



**DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE
DİSÜLFİRAM YÜKLÜ NANOPARÇACIKLARIN
ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Kübra SOLAK

**Yüksek Lisans Tezi
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet MAVİ
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE DİSÜLFİRAM
YÜKLÜ NANOPARÇACIKLARIN ANTİKANSER ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Kübra SOLAK

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı**

ERZURUM

2017

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE DİSÜLFİRAM YÜKLÜ
NANOPARÇACIKLARIN ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Ahmet MAVİ danışmanlığında, Kübra SOLAK tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanpbilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ahmet MAVİ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **28.12./2017** tarih ve **51/.../31** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2015.202 ve 2015.412

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE DİSÜLFİRAM YÜKLÜ NANOPARÇACIKLARIN ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Kübra SOLAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Bu çalışmada toksik olmayan, biyouyumlu ve gözenekli yapıya sahip manyetik silika nano materyallerin ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$) kullanıldığı ilaç taşıyıcı sistemin hazırlanması amaçlanmıştır. İlaç taşıma sisteminin suda çözünürlüğünü artırmak ve kanser hücrelerine spesifikliğini sağlamak amacıyla ilaç yüklenmiş yapı, folik asit bağlı polietilenimin (PEI-FA) ile kaplanmıştır. Böylece ~160 nm boyutlarına sahip manyetik çekirdekli mezogözenekli folik asit takılı nano taşıyıcı sistem (mMDPF) hazırlanmıştır. mMDPF'lerin ilaç yükleme oranı %4,35 olarak belirlenmiştir. Partiküllerin ilaç salım kinetiği araştırılmış ve en iyi ilaç salımı pH 6,0'da 37°C'de elde edilmiştir. mMDPF, bakır ve/veya sodyum nitroprusit ile birlikte MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine uygulanarak ilaç sisteminin meme kanseri tedavisinde etkinliği artırılmıştır. mMDPF'nin MCF-7 hücreleri tarafından daha fazla alındığı ve MCF-7'ye karşı toksik etkisinin MCF-10A'ya göre çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

2017, 117 sayfa

Anahtar Kelimeler: İlaç Taşıma Sistemi, Manyetik Nanoparçacık, Fe_3O_4 , Disülfiram, Kanser

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF ANTICANCER EFFECT OF DISULFIRAM LOADED NANOPARTICLES ON/IN EXPERIMENTAL BREAST CANCER MODEL

Kübra SOLAK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nano Science and Nano Engineering
Nanobiotechnology Science

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

In this study, it was aimed to prepare a drug delivery system using magnetic silica nanomaterial ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$) which was non-toxic, biocompatible and porous. The drug-loaded structure was coated with folic acid linked polyethyleneimine (PEI-FA) to increase the water solubility of the drug delivery system and to provide specificity for cancer cells. Thus, a magnetic core mesoporous nano-carrier system (mMDPF) with ~160 nm dimensions was prepared. The drug-loading capacity of mMDPF was measured as 4.35%. Drug release kinetics of mMDPF was investigated and the best drug release was obtained at pH 6.0 and 37°C. The efficacy of the drug system in breast cancer treatment was improved by applying mMDPF with copper and/or sodium nitroprusside to MCF-7 and MCF-10A cells. It was observed that mMDPF was taken more by the MCF-7 cells and its toxicity on MCF-7 was much higher cells than MCF-10A cells.

2017, 117 pages

Keywords: Drug Delivery System, Magnetic Nanoparticle, Fe_3O_4 , Disulfiram, Cancer

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi birikiminden, önerilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, güler yüzünü eksiltmeyen değerli tez hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ'ye en içten sevgi ve saygılarımla birlikte teşekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi her konudaki desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL'a, çalışmamın HPLC analizlerinde yardımcı olan ve bu konudakiengin tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Yrd. Doç. Dr. Bilal YILMAZ'a ve nanoparçacık karakterizasyonu konusunda desteklerini esirgemeyen DAYTAM ailesine halisane teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca bana büyük destek ve güç kaynağı olan, varlık sebeplerim annem Sayın Semra SOLAK, babam Sayın Ahmet SOLAK ve kardeşlerim Zeynep ve Abdussamet SOLAK başta olmak üzere her daim dualarını benden eksik etmeyen tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Atatürk Üniversitesi Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı kapsamında Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Araştırma Laboratuvarı ve Doğu Anadolu İleri Teknoloji Araştırma Merkezi (DAYTAM), Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Aralık, 2017

Kübra SOLAK

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Problem Tespiti	1
1.2. Çalışmanın Amacı	1
1.3. Kanser ve Tedavi Yöntemleri	3
1.3.1. Hedefe yönelik tedavi	6
1.3.2. Kimyasal tedavi ilaçları	11
1.3.3. Disülfiram ilacı	13
1.4. İlaç Taşıma Sistemleri ve Nano-sistemler	18
1.4.1. Mezogözenekli nano yapılar	21
1.4.2. Demir oksit manyetik nanoparçacıklar (MNP)	27
2. KAYNAK ÖZETLERİ	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	40
3.1. Kullanılan Kimyasallar	40
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	41
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler	43
3.4. İlaç Taşıyıcı Sistemin Hazırlanışı	43
3.4.1. Demir oksit manyetik nanoparçacık (Fe_3O_4 MNP, manyetit) sentezi	43
3.4.2. Mezogözenekli silika kaplı Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$) sentezi	45
3.5. Nanoparçacıklara İlaç Yükleme ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}$)	48
3.5.1. Yüzey modifikasyonu ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}@PEI\text{-FA}$, mMDPF)	49
3.6. Nanoparçacık karakterizasyonu	50
3.7. İlaç Salım Kinetiğinin İncelenmesi	55

3.7.1.	HPLC yöntemi	56
3.7.1.a.	HPLC yönteminin geçerlilik testi (validasyon).....	56
3.8.	Hücre Kültürü.....	58
3.8.1.	Hücre canlılığı ve sayımı	61
3.8.2.	Doz belirleme ve ilaç uygulama.....	62
3.8.3.	Toksisite testi (MTS)	62
3.8.4.	Nanoparçacıkların hücresel alımı.....	63
3.8.5.	Klonojenik deney	64
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	65
4.1.	İlaç Taşıyıcı Sistem	65
4.2.	İlaç Yükleme Oranı	83
4.3.	İlaç Salımı	85
4.4.	In vitro Deneyler	87
4.4.1.	Nanoparçacıkların hücresel alımı.....	92
4.4.2.	Hücre canlılığı.....	95
4.4.3.	Klonojenik deney	102
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	105
	KAYNAKLAR	107
	ÖZGEÇMİŞ.....	118

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

g	Gram
g (RCF)	Göreceli santrifüj kuvveti (Relative centrifugal force)
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
°	Derece
C	Selsiyus (Santigrat)
K	Kelvin
K	Şekil parametresi (manyetit için 0,89)
mL	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
R _h	Hidrodinamik boyut
IC ₅₀ değeri	Hücre büyümesinin %50 oranında baskılandığı ilaç derişimi
λ	Dalga boyu

Kısaltmalar

BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
bk.	Bakınız
CTAB	Heksadesiltrimetil-amonyum bromür
Cu	Bakır
DAYTAM	Doğu Anadolu İleri Teknoloji Araştırma Merkezi
DDTC	Dietilditiyokarbomat
DLS	Dinamik ışık saçılması
DOX	Doksorubisin
DSF	Disülfiram

FA	Folik asit, folat
Fe	Demir
FHWM	Full Width Half Maxima, pik şiddetinin maksimum değerinin yarısına düştüğü pik yarı genişliği
FITC-β-CD	floresan izotiosiyanat-β-siklodekstrin
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
MDR	Çoklu ilaç direnç mekanizması
mMDPF	Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ -DSF@PEI-FA
mMPF	Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ @PEI-FA
MNP	Manyetik nanoparçacık
MSP	Mezogözenekli nanoparçacık
NP	Nanoparçacık
OA	Oleik asit
OAm	Oleyilamin
PCL	Poli (ε-kaprolakton)
PEI	Polietilenimin
PEG	Polietilenglikol
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SNP	Sodyum nitroprusit
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
UV/VIS/NIR	Ultra viyole/görünür bölge/yakın kızılötesi
UV/VIS	Ultra viyole görünür bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tez çalışmasının genel amacı.	2
Şekil 1.2. İnsan tümörünün çok aşamalı gelişim süreci.....	4
Şekil 1.3. Türkiye’de cinsiyete bağlı olarak en sık karşılaşılan kanser vakaları (WHO 2014)	5
Şekil 1.4. Kanser hücrelerini hedefleme yöntemleri.....	8
Şekil 1.5. Folik asitin kimyasal yapısı	8
Şekil 1.6. FR-bağımlı hücresel alım ve proton sünger etki mekanizması	10
Şekil 1.7. Dallanmış yapıya sahip PEI.....	11
Şekil 1.8. Kemoterapi ajanlarının doz-cevap eğrisi.....	12
Şekil 1.9. Disülfiramın kimyasal yapısı.	13
Şekil 1.10. DSF metabolizması.....	14
Şekil 1.11. ALDH metabolizması.....	15
Şekil 1.12. DDTC-bakır (Cu) kompleksi.....	16
Şekil 1.13. Çeşitli ilaç taşıma sistemleri	19
Şekil 1.14. Nanomalzeme sentez yöntemleri ve örnekleri.....	20
Şekil 1.15. Gözenekli yapıların sınıflandırılması	22
Şekil 1.16. Gözenek çeşitleri	23
Şekil 1.17. Web of Science alıntılama raporu.....	26
Şekil 1.18. Manyetizma genel olarak beş gruba ayrılmaktadır.....	28
Şekil 1.19. Birlikte çöktürme yöntemi ile manyetit üretim yolu (Ahn <i>et al.</i> 2012).....	29
Şekil 1.20. 2,6 nm boyutlu bir Fe ₃ O ₄ MNP	30
Şekil 1.21. Birlikte çöktürme yöntemi reaksiyon denklemi	31
Şekil 1.22. Manyetik hipertermi	32
Şekil 1.23. Manyetik çekirdek ve kabuk formunda MNP’ler.....	33
Şekil 3.1. Oleyilamin kaplı Fe ₃ O ₄ MNP sentezi için kullanılmış olan schlenk sistemi..	44
Şekil 3.2. Fe ₃ O ₄ MNP sentezinin süre-sıcaklık ilişkisi.....	45
Şekil 3.3. (A) Su-yag mikroemülsiyonunun şematik gösterimi ve (B) mikroemülsiyonun fotoğrafı.....	46
Şekil 3.4. Silika kaplama reaksiyonu (aging)	47

Şekil 3.5. (A) Kalsinasyon işleminin şematik gösterimi ve (B) süreçte kullanılan fırın	48
Şekil 3.6. Gözenekli taşıyıcı sisteme DSF (Kırmızı) yüklenmesi	49
Şekil 3.7. İlaç yüklü nano taşıyıcının PEI-FA ile yüzey modifikasyonu.....	50
Şekil 3.8. Vertex 70V FTIR spektrometresi, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi	51
Şekil 3.9. Zetasizer, ZS90, Malvern, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi	52
Şekil 3.10. İzoterm eğrileri	54
Şekil 3.11. Mezogözenekli yapılarda gözlenen gecikme kavisleri (ALothman 2012) ..	55
Şekil 3.12. Hücre kültürü çalışmalarının yürütüldüğü Class II tip steril kabin	59
Şekil 3.13. Thoma lamında canlı (parlak) ve ölü (mavi) hücrelerin görünümü	62
Şekil 4.1. NP'lerin çözücüde dağılım ve manyetik yanıtlama (responsiveness) bulguları	66
Şekil 4.2. Fe ₃ O ₄ MNP'lerinin XRD kırınım deseni	67
Şekil 4.3. (A) Oleyilamin (B) Oleyilamin bağlı Fe ₃ O ₄ MNP (C) Oleyilamin bağlı Fe ₃ O ₄ MNP'nin FTIR spektrumu	68
Şekil 4.4. Fe ₃ O ₄ MNP'lerinin (A) SEM ve (B) TEM görüntüsü. (C) Fe ₃ O ₄ MNP'lerin hidrodinamik boyut (Rh) dağılımı	69
Şekil 4.5. Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ MNP'lerinin XRD kırınım deseni	70
Şekil 4.6. (A) Silika kaplama ve (B) Kalsinasyonla CTAB'in çıkarıldığını gösteren FTIR sonuçları	71
Şekil 4.7. Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ MNP'lerin (A) SEM ve (B) TEM görüntüleri.....	73
Şekil 4.8. Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ MNP'lere ait zeta potansiyel ölçümü	74
Şekil 4.9. İlaç (DSF) ve ilaç yüklenmiş taşıyıcı sisteme (Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ -DSF) ait FTIR sonucu	75
Şekil 4.10. FA, PEI ve Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ -DSF@PEI-FA (mMDPF) için IR spektrumu ...	77
Şekil 4.11. mMDPF'in DLS analizi boyut sonuçları.....	78
Şekil 4.12. UV spektrofotometre analizi ile FA bağlanma.....	79
Şekil 4.13. İlaç içermeyen taşıyıcı sistem (Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ @PEI-FA, mMPF).....	80
Şekil 4.14. Nitrojen adsorbsiyon-desorbsiyon analizi BET grafiği	81
Şekil 4.15. mMDPF'lerin gözeneklerine ait TEM görüntüsü.....	82
Şekil 4.16. BHJ analizi ile gözenek hacmi ve çapı	83
Şekil 4.17. DSF kalibrasyon eğrisi	84

Şekil 4.18. Salım örneklerinden elde edilen kromatogramlara ait pik alanlarının kalibrasyon eğrisinde yerine konulması.....	85
Şekil 4.19. mMDPF sisteminin DSF salım kinetiği.....	86
Şekil 4.20. Çalışılan hücre hatlarının morfolojik kontrolü	87
Şekil 4.21. Fe ₃ O ₄ @mSiO ₂ toksisitesi	88
Şekil 4.22. DSF için MTS canlılık testi.	89
Şekil 4.23. Bakır toksisitesi	90
Şekil 4.24. SNP toksik etkisi.....	91
Şekil 4.25. mMPF'in 24 saat sonunda hücre hatları üzerine etkisi.....	92
Şekil 4.26. Zaman bağımlı mMDPF'in hücre alımı	94
Şekil 4.27. mMDPF'lerin hücre alımının gösterimi için Prussian Mavisi ile boyama	95
Şekil 4.28. mMDPF'in MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerinde 24 saat sonundaki etkisi	96
Şekil 4.29. 60 µg/mL mMDPF uygulamasının morfolojik etkisi.....	97
Şekil 4.30. DSF (1 µM)'ın Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) ile kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine 24 saatlik toksik etkisi.....	98
Şekil 4.31. mMPF'in (60 µg/mL) Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) ile kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine 24 saatlik toksik etkisi.....	99
Şekil 4.32. mMDPF (60 µg/mL)'in Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) ile kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine 24 saatlik toksik etkisi	100
Şekil 4.33. 60 µg/mL mMDPF, Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) uygulaması	101
Şekil 4.34. Klonojenik deney.....	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İlaçlar etki ve mekanizmaları.....	13
Çizelge 1.2. DSF taşınmasında kullanılan sistemler, yükleme ve salım oranları	18
Çizelge 1.3. Manyetik mezogözenekli nano-taşıyıcı sistemlerinin özellikleri	34
Çizelge 3.1. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	42
Çizelge 3.2. HPLC çalışmasında disülfirama ait kalibrasyon eğrileri ile ilgili istatistik değerleri.....	57
Çizelge 3.3. HPLC yönteminin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri	57
Çizelge 3.4. HPLC yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri .	58
Çizelge 3.5. Disülfiramın HPLC yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri.....	58
Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan hücre hatları	60
Çizelge 3.7. Hücre ekim yoğunluğu ve uygulanan medyum miktarı	60

1. GİRİŞ

1.1. Problem Tespiti

Kanser ilaçları, intravenöz (damar içi enjeksiyon) veya oral yolla vücuda gönderilirken kanser hücrelerine yeterli miktarda ulaşması arzulanır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu suda çözünmez veya az çözünür, immünojeniktir¹ veya vücut ortamlarında (kan, mide gibi) kararsızdır (Bardin *et al.* 2011; Narvekar *et al.* 2014). Bu nedenle tedavide yüksek doz ilaç uygulanmaktadır. Yüksek doz ilaç uygulaması sonucunda, kanser hücrelerinin yanında vücuttaki her bir hücre, ilaçtan olumsuz yönde etkilenmektedir.

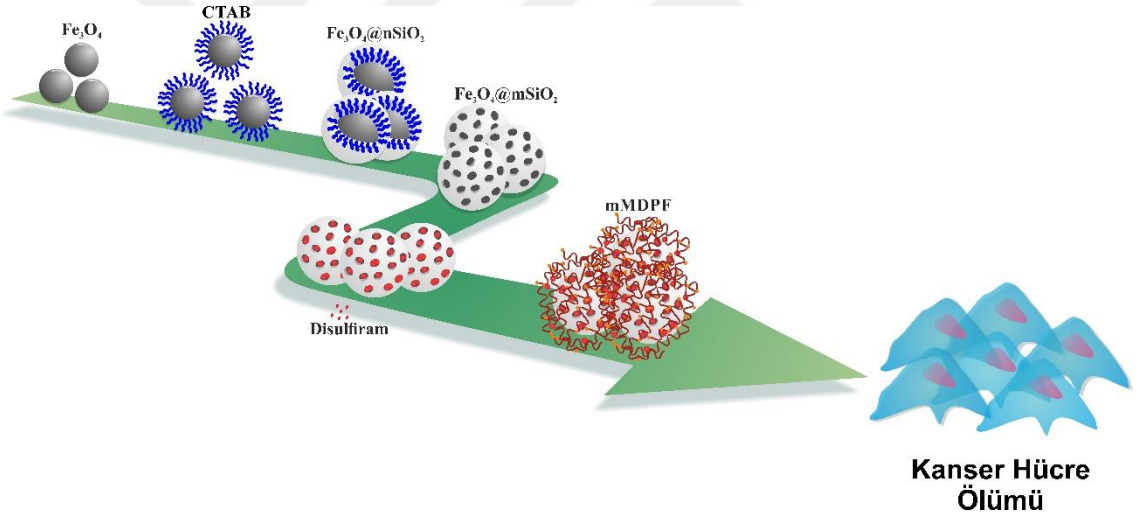
Geliştirilecek taşıyıcı sistemler ile ilaç, suda çözünür bir matriks içerisinde taşınabilir. Seçilen taşıyıcı sistemin immünojenik olmaması, sadece hedef bölge/hücrelerde ilacı salması, suda çözünür olması ve vücut sıvılarında degradasyona karşı ilacı koruyabilmesi belirtilen problemlerin çözümü olabilir. Tüm bu özelliklere sahip olan taşıyıcı molekülün, damarlardan geçebilecek boyutlarda olması gerekmektedir.

1.2. Çalışmanın Amacı

İlaç taşıyıcı sistemler (DDSs, Drug Delivery Systems), ilacın bir taşıyıcı üzerinde hedefe özgül taşınmasını sağlar ve/veya yalnızca amaçlanan bölgede faaliyet göstererek sağlıklı dokuları ilacın yan etkilerinden korur. İlaç taşıyıcı sistemler, ısı veya ışık tedavisi ile birleştirilerek multifonksiyonel tedavilerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Hedef seçiciliği yüksek olarak hazırlanabilen çoklu ilaç taşıyıcı sistemler, teropötik açıdan hücresel yolları sinerjistik bir şekilde etkilemektedir. Nanoteknolojiyi kullanan taşıyıcı sistemler, ideal boyutları nedeniyle çeşitli sistemleri bir arada kullanmak için uygun yapılardır.

¹ Bağışıklığa neden olan moleküller

Bu tez çalışmasında, manyetik nanoparçacıklar (Fe_3O_4 MNP), mıknatısla yönlendirilebilmelerinden dolayı çekirdek yapı olarak seçilmiştir. Daha sonra Fe_3O_4 MNP'ler mezogözenekli silika ile kaplanmıştır ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$). Gözeneklere anti kanser, apoptotik, reaktif oksijen türlerini (ROS) indükleyici etkiye sahip disülfiram (DSF) ilacı yüklenmiştir. DSF yüklü $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ sistemini suda iyi dağıtmak, immünojenik etkisini azaltmak ve hücre dışında ilacın salımını önlemek amacıyla yapı, polietilenimin-folik asit (PEI-FA) ile kaplanmıştır. Folik asit (FA) ise ilaç taşıyıcı sistemin kanser hücrelerine özgülüğünü artırmaktadır. İlaç taşıma sisteminin ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF@PEI-FA}$, mMDPF) salım kinetiği ve kararlılığı iki farklı pH ve sıcaklıkta araştırılmıştır. Sistemin hem sağlıklı hem de kanser hücreleri üzerindeki etkisi in vitro olarak çalışılmıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Tez çalışmasının genel amacı.

CTAB: Heksadesiltrimetil-amonyum bromür, mMDPF: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF@PEI-FA}$, ilaç yüklü manyetik mezogözenekli silika nanoparçacıklar. PEI: polietilenimin, FA: folik asit

Bu tez çalışmasında sıkça kullanılan manyetik mezogözenekli ilaç taşıyıcı sistem, ilk defa disülfiram taşınmasında kullanılmıştır.

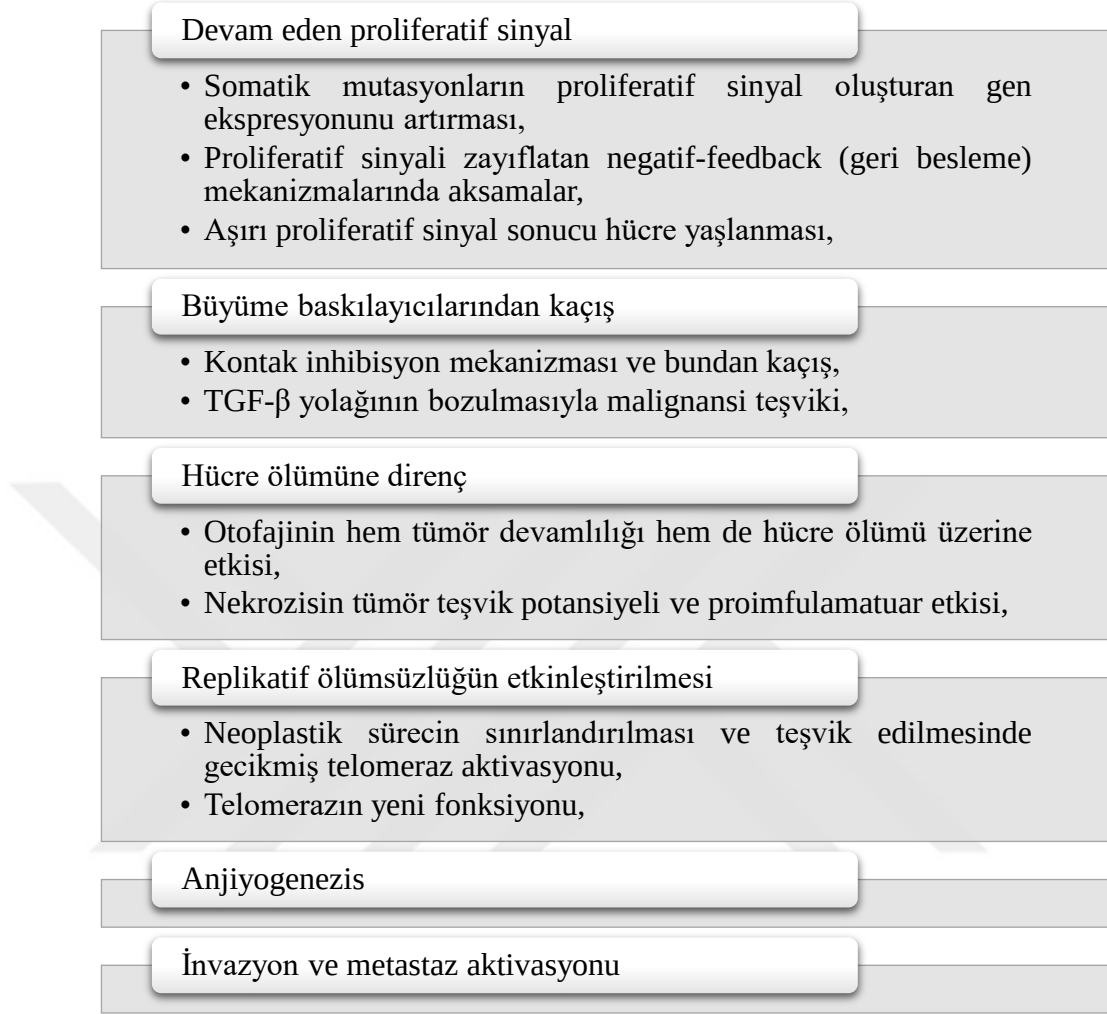
1.3. Kanser ve Tedavi Yöntemleri

Kanser, insan sağlığını ve kaliteli yaşamını etkileyen, kontrolsüz hücre bölünmesi ve anormal hücre döngüsünü ile karakterize olan bir grup hastalığa verilen genel bir addır. Hastalık klonaldır² ve neoplastik³ süreçle tümör kitlesine dönüşür. Tümör patogenezi çalışmaları, normal hücrelerin aşamalı olarak neoplastik bir hal aldığını ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar ile tümör mikro çevresinde bulunan normal hücrelerin, tümör gelişimini izleyen pasif seyirciler olmadığı, tümör gelişimine katılan aktif üyeler olduğu ortaya çıkmıştır (Hanahan and Weinberg 2011).

100'ün üzerinde farklı türü (NIH 2015) olan kanser hücreleri, devam eden proliferatif sinyal süreciyle başlayan kanserleşme sürecinde metastatik evreye ulaşınca kadar pek çok değişikliğe uğrar (Şekil 1.2) (Hanahan and Weinberg 2011). Kanserin insan hayatı için tehdit oluşturduğu en ciddi aşama, metastatik evredir. Çünkü bu aşamada, vücudun belli bir yerinde başlayan kontrolsüz hücre bölünmesi, diğer organlara taşınır.

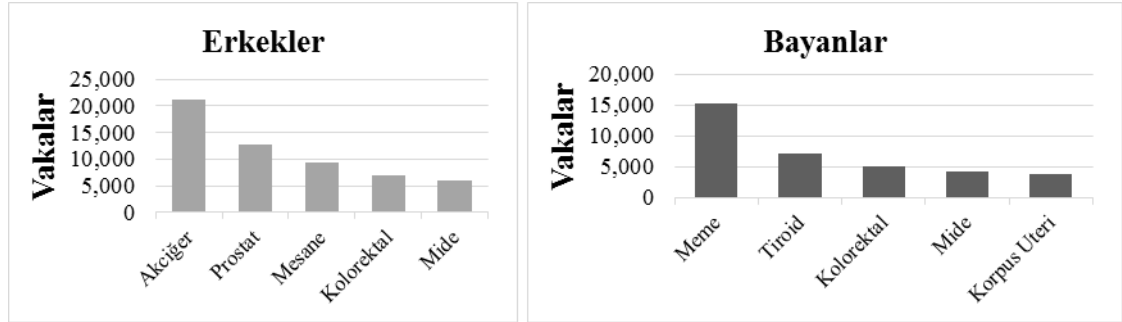
² Tümörlü dokudaki her bir hücre tek bir kanser hücresinden köken alır

³ Tümöral gelişmeyle ilgili, tümör yapısında



Şekil 1.2. İnsan tümörünün çok aşamalı gelişim süreci

Trilyonlarca hücreye sahip insan vücudunun her an, herhangi bir yerinde, kanser başlayabilir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO), 2012 yılında 8,2 milyon insanın ölüm nedenini kanser olarak açıklamıştır (WHO 2014). Üstelik her geçen gün yeni kanser vakalarında artış gözlenmektedir. Amerika Kanser Topluluğu (ACS) 2017 yılında 1.688.780 yeni vakaya kanser teşhisi konduğunu rapor etmiştir (ACS 2017). Türkiye’de, kanser nedenli ölüm oranlarına bakıldığında erkeklerde akciğer kanseri nedenli ölüm (%32,2) ilk sırada iken kadınların %15,7’si (Şekil 1.3) meme kanserinden hayatını kaybetmektedir (WHO 2014). Bu oran, dünyanın pek çok yerinde olduğu gibi kadın kanser vakalarında ölüm nedeni olarak, meme kanserini birinci sıraya yerleştirmektedir.



Şekil 1.3. Türkiye’de cinsiyete bağlı olarak en sık karşılaşılan kanser vakaları (WHO 2014)

Kanser hastalığına cerrahi operasyonla tümörün uzaklaştırılması, kimyasal tedavi, ışın tedavisi, immünoterapi, hormon ile tedavi ve hatta alternatif tıp gibi birçok farklı yöntem ile çare aranmaktadır. Ancak bunların hiçbirinde şu ana kadar kalıcı ve etkili bir başarı sağlanamamıştır.

Kanserleşme sürecinde hücrelerin kazandığı her yeni özellik bilim insanları için birer hedeftir. Örneğin sınırsız bölünme özelliğini sağlayan telomerez enzim aktivitesini kazanmaları kanser hücrelerinde bu enzimin hedef olarak seçilmesine sebep olmuştur (N. W. Kim *et al.* 1994; L.-J. Ma *et al.* 2017; Zhdanov *et al.* 2017). Bunun yanında kanser hücreleri artmış reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesi ile karakterizedir (Liou and Storz 2010). Yüksek ROS miktarını tolere etmek için kanser hücreleri, antioksidan ve ROS-temizleyici sistemlerin aktivite ve ekspresyonlarını artırır (Allensworth *et al.* 2015). Bazı anti-kanser tedavi yaklaşımları kanser hücrelerinin bu savunma hattını yıkarak kanseri yüksek seviyede ROS birikimi ile yok etmeyi önermektedir (Marengo *et al.* 2016). Yine kanser hücrelerinin pH değerinin normal hücrelerden daha düşük olduğu bilinmektedir (Gerweck and Seetharaman 1996). Bu özellik kullanılarak pH-bağımlı ilaç taşıma sistemleri hazırlanmaktadır (Wu *et al.* 2008). Böylece sağlıklı somatik⁴ hücreler ilaçlardan daha az etkilenmektedir.

⁴ Vücut hücreleri

Pek çok araştırmacı kanser için tek bir tedavi yönteminin yeterli olamayacağı noktasında hem fikirdir. Bu nedenle erken teşhisin yanında birden fazla tedavi yönteminin kombinasyonu ile kanser tedavisi hem *in vitro* hem *in vivo* olarak araştırılmakta ve bu kapsamda klinik uygulamalar yürütülmektedir. Örneğin kanserin ilaç ile tedavisi, ışık veya ısı uygulamaları ile desteklenmektedir (Access *et al.* 2014; Luo *et al.* 2016).

1.3.1. Hedefe yönelik tedavi

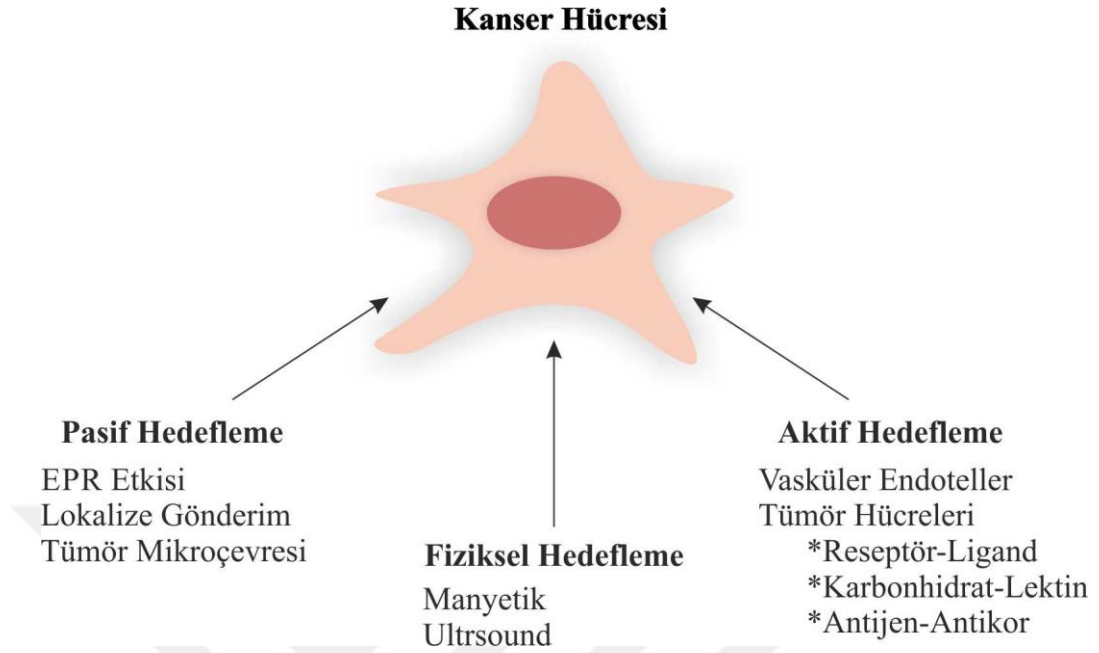
Kemoterapi olarak bilinen kimyasal tedavi, kanser hücrelerini öldürmek için muhtelif ilaçların kullanıldığı yaygın bir tedavi yöntemidir. Fakat ilaçların tümör bölgesine yeterli miktarda ulaşamaması, tolere edilemeyen toksik etkisi, çoklu ilaç direncinin gelişmesi gibi nedenlerle kimyasal tedavi başarısı sınırlıdır. Ek olarak, ilacın kanser hücrelerine ulaşması oldukça zorlu bir süreçtir. İlaç vücuda girdiğinde birçok engelle karşılaşır (Maeda *et al.* 2013; McCrudden and McCarthy 2013). Örneğin kan, pek çok ilaç için kararsız bir ortamdır. Kan, tüm vücudu dolaştığı için tümörün olduğu organa gelinceye kadar ilaç pek çok organ tarafından alınmaktadır. Hedef hücreye ulaşsa bile hücresel bariyerler (hücre zarı, seçici geçirgen gözenekler vb.) ile ilacın hücre içine alımı kısıtlanır. Ayrıca hücre, ilacı aldıktan sonra aktif dışa atım (efflux) mekanizması ile ilacı hücre dışına atmak suretiyle hücresel ilaç miktarının azaltılması söz konusudur. Yine hücre zarı ve çekirdek zarında bolca bulunan, p-glikoproteini (P-gp veya MDR1), ilaca karşı direnç (MDR, multi drug resistance) geliştirir ve hücre içi anti kanser ilaç miktarını azaltır (Vasir and Labhasetwar 2005). Bu sebeple,

- Tedavide gözlenen olumsuzlukları gidermek/en aza indirmek,
- Hücresel düzeyde ilaç alımını artırmak,
- İlaçların dolaşım gibi biyolojik ortamlardaki derişimini ve salım kinetiklerini optimize etmek,
- İlaçların toksik ve immunojenik özelliklerini gidermek ya da en aza indirmek,
- Düşük ya da yüksek dozlarda etkin ve güvenli tedavi sağlamak, ilaçların kararlılığını artırmak,

- Vücudun diğer bölgelerinde istenmeyen etkileşmeye neden olmadan, hedef bölgede istenilen düzeyde farmakolojik yanıt elde etmek gibi nedenlerle hedefleme yapılmaktadır (Vasir and Labhasetwar 2005).

Tümör hücre biyolojisi, tümör gelişim süreci ve tümör mikro çevresi hakkında artan araştırmalar neticesinde, etkili hedeflenmiş ilaç taşıma sistemleri tasarlanmaktadır. Hücreler aktif, pasif veya fiziksel yöntemler kullanılarak hedeflenebilir (Şekil 1.4). Pasif hedefleme, ilacın tümör bölgesinde seçici olarak toplanmasını sağlar ve tümör çevresindeki damar yapılanmasının normal dokulardan farklılığını kullanır (EPR etkisi, enhanced permeability and retention effect)⁵ (Peer *et al.* 2007; Vasir and Labhasetwar 2005). Hem ilacın hedeflenmesi hem de kontrollü salınımında rol oynayan fiziksel yöntemlerde, ultrasound veya manyetik taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır (Vasir and Labhasetwar 2005; Yin *et al.* 2016). Aktif hedeflemede ise doğrudan tümör vasküler endoteli veya tümör hücrelerinin sahip oldukları biyolojik özellikleri kullanılarak hedefleme yapılır. Bu kapsamda VEGF (vascular endothelial growth factor), Endoglin (CD105), LDL (low density protein) reseptörü ve çeşitli hormon reseptörleri gibi hedefler anti-VEGF antikorları, RGD peptit dizisi, LDL ve hormon gibi ligandlarla kanser hücreleri hedeflenir (Peer *et al.* 2007; Vasir and Labhasetwar 2005).

