



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TOPOİZOMERAZ I İNHİBİTÖRÜ KAMPTOTESİN'İN AuFe
NANOPARÇACIKLARA KONJUGASYONU,
RADYOİYODİNASYONU VE KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİ**

Özge TEKİN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 622.02.01

Sunuş Tarihi : 30.01.2015

Bornova-İZMİR

2015

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TOPOİZOMERAZ I İNHİBİTÖRÜ KAMPTOTESİN'İN
AuFe NANOPARÇACIKLARA KONJUGASYONU,
RADYOİYODİNASYONU VE KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİ**

Özge TEKİN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 622.02.01

Sunuş Tarihi : 30.01.2015

Bornova-İZMİR

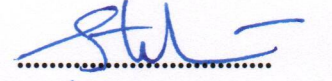
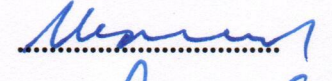
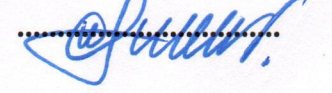
2015

Özge TEKİN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Topoizomerez I İnhibitörü Kamptotesin’in AuFe Nanoparçacıklara Konjugasyonu, Radyoiyodinasyonu ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkinliği” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 30.01.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Serap TEKSÖZ
Raportör Üye : Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE
Üye : Doç. Dr. Uğur AVCIBAŞI

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Topoizomeraz I İnhibitörü Kamptotesin’in AuFe Nanoparçacıklara Konjugasyonu, Radyoiyodinasyonu ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkinliği” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30/ 01 / 2015

Özge TEKİN

ÖZET

**TOPOİZOMERAZ I İNHİBİTÖRÜ KAMPTOTESİN’İN AuFe
NANOPARÇACIKLARA KONJUGASYONU,
RADYOİYODİNASYONU VE KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİ**

TEKİN, Özge

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE

Ocak 2015, 94 Sayfa

Topoizomerazlar; DNA’nın topolojisinde görülen, DNA’nın çoğaltılması ve şekil verilmesi işlemlerinden sorumlu izomeraz enzimleridir. Antitümör etkisi gösteren Kamptotesin ile topoizomeraz I inhibisyonu gerçekleşerek, kontrolsüz bölünmeye programlanmış tümör hücrelerinin çoğalmasının durdurulabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu düşünceyi destekler niteliktedir.

Yapılan bu tez kapsamında, topoizomeraz I inhibitörü Kamptotesin mikroemülsiyon yöntemi ile sentezlenen manyetik AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilmiştir. Konjugasyon sonrasında manyetik özellik kazanan Kamptotesin’in manyetik alan yardımıyla tümörlü bölgeye yönlendirilerek hedef bölgede daha fazla tutulması ve bu şekilde ilacın sağlıklı hücreler üzerindeki toksisitesinin ve hasta dozunun azaltılması amaçlanmaktadır. Sentezlenen AuFe nanoparçacıklarının karakterizasyonu TEM ve VSM analizleri yapılmış, ortalama parçacık boyutunu $5,25 \pm 0,92$ nm, manyetizasyon değeri 5.3 emu/g olarak tespit edilmiştir. Sisteamin hidroklorür ve CDI (1,1’-karbonildiimidazol) ara molekülleri ile Kamptotesin’in AuFe nanoparçacıklarına konjugasyonu yapılmış ve konjugasyon verimi HPLC yöntemiyle %97,6 olarak bulunmuştur.

İodojen yöntemi ile Kamptotesin ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin’in ^{131}I ile radyoiyodinasyonu gerçekleştirilmiş ve TLRC, kağıt elektroforezi, lipofilite, stabilite çalışmaları ile kalite kontrol çalışmaları

tamamlanmıştır. TLRC yöntemi ile Kamptotesin'in işaretleme verimi % $98,00 \pm 2,49$, AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in işaretleme verimi % $97,75 \pm 1,50$ olarak bulunmuştur. ^{131}I işaretli Kamptotesin'in negatif yüklü, AuFe nanoparçacıklarla konjuge Kamptotesin'in ise nötr olduğu kağıt elektroforezi yöntemiyle tespit edilmiştir. Lipofilite tayini sonucunda Kamptotesin'in lipofilik özellik sergilediği görülmüştür.

Kamptotesin ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in *in vitro* olarak incelenmesi MCF7 ve HeLa hücre hatları kullanılarak yapılmıştır. WST-8 testi kullanılarak IC_{50} değerleri tespit edilmiştir. MCF7 ve HeLa hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri Kamptotesin için sırasıyla $8,50 \mu\text{g/mL}$ ve $12,73 \mu\text{g/mL}$, AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin için sırasıyla $7,35 \mu\text{g/mL}$ ve $10,35 \mu\text{g/mL}$ 'dir. İnkorporasyon çalışmasında manyetik alan uygulanan AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in daha yüksek bir tutulum gösterdiği görülmüştür. Örneklerin HeLa hücre hattında, MCF7 hücre hattına oranla proliferasyon hızını düşürücü etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kamptotesin'in her iki hücre hattında da herhangi bir apoptotik etkisi gözlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlar AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in terapi etkinliğinin araştırılmaya devam etmesi açısından umut verici görünmektedir.

Anahtar sözcükler: Topoizomeraz I, Kamptotesin, AuFe nanoparçacıklar, ^{131}I , manyetik ilaç hedefleme

ABSTRACT**RADIOIODINATION OF AuFe NANOPARTICLE CONJUGATED
TOPOISOMERASE I INHIBITOR CAMPTOTHECINE AND
EVALUATION OF IT'S EFFICACY ON CANCEROUS CELLS**

TEKİN, Özge

MSc Thesis, Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emin İlker MEDİNE

January 2015, 94 pages

Topoisomerases are isomer enzymes that can be identified by effecting DNA topology in the DNA replication and transcription manner. It's have been showed that antiproliferative effect of Camptothecin can be used for decreasing proliferation rate of cancer cells by inhibition of topoisomerase I.

In this study, topoisomerase I inhibitor Camptothecin was loaded on magnetic AuFe nanoparticles which synthesized by microemulsion method. Targeted drug delivery using external magnetic field enhances the chemotherapeutic potential of Camptothecin. Thus, effect of Camptothecin on healthy tissues may be prevented during therapy. Characterization of AuFe nanoparticles was utilized by TEM and VSM techniques. Average particle size was determined as $5,25 \pm 0.92$ nm and magnetic saturation was observed on 5.3 emu/g. Cysteamine hydrochloride and CDI (1,1'-carbonyldiimidazole) were used as linker molecules in conjugation studies. Conjugation yield was 97,6% as obtained from HPLC analysis.

Iodination of Camptothecin and Camptothecin conjugated AuFe nanoparticles with ^{131}I were performed by the iodogen method. Radiolabeling

yield obtained from TLRC studies for Camptothecin and AuFe-CMP was $98.00\% \pm 2.49$ and $97.75\% \pm 1.50$, respectively.

Therapeutic efficiency of Camptothecin and Camptothecin conjugated AuFe nanoparticles were investigated on MCF7 and HeLa cell lines. IC_{50} values are determined by WST-8 test. IC_{50} values of Camptothecin for MCF7 and HeLa cell lines were calculated as $8.50 \mu\text{g/mL}$ and $12.73 \mu\text{g/mL}$ respectively, while $7.35 \mu\text{g/mL}$ and $10.35 \mu\text{g/mL}$ for Camptothecin conjugated AuFe nanoparticles. Effect of magnetic field on incorporation ratio was showed. Camptothecin was reduced proliferation rate of HeLa cells relatively more than MCF7 cell line.

All these results obtained shows that Camptothecin conjugated AuFe nanoparticles are promising therapeutic agent for cancer treatment.

Keywords: Topoisomerase I, Camptothecin, AuFe nanoparticles, ^{131}I , magnetic drug targeting

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecinde yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, kıymetli fikirlerinden ve bakış açısından yararlandığım, maddi ve manevi her türlü katkıyı sunan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Emin İlker Medine'ye, derslerinde nükleer kimya alanındaki sonsuz bilgi ve deneyimlerinden faydalanarak çok yol katetmemi sağlayan ve enstitü laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sunan Nükleer Uygulamalar Ana Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Perihan Ünak'a, çalışmalarım esnasında bıkmadan usanmadan bana her konuda yardımcı olan manevi desteğini her an hissettiğim Ar. Gör. Özge Kozguş Güldü'ye, gerek laboratuvar çalışmaları boyunca gerekse tez yazım süresince bana en büyük desteği ve yardımı sağlayan sevgili arkadaşlarım Gökhan Takan ve Gökem Yıldız'a, Nükleer Uygulamalar Ana Bilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlileri ve arkadaşlarıma; teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kanser	4
2.2 Kanser Sıklığı ve Yaygınlığı	5
2.3 Kanser Tedavi Yöntemleri.....	6
2.3.1 Alternatif tıp yöntemleri	8
2.3.2 Cerrahi yöntem	8
2.3.3 Radyoterapi.....	6
2.3.4 Kemoterapi	10
2.4 Nanoteknoloji	11

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.1 Manyetik kontrollü ilaç hedefleme	13
2.4.2 Demir nanoparçacıklar	14
2.4.3 Altın nanoparçacıklar	16
2.4.4 AuFe nanoparçacıklar	17
2.5 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler.....	19
2.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi yöntemi (TLRC)	19
2.5.2 Kağıt elektroforezi	20
2.5.3 Lipofilite.....	21
2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	21
2.6.1 SEM	21
2.6.2 TEM	22
2.6.3 X-ışını kırınım yöntemi	22
2.6.4 VSM.....	23
2.7 Radyoaktif İyot İzotopları.....	24
2.7.1 ¹³¹ I	24

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7.2 ^{125}I	25
2.7.3 ^{123}I	26
2.7.4 İyot radyoizotoplarının kullanım alanları	26
2.8 Kamptotesin	27
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	33
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	33
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	34
3.2 AuFe Nanoparçacıkların Sentezi	36
3.2.1 AuFe nanoparçacıklarda yüzey modifikasyonu.....	37
3.2.2 AuFe nanoparçacıklara Kamptotesin'in konjugasyonu.....	37
3.2.3 Kamptotesin'in nanoparçacıklara bağlanma veriminin belirlenmesi	37
3.2.4 Manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi.....	38
3.2.5 Yapısal analiz çalışmaları	39
3.3 ^{131}I ile İşaretleme Çalışmaları.....	40

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3.1 İodojen yöntemi	40
3.3.2 Kamp ve AuFe-Kamp'ın ¹³¹ I ile işaretlemesi	41
3.3.2.1 Kamp'ın ¹³¹ I ile işaretlenmesi	41
3.3.2.2 AuFe-Kamp'ın ¹³¹ I ile işaretlenmesi	41
3.4 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler	41
3.4.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi	41
3.4.2 Kağıt elektroforezi yöntemi	42
3.4.3 Lipofilite tayini	43
3.4.4 Stabilite tayini	43
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları	43
3.5.1 Sitotoksosite çalışmaları	45
3.5.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişiminin incelenmesi	46
3.5.3 Proliferasyon çalışmaları.....	47
3.5.4 Hücre migrasyon çalışmaları	48
3.5.5 Apoptosis çalışmaları.....	48

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.5.6 İstatistik Analizler.....	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	50
4.1 AuFe Nanoparçacıkların Özelliklerinin İncelenmesi	50
4.1.1 SEM analiz sonuçları.....	50
4.1.2 TEM analiz sonuçları.....	51
4.1.3 DLS analiz sonuçları.....	53
4.1.4 EDX analiz sonuçları.....	54
4.1.5 XRD analiz sonuçları.....	55
4.1.5 VSM analiz sonuçları	56
4.2 Kamptotesin'in AuFe Nanoparçacıkları İle Konjugasyon Verimi	56
4.3 Yapısal Analiz Çalışmaları	58
4.3.1 FTIR sonuçları.....	58
4.4 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları	60
4.4.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar	60
4.4.2 Kağıt elektroforezi yöntemi ile elde edilen sonuçlar	64
4.4.3 Lipofilite sonuçları.....	66

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4.4 Stabilité sonuçları.....	66
4.5 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları.....	66
4.5.1 Sitotoksité sonuçları	66
4.5.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi sonuçları	70
4.5.3 Proliferasyon sonuçları	73
4.5.4 Hücre migrasyonu sonuçları	74
4.5.5 Apoptosis sonuçları.....	78
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR DİZİNİ	84
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hücresel yüzey karakterizasyonu	5
2.2 Kanser safhaları	7
2.3 Nanoparçacıklarla konjuge edilen kemoterapi ajanının damardan enjekte edildiğinde tümörlü bölgede toplanmasının şemasal gösterimi	13
2.4 Nano partiküllere ait elektron mikroskobu görüntüsü	16
2.5 Kağıt elektroforezi deney düzeneği	20
2.6 ^{131}I 'in bozunum şeması	24
2.7 ^{125}I 'in bozunum şeması	26
2.8 Kamptotesin'in yapısal gösterimi	28
2.9 Kamptotesin aktivasyon mekanizmasını belirleyen birincil ve ikincil olaylar	29
2.10 Kamptotesin'in G1 hücrelerinde tutularak apoptozu engellemesinin şemasal gösterimi	30
2.11 Topoizomerase enzimi (TOPİ) varlığında DNA hasarının oluşumu.	31
3.1 İodojen'in moleküler yapısı.	40
3.2 MCF7 ve HeLa hücre hatlarının inkübasyonu.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.3 MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmaları.	45
3.4 MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması.	47
4.1 AuFe nanoparçacıklarının SEM görüntüsü	51
4.2 AuFe nanoparçacıklarının TEM görüntüleri	52
4.3 AuFe nanoparçacıkların boyut histogramı	53
4.4 AuFe nanoparçacıklarının boyut dağılımı analizi	53
4.5 AuFe nanoparçacıklarının EDX diagramları	54
4.6 AuFe nanoparçacıklarının XRD analizi difraktogramı	55
4.7 AuFe nanoparçacıklarının VSM diagramı	56
4.8 Kamptotesin'in farklı konsantrasyonlarına ait kromatogram	57
4.9 AuFe-Kamp'ın açık yapısı	58
4.10 AuFe-Kamp ve AuFe nanoparçacıklarının FT-IR spektrumu	59
4.11 TLRC-1 banyosundaki ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kromatogramlar	62
4.12 TLRC-2 banyosundaki ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kromatogramlar	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13 TLRC-3 banyosundaki ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kromatogramlar	64
4.14 TLRC-2 banyo çözeltisinde ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kağıt elektroforezi kromatogramları	65
4.15 ^{131}I -Kamp (a), ^{131}I -AuFe-Kamp (b) ait stabilite çalışması kromatogramları	67
4.16 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında Kamp'ın konsantrasyon ve zamana bağlı % canlılık değerleri	68
4.17 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında Kamp'ın konsantrasyon ve zamana bağlı % canlılık değerleri	69
4.18 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında AuFe-Kamp'ın konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri	69
4.19 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında ^{131}I -Kamp, ^{131}I -AuFe-Kamp, ^{131}I -MA-AuFe-Kamp ve ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	72
4.20 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında ^{131}I -Kamp, ^{131}I -AuFe-Kamp, ^{131}I -MA-AuFe-Kamp, ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin değişimi.....	72
4.21 MCF7 ve HeLa hücrelerinde Kamp ve AuFe-Kamp'ın proliferasyon hızına etkisi	73
4.22 MCF7 hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu görüntüleri	75
4.23 HeLa hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu görüntüleri.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

4.24 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında hücre migrasyonu değerleri.....77

4.25 MCF7 hücre hattında Kamp (a) ve AuFe-Kamp'ın (b) apoptotik etkisi.....78

4.26 HeLa hücre hattında Kamp (a) ve AuFe-Kamp'ın (b) apoptotik etkisi 79

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 HPLC yönteminde kullanılan kromatografik koşullar	38
4.1 AuFe nanoparçacıklarının elementel bileşenlerinin atomik ve ağırlıkça yüzdeleri	54
4.2 AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in FTIR incelemesi	58
4.3 ^{131}I ile işaretli örneklerin TLRC yöntemi ile elde edilen R_f değerleri	61
4.4 ^{131}I ile işaretli örneklerin işaretlenme verimleri	64
4.5 Kamp ve AuFe-Kamp'ın IC_{50} değerleri	70
4.6 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında ^{131}I -Kamp, ^{131}I -AuFe-Kamp, ^{131}I -MA-AuFe Kamp ve ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi	71
4.7 MCF7 ve HeLa hücre hatlarındaki % hücre migrasyonu değerleri	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TLRC	İnce Tabaka Radyokromatografi Yöntemi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
R _t	Alıkonma Süresi
R _f	Alıkonma Mesafesi
SEM	Scanning Electron Microscopy
TEM	Transmission Electron Microscopy
VSM	Vibrating Sample Magnetometer
EDX	Energy-dispersive X-ray Spectroscopy
XRD	X-ray Diffraction
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
DLS	Dynamic Light Scattering
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
M _r	Doyum Manyetizasyonu
M _s	Kalıcı Manyetizasyon
MTT	Cell Sensivity Assay
keV	Kilo Elektron Volt

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

TOPI	Topoizomeraz Enzimi
SAR	Specific Absorbtion Rate
PBS	Fetal Bovine Serum
ACD	Advanced Chemistry Development
CCD	Charge Coupled Device
AuFe	Hibrid altın demir nanoparçacıklar
AuFe-Kamp	Altın demir nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin
MA-AuFe-Kamp	Manyetik alan uygulanmış Kamptotesin konjuge demir altın nanoparçacık

1.GİRİŞ

Topoizomeraz enzim inhibitörleri, topoizomeraz tip 1 ve topoizomeraz tip 2 olmak üzere iki çeşittir ve DNA'nın topolojisinde görülen bir izomeraz enzimidir. Tip 1 topoizomeraz DNA'nın tek bir zincirini kırar ve kırılan zinciri diğer zincirin üzerinden atlatarak birleştirir. Tip 2 topoizomeraz ise DNA'nın iki zincirini birden kırmasını takiben zinciri son derece şuurulu işlemlerle döndürerek tekrar birleştirir. Bu enzimler ilk olarak Harward Üniversitesi Profesörü James C. Wang tarafından keşfedilmiştir (Innocenti F. et.al., 2004; Chen A.Y. and Liu L.F., 1994). DNA'nın çift sarmallı yapısı onu zor ayrıştırılır kılmaktadır. Aynı şekilde birçok enzim de ayrıştırma sırasında DNA'nın gen yapısında hasarlar oluşturabilmektedir. Topoizomerazlar, DNA yapısına uygun enzimlerdir. DNA'nın dönme sayısını değiştirme yeteneklerinden dolayı hücre için çok kritik olan DNA'nın çoğaltılması işlemi ve paketlenerek şekil verilmesi işlemi mümkün olmaktadır. Son yıllarda topoizomeraz enzimleri kanserin kemoterapi ile tedavisinde oldukça büyük önem kazanmıştır (De Jong F.A. et.al., 2006). Hücre çoğalmasında etkili olan topoizomeraz enzimlerinin, DNA küçük oluğundaki özgül dizilere bağlanarak antitümör etkisi gösteren ilaçlar tarafından inhibisyonu ile kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabileceği düşünülmektedir (Pindur ve Lemstel, 1998). Giderek artan çeşitlilikteki topoizomeraz inhibitörleri, antitümör özelliğe sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmuştur (Pometsil ve Kahn, 1991; Ralph et.al., 1994; Osheroff, 2003)

Topoizomeraz 1; DNA'nın replikasyon sürecinde bir zincirini keserek ve bunun hemen ardından tekrar o zincire bağlanarak çözülmesine ve yeniden sarılmasına yardım eden enzimi inhibe eder. Aktif sitotoksik metaboliti 7-etil-10-hidroksil-kamptotesin (SN-38)'e karboksil esteraz enzimi ile dönüşür, Topoizomeraz 1 inhibitörü olan da aslında bu aktif metabolittir (Asmis T.R. et al., 2008; Cunningham et al. 2001; Vanhoefer et al., 2001). İnsan topoizomeraz 1 enziminin son kristalografik ve moleküler modelleme çalışmaları, Kamptotesin'e karşı oluşan hücresel duyarlılığın, enzimin ortamdaki seviyesine bağlı olduğunu göstermiştir. Topoizomeraz 1'in sekans özgüllüğü olmamasına rağmen, Kamptotesin genellikle kesik zincirin +1 pozisyonundaki G rezidusuna ilgi gösterir ve DNA dubleksinden 1+G rezidusunu uzaklaştırarak kesimden sonra

enzimin DNA ile yeniden birleşmesini engellemis olur. Kamptotesin'nin DNA ve topoizomeraz 1 ile etkileşimini açıklayan mekanizma “ilaç yığılım mekanizması” olarak adlandırılır (Fan et.al., 1998; Stewart et.al., 1998). Bu mekanizmaya göre bir topoizomeraz 1 molekülü ile bir Kamptotesin molekülünün bileşimi her zaman bir DNA kırığı ile sonuçlanmaktadır. Bu durum her bir topoizomeraz 1 molekülü için DNA kırığı potansiyelinin olması nedeni ile hücrelerin Kamptotesin'in yüksek seviyesine bağlı olduğunun kanıtı olma özelliğini taşımaktadır (Strumberg et.al., 2000).

Kanser tedavisinde başvurulanan yöntemler arasında gerek cerrahi yöntemi destekleyici olarak gerekse başlı başına tedavi amacıyla kullanılması bakımından büyük öneme sahip olan kemoterapinin, başarılı olabilmesi için belki de en önemli parametre tümörlü bölgede maksimum, sağlıklı hücrelerde ise minimum konsantrasyonun sağlanabilmesidir.

Manyetik kontrollü ilaç hedefleme yöntemi ile tümörlü bölgedeki antikanser ajanın konsantrasyonunu maksimum seviyeye ulaştırmak mümkündür. Bunun yanı sıra sağlıklı hücrelere olan tahribat da minimum seviyeye indirilebilmektedir. Bu avantajdan dolayı son yıllarda manyetik kontrollü ilaç hedefleme yöntemi ile ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu yöntem kemoterapinin dezavantajları ile ihtiyaç duyulan doz miktarının azaltılması bakımından kanser tedavisine yepyeni bir ışık tutmaktadır (Chunfu et.al., 2004; Halefi, 2004).

Bu tez kapsamında mikroemülsiyon yöntemi kullanılarak manyetik özellikteki demir oksit (Fe_3O_4) çekirdeklerinin etrafı altın ile kaplanarak manyetik özelliğini koruyan altın kaplı demir (AuFe) nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Bu nanoparçacıkların karakterizasyonu için; SEM (Scanning Electron Microscopy), TEM (Transmission Electron Microscopy), EDX (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy), XRD (X-ray Diffraction), VSM (Vibrating Sample Magnetometer) ve DLS (Dynamic Light Scattering) analizleri yapılmıştır. Sisteamin hidroklorür ve 1,1 karbonildiimidazol (CDI) ara molekülleri kullanılarak Kamptotesin ile AuFe nanoparçacıklarının konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilen Kamptotesin'in (AuFe-Kamp) bağ yapıları FT-IR (fourier transform infrared spectroscopy) analizi ile incelenmiştir. Yapılan bu konjugasyonun verimini tayin etmek amacı ile Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

kullanılmıştır. AuFe-Kamp iodojen yöntemi kullanılarak ^{131}I ile işaretlenmiş ve TLRC (Thin Layer Radio Chromatography) yöntemi ile kalite kontrolü sağlanmıştır. AuFe-Kamp'ın etkinliği MCF7 (insan meme adenokarsinoma epiteli) ve HeLa (insan serviks karsinoma epiteli) hücreleri üzerinde bağlanma etkinliği, proliferasyon hızı, hücre migrasyonu ve apoptosis çalışmalarıyla *in vitro* olarak incelenmiştir.

Yapılan bu tez çalışması ile Topoizomeraz 1 inhibitörü olan Kamptotesin'in AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilmesi ile manyetik özellik kazandırılarak kanser hücrelerinde manyetik alan altında hedeflenebilirliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

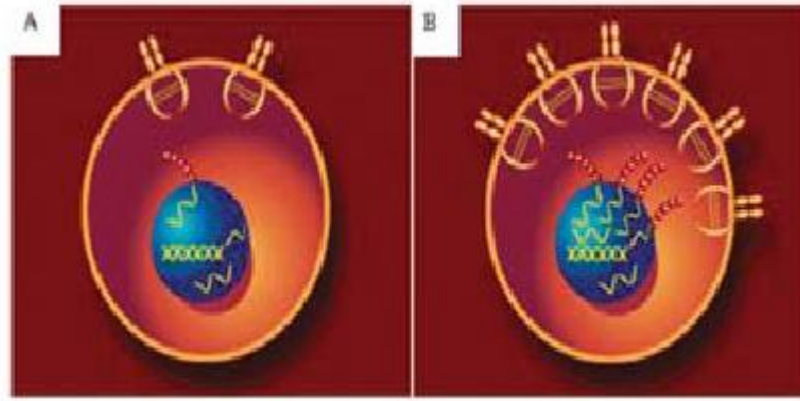
2.1 Kanser

Kanser, belirli genlerde bir takım etkilerle oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ve zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Bu bozukluk neticesinde hücre döngüsünün bozularak sürekli olarak yeni kanser hücrelerinin meydana gelmesi ve yok edilememesi ile karakterize bir hastalıktır (Cummings ve Klug, 2002).

Kanser; kontrolsüz büyüme ve anormal şekilde yayılım özelliği gösteren hastalıklar grubunu, çoğu zaman da ölümü ve yaşamı tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kanser, çoğu zaman ölümle yaşam üzerindeki kontrolün sınırlılığını sembolize eden kronik bir hastalıktır (Crane N., 2001). Kanser, gelişmiş ülkelerdeki istatistiklere göre, ölüme yol açan nedenler arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alırken, tüm ölümlerin % 22,3'ünden sorumlu tutulmaktadır. Türkiye'de ise %57,77 oranında görülmekte ve bildirilmeyen vakalar göz önüne alındığında, daha yüksek bir oranda olduğu tahmin edilmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2002).

Kanser oluştuğu dokuya bağlı olarak yüzden fazla çeşidi bulunan bir hastalık türüdür. Tümörlerinin ilk olarak başladığı organa bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Tümörler üç sınıfta incelenebilir. Bunlardan ilki benign tümörlerdir, herhangi bir dokuda oluşabilirler. Çevrelerindeki dokulardan bir zar ile izole durumda oldukları için çevre dokularda yayılım göstermezler ve metastaz yapma yetenekleri yoktur. İn situ tümörler ise; genellikle epitelyum dokularda oluşurlar. Bu tümörler morfolojik olarak malign tümörlere benzerler ancak epitelyum dokudan daha ileriye gidemezler. Çevre dokularla bir kapsül aracılığı ile ayrılmazlar dolayısıyla çevrelerindeki dokulara yayılırlar. Kan damarları ya da lenf damarları aracılığıyla uzaktaki dokulara metastaz yapma yetenekleri vardır. Bu nedenle, kanserli dokusunun erken safhadaki tanısı çok önemlidir. Ayrıca kanserli hücrelerin şeklinde ve hacminde değişim, hücre çekirdeğinde büyüme ve

yoğunluk artışı, mitototik aktivitede artış ve anormal mitoz ve kromozomların görülmesi gibi anormaliler de gözlenir (Ünak, 2009).



Şekil 2.1 Hücresel yüzey karakteristiği (a) sağlıklı hücre, (b) kanserli hücre.

Kanserin başlıca görüldüğü yerler, beyin ve omirilik, cilt, genital bölgeler, meme, sindirim sistemi, solunum yolları, karaciğer ve safra kesesi ve vücuttaki diğer organlardır.

2.2 Kanser Sıklığı ve Yaygınlığı

Son 30 yıldan beri, evrensel olarak kanserin bireysel ve toplumsal yükü üzerinde çalışan Uluslar Arası Kanser Araştırma Merkezi 2002 yılı için dünya çapında 10,9 milyon yeni vaka, 6,7 milyon ölüm ve 24,6 milyon kişinin kanser tanısı ile yaşamakta olduğunu tahmin edildiğini bildirilmiştir (Parkin DM et.al., 2006).

En çok görülen kanser tipleri, akciğer kanseri (1,3 milyon), meme kanseri (1,15 milyon) ve kolorektal kanserdir (1 milyon). Kanser ölümlerinin en yaygın nedenleri ise akciğer kanseri (1,8 milyon ölüm), mide kanseri (700.000 ölüm) ve karaciğer kanseridir (598.000 ölüm). Dünya Sağlık Örgütü (WHO- World Health Organization) ise 3 Nisan 2003 tarihindeki Dünya Kanser Raporu'nda 2020 yılına kadar yeni vaka görülme oranının % 50 artarak 15 milyon yeni vakaya ulaşabileceği bildirilmiştir. Dünyada en sık görülen kanser tipinin meme kanseri olduğunu tahmin edildiği bildirilmiştir (tanı sonrası 5 yıllık takiplerde 4,4 milyon) (Çerçel A., 2006; Tuğrul C., 2004).

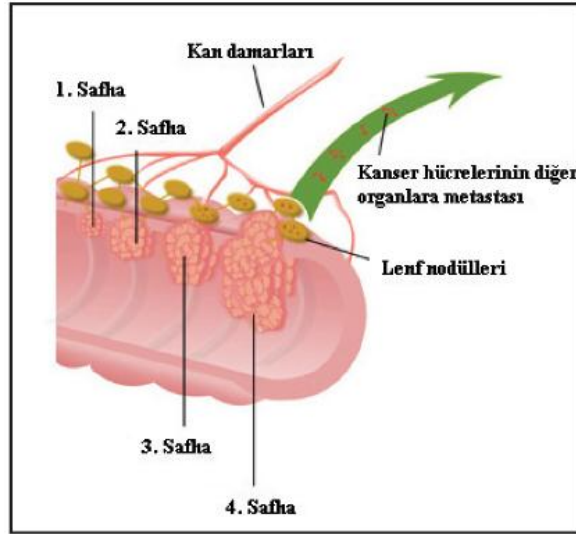
Ülkemizde Kanselerle Savaş Dairesi Başkanlığı 2002 yılı kanser verilerine göre % 23,89 oranı ile akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır. Kadınlarda en sık görülen kanser türü % 24,2 ile meme kanseridir. Bu kanser türünü sırasıyla barsak kanseri (% 9,3), mide kanseri (% 6,9), yumurtalık kanseri (% 5,9), akciğer kanseri (% 5,7) ve lösemi (% 5,4) izlemektedir. Uluslar Arası Kanser Araştırma Merkezi'nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre, erkeklerde en sık görülen kanser türleri arasında ilk sırayı % 33,8 ile akciğer kanseri almaktadır. Mide kanseri % 8,7 ile 2. sırada, mesane kanseri % 7,8 ile 3. sırada, barsak kanseri % 6,7 ile 4. sırada, gırtlak kanseri % 5,8 ile 5. sırada, prostat kanseri % 5,5 ile 6. sırada bulunmaktadır. Türkiye'de en sık ölüme yol açan kanser türleri ise erkeklerde sırasıyla; akciğer kanseri (% 40,2), mide kanseri (% 9,5), barsak kanseri (% 5,5) ve mesane kanseridir (% 5,4). Kadınlarda kanserden ölümlerde ise; meme kanseri (% 16,7) ile ilk sırada yer almaktadır. Meme kanserini % 9,3 ile barsak kanseri, % 9,1 ile mide kanseri ve % 8,7 ile akciğer kanseri izlemektedir (Kanselerle Savaş Dairesi Başkanlığı, 2008; Kanser Yüğü 2006 Raporu; Kadınlarda En Çok Görülen On Kanser Türü 1999, Sağlık Bakanlığı; Türkiye Kanser İstatistikleri, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, 2008).

2.3 Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağ kalımı arttırmak için birçok farklı tedavi modaliteleri uygulanmaktadır. Bunlar; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri olarak sayılabilir (Dellabona P. et. al., 1999; Terrero M.N., 2004).

