayrıca non-kovalent işlevselleştirme sonrasında, yüzeylere adsorbe olan moleküllerle ilgili de bilgi elde etmek mümkündür.

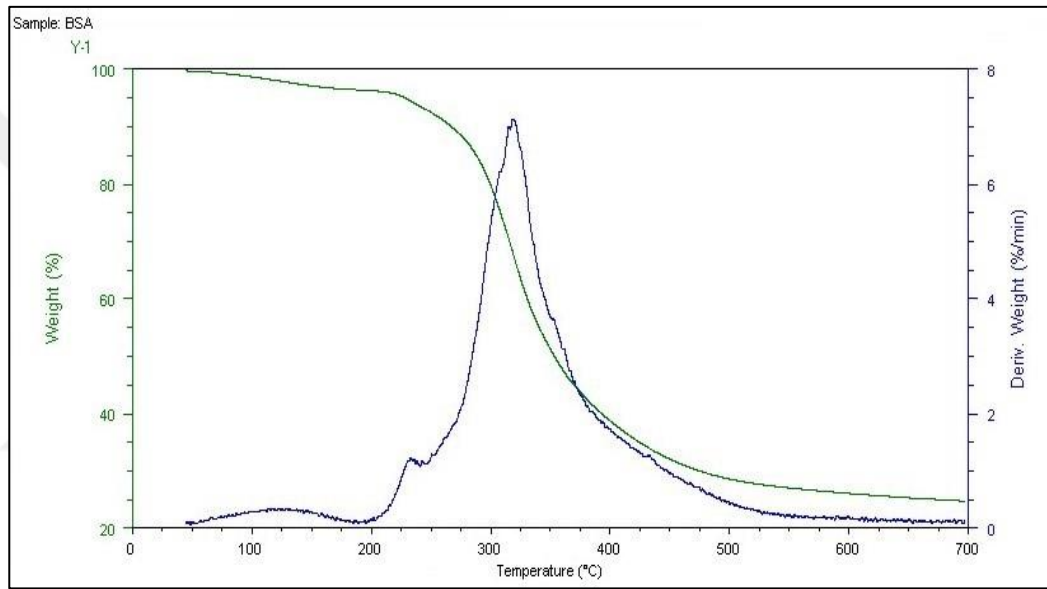


Şekil 11: İşlevselleştirilmiş KNT'lerin FTIR Spektrumu.

ÇDNT'lerin FTIR'da yapısal özelliklerine göre ortaya çıkan birkaç karakteristik tepe vardır. ÇDNT'lerin iç içe tüpler içeren yapısı nedeniyle TDNT'lere kıyasla daha çok tepe verirler ve daha geniş bantlar ortaya çıkarırlar. 1150 cm^{-1} 'deki tepe C-O bağlarını ifade eden tepedir ve İKNT'de daha yüksek tepe vermiştir. Bu da yüzeyde C-O gruplarının oluştuğunun bir göstergesidir. 3500 cm^{-1} 'de görülen geniş bant da aynı şekilde İKNT'lerde O-H germe modunu temsil ettiğinden daha yüksek değerde olmalıdır ve

beklenenden farklı olarak saf olanda daha yüksek şiddette olduğu görülmektedir (Şekil 11).

Hem İKNT hem de saf KNT'lerin altıgen yapısını doğrulayan tepe 1580 cm^{-1} 'de yer almaktadır. İKNT'lerde daha yüksek şiddette olduğu görülen 3500 cm^{-1} 'den sonra elde edilen tepeler işlevselleştirmenin bir sonucu olarak O-H gerilmesini ifade eder. Bu tepelerin $2000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ arasındaki bölümleri tetrahedron yapıda C-C bağları için karakteristik titreşim tepeleridir. Saf KNT'ler içinde C-O ve O-H bağlarına ait tepe değerleri izlenmesi, saf KNT'lerin, yapısal safsızlıklara sahip olduğu bilgisini verir (25,36,37).



Şekil 12: Sığır serum albümini termogravimetrik analizi

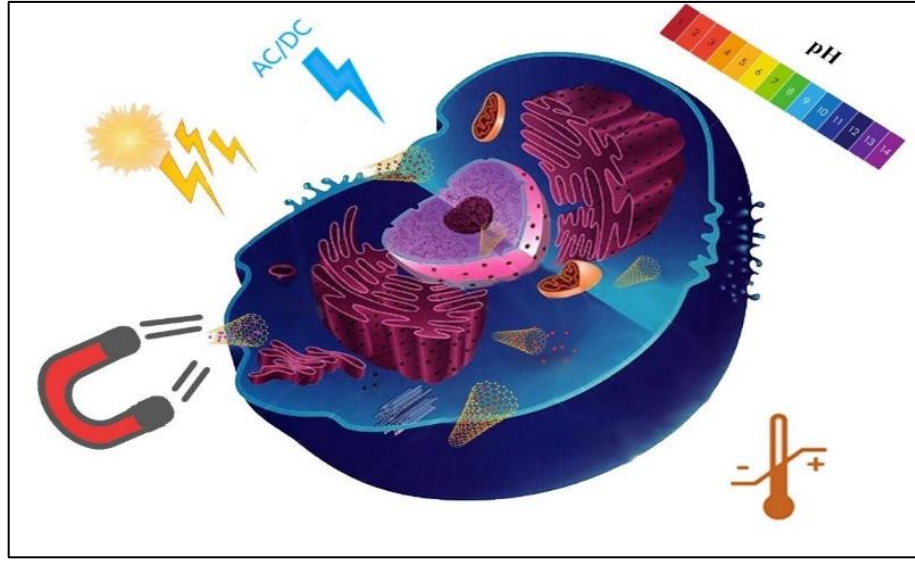
Bir diğer yaygın karakterizasyon yöntemi termogravimetrik analiz (TGA)'dır. Bu yöntemde bozunma sıcaklığına bağlı olarak, malzemenin saflığı ve kalitesi hakkında bilgi elde edilebilir. Ayrıca KNT'lerdeki karbon-metal oranı, duvar sayısı, yüzeydeki bozukluklar ve sentez sırasında kullanılan katalizörler hakkında da bilgi edinilebilir.

Ayrıca molekül yüklenen KNT'lerin sıcaklığa bağlı ağırlık kayıpları, molekülün kendi bilgisi ve molekül yüklenmemiş KNT'ler ile karşılaştırılarak, bağlanmanın ne oranda gerçekleştiği bilgisi elde edilebilir (6). Sığır serum albümininin sıcaklığa bağlı bozunma eğrisi görülmektedir (Şekil 12). Bu eğriden hesaplanan termogravimetrik türev eğrisi (DTG), hangi sıcaklıklarda daha belirgin kütle kayıpları yaşandığını ve buna bağlı olarak,

endositozdan bağımsız yolak: ilaç bağlanmış fonksiyonel karbon nano tüplerin membrandan doğrudan geçişi, 10)'da ilacın serbest bırakılması sonrası ve (3,11) KNT'lerin dışarı atılması gösterilmektedir. KNT'lerin hücreye alımında endositozun etkili olduğu ve bunu reseptör aracılı ya da aracısız olarak gerçekleştirilebildiği bilinmektedir. Ayrıca difüzyon, membran füzyonu ve porlardan girebildiği de görülmüştür. Hücre içine girmede boyut, yüzeydeki işlevsel gruplar, biyouyumluluk, hidrofobiklik gibi faktörlerle de bağlantılı olduğu görülmüştür. Bu nedenle işlevselleştirme CNT'lerin hücresel alımını arttırmaktadır (41,42). Endositozla içe alımda, enerji ve sıcaklığa bağlı olarak vezikül oluşturma, fagositozla ve pinositozla clathrin ve caveolin kılıfları ile hücreye alım söz konusudur. Reseptör aracılı endositozda, molekül yüklü KNT'ler membran reseptörüne bağlanır ve hücreye alımları reseptör-ligand kompleksi halinde olur. Hücre içinin farklı pH'ına göre de ligand reseptörden ayrılır. Veziküllerin lizozomlarla birleşmesi ile molekül salınımı olur ve KNT dışarı atılır (38,39). Reseptör aracılı olmayan endositozda, plazma membranının küçük bir parçası molekül yüklü KNT'yi kuşatır ve hücre içine salınma sonrası, endozomlar lizozomlara dönüşür, KNT dışarı atılır (38,40). Hücre membranından KNT'lerin doğrudan geçişine nano iğne mekanizması denir. Bu mekanizma difüzyon, membran füzyonu ve porlardan doğrudan geçişini ifade eder (42-44).

2.6. KNT'lerin Hücreye Alımını Etkileyen Faktörler

KNT'ler aracılığı ile kontrollü ilaç salınımında pasif hedefleme yapılarak, birbirleri ile arasındaki mesafe daha fazla olan endotel hücrelerde, taşıyıcının daha fazla içeri alınması söz konusudur. Hidrofobik yapıdaki KNT'ler dolaşımında daha uzun süre kalırlar ve bu da ilacın bölgede daha uzun süreli salınımında etkili olur. Aktif hedefleme olarak ise KNT'nin yüzeyine tümör hedefleyen ajanlardan biri yüklenir, böylece tümörlü doku hedeflenir ve tümör hücreleri tarafından ilaç seçilir (45,46). Kontrollü ilaç salınımı, iç ve dış uyaranlara bağlı olarak da gerçekleşebilir. Sıcaklık, pH değişimi, manyetik alana, ışığa ve elektriksel alana maruz kalma Şekil 14'de gösterildiği gibi hücrede ilaç salınımında etkili olan uyaranlardan başlıcalarıdır.



Şekil 14: Uyarıcı varlığında KNT'lerin kontrollü ilaç salınımı.

Enzim aktivitesinde ve redoks potansiyeli değişiklikleri de hücre içi salınımında etkili olan uyarıcılardır. Sıcaklık artışının ilaç salınımını arttırdığı görülmüştür. Dışarıdan uygulanan manyetik alanın da ısı üreterek hipotermiye sebep olması sonucunda ilacın salınımı gerçekleşir. Elektriksel alan etkisi, KNT'lerin iyi iletkenlik değerlerine sahip olması nedeniyle, yine sıcaklık artışı etkisi ile, ilacın salınımını hızlandırır. Işık etkisi, foton enerjisinin KNT'ler tarafından emilmesi ile bağların kopması ya da reaktif oksijen türlerinin oluşması sonucu gerçekleşir. Tümör hücrelerinin normal hücrelere göre daha düşük pH değerlerine sahip olduğu bilinmektedir. KNT'lerin bazik ortamda ilacı daha çok yüklenip, asidik ortamda salması pH'a bağlı ilaç salınımını mümkün kılmaktadır. Hücrenin iç ve dışında redoks potansiyelindeki değişim de ilaç salınımı için uyarıcı oluşturmaktadır. Enzimlerin yapısal değişiklik ya da bozunmaya yol açtığı nanoparçacıklar da enzim etkisi ile salınım yapmayı sağlarlar (47). KNT'ler aracılığı ile kontrollü ilaç salınımında pasif hedefleme yapılarak, birbirleri ile arasındaki mesafe daha fazla olan endotel hücrelerde, taşıyıcının daha fazla içeri alınması söz konusudur. Hidrofobik yapıdaki KNT'ler dolaşımında daha uzun süre kalırlar ve bu da ilacın bölgede daha uzun süreli salınımında etkili olur. Aktif hedefleme olarak ise KNT'nin yüzeyine tümör hedefleyen ajanlardan biri yüklenir, böylece tümörlü doku hedeflenir ve tümör hücreleri tarafından ilaç seçilir (43,44). Kontrollü ilaç salınımı, iç ve dış uyarıcılara bağlı olarak da gerçekleşebilir. Sıcaklıktaki ve pH'daki değişim, manyetik alana maruz

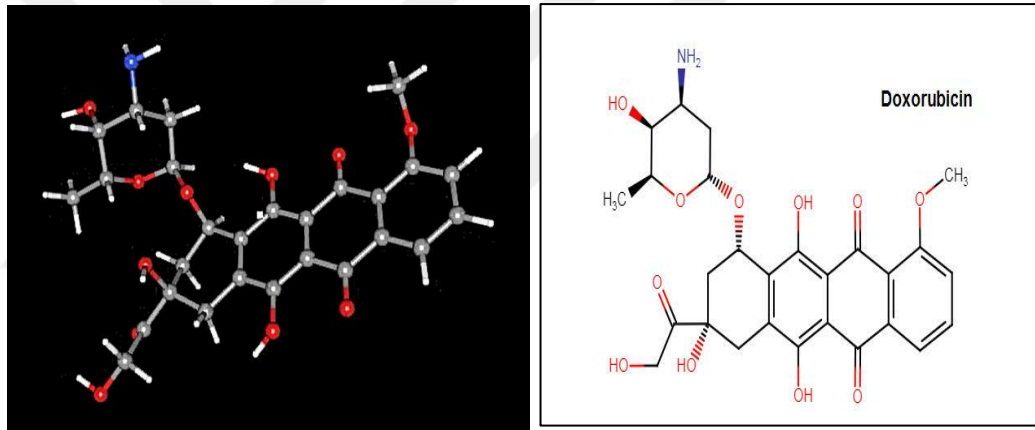
bırakılma, ışığa maruz kalma ve elektriksel alana maruz kalma hücrede ilaç salınımında etkili olan uyaranlardan başlıcalarıdır (Şekil 14).

2.7. KNT'lerin Toksisitesi

Saf KNT'ler sıvı ortamda çözünmezler ve medikal uygulamalar için uygun değildirler. Güçlü asitlerle muamele edilerek yüzeylerinde karboksil grupları oluşturulduğunda ve yüzeylerine hidrofilik moleküller bağlandığında çözünürlükleri arttırılabilir. Bu sayede biyouyumlulukları da arttırılabilir. Literatürde var olan toksisite araştırmalarında İKNT'lerin toksisitelerinin düşük olduğu, bazı araştırmalarda hiç toksik etki ortaya çıkarmadığı ifade edilmiştir. Ancak bu kıyaslama TDNT ve ÇDNT'ler bakımından yapıldığında ÇDNT'lerin daha az toksik etki ortaya çıkardığı görülmüştür (27). Çok sayıda araştırma ile de kısa KNT'lerin daha az toksik etki yarattığı ortaya çıkmıştır (48,49). KNT'lerde kullanılan katalizörler, üretim yöntemi, uzunluğu, yüzey alanı ve yapısı toksik etkilerini değiştirmektedir. Bu nedenle araştırmanın amacına yönelik fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip KNT'ler tasarlanmalıdır (50). Literatürde yapılan toksisite çalışmalarının çoğunu farklı hücre hatlarının canlılık oranları ile ilgili çalışmalardır. KNT'lerin hücre canlılığı deneyleri, farklı çözücülerde çözündürülmüş KNT'lerin farklı derişimlerde hücrelere uygulanması ile gerçekleşir. KNT'ler hücrelerle birlikte inkübe edildikten sonra canlı ve ölü hücreler sayılarak ya da hücresel aktiviteyi ortaya çıkaran boyalar kullanılarak absorbans ya da otofloresan ölçümü yapılarak canlılık değerlendirmesi yapılır (51-53). Hücre ortamındaki nitrit konsantrasyonu ve reaktif oksijen türlerinin floresan yoğunluğu ölçümü yapılarak belirlenmesi, mRNA ekspresyonunun ölçülmesi, mikroskopik yöntemler kullanılarak hücre şekline olan etkilerinin belirlenmesi de kullanılan yöntemler arasındadır. Farklı özelliklere sahip ve kovalent ve non-kovalent işlevselleştirme yöntemleri kullanılarak biyouyumlu hale getirilmiş KNT'lerin, hayvan deneyleri ile organlarda birikip birikmediğinin ve vücuttan hangi yollarla atıldığının araştırılması da yapılan toksik etki araştırmaları arasındadır. Bu çalışmalar KNT'lerin biyosensörlerde kullanılmasına, doku iskeleti olarak kullanılmasına öncülük etmişlerdir (54).

2.8. Doksorubisin (Adriamisin- $C_{27}H_{29}O_{11}N \cdot HCl$)

Doksorubisin (Doks) 1960'ların sonlarından bu yana kullanılan güçlü bir kanser ilacıdır. Meme kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri, yumuşak doku kanserleri, mide kanseri, lenfoma, kemik kanserleri gibi çok sayıda kanser çeşidi için kullanılabilen, geniş spektrumlu bir antitümör ajandır (Şekil 15). Ancak kalpte ve sağlıklı dokularda toksik etkilere sebep olduğu uzun süreli kullanımda kalp krizine bile yol açabildiği bilinmektedir. Tedavi bittikten 20 yıl sonra dahi kalp üzerindeki toksik etkilerinin devam ettiği görülmüştür. Doks'un kimyasal yapısı serbest radikallerin oluşturulmasını sağlamaktadır. Böylece oluşan oksidatif stres ile hücre hasarı meydana gelmektedir (55-57). Doks DNA sentez inhibisyonu yapmakta, tümör hücrelerine apoptotik etkiye sebep olmakta ve immün hücrelerdeki antitümör yanıtı indüklemektedir. Bu nedenle toksik etkilerine rağmen kullanımına devam edilmektedir (58).

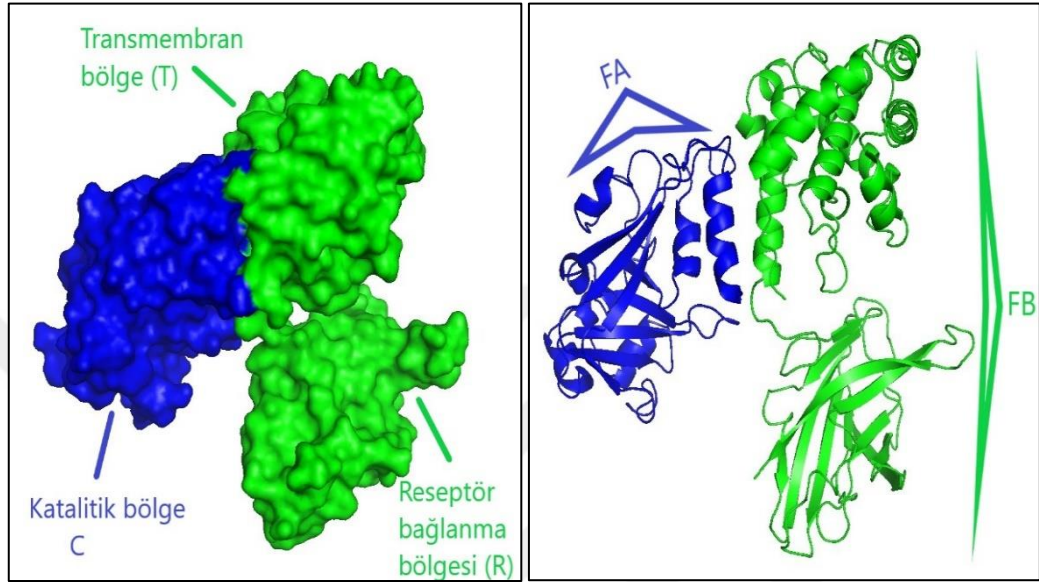


Şekil 15: Doksorubisin'in yapısı.

Malign tümörlerin tedavisinde etkili olan ve hala kullanımına devam edilen bu ilaç yan etkileri nedeniyle, kullanımı hala tartışmalı bir ilaçtır. Kusma, kellik, aritmi ve kilo kaybı gibi yan etkileri geri dönüşümlü yan etkiler olsa da, birkaç haftalık kullanım sonrası geri dönüştürülemez kardiyotoksikiteye sebep olduğu bilinmektedir. Hastaya infüzyonla vücut yüzey alanına göre verilen ilaç, metrekare başına 550 mg'ı geçtiğinde, kemoterapide uygulaması kesilir (59). Toksik etkisini azaltmak ve dozun etkinliğini arttırmak amacıyla lipozomların, nanoparçacıkların ve karbon nanotüplerin taşıyıcı olarak kullanımına yönelik araştırmalar ve çok sayıda araştırma grubu tarafından ortaya çıkarılan olumlu sonuçlar vardır. Aynı amaca yönelik, ÇDNT'lerin Doks'u hücrelere daha az ve etkili dozlarda iletmeye yönelik araştırmalar devam etmektedir (60-62).

2.9. Difteri Toksini

Difteri, kuş palazı olarak da bilinen ve *Corynebacterium diphtheriae* adlı bakterinin boğaz, burun, göz ve deriye yerleşmesiyle oluşan, ölümcül bir hastalıktır. *C. Diphtheriae* 2-6 μm boyunda, 0,5-1 μm genişliğinde, çomak şekilli, gram pozitif bir bakteridir (63).



Şekil 16: Difteri toksininin yüzey yapısı (sol), katlanma yapısı (sağ).

Difteri toksini (DT), 63 kDa molekül ağırlığında, 374 aa içeren bir ekzotoksindir (63) (Şekil 16). Ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF2)'yi NAD varlığında ADP ribozilleyerek, protein sentezinin inhibisyonuna neden olur. Bu işlemi katalitik olarak etkin A parçası (FA) ile gerçekleştirir. Difteri toksini S-S bağlarının indirgenmesi ve kısmi sindirim ile FA (Şekil 13- mavi) ve B parçası (FB- Şekil 13 yeşil) olmak üzere 2 parçaya ayrılmaktadır. FB parçasında yer alan reseptör bağlanma bölgesi (R bölgesi), memeli hücrelerindeki reseptöre bağlanarak toksinin endositozla hücreye alınmasını sağlar. Bu reseptör Hb-EGF olarak bilinen heparin bağlanan epidermal büyüme faktörü-büyüme faktörü benzeri bir reseptördür. DT bu reseptöre bağlandığında endozomla hücreye alımı hızlanır. Difteri toksininin sitotoksik etki gösterebilmesi için FA'nın sitoplazmaya girmesi gerekmektedir. DT hücre içine endozomlar ile taşınır, endozomun pH'ını asidik hale getirerek, FA'nın sitozole geçişini sağlar. FA, NAD'dan dönüşen ADP riboz varlığında, eEF2'nin ADP-ribozillenme tepkimesini hızlandırarak, protein sentezi sırasında peptit uzamasını durdurduğu bilinmektedir (64,68). Ayrıca toksin protein

sentezini durdurulması yanında, hücre iskeletinin yıkılması ve apoptotik süreçte rol alır (69). Fare ve sıçanlarda, toksinin bağlandığı reseptördeki aminoasit farklılığından dolayı, toksinin hücre içine alımı gerçekleşmemektedir. İnsan kökenli hücrelerde toksinin FB kısmındaki reseptör bağlama bölgesi (R Bölgesi), yüzeydeki HB-EGF reseptörüne bağlanır ve sonrasında endositozla toksin içeri alınır (70).

ADP ribozillenme tanımı Dr. Paul Mendel'in 1963 yılında, memeli hücre çekirdeğinde poli-ADP ribozun bulunduğunu kanıtlaması ile yapılmıştır (71). Sonraki yıllarda NAD'ın hücre dışı sistemde protein sentezinin inhibisyonunda her zaman görev aldığı ve DT'nin eEF2'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (72). eEF2'nin DT yokluğunda ADP- ribozillendiği bilinmektedir. Hücre hasarı, oksidatif stres ve bazı hastatıklara bağlı olarak eEF2'nin endojen ADP-ibozillenmesinde artış olmaktadır (73).

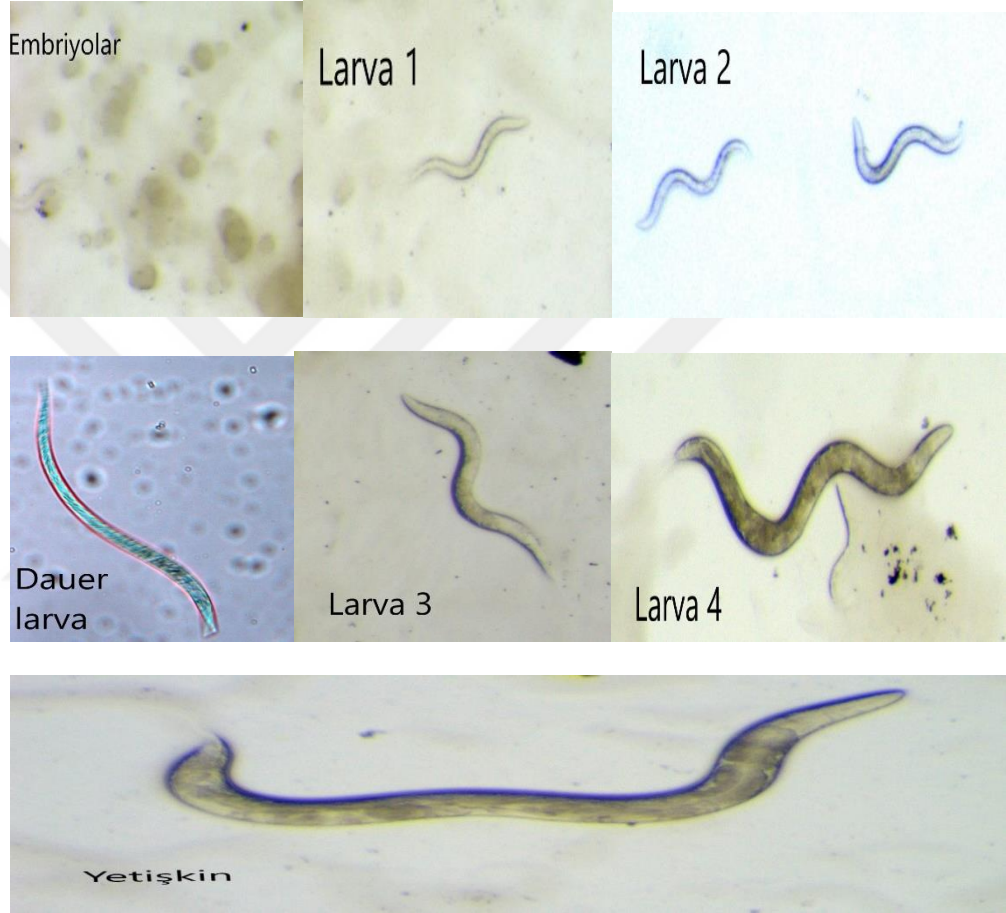
Hücrelerdeki DT reseptörlerinin, hücre membran yüzeyindeki anlatım oranı düşük olan hücreler, DT'ye duyarlı değildir. İnsan ve maymundan elde edilen hücre hatları toksine duyarlıyken, sıçanlardan elde edilen hücre hatları toksine duyarsızdır (74,75). Çalışmada fare kökenli hücre hattı olan NIH-3T3 seçilerek, hücre reseptör anlatım oranı düşük olan bu hücreye, KNT'ye bağlanarak DT'nin taşınması hedeflenmiştir. DT'nin CRM197 gibi protein sentezini inhibe etmeyen formlarının kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli yüksektir. Bu nedenle de hücreye bir taşıyıcı ile taşınması önem arzeder.

2.10. *C. elegans*'ın Nano Toksisite Araştırmalarında Kullanılması

C. elegans toprakta yaşayan ve bakteri ile beslenen bir nematod (yuvarlak solucan) türüdür. Kimyasal malzemelerin çevresel ve hücrel toksisitelerinin araştırılmasında, genetik araştırmalarda ve oksidatif stres araştırmalarında kullanılabilen model canlılardır (56). Anatomisinin iyi tanımlanmış olması, kısa hayat döngüleri, kolay ve tekrar tekrar üretilme özellikleri sayesinde yaşlanma araştırmaları ve genetik araştırmalara oldukça uygundur. Şeffaf olmaları da iç organlarının görüntülenmesini ve yapılarındaki değişimlerin izlenmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca topraktaki besin zincirinin önemli bir parçası olduğundan, hücrel ve sistemsel toksisitenin gözlemlenmesi yanında, çevresel toksisitenin belirlenmesi için de oldukça önem arz etmektedirler (76). *C.Elegans*'ların yaşam döngüsü görülmektedir (Şekil 17).

Yeni yumurtadan çıkan larvalar 0,25 mm uzunluğunda, ergin bireyler 1 mm uzunluğundadır. Boyutları larva 4 (L4) aşamasına kadar artmaktadır ve bu aşamaya kadar

cinsiyetlerini ayırt etmek oldukça zordur. L4 aşamasında hermafroditlerin konik bir kuyruğu, geniş çevreleri vardır. Erkeklerin kuyrukları hermafroditlerden daha geniştir, çevreleri daha incedir. Üremede görevli dişi germ hücreleri, hermafroditlerden gelen sperm ya da erkekten gelen spermle, çiftleşme sırasında döllenir. Dauer larva safhasında, tüm diğer larva safhalarından daha ince yapıya bürünürler.

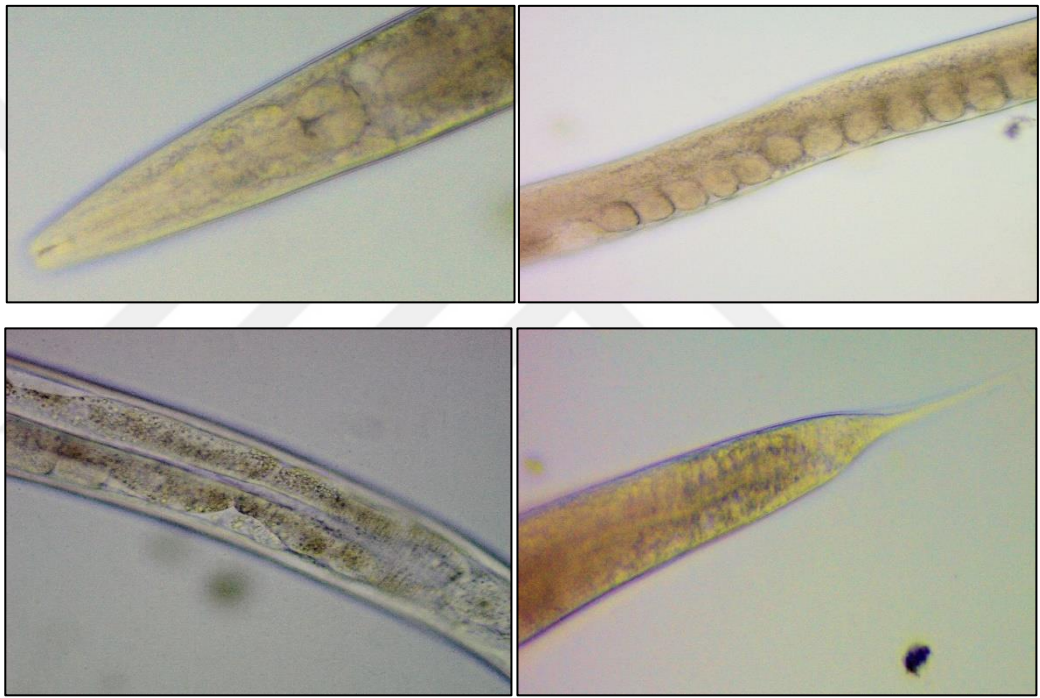


Şekil 17: *C. elegans*'ın yaşam döngüsü.

Döllenmeden sonra, anneden bağımsız olarak gelişebilecekleri, geçirimsiz yumurtaların embriyonik gelişimleri 20 °C'de 16 saat sürer. Embriyolar hermafrodit olanlarda 24 hücreli aşamaya ulaşana kadar, vücutta tutulurlar. Yumurtadan çıktıklarında larva 1 (L1) aşamasındadırlar. Sonrasında, *E. coli* ile beslenerek L4 aşamasına kadar gelişirler. L1 aşaması 16 saat, diğer aşamalar ise yaklaşık 12 saat sürmektedir.

Her aşamanın sonunda, deri değiştirme işlemine benzer şekilde, dış kalojen tabakası yenilenirken, bu esnada eylemsiz, uyuşukluk benzeri bir durum gerçekleşir. L4 evresinde dış kalojen tabakası değiştikten 12 saat sonra, hermafrodit olanlar 2 ya da 3 günlük

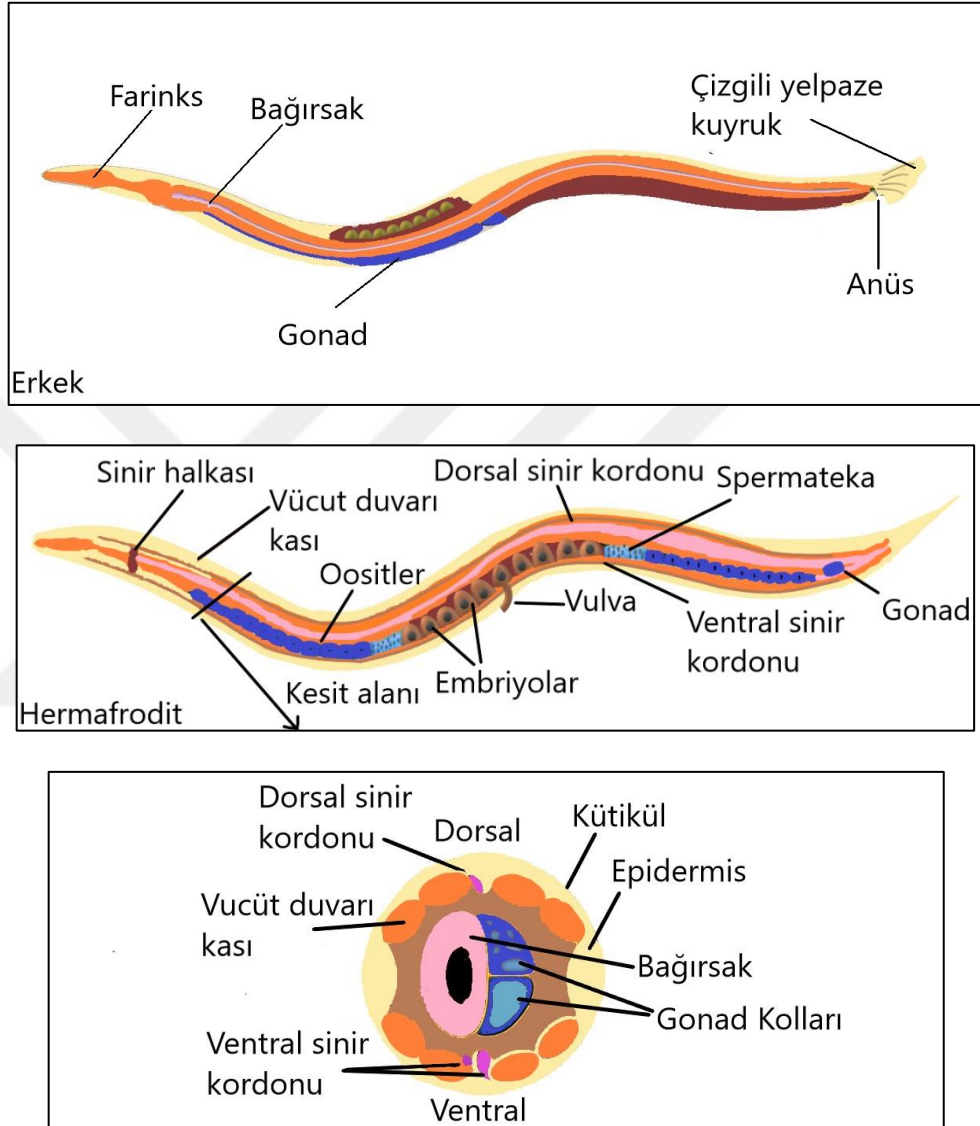
periyotlarda, spermlerini tüketene kadar, yeni soylar üretebilir. Hermafroditlerin spermleri tükendikten sonra yeni soylar üretebilmesi için bir erkekle çiftleşmesi gerekir. Hermafroditler üreme döneminden sonra, yaşlanmadan, beslenmeden birkaç hafta hayatta kalabilirler. Bu evre dauer lavra (DL) evresidir. L2 evresinden sonra, ortamda yeteri kadar besin yoksa, alternatif bir L3 evresi oluştururlar. L2'den sonra kalojen tabaka solucanı tamamen çevreler ve beslenmesini engelleyecek şekilde ağzını tıkar. Bu evre kimyasallara, basınca en dayanıklı olduğu evredir. Bu evrede beslenmeden en az bir ay kalabilirler. Besin olan bir bölgeye yerleştirildiğindeyse, ağız bölgelerindeki tabakayı eritip beslenmeye başlar ve L4 evresine geçerler.



Şekil 18: *C. elegans*'ın vücut kısımlarının ışık mikroskobu görüntüsü.

Erkek ve hermafrodit *C.elegans*'ların temel anatomik özellikleri görülmektedir (Şekil 18). Dorsal ve ventral sinir kordonu, sinir halkasından başlar ve tüm vücut boyunca uzanır. Şekilde ayrıca farinks ve bağırsaklar da görülmektedir. Kesit alanında ise, vücut kasının epidermis ve katikül ile çevrelendiği görülmektedir. Çürük bitkilerden izole edilebilen *C. elegans*'ların bir adet hermafrodit bireyi, bir petriyi dolduracak kadar birey çoğaltabilir. Hayvanlar dondurulmuş halde yıllarca saklanabilir. 12-25 °C arası sıcaklıklarda yetiştirilip, farklı sıcaklıklara dayanıklı, mutant bireyler oluşturulabilir. Nano yapıların toksisitelerinin izlenmesinde, uzunluk değişimleri, yer değiştirme hızları

ve yaşam süreleri analiz edilerek, toksisite araştırmaları gerçekleştirilmiştir (77). Yaşam suresi analizleri için her petri kabına 30-50 solucan ekilir ve mikroskop altında sayılır. Metal ezeler ile dokunulduğunda hareket etmeyen solucanlar l sayılır. En az 3 tekrar yapılması onulur.



şekil 19 : Yukarıdan aşağıya, erkek, hermafrodit *C. elegans* 'ın vücut kısımları ve kesit alanı görüntüsü

Toksikoloji araştırmalarında “Lethal Concentration” olarak bilinen ve % 50 ve % 20 ölüm oranlarını ifade eden LC_{50} ve LC_{20} değerleri, toksisitesi araştırılan malzemelerin değerlendirilmesinde kullanılır (78,79). Ayrıca solucanların vücut morfolojisindeki değişikliklerin araştırılması da toksisite araştırmaları arasındadır. Uzunluk ve kalınlık ölçümleri yapan yazılımlar ile iřitli yazılımlar kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (80).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

AKTA Prime Plus sıvı kromatografi

ATR-FTIR (Altınbaş Üniversitesi)

Buz makinası (Hoshizaki)

Çalkalamalı inkübatör (Shaker - Thermo)

Derin dondurucu (-80 °C NUAIRE)

Distile su cihazı (GFL)

Diyaliz tüpü (Thermo fisher)

Etüv (Sanyo)

Hassas terazi (Metler)

Hücre Kazıyıcı (Nest)

Icelligence Real Time Cell Analyser (Acea Biosciences)

Jel elektroforez tankı (Biorad)

Konfokal mikroskop (OLYMPUS FV1000)

Laminar hava akım cihazı (Heraus ELB2472)

Likit kromatografi cihazı (GE Healthcare)

Liyafilizatör (Labconco)

Manyetik çalkalayıcı (Biosan)

Micro 200R Hettich soğutmalı santrifüj

pH metre (Hanna)

Plaka (NEST 6'lı, 24'lü, 96'lı)

Raman spektrofotometresi (Koç Üniversitesi)

Santrifüj (Nuve)

Sıvı azot tankı (34 XT Taylor-Wharton)

Soğutmalı santrifüj (Hettich)

Spektrofotometre (Shmatzu UV 1800)

Sterio mikroskop (Zeiss)

Synergy HTX plaka okuyucu (BioTek)

TEM (JEOL JEM 2100F HRTEM)

Ters mikroskop (Olympus)

TGA cihazı (TGA 2000)

Thoma lamı

Vorteks (Biosan)

Western-Blot jel transfer sistemi (Invitrogen)

3.2. Kimyasal Maddeler

Agar tozu (Himedia)

Bradford Reaktifi

BSA (Santacruz)

CaCl₂ (Merck)

DAPI (Sigma)

Difteri Toksini (Sigma – Refik Saydam Hıfzısıha)

Dimetil Sülfoksit (DMSO)

DMEM (Multicell)

DMEM F12 (Gibco)

Doxorubicin (Sigma)

E. coli OP 50 İzolatı (Fisher Scientific, Catalog No: S29021)

Falloidin (TRITC -Sigma)

FBS (Fetal Bovine Serum- Gibco)

Kolesterol (Sigma)

MTT (Sigma)

NaCl (Carlo Erba, 368257)

Esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (Gibco)

Penisilin-Streptomisin (Gibco)

Peptone (Merck)

Proteaz inhibitörü (Sigma)

Protein İşaretleyici (Sigma)

RIPA tamponu (Sigma)

RPMI (Multicell)

Sekonder Antikor Streptoavidin-AP

Sodyum dodesil sülfat (SDS Sigma)

TEMED (Sigma)

Tripan Blue (Sigma)

Tris (Sigma)

Triton X-100 (Sigma)

MgSO₄ , Metanol, Etanol, HCl, KCl, H₂SO₄, Amonyum persülfat (APS), Asetik Asit, Triklor asetik asit (TCA), Aseton, CaCl₂, NaN₃, KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, Na₂CO₃, HCl ve diğer kimyasallar Sigma, Merck ve Fluka firmalarından alınmıştır.