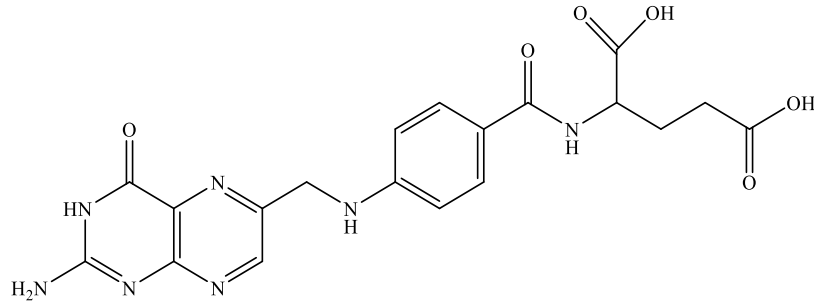
⁵ Tümör çevresindeki damar geçirgenliğinin artması



Şekil 1.4. Kanser hücrelerini hedefleme yöntemleri.

EPR: enhanced permeability and retention

Folik asit (FA) (Şekil 1.5) ve folik asit reseptörü (FR), kanser hedefli ilaç taşıma sistemleri için en sık tercih edilen aktif hedefleme ajanlarıdır (Fasehee *et al.* 2016; Han *et al.* 2016; K Hayashi *et al.* 2009; Li *et al.* 2016; Mohapatra *et al.* 2011). Pek çok kanser hücresinde overekspres olan (fazla miktarda üretilen) folik asit reseptörü normal hücrelerde bulunmaz veya az bulunur (Parker *et al.* 2005). Bu nedenle, FR uzun süredir tümör marker olarak kullanılmaktadır.



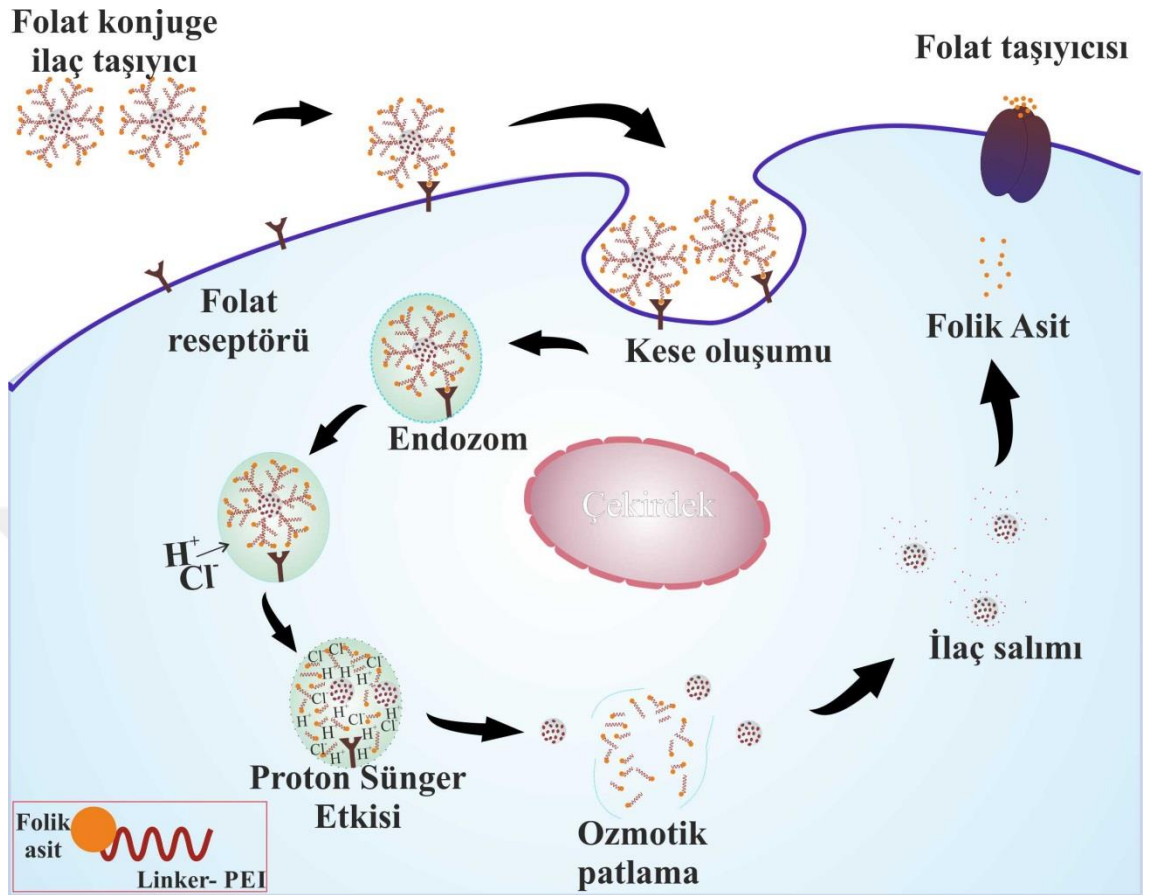
Şekil 1.5. Folik asitin kimyasal yapısı

α ve β izoformu olan FR, glikozilfosfatidil inositol bağı (anchored) bir membran proteinidir (Parker *et al.* 2005). FR, FA için yüksek afiniteye sahiptir ($K_d \sim 10^{-10}$ M) (Parker *et al.* 2005). Folik asit ise vitamin B'nin suda çözünür halidir. Folik asit düşük maliyetlidir, kolay bir şekilde uygulanabilir, sitoplazmaya taşınması kolaydır, diğer ligandlara kıyasla küçüktür (molekül kütlesi 441,40 g/mol), kararlıdır, pH ve ısıya karşı dirençlidir, reseptörüne afinitesi güçlüdür, yüksek düzeyde kanser seçicidir ve en önemlisi immunojenik cevap oluşturmeyen bir moleküldür (Fasehee *et al.* 2016; K Hayashi *et al.* 2009; Hilgenbrink and Low 2005). Bu nedenle ilaç hedeflemede çok önemli bir yere sahiptir. FA, FR içermeyen dokulardan hızlıca atılmaktadır (Hilgenbrink and Low 2005). Tüm bu avantajlarından dolayı FA kullanılan hedefe yönelik ilaçların klinik kullanımının, gelecekte daha fazla olması beklenmektedir.

FR, reseptör ilişkili endositoz⁶ mekanizması ile FA ve FA bağı her molekülü hücre içine almaktadır (Hilgenbrink and Low 2005). Reseptöre bağlanan folik asit veya folik asit konjuge yapı, endositoz vezikülü ile hücre içine geçer. Endozom kesesinin düşük pH şartlarından (pH $\approx$ 5) dolayı folik asit veya folik asit konjuge yapı reseptörden ayrılarak (Şekil 1.6) vezikülde serbest kalır (Hilgenbrink and Low 2005).

İlacın hücre içine alındıktan sonra, endozomdan etkili bir şekilde sitoplazmaya geçmesi (endozomal kaçış) ve hücreye etki etmesi beklenmektedir. Endozomal zarda gözenek oluşumu (i), proton sünger etkisi (proton sponge effect) (ii), füzyon (iii) ve fitokimyasal parçalanma (iv) olmak üzere dört yolla endozomal kaçış söz konusudur (Varkouhi *et al.* 2011). Taşıyıcı sistem çalışmalarında pH-tamponlama etkisi olan polietilenimin (PEI), proton sünger etkisi ile endozomal kaçış sağladığından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Şekil 1.6, Şekil 1.7).

⁶ Hücresel alım mekanizmalarından biri olan endositoz karmaşık olmasına karşın, birçok molekülün hücreye alımında görülen yaygın bir yoldur. Endositoz ile alınan yapıların bulunduğu veziküle endozom denir.

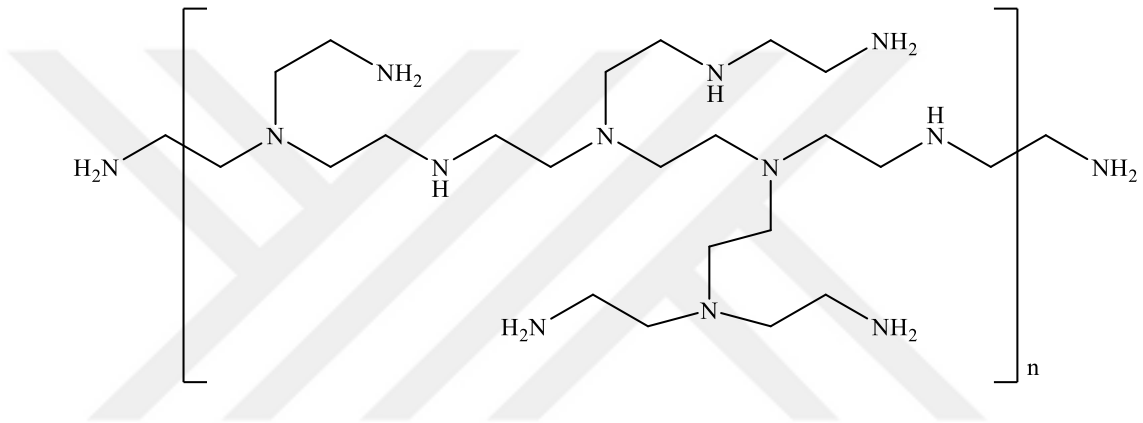


Şekil 1.6. FR-bağımlı hücresel alım ve proton sünger etki mekanizması

Proton sünger etkisi, asidik pH'da endozomda ozmotik şişme yoluyla endozomun parçalanması şeklinde açıklanmaktadır. Yüksek tamponlanma kapasitesinden (pH=7,2-5 (Varkouhi *et al.* 2011)) dolayı PEI, endozomal membranı destabilize eder (endozmoliz). Fazla miktarda amin gruplarına sahip PEI, endozom içinde proton birikmesi nedeniyle endozomda pozitif yüklerin artışına neden olur (Argyo *et al.* 2014; El-Sayed *et al.* 2009; X. Wang *et al.* 2009). Artan pozitiviteye karşın sitoplazmadan endozoma doğru klor ve su akışı gerçekleşir. Nihayetinde ozmotik patlama ile endozom içerisindeki taşınan molekül, gen/vektör sitoplazmaya dağılır (Huth *et al.* 2004). Böylece ekstra bir endozom dağıtıcı ajan (chloroquine, peptit gibi) kullanmaya gerek kalmadan endozomal kaçış mümkün olur.

Proton sünger etki, henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, yüksek transfeksiyon kapasitesine sahip olduğundan dolayı hücrelere ilaç veya gen gibi bir kargo molekülün

aktarılmasında kullanılan başarılı bir mekanizmadır (Akinc *et al.* 2005; Benjaminsen *et al.* 2013; Varkouhi *et al.* 2011). Ek olarak PEI, retiküloendotelyal sistemden (RES, Reticuloendothelial system)⁷ kaçışı sağlayarak taşıyıcı sistemi hedef doku/hücrelere güvenle ulaştırmaktadır (Cai *et al.* 2013). Ayrıca PEI, yapısındaki amin grupları nedeniyle folik asit, floresan işaret gibi farklı moleküllerle modifiye edilebilir. PEI'nın dallanmış uzun zincirli formu (Şekil 1.7), moleküllerin bağlanabileceği ekstra boş alanlar sağladığı için moleküler modifikasyon için kullanılabilir (Steitz *et al.* 2007).



Şekil 1.7. Dallanmış yapıya sahip PEI

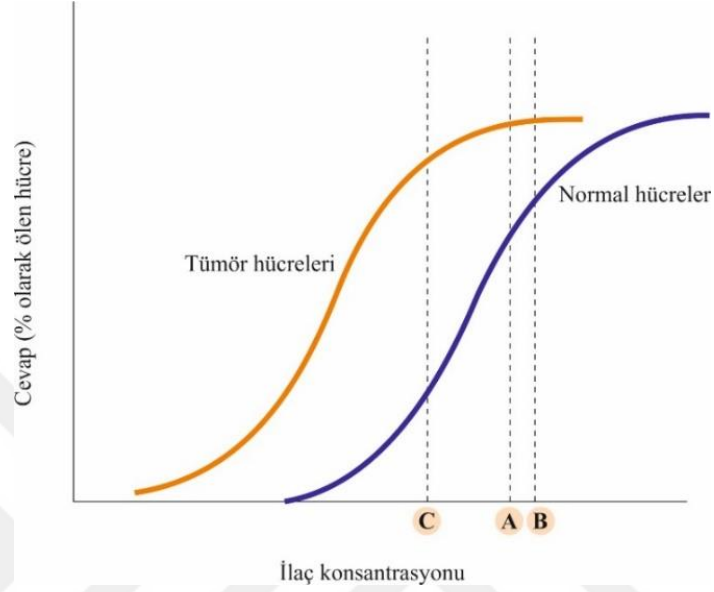
Yüksek moleküler ağırlığa sahip PEI, yüksek dozda hücreler için sitotoksiktir ancak taşıyıcı sistemlerde kullanılan miktarda toksisite oldukça düşüktür (H. Yang *et al.* 2015).

1.3.2. Kimyasal tedavi ilaçları

Kimyasal tedavi ajanları, kanser tipine ve gözleendiği organa göre farklı şekillerde tasarlanmıştır (Corrie 2007). Klasik olarak ilaç intravenöz enjeksiyon veya oral yol ile uygulanır. Tümör bölgesine yeterli miktarda ilacın ulaşabilmesi için ise verilmesi

⁷ Sitoplazmalarına aldıkları hücre artıkları, yabancı cisimler ve mikroorganizmalar gibi çeşitli maddeleri sindirme özelliği bulunan, sabit ya da hareketli hücrelerden oluşan sistemdir.

gerekenden daha yüksek dozda ilaç verilir (Şekil 1.8). Doğal olarak, her ilaç ciddi anlamda yan etkiye sebep olur (Corrie 2007).



Şekil 1.8. Kemoterapi ajanlarının doz-cevap eğrisi

(A) Toksik doza çok yakın, (B) Teröpötik ajanın güvenli olmayan seviyesi, (C) Hastalar için seçilen doz ((Corrie 2007)'den Türkçe'ye çevrilmiştir)

Kemoterapi ajanı olarak kullanılan yapılardan bazıları alkilleyici ajanlar, anti-metabolitler, steroidler, hormonlar (östrojen ve progesteron gibi), monoklonal antikorlar, proteazom⁸ inhibitörleri, interferonlar, kanser büyüme baskılayıcılarıdır. Herseptin, doksorubisin, sispilin, tamoksifen ve avastin gibi ilaçlar halihazırda kullanılan etkili kemoterapi ilaçlarından birkaçıdır (Çizelge 1.1). Son yıllarda alkol bağımlılığı tedavisinde kullanılan disülfiram ilacının da anti-kanser etkisi ortaya konmuş ve klinik olarak kanser hastalarında kullanılmıştır (Nechushtan *et al.* 2015).

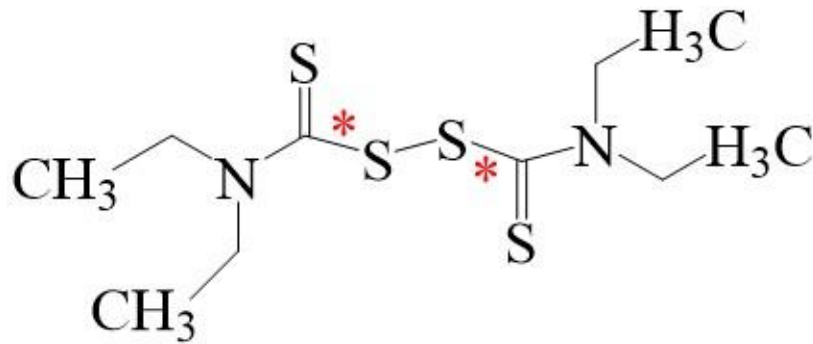
⁸ Büyük protein yapılardan oluşur. Hasar görmüş veya işe yaramayan proteinleri, peptit bağlarını kırarak çalışan proteoliz enzimi aracılığıyla vücuttan atar.

Çizelge 1.1. İlaçlar etki ve mekanizmaları

İlaç	Etki Mekanizması
Herseptin	Kinaz inhibitörü ve antikor bağımlı hücrel sitotoksosite sağlayan monoklonal antikor
Doksorubisin	DNA enterkalasyon ajanı
Sisplatin	DNA replikasyonunu durdurur
Tamoksifen	Seçici östrojen reseptörü modülatörü (östrojen antagonisti)
Avastin	VEGF (vascular endothelial growth factor - damar içi dokusu üreme faktörü) inhibitörüdür. Tümörü besleyen damar oluşumunu önler.
Disülfiram	Divalent metal bağlayıcıdır. Çeşitli enzim ve proteinleri inhibe eder.

1.3.3. Disülfiram ilacı

Ditiyokarbomat ailesinin üyesi olan disülfiram (Bis(dietiltiyokarbamoil) disülfid, $C_{10}H_{20}N_2S_4$, DSF), ticari sahada Antabus veya Antabuse olarak bilinir. IUPAC ismi 1-(dimetil tiokarbamoil disülfanil)-N, N-dietil-metan tiyoamit (Şekil 1.9) olarak geçmektedir. 1800’lü yıllarda kauçuk işlenmesini hızlandırıcı bir madde olarak kullanılırken, ilk kez 1937’de alkol bağımlılığı tedavisinde kullanılmıştır (Suh *et al.* 2006). DSF, günlük kullanım dozu sınırlı olması şartıyla (500 mg/gün), 1951 yılında Amerikan Besin ve İlaç Yönetim Kurumu’ndan (FDA, Food and Drug Administration) onay almış güvenli bir ilaçtır (Suh *et al.* 2006).

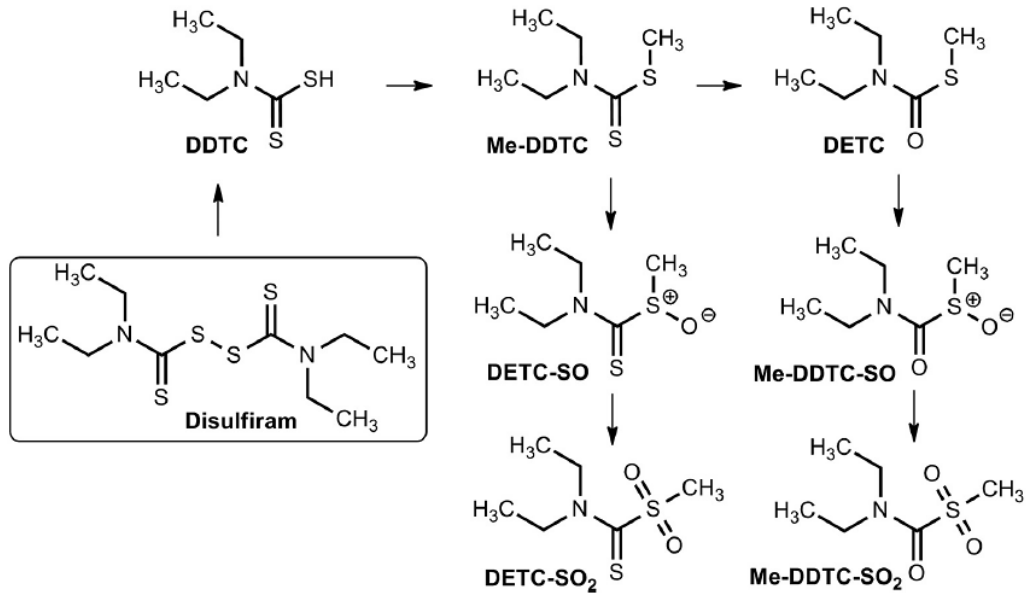


Şekil 1.9. Disülfiramın kimyasal yapısı.

* metal bağlama bölgeleri

Hidroforbik karakterli DSF, kan dolaşımında ve mide ortamında hızlıca parçalan an oldukça reaktif bir moleküldür (Doroschuk *et al.* 2016). Dolaşımında glutasyon peroksidaz enzimi ile hızlıca yıkılır (yaklaşık %90'ı) ve kandaki oranı tespit edilemeyecek konsantrasyonlara düşer (Xi Chen *et al.* 2015; Doroschuk *et al.* 2016). Sonuç olarak DSF'in hızlı yıkımı ve kararsızlığı ilacın klinik uygulamalarda kullanımını sınırlandırmakta ve kullanılacak dozu artırmaktadır.

DSF yıkımı ile oluşan ilk metaboliti, hücre içinde pek çok molekül ve proteinle reaksiyona giren dietilditiyokarbamattır (DDC, DDTC) (şekil 1.10). Asidik sindirim ortamında ise DSF, hızlıca dietilditiyokarbomata çevrilir (Doroschuk *et al.* 2016; Fasehee *et al.* 2016; Koppaka *et al.* 2012). Genel olarak tüm ditiyokarbomatlarda olduğu gibi t k tilmesi ile son ürün olarak CS₂ oluşmaktadır (B Cvek and Dvorak 2007). CS₂, proteinlerle çapraz bağlar kurarak ditiyokarbomat toksisitesinde etki gösterir.

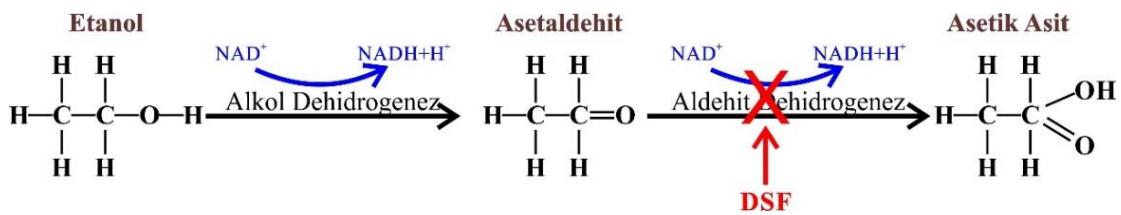


şekil 1.10. DSF metabolizması

DDTC; dietilditiokarbamat, Me-DDTC; Metil Dietilditiokarbamat, DETC: S-Metil-N, N-dietiltiokarbamat, DETC-SO: DETC-sülfoksit, Me-DDTC-SO: S-Metil-N, N-dietiltiokarbamat sülfoksit, Me-DDTC-SO₂: S-Metil-N, N-dietiltiokarbamat sülfon (Koppaka *et al.* 2012)

Hem DSF hem de DDTC, tiyol reaktifidir ve proteinlerin serbest tiyolları ile reaksiyona girer. Ayrıca bakır ve çinko gibi ağır metalleri şelatlar. Bu iki özellik ile hücresel öneme sahip pek çok enzimi ve proteini iş göremez hale getirir. Örneğin DSF'nin aldehit dehidrogenaz enzimini (ALDH) (EC 1.2.1.10) inhibe etmesi alkol ve kokain bağımlılığına karşın DSF'nin ilaç olarak kullanılmasına neden olmuştur (Suh *et al.* 2006). ALDH, beyin ve karaciğerde metabolizma sonucu oluşan asetaldehiti asetik asite dönüştüren bir enzimdir (Center for Substance Abuse Treatment 2009). DSF ve metabolitlerinin hem sitozolik (ALDH1) hem de mitokondriyal (ALDH2) ALDH inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir (Babu *et al.* 2014).

Normalde alkol vücuda alındıktan sonra metabolize olur ve asetaldehit oluşur. DSF, ALDH'nin spesifik bölgesine bağlanır ve -S-S- bağları oluşturarak enzimi geri dönüşümsüz olarak inhibe eder (Şekil 1.11) (Kai 1982; Soghoian and Tarabar 2016). Alkol alımına bağlı olarak asetaldehit birikimi ile sonuçlanan mekanizma disülfiram-alkol reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (Center for Substance Abuse Treatment 2009; Kai 1982; Koppaka *et al.* 2012). Asetaldehit birikimi, alkol tüketimini önleyecek derecede, bireyde fizyolojik ve psikolojik hoşnutsuzluğa, tiksindirici duygu oluşturmaya neden olur. DSF'in az miktarda olması halinde bile ALDH inhibe olur ve bu durum alkol alan kişide mide bulantısı, kusma ve taşikardi⁹ gibi etkilere sebep olur.



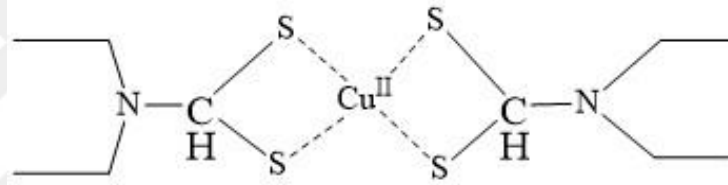
Şekil 1.11. ALDH metabolizması
DSF varlığında ortamda asetaldehit birikir.

İlaç, ALDH dışında pek çok enzim ve proteinin fonksiyonunu bozar. DSF, tiyol gruplarına ve bakır, çinko gibi divalent katyonlara bağlandığından hücre içi metal

⁹ Kalbin hızlı hızlı atışı şeklinde seyreden kalp rahatsızlığıdır.

bağımlı süreçleri olumsuz yönde etkiler (Allensworth *et al.* 2015; Wiggins *et al.* 2015). Örneğin çinko şelatlayarak matriks metalloproteinaz¹⁰ MMP-2 ve MMP-9 ile doğrudan etkileşir ve onların proteolitik aktivitesini inhibe eder (Fasehee *et al.* 2016).

DSF metaboliti olan DDTC de, bakır şelatlar (Şekil 1.12) ve sonuçta hücre içine Cu akışı başlar. Cu, redoks reaksiyonlarında kritik bir role sahiptir ve DNA hasarı, protein yıkımı gibi sonuçlar doğuracak reaktif oksijen türlerinin üretimini başlatır (Xinwei Liu *et al.* 2016). DDTC uygulanan farelerin beyinde dopamin- β -hidroksilaz enziminin inhibisyonu gözlenmiştir (Lakomaa *et al.* 1982). Yine bu çalışmada enzimin aktif bölgesinde bulunan bakırın, DDTC tarafından şelatlanması suretiyle enzimin inhibe olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 1.12. DDTC-bakır (Cu) kompleksi

Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma, DSF'in kimyasal olarak uyarılmış toksisite ve karsinogeneze karşı koruyucu etkisini ortaya koymaktadır. DSF sitotoksik etkisi birçok parametreye dayanmaktadır; DNA metiltransferazı inhibe eder, DNA'ya bağlanır ve DNA replikasyonunu durdurur, oksidatif stresi indükler, mitokondriyal membran geçirgenliğini artırır, hücre döngüsünü aksatır, proteazom aktivitesini inhibe eder (Boris Cvek and Dvorak 2008; Fasehee *et al.* 2016; Subastri *et al.* 2016). Redoks ilişkili bir yolla apoptozisi indükler, kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe eder, angiogenezi durdurur ve tümör metastazına karşı direnç gösterir (Cen *et al.* 2002; D. Chen *et al.* 2006; Uyulur 2015; Wiggins *et al.* 2015). DSF, P-gp'i inhibe ederek MDR gelişimini önler (B Cvek and Dvorak 2007; X. Duan *et al.* 2013; Song, Tang, Lei, *et al.* 2016;

¹⁰ Kanser hücrelerinin invazyon ve metastazını sağlar.

Tawari et al. 2015). Böylece alınan ilacın hücre dışına atılmasını önleyerek kanser hücrelerini öldüren mekanizmaları çalıştırır.

Pro-enflamatuar gen ekspresyonunun düzenlemesinde görev aldığı için birçok tedavide ilgi çekici bir hedef olarak görülen çekirdek faktörü NF- κ B, ditiyokarbomatlar tarafından inhibe edilmektedir (B Cvek and Dvorak 2007). Bakır bağımlı etki gösteren DSF, NF- κ B inhibisyonu neticesinde ROS seviyesini yükseltir. DSF proteazom aktivitesini bozarak NF- κ B'nin aktivasyonunu önler (Boris Cvek and Dvorak 2008). Böylece kanser ve kanser kök hücrelerini yok edici bir etki gösterir. DSF'in Cu ile desteklenmesi sonucunda kanser hücreleri için DSF'in sitotoksik etkisi artmaktadır (Yip *et al.* 2011). DSF-Cu kompleksi bir prooksidan olarak görev yapar, NF- κ B'yi inhibe ederek ROS aracılı kanser hücresi ölümünü indükler. Bu durumda NF- κ B'ye bağlı antioksidan ve anti-apoptotik gen ifadesi azalır (Yip *et al.* 2011). DSF-Cu, kanser hücrelerini ROS'a karşı koruyan ALDH1'i inhibe eder. Liu ve arkadaşları DSF'in ALDH inhibisyon özelliğinin doz bağımlı olduğunu belirtmiştir (P Liu *et al.* 2012). Bu çalışmada DSF-Cu kombinasyonunun düşük dozda bile ALDH1'i inhibe ettiği gösterilmiştir. DSF'nin ALDH'ı inhibe etmesinin kanser tedavisinde önemli olma nedeni ALDH'ın kanser kök hücre (CSC) markeri olarak bilinmesidir (J. Y. Kim et al. 2016; P Liu et al. 2012, 2013). Bu nedenle DSF, ALDH inhibisyonu yoluyla CSC'leri hedefe almaktadır.

DSF suda kısmi çözünürlüğe sahip, asidik olan gastrik çevrede kararsız, hızlıca parçalanıp metabolize olan bir molekül olduğundan dolayı kanser tedavisinde yeterli miktarda ilacın tümörlü bölgeye ulaşması çok zordur. Bu nedenle DSF'in ilaç taşıyıcı sistem ile birlikte kullanılması gerekmektedir. Genelde emülsiyon sistemleri, lipozom gibi toksik olmayan, biyoyumlu bileşenler bu tip ilaçların taşınmasında güvenli yol olmuştur. Nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıma sistemleri DSF'yi kararlı bir şekilde hedefe ulaştırmak için kullanılmaktadır (X. Duan *et al.* 2013; Najlah *et al.* 2016; L. Zhang *et al.* 2015). DSF taşınmasında kullanılan sistemler, yükleme ve salım oranları Çizelge 1.2'de sunulmuştur.

Çizelge 1.2. DSF taşınmasında kullanılan sistemler, yükleme ve salım oranları

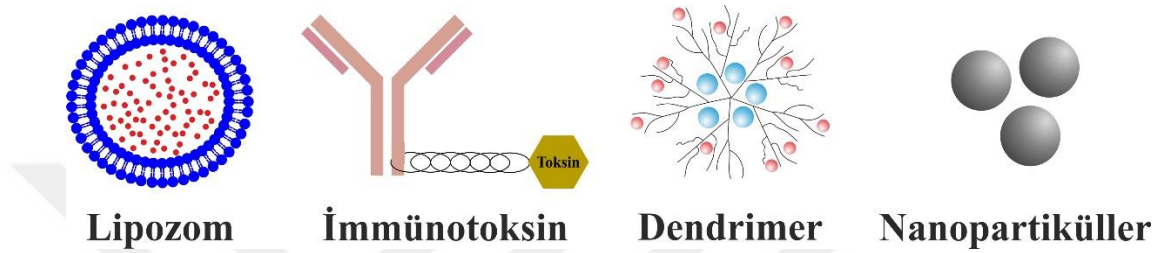
DDS	Yükleme	Salım	Kaynak
Polimerik misel	%5	12 saat pH 7,4'te %60	(X. Duan <i>et al.</i> 2013)
Lipozom enkapsülasyonu	3 mg/mL	120 saat %>60	(Peng Liu <i>et al.</i> 2014)
Lipit nanokapsülasyon	%3,45-3,76	72 saat pH 6,5'da %~50	(L. Zhang <i>et al.</i> 2015)
PLGA-PEG	%5,4	24 saat %30	(Fasehee <i>et al.</i> 2016)
mPEG-PLGA/PCL	%5,5	-	(Song, Tang, Shen, <i>et al.</i> 2016)
mPEG-PLGA/PCL	%7,8	24 saat %30	(Song, Tang, Lei, <i>et al.</i> 2016)
PLGA nanoparçacıkları	%10 (w/w)	24 saat %~40	(Najlah <i>et al.</i> 2016)

Tüm bunlara ek olarak DSF'in silikaya karşı güçlü adsorbsiyon özelliği Sandberg ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (Sandberg *et al.* 2008). Ancak şimdiye kadar DSF taşınmasında silika sistem kullanılmamıştır.

1.4. İlaç Taşıma Sistemleri ve Nano-sistemler

Yeni ilaç keşfi ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde aranan en temel özellik, tedavinin bölgesel olması, sadece kanser hücrelerini hedeflemesi ve ilaç salınımının kontrollü bir şekilde yapılabilmesidir. Çoğu makro molekül hidrofobiktir ve vücut sıvılarında iyi dağılmaz. Pek çok ilaç molekülü için hücre zarı geçirgen olmadığından dolayı hücreler tarafından alınamazlar. Bu sebeplerden dolayı araştırmacılar çeşitli ilaç taşıma sistemleri (drug delivery systems, DDSs) geliştirmektedir. Üstelik aynı sistemlerin tedavinin yanında hastalık teşhisine yönelik olarak da kullanılabilmesi, istenen bir durumdur. Nanoteknolojinin çok hızlı bir şekilde gelişmesi ile DDS'ler

arasında nano ölçekli taşıyıcı sistemler sıkça görülmektedir. Çıplak antikörler, kimerik proteinler¹¹, immünotoksinler¹², hidrojel, dendrimerler, polimerik miseller ve inorganik nanoparçacıklar gibi farklı taşıma sistemleri hazırlanmaktadır (Şekil 1.13) (Fan and Moon 2015; Safari and Zarnegar 2014; Sanna *et al.* 2014; Singh and Lillard 2009; Vasir and Labhasetwar 2005).



Şekil 1.13. Çeşitli ilaç taşıma sistemleri

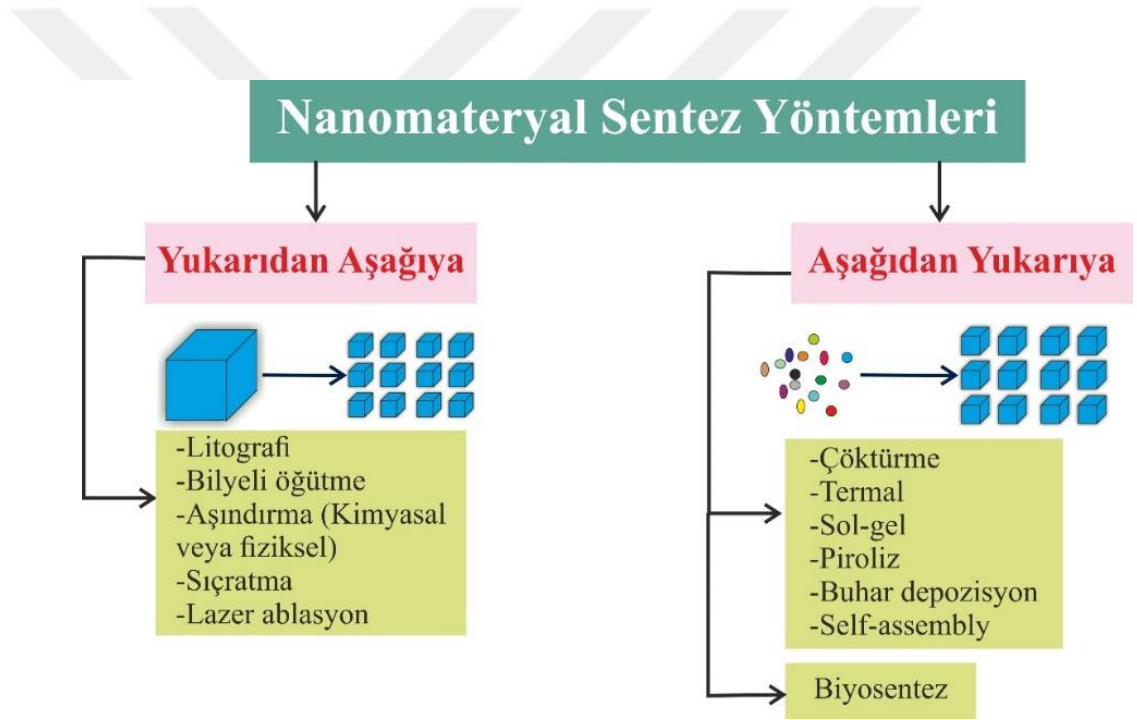
Nano, Yunanca “cüce” kelimesinden gelmektedir (Buzea *et al.* 2007). Nanometre ise matematiksel olarak 10^{-9} metre olarak tanımlanan bir ölçü birimidir. Nanoparçacıklar, en az bir boyutu 1-100 nm arasında olan, bulk hallerinden farklı olarak kendilerine özgü optik, elektronik, manyetik ve kimyasal özelliklere sahip yapılardır (Buzea *et al.* 2007). Boyutla ters orantılı olarak nanoparçacıklar, geniş yüzey alanına sahiptir. Yüzey alanının artması parçacıkların pek çok özelliğinde olduğu gibi biyolojik aktivitelerinde de değişime neden olmaktadır. Mesela; kuantum noktalar (quantum dots) tıbbi görüntülemede kullanılmaktadır (Chanda and Mohanta 2016). Bunun yanında manyetik nanoparçacıklar sağlık alanında hem görüntüleme (manyetik rezonans-MR ajanı) hem de tedavi (manyetik hipertermi) amacıyla kullanıldığı için teronostik (terapi + diyagnoz) multipotensiyel ilaç olarak düşünülmektedirler (Gobbo *et al.* 2015; Janib *et al.* 2010; Wu *et al.* 2008). Biyoloji ve tıp alanında nanomateryallerin kullanım alanları; ilaç ve gen gönderimi, proteinlerin ve patojenlerin biyodedeksiyonu, nükleik asit analizleri, hipertermi, biyolojik moleküllerin ve hücrelerin belirlenmesi ve saflaştırılması gibi

¹¹ Rekombinant DNA teknolojisi ile hazırlanan iki veya daha fazla kodlanan diziye (coding sequence) içeren bir nükleotid sekansı tarafından kodlanan hibrid proteinlerdir.