Kanser hastalığı süreci dört safhadan oluşur. 1. ve 2. safha; kanserin malign tümöre dönüştüğü ve yayılmaya başladığı aşamadır. 1. safhada tümörlü yapı gelişir ve yavaş yavaş komşu dokuya doğru harekete geçer. 2. safhada tümör büyüse bile göreceli olarak hala küçüktür ve ancak yakın dokuları istilaya başlamıştır. 3. safhada kanserin kapladığı hacim giderek artar, tümör boyutu büyür ve organlara yayılım başlamıştır. 4. safhada kanser artık metastatik bir kanserdir ve pek çok doku ve organda gözlenir. Kanserli hücrelerin oluşturduğu

tümör yapılarına ne kadar erken seviyede tanı konursa tedavi yöntemi de o derece erken ve etkili olur (Tu et. al., 2002).



Şekil 2.2 Kanser safhaları

Kanser tedavisi için son yıllarda çok sayıda ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına karşın günümüzde ilerlemiş kanser vakalarında şifa sağlayıcı tedavi seçenekleri hemen hemen yok gibidir. Bu durum özellikle kanser gelişim sürecinin karmaşıklığı ve henüz aydınlatılması gereken çok sayıda noktaların olması ile kısmen açıklanabilir.

Kanser hücrelerinin otonomi, kontakt inhibasyon, apoptozi baskılama, anjiyogenez, ölümsüzlük, invazyon ve metastaz gibi bir takım temel özellikleri vardır (Akbulut H. ve Akbulut K.G., 2005). Bu özellikler arasından, anjiyogenez belki de üzerinde en çok çalışılanıdır.

Tümörler besinleri difüzyon yolu ile sağlayarak ancak 1-2 mm çapında küçük hücre popülasyonları şeklinde yaşamlarını sürdürebilirler. Difüzyon yolu ile beslenme daha büyük tümörlerin gelişimi ve bunun sonucunda klinik kanser hastalığı oluşturabilmeleri için yetersiz kalmaktadır. Tümörün büyümesi yeterli miktarda besin, oksijen, proteolitik enzim ve diğer gerekli elementleri sağlamak için tümör anjiyogenezi adı verilen süreçle yeni kan damarlarının oluşması gerekir (Tobelem, 2007).

Anjiyogenez, mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşması anlamına gelir (Ribatti D., 2004). Fizyolojik durumlarda; menstrüel siklus boyunca endometriyumda, yara iyileşmesi boyunca doku rejenerasyonu ya da onarımında, embriyogenez sırasında diferansiyasyon ve organ gelişimi için anjiyogenez limitli bir çevrilme ile devam eder (Werther et. al. 2000; Maharaj A.S.R. et. al. 2007). Fizyolojik durumlarda izlenen anjiyogenez organizmanın bütünlüğünün korunması ve dengenin devam etmesi açısından önem taşırken, tümörde izlenen anjiyogenez hastalığının ilerlemesi ve vücuda yayılmasında çok önemli rol oynamaktadır (Konukoğlu, 2005).

Kanser tedavisi dört yolla yapılmaktadır. Bunlar; alternatif tıp yöntemleri, cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapidir.

2.3.1 Alternatif tıp yöntemleri

Asıl tedaviye destek vermek amaçlı uygulanan ancak; güvenilirliği ve etkinliği deneylerle ispatlanmamış ön tıbbi yöntemlerdir. Doğrudan kanser tedavisini hedeflemez ancak; kanser ve kanser tedavilerinin yan etkilerini azaltmayı amaçlamaktadır.

2.3.2 Cerrahi yöntem

Kanserli doku ve çevresindeki tümörün yayılma ihtimali olan bir miktar sağlıklı doku alıp çıkarılır. Gerekli görüldüğü durumlarda diğer kanser tedavi yöntemleri ile desteklenmektedir.

2.3.3 Radyoterapi

Işın veya şua tedavisi olarak adlandırılan radyoterapi, yüksek enerjili parçacıkların hücre üzerinde yarattığı etkiden yararlanmayı esas alan bir tedavi biçimidir. Radyoterapi, tümör hücrelerinin iyonlaştırıcı radyasyonla yok edilmesi temeline dayanır. Kanser olgularında ameliyat öncesi, sonrası ya da kemoterapi beraberliğinde de uygulanabilir.

Radyoterapinin genel amacı; tanımlanmış tümör hacmine, tümörü çevreleyen sağlıklı dokuya en az zarar verecek şekilde, yüksek doğrulukla ölçülmüş radyasyon dozunu vermek ve bu sayede tümör içindeki hastalıklı hücrelerin çoğalmasını devamlı olarak durdurmak, tümörün yok olmasını sağlamak, hayat kalitesini arttırmak ve hastanın sağ kalımını uzatmaktır. Kısaca; çok fazla yan etkiye yol açmadan kanseri bölgesel olarak yok etmektir.

Radyasyon ya doğrudan DNA zincirlerini kırarak hücreyi hasara uğratar ya da içinden geçtiği ortamdaki suyu iyonlaştırarak bir tür hücre zehri etkisi gösteren hidroksil molekülleri ve peroksitleri oluşturarak dolaylı hasar oluşturur.

Tümör hücreleri normal hücrelerden çok daha hızlı bölündüğünden dolayı dirençleri düşer ve radyasyondan daha fazla etkilenirler ve kendilerinde meydana gelen hasarı tamir etmeye yönelmezler. Tedavi alanı içindeki normal hücreler de bu ışınlardan kötü etkilenmeler bile onların kendilerini onarma yetenekleri vardır. Dolayısıyla radyasyona bağlı normal doku hasarı genelde geçicidir. Muhtemel yan etkilerden olabildiğince kaçınmak amacı ile radyoterapide verilmesi hedeflenen doz, seanslara bölünerek verilir. Genellikle haftanın beş günü günde bir seans şeklinde uygulanır ve hafta sonu hastanın dinlenmesi hedeflenir. Böylece normal hücrelerin iyileşmesine de fırsat tanınmış olur.

Radyoterapide kullanılan radyasyonlar; elektromanyetik radyasyonlar (x ışınları ve gamma ışınları) ve parçacık şeklinde radyasyonlar (elektronlar, protonlar ve nötronlar) olmak üzere iki tiptir. Çevredeki dokulara en az zarar verme ilkesinden hareketle değişik radyoterapi teknikleri geliştirilmiştir. Günümüzde uygulanan üç ana yöntem mevcuttur bunlar;

- 1) Harici (Eksternal) Radyoterapi-Teleterapi
- 2) Dahili (İnternal) Radyoterapi-Brakiterapi
- 3) Sistemik Selektif Radyoterapi (Seyrek, 2007).

2.3.4 Kemoterapi

Kemoterapi kelimesi ilk olarak Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Bu tedavi yönteminde bir çok kemoterapi ilacı kullanılmakla birlikte I. ve II. Dünya savaşında İngiltere tarafından gizli gaz programı kapsamında kullanılan alkilleyici ajanlar kemoterapötik ilaçların ilk sınıfını oluştururlar. II. Dünya Savaşında bu ajana maruz kalan kişilerde ilik ve lenfoid hipoplazisi saptanmış ve daha sonraları hemotolojik neoplazmlarda bunun gibi ajanların direk uygulanımı söz konusu olmuştur (Chu E. et.al., 2001).

Bazı ilaçlar kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder ya da onları öldürebilir. İlaçların doğasının farklılıkları kanserin türüne, vücuttaki lokasyonuna, normal vücut fonksiyonlarına olan etkisine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişmektedir. Genellikle günümüzde kullanılan kanser ilaçları, DNA'yı hasara uğratar, DNA ve RNA sentezini engeller ya da mitototik dengeyi bozar. Ancak; aynı zamanda normal fizyolojik hücrelere de etki göstererek hormon reseptörlerinin sentezini bloke eder. DNA'yı hedef alan ilaçlar DNA'yı kimyasal olarak zarara uğratar ve DNA replikasyonu ile RNA transkripsiyonunu durdurur. Bazı durumlarda bu ilaçlar mRNA'nın üretimine yol açarlar ve bu durumda ilgili protein sentezlenemez. Bu ilaçlara örnek olarak cis-platin Doxorubicin verilebilir (Panno et.al., 2004).

Alkilleyici ajanların dışında kemoterapide kullanılan pek çok kemoterapötik bulunmaktadır. Platin ilaçlarından oksaliptatin, antimetabolitlerden 5-flurourasil, topoizomeraaz etkileşimli ilaçlardan irinotekan, antimikrotübül ajanlardan dosetaksel ve paklitaksel, antibiyotiklerden adriamisin bunlardan önemli bir kaçıdır (Pamir A, 2001).

Kemoterapi esas olarak kanser hücrelerinin öldürülmesini hedefleyen bir tedavi şeklidir. Ancak kemoterapi ajanlarının değişik kanser türlerinde etkinliği sınırlıdır. Bazı kemoterapi ilaçları ise, örneğin paklitaksel, düşük dozlarda kullanıldıklarında tümörlerin damarlanmasını azaltarak hastalığın kontrol edilmesine yardımcı olabilmektedir. Kemoterapi ilaçlarının bu etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Anjiyogeneizde önemli rol oynayan

VEGF'nin tümör hücreleri tarafından salgılanmasının baskılanması mekanizmalarından birisi olmaya aday görünmektedir. Son yıllarda yapılan kemoterapi cevabı ile VEGF düzeylerindeki düşüş arasında bir kolerasyon olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmaya başlamıştır (Vincenzi et. al., 2007).

Kemoterapi ile kanser tedavisinin çok fazla yan etkisi vardır ve hasta fizyolojik ve psikolojik olarak tedavinin kendisinden bile daha fazla zarar görebilmektedir. Örnek olarak; aşırı derece halsizlik, mide bulantısı/kusma, saç dökülmesi, ağrı, anemi, kolay enfeksiyon riski, kan pıhtılaşma problemleri vb gibi daha sayılabilecek pek çok ciddi yan etkiler göstermektedir (G.M Mead et.al., 1982). Bütün bunların yanında sistematik kemoterapinin bir takım avantajları da vardır. Örneğin; kemoterapi yöntemi cerrahi operasyon öncesi uygulanan birincil tedavidir ve özellikle ileri safhalardaki tümör oluşumları için büyük umut vaat etmektedir.

2.4 Nanoteknoloji

'Nano' öncül eki Yunanca bir kelime olan 'cüce/bodur' kelimesinden türetilmiştir (Sahoo et.al., 2007). Bir nanometre (nm) metrenin milyarda birine, 6 tane karbon atomunun ya da 10 tane su molekülünün bir araya gelmesiyle oluşan boyuta denk gelmektedir. İnsan saçı 80.000 nm, kırmızı kan hücreleri ise yaklaşık 7000 nm genişliğindedir. Atomlar ise 1 nm'den küçük iken bazı proteinler dahil olmak üzere pek çok molekül 1 nm ve daha büyük boyut skalası arasındadır (Whitesides et.al., 2003). Nanoteknoloji kavramı ilk olarak 1959 yılında Richard Feynman adlı fizikcinin dersinde "There is plenty of room at the bottom" (odanın derinliklerinde çok şey var) konuşması ile ortaya atılmıştır. Ancak; Tokyo üniversitesinde bir araştırmacı olan Norio Toniguchi'nin materyal biliminde nanometre seviyesinde yapılanmanın çok önemli olduğunu vurguladığı 1974 yılına kadar hiç kullanılmamıştır. Bu sırada öncül minyatürizeleştirme çalışması ise elektronik dünyası tarafından elektronik aletleri silikon çip yüzeyleri üzerinde küçükleştirmeleri ile gerçekleştirilmiştir. 1970 yılının başında IBM'nin 'Elektron Işın Demeti Litografisi' adını verdiği yöntem ile 40-70 nm boyutlarında nanoyapı ve cihaz tasarımını gerçekleştirmiştir.

Boyutları 100 nm altında kalan parçacıklar olarak tanımlanan nanoparçacıklar, nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadırlar (Miller et. al., 2004). Küçük parçacıkların kimyasal ve fiziksel özelliklerindeki değişimin ana sebebi boyut küçüldükçe yüzeydeki atomların hacmindeki atom sayısına oranının artmasıdır. Bu durum nano boyutlu malzemelerin daha büyük formdaki hallerinden farklı mekanik, optik, elektronik, manyetik özellikler göstermesine yol açmaktadır (Goldstain, A., 1997; Rao et.al., 2005). Nano boyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar, nanoparçacıklar, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Nanoparçacıkların farklı özelliklerinin bilinen nedenleri ise, kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzemeyen karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak ön plana çıkmaktadır (Liveri, 2006).

Manyetik nanoparçacıklar, kolloidal, manyetik ve optik özellikleriyle ‘bulk’ karşılıklarından ayrılmaktadır (Camargo, 2007). Çekirdek-kabuk nanoparçacıklar biyoloji (Yoon, 2006), görüntüleme (Lee, 2007), tıp (Xu, 2004) ve DNA ayrıştırma (Zhao, 2003)’deki potansiyel kullanımına bağlı olarak büyük ilgi görmektedir. Manyetik nanoparçacıkların koloidal süspansiyonları kendiliğinden düzenli yapılar olarak toplanabilirler. Alan, sıcaklık, derişim gibi dışarıdan ayrılabilme parametreleriyle bu topluluğu idare etme kabiliyeti yeni ‘uyarıcı-tepkili’ materyallerin geliştirilmesi için gereklidir.

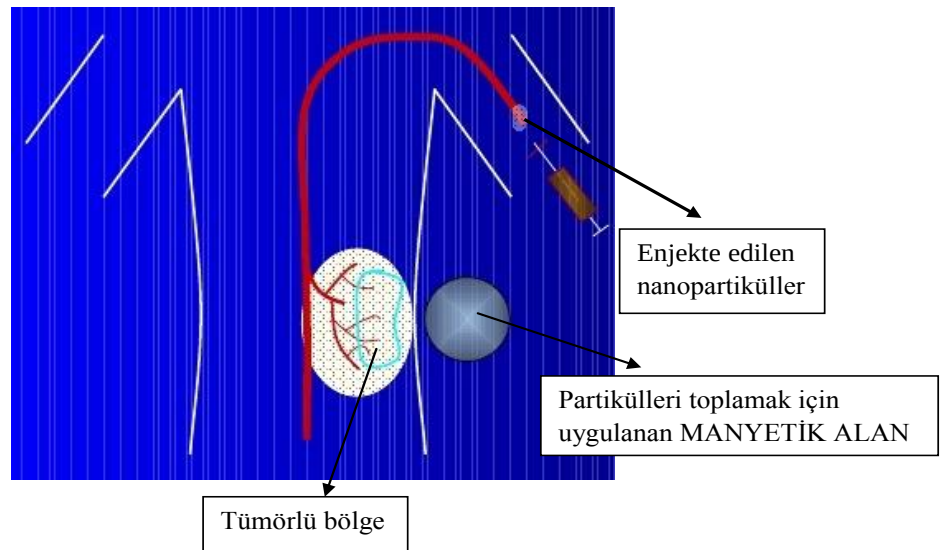
Yakın zaman önce Yin ve ekibinin yaptığı bir çalışma sonunda yeni bir süpermanyetik manyetik kolloidal nanoparçacık sentezlemişlerdir. Bu parçacıklar tek boyutlu (1D) zincirler olarak kendiliğinden toplanabilir ve mükemmel ayarlanabilir fotojenik özellikler gösterebilirler (Yin, 2007). Bu nanoparçacıkların süspansiyonu elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinde ayarlanabilir renkler göstermektedir. Yansıyan rengi ayarlamak sadece parçacık boyutuna değil uygulanan dış manyetik alan kuvvet değişimine de bağlıdır.

2.4.1 Manyetik kontrollü ilaç hedefleme

Manyetik ilaç hedefleme, tedavi edici ilaçların, insan vücudunda doğru bölgeye, doğru dozda ve istenilen zamanda, ulaştırılması için, manyetik parçacıkların ve manyetik alanın kullanılmasıdır (Medine, 2008).

Nano seviyedeki materyallerin üretimi ve geliştirilmesini kapsayan nanoteknoloji, kemoterapi ve cerrahi yöntemler gibi gelenekselleşmiş kanser tedavilerinin dezavantajlarına karşı alternatif bir seçenek olarak gündeme gelmektedir. Kanser nanoteknolojisi kimya, biyoloji, mühendislik ve ilaç alanlarının bir araya geldiği interdisipliner bir alandır ve bu yaklaşımla ulaşılan her sonuç kanser teşhis ve tedavisinde bir adım öne geçmeye yardımcı olmaktadır (Ferrari et.al., 2005). Nanoteknolojinin medikal uygulaması olan nano-ilac kavramı ise ilaç taşıyıcı vektör, teşhis ve tedavi edici ajan olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir (Parviin et. al., 2008).

Manyetik kontrollü ilaç hedefleme, manyetik bir alan yardımı ile belirlenmiş olan hedef bölgeye, ilaç konsantrasyonunun reticular endothelial system (RES) den uzak tutmayı sağlamaktadır. Kullanılmak istenilen ilaç, manyetik özellik taşıyan bileşim ile uygun bir proses kullanılarak hazırlanır. Ancak; günümüzde bunlardan çok azı hayvanlarda başarı ile uygulanabilmektedir.



Şekil 2.3 Nanoparçacıklarla konjuge edilen kemoterapi ajanının damardan enjekte edildiğinde tümörlü bölgede toplanmasının şemasal gösterimi.

Nanosistemler, diğer tedavi seçeneklerinden ayrılan dört önemli özelliğe sahiptir bunlar;

- 1) Nanosistemler, kendileri tedavi edici özelliğe sahip olabilirler ya da doğal yapıları gereği teşhis özelliği sağlayabildiklerinden tedavi edici ajanla yüklenerek çok fonksiyonlu bileşikler olarak kullanılabilir.
- 2) Yüksek afinite ve spesifik hedeflemeye imkan sağlayacak önemli hedefleme ligandları ile konjuge edilebilirler.
- 3) Nanosistemler kanser tedavisi için aynı anda etki gösterebilme yeteneğine sahip kombine çoklu ilaç molekülleri ile konjuge edilebilirler.
- 4) Geleneksel yöntemler sonucu oluşan ilaç direnci yıkılabilir, ister pasif ister aktif hedeflenmiş taşıma stratejileri olsun, her ikisinde de nanotaşıyıcılar hücre içi ilaç konsantrasyonunu arttırırlar, normal hücrelere toksik etkiyi minimuma indirirler ve aynı zamanda antikanser etkisini arttırırken sistematik toksisiteyi azaltıcı yönde etki gösterirler (Acharya et.al., 2009).

Süpermanyetik nanopartiküller; MRI görüntüleme, manyetik ilaç hedefleme, yüksek çözünürlük manyetik rezonans görüntüleme, doku onarımı, hücre ve doku tespiti ve transfeksiyonu gibi potansiyel biyomedikal kullanım alanlarına sahiptir (Laurent S. et.al., 2008).

Süpermanyetik partiküllerin in vivo uygulamasında plazma proteinlerinin soğurulması ve retikuloendotelial sistem tarafından belirsiz bir şekilde alınımına bağlı olarak, istikrarsızlaşmasını kapsayan iki büyük kusurla karşılaşıldı. İki durumda da parçacıklar, nanoparçacık bazlı teşhisler ve tedavilerde kan dolaşımından ayrılarak, etkinin azalmasına yol açmaktadır. Bu olayı önlemek ve daha uzun dolaşım süresi sağlamak için nanoparçacıklar genellikle hidrofilik ve biyouyumlu polimerler ya da moleküllerle kaplanır (T.Jafari et.al., 2010)

2.4.2 Demir nanoparçacıklar

Fe_3O_4 nano yapıları demirin oksitlenerek pasifleşmesi (yüzey aktivitesinin azalması) sonucu oluşan bir yapıdır. Demir bilindiği gibi sahip olduğu yüksek manyetik doygunluk değeri nedeni ile teknolojik pek çok alanda vazgeçilmez bir

yapıdır. Demir nano parçacıkları özellikle, karbon-karbon bağlarının oluşumu ve parçalanmasında etkin rol oynamaktadır. Fakat nano boyutta demirin teknolojik uygulamasında karşılaşılan en büyük dezavantaj, sahip olduğu yüksek reaktivitesidir. Su veya hava ortamında bulunduğu zaman çok hızlı bir şekilde oksitlenerek sahip olduğu ferromanyetik karakteristiği kaybedip antiferromanyetik yapıya dönüşmektedir. Bu da yüksek oranda oksijen içeren veya sulu ortamlarda demirin kullanılmasını engelleyici bir ortam olarak karşımıza çıkmaktadır (Köse D., 2013)

Literatürlerde bu sebeble, demirin yüzey reaktivitesinin azaltılıp, kullanılan sistem içerisinde kararlı olarak uzun süreler kalabilmesi için çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların en önemlileri, farklı element matrisleri içerisinde tutularak, polimer ile kaplanarak veya istenilen şekillerde oksitlenerek yapının antiferromanyetik yapıya dönüşmeyip, net bir mıknatıslanma değeri olan kararlı ferrimanyetik yapıya dönüşmesi veya ferromanyetik halde tutma çalışmalarıdır. Bu şekilde, demirin teknolojik uygulamalarda kararlı olarak uzun süreler pasifleşerek kullanılması sağlanmıştır.

Ferromanyetik malzemelerin manyetik döngüsü kristal kafes tarafından engellenir ve ters yöne uygulanır, fakat süpermanyetik malzemeler, kafes oryantasyonu tarafından engellenmeyen bir manyetik momente sahiptir ve gecikme çevrimi sergilemez. Boyutun etkisine bağlı olarak demir bazlı nanopartiküller ($< 27\text{nm}$) gecikme çevrimi gösterir. Demir nanoparçacıkların manyetik özellikleri üzerinde hem deneysel hem de teorik olarak geniş bir biçimde çalışılmaktadır. Demiroksit nanoparçacıklara kıyasla demir nanoparçacıkların daha yüksek manyetik doygunluğuna rağmen oksidasyona duyarlı olmaları kullanımlarını sınırlamaktadır. Eğer demir nanoparçacıkları oksidasyondan korunursa, küçük parçacık boyutuyla geniş bir manyetik döngüye sahip olma potansiyeline açıktır (T.Jafari et. al., 2010).

Süpermanyetik demir oksit nanoparçacıkları manyetik rezonans görüntüleme, manyetik ayırıştırma ya da direk manyetik alanda doku, tümör, protein, enzim, antikora bağlanma, vücuda ilaç ve gen göndermeye kadar pek çok biyomedikal sahada kullanılmaktadır. Küçük ve kararlı toksik olmayan

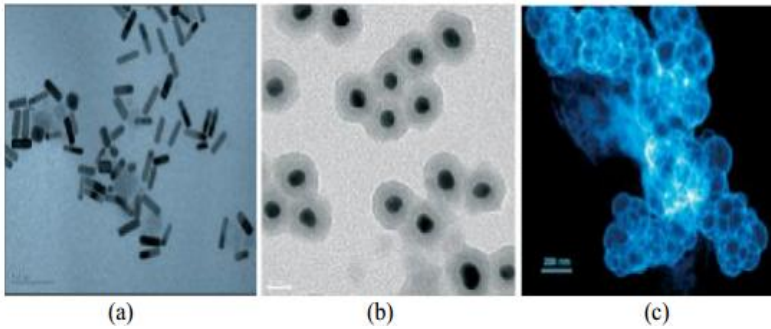
süpermanyetik demir oksit nanoparçacıkları belli organlara ilaç taşıma ve manyetik rezonans görüntülemeye kontrast yaratma potansiyeline sahiptir (Muller, R.N. et. al., 2008).

2.4.3 Altın nano parçacıklar

Son yıllarda metal nanoparçacıklarının; olağanüstü fizikokimyasal özellikleri ve geniş uygulama alanına sahip olmaları nedeniyle kapsamlı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise uygun boyutlarda sentezlenmeleri ile ilgili çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırmalar sonucunda istenilen boyutta altın nanozincirlerinin sentezlenmesi konusunda önemli ölçüde ilerleme sağlanmıştır (Zhimin Xing et. al., 2009).

Altın nanoparçacıklar monoklonal anti-EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörüne spesifik antikor) ile konjuge edildiğinde, normal hücrelere oranla kanserli hücre yüzeyinde 6 kat gibi çok yüksek bir oranda ve homojen olarak tutulduğu saptanmıştır (El-Sayed et. al., 2005).

Altın basit sentez süreci ve kimyasal fonksiyonelliği sebebi ile kaplama için en çok tercih edilen malzeme olmuştur. Demir nanoparçacıkların altın kaplama ile oksitlenmekten kaçınması ve mıknatıslığı giderme ya da ısıyı önleme gibi manyetik özelliklerini koruyabilmesi beklenmektedir. Öte yandan nanoparçacıkların agregatlaşması giderek önem kazanmaktadır. Bu sebeple yeni ortaya çıkmış toplu özellikleri de göz önünde bulundurularak sıralı bir nanoparçacık tahlili ile üretilmesi sağlanacaktır. (Jun Lin et. al., 2000).



Şekil 2.4 Nano partiküllere ait elektron mikroskobu görüntüsü (a) altın nano çubuklar, (b) altın çekirdek silika kabuk nano partiküller, (c) iç boşluklu platin nano çubuklar (Köse D., 2013).

2.4.4 Altın-demir (AuFe) nanoparçacıklar

Nanoparçacıkların oksitlenmesini engellemenin yaygın bir yolu çekirdek kabuk yapısı oluşturarak onları pasif bir katmanla örtmektir. Şu ana kadar metalik ve polimerik kaplamalar demir nanoparçacıkların yüzey işlemlerinde kullanılmıştır. Bu bağlamda altın kabuk kimyasal stabilitesi ve manyetik özelliklerinde eksilme olmadan biyouyumluluk gösterdiği için oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Ayrıca kaplama yüzey yapılanması ve işlevselliği için bir platform sağlayarak onları potansiyel olarak toksik olmayan biyouyumlu hale getirir ve sonrasında kaplama ilaç yüklemesi için bir platform olarak kullanılabilir. Çekirdek- kabuk yapılarının sentezinde kullanılan farklı yöntemler arasından ters misel yöntemi, biyomedikal uygulamalarda oldukça önemli olan dar parçacık boyut dağılımı avantajını sunar (T. Jafari et. al., 2009).

Manyetik demir, demir oksitlerden daha yüksek spesifik manyetik alana sahiptir ancak; metalik demir parçacıkları oksidasyona ve korozyona karşı oldukça dayanıksızdır. Demir ince altın kabuğu tarafından korunduğunda korozyona ve oksitlenmeye karşı dayanıklı olmaktadır. Ticari nanoparçacıklar altınla kaplanıldığında yüksek korozyon direnci göstermektedir . 0,001M HCl çözeltisinde 80°C de 12 saat bekletildiğinde demir nanoparçacıkların parçalanmasına rağmen altın kaplı nanoparçacıkların korunduğu görülmüştür (Chen M. et.al., 2003). Böylece birçok farklı alanda olduğu gibi biyomedikal uygulamalarda da yerini alabilmiştir.

Altın-Demir çekirdek-kabuk nanoparçacığının Au kabuk kısmı biyoölçümler için reaktif yüzey olarak kullanılır ve manyetik biyoayırma içinde çekirdek demir kullanılır. Bu da istenilen büyüklükte manyetik ve yüzey özelliklerine sahip nanoparçacık sentezlemenin biyoayırmada öncelikli çalışma alanı olmasına neden olmuştur. Çünkü arzu edilen kimyasal ve biyomedikal özellikteki manyetik nanoparçacıklarla kaplanan altın yüzeyi kimyasal ve biyolojik olarak uyumludur (Gupta AK, 2005; Xia Y. et. al., 2000).

Altın kaplı manyetik nanoparçacıklara antikör immobilize edilerek spesifik proteinlere duyarlı hale getirilebilir. Manyetik alan uygulanarak etkili bir protein

ayırma işleminde kullanılabilir. Aynı strateji DNA ayırmada da kullanılabilir (Chen M. et. al., 2003).

Altın kaplı manyetik çekirdek-kabuk parçacıkları değişik şekillerde sentezlenebilir. Gama ışını ışıması, lazer kullanılarak, sono kimyasal reaksiyon, tabaka-tabaka elektrostatik biriktirme, kimyasal indirgenme ve misel metodu yöntemleriyle sentezler gerçekleştirilmiştir (Kinoshita T. et.al., 2005; Mandal M. et. al., 2005).

Altın ile kaplama sayesinde demir nanoparçacıkların oksitlenme karşısında dirençli ve açık havada kararlı durması sağlanmıştır. Mikro emülsiyon yöntemi ile altın-demir-altın çekirdek-kabuk nanoparçacıkların sentezlenmesine olanak sağlamıştır (Caroenter EE. et. al., 2001).

Au-Fe nanoparçacıkların fonksiyonlarının potansiyel kullanımlarına rağmen manyetik nanoparçacıkların zehirlilik ve biyouyumluluk profillerine dair ender raporlar vardır. Polivinil alkolle kaplanmış demiroksit nanoparçacıkların biyouyumluluğu çok yakın bir zamanda MTT tahlili ile değerlendirilmiştir. Karlsson hiç denebilecek kadar düşük bir seviyede zehirlilik oranı bulmuştur (Karlsson H.I. et.al., 2008).

Mahmoudi ise; 1.929 tane fare fibroblast hücre çizgisi ile manyetik nanoparçacıkların etkileşimi esnasında hiçbir hücre ölümü ve apoptozisi oluşmadığını göstermiştir (Mahmoudi M. et.al., 2009).

Jafari ve arkadaşları gelen biyolojik tepkileri göz önünde bulundurarak belli bir tartışma konusu olan manyetik nanoparçacıkların olası zehirliliğini daha detaylı bir biçimde incelemek için, demir-altın nanoparçacıkları kolay bir ters misel metodu ile sentezlediler. Nanoparçacıkların boyutu manyetik özelliklerini büyük ölçüde etkilediği için, suyun sürfaktan (yüzey aktif madde) molekül oranına etkisi üstünde çalışmışlardır (T. Jafari et. al., 2009).

Bu nano yapılar biyomedikal alanda birçok pratik uygulama alanı bulmuştur. Örneğin kontrast arttırma ajanı olarak manyetik rezonans

görüntüleme, çeşitli biyomoleküllerin ayrımında, hedeflenen ilaç manyetik ısıtma ile takip sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda nanoparçacıkların yüksek yüzey alanı, toksik olmayan manyetik özellikleri ve süperparamanyetizma özelliklerinden faydalanılmıştır (Jeong J. et. al., 2000).

2.5 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler

2.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi yöntemi (TLRC)

Bileşiklerin ayrılma, saflaştırma ve tanınmaları için en çok uygulanan işlemlerden biri kromografidir.

Hareketli bir faz ile sabit bir fazın temas etmesi ile maddelerin yer değiştirme hızlarının farklılaştırılarak ayrılmasını sağlayan tekniğe kromatografi adı verilmektedir. Hareketli faz sıvı ya da gaz karışımından oluşabilir. Sabit faz ise katı ya da katı madde tarafından tutulan bir sıvıdır. Ayırmada etkin olan maddelerine göre adsorbsiyon, dağılma, iyon değişimi ve jel kromatografisi olarak dörde ayrılır. Hareketli ve sabit fazın cinsine göre kağıt, ince tabaka, kolon ve gaz kromatografisi olarak dörde ayrılır.

İnce tabaka kromatografisi katı-sıvı adsorbsiyon kromatografisidir. Destek maddeler, cam, alüminyum ya da plastik plakalar olabilir. Destek maddeleri ince bir tabaka halinde adsorban olarak, silikajel, alüminyum oksit gibi maddelerle kaplanılarak kullanılırlar (Erdik vd., 2000).