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Eriyikler

3.3.1. *C. elegans* Yumurta Senkronizasyon Karışımı

5M NaOH: 0,5 mL

Çamaşı suyu: 1 mL (%5 hipoklorit (NaClO) solüsyonu)

Distile su: 3,5 mL

3.3.2. Bakteri üretimi için LB Agar ve hazırlama

Luria-Bertani (LB) Broth

Bacto tyrtone 10 g

Bacto yeast 10 g

NaCl 5 g

1 M NaOH, pH 7,5
dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır
Luria-Bertani (LB) Agar
Bacto tryotone 10 g
Bacto yeast 5 g
NaCl 5 g
Agar 15 g
1M NaOH, pH 7,5
1 lt'ye dH₂O ile tamamlanır

3.3.3. *C. elegans* için NGM karışımı

NaCl 3 gr
Agar 17 gr
Pepton 25 gr
975 ml dH₂O
CaCl₂, 1 M, 1 ml
Kolesterol, 5 mg /ml den 1 ml
MgSO₄, 1M, 1 ml
KPO₄ tampon, 1 M, pH: 6,0 25 ml

3.3.4. Hücre Patlatma Tamponu (Lysis Buffer)

Lizis tamponu
1 mM PMSF
0,5 µl /ml Proteaz inhibitör kokteyli

3.3.5. Yükleme (Dentaürasyon) Tamponu

12 mM Tris-HCl, pH: 6,8
% 2 Gliserol
% 0,5 SDS
% 1 BME
% 0,01 brom fenol mavisi

3.3.6. PAGE Yürütme Tamponu

15 g Glisin

3 g Tris-baz

1 g SDS

1 lt'ye dH₂O ile tamamlanır

3.3.7. PAGE Yükleme Tamponu

10 mM β-merkapto-etanol

% 10 SDS

%20 Gliserol

0,2 M Tris-HCl pH:6,8

% 0,05 Bromfenol Mavisi

3.3.8. Transfer Tamponu

3,03 g Tris-baz

14,41 g Glisin

% 0,01 SDS

1 lt'ye dH₂O ile tamamlanır.

3.3.9. PBS (fosfat) Tamponu

10 mM K-fosfat, pH: 7,2

150 Mm NaCl

3.3.10. TBST Tamponu

10 mM Tris-HCl, pH: 8,0

150 mM NaCl

% 0,05 Tween 20

3.3.11. DT Tamponu

10 mM EDTA

40 mM Tris Asetat

3.3.7. PAGE Alt Jeli

3,22 ml Akrilamit/bisakrilamit (30:0,8)

2 ml Tris-HCl (1.5 M pH: 8,8)

2,72 ml dH₂O

0,075 ml %10 SDS

30 µl % 10 Amonyum per sülfat (APS)

5 µl TEMED

3.3.12. Hücre Canlılığı Solüsyonu

50 mg MTT

10 ml PBS

3.3.13. Antikorlar

Primer Antikor Anti-FA Tavşan (Abcam)

Primer Antikor Anti Biyotin Tavşan (Sigma)

Sekonder Antikor Anti-mouse-AP

Sekonder Antikor Anti-rabbit-AP

3.3.14. Floresan Görüntülemeye Kullanılan Çözeltiler

PBS pH (7,4)

%5 PBS/BSA (5 gram BSA, 100 ml PBS)

% 1 Triton X-100 (1 ml Triton X-100, 100 ml PBS)

% 2 Paraformaldehit (2 g Paraformaldehit, 100 ml PBS)

DAPI (Sigma)

3.4. YÖNTEMLER

3.4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmalarda NIH-3T3 hücreleri için CDMEM, MDA-MB-231 ve HUVEC hücreleri için CDMEM-F12, HT-29 hücreleri için CRPMI medyumları kullanıldı. Hücreler standart kültür koşullarında (37 °C’de % 5 CO₂ ortamında) çoğaltıldı.

3.4.2. Hücrelerin Sayılması

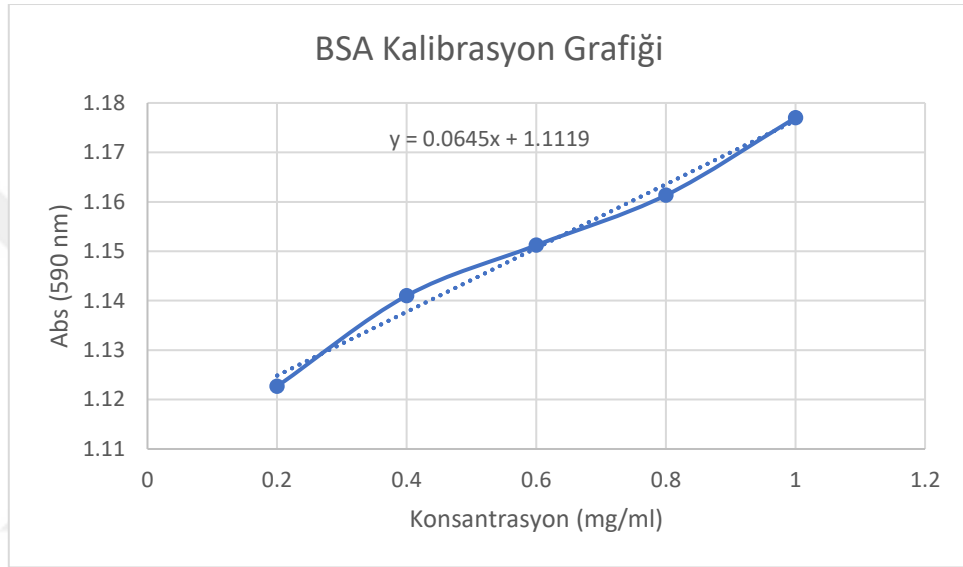
Hücreler çoğaltılıp, yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra, hücre kazıyıcı ile kazındı. 3000 devir, 4 Dak. santrifüj edildi. Pelet 1 ml medium ile dilüe edildi. Dilüsyondan 10 µl alınarak Thoma lamı üzerine damlatıldı. Buradaki sayımda esas 0,1 mm³ hacimde sayım yapılmasıdır. Lam üzerinde 0,1 mm yükseklikte bulunan, karelerin bulunduğu çukura hücreler bırakılıp üzerine lamel kapatıldığında, çukurda 0.1 mm derinlik içinde sıvı hapsolür. Bu alanda 16 büyük, her karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım işlemi büyük karelerde yapılır. Karenin çizgileri üzerine denk gelen hücreler sayılmaz. Sayım yapılan, kare prizma şeklindeki alanın hacmi 0,1 mm³’tür. Sonuç sayılan kare miktarı ile seyretme faktörünün 10⁴ ile çarpılması ile elde edilir. Burada 10⁴, 0,1 mm³’deki sayım sonucunu 1 ml’deki sayıya dönüştürmek için kullanılır.

3.4.3. Hücre Lizatı Hazırlanması

NIH-3T3 hücreleri kültür edildikten ve yeterli sayıya ulaştıktan sonra, 6 kuyulu plakalara, her kuyuya 1x10⁶ hücre olarak ekildiler. 48 saat sonra, hücrelere, difteri toksini, KNT, DT-KNT uygulandı. Ayrıca kontrol grubuna madde uygulanmadı. Hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler, hücre kazıyıcı ile kazındı. Her bir kuyu 1 ml’lik ependorflara alındıktan sonra, 2 kez soğuk PBS ile 3000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenerek yıkandı. Üst sıvıları uzaklaştırıldıktan sonra, peletin üzerine 200 µl hücre patlatma tamponu konularak, buz içinde, insülin enjekterü ile muamele edildi. Sonrasında, + 4 °C’de 14000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları alınarak ve protein miktarları belirlenerek, FTIR ölçümlerinde ve Western-Blot işleminde kullanılmak üzere, -20 °C’ye kaldırıldı.

3.4.4. Hücre Lizatından Protein Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen hücre lizatlarının protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Standart için ayrılan kuyulara, 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ve 1 µg/ml BSA, 2 µl hücre lizati eklendi. 96 kuyulu plakaya, boşluk, BSA içeren standart kuyular ve hücre lizatları ikiyeşerli tekrarlar halinde eklendi. Absorbans değerleri 590 nm’de okundu. Elde edilen sonuçlardan standart eğri hazırlanarak protein miktarları belirlendi.



Şekil 20 : BSA kalibrasyon eğrisi.

BSA’nın kalibrasyon eğrisi çıkarıldıktan sonra elde edilen lineer denklem kullanılarak, hücre lizatlarındaki protein mikratları tespit edildi. İçerisinde FA kesiminin de bulunduğu yaklaşık 40 mg lizat proteini eEF-2’nin ADP ribozillenmesinde kullanıldı.

3.4.5. Elektroforez (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi

Hücre lizatından protein miktarı belirlendikten sonra, örnekler yüklem tamponu yüklenerek 100 °C’de 5 dakika proteinlerin denatüre olması sağlandı. Örnekler % 4-10 ‘luk jellere, kuyu başı 10 µg olacak şekilde ayarlandı. 140 mV akımda 45 dakika elektroforez işlemi sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit (SDS-PAGE) Laemmli yöntemine göre yapıldı (81). Elektroforez sonrası, protein örneklerini içeren jelin bir bölümü coommasie parlak mavisi ile boyandı. Boya çıkarma işlemi % 10 asetik asit içeren solüsyonda, hafif çalkalayıcıda bir gece boyunca tutularak, proteinlerin görünürlüğü sağlandı. Boyanmamış diğer jel bölümü Western Blot analizi için kullanıldı. Jel örnekleri, transfer tamponunda ısıtılan nitroselüloz membran ve whatman kağıtları

(3 µm) arasına yerleştirildi. Hazırlanan sandviç kasetleri içerisinde, aktarım tamponu olan elektroblot tankına yerleştirildi. Oluşturulan düzeneğe 4 °C’de, 90 dakika boyunca aktarım yapıldı. Protein örnekleri içeren membrana özgün olmayan bağlanmaları engellemek için, % 5 BSA için TBST ile doyurulduktan sonra, birincil antikorun bağlanma işlemine geçildi.

Membran 1 gece boyunca birincil antikor (DT karakterizasyonunda: Anti-difteri toksini FA’ya özgün fare kökenli monoklonal antikor (Abcam), eEF-2 ADP ribozillenme deneyinde: Anti-biyotin) ile muamele edilerek +4 °C’de tutuldu. Sonrasında TBS-T ile 3 kez yıkama yapıldı ve 1 saat sekonder antikor (eEF-2 ADP ribozillenme deneyinde: Streptavidin) ile oda sıcaklığında tutuldu. 3 kez TBS-T yıkama yapıldıktan sonra, TMB ile muamele edilerek bantların görünür hale gelmesi sağlandı ve membranın fotoğrafı çekilerek saklandı.

3.4.6. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile DT’nin Saflık Analizi

Farklı kaynaklardan sağlanan DT’leri karşılaştırıldı. Bu amaçla, her iki toksinin Western Blot yöntemi ile karşılaştırılması yapıldı. Primer Antikor Anti-FA Tavşan (Abcam), Sekonder Antikor Anti-rabbit-AP kullanılarak ifadeleri görüntülendi.

3.4.7. Moleküler Elek Kromatografisi

Farklı kaynaklardan sağlanan (Sigma ve Refik Saydam) DT’nin, moleküler elek kromatografisinde analizi yapıldı. Kolonun kalibrasyonu 75 kDa (konalbumin), 66 kDa BSA, 45 kDa (yumurta albumin), 29 kDa (karbonik anhidraz) ve 13.7 kDa (Ribonükleaz A) varlığında yapılmıştır. İşlem için, toplam hacmi 120 ml olan Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 kolonu kullanıldı. 1 mg/1ml DT örnek hacmi 1 ml, akış hızı 0.8 ml/dak. ayarlanarak, DT kromatogramı elde edildi.

3.4.8. MTT Canlılık Deneyleri

Kullanılan 4 hücre hattı için de aynı MTT prosedürü uygulanmıştır. 24’lük plakalar için kuyu başına 5×10^4 hücre, 96’lık plakalar için 5×10^3 hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin olduğu plaklar, 24 saatlik sürelerde standart kültür koşullarında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, canlılık testi yapılmak istenen ilaç, ilaç yüklü KNT ya da toksin, farklı konsantrasyonlarda uygulandı. Uygulama sonrası 24, 48, 72 saatlik sürelerde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 24’lük plakalara 1ml’ye 50 µl, 96’lık plakalara 200 µl’ye 20 µl olacak şekilde MTT solüsyonu kuyulara eklendi. İşlem karanlıkta laminar

akım altında yapıldı. Sonrasında ışık geçirmeyecek şekile sarılarak 2 saat standart inkübasyon koşullarında bırakıldı. Sonrasında üst sıvısı çekilerek, 96'lık plakalara kuyu başı 200 µl, 24'lük plakalara kuyu başı 200 µl DMSO eklenerek, ışık geçirmeyecek şekilde, yarım saat oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında, 470 nm, 520 nm, 590 nm dalgaboylarında, uygulanan bileşiğe uygun olarak okunmak istenen dalgaboyunda Epoch Microplate Spectrophotometer cihazında absorbans değerleri ölçüldü.

3.4.9. Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Deneyleri

96'lık E-plate'e kuyu başı 5×10^4 hücre ekimi yapıldı. MDA-MB-231 hücre hattının plate kuyularına yapışması için 24 saat beklenildi. Sonrasında, KNT'ler kuyulara 10 ve 50 µg/ml olacak şekilde uygulandı. 2 gün boyunca hücre indeksi değerleri kaydedildi. Sonuçlar RTCA Analysis programında analiz edildi.

3.4.10. Kullanılacak KNT'lerin seçimi

Çalışmalarda kullanılan farklı KNT'ler ilk olarak İstanbul Teknik Üniversitesi (İTÜ), Bayer Material Science ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Teknokent'te faaliyet gösteren Nanografi'den temin edilmiştir. Medikal araştırmalar ve ilaç taşımaya yönelik olmayan daha çok endüstriyel ürünlere yönelik nanotüpler üreten firmayla ortak çalışılarak, ilaç taşımaya uygun, kısa ÇDNT'lerin sentezlenmesi sağlanmıştır. Elde edilen bu kısa, saf KNT'ler asitle muamele edilerek işlevsel hale getirilmiştir.

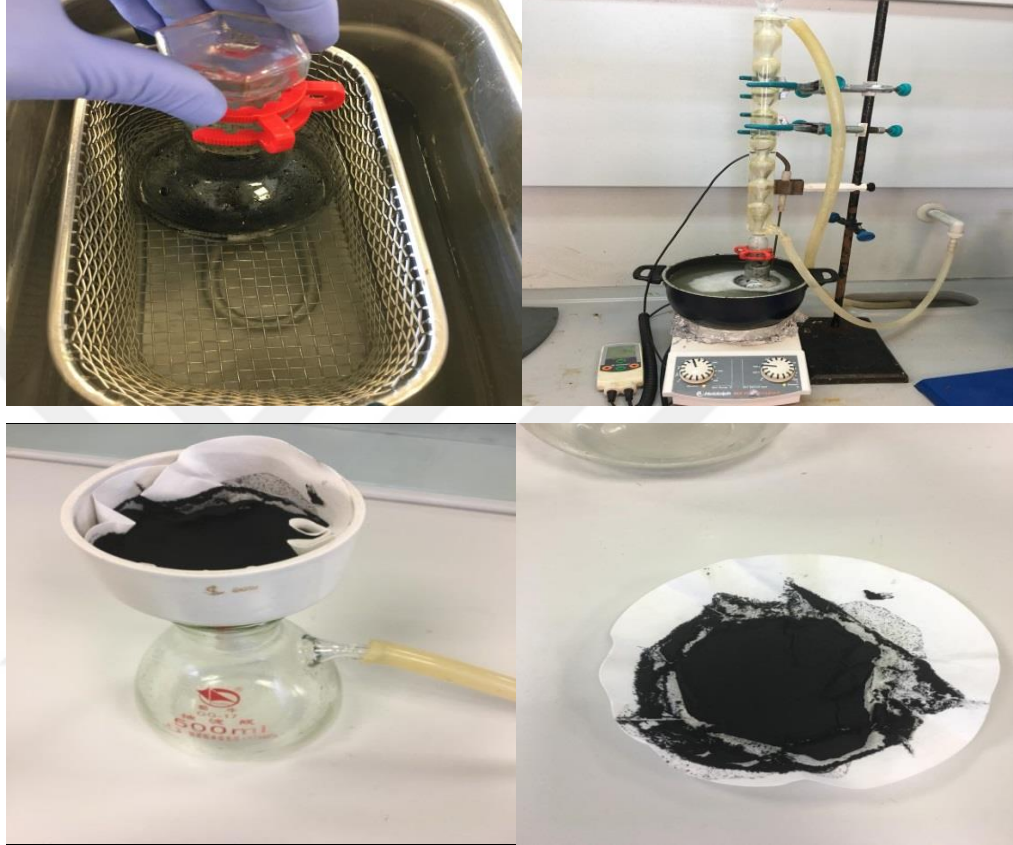
İTÜ, Baytube ve ODTÜ'den elde edilen KNT'ler insan kökenli MDA-MB-231, HT-29, HUVEC hücrelerde toksisite testlerine tabi tutulmuştur. ODTÜ'den elde edilen KNT'lerden istenilen hücreye giriş ve molekül yüklenme verimi alındığı için çalışmalara ODTÜ-Nanografi'den elde edilen KNT'ler ile devam edilmiştir.

3.4.11. KNT'lerin TEM Görüntülerinin Alınması

TEM görüntüsü alınmadan önce, bakır gridler kullanılarak numuneler hazırlandı, bu sayede TEM görüntüsü alınırken ızgaraların arasında kalan alanlar analiz edilebildi. İzopropil alkol içinde KNT'ler çözündürüldü ve stok karışım hazırlandı (1 mg/ml). Bakır ızgara bir penset yardımıyla bir parça parafilm üzerine yerleştirildi. Üzerine ana stoktan 15 µl alınarak damlatıldı ve kuruması beklendi. Böylece KNT'lerin analiz edileceği numune hazırlandı.

3.4.12. KNT'lerin İşlevselleştirilmesi

İşlevsel hale getirme işlemi için KNT'ler asitle muamele edildi. %98 H_2SO_4 ve %68 HNO_3 'den, distile su ile 1/1 oranında karıştırıldı ve sonrasında bu iki asit 3'e 1 (H_2SO_4 / HNO_3) oranında karıştırıldı.



Şekil 21: KNT'lerin reflüks işlemi ile işlevsel hale getirilmesi.

Reflüks işlemi 10 saat boyunca 80 °C'de gerçekleştirildi. Sonrasında bidistile su kullanılarak KNT'ler yıkandı ve kurutucuda 80 °C'de, 24 saat kurutulmaya bırakıldı (Şekil 21).

3.4.13. Raman ve FTIR Spektrumları

İşlevselleştirilmiş ve saf KNT'lerin, Raman spektrumları, toz numunelerden, Koç Üniversitesi Yüzey Teknolojileri Araştırma Merkezi'nde alındı. 633 nm laser ışığı ile 50X'de ölçümler gerçekleştirildi. Bu işlem ayrıca DT için de uygulandı.

Ayrıca Perkin Elmer'in ATR Ataşmalı SpektromTwo Model spektrofotometresi kullanılarak, 450-4000 cm^{-1} mid-IR aralığında, 10 gauge basınç altındaki kuru toz

halindeki numuneden, her bir spektrum için 12 scan alınarak ölçümler yapılmıştır. Her bir numuneden en az 2 spektrum ölçümü yapılacak şekilde en az 2'şer ölçüm yapılmıştır. Spektrumların başlangıç eğrilikleri, ölçümlerin de yapıldığı, cihazın Spektrum yazılımı ile düzeltilmiştir. Ardından, spektrumların başlangıç seviyeleri, Spectrum programı ile, her bir spektrumun kayma miktarına bağlı olarak manuel biçimde 0'a getirilmiştir. Son olarak, spektrumların çok gürültülü olmaları nedeni ile yine Spectrum programı kullanılarak 60 nokta düzeltme işlemi yapılmıştır.

3.4.14. KNT ve KNT Bağlı Proteinlerin TGA Analizlerinin Yapılması

Ölçümler İstanbul Teknik Üniversitesi, Enerji Enstitüsü, TA Instruments cihazı ile, Universal Analysis 2000 programı ile termogravimetrik analizle gerçekleştirildi. Ölçümler alümina pan kullanılarak, nitrojen ortamında, sıcaklık dakikada 10 °C artırılarak, 800 °C'ye kadar arttırıldı. Sıcaklığa bağlı, ağırlık yüzdesi kaybı eğrisi ve bu eğriden hesaplanan termogravimetrik türev eğrisi (DTG), hangi sıcaklıklarda daha belirgin kütle kayıpları yaşandığını ve buna bağlı olarak, bu noktada bozunan maddenin ne olabileceği bilgisini edinmemizi sağlar.

3.4.15. KNT'lere Protein ve İlaç bağlanması

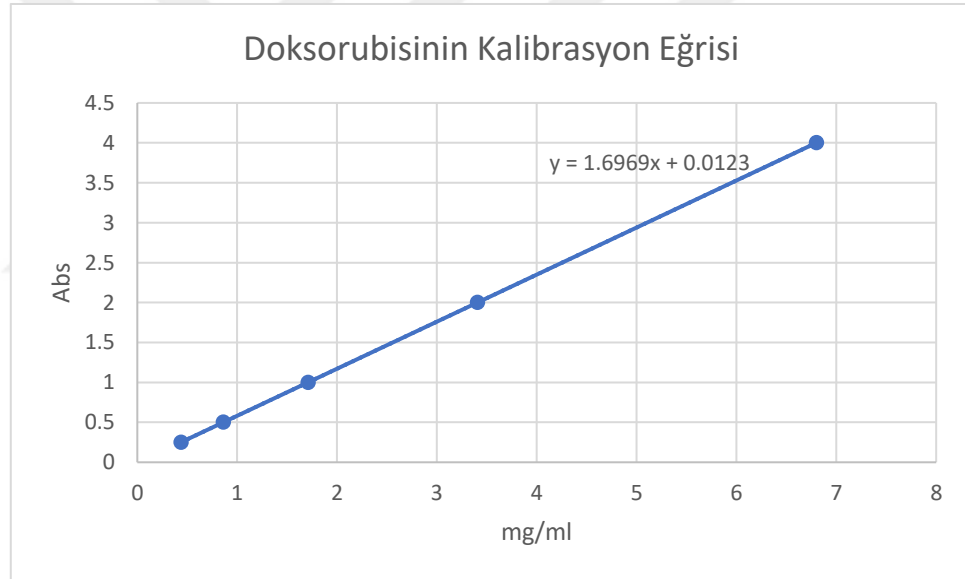
KNT'lere BSA bağlanma deneyleri literatüre uygun olarak gerçekleştirildi (82). Çalışmadan BSA/KNT oranları 1,5; 1; 0,5; 0,25 oranlarda 10 ml çözücüde 24 saat, +4 °C'de 400 rpm'de çalkalayıcıda tutuldu. Karışım masa santrifüjünde 10 dakika 5000 rpm'de santrifüjlendi. Pelet 12 saat boyunca -80 °C'de liyofilize edildi. Ayrıca santrifüj yerine bağlanan BSA'nın ortamdan uzaklaştırılması için diyaliz yöntemi de kullanıldı.

BSA'ya benzer biçimde, KNT'lere DT bağlanması işlemi için 10 mg DT ve KNT eşit oranda karıştırılarak, DT tamponunda çözündürülerek, +4 °C'de 24 saat 400 rpm'de çalkalayıcıda tutularak moleküler kesimi 100 000 Da olan diyaliz tüpü ile diyaliz edildi. Sonrasında liyofilize edildi ve bağlanma oranını belirlemek amacıyla TGA yapıldı

KNT'lere kanser ilacı bağlama aşamasında, öncelikle 3 farklı konsantrasyonda Doksorubisin bağlanma deneyi gerçekleştirildi. 3 mg KNT miktarı sabit tutularak, 1 mg/ml konsantrasyonda Doks içeren karışımdan 0,5 ml, 1 ve 2 ml alınarak toplamda 30 ml de birleştirildi. Sonrasında bu karışımlar 24 saat boyunca 400 rpmde +4 derecede soğuk odada tutuldu. Sonrasında 1000 Da diyaliz tüpü ile diyaliz yapıldı. Diyalizatların absorbanlarına 490 nm'de bakıldı.

Tablo 1: Doks-KNT bağlanma denemesinde, karışımların oranları.

Madde miktarları	Absorbans (490 nm'de)	C _t (mg/ml)	Q (mg/ml)
0,5 mg Doks + 3 mg MWNT/ 29,5 ml PBS	0,83	1,709x10 ⁻³	49,8 mg/g
1 mg Doks + 3 mg MWNT/ 29 ml PBS	1,67	11,492x10 ⁻³	115 mg/g
2 mg Doks + 3 mg MWNT/ 28 ml PBS	2,75	51,08 x10 ⁻³	197,9 mg/g

**Şekil 22 : Doks'un kalibrasyon eğrisi**

$$q = \frac{(C_0 - C_t)}{m} V \quad (3-1)$$

q: Nanotüplere adsorbe olunan madde miktarı (mg/g)

C₀= Çözünen ve bağlanmak istenen maddenin başlangıçtaki konsantrasyonu (mg/ml)

C_t = Çözünen üst sıvısı veya diyalizatın konsantrasyonu (mg/ml)

V= Karışım solüsyonunun toplam hacmi (mL)

m= Maddeyi emecek olan adsorban (g)

Başlangıçtaki madde konsantrasyonu, emilecek ve emici madde miktarı, karışımın toplam hacmi biliniyordu. Ancak üst sıvı veya diyalizatın ne kadar madde miktarına denk geldiği bilinmiyordu. Bu nedenle öncelikle Doks kalibrasyon eğrisi çıkarıldı.

Sonrasında, diyalizatların absorbans değerlerine göre kalibrasyon eğrisinden, Ct değeri çıkarıldı ve q değeri, denklem (3-1) kullanılarak hesaplandı (83). Örnekler 24 saat liyofilize edildi. Sonrasında, en yüksek konsantrasyon olan (2 mg alınan) numunenin bağlanması için bir de TGA analizi yapıldı. Aynı sıcaklık aralığında Doks'un en yüksek oranda tutulduğu (2 mg) numunenin TGA'sı yapıldı.

3.4.16. Toksine Bağlı ADP Ribozillenme

Standart kültür koşullarında doğaltılan hücrelere, DT, KNT ve DT-KNT uygulandı. İlk olarak hücreye DT'nin girip girmediğini anlamak için yapılan bu deneyde tek konsantrasyon DT-KNT kompleksi kullanıldı. 1 ml'ye 4 µl DT-KNT karışımı gelecek şekilde uygulama yapıldı. ADP ribozillenme deneyinde ise 200 ng, 500 ng ve 1000 ng DT-KNT kompleksi uygulananan, hücrelerden lizatları hazırlandı. Lisis sırasında (% 0.5 Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 10 mM Tris- HCl pH:7,4; 1:100 proteaz inhibitör kokteyli) kullanıldı. Pritein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendikten sonra, içinde 40 ug protein olan lizatı 10 µM 6-biotin-17- NAD (Trevigen, Gaithersburg, MD,USA) ile inkübe edildi. Sonrasında 30 dakika 20 °C'de işaretlendi. Numuneler SDS-PAGE 'de ayrıştırıldı ve ADP ribozillenen eEF2, anti-biotin (Sigma) ve Streptavidin-AP konjuge antibody ile belirlendi.

3.4.17. İmmünfloresan Görüntüleme Çalışmaları

İmmünfloresan görüntüleme için, HUVEC ve MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı. Hücreler, 6 kuyulu plakalara kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Kuyuların dibine 2,5 cm çaplı dairesel lameller yerleştirildi. 24 saat standart kültür koşullarında bırakıldıktan sonra, KNT'ler, molekül yüklü KNT'ler ve ilaçlar uygulandı. 24,48 saat beklenildikten sonra, PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. 10 dak. %0,1'lik Triton X-100-PBS içerisinde bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkama yapıldı ve %2'lik paraformaldehit-PBS, 4 °C' de 1 saat beklenildi. Sonrasında Falloidin-TRITC 1:1000 oranında %1 PBS-BSA içinde seyreltilti. İnkübatör içinde 1 saat bekletildi ve DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) damlatılan lam üzerine ters çevrilerek kapatıldı. Olympus BX51 floresan mikroskopta incelendi. Görüntüleme, Olympus DP-72 kamera sistemi ve *DP2-TWAIN* yazılım programı ile gerçekleştirildi. Görüntüleme sırasında Olympus U-25ND25 ve U-

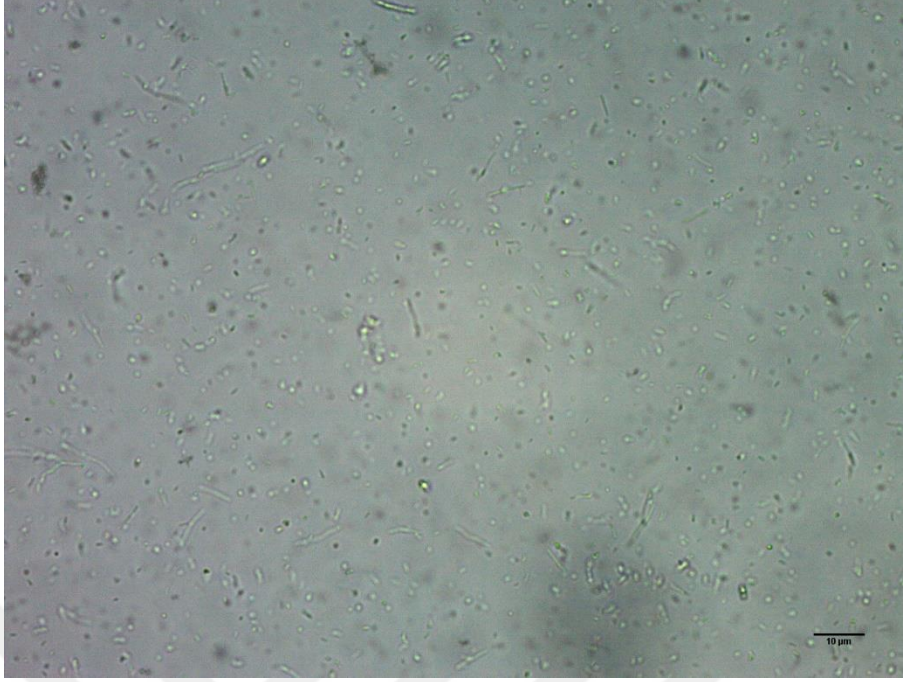
25ND6 filtreleri kullanıldı. Bu değerler DAPI için uyarılma 345 nm salım 458 nm, FITC için uyarılma 494 nm, salım 518 nm, TRITC için uyarılma 554 nm, salım 576 nm, olarak belirlendi.

3.4.18. *C. elegans* ile Yapılan Çalışmalar

Bu çalışmadan kullanılan *C. elegans* N2 tipi vahşi tiptir ve OP50 (Şekil 23) bakteri suşu ile beslenmektedir. *C. elegans* 10 gün boyunca 1 milyon bakteri yemektir. OP50 suşu oda sıcaklığında çoğalmayan bakteri türüdür. 37 °C’de çoğaltılması gerekmektedir. Bu nedenle *C. elegans* besini olarak tercih edilmiştir. Yaklaşık 1000 hücreye sahip bu canlılar, toprakta yaşadıklarından çevre toksisitesi incelemelerinde çok tercih edilmektedir. Canlı bir sistemde etki izlemek açısından da avantajlıdır.

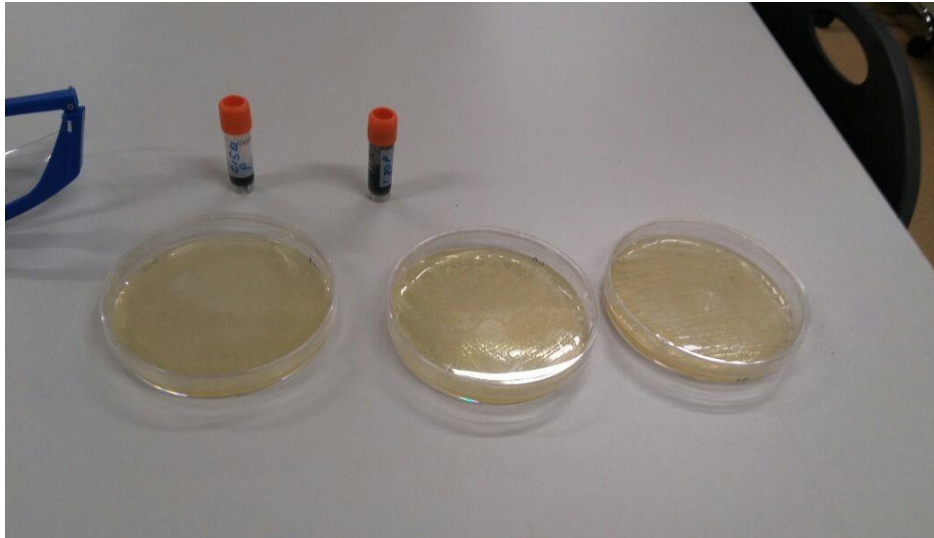
C. elegans için hazırlanan petri kaplarına dökülecek medium hazırlamak için öncelikle 3 g NaCl, 17 g Agar, 2,5 g peptone tartıldıktan sonra üzerine 975 ml dH₂O eklendi. 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. 15 dakika oda sıcaklığında, sıcaklığın 55 °C’ye düşmesi beklenildi. Sonrasında 1 ml, 1 M CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄, 1 ml (5 mg kolesterol/ml etanol) kolesterol eklendi ve iyice karıştırıldı. 100 mm çaplı her bir petri kabına 20 ml NGM eklenerek soğumaya bırakıldı. Bakteriyel besi hazırlamak için, LB agar ve LB Broth 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. 12 ml’ye stok bakterilerden 1 koloni eklendi. 1 gece inkübe edildi. Sonrasında her bir petriye 500 µl bakteri kültürü ilave edildi.

Deney grupları L4 evresinden başlatıldı. L4 evresinde eşzamanlı *C. elegans* eldesi için, stokta bulunan ve içinde yumurtalar olduğu gözlemlenen ergin bireyler alındı ve petri kapları 3 ml steril distile su ile yıkanarak, bireylerin suya toplanması sağlandı. Üzerin su ilave edilerek 15’lik falkonlarda santrifüj edildi (3000 rpm, 5 dakika). 0,5 ml 5 M NaOH ve 1 ml çamaşır suyu santrifüj tüpüne eklenerek, toplamda 10 dakika 2 dakika aralıklarla vortekslendi. 1300 rpm de 30 saniye santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Steril su eklenerek yumurtalar toplandı. Özel kabuğu olan yumurtalar, ergin bireylerden izole edilir ve bu süreçte hayatta kalır. Bu yumurtalar petri kaplarına dağıtıldı ve L4 evresine gelmeleri beklenildi. Deneylerdeki KNT’ler bakterilere eklenerek, petri kabına, L4 aşamasında dağıtıldı.



Şekil 23: *E. coli*'nin OP50 izolatının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

Sonrasında, *C. elegans* için NGM hazırlandı. Hem kontrol grubu için hem de 100 µg/ml konsantrasyon uygulamak üzere 100 mm x 20 mm petri kaplarından 3'er tane hazırlandı. Bu konsantrasyon için yapılan deney 3 kez tekrar edildi.



Şekil 24: KNT'lerin uygulanması öncesi *C. elegans*'ın çoğaltıldığı petri kaplarının hazırlanması

C. elegans ile yapılan ilk çalışmada, İTÜ’de sentezlenen ve Baytube firmasından alınan C70P ve C150P kodlu KNT’ler kullanıldı. Yapılan ilk çalışmada *E. coli*’lerin 12 ml’de 1 koloni ekilmiş ve 24 saat bekletilmiş, besi ortamına, 100 µg/ml KNT karışımları eklendi. Bu eklenmeden bir saat sonra, normalde besi yerinde dibe çöken KNT’lerin, *E. coli* ile birlikte süspanse halde kaldığı gözlemlendi. *C. elegans*’ın besi ortamına 100 µg/ml konsantrasyonlarda 3 KNT çeşidinden de eklenildi. Nematodlar 48 saat boyunca 3 saat ara ile sayıldı, stereo mikroskopla görüntüleri alındı. Sonrasında Nanografi’den elde edilen KNT’lerin kısa ve uzun dönem etkilerini belirlemek üzere öncelikle 0, 100 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarda 3’er petri kabına, 50’şer birey ekimi yapıldı. Besi yerine KNT’ler 100 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarda dağıtıldı. 3 gün boyunca hem çoğalmaları hem de beslenme ve yer değiştirme alışkanlıkları mikroskop altında izlendi. Bu miktarlarda uzun dönem etkilerini belirlemek üzere, her konsantrasyon için içine 50 adet ekim yapılan, 4’er tane petri kabı kabı hazırlandı ve besi yerlerine artan konsantrasyonlarda uygulama yapıldı. 15 gün boyunca, morfolojik değişiklikler incelendi ve steryo mikroskop ile video ve fotoğraf kayıtları yapıldı. Fotoğraflar 4x ve 8x büyütme ile gerçekleştirildi.

3.4.19. İstatistik

Canlılık deneyleri “Student t-test” ile analiz edildi. *C.Elegans* deney sonuçları için ortalama eşitliği testleri gerçekleştirildi. İstatistiksel yöntemler içerisinde ortalama (veya verinin çarpık olması durumunda gerekirse medyan) literatürde bir çok karşılaştırma testleri bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler, verinin dağılımına göre parametrik veya nonparametrik olmak durumundadır. Parametrik yöntemlerden en çok bilineni Student’s t-istatistiği kullanılarak yapılan ortalama karşılaştırma testleri (kısaca t-testi veya A/B test), nonparametrik yöntemlerden de Kruskal-Wallis testidir, ayrıca nonparametrik testler, veri boyutunun kısıtlı olduğu durumlarda da görece daha kullanışlıdır. Ancak kimi durumlarda ortalama karşılaştırma testleri sadece ortalamayı kullanmakla kalmaz, standart sapma veya varyans kullanarak da bunu gerçekleştirebilir. Bu yöntem ise parametrik testler içerisinde yer almakla birlikte, güç açısından nonparametrik yöntemlerden daha üstündür. Eğer veri boyutu kısıtlı ama parametrik bir yöntem kullanılmak istenirse ortalama karşılaştırma testleri, en kolaylıkla varyans analizi üzerinden yapılabilir.