¹² Bir toksine bağlanan insan yapımı proteinlerdir. Bir çeşit kimerik proteindir ve genelde bir antikordur ya da bir antikör ile modifiye edilir.

sıralanmaktadır. Bunlar dışında doku mühendisliğinde, nano-cerrahide ve floresan biyolojik marker olarak da kullanılmaktadırlar (Chanda and Mohanta 2016; H. Huang and Lovell 2017). Sayılamayacak kadar çok alanda, birbirinden farklı amaçlara hizmet eden, onlarca nanoyapı mevcuttur.

Nanoparçacıklar farklı üretim yöntemleri ile hazırlanabilir (Şekil 1.14). Sentez yöntemleri ile NP'lerin boyut ve şekil kontrolü sağlanır, istenilen yüzey modifikasyonları yapılır. Aynı zamanda çeşitli NP'lerin bir arada kullanıldığı çoklu sistemler hazırlanır.



Şekil 1.14. Nanomalzeme sentez yöntemleri ve örnekleri.

NP'ler amaca uygun olarak seçilen herhangi bir sentez yöntemi kullanılarak sentezlenebilir.

Kullanılacak ilaç taşıyıcı sistemin nanoboyutta olması çok önemlidir. Vücut içerisindeki en küçük kapiler çapı 5-6 μm olduğu için kullanılacak taşıyıcı sistemin boyutunun 5 μm 'den küçük olması gerekmektedir. Ayrıca, olası bir agregat oluşumu damar tıkanıklığına yol açabilir. Agregasyon oluşturmeyen nano sistemlerin hazırlandığından emin olunmalıdır.

Günümüzde “Sihirli kurşun (magic bullet)” olarak adlandırılan, çevresiyle iletişim kurabilen ve cevap olarak ortam şartlarına göre sistemini açıp kapatabilen akıllı nano taşıyıcılar geliştirilmektedir (Chanda and Mohanta 2016). Bu sayede ilaçların yan etkisinin önemli ölçüde azaltılacağı düşünülmektedir. Ayrıca tek bir nano taşıyıcı üzerine birçok ajan tutturularak farklı kombinasyonların kullanılması, sadece bir ilacın yüksek dozda kullanılmasına nispeten daha avantajlıdır ve mantıklıdır. Çoklu ajan taşıyıcı nano sistemler;

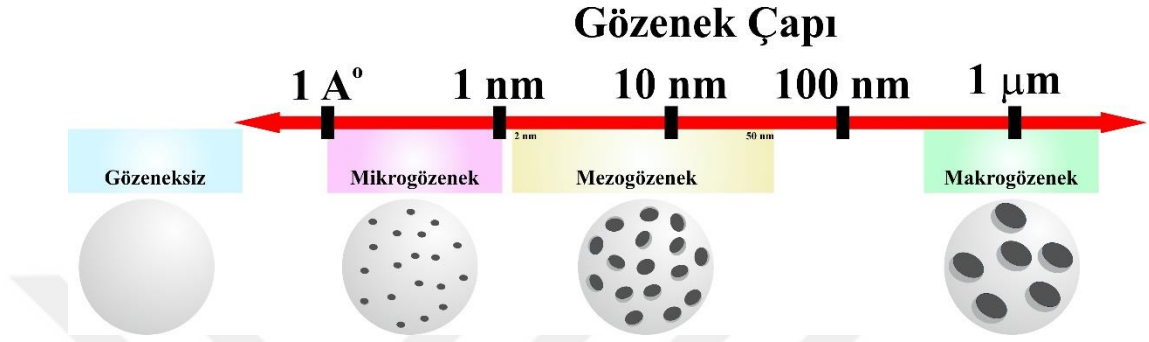
- Ucuz yolla elde edilmeli,
- Kolay bir şekilde üretilmeli,
- Ayarlanabilir ve dar boyut dağılım aralığına sahip olmalı,
- Yüksek ilaç yükleme oranı için geniş yüzey alanına sahip olmalı,
- Kan dolaşımında uzun süre bozulmadan kalabilmesi için suda iyi dağılabilmeli ve kararlı olmalı,
- Tümör/hastalık bölgesine yeterli miktarda ilaç taşıyabilmeli ve
- Yalnızca tümör/hastalık bölgesinde ilaç salarak ilacın yan etkilerini azaltmalıdır (X. Duan *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2010).

İlaç taşıyıcı sistemler çoklu ilaç direncini aşar veya azaltır, tümör hücreesindeki ilaç yoğunluğunun fazla olmasını sağlayarak teropötik etkiyi artırır. İlacın kanserli hücrelerce çok daha yoğun alınabilmesi için ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeyine çeşitli moleküller takılmaktadır. Bu amaçla kanser hücre yüzeylerinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla üretilen reseptörlerin ligandları, örneğin epitelyal büyüme faktörü (EGF), folik asit, RGD (aminoasit dizisi), mannoz gibi moleküller kullanılmaktadır (Argyo *et al.* 2014).

1.4.1. Mezogözenekli nano yapılar

Katı maddeler üzerindeki küçük açıklıklar olarak tanımlanan gözenek (por), dış yüzeyle bağlantısının olup olmamasına göre açık veya kapalı formda olabilir. Gözenekli yapılar, IUPAC (International Union at Pure and Applied Chemistry) tarafından gözenek çapı <

2 nm ise mikrogözenekli, 2-50 nm ise mezogözenekli ve >50 nm ise makrogözenekli şeklinde sınıflandırılır (ALothman 2012; Föll *et al.* 2006; Kresge *et al.* 1992) (Şekil 1.15).

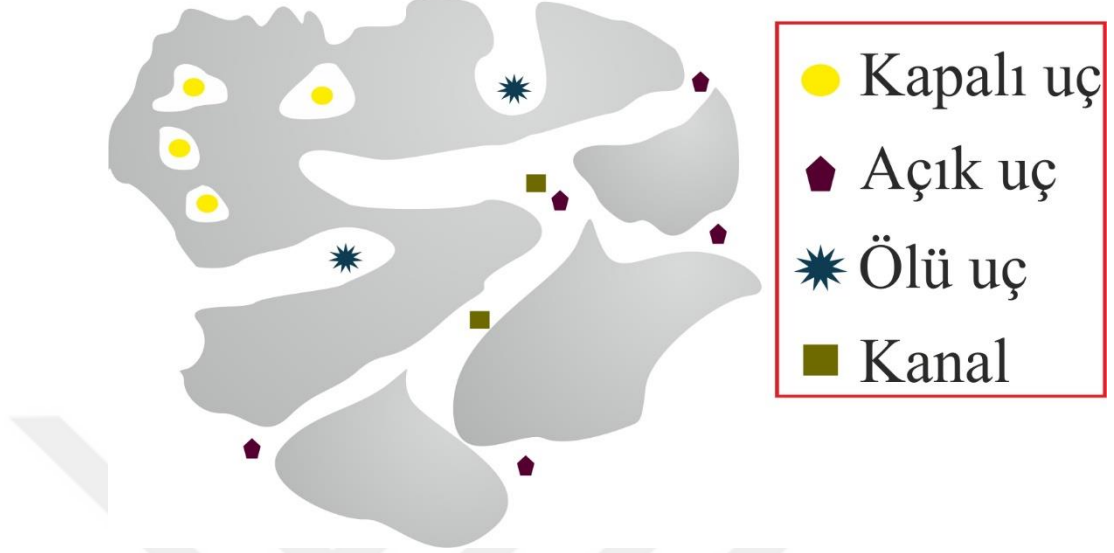


Şekil 1.15. Gözenekli yapıların sınıflandırılması
Skala ölçeksizdir.

Takip edilen sentez yöntemi ve kullanılan materyaller farklı yapısal özelliklere sahip gözenek formlarının biçimlenmesine neden olmaktadır (Şekil 1.16). Mezogözenekli materyaller SBA ve M41S olmak üzere iki tiptir (ALothman 2012). SBA (Santa Barbara Amorphous) tip materyallerde gözenek boyutu 5-30 nm arasında değişir. SBA'nın SBA-16, SBA-15, SBA-14 ve SBA-11 gibi çeşitleri vardır. Kübik MCM-48 (MCM: Mobile Crystalline Materials), hekzagonal MCM-41 ve lamelli yapıdaki MCM-50 gibi çeşitleri olan M41S tipi gözenekli yapılar sentezlenirken zeolitler¹³, tek moleküller veya katyonlar kalıp olarak kullanılmaktadır. SBA sentezi asidik koşullar altında yürütülürken M41S üretiminde ortam şartları baziktir (He and Shi 2011). Farklı organik materyaller eklenerek veya ortam şartları değiştirilerek yapısal kontrol sağlanmaktadır.

¹³ Yapısal olarak kil minerallerine benzeyen, pozitif yüklü atomları, iyonları ve diğer bileşenleri hapsedip bulundukları sistemden uzaklaştıran, çeşitli minerallerin birleşimi ile oluşan bir grup mineralidir.

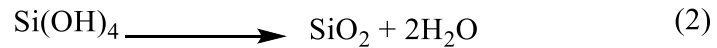
Gözenekli Yapı



Şekil 1.16. Gözenek çeşitleri

Gözenekler kapalı uç, açık uç, ölü uç veya kanal formunda olabilir

Silika NP'lerin sentezi için sıklıkla kullanılan Stöber metodunda, bir sol-gel öncülünün hidrolizi ve yoğunlaşması ile kaplama gerçekleşir (Lieberman *et al.* 2014). İkinci yöntem olan mikroemülsiyon sentezde silika kabuk oluşumu miseller aracılığıyla sınırlandırılır (Y. Lu *et al.* 2002). Sol-gel yöntemi, mikroemülsiyon yöntemine göre daha çok tercih edilmektedir. Silika kaplama için kullanılan Stöber metodunda kimyasal reaksiyon şu şekildedir:



Farklı mezogözenek materyalleri kullanılarak değişik şekillerde mezogözenekli nano yapılar hazırlanmaktadır (Lieberman *et al.* 2014; Safari and Zarnegar 2014). Sentezde kullanılan her materyal nanoparçacığın boyutunu, gözenek çapını ve yüzey alanını etkilemektedir. Genellikle bir organosilika materyal (TEOS gibi) kullanılarak yüksek bazik ortamda sol-gel metoduyla elde edilen silika nanoparçacıklar, kalsinasyon veya

asidik alkol ortamında aşındırma yoluyla gözenekli forma dönüştürülür (Lieberman *et al.* 2014). Üretim sürecinde pH, sıcaklık veya süre gibi ortam parametreleri değiştirilerek gözenek boyutu, gözenek hacmi ve yüzey alanı kolayca ayarlanabilir. Ayrıca kullanılan sürfaktanın karbon zincir uzunluğu değiştirilerek de gözenek boyutu ayarlanabilir (Jiang *et al.* 2016).

Mezogözenekli silika nanoparçacıklar (MSP NP) mükemmel biyobozunur özellik ve kolloidal kararlılık gösterir (Cauda *et al.* 2010). MSP kaplama, nanoparçacık yüzeyinde oluşacak istenmeyen protein adsorbsiyonunu minimize eder (Argyio *et al.* 2014). MSP'ler teşhis amaçlı biyo işaretleme, biyo algılama, biyo kataliz, kemik onarımı için scaffold mühendisliği, molekül taşınması gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Argyio *et al.* 2014; Bayat *et al.* 2014). Mezogözenekli silika içeren nano taşıyıcı sistemler, gözenekli yapısından dolayı yüksek ilaç taşıma kapasitesine sahiptir. MSP'ler ilaç dışında DNA, RNA, oligonükleotit, protein veya enzim gibi geniş çeşitlilik gösteren kargo repertuarına sahiptir (Kalantari *et al.* 2012; X. Ma *et al.* 2013; Cui *et al.* 2014; Y. Wang *et al.* 2014).

MSP'lerin yapısında bulunan silanol grupları vasıtasıyla yüzey kimyası rahatlıkla değiştirilebilir ve bu sayede hedeflenebilir özellikleri artırılmaktadır. Bunun dışında, silika kabuğa floresan boyalar ilave edilebilir (Y. Lu *et al.* 2002). Yüzeyine floresan etiket taşıyan antikör takılarak dokularda istenilen hücreler işaretlenebilir. Hedefe özgü ajanların takılması suretiyle hedef hücre tarafından alımları artırılabilir.

MSP'lerin gözenekli yapısı nedeniyle artan yüzey alanı, yükleme etkinliğini de artırmaktadır. İlaç yükleme oranının fazla olması kadar ilacın hedefte salınımı da çok önemlidir. Organik veya inorganik moleküllerle yapılan yüzey modifikasyonları ile ilaç salım mekanizması manyetizma (Baeza *et al.* 2012), ışık (Lai *et al.* 2010; Wang *et al.* 2014), ısı, pH (Cui *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015), iyonik etki (Casasús *et al.* 2004), reaktif oksijen türleri (ROS), enzim (Zhang *et al.* 2013) gibi iç veya dış etkilerle tetiklenebilir. Böylece ilaç salımı, kontrollü bir şekilde başlatılıp durdurulabilir. Wang ve arkadaşları doksorubisin taşıyan, polietilen glikol ve hedefleme peptidi ile yüzeyi

değiştirilmiş mezogözenekli nanoparçacık sistemi kullanarak çift uyarıcı etki (NIR/pH) sonucunda ilaç salımı yapan bir taşıma sistemi geliştirmiş ve meme kanseri hücrelerini yok etmişlerdir (Wang *et al.* 2014).

Taşınacak materyalin gözeneklere hapsedilmesinin ardından erken salımı önlemek adına genel olarak gatekeeper olarak adlandırılan protein veya farklı bir nanoparçacık (altın, demir nanoparçacıklar) ile gözenekler kapatılabilir, MSP tamamen lipit ile sarılabilir ya da aptamer ile kaplama yapılabilir (Argyo *et al.* 2014; C. Yang *et al.* 2015). Bu işlemlerin sonradan ilaç salınımını engellemeyecek şekilde olması veya bir uyarıcı ile salımın başlaması gerekir. Yapılan modifikasyonlar MSP'nin suda çözünürlüğünü artırır, agregasyonunu azaltır, kaplanmış materyalin hızlıca parçalanmasını önler ve retikuloendotelial sistemden (RES¹⁴) kaçışını sağlar.

Genellikle ilaç taşıyan MSP'ler hücreye calveole ilişkili endositoz yolu ile alınır (Argyo *et al.* 2014). İlacın sitoplazmada etki edebilmesi için endozomdan sitoplazmaya geçişi zorunludur. Çünkü uzun süre endozomda bulunma, lizozomal degradasyon nedeniyle ilacın zarar görmesine neden olacaktır. Doksorubisin gibi bazı kanser ilaçları kendi endozomal kaçış mekanizmalarına sahiptir. Bu nedenle MSP dâhil diğer çok fonksiyonlu ilaç taşıyıcı sistemlerde etkili bir endozomal kaçış sağlanmalıdır. Yüzey yükü pozitif olan yapıların endozomal kaçışının daha kolay olduğu bilinmektedir (He and Shi 2011). Bu sebeple pozitif zeta potansiyeline sahip polietilenimin (PEI), tek başına veya nanoparçacıkları kaplamak amacıyla, ilaç taşıyıcı sistemlerde tercih edilmektedir (Varkouhi *et al.* 2011).

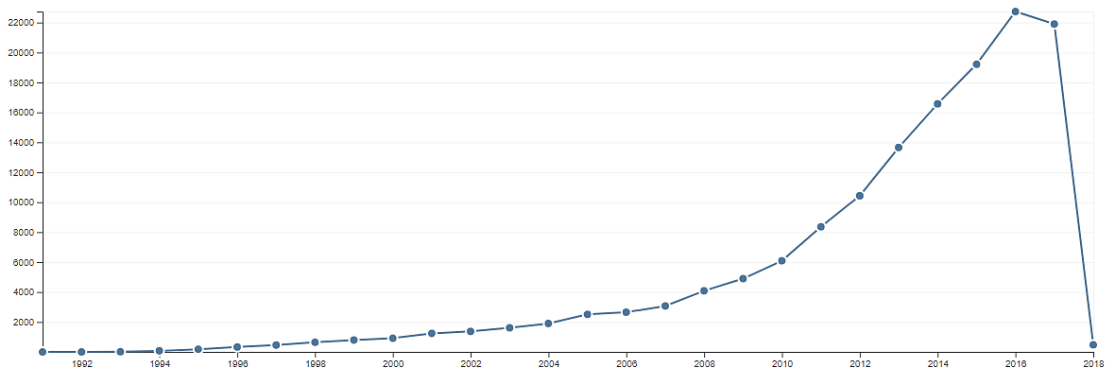
MSP'lerin biyobozunması ile ilgili çalışmalar, MSP birikiminin en fazla RES organları olan karaciğer ve dalakta olduğunu belirtmektedir (Lieberman *et al.* 2014). Fare kuyruğundan enjekte edilen MSP'ler daha çok tümör çevresinde yoğunlaşmaktadır (He and Shi 2011). Fare deneyleri MSP biyobozunmasının karaciğerde gerçekleştiğini ve enjeksiyondan 4 gün sonra degradasyon ürünlerinin dahi atıldığını göstermektedir (He

¹⁴ Retikulo endotelial sistem, bk. dipnot 7

and Shi 2011). Yüzey modifikasyonları ile yüzey yükü pozitif yapılan MSP'ler daha hızlı vücuttan atılmaktadır (He and Shi 2011; Liberman *et al.* 2014). Aksine, yapılan kaplama türüne bağlı olarak nanoparçacığın degradasyon süresi uzatılabilir. Örneğin PEG (Polietilen glikol) ile kaplanmış MSP'ler 10 gün sonunda hala tespit edilebilmektedir (Liberman *et al.* 2014). Üstelik bu kaplama işlemi MSP'lerin makrofajlar tarafından toplanmasını azaltmaktadır. Boyut ve yüzey özellikleri, MSP'lerin biyodağılımlarını etkilemektedir. Genel olarak MSP'ler biyoyumu yüksek ve düşük toksisite gösteren taşıyıcı sistemlerdir. In vivo ve in vitro MSP toksisitesi doz ayarı ile kontrol edilebilir (Liberman *et al.* 2014). Bu özellikler, taşıyıcı sistemler arasında MSP'lerin kullanım potansiyelini artırmaktadır.

MSP'ler tek başlarına kullanıldığı gibi bir metal nanoparçacığın yüzeyine kaplama olarak da uygulanabilir. Bu sayede onların immün sistemden kaçışını ve doğal kan ortamında degradasyonunu önler. Özellikle toksik olmaması ve kaplama olarak kullanıldığında metal NP'lerin toksisitesini azaltması da göze çarpan bir diğer avantajdır (Suteewong *et al.* 2010). Bu sayede yapı, yeni özellikler kazanmakta ve çok daha geniş uygulama sahasında kullanılabilmektedir. Bilhassa manyetik hedefleme sağlaması açısından manyetik mezogözenekli nanoparçacıklar son yıllarda yoğun ilgi görmektedir (Şekil 1.17).

Sum of Times Cited per Year



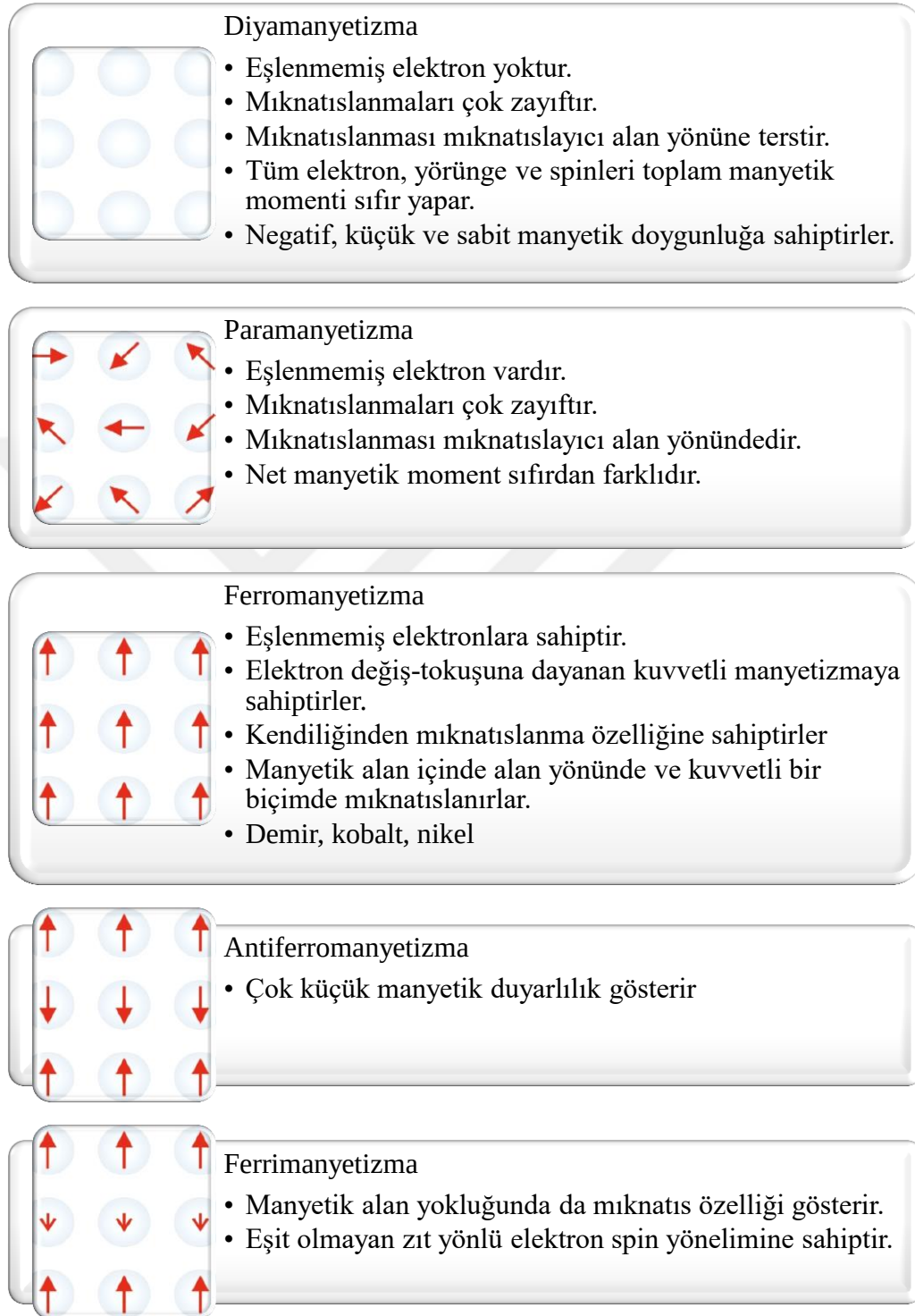
Şekil 1.17. Web of Science alıntılama raporu

“Magnetic Mesoporous” başlığının Web of Science veri tabanında aranması sonucu elde edilen alıntılama indeksi (Science 2017)

Manyetik mezogözenekli NP'ler çekirdek-kabuk (core-shell) yapısıyla biyolojik uygulama alanlarında kendine geniş yer bulmuştur. Çekirdek-kabuk yapısı hazırlanırken NP'lere manyetik özellik kazandıracak manyetik nanoparçacıklar, çekirdek yapı olarak kullanılırken çekirdeğin etrafını saran mezogözenekli silika tabaka ise kabuk kısmında kullanılmaktadır. Böylece geniş gözenek kanallarını barındıran manyetik sistem istenilen moleküllerin taşınmasında kullanılabilir.

1.4.2. Demir oksit manyetik nanoparçacıklar (MNP)

Peki, manyetik nanoparçacıklar nelerdir? Manyetik nanoparçacıklar, nano ölçeğe sahip (1-100 nm), metal veya metal oksit yapıda (Ni, Co, Fe, Fe₃O₄ ve Fe₂O₃ gibi) olan ve ferromanyetik yani mıknatıstan oldukça yüksek seviyede etkilenen nano parçacıklardır. Aslında tüm materyaller birbirinden farklı olarak belirli bir manyetik özelliğe sahiptir. Atomik düzeyde yüklü parçacıkların hareketi manyetizmanın kaynağını oluşturur. Materyaller manyetik duyarlılıklarına göre diamanyetik, ferromanyetik, ferrimanyetik, antiferrimanyetik veya paramanyetik olabilirler (Şekil 1.18) (C. Sun *et al.* 2008).

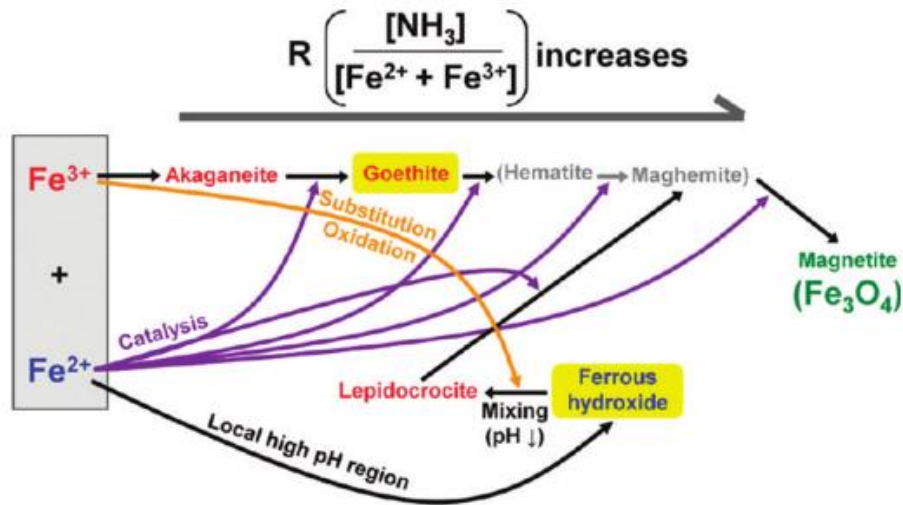


Şekil 1.18. Manyetizma genel olarak beş gruba ayrılmaktadır.

Manyetik nanoparçacıklar, teropötik ajanların doku spesifik salımı, hücre ve biyokimyasal moleküllerin işaretlenmesi ve ayırımı gibi uygulama alanlarında

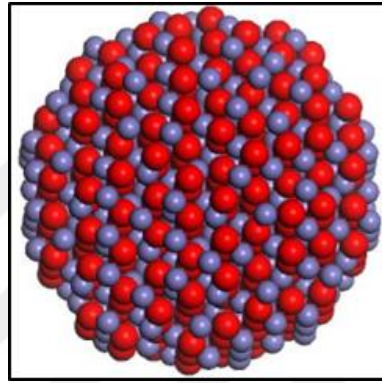
kullanılmaktadır (Sheng-Nan *et al.* 2014). Kullanılacak MNP'ler, termal ve kimyasal özellikleri bakımından kararlı olmalı, boyut ve şekli arzulanan uygulamaya göre ayarlanabilmelidir. Son derece hassas manyetik nano-araçlarda ve biyomedikal uygulamalarda MNP'lerin 20 nm'den küçük boyutlarda (süpermanyetik (Gnanaprakash *et al.* 2007)) ve dar boyut dağılım aralığına sahip (monodispers) olması öncelikli istenilen durumdur (S. Sun *et al.* 2004). Kristal yapı, şekil ve boyut, demir oksit NP'lerinin manyetik hipertermi ve manyetik alanda hareket yeteneklerini etkilemektedir (Sheng-Nan *et al.* 2014). MNP'ler *in vitro* ve *in vivo* pek çok biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Özellikle kısa veya uzun vadede düşük toksisite ve yüksek süpermanyetik özellikleri nedeniyle demir oksit nanoparçacıkları, ısı artışı yoluyla tedavi (manyetik hipertermi) ve yüksek çözünürlükte anatomik görüntüler alınmasında kullanılan manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sistemlerinde tercih edilmektedir (G. Huang *et al.* 2013; Sheng-Nan *et al.* 2014).

Literatürde yapısal açıdan farklılık gösteren wüstite (FeO), goetit (FeO(OH)), hematit (α -Fe₂O₃), maghemit (γ -Fe₂O₃), manyetit (Fe₃O₄) gibi çeşitli demir oksit nanoparçacıkları karşımıza çıkmaktadır (Ahn *et al.* 2012). Bu çeşitlilik, demir tuzlarının içinde bulunduğu solüsyon ortamından etkilenerek demir iyonlarının (Fe²⁺, Fe³⁺) farklı indirgenme reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. Birlikte çöktürme yöntemi ile manyetit üretim yolu (Ahn *et al.* 2012)

Manyetit olarak adlandırılan demir oksit ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, Fe_3O_4) nanoparçacıkları en kararlı MNP'dir. Kimyasal olarak yapısında hem Fe^{2+} hem de Fe^{3+} bulundurur (Sheng-Nan *et al.* 2014). Bu nedenle oksijen atomlarının arasında tetrahedral ve oktahedral bölgelere demir katyonu yerleşmiştir (Şekil 1.20) (Harris *et al.* 2015). Yani manyetit oktahedral ve tetrahedral/oktahedral tabakaların karışımından oluşmaktadır (Sheng-Nan *et al.* 2014).

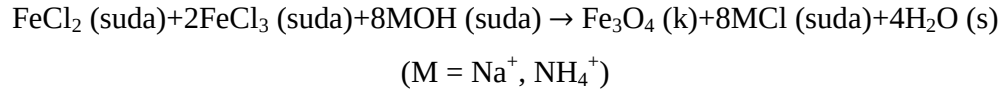


Şekil 1.20. 2,6 nm boyutlu bir Fe_3O_4 MNP

Mavi demir atomunu, kırmızı oksijen atomunu temsil etmektedir (Harris *et al.* 2015)

Demir oksit nanoparçacıkların boyutu, kristal ve yüzey yapısı gibi özellikleri çeşitli sentez yöntemleri kullanılarak kontrol edilmektedir. PVD (physical vapor deposition), CVD (chemical vapor deposition), sol-jel, elektrodepozisyon, birlikte çöktürme, hidrotermal, termal bozuşma gibi çeşitli yöntemler ile MNP'ler sentezlenmektedir (Mascolo *et al.* 2013; Sheng-Nan *et al.* 2014).

Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının bir bazik çözelti varlığında (NaOH veya NH_4OH) birlikte çöktürüldüğü sentez yöntemi en yaygın kullanılan yöntemdir (Şekil 1.21). Ancak bu yöntemde sulu ortamda sentez yürütüldüğünden dolayı yüksek kristalinite için gereken yüksek sıcaklıklara çıkılamaz. Bu yöntemde genellikle sentez ortamının pH'ı ayarlayarak parçacıkların şekil ve kararlılıkları kontrol edilmektedir. Ancak 20 nm'nin altında ve kontrollü boyut dağılımının elde edilmesi bu yöntemde zordur. Farklı şekil ve boyuta sahip parçacıklar farklı manyetik özellikler göstereceği için monodispers dağılımın elde edilmesi çok önemlidir.



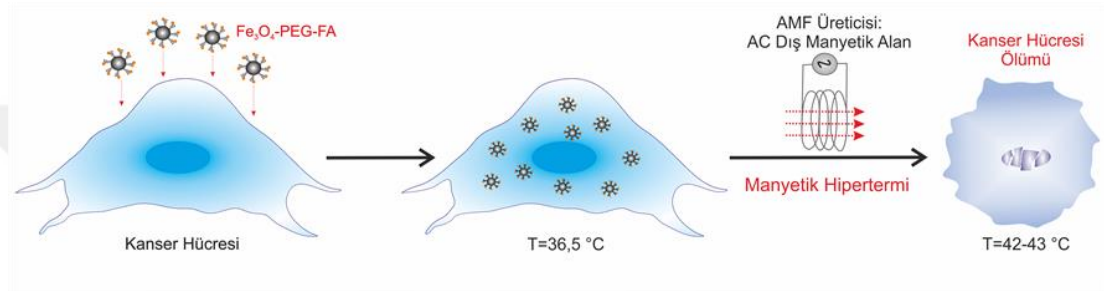
Şekil 1.21. Birlikte çöktürme yöntemi reaksiyon denklemi

Alternatif olarak bir öncü demir kaynağının yüksek sıcaklıkta organik fazda bozunması (thermal decomposition) yoluyla monodispers dağılım elde edilmektedir. Bu sentez yönteminde yüksek kristalinite elde edilir. Sentez sürecinde ulaşılan sıcaklık değeri ve bu sıcaklıkta tutuldukları süre parçacık boyutuna doğrudan etki etmektedir. Örneğin 298°C kaynama noktasına sahip benzil eter ile 259°C’de kaynamaya başlayan fenil eter kullanılarak hazırlanmış olan parçacıklar kıyaslandığında benzil eter kullanılanların daha büyük boyutta olduğu gözlenmiştir (S. Sun *et al.* 2004). Genelde öncü madde olarak diğer öncül maddelerle kıyaslandığında daha ucuz ve yüksek verim sağlayan demir (III) asetilasetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) kullanılmaktadır.

Termal yöntemde parçacıkların hekzan içerisinde dağılımını kolaylaştırıp kararlılığını artırmak amacıyla oleyilamin ve oleik asit kaplama ajanları kullanılmaktadır. Sürfaktan (surface active agent) olarak bilinen yüzey aktif maddeler genel olarak parçacıkların kararlılığı için gereklidirler. Bir parçacık, sürfaktan ile dipol-dipol, Van der Waals veya hidrojen bağı yoluyla etkileşebilir. Termal bozunma metodunda kullanılan diğer indirgeyicilerle kıyaslandığında, mesela 1,2-hekzadekandiole göre oleyilamin daha ucuzdur. Oleyilamin, amin grubuyla parçacık yüzeyine bağlandığından parçacıktan ayrılması daha kolaydır. Örneğin oleik asit parçacık yüzeyine karboksil grubuyla bağlanır ve oleyilamin ile kıyaslandığında NP yüzeyinden daha zor ayrılır (Sheng-Nan *et al.* 2014). Parçacığın sürfaktan ile yaptığı bağ daha sonra istediğimiz molekülle sürfaktanın yer değiştirebilmesi açısından önemlidir.

MNP’ler kimyasal tedavi ve radyoterapiye alternatif olarak geliştirilen manyetik hipertermi (magnetic hyperthermia) tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmektedir. Kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında normal hücreler, sıcaklık artışına daha dirençlidir. Sıcaklık artışı kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe eder ve hücre ölümüne (apoptotik/nekrotik) neden olur (Access *et al.* 2014). Isı kaynağı olarak AC dış

manyetik alan altında MNP'lerin kullanımı manyetik hipertermi uygulamasını doğurmuştur. Çünkü MNP'ler yüksek frekanslı alternatif manyetik alan (AMF) altında histerezis kaybederek¹⁵ ısı üretirler (Şekil 1.22). Bu yöntemde; kanserli bölgede manyetik nanoparçacıkların biriktirilmesi sonucu AMF altında bölgesel ısınma ve buna bağlı olarak o bölgedeki kanser hücrelerinin öldürülmesi hedeflenmektedir (Koichiro Hayashi *et al.* 2014).



Şekil 1.22. Manyetik hipertermi

MNP'ler AC dış manyetik alan altında titreşirler ve bu titreşim ısı üretir. Sıcaklık 42-43°C'ye ulaştığında hücrelerde apoptotik süreç başlar. (AMF: Alternative Magnetic Field)

Hipertermi hücre ölümünün teşviki dışında uyarıcı olarak da kullanılabilir (Yin *et al.* 2016). Özellikle uyarıcı varlığında ilaç salımı, ilaç salım sistemlerinde kontrolü elde tutmak açısından büyük avantaj sunar. Bu nedenle sıcaklık artışının ilaç salımını artırdığı ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi, sağlıklı hücreleri ilacın etkisinden koruyacaktır.