İnce tabaka kromatografisinde çeşitli kromatografik maddeler kullanılabilir. Madde ince tabaka üzerine konulurken, ne çok az, ne de fazla konulmamasına özen gösterilmelidir. Uygun miktarda örnek eklendikten sonra uygun çözügen bulunan tanka, uygulama noktası çözügene değmeyecek şekilde yerleştirilir ve sıvı fazın yürümesi bittikten sonra radyo TLC cihazı ile sayımlar alınır. Bu cihaz sayım yoğunluğunun biriktiği noktayı esas alarak kromatogramı oluşturur. Bu kromatogramlardan maddenin R_f değeri hesaplanır ve bağlanma verimi elde edilir (Reich and Schibli, 2007).

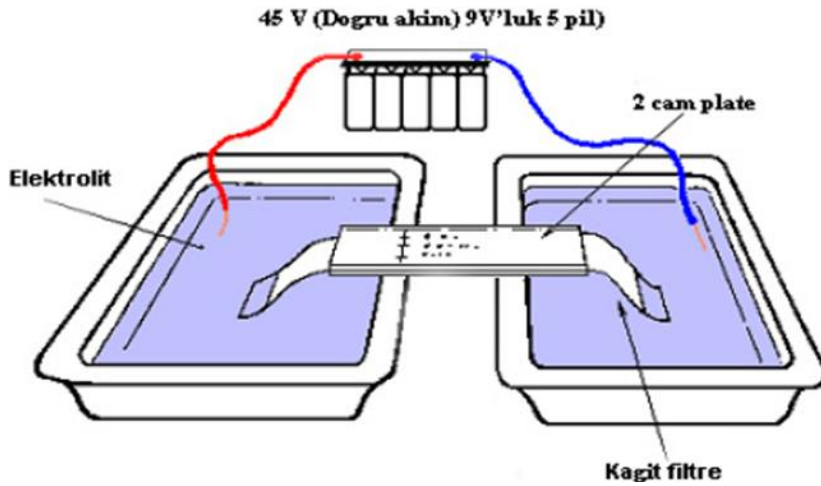
2.5.2 Kağıt elektroforezi

Elektroforez, ilk olarak İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından serum proteinleri üzerinde çalışırken bulunmuş ve çalışmadan dolayı kendisi 1948’de Nobel Ödülü ile ödüllendirilmiştir.

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Yüklü türlerin, içinden elektrik akımı geçirilen bir elektrolitte çözündükleri veya süspanse olduklarında göç etmesi esasına dayanır.

Ayrırma işlemi bileşiklerin; yük/kütle oranı, afiniteleri, parçacık büyüklükleri, hidrofobik özellikleri ve adsorbsiyon özelliklerine göre gerçekleşir.

Kağıt ve selüloz asetatı elektroforezinde; kağıt tampon çözelti ile doyurulduktan sonra, iki ucu tampon çözeltiye batacak şekilde gerilir. Örnek madde kağıt üzerine genellikle bir çizgi halinde sürülür. Kurumaması için kağıt hem üstten kapatılır hem de bir su deposu üstünde tutulur. Gerilim uygulandıktan sonra bir süre bekletilir, süre tamamlandığında kağıt çıkartılır, kurutulur ve analiz edilir.



Şekil 2.5 Kağıt elektroforezi deney düzeneği

2.5.3 Lipofilite

Lipofilite maddenin yağda çözünme eğiliminin bir ölçüsüdür ve lipid su oranı şeklinde partisyon katsayısı olarak ifade edilir. Bu katsayı ne kadar büyükse maddenin lipid membranından absorpsiyonu o kadar fazla olmaktadır (Coenen, 2006). Kimyasal bileşikler için yağ, petrol, lipid ve hekzan, toluen, oktanol gibi apolar çözügenlerde çözünme yeteneğini gösterir (Theobald, 1989; Özyüncü, 2009).

Tek bir molekülün iki faz arasındaki dağılım faktörü olarak tanımlanabilir.

$$P=A_0/A_{su}$$

Oktanol ve su arasındaki dağılım faktörünün logaritması moleküler lipofilite ve hidrofobiteyi tayin etmek için önemli bir parametredir. Organik moleküller için medikal kimyada önemli olan fizikokimyasal özellikleri saptamada bilgi verici ve başarılı birkaç teknik olmakla birlikte, peptidler ve aminoasitlere gittikçe artan farmosötik ilgiden dolayı genellikle hızlı, güvenilirdir. Peptidlerin, proteinlerin ve enzimlerin biyolojik aktivitesini, ilaç dağılım bilgisini ve dozaj formülasyonunun saptanması için hidrofobite ve lipofilite önemlidir. Peptidin biyolojik transport özelliklerini anlamada P_0/su ile çoğu zaman iyi bir yol göstericidir. Peptidlerin çoğu hidrofilik özelliğe sahiptir (Buchwald, 1988).

2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

2.6.1 SEM

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektron mikroskobunun bir türüdür ve örneği yüksek enerjili elektron demeti ile tarayarak üç boyutlu fotoğraf görüntüsü oluşturur. İncelenecek malzemeyi yüksek çözünürlüklü görüntü oluşturarak analiz etme imkanı sağlar. Örneğin yüzey topolojisi ve kompozisyonu gibi önemli veriler üç boyutlu SEM görüntüleme cihazı ile elde edilir. TEM görüntüleme sisteminden farklı olarak elektron demeti ile çok ince örnek kesitinin içinden geçerek örneğin morfolojisi ile birlikte görüntü CCD kamera (charge

coupled device) ile alınır (Seven B., 2013). Çözünürlük, odak derinliği, görüntü ve analizi birleştirme özelliklerinden dolayı taramalı elektron mikroskobunun uygulama alanları oldukça geniştir (Laurent S. et.al., 2008).

2.6.2 TEM

Geçirimli Elektron Mikroskobu cismin içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır ve optik mikroskoba kıyasla çok daha küçük ayrıntıları nano boyutta görmeye olanak tanır. Elektron mikroskobu ile hücre içi organellerin yapılarını, hücre içindeki dağılımını ve diğer organeller ile komşuluğunu, fonksiyonel ilişkilerini, çekirdeğin yapısını membran bütünlüğünü ya da membrandaki değişiklikleri görmek ve ayrıca dokuların organizasyonunu, matriks liflerini, hücre matriks ilişkilerini gözlemlemek de mümkündür. Bunların yanı sıra patolojik dokularda TEM'in tanısal değeri vardır. Bu amaçla en sık kullanıldığı alanlar; doğru tümör tanısı, tümörlerin tiplendirilmesi ve evrelendirilmesi, virüs gibi enfeksiyon ajanlarının dokularda tanınması uygulamalarıdır (Uğur A., 2008; Reed, 2005)

2.6.3 X-ışını kırınım yöntemi (XRD)

XRD yöntemi çoğunlukla ağır elementlerden oluşan, katı inorganik ve kristal halindeki maddelerin araştırılmasına uygun bir aygıtsal yöntemdir. XRD ölçümleri için kullanılan cihazlar basit bir blok diagramına sahiptir (Kim Y.I., 2007).

Bir malzemenin atomik yapısını görüntülemek için elektron mikroskopları kullanılabilmesine rağmen; bilinmeyen yapıları belirlemek ve yapısal parametreleri tayin etmek mümkün olmamaktadır. Bunun için kırınım teknikleri kullanılmalıdır. X ışını kırınım yöntemi, ilk olarak Max. Van Lue tarafından kullanılmıştır ve günümüzde ise kristal yapıları incelemek için en çok kullanılan teknik haline gelmiştir. Ayrıca X-ışını saçılım tekniğinin yıkıcı olmaması ve numunenin özelliklerini değiştirmemesi bu tekniğin kullanımını avantajlı hale getirmektedir (Cullity B.D., 1996).

Yöntem; süperiletkenler, seramikler, metaller, alaşımlar, katı çözeltiler, heterojen katı karışımlar, korozyon maddeleri, çelik kaplama malzemeleri, maden analizleri, toprak analizleri, safsızlık katkılanmış yarı iletkenlerde, böbrek ve mesane taşlarında, bazı adli konularda bazı boyar maddelerde, pigmentlerde, çimentolarda, doğal ve yapay minerallerde, herhangi bir malzemenin içerdiği bileşik veya element tayininde, inorganik polimerlerde, faz diagramlarının ve faz dönüşümlerinin araştırılması bazı kristal veya amorf kompleks bileşiklerinin incelenmesinde olduğu gibi bir çok konuda yaygın kullanım alanına sahiptir. Yaygın olmamakla birlikte bazı katı organik bileşiklerin, katı organik polimerlerin, plastiklerin, organik boyar maddelerin analizlerinde de kullanılabilir (Kim, Y.I., 2007).

2.6.4 VSM (Titreşimli örnek magnetometresi)

Bir numunenin izotopik veya anizotopik özelliği titreşimli örnek manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM) ve Manyeto Optik Kerr Etki (Magneto Optic Kerr Effect, MOKE) tekniklerini kullanarak belirlemek mümkündür. Her iki yöntemde de numuneye 0° - 90° arasında değişen açılarla manyetik alan uygulanarak histerisiz eğri ölçümleri yapılmaktadır. Bu ölçümlerden doyum manyetizasyonu M_r nin kalıcı manyetizasyon M_s oranları, M_r/M_s oranları (squarness) sabit kalıyorsa bu numune izotropik özellik göstermektedir. Eğer farklı açılarda M_r/M_s değişiyorsa anizotropik özellik göstermektedir (Torre E.D, 1999).

Bilindiği üzere bütün malzemeler manyetik alan etkisinde tepki vermekte ve malzeme içerisinde kendine özgü bir manyetizasyona sahip olmaktadır. Bu durum malzemenin uygulanan alana karşı göstermiş olduğu duyarlılıkla ilişkilidir ve bu duyarlılığın ölçüsüne maddenin manyetik doyumluğu denir. Manyetizasyonun uygulanan alana göre değişim hızı maddenin doyumluğunun bir ölçüsüdür. Maddelerin yüksek ve düşük sıcaklıklarda yapılarında meydana gelen değişimlerden olayı, manyetik alanın uygulandığı sıcaklık da kritik bir öneme sahip olmaktadır (Jiles D., 1991).

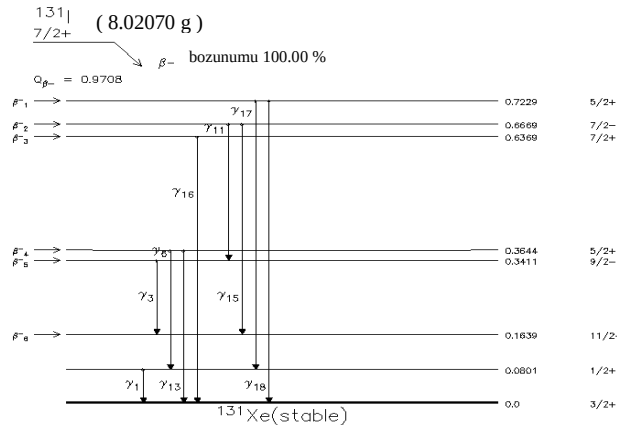
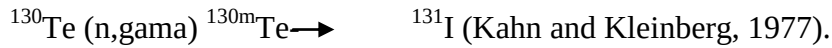
2.7 Radyoaktif İyot İzotopları

2.7.1 ^{131}I

Yarı ömrü 8,02 gün olan ^{131}I % 100 β^- ışıması yapan aynı zamanda da 364, 637, 284, 80 ve 723 keV enerjili gamma ışınlarını salan bir radyoizotoptur. Nükleer tıp alanında teşhis ve tedavi amaçlı kullanılırlar. β^- ışıması yapıyor olmaları nükleer tıp alanında tedavi amaçla kullanılmalarını sağlarken, az miktarda kullanımları ile elektron salınımının yanında çıkan uygun enerjili gamma ışınları ile sintigrafik görüntüleme kullanılırlar (Yurt F., 1998; Kowlsky and Perry, 1987).

Yüksek gama enerjisi (364 keV) beta ışıması, uzun yarı ömrü (8 gün) nedeni ile düşük dozlarda kullanmak gerektiği için gama kameralarla görüntülemeye uygun bir ajan değildir. Yüksek enerjisi sayesinde, substrenal guatrın araştırılmasında ve beta ışımasını nedeniyle hipertiroidi ile tiroid kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Düşük dozlarda (30-100 μCi) oral yolla verilmesini takriben 24. saatte görüntüleme yapılır (Rivkees et.al., 1998).

^{235}U 'in fisyonu sonucunda reaktörde üretilirler.



Şekil 2.6 ^{131}I 'in bozunum şeması

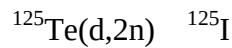
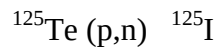
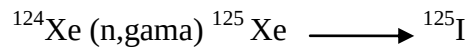
2.7.2 ^{125}I

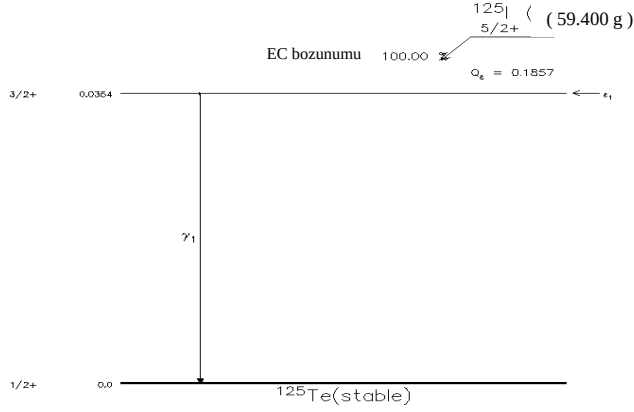
53 proton ve 72 nötrona sahip olan ^{125}I çekirdeği nötron eksikliğinden dolayı elektron yakalama (EC) bozunumuna uğrar ve yarı kararlı $^{125\text{m}}\text{Te}$ 'e dönüşür. Bu bozunumda geçiş enerjisi 178 keV dir ve bu enerjiye sahip nötrino, uyarılmış $^{125\text{m}}\text{Te}$ 'in geçişinde 143 keV enerji taşır. $^{125\text{m}}\text{Te}$ 'in temel düzeyine geçişinde 35 keV gama ışını salınır (Narra et.al., 1992).

Yarı ömrünün uzun olması ve düşük gama ışıması yapması nedeni ile radyoimmunoassay gibi *in vitro* çalışmalar için uygun bir radyonüklittir. ^{125}I önceleri tiroid görüntülenmesinde kullanılmışsa da günümüzde büyük çoğunlukla *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır. ^{125}I izotopu antijen radyo işaretlenmesi için çok kullanılmaktadır ve uzun yarı ömrü (60 gün) sayesinde avantaj sağlamaktadır. Ayrıca yine bu uzun yarı ömrü sayesinde birçok işaretleme çalışması ekonomik olarak ^{125}I ile yapılabilmektedir (Harper et. al., 2001).

^{131}I 'e göre bir diğer avantajı ise; radyo işaretlenme esnasında ^{125}I 'in beta salınımı olmaması işaretli moleküllerin radyolitik dekompozisyonunu minimuma indirir. Yarı ömrü 60 gün olası nedeni ile bileşiklerin uzun süre metabolizma çalışmaları için tercih edilir ve böyle bileşikler için uzun süre raf ömrü sağlar. Böylece sıklıkla hazırlanmasına ihtiyaç duyulmaz (Kahn ve Kleinberg, 1977).

^{125}I aşağıdaki şekilde üretilmektedir (Kiss et. al., 1969).





Şekil 2.7 ^{125}I 'in bozunum şeması

2.7.3 ^{123}I

Kararlı izotopu olan ^{127}I den 4 nötron eksik olması dolayısıyla elektron yakalama (EC) bozunumuna uğrar ve $^{123\text{m}}\text{Te}$ 'e bozunur. 13.3 saatlik yarı ömrü ve 159 keV lik gama enerjisi nedeniyle klinik çalışmalar için ideal bir radyoizotoptur. Siklotronlarda üretimi sağlanmaktadır (Yurt F., 1998).

Tiroid sintigrafisi için ideal olmasına rağmen, siklotron ürünü olması ve temin güçlüğü nedeni ile ülkemizde kullanılmamaktadır. Oral yoldan verildikten 6 saat sonra çok iyi rezolüsyonlu, minimal zemin aktivitesi bulunan görüntüler elde edilmektedir (Venkat et.al., 1992).

2.7.4 İyot radyoizotoplarının kullanım alanları

Tiroid bezinde toplanma eğilimi, iyodu özellikle tiroit problemlerinin teşhisi ve işlemleri için yararlı kılmaktadır. ^{131}I , kısa yarı ömürlü ve yararlı beta yayılımı nedeni ile nükleer tıpta yoğun bir biçimde kullanılmaktadır. ^{131}I , tiroitten gelen tiroksin akışını izlemeyi ve görüntülemeyi içeren bir çok tıbbi işlemler için faydalıdır (Hertz et.al., 2009). Aslında 8 günlük yarı ömre sahip olan ^{131}I , üç günden daha kısa bir sürede vücuttan atılır. ^{123}I 'de tıbbi görüntülemeye yaygın bir şekilde kullanılır. Buna karşılık ^{124}I , hedeflenmiş terapi için yararlıdır. ^{125}I izotopu ise bazen kanser dokusunu tedavi etmede kullanılır. ^{129}I önemli tıbbi kullanımlara

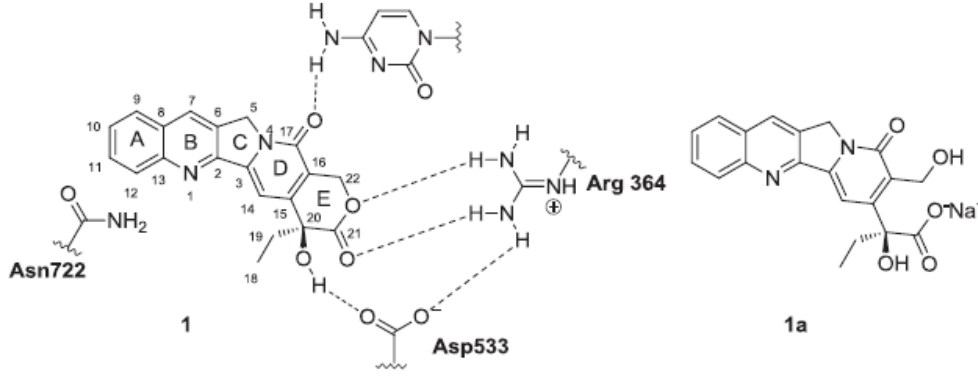
sahip değildir. Pratik kullanımda teşhise yönelik test etme laboratuvarında bazı radyoaktif sayıcıları kontrol etmek için kullanılır (Gilby et.al., 2010).

2.8 Kamptotesin

Wani ve Wall'ın 1966 yılında Camptotheca acumunata adlı Çin ağacından sentezlediği Kamptotesin, büyük bir aile olan kanser ajanlarının, önemli bir üyesidir. Kamptotesin'in topotekan ve irritan ajanları, çeşitli ülkelerde pazarlanmaktadır ve diğer analoglarının da klinik ve klinik öncesi değerlendirmeleri ise halen devam etmektedir (Dennis P. Curran et. al., 2001).

İrinotekan, semisentetik bir Kamptotesin türevidir. Topoizomerez 1 adı verilen, DNA'nın replikasyon sürecinde bir zincirini keserek ve bunun hemen ardından tekrar o zincire bağlanarak, çözülmesine ve yeniden sarılmasına yardım eden enzimi inhibe eder. Aktif sitotoksik metaboliti olan 7-etil-10-hidroksil-kamptotesin (SN-38)'e karboksil esteraz enzimi ile dönüşür ki Topoizomerez 1 inhibitörü olan bu aktif metabolittir (Asmis T.R. et.al., 2008, Cunningham et.al., 2001). Kolon kanserlerinde birinci basamak tedavide ve mide kanserlerinde birinci basamak tedavide, bunların yanı sıra da meme kanseri tedavisinde kullanılan önemli bir antikanser ajandır. (Tebbutt et.al., 2002). İrinotekanın VEGF düzeylerinde doğrudan bir etkisi gösterilememiş olmakla birlikte VEGF ekspresyonu fazla olan tümörlerde bu ilacın daha etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Koizumi F. et. al., 2006; Bocci G. et. al., 2008).

Topoizomerez 1 enziminin katalize ettiği DNA sarmallarında, geçici bir reaksiyon ile rahatlama ve enzim bağlantılı tek tutam kırılmaları meydana gelir. Kamptotesin'in üçlü kompleksi olan Topo1-CPT-DNA (bölünebilir karışık kompleks) ile geri birikim yaparak, bölgesel alanda bu reaksiyona müdahale edip engellediği düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin kamptotesin sınıfı bileşiklere uzun süreli maruz kalmaları sonucunda, geri dönüşü olmayan DNA hasarı ve hücre ölümleri gerçekleşmektedir (Wei Lu et.al., 2013).



Şekil 2.8 Kamptotesin'in yapısal gösterimi (1) Topoizomeraz 1 inhibitörü sayesinde DNA'ya bağlanan Kamptotesin (1a) (Q. Huang et al., 2013).

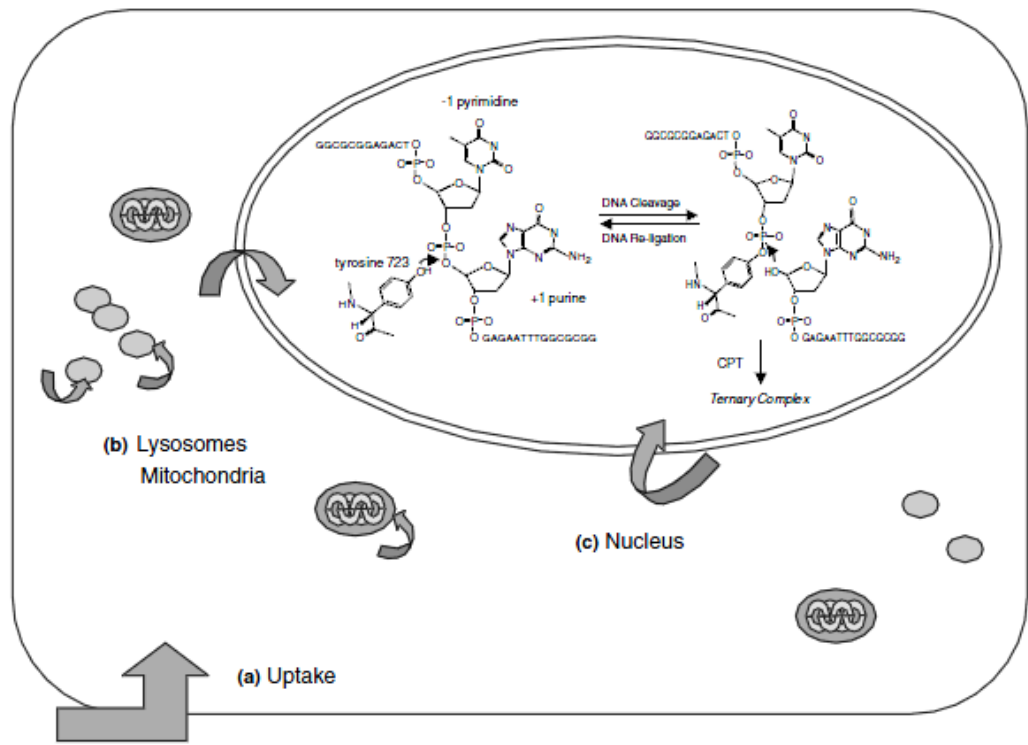
Her iki model önermesinde de farklılıklar olmasına rağmen; Kamptotesin'in altı üyeli hidroksi lakton E-halkası dizilimi, moleküller arası hidrojen bağları ve aminoasit tortuları, enzim-DNA kompleksine bir nükleotid bağlanma bölgesi olması bakımından önemli bir özelliktir. Bu nedenle, altı üyeli hidroksi E-halkası Kamptotesin'in aktivitesi bakımından önemlidir. Aynı zamanda E-halkası yapısındaki lakton nedeniyle, kritik yapısal eğilim ve hidrolize duyarlılık göstermektedir. Kamptotesin'in aktif olmayan hidroksi asit formu, insan plazmasında hızla açılır sadece göz ardı edilebilir aktif lakton formu dengede kalmaktadır. Hidroksi lakton halkasının kimyasal kararsızlığı nedeniyle başarısız olabilmektedir ancak; Kamptotesin'in seri aktif bileşikleri, tümör tedavisinde başarılı sonuçlar vermektedir (Wu Du. et.al., 2002).

Modifiye edilmiş Kamptotesin E-halkası analoglarının, kimyasal kararlılığı iyileştirilirken, enzim-DNA kompleksi bağlama kabiliyetinin ise değişmemesi hedeflenmektedir. İlerleyen yıllarda, E-halkası modifiyeli Kamptotesin analogları hazırlanmıştır. Bunlar Kamptotesin 10-laktol ve laktam türevleri, 11-hidroksi amid açık halkası, 12-halolakton, 1,13-azid lakton, 13-aminolakton ve 13,14-aexometilen laktondur. Modifiye edilen bu bileşiklerden hiçbirinin, inaktif olmadığı ve hücrel aktivitelerinde herhangi bir düşüşün gözlenmediği, Kamptotesin'in hücre tahlilleri sonucunda belirlendi (Dennis P. Curran et. al., 2001).

Kamptotesin, doğal bir Topoizomeraz 1 enzimi inhibitörüdür. Kolorektal, meme, akciğer ve yumurtalık kanserlerine karşı güçlü bir antineoplastik aktivite

sergilemektedir. Diğer yandan lakton E halkasının zayıf çözünürlüğü, instabilitesi, fizyolojik pH'ı nedeniyle, toksik etki ve düşük terapötik etki göstermektedir (Quingqing Huang et. al., 2013).

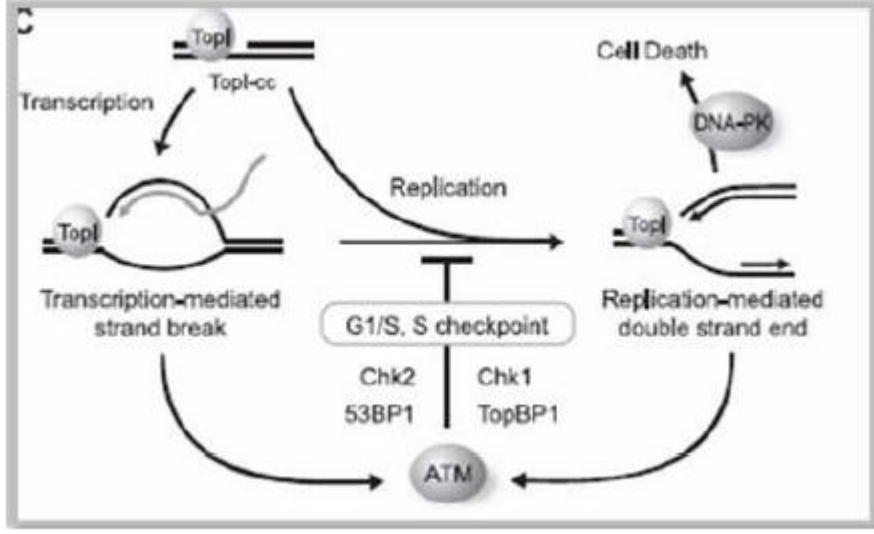
Şekil 2.9'da görüldüğü üzere Kamptotesin hücreye girmeden önce hücre zarı tarafından tutulur. Lizozom veya mitokondriler tarafından hücre zarından alınan Kamptotesin bu organeller sayesinde çekirdekçiğe içine taşınır. Çekirdekçiğe içerisine girdikten sonra DNA sarmallarında geri dönüşü olmayan hasara neden olur ve akabinde hücre ölümü gerçekleşir.



Şekil 2.9 Kamptotesin aktivasyon mekanizmasını belirleyen birincil ve ikincil olaylar (A. Lorence, C.N. Nessler, 2004).

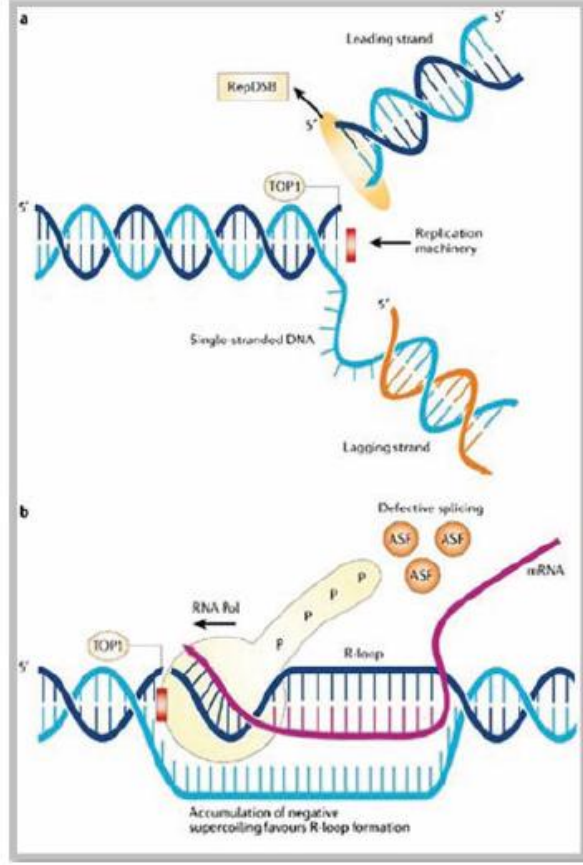
Tek zincir kırıklarında görevli topoizomerez 1 ve çift zincir kırıklarının tamirinde görevli topoizomerez 2 olmak üzere iki çeşit topoizomerez enzimi mevcuttur (Nittis, 2009). DNA topoizomerez 1 inhibitörü; kamptotesin ve topotekan, DNA topoizomerez 2, etoposid ve doksorubisin en etkili antitümör ilaçlarındandır. Aktivitelerini, topoizomerez ve DNA arasındaki kompleksleri sabitleyerek gerçekleştirmektedirler. Topoizomerezlar, devam eden DNA replikasyon çatalı ve RNA polimerazı, sabit topoizomerez-DNA kompleksi ile

çakıştırmakta ve replikasyon çatalını çift zincir kırıklarına dönüştürerek apoptoza neden olmaktadır (Pommier, 2009; 2006).



Şekil 2.10 Kamptotesin'in G1 hücrelerinde tutularak apoptozu engellemesinin şemasal gösterimi.

Şekil 2.10'da görüldüğü üzere; G1 hücrelerinde transkripsiyon yolu ile kamptotesin'in yarattığı kırıklar, replikasyon sırasında çift sarmal kırıklara dönüşmüş olur. ATM aktivasyonu, hücreleri G1/S'de tutarak DNA-PK'nın aşırı aktivasyonunu ve böylece apoptozu engellemektedir (Sakasi et.al., 2010). 2010 da yapılan bir çalışmada ise topoizomeraz 1 inhibitörü tarafından yaratılan DNA hasarının transkripsiyonel olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.11 Topoizomeraz enzimi (TOPİ) varlığında DNA hasarının oluşumu.

Şekil 2.11'e göre A. Devam eden replikasyonun, TOPİ'nin yarattığı DNA kırığına ulaşması, çift zincir DNA hasarına neden olmaktadır. B. İlerleyen transkripsiyon çatalının TOPİ ile çarpışması sonucunda R-loop oluşmakta ve hatalı kesilme (işlenme) meydana gelmektedir (Pommier, 2006).