Bu tezde, bunun bir örneği olan standart sapma testi nematod deneyleri için kullanılmıştır. Genel bir algoritma olarak, ortalaması yakın olan değişkenlerin, standart sapmalarının da birbirlerine oranı belirli bir aralık içinde gerçekleşmelidir, elbette ki aynı olabilir ancak veri dağılımı çok farklı olabilir ve standart sapmalar çok farklı olabilir. SDtest hızlıca bu konuda, belirli bir aralıkta kalmak şartıyla izin verebilir ancak aşılması durumunda bu testten geçmek mümkün değildir.

Aşağıda formülasyonu belirtilen (3-2, 3-3) F dağılımı ile test edilen bir varyans oranı testi yerine, sadece varyansları kullanarak test edebilir.

$$\sigma_x^2 = \sigma_y^2 \quad (3-2) \quad \text{için analiz edilen,}$$

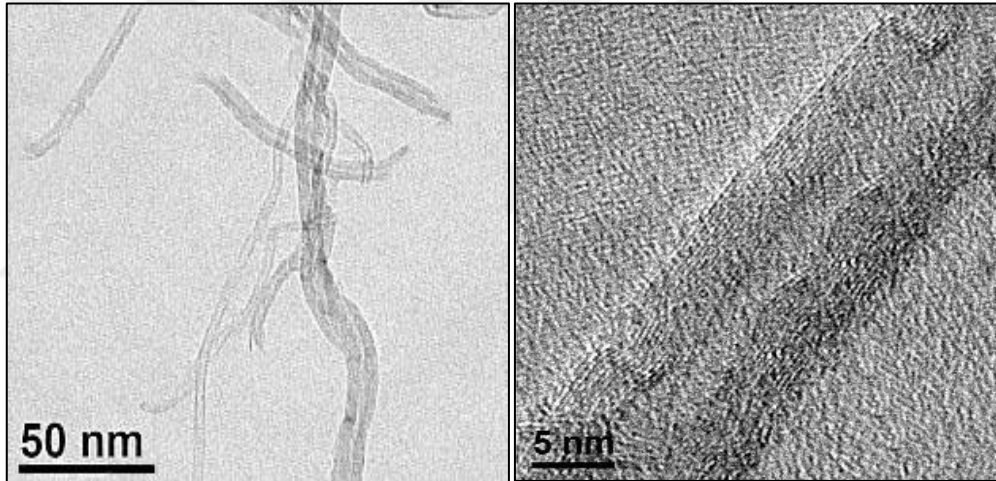
$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad (3-3), \quad n_x-1 \text{ ve } n_y-1 \text{ serbestlik derecesine sahiptir.}$$

Buna göre H0 hipotezinde varyans oranının 1'e eşit olup olmadığı test edilmektedir. H1 alternatif hipotezi ise 1'den küçük/büyük oran (tek yönlü) veya 1'e eşit olmayan bir standart sapma oranı olduğunu test eder. Buna göre sonuçta elde edilen F kritik değeri (veya p-value değeri), tablo F değerinden büyükse (p-value 0.05'den küçükse) H0 hipotezi reddedilebilir, buna göre standart sapma oranları birbirine yakın değildir denir ve hızlıca ortalama arasında da istatistiksel belirgin ve anlamlı bir fark olduğu sonucu çıkarılabilir. Aksi durumda ise H0 hipotezi reddedilemez, dolayısıyla ortalamalar arasında istatistiksel bir fark olmadığı iddia edilebilir.

4. BULGULAR

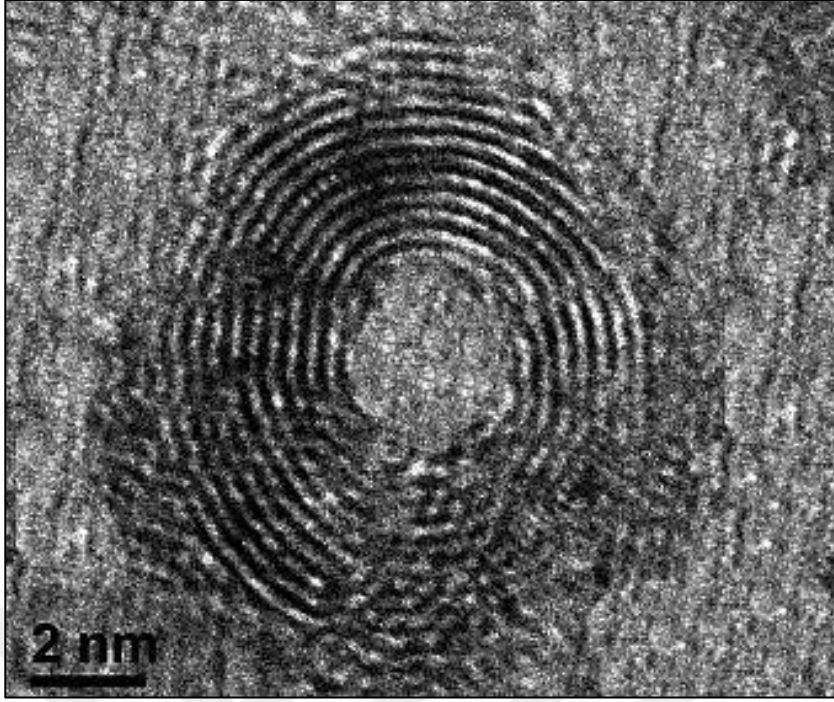
4.1. KNT'lerin TEM ve SEM Görüntüleri

KNT'lerin karakterizasyon aşamasında, duvar sayılarını ve yapısı hakkında bilgi edinebilmenin en iyi yolu TEM ve SEM görüntülerinin elde edilmesidir. SEM görüntüleri bize agregasyon ve aynı boyutlarda bir dağılım olup olmadığı hakkında bilgi verebilir. TEM görüntüleri ile asitle muamele edilerek işlevselleştirilen KNT'lerin yüzeylerinde oluşan işlevsel gruplar da görüntülenebilir. İlk olarak İTÜ'de Enerji Enstitüsü'nde sentezlenen ÇDNT'lere ait TEM görüntüleri Şekil 25'de görülmektedir. (Görüntüler JEOL JEM-ARM200CFEG UHR-Transmission Electron Microscope ile Sabancı Üniversitesi'nde alınmıştır.)



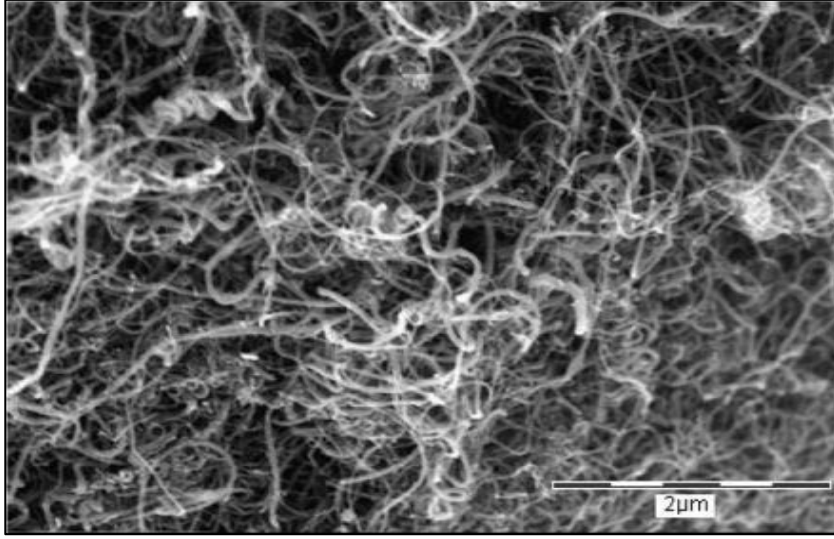
Şekil 25: İTÜ3M ÇDNT'lerin TEM görüntüleri.

İTÜ'de CVD yöntemi ile sentezlenen KNT'lerin şekil 25'deki görüntülerinden ÇDNT yapısına sahip oldukları görülmektedir. 50 nm ölçekli görüntüde dallanmış yapılar ve, duvar sayısındaki değişiklikler göze çarpmaktadır. Aynı resimde agregasyonlar görülmekte ve bu bölgede noktasal nano küre benzeri yapılar olduğu görülmektedir. Ayrıca yapıdaki dallanmalarda açık ve kapalı uçlu KNT'ler vardır. KNT'ler için 5 nm ölçekte elde edilen görüntüde çok duvarlı yapısı daha çok göze çarpmaktadır. İç ve dış yarıçaplar 3-15 nm arasındadır. Ayrıca yapıda birtakım düzensizlikler olduğu göze çarpmaktadır. Yapının içi boş, silindirik, tüp yapısı da bu görüntüde doğrulanmaktadır.

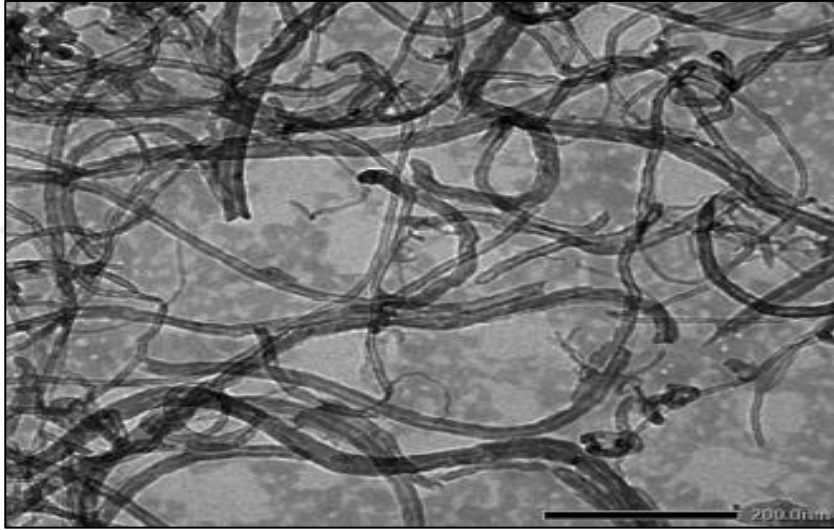


Şekil 26: KNT duvar yapısının TEM görüntüsü.

TEM görüntüsünde duvar sayılarının 5-10 arasında değiştiği görülmektedir (Şekil 26). Yapıdaki duvar sayılarının değişmesi de, yüzeydeki girintili yapıları doğrulamaktadır. Yapıda hem kısa hem uzun ÇDNT'ler olduğu görülmektedir. Şekil 27'de kısa ve uzun dallanma yapıları, sentezlenen KNT'lerin içinde oldukça uzun KNT'ler olduğunu göstermektedir. 1-1,5 μm arasında bir boy dağılımı olduğu görülmüştür. Ayrıca İTÜ'de kütle (bulk) yoğunluğu ölçümü yapılmış ve 120-140 kg/m^3 aralığında ölçüm sonuçları elde edilmiştir. % 95'in üzerinde saflık elde edilmiştir. İTÜ'den elde edilen ÇDNT'lerin yanında, kütle yoğunluğu birbirinden farklı 2 farklı ÇDNT Bayer'in Baytube firmasından elde edilmiştir. Baytube'ün C150P ve C70P kodlu 2 adet ÇDNT çeşidi, HT-29 hücrelerinde denenmiştir ve *C. elegans* 'ta kısa dönem toksik etkileri incelenmiştir. Ticari olarak da elde edilebilen bu KNT'lerin TEM görüntüleri firmadan temin edilmiştir (84). C150P'nin 2 μm çözünürlükteki TEM görüntülerine bakıldığında, kütle yoğunluğunun oldukça fazla görüldüğü, belli bölgelerde agregasyonlar olduğu görülmektedir. Ayrıca yapıda noktasal bazı parçacıklar da göze çarpmaktadır. Bu küçük noktasal yapılar üretim sırasında kullanılan metallerden kaynaklanabilir ya da karbon atomlarının oluşturduğu nano küreler olabilirler (Şekil 27).



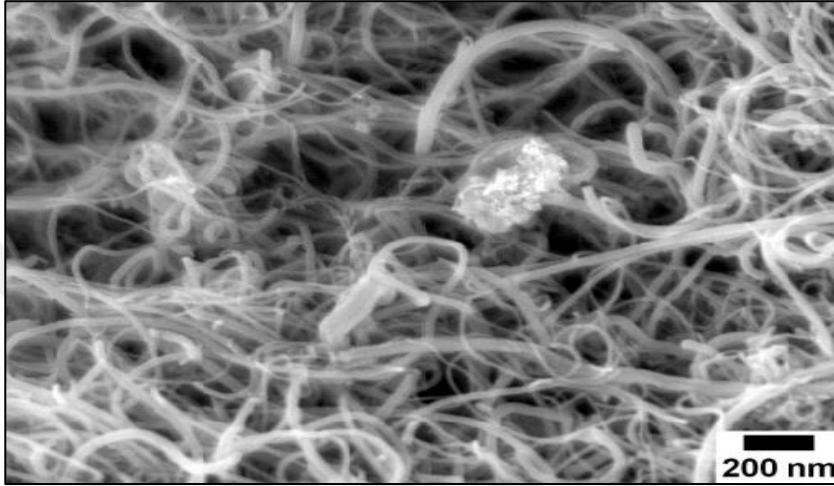
Şekil 27: C150P 'nin SEM görüntüsü (84).



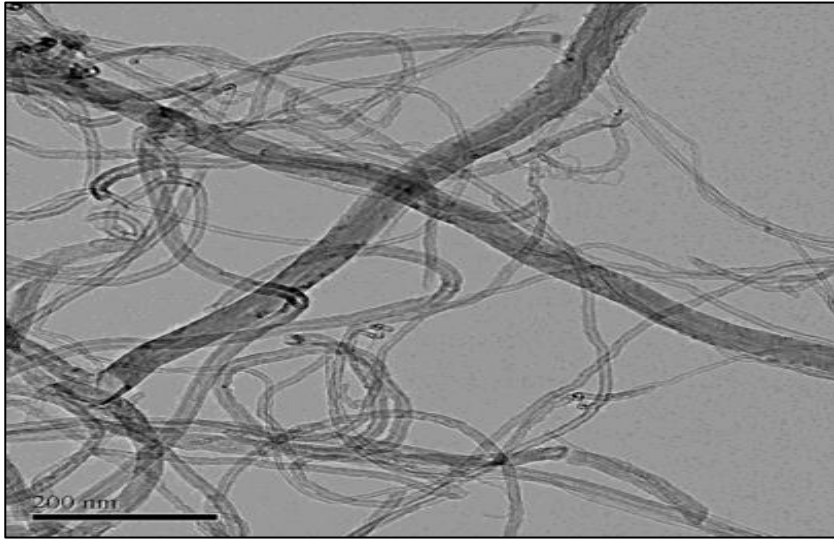
Şekil 28: C150P TEM görüntüsü (84).

C150P'nin 200 nm çözünürlükteki TEM görüntüsünde, yapıların ÇDNT yapısında olduğu ve dallanmaların ve ÇDNT parçalarının 200 nm'nin de altında uzunluğa sahip olduğu görülmektedir (Şekil 28). C150P'nin saflığı % 95'in üzerinde üretilmiştir. İç çapı ~4 nm ve dış çapı ~13 nm genişliktedir. Boyu ortalama 1 μm , bulk yoğunluğu 130-150 kg/m^3 arasında değişmektedir. C70P'nin, iç çapı ~4 nm ve dış çapı ~13 nm genişliktedir. Boyu ortalama 1 μm , kütle yoğunluğu 45-95 kg/m^3 arasında değişmektedir.

TEM görüntüsünde C70P'nin daha az kütle yoğunluğa sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca 1 μm 'ye kadar farklı kalınlık ve uzunluklarda ÇDNT yapıları görülmektedir (Şekil 30). Daha kalın yapıda yüksek çap değerlerine sahip ve ince yapıda küçük çap değerlerine sahip KNT'ler de görülmektedir. Daha düşük kütle yoğunluğuna sahip olan C70P'de gözlemlenen boşluklar bunu doğrular niteliktedir (Şekil 29).

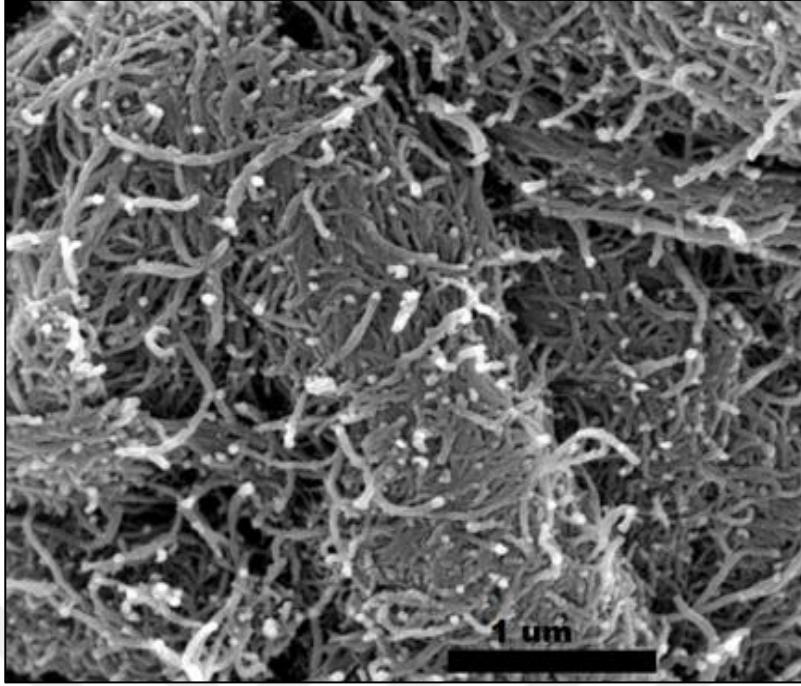


Şekil 29: C70P SEM görüntüsü (84).



Şekil 30: C70P'nin 200 nm çözünürlükte TEM görüntüsü (84).

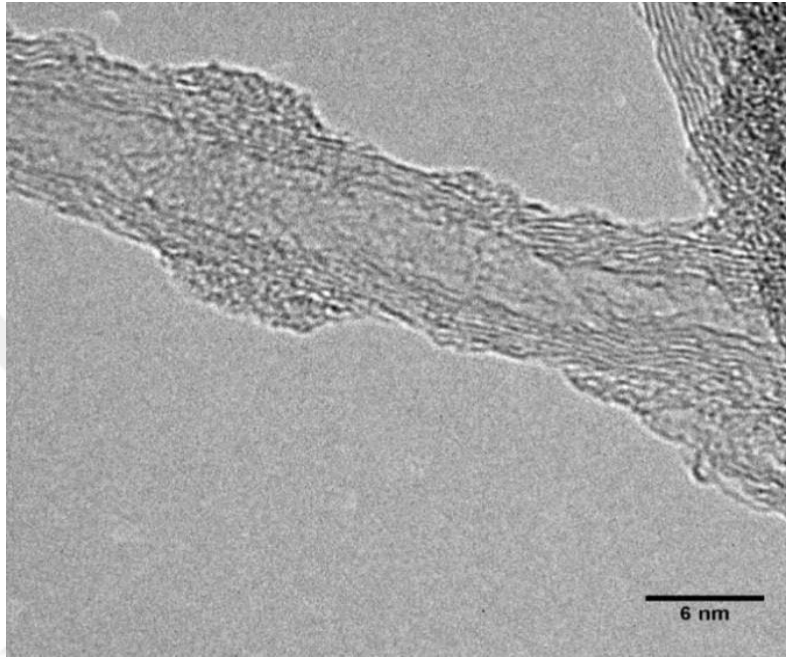
Şekil 30'daki TEM görüntüsünde C70P'nin daha az bulk yoğunluğa sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca 1 μm 'ye kadar farklı kalınlık ve uzunluklarda ÇDNT yapıları görülmektedir.



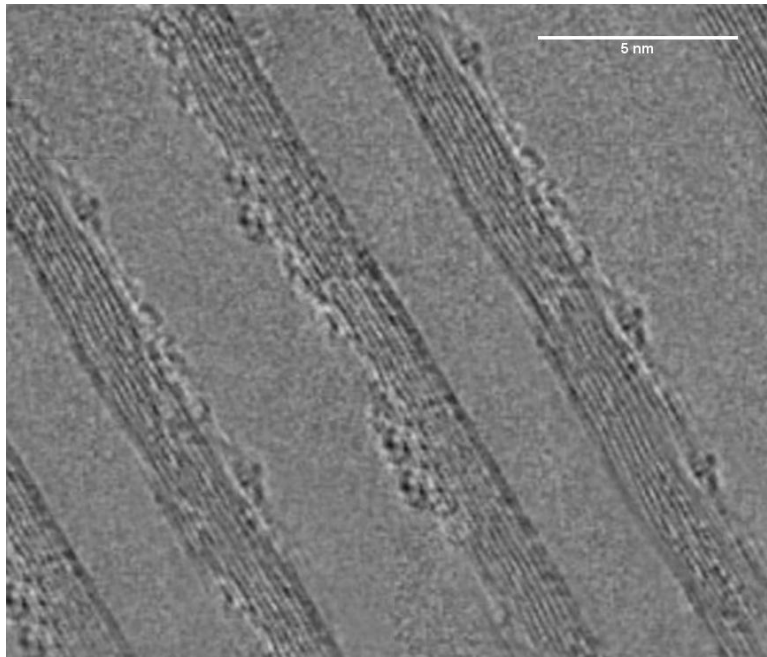
Şekil 31: Nanografiden temin edilen saf ÇDNT'lerin SEM görüntüsü.

Saf KNT'lerin SEM görüntüsü, yaklaşık 1 µm çözünürlükteki uçları kapalı ve demetsi yapıda izlenmektedir (Şekil 31). Ayrıca yapıda noktasal safsızlıklar ve KNT'nin tüp yapısı da göze çarpmaktadır. Bir tabaka üzerinde yaklaşık 800 °C'de termal kimyasal buhar biriktirme ile biriktirilmiş ve hizalanmış karbon nano lifleri bu görüntüde gözlemlenmek mümkündür. Yaklaşık olarak benzer uzunluklarda lif yapılar gözlemlenmektedir. Burada görülen mikro yapıların, iç yapıları ancak TEM ile izlenebilir. Nanografide üretilen KNT'lere ait yüksek çözünürlüklü TEM görüntüsünde çok duvarlı yapı izlenmektedir (Şekil 32). En içteki silindir yapıya ait yarıçap 2-3 nm arası değişmekte, dış yarıçap 5 nm'yi bulabilmektedir. Boşluklu silindir yapı ve değişen duvar sayıları izlenmektedir. Yapıda dallanma bağlantı bölgelerinde, duvarlı silindirik yapının çevresinde kalınlaşmalar ve fazlalıklar göze çarpmaktadır. iKNT'lerin şekil 33'deki görüntüsüne bakıldığında agregat yapıların azaldığı ve daha hizalı bir yapı kazandığı görülmektedir. ODTU'de üretilen ve işlevsel hale getirilen KNT'lerin TEM görüntüleri ile, 0,5 -1 µm arası uzunlukları ve 2-8 nm iç ve dış çapları doğrulanmaktadır (Şekil 31-33). Dikey olarak hizalanmış, konik karbon nanotüplerin yapısını göstermektedir şekil 33'de görülmektedir. Bu yapıları doğada bu haliyle gözlemlenmek mümkün değildir, doğada tamamen amorf yapıdadırlar. İç yapıda sıralı duvarlar, merkezi oyuk kısım açıkça görülmekte, KNT'lerin oyuk yapısı doğrulanmaktadır. Ayrıca iç ve dış

yarıçaplar, diğer nanofiberlerle aralardaki mesafelerde gözlemlenebilmekte, yaklaşık olarak ölçülmektedir. İç içe duvarlar arası mesafe de görülmektedir. KNT'lerde uzun mesafede sıralı bir düzen yoktur ancak işlevselleştirme sonrası daha sıralı bir düzen gözlenir. Yüzeylerde oluşan oyukları ve karboksil grupları da izlenebilmektedir (Şekil 33).



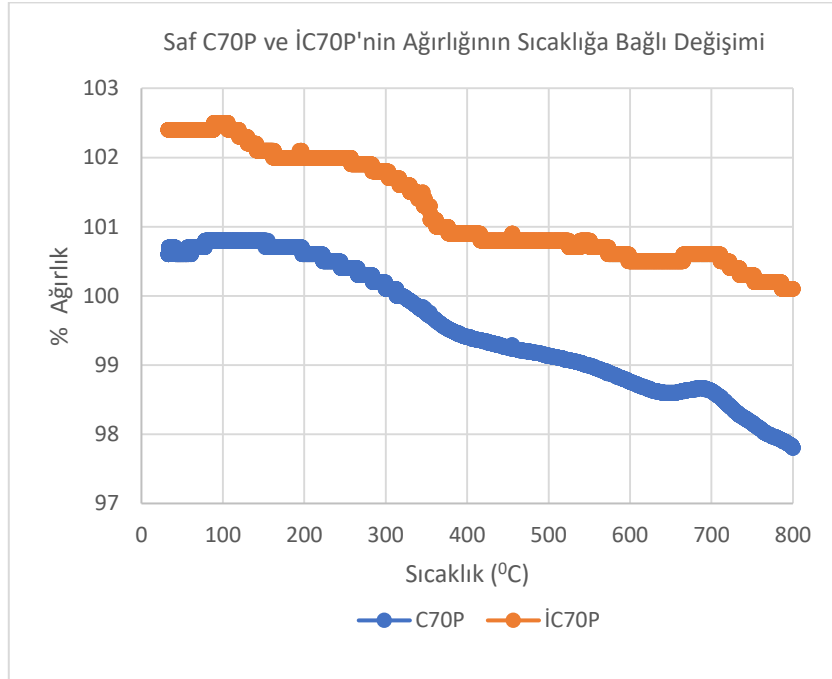
Şekil 32: Saf KNT'lerin yüksek çözünürlükteki TEM görüntüsü.



Şekil 33: İKNT'lerin TEM görüntüsü.

4.2. Serbest ve Yüklü KNT'lerin Termogravimetrik Analizi

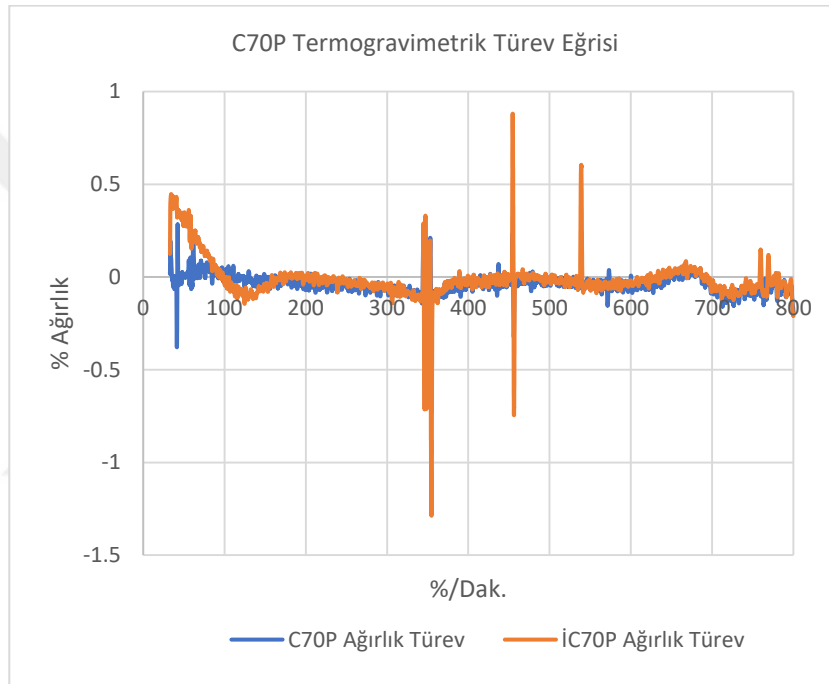
TGA, sıcaklığa bağlı olarak ağırlık kaybının araştırıldığı, oksijen ya da nitrojen gazı ortamında numunelerin yakılarak, belirli sıcaklıklardaki kütle kayıplarına bağlı olarak içerik bilgisi elde edilebilen bir yöntemdir. Bu yöntem aracılığı ile ilk olarak saf ve işlevselleştirilmiş C150P ve C70P'lerin karakterizasyonu yapılmıştır. İşlevselleştirme aşamasında her iki KNT'de aynı süre ve sıcaklıkta asitle muamele edilmiştir. Kütle yoğunluğu yüksek olan C150P kodlu numune için bu süre ve sıcaklık yeterli olmamış ve işlevselleştirme işlemi yeterince gerçekleşmemiştir. Kütle yoğunluğu daha düşük olan C70P'nin ve İC70P'nin kütle kaybına ve hangi sıcaklıklarda belirdin değişimler olduğunu gösteren Şekil 34'e bakıldığında, 200 °C'den hemen sonra, 250, 350 ve 450 °C'den sonra ani kütle artışı ve azalmaları olduğu görülmektedir. Bunlar yüzeyde oluşmuş ve karbon atomları ile bağ yapmış -OH gruplarının sebep olduğu değişikliklerdir. Yapılan TGA analizleri sonucunda, İC70P'nin kütle kaybının daha az olduğu görülmektedir (Tablo 2). Bu beklenen bir durum değildir çünkü literatürdeki çalışmalarda işlevselleştirme sonrası uçların açılması, yüzeyde oluşan oyuklar ve bağlanan karboksil grupları nedeniyle sıcaklığa bağlı kütle kaybı yaklaşık % 30'luk bir fark oluşturmaktadır. TGA türev eğrisinde yüzeyde -OH gruplarına işaret eden değişimler vardır. Ancak bunların miktar olarak az olduğu görülmektedir (Şekil 34).



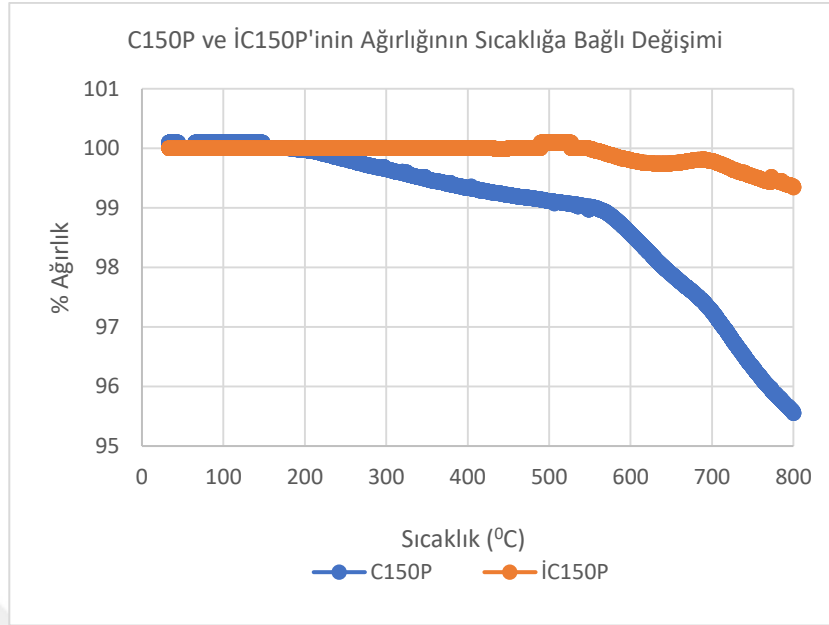
Şekil 34: C70P ve İC70P'nin sıcaklığa bağlı kütle değişimi.

Tablo 2: C70P ve İC70P'nin sıcaklığa bağlı ağırlık değişimleri

KNT	Sıcaklık aralığı (°C)	% değişim	Kütledeki değişim (mg)
C70P	33 – 900	2,78	0,095
İC70P	33 – 800	2,25	0,090

**Şekil 35: C70P ve İC70P'nin, sıcaklığa bağlı kütle değişiminin türev eğrisi.**

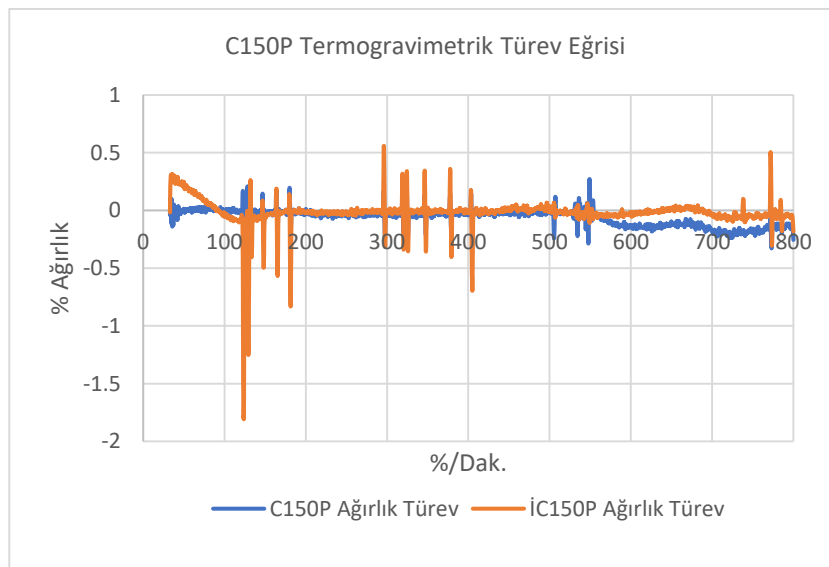
C150P'nin ve asitlerle muamele edilmiş C150P'nin TGA egrisi incelendiğinde, yüzeyde karboksil grupları oranının oldukça az olduğu, hatta bu oranın İC70P'de 0.0897 mg'lık bir azalmaya denk gelirken, İC150P'de 0,0196 mg'lık bir değere karşılık geldiği görülmektedir (Şekil 39). Aralarındaki tek fark kütle yoğunluğu olan bu iki tür ÇDNT'lerin daha uzun süre ve sıcaklıklarda kuvvetli asitlerle muamele edilerek, istenilen işlevselleştirme oranına ulaşılabilir.



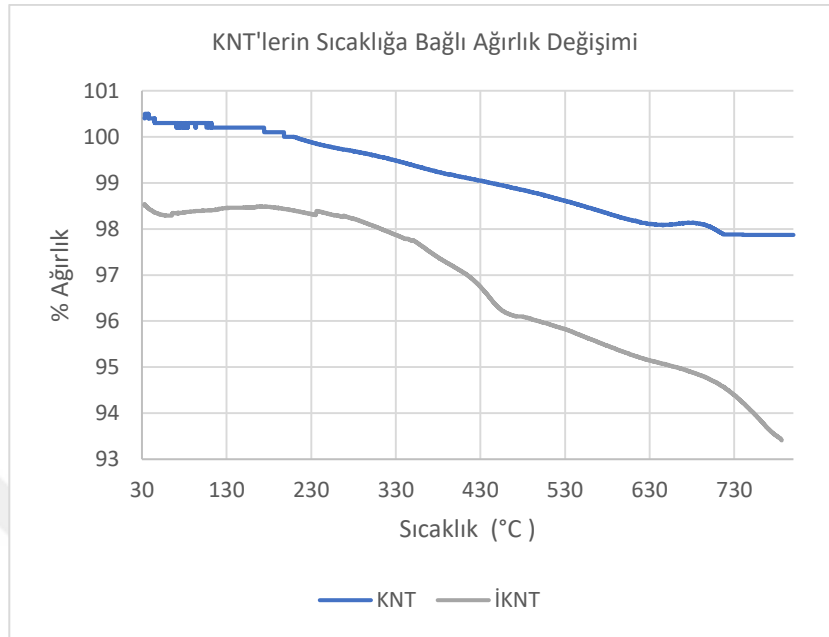
Şekil 36: C150P ve İC150P'nin sıcaklığa bağlı kütle değişimi.

Tablo 3: C150P ve İC150P'nin sıcaklığa bağlı ağırlık değişimleri.

KNT	Sıcaklık aralığı (°C)	% değişim	Kütledeki değişim (mg)
C150P	33 – 800	0,36	0,23
İC150P	33– 800	4,56	0,20

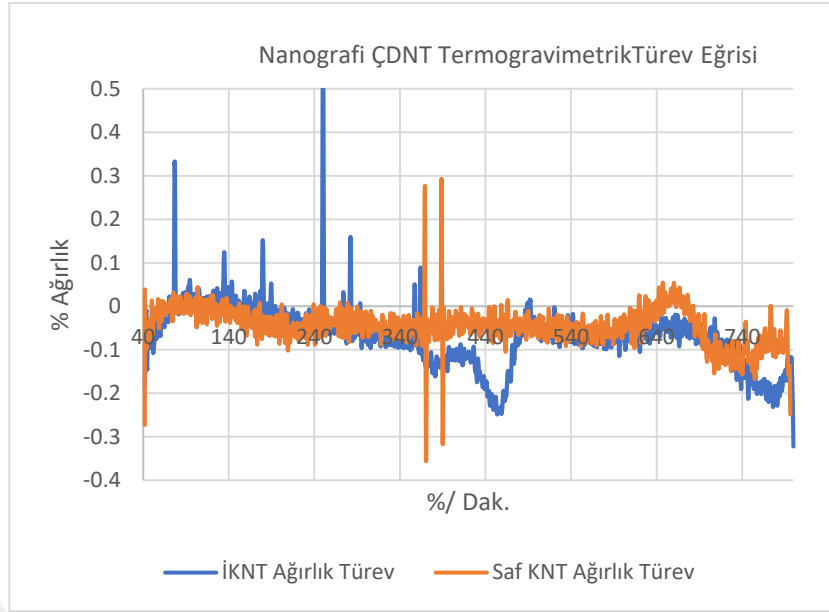


Şekil 37: C150P ve İC150P'nin, sıcaklığa bağlı kütle değişiminin türev eğrisi.



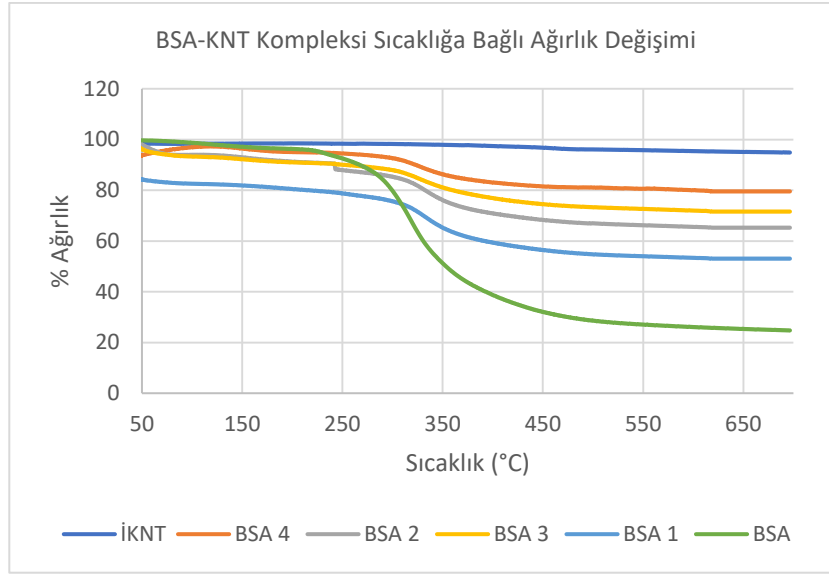
Şekil 38: Nanografiden elde edilen ÇDNT'lerin TGA analizleri.

Saf ve İKNT'lerin termal bozunma eğrileri, işlevselleştirme sonrası, fonksiyonel grupları doğrulamaktadır. Saf KNT'lerin termal bozunmaya karşı daha stabil bir durum sergilediği ve ağırlık kaybının 100,4'den, 97,9'ye düştüğü; İKNT'ler içinse bu değişimin, 98,7'dan 91,9'ye azaldığı görülmüştür. İKNT'ler için 600-800 °C arasındaki değişim, -COOH gruplarının termal bozunmasını ifade etmektedir. Saf KNT'lerde % 2,5 sıcaklığa bağlı ağırlık kaybı gözlenirken, İKNT'lerde % 8 ağırlık kaybı izlenmiştir (Şekil 38).