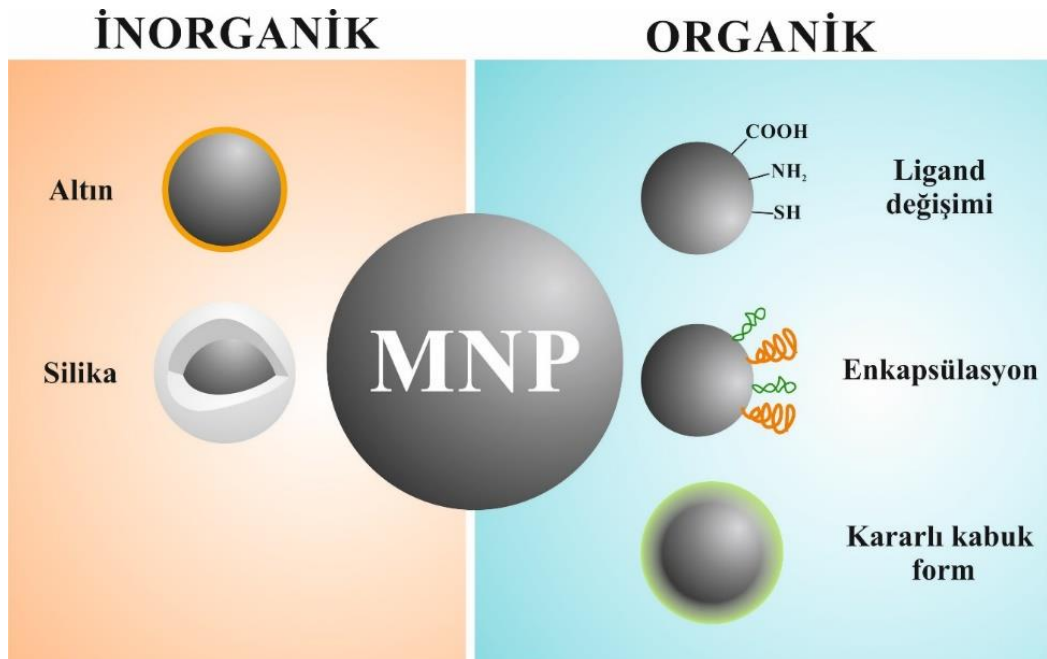
Tüm özelliklerinin yanında MNP'ler, Fe²⁺ kaynağı rolünü üstlenir. Demir, demir bağlayan reseptör olarak bilinen transferrin aracılı endositoz yoluyla hücrelere alınır (Richardson and Ponka 1997). Çalışmalar, hücre tarafından alınan demir nanoparçacıkların endositik organelde¹⁶ metabolize olduğunu ve açığa çıkan demirin divalent metal transporter aracılığıyla endo-lizozomal membrandan sitozole geçtiğini belirtmektedir (G. Huang *et al.* 2013). Açığa çıkan demir, hücre içi ROS miktarını

¹⁵ Doğrultusu dönüşümlü olarak değişen manyetik alanın, manyetik malzemede oluşturduğu manyetik sürtünmeden kaynaklanan enerji kaybıdır.

¹⁶ Endozomun lizozom ile birleşmiş hali

artırmak suretiyle düşükte olsa kanserli dokular üzerinde toksisite gösterir (G. Huang *et al.* 2013; Richardson and Ponka 1997).

Tüm bunlara karşın, Fe_3O_4 MNP'ler, biyolojik çalışmalarda kullanıldığında agregasyon oluşturarak hedef hücre tarafından alınmama, bağışıklık sistemince yakalanma veya hücre tarafından alındıktan sonra hemen atılma gibi problemlerle karşılaşmaktadır. MNP'lerin demir iyonu salmasının istenmediği durumlarda MNP'ler inert bir yapı (altın gibi) ile kaplanarak nontoksik hale getirilebilir. Kaplanan MNP'ler, manyetik özelliklerinden bir şey kaybetmez. Yine parçacıkların kararlılığını artırmak ve onları biyoyumlu hale getirmek için yüzey modifikasyonları yapılmaktadır. Örneğin pH 7'nin altına düşünce demir oksitin yaşam süresi kısalmaktadır (Sheng-Nan *et al.* 2014). Yüzey kimyasını değiştirilmesi, NP'lere ekstra kimyasal ve fiziksel özellikler de eklemektedir. Bu nedenle altın, polimer, karbon vb. organik veya inorganik moleküller ile yüzey kaplaması yapılarak manyetit, canlı sistemlerde kullanıma uygun hale getirilmektedir (Şekil 1.23).



Şekil 1.23. Manyetik çekirdek ve kabuk formunda MNP'ler MNP yüzeyi organik veya inorganik moleküller ile modifiye edilebilir

Bölüm 1.4.1’de detaylıca anlatıldığı üzere silika, manyetitin kaplanması için idealdir. MNP’ler, mezogözenekli silika ile birleştirilince tek bir taşıyıcı ile birden fazla işlemin eş zamanda yürütülmesi mümkün olmaktadır (Çizelge 1.3). Bunun yanında silika kaplama manyetik nanoparçacıkları daha kararlı kılar (Sheng-Nan *et al.* 2014).

Çizelge 1.3. Manyetik mezogözenekli nano-taşıyıcı sistemlerinin özellikleri

Mezogözenekli Nanoparçacık	Manyetik Nanoparçacık
50-300 nm boyut aralığında sentezlenerek kolayca endositoz ile hücreler tarafından alınabilmektedir.	Mıknatıs ile istenilen bölgede toplanabilmektedir.
Polimerlerle kıyaslandığında mekanik stres, ısı, hidroliz indüklü degradasyon gibi olumsuz şartlara karşı daha dirençli olmaktadır.	Dışarıdan yüksek frekanslı alternatif manyetik alan uygulandığında sıcaklık artışına neden olmaktadır
Çok dar gözenek boyutu dağılımına sahiptir ve gözenek çapı ayarlanabilir. Bu özellik, farklı ilaç moleküllerinin yüklenmesini sağlar.	Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için kullanılır. Bu özelliği sayesinde teşhis ve tedavi eş zamanlı yürütülebilmektedir.
Çok geniş yüzey alanına ve çok büyük gözenek hacmine sahiptir. Böylece maksimum düzeyde kargo yüklenebilmektedir.	Çok küçük boyutlarda hazırlanabilmeleri ve yüzeyinin çeşitli şekillerde fonksiyonel hâle getirilmesi ile geniş kullanım alanına sahiptir.
Hem iç hem dış yüzey alanına sahip olması farklı fonksiyonel grupların yüzeye katılmasını sağlar. Böylece sistemin kullanılabilirliği artmaktadır.	Karasıdır, hızla oksitlenir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Disülfiram (DSF), metabolize olarak hızlıca dietilditiyokarbamat (DDTC)'a parçalandığı ve hem DSF hem de DDTC dolaşımında kararsız olduğu için DSF taşıma sistemleri kullanılmaktadır. Bu konuda yürütülmüş birkaç çalışma devam eden bölümde sunulmuştur:

Lipozom enkapsülasyonu ile meme kanseri hücrelerine gönderilen DSF'in NF- κ B yolağını inhibe ettiği bildirilmiştir (Peng Liu *et al.* 2014). Duan ve arkadaşları, doksorubisin (DOX) ve disülfiramı (DSF) kombinleyerek önerdikleri tedavi modelinde pH duyarlı misel taşıma sistemi kullanmışlardır (X. Duan *et al.* 2013). Bu çalışmada çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek için DSF'in P-glikoproteini inhibe etme özelliğinden faydalanılmıştır. Bu şekilde hücreler aldıkları DOX ilacını eflüks mekanizmasıyla geri atamayacaktır. Aynı zamanda DSF, apoptotik özelliğe sahip olduğu için tedaviye ikinci bir katkı sağlamıştır. Geliştirdikleri kan dolaşımında kararlı, sadece asidik ortamda parçalanabilen, hem DSF hem de DOX taşıyan misel yapısı, meme kanseri tümör modelinde etkili sonuç göstermiştir. DSF'i oldukça kararlı bir şekilde misel içerisine hapsetmişler ve yapının DSF taşıma kapasitesini %5 olarak ölçmüşlerdir.

Chen ve ekibi mide ortamında ve yüksek sıcaklıkta DSF ilacının kararlı kalmasını sağlayacak lipid emülsiyon sistemi hazırlamışlardır (Xi Chen *et al.* 2015). Bir diğer çalışmada, kanser hücrelerinde bakır (Cu) ve DSF sitotoksikite mekanizması araştırılmış, sonuçta DSF/Cu kompleksinin kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerini ürettiği ve hızlı bir şekilde hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (Tawari *et al.* 2015). DSF/Cu kompleksinin yüksek oranda toksik olmasına rağmen DDTC/Cu kombinasyonunun sitotoksik olmadığı ortaya konmuştur. Aynı zamanda araştırmacılar ayrı ayrı verilen DDTC-bakır karışımının ROS üretimine neden olmadığını gözlemlemiştir. Ancak aynı anda uygulanan düşük doz DSF/Cu kompleksi yüksek miktarda ROS üretimine neden olmaktadır. Diğer bir çalışmada DSF, Cu ile birlikte

kullanıldığında, enflamatuar meme kanserinde (IBC) tümör redoks direncinin kırıldığı ve kanser hücrelerinin etkili bir şekilde öldürüldüğü belirtilmiştir (Allensworth *et al.* 2015). Bunun dışında Wiggins ve arkadaşları meme kanseri tedavisinde DSF-indüklü sitotoksiteden faydalanmıştır (Wiggins *et al.* 2015). Çalışmada DSF'in anti-tümör aktivitesinde çinko iyonunun rolü araştırılmış ve çok düşük konsantrasyonlarda uygulanan DSF ve $ZnCl_2$ ile meme kanseri hücrelerinde ciddi oranda ölüm gözlenirken sağlıklı epitel hücrelerde hiçbir etki gözlenmemiştir. Çinkoya kıyasla bakırın kanser hücrelerinde DSF toksisitesini daha çok artırdığı ortaya konmuştur (Wiggins *et al.* 2015).

Glioblastoma hücrelerine DSF taşınması amacıyla yapılan bir araştırmada, araştırmacılar %10 ve %20 (w/w) oranlarında PLGA (Poli (laktik-ko-glikolik asit)) ve DSF kullanarak milirod hazırlamışlardır (McConville *et al.* 2015). Çubukları küçük parçalara ayırdıktan sonra DSF/PLGA kararlı solüsyonu hazırlanmış, tüm çalışma bu kararlı solüsyon üzerinden sürdürülmüştür. Araştırmacılar tümör çevresine hazırlanan milirodun stereotaksi¹⁷ ile yerleştirilerek tedavide kullanılabileceğini önermişlerdir.

Zhang ve arkadaşları, TAT peptidi (TATp, YGRKKRRQRRR) ile hedef özgül hâle getirdikleri lipozom enkapsülasyon sistemini DSF taşıma aracı olarak kullanmış ve pH bağımlı ilaç salınımını denetlemişlerdir (Zhang *et al.* 2015). Araştırmacılar farklı miktarlarda PEG (Polietilen glikol) ile kaplama yaparak korudukları sistemlerinin boyutunun 50-100 nm aralığında değiştiğini ve ilaç yükleme oranlarının %3,45-3,76 arasında değiştiğini belirtmiştir. TATp ve PEG, lipit nanokapsülün kararlılığını artırmıştır. Sisteme dâhil ettikleri PGA (Poliglutamat asit) ile pH kontrollü ilaç salınımını sağlamışlardır. Çalışmada en iyi ilaç salınımının pH=6,5'te elde edildiği gösterilmiştir. Fareler üzerinde yürüttükleri çalışmalarda DSF taşıyan sistemin tümör bölgesinde yoğunlaştığı ve tümörü küçülttüğü ortaya konmuştur. Araştırmacılar DSF'in en iyi anti kanser etkisini, Cu varlığında gözlemlemiştir.

¹⁷ Bir tümör veya hastalıklı alana tam bir kesinlik içinde ve sağlıklı dokuları en az etkileyecek biçimde ilaç/ışık verilmesi

Song ve arkadaşları ilaç taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanılan yaygın bir polyester olan PLGA'yı DSF enkapsülasyonunda kullanmışlardır (Song, Tang, Lei, *et al.* 2016). Hazırladıkları mPEG-PLGA/PCL¹⁸ sisteminin ilaç taşıma kapasitesini %7,8 olarak belirlemişlerdir. Aynı zamanda bu çalışmada lipozom tabanlı taşıma sistemiyle kıyaslandığında NP tabanlı taşıma sistemlerinin DSF yükleme oranını ve kararlılığını artırma yönünde daha avantajlı olduğu ortaya konmuştur. Wang ve arkadaşları da DSF yüklü PLGA uygulanmış olan pankreas kanseri hücrelerinin öldüğünü, bu enkapsülasyon sistemini fare modelinde denediklerinde de tümörü küçülttüğünü ortaya koymuştur (Z. Wang *et al.* 2016). Fasehee ve arkadaşları, folat reseptörü hedefli DSF yüklü (yaklaşık %5) PLGA-PEG nanoparçacıklarını meme kanserine karşı kullanmışlardır (Fasehee *et al.* 2016). Bu çalışmada, folik asit içermeyen nanoparçacıklara oranla, folik asit ile modifiye edilmiş nanoparçacıkların toksisite ve ROS miktarında artış gözlenmiştir. Ayrıca fare modelinde denenen ilaç taşıyan sistem, tümör kitlesini ciddi oranda küçültmüştür. Benzer bir çalışmada %10'luk DSF solüsyonu PLGA ve PCL sistemine hapsedilmiştir (Najlah *et al.* 2016). Poli-L-glutamik asit-sisplatin ile konjuge olarak kullanıldığında ise disülfiramın sisplatin direncini azalttığı ortaya konmuştur (Song, Tang, Shen, *et al.* 2016).

DSF dışında farklı ilaçların taşınması için kullanılan sistemler mevcuttur. Örneğin FA reseptörü ile hedeflenmiş manyetik-mezogözenekli silika nanoparçacıkları anti kanser DOX ilacının taşınmasında kullanılmıştır (Li *et al.* 2016). Li ve arkadaşları, DOX yüklü manyetik-mezogözenekli silika nanoparçacıkları PEI-FA ile modifiye etmiş (M-MSN(DOX)/PEI-FA), sistemin suda çözünürlüğünü ve kanser hedefleme özelliklerini artırmışlardır (Li *et al.* 2016). Bu çalışmada PEI-FA kaplamanın nanokompleksin ortalama boyutunda 195 nm'den 217 nm'ye artışa sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca gözenekli yapıda gözenek çapı 3,4 nm, gözenek hacmi 0,51 cm³/g olarak ölçülmüştür. Elektron mikroskop görüntülerine dayanarak nanokompleksin uniform ve küresel şekilde oldukları, ilaç ve siRNA yüklemenin morfolojik açıdan bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. İlaç yükleme etkinliği %12,3 olan M-MSN(DOX)/PEI-FA

¹⁸ Poli (etilen glikol)-b-poli (laktit-ko-glikolid)/poli (ε-kaprolakton)

nanokompleksinin ilaç salımında en ideal pH değerini 4,7 olarak belirtilmiştir. İlaç salımının 10 saat içinde yapılmasından ötürü tasarladıkları sistemi başlangıçta yüksek doz uygulaması gereken kanser tedavisinde kullanışlı olduğu öne sürülmüştür. Bu çalışmada kimyasal tedavi ve gen tedavi eş zamanlı yürütülmüştür.

Lai ve arkadaşları floresan izotiosiyanat- β -siklodekstrin (FITC- β -CD) ile modifiye edilmiş mezogözenekli silika nanoparçacıklar hazırlamışlardır (Lai *et al.* 2013). Hazırladıkları sistem indirgeyici olmayan şartlarda istikrarlı iken, redoks uyararı varlığında gözenekler açılmakta ve ilaç salınımı gerçekleşmektedir. Bu sistem ile gerçek zamanlı olarak ilaç salınımı izlenebilmektedir. Salım kontrollü ilaç taşıyıcı sisteme başka bir örnek olarak Chen ve arkadaşlarının çalışması verilebilir. Bu çalışmada kanser hücrelerinin sahip olduğu düşük pH özelliği kullanılarak pH<5,5 şartlarında ve yalnızca tümör hücrelerinde bolca bulunan esteraz varlığında ilaç salınımı yapabilen mezogözenekli silika nanoparçacıklar ile akıllı ilaç taşıma sistemi hazırlamışlardır (Chen *et al.* 2014).

Yapılan bir çalışmada manyetik çekirdek içeren mezogözenekli nanokompozit hazırlanmış ve bu sistem DOX ilacının taşınması için kullanılmıştır. Çalışmada DOX taşıma kapasitesi %1,75 olarak belirlenmiş ve pH kontrolünde salım için taşıma sisteminin etrafı PEI-FA ile sarılmıştır (Han *et al.* 2016). PEI-FA ile ilacın pH=7,4’de gözeneklerde kaldığı ve bu şekilde hazırlanmış ilaç taşıma sisteminin daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca PEI-FA ile düşük pH’da ilaç salımının daha hızlı olduğu belirtilmiştir. Araştırma sonuçlarında sistemin maksimum ilaç salımı için en uygun şartların pH=2,0 ve PEI-FA:Nanoparçacık oranının 0,5:1 olduğunu belirtmişlerdir.

Jiang ve ekibinin hazırladığı Fe₃O₄@SiO₂@LDH nanokompozit sistemine %60,32 oranında ilaç (MTX) yüklenmiş ve sistem 72 saat sonunda pH=4’te bu ilacın %66,16’sını salmıştır (Jiang *et al.* 2016). Üstelik HeLa hücre hattında sistemin sitotoksik etkisi tek başına ilaç ile kıyaslandığında daha yüksek çıkmıştır.

Aerosil kullanılarak hazırlanan Aerosil nanoparçacıklar, DSF çözünürlüğünü artırmış ve parçalanmasını önemli ölçüde yavaşlatmıştır (Jing *et al.* 2014). Çalışmada DSF yapısındaki kükürt (S) ile Aerosil'e ait silika-OH grupları arasında kurulan bağın DSF yıkımını yavaşlattığı bu nedenle silika nanoparçacıkların kolay parçalanabilen DSF gibi ilaçların taşınmasında daha kullanışlı olduğu belirtilmiştir.

Bu tez çalışmasında, öncelikle Fe_3O_4 manyetik nanoparçacıklar sentezlenmiş ve bu tanecikler mezogözenekli silika kabuk ile kaplanmıştır ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$). Daha sonra gözeneklere DSF yüklenmiştir. Ardından DSF yüklü nanoparçacıklar PEI-FA ile kaplanmıştır ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF@PEI-FA}$, mMDPF). PEI, ilacın gözeneklerde kalmasını ve ilacın sadece endozomal pH'ta salınmasını sağlar. FA ise ilaç taşıyan sistemin kanser hücreleri tarafından daha fazla alınmasını desteklemektedir. İlaç taşıyıcı sistemin iki farklı pH (pH 7,4 ve 6,0) ve iki farklı sıcaklıkta (37 ve 42°C) DSF salım kinetiği belirlenmiştir. Ayrıca ilaç taşıyıcı sistemin kanser (MCF-7) ve normal hücre (MCF-10A) hatları üzerine etkinliği test edilmiştir. Buna ilave olarak ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğinin bakır ve/veya sodyum nitroprusit (SNP) varlığında nasıl değiştiği belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Marka	İsim
Sigma Aldrich	Amonyum hidroksit (NH_3 basis)
Gibco	At serumu
MERCK	Bakır Klorür (CuCl_2)
Sigma Aldrich	Benzil Eter
Sigma Aldrich	Demir (III) asetilasetonat, $\text{Fe}(\text{acac})_3$
MERCK	Dimetilsülfoksit (DMSO)
Sigma Aldrich	Disikloheksilkarbodiimid (DCC)
Sigma Aldrich	Disülfiram (DSF)
Gibco	DMEM (glikoz ve L-glutamin içeren besiyeri)
Gibco	DMEM/F12 (glikoz ve L-glutamin içeren besiyeri)
Sigma Aldrich	Epidermal büyüme faktörü (EGF)
Sigma Aldrich	Etil alkol, etanol (EtOH)
Sigma Aldrich	Etil asetat (EtOAc)
Gibco	FBS (Fetal Bovine Serum)
Sigma Aldrich	Folik asit (FA)
Sigma Aldrich	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS)
Sigma Aldrich	Hekzan
Sigma Aldrich	Hidroklorik asit (HCl)
Sigma Aldrich	Hidrokortizon
Sigma Aldrich	İnsülin
Sigma Aldrich	Kloroform
Sigma Aldrich	Metanol
ABCAM	MTS Cell Proliferation Assay Kit
Sigma Aldrich	N-Dimetilformamit (DMF)
Sigma Aldrich	N-Hidroksisüksinimid (NHS)

Carlo Erba	Nitrik asit (HNO_3)
Sigma Aldrich	Oleyilamin
Sigma Aldrich	Paraformaldehit
Gibco	Penisilin-streptomisin antibiyotiği
Sigma Aldrich	Polietilenimin (PEI) 25kDa, dallanmış
MERCK	Potasyum ferrosiyanür ($\text{Fe}_4(\text{Fe}[\text{CN}]_6)_3$)
MERCK	Potasyum fosfat monobzik (KH_2PO_4)
Carlo Erba	Potasyum klorür (KCl)
Fluka	Setrimonyum bromür (CTAB), (364,45 g/mol)
MERCK	Sodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
Sigma Aldrich	Sodyum klorür (NaCl)
Sigma Aldrich	Sodyum nitroprusit (SNP)
Sigma Aldrich	Tetraetil ortosilikat (TEOS)
Gibco	Tripsin/EDTA (%0,25)
Gibco	Trypan blue

3.2. Kullanılan Çözeltiiler ve Hazırlanışı

Çalışma boyunca hazırlanmış olan tüm çözeltiiler Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Çözelti	Hazırlanışı
0,1 M PBS (pH 7,4)	0,8 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,363 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (0,144 g Na ₂ HPO ₄) ve 0,024 g KH ₂ PO ₄ 80 mL saf suda çözüldükten sonra HCl ekleyerek pH metre yardımıyla pH 7,4'e ayarlanmıştır. Son olarak hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
PBS, pH=7,4	200 mL saf su içerisinde 1 tablet çözülmüştür.
PBS pH=6,0	200 mL saf su içerisinde 1 tablet çözülmüş ve konsantre HCl (%36,5-38) ile pH ayarlanmıştır.
PBS (%10 FBS)	90 mL PBS (pH=7,4) ve 10 mL serum karıştırılmıştır.
Hazır DMEM	10 mL serum, 1 mL antibiyotik karışımı ve 89 mL DMEM karıştırılmıştır.
%4 PFA	Paraformaldehit kullanmadan önce taze olarak 0,1 M PBS (pH=7,4) içerisinde %4 oranında 30 dakika oda şartlarında karıştırılarak hazırlanmıştır.
DMEM/F12	1 mg/mL konsantrasyonlu 50 µL hidrokortizon, 5 mL at serum, 1 mL antibiyotik karışımı ve 84 mL DMEM/F12 karıştırılmıştır. Bu besi yeri MCF-10A hücrelerinde kullanılmıştır.
Altınsuyu (kral suyu)	10 mL nitrik asit, 30 mL hidroklorik asit ile çeker ocakta karıştırılarak hazırlanmıştır.
%20 sulu hidroklorik asit çözeltisi	56 mL konsantre HCl (%36,5-38) ile 20 mL saf su karıştırılmış ve saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
%10 Potasyum ferrosiyanür solüsyonu	10 g potasyum ferrosiyanür trihidrat, 80 mL distile su içerisinde çözülmüş ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
Prussian mavisi	%20 sulu hidroklorik asit çözeltisi ve %10 potasyum ferrosiyanit solüsyonu kullanmadan hemen önce 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak Prussian mavisi solüsyonu hazırlanmıştır.

3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Saf su cihazı (FISTREEM Calypso, Direct-Q 8UV), pH metre (Mettler Toledo), etüv (Redline- RE 53), sıcaklık kontrol ünitesi (PC441, Ordell), vakum pompası (Labconco), buz dolabı (Arçelik), - 80°C dondurucu (NUAIRE), vorteks (Whirlimixer), ultrasonik su banyosu (ISOLAB), hassas terazi (Shimadzu UniBloc-AUX220, Shimadzu-ATX224), çalkalayıcı (Heidolph-Vibramax 100), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph), kuş yuvası ısıtıcı (LapHeat), mantolu ısıtıcı (Elecrothermal), peristaltik pompa (Langer Pump-BT100-1L), santrifüj (Hettich-Universal 16, NÜVE-NF1200R), CO₂'li inkübatör (NUAIRE), steril kabin (ESCO, Class II BSC), inverted mikroskop (ZEISS), mikroskop kamerası (Axiocam ERc 5s, Zeis), su banyosu (Memmert), Elisa plate okuyucu (BioTek-Epoch), çalkalayıcı inkübatör (IKA KS 2000), zetametre (Malvern), otoklav (HMC HIRAYAMA), evaporatör (Heidolph), UV spektrofotometre (JASCO-V-530, MERCK-Spectroquant NOVA 60 ve Shimadzu UV-1800), HPLC (Agilent Technology, 1260), XRD (D2 Bruker ve GNR APD 2000 Pro), FTIR (Vertex 70V), fotoğraf makinesi (Canon).

3.4. İlaç Taşıyıcı Sistemin Hazırlanışı

3.4.1. Demir oksit manyetik nanoparçacık (Fe₃O₄ MNP, manyetit) sentezi

Nanomateriyallerin sentezi için schlenk sistemi kurulmuştur (Şekil 3.1). Bu sistem ile ortamdaki tüm hava vakum yapılarak çekilir, ortama istenilen gaz verilir ve su akışı ile soğutma yapılarak buharlaşan çözücülerin reaksiyon ortamına geri dönüşü sağlanır. MNP sentezi süresince sıcaklık rejimi otomatik olarak adım kontrol cihazı (PC441, Ordell) ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.1). Senteze başlamadan önce otomatik ayar (auto-tune) yapılarak sistem set edilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinde K4 tipi termokupl (NiCr-Ni) kullanılmıştır.

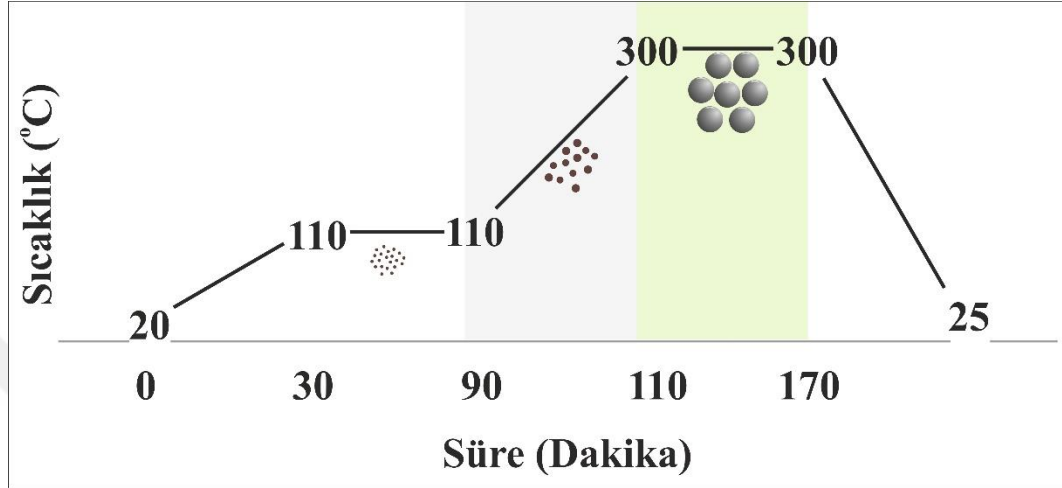


Şekil 3.1. Oleyilamin kaplı Fe_3O_4 MNP sentezi için kullanılmış olan schlenk sistemi

Yüksek kalitede kristal yapıya sahip 10 nm'den küçük manyetit (Fe_3O_4) MNP'ler termal bozunma yöntemiyle (thermal decomposition) sentezlenmiştir. Öncül demir kaynağı olarak demir (III) asetil asetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) kullanılmıştır. Çözücü, sürfaktan ve indirgeyici ajan olarak oleyilamin, çözücü olarak ise benzil eter tercih edilmiştir. Sentez 15 mL oleyilamin ve 15 mL benzil eter içerisinde çözülmüş 3 mmol $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ile yürütülmüştür (Xu *et al.* 2009). Ortamı su ve oksijen kalıntılarından arındırmak için schlenk sistemine 45 dakika vakum uygulanmıştır. Vakum işleminden sonra istenmeyen oksidasyonu önlemek amacıyla ortama azot (N_2) gazı uygulanmış ve reaksiyon boyunca ortam inert atmosferde tutulmuştur.

Reaksiyon ortamının sıcaklığı 30 dakika içerisinde 110°C 'ye çıkarılmış ve tüm öncü maddelerin çözünmesi için sıcaklık 1 saat bu değerde tutulmuştur (Şekil 3.2). Çekirdek oluşumu (nucleation) bu süreçte gerçekleşmektedir (Sheng-Nan *et al.* 2014). 1 saat sonunda, stabilizasyon için reaksiyon ortamı 300°C 'ye ısıtılmış ($\sim 10^\circ\text{C}/\text{dakika}$) ve 1

saat daha sistem bu sıcaklıkta tutulmuştur. Ardından solüsyonun oda sıcaklığına soğuması için beklenmiştir (Şekil 3.2).



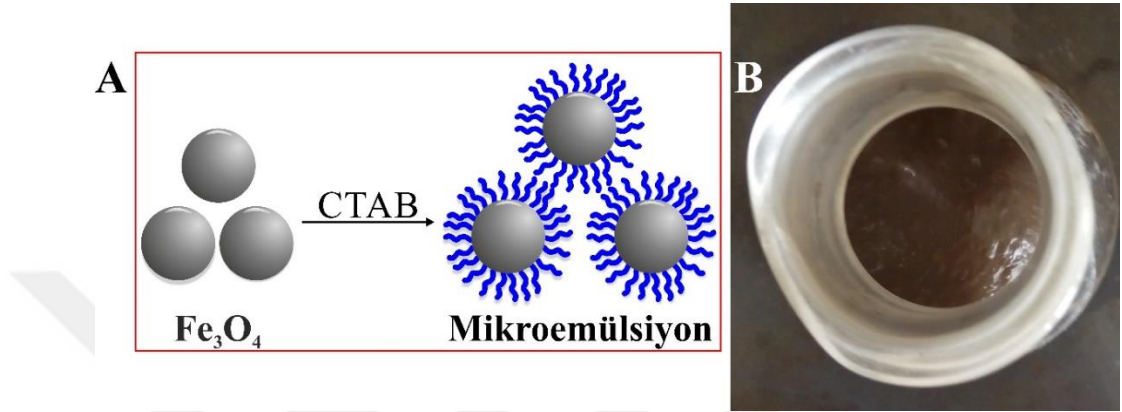
Şekil 3.2. Fe_3O_4 MNP sentezinin süre-sıcaklık ilişkisi

Ortamdaki çözücü ve kirlilikleri gidermek için Fe_3O_4 MNP'leri etanolde dağıtılmış ve falkon tüp içerisinde 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemiyle çöktürülmüştür. Yıkama adımı 2-3 kez (temiz süpernatant görünceye kadar) tekrar edilmiştir. Her yıkamada süpernatant pH metre ile ölçülmüş ve yıkama işlemiyle MNP ortamının pH değerinin bazik düzeyden nötre yaklaştığı gözlenmiştir. Bu durum bağlanmayan oleyilaminin uzaklaştırıldığını göstermektedir. Son olarak parçacıklar hekzan (50 mg/mL) içerisinde dağıtılarak azot atmosferinde kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.4.2. Mezogözenekli silika kaplı Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$) sentezi

Gözenekli silika kaplı manyetik nanoparçacık sentezinde Stöber metodunun modifiye edilmiş hali kullanılmıştır (J. Kim *et al.* 2006). Öncelikle, 30 mg Fe_3O_4 MNP'leri (600 μL) 3 mL kloroformda ultra sonikasyon ve vorteks ile dağıtılmıştır. Monodispers manyetit nanoparçacıklar, 0,4 g CTAB (54,8 mM) ihtiva eden 20 mL sulu bir solüsyona ilave edilmiş ve 30 dakika şiddetli bir şekilde (1400 rpm) karıştırıldıktan sonra,

homojen bir su-yağ mikroemülsiyonu (Şekil 3.3) elde edilmiştir. Amfifilik¹⁹ CTAB, yapısal olarak misel oluşumuna elverişli olduğundan dolayı düzenli MCM-41 tip nanoparçacıkların hazırlanmasında sıkça kullanılmaktadır (Liberman *et al.* 2014).



Şekil 3.3. (A) Su-yağ mikroemülsiyonunun şematik gösterimi ve **(B)** mikroemülsiyonun fotoğrafı

Çözelti 70°C’de 30 dakika ısıtarak kloroform uzaklaştırılmış, böylece sulu fazda dağılmış nanoparçacıklar hazırlanmıştır. Daha sonra, elde edilen sulu solüsyondan 0,5 mL alınarak, 10 mL su ile seyreltilmiştir. Manyetit nanoparçacıklarını içeren seyreltilmiş sulu solüsyona 0,3 mL amonyum hidroksit (NH₄OH) çözeltisi ve 0,5 mL etil asetat (EtOAc) (5,11 mmol) içerisinde çözülmüş olan 0,05 mL tetraetilortosilikat (TEOS, 0,223 mmol) ilave edilmiştir. Nihai karışım, 30 saniye karıştırılıp (500 rpm) 3 saat dinlendirilmiştir (Şekil 3.4).

¹⁹ Hem hidrofilik hem hidrofobik özelliğe sahip

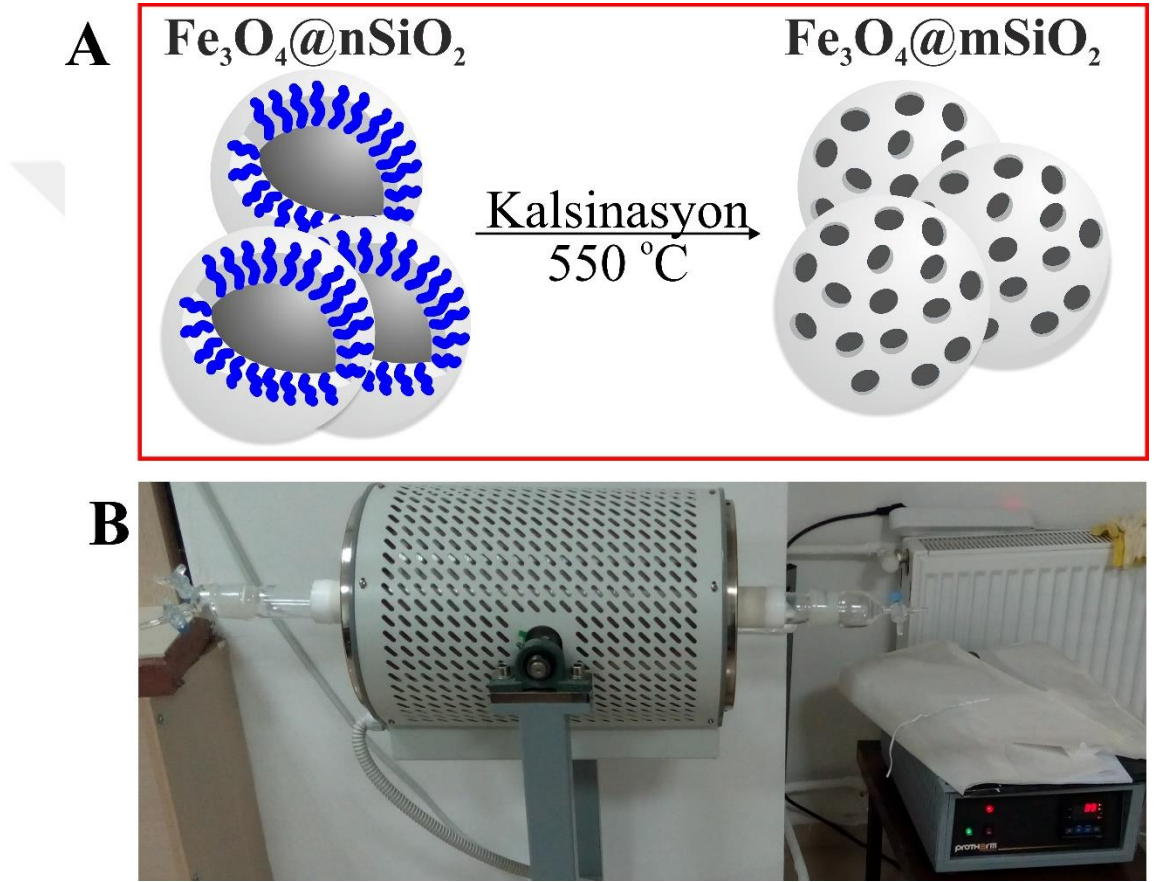


Şekil 3.4. Silika kaplama reaksiyonu (aging)

TEOS, suda karışmadığı için çözünürlüğünün artırılmasında etanol veya etil asetat kullanılmaktadır (Suteewong *et al.* 2010). Sentez sisteminin pH değeri, elde edilecek yapıların düzenli sıralanmasını ve şekil-boyut gibi özelliklerini etkilemektedir. Etil asetat kullanılarak pH değeri düşürülür. Bazı çalışmalarda etanol kullanılarak sistemin polaritesi artırılır (Suteewong *et al.* 2010). Su miktarı az tutularak ve düşük konsantrasyonlu TEOS kullanılarak küçük boyutlarda parçacık elde edilmektedir (Lieberman *et al.* 2014). Hidrolizlenmiş TEOS ile sürfaktan-stabilize inorganik nanoparçacıklar (CTAB ile sarılmış manyetit) elektrostatik olarak etkileşir ve manyetik çekirdekli silika kaplı nanokompozit elde edilir. Ayrıca silika ve MNP arasında kovalent bağlar ve hidrojen bağları da kurulur.