Kamptotesin güçlü bir antitümör aktivitesi sağlayan, pentasiklik bir alkaloiddir. DNA ve Topoizomeraz 1 enzimi arasında kompleks oluşturarak yakalama özelliği sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan, SAR çalışmaları ile geliştirilen Kamptotesin'in çeşitli türevleri; 2 (CKD 602), 2 3 (lurtotecan), 3 and 4 (DX8951f)4, potansiyel antikanser ajanları oldukça sık olarak vurgulanmaktadır. Etkin enantioselektif sentez yöntemleri ile elde edilen; 20(S)-enantiyomerinin biyolojik aktiviteleri üzerinde yoğun olarak çalışılmıştır. Son yıllarda çeşitli enantioselektif sentez yöntemleri kullanılarak elde edilen 20(S)-Kamptotesin'in kimyasal ve enzimatik çözünürlüklerinde; 6 asimetrik alkilasyon ile birlikte kiral enolatları ve katalitik asimetrik dihidroksilasyon formları, reaksiyonlarda anahtar rol oynamaktadır. Ciufolini'nin 3-siyanopiridan protokolü; 20(S)-Kamptotesin

için; iyi bir enanatiyoselektiflik sağlayan sentez yöntemidir. Domuz ciğeri esterazında hazırlanan, (S)-aldehit 5'in enzimatik çözünürlüğünde, orta seviyede sentetik olduğu da gözlenmiştir (Sang-sup Jew et. al., 2000).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- MCF7 insan meme adenokarsinoma epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- HeLa insan serviks karsinoma epiteli (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi)
- Hegzadesiltrimetilamonyum bromür $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$ (Sigma Aldrich)
- Altın (III) klorür hidrat $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{aq}$ (Sigma Aldrich)
- Camptothecin (Sigma Aldrich)
- Oktan $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ (Sigma Aldrich)
- N-Oktanol $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$ (Merck)
- Sodyumbor hidrür NaBH_4 (Merck)
- Sisteamin hidroklorür $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ (Sigma Aldrich)
- 1,1'-Karbonildiimidazol $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_4\text{O}$ (Sigma)
- Demir (II) sülfat heptahidrat $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka)
- Kloroform CHCl_3 (Merck)
- Min. Essential Medium (Mem Eagle) (Lonza)
- L-Glutamine (Lonza)
- Essential amino acid (Lonza)
- Sodyum pruvat (Lonza)
- Fetal bovine serum (Biowest)
- Penisilin/ streptomisin (Lonza)
- Tripan mavisi (Bio. Ind.)
- PBS (Amresco)
- Tripsin EDTA (Lonza)
- Şişe üstü 500 ml, 70 mm Diatemer Selüloz asetat filtre (Corning)
- pH = 7 Tamponu (Merck)
- Serum Fizyolojik (SF) (% 0.9 NaCl çözeltisi)
- Triton X100 (Sigma)
- İyot-131 (^{131}I) (Şifa Hastanesi, Türkiye)
- Iodogen, 1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α -difenil-glikoluril (Sigma Aldrich)

- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)
- N-bütanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$) (Merck)
- Asetik asit (CH_3COOH) (Merck)
- İzopropil alkol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) (Merck)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- Diklorometan (CH_2Cl_2) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Amonyak (NH_3) (Merck)
- Dimetilsülfoksit ($\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Merck)
- ITLC-SG Selüloz kaplı plastik şeritler (Merck)
- Elektroforez Kağıdı (Whatman 1)
- 1.17-1.21 Tesla NdFeB mıknatısları (Mega Hand)
- Cell Counting Kit-8 (WST-8) (Sigma Aldrich)
- Dead END Fluorometric TUNEL System (Promega)
- BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay kit (Thermo Scientific Pierce)

3.1.2 Kullanılan cihazlar

- RadyoTLC (Bioscan 2000) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gamma sayım sistemi (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC (ShimadzuSCL-10AVP) (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Kağıt Elektroforezi (Gelman) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC küvetleri (Sigma) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Millipor (Milli-Q Gradient A-10) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

- Doz Kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Laminar Flow Kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO₂ inkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Işık mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Memmert) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacı (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim. Dalı.)
- TEM (Transmission Electron Microscopy) (JEOL JEM 2100F HRTEM) (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı)
- SEM (Scanning Electron Microscopy) (Phillips XL-30 S FEG) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- XRD (Phillips X'Pert Pro) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (Cryogenic Limited PPMS) (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı)
- Infrared Spektrofotometre (FT-IR) Cihazı (Agilent Cary 660) (Celal Bayar Üniversitesi, Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi)

- DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

3.2 AuFe Nanoparçacıkların Sentezi

AuFe nanoparçacıklarını elde etmek için; Jun Lin ve arkadaşlarının üzerinde geniş çapta çalışmalar yaptığı misel metodu kullanılmıştır (Lun Jin et.al., 2001).

0,33 gram FeSO_4 2,4 mL bidistile su içerisinde çözülerek 0,5 M 'lık çözeltisi hazırlandı. Bidistile su kullanılmadan önce 15 dakika boyunca argon gazından geçirildi. 6,0 g CTAB, 6,25 mL 1-Bütanol (5,0 g) ve 21,45 mL Oktan (15,0 g) hazırlanan 0,5 M lık FeSO_4 çözeltisi ile karıştırılarak bir süre argon gazına tabii tutuldu. Ayrıca 2,4 mL 1,0 M NaBH_4 çözeltisi suda hazırlandı ve argon gazından geçirildi. Hazırlanan NaBH_4 çözeltisi içerisine; 6,0 gram CTAB, 6,25 mL 1-Bütanol (5,0 gram) ve 21,45 mL Oktan (15,0 gram) ilave edildikten sonra bir süre Argon gazından geçirildi. Hazırlanan çözeltiler bir balona önce FeSO_4 içeren çözelti konuldu ve üzerine NaBH_4 içeren çözelti ilave edildi ve sistem sürekli olarak argon gazı altında tutularak 60 dakika kadar hem homojenizatör hem de manyetik bar ile karıştırıldı. Prosesin bu aşaması ilk basamak olmakla birlikte demir nanoparçacıkları bu aşamada oluşturuldu.

Prosesin ikinci basamağında ise elde edilmiş olan demir nanoparçacıkları altın ile kaplandı. 1,8 mL 0,44 M HAuCl_4 çözeltisi bidistile suda hazırlandı. 3,0 gram CTAB, 2,5 gram 1-Bütanol (3,125 mL) ve 15,0 gram oktan (21,45 mL) hazırlanan HAuCl_4 çözeltisi ile karıştırıldı ve bir süre argon gazı altında bekletildi. Diğer taraftan, 1,8 mL 1,6 M NaBH_4 çözeltisi hazırlanarak içine 3,0 gram CTAB, 3,125 mL 1-Bütanol (15,0 gram) ve 21,45 mL Oktan (15,0 gram) ilave edildi. Hazırlanan bu çözelti de argon gazından geçirildikten sonra, çözeltiler bir önceki aşamada elde edilen demir nanoparçacıklarının bulunduğu balona, ilk önce içinde HAuCl_4 bulunan çözelti daha sonra da NaBH_4 bulunan çözelti olmak üzere sırasıyla ilave edildi. Yaklaşık 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında karıştırılarak reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Reaksiyon argon gazı altında ve karanlık bir ortamda gerçekleştirildi.

3.2.1 AuFe nanoparçacıklarının yüzey modifikasyonu

AuFe nanoparçacıklarına kamptotesin'in konjuge edilmesi için yüzey modifikasyonu yapılması gerekmektedir. Bu amaçla AuFe nanoparçacıklarının yüzey modifikasyonu sisteamin ile gerçekleştirilmiştir.

Yüzey modifikasyonu için 10 mg AuFe nanoparçacıkları suda çözüldü ve üzerine 0,2 M sisteaminhidroklorür eklendi ve sonrasında vorteks ile karıştırıldı. Nanoparçacıklar 24 saat karanlık ortamda üç boyutlu orbital karıştırıcı kullanılarak karıştırıldı. Karıştırmanın ardından reaksiyona girmeyen sisteamini ortamdan uzaklaştırmak için birkaç kez santrifüjlendi. Elde edilen nanoparçacıklar kurutuldu.

3.2.2 AuFe nanoparçacıklara kamptotesin'in konjugasyonu

1,25 gram CDI tartılarak tüpe konuldu. 1 mg Kamptotesin 1 mL DMSO içerisinde çözüldü ve çözeltisinin 500 μ L si üzerine 1,25 gram CDI eklendi. Karışım 2 saat boyunca vorteks ile karıştırıldı. Karıştırmanın ardından ortamdaki DMSO'yi uzaklaştırmak için argon gazı kullanıldı. Yüzey modifikasyonunu gerçekleştirdiğimiz AuFe nanoparçacıkları daha önceden hazırlanmış olan 0,1 M 5,0 mL Na_2CO_3 tamponunda çözüldü. Na_2CO_3 tamponu konjugasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan pH:10 koşulunu sağlamak için kullanılmıştır. Elde edilen çözelti argon altında kurutulan Kamptotesin üzerine eklendi ve orbital karıştırıcı üzerinde 24 saat karıştırılarak reaksiyonun tamamlanması sağlandı.

3.2.3 Kamptotesin'in nanoparçacıklara bağlanma veriminin belirlenmesi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) sıvı fazda çözünebilen kimyasal bir karışımı bileşenlerine oldukça hızlı ve kolay bir şekilde ayırabilen, duyarlılığı ise diğer yöntemlere göre daha fazla olan bir yöntemdir (Macherey-Nagel, 2006). Kamptotesin'in AuFe nanoparçacıklarına bağlanma veriminin bulunmasında HPLC yöntemi kullanıldı.

Çalışma oda sıcaklığında, mobil faz olarak Asetonitril kullanılarak 1 mL/dakika akış hızı ve 254 nm dalga boyu koşullarında Nucleodur 100-5 RP-C18 (Macherey-Nagel) (250 x 4.6 mm I.D) kolon kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.1 HPLC yönteminde kullanılan kromatografik koşullar

Kolon	RP-C18 (250 x 4,6 mm I.D)
Akış hızı	1 mL/dakika
Dalga boyu	254 nm
Mobil faz	Asetonitril

Kamptotesin'in 6 farklı konsantrasyonunun (1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,0625 µg/mL, 0,03125 µg/mL) 10µl lik hacimlerinin enjeksiyonu yapılmış ve 254 nm de elde edilen pik alanlarından kalibrasyon grafiği çizilmiştir. AuFe nanoparçacıkları ile Kamptotesinin konjugasyonu sonrasında reaksiyona girmeyen Kamptotesin'i içeren üst fazın aynı koşullarda analizi yapılmış ve elde edilen pik alanı değeri kalibrasyon grafiği ile değerlendirilerek Kamptotesin'in AuFe nanoparçacıklarına bağlanma verimi tespit edilmiştir.

3.2.4 Manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi

Sentezlenen AuFe nanoparçacıklarının yüzey morfolojileri hakkında bilgi edinmek ve boyutlarını belirlemek için SEM (Phillips XL-30 S FEG) cihazı kullanıldı. Manyetik nanoparçacıklar metanol içerisinde dağıtıldı. Analiz esnasında, parçacıkların kuru olması gerektiği için SEM cihazına ait çelik tabakaların üzerine yapıştırılan alüminyum bantların üzerine nanoparçacıklar konuldu. Metanolün uçması için bir süre beklendi ve SEM cihazı ile görüntüler alındı. SEM analizi ile birlikte EDX analizi yapılarak nanoparçacıkların atomik bileşenleri ve bu bileşenlerin kütlece yüzdeleri hakkında bilgi edinildi.

Sentezlenen AuFe nanoparçacıklarda altın kaplamanın gerçekleşip gerçekleşmediği tespit etmek için TEM cihazına ait bakır gridler üzerine damlatılan örnekler kısa bir süre metanolün uçması için bekletildi ve analiz TEM (JEOL JEM 2100F) cihazı ile gerçekleştirildi.

DLS (Malvern Nano-ZS) cihazı ile AuFe nanoparçacık örneklerinin ortalama parçacık boyutları tespit edildi. Analiz öncesinde sentezlenen nanoparçacıklar metanol içerisinde dağılmış halde iken 10 dakika sonikatör cihazına tabii tutuldu ve oluşan agregatlaşmanın minimum seviyeye inmesi sağlandı. Homojenize edilen nanoparçacıklar 22 μm 'lik filtreden geçirildi ve DLS cihazında parçacıkların ortalama boyutları bulundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak sentezlediğimiz manyetik nanoparçacıkların ortalama parçacık boyutu elde edildi.

XRD (Phillips X'Pert Pro) cihazına verilen örnekler, kolimotörden geçirildikten sonra monokromatik hale gelen X-ışınları ile ışınlanarak, nanoparçacıkların kristal yapıları hakkında verilere ulaşıldı.

VSM (Cryogenic Limited PPMS) cihazı ile sentezlediğimiz AuFe nanoparçacıklarının manyetik özelliği ölçüldü. Kurutulan örnekler, analiz öncesinde 300 mg olacak şekilde hassas olarak tartıldı. -1,5 ve +1,5 Tesla arasında uygulanan manyetik alan aralığında, 0,1 emu/g duyarlılığında, manyetik nanoparçacıkların manyetik momenti ölçüldü. Ölçümden elde edilmiş olan manyetik moment değeri (emu) örnek miktarına bölünerek gram başına düşen manyetik moment değerleri bulundu (emu/g). Uygulanan manyetik alanlara karşılık gelen emu/g değerleri grafiğe geçirilerek manyetik nanoparçacıkların manyetik doygunluğa ulaştığı emu/g değeri hesaplandı.

3.2.5 Yapısal analiz çalışmaları

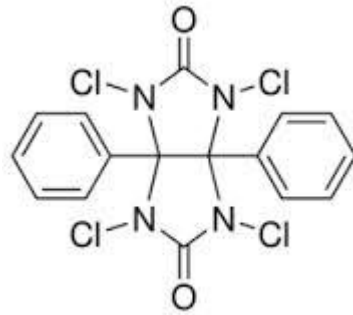
AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in (AuFe-Kamp) yapısal analiz çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada FT-IR yöntemi için Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Agilent Cary 660 cihazı kullanıldı. Kuru haldeki örnekler KBr ile pellet haline getirildi. Analiz sonucunda elde edilen spektrum yorumlandı.

3.3 ^{131}I ile İşaretleme Çalışmaları

3.3.1 İodojen yöntemi

IUPAC'a göre 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril olarak adlandırılan iodojen, radyoiyodinasyonda kullanılan yükseltgeyici bir ajandır. İodojen ilk defa Fraker ve Speck tarafından hücre membranı ve proteinlerin radyoiyodinasyonunda kullanılabilecek bir reaksiyon olarak tanımlanmıştır (Fraker P.J. ve Speck J.C., 1978).

İodojen suda çözünmez, kloroform veya diklorometanda çözünür ve çözgenin buharlaşmasıyla ince bir kağıt halinde içinde bulunduğu kabın duvarlarına kaplanır. Böylece oksidasyon reaktifi ile organik bileşiğin çok zayıf bir teması bile işaretleme olayının gerçekleşmesine olanak sağlar. İşaretleme, sıvı fazdaki organik bileşik ve I^- ile iodojen filmin teması sonunda iyodürün yükseltgenerek organik bileşiğe bağlanması ile meydana gelir. Reaksiyon katı fazda iodojen bulunan kapta reaksiyon çözeltisi ayrılarak son bulur.



Şekil 3.1 İodojen'in moleküler yapısı

İodojen tüplerinin hazırlanması için 1 mg iodojen tartılır ve 1 mL diklorometan içerisinde çözülür. Radyoiyodinasyon işlemi için 250 μg lık iodojen tüpüne ihtiyaç duyulduğu için elde edilen çözelti dört ayrı deney tüpüne eşit bir biçimde aktarılır. Daha sonra bu tüpler diklorometanın buharlaşması için bekletildi. Diklorometan uzaklaştırıldıktan sonra 250'şer μg 'lık iodojen cam tüplerin yüzeyine bir film tabakası şeklinde kaplanmıştır.

3.3.2 Kamp ve AuFe-Kamp'ın ^{131}I ile işaretlenmesi

3.3.2.1 Kamp'ın ^{131}I ile işaretlenmesi

1,0 mg Kamptotesin 1 mL DMSO içerisinde çözöldü. Önceden hazırlanmış iodojen tüpü içerisinde sırasıyla; 500 µl bidistile su, 250 µl Kamptotesin ve 100 µCi ^{131}I ilave edildikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak için çözelti iodojen tüpü içinden alındı. İşaretleme verimini tespit etmek için TLRC ve kağıt elektroforezi gibi kromatografik yöntemler kullanıldı.

3.3.2.2 AuFe-Kamp'ın ^{131}I ile işaretlenmesi

AuFe-Kamp çözeltisinden 25 µl alındı. İodojen tüpü içerisinde sırasıyla, 75 µl bidistile saf su, 25 µl AuFe-Kamp ve 35 µCi ^{131}I ilave edildi ve 20 dakika işaretleme işleminin gerçekleşmesi için beklenildi. 20 dakika sonunda reaksiyonu sonlandırmak için çözelti iyodojen tüpünden alındı. Daha sonra işaretleme veriminin tespit edilebilmesi için kromatografik yöntemler kullanıldı.

3.4 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler

3.4.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi

İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile kalite kontrolü yapılacak numune radyoaktif bir bileşen içeriyorsa, yapılan bu işlem; ince tabaka radyo kromatografisi adını almaktadır. Yapılmış olan bu çalışmada; ince tabaka radyo kromatografisi yöntemi kullanıldı ve TLC Scanner cihazı ile sayımlar alınıp Relatif Front (R_f) değerine ulaşıldı.

Kalınlığı 0,1 mm olan silikajel ile kaplı TLC'ler; 1,5 cm eninde ve 10 cm boyunda (1,5×10 cm) dikkatlice kesildikten sonra çözöcöye değecek olan kısımlarından 1 cm yukarıda olacak şekilde uygulama noktaları belirlendi. Uygun çözöcö tespiti yapıldıktan sonra banyo tankına çözöcö konularak kapağı kapatıldı

ve buharı ile doymuş hale gelmesi sağlandı. TLC üzerindeki noktalara ^{131}I , yükseltgenmiş ^{131}I , ^{131}I -Kamp ve ^{131}I -AuFe-Kamp kapiler yardımı ile ayrı ayrı damlatıldıktan sonra kuruması için bekletildi. Kuruduktan sonra tanka uygun bir şekilde yerleştirildi. Burada dikkat edilmesi gereken husus, çözücü numunenin uygulandığı noktaya kesinlikle değmemelidir. Çözücü şeridin sonuna ulaşmadan tanktan çıkartıldı ve kuruması için bir süre bekletildi. Şeritler üzerindeki aktivitenin sayılması için TLC Scanner (BioscanAR 2000) cihazı kullanılarak, numunenin yürüdüğü mesafenin, çözücünün yürüdüğü mesafeye oranı (R_f) değeri ve işaretleme verimleri tespit edildi. Deneyler en az 5 kez tekrarlandı.

Kullanılan TLRC banyo çözeltileri:

- ✓ TLRC-1: diklorometan:metanol (9:1)
- ✓ TLRC-2: n bütanol:su:asetik asit (4:2:1)
- ✓ TLRC-3:kloroform:asetik asit (9:1)
- ✓ TLRC-4: n bütanol:etil alkol:0.2N NH_4OH (5:2:1)
- ✓ TLRC-5: izopropil alkol:n bütanol:0.2N NH_4OH (2:1:1)
- ✓ TLRC-6: izopropil alkol:n bütanol:0.2N NH_4OH (4:2:1)

3.4.2 Kağıt elektroforezi yöntemi

Poliselüoz asetat olan elektroforez kağıtları, 1,5 cm eninde ve 20 cm boyunda olacak şekilde kesildi. Tam orta noktaları uygulama noktası olarak işaretlendi. Elektroforez kağıdı sağ ve sol olmak üzere uç kısımları pozitif ve negatif kutup olarak işaretlendi. Kağıt elektroforezi yönteminde TLRC-2: n-Bütanol/su/asetik asit (4:2:1) banyo çözeltisi olarak kullanıldı. İşaretli kağıtlar banyo çözelti ile ıslatıldıktan sonra, elektroforez kabına uygun bir şekilde yerleştirildi ve uygulama noktalarına ^{131}I , yükseltgenmiş ^{131}I , ^{131}I -Kamp ve ^{131}I -AuFe-Kamp damlatıldı. Kapalı ortamda 0-125 mA ve 250 Volt gerilim altında yaklaşık iki saat bekletildi. İki saatin sonunda alınan elektroforez kağıtları oda sıcaklığında kurutulduktan sonra TLC Scanner cihazı ile sayımı yapıldı.

3.4.3 Lipofilite tayini

n-oktanol ve PBS (fosfat tampon çözeltisi) aralarında faz oluşturan heterojen bir karışımdır. Her iki çözeltiden de eşit hacimlerde alınır ve işaretlenmiş bileşik üzerine ilave edilir. 300 µl n-oktanol, 300 µl PBS ve 100 µl ¹³¹I işaretli Kamptotesin karışımı 1 dakika kadar vortekslenir. 2500 rpm de 30 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst ve alt fazlar birbirinden ayrıldı. Burada PBS polar bir çözügendir ve hidrofilik kısmı oluşturmaktadır. n-oktanol ise; apolar bir çözügendir ve lipofilik kısmı oluşturur, dolayısıyla tüpte alt kısım PBS yani su fazı, üst kısım ise n-oktanol yani yağ fazıdır. Alt (su) ve üst (oktanol) fazlar birbirinden ayrılarak aktiviteleri Cd(Te) dedektöründe sayıldı. Alınan sayımlara göre, ¹³¹I işaretli Kamptotesin'in alt ve üst fazdaki aktivitelerine göre hidrofilik ve lipofilik çözeltilerdeki çözünürlükleri kıyaslanarak, lipofilite değerleri bulundu. Bulunan bu deneysel lipofilite ile ACD (Advanced Chemistry Development, Inc., (ACD/Labs 5.0) programı kullanılarak bulunan teorik lipofilite karşılaştırıldı.

3.4.4 Stabilite tayini

Kamptotesin'in stabilite tayinini gerçekleştirmek için Kamptotesin 100 µ Ci ¹³¹I ile işaretlendi ve işaretleme için gerekli olan 20 dakikanın sonunda ayrı bir tüpe alındı. AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilen Kamptotesin için de aynı şekilde işaretleme işlemi yapıp işaretleme sonunda ayrı bir tüpe alındıktan sonra tüpler oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. 0, 30, 60, 240 ve 1440. dakikalarda tüplerden örnekler alınarak TLC şeritler üzerine damlatıldı ve TLRC-1 banyo çözeltisinin bulunduğu tanka yerleştirildi. Örneklerin TLC şerit üzerinde yeteri miktarda yürümesi sağlandıktan sonra tanktan çıkartılarak kurutuldu. TLC Scanner ile sayımları yapılan ¹³¹I ile işaretli Kamptotesin ve AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilen Kamptotesin'in belirlenen zaman aralıklarındaki işaretleme verimleri tespit edildi.

3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Yapılan bu tez çalışmasında, Kamp ve AuFe-Kamp hücre düzeyindeki etkinliklerinin incelenmesi için MCF7 insan meme adenokarsinoma ve HeLa

insan serviks karsinoma epitelleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan MCF7 epiteli American Type Culture Collection'dan (Rockville, MD, ABD) ve HeLa epiteli Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesinden temin edilmiştir.

MCF7 ve HeLa hücreleri minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pirüvat ve % 10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyumda üretildi.

MCF7 ve HeLa hücreleri bulundukları flaskların % 80 lik kısmını kaplayana kadar üretildikten sonra, % 0.25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak bulundukları flaskın tabanından ayrılmalari sağlandı.

Kullanılmayacak olan hücreler, % 5 DMSO içeren medyumları içine koyularak -80°C'de dondurulup, -190 °C sıvı azot içinde stoklandı.



Şekil 3.2 MCF7 ve HeLa hücre hatlarının inkübasyonu.

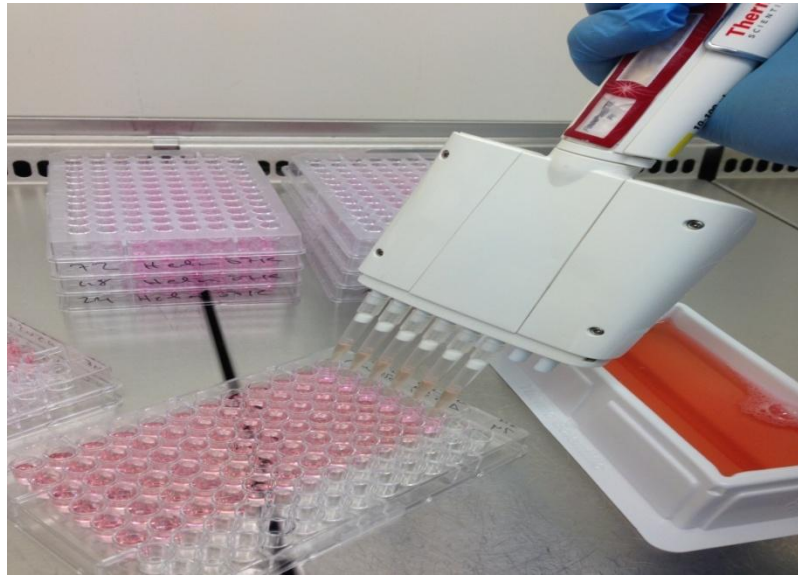
3.5.1 Sitotoksisite çalışmaları

MCF7 ve HeLa hücreleri kullanılarak Kamp ve AuFe-Kamp'ın sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirildi.

WST-8 testi ile kolorimetrik olarak, % 50 ölüm oranına neden olan konsantrasyon aralığı (IC₅₀) bulundu. 96 kuyucuklu mikrotiplerle her bir kuyucuğa 10⁵ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonları konuldu. Her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu konuldu. Kontrol dışında kalan kuyucuklara ise Kamp ve AuFe-Kamp çözeltileri eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Yapılan bu çalışmada, her bir parametre üç defa tekrar edilerek çalışıldı.

Hücreler CO₂ inkübatöründe 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ varlığında 24 ve 48. saate kadar inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğun üzerine 10 µl WST solüsyonu eklendi. Dört saatlik inkübasyon süresi sonunda 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometresi kullanılarak okundu. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edildi. Aşağıdaki formülden yararlanılarak % sitotoksisite değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ sitotoksisite} = 1 - (\text{ölçülen optik densite değeri} / \text{kontrol değeri}) \times 100$$



Şekil 3.3 MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmaları

3.5.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişiminin incelenmesi

MCF7 ve HeLa hücreleri yeteri kadar üretildikten sonra 24'lük plakalara alındı. Yapılan bu çalışmada 30. dakika, 60. dakika, 120. dakika ve 240. dakika olmak üzere 4 farklı zaman parametresi denenerek Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücreleri üzerindeki tutulumları belirlendi.

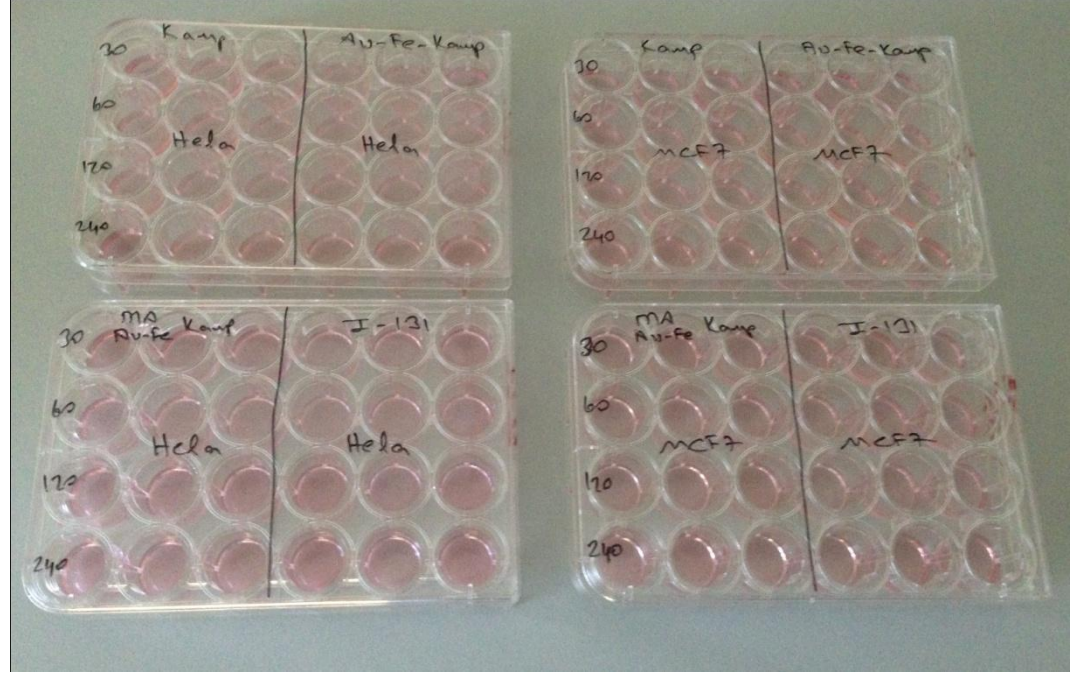
Her bir kuyucuğa 1 µg/mL Kamp ve 1 µg/mL AuFe-Kamp konuldu. Örneklerin işaretlemeleri her bir kuyucuğa 1 µCi/mL aktivite düşecek şekilde gerçekleştirildi ve işaretli örnekler besiyer ile karıştırıldı. Kuyucuklar üzerindeki besiyer atılarak, ölü hücreler ortamdaki uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 2 defa yıkandıktan sonra kuyucukların üzerine ¹³¹I ile işaretlenen örneklerin bulunduğu besiyerler ilave edildi ve 37°C' de inkübasyona bırakıldı. Bileşiğin etkisini incelemek amacıyla yukarıda bahsedilen prosedür sadece ¹³¹I kullanılarak uygulandı.

AuFe-Kamp iki farklı grupta çalışıldı. Gruplardan birisinin çalışıldığı kuyucukların altına eşit büyüklükte ve eşit manyetik akım yoğunluğuna (1,17-1,21 Tesla) sahip NdFeB mıknatısları konularak manyetik alan uygulanırken diğer grubun çalışıldığı kuyucukların altına manyetik alan uygulanmadı. Bu şekilde manyetik alan uygulamanın bağlanma etkinliği üzerine etkisi incelendi.

Hücreler üzerindeki ¹³¹I ile işaretlenmiş örnekleri içeren besiyerler sırasıyla; 30. dakika, 60. dakika, 120. dakika ve 240. dakikalarda atılmasının ardından, PBS ile 2 defa yıkandı. Yıkama işlemini takiben her bir kuyucuğa, 200'er µL Ripa tampon çözeltisi ilave edildi ve pipet ile mekanik olarak zorlanarak hücrelerin süspansiyon hale gelmeleri sağlandı.

Her bir kuyucuktan alınan 100 er µL hücre süspansiyonları içerisine 900'er µL sintilasyon sıvısı ilave edildikten sonra örnekler Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacında sayıldı. Ripa tamponu ile yüzeyden kaldırılmış hücreleri içeren çözeltilerden 25'er µL alınarak protein analizi Multimode Mikroplaka Okuyucu cihazı kullanılarak Bicinchoninic asit yöntemi ile 562 nm de tespit

edildi. Protein sonuçlarından elde edilen verilere göre, hücre başına düşen aktivite miktarları hesaplandı. Elde edilen bu değerler ile kontrol gurubundan elde edilen değerler oranlanarak bağlanma yüzdeleri hesaplandı.



Şekil 3.4 MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması.

3.5.3 Proliferasyon çalışmaları

Kamp ve AuFe-Kamp'ın proliferasyon çalışmaları MCF7 ve HeLa hücre hatları kullanılarak WST-8 testi ile yapılmıştır.

Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuk içeren mikrolatelerde her bir kuyucuk başına 10^5 hücre/mL olacak şekilde 100 μ l besiyer içinde ilave edildi. Kontrol grubu dışındaki kuyucuklara; 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, 6,25 μ g/mL, 3,125 μ g/mL, 1,5625 μ g/mL olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda Kamp ve AuFe-Kamp çözeltileri ilave edildi. Negatif kontrol grubu için hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için hücre sayıları bilinen MCF7 ve HeLa hücreleri kuyucuklara ilave edildi.