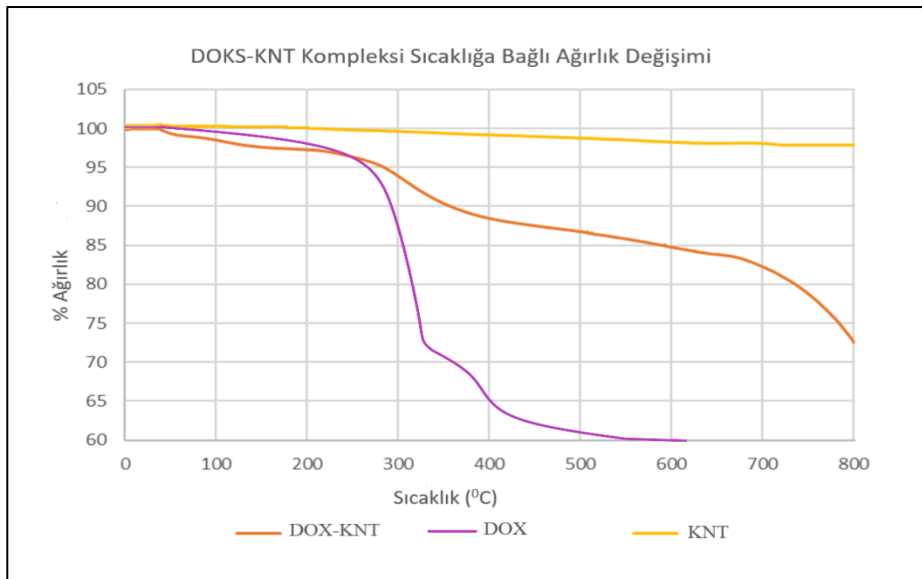
Şekil 39: Nanografiden alınan İKNT'lerin termogravimetrik türev eğrisi.

Saf KNT'lerde 600 °C'ye kadar lineer bir azalma ve sonrasında oldukça az bir değişim gözlenirken, işlevsel KNT'lerde 340, 440 ve 740 °C'den sonra belirgin kütle kayıpları olmuştur (Şekil 39). İKNT'lerde daha aşamalı bir bozunma görülmektedir. TGA böylece KNT'lerin işlevselleşme miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. TGA'nın KNT'lerin karakterizasyonu dışında, kütle kazanımı ya da kaybını, malzemenin ayrışma sıcaklıklarını ve bu ayrışmalara bağlı olarak, malzemelerin bileşimlerini ve termal stabilitesini belirlemek için de kullanılır. İKNT'nin TGA eğrisi elde edildikten sonra, BSA yüklenmiş İKNT'lerin ve saf BSA'nın da TGA eğrisi elde edilmiştir. Daha önce TGA ile ilgili literatür bilgisi verilirken Şekil 12'de BSA'nın % ağırlık kaybı ve hangi noktalarda dikkat çeken azalma ve artma olduğunu gösteren termal türev eğrisi verilmişti. Şekil 12'de görülen termal türev eğrisinde 227, 314 ve 321 °C'de ani kütle değişimleri olduğu görülmektedir. BSA-KNT oranları BSA 1 kodlu numunede 1,5, BSA 2'de 1, BSA 3 'de 0,66 ve BSA 4'de 0,25 şeklindedir. Termal bozunma eğrisine bakıldığında, BSA miktarı fazla olan numunenin bozunma eğrisi de BSA eğrisine yaklaşmaktadır. BSA 1 için % 59,12 , BSA 2 için % 36,57 , BSA 3 için % 32,27 , BSA 4 için % 11,8 adsorpsiyon tespit edilmiştir. Bu oranlar nano taşıyıcılar için yüksek bağlanma oranlarıdır (Şekil 40).



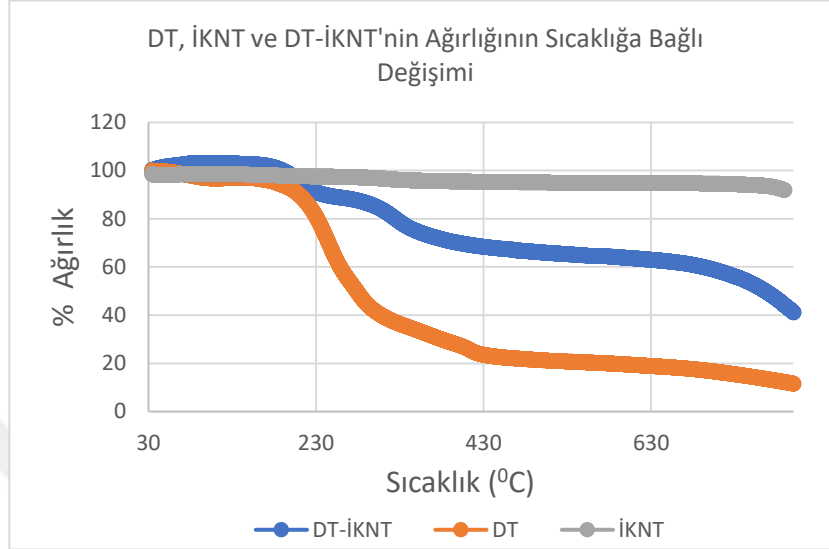
Şekil 40: KNT-BSA ve İKNT-BSA komplekslerinin termal bozunma eğrileri.

Doks inert nitrojen ortamında yakıldığında, 237, 320 ve 400 °C’de yüksek oranda kütle kayıpları izlenmiştir. Doks yüklenmiş KNT’ler için spektroskopik yöntemler incelendiğinde, en yüksek konsantrasyonda (2 mg Doks, 3 mg İKNT), elde edilen absorbans değerine göre hesaplama yapıldığında 1000 mg İKNT’ye 190,79 mg Doks bağlanması elde etmiştik. TGA eğrisinden elde edilen sonuca göre ise bu oran % 23 olarak ortaya çıkmıştır. 1000 mg için 234 mg bağlanma ile değerler birbirini birebir doğrulaması da birbirine yakın değer ortaya çıkmıştır.



Şekil 41: Doks-İKNT komplekslerinin termal bozunma eğrileri.

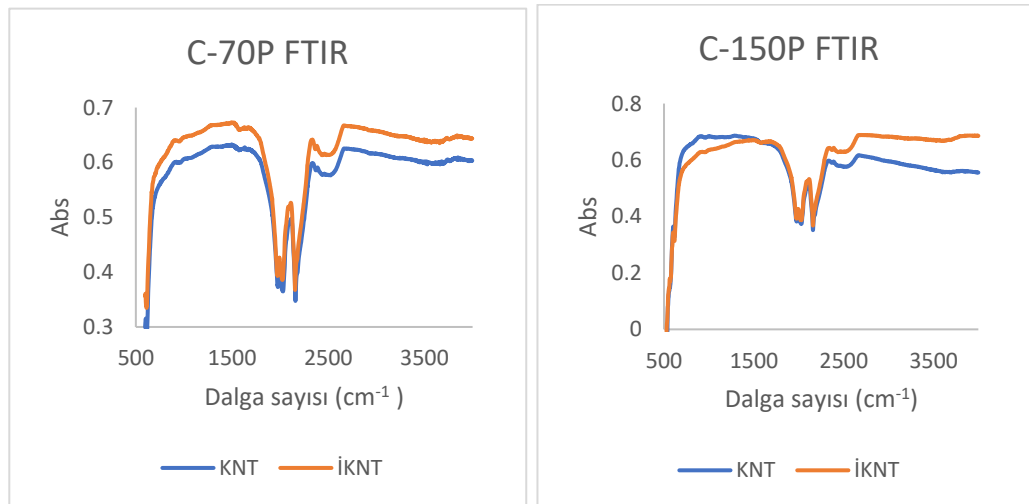
Daha önce literatürde DT'nin İKNT'lere bağlanması ile ilgili bir çalışma olmadığından, 1 mg DT ile 1 mg İKNT etkileşime sokuldu. % 51'luk bir bağlanma oranı görüldü (Şekil 42).



Şekil 42: DT-İKNT komplekslerinin termal bozunma eğrileri.

4.3. FTIR ile Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

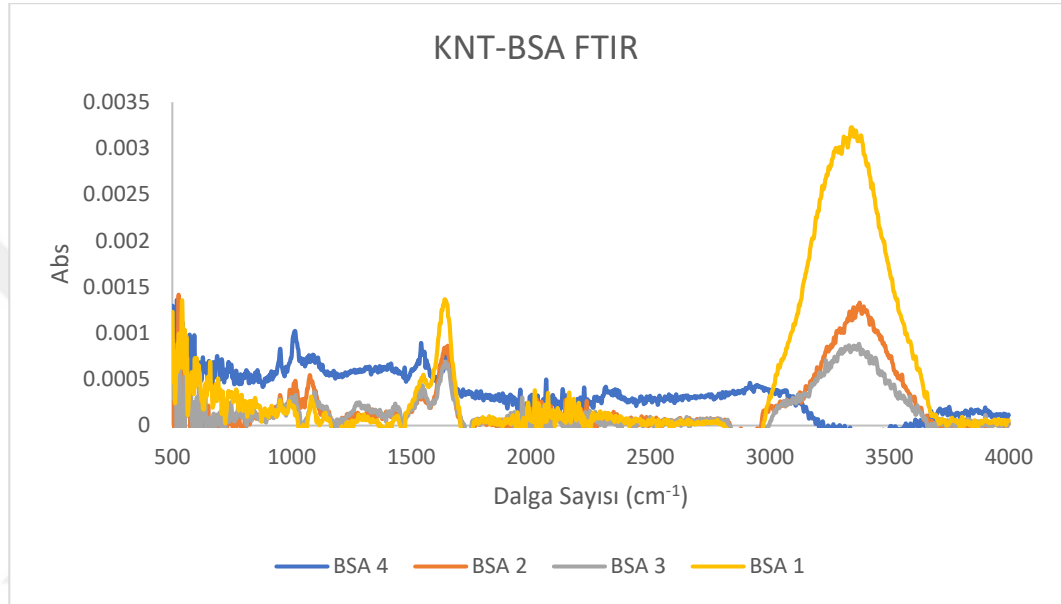
Diğer bir spektroskopik yöntem olan FTIR ile de KNT'lerin karakterizasyonu yapıldı ve BSA'nın KNT'ye bağlanma oranı toz numuneden elde edildi.



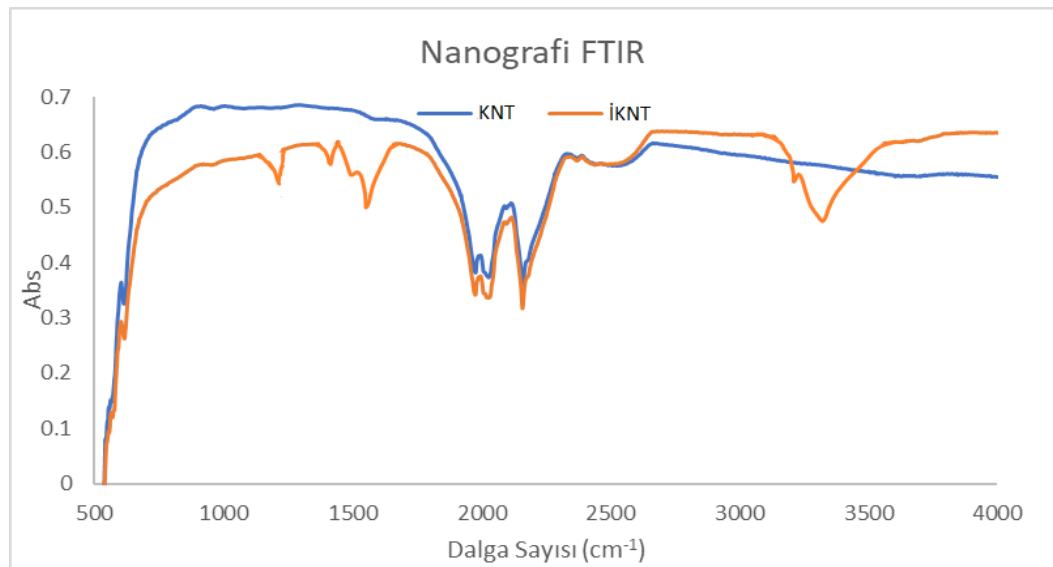
Şekil 43: C-70P ve C-150P'nin FTIR Spektrumları.

Baytube'den elde edilen ve işlevsel hale getirilmeye çalışılan KNT'lerin, yüzeylerinde karboksilik gruplara yönelik titreşimler izlenmezken, 1500-2000 cm^{-1} aralığında C=C gemesi görülmektedir (Şekil 43).

KNT'lere BSA bağlandıktan sonra toz numunelerden elde edilen sonuçlarda, artan BSA oranına karşı, artan şiddette absorpsiyon elde edilmiş ve bağlanma oranı doğrulanmıştır (Şekil 44).



Şekil 44: BSA'nın toz numunelerinden elde edilen FTIR spektrumları.

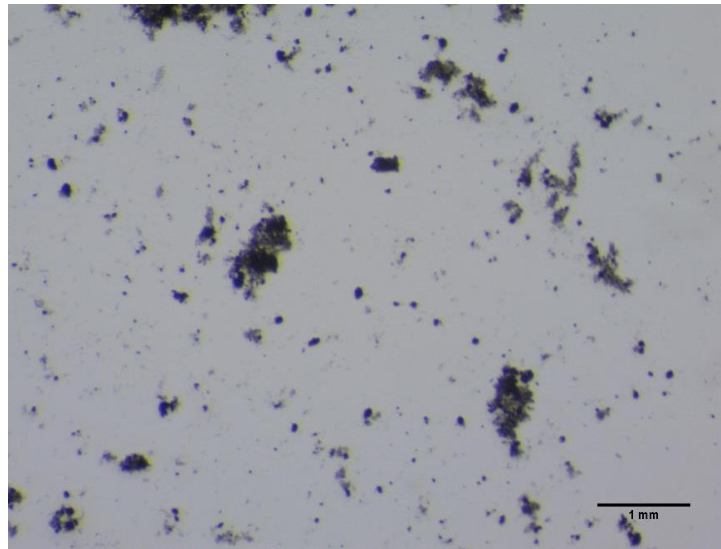


Şekil 45: Nanografi KNT'lerin FTIR spektrumu.

Doks, BSA ve DT bağlama çalışmalarında kullanılan nanografiden elde KNT'lerin FTIR spektrumları, işlevselleştirme işlemini ve yüzeyde oluşan -COOH gruplarını doğrulamaktadır (Şekil 45). Doks, BSA ve DT bağlama çalışmalarında kullanılan KNT'lerin (Nanografi) FTIR spektrumları, işlevselleştirme işlemini ve yüzeyde oluşan COOH gruplarını doğrulamaktadır (Şekil 45). Karakterizasyon ve bağlanma çalışmalarında deneyler 3 kez tekrarlanmış ve ortalamalar alınmıştır.

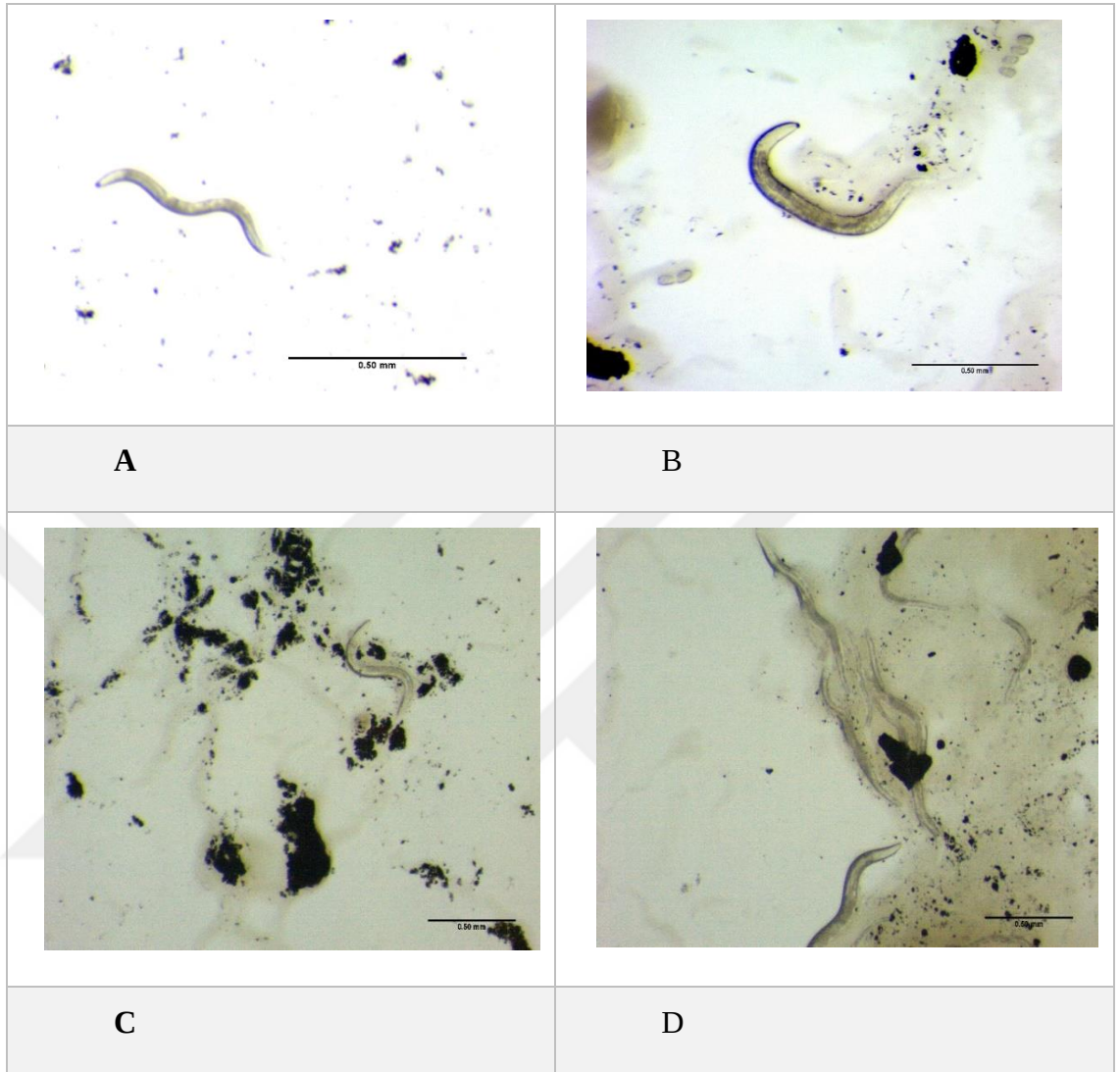
4.4. *C. elegans* ile Yapılan Toksisite Araştırmaları

İlk yapılan toksisite araştırmalarında, İTÜ ve Baytube'den temin edilen KNT'ler kullanıldı. İlk yapılan deneylerde, L4 evresine gelmiş bireylerin besisi yerine steril distile suda çözdürülmüş 3 farklı KNT çeşidi 100 µg/ml olarak uygulandı. 24 saat boyunca, 8 saat aralıklarla mikroskop görüntüleri, kontrol grubu ile karşılaştırarak değerlendirme yapıldı. Birim alana düşen *E. coli* sayıldı ve en yüksek derişimde (100 µg/ml) *C. elegans*'ların yaşam ortamlarına bırakıldı. Yumurtladıkları ve yumurtalarını KNT'lerin üzerine bıraktıkları görüldü. KNT'lerin aralarından geçtiler ve toksik maddelere davrandıkları gibi davranmadılar. Bu hayvanların toksik malzemelerden kaçma eğilimi gösterdikleri ve bu malzemenin en az bulunduğu ya da hiç olmadığı yerde toplandıkları bilinmektedir. L4 evresinden sonra 4 saat içinde yumurtalarını bırakmaktadırlar. Yumurta sayılarında kontrol grubuna göre azalma olması da toksisite sonucu olarak değerlendirilir (Şekil 46).



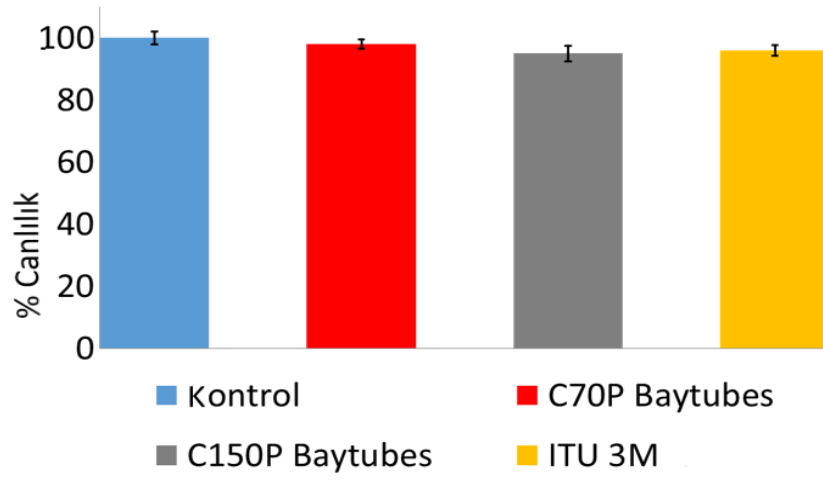
Şekil 46: KNT'lerin petri kabındaki görünümü.

C. elegans'ın KNT çevresinden uzaklaşmaması ve yumurtlamaları, yüksek derişimlerde bile, KNT'lerin toksik etki yaratmadığını ortaya koymaktadır.



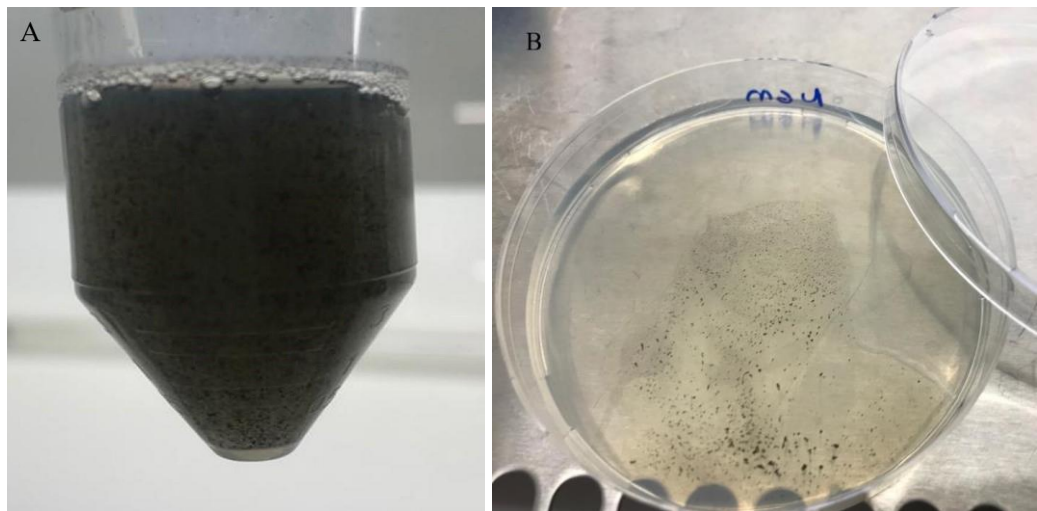
Şekil 47: *C. elegans*'ın petri kabındaki görünümü. A) Başlangıç, B) 8. saat, C) 16. Saat. D) 24 saat sonraki görünümü

İlk incelemelerde, 24 saat sonrasında anlamlı bir toksisite etkisi gözlemlenmedi. Her petri kabında 1 ya da 2 hayvan azalma vardı. Ancak yumurtlamaya devam etme davranışları ve ortalama yumurta sayılarında anlamlı fark gözlenmedi (Şekil 47 B)'de yumurtalar görülmektedir. Kontrol gruplarında daha az yumurta sayısına sahip bir petri kabımız vardı. Hayvanlar KNT'lerden kaçma eğilimi göstermediler. KNT'lerle beslendikleri ve yumurtalarını KNT olan bölgelere bıraktıkları gözlemlendi. Tüm KNT'ler için yaklaşık değerlerde hayvan sayısı olması, farklı kaynaklardan temin edilen, KNT'lerin canlılığı etkilemediğini gösterdi (Şekil 48).



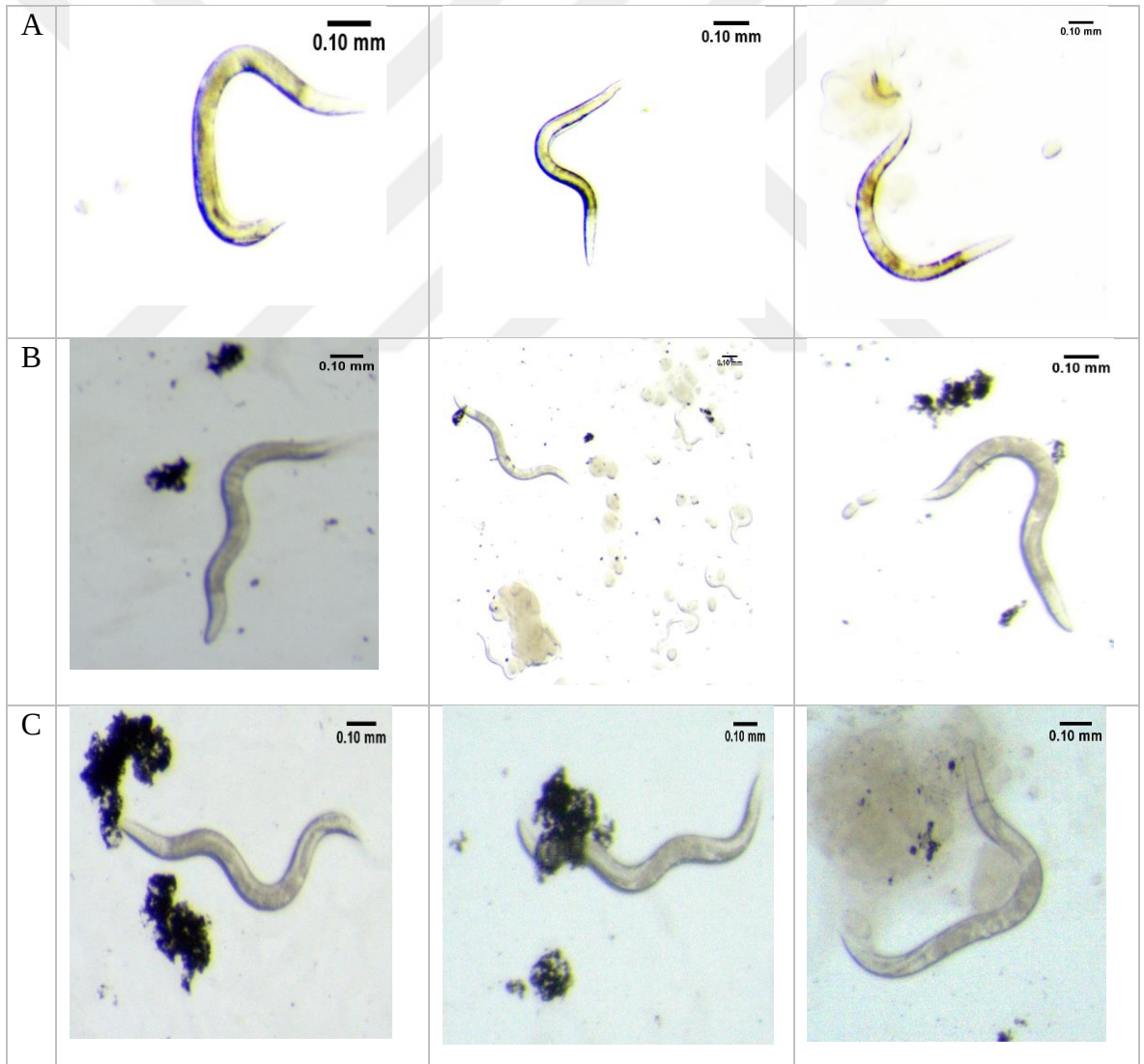
Şekil 48: KNT uygulanan *C. elegans*'ın canlılık oranları.

Sonraki çalışmalarda Nanografide üretilen KNT'ler işlevsel hale getirilerek *C. elegans* 'da denendi. *C. elegans* 12-15 gün arası bir yaşam süresine sahip olduğundan 15 gün boyunca steryo mikroskopla incelenip fotoğrafları alındı. Sayılarındaki değişimlere bakıldı; boy ve kalınlık ölçümleri yapıldı. Diğer 3 KNT ile yapılan deneylerde, petriye 100 µg/ml uygulanırken daha sonraları 500 µg/ml'ye kadar çıkıldı. Bu denemelerde, her derişim için 4 petri ile çalışıldı ve her petriye L4 evresinde 50 birey ekildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı. İKNT'ler, bakterilerin çoğaltıldığı besi yerine 1 mg/ml ilave edildi. Yaklaşık 10 dak. sonra petriye aktarıldı ve fotograflandı (Şekil 49).



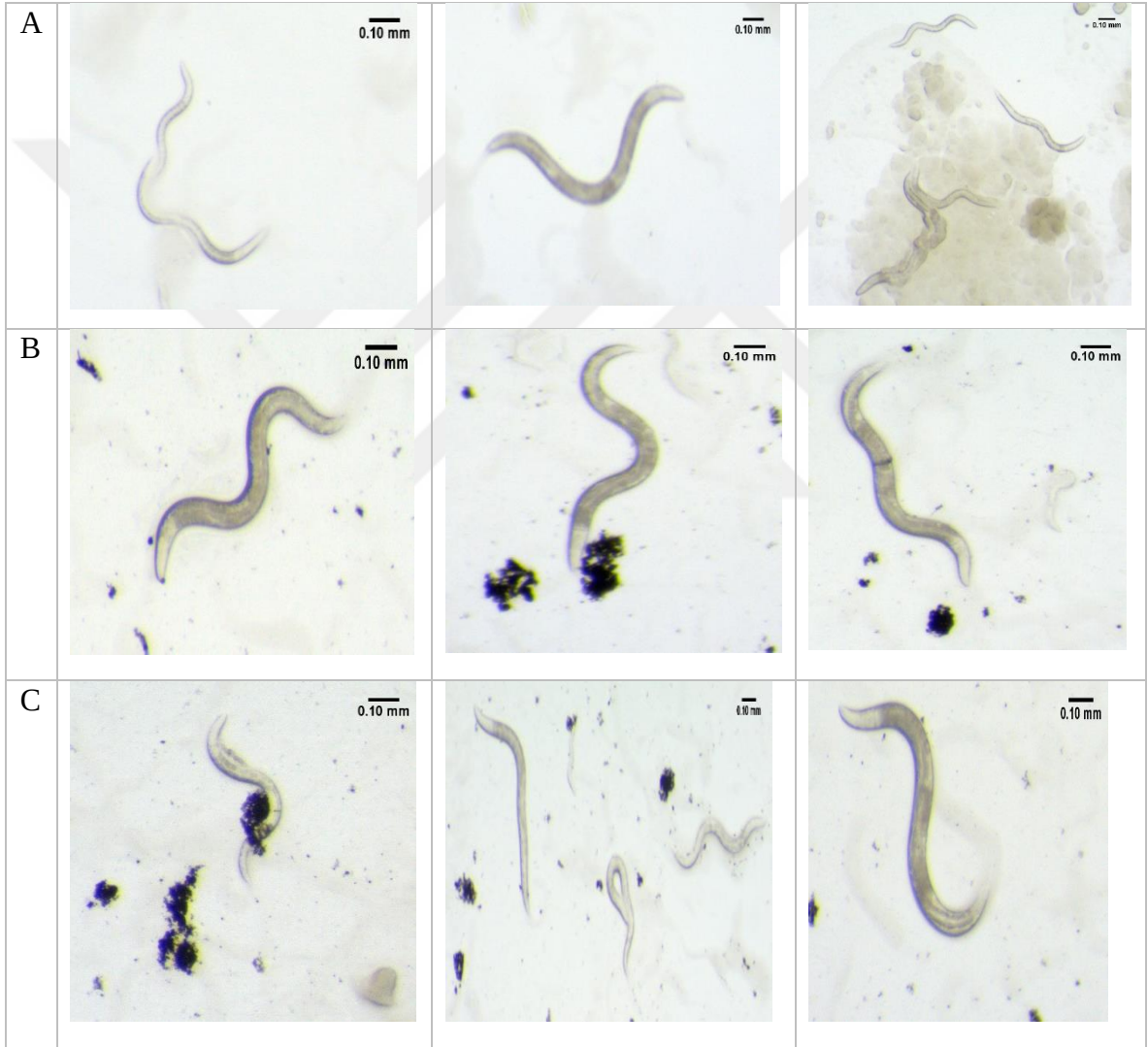
Şekil 49: E.Coli-KNT süspansiyonunun hazırlanışı. A) E. coli ile medyumda karıştırılan KNT'ler B) İKNT'lerin E. coli ile karıştırılarak petriye ekilmesi

Sonrasında bakteriler, medyum ve İKNT karışımı, solucan ekimi yapılmadan önce, NGM içeren petri yüzeyine eşit dağıtıldı. Bakteri medyumunun içerisinde KNT'lerin süspanse olduğu, ancak ilk durumda daha homojen bir görüntü sergilerken, 10 dakika bekletildiğinde çevrelerinin bakteriler tarafından sarılması nedeniyle, farklı şekillerde agrege olmuş yapılar oluşturdıkları görüldü (Şekil 49). Bakteri-KNT-medium karışımları eşit sayıda bakteri (100, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) içeren derişimlerde İKNT ile karıştırılarak NGM yüzeyine dağıtıldı. KNT ilavesinden sonra *C. elegans* petrilere 50'şer birey sayılarak ekildi. Çalışmalarda farklı günlerde (1, 3, 6, 8, 10, 12 ve 15) boy ve uzunluk ölçümleri yapılan *C. elegans*'ın, görüntüleri, karşılaştırmalı olarak gösterildi.



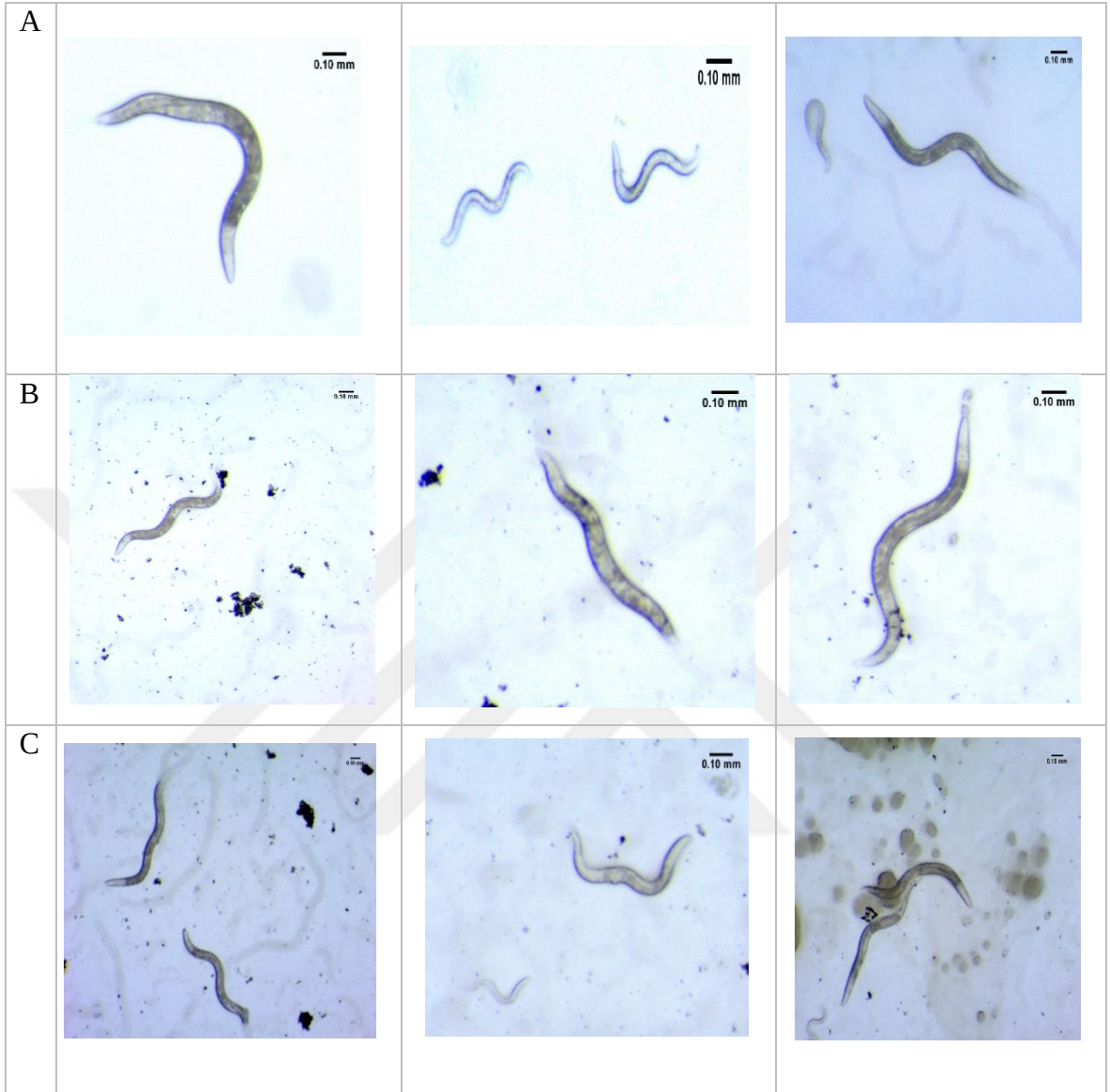
Şekil 50: KNT uygulanan *C. elegans* 'ın ilk gün görüntüleri. A) Kontrol KNT yok, B) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KNT, C) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KNT.

İlk gün elde edilen görüntülerde, KNT uygulanan *C. elegans* 'ın hem kontrol hem de diğer gruplarında yumurtalar ve yumurtadan çıkan bireyler gözlenmiştir. Bireylerin KNT'lerden yedikleri, yumurtalarını KNT olan bölgelere yaptıkları görülmüştür. Bireylerin hareketlerinde ve yer değiştirme davranışlarında ilk gün fark gözlenmemiştir (Şekil 50). Üç grupta da, 2. ve 3. günlerde, yer değiştirme, beslenme davranışlarında fark izlenmedi. Bireylerin KNT'lerin arasından geçtikleri, KNT'lerle beslenmeye devam ettikleri gözlemlendi (Şekil 51).