Suteewong ve arkadaşları yaşlanma (aging) süresine bağlı olarak, manyetik çekirdeğin gözenekli yapının merkezinden kenarına doğru konum değiştirdiğini öne sürmüştür (Suteewong *et al.* 2010). Bu çalışmada aynı zamanda demir oksit manyetik çekirdek varlığının, daha küçük boyutlarda ve daha dar dispersiyon aralığında mezogözenekli yapıların elde edilmesine katkı sağladığı belirtilmiştir. Neticede manyetik çekirdek, silika NP'lerin boyut kontrolünü de sağlamaktadır. Bunun yanında yaşlanma süresi parçacıkların morfolojilerini de etkilemektedir (X. Sun *et al.* 2015).

3 saat sonra santrifüj yapılarak gözeneksiz silika kaplı manyetik nanoparçacıklar ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{nSiO}_2$) çöktürülmüş, birkaç kez su ve etanol ile yıkanmıştır. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{nSiO}_2$ MNP'leri kurutulduktan sonra 550°C 'de (Şekil 3.5) 5 saat kalsinasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu sayede, CTAB çıkarılarak mezogözenekli silika küreler içine gömülü manyetit nanoparçacıklar elde edilmiştir ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$).



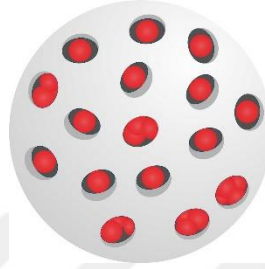
Şekil 3.5. (A) Kalsinasyon işleminin şematik gösterimi ve (B) süreçte kullanılan fırın

NP'ler, birkaç kez su ve etanol ile yıkanmış, 9000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemiyle çöktürülmüştür. Çökelek ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$), kuru bir şekilde oda şartlarında saklanmıştır.

3.5. Nanoparçacıklara İlaç Yükleme ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}$)

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lere disülfiram (DSF) yükleme işleminde, 0,5 g DSF, 25 mL metanolde tamamen çözülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. DSF stok solüsyonu,

+4°C’de (L. Zhang *et al.* 2013) saklanmıştır. 250 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP’ler, 20 mL DSF solüsyonu içerisinde tamamen dağıtılmıştır. Karışım 24 saat oda şartlarında karıştırılmıştır (500 rpm). Böylece hidrofobik DSF, hidrofobik gözeneklere kolay bir şekilde yerleşmiştir (He and Shi 2011) (Şekil 3.6).

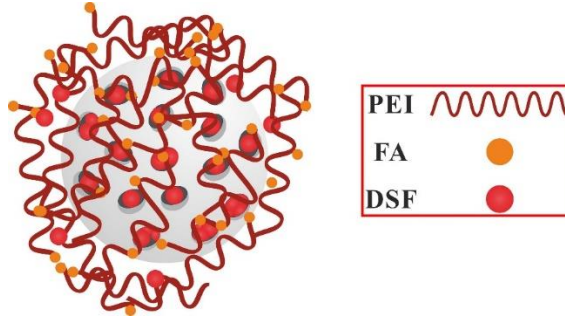


Şekil 3.6. Gözenekli taşıyıcı sisteme DSF (Kırmızı) yüklenmesi

3.5.1. Yüzey modifikasyonu ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF@PEI-FA}$, mMDPF)

Öncelikle 300 mg folik asit, dimetilformamit (DMF)/dimetil sülfoksit (DMSO) (27 mL, 3:1, h/h) çözeltisi içinde çözülmüş disikloheksilkarbodiimid (DCC, 93 mg) ve N-hidroksisüksinimid (NHS, 77 mg) ile 24 saat boyunca 300 rpm karıştırma hızıyla karıştırılarak aktive edilmiştir (Zhu *et al.* 2010). Ardından, aktive edilmiş FA solüsyonu, %5’lik PEI solüsyonuna (250 mg PEI/5 mL DMSO) ilave edilmiştir. Reaksiyon ortamı oda sıcaklığında ve karanlık koşullar altında 24 saat karıştırılmıştır (300 rpm).

PEI-FA solüsyonu DSF ile doyurulduktan sonra $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}$ solüsyonuna damla damla eklenmiştir (1:1, PEI: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}$) (Li *et al.* 2016; X. Ma *et al.* 2013). Karışım, 2 saat 180 rpm’de karıştırılmıştır. Ortamdaki fazla DSF, bağlanmayan PEI ve FA yapılarını uzaklaştırmak için parçacıklar, en az üç kez organik çözücü ve saf su ile yıkanıp santrifüj (9000 rpm’de 15 dakika) işlemiyle $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF@PEI-FA}$ (mMDPF) parçacıkları (Şekil 3.7) toplanmıştır (Han *et al.* 2016; Li *et al.* 2016; G. Wang *et al.* 2015). Aynı yöntem ile taşıyıcı sistemin etkisini kontrol etmek amacıyla $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2@\text{PEI-FA}$ (mMPF) (disülfiram içermeyen taşıyıcı sistem) hazırlanmış ve deneylerde kontrol numunesi olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.7. İlaç yüklü nano taşıyıcının PEI-FA ile yüzey modifikasyonu

Modifikasyon işlemlerinin ardından mMDPF'deki DSF miktarı belirlenmiştir. Bunun için 10 mg mMDPF, oda şartlarında 5 mL metanol içerisinde dağıtılmış ve 1 saat karıştırılmıştır (Wan *et al.* 2014). Numuneler, 9000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatanttaki DSF miktarı tespit edilmiştir. DSF miktarının belirlenmesinde literatürde HPLC veya UV/VIS spektrofotometre kullanılmaktadır (X. Duan *et al.* 2013; L. Zhang *et al.* 2013, 2015). Çalışmamızda, daha hassas olması bakımından, HPLC metodu ile DSF miktarı ölçülmüştür. İlacın yüklenip yüklenmediği ve yüzey modifikasyonlarının karakterizasyonu, HPLC dışında, DLS ve FTIR ölçümleri ile de doğrulanmıştır (Fasehee *et al.* 2016; L. Zhang *et al.* 2015). Ayrıca FA, $\lambda=280-370$ nm'de absorbans piki gösterdiğinden dolayı FA bağlama UV/VIS spektrofotometre ile kontrol edilmiştir (X. Ma *et al.* 2013). İlaç yükleme kapasitesi (YK) aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (M; ağırlık olarak alınmıştır) (Li *et al.* 2016; Luo *et al.* 2016; Song, Tang, Lei, *et al.* 2016; Wan *et al.* 2014):

$$\%YK = \frac{M_{\text{Süpernatanttaki DSF}}}{M_{\text{mMDPF}}} \times 100$$

3.6. Nanoparçacık karakterizasyonu

Sentez ürünlerinin kristal yapısının aydınlatılmasında, X-ışını kırınım (XRD) analizi yapılmıştır. Bunun için numuneler toz halinde hazırlanmış ve XRD cihazının aparatına tutturulmuştur. Numunelerin XRD desenleri D2 Bruker (Fizik Bölümü, Fen Fakültesi, Atatürk Üniversitesi) ve GNR APD 2000 Pro (Elektrik Elektronik Bölümü,

Mühendislik Fakültesi) difraktometre ile elde edilmiştir. Cu K α $\lambda=1,54$ °A dalga boyundaki X ışınları ile 30 mV ve 10 mA veya 40 mV ve 30 mA koşullarında çalışılmıştır. Örnekler 0,05 adımlar ile 2 θ değerinin 5-80° ve 0,02 adımlar ile 2 θ değerinin 10-70° olduğu aralıkta taranmıştır. Kırınım desenleri XPOWDer yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve kristalit boyutu Debye-Scherrer denklemi ile hesaplanmıştır:

$$D = \frac{K \times \lambda}{\beta \times \cos\theta} \quad D = \frac{0,9 \times 1,54}{\beta \times \cos\theta}$$

λ : X-ışını dalga boyu (0,15406 nm).

β : FWHM değeri (full width at half maximum, pik şiddetinin maksimum değerinin yarısına düştüğü pik yarı genişliği). Origin Pro 8.5 programı ile 1,219 olarak hesaplanmıştır.

K: Şekil parametresidir ve manyetit için bu değer 0,89'dur (Mascolo *et al.* 2013).

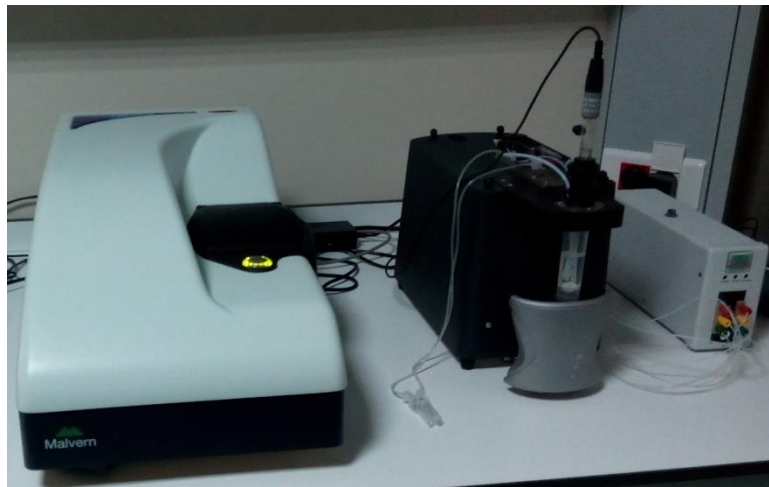
θ : Bragg açısı. 2 θ değeri 35,68° olan pik seçilmiş ve $\cos 17,84 = 0,5322$ olarak hesaplanmıştır.

Parçacıkların sahip oldukları fonksiyonel grupların belirlenmesinde Vertex 70V FTIR spektrometresi (DAYTAM) kullanılmıştır (Şekil 3.8). Örneklerin 400-4000 cm⁻¹ arası geçirgenlik (Transmittans) pikleri alınmıştır. Sıvı ölçümlerde cihazın sıvı numune aparatı kullanılmıştır.



Şekil 3.8. Vertex 70V FTIR spektrometresi, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi

Çalışmamızda nanoparçacıkların yüzey yükleri (ξ -potansiyel), hidrodinamik boyutları (R_h) ve polidispersite indekslerinin (PDI) belirlenmesi için DLS (Dynamic Light Scattering) tekniği kullanılmıştır. Bunun için kullanılan Zetasizer cihazı (Şekil 3.9), dalga boyu 633 nm, ışık kaynağı He-Ne lazer ve lazer kuvveti 2 mW'tır (ZS90, Malvern, DAYTAM). Cihaz, süspansiyon içindeki küçük parçacıkların boyut dağılım profillerini belirleyen DLS metodu ile çalışır. DLS analizi ile parçacıkların hidrodinamik boyut (R_h), polidispersite indeksi (PDI, Polydispersity Index) ve zeta potansiyelleri hakkında bilgi elde edilmektedir. PDI değerleri 0,7'den büyük ise numune çok geniş bir boyut dağılımına sahiptir ve DLS tekniği için uygun değildir. PDI değerlerinin 0,05-0,7 arasında olması, parçacıkların monodispers (dar dağılım) özelliğe sahip olduklarını göstermektedir. En ideal dar dağılım aralığı PDI'nin 0,1-0,25 arasında olduğu durumlarda gözlenir. DLS ölçümüyle belirlenen zeta potansiyel değerlerinin ± 40 ve ± 60 mV arasında bir yüke sahip olmaları kararlılıklarının iyi olduğunu, hatta bu değer ± 61 mV olması mükemmel kararlılığı belirtmektedir. Zeta potansiyelinde yükün pozitif veya negatif olması parçacığın yüzey grupları tarafından belirlenir. Bu nedenle okunan ξ -potansiyel değerlerinin işareti yüzey kimyasını belirtirken değer kendisi kararlılığını ifade etmektedir. Örneğin karboksil grupları ile modifiye edilen bir parçacığın ξ -potansiyelini -40 olarak ölçtüğümüzü farz edelim. Bu durumda parçacığın kararlılığının iyi olduğu 40 değerinden, yüzeyinin karboksille kaplı olduğu (-) işaretinden anlaşılmaktadır.



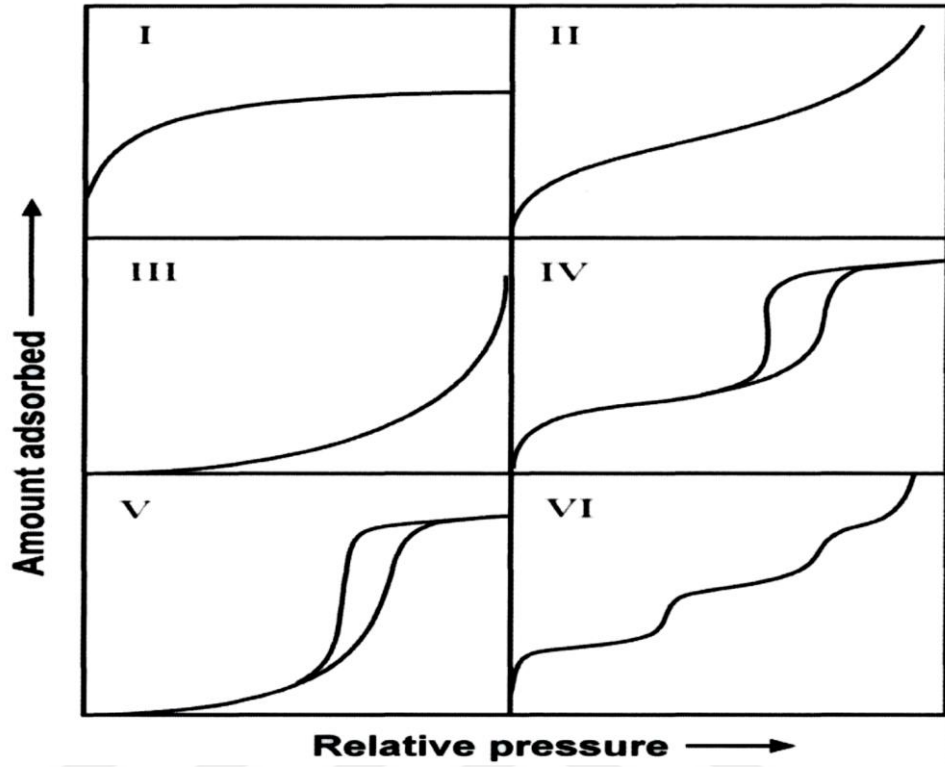
Şekil 3.9. Zetasizer, ZS90, Malvern, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi

DLS ölçümleri, 90° açıda 25°C 'de yapılmıştır. Numune hazırlama işleminde nanoparçacıklar analizden önce sonikasyonda tutularak dispers edilmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik yapı belirlenmiştir. SEM görüntüleri için numuneler cam yüzeyinde kurutulmuş, altın kaplama yapıldıktan sonra yüzey görüntüleri alınmıştır (Erzincan Üniversitesi). Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak nanoparçacıkların yapısal özellikleri belirlenmiştir. Bunun için FEI TALOS F200S TEM 200 kV elektron mikroskobu kullanılmıştır (Bayburt Üniversitesi). Nanoparçacıklar, uygun çözücülerde dispers edildikten sonra karbon kaplı bakır grid üzerine tutturulmuş ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra görüntüleri alınmıştır.

Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) metotları kullanılarak parçacıkların gözenek dağılımı ve yüzey alanı tespit edilmiştir. BET yönteminde malzemenin adsobladığı gazın hacminden yola çıkılarak adsorbent yüzey alanı hesaplanmaktadır. BET ile yüzey alanı analizi belirli bir basınçta P/P_0 adsorbsiyon değerini kullanır. Gözenek boyut dağılımı ise BJH metodunu kullanarak hesaplanır. Bu teknikte ise gaz ile tamamen dolduğu varsayılan gözeneklerin zamanla azalan rölatif basıncını (P/P_0) kullanarak gözenek boyut dağılımı belirlemektedir. Ölçüm sırasında dakikada 10°C artış seyredecek şekilde 300°C 'de degaz işlemi yapılmıştır.

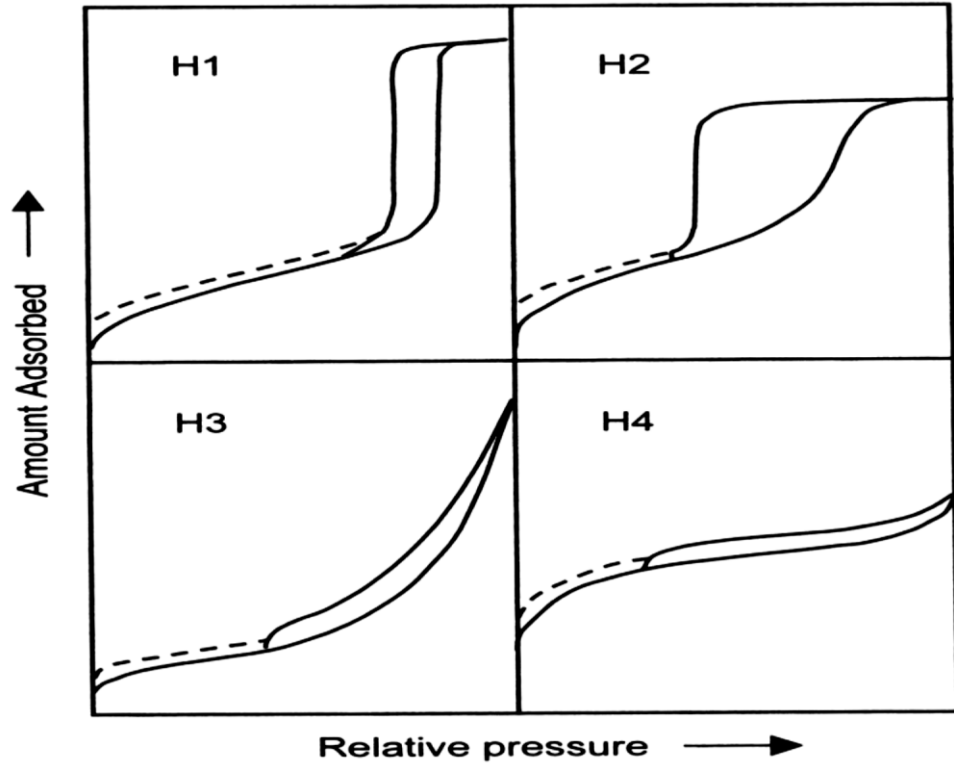
Toplam gözenek boşluğunun malzemenin hacmine oranına poropzite denir (ALothman 2012). Gözenekli malzemelerde genellikle 0,2-0,95 oranında porozite amaçlanır. IUPAC gözenekli yapıların adsorbsiyon özelliklerine bakarak, adsorbsiyon izotermini 6 sınıfa ayırmaktadır (ALothman 2012). Şekil 3.10'de sunulan bu eğrilerden tip I mikrogözenekli, tip II, III ve VI gözeneksiz veya makrogözenekli yapılara aittir. Tip IV ve V ise mezogözenekli yapılara ait adsorbsiyon izotermini belirtmektedir.



Şekil 3.10. İzoterm eğrileri

Mikro (I) makro (II, III ve VI) ve mezogözenekli (IV ve V) yapılar (ALÖthman 2012).

Mezogözenekli yapılarda izoterm eğrilerinde 4 farklı gecikme kavis (hysteresis loop) gözlenir ve bunlar yapıdaki gözeneklerin boyut ve geometrisi hakkında bilgi vermektedir (Şekil 3.11) (ALÖthman 2012). Bu eğrilerden H1, yapının silindirik benzeri gözenek kanallarına sahip olduğunu ve uniform dağılım gösterdiğini belirtmektedir. H2 ise genellikle iyi tanımlanmamış gözenek şekli ve boyutuna sahip materyallerde gözlenmiştir. H3 ve H4 gecikme kavisleri kesik şeklinde gözenek yapılarını belirtir. H4’de kesikler çok dardır.



Şekil 3.11. Mezogözenekli yapılarda gözlenen gecikme kavisleri (ALothman 2012)

Gözenek yapısının doğrulanması için $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{nSiO}_2$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerinin BET ve BHJ analizleri yaptırılmıştır.

PEI-FA ile kaplı olan nanoparçacıklar UV/NIR spektrofotometre (DAYTAM) ile geniş aralıkta taranmıştır. FA, $\lambda=280$ ve 370 nm'de absorpsiyon pikleri verir (X. Ma *et al.* 2013). UV/NIR spektrofotometre ile yapıya bağlanan FA doğrulanmıştır.

3.7. İlaç Salım Kinetiğinin İncelenmesi

2 mg/mL mMDPF solüsyonu hem pH=7,4 hem de pH=6,0 olan şartlarda hazırlanmıştır. Solüsyonlar ependorf tüplere dağıtılmış (1 mL) ve çalkalamalı inkübatörde (300 rpm) 37°C ve 42°C 'de inkübe edilmiştir. 4, 6, 7, 8, 18 ve 24. saatlerde tüpler santrifüjlenmiş (15.000 rpm 10 dakika) süpernatant ayrılmıştır. DSF sulu ortamda hızla hidrolizlendiğinden, tampon solüsyonundaki DSF miktarının doğru bir şekilde ölçümü olası değildir (Cen *et al.* 2004; Lewis *et al.* 2014; Song, Tang, Lei, *et al.* 2016; L. Zhang

et al. 2013). Bu nedenle salınan DSF miktarı NP’de kalan DSF miktarı ölçülerek hesaplanmıştır. Bu amaçla santrifüjle çöktürülen mMDPF, 1 mL metanol ile muamele edilip tekrar santrifüjlenmiştir. Metanol faz HPLC ile analiz edilmiş ve salım süresi sonunda parçacıklarda kalan DSF miktarı tespit edilmiştir. Aynı şekilde kontrol grubunda, 10 mg mMDPF 5 mL metanol ile karıştırılmış ve mg nanoparçacık başına ne kadar DSF’nin yüklü olduğu HPLC ile belirlenmiştir. Kontrol grubu ile deney gruplarının farkı alınarak salınan DSF miktarı (S_{DSF}) hesaplanmıştır:

$$S_{DSF} = M_{Kontrol\ DSF} - M_{mMDPF'de\ kalan\ DSF}$$

3.7.1.HPLC yöntemi

İlaç içeriği HPLC metoduyla belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan HPLC sistemi (Agilent teknoloji 1260 Infinity II) Ace C18 kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm) ve UV detektörden oluşmaktadır. Mobil faz olarak 0,7 mL/dakika akış hızında su-metanol (20/80, h/h) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C, UV detektör 275 nm ve enjeksiyon hacmi 5 µL olarak ayarlanmıştır.

Numunelerin ölçümüne başlamadan önce 0,1-30 ppm aralığında DSF çözeltileri kullanılarak standart grafik hazırlanmıştır. Nanoparçacıklara yüklenen ve nanoparçacıklardan salınan ilaç miktarı bu standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

3.7.1.a. HPLC yönteminin geçerlilik testi (validasyon)

HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. HPLC çalışmasında disülfiram a ait kalibrasyon eğrileri ile ilgili istatistik değerleri

Parametreler	Disülfiram
Dalga boyu (λ)	275 nm
Doğrusal aralık	0-30 (ppm)
Regresyon doğrusu denklemi	$y=16,919x+0,2752$
Korelasyon katsayısı (r^2)	0,9997

Disülfiram için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlanıp kromatogramları alınmıştır. Kromatogramlarda pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının (sinyal/gürültü oranının) 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı, 10 olduğu derişim ise tayin alt sınırı değeri olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. HPLC yönteminin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri

Etkin madde	Gözlenebilme Sınırı (LOD) (ng/mL) (ppb)	Tayin Alt Sınırı (LOQ) (ng/mL) (ppb)
Disülfiram	25	75

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği gün içi ve günler arası değişkenlerle belirlenmiştir. Disülfiramın kalibrasyon eğrileri içine düşen, üç farklı derişimde hazırlanan çözeltilerin aynı gün ve farklı günlerde (en fazla 2 gün içinde) kromatogramları alınıp pik alanları üç kez okunmuştur. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlenmiştir. Yöntemin kesinliği yüzde bağıl standart sapma (%RSD) ve doğruluk da bağıl hata ile Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

	Eklenen	Gün içi			Günler arası		
		Bulunan $\pm$ std. sapma	%bağıl hata	%RSD	Bulunan $\pm$ std. sapma	%bağıl hata	%RSD
Disülfiram (ppm)	1,25	1,29 $\pm$ 0,039	3,20	3,02	1,31 $\pm$ 0,050	4,80	3,82
	7,5	7,61 $\pm$ 0,136	1,47	1,79	7,72 $\pm$ 0,172	2,93	2,23
	25	26,14 $\pm$ 0,397	4,56	1,52	26,28 $\pm$ 0,752	5,12	2,86

Disülfiram stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun için üç farklı derişimde hazırlanan disülfiram çözeltileri oda sıcaklığı, +4 ve -20°C’de 24 ve 48 saat süreyle bekletilmiştir. Bu süreler sonunda çözeltilerin kromatogramları alınıp pik alanları ölçülmüş ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ve %RSD ile Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Disülfiramın HPLC yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Süre	Sıcaklık	Disülfiram Derişimi (ppm)		
		2,5	10	20
24 saat	Oda sıcaklığı	97,6 $\pm$ 2,12	98,5 $\pm$ 2,47	101,2 $\pm$ 2,71
	+4°C	98,1 $\pm$ 3,85	99,2 $\pm$ 2,27	101,7 $\pm$ 2,34
	-20°C	99,4 $\pm$ 3,12	99,7 $\pm$ 2,08	100,6 $\pm$ 1,89
48 saat	Oda sıcaklığı	96,9 $\pm$ 4,13	98,4 $\pm$ 3,16	99,4 $\pm$ 3,89
	+4°C	97,7 $\pm$ 4,97	98,6 $\pm$ 3,06	102,1 $\pm$ 3,54
	-20°C	99,6 $\pm$ 3,78	100,7 $\pm$ 3,15	101,8 $\pm$ 2,76

3.8. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce tüm malzemeler uygun sterilizasyon koşulları ile steril edilmiştir. Her defasında laminar kabin (Şekil 3.12) %70 etanol ile silinmiş ve kabine alınan her malzeme önce alkol ile muamele edilmiştir. Çalışma süresince eldivensiz kabine dokunulmamış sık sık eller alkol ile steril edilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce ve çalışmanın sonunda kabinin UV lambası en az 15 dakika çalıştırılmıştır.



Şekil 3.12. Hücre kültürü çalışmalarının yürütüldüğü Class II tip steril kabin

Çalışmada kullanılan hücre hatları Çizelge 3.6’de belirtilmiştir. Tüm hücreler satıcı firmanın tavsiye ettiği şekilde yetiştirilip pasajlanmıştır. Kanser hücre hattı (MCF-7) %1 antibiyotik ve %10 serum (FBS) içeren DMEM medyum ile kültüre alınmıştır. MCF-10A hücreleri ise %5 at serum, %1 antibiyotik, hidrokortizon, insülin ve epidermal büyüme faktörü (EGF) içeren DMEM/F12 medyumunda yetiştirilmiştir. Hücreler 37°C’de %5 CO₂ ve %90 nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Hücre Hattı	Özellik	Organizma	Kaynak
MCF-7	Meme Kanseri	İnsan	Veteriner Fakültesi, Atatürk Üniversitesi
MCF-10A	Meme Epitel	İnsan	Celal Bayar Üniversitesi

Dondurulmuş halde saklanan stok hücre hatları, hızlıca çözündürülüp üzerlerine 1 mL FBS içeren medyum eklenmiştir. 1500 rpm’de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve pellet, hücre medyumunda çözülerek flasklara hücre ekimi yapılmıştır. Ekim için kullanılan hücre sayısı, medyum ve tripsin miktarı Çizelge 3.7’de belirtilmiştir. Bütün çalışma boyunca hücrelerin maksimum 30 pasaja kadar ilerlemesine müsaade edilmiş, morfolojileri her adımda kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.7. Hücre ekim yoğunluğu ve uygulanan medyum miktarı

Hücre Büyüme Kapları	Hücre Sayısı	Medyum	Tripsin
96 Kuyucuklu Kap	5×10^3 hücre/kuyu	0,2 mL	-
12 Kuyucuklu Kap	5×10^4 hücre/kuyu	1 mL	0,5 mL
6 Kuyucuklu Kap	3×10^5 hücre/kuyu	2 mL	1 mL
T25 flask	1×10^6 hücre	4 mL	2 mL
T75 flask	3×10^6 hücre	15 mL	4 mL

Kullanılan hücre tipleri adherent (yüzeye yapışarak büyüyen) olup pasajlanma sürecinde;

- Eski medyumun uzaklaştırılması,
- Tripsin/EDTA (%0,25) ile 2-3 dakika 37°C’de inkübasyon,
- Serum içeren medyum ile tripsinin inaktive edilmesi,
- 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj ile hücrelerin çöktürülmesi,
- Hücrelerin trypan blue ile boyanması ve thoma lamı kullanılarak sayımı,
- Uygun sayıda hücrenin yeniden ekimi şeklinde sıralanan adımlar takip edilmiştir.

Çalışma sürecinde elde edilen fazla hücreler, %5 DMSO içeren besiyeri ile cryotüp içerisinde (1,5 mL) 1 saat -20°C’de, 24 saat -80°C’de dondurduktan sonra sıvı azot tankında stoklanmıştır. Hücreler, mikroskopik olarak görüntülenmiş ve Axiocam ERc 5s tipi Zeis marka kamera ile resimleri alınmıştır.

3.8.1. Hücre canlılığı ve sayımı

Hücre ayırma, dondurma veya çözme gibi işlemlerden sonra canlı kalan hücre sayısını belirlemek için kullanılan trypan blue canlılık testi, canlı hücrelerin boyayı almaması ve ölü hücrelerin alması prensibine dayanır. 10 µL hücre süspansiyonu ve 10 µL trypan blue boyası karıştırılmış, ışık mikroskopunda 10X büyütmede hücreler thoma lamı ile sayılmıştır. Mililitre başına ölü ve canlı hücrelerin toplam sayısının belirlenmesinde kullanılan formül aşağıdaki gibidir.

$$\text{Hücre Konsantrasyonu} = \frac{\text{Sayılan Toplam Hücre}}{16 \text{ Adet Kare}} \times 10.000 \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

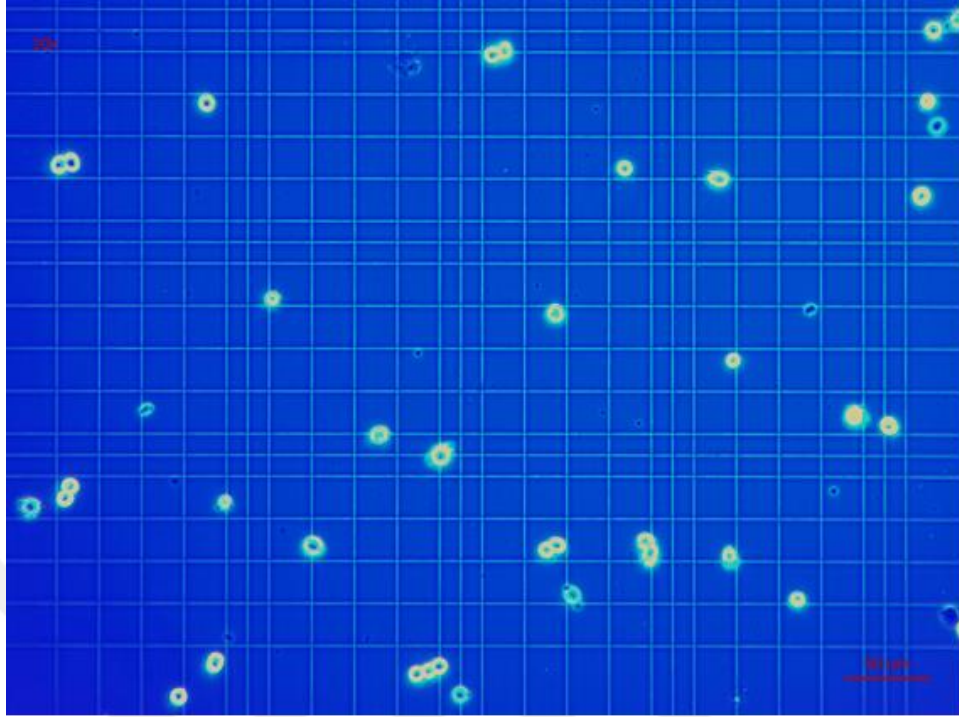
10.000: 0,1 mm³’teki sayım sonucunu 1 mL’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan sabit bir değerdir.

Dilüsyon faktörü: 2 (10 µL hücre süspansiyonu ve 10 µL trypan blue boyası) olarak alınmıştır.

Hücre canlılığı için kullanılan formül ise şu şekildedir:

$$\% \text{ Canlı Hücre} = \left[1,00 - \left(\frac{\text{Mavi Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \right) \right] \times 100$$

Canlılık yüzdesinin %95 ve üzeri çıkması hücrelerin sağlıklı olduğunu göstermiştir. Sayım işlemini takiben kullanılacak hücre sayısı Çizelge 3.7’de belirtildiği gibi kültür kabının hacmine uygun sayıda hücre ekimi yapılmıştır.



Şekil 3.13. Thoma lamında canlı (parlak) ve ölü (mavi) hücrelerin görünümü
10X büyüme

3.8.2. Doz belirleme ve ilaç uygulama

T75 flaskta, uygun besi yeri ortamında çoğaltılan MCF-7 ve MCF-10A hücreleri, her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekilmiştir. 200 µl hücre medyumu ile 24 saat inkübe edilmiştir. Hücrelere uygulanacak DSF, CuCl₂, SNP ve mMDPF miktarının belirlenmesi için öncelikle ayrı ayrı CuCl₂ (0,1-15 µM), DSF (0,1-25 µM), SNP (1-100 mM), Fe₃O₄@mSiO₂ (5-600 µg/mL) ve Fe₃O₄@mSiO₂@PEI-FA (20-80 µg/mL) uygulanmıştır. Muameleden 24 ve 48 saat sonra hücreler bölüm 3.8.3'te anlatıldığı gibi MTS toksisite testine tabi tutulmuştur.

3.8.3. Toksisite testi (MTS)

Uygulanacak yapıların hücreler üzerindeki proliferatif ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için MTS testi (MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric), 197010, ABCAM) uygulanmıştır. MTS, hücrelerin proliferatif ve sitotoksik özelliklerini ortaya

koyan kolorimetrik bir test yöntemidir. Test, MTS tetrazolium tuzunun canlı hücreler tarafından üretilen formazan tarafından yıkımına dayanır. Formazan boyası 490-500 nm’de absorbens ölçümüyle belirlenir.

Hücre ekimi (5.000 hücre/kuyu) ve muamele işleminin ardından hücreler belirli sürelerde (24 veya 48 saat) inkübe edildikten sonra canlılık belirlenmiştir. 96 kuyucuklu kaplardaki (200 µl) hücrelere 20 µl MTS solüsyonu eklenmiştir. 3 saatlik inkübasyonun ardından 490 nm’de absorbens değerleri Plate Reader ile ölçülmüştür. Hücre canlılığı (%) aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Absorbans}_{\text{Muamele}}}{\text{Absorbans}_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

3.8.4. Nanoparçacıkların hücresel alımı

Hücresel alımın araştırılması için 50.000 hücre 12 kuyucuklu kültür kaplarına 1 mL medyum ile ekilmiş ve kültür kapları 24 saat inkübe edilmiştir. Endositozik mekanizmanın aydınlatılması için Prussian Mavisi (Prussian Blue) ile boyama yapılmıştır (Shanehsazzadeh *et al.* 2013). Bu boyama hücre içerisindeki demiri belirlemek için kullanılan bir boyamadır. Hücrelere 0,5 mg/mL mMDPF uygulandıktan sonra her bir grup için kültür kaplarının alt kısmına 10 dakika miknatıs tutularak parçacıkların hücre içine geçişi hızlandırılmıştır. Hücreler 24 saat sonra, soğuk (ice cold) PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından %4 PFA (Çizelge 3.1) ile 20 dakika oda sıcaklığında fiksasyon işlemi endositozu durdurmak amacıyla yapılmıştır. Çizelge 3.1’de anlatıldığı gibi hücreler, taze hazırlanmış Prussian Mavi solüsyonu ile 30 dakika, 37°C’de inkübe edilmiştir. Hücreler tekrar PBS ile yıkanmış ve mikroskop ile gözlenmiştir.

3.8.5. Klonojenik deney

mMDPF'lerin, hücrelerin üreme ve koloni oluşturma kapasitelerinin araştırılmasında kullanılan bir sitotoksosite testidir. Öncelikle 12 kuyucuklu kaplara ekilen hücreler, mMDPF ile muamele edilmiş, 12 saat sonra toplanmıştır (Fasehee *et al.* 2016). 50 hücre/kuyu olacak şekilde ilaç içermeyen taze medyum ile hücreler yeniden kültüre alınmıştır. Kültürün 7-10. gününden sonra en az 50 hücre içeren koloni formları kolonijenik hücre olarak sayılmıştır (Peng Liu *et al.* 2014; Xinwei Liu *et al.* 2016; Yip *et al.* 2011). Sayım için kuyucuklar PBS ile yıkanmış soğuk metanol ile hücreler fikse edilmiş ve %0,4 trypan mavisi ile hazırlanan %10'luk PBS-trypan mavisi solüsyonu ile koloniler boyanmıştır.