Hücreler 37°C ve % 5 CO₂ ortamında 24 ve 48. saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 10 μ l WST-8 solüsyonu ilave edildi ve dört

saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD) spektrofotometre kullanılarak okundu. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. Çalışmada her bir parametre üçer defa tekrarlandı.

3.5.4 Hücre migrasyonu çalışmaları

Yapılan hücre migrasyonu çalışmasıyla Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücrelerinde mekanik olarak yaratılan hasarlı bölgedeki hücre migrasyonuna etkisi incelenmiştir. Hücre migrasyonu etkisi için zaman ve konsantrasyon parametreleri değerlendirildi.

Bu çalışma için MCF7 ve HeLa hücreleri 24'lük plakalara hazırlandı. Kuyucuk başına 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL ve 3,12 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan Kamp ve AuFe-Kamp örnekleri besiyer içerisinde hücreler üzerine eklendi. Kontrol grubu olarak örnek içermeyen besiyer kullanılarak hücrelere uygulandı. Mekanik hasar oluşturmak için pipet ucu ile plağın tabanı çizilerek hasarlı bölge oluşturuldu. Hücreler 0.dakika ve 6, 12, 24, 36, 48, 72. saatlerde invert mikroskop ile görüntüleri alındı. Alınan görüntülerde image j programı ile kareleme yapıldı. Kontrol ve deney gurubundaki karelerde kapanma oranları karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

3.5.3 Apoptosis çalışmaları

Tunnel yöntemi kullanılarak Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkileri incelendi.

Apoptosis çalışmasında her bir grupta en az 300 hücre değerlendirmeye tabii tutulmuştur. Chamber slide'ların üzerine hücre ekimleri gerçekleştirildi ve 24 saat geçtikten sonra üzerlerindeki besiyer atıldı. Hücrelerin % 50 sini öldürmek için gerekli olan dozda örnekleri içeren besiyerler hücrelerin üzerine eklendi. 24 saat inkünasyon sonunda her bir kuyucuktaki besiyerler atıldı ve kuyucuklar 2 kez PBS ile yıkandı. Chamber slide üzerindeki plastik çıkarıldı ve çalışma hücrelerin üzerinde bulunduğu lamalar ile devam ettirildi. Cam şale içerisine PBS (pH:7,4) içerisinde hazırlanmış olan % 4'lük paraformaldehidin çözeltisi ilave edildi. +4°C

sıcaklık sağlandıktan sonra hücrelerin üzerinde bulunduğu lamlar bu cam şale içerisine yerleştirilerek 25 dakika kadar bekletildi. 25 dakikanın hemen ardından çözelti içerisinden çıkartılan lamlar PBS içerisinde hazırlanmış % 0,2 Triton-X çözeltisi içerisine atılarak hücrelerin daha geçirgen bir forma ulaşması sağlandı. Bu çözelti içerisinde ise 5 dakika bekletildikten sonra cam lamlar 5 er dakika süre ile 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin hemen ardından lamlar üzerine 100 µl equilibration tamponu eklendi ve 10 dakika boyunca bu tampon içerisinde kalması sağlandı. Bu süre içerisinde ise; 90 µl equilibration tamponu, 10 µl nükleotit karışımı ve 2 µl rTdT enzimi karıştırılarak rTdTinkübasyon tamponu hazırlandı. Yıkama işlemi sonunda lamlar üzerinde kalan PBS uzaklaştırıldı, hazırlanan tampon çözelti lamların üzerine döküldü ve lamel ile lamların üzeri kapatıldı. Etüvde, 37 °C sıcaklıkta 60 dakika kadar bekletildi. Bu sürenin sonunda ise 2XSSC içinde ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek reaksiyonun durması sağlandı. Lamlar 5 er dakika boyunca 3 kez PBS çözeltisi ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamların üzerine propidyum iyodid damlatıldı ve lamel ile üzerleri kapatıldı. Son olarak floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreleri ile inceleme yapıldı.

3.5.6 İstatik analizler

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri GraphPad istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her bir parametre için iki ayrı denemede toplam altı tekrar yapıldıktan sonra ortalama bağlanma değerleri ile standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Her bir parametre seviyesi için elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için ANOVA analizi yapılmıştır. Bağlanma değerleri arasında 0,95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerleri incelenerek tespit edilmiştir. 0,05' den küçük P değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Sitotoksite çalışması sonucunda IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için nonlineer regresyon analizi yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

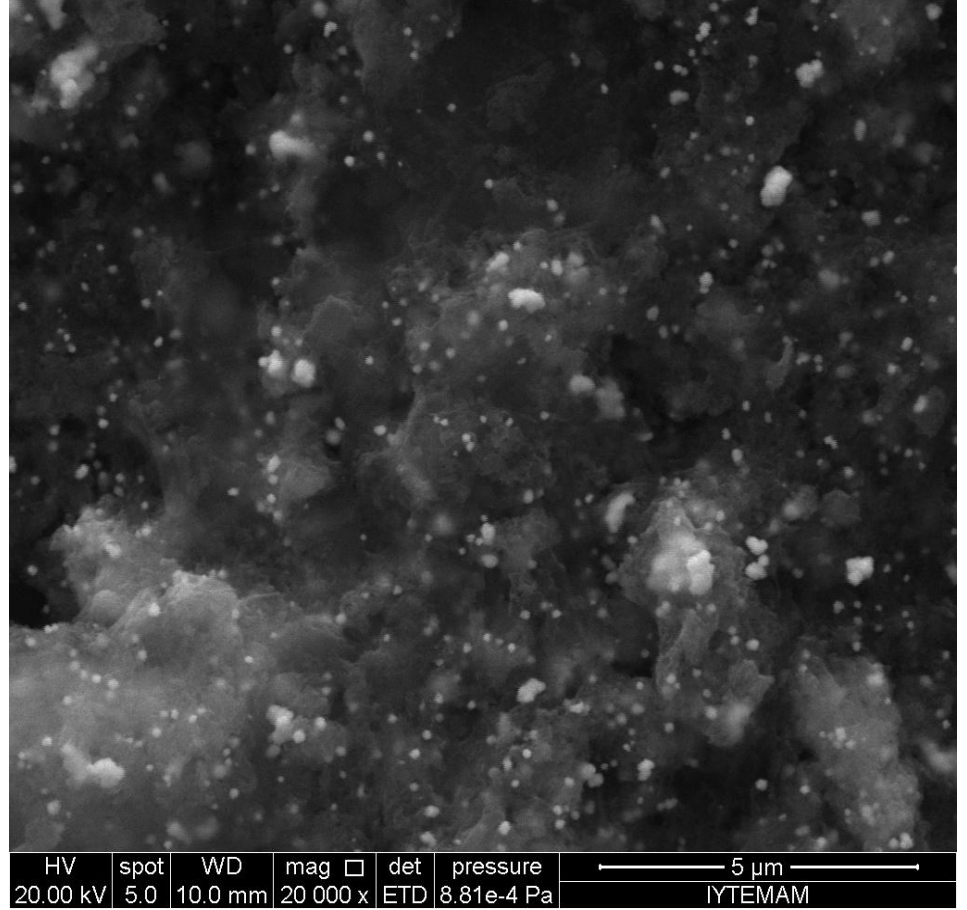
4.1 AuFe nanoparçacıkların özelliklerinin incelenmesi

4.1.2 SEM Analiz sonuçları

Sentezlenen AuFe nanoparçacıklarının SEM görüntüleri; İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde yer alan SEM (Scanning Electron Microscopy) Phillips XL-30 S FEG marka cihazdan alınmıştır.

SEM görüntüleme cihazı ile sentezlenen AuFe nanoparçacıklarının yüzey morfolojisi ve kompozisyonu hakkında önemli veriler elde edildi. TEM görüntüleme sisteminden farklı olarak, elektron demeti çok ince bir örnek kesitinin içinden geçer ve örneğin morfolojisi ile birlikte görüntüler CCD kamera (Charge Coupled Device) kullanılarak alınır (Gerstbach, 1996).

SEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen AuFe nanoparçacık boyutlarının 53,73 nm ile 127,8 nm arasında değiştiği görülmektedir. SEM görüntülerinden elde edilen verilere göre ortalama parçacık boyutu 81,90 nm olarak hesaplanmıştır. Bu değer nanoteknolojide tanımlanan maksimum nanoparçacık boyutu olan 100 nm'nin altında kalmaktadır. SEM görüntülerinde bir miktar agregatlaşma olduğunu gözlenmiştir. Görüntülerde yer alan 127,8 nm parçacık boyutları ise agregatlaşmadan kaynaklanmaktadır.



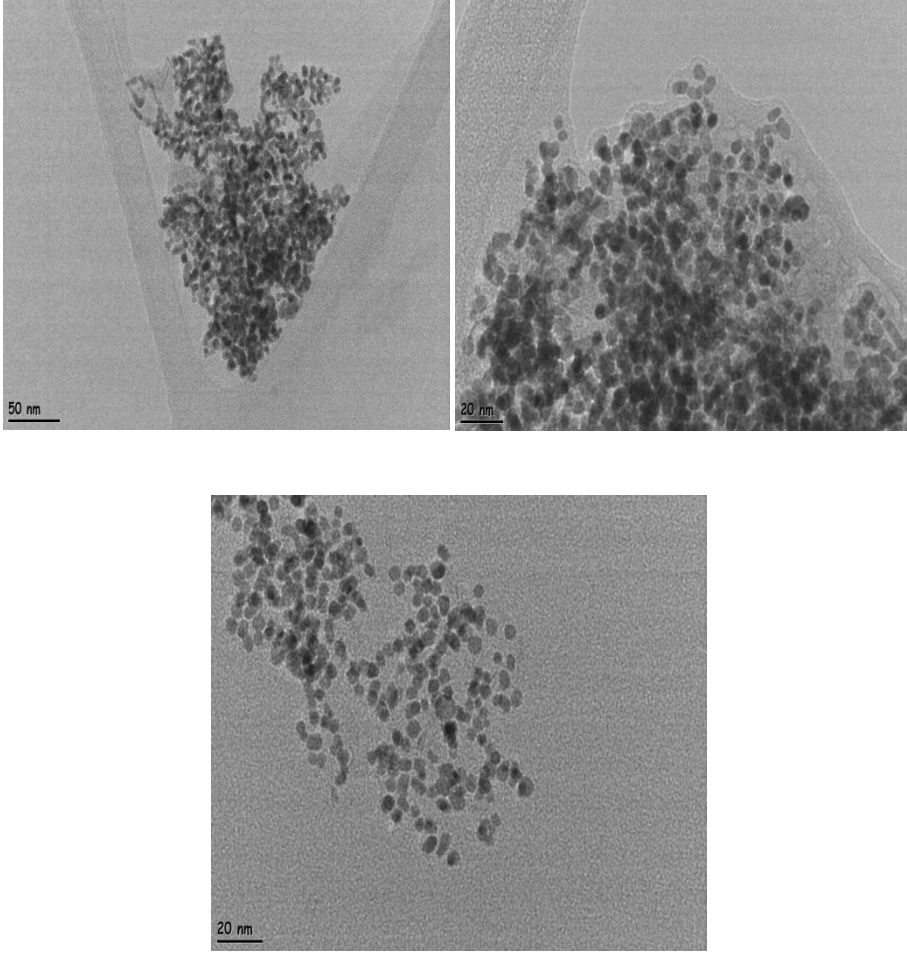
Şekil 4.1 AuFe nanoparçacıklarının SEM görüntüsü

SEM görüntüleri ile AuFe nanoparçacıklarının yüzey morfolojisi ve boyut dağılımı ile ilgili yeterli bilgi elde edilemediğinden daha hassas sonuçlar için nanoparçacıkların TEM görüntüleri alınmıştır.

4.1.1 TEM analiz sonuçları

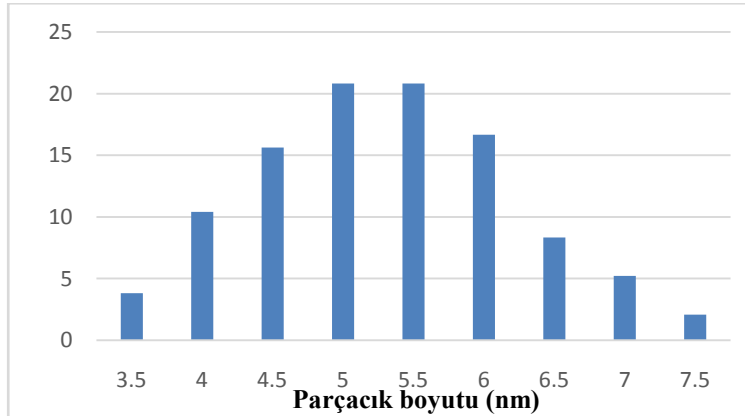
AuFe nanoparçacıklarının boyut analizi ve yüzey morfolojilerinin incelenmesi işlemi Orta Doğu Teknik Üniversitesi TEM JEOL JEM 2100F HRTEM model cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Geçirimli elektron mikroskobu, optik mikroskoba kıyasla çok daha küçük ayrıntıları nano boyutta görmeye imkan tanır. TEM cihazından alınan görüntüler incelendiğinde demir çekirdeklerinin altın tabakası ile başarıyla kaplandığı görülmektedir.



Şekil 4.2 AuFe nanoparçacıklarının TEM görüntüleri

Elde edilen TEM görüntülerinden AuFe nanoparçacıklarının homojen bir boyut dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir. GraphPad programı ile TEM görüntülerinin istatistiksel analizleri yapıldı ve AuFe nanoparçacıklarının ortalama boyutlarının $5,25 \pm 0,92$ nm olduğu belirlendi.

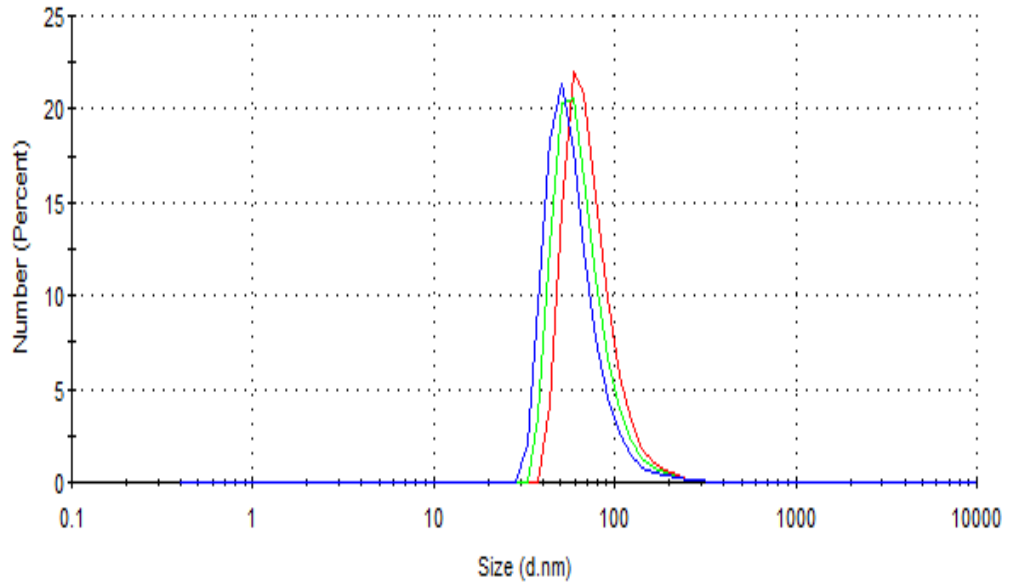


Şekil 4.3 AuFe nanoparçacıklarının boyut histogramı

Pham ve arkadaşları sentezledikleri altın-demir nanoparçacıklarının boyutlarını 7,07 nm ile 12,9 nm arasında, Srikanth ve arkadaşları ise 7 nm civarı, Chauhan ve arkadaşları ise 20 nm ile 30 nm arasında değişen boyutlarda AuFe nanoparçacıkları sentezlemişlerdir (Srikanth H. Et. al., 2001; Chauhan N. et.al., 2014; Pham T. et.al., 2008).

4.1.3 DLS analiz sonuçları

DLS (Dynamic Light Scattering) analizi ile sentezlenen AuFe nanoparçacıklarının ortalama boyutları hakkında bilgi sahibi olundu. Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda DLS (Dynamic Light Scattering) Malvern Nano-ZS model cihazı ile analiz yapıldı. Analiz sonucunda AuFe nanoparçacıklarının ortalama parçacık boyutu $74,63 \pm 28,16$ olarak bulundu.



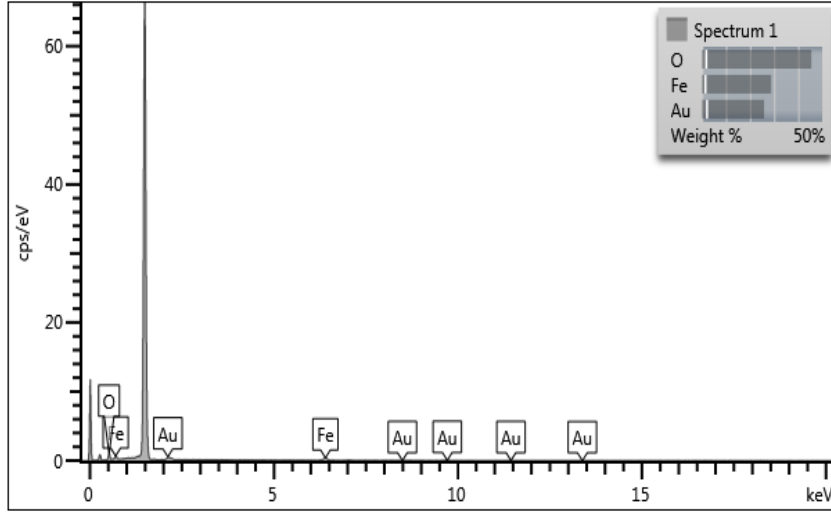
Şekil 4.4 AuFe nanoparçacıklarının boyut dağılımı analizi

Polydispersity Index (PDI) analizi ise parçacık boyutlarının çözelti içerisinde monodispers ya da polidispers olduğunu göstermektedir ve bizim yaptığımız boyut analizinin doğruluğunu desteklemesi bakımından oldukça önemlidir. Polydispersity Index analizi sonucunda elde edilen PDI değeri 0,2 den küçük çıkarsa çözelti monodispers bir çözeltidir. Yapılan PDI analizi sonucunda elde

edilen PdI değeri: 0,188'dir. Yapılan bu analiz ile sentezlenen nanoparçacıkların monodispers olduğu belirlenmiştir.

4.1.4 EDX analiz sonuçları

EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) analizi numune üzerine yüksek enerjili elektronların çarptırılıp, numuneden elektron kopması ile birlikte ortaya karakteristik x-ışınları salınması ve yarı iletken dedektör tarafından algılanıp elektron sinyaline dönüştürülmesi prensibine dayalı bir analiz yöntemidir. Yapılan EXD analizi ile AuFe nanoparçacıklarının elementel bileşenleri ve yüzdeleri hakkında detaylı bilgilere ulaşılmıştır.



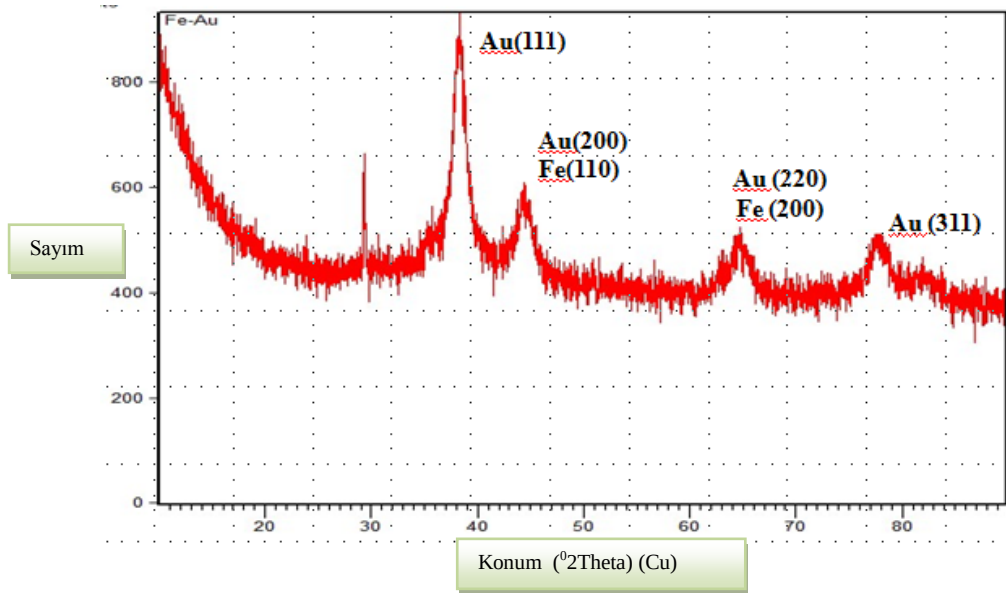
Şekil 4.5 AuFe nanoparçacıklarının EDX diagramları

Çizelge 4.1 AuFe nanoparçacıklarının elementel bileşenlerinin atomik ve ağırlıkça yüzdeleri

Element	Wt %	Atomik %
C	15,37	34,26
O	25,37	42,45
Si	0,95	0,91
S	7,12	5,95
Fe	27,61	13,23
Au	23,58	3,2
Toplam	100	100

4.1.5 XRD analiz sonuçları

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü XRD (X-Ray diffractometer) Phillips X'Pert Pro cihazı ile yapılan AuFe nanoparçacıkları analizi aşağıda görülmektedir. XRD analiz sonuçları ile AuFe nanoparçacık örneklerinden elde edilen x-ışını kırılım deseni karakteristik demir ve altın pikleri ile eşleşmiştir. Aşağıda verilen XRD difraktogramında görülen $2\theta = 38.14^\circ$, 44.36° , 64.58° ve 78.30° kırınım pikleri sırasıyla Au (111), Au (200)-Fe (110), Au (220)-Fe (200) ve Au (311) düzlemlerine denk gelmektedir ve bunlar da difraktogram üzerinde gösterilmiştir (Islam et al. 2013).



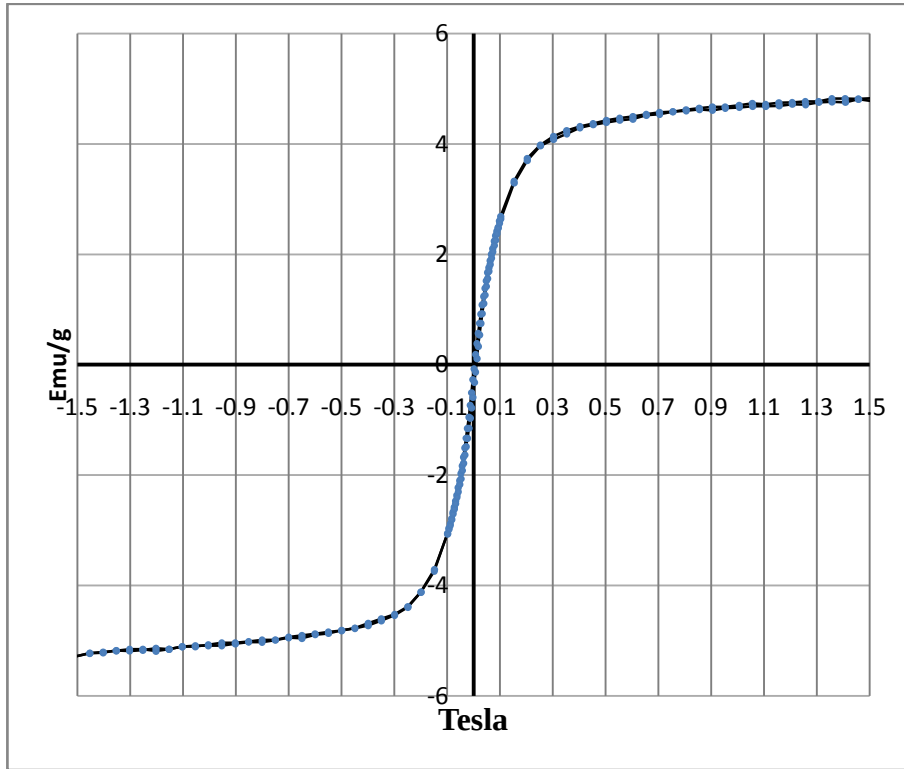
Şekil 4.6 AuFe nanoparçacıklarının XRD analizi difraktogramı

Difraktogram incelendiğinde sadece altın ve altın ile kaplanmış demir nanoparçacıklarına ait pikler görülmektedir. Demir nanoparçacıklarının Fe_3O_4 'e ait piklerinin bu difraktogramda görülmemesi ve altın nanoparçacıklarının pikleri ile baskılanması ise sentezlediğimiz demir nanoparçacıklarının üzerinin altın ile kaplandığının bir kanıtı olma özelliğini taşımaktadır.

4.1.6 VSM analiz sonuçları

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (Cryogenic Limited PPMS) model cihazı kullanılarak yapılan bu analizde sentezlenen AuFe nanoparçacıklarının manyetizasyon değerleri tespit edildi.

Uygulanan manyetik alanlara (Tesla) karşılık gelen gram başına düşen manyetik moment değerleri emu/g aşağıdaki şekilde grafiğe geçirildi. Buradan yola çıkarak yapılan hesaplamalarda AuFe nanoparçacıklarının manyetizasyon değerleri; 5,3 emu/g olarak bulundu.



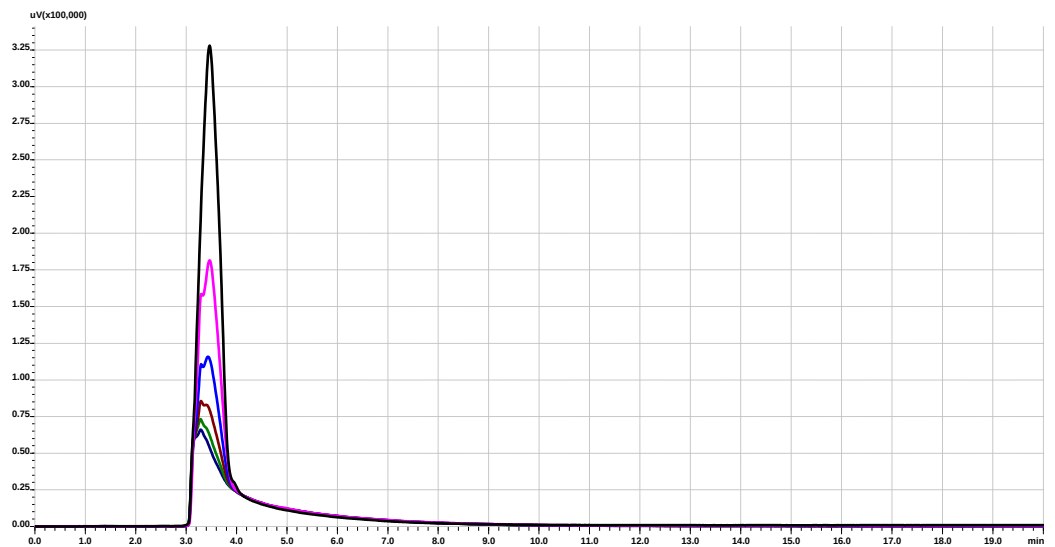
Şekil 4.7 AuFe nanoparçacıklarının VSM diagramı

4.2 Kamptotesin'in AuFe Nanoparçacıkları İle Konjugasyon Verimi

AuFe nanoparçacıklarının Kamptotesin'e bağlanma verimini tayin etmek amacıyla Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) yöntemi kullanılmıştır.

İlk olarak Kamptotesin'in yarı yarıya azalan derişimlerinden (1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,0625 µg/mL, 0,03125 µg/mL) 10µL hacminde örnek alınarak HPLC cihazına verildi. Her bir enjeksiyon için elde edilen pik alanları hesaplandı. Kamptotesin'in çözgeni olarak kullanılan DMSO'da 10µL enjeksiyon hacminde kolona verilerek elde edilen pik alanı hesaplandı. DMSO'dan elde edilen pik alanı, Kamptotesin'in yarı yarıya azalan derişimlerinden elde edilen pik alanlarından tek tek çıkartılarak kalibrasyon grafiğı çizildi. Kalibrasyon grafiğı denklemi $y = 6.963.988,42x$ olarak tespit edildi ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen r^2 değeri ise 1 bulundu.

AuFe nanoparçacıklarını Kamptotesin'e bağlama işlemi sonucunda yapılan ilk santrifüj sonunda elde edilen üst faz 10 µL enjeksiyon hacminde kolona verildi. Elde edilen pik alanı 172857 olarak hesaplandı. Kamptotesin kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine yazılarak madde miktarı 0,024822 µg/10µL olarak hesaplandı. Elde edilen ilk üst fazın hacmi 5 mL olduğu için, konjuge olmadan kalan Kamptotesin miktarı 124,11 µg/5mL olarak hesaplandı. Buradan yola çıkılarak 1 mg Kamptotesin'in nanoparçacıklara bağlanma verimi bulundu. Yapılan hesaplamalar sonucunda AuFe nanoparçacıklarının Kamptotesin'e bağlanma verimi % 97,6 bulunmuştur. Elde edilen bu verilerden 1000 µg Kamptotesin'in 875,89 µg'lık kısmının, 10 mg miktarındaki AuFe nanoparçacığına bağlandığı sonucuna ulaşılmıştır.



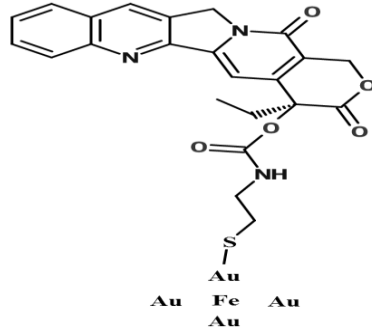
Şekil 4.8 Kamptotesin'in farklı konsantrasyonlarına ait kromatogram

4.3 Yapısal analiz çalışmaları

4.3.1 FT-IR sonuçları

Celal Bayar Üniversitesi, Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, FT-IR (Infrared Spektrofotometre) Agilent Cary 660 model cihazına gönderilmiş olan örneklerin spektrumları aşağıda yer almaktadır.

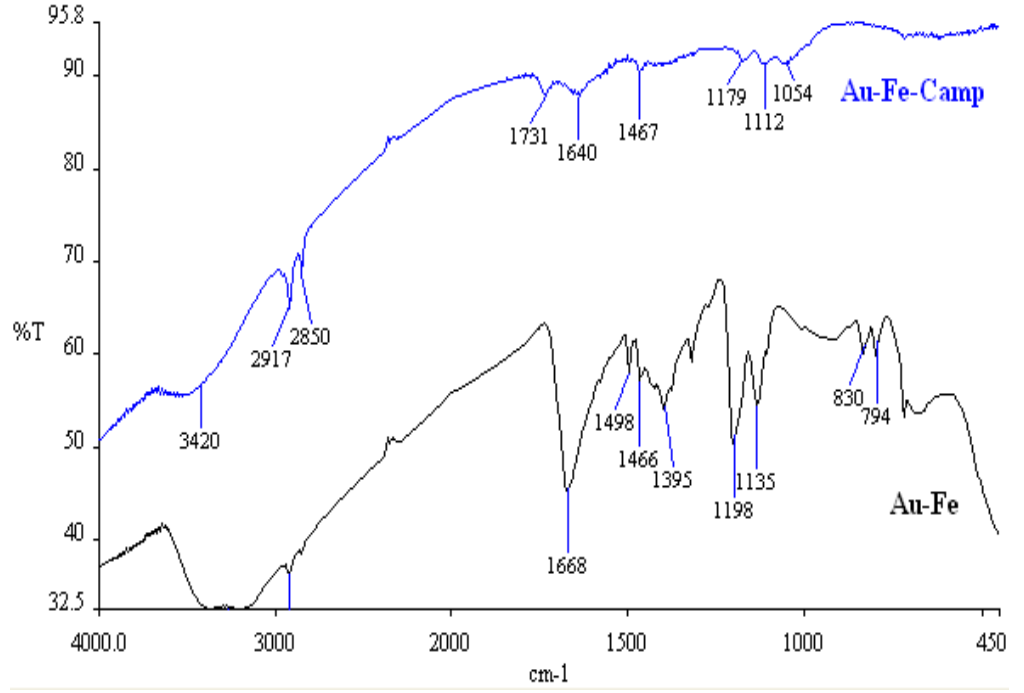
Burada konjugasyon işlemi sonucunda hedeflenen, AuFe nanoparçacıklarına konjuge Kamptotesin'in, oluşup oluşmadığına dair bilgi sahibi olamamıza olanak tanıyan, önemli karakterizasyon yöntemi FT-IR analizi gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki tabloda FT-IR spektrumunda görülen pikler ve piklerin ait olduğu gerilimler gösterilmektedir.