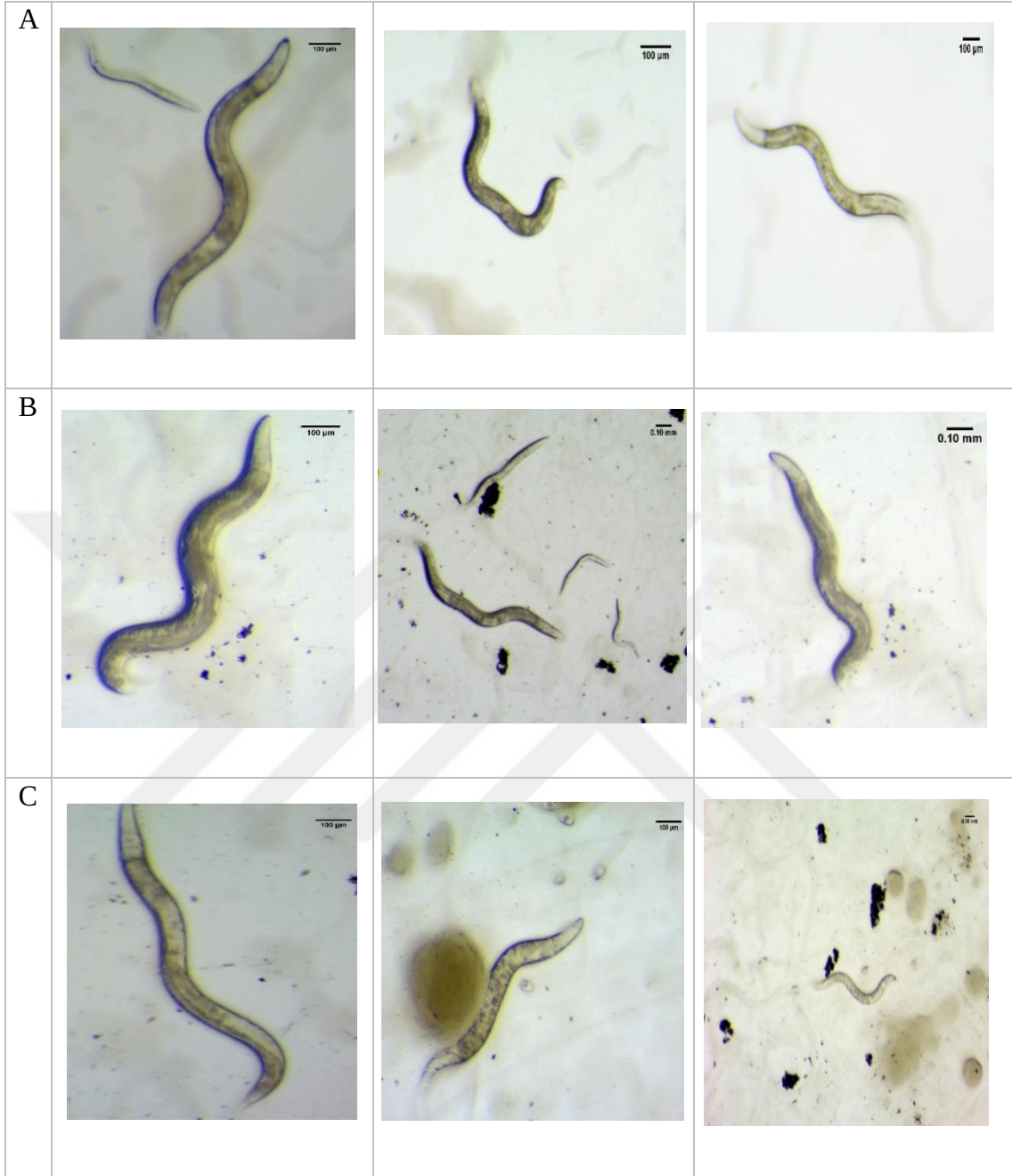


Şekil 51: KNT uygulanan *C. elegans* 'ın 3. gün görüntüleri. A) Kontrol KNT yok B) 100 µg/ml KNT C) 500 µg/ml KNT.

Kontrol grubuna göre, 6. güne kadar izlenen bireylerde, kalınlaşan bireyler gözlenmeye başlandı. Boylarda kısalma olmadı ve petrilere ölü bireye rastlanmadı (Şekil 52).



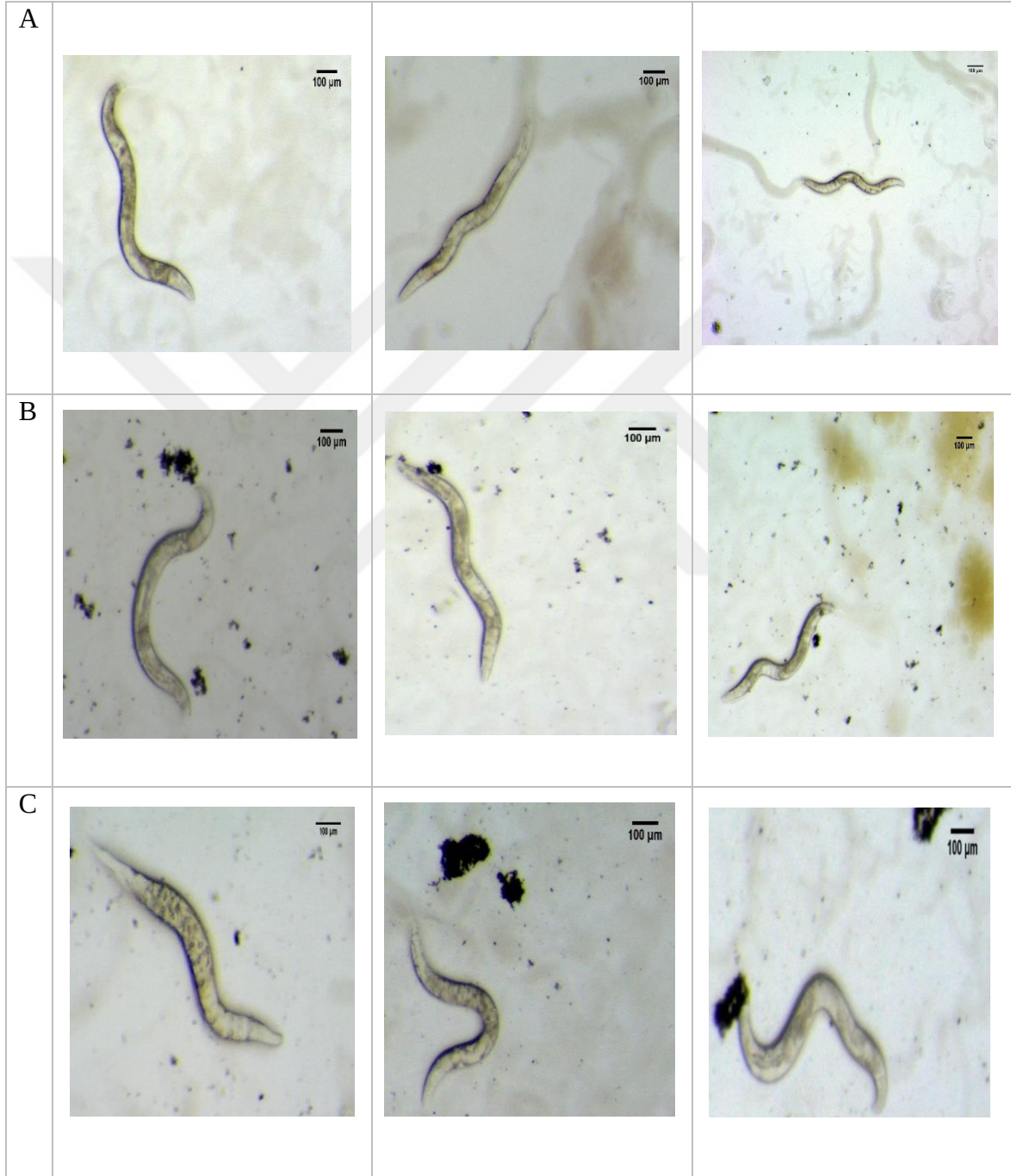
Şekil 52: KNT uygulanan *C. elegans* 'ın 6. gün görüntüleri. A) Kontrol KNT yok, B) 100 µg/ml KNT, C) 500 µg/ml KNT.



Şekil 53: KNT uygulanan *C. elegans* 'ın 8. gün görüntüleri. A) Kontrol KNT yok, B) 100 µg/ml KNT, C) 500 µg/ml KNT.

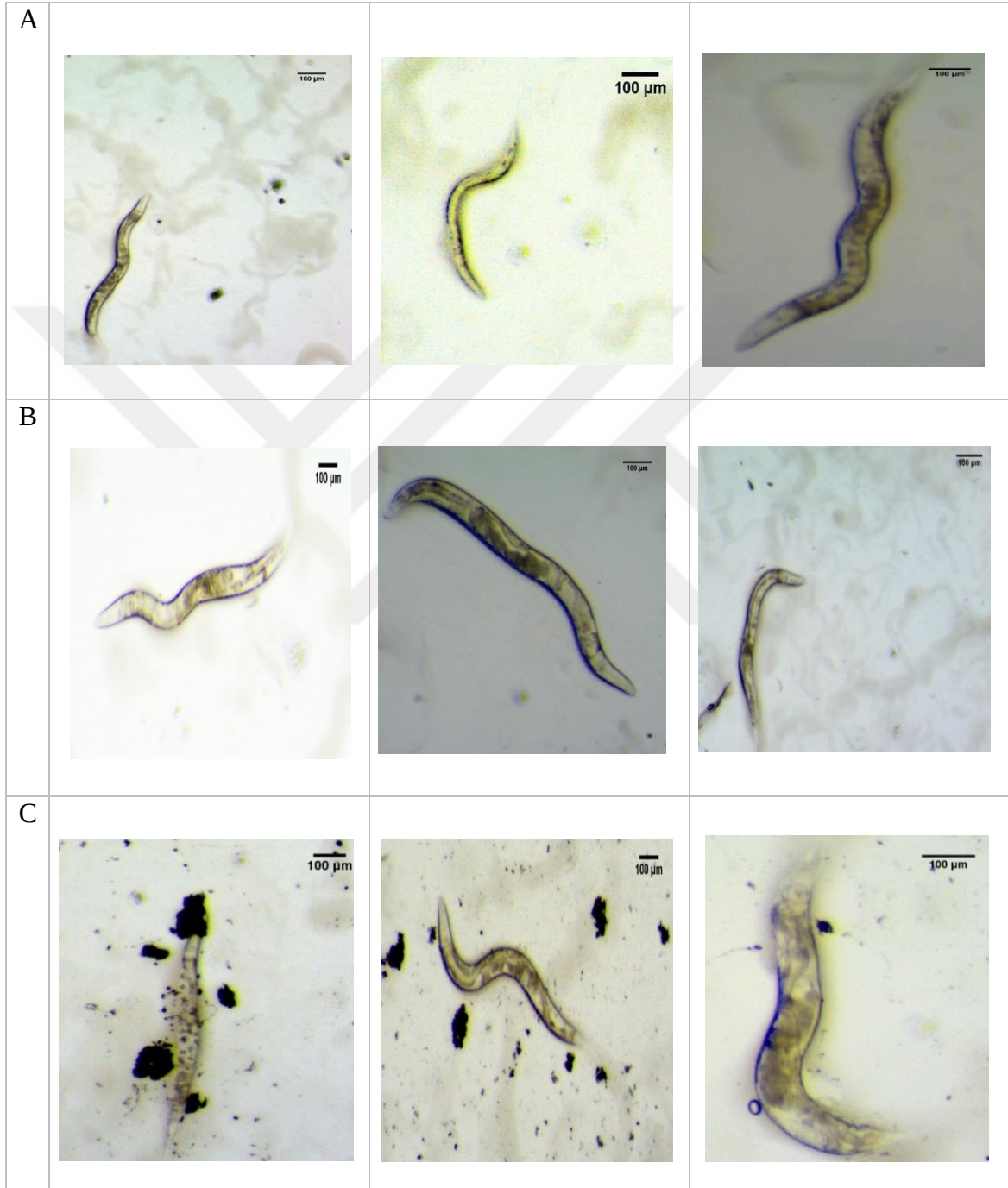
KNT'lerin koyu renkli oluşu nedeniyle, kontrol grubu petrilere göre, KNT içeren petrilere feçeslerin daha koyu renk olduğu izlendi. Petrilere birer ve ikişer ölü bireyler 8. Günden sonra görülmeye başlandı. Ölü bireyler petriden alındı. KNT içeren petrilere bireylerde kalınlaşmalar belirginleşti (Şekil 53).

Artan derişime bağlı kalınlaşmalar ve bireylerin vücutlarında KNT birikimleri, 10. güne ait görüntülerde, daha görünür hale geldi. Bireylerin kontrol grubuna kıyasla yavaşladıkları görüldü. Artan derişime bağlı ölüm izlenmedi. 5-10 birey arası ölüm her konsantrasyonda izlendi (Şekil 54).

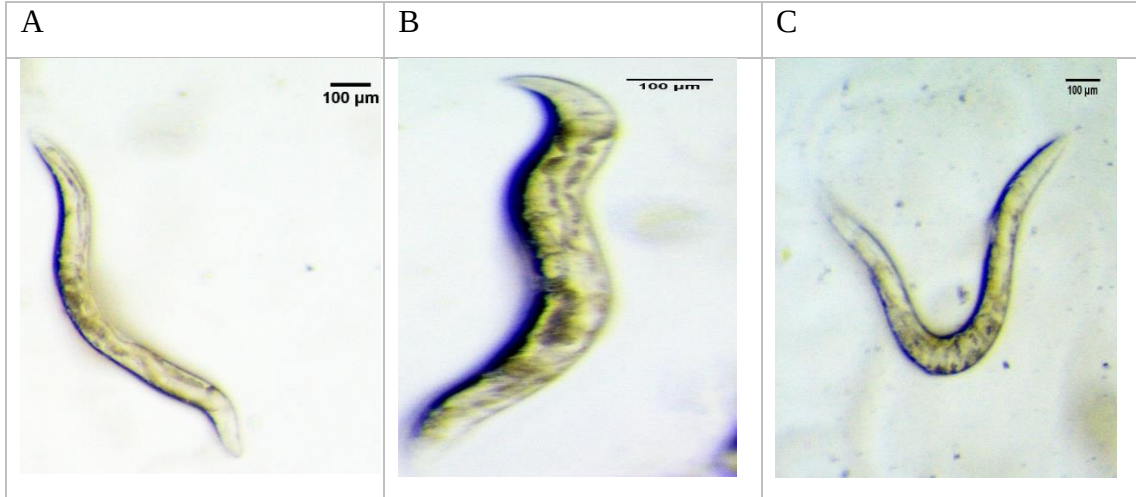


Şekil 54: KNT uygulanan *C. elegans* 'ın 10. gün görüntüleri. A) Kontrol KNT yok, B) 100 µg/ml KNT, C) 500 µg/ml KNT.

Petrilerdeki bireylerin yarısından çoğu 12. güne gelindiğinde kaybedilmiştir. KNT olan grupların hareketlerindeki yavaşlama ve kalınlaşma devam etmiştir (Şekil 55).

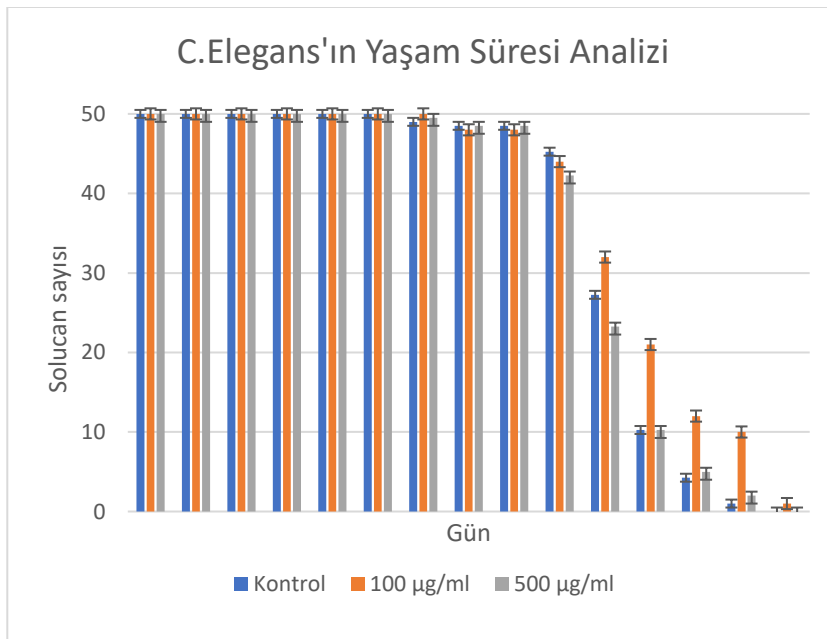


Şekil 55: KNT uygulanan *C. elegans* 'ın 12. gün görüntüleri. A) Kontrol KNT yok, B) 100 µg/ml KNT, C) 500 µg/ml KNT.

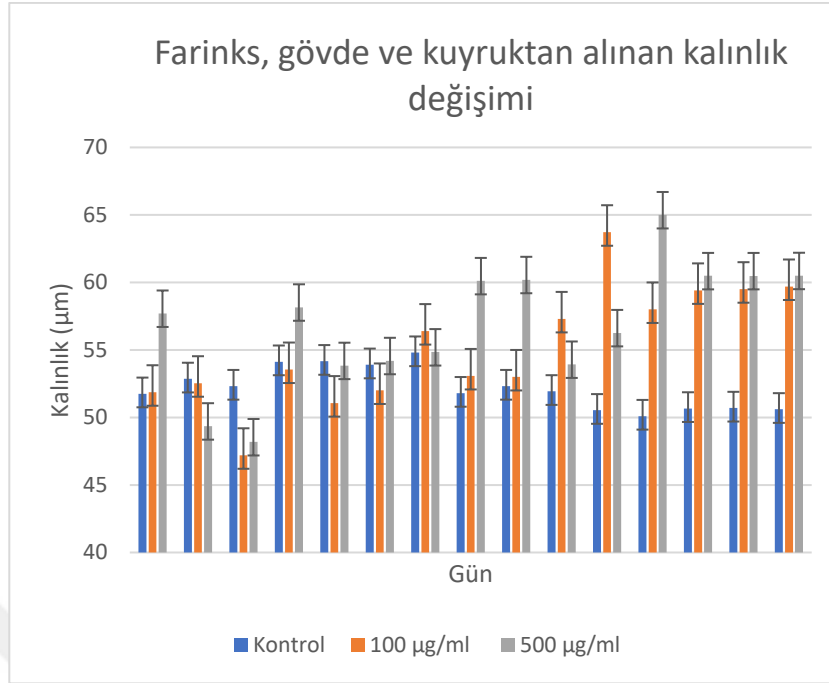


Şekil 56: KNT uygulanan *C. elegans* 'ın 15. gün görüntüleri. A) Kontrol KNT yok, B) 100 µg/ml KNT, C) 500 µg/ml KNT.

C. elegans 'ın 15 günlük yaşam süresi analizi görülmektedir (Şekil 59). 10. ve 11. günlerde kontrole göre ölü sayısı artmıştır, ancak sonrasında bu durum, başlardaki gibi, kontrol ve deney gruplarında eşit ilerlemiştir. Kontrol ve diğer gruplarda *C. elegans* 'ın, farinks, gövde ve kuyruklarından, boylarından ölçüm alındı. Ölçümler aynı ölçekte çekilen fotoğraflardan imageJ programı ile yapıldı. 50 bireyin olduğu, 4 'er petri kabından alınan fotoğraf ölçümlerinin ortalamalarından elde edilen verilerin grafikleri çizildi.

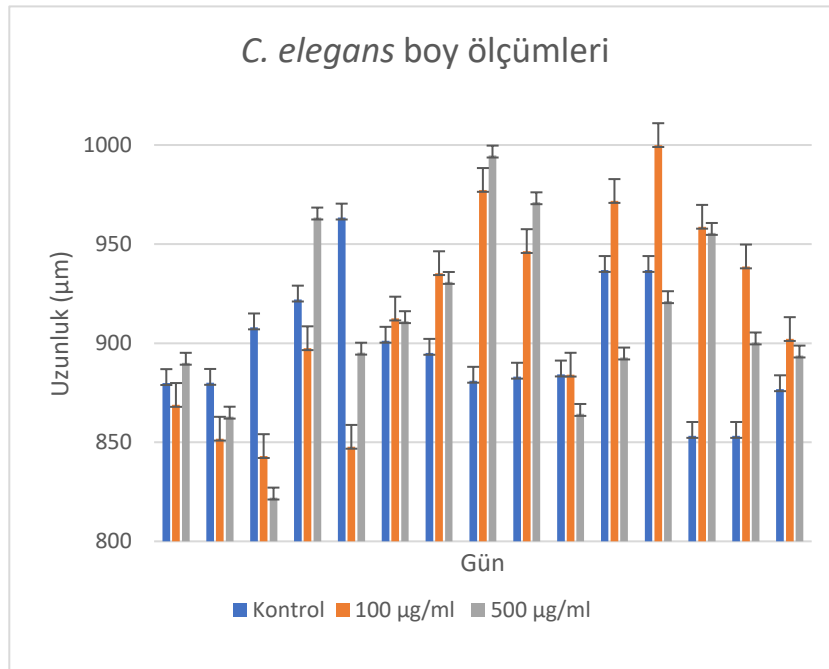


Şekil 57: *C. elegans* 'ın yaşam süresi analizi.



Şekil 58: *C. elegans* 'ın 15 günlük periyotta kalınlık değışimleri.

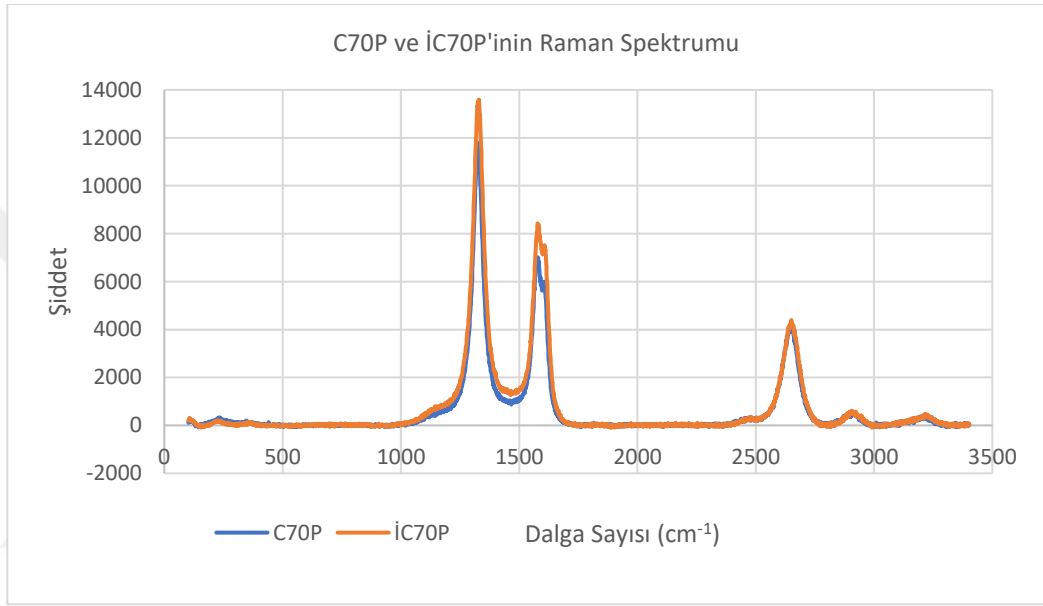
KNT uygulanan nematodlardaki kalınlaşmalar, Şekil 60'da kontrole kıyasla, özellikle 6. gün sonrasında, gün gün artarak devam etmiştir. Deney ve kontrol gruplarının, kalınlık ölçümlerinde gösterdiği fark, boy ölçümlerinde ortaya çıkmamıştır. Çoğunlukla, deney gruplarının ortalama nematod uzunluğu, kontrol gruplarınınkinden fazla seyretmiştir (Şekil 59).



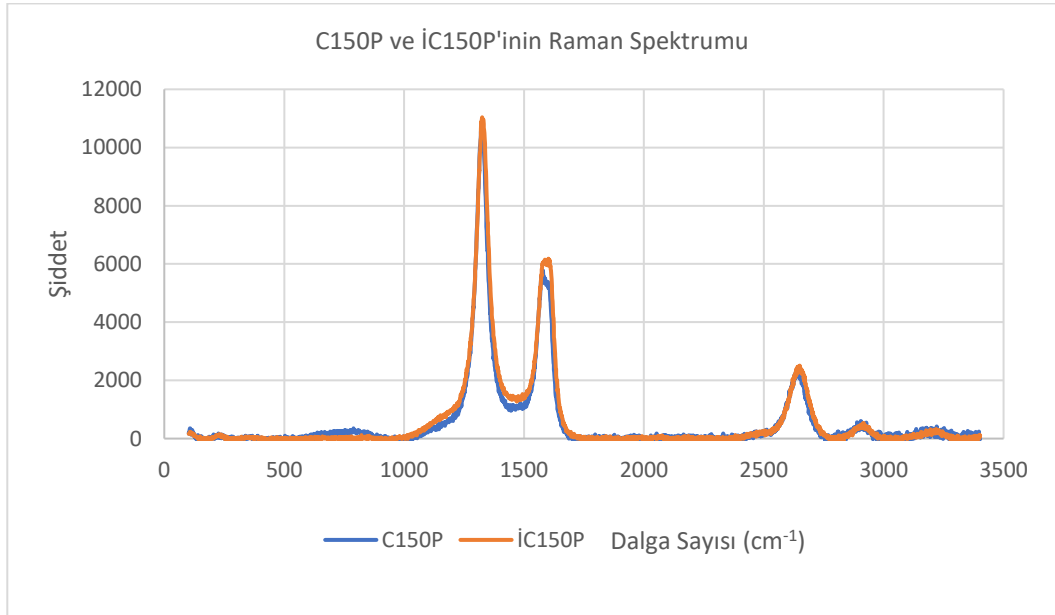
Şekil 59: *C. elegans* 'ın 15 günlük periyotta uzunluk değışimleri.

4.5. Raman Spektrumu ile KNT'lerin Karakterizasyonu

Raman spektroskopisi toz numuneden analiz yapılmasını sağlayan, numuneye zarar vermeyen ve KNT'lerin karakterizasyonunda çok sık kullanılan bir yöntemdir. KNT'ler grafit yapısında, karbon allotroplardır ve bu nedenle karakteristik D ve G bantları ortaya çıkarırlar. İşlevselleşme sonrası, daha yüksek çıkması beklenen D bandında, şiddetli artış göstermemiştir (Şekil 60). Az da olsa yüzeydeki düzensizlikte belirli bir artış olduğu görülmektedir. Gr bandındaki artış da işlevselleştirme bilgisi vermektedir.



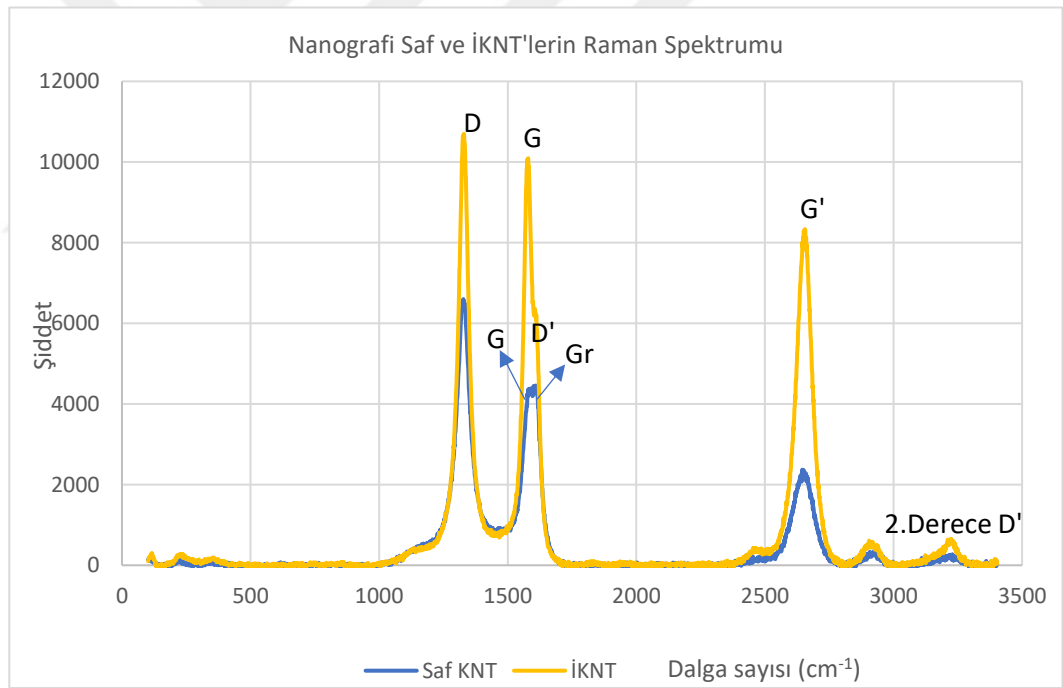
Şekil 60: C70P ve İC70P'nin Raman Spektrumu



Şekil 61: C150P ve İC150P'nin Raman Spektrumu.

TGA ile karakterizasyonu sırasında da İC70P ile kıyaslandığında İC150P ‘nin işlevselleşme oranı düşük bulunmuş ve kütle yoğunluğunun fazla olması nedeniyle daha uzun süre ve yüksek sıcaklıklarda işlevselleştirme işlemi gerektiği düşünülmüştür. Şekil 61’de C150P’ye ait olan Raman spektrumuna bakıldığında işlevselleştirme ile ilgili yorum yapılamayacağı, her ikisinin de aynı izi verdiği görülmektedir (Şekil 61).

Nanografi’den elde edilen Raman spektrumuna ait karakteristik D bandı 1327 cm^{-1} ’de 6599 şiddette saf KNT’ler için ortaya çıkmıştır. İKNT’ler 1329 dalga sayısında 10697 şiddette D bandı ortaya çıkardı. G bandı İKNT’ler için 1582 cm^{-1} ’de 9717 şiddette G bandı ortaya çıkarmıştır. Saf KNT’ler için, 1600 cm^{-1} ’de 4445 ‘de G bandı ve 1608 cm^{-1} ’de 4457 şiddette Gr bandı ortaya çıkmıştır. 2. derece D’ bandının İKNT’ler için 3242 ’de yüksek şiddette bant verdiği görülmüştür (Şekil 62).

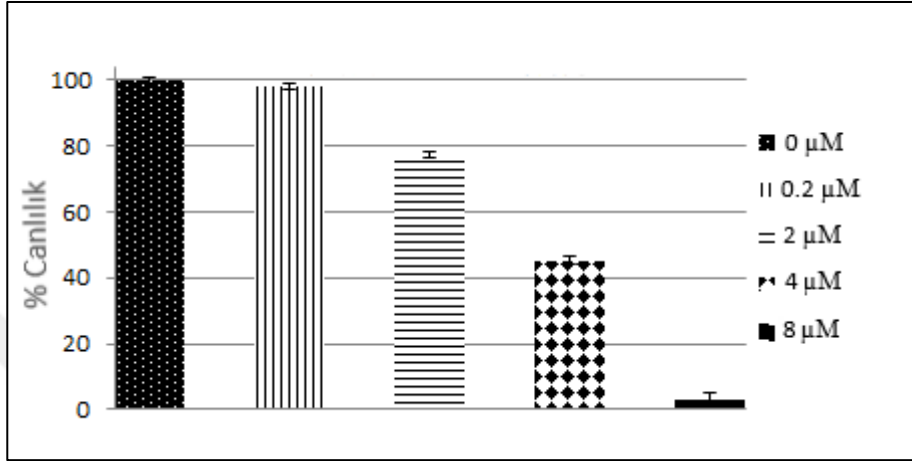


Şekil 62: Nanografi KNT ve İKNT’nin Raman spektrumu.

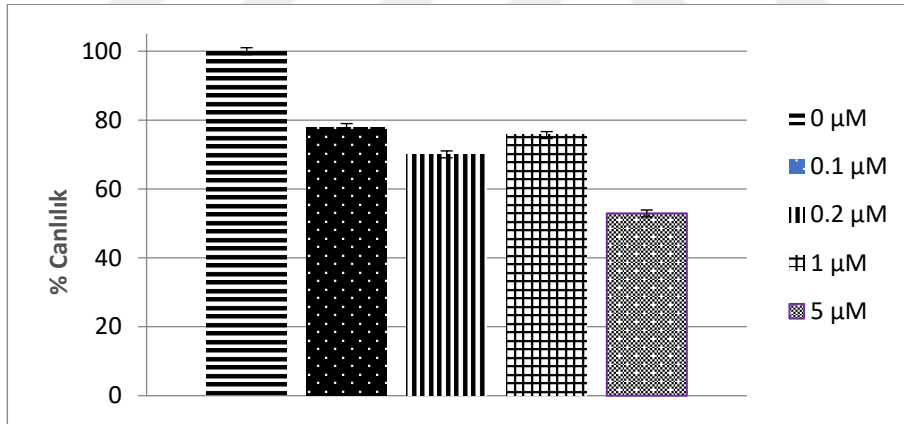
4.6. Farklı Hücre Hatlarında Doks’un Etkisi

Doksorubisin, geniş spektrumlu bir kanser ilacıdır. Ancak ilacın çevre dokularda ve kalpte toksisitesi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, halen kullanımda olan bu ilacın, potansiyel bir taşıyıcı kullanılarak dokulara iletilmesinin, çevresel dokularda toksisiteyi azaltabileceği düşünülmektedir. KNT’lere yüklendikten sonraki dozları karşılaştırmak

adına, öncelikle ilacın bu hücre hatlarındaki 24 saatlik etkileri incelenmiştir. Ayrıca HUVEC hücrelerinde ve HT-29 hücrelerinde de MTT deneyleri yapılarak, canlılık değerleri elde edilmiştir. Şekil 63’de MDA-MB-231 hücrelerinde Doks etkisine bakıldığında, 4 μM ’ın 24 saat sonrasında hücrelerin % 55’inden fazlasını öldürdüğü görülmüştür.

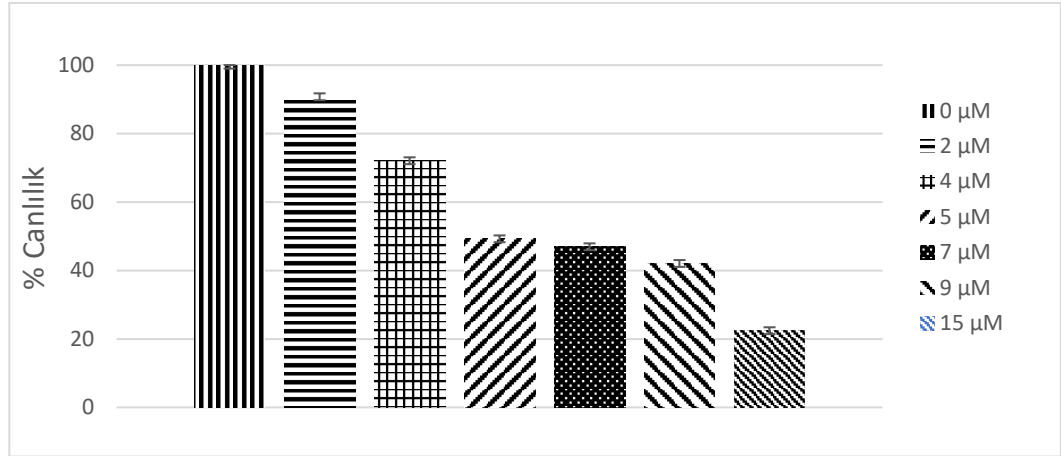


Şekil 63: MDA-MB-231 hücrelerinde Doks’un hücre canlılığına etkisi.



Şekil 64: HUVEC Hücrelerinde Doks’un hücre canlılığına etkisi.

Taşıyıcı olarak Doks bağlı KNT’lerin kullanılması amaçlanan diğer hücre hattı HUVEC hücrelerinde de canlılık değerlerine bakılmıştır. 5 μM Doks’un 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık % 50’sini öldürdüğü görülmüştür (Şekil 64).



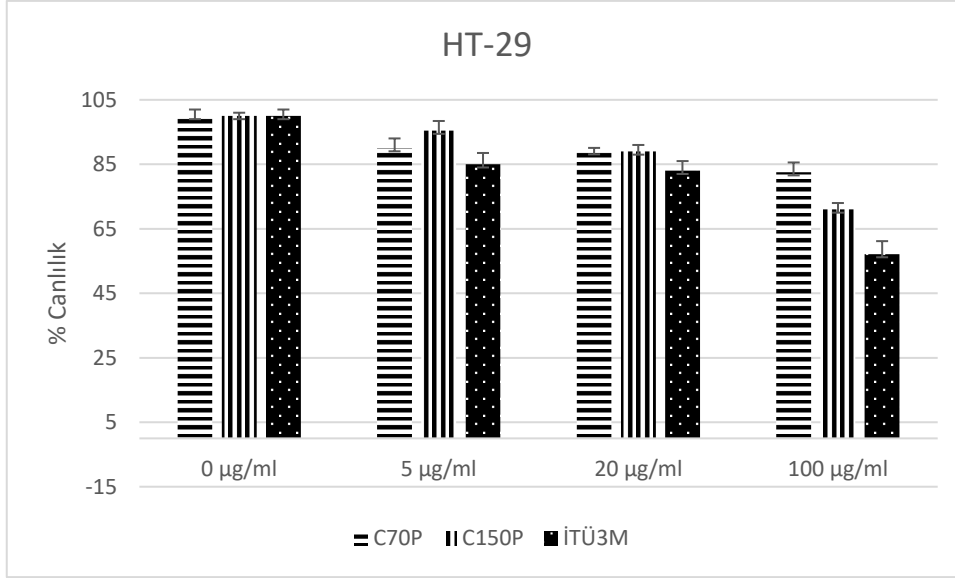
Şekil 65: HT-29 Hücrelerinde Doks'un hücre canlılığına etkisi.

Kullanılan 3 hücre hattında Doks etkisi, literatür araştırması yapıldıktan sonra, uygun konsantrasyonlarda denenmiş ve HUVEC ve HT-29 hücrelerinden (Şekil 65) elde edilen canlılık değerleri literatürdeki IC50 değerlerine yakın bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde literatürde hem bu tez kapsamında yapılan çalışmalardakilere yakın değerler hem de çok daha küçük değerler içeren çalışmalar bulunmaktadır. Bu konuya tartışma kısmında değinilecektir.

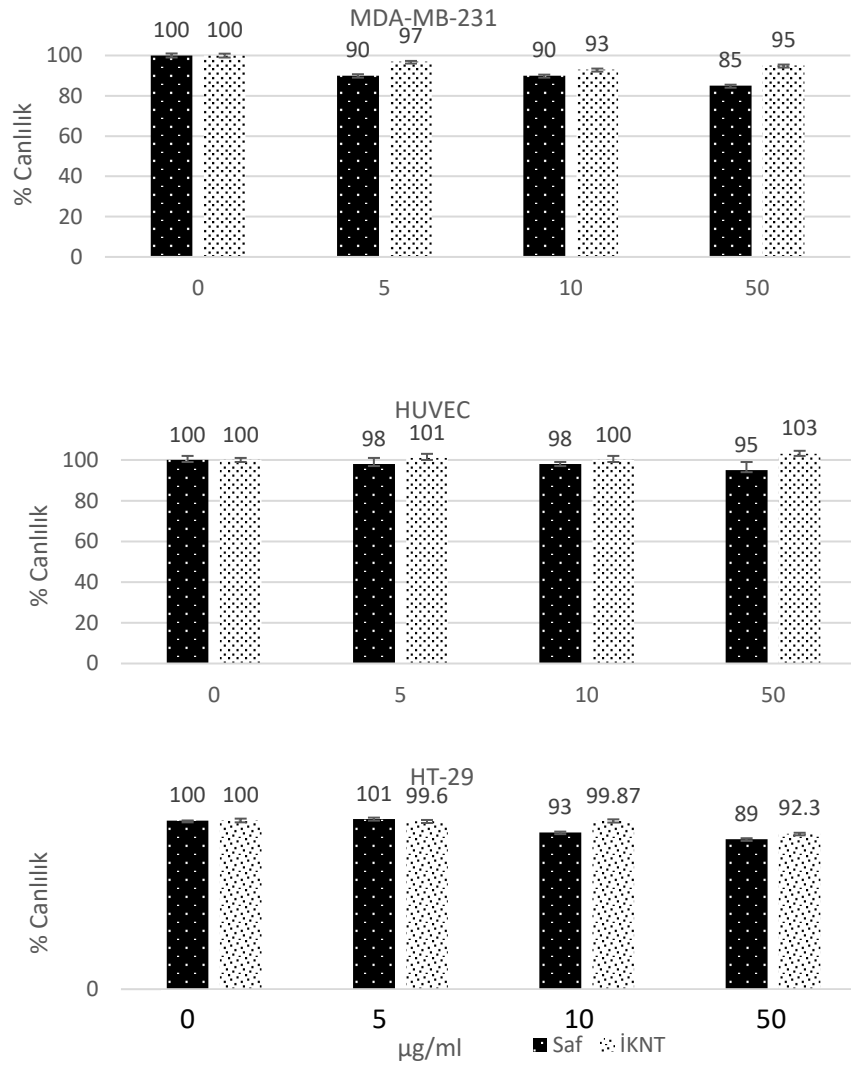
4.7. KNT'lerin Hücrelerdeki Canlılık Değerleri ve Toksisite Araştırmaları

İTÜ'den elde edilen ÇDNT'lerin ve Baytube'e ait kütle yoğunluğu farklı C70P ve C150P kodlu saf KNT'lerin toksisiteleri araştırıldı. Toksisite deneylerinde 3 farklı miktarda, 3 ÇDNT çeşidine ait sonuçlarda, kütle yoğunluğu fazla olan KNT'nin daha toksik olduğu görülmektedir (Şekil 66). Çalışmada 5 µg/ml konsantrasyon için 45-95 ve 130-150 kg/m³ kütle yoğunluğu olan KNT'lerin canlılık değerlerini % 10'dan daha az etkilemiştir. İTÜ'de üretilen KNT'nin yaklaşık % 15 hücre canlılığını azalttığı, 5 ve 20 µg/ml miktarlarda, diğer KNT'lere göre daha belirgin toksisite gösterdiği görülmüştür.