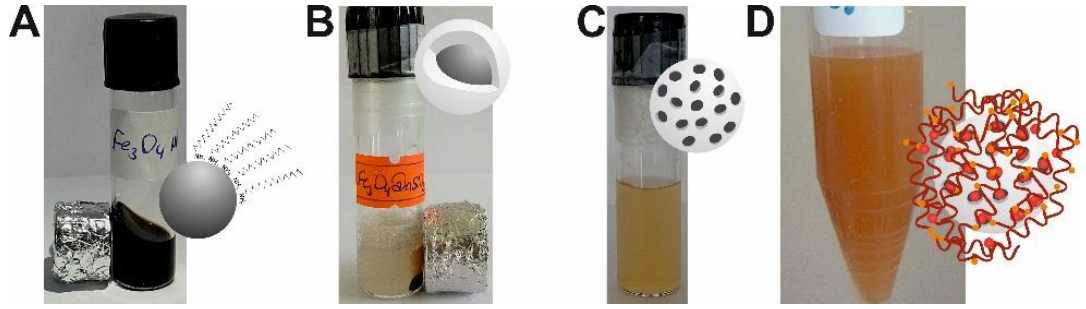
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. İlaç Taşıyıcı Sistem

Bu tez çalışmasında, çekirdek materyali olarak Fe_3O_4 (Manyetit) manyetik nanoparçacıkları (MNP) basit ve hızlı bir yöntem olan termal dekompozisyon metoduyla üretilmiştir (Şekil 4.1). Böylece çok iyi monodispers dağılım gösteren manyetit nanoparçacıkları hazırlanmıştır. Termal yöntemde başlangıç materyali olarak demir kaynaklarından $\text{Fe}(\text{acac})_3$ veya $\text{Fe}(\text{CO})_5$ kullanılmaktadır. $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 'nin yüksek toksisitesi (Sheng-Nan *et al.* 2014) nedeniyle çalışmamızda öncül demir kaynağı olarak $\text{Fe}(\text{acac})_3$ kullanılmıştır. Yüzey aktif madde (sürfaktan) olarak oleyilamin kullanılmıştır. Böylece hekzanda dağılan, monodispers ve süpermanyetik MNP'ler hazırlanmıştır. Sentez sonucunda %28,30 verimle 300 mg Fe_3O_4 MNP elde edilmiştir. Verim hesabında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Bikiaris *et al.* 2009):

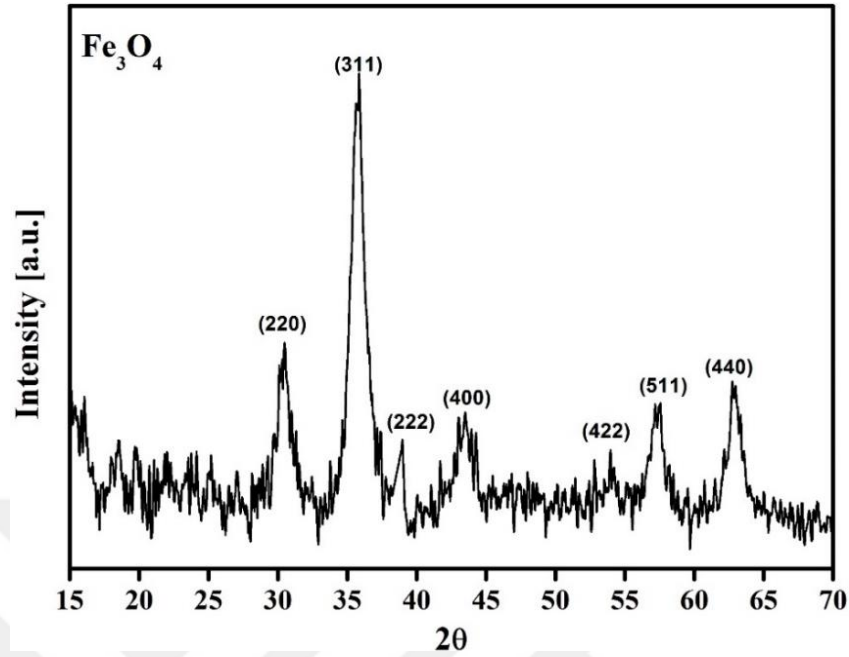
$$\% \text{ NP Verimi} = \frac{\text{NP (g)}}{\text{Başlangıç materyali (g)}} \times 100$$

Fe_3O_4 MNP'leri hekzan içerisinde dağıtılıp (50 mg/mL), N_2 atmosferinde saklanmıştır. Şekil 4.1'de, MNP'lerin ve ilaç taşıyan sistemin, çözücülerde dağılımı ve manyetik yanıtlama (responsiveness) bulguları sunulmuştur. Resimlerden de anlaşıldığı üzere, hazırlanmış olan ilaç taşıyıcı sistem, dış manyetik etki ile hareket ettirilebilir ve manyetik hedefleme amacıyla kullanılabilir. Manyetik özellikleri kullanılarak, ilaç taşıyıcı sistemin hücrelere uygulanmasının ardından hücre kaplarının tabanına mıknatıs tutulmuş ve taşıyıcı sistemin, doğal olarak da ilacın hücre içinde konsantre olması sağlanmıştır. Ayrıca manyetik yetenekleri bu yapının farklı çalışmalarda manyetik hipertermi tedavisinde kullanımını da sağlar. In vivo uygulamalarda MRI ajan olarak da kullanılabilir.



Şekil 4.1. NP'lerin çözücünde dağılım ve manyetik yanıt (responsiveness) bulguları
(A) Hekzan içerisinde dağıtılmış oleyilamin kaplı Fe_3O_4 MNP, **(B)** Suda $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2$ MNP'ler, **(C)** Suda $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ MNP'ler ve **(D)** Suda dağıtılan mMDPF

Sentezlenen MNP'lerin, beklenildiği gibi manyetik olup olmadığını anlamak, nanoparçacıkların kristal yapısını belirlemek ve kristal boyutu hesaplamak amacıyla toz halindeki örneklerin geniş açılı X-ışını kırınım (XRD) desenlerine bakılmıştır. XRD analizinde, Fe_3O_4 MNP'lere ait tipik 30,27, 35,68, 37,43, 43,01, 54,17, 57,56 ve 62,97° pikleri gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu pikler sırasıyla ters kübik spinel manyetitin [220], [311], [222], [400], [422], [511] ve [440] düzlemlerini belirtmektedir (PDF No. 01-075-0149). Sentezlenen Fe_3O_4 MNP'lerin yüzey merkezli kübik ters spinel kristal yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. $\text{Fe}(\text{acac})_3$ öncül molekülü kullanıldığında kübik kristal örgüye sahip NP'ler elde edildiği bilinmektedir (Sheng-Nan *et al.* 2014). Kristal boyutun hesaplanması için gereken FWHM değeri hesaplanırken $2\theta = 35,68^\circ$ açısında gözlenen (311) majör pik (Şekil 4.2) baz alınmıştır. Debye-Scherrer denklemi kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda kristal boyut 2,14 nm olarak bulunmuştur.

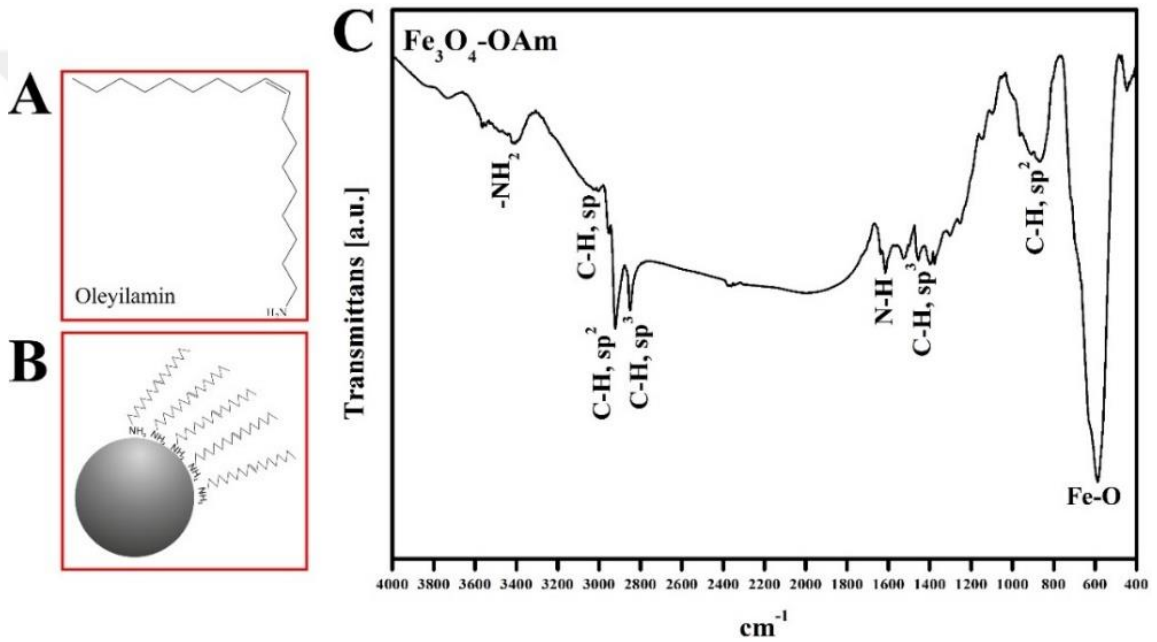


Şekil 4.2. Fe_3O_4 MNP'lerinin XRD kırınım deseni

XRD analizi sonucunda elde edilen pikler çeşitli makale sonuçları ile kıyaslanmıştır (Cui *et al.* 2014; Metin *et al.* 2014; S. Sun *et al.* 2004). Piklerden anlaşıldığı üzere, hazırlanan MNP'ler sadece manyetit içermektedir, diğer demir oksitleri ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ veya $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) barındırmamaktadır. Buna ilaveten hekzan-MNP solüsyonunun siyah olması ve solüsyonda kırmızı ya da kahverengi yansımaların olmaması, üretilmiş parçacıkların sadece manyetitten oluştuğunu göstermektedir (Chicea *et al.* 2012).

MNP yüzeyinin kimyasal yapısının karakterizasyonu FTIR ile yapılmıştır. Fe_3O_4 MNP'lerine ait IR spektrumunda görülen 3412 ve 1577 cm^{-1} pikleri oleyilaminin -NH_2 gruplarını belirtmektedir (Şekil 4.3). Yang ve arkadaşları bu pikleri 3406 ve 1596 cm^{-1} 'de görmüşlerdir (H.-M. Yang *et al.* 2009). 3014 , 2922 ve 2850 cm^{-1} 'deki yoğun absorpsiyon bantları, oleyilaminde bulunan -CH_2 ve -CH_3 gruplarının -C-H titreşimlerini belirtmektedir (Xu *et al.* 2009; H.-M. Yang *et al.* 2009). Xu ve arkadaşları, çalışmamızda gözlenen, $1330\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikin oleyilamin yapısında bulunan -NH_2 grubundan kaynaklandığını belirtmiştir (Xu *et al.* 2009). 1451 ve 1402 cm^{-1} 'deki pikler asimetrik ve simetrik -CH_3 'den kaynaklanan titreşimleri göstermektedir (H.-M. Yang *et al.* 2009). Son olarak, Fe_3O_4 MNP'lerde oktahedral demir iyonu ile oksijen

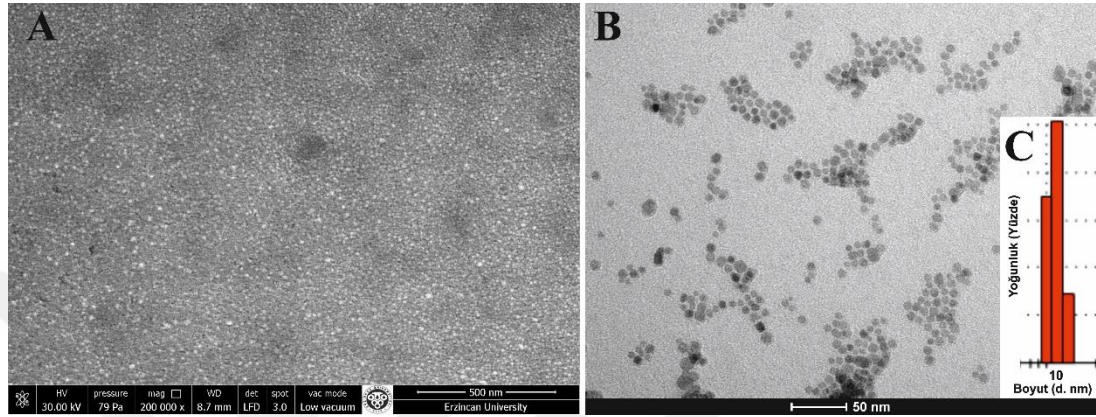
kompleksinin neden olduğu güçlü emilimi, 587cm^{-1} 'deki pik ile görmekteyiz (Sharma *et al.* 2015; Xu *et al.* 2009). Andrade ve arkadaşlarının çalışmasına göre, ters spinal yapı FTIR spektrumunda $550\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ 'de pik vermektedir (Andrade *et al.* 2009). Buna göre sonuçlarımızda gözlemlediğimiz 587 cm^{-1} piki, oluşan yapının manyetit olduğunu kesinleştirmektedir. Bununla birlikte 417 cm^{-1} dolaylarında Fe-O deformasyonunu gösteren pik bulunmaktadır (Xu *et al.* 2009). Tüm bu bulgular, oleyilamin kaplı manyetitin varlığını göstermektedir.



Şekil 4.3. (A) Oleyilamin (B) Oleyilamin bağlı Fe₃O₄ MNP (C) Oleyilamin bağlı Fe₃O₄ MNP'nin FTIR spektrumu

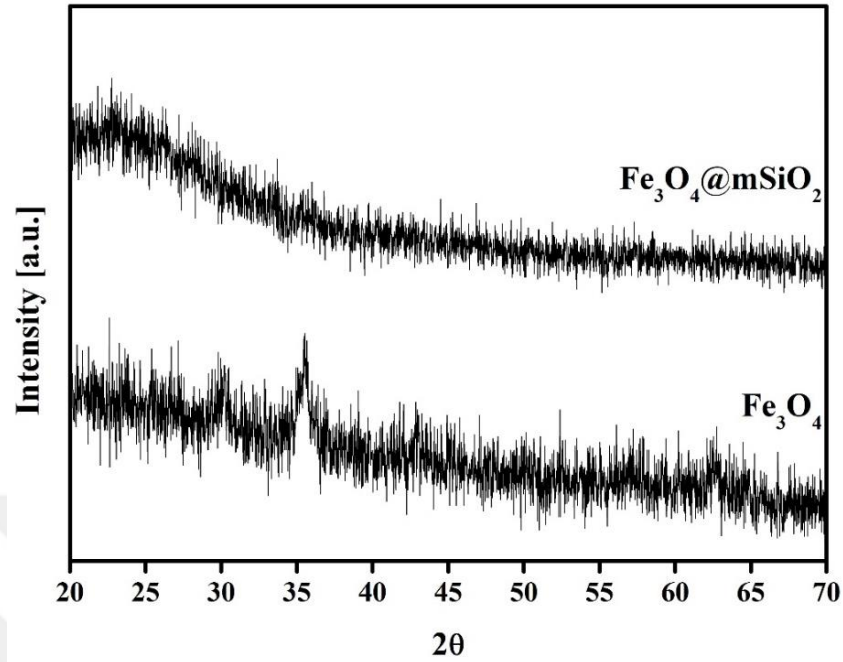
Hazırlanan örneklerin yapısal analizi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi Fe₃O₄ MNP'leri monodisperstir ve ortalama 10 nm boyutlarındadır. TEM sonuçlarında manyetitin hekzagonal şekle sahip olduğu gözlenmiştir. Sentez koşullarına bağlı olarak hekzagonal şekilli manyetitler kübik kristal örgüye sahip olabilir (Eom *et al.* 2016). Fe₃O₄ MNP'lerin hidrodinamik boyutlarını (R_h) belirten dinamik ışık saçılması (DLS) sonuçlarına göre Fe₃O₄ MNP'leri, monodispers boyut dağılımına sahiptir (Şekil 4.4). Buna göre Fe₃O₄ MNP'lerinin R_h dağılımı 8-11 nm (Şekil 4.4) arasındadır. Zeta potansiyeli olarak tanımlanan yüzey yükü -39,5 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Bu

değer, parçacıkların hekzan içerisinde kararlı olduğunu ve iyi dağılıma sahip olduklarını göstermektedir. Polidispersite indeksi (PDI) ise 0,347 olarak gözlenmiştir. Böylece parçacıkların monodispers dağılıma sahip olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 4.4. Fe₃O₄ MNP'lerinin (A) SEM ve (B) TEM görüntüsü. (C) Fe₃O₄ MNP'lerin hidrodinamik boyut (Rh) dağılımı

Sol-gel yöntemi ile yapılan silika kaplama işleminin ardından Fe₃O₄@nSiO₂ MNP'ler, kalsinasyon işlemine tabi tutulmuştur. Kalsinasyon işlemi, silika kaplamadan CTAB'i uzaklaştırarak mezoporoz yapının (Fe₃O₄@mSiO₂) oluşmasını sağlamaktadır. Çalışmamızda kalsinasyon sonunda 320 mg Fe₃O₄@mSiO₂ MNP elde edilmiştir. Hazırlanan Fe₃O₄@mSiO₂ MNP'ler suda çok iyi dağılmaktadır (Şekil 4.1). XRD analiz sonuçlarında gözlenen 20-30° (2θ=21,8°) yayvan pik (Şekil 4.5) amorf silika yapısına aittir (Cui *et al.* 2014; Han *et al.* 2016; Jiang *et al.* 2016). Silika kaplamanın etkisi ile Fe₃O₄ MNP'lere ait karakteristik pik yoğunluklarında azalma gözlenmiştir.

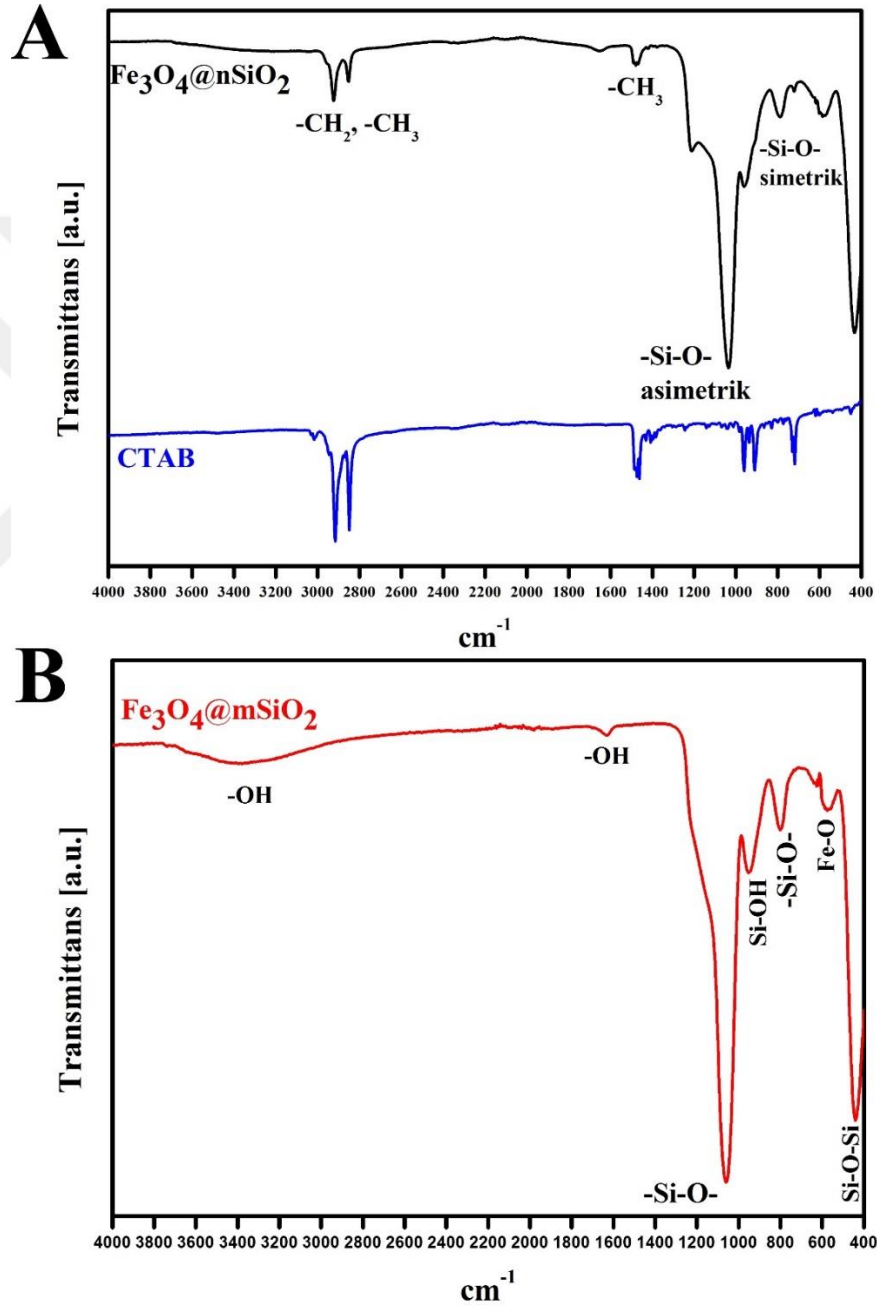


Şekil 4.5. $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ MNP'lerinin XRD kırınım deseni

Şekil 4.6'da sunulan IR spektrumunda, silika kaplı parçacıkların suda dağılmasını kolaylaştıran $-\text{OH}$ absorpsiyonu $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde hafif yayvan bir pik olarak görülmektedir. Yine 1630 cm^{-1} civarında görülen pik, parçacıkların hidrofilik silanol (SiO-H) içeren yüzeye sahip olduğunu göstermektedir (Möller *et al.* 2007). Andrade ve arkadaşları, 1080 , 800 ve 460 cm^{-1} 'de IR bantlarının $-\text{Si-O-Si-}$ bağına ait olduğunu belirtmiştir (Andrade *et al.* 2009). Jiang ve arkadaşları ise $-\text{Si-O-Si-}$ yapısının absorpsiyon bantlarını 1032 ve 778 cm^{-1} 'de gözlemlemiştir (Jiang *et al.* 2016). Xiaodong Liu, $-\text{Si-O-Si-}$ bağlarını 800 ve $1100\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler olarak belirtmiştir (Xiaodong Liu *et al.* 2015). Bizim sonuçlarımızda da (Şekil 4.6) 1221 ve 1041 cm^{-1} ile 788 cm^{-1} ve 433 cm^{-1} pikleri simetrik ve asimetrik $-\text{Si-O-Si-}$ bağlarını belirttiği düşünülmektedir.

Andrade'nin 960 cm^{-1} 'de, Xiaodong Liu'nin ise 961 cm^{-1} 'de gördüğü $-\text{Si-OH}$ absorpsiyon piki çalışmamızda 962 cm^{-1} 'de görülmüştür (Andrade *et al.* 2009; Xiaodong Liu *et al.* 2015). Bu omuz, $-\text{Fe-O}$ titreşimi ile $-\text{Si-O-H}$ geriliminin birleşimiyle oluşmaktadır (Andrade *et al.* 2009). Kalsinasyon işlemi $-\text{Si-OH}$ gruplarında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.6-B). Ancak kalsinasyon ciddi bir yapısal bozulmaya

neden olmamaktadır (Kumar *et al.* 2006; Liberman *et al.* 2014). Neticede, Şekil 4.6-A'da sunulan IR spektrum sonuçları literatürle uyumlu olup, çekirdek-kabuk yapısının elde edildiğini ortaya koymuştur (Andrade *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2016; Xiaodong Liu *et al.* 2015; H.-M. Yang *et al.* 2009).



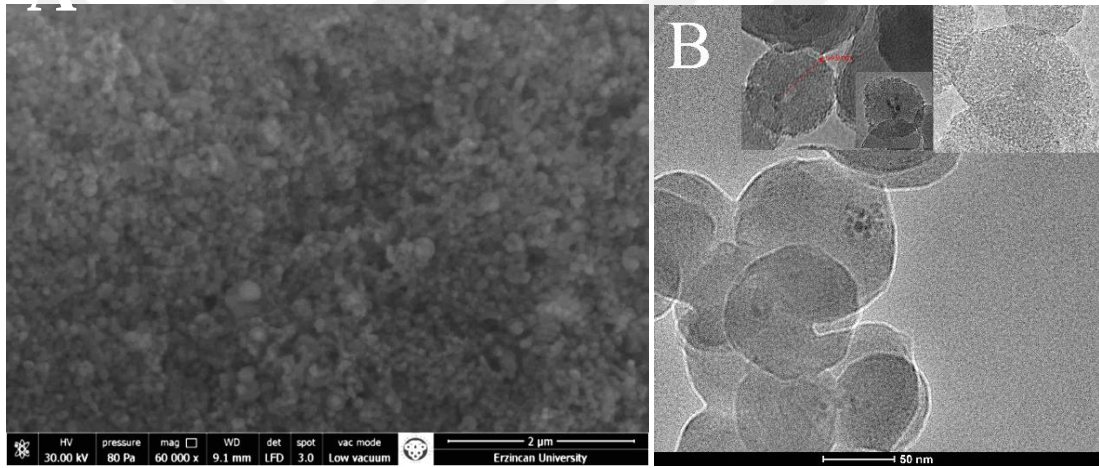
Şekil 4.6. (A) Silika kaplama ve (B) Kalsinasyonla CTAB'in çıkarıldığını gösteren FTIR sonuçları

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{nSiO}_2$ MNP'lerden CTAB çıkarılarak gözenekli $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'ler hazırlanmıştır (Şekil 3.5 ve Şekil 4.6-B). Kalsinasyon işleminde çok yüksek sıcaklığa çıkılmasına rağmen bu süreçte inorganik gruplarda ciddi bir değişim olmamaktadır (Kumar *et al.* 2006). Ayrıca kalsinasyon işlemi mezogözenekli silika nanoparçacıkların (MSP) biyo-uyumluluğunu artırarak toksisitesini düşürmektedir (Lieberman *et al.* 2014). Çünkü MSP'ler silanol grupları nedeniyle hücreler için toksiktir ve kalsinasyon sonucunda silanol grupları parçacık yüzeyinde azalır.

Başlangıçta MNP'lerin oleyilamin kaplı olarak hazırlanması silika kaplama ve gözenek formun oluşmasına yardımcı olmaktadır. Oleyilamin, $-\text{NH}_2$ gruplarıyla parçacık yüzeyiyle temas halindedir. Bu etkileşim çok zayıftır. Kloroform varlığında oleyilamin kolayca parçacık yüzeyinden kopmaktadır (Sheng-Nan *et al.* 2014). Parçacıkların organik fazdan su fazına geçişi, parçacık yüzeyinde tutunmuş olan hidrofobik zincirin (oleylamin) hidrokarbonları ve CTAB arasındaki Van der Waals etkileşimi ile gerçekleşir (Suteewong *et al.* 2010; J. Zhang *et al.* 2011). Daha sonraki adımlarda CTAB'in uzaklaştırılması ile son derece düzenli mezogözenekli yapılar elde edilmektedir. CTAB'in başarılı bir şekilde uzaklaştırılması hem düzenli gözenek yapılarının elde edilmesini sağlar hem de taşıyıcı sistemin sitotoksik etkisini azaltması açısından gereklidir. Tamamen uzaklaştırılmadığı takdirde, CTAB hücreler üzerinde belli bir toksik etki oluşturmaktadır (He and Shi 2011). Elde edilen FTIR sonuçlarına dayanarak, CTAB yapısında bulunan metilen zincirinin geriliminden kaynaklı 2923 ve 2855 cm^{-1} 'deki piklerin (Şekil 4.6-B) kalsinasyon sonrası yok olması, CTAB molekülünün yapıdan başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını gösterir (Yin *et al.* 2016). FTIR spektrumunda, kaplamanın etkisi ile Fe-O kaynaklı pik şiddetinin azaldığı gözlenmiştir. Kalsinasyon sonunda hızlı soğutma yapıldığı zaman, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ parçacıklarının suda dağılmadığı, topaklanıp çöktüğü gözlenmiştir. Ancak yavaş soğutma işlemi neticesinde elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin suda dağılımı yeterince iyidir.

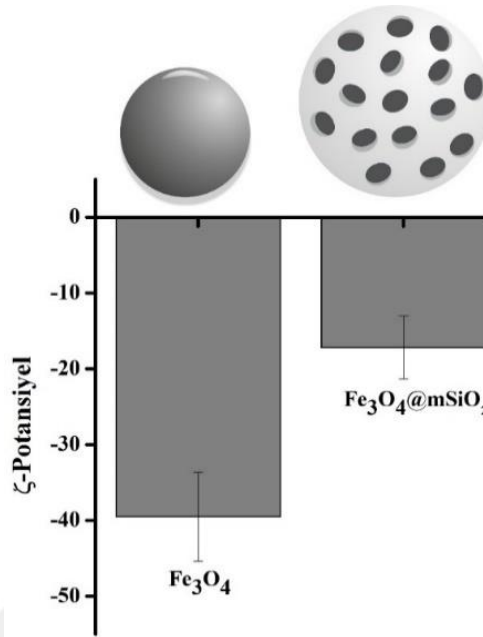
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin morfolojileri Şekil 4.7'deki SEM görüntülerinde görüldüğü üzere küresel ve monodispers şekildedir. Silika kaplama sonucunda elde edilen

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin silika kalınlığı ve gözenek oluşumu TEM ile belirlenmiştir. Hui ve arkadaşları, silika kabuk kalınlığının reaksiyon süresi ve ilave edilen TEOS miktarına bağlı, ancak Fe_3O_4 MNP konsantrasyonundan bağımsız olduğunu ortaya koymuşlardır (Hui *et al.* 2011). Şekil 4.7'de, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin silika kalınlığının ~50 nm, parçacık boyutlarının ise ~100 nm olduğu görülmektedir. Hui ve arkadaşları 1 mg/mL Fe_3O_4 MNP kullandığında silika kaplamada birden fazla çekirdek yapısı gözlemişlerdir (Hui *et al.* 2011). TEM sonuçları, sentezlediğimiz bazı NP'lerin manyetik çekirdek içermediğini bazılarının birden fazla veya tekli çekirdek yapısına sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin (A) SEM ve (B) TEM görüntüleri

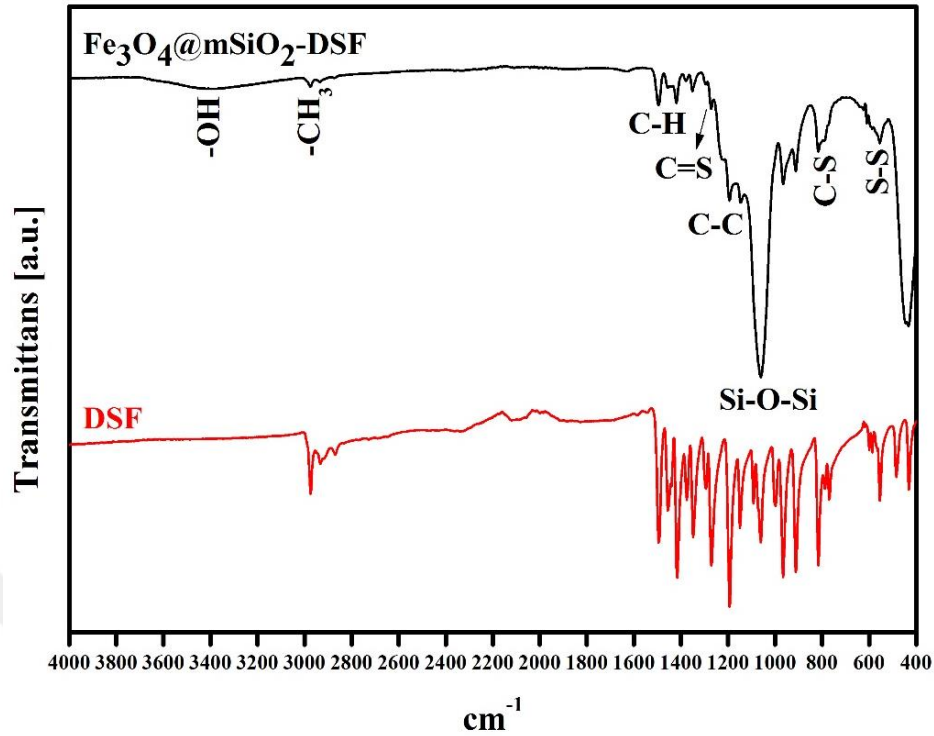
Zetapotansiyel ölçümleri ile gözenekli silika kaplanmış nanoparçacıkların negatif yüzeye sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Fe₃O₄ ve Fe₃O₄@mSiO₂ MNP'lere ait zeta potansiyel ölçümü

Gözenekli parçacıkların DSF ile karıştırılması sırasında DSF ve silika arasında zayıf hidrojen bağı kurulmaktadır (Jing *et al.* 2014). Bu etkileşimler neticesinde hidrofobik olan DSF, hidrofobik karakterli gözeneklere yerleşmektedir. Yapılan bir çalışma, suda çözülerek hazırlanan DSF çözeltisinin 6 ve 96 saat sonra DSF miktarını sırasıyla %43 ve %10 olarak belirlemiştir (Song, Tang, Lei, *et al.* 2016). Bu tez çalışması sürecinde metanolde çözülen DSF'in aylar sonra bile çok büyük oranda bozulmadan kaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle DSF yükleme işlemi metanol ortamında yapılmıştır.

Şekil 4.9'da sunulan IR spektrumunda görüleceği üzere, DSF'ye ait -S-S- geriliminden kaynaklanan 554-666 cm⁻¹ piki (Mahendra Kumar Trivedi 2015) Fe₃O₄@mSiO₂ MNP'lerinde görülmezken, bu pik DSF yüklendikten sonra görülmektedir. C=S gerilimi ise 1270 cm⁻¹ civarında pik vermiştir (Mahendra Kumar Trivedi 2015). Fe₃O₄@mSiO₂ MNP'lerde olmadığı halde, DSF yapısında görülen 2972 cm⁻¹ piki Fe₃O₄@mSiO₂-DSF MNP'lerde görülmektedir (Şekil 4.9). Bunun yanında silika kaplı parçacıklarda gözlenen Si-OH pikinde, ilaç yükleme işleminden sonra, DSF ile yaptığı hidrojen bağı nedeniyle çok az bir kayma gözlenmiştir (Jing *et al.* 2014).