Şekil 4.9 AuFe-Kamp'ın açık yapısı

Çizelge 4.2 AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in FTIR incelemesi

Pik	Gerilim	Açıklama
3420	O-H	Alkol
2917	-CH ₂ -	Metilen köprüsü
2850	-CH ₂ -	Metilen köprüsü
1731	O=C-O	Ester
1640	C-C	Benzen halkası
1467	C=C	Aromatik halkadaki C-C gerilimi



Şekil 4.10 AuFe-Kamp ve AuFe nanoparçacıklarının FT-IR spektrumu

Organik bileşiklerin yapılarındaki fonksiyonel grupların belirlenmesinde kullanılan FT-IR analizi yöntemi ile, bu tez kapsamında kullanılan antikanser ajanı Kamptotesin'in yapı tayini gerçekleştirildi. AuFe nanoparçacıklarına ait FT-IR spektrumunda yer alan 3420 cm^{-1} bölgesindeki yayvan pik O-H bağına ait olan gerilimdir. Spektrumun 1668 cm^{-1} bölgesinde görülen keskin pik ise H-O-H bağına ait olan gerilimdir. Bu iki gerilimden yola çıkarak; AuFe nanoparçacıklarının sentezi sonunda, su ile yıkayarak santrifüj edilme işlemi esnasında AuFe nanoparçacıkları üzerinde bir miktar suyun kalmış olduğu yorumu yapılabilir. AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilen Kamptotesin'in spektrumu incelendiğinde, 2917 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} bölgesinde yer alan çift pikin $\text{H}=\text{C}=\text{H}$ bağına ait olduğu tespit edilmiştir. 1731 cm^{-1} bölgesindeki pik ise AuFe nanoparçacıklarının Kamptotesine bağlandığı aromatik halkadaki ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$) esterine ait olan gerilimdir. Kamptotesin'in moleküler yapısında görülen benzen halkasındaki C-C bağlarına ait pikler ise spektrumun 1640 cm^{-1} bölgesinde görülmüştür. AuFe nanoparçacıklarına ait spektrumda 1668 cm^{-1} ve 1135 cm^{-1} bölgesi arasında kalan bölgedeki pikler AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in bu bölgedeki pikleri ile örtüşmektedir. Aynı zamanda Kamptotesin ile konjugasyon sonrasında AuFe nanoparçacıklarına ait spektrumda

görülen piklerin şiddetlerindeki değişim bize konjugasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

4.5 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları

4.5.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

AuFe-Kamp'ın ^{131}I ile işaretlenme verimleri ince tabaka radyokromatografisi (TLRC) yöntemi ile bulundu. AuFe-Kamp'ın ^{131}I ile işaretlenme verimlerinin bulunmasında 6 farklı banyo çözeltisi kullanılmıştır. Kullanılan banyo çözeltilerinin içerikleri aşağıdaki listede sıralanmıştır.

- TLRC-1: diklorometan:metanol (9:1)
- TLRC-2: n bütanol:su:asetik asit (4:2:1)
- TLRC-3: kloroform:asetik asit (9:1)
- TLRC-4: n bütanol:etil alkol:0.2N NH_4OH (5:2:1)
- TLRC-5: n bütanol:su:asetik asit (4:2:1)
- TLRC-6: izopropil alkol:n bütanol:0.2N NH_4OH (2:1:1)

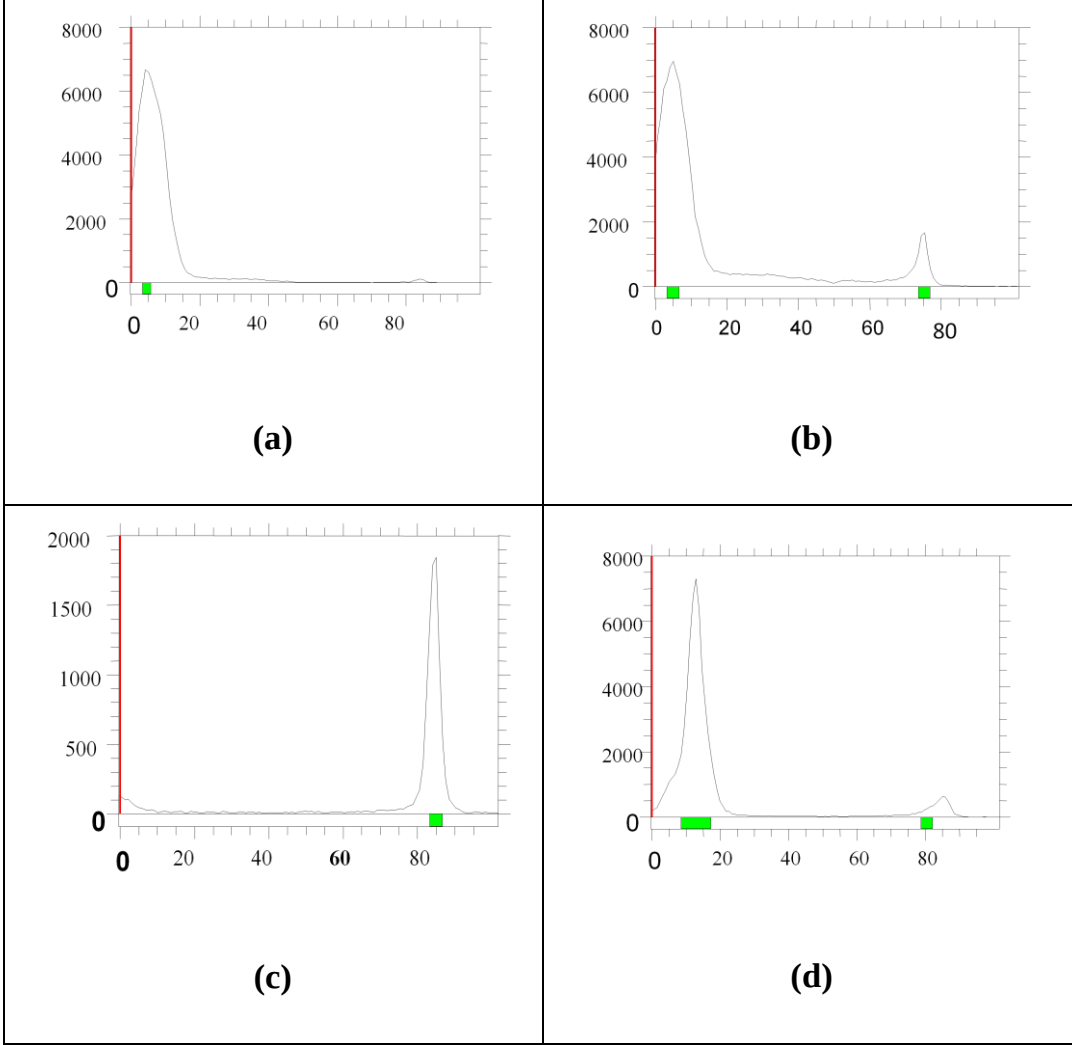
Kullanılan banyo çözeltilerinden en yüksek verim elde edilenler TLRC-1, TLRC-2 ve TLRC-3 dür. Bu banyo çözeltilerinden elde edilen kromatogramlara göre Kamptotesin'in ^{131}I ile işaretlenmiş olduğu tespit edilmiştir. Bu kromatogramlardan elde edilen R_f değerleri çizelge 4.3'de görüldüğü gibidir. Diğer banyo çözeltilerinde ise örneklerin R_f değerlerinin birbirine yakın olması sebebiyle bu banyo çözeltileri ayırt edici özellik göstermemiştir.

Çizelge 4.3 ^{131}I ile işaretli örneklerin TLRC yöntemi ile elde edilen R_f değerleri

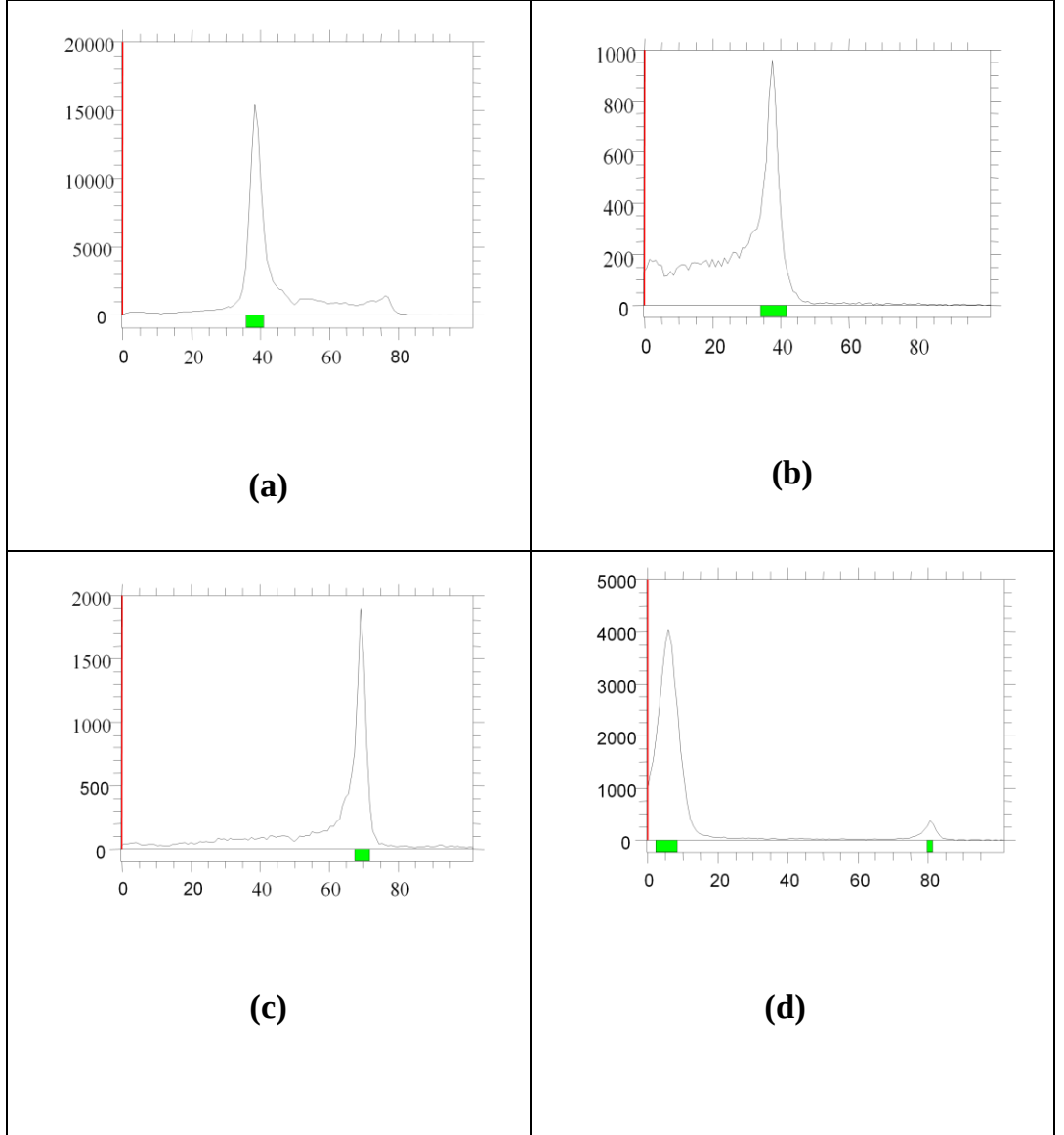
Banyo Çözeltisi	R_f			
	^{131}I	Yükseltgenmiş ^{131}I	^{131}I -Kamp	^{131}I -AuFe-Kamp
TLRC-1	0,04±0,01	0,05±0,01	0,93±0,02	0,14±0,01
TLRC-2	0,51±0,01	0,23±0,01	0,97±0,01	0,16±0,01
TLRC-3	0,04±0,01	0,04±0,01	0,86±0,03	0,96±0,01

Çizelge 4.3 incelendiğinde; kullanılan üç banyo çözeltisinde de, ^{131}I ile işaretlenmiş Kamptotesin ve AuFe nanoparçacıklarına konjuge edilen Kamptotesin'in R_f değerlerinin, ^{131}I ve yükseltgenmiş ^{131}I 'in R_f değerlerinden farklı olduğu görülmektedir. R_f değerlerinde gözlenen bu farklılık ile; hem Kamptotesin'in hem de AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in ^{131}I ile başarıyla işaretlendiği sonucuna ulaşılmaktadır. En yüksek verimlerin alındığı TLRC-2 banyo çözeltisinde; ^{131}I R_f değeri 0,51±0,01, yükseltgenmiş ^{131}I R_f değeri 0,23±0,01 iken; Kamptotesin'in R_f değeri 0,97±0,01 ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'in R_f değeri 0,94±0,01'dir. TLRC-2 banyo çözeltisinden elde edilen bu R_f değerlerine göre; ^{131}I 'in başarı ile yükseltgenmesinin yanı sıra örneklerin de başarılı bir şekilde ^{131}I ile işaretlendiği görülmektedir. Elde edilen bu verilere göre R_f değerlerindeki en net farklanmanın TLRC-2 banyosunda görülmesi nedeniyle ^{131}I -AuFe-Kamp örneğinin değerlendirilmesinde bu banyo çözeltisi esas alınmıştır. ^{131}I -AuFe-Kamp'ın TLRC-2 banyo çözeltisinden elde edilen işaretleme verimi % 97,75±1,50 ^{131}I -Kamp. işaretleme verimi ise % 98,00±2,49 olarak bulunmuştur. Çizelge 4.4'de ^{131}I ile işaretlenen örneklerin bu banyo çözeltilerindeki işaretleme verimleri yer almaktadır.

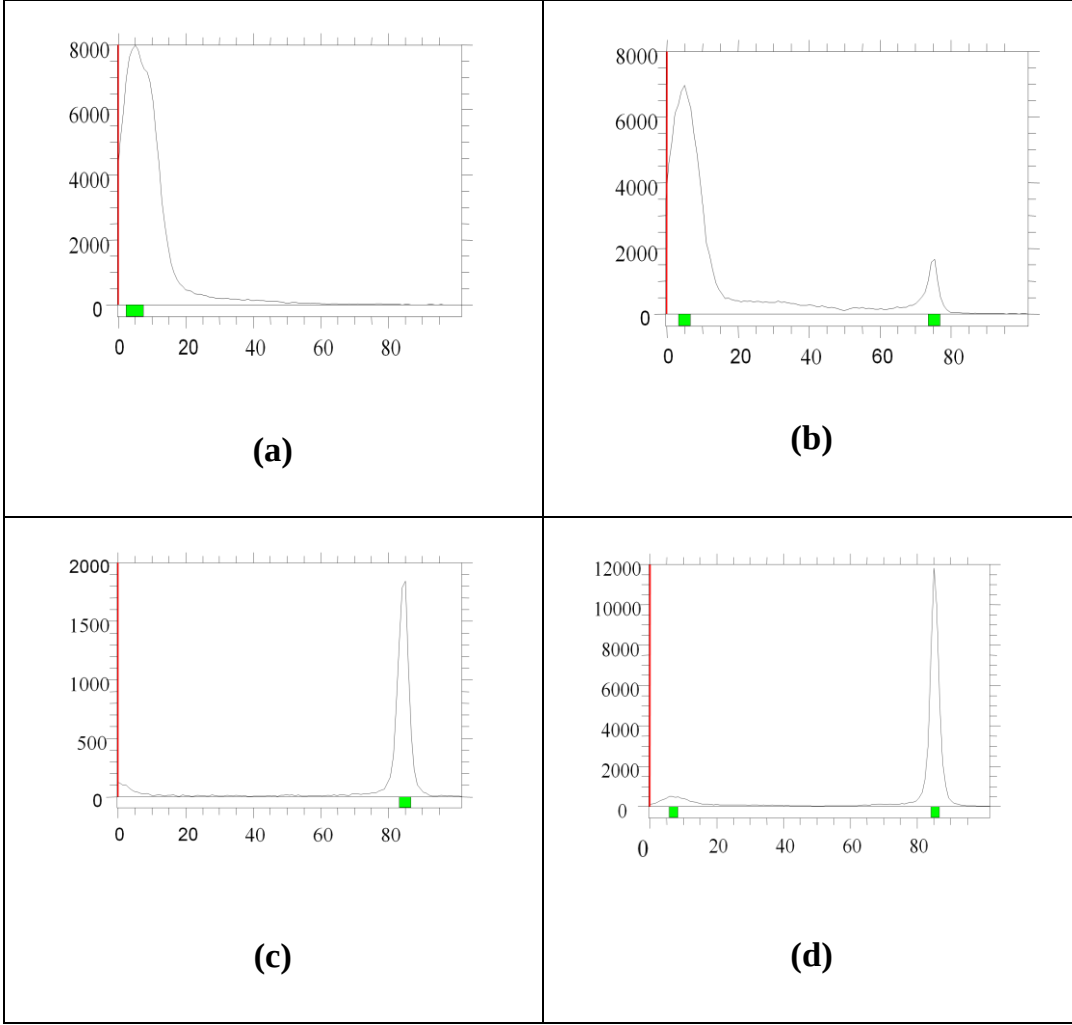
TLRC-1, TLRC2 ve TLRC-3 banyo çözeltileri kullanılarak alınan kromatogramlar şekil 4.11, şekil 4.12 ve şekil 4.13'de yer almaktadır.



Şekil 4.11: TLRC-1 banyosundaki ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kromatogramlar.



Şekil 4.12: TLRC-2 banyosundaki ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kromatogramlar.



Şekil 4.13 TLRC-3 banyosundaki ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kromatogramlar.

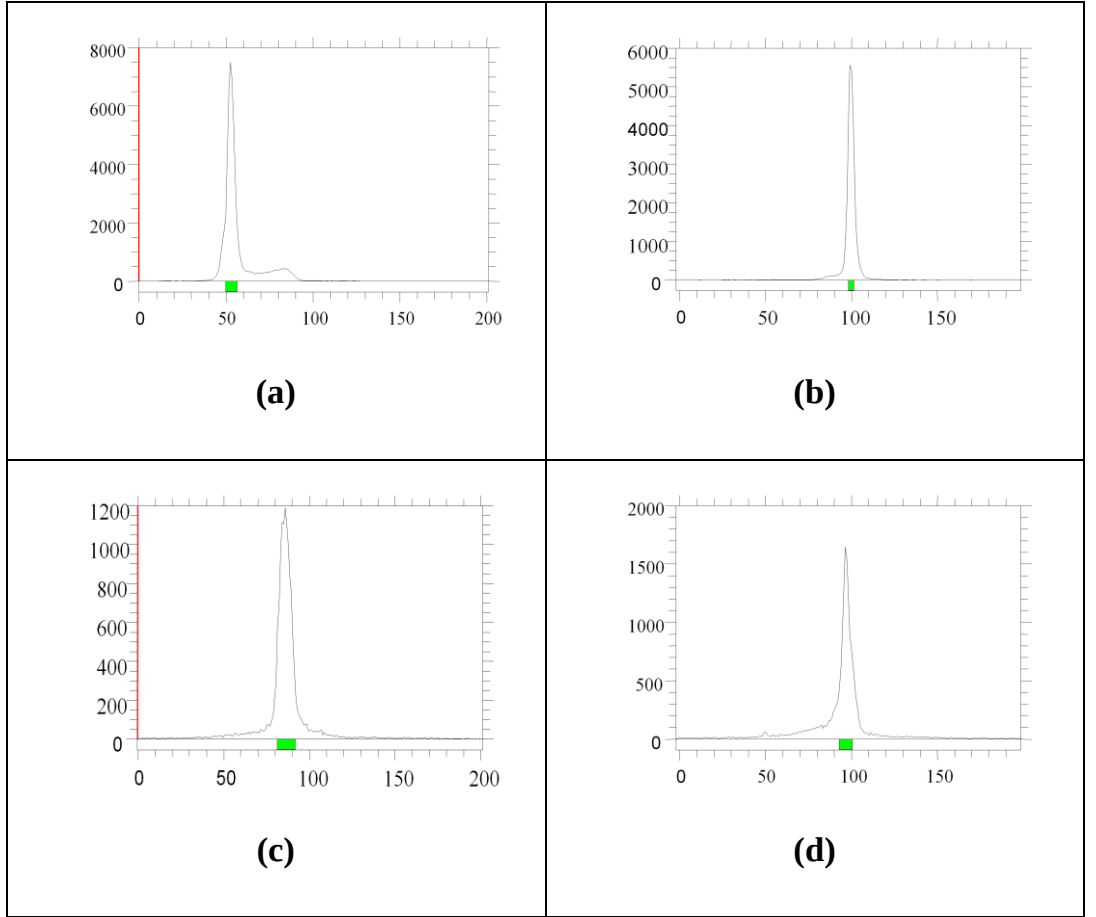
Çizelge 4.4 ^{131}I ile işaretli örneklerin işaretlenme verimleri

Banyo çözeltisi	^{131}I -Kamp.	^{131}I -AuFe-Kamp.
TLRC-1	% 95,60±0,52	% 97,60±0,59
TLRC-2	% 98,00±2,49	% 97,75±1,50
TLRC-3	% 94,30±0,94	% 94,99±0,17

4.5.2 Kağıt elektroforezi yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Kağıt elektroforezi ile yapılan çalışmada ^{131}I , yükseltgenmiş ^{131}I , ^{131}I -Kamp ve ^{131}I -AuFe-Kamp'a ait sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

İşaretli örnekler 20 cm'lik elektroforez kağıtlarının tam orta noktası olan 10. cm'sine damlatıldı. Elektroforez kromatogramlardaki 0-10 cm arası pozitif kutup, 10-20 cm arası ise negatif kutuptur. Negatif yüklü ^{131}I pozitif kutba doğru ilerlemiş ve bundan dolayı negatif yükle yüklü olduğu kanıtlanmıştır. Kamptotesin ^{131}I ile işaretlendikten sonra pozitif kutba doğru ilerlemiş ve anyon karakteri sergilemiştir. Yükseltgenmiş ^{131}I ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Kamptotesin'de ise herhangi bir kutba doğru ilerleme gözlenmemiş, uygulama noktasında kalarak nötr özellik göstermiştir. Kamptotesin'in AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edildikten sonra anyon olan karakteri nötr forma dönüşmüştür.



Şekil 4.14 TLRC-2 banyo çözeltisinde ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Kamp (c), ^{131}I -AuFe-Kamp (d) ait kağıt elektroforezi kromatogramları

Elektroforez sonuçlarından elde ettiğimiz verilere göre yükseltgeme ve radyoişaretleme işleminin gerçekleştiği anlaşılmış ve sonuçların da TLRC yöntemini desteklediği görülmüştür.

4.5.3 Lipofilite sonuçları

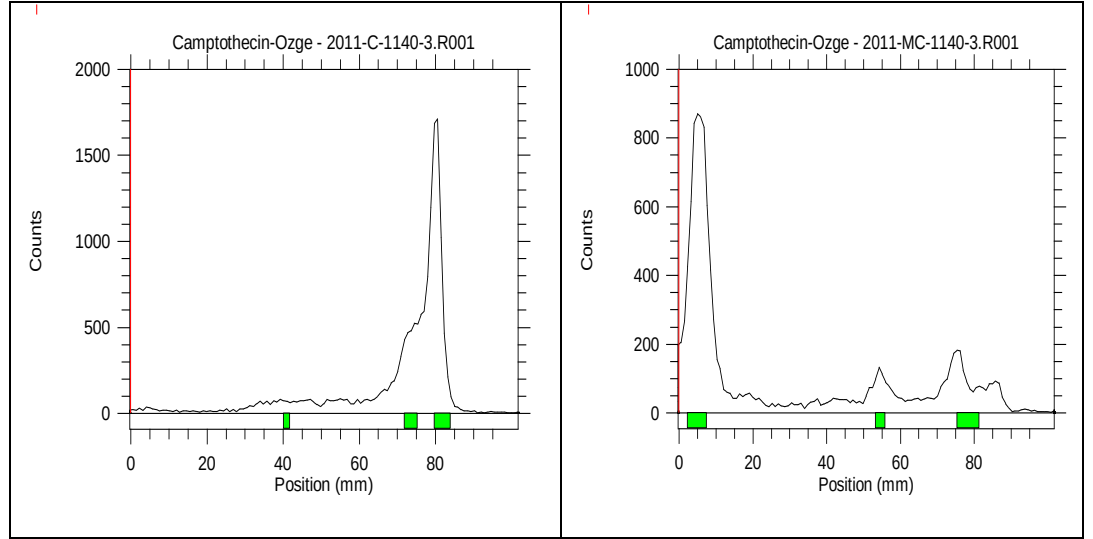
Kamptotesin'in teorik lipofilite değerleri ACD (Advanced Chemistry Developmant, Inc., ACD/labs 5.0) programı kullanılarak bulundu ve deneysel lipofilite değerleri ile karşılaştırıldı.

Kamptotesin'in teorik lipofilite değeri $1,92\pm0,65$ olarak hesaplanmıştır. Kamptotesin'in deneysel lipofilite değeri ise $1,26\pm0,29$ olarak tespit edilmiştir.

4.5.4 Stabilite sonuçları

Kamp ve AuFe-Kamp ^{131}I ile işaretlendikten sonra oda sıcaklığında TLRC-1 banyosundaki 24. saate kadar olan stabiliteleri TLC Scanner (Bioscan 2000) cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.15'de Kamp ve AuFe-Kamp'ın 24. saatte elde edilen kromatogramları yer almaktadır. 24. saatte Kamp ve AuFe-Kamp'ın R_f değerleri sırası ile $0,95\pm0,01$ ve $0,07\pm0,01$ olarak bulunmuştur. Kamp ve AuFe-Kamp'ın 24. saatteki % bağlanma değerleri ise sırasıyla % $75,80\pm4,19$ ve % $76,20\pm3,28$ olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Kamp ve AuFe-Kamp'ın 24. saatte işaretleme verimlerinin % 75'in üzerinde olduğu görülmüştür.



(a)

(b)

Şekil 4.15: ^{131}I -Kamp (a), ^{131}I -AuFe-Kamp (b) ait stabilite çalışması kromatogramları.

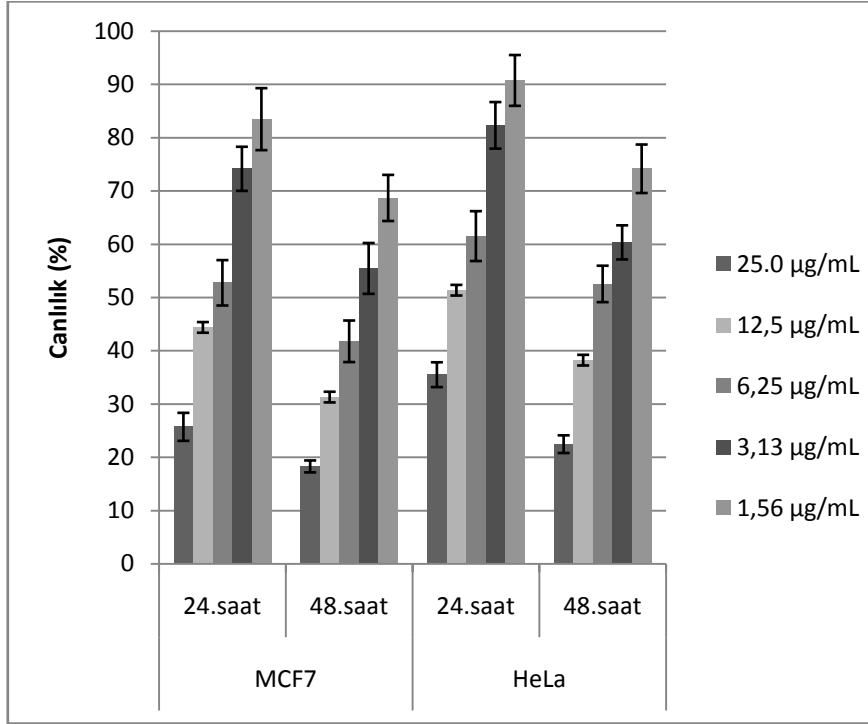
4.6 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları

4.6.1 Sitotoksosite sonuçları

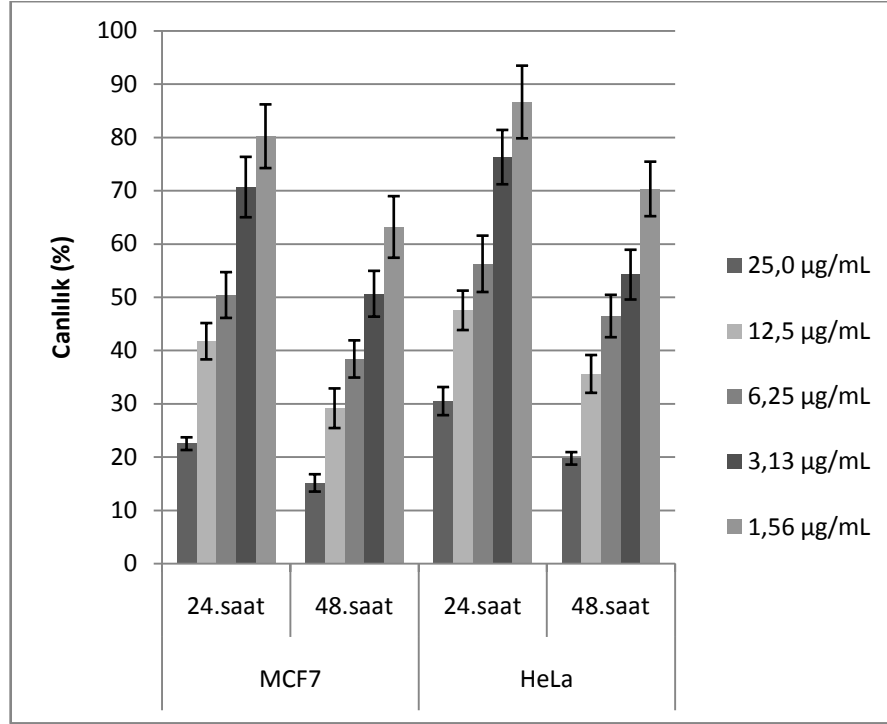
Sitotoksosite çalışmaları kapsamında Kamp, Au-Fe ve AuFe-Kamp'ın 5 farklı konsantrasyonu hazırlandıktan sonra MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerinde yapılmıştır.