En yüksek miktarda, yaklaşık % 43 toksik etki göstermiştir (Şekil 66) Ayrıca bu 3 KNT çeşidinin *C. elegans*' ta kısa dönem toksisitesine bakılmıştır. *C. elegans* sonuçlarının arasında, ayrıntılı sonuçlar yer almaktadır.



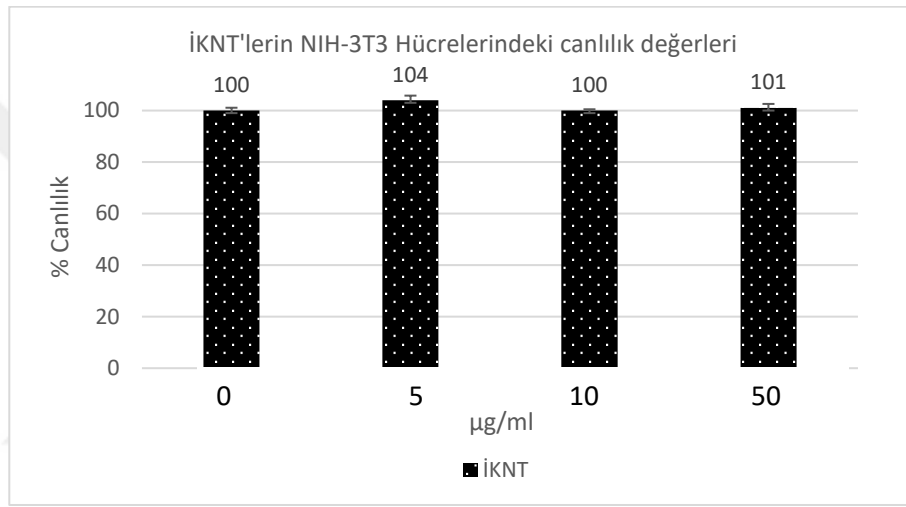
Şekil 66: ÇDNT'lerin HT-29 hücrelerindeki toksisite sonuçları.



Şekil 67: Farklı hücre soylarında, KNT ve İKNT'lerin canlılığa etkisi.

ODTÜ’de üretimi sağlanan KNT’lerin de toksisitesine bakılmıştır. Bu araştırma HUVEC, MDA-MB-231 ve HT-29 hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir.

Canlılık değerleri incelendiğinde, en yüksek toksik etkinin HT-29 hücrelerinde olduğu görülmektedir (Şekil 67). Kullanılan hücreler arasında yaklaşık 7 µm’lik çapı ile en küçük hücre hattı HT-29 hücreleridir. Bu durum toksik etkinin, çapı 17 ve 18 µm olan MDA-MB-231 ve HUVEC hücrelerine göre daha belirginleşmesini sağlamıştır.

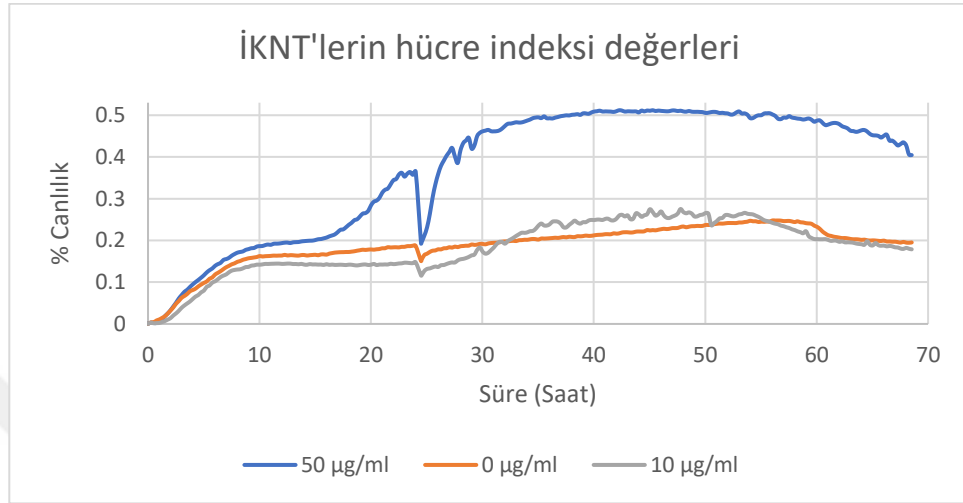


Şekil 68: NIH-3T3 hücrelerinde İKNT’lerin canlılık değerleri.

Yapılan MTT testlerinde, yaklaşık 20 µm çapı ile en büyük hücreler NIH-3T3 hücreleridir. Bu hücre hattında uyguladığımız en yüksek konsantrasyonun bile belirgin bir toksik etki göstermediği görülmektedir (Şekil 68). Ayrıca HUVEC hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerine göre daha az toksik etki izlenmiştir. NIH-3T3 hücreleri dışındaki tüm hücre hatlarında, İKNT’lerin, saf KNT’lere göre daha az toksik etki gösterdiği ve canlılık değerlerini daha az etkilediği görülmektedir.

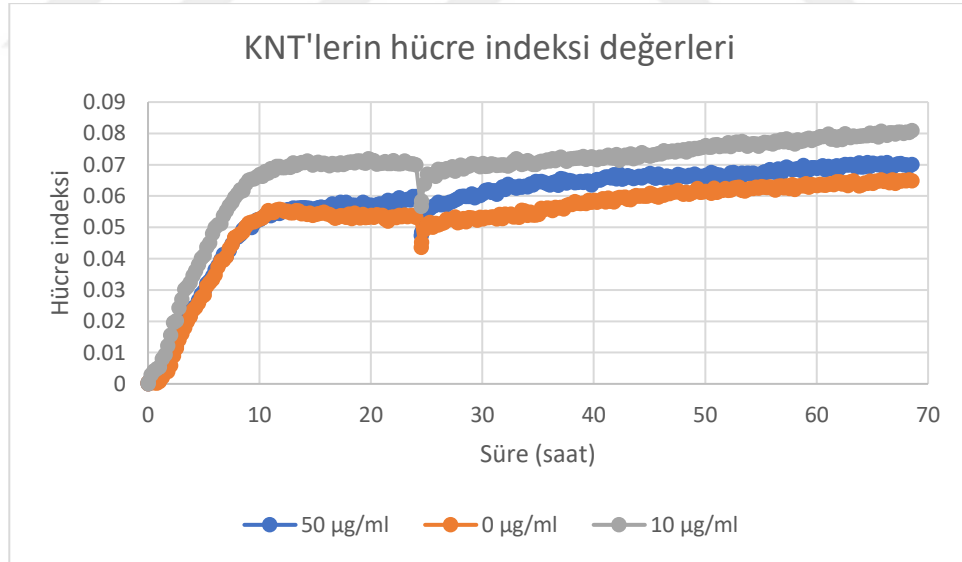
Farklı bir yöntemle toksisite araştırması yapmak amacıyla, Xcelligence gerçek zamanlı hücre görüntüleme sistemi kullanıldı. Saf ve İKNT’ler, MTT deneylerinde de uygulanan 2 farklı konsantrasyonda, kuyu başına 5×10^3 hücre ekilerek, 96 kuyuluk e-plate ile deneyler gerçekleştirildi.

Şimdiye kadar yapılan deneylerde saf KNT'lerin hücreler üzerinde daha toksik etkilere neden olduğu bilinmektedir. Ancak hücre indeksi değerlerinde bunun tersi sonuçlar görülmektedir (Şekil 69,70). Sebebinin KNT'lerin elektriksel iletkenliğinin daha fazla olması ve elektrotlar üzerinde akımı artırıcı etki yaratması olduğu düşünülmektedir.



Şekil 69: İKNT'lerin MDA-MB-231 hücrelerinde hücre indeksi değerleri.

A) 10 µg/ml İKNT, B) 50 µg/ml İKNT.



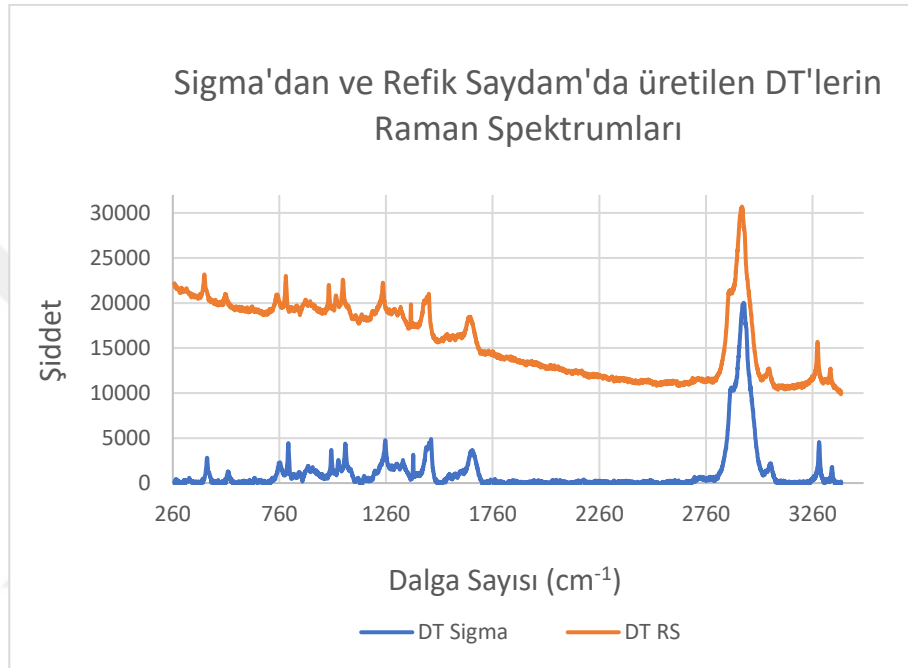
Şekil 70: KNT'lerin MDA-MB-231 hücrelerinde 70 saatlik hücre indeksi değerleri.

A) 10 µg/ml KNT, B) 50 µg/ml KNT.

KNT'lerde 0, 10 ve 50 µg/ml için hücre indeksi değerlerinde madde uygulama sonrası, hücre indeksi değerleri sırasıyla 0,021; 0,022 ve 0,024 artmıştır. İKNT'lerde ise aynı derişimler için bu değerler sırasıyla, 0,1; 0,18 ve 0,28 olarak artış göstermiştir.

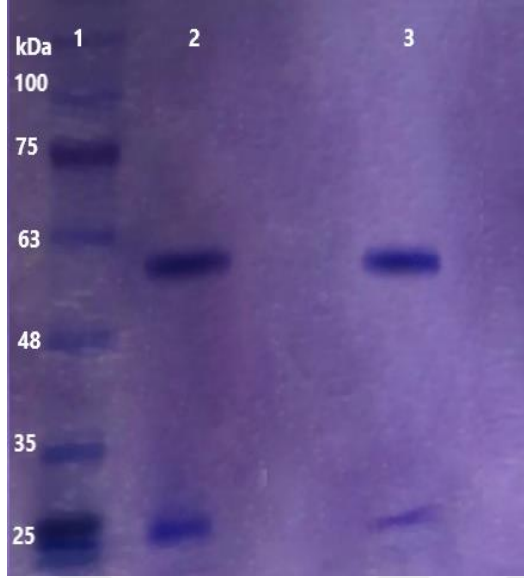
4.8. Difteri Toksininin Dirençli Hücrelere Taşınması ve Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı kaynaklardan sağlanan (Sigma, Refik Saydam) DT'nin karakterizasyonu için farklı moleküler yöntemler (Raman spektrumları, moleküler elek kromatografisi ve Western Blot) kullanıldı. İki farklı kaynaktan sağlanan toksin moleküllerinin Raman spektrumu (Şekil 71) literatüre uygun olarak aynı parmak izi vermiştir (115).



Şekil 71: Sigma ve R. Saydam'da üretilen DT'lerinin Raman Spektrumları.

Farklı iki kaynaktan sağlanan toksinin kalite ve saflığı elektroforez (SDS-PAGE) yöntemiyle de gösterildi (Şekil 72). Yaklaşık 63 kDa civarındaki toksinin gelde hidroliz olduğu ve fragmanlarına (FA ve FB) ayrıldığı görüldü (Şekil 72, 2-3). Elektrik akımı (elektro-blot) yardımıyla, boyanmayan jel bölümünden nitroselüloz membrana aktarılan toksin anti-FA varlığında Western Blot tekniği ile gösterildi. 63 kDa civarındaki ful toksin ve 21 kDa civarındaki FA görülmektedir (Şekil 73).



Şekil 72: Farklı iki kaynaktan sağlanan difteri toksininin SDS/PAGE analizi.

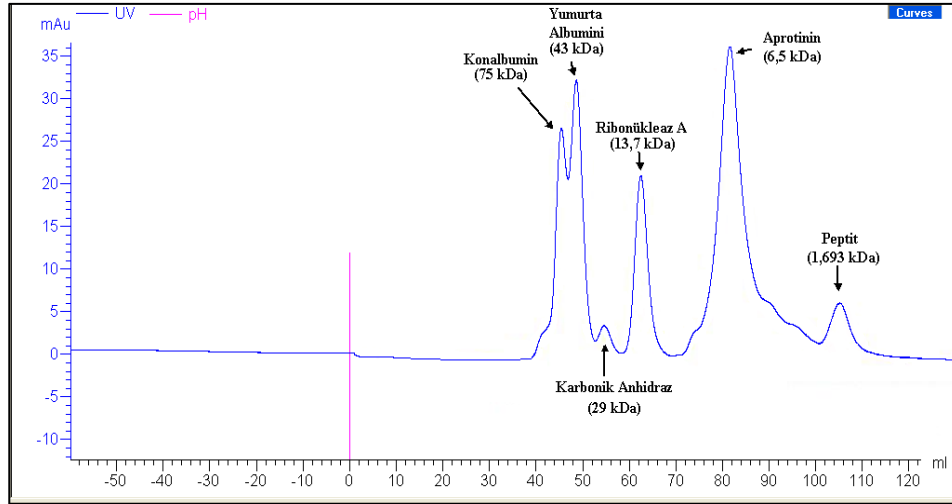
1) Marker (10 µg), 2) Sigma DT (2 µg), 3) Refik Saydam DT (2 µg).



Şekil 73: DT'nin Western Blot Görüntüsü.

1) Marker 2) Sigma DT 3) R. Saydam DT

Toksin molekülünün kalite ve saflığını araştırmak için moleküler elek (gel filtrasyon) yöntemi ve HiPrep Sefakril S-100 ve S-200 kolonu (16 x 60 cm) kullanıldı. Kalibrasyon işlemi için proteinlerin büyükten küçüğe doğru geliş hacimleri (Ve) belirlendi. Örnek hacmi 1 ml, akış hızı 0,8 ml/dak olacak şekilde 1 mg/ml protein ve 0,1 mg/ml peptit örnekleri kolondan geçirildi ve Tablo 4'deki proteinler ile kalibrasyon gerçekleştirildi.

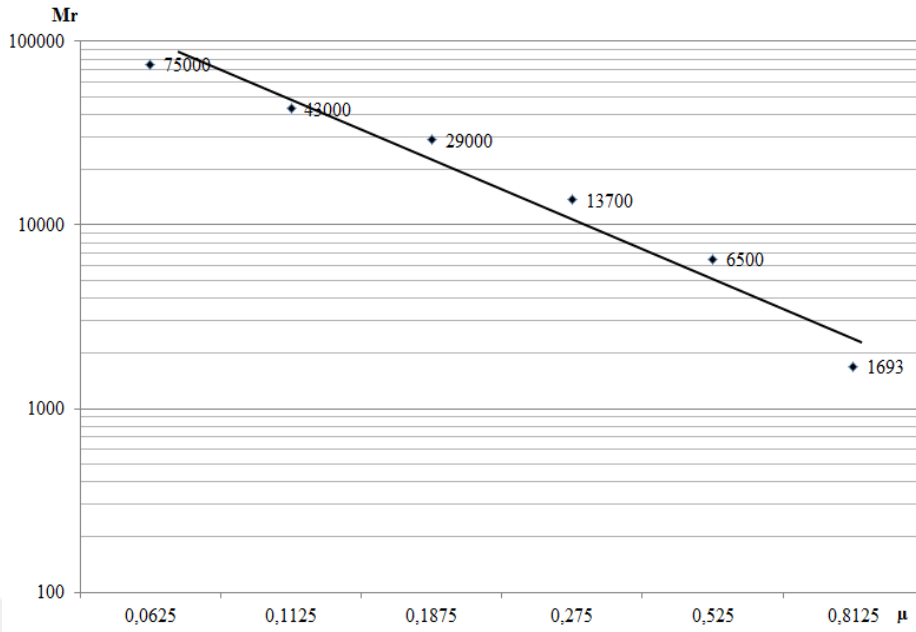


Şekil 74: Sefakril S-100 kalibrasyon grafiği.

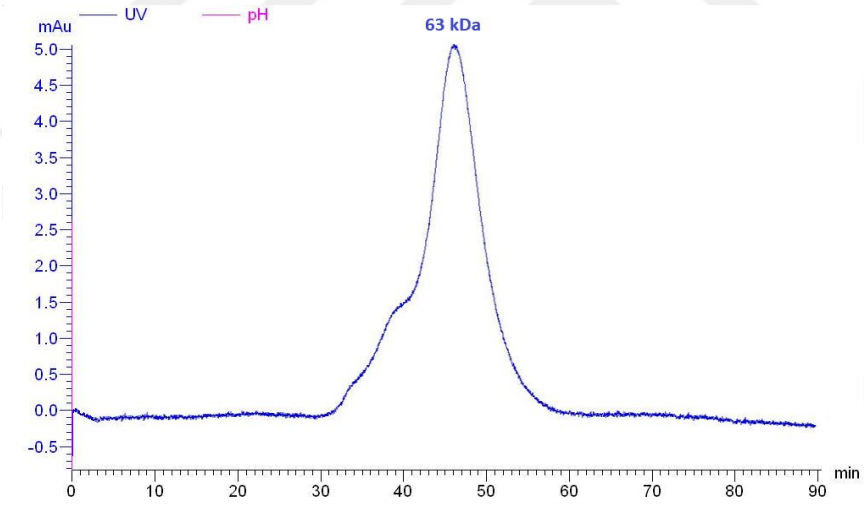
Tablo 4: Sefakril S-100 kalibrasyon tablosu.

Protein	Mr (Da)	Ve (ml)	μ (Möbilité)
Konalbumin	75000	45	0,0625
Yumurta Albumini	43000	49	0,1125
Karbonik Anhidraz	29000	55	0,1875
Ribonükleaz A	13700	62	0,275
Aprotinin	6500	82	0,525
Peptit	1693	105	0,8125

Moleküler ağırlık (Mr) ve mobilité (μ) ilişkisinden yola çıkılarak yarı logaritmik çiziminden toksinin molekül ağırlığı kontrol edildi (Şekil 75).



Şekil 75: Sefakril S-100 kalibrasyon dağılım grafiği.



Şekil 76: R. Saydam DT'nin kromatogramı

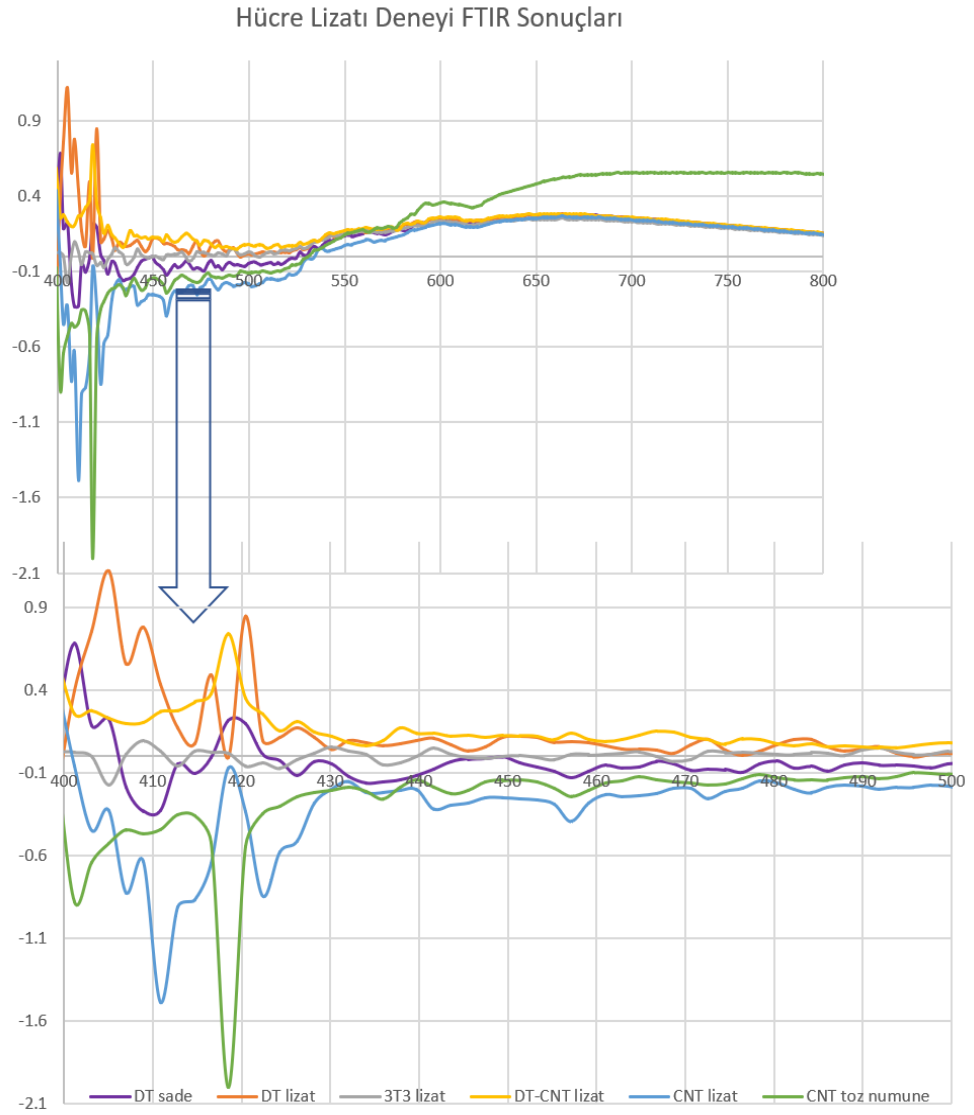
Şekil 76'da DT'nin kromatogramından elde edilen full toksine ait sonuç, kalibrasyon grafiğindeki (Şekil 75), 63 kDa molekül ağırlığına sahip DT'nin geldiği tepenin bulunduğu hacim ile örtüştüğü gözlemlendi (127).

Mobilite hesaplanmasında aşağıdaki denklem kullanıldı.

$$\mu = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \quad (4-1) \quad (127).$$

Tablo 4’de elde edilen standartların geliş hacimlerine (V_e) göre μ değerleri bulunarak (4-1) çizilen kalibrasyon grafiği (Şekil 75), bu grafikten DT için, moleküler ağırlık hesaplaması yapıldı. Denklemden V_0 sıvı kromatografi cihazının kolonlarının toplam hacminin 1/3’ünü ifade etmektedir. V_c ise kolonların toplam hacimlerini ifade eder. RS DT’nin molekül ağırlığı Sigma’dan ticari olarak satın alınan DT’nin ağırlığına benzer değerde 63 kDa olarak elde edildi. Farklı iki kaynaktan sağlanan toksin moleküllerinin, elektroforez, Western Blot, Raman spektroskopisi ve moleküler elek çalışmaları sonunda, benzer saflık ve kalitede olduğu görüldü.

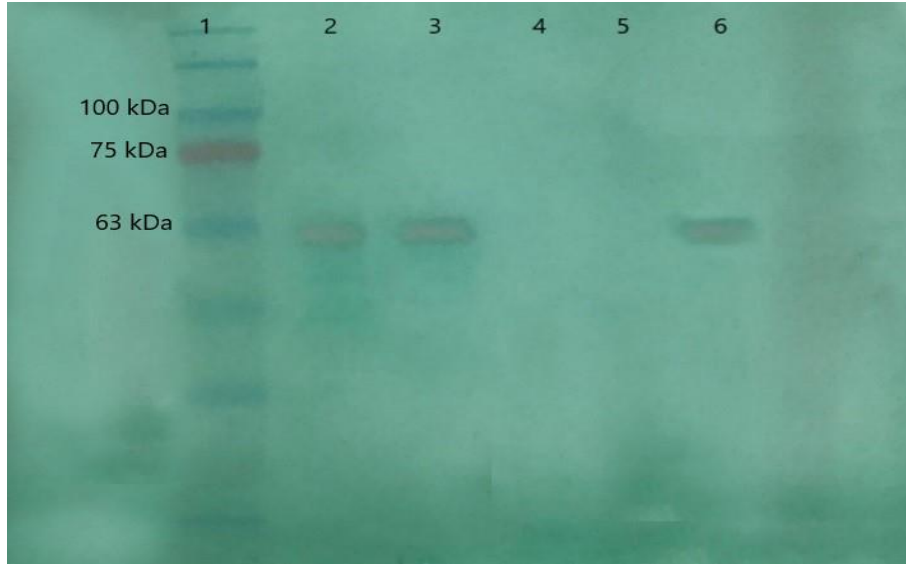
DT’nin hücreye girişini göstermek için yaklaşık % 50 bağlanma gösteren KNT-DT kompleksi, NIH-3T3 hücrelerinde denendi. Fare kökenli hücrelere DT’nin girmediği bilinmektedir. KNT’ler taşıyıcı olarak kullanılarak, DT’nin hücresel alımının gerçekleşip, gerçekleşmediği belirlendi. Bu işlem için uygun süre ve miktarda DT-KNT ile inkübe edilen hücrelerden hazırlanan lizatlardaki protein miktarı, Bradford yöntemi ile belirlendikten sonra, western blot yapılmıştır. Ayrıca lizatın FTIR izine ve KNT-DT kompleksinin hücreleri öldürüp öldürmediğine bakılmıştır.



Şekil 77: KNT ile NIH-3T3 hücrelerine taşınan DT'nin FTIR analizi.

Lizatların FTIR izlerine bakıldığında 420 cm^{-1} dalga sayısında DT'nin FTIR izi ile, DT-CNT kompleksi uygulanan hücrelerin lizatının benzer izler verdiği görülmektedir (Şekil 77).

Yöntem kısmında anlatıldığı gibi hazırlanan, KNT-DT kompleksi, toksine dirençli fare kaynaklı NIH-3T3 hücreleriyle inkübasyon sonrasında, bu hücrelerden hazırlanan lizatların, protein içerdikleri belirlendi. SDS/PAGE sonrası ayrıştırılan yaklaşık $40\text{ }\mu\text{g}$ lizat proteinleri, Western Blot analizine tabii tutuldu. Anti-FA varlığında yürütülen deneyler sonrası beklenildiği gibi, serbest DT'nin NIH-3T3 hücrelerine alınmadığı gözlenirken, KNT'lerle beraber taşındığı gözlemlendi (Şekil 8).

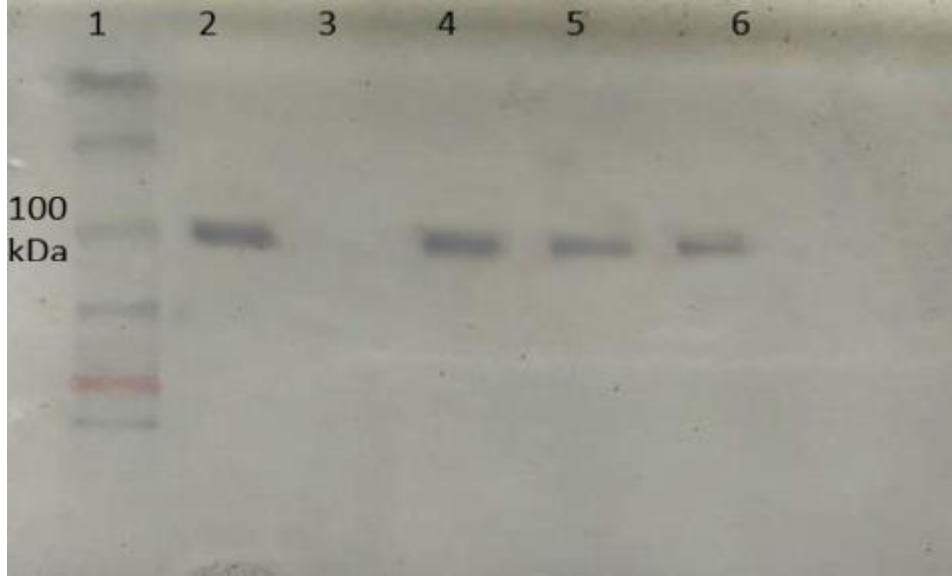


Şekil 78: NIH-3T3 lizatında DT'nin varlığı.

1) Marker (10 µg), 2) Refik Saydam DT (2 µg), 3) Sigma DT (2 mg), 4) NIH-3T3 Lizatı (20 µg), 5) NIH-3T3 lizatı (49 µg), 6) KNT-DT/3T3 Lizatı (40 µg).

Normal koşullarda reseptörü olmadığından NIH-3T3 hücrelerine girmeyen toksinin, KNT ilw hücre içine taşındığı görüldükten sonra, içeri giren toksinin biyolojik aktivitesini (eEF2'nin ADP ribozillenmesi) gösterip göstermediğine bakıldı. Bu amaçla hazırlanan hücre lizatları içerisindeki, eEF2'nin ADP ribozillenmesi, yöntem bölümünde anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. eEF2'nin ADP-ribozillenmesi yaklaşık 50 µl reaksiyon karışımında (20 µg lizat proteinleri, 10 µM biotin işaretli NAD ve 5 µM DT) oda sıcaklığında 30 dakika gerçekleştirildi (Şekil 79).

Toksin içermeyen lizat (Şekil 81 2) içerisindeki eEF-2'nin bant kalınlığına göre, 4,5,6 nolu lizatlarda, 97 kDa civarında, bant kalınlığının incelendiği görüldü.



Şekil 79: NIH-3T3 lizatlarında DT varlığında ADP ribozillenme.

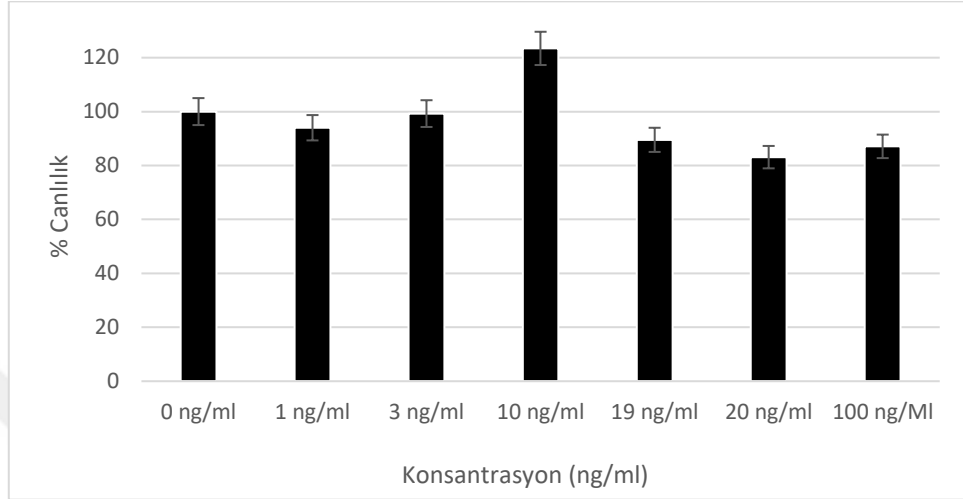
1) Marker (10 μ g), 2) Kontrol (DT içeren Lizat), 3) Sonradan DT eklenmeyen lizat, 4) 0,2 μ g/ml KNT-DT içeren lizat, 5) 0,5 μ g/ml KNT-DT içeren lizat, 6) 1 μ g/ml KNT-DT içeren lizat

ADP ribozillenmedeki azalmanın, KNT'lere bağlanan ve hücre içine taşınan toksin miktarının artmasına bağlı olduğu düşünüldü. Hücre içine alınan toksinin, hücre içerisindeki eEF2'nin büyük bölümünü önceden ADP ribozillediği için, sonrasında yapılan deneylerde, sadece ADP ribozillenmeden kalan eEF2'nin modifikasyona uğradığı düşünüldü (Şekil 79; 4,5,6).

Toksinsiz NIH-3T3 lizatlarındaki, eEF2'nin ADP ribozillenmesi için, toksin kaynağı olarak toksinle muamele edilmiş, NIH-3T3 lizatları kullanıldı (Şekil 79, 3). DT normal koşullarda bu hücrelere girmediği için, ADP ribozillenme görülmedi. Bu bulgular, KNT'lere bağlanan DT moleküllerinin, dirençli hücrelere taşındığını, hücre içerisinde KNT'lerden ayrılarak eEF2'yi ADP ribozillediği görüldü.

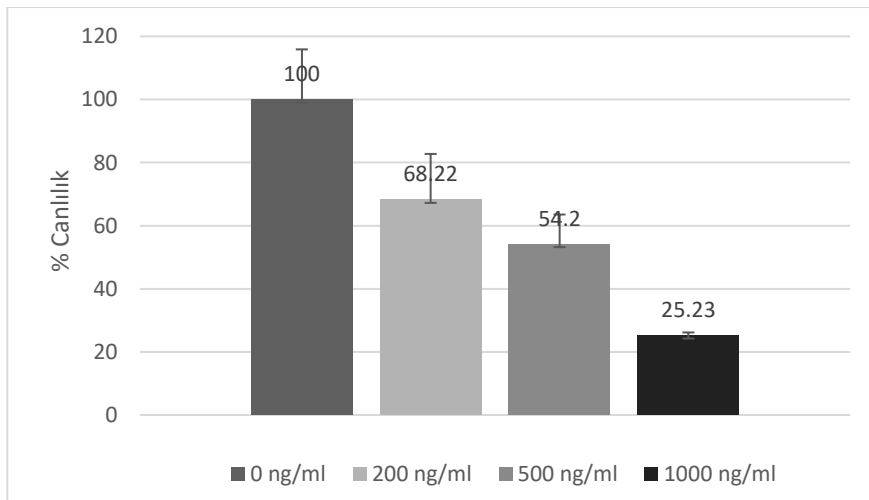
4.9. DT-KNT Uygulanan Hücrelerin Canlılık Değerleri

DT-KNT kompleksinin fare kökenli NIH-3T3 hücrelerine iletimi öncesinde, sadece DT bu hücrelere uygulanarak 48 saat sonraki % canlılık değerlerine bakıldı (Şekil 80, 81).



Şekil 80: DT'nin canlılığa etkisi.

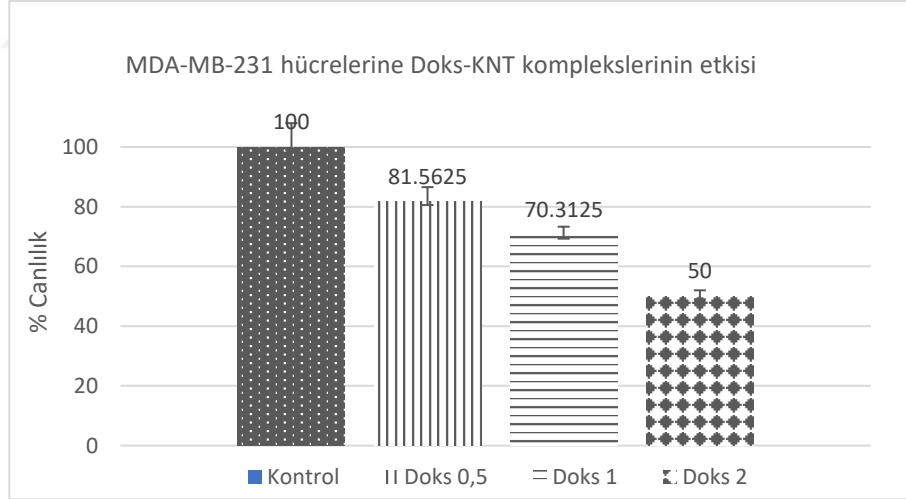
Artan miktarda toksinin, toksine dirençli hücrelerde (NIH-3T3) hücre canlılığında azalmaya neden olmadığı görülmektedir. Sonrasında DT-KNT'nin 200, 500 ve 1000 ng/ml miktarları, aynı hücrelere uygulandığında, canlılık değerlerinde düşüşe neden olduğu ortaya çıktı (Şekil 81). KNT'nin, DT için kargo görevi görmesi ile hücreye taşınması sonucu elde edilen canlılık değerleri görülmektedir (Şekil 81).



Şekil 81: DT-KNT'nin canlılığa etkisi.

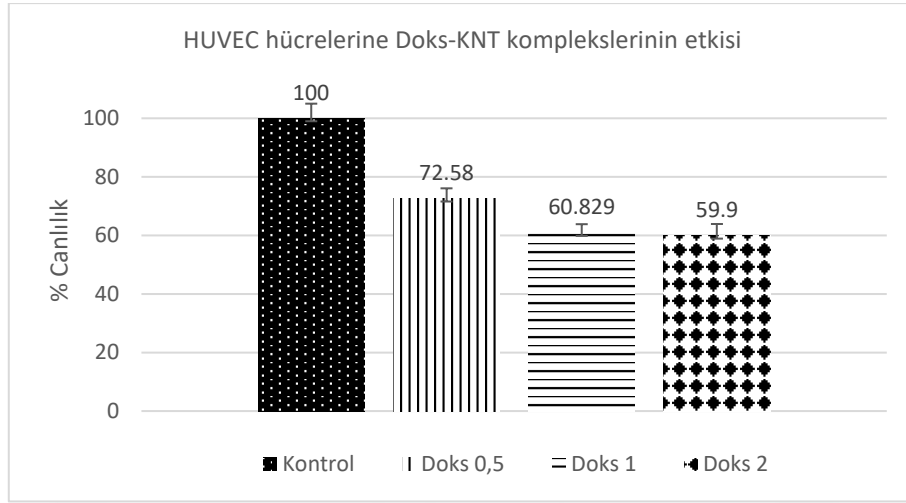
4.10. Doks-KNT Uygulanan Hücrelerin Canlılık Değerleri

Doks-KNT kompleksi uygulanan hücrelerin canlılık değerlerinin elde edilmesi aşamasında, sadece Doks uygulandığında elde edilen değerler dikkate alındı. MDA-MB-231 hücrelerinde, hücrelerin % 55'ten fazlasını öldüren 2 µg/ml (4 µM) değeri referans alındı. HUVEC hücrelerinde 5 µM (2,89 µg/ml), HT-29 hücrelerinde ise 5 µg/ml (10 µM) değeri referans alındı. Hücrelerin yarısını öldüren bu değerler referans alındıktan sonra, taşıyıcı olarak KNT kullanılarak iletim sağlanacağı için, etkili bir taşıma olup olmadığını test etmek adına, bu değerlerin yarısını içeren Doks-KNT kompleksi hücrelere hesaplanarak uygulandı. Daha önce yapılan TGA analizlerinde, 1 mg KNT'ye 0.2 mg Doks'un bağlandığı görüldü. Doks-KNT kompleksinden ana stok hazırlanıp, kuyularda Doks 1 µg/ml olacak şekilde düzenlendi. Bu değeri sağlamak için ana stoktan kuyulara 100 µl Doks-KNT kompleksi uygulamak gerekiyorsa, 1 mg ve 0,5 mg Doks ile muamele edilerek Doks-KNT kompleksi oluşturulan diğer numunelerden de aynı ana stok yapıp, 100 µl kuyulara ilave edildi. Her bir hücre hattında bu yöntem benimsendi. Doks yüklü (3 farklı konsantrasyon- 0,5; 1 ; 2 mg) KNT'lerin MDA-MB-231 hücre soyunda 24 saat sonraki canlılık etkisine bakıldı (Şekil 82).