Şekil 4.9. İlaç (DSF) ve ilaç yüklenmiş taşıyıcı sisteme ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}$) ait FTIR sonucu

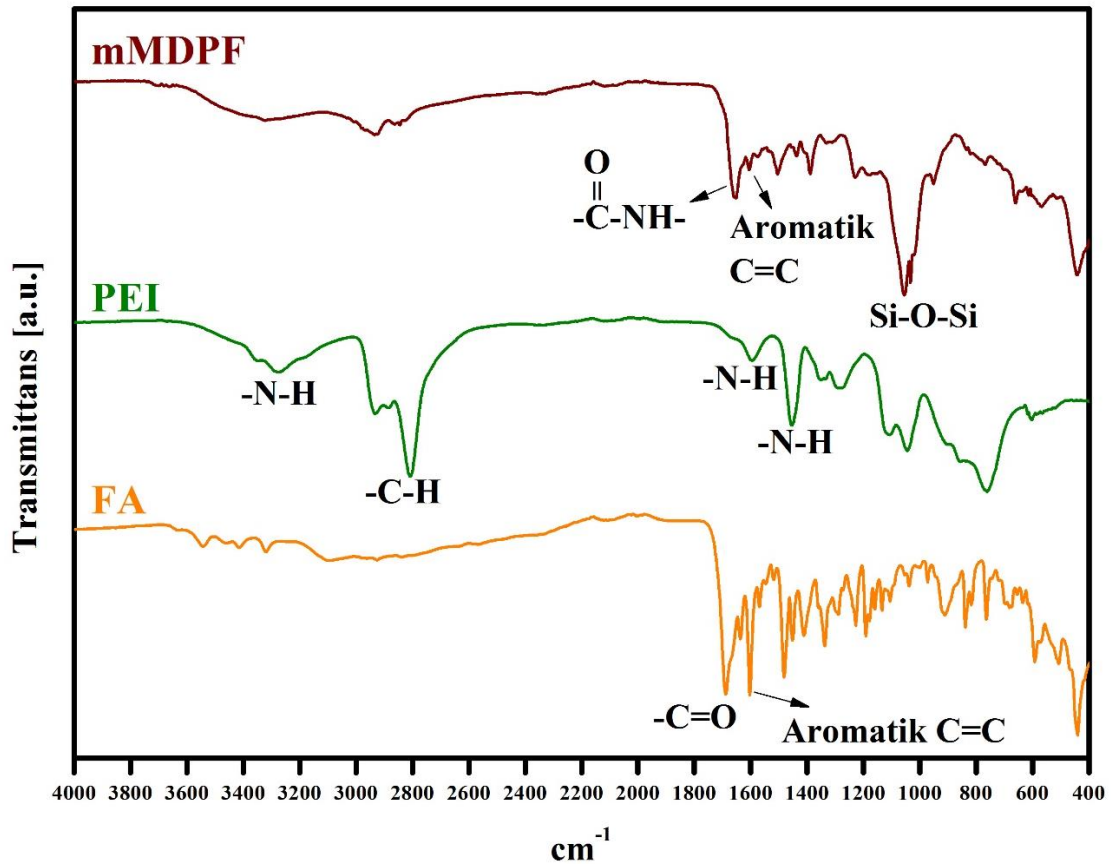
Hazırlanmış olan $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}$ yapısı negatif yüklüdür ve suda çözünürlüğü düşüktür. Biyolojik çalışmalarda suda çözünürlük ilacın taşınması için çok önemlidir. Ayrıca parçacıkların negatif yükü, sistemin hücre zarından geçişini ve hedefe ulaşmasını zorlaştıracaktır. Bir çok çalışmada parçacıkların yüzeyi amin grubu içeren moleküllerle (APTES, PEI gibi) modifiye edilerek sudaki dağılım artırılmıştır. Mezogözenekli yapıların pozitif yüklü yüzeye sahip olmaları, ilaç salımını da desteklemektedir (He and Shi 2011). Ayrıca gözenekli yapının elde edilmesinde tercih ettiğimiz kalsinasyon işlemi silanol gruplarında azalmaya neden oluğu için hidrofobikliği artırmaktadır. Bu durum taşıyıcı sistemin endositoz ile alımını azalmaktadır (He and Shi 2011). Çalışmamızda ilaç yüklü taşıyıcı sistemin hücrelerce kolay bir şekilde alınması, sistemin suda çözünürlüğünün artırılması hem de yüzeye pozitif yük sağlaması açısından ilaç yüklü nanoparçacıklar biyo-uyumu artıran, pozitif yüklü PEI ile kaplanmıştır (Cai *et al.* 2013). PEI molekülü, pozitif yüklerinin elektrostatik itmesi ile stabilizasyon ajanı olarak iş görmektedir.

PEI kaplama işleminde PEI:NP oranı ilaç salım hızını ve miktarını etkilemektedir. Ayrıca PEI'nın yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Han ve arkadaşları en iyi kaplama oranının 0,5:1 olduğunu belirtmiştir (Han *et al.* 2016). Yine bu çalışmada PEI miktarının artması ile ilaç salımının yavaşladığı belirtilmiştir. Kullandığımız metotta PEI, folik asite (FA) kovalent olarak bağlı halde (PEI-FA) MNP'lere uygulanmaktadır. Yaptığımız ön çalışmalarda, 0,5:1 PEI-FA:MNP oranı kullanıldığında parçacıkların suda dağılımının istenilen düzeyde olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle PEI-FA:MNP oranı çalışmamız süresince 1:1 olarak tutulmuştur.

PEI'nın FA ile modifiye edilmesi taşıyıcı sistemin kanser hücreleri tarafından alımını artırmaktadır. FA reseptörü özellikle metastatik olmak üzere genel olarak tüm kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelerden çok daha fazla üretilmektedir (Parker *et al.* 2005). Eğer sadece PEI kaplanarak uygulama yapılırsa suda dağılımı iyi olan ilaç yüklü sistem, tüm hücrelerce kolayca hücre içine alınacaktır. Taşıyıcı sistemi kanser hücreleri tarafından tanınır yapmak ve sağlıklı hücreler tarafından alımını azaltmak amacıyla PEI yapısında bulunan amin grupları kullanılarak PEI-FA molekülü hazırlanmış ve ardından PEI-FA ile ilaç yüklü NP'ler kaplanmıştır (mMDPF, Fe₃O₄@mSiO₂-DSF@PEI-FA). Bu yolla kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere nispeten daha fazla ilaç alması sağlanmıştır. Bunun yanında ilaç taşıyıcı sistemin hücre içine transmembran proteinleri kullanan reseptör ilişkili endositoz ile geçişi, kargonun hücresel yıkımını önlemektedir (He and Shi 2011). FA bağlı nanoparçacıkların endositoz ile alımı bu şekildedir.

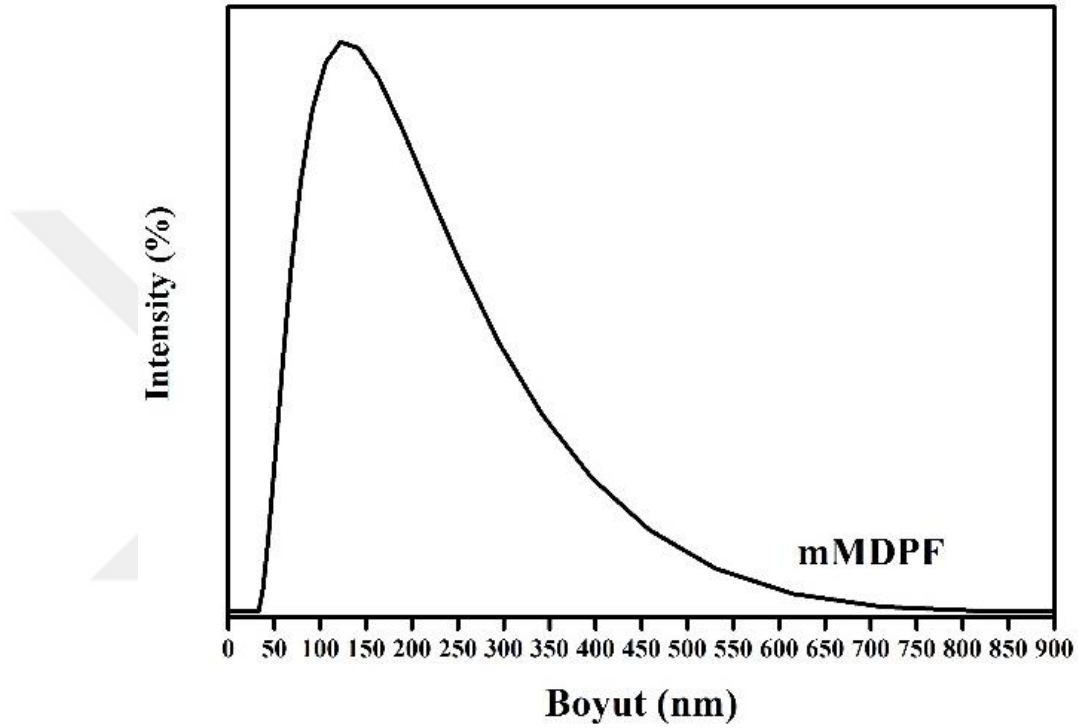
PEI-FA ile kaplanan Fe₃O₄@mSiO₂-DSF sisteminin yüzeyinde meydana gelen yeni bağlar FTIR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.10). PEI ve FA bağlanmasında DCC ve NHS kimyası kullanılmıştır. Böylece PEI'nın amit grupları ile FA'nın karboksil grupları amidasyon reaksiyonu ile bağlanmıştır (Han *et al.* 2016). Bu bağ IR spektrumunda ~1500 cm⁻¹ görülmektedir (C. Lu *et al.* 2012). PEI kaplama, -Si-O- ve -Si-OH piklerinde azalmaya neden olmaktadır (Islam *et al.* 2014). Wan ve arkadaşları -N-H amit II bağına ait titreşimi 1605 cm⁻¹'de göstermiştir (Wan *et al.* 2014).

MNP'ler negatif yüzeyle olduğu için PEI elektrostatik olarak nanoparçacık yüzeyini sarar. Bunun yanında PEI, silika kaplı NP'lere hidrojen bağı ile de bağlanır (Islam *et al.* 2014). FTIR spektrumunda gözlenen 3317 ve $\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler, PEI yapısında bulunan -NH deformasyonunu göstermektedir (Şekil 4.10). Bunun dışında, 1502 cm^{-1} 'deki pik de -N-H yapısını göstermektedir (Han *et al.* 2016; Islam *et al.* 2014). Folik asitin karboksil grubunda bulunan C=O piki 1689 cm^{-1} 'dedir. mMDPF hazırlanırken FA ve PEI arasında kurulan amit bağı (CO-NH) neticesinde bu pik 1654 cm^{-1} 'ye kaymıştır (Fasehee *et al.* 2016; Han *et al.* 2016; Zhu *et al.* 2010). Yine mMDPF yapısındaki PEI'e ait C-H titreşimlerini 2846 ve 1107 cm^{-1} 'de görmekteyiz (C. Wang *et al.* 2016). FA yapısında bulunan aromatik C=C 1606 cm^{-1} 'de, fenil halkasına ait pik ise 1483 cm^{-1} 'de görülmektedir (Fasehee *et al.* 2016; C. Wang *et al.* 2016). IR spektrumunda DMSO, THF, NHS ve DCC'ye ait piklerin görülmemesi yıkama işleminde tüm safsızlıkların uzaklaştırıldığını göstermektedir.



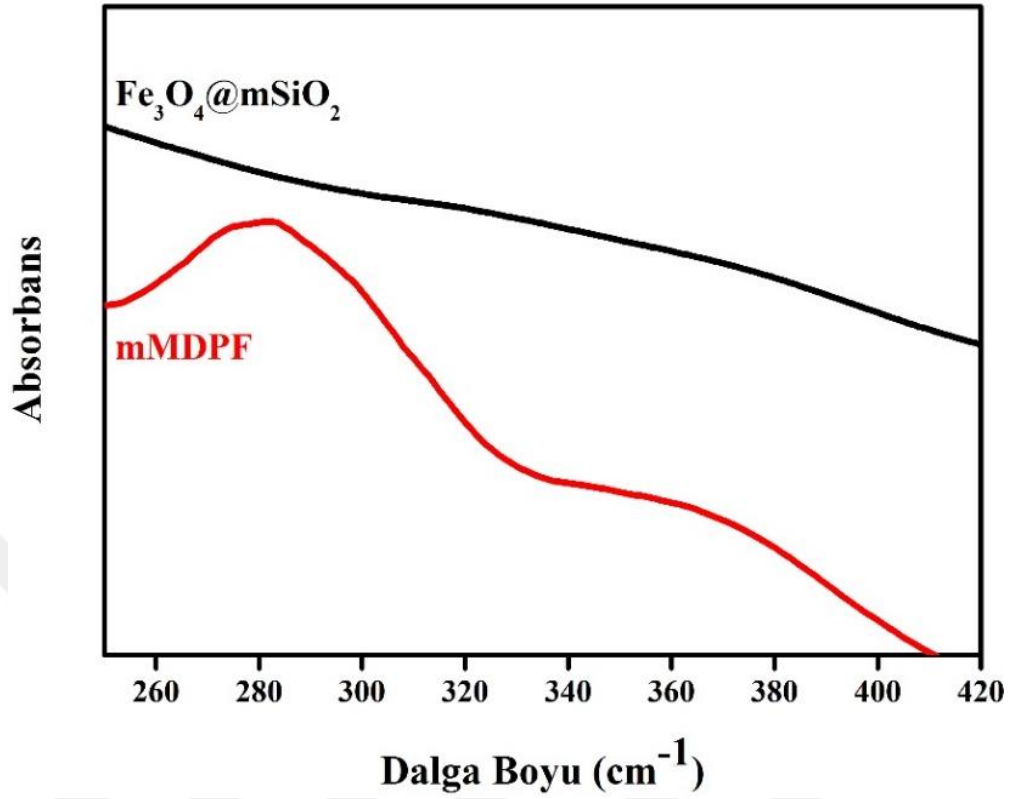
Şekil 4.10. FA, PEI ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2\text{-DSF}@PEI\text{-FA}$ (mMDPF) için IR spektrumu

İlaç taşıyıcı sistemin hücreler tarafından endositoz ile alımı için boyutun 200 nm'den küçük olması gerekmektedir (Argyo *et al.* 2014). DLS ölçümleri ile elde edilen bulgulardan ~160 nm hidrodinamik çapa (R_h) sahip mMDPF'lerin en yüksek oranda bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.11). Bu veriler TEM sonuçları ile örtüşmektedir.



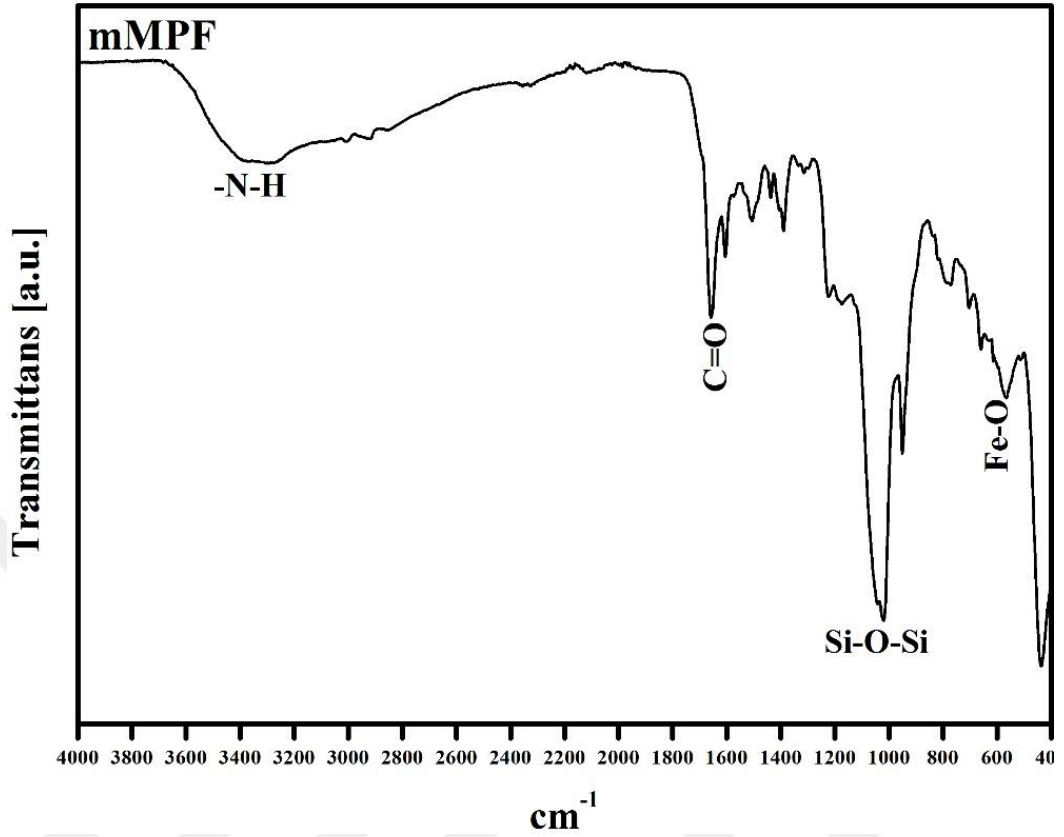
Şekil 4.11. mMDPF'in DLS analizi boyut sonuçları

UV spektrumunda yaklaşık $\lambda=280$ nm ve $\lambda=360$ nm absorpsiyon pikleri FA'nın varlığını göstermektedir (Han *et al.* 2016; X. Ma *et al.* 2013; H. Yang *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2010). Absorbans grafiğinde (Şekil 4.12) görüldüğü gibi, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerde hiçbir pik yok iken mMDPF'lerde folik asite ait absorpsiyon pikleri gözlenmiştir. Böylece, FTIR ölçüm sonuçlarıyla uyumlu olarak, folik asit modifikasyonunun başarılı olduğu doğrulanmıştır.



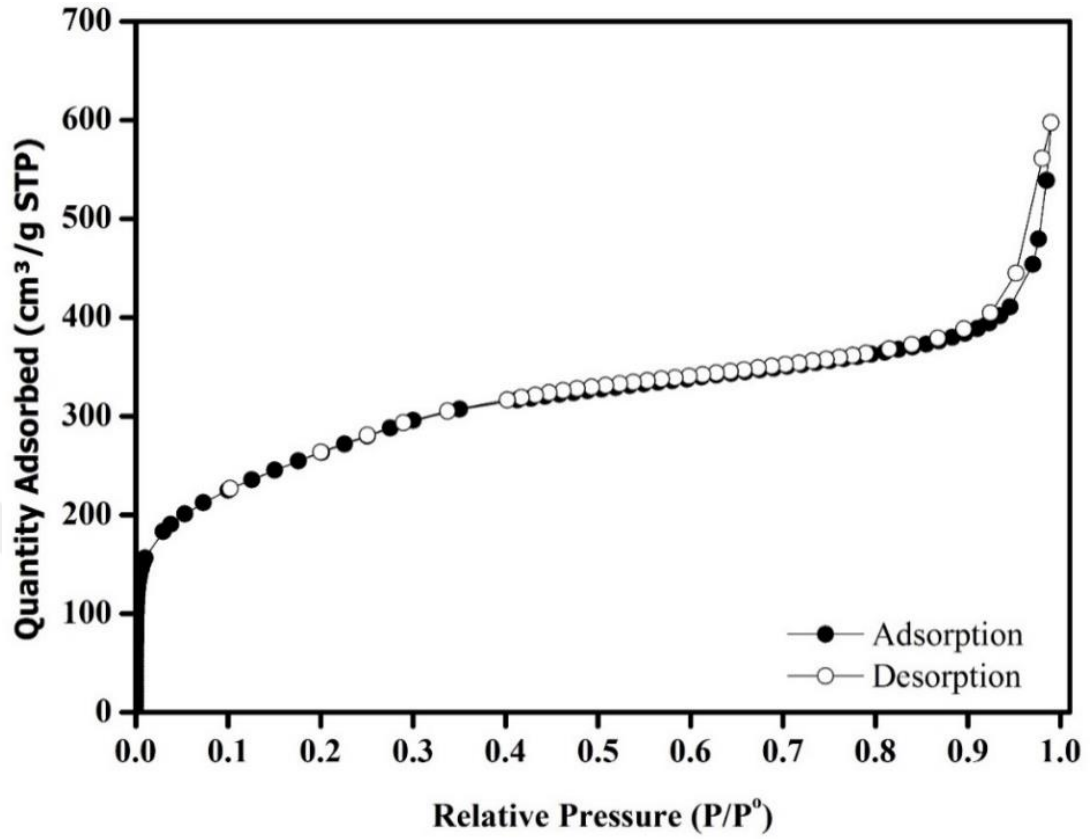
Şekil 4.12. UV spektrofotometre analizi ile FA bağlanma

In vitro çalışmalarda taşıyıcı sistemin etkisini görmek ve ilaçtan kaynaklı etkiyi gözlemleyebilmek amacıyla ilaç içermeyen boş taşıyıcı sistem (Fe₃O₄@mSiO₂@PEI-FA, mMPPF) hazırlanmıştır. mMPPF yapısı FTIR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.13).



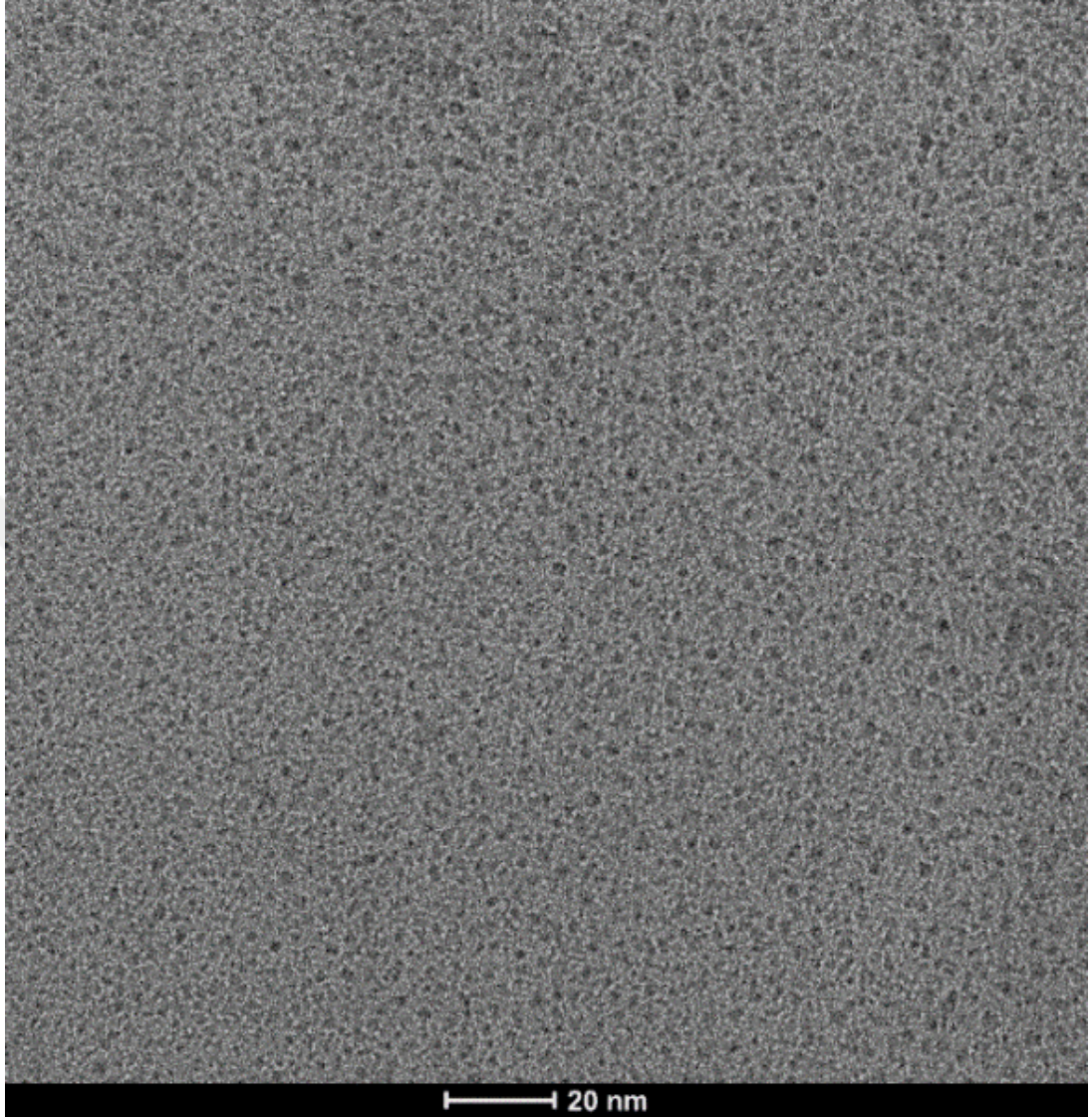
Şekil 4.13. İlaç içermeyen taşıyıcı sistem ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2@\text{PEI-FA}$, mMPF)

Hazırlanan gözenekli yapının yüzey alanını, gözenek hacmini ve gözenek boyutunu belirlemek için nitrojen adsorbsiyon-desorbsiyon tekniği kullanılmıştır. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 'ye ait BET grafiğinde (Şekil 4.14) gözlenen izoterm eğrisinden anlaşıldığı üzere üretilen materyal mezogözenekli yapı sergilemektedir. BET sonuçlarına göre $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ yapısının yüzey alanı $930,38 \text{ m}^2/\text{g}$ olup, nanoparçacıkların oldukça geniş yüzey alanına sahip oldukları görülmektedir ($P/P_0=0,275$) (Şekil 4.14). Kontrol amaçlı yapılan gözeneksiz form olan $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2$ MNP'lere ait BET ölçümünde yüzey alanı $44,40 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak belirlenmiştir. Bu bulgular ile $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin gözenekli yapıya sahip olduğu, oluşan gözenekler sayesinde yapının yüzey alanının yaklaşık 20 kat arttığı sonucuna varılmıştır. Suteewong ve arkadaşları benzer yöntemle yaptıkları sentez sonucunda $893 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzeyine sahip manyetik mezogözenekli yapılar hazırlamıştır (Suteewong *et al.* 2010).



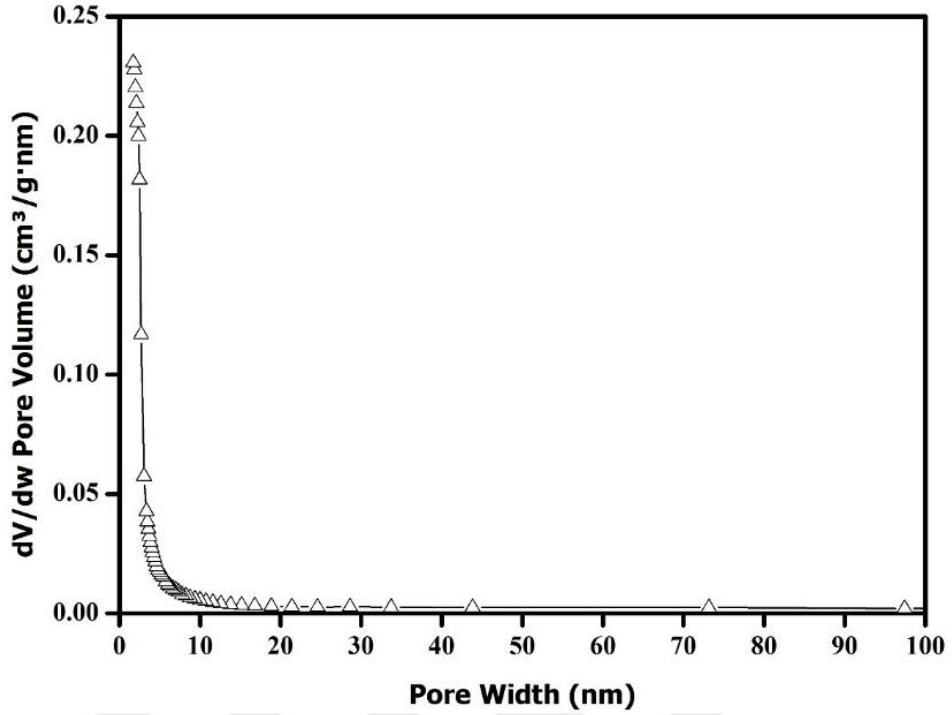
Şekil 4.14. Nitrojen adsorbsiyon-desorbsiyon analizi BET grafiği

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 'e ait BET grafiğinde (Şekil 4.14) gözlenen izoterm eğrisinde H4 tip gecikme kavisi gözlenmiştir. Böylece açık ve ulaşılabilir olan gözeneklerin kesik (slit) şeklinde olduğu anlaşılmaktadır (ALothman 2012; Suteewong *et al.* 2010). Bu sonuçlar TEM sonuçlarıyla örtüşmektedir (Şekil 4.15). Gözenekler, çok küçük kılcal kanallara sahip yapının yüzeye açılan kısmında küçük çaplarıyla (<3 nm) belirmiştir.



Şekil 4.15. mMDPF'lerin gözeneklerine ait TEM görüntüsü

BHJ analizi ile elde edilen, gözenek boyutu dağılım eğrisi sonuçlarına göre $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerinin gözenek hacmi $0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$ ve gözenek çapı $2,74 \text{ nm}$ 'dir (Şekil 4.16). Gözenek boyutu grafiğinde gözlenen dar pik (pik merkezi yaklaşık 2 nm 'de) uniform ve dar gözenek boyutuna sahip yapıların elde edildiğini göstermektedir.



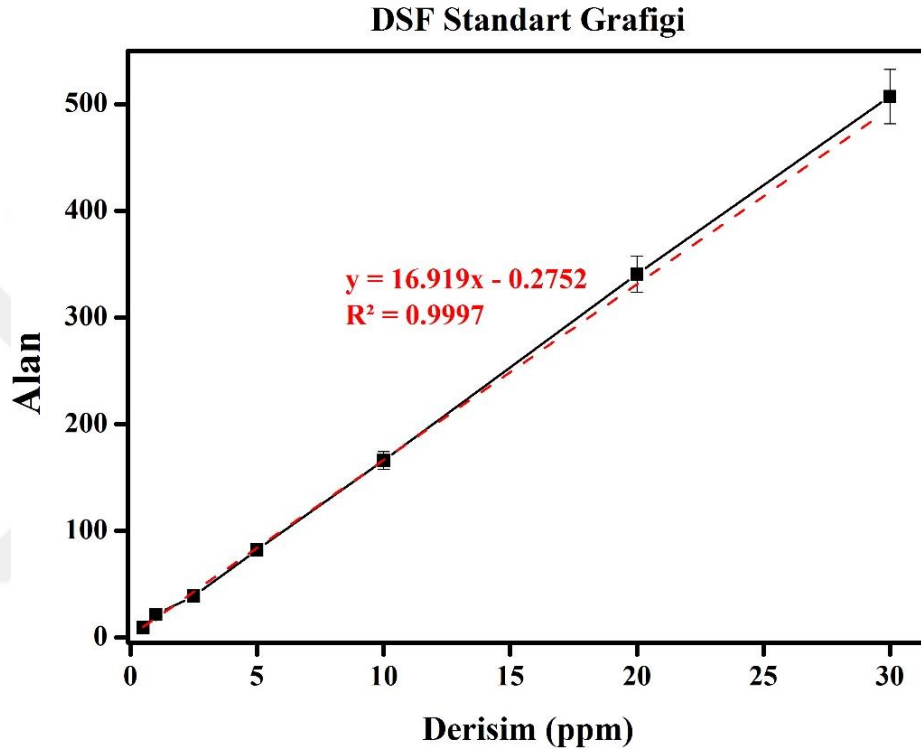
Şekil 4.16. BHJ analizi ile gözenek hacmi ve çapı

Cui ve arkadaşları elde ettikleri $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ nano yapısının yüzey alanını $642 \text{ m}^2/\text{g}$, gözenek hacmini $0,6 \text{ cm}^3/\text{g}$ ve gözenek çapı $2,8 \text{ nm}$ olarak belirtmişlerdir (Cui *et al.* 2014). Tez çalışmamızda ise elde ettiğimiz mezogözenekli yapılar oldukça geniş yüzey alanına sahiptir, gözenek boyutu küçük ve gözenek hacmi oldukça fazladır. Tüm bu bulgular hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin ideal olma özelliklerini artırmaktadır.

4.2. İlaç Yükleme Oranı

İlaç yükleme işlemi metanol ortamda yürütülmüştür. Bazı çalışmalarda DMSO ile çözülen DSF ile ilaç yükleme işlemi yapılmaktadır. Ancak DMSO uzaklaştırma sürecinde DSF de kaybedildiği için bu durum ilaç enkapsülasyon oranını düşürmektedir (Fasehee *et al.* 2016). Çalışmamızda ilaç taşıyıcı mMDPF içerisindeki DSF miktarı, HPLC ile belirlenmiştir. Metanol ile karıştırılan mMDPF'ler santrifüj edilmiş ve süpernatanttaki DSF derişimi HPLC ile ölçülmüştür. Elde edilen pikin altında kalan alan standart grafikte yerine konularak nanopartiküldeki DSF miktarı hesaplanmıştır.

Bu amaçla çalışmada öncelikle belirli miktarda DSF, metanolde çözülerek farklı derişimlerde (0-30 ppm) çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltiler HPLC ile analiz edilerek, derişim-alan grafiğı (standart grafik) çizilmiştir (Şekil 4.17). Bu grafikten elde edilen denklem kullanılarak nanoparçacıklarda kalan DSF miktarı hesaplanmıştır.



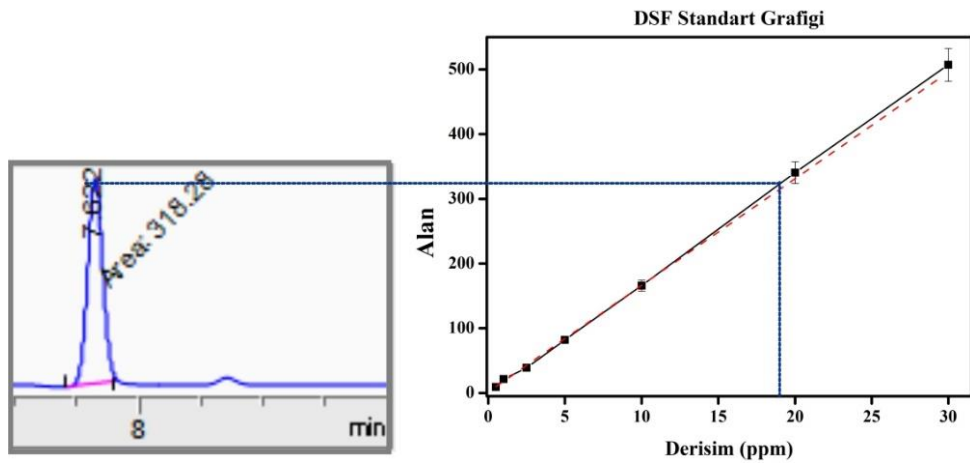
Şekil 4.17. DSF kalibrasyon eğrisi

HPLC analiz sonuçlarına göre 10 mg mMDPF $435,8 \pm 13,023 \mu\text{g}$ DSF içermektedir. Yani mMDPF'nin ilaç yükleme kapasitesi %4,35'tir ($0,0435\text{mg DSF/mg mMDPF}$, $43,5\mu\text{g DSF/mg mMDPF}$). Han ve arkadaşları manyetik mezogözenekli nanoparçacıklara ilaç yükleme oranını kütlece %1,75 olarak belirtmiştir (Han *et al.* 2016). Bir başka çalışmada mezogözenekli taşıyıcı sistemin ilaç (DOX) taşıma miktarı $16,3 \mu\text{g/mg}$ olarak verilmiştir (F.-H. Chen *et al.* 2010). Çalışmamızda gözlenen yükleme oranı, diğer DSF taşıma sistemleri ile kıyaslandığında, normal bir yükleme oranıdır (Çizelge 1.2).

4.3. İlaç Salımı

Kan dolaşımı ve normal dokulardan farklı olarak birçok katı tümör yapısının ekstraselüler çevresinde pH değeri 6,0-7,0 olarak bilinmektedir (Han *et al.* 2016). Bu değer hücre içinde, özellikle endozomal yapılarda 5-6'ya kadar düşmektedir. Bu özellik, sağlıklı ve tümörlü dokunun ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, mMDPF'in 4, 6, 7, 8, 18 ve 24 saat sonunda ilaç salım tutumu iki farklı sıcaklık ve iki farklı pH altında (sıcaklık 37°C-42°C ve pH=6,0-7,4) incelenmiştir.

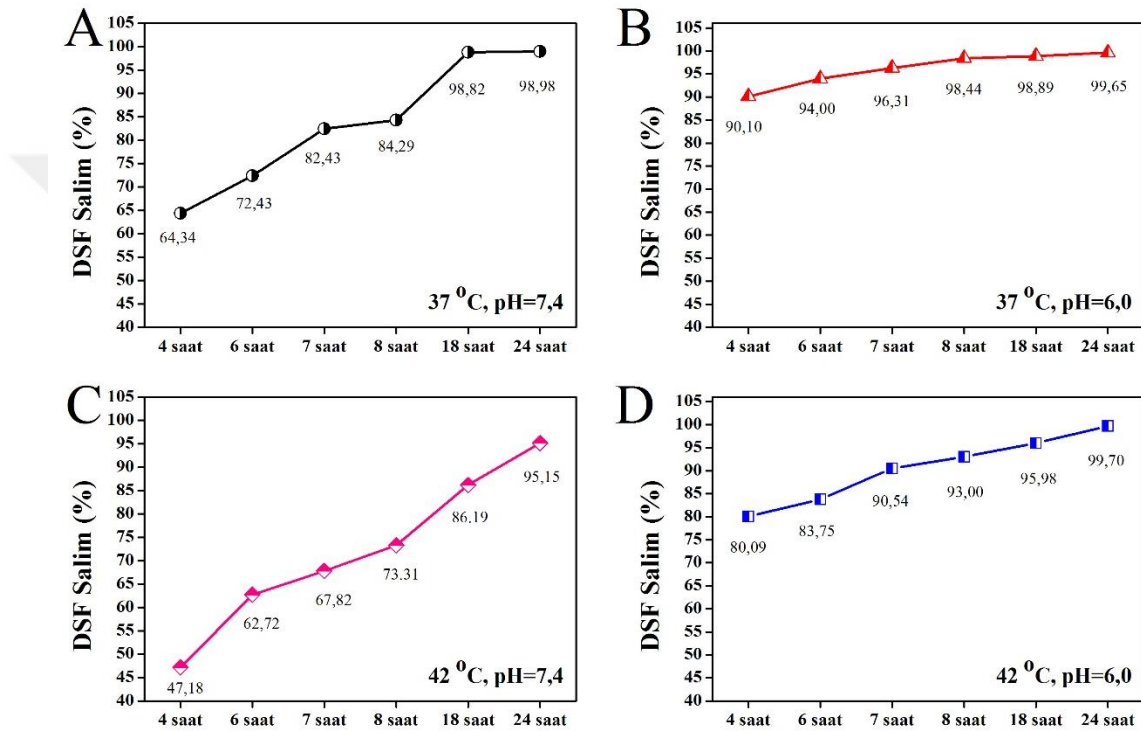
Hazırlanan örneklerden PBS ortamında salınan DSF miktarı, salım sonrası nanoparçacıklarda kalan DSF miktarının tespiti ile hesaplanmıştır. Bunun için salım süresi dolan parçacıklar çöktürülmüş ve parçacıklarda kalan DSF metanolle çözülmüştür. Metanol solüsyonları HPLC ile analiz edilmiş, elde edilen pik alanları standart grafik denkleminde yerine yazılarak salınan DSF derişimleri hesaplanmıştır (Şekil 4.18). Süpernatantlardan ölçülen DSF miktarları, kontrol grubu DSF miktarından çıkarılarak salınan DSF miktarı hesaplanmış ve salım grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.19). Kontrol grubu olarak PBS ile muamele edilmeyen mMDPF yapılar kullanılmıştır.