24 ve 48. saatlerde belirlenen % canlılık değerleri şekil 4.16, şekil 4.17, şekil 4.18 de yer alan grafiklerde verilmiştir. Kamp, Au-Fe ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde konsantrasyonun artması ile doğru orantılı olarak sitotoksik etkinin arttığı görülmektedir. Kamp'ın 25,0 $\mu\text{g/mL}$ 'sinin MCF7 hücre hattındaki canlılık oranını 24. saatte % 25'e indirdiği, AuFe-Kamp'ın 25,0 $\mu\text{g/mL}$ 'sinin yine 24. saatte belirlenen % canlılık oranını ise %22,49 değerine düşürdüğü görülmüştür. Kamp ve AuFe-Kamp'ın 25,0 $\mu\text{g/mL}$ 'sinin HeLa hücre hattındaki 24. saatte belirlenen % canlılık oranlarının MCF7 hücre hattına göre farklı olduğu gözlenmiştir ve bu oranlar sırasıyla; % 35 ve % 30,48'dir. 1,56 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanan

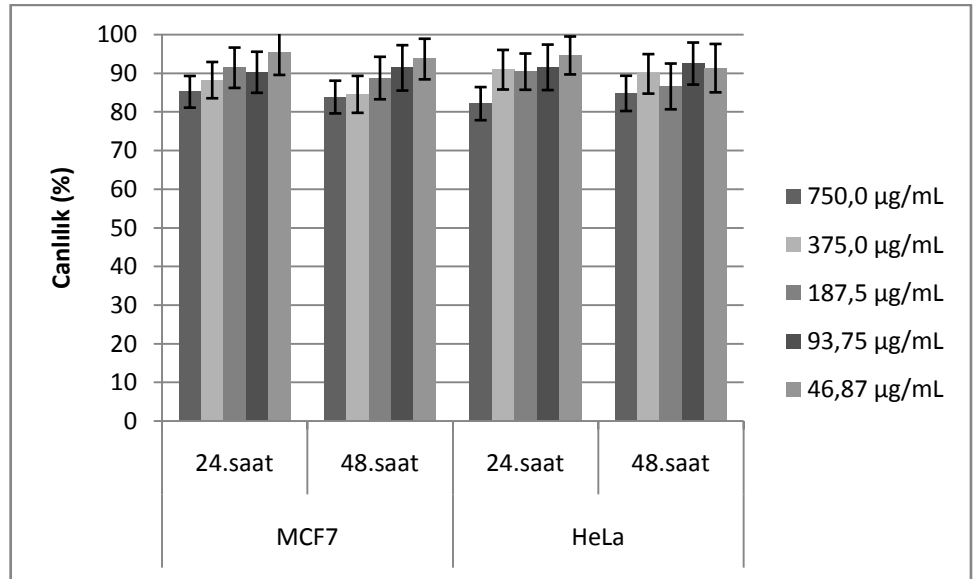
Kamp ve AuFe-Kamp'ın 48. saatte belirlenen % canlılık oranları MCF7 hücre hattında sırasıyla % 68 ve %63, HeLa hücre hattında ise % 74 ve % 80'dir. Her iki hücre hattından elde edilen verilere göre; 1,56 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan Kamp ve AuFe-Kamp'ın 25,0 µg/mL'de hazırlanan konsantrasyonlarına göre % canlılık oranlarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Au-Fe nano parçacıklarının 46,87 µg/mL konsantrasyonunda % canlılık oranları ise; 24. saatte MCF7 hücre hattında % 95, HeLa hücre hattında ise; % 94'dür. Ayrıca hücrelerdeki canlılık oranlarını kıyaslayacak olursak, beklenildiği üzere Kamptotesin Au-Fe nanoparçacıkları ile konjuge edildiğinde hücrelerdeki canlılık oranlarını Kamptotesin'e göre daha fazla düşürdüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.16 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında Kamp'ın konsantrasyon ve zamana bağlı % canlılık değerleri.



Şekil 4.17 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında AuFe-Kamp'ın konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri.



Şekil 4.18 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında AuFe'nin konsantrasyon ve zamana bağlı % canlılık değerleri.

Maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan Kamp ve AuFe-Kamp'ın konsantrasyonları çizelge 4.5' de verilmiştir. Kamptotesin'in 24. saatteki IC₅₀ değeri MCF7 ve HeLa hücre hatlarında sırasıyla; 8,50 µg/mL ve 12,73 µg/mL'dir.

AuFe-Kamp'da ise bu değerler MCF7 ve HeLa hücre hatlarında sırasıyla; 7,35 $\mu\text{g/mL}$ ve 10,35 $\mu\text{g/mL}$ 'dir.

Çizelge 4.5 Kamp ve AuFe-Kamp'ın IC_{50} değerleri

Zaman	Kamp		AuFe-Kamp	
	MCF7	HeLa	MCF7	HeLa
24. saat	8,50 $\mu\text{g/mL}$	12,73 $\mu\text{g/mL}$	7,35 $\mu\text{g/mL}$	10,35 $\mu\text{g/mL}$
48. saat	4,18 $\mu\text{g/mL}$	6,13 $\mu\text{g/mL}$	3,28 $\mu\text{g/mL}$	4,69 $\mu\text{g/mL}$

Kamp'ın IC_{50} değerleri ile AuFe-Kamp'ın IC_{50} değerleri arasında gözlenen fark sonucunda AuFe nanoparçacıklarının Kamp'a konjugasyonu sonucunda hücreler üzerindeki sitotoksik etkiyi azalttığı görülmektedir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda nano yapılar ile konjuge edilen antikanser ilaçların, ilaca bağlı yan etkilerinin azalmış olduğu ancak tümöre olan sitotoksik etkinin artmış olduğu gözlemlenmiştir (deGroot FM. et.al., 2001; Terry W. Moody et. al., 2007). Literatürde Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerinde son yıllarda yapılan sitotoksikite çalışmaları sonucunda 24. saatte elde edilmiş olan IC_{50} değerleri sırasıyla; 3,21 $\mu\text{g/mL}$ ve 0,42 $\mu\text{g/mL}$ 'dir (Gopalakrishnan R. and Shankar B., 2014; Rodríguez-Berna G. et.al., 2014).

4.6.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişiminin sonuçları

^{131}I işaretli Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatlarındaki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi incelenmiştir.

Çizelge 4.6 da ^{131}I ve ^{131}I işaretli Kamp ve AuFe-Kamp, manyetik alan uygulanmış olan AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatlarında, 30, 60, 120 ve 240. dakikalarındaki bağlanma düzeyleri görülmektedir. Çizelge incelendiğinde ^{131}I ile işaretlenmiş olan Kamp'ın bağlanma düzeylerinin her iki hücre hattında birbirine oldukça yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. 240. dakikada MCF7 ve HeLa hücre hattındaki bağlanma yüzdeleri sırasıyla; % 15,90 ve % 16,50'dir. ^{131}I 'in MCF7 hücre hattındaki bağlanma düzeyinin HeLa hücre hattından daha

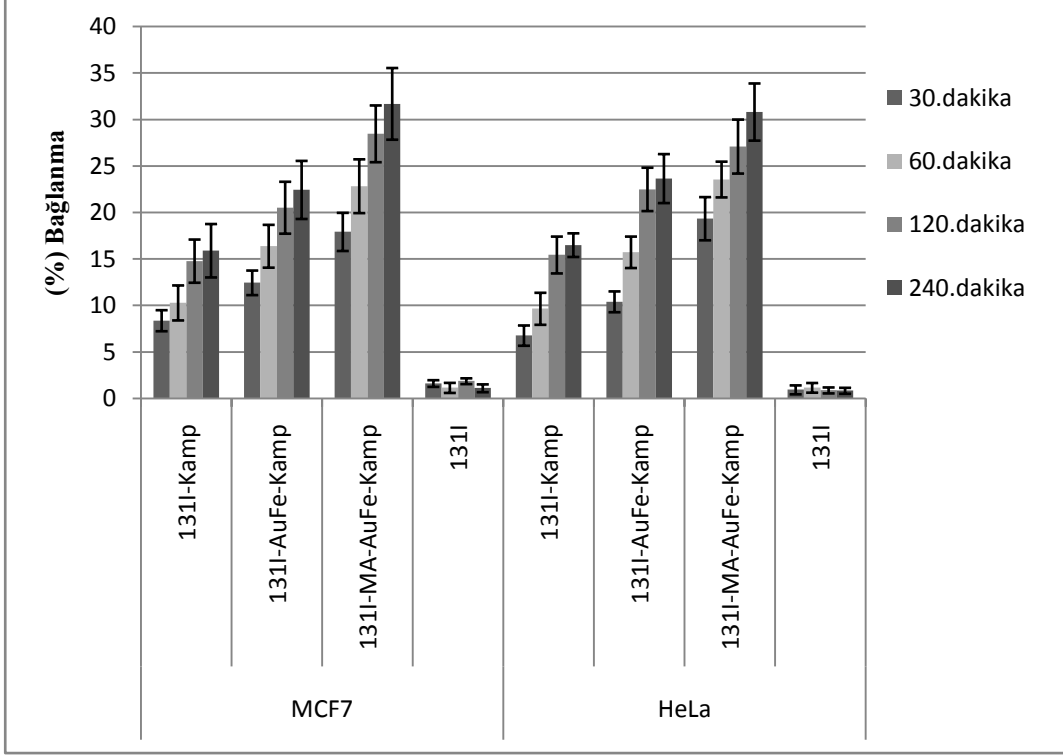
yüksek olduğu görülmüştür ancak her iki hücre hattında da bağlanma yüzdeleri oldukça düşük ve yaklaşık % 1 mertebesinde.

Çizelge 4.6 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında ^{131}I -Kamp, ^{131}I -AuFe-Kamp, ^{131}I -MA-AuFe-Kamp ve ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi.

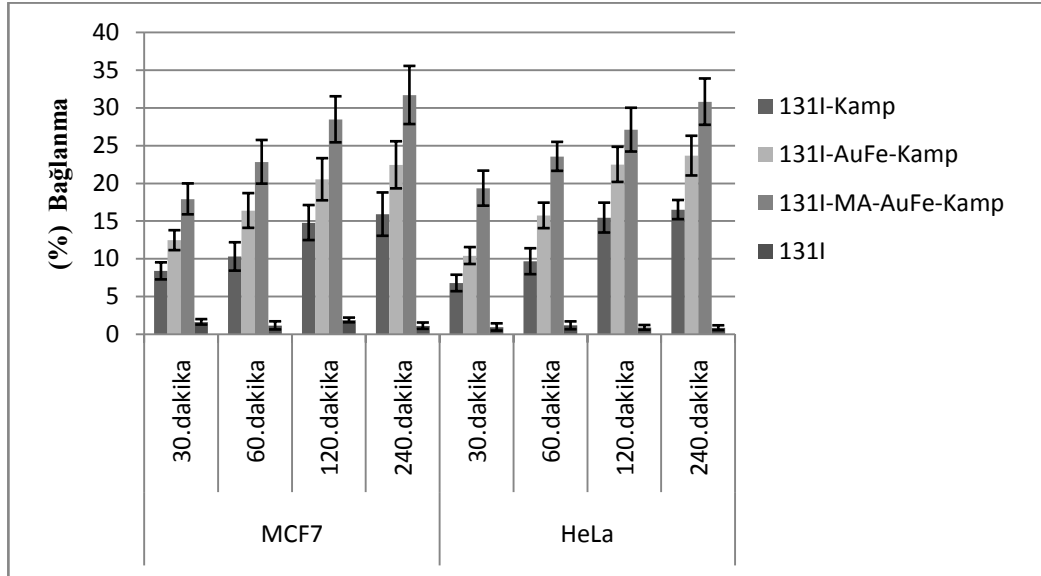
<u>MCF7</u>	% Bağlanma			
	30.dakika	60.dakika	120.dakika	240.dakika
^{131}I -Kamp	8,38±1,13	10,29±1,88	14,78±2,32	15,90±2,87
^{131}I -AuFe-Kamp	12,45±1,32	16,38±2,30	20,52±2,79	22,43±3,12
^{131}I -MA-AuFe-Kamp	17,92±2,05	22,83±2,89	28,46±3,05	31,68±3,85
^{131}I	1,63±0,36	1,16±0,54	1,88±0,31	1,12±0,42
<u>HeLa</u>	% Bağlanma			
	30.dakika	60.dakika	120.dakika	240.dakika
^{131}I -Kamp	6,78±1,09	9,66±1,72	15,44±1,98	16,50±1,27
^{131}I -AuFe-Kamp	10,41±1,12	15,73±1,69	22,49±2,33	23,65±2,63
^{131}I -MA-AuFe-Kamp	19,34±2,32	23,55±1,92	27,09±2,90	30,80±3,07
^{131}I	0,95±0,48	1,17±0,52	0,89±0,32	0,85±0,32

Şekil 4.19 incelendiğinde manyetik alan uygulanan ve ^{131}I ile işaretlenmiş Kamp'ın, her iki hücre hattında da en yüksek tutulumu sahip olduğu ve bağlanma yüzdelerinin zaman ile doğru orantılı olarak arttığı sonucuna ulaşılmaktadır. Şekil 4.15 incelendiğinde ise ^{131}I ile işaretlenmiş AuFe-Kamp'ın her iki hücre hattında bağlanma etkinliğinin zamanla doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. 240. dakikada MCF7 hücre hattında ^{131}I -AuFe-Kamp'ın bağlanma etkinliği ^{131}I -Kamp'dan 1,4 kat fazladır ve HeLa hücre hattında bu oran değişmemektedir. Manyetik alan uygulanan ^{131}I -AuFe-Kamp'ın bağlanma etkinliği, manyetik alan uygulanmayan ^{131}I -AuFe-Kamp'a göre yaklaşık 1,4 kat daha fazladır. Bunun yanı sıra manyetik alan uygulanan AuFe-Kamp'ın bağlanma etkinliğinin ^{131}I -Kamp'dan yaklaşık olarak 2 katı kadar fazla olduğu görülmektedir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde manyetik alan uygulanmasının hücrede bağlanma etkinliğini önemli bir ölçüde arttırdığı ve manyetik alan uygulamasının ilaç etkinliğini arttırmaya katkı sağlayacağı görülmektedir.



Şekil 4.19 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında ^{131}I -Kamp, ^{131}I -AuFe-Kamp, ^{131}I -MA-AuFe-Kamp ve ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin zamana bağlı değişimi.

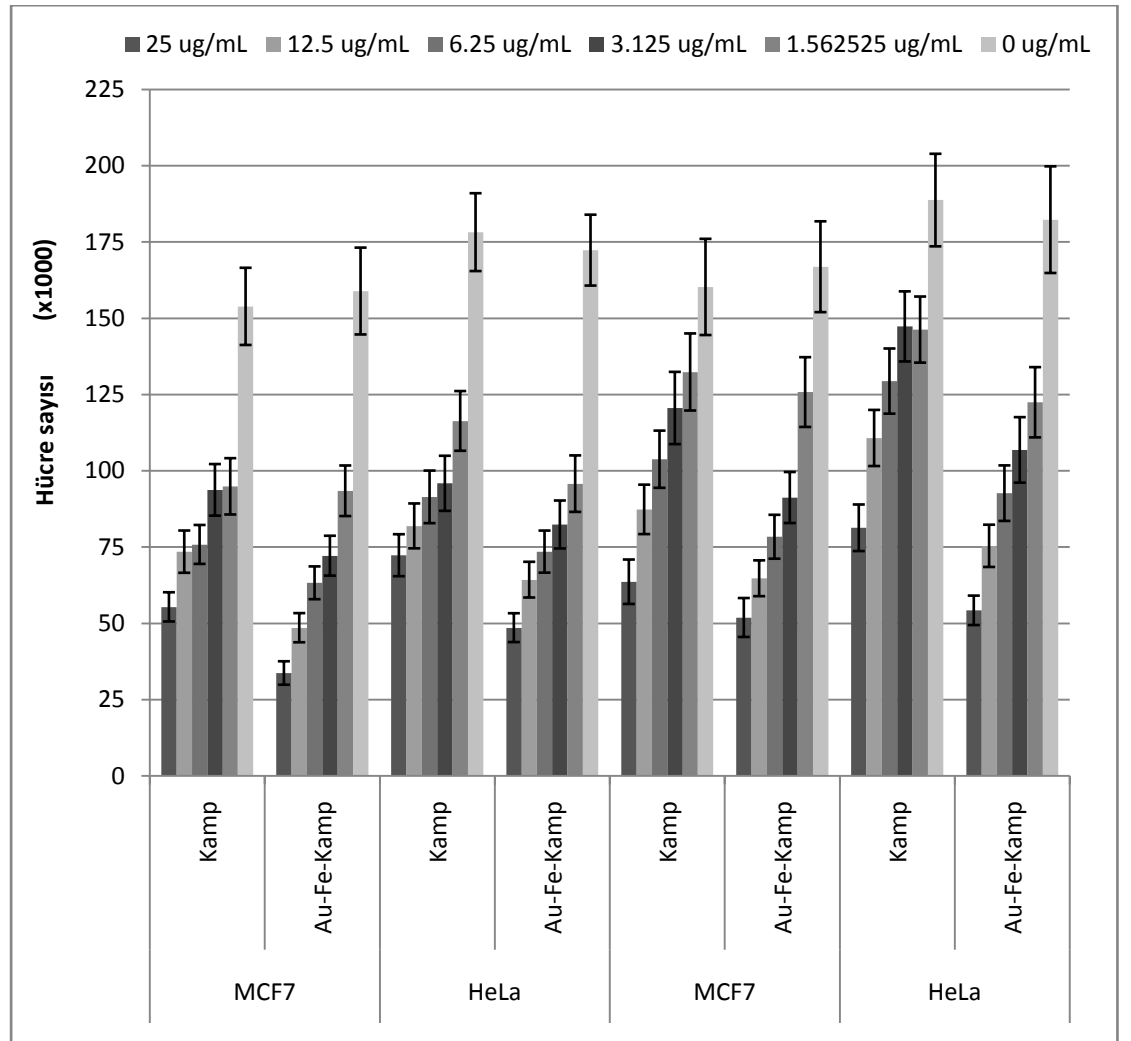


Şekil 4.20 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında ^{131}I -Kamp, ^{131}I -AuFe-Kamp, ^{131}I -MA-AuFe-Kamp, ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin değişimi.

4.6.3 Proliferasyon sonuçları

Kamp ve AuFe-Kamp'ın farklı konsantrasyonlarının MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerindeki proliferasyon hızına etkileri zamana bağlı olarak incelenmiştir.

Şekil 4.21 incelendiğinde her iki hücre hattında Kamp ve AuFe-Kamp'ın proliferasyon hızı konsantrasyon ile ters orantılı olarak değişmekte ve konsantrasyon artışı ile proliferasyon hızının düştüğü görülmektedir. Diğer bir taraftan her iki zaman parametresinde Kamp ve AuFe-Kamp'ın proliferasyon hızı HeLa hücre hattında, MCF7 hücre hattına göre daha yüksektir. HeLa hücre hattında her iki zaman parametresinde Kamp'ın AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilmesi sonucunda proliferasyon hızını azaltan bir yönde etki gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.21 MCF7 ve HeLa hücrelerinde Kamp ve AuFe-Kamp'ın proliferasyon hızına etkisi

Kamptotesin kaynaklı sitotoksitenin hücreler üzerindeki proliferasyon hızı, hücre morfolojisi ve Kamptotesin'in hücreler üzerindeki apoptotik etkisine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. U-937 hücre hatları üzerinde 9-nitri Kamptotesin ile yapılan bir proliferasyon çalışmasında Kamptotesin'in hücre hattı üzerinde belirli bir direnç göstermesi nedeniyle ilaç üzerinde bir modifikasyon yapılması önerilmiştir (Pantazis P. et.al., 1994; 1995).

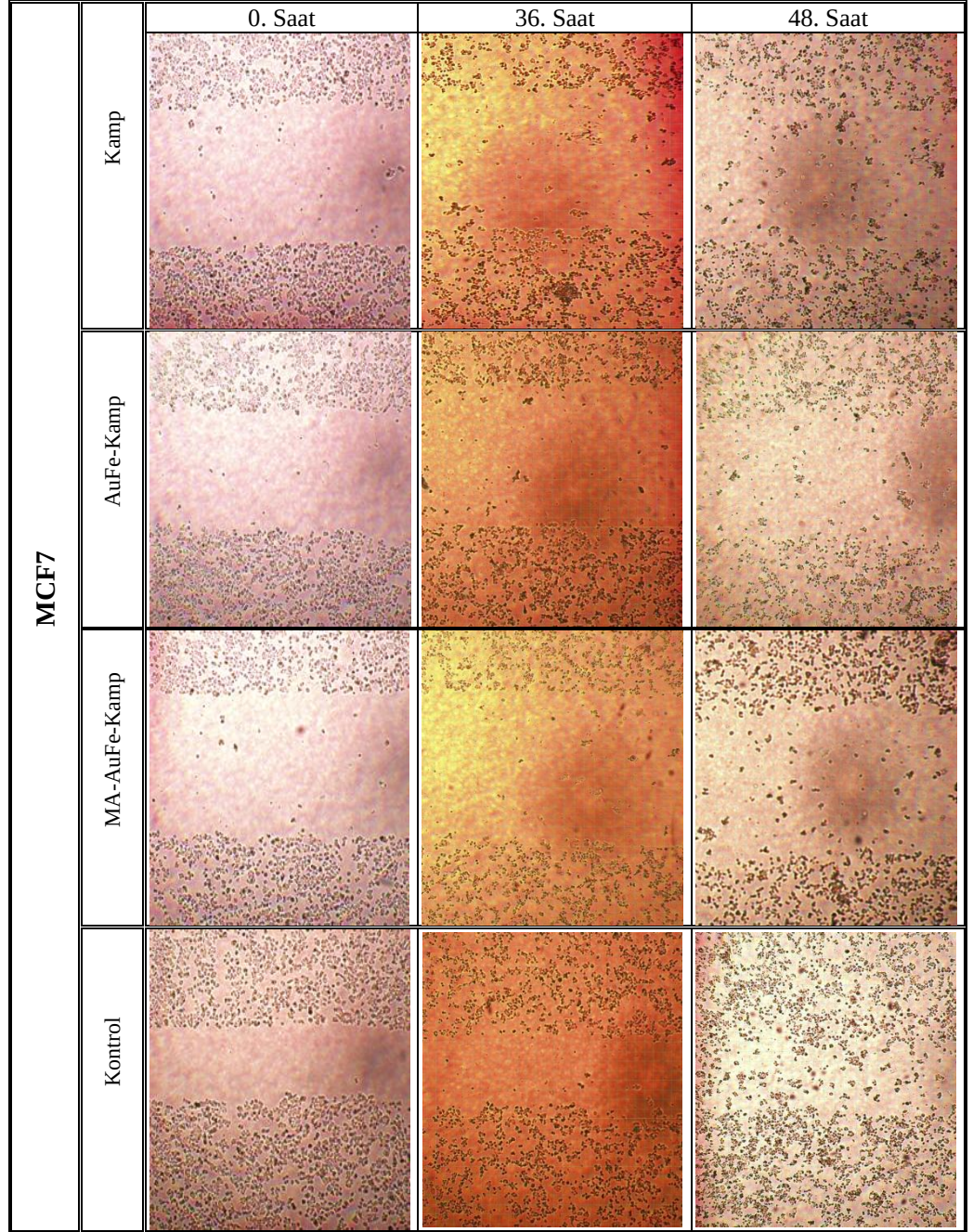
4.5.4 Hücre migrasyonu sonuçları

Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerindeki migrasyon hızı incelenmiştir. NdFeB mıknatısları inkübasyon esnasında AuFe-Kamp örneklerinin uygulandığı kuyucukların altına yerleştirilerek manyetik alanın hücre migrasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerindeki hücre migrasyonu sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

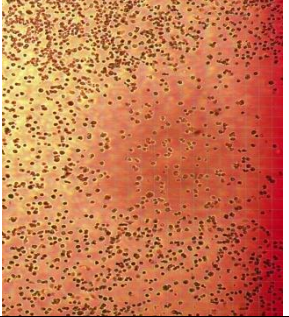
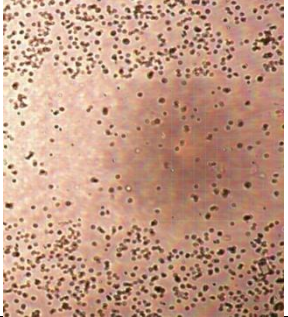
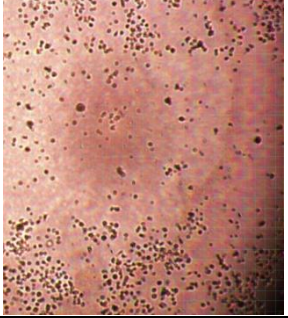
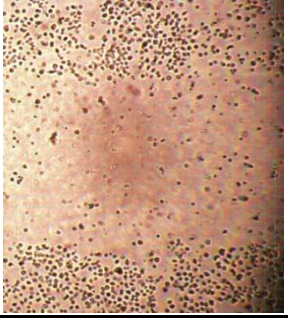
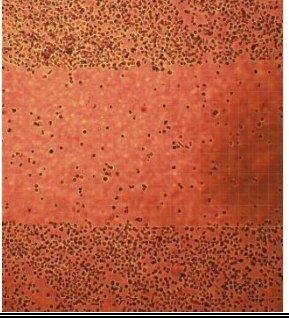
Çizelge 4.7 MCF7 ve HeLa hücre hatlarındaki % hücre migrasyonu değerleri.

<u>MCF7</u>	% Hücre migrasyonu			
	Kontrol	Kamp	AuFe-Kamp	MA-AuFe-Kamp
0.saat	0	0	0	0
6.saat	3,54 ± 3,22	6,25 ± 0,58	2,56 ± 0,58	0
12.saat	8,90 ± 3,15	13,89 ± 1,53	2,56 ± 0,58	7,14 ± 0,58
24.saat	24,97 ± 2,53	18,33 ± 1,00	10,26 ± 0,58	14,29 ± 1,00
36.saat	48,55 ± 2,66	18,33 ± 1,00	10,26 ± 0,58	14,29 ± 1,15
48.saat	100	19,44 ± 0,58	20,51 ± 1,05	19,05 ± 0,55
<u>HeLa</u>	% Hücre migrasyonu			
	Kontrol	Kamp	Au-Fe-Kamp	MA-AuFe-Kamp
0.saat	0	0	0	0
6.saat	3,33 ± 0,41	7,14 ± 1,53	2,08 ± 0,58	6,67 ± 1,00
12.saat	6,67 ± 0,52	14,29 ± 1,15	6,25 ± 0,20	13,33 ± 1,00
24.saat	13,33 ± 1,03	21,43 ± 1,15	12,50 ± 0,58	20,00 ± 1,00
36.saat	74,44 ± 5,23	57,14 ± 1,00	16,67 ± 1,15	26,67 ± 2,00
48.saat	100	59,52 ± 1,53	43,75 ± 1,00	31,11 ± 2,52

Çizelge 4.7’de görüldüğü üzere MCF7 ve HeLa hücre hatlarının her ikisinde de 48. saatte kontrol gurubu, 72. Saatte Kamptotesin, AuFe-Kamp ve MA-AuFe-Kamp’de %100 kapanma gerçekleşmiştir.



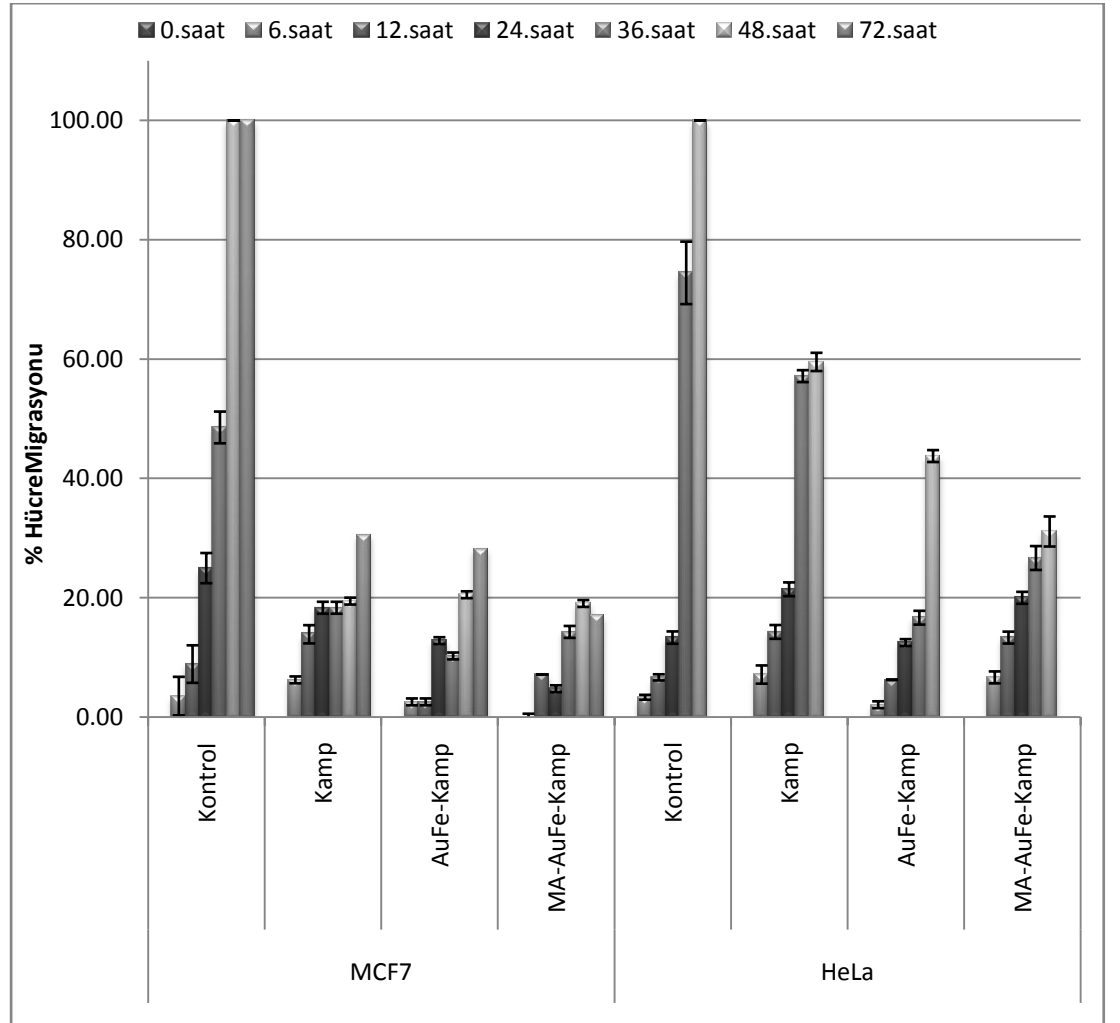
Şekil 4.22 MCF7 hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu görüntüleri

HeLa	Kamp	0. Saat	36. Saat	48. Saat
				
	AuFe-Kamp			
	MA-AuFe-Kamp			
	Kontrol			

Şekil 4.23 HeLa hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu görüntüleri

MCF-7 hücre hattında ilk 6 saat içerisinde MA-AuFe-Kamp'de hiç kapanma gözlenmezken Kamp'da % 6,25'lük ve Au-Fe-Kamp'da % 2,56'lık bir kapanma görülmüştür. 48. saatte MCF-7 hücre hattı kontrol gurubunda % 100 kapanma gözlenirken, Kamptotesin, AuFe-Kamp. ve MA-AuFe-Kamp.'de kapanma yüzdeleri sırasıyla; % 19,44, % 20,51, % 19,05'dir.

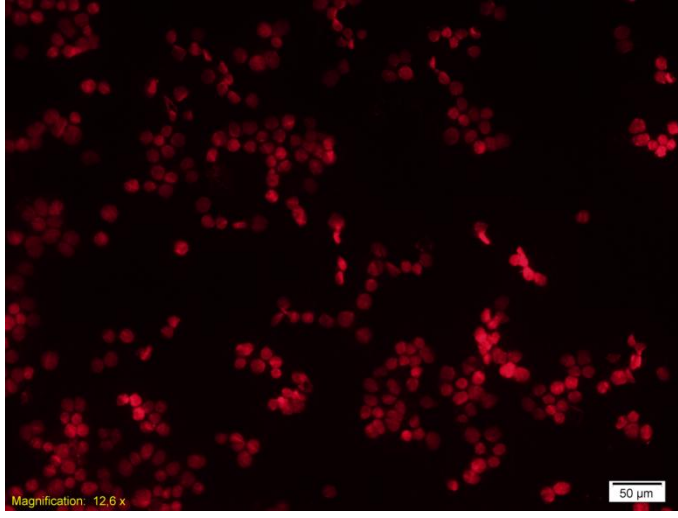
HeLa hücre hattında MA-AuFe-Kamp gurubunda 6. saatten itibaren kapanma başlamıştır. 48. saatte HeLa hücre hattı kontrol gurubunda % 100 kapanma gözlenirken Kamp, AuFe-Kamp ve MA-AuFe-Kamp gurubunda bu oran % 59,52, % 43,75, %31,11'dir.