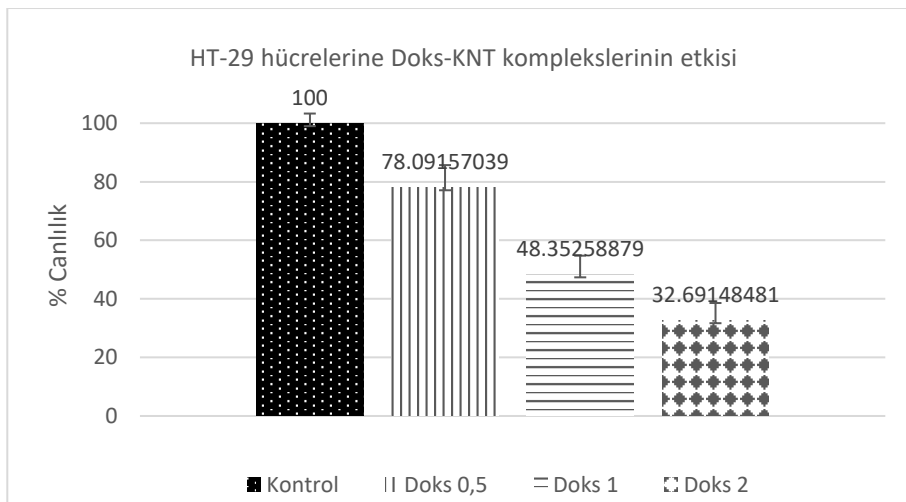
Şekil 82: MDA-MB-231 Hücreleri Canlılık Değerleri.

HUVEC hücrelerinde, Doks'un IC50 değeri 5 µM (2,9 µg/ml) kabul edilerek, Doks-KNT kompleksinden ana stok hazırlandı, kuyularda son konsantrasyon Doks IC50 değerinin yarısı kadar olacak şekilde düzenlendi. Aynı miktar, aynı oranda ana stok hazırlandıktan sonra HUVEC hücrelerinde canlılık etkisine bakıldı (Şekil 83).



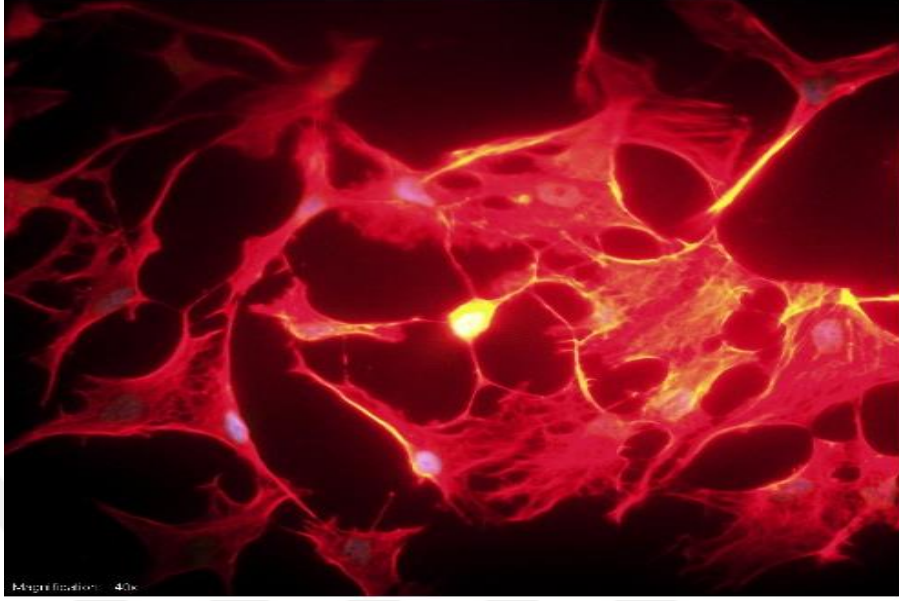
Şekil 83: HUVEC Hücresleri canlilik değersleri.

HT-29 hücreslerinde ise 10 μ M IC₅₀ kabul edilerek, Doks-KNT kompleksinden ana stok hazırlanıp, kuyularda son konsantrasyon Doks'un IC₅₀ değersinin yarısı kadar olacak şekilde düzenlendi. Aynı miktar, aynı oranda ana stok hazırlanmış diğers iki Doks-KNT kompleksi için de gerçekleştirildi (Şekil 84) ve bu komplekslerin 24 saat boyunca HT-29 hücreslerinde canliliğs etkisine bakıldı. En yüksek Doks bağlanmış KNT'ler, MDA-MB-231'de % 50, HUVEC'de % 40, HT-29'da % 70 civarında canlilikta azalmaya sebep olmuştur.

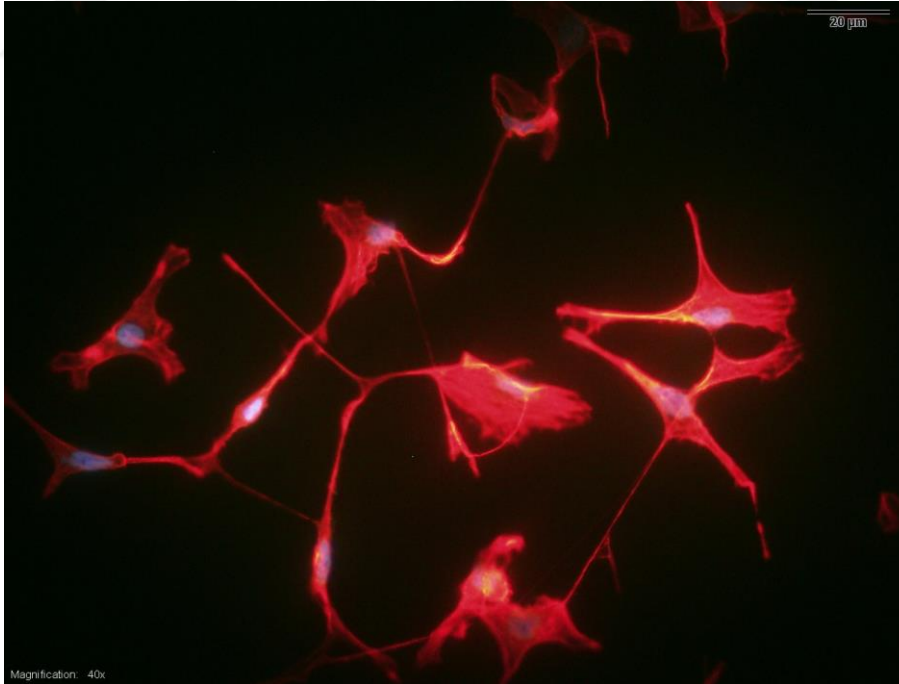


Şekil 84: HT-29 Hücresleri canlilik değersleri.

4.11. İmmü Floresan Mikroskopi Çalışmaları

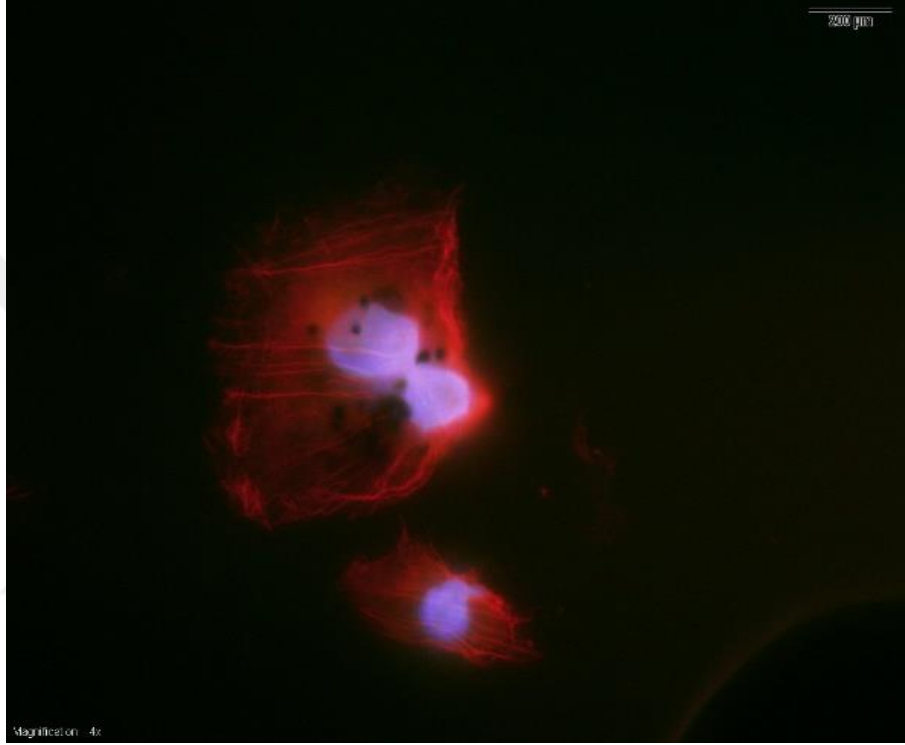


Şekil 85: MDA-MB-231 Kontrol hücreleri.

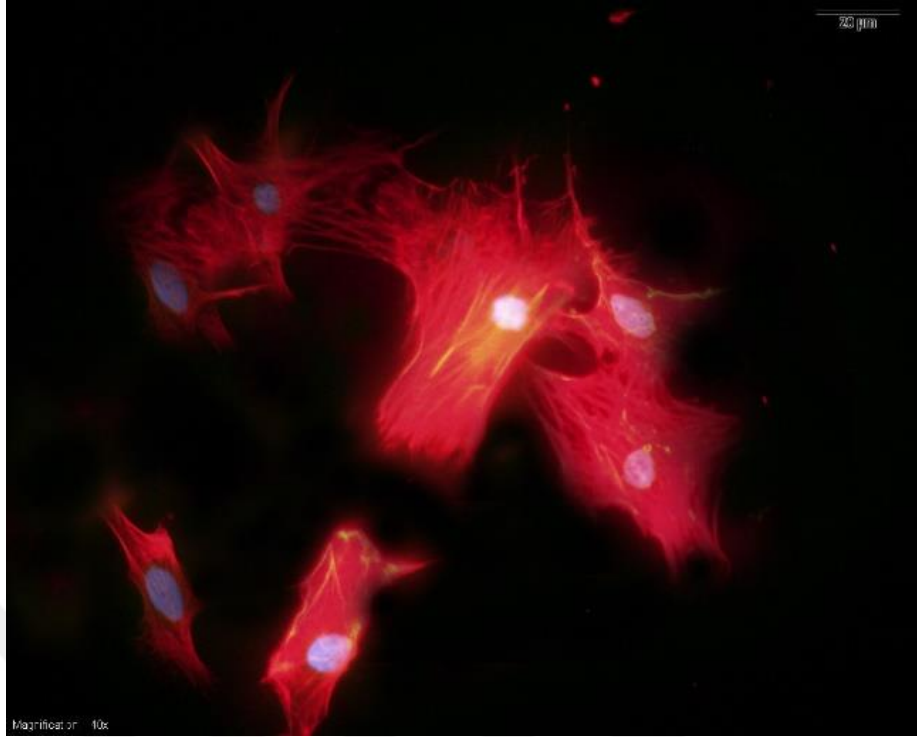


Şekil 86: Çalışmanın başlangıcında uzun 100 µg/ml TDNT uygulanan MDA-MB-231 hücreleri.

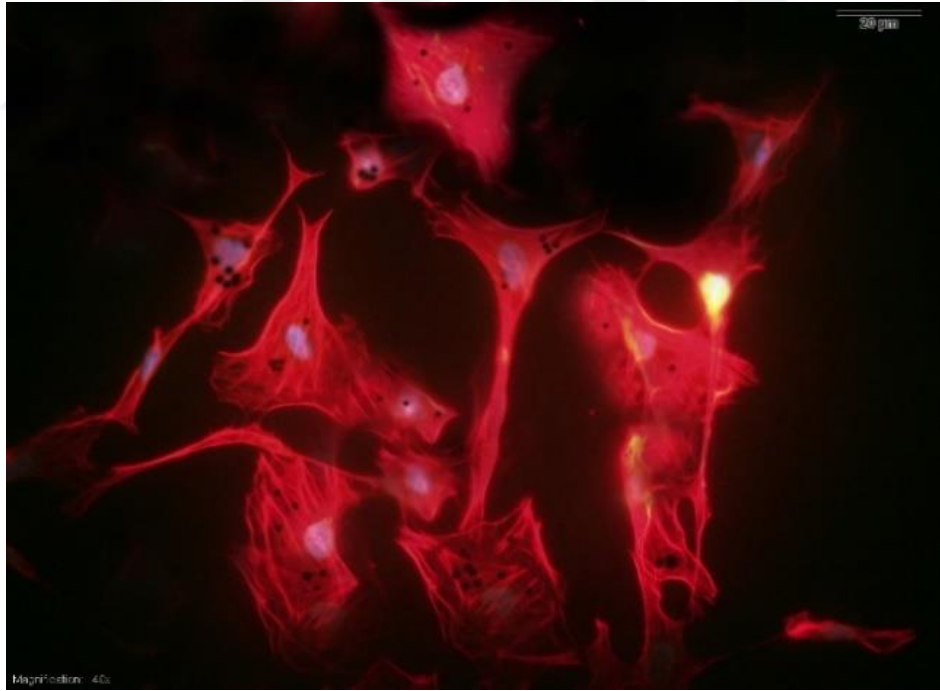
İmmünfloresan görüntüleme çalışmalarında ilk olarak, uzun ve TDNT'lerin MDA-MB-231 hücrelerindeki etkileri incelendi. Hücresel alımın gerçekleşmediği TDNT'ler aktin iskeletine zarar verdiler (Şekil 85,86). Sonrasında çok duvarlı ve hücre boyutlarına uygun olarak kısa üretilen KNT'ler, hücre içine alındı. Hem MDA-MB-231 hem de HUVEC hücrelerinde KNT'ler noktasal siyahlıklar olarak, hücre içinde izlendi (Şekil 87,89).



Şekil 87: 50 µg/ml KNT uygulanan MDA-MB-231 hücreleri.



Şekil 88: HUVEC Kontrol hücreleri.



Şekil 89: 50 µg/ml ÇDNT (Nanografi İKNT) uygulanan HUVEC hücreleri.

4.12. İstatistik

Canlılık testlerinde tekrarlanan deneylerin sonuçlarında “Student t testine göre $P \leq 0.05$ olarak hesaplandı”.

C. elegans araştırmalarının sonuçları da varyans analizine tabii tutuldu. Buna göre kontrol grubuna, 6. Günden sonra kalınlıklarda anlamlı değişiklikler elde edilirken 6. Günden, solucan sayılarındaki ve uzunluklardaki değişim anlamlı bulunmadı. “Ayrıca ortalama eşitliği testlerinde $P \leq 0.05$ olarak hesaplandı”.

Tablo 5: *C. elegans*’a ait boy ve en değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler (1.gün).

Type 1: Kalınlık, Type 2: Boy					
Tanımlayıcı İstatistikler - Type1					

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
-----+-----					
-					
kontrol	92	53.24936	6.522163	38.40033	71.13267
yuz	91	55.00696	6.491162	45.14456	80.4685
besyuz	98	58.91414	9.739832	41.35489	88.3965
Tanımlayıcı İstatistikler - Type2					
Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
-----+-----					

kontrol	92	908.1037	91.72246	693.881	1187.047
yuz	91	918.5654	14.2237	680.9377	1317.862
besyuz	98	907.4608	153.537	53.36767	1383.169
Tanımlayıcı İstatistikler - Type1 ve Gun1					
Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
-----+-----					

kontrol	10	55.61889	4.612302	47.05811	60.36067
yuz	10	56.31959	5.739862	50.47756	63.993
besyuz	10	61.91206	8.293891	52.52978	76.07117

Analiz yapılırken öncelikle her bir gün için, standart sapma, maksimum ve minimum değerler belirlendi. Bu tanımlamalar her bir gün için ayrı ayrı yapıldı.

Ortalama eşitliği testinde, ilk güne ait sonuçlarda düşük standart hata değerleri ile kalınlıkların yakın değerlerde olduğu görülmektedir (Tablo 6). İlk gün uzunluklarında standart sapmalar fazladır (Tablo 7).

Kalınlık değerleri, en çok 500 µg/ml uygulanan bireylerde artış göstermiş, son günlere doğru standart sapmalar azalmıştır. Uzunluk değerleri son günlere doğru her bir deney grubu için, düşük standart sapma değerleri ile yakın değerlere ulaşmıştır.

Tablo 6: ilk güne ait kalınlık değerlerinin ortalama eşitliği testi sonuçları.

Gun (Sabit) Bazında Variance Testing- Type1 (Kalınlık) ve 1. Gun için					
Variance ratio test					
Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
kontrol	10	55.61889	1.458538	4.612302	52.31945
58.91833					
yuz	10	56.31959	1.815104	5.739862	52.21354
60.42564					
-----+-----					
combined	20	55.96924	1.136047	5.080557	53.59147
58.34702					

ratio = sd(kontrol) / sd(yuz)				f =	0.6457
Ho: ratio = 1				degrees of freedom =	9, 9
Ha: ratio < 1		Ha: ratio != 1		Ha:	
ratio > 1					
Pr(F < f) = 0.2625		2*Pr(F < f) = 0.5249		Pr(F >	
f) = 0.7375					

Tablo 7: İlk güne ait uzunluk değerlerinin ortalama eşitliği testi sonuçları.

Gun (Sabit) Bazında Variance Testing- Type2 (uzunluk) ve 1. Gun için					
Variance ratio test					
Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]
-----+-----					
kontrol	10	933.0152	25.86498	81.79226	874.5046
991.5259					
yuz	10	908.0701	33.40046	105.6215	832.5131
983.6272					
-----+-----					
combined	20	920.5427	20.757	92.82814	877.0978
963.9876					

ratio = sd(kontrol) / sd(yuz)				f =	0.5997
Ho: ratio = 1				degrees of freedom =	9, 9
Ha: ratio < 1		Ha: ratio != 1		Ha:	
ratio > 1					
Pr(F < f) = 0.2290		2*Pr(F < f) = 0.4580		Pr(F	
> f) = 0.7710					

5. TARTIŞMA

KNT'ler elektron iletme kapasitelerinin oldukça yüksek olmasıyla biyosensörlerin geliştirilmesine, sağlam ve esnek yapıları ile doku araştırmalarında iskelet görevi üstlenmesi ve geniş yüzey alanlarının yanı sıra, hücresel alımlarının yüksek oluşu ile de ilaç taşıma araştırmalarına yüksek oranda katkıda bulunmuşlardır. KNT'lerin dünya pazarındaki yeri 2014-2019 yılları arasında 158,6 milyon dolardan; 670,6 milyon dolara ulaşmıştır (87). KNT'ler endüstriyel ve medikal alanlardaki bu uygulamaları ve araştırmacıların artan ilgisi ile, hayatımızdaki yerini koruyacaktır.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmaların ilk ayağı ilaç taşıma potansiyeli olan KNT'lerin bulunması çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak İTÜ'de CVD yöntemi ile üretimi gerçekleştirilen, uzun ve kısa KNT'ler ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda uzun TDNT'lerin toksik etkilerinin fazla olduğu ve hücre iskeletine zarar verdiği gözlemlenmiştir. Uzun TDNT'lerin hücrenin aktin iskeletine zarar verdiği görülmüştür (48).

TDNT'lerin ÇDNT'lere göre protein bağlama ve taşıma kapasitelerinin düşük olması (84) ve toksisitelerinin fazla oluşu (90), bizi çalışmalarımızda ÇDNT'lerin kullanılmasına yöneltmiştir. ÇDNT'lerin karakterizasyonu aşamasında elde edilen TEM görüntülerinde, biyolojik ortamda denenerek ve toksisitesi araştırılacak KNT'lerin bu araştırmalar için uygun olup olmadıkları araştırılmıştır. İlk olarak İTÜ-3M kodlu ÇDNT'lerle toksisite deneyleri HT-29 hücrelerinde ve kısa dönem için *C. elegans*'ta toksik etkileri incelenmiştir. Ayrıca, Baytube'dan C150P ve C70P kodlu 2 farklı ÇDNT istenilmiştir. Yaklaşık 1-1.5 μm uzunlukta İTÜ-3M, C150P ve C70P ÇDNT'lerin uzunlukları ve çok duvarlı yapıları elde edilen TEM ve SEM görüntüleri ile doğrulanmıştır. TEM görüntülerinde aggrege yapılar ve noktasal olarak görülen nano kapsüller üretim aşamasında kullanılan metallerden kaynaklanan safsızlıklardır.

KNT'lerin yay benzeri esnek davranışları vardır. Bu davranış da TEM görüntüleri ile incelenmiştir. TEM'deki enerji yüklü elektron ışını, ÇDNT'e çarptığında, ÇDNT'ün büküldüğü gözlemlenmiştir. Sonrasında ışın etkisi ortadan kalktığında, kendi şekillerine tekrar döndükleri görülmüştür. 90° kadar bükülebildikleri gözlemlenmiştir. Orijinal şeklin tamamen geri kazanılması, bu şeklin yüksek enerjili ışınlar tarafından yaratılmadığını ve KNT'lerin esnekliklerinin doğal özellikleri olduğunu kanıtlamaktadır (91).

Yüksek esneklikleri ve iğne benzeri yapıları ile, uyumlu hücre boyutu ve KNT boyutu ile büyük moleküllerden DNA plazmitlerine kadar çok sayıda molekül ve ilacın hücre içine taşınmasında kullanılmışlardır (88,92-94).

Tez kapsamında çalışılan HT-29, HUVEC, MDA-MB-231, NIH-3T3 hücrelerinin çapları sırasıyla yaklaşık olarak 7,18, 17, 20 μm 'dir. İTÜ-3M, C150P ve C70P'nin hücresel alımının gerçekleştiği gözlemlense de, hücre boyutlarına daha uygun, daha kısa ÇDNT'lerle çalışılmak istenmiştir. İlk olarak denenen 3 farklı ÇDNT, hücreye alınmıştır, çünkü yaklaşık 1 μm 'ye sahip olan bu CNT'lerin içinde daha kısa olan yapılar da mevcuttur ve hücreye alımı gerçekleşenlerin bunlar olduğu sanılmaktadır. ODTU Teknokent'de varlığını sürdüren Nanografi şirketi ile ilaç taşımaya uygun olarak, daha az toksik etki göstermesi için metal katalizör miktarı azaltılmış ve kısa boylu KNT'ler üretmeleri için bağlantıya geçilmiştir. Böylece kısa, saflığı yüksek ve daha az toksik etkiye sahip olan ÇDNT'ler elde edilmiş ve sonrasında çalışmalara bu KNT'ler ile devam edilmiştir. Bu çalışmaların karakterizasyonu aşamasında TEM ve SEM görüntüleri ile boyları ve çok duvarlı yapıları doğrulanmıştır. Sonrasında çözünürlüğünü ve biyouyumluluğunu arttırmak, var olan safsızlıkları gidermek ve duvarlarda işlevsel gruplar oluşturmak amacıyla, KNT'ler güçlü asit karışımları ile muamele edilerek işlevsel hale getirilmiş ve İKNT'ler elde edilmiştir. Bu KNT'lerin TEM görüntüleri, daha hizalı, agregre yapıları oldukça azalmış, duvarlarında işlevsel gruplar oluşmuş ve boyları daha da kısalmış yapılar elde edildiğini doğrulamıştır.

Karakterizasyon aşamasında kullanılan TGA yöntemi, hem saf ve İKNT'lerin karşılaştırılması için kullanılmış hem de BSA, Doks ve DT yüklendikten sonra bağlanma miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Yöntemde ilk olarak KNT'lerin sıcaklığa bağlı olarak termal bozunma eğrileri elde edilmiştir. Aynı işlevselleştirme işlemleri hem C70P'ye hem C150P'ye hem de nanografiden elde edilen KNT'ye uygulanmıştır. Fakat TGA sonuçlarından elde edilen bozunma eğrilerine bakıldığında, yüzeyde TGA ile belirlenen fonksiyonel grupların oldukça az oranda kaldığı izlenmiştir. Hatta işlevselleştirme işlemi kütle yoğunluğu yüksek olan numunede neredeyse hiç etkili olamamıştır. Kütle yoğunluğu yüksek olan numunelere daha uzun süre ve daha yüksek sıcaklıklarda işlevselleştirme prosedürleri uygulanabilir. Literatürde yapılan işlevselleştirme işlemlerinde, 40 ile 140 $^{\circ}\text{C}$ arasında, 2 ile 48 saat arasında sürelerde, işlevselleştirme işlemleri gerçekleştirmiş araştırma grupları vardır. Çalışmada ÇDNT'ler

için uygulanan prosedürlere bakılıp, en iyi sonuç alınan denemelere göre deneyler gerçekleştirilmiştir (95,96). Ancak KNT'lerin boyları, çapları, kütle yoğunluklarının da işlevselleştirme işleminin başarısını etkileyebilmektedir.

Nanografiden elde edilen KNT'lerin işlevselleştirme işlemleri, C150P ve C70P'ye göre iyi bir orana ulaştığından, sonrasındaki tüm ilaç ve molekül bağlama denemelerinde bu İKNT'ler kullanılmıştır. Proteinlerin bu KNT'lerdeki davranışları BSA bağlanarak denenmiştir. 3 mg BSA, 2 mg CNT oranları ile yapılan yüklenme denemesinde % 59,12 yüklenme olduğu görülmüştür. Bu oldukça yüksek bir orandır. BSA yapısal stabilitesi ve moleküler biyolojideki geniş uygulama alanları ile model bir proteindir. CNT'lerin hidrofobik yüzeyi ile, BSA aromatik ve hidrofobik kısımları etkileşime girerler. Bu nedenle BSA KNT'lerin non-kovalent işlevselleştirme işlemleri için de kullanılmaktadır. Farklı oranlarda bağlanmalar gerçekleştirilen BSA-KNT kompleksinin, FTIR spektrumları da elde edilmiş. Bağlanma oranları, FTIR spektrumu ile de doğrulanmıştır. Araştırmalarda birebir BSA-KNT bağlanma oranı veren çalışmalar da mevcuttur (97-100).

Doksorubisinin bağlanma oranı araştırması 2 farklı yöntemle yapılmıştır. TGA analizi ile Doks yüklenmiş İKNT'nin ve sadece İKNT ve Doks-İKNT kompleksinin sıcaklığa bağlı kütle değişimine bakılarak, bağlanma oranları tespit edilmiştir. Doks'a ait eğrinin literatürdeki Doks TGA eğrileri ile uyumlu olduğu, 237, 320 ve 400 °C'de görülen kütle kayıplarının, Doks'un karakteristik kütle kaybını doğruladığı görülmektedir (101). Doks-İKNT kompleksinin aynı sıcaklık aralığında, kütle kaybettiği sıcaklıklar benzerdir ve kompleksin toplam kütle kaybı İKNT'den çıkarıldığında % 23,43'lük bağlanma oranı ortaya çıkmıştır. Bu oran 2 mg Doks ve 3 mg İKNT ile elde edilen sonuçtur. Doks'un bağlanma oranlarını belirlemek için, kırmızı rengi nedeniyle spektroskopik yöntemler de uygun sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle absorbans değerlerinden ve Doks'un kalibrasyon eğrisinden, % 20 bağlanma oranı hesaplanmıştır. Hesaplamalar Seredych ve arkadaşlarının, absorbans değerlerine göre bağlanma oranlarını hesapladığı çalışma referans alınarak gerçekleştirilmiştir (102). Literatürde KNT'lere Doks yüklenme çalışmaları çok daha az miktarlarda Doks kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneğin 20 mg KNT ile 1 mg Doks'u etkileştiren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda da % 1,5'i bulan bağlanma oranları verilmektedir (103).

Bazı kanser tiplerinde kullanılması düşünülen mutant DT'nin (CRM-197) KNT'lerle hücre içine taşınmasının mümkün olabileceği düşünüldüğünden, DT'nin KNT'lere yükleme deneyleri yapılmıştır. DT bağlanma çalışmasında elde edilen verilere bakıldığında, birebir oranda muamele edilen DT ve KNT'nin % 50 oranda bağlandığı sonucu ortaya çıkmıştır. Bu bağlanma oranına uygun konsantrasyon oranları ile hücrelerde denenmiştir.

KNT'ler Raman spektrumu incelemelerinde karakteristik bantlar ortaya çıkarılır (104). KNT'ler için karakteristik G bandı $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ 'dir ve grafit bandı olarak da bilinir. Grafen yapı üzerindeki titreşimsel bantları G bandı gösterir. $1300-1350\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlemlenen D bandı, kusur ya da düzensizlik bandı olarak bilinir. Düzensiz, amorf karbon yapıyı ifade eder. D ve G bantlarının oranı düzensizlik modu olarak da bilinir ve şiddetlerinin oranının büyümesi, daha fazla kusurlu yapı olduğunu ifade eder (105). Ancak bu oran her zaman doğrudan işlevselleştirmenin bir kanıtı değildir (106). $2700\text{ ve }2730\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlemlenen G' bandı K noktasında 2 fononun saçılması ile ortaya çıkar ve G bandının Brillouin bölgesi olarak bilinir. D bandı işlevselleştirme sonrası düzensizlik bilgisi verir, D' bandı ise C-C bağı titreşimlerinde gerilme bilgisi verir. İkinci derece D' bandı ise işlevselleştirme sonrası yüksek şiddette izlenir (107). İC70P ve İC150-P'nin saf KNT'lerle karşılaştırılan Raman spektrumlarına bakıldığında, TGA sonuçlarına benzer şekilde kütle yoğunluğu fazla olan C150-P'nin yüzeyinde daha az işlevsel gruplar olduğu Raman spektrumu ile de doğrulanmıştır. Hem saf hem de İC150-P'nin Raman spektrumu izi G bandı hariç, birebir benzerdir. G bandı ise yüzeyde karboksil grupları ya da defect oluştuğunu gösteren bir şiddet verisi ortaya çıkarmamıştır. G bandının 2'ye bölünmesi ile ortaya çıkan Gr bandı incelendiğinde İC70P'de daha belirgindir, G bandı şiddetindeki artış işlevselleştirme sonrası İC70P'de daha fazladır. Bu sonuçlar TGA verilerini doğrulamaktadır.

Nanografiden alınan KNT ve İKNT'lerin Raman spektrumu incelendiğinde, daha yüksek şiddette D bandı ve 2. Derece D' bandı, yüzeylerde bozuklukları ve karboksil grupları oluşumunu doğrulamaktadır. D ve G'nin şiddetleri oranlanarak, düzensizlik derecesi hakkında bilgi edinilebilmektedir. Ancak bu oran kovalent işlevselleştirmeye kanıt olarak sunulamamaktadır. D bandının yüksek oluşu amorf karbon yapısını işaret eder. G bandında ikiye bölünme sonrası Gr olarak ortaya çıkan band, G bandından daha düşük şiddete sahipse, oksidize olmuş ya da işlevselleştirilmiş KNT'leri işaret eder.

Ancak Saf KNT'lere ait Raman spektrumunda Gr'nin şiddetinin G bandından yüksek olduğu göze çarpmaktadır. İkinci derece D' bandındaki artış aynı zamanda ÇDNT'lerin iç tabakalarına O₂'nin difüzyonunun gerçekleşmesi, istif yapısının ayrışması olarak da yorumlanmaktadır.

Diğer bir spektroskopik analiz yöntemi olan FTIR da işlevselleşme bilgisi verebilmektedir. FTIR malzemelerin yüzey değişimleri hakkında bilgi etmek için kullanılabilen bir yöntemdir (128). ÇDNT'lerin iç içe duvarlı yapıda olması, FTIR spektrumunda daha geniş bantlar vermesine yol açar. Ayrıca ÇDNT'lerin birkaç kızılötesi tipik değeri vardır. 1500-2000 cm⁻¹ arası, kullanılan her KNT çeşidinde görülen spektrumlar, KNT'nin altıgen yapısı ve C=C yapısı nedeniyle ortaya çıkan karakteristik titreşim bölgeleridir. C150P ve C70P'den elde edilen FTIR spektrumlarında işlevselleşmeye yönelik titreşim bölgeleri ortaya çıkmamıştır. İşlevselleştirme işlemi gerçekleştirilen KNT'lerle aynı iz elde edilmiştir. Nanografiden elde edilen FTIR sonuçlarında, 3500 cm⁻¹'deki tepe tipik O-H germe değerini temsil eder. 1000-1500 cm⁻¹ arası görülen tepeler ise, C-O ve O-H bağlarını ifade etmektedir (36,37). Böylece yüzeyde oluşan işlevsel gruplar doğrulanmıştır.

Doksorubisin çok farklı kanser tiplerinin tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir kanser ilacıdır. DNA hasarına yol açar, topoizomera II'yi inhibe eder ve O₂ serbest radikallerin oluşmasını sağlar. Klinik uygulamalarda yol açtığı toksisite oldukça büyük bir sorundur, ilacın etki süresi kısa ve terapötik indeksi ise düşüktür (108-110). Bu nedenle bu ilacın taşıyıcılarla dokulara daha efektif iletimi oldukça önemlidir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Doks'un etkisini incelemek için yapılan ve 24 saat Doks ile inkübe edilen hücrelerde 4 µM hücrelerin %55'ten fazlasını öldürmüştür. Literatürde aynı hücre hattında yapılmış çalışmalar incelendiğinde 24 ve 48 saatlik sonuçlar için sırasıyla 4.0 ve 1.4 µM'lık IC₅₀ değerleri elde edilmiştir (111,112). Ferrato ve Calaf'in yayınladığı başka bir araştırmada ise Doks için 1 µM IC₅₀ değeri 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında verilmiştir (113). Bu yüksek değerlerin yanında başka bir araştırma grubu 48 saat inkübasyon sonrası 138 nM gibi küçük bir değerde IC₅₀ değeri rapor etmiştir (114).

HUVEC hücrelerinde de Doks'un etkisi incelenmiştir. Farklı sürelerde Doks ile inkübe edilen hücreler için, farklı IC₅₀ değerleri daha önce çok sayıda araştırma grubu tarafından rapor edilmiştir. 3 saatlik inkübasyon süresi için yaklaşık 226 nM (115), 24

saatlik inkübasyon süresi için 5 μM Doks'un hücrelerin % 60 'a yakını öldürdüğünü söyleyen (116) ve 48 saat için 1.3 μM (117) ve 72 saat inkübasyon süresi için 4.60 μM IC50 (118) değerleri veren çalışmalar mevcuttur. Çalışmaların çoğunda sadece inkübasyon süresi ve konsantrasyon bilgisi verilmiş, hücre sayısı bilgisi paylaşılmamıştır. Bu çalışmada HUVEC hücreleri 5×10^4 hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra artan konsantrasyonlarda Doks uygulanmış ve 5 μM Doks'un 24 saat sonra hücrelerin yaklaşık % 52'sini öldürdüğü görülmüştür. Bu değer aynı konsantrasyonun hücrelerin % 60'ını 24 saat sonra öldürdüğünü söyleyen çalışma ile benzerlik göstermektedir. HT-29 hücrelerinde Doks'un etkisi yine artan konsantrasyonlarda incelenmiş ve yaklaşık 7 μM Doks'un 24 saat inkübasyon süresinde hücrelerin yaklaşık %51'ini öldürdüğü gözlenmiştir. Bu değer 5×10^4 hücre için 24 saat Doks inkübasyonu sonrası elde edilen değerdir. Bu çalışmada elde edilen değerler literatürdeki değerlerle birebir örtüşmemektedir. 24 saat Doks inkübasyonu sonrası 10 μM 'ın hücrelerin yarısını öldürdüğünü rapor eden çalışmalar mevcuttur, çalışmada sadece konsantrasyon ve süre bilgisi verilmiş, hücre sayısı paylaşılmamıştır (119). 48 saat Doks ile inkübasyon sonrasında 4,6 μM (113), 72 saat inkübasyon sonrası 2.75 μM IC50 değerleri verilmiştir (120).

Doks'un hücrelerdeki etkileri incelendikten sonra, KNT'lerin hücrelerdeki toksisiteyi değerlendirildi. İlk olarak elimizde varolan C150P, C70P ve İTÜ'nün KNT'leri HT-29 hücrelerinde ve *C.Elegans*'ta kısa dönemde (24 saat) denendi. HT-29 hücrelerinden elde edilen sonuçlarda, 3 farklı saf KNT çeşidinden, kütle yoğunluğu fazla olanın toksisitesi de fazla bulunmuştur. Ayrıca İTÜ'de üretilen KNT'nin metal oranının fazla oluşu toksisitesini arttırmıştır. Kütle yoğunluğuna bağlı olarak yaklaşık %10 luk bir toksisite artışı ortaya çıkmıştır.

KNT'ler, 24 saatlik periyotta *C.Elegans*'ların üzerinde ani bir toksik etki göstermemiştir. Son zamanlarda oldukça yaygın kullanılmakta olan KNT'lerin çevresel toksisitesine yönelik bilgi vermesi bakımından da önemlidir. *C.Elegans* 24 saat sonunda sayılarak, sayılarında bir azalma olup olmadığına bakılmıştır. Ayrıca KNT'lerden kaçma eğiliminde olup olmadıkları, kütle yoğunluğunun hücrelerdeki kadar toksik etki farkına neden olup olmadığı incelenmiştir. Ancak 50 ekim yapılmış ve 3 kontrol ve 3 KNT çeşidi için 3'er petri kabında yapılan sayımlarda, C150P'de sadece 1 petride 3 bireyde eksilme olmuştur ancak bu sayı bir kontrol grubu petrisinde de görülmüştür. Bu deney 3 kez tekrar edilip ortalamaları alınan birey sayıları da benzer sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Bu 24

saatlik deneyler uzun dönem yaşam analizi yapmanın daha farklı sonuçlar ortaya çıkarabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Sonrasında Nanografi'den temin edilen KNT'ler ile deneylere devam edilmiştir. Toksisite araştırmalarında birincil insan hücrelerinin kullanımı, doğrudan memeli organizmalarda denenmesine kıyasla daha özelleşmiş araştırmalar yapılmasına ve toksisite araştırmalarında etki mekanizmalarının daha ayrıntılı araştırılmasına olanak sunar. Bu sonuçlar oldukça değerlidir fakat, kompleks bir organizmanın toksik bir maddeye cevabının belirlenmesinde yeterli değildir. Laboratuvar ortamında ölümsüzleştirilerek, deneysel araştırmalara uygun hale getirilmiş hücreler, yüksek oranlarda hatalı sonuçlar da verebilmektedir (121,122).