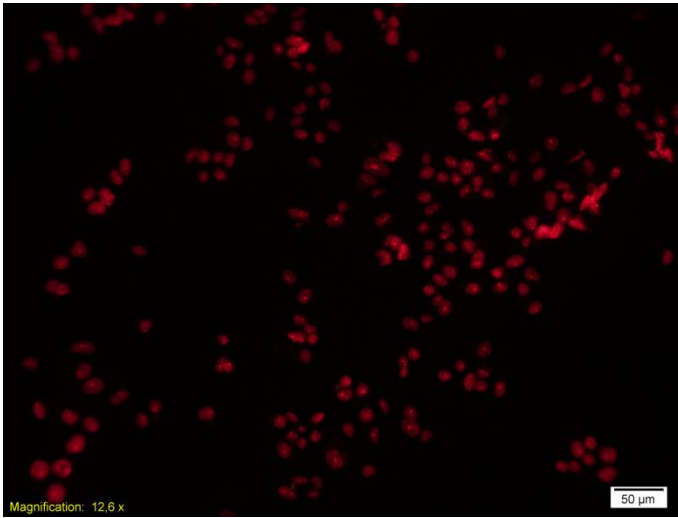
Şekil 4.24 MCF7 ve HeLa hücre hatlarında hücre migrasyonu değerleri.

4.5.5 Apoptosis sonuçları

%50 ölüme neden olan konsantrasyona (IC_{50}) sahip örneklerden MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerine eklenip 24 saat inkübasyona bırakılarak apoptosis çalışması gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi sonucunda Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatlarının her ikisi üzerinde de apoptotik etkilerinin olmadığı görülmüştür. Kamp ve AuFe-Kamp'ın apoptosisı tetiklediğine dair herhangi bir gösterge bulunmamaktadır. Apoptosis çalışması sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verilmiştir.

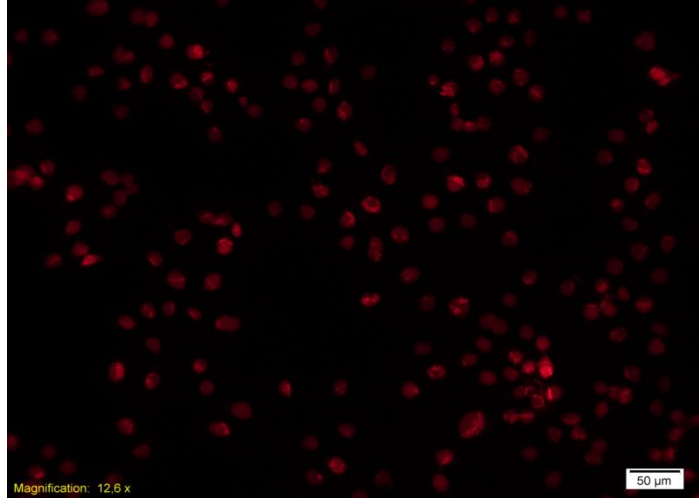


(a)

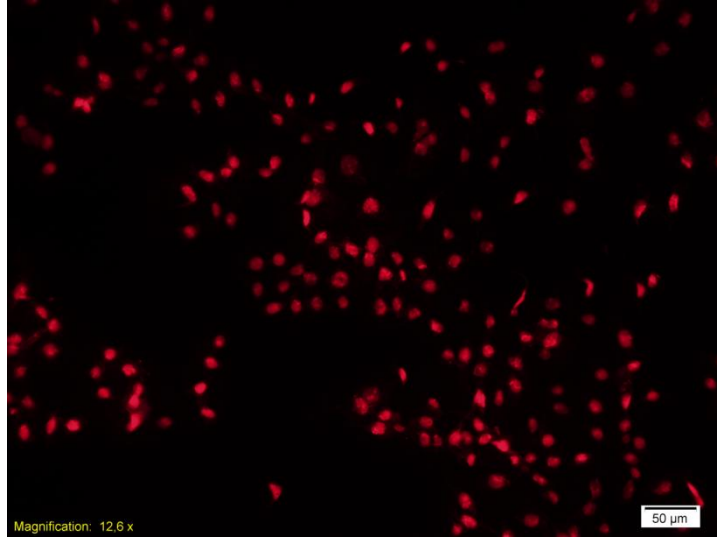


(b)

Şekil 4.25 MCF7 hücre hattında Kamp (a) ve AuFe-Kamp'ın (b) apoptotik etkisi.



(a)



(b)

Şekil 4.26 HeLa hücre hattında Kamp (a) ve AuFe-Kamp'ın (b) apoptotik etkisi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında mikroemülsiyon yöntemi kullanılarak demir nanoparçacığı çekirdeğinin etrafı altın tabakası ile kaplanarak manyetik özellikteki altın kaplı demir nanoparçacıkları ($\text{Au@Fe}_3\text{O}_4$) sentezlenmiştir. Sentezlenen altın kaplı demir nanoparçacıklarının karakterizasyonu SEM, TEM, VSM, XRD ve DLS analizleri ile yapılmıştır.

TEM analizi sonucunda parçacıkların ortalama boyutu $5,25 \pm 0,92$ nm olarak tespit edilmiştir. Yapılan DLS analizi sonucunda elde edilen parçacık boyutu diğer yöntemler ile belirlenen parçacık boyutundan farklı olup $74,63 \pm 28,16$ nm olarak belirlenmiştir. Bu verilerin ışığında parçacık boyutlarındaki farklılığın parçacıkların agregatlaşmasından kaynaklandığı sonucuna ulaşılmaktadır. DLS analizinde belirlenen PDI değerinin 0,2 den küçük ve 0,188 olarak bulunması, parçacıkların istenildiği şekilde monodispers olduğu sonucuna ulaşılmasına olanak tanımaktadır.

XRD ölçümleri sonucunda AuFe nanoparçacıklarına ait yansıma veren düzlemler; literatürdeki karakteristik altın ve demir pikleri ile eşleşerek, Au (111), Au (200)-Fe (110), Au (220)-Fe (200) ve Au (311) olarak indekslenmiştir. Diagramdan elde edilen verilere göre; sadece demir nanoparçacığına ait bir pik bulunmamakta ve demir motifine ait piklerin tamamının altın motifine ait pikler ile baskılandığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu da AuFe nanoparçacıkları sentezi esnasında, ortamda bulunan bütün demir nanoparçacıklarının etrafının altın ile kaplandığı ve AuFe nanoparçacığı sentezinin başarı ile gerçekleştiğinin kanıtı olma niteliğindedir.

VSM analizi sonuçlarına göre AuFe nanoparçacıklarının manyetizasyon değeri 5,3 emu/g olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu manyetizasyon değeri, literatürde yer alan benzer çalışmalardaki manyetizasyon değerlerinden daha düşüktür. XRD diagramında serbest altın nanoparçacıklarına ait piklerin bulunması, sentez esnasında demir nanoparçacığı miktarının yeterli olmadığını göstermektedir. AuFe nanoparçacığının manyetik özellik göstermesini sağlayan

demir nanoparçacığı miktarlarının artırılması ile manyetizasyonun daha yüksek bir değere ulaşabileceği düşünülmektedir

Kamptotesin'in AuFe nanoparçacıklarıyla konjugasyonun gerçekleştiğinin belirleyebilmek için FT-IR analizi ile yapı tayini yapılmıştır. FT-IR analizi sonrasında elde edilen spektrumda; AuFe nanoparçacıklarından elde edilen pikler ile AuFe nanoparçacığı konjuge Kamptotesin'den elde edilen piklerin örtüştüğü ve konjugasyonun başarı ile gerçekleştiği kanıtlanmıştır. Konjugasyon sonrasında AuFe nanoparçacıklarının Kamptotesin'e bağlanma veriminin tespit edilebilmesi için HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizinden elde edilen verilere göre AuFe nanoparçacıklarının Kamptotesin'e göre oldukça yüksek bir verimle (% 97,6) bağlandığı tespit edilmiştir.

İyodojen yöntemi kullanılarak radyoiyodinasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İşaretleme işlemi sonrasında yapılan TLRC, elektroforez, lipofilite ve stabilite çalışmaları ile kalite kontrol çalışmaları tamamlanmıştır. Yapılan kalite kontrol çalışmaları sonucunda Kamp'ın ^{131}I ile işaretleme veriminin oldukça yüksek olduğu (% $98,00 \pm 2,49$) ancak; AuFe-Kamp'ın ^{131}I ile işaretleme veriminin Kamp'a göre daha düşük olduğu (% $97,75 \pm 1,50$) belirlenmiştir. Yapılan stabilite çalışmaları Kamp'ın stabilitesinin AuFe nanoparçacıklar ile konjuge edildikten sonra arttığını göstermiştir. 24. Saatte Kamp ve AuFe-Kamp'ın stabilite verimleri sırası ile % $75,80 \pm 4,19$ ve % $76,20 \pm 3,28$ olarak tespit edilmiştir.

Kamp ve AuFe-Kamp'ın terapötik etkinliği *in vitro* olarak MCF7 ve HeLa hücre hatları kullanılarak belirlenmiştir. Hücre kültürü denemeleri kapsamında sitotoksosite, hücrelere tutunma etkinliği, proliferasyon hızı, hücre migrasyonu ve apoptosis çalışmaları yapılmıştır.

Kamptotesin ve AuFe-Kamp için sitotoksosite çalışması gerçekleştirilmiş ve bu çalışma sonucunda hücrelerdeki canlılık oranının her iki hücre hattında da zamanla düştüğü görülmüştür. AuFe-Kamp öngörüldüğü gibi, Kamptotesin'e oranla hücrelerdeki canlılık yüzdelerinde daha fazla bir düşüşe sebep olmuştur. Sitotoksosite çalışması ile birlikte WST-8 analizi gerçekleştirilmiş ve hücrelerdeki IC_{50} değerleri tespit edilmiştir.

Yapılan inkorporasyon çalışmaları sonucunda, kullanılan her iki hücre hattında da, ^{131}I -AuFe-Kamp, ^{131}I -Kamp'a göre daha yüksek oranlarda tutulum göstermiştir. Diğer taraftan; manyetik alan uygulanan AuFe-Kamp'ın hücrelerdeki bağlanma yüzdesi, diğer örneklerle kıyasla 1,4 kat daha fazladır.

Proliferasyon çalışmaları ile Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatlarındaki proliferasyon hızını düşürücü etkisi gösterilmiştir. Proliferasyon hızının HeLa hücre hattında MCF7 hücre hattına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan kullanılan her iki hücre hattında konsantrasyon ile proliferasyon hızının ters orantılı olduğu ve konsantrasyon artışı ile proliferasyon hızının düştüğü sonucuna ulaşılmaktadır.

Hücre migrasyonu çalışmalarına göre MCF7 ve HeLa hücre hatlarının her ikisinde de manyetik alan uygulanan AuFe-Kamp'ın hücre migrasyon hızı diğer örnekler arasında en düşük değerlere sahiptir. MCF7 hücre hattında 48. saatte kontrol grubunda % 100'lük bir kapanma mevcut iken, Kamp, AuFe-Kamp ve manyetik alan uygulanan AuFe-Kamp'ın % hücre migrasyon değerleri sırası ile % 19,44, % 20,51, % 19,05'dir. HeLa hücre hattındaki hücre migrasyonunun MCF7 hücre hattına oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Manyetik alan uygulanması ile AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerindeki tutulumunun arttığı görülmüştür. Diğer taraftan hücre migrasyonu ve proliferasyon çalışmaları sonucunda manyetik alan altındaki AuFe-Kamp'ın antiproliferatif etkiyi arttırdığı tespit edilmiştir.

Kamp ve AuFe-Kamp'ın MCF7 ve HeLa hücre hatları üzerinde yapılan apoptosis çalışması sonucunda her iki hücre hattında de apoptosise uğrayan hücreye rastlanmamıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla, Kamptotesin AuFe nanoparçacıkları ile konjuge edilerek manyetik özelliğe sahip olması sağlanmıştır. Manyetik alan yardımı ile molekülün hedef bölgeye yönelmesi sağlanmış ve bunun sonucunda hedef bölge içerisindeki konsantrasyonunun yükselmesi ile antikanser ajanının etkinliği arttırılmıştır. Elde edilen tüm bu sonuçların Topoizomeraz

inhibitörlerinin daha etkili bir şekilde kullanılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akbulut, H.** 2005, Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. s.281.
- Akbulut, H ve Akbulut K.G.,** 2005, Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. s.23.
- Asmis, T. R., and Saltz, L.,** 2008, Systemic therapy for colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 37(1), pp.287-295.
- Bocci, G., Falcone, A., Fioravanti, A., Orlandi, P., Di Paolo, A., Fanelli, G., Viacava, P., Naccarato, A.G., Kerbel, R.S., Danesi, R., Del Tacca M. and Allegrini, G.,** 2008, Antiangiogenic and anticolorectal cancer effects of metronomic irinotecan chemotherapy alone and in combination with semaxinib. *British Journal of Cancer*, 98(10), pp. 1619–1629.
- Camargo, P. H., Li, Z. Y., and Xia, Y.,** 2007, Colloidal building blocks with potential for magnetically configurable photonic crystals. *Soft Matter*, 3(10), pp. 1215-1222.
- Chauhan N. and Pundir C. S.,** 2014, Amperometric determination of acetylcholine—A neurotransmitter, bychitosan/gold-coated ferric oxide nanoparticles modified gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 61, pp. 1–8.
- Chen, A.Y. and Liu, L.F.** 1994, DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets. *Annu. Rev. Pharmacol., Toxicol.*, 34, pp. 191-218.
- Chu, E., Vincent T. DeVita, Jr.,** 2001, Editors; Vincent T.DeVita, Jr., Hellman, S.,Rosenberg, S.A. Cancer Principles&Practice of Oncology 6th edition. 289p.
- Chunfu, Z., Junquan, C., Duanzhi, Y., Yongxian, W., Yanlin, F. and Jiajü, T.,** 2004, Preparation and radiobelling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Applied radiation and isotopes: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine*, 61(6), pp. 1255-9.
- Crane R.,** 2001, Breast Cancers, In *Oncology Nursing*. 4th Ed. Philadelphia USA, Mosby, pp. 113-167.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cummings, M. R., ve Klug, W. S.,** 2002, Genetik, 6. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 816.
- Cullity B. D.,** 1996, X ışınlarının Difraksiyonu, (Çev. A. Sümer), İstanbul Teknik Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Cunningham, D., Maroun, J., Vanhoeffer, U. and Cutsem, E. V.,** 2001, Optimizing the Use of Irinotekan in Colorectal Cancer, *The Oncologist*; 6 (4), pp. 17-23.
- Çerçel A.,** 2006 Lokal İleri Meme Kanseri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54 Aralık, pp. 121 - 125.
- De Jong, F. A., de Jonge, M. J. A., Verweij, J. and Mathijssen, R. H. J.,** 2006, Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy, *Cancer Letters*, 234(1), pp. 90–106.
- deGroot F. M., Damen E.W. and Scheeren H.W.,** 2001, Anticancer prodrugs for application in monotherapy: targeting hypoxia, tumor-associated enzymes, and receptors. *Current Medicinal Chemistr.*, 8, pp. 1093–122.
- Dellabona, P. Moro, M., Crosti, MC, Casorati, G. and Corti, A.,** 1999, Vascular attack and immunotherapy: a ‘two hits’ approach to improve biological treatment of cancer. *Gene Therapy* 6, pp. 153-154.
- Du, W., Curran, D. P., Bevins, R. L., Zimmer, S. G., Zhang, J. and Burke, T. G.,** 2002, Synthesis and Evaluation of a Novel E-ring Modified α -Hydroxy Keto Ether Analogue of Camptothecin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, pp. 103–110.
- Erdik, E., Obalı M., Yüksekışık N., Öktemer A., Pekel T. ve İhsanoğlu E.,** 2000, Denel Organik Kimya, Ankara, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Yayınları, 3.Baskı, 835s.
- Fan, Y., Weinstein, J. N., Kohn, K. W., Shi, L. M. and Pommier, Y.,** 1998. Molecular modeling studies of the DNA - topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin, *Journal Medicine Chemistry*, 41, p. 2216.
- Ferrari M.,** 2005, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Naure Reviews Cancer*, 5, pp. 161–171.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gerstbach G.**, 1996, How to get an European centimeter geoid (“astro-geological geoid”), *Physics & Chemistry Research of Earth*.
- Gilby, E. D., Jeffcoate and Edwards**, 2010, 125-Iodine tracers for steroid radioimmunoassay, *Journal of Endocrinology*, 58 (1), PMID 4578967.
- Gopalakrishnan, R. and Shankar, B.**, 2014, Multiple shoot cultures of *Ophiorrhiza rugosa* var. *decumbens* Deb and Mondal A viable renewable source for the continuous production of bioactive *Camptotheca* alkaloids apart from stems of the parent plant of *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer. *Phytomedicine*, 21(3), pp. 383–389.
- Gupta, A.K and Gupta, M.**, 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), pp. 3995-4021.
- Halefi, U.O.**, 2004, Magnetically modulated therapeutic systems. *International journal of pharmaceutics*, 277(1-2), pp. 19-24.
- Harper, P. V., Siemens, W. D., Lathrop, K. A., Brizel, H. E. and Harrison R. W.**, 2001, Iodine-125. *Prock. Japan Conf. Radioisotopes*;4th, 1961p.
- Hertz, B., Schueller, K. And Saul H.**, 2010 MD. A Pionner in the use of Radioactive Iodine. *Endocrine Practice*, 16(4), pp. 713-715.
- Hien Pham, T. T., Cao, C., and Sim, S. J.**, 2008, Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 320(15), 2049-2055.
- Huang, Q., Wang, L. and Lu, W.**, 2013, Evolution in medicinal chemistry of E-ring-modified Camptothecin analogs as anticancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, pp. 746-757
- Innocenti, F., Undevia, S. D., Iyer, L., Chen, P. X., Das, S., Kocherginsky, M., and Ratain, M. J.**, 2004, Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *Journal of Clinical Oncology*, 22(8), pp. 1382-1388.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Islam, M. R., Bach, L. G., Nga, T. T. and Lim, K. T., 2013,** Covalent ligation of gold coated iron nanoparticles to the multi-walled carbon nanotubes employing click chemistry. *Journal of Alloyes and Compounds*, 561, pp. 201-205.
- Jafari, T., Simchi, A. and Khakpash, N., 2010,** Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron–gold core–shell nanoparticles coated with polyglycerol, *Journal of Colloid and Interface Science*, 345 pp. 64–71.
- Jeong, B., Choi, Y. K., Bae, Y. H., Zentner G. and Kim, S. V., 1999,** New biodegradable polimers for injectable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 62(1-2), pp. 109-114.
- Jew, S. S., Roh, E. Y., Kim, H. J., and Goo Kim, M., 2000,** Enantioselective synthesis of diethyl-2-formyl-2-(methoxymethoxy) butyramide, a key intermediate for camptothecin analogues, via asymmetric bromolactonization. *Tetrahedron: Asymmetry* 11(19), pp.3985-3994.
- Jiles, D., 1991,** Introduction to Magnetism and Magnetic Materials Chapman and Hall, Ltd, London 52p.
- Kahler, G., and Della Torre, E., 2000,** Application of simplified vector Preisach model to vector magnetizing process. *Physica B: Condensed Matter*, 275(1), pp. 114-119.
- Kahn, M., and Kleinberg, J., 1977,** *Radiochemistry of iodine*. Vol. 3062. National Academies.
- Kadınlarda En Çok Görülen On Kanser Türü, 1999,** Sağlık Bakanlığı, Erişim: <http://www.saglik.gov.tr/extras/istatistikler/apk2001/092.htm> Erişim tarihi: 23.01.2008.
- Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Erişim:**
www.saglik.gov.tr/KSDB/dosyagoster.aspx?DIL=1&BELGEANAH=16035&DOSYASIM=2007%20Starteji.doc , **Erişim tarihi:** 16.01.2008
- Kanser Yüğü 2006 Raporu, Erişim:**
www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=804&1=1-19k, **Erişim tarihi:** 16.01.2008.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J. and Moller, L.,** 2008. *Chem. Res. Toxicol.*, 21, pp. 1726–1732.
- Kim, Y.I.,** 2007, Evolution of Local Structures İn Polycrystalline $Zn_{1-x}Mg_xO$ Studied By Raman Spectroscopy And Synchrotron X-Ray Pair-Distribution-Function Analysis. *Physical Review B*, 76, 115204.
- Koizumi, F., Kitagawa, M., Negishi, T., Onda, T., Matsumoto, S., Hamaguchi, T. and Matsumura, Y.,** 1996, Novel SN-38–Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. *Cancer Research* 66, 10048p.
- Konukoğlu, D., Turhan, M. S.,** 2005. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezini. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 36(1).
- Kowalsky, R.J. and Perry, J.P.,** 1987, Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice, USA, 13-15, pp. 123-147.
- Köse D.,** 2013, Manyetik Nanopartikül Destekli Katalizör Sentezi, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Caroline, R., Vander Elst, L., and Muller, R. N.,** 2008, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization. *Physicochemical Characterizations, and Biological Applications Chem. Rev., Fransa*, 108, pp. 2064–2110.
- Lee J. H., Huh, Y. M., Jun, Y. W., Seo, J. W., Jang, J. T., Song, H. T., Kim, S., Cho, E. J., Yoon, H. G., Suh, J. S., and Cheon, J.,** 2007 *Nature Medicine*, 13(1), pp. 95-99.
- Lembares, N., Beck, R.N., and Harper, P.V.,** 1970 Use of a Semiconductor Detector to Increase Image Contrast in Thyroid Scanning with I-125. *Journal of Nuclear Medicine* 11(6), 1850p. Samuel Morse Dr, Reston, Va 20190-5316: Soc Nuclear Medicine INC.
- Lorence A., Nessler C. L.,** 2004, Molecules of Interest Camptothecin, over four decades of surprising findings, *Phytochemistry*, pp. 2735–2749.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maharaj, A.S.R., Sent-Geniez, M., Maldonao, A.E. and D'Amore, P.A., 2006.** Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *American Journal of Pathology*, 168(2).
- Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Milani, A.S. and Stroeve, P., 2009.** *Nanotechnology*, 20, pp. 1–8.
- Mahmoudi, M., Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Boutry, S., Simchi, A., Journeay, W. S. and Laurent, S., 2011,** Magnetic resonance imaging tracking of stem cells in vivo using iron oxide nanoparticles as a tool for the advancement of clinical regenerative medicine. *Chemical reviews*, 111(2), pp. 253-80.
- Mahmoudi, M., Simchi, A. and Imani, M., 2010,** Recent advances in surface engineering of supermagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7(S2), pp.S1-S27.
- Mead, G.M., Macbeth, F.R., Green, J.A., Williams, C.J., Whitehouse, J.M.A., Clifford, P., O'Connor, A.D., Carter, R.L., Dalley, V.M., Darby, A.J., Deutsch, G., Durden-Smith, D.J., Edwards, W.G., Grant, H. and McGuire, N.G., 1982,** Treatment of head and neck cancer. *The Lancet*, 320(8503), 979p.
- Medine İ., 2008,** 125/131I İşaretli urasil'in glukuronid sentezi ve manyetik özellik kazandırılarak yeni bir manyetik ilaç taşıyıcı oluşturulması. Doktora tezi, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü.
- Moody, T.W., Mantey, S.A., Fuselier, J.A., Coy, D.A. and Jensen, R.T., 2007,** Vasoactive intestinal peptide–camptothecin conjugates inhibit the proliferation of breast cancer cells. *Peptides*, 28, pp. 1883–1890.
- Narra V. R., Howell, R.W, Harapanhalli, R.S., Sastry, K.S.R. and Rao, D.V., 1992,** Radiotoxicity of Some Iodine-123, Iodine-125, and Iodine-131-labelled Compounds in Mouse Tastes: Implications for Radiopharmaceutical Design. *Journal of Nuclear Medicine*, 33 (12), pp. 2196-2201
- Nitiss L. J., 2009,** DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), pp. 327-337.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pamir A.**, 2005, Tıbbi Onkoloji Kitabı, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antip Yayınları*, Editör İçli F., 145s.
- Panno, J.**, 2004, Cancer: The Role of Genes, Lifestyle, and Environment, *Facts On File, Inc.*, 177p.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.**, 2006, Global Cancer Statistics 2002. CAA Cancer Journal for Clinicians, *American Cancer Society, Lippincott Williams&Wilkins*.
- Parveen S. and Sahoo S.**, 2008, Polymeric nanoparticles for cancer therapy, *Journal of Drug Targeting*, 16, pp. 108–123.
- Pindur, U. and Lemster, T.** 1998, Antitumor drug design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I. *Pharmazie*, 5(32), pp. 79-86.
- Pommier Y.** 2006, Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), pp. 789-802.
- Pommier Y.** 2009, DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chemical Reviews*, 109(7), pp. 2894-2902.
- Potmesil, M. and Kohn, K.W.**, 1991, DNA topoisomerase in cancer, *Oxford University Press*, New York.
- Ralph, R.K., Judd, W., Pommier, Y., Kohn, K.W., Neidle, S. and Waring, M.J.**, 1994, DNA topoisomerases in molecular aspects and anticancer drug. *DNA interaction*, 2(1), Macmillan, London.
- Ribatti, D.**, 2004, The first evidence of the tumor-induced angiogenesis *in vivo* by using the chorioallantoic membrane assay dated 1913. *Leukemia*, 18, pp. 1350–1351.
- Ribatti, D.**, 2004, The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *BJH*, 128, pp. 303-309.
- Reed, S.J.B.**, 2005, Electron microprobe Analysis and Scanning electron microscopy in geology, Reed, Cambridge.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reich, E., and Schibli, A.**, 2007, High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. *New York Thieme*, pp. 175-192.
- Rivkees, S.A., Charles Sklar, C. and Freemark, M.**, 1998, The management of Graves disease in children, with special emphasis on radioiodine treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(11) pp. 3767-3776.
- Rodríguez-Berna, G., Mangas-Sanjuán, V., Gonzalez-Alvarez, M., Gonzalez-Alvarez, I., García-Giménez, J. L., Cabañas, M. J. D., and Corma, A.** 2014, A promising camptothecin derivative: Semisynthesis, antitumor activity and intestinal permeability. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 366-373.
- Sahoo, S. K., Parveen, S. and Panda, J.**, 2007, The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, pp. 20-31.
- Sakasai, R., Teraoka, H., Takag, M., and Tibbetts S. R.**, 2010, Transcriptiondependent activation of ATM prevents DNA-PK mediated cell death in response to topoisomerase I Poison. *Journal Biology Chemistry*, 285(20), pp. 15201-15208.
- Seven B.**, 2013, Modifiye elektroaktif tabakaların hazırlanması, karakterizasyonu ve kanser hücrelerine affinitelerinin *in vitro* incelenmesi. Yüksek lisans tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Srikanth, H., Carpenter, E.E., Spinu, L., Wiggins, J., Zhou, W.L. and O'Connor, C.J.**, 2001, Dynamic transverse susceptibility in Au-Fe-Au nanoparticles. *Materials Science and Engineering*, 304(306), pp. 901-904.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G.J. and Champoux, J.J.**, 1998, A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, 279, pp. 1534-1541.
- Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L. and Pommier, Y.** 2000, Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3977p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- T.C. Sağlık Bakanlığı.** 2002, T.C. Sağlık Bakanlığı Kanseri Savaş Daire Başkanlığı 1998 Yılı Türkiye Kanseri İstatistikleri.
- Tebbutt, N.C., Cattell, E., Midgley, R., Cunningham, D. and Kerr, D.,** 2002, Systemic treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 38, pp. 1000-1015.
- Terrero, M.N. and Li, S.,** 2004, Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Gene Ther Mol Biol*, 8, pp. 175-180.
- Toblem G.,** 2007, VEGF: a key therapeutic target for the treatment of cancer-insights into its role and pharmacological inhibition. *Targ Oncol*, 2, pp. 153-164.
- Tu, S., Yasui, Y., Kuniyuki, A., Schwartz, S., Jackson, J. and Taylor, V.,** 2002, Breast cancer screening: stages of adoption among Cambodian American women, *Cancer Detection and Prevention*, 26 pp. 33-41.
- Tuğrul C.,** 2004, Her Yönüyle Meme Kanseri. *İstanbul Boyut Yayın Grubu*, ss. 7-84.
- Türkiye Kanseri İstatistikleri, Türk Kanseri Araştırma ve Savaş Kurumu,** 2008, Erişim: http://www.turkkanser.org.tr/pdf/turkiye%20_istatistikler-2pdf.
- Uğur, A.,** 2009, Yapay integrin temelli nanobiyokonjugatif platform geliştirilmesi. Yüksek lisans tezi, A.Ü. İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı.
- Ünak, A.G.,** 2009, Nanobiyoteknolojik yaklaşımlarla hazırlanmış modifiye altın nanopartiküllerinin hücre kültürüne dayalı meme kanseri araştırmalarında kullanılması ve biyoafinitelerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Osherooff, N.** 2003. DNA Topology, Topoisomerases and Chemotherapy, IGP, Autum.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xu, C., Xu, K., Gu, H., Zheng, R., Liu, H., Zhang, X. and Xu, B.,** 2004, Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(32), pp. 9938-9939.
- Yoon, T. J., Yu, K. N., Kim, E., Kim, J. S., Kim, B. G., Yun, S. H. and Park, S. B.,** 2006, Specific targeting, cell sorting, and bioimaging with smart magnetic silica core-shell nanomaterials. *Small*, 2(2), pp. 209-215.
- Yurt, F.,** 1998, Benzodiazepin (diazepam) ve cyclopyrrolone (Zopiclone) grubu farmasötiklerin I-131 ile işaretlenmesi. Doktora tezi, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 26.s.
- Vanhoefer, U., Harstrick, A., Achterrath, W., Cao, S., Seeber, S., Rustum, Y.M.,** 2001, Irinotekan in the Treatment of Colorectal Cancer: Clinical Overview. *Journal of Clinical Oncology*, 19(5), pp:1501-1518.
- Vincenzi, B., Santini, D., Russo, A., Gavasci, M., Battistoni, F., Dicuonzo, G., Rocci, L., Rosaria, VM., Gebbia, N. and Tonini, G.,** 2007, Circulating VEGF reduction, response and outcome in advanced colorectal cancer patients treated with cetuximab plus irinotecan. *Pharmacogenomics*, 8(4), pp. 319-27.
- Werther, K., Christensen, I.J., Brünner, N., Nielsen, H.J. and the Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group.,** 2000, Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*, 26, pp. 657-662.
- Whitesides, G.,** 2003, The ‘Right’ size in nanobiotechnology, *Nature Biotechnology*, 21, pp. 1161-1165.
- Zhao, X., Tapeç-Dytioco, R., Wang, K., and Tan, W.,** 2003, Collection of trace amounts of DNA/mRNA molecules using genomagnetic nanocaptors. *Analytical chemistry*, 75(14), pp. 3476-3483.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Özge TEKİN

Doğum Yeri: Kastamonu

Doğum Yılı: 20.11.1989

Öğrenim Durumu:

Lise: Ankara Atatürk Anadolu Lisesi (2003-2007)

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2007 - 2012)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı (2012 -)

İş Bilgileri:

21. Yüzyıl Bilimsel ve Teknolojik Araştırma-Geliştirme, Danışmanlık, Üretim, Organizasyon San. Tic. Ltd. Şti. Araştırmacı kimyager. (Nisan 2012 - Ağustos 2013)

DMS Daş Mürekkep ve Kimya San. Tic. Ltd. Şti. AR-GE laboratuvarı kimyager.(Kasım 2014 - Ocak 2015)

BAGFAŞ Bandırna Gübre Fabrikaları A.Ş. İş Sağlığı ve Güvenliği Uzmanı (Ocak 2015 -)