C. elegans toksisite araştırmalarında *in vitro* testler ve memeli hayvan testlerinde ara bir basamak olarak kullanılmakta ve sonrasında yapılan memeli testlerinde, sonuçların uyum arz ettiği görülmektedir (123).

Kısa dönem etkileri incelemek için yapılan 3 günlük incelemelerde, toksik etki izlenmemiştir. Yaşam süresi analizi için ve uzun dönem etkilerini gözlemlemek için İKNT'ler kullanıldı. Hayvanların toksik maddelerden kaçma eğilimi gösterdikleri ancak İKNT'lerden kaçma eğilimi göstermedikleri, yumurtalarını KNT'lerin üzerine bıraktıkları, lokomadasyon davranışlarını değiştirmediklerini ve İKNT'lerin agrege olduğu yerlerde içinden geçerek yol aldıkları görülmüştür. KNT'ler *E. coli* ile birlikte besi yerine ilave edildiğinden ve petri kaplarına ilave edilmeden önce KNT-*E. coli* birlikte agrege bir yapı oluşturduğundan, bireylerin İKNT'lerden beslendikleri izlenilmiştir. İlk 3 gün, bireylerin kontrol grubu ile benzer hızlarda hareket ettikleri izlenilmiştir. 6. Günden sonra, İKNT uygulanan gruplarda kalınlaşmalar, petri kaplarında koyu renk defekasyona bağlı kirlilikler izlenilmeye başlanılmıştır. 8. Günden sonra, ölü bireyler görülmeye ve kalınlaşmalar belirginleşmeye başlamıştır. Sonrasında, kalınlaşmalar ve ölü sayısı artmıştır. Bu sonuçlar, İKNT'lerin bireylerin vücutlarında biriktiğini ve defekasyon ile vücuttan atıldığını göstermektedir. Kalınlaşan ve vücutlarında İKNT biriken bireylerin, hareketlerinde de yavaşlamalar izlenmiştir.

Yaşam süresi analizler ile ilgili dikkat çeken ilk sonuç, en yüksek dozun (500 µg/ml) uygulandığı petrilerin hiçbirinde, her 3 denemede de küf mantarı oluşmamasıdır. Düşük doz (100 µg/ml) ve kontrol gruplarında, her denemede 1 ya da 2 petri kabı küf mantarı oluşumu nedeniyle kaybedilmiştir. Bundan sonraki dönemde KNT'lerin antifungal etkisi araştırılacaktır.

C.elegans L4 başlangıç evresinde boyları 620-650 μm uzunluğundadır. 10 saat sonra genç erişkin olduklarında, 900-940 μm arası uzunluğa ulaşırlar. Yumurta bırakabilen yetişkin olduklarında ise 1110-1150 μm arasında uzunluktadırlar (124). Bu çalışmada kontrol grubunun boyu 979-876 μm arasında değişkenlik göstermiş ve ilk 6 gün artan bir süreç izlerken sonrasında azalan ve birbirine yakın aralıklarda seyreden bir uzunluk ölçülmüştür. 1. Gün 879.8876 μm olan uzunluk, 15. Gün sonunda 876,7851 μm 'dir. Boy ortalaması ilk gün 868.87435 μm olan olan 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon olan bireylerin boyları ilk 8 gün aşamalı olarak artmıştır. 8. Gün uzunluk ortalamaları 977.3683 μm 'e kadar ulaşmış, 15. Gün sonunda ise 902 μm 'ye kadar düşmüştür. En yüksek konsantrasyonda 890.1368 μm ile başlayan boy ortalaması 8. Güne kadar sürekli artış göstermiş, sonrasında azalarak 15. Gün 893.7833 μm ile sonlanmıştır. Hem kontrol hem de deney gruplarında ilk 6-8 gün boyda artış, sonrasında azalıp, ± 40 μm değerlerde sabitlendiği görülmüştür. İKNT'lerin boylarda kısaltmaya yol açmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Kalınlık ölçümlerinde ise durum bu şekilde değildir. *C.Elegans*'larda artan konsantrasyon daha kalın bireyler ölçülmesini sağlamıştır. Kontrol grubunda ilk 7 gün 51,753 μm 'ten 54,8 μm 'e ulaşan ortalama kalınlık değeri, sonraki günlerde 50-51 μm arası değerlerde sabitlenmiştir. Bu durum beklenen bir süreçtir. 100 ve 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda ise ilk 7 gün 50-55 μm arasında değişen değerler gösteren, güne bağlı bir artış göstermeyen kalınlıklar, sonrasında sürekli artış göstermiştir. 8-9 μm arası kalınlaşma artışı ölçülmüştür. Bu durum İKNT'lerin bireylerin vücudunda birikmesinin bir sonucudur. Yaşam süresi analiz edilen hayvanlarda, ilk 9 gün kontrol ve deney grupları arasında 50-48 birey arasında değişen ve kontrol grubuyla fark izlenmeyen sonuçlar ortaya çıkmıştır. Deney sonlanırken, 15. Gün sonunda 0 ve 500 $\mu\text{g/ml}$ 'de canlı hayvan kalmazken, 100 $\mu\text{g/ml}$ 'de bir canlı hayvan kalmıştır. Kontrol ve en yüksek konsantrasyon birey sayısındaki azalma bakımından aynı sonuçları vermişlerdir. Hayvanları "öldürmeyen ama süründüren" İKNT'lerin vücuda alımı, vücuttan defekasyon ile atıldığı, kalınlığa etki ettiği, bireylerin hareket hızını azalttığı, boy ve yaşam süresi üzerinde doğrudan bir etki ortaya çıkarmadığı görülmüştür. KNT'ler hücrelerde toksik etki gösterirken, İKNT'ler toksik etki göstermemişlerdir. Toksik etkinin yüksek olduğu HT-29 hücrelerinde, etki hücre çaplarının küçük olmasına bağlanmıştır.

Xcelligence deneylerinde, 10'ar kuyudan alınan ortalamalarla elde edilen hücre indeksi değerlerine göre, KNT uygulamasının hücre indeksi değerlerinde kontrol grubuna göre belirgin artışın neden olduğu görülmüştür. Bu durum KNT'lerin elektriksel iletkenliklerinin yüksek oluşu nedeniyle, altın elektrotlara yapışarak iletkenliğe pozitif katkı yapmasına bağlanmıştır.

DT'nin karakterizasyonu sırasında elde edilen Raman Spektrumlarında Sigma ve Refik Saydam'dan elde edilene ait sonuçlar birbirini doğrulamaktadır. Ayrıca literatürde DT'nin Raman spektrumunu içeren bir çalışma da yer almaktadır. Bu çalışmadaki DT izi de elde ettiğimiz izlerle benzeşmektedir (125). Sonrasında Western blot ile yapılan analizlerde de aynı molekül ağırlığında aynı izleri vermişlerdir. Ayrıca sıvı kromatografi ile elde edilen kromatogram da DT'nin 63 kDa'luk molekül ağırlığı doğrulanmıştır.

Sigmadan elde edilen DT'ne yüksek maliyeti nedeniyle alternatif olarak RS'da üretilen DT kullanılmıştır. Çünkü bağlanma için yüksek miktarda DT gerekmektedir. DT'ler karşılaştırıldığında moleküler yapılarının aynı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada 5 mg DT, 5 mg İKNT ile etkileşime sokularak, yarı yarıya bağlanma sonucu elde edilmiştir. DT'nin karakterizasyonunu ve hücre alımını doğrulamak amacıyla yapılan deneylerde, Sigma ve RS DT'ni karşılaştırmak amacıyla Raman Spektrumu elde edilmiş ve Western Blot analizi yapılmıştır. Raman spektrumlarındaki izlerin birebir doğrulandığı görülmüştür. Western blot analizlerinde de aynı sonucu vermiştir. DT-KNT kompleksinin hücre alımını doğrulamak amacıyla, DT karakterizasyonu aşamasında kullanılan antikorlar kullanılarak, hücre lizatından DT-KNT kompleksinin hücre alımı doğrulanmıştır. Bektaş ve arkadaşlarının uyguladığı alternatif ADP ribozillenme deneyi kullanılarak (126), konsantrasyona bağlı olarak lizatlarda eEF-2 miktarında azalma belirlenmiştir. DT varlığında eEF-2 üzerindeki arjinin kalıntılarının, ADP ribozillenme esnasında inhibe olduğu bildirilmiştir (127). DT ölümcül bir toksindir ve ökaryotik hücre ölümünde çok etkili olduğu bilinmektedir. Oldukça büyük bir hücre olan ve yaklaşık 20 µm'lik çapa sahip olan NIH-3T3 hücrelerine DT'nin girmediği bilinmektedir (70).

İKNT'lerin yüksek oranda protein (BSA, DT) ve Doks bağladığı saptandıktan sonra, kargo işlevi görebileceği düşünüldü. Bağlanma amaçlı kullanılan BSA'nın literatürde çok çalışılması, DT'nin protein sentez inhibitörü olması ve dokstrobisinin kanser tedavisinde kullanılması bizi bu maddelerle çalışmaya sevk etti. BSA moleküler biyolojide çok amaçlı kullanılan bir proteindir. DT hücreler için toksik (apoptotik, protein sentez inhibitörü ve hücre iskelet yıkımı) etki göstermektedir (69). Toksin normal koşullarda

reseptör aracılı endositoz ile hücreye girer, ökaryotik elongasyon faktör 2'yi ADP-riboziller ve protein sentezi durur (73). Sonraki süreçlerde hücre iskeleti yıkılır ve apoptotik süreç başlar. Burada iki konu önem kazanmaktadır. Birincisi toksinin reseptör içermeyen hücelere (NIH-3T3) girememesi (70; ikincisi ise toksinin hürelere giren fakat protein sentezini inhibe etmeyen mutant formlarında (CRM 197) olmasıdır (128). Bu mutant formların protein sentezi dışında toksik etkileri mevcuttur. Son yıllarda bu mutantların bazı kanser türlerinde tedavi amaçlı kullanılması düşünülmektedir ve bazıları (difitox) FDA onayı da almışlardır. Sorun bu mutant formların kanser hücrelerine nasıl taşınacağıdır. Normal hücelere göre kanser hücrelerinde EGF reseptörleri oldukça fazla bulunmaktadır. Bu EGF resptörleri difteri toksini reseptörlerine çok benzemektedir. Mutant formlar bu reseptörler üzerinden kanser hücrelerine endositozla taşınabilir. Ayrıca mutant formlara bağlanan yapılar (protein, peptit, drag) istenilen hücelere endositik yolakla aktarılabilir.

Bizim düşüncemiz natif ve mutant formları nanotüplere bağlayıp toksine dirençli olan (reseptörsüz) hücelere (NIH-3T3) taşımak olmuştur. Deneysel çalışmalarla işlevselleştirilmiş karbon nanotüplere toksin bağlandıktan sonra hücelere taşındığı gösterilmiştir. DT'nin sitoplazmada salındığı, sitozoldeki eEF2'yi ADP-ribozillediği görüldü. Bu sürecin doğal sonucu olarak ortaya çıkan toksik etkinin protein sentezinin durmasından ortaya çıkabileceği düşünüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda KNT'lerin DNA plazmitleri gibi büyük molekülleri, hücre içine iğne benzeri esnek yapıları ile ilettiği, endositoz aracılığı ile hücre içine alındığı doğrulanmıştır (129). Bu çalışmada DT bağlanmış KNT'nin hücresel alımının gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu konudaki deneyler, Bektaş ve arkadaşlarının kullandığı diğer yöntemler de kullanılarak doğrulanacaktır.

Doks-KNT kompleksinin HUVEC, MDA-MB-231 ve HT-29 hücrelerine olan etkilerine bakılırken, hücrelerde daha az Doks içeren KNT'lerin hücresel iletiminin yeterince gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek için farklı bir yöntem izlenmiştir. Sadece Doks uygulandığında elde edilen ve hücrelerin yaklaşık yarısını öldürdüğü düşünülen değerlerin yarısı kadar Doks içeren en çok Doks yüklü Doks-KNT kompleksi hücelere uygulanmıştır. Elde edilen canlılık değerleri incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinde yarı değer Doks ile IC50 değerinin tutturulduğu görülmektedir. HUVEC hücrelerinde bu tutturulan değer % 60 'a ulaşabilmiştir. HT-29 hücrelerinde ise kompleksin oldukça etkili olduğu ve hücre canlılığını % 33'e kadar düşürdüğü görülmektedir. Biyolojik bariyerleri

aşan kompleksin, hücreye ilaç iletiminde etkili olduğu ve yarı doz içeren kompleksin ilacın verimli iletiminde etkili olduğu görülmektedir.

Son olarak KNT'lerin hücresel alımı floresan çalışmalarla gösterildi. Hücrelerin floresan mikroskobu görüntülemelerinden elde edilen sonuçlar da KNT'lerin hücresel alımını doğrulamaktadır. HUVEC ve MDA-MB-231 hücrelerinde çekirdek DAPI ile ve aktin falloidin FITCH ile boyanarak, hücrede konumlanmış KNT'ler izlenmiştir.

Taşıyıcı rolüne uygun sonuçlar ortaya çıkaran KNT'ler, ilaç, molekül taşıma ve molekül ayrıştırma çalışmalarında ve biyosensör geliştirilmesinde kullanılmak üzere, gelecek vaad eden nano taşıyıcılardır. Bundan sonraki çalışmalarımızda, bu özelliklerinden faydalanılarak araştırmalar yapılmaya devam edilecektir.



KAYNAKLAR

1. Fisher, C. *et al.* Applications and nanotoxicity of carbon nanotubes and graphene in biomedicine. *J. Nanomater.* 2012, (2012).
2. Iancu, C. *et al.* Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin. *Int. J. Nanomedicine* 129 (2011).
3. Wieckowski, B. *et al.* Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat. Nanotechnol.* 2, 108–113 (2007).
4. Jastrzebski, C., Huczko, A., Gebicki, W., Zdrojek, M. & Melin, T. Studies of Multiwall Carbon Nanotubes Using Raman Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Solid State Phenom.* 99–100, 265–268 (2009).
5. Stobinski, L. *et al.* Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. *J. Alloys Compd.* 501, 77–84 (2010).
6. Bom, D. *et al.* Thermogravimetric Analysis of the Oxidation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Evidence for the Role of Defect Sites in Carbon Nanotube Chemistry. *Nano Lett.* 2, 615–619 (2002).
7. Lacerda, L. *et al.* Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials* 33, 3334–3343 (2012).
8. Baun, A. *et al.* Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chem. Cent. J.* 7, 154 (2013).
9. S.-K., J. *et al.* Multi-endpoint, high-throughput study of nanomaterial toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 2477–2485 (2015).
10. Tan, J., Saifullah, B., Kura, A., Fakurazi, S. & Hussein, M. Incorporation of Levodopa into Biopolymer Coatings Based on Carboxylated Carbon Nanotubes for pH-Dependent Sustained Release Drug Delivery. *Nanomaterials* 8, 389 (2018).
11. Farahani, B. V., Behbahani, G. R. & Javadi, N. Functionalized multi walled carbon nanotubes as a carrier for doxorubicin: Drug adsorption study and statistical optimization of drug loading by factorial design methodology. *J. Braz. Chem. Soc.* 27, 694–705 (2016).
12. Sereych, M., Mikhalovska, L., Mikhalovsky, S. & Gogotsi, Y. Adsorption of Bovine Serum Albumin on Carbon-Based Materials. *C* 4, 3 (2018).

13. Singh, R. *et al.* Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3357–3362 (2006).
14. Changgu, L., Xiaoding, W., Kysar Jeffrey W & James, H. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* (80-.). 321, 385–388 (2008).
15. Karthik, P. S., Himaja, A. L. & Singh, S. P. Carbon-allotropes: synthesis methods, applications and future perspectives. *Carbon Lett.* 15, 219–237 (2014).
16. Oliver, J. ``Global Markets and Technologies for Carbon Nanotubes". *BCC Research* (2015). doi:NAN024F
17. Pinillos-Madrid, J. F. & Gallardo, C. Carbon nanotubes: A viable drug delivery platform for the treatment of cancer. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5, 143–152 (2015).
18. Wang, Z. L., Hui, C. Electron microscopy of nanotubes. *Kluwer Academic Publishers*, 112, (2003).
19. Hirsch, A. & Vostrowsky, O. Functionalization of Carbon Nanotubes. *Funct. Org. Mater. Synth. Strateg. Appl.* 1–57 (2007). doi:10.1002/9783527610266.ch1
20. Iijima, S. Synthesis of Carbon Nanotubes. *Nature*, 354, 56–58 (1991).
21. Ando, Y., Zhao, X. Synthesis of Carbon Nanotubes by Arc-Discharge Method. *New Diamond and Frontier Carbon Technology*, 16,3 (2016)
22. Sharma, R., Sharma, A. K. & Sharma, V. Synthesis of carbon nanotubes by arc-discharge and chemical vapor deposition method with analysis of its morphology, dispersion and functionalization characteristics. *Cogent Eng.* 2, (2015).
23. Chrzanowska, J. *et al.* Synthesis of carbon nanotubes by the laser ablation method: Effect of laser wavelength. *Phys. Status Solidi Basic Res.* 252, 1860–1867 (2015).
24. Guo T., Nikolaev P., Thess A., Colbert D. T. & Smalley R.E. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chem. Phys. Lett.* 243, 49–54 (1995).
25. Kouklin, N., Tzolov, M., Straus, D., Yin, A. & Xu, J. M. Infrared absorption properties of carbon nanotubes synthesized by chemical vapor deposition. *Appl. Phys. Lett.* 85, 4463–4465 (2004).
26. Aziz, A. A., Ismail, N. I. N., Che Su, M. S. & Rusop, M. Characterization of functionalized multi-walled carbon nanotubes in pre-vulcanized natural rubber latex. *AIP Conf. Proc.* 1455, 124–130 (2012).

27. Allegri, M. *et al.* Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicol. Reports* 3, 230–243 (2016).
28. Shao, W., Arghya, P., Yiyong, M., Rodes, L. & Prakash, S. Carbon Nanotubes for Use in Medicine: Potentials and Limitations. *Synth. Appl. Carbon Nanotub. Their Compos.* (2013). doi:10.5772/51785
29. Safarova, K., Drovak, a & Kubinek, R. Usage of AFM, SEM and TEM for the research of carbon nanotubes. *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.* 513–519 (2007).
30. Lehman, J. H., Terrones, M., Mansfield, E., Hurst, K. E. & Meunier, V. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* 49, 2581–2602 (2011).
31. Jastrzebski, C., Huczko, A., Gebicki, W., Zdrojek, M. & Melin, T. Studies of Multiwall Carbon Nanotubes Using Raman Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Solid State Phenom.* 99–100, 265–268 (2009).
32. Costa, S. Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Mater. Sci.* 26, 1–9 (2008).
33. Islam, S. S. *et al.* Raman study on single-walled carbon nanotubes with different laser excitation energies. *Bull. Mater. Sci.* 30, 295–299 (2007).
34. Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., Saito, R. & Jorio, A. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Phys. Rep.* 409, 47–99 (2005).
35. Mutlay, I., Soysal, F. , Çiçek, B. Modification of a low cost Raman Spectrometer for carbon nanotube analysis. *Eng&Arch.Fac. Eskisehir Osmangazi University*, 21: 2 (2008).
36. Misra, A., Tyagi, P., Rai, P. & Misra, D. S. FTIR Spectroscopy of Multiwalled Carbon Nanotubes: A Simple Approach to Study the Nitrogen Doping. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 1820–1823 (2007).
37. Țucureanu, V., Matei, A. & Avram, A. M. FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46, 502–520 (2016).
38. Dimitrios, T., Nikos, T., Vasilios, G. & Maurizio, P. Soluble Carbon Nanotubes. *Chem. – A Eur. J.* 9, 4000–4008 (2003).
39. Vasilios Georgakilas, † *et al.* Organic Functionalization of Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 760–761 (2002).

40. Pantarotto, D. *et al.* Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 43, 5242–5246 (2004).
41. Fisher, C. *et al.* Applications and nanotoxicity of carbon nanotubes and graphene in biomedicine. *J. Nanomater.* 2012, (2012).
42. Wieckowski, B. *et al.* Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat. Nanotechnol.* 2, 108–113 (2007).
43. Liu, Z. *et al.* Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res.* 68, 6652–6660 (2008).
44. Li, Z., de Barros, A. L. B., Soares, D. C. F., Moss, S. N. & Alisaraie, L. Functionalized single-walled carbon nanotubes: cellular uptake, biodistribution and applications in drug delivery. *Int. J. Pharm.* 524, 41–54 (2017).
45. Torchilin, V. P. Passive and active drug targeting: Drug delivery to tumors as an example. *Handb. Exp. Pharmacol.* 197, 3–53 (2010).
46. Wang, X., Wang, Y., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology. *Cancer Res. Treat.* 41, 1 (2009).
47. Torchilin, V. P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 813–827 (2014).
48. Ünlü, A. *et al.* Cytotoxicity of doxorubicin loaded single-walled carbon nanotubes. *Mol. Biol. Rep.* 45, 523–531 (2018).
49. Anderson IV, R. The Long and Short Nanotube Toxicity. *Georg. Mason Law Rev.* 23, 19–68 (2015).
50. Meng, H., Xia, T., George, S. & Nel, A. E. A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS Nano* 3, 1620–1627 (2009).
51. John, O., Ian, W., Terry, O. & François, P. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426 (2000).
52. Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A. & Wick, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. *Carbon N. Y.* 45, 2643–2648 (2007).
53. Lee, S., Khang, D. & Kim, S. H. High dispersity of carbon nanotubes diminishes immunotoxicity in spleen. *Int. J. Nanomedicine* 10, 2697–2710 (2015).
54. Taruta, S. *et al.* Safe Clinical Use of Carbon Nanotubes as Innovative Biomaterials. *Chem. Rev.* 114, 6040–6079 (2014).

55. E.A., Lefrak, J., Pitha, S., Rosenheim & J.A., Gottlieb. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32, 302–314 (1973).
56. DD, Von Hoff *et al.* Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* 91, 710–717 (1979).
57. Gilladoga, A. C. *et al.* The cardiotoxicity of adriamycin and daunomycin in children. *Cancer* 37, 1070–1078 (1976).
58. Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* 202, 1691–1701 (2005).
59. Quiles, J. L., Huertas, J. R., Battino, M., Mataix, J. & Ramírez-Tortosa, M. C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180, 79–95 (2002).
60. Strother, R. & Matei, D. Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Ther. Clin. Risk Manag.* 5, 639–650 (2009).
61. Shafei, A. *et al.* A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 95, 1209–1218 (2017).
62. Ali-Boucetta, H. *et al.* Multiwalled carbon nanotube-doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics. *Chem. Commun.* 8, 459–461 (2002).
63. RJ, C. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 39, 1793–1803 (2001).
64. Sandvig, K. & Olsnes, S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J. Cell Biol.* 87, 828–832 (1980).
65. Leung, M. C. K. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* 106, 5–28 (2008).
66. Zhao, Y., Wu, Q., Li, Y. & Wang, D. Translocation, transfer, and in vivo safety evaluation of engineered nanomaterials in the non-mammalian alternative toxicity assay model of nematode *Caenorhabditis elegans*. *RSC Adv.* 3, 5741–5757 (2013).
67. He, Xiaoqing. *et al.* Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF- κ B signaling, and promoting fibroblast-to-myofibroblast transformation. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 2237–2248 (2011).
68. Ünlü, A., Bektaş, M., Şener, S. & Nurten, R. The interaction between actin and FA fragment of diphtheria toxin. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3135–3145 (2013).

69. Varol, B., Bektaş, M., Nurten, R. & Bermek, E. The cytotoxic effect of diphtheria toxin on the actin cytoskeleton. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 17, 49–61 (2012).
70. Cha, J. H., Brooke, J. S., Chang, M. Y. & Eidels, L. Receptor-based antidote for diphtheria. *Infect. Immun.* 70, 2344–2350 (2002).
71. Kraus, W. L. PARPs and ADP-Ribosylation: 50 Years . . . and Counting. *Mol. Cell* 58, 902–910 (2015).
72. Goor, R. S. Studies on the Mode of Action of Diphtheria Toxin: V. Inhibition of Peptide Bond Formation By Toxin and Nad in Cell-Free Systems and Its Reversal By Nicotinamide. *J. Exp. Med.* 126, 923–939 (2004).
73. Bektaş, M. *et al.* On diphtheria toxin fragment A release into the cytosol - Cytochalasin D effect and involvement of actin filaments and eukaryotic elongation factor 2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1365–1372 (2011).
74. Mekada, E. *et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J.* 13, 2322–2330 (1994).
75. Mitamura, T. *et al.* Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 272, 27084–27090 (1997).
76. Chatterjee, N. *et al.* Potential toxicity of differential functionalized multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) in human cell line (BEAS2B) and caenorhabditis elegans. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 77, 1399–1408 (2014).
77. Chatterjee, N. *et al.* Screening of toxic potential of graphene family nanomaterials using in vitro and alternative in vivo toxicity testing systems. *Environ. Health Toxicol.* 30, e2015007 (2015).
78. Ma, H., Bertsch, P. M., Glenn, T. C., Kabengi, N. J. & Williams, P. L. Toxicity of manufactured zinc oxide nanoparticles in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1324–1330 (2009).
79. Wu, Q. *et al.* Quantum dots exposure alters both development and function of D-type GABAergic motor neurons in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Res. (Camb)*. (2014). doi:10.1039/c4tx00207e
80. Wang, D. Y. & Wang, Y. Phenotypic and behavioral defects caused by barium exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 447–453 (2008).

81. B. U. K., Laemmli. Cleavage Of Structural Proteins During Assembly Of Head Of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
82. Chalikian, T. V., Totrov, M., Abagyan, R. & Breslauer, K. J. The hydration of globular proteins as derived from volume and compressibility measurements: Cross correlating thermodynamic and structural data. *J. Mol. Biol.* 260, 588–603 (1996).
83. Adamiano, A., Lesci, I. G., Fabbri, D. & Roveri, N. Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic Fe-doped geomimetic chrysotile. *J. R. Soc. Interface* 12, (2015).
84. Lidorr Chemicals Ltd.
<http://www.lidorr.com/uploads/dbsattachedfiles/baytubeseminartechncalpresentation2010.pdf>
85. Silge, A. *et al.* Raman spectroscopy-based identification of toxoid vaccine products. *npj Vaccines* 3, (2018).
86. Unlu, A. Aktin ve aktin bağlayan proteinlerin etkileşimlerinin homoloji modeli modellemesi ile incelenmesi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Doktora Tezi (2011).
87. Hay, D. Carbon nanotube market size, share and forecast- detailed research study 2019-2025, Market Research (2019).
88. Manzetti, S. Molecular and crystal assembly inside the carbon nanotube: Encapsulation and manufacturing approaches. *Adv. Manuf.* 1, 198–210 (2013).
89. Zeinabad, H. A., Zarrabian, A., Saboury, A. A., Alizadeh, A. M. O. & Falahati, M. Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: Tau protein and PC12 cells as targets. *Sci. Rep.* 6, (2016).
90. Kavosi, A. *et al.* The toxicity and therapeutic effects of single-and multi-wall carbon nanotubes on mice breast cancer. *Sci. Rep.* 8, (2018).
91. Somani, P. & Umeno, M. Importance of Transmission Electron Microscopy for Carbon Nanomaterials Research. *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.* 634–642 (2007).
92. Tsai, H. C., Lin, J. Y., Maryani, F., Huang, C. C. & Imae, T. Drug-loading capacity and nuclear targeting of multiwalled carbon nanotubes grafted with anionic amphiphilic copolymers. *Int. J. Nanomedicine* 8, 4427–4440 (2013).
93. Pinillos-Madrid, J. F. & Gallardo, C. Carbon nanotubes: A viable drug delivery platform for the treatment of cancer. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5, 143–152 (2015).

94. Dinc, B., Unlu, A., Bektas M. Carbon Nanotubes: Synthesis, Functionalization, Characterization, Toxicity Researches. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 4:10, (2018).
95. Taklimi, S. R., Ghazinezami, A. & Askari, D. Chemical Functionalization of Helical Carbon Nanotubes: Influence of Sonication Time and Concentrations of Sulfuric and Nitric Acids with 3 : 1 Mixing Ratio. *J. Nanomater.* 2019, 1–10 (2019).
96. Sahebian, S., Zebarjad, S. M., vahdati Khaki, J. & Lazzeri, A. A study on the dependence of structure of multi-walled carbon nanotubes on acid treatment. *J. Nanostructure Chem.* 5, 287–293 (2015).
97. Zhao, X., Liu, R., Chi, Z., Teng, Y. & Qin, P. New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. *J. Phys. Chem. B* 114, 5625–5631 (2010).
98. Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, E., Rai, B. & Mielczarski, J. A. Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir* 25, 11614–11620 (2009).
99. Du, P., Zhao, J., Mashayekhi, H. & Xing, B. Adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on functionalized carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. C* 118, 22249–22257 (2014).
100. Mu, Q. *et al.* Protein binding by functionalized multiwalled carbon nanotubes is governed by the surface chemistry of both parties and the nanotube diameter. *J. Phys. Chem. C* 112, 3300–3307 (2008).
101. Lanz-Landázuri, A., Martínez De Ilarduya, A., García-Alvarez, M. & Muñoz-Guerra, S. Poly(β ,L-malic acid)/Doxorubicin ionic complex: A pH-dependent delivery system. *React. Funct. Polym.* 81, 45–53 (2014).
102. Seredych, M., Mikhalovska, L., Mikhalovsky, S. & Gogotsi, Y. Adsorption of Bovine Serum Albumin on Carbon-Based Materials. *C* 4, 3 (2018).
103. Yu, Y., Kong, L., Li, L., Li, N. & Yan, P. Antitumor Activity of Doxorubicin-Loaded Carbon Nanotubes Incorporated Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Electrospun Composite Nanofibers. *Nanoscale Res. Lett.* 10, (2015).
104. Bai, W., Wu, Z., Mitra, S. & Brown, J. M. Effects of Multiwalled Carbon Nanotube Surface Modification and Purification on Bovine Serum Albumin Binding and Biological Responses. *J. Nanomater.* 2016, 1–10 (2016).

105. Kim, K. K. *et al.* Dependence of Raman spectra G' band intensity on metallicity of single-wall carbon nanotubes. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 76, (2007).
106. Thomsen, C. & Reich, S. Raman scattering in carbon nanotubes. *Top. Appl. Phys.* 108, 115–234 (2006).
107. Hou, P., Liu, C. & Cheng, H. Purification of carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 6, (2013).
108. Li, K. *et al.* Mulberry-like dual-drug complicated nanocarriers assembled with apogossypolone amphiphilic starch micelles and doxorubicin hyaluronic acid nanoparticles for tumor combination and targeted therapy. *Biomaterials* 39, 131–144 (2015).
109. Zheng, F., Wang, S., Shen, M., Zhu, M. & Shi, X. Antitumor efficacy of doxorubicin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite- poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Polym. Chem.* 4, 933–941 (2013).
110. Morgan, R. J. *et al.* High-dose infusional doxorubicin and cyclophosphamide: A feasibility study of tandem high-dose chemotherapy cycles without stem cell support. *Clin. Cancer Res.* 3, 2337–2345 (1997).
111. Chan, K. W. Y. *et al.* CEST-MRI detects metabolite levels altered by breast cancer cell aggressiveness and chemotherapy response. *NMR Biomed.* 29, 806–816 (2016).
112. Cheng, M., Rizwan, A., Jiang, L., Bhujwala, Z. M. & Glunde, K. Molecular Effects of Doxorubicin on Choline Metabolism in Breast Cancer. *Neoplasia (United States)* 19, 617–627 (2017).
113. Pilco-Ferreto, N. & Calaf, G. M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 49, 753–762 (2016).
114. Pichot, C. S. *et al.* Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 101, 38–47 (2009).
115. Sun, Z. *et al.* Application of dual targeting drug delivery system for the improvement of anti-glioma efficacy of doxorubicin. *Oncotarget* 8, (2017).
116. Abou El Hassan, M. A. I. *et al.* The new cardioprotector Monohydroxyethylrutoside protects against doxorubicin-induced inflammatory effects in vitro. *Br. J. Cancer* 89, 357–362 (2003).
117. Gezici, S. Anticancer, Antiproliferative, Lysosomal and Lactate Dehydrogenase Inhibitory Effects of Fruit Extracts from Sumac (*Rhus coriaria* L.) on Human Lung Cancer Cells. *Acta Oncol. Turc.* 52, 160–168 (2019).

118. Wang, H. *et al.* Self-Assembly Assisted Fabrication of Dextran-Based Nanohydrogels with Reduction-Cleavable Junctions for Applications as Efficient Drug Delivery Systems. *Sci. Rep.* 7, (2017).
119. Sarvestani, N. N., Sepehri, H., Delphi, L. & Farimani, M. M. Eupatorin and Salvigenin potentiate doxorubicin-induced apoptosis and cell cycle arrest in HT-29 and SW948 human colon cancer cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 19, 131–139 (2018).
120. Yang, G. *et al.* MicroRNA-522 reverses drug resistance of doxorubicin-induced HT29 colon cancer cell by targeting ABCB5. *Mol. Med. Rep.* 12, 3930–3936 (2015).
121. Miranda, J. P. *et al.* Towards an Extended Functional Hepatocyte In Vitro Culture. *Tissue Eng. Part C Methods* 15, 157–167 (2008).
122. Scott, C. W., Peters, M. F. & Dragan, Y. P. Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. *Toxicol. Lett.* 219, 49–58 (2013).
123. Hunt, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.* 37, 50–59 (2017).
124. Courtesy: Introduction to *C. elegans* anatomy, Handbook-Hermaphrodite; Erişim: 11.01.2019 <http://www.wormatlas.org>
125. Bocklitz, T. *et al.* Raman spectroscopy-based identification of toxoid vaccine products. *npj Vaccines* 3, (2018).
126. Hacıosmanoğlu, E., Varol, B., Edis, B. Ö. & Bektaş, M. Interleukin-1 β effect on the endogenous ADP-ribosylation and phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2. *Cytotechnology* 68, 2659–2666 (2016).
127. Lory, S., Carroll, S. F., Bernard, P. D. & Collier, R. J. Ligand interactions of diphtheria toxin. I. Binding and hydrolysis of NAD. *J. Biol. Chem.* 255, 12011–12015 (1980).
128. Qiao, J., Ghani, K. & Caruso, M. Diphtheria toxin mutant CRM197 is an inhibitor of protein synthesis that induces cellular toxicity. *Toxicon* 51, 473–477 (2008).
129. Ravi Singh, *et al.* Binding and Condensation of Plasmid DNA onto Functionalized Carbon Nanotubes: Toward the Construction of Nanotube-Based Gene Delivery Vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 4388–4396 (2005). doi:10.1021/JA0441561

HAM VERİLER

ETİK KURUL KARARI

C.Elegans deneyleri için etik kurul izni gerekmemektedir.



PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Fonksiyonel Hale Getirilmiş ve Protein Bağlanmış Karbon Nano Tüplerin Biyolojik Ortamda Araştırılması

ORIJİNALLIK RAPORU

% 4	% 2	% 1	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
2	link.springer.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	www.jove.com İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Batman University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	nardus.mpn.gov.rs İnternet Kaynağı	<% 1
7	bio-protocol.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Higher Education Commission Pakistan Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Bircan	Soyadı	Dinç
Doğ.Yeri	Sinop	Doğ.Tar.	01.09.1985
Uyruğu	TC	TC Kim No	19517693360
Email	dincbircan@gmail.com	Tel	5065981238

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	2019
Yük.Lis.	İstanbul Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2009
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2007
Lise	Beşiktaş Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretmen	Kavram Dershanesi	2007-2009
2.	Laser ürün sorumlusu	Optik medikal	2009-2011
3.	Öğretim görevlisi	Altınbaş Üniversitesi	2012-2019

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	93	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
C	İyi
MATLAB	İyi
Schrodinger	Orta
MS Office	Çok iyi
MATHEMATICA	İyi
PS	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

2017 Ulusal Kongre Bildiriler:

1. Sağlık Bilimleri Eğitim Araştırma ve Uygulamalarında Güncel Yönelimler Kongresi
A.Unlu, B.Dinc, K.A. Önsü, M.Bektaş

Karbon Nanotüplere Kanser İlacı Bağlanması ve Taşınması

2. Association of Thrace Universities 1st International Health Sciences Congress
The Effect of Doxorubicin on Breast Cancer Cell Line and Human Vein Endothelial Cells

B.Dinc, A.Unlu, M.Bektas, T.Sipahi

3. Association of Thrace Universities 1st International Health Sciences Congress
Comparison of MTT and Xcelligence Experiments of Carbon Nanotubes on Healthy and Cancer Cell Lines

2017 Uluslararası Kongre Bildiriler

1. 5th International BAU Drug Design Congress
In Vitro Cytotoxicity of Multiwalled Carbon Nanotubes as Protein Nanocarriers
A. Unlu, B. Dinç, M.P. Meran, N. Karatepe, M. Bektaş

2017 Ulusal Kongre Poster Sunumu:

1. Novel PARP-2 Inhibitor Scaffolds Developed by Dynamic Structure Based Pharmacophore Approach
M.Meran, B.Dinc, A.Unlu, M.Budak, T. Sipahi
Association of Thrace Universities 1st International Health Sciences Congress
2. Design of High Affinity PARP-10 Inhibitors Developed by Dynamic Structure Based Pharmacophore Approach
K.A. Onsu, B.Dinc, A.Unlu, M.Budak, F.Dallar, M.Bektas, T.Sipahi
Association of Thrace Universities 1st International Health Sciences Congress
4. 18. Ulusal Biyofizik Kongresi
Paralel Plakalı Akış Çemberi ile Yapışan Hücrelerin Sıvı Kayma Gerilimine Maruz Bırakılarak Tümör Nekroz Faktör-Alfa Etkisinin İncelenmesi
B. Dinc , A. Ünlü , R. Nurten

2017 Uluslararası Kongre Poster Sunumu:

1. 19th IUPAB and 11th EBSA Congress
Identifying the Interaction Site of Poly ADP-ribose Polymerase-4 with NAD Using Molecular Dynamics
2. 5th International BAU Drug Design Congress
Design of High-affinity PARP-2 Inhibitors by Dynamic Structure-Based Pharmacophore Approach
M.Meran, B.Dinc, A.Unlu

2017 Kongre Düzenleme Kurulunda yer alma:

Association of Thrace Universities 1st International Health Sciences Congress,
Organizing Committee

2017 Yayınlar:

1. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines
L Türker Şener, G Albeniz, B Dinç, I Albeniz
Experimental and therapeutic medicine 14 (3), 1866-1870
2. Cytotoxicity of doxorubicin loaded single-walled carbon nanotubes
A Ünlü, M Meran, B Dinc, N Karatepe, M Bektaş, FS Güner

Molecular Biology Reports, 1-9

2018 Uluslararası Kongre Bildiriler

1. 6th International BAU Drug Design Congress
Cellular Uptake of Multi Wall Carbon Nanotubes, Protein Loading and Drug Loading Qualification
A.Unlu, B.Dinc, M.Bektas
2. 30. International Annual Biophysics Congress
Characterization short length multi 116all carbon nanotubes and toxicity on caernohabditis elegans
B. Dinç, E.Şen, K.A. Önsü, A. Ünlü, M. Bektaş

2018 Yayınlar

1. Carbon Nanotubes: Synthesis, Functionalization, Characterization, Toxicity Researches,
B Dinc, A Unlu, M Bektaş
International Journal of Scientific and Technological Research 4 (10)

2019 Yayınlar

Characterization of Short Length Multi Walled Carbon Nanotubes and Cytotoxicity on MDA-MB-231 and HUVEC Cell Lines, Carbon Letters, Dinç B, Ünlü A, Bektaş M.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Metal müzik dinleme, amatör fotoğrafçılık, yüzme