Şekil 4.18. Salım örneklerinden elde edilen kromatogramlara ait pik alanlarının kalibrasyon eğrisinde yerine konulması

Elde edilen bulgulara dayanarak pH=7,4'te ve 37°C'de ilaç salımı nispeten yavaştır (4 saat sonra salım oranı %64,34 olarak tespit edilmiştir). Ancak pH=6 ve 37°C'de 4 saat

sonunda ilaç salım oranı %90,1 olarak belirlenmiştir. Benzer durum 42°C'deki pH 6,0 ve 7,4 altındaki ölçümler için de geçerlidir. Asidik ortamda daha hızlı ilaç salımı PEI'nin kapı görevi gördüğünü ve kontrollü ilaç salımına neden olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda pH=6,0'da her iki sıcaklıkta da daha hızlı ilaç salımı gözlenmiştir.



Şekil 4.19. mMDPF sisteminin DSF salım kinetiği

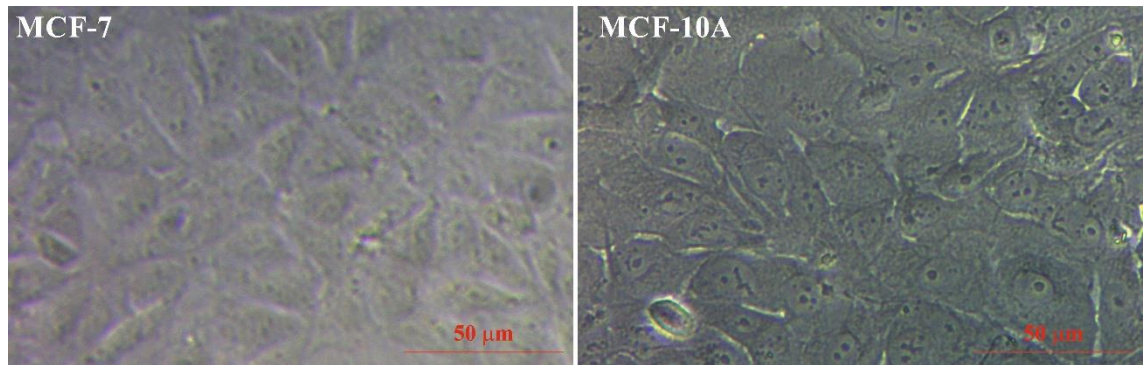
Duan ve arkadaşları pH 7,4'de polimerik misel ile taşıdıkları DSF'nin 12 saat içerisinde %70,2'sinin salındığını belirtmiştir (X. Duan *et al.* 2013). mPEG-PLGA/PCL ile DSF aktarımı yapıldığı çalışmada, Song ve ekibi 24 saat sonra DSF'in %70'inin hala taşıyıcı sistemde olduğunu ve yapısının bozulmadığını belirtmiştir (Song, Tang, Lei, *et al.* 2016). Wan ve arkadaşları PEI-FA ile modifiye ettikleri paklitaksel (PTX) taşıyan mezogözenekli taşıyıcı sistemin ilaç salım oranlarını %30,86, %56,35 ve %81,90 (sırasıyla pH=7,4, pH=6,5 ve pH=5,0 için) olarak belirlemişlerdir (Wan *et al.* 2014). Han ve arkadaşları 1:1 oranında PEI-FA ile kapladıkları manyetik mezogözenekli taşıyıcı sistemden ilaç salım oranının düşük pH'da daha hızlı ve yüksek olduğunu (5

saat sonra pH=4'te yaklaşık %65) belirtmiştir (Han *et al.* 2016). Najlah ve arkadaşları farklı oranlarda polimer kullanarak hazırladıkları DSF taşıyan sistemden ilaç salım oranlarının 4 saat sonunda %30-90 arasında değiştiğini göstermiştir (Najlah *et al.* 2016).

DSF, MDR denilen ilaç direncinden sorumlu olan P-gp'i hızlıca inaktive etmektedir (X. Duan *et al.* 2013). Hızlıca DSF salımı sayesinde bloke olan efluks mekanizması nedeniyle hücreler aldıkları mMDPF'leri hücre dışına atamadığından ilaç salımı hücre içinde devam edecektir. Tez çalışmamızda mMDPF'lerin manyetik özellikleri kullanılmış ve hücrelerin mMDPF ile muamelesinin ardından hücre kültür kabının alt yüzeyine mıknatıs tutulmuştur. Böylece hücresel alım hızlandırılmak suretiyle, salınan ilacın hücre içinde daha hızlı bir şekilde konsantre olması sağlanmıştır.

4.4. In vitro Deneyler

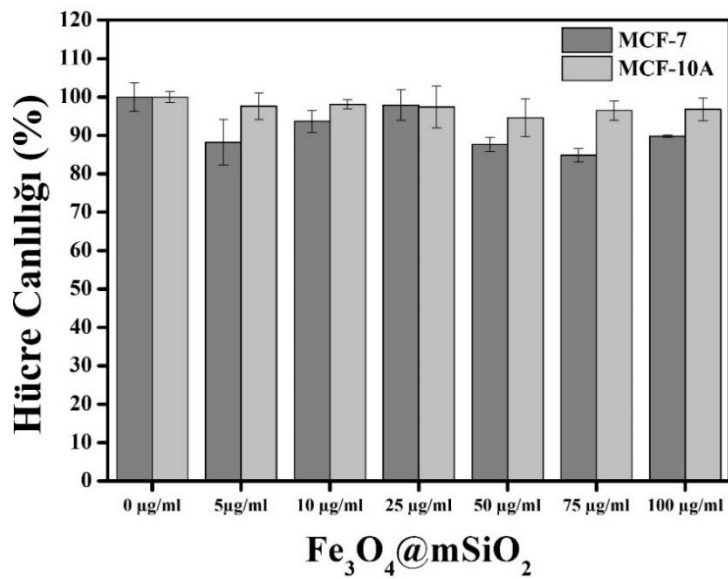
Çalışmamızda östrojen bağımsız MCF-7 meme kanseri hücresi ve non-tümörejenik olan MCF-10A ölümsüz meme epitel hücresi kullanılmıştır. Hücre morfolojileri her adımda kontrol edilmiş ve morfolojiyi değiştirecek etkilerin olmadığından emin olunmuştur (Şekil 4.20). Tryphan blue canlılık testine göre canlılık yüzdesi %95 ve üzeri olan hücrelere uygulama yapılmıştır.



Şekil 4.20. Çalışılan hücre hatlarının morfolojik kontrolü
40X büyütme

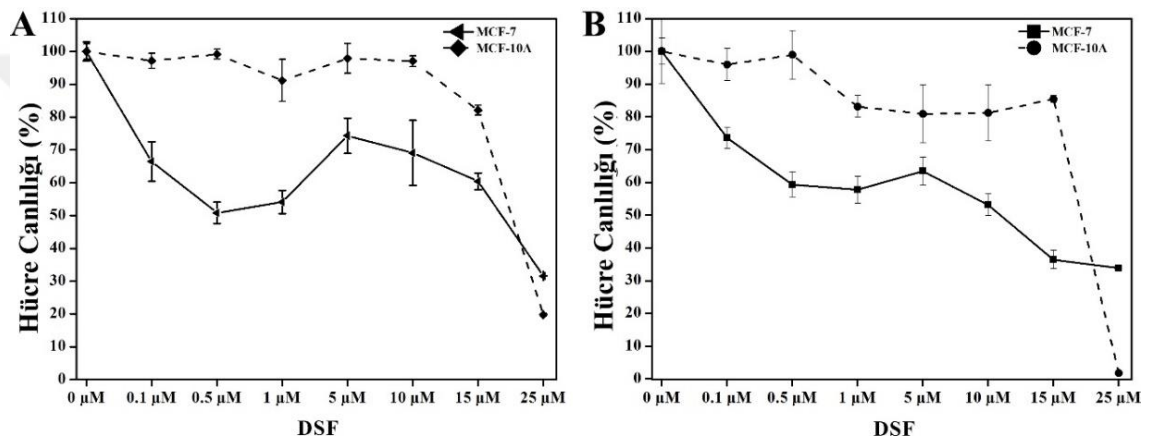
Uygulama çalışmalarına geçmeden önce kullanılacak grupların uygulama dozları belirlenmiştir. Bunun için MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine disülfiram, CuCl_2 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ ve sodyum nitropurisit (SNP)'in farklı dozlarda uygulaması yapılmış, 24 ve/veya 48 saatlik toksik etkileri ayrı ayrı belirlenmiştir.

Normalde mezogözenekli nanoparçacıklar 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon altında toksik özellik göstermezler (Liberman *et al.* 2014). Ancak mezogözenekli nanoparçacıklar bu değerin üstünde farklı hücre hatlarında farklı etkiler gösterir. MSP'lerin toksik özelliği konsantrasyon dışında parçacık boyutu ile de ilişkilidir (Wei *et al.* 2016). 500 $\mu\text{g/mL}$ altın kaplı $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP uygulanmış HeLa hücre hattında 48 saat sonra %80'den fazla canlılık gözlenmiştir (Cui *et al.* 2014). Başka bir çalışmada ise 80 $\mu\text{g/mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP, MCF-7 hücrelerinde sadece %10'luk toksik etki göstermiştir (Li *et al.* 2015). Tez çalışmamızda hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin meme epitel ve meme kanseri hücre hatlarında düşük düzeyde toksisite gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.21). 48 saat sonunda 75 $\mu\text{g/mL}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP uygulanmış MFC-7 hücrelerinde canlılık yaklaşık %84, MCF-10A hücrelerinde ise %96 olarak gözlenmiştir. Bu bulgular, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ MNP'lerin düşük toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.21. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ toksisitesi (0-100 $\mu\text{g/mL}$) uygulamasının 48 saatte hücreler üzerindeki etkisi

MCF-10A hücre hattında yüksek dozda (25 μ M) etkili olan DSF, MCF-7 hücre hatlarında düşük dozlarda bile etki göstermiştir (Şekil 4.22). Bu durum DSF'in kanser seçici toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. 48 saat sonunda 1 μ M DSF'in MCF-7 hücrelerinde canlılık oranı %54 olarak gözlenmiştir. Faasehee ve arkadaşları ise 500 nM DSF uygulanmış MCF-7 hücrelerinde 24 saat sonra canlılığı %68 olarak belirlemiştir (Fasehee *et al.* 2016). Kontrol hücrelerimiz olan MCF-10A'da, 48 saat sonunda 15 μ M DSF uygulamasında bile canlılık %82'dir.



Şekil 4.22. DSF için MTS canlılık testi.

DSF (0-25 μ M) uygulamasının (A) 24 ve (B) 48 saatte MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki toksik etkisi

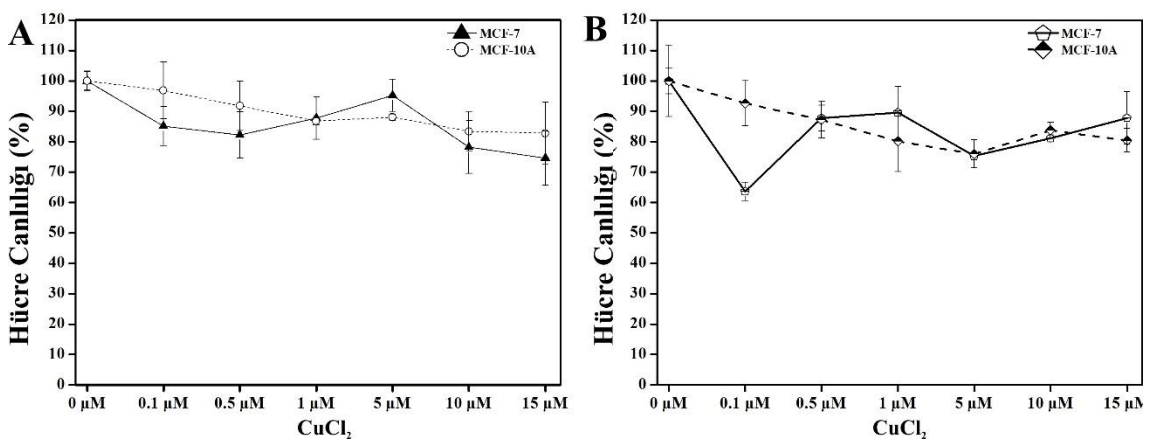
Doz bağımlı MTS sonuçları kullanılarak, DSF'in hücreler üzerindeki etkisini karşılaştırmak amacıyla Origin Pro Lab 8.5 programında IC_{50}^{20} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bulgulara göre 24 saatlik inkübasyon sonunda MCF-7 hücreleri için IC_{50} değeri 5,33 μ M, MCF-10A hücreleri için ise 17,80 μ M olarak bulunmuştur. 48 saatlik IC_{50} değeri MCF-10A hücreleri için 19,56 μ M olarak bulunmuştur. Song ve arkadaşları MCF-7 hücreleri için 48 saat sonra IC_{50} değerini 18 μ M olarak belirtmiştir (Song, Tang, Lei, *et al.* 2016). Wiggins ve grubu MCF-7 hücreleri için 48 saat sonra DSF IC_{50} değerini 0,3 μ M, MCF-10A hücreleri için ise DSF IC_{50} değerini >10 μ M olarak belirtmiştir (Wiggins *et al.* 2015).

²⁰ IC_{50} değeri hücreler üzerinde %50 toksisite gösteren ilaç konsantrasyonudur, inhibitory concentration

Sonuç olarak, DSF ilacının meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) daha etkili olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı hücre soyu olan MCF-10A, kanser hücreleriyle kıyaslandığında daha yüksek DSF konsantrasyonunda canlılığını kaybetmektedir.

Normal hücrelere kıyasla kanser hücreleri, yüksek seviyede bakır (Cu) ile karakterizedir (Mulay *et al.* 1971; Yip *et al.* 2011). Bakır, 15 μM dozda bile hem kanser hem sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki göstermemektedir (Yip *et al.* 2011). Bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde Cu için IC_{50} değeri $>20 \mu\text{M}$ olarak belirtilmiştir (Yip *et al.* 2011). Ancak bakırın sitotoksik etkisi DSF varlığında, bir başka deyişle DSF'm öldürücü etkisi Cu varlığında, artmaktadır (Allensworth *et al.* 2015; Xinwei Liu *et al.* 2016; Wiggins *et al.* 2015; Yip *et al.* 2011). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada mMDPF yapısının bakır bağımlı toksik etkisinin araştırılması da amaçlanmıştır. Bu nedenle öncelikle hücreler üzerinde bakırın tek başına etkisi araştırılmış ve kullanılacak bakır dozu belirlenmiştir.

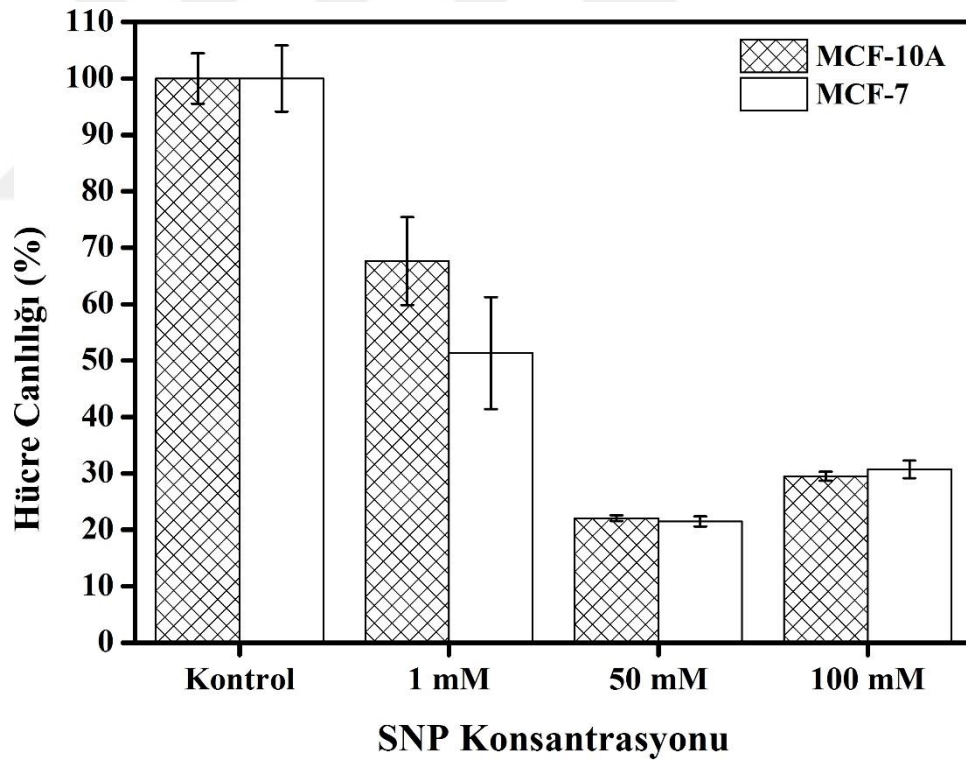
Bakır uygulaması için yapılan CuCl_2 toksisite araştırmasında, ciddi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil 4.23). Cu uygulandığında normal hücre hattında canlılık oranı kanser hücrelerinden fazladır. Deneylerde uygulanacak CuCl_2 dozu 5 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. Bakır toksisitesi

0-15 μM CuCl_2 uygulamasının MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerinde **(A)** 24 ve **(B)** 48 saat sonundaki etkisi.

DSF'nin toksisitesine bakır dışında sodyum nitropurisit (SNP)'in etkisi de araştırılmıştır. SNP, vasodilatör bir ilaçtır ve konsantrasyona bağlı olarak ROS kaynaklı stres (oksidatif stres) oluşturur. Çünkü SNP, bir ROS çeşidi olan nitrik oksit (NO) donörüdür (Kaku *et al.* 2001). NO, bir radikal moleküldür ve DNA gibi bazı hücresel yapılara saldıran ikincil moleküllerin oluşmasına neden olur (Janjetovic *et al.* 2008). Sonuç olarak SNP uygulamasını takiben NO artışı olması ve buna bağlı olarak radikalik zincir reaksiyonların indüklenmesi ile ortamdaki ROS miktarının artması beklenmektedir. Bu sebeple çalışmamızda ROS kaynağı olan DSF ile SNP'in sitotoksikite üzerine sinerjistik bir etki oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. SNP, 1 mM konsantrasyonda toksisite (Şekil 4.24) göstermiştir. Deneylerde SNP 0,5 mM kullanılmıştır.

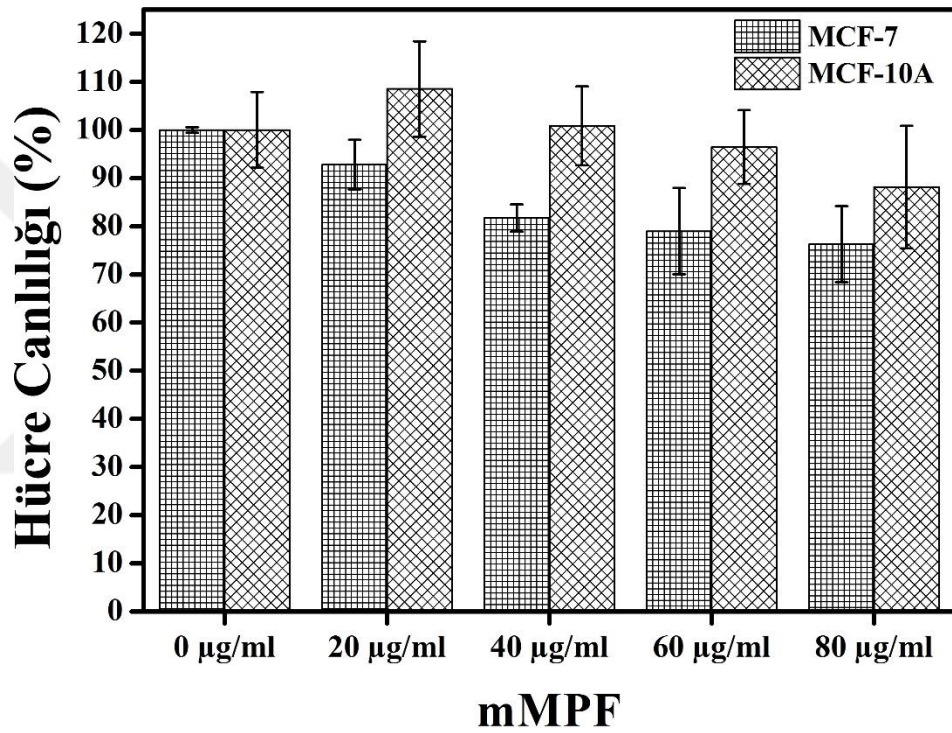


Şekil 4.24. SNP toksik etkisi

0-100 mM SNP'nin 24 saat sonunda MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine etkisi

Son olarak ilaç içermeyen taşıyıcı sistemin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bunun için 20, 40, 60 ve 80 µg/mL mMPF ile muamele edilen hücreler 24 saat sonra toksisite testine tabi tutulmuştur. Özellikle PEI hücrelerde doz bağımlı

toksositeye neden olduğu için ilaç taşıyıcı sistemin hücrelerdeki toksik etkisinin araştırılması önem arz etmektedir. Çalışmamızda uygulanan dozların kullanılan hücre hatları için ihmal edilebilir toksisiteye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.25). Özellikle MCF-10A hücre soyunu için mMPF'in etkisi yoktur. Çünkü 80 $\mu\text{g/mL}$ mMPF uygulamasında bile MCF-10A hücrelerinde %90 canlılık gözlenmiştir. Sonuç olarak, 60 $\mu\text{g/mL}$ taşıyıcı sistemin uygulamalar için ideal olduğu belirlenmiştir.



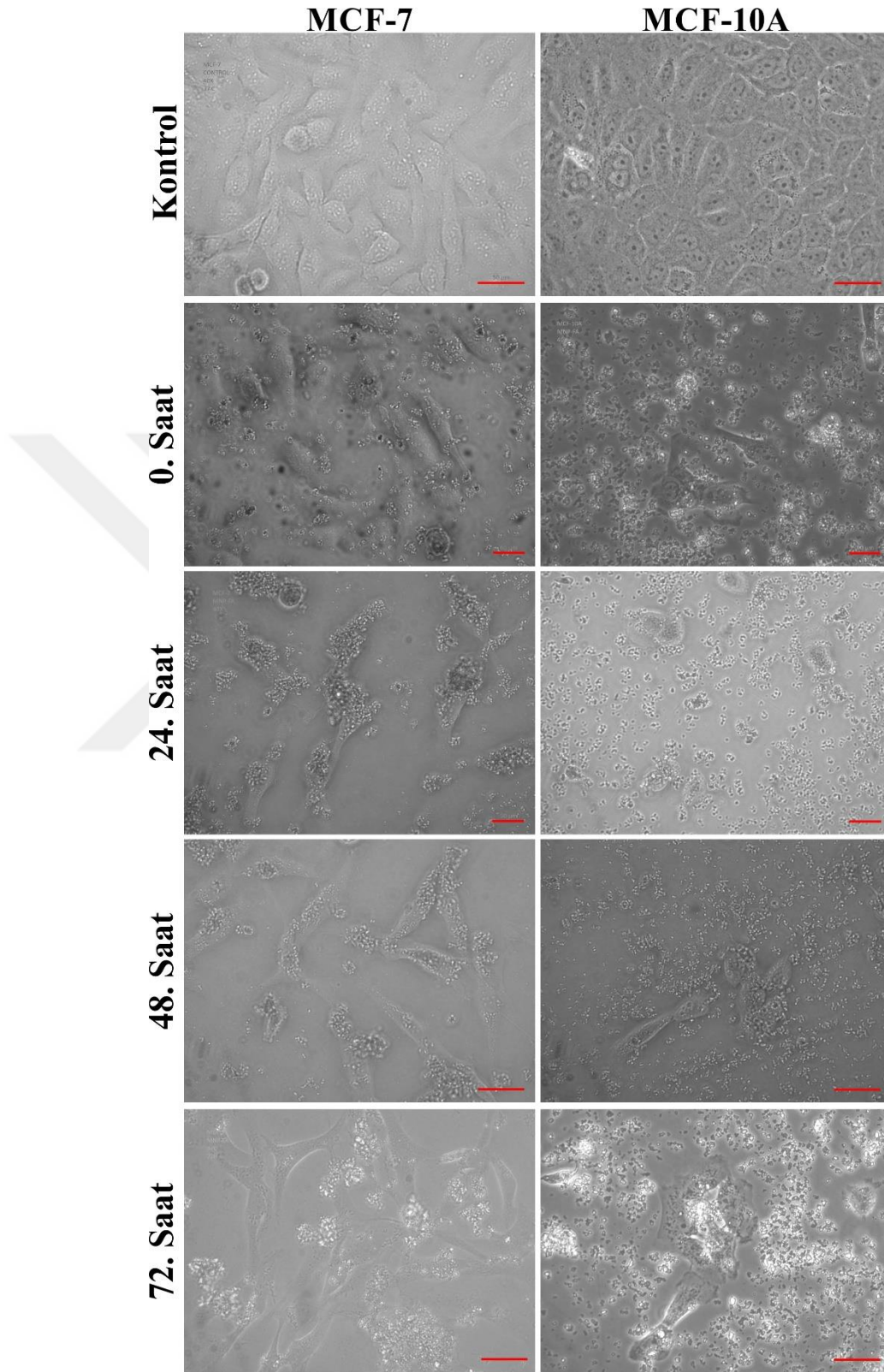
Şekil 4.25. mMPF'in 24 saat sonunda hücre hatları üzerine etkisi

4.4.1. Nanoparçacıkların hücresel alımı

Ekimi yapılan hücrelere mMDPF uygulaması yapıldıktan sonra, hücrelerin mMDPF alımları araştırılmıştır. Mikroskop görüntüleri, kanser hücrelerinin daha fazla mMDPF aldığını göstermektedir (Şekil 4.26). Yine aynı görüntüler, 72 saat sonunda MCF-7 medyumunda bulunan nanoparçacık miktarının MCF-10A medyumunda bulunan nanoparçacık miktarına göre az olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.26). Yani FA ile

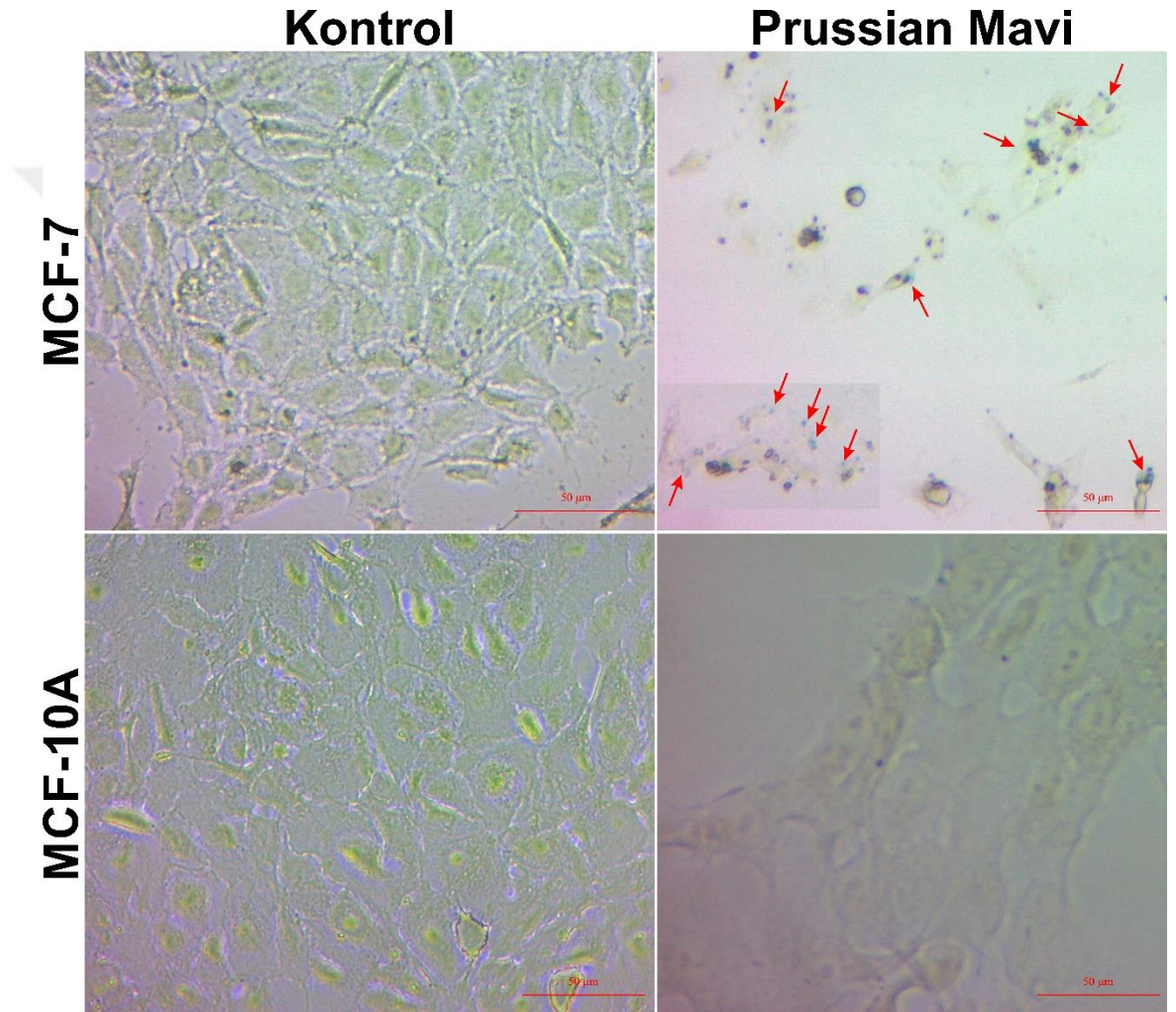
modifiye ettiğimiz mMDPF'ler, MCF-7 kanser hücreleri tarafından daha fazla alınırken, sağlıklı kontrol hücreleri (MCF-10A) tarafından daha az alınmıştır.





Şekil 4.26. Zaman bağımlı mMDPF'in hücresel alımı
Ölçek 50 μm 'dir.

Manyetik nanoparçacıkların intra- ve ekstraselüler alımı Prussian Mavi boyaması ile doğrulanmıştır. Net bir gözlem için hücrelere 500 $\mu\text{g/mL}$ mMDPF uygulanmıştır. Şekil 4.27’de ışık mikroskobu ile alınan hücre görüntülerinde, hücre içinde gözlenen mavi renk hücre içine alınan nanoparçacıkları belirtmektedir. MCF-7 hücrelerinin MCF-10A hücrelerine kıyasla çok daha fazla mMDPF aldığı gözlenmiştir.

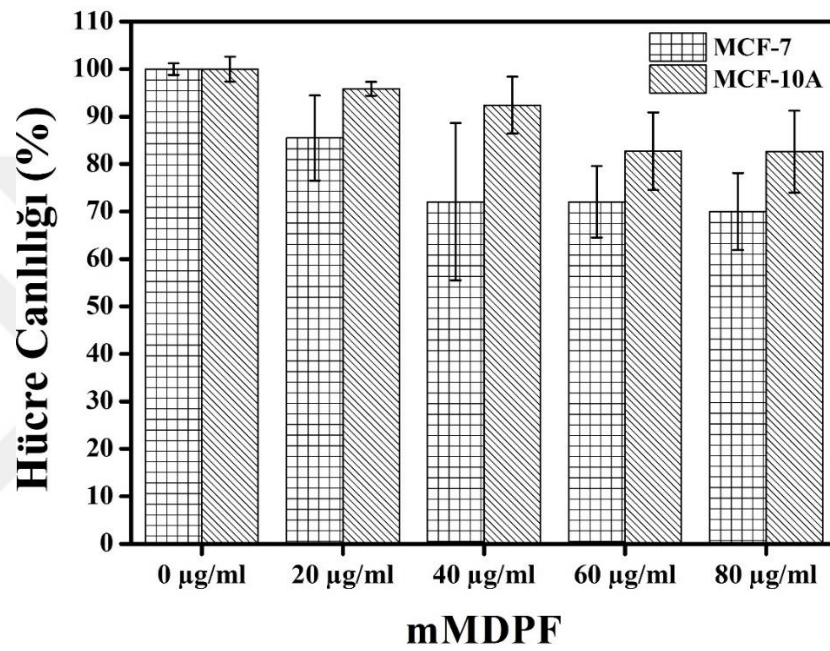


Şekil 4.27. mMDPF’lerin hücresel alımının gösterimi için Prussian Mavisi ile boyama

4.4.2. Hücre canlılığı

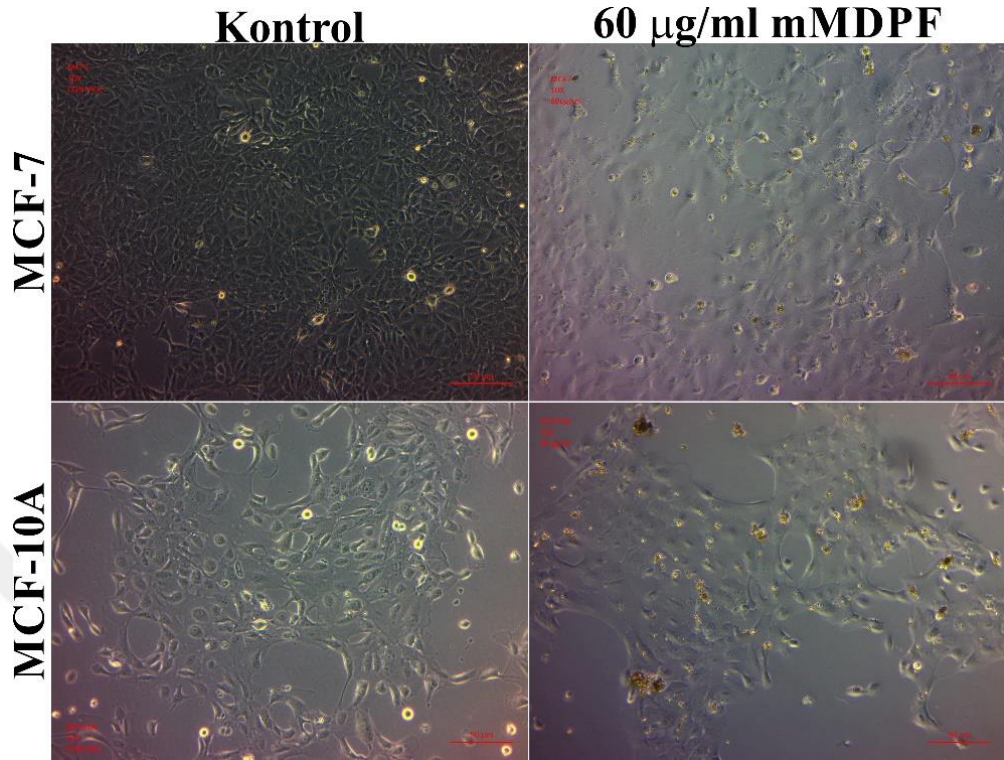
Hazırlanan ilaç içeren taşıyıcı sistem (mMDPF), MCF-7 kanser hücrelerinde doza bağlı etki göstermektedir (Şekil 4.28). mMDPF’in MCF-10A hücreleri üzerinde toksik etkisi

gözlenmemiştir. MCF-7 hücrelerinde ise doz artışına bağlı olarak toksisitede artış gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerine 60 $\mu\text{g/mL}$ mMDPF uygulandığında 24 saat sonunda %70 civarında canlılık gözlenmiştir (Şekil 4.28). mMPF ve mMDPF uygulandıktan sonra elde edilen toksisite sonuçlarına dayanarak hücre kültürü çalışmalarımızda 60 $\mu\text{g/mL}$ mMDPF kullanılmıştır.



Şekil 4.28. mMDPF'in MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerinde 24 saat sonundaki etkisi

60 $\mu\text{g/mL}$ mMDPF uygulanan MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde 24 saat sonunda hücre morfolojilerinde bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 4.29). Ancak 80 $\mu\text{g/mL}$ mMDPF uygulamasında MCF-7 hücrelerinin morfolojisi değişmiş, hücreler küresel bir şekil almıştır. MCF-10A hücrelerinde ise 80 $\mu\text{g/mL}$ mMDPF uygulamasında da bir etki gözlenmemiştir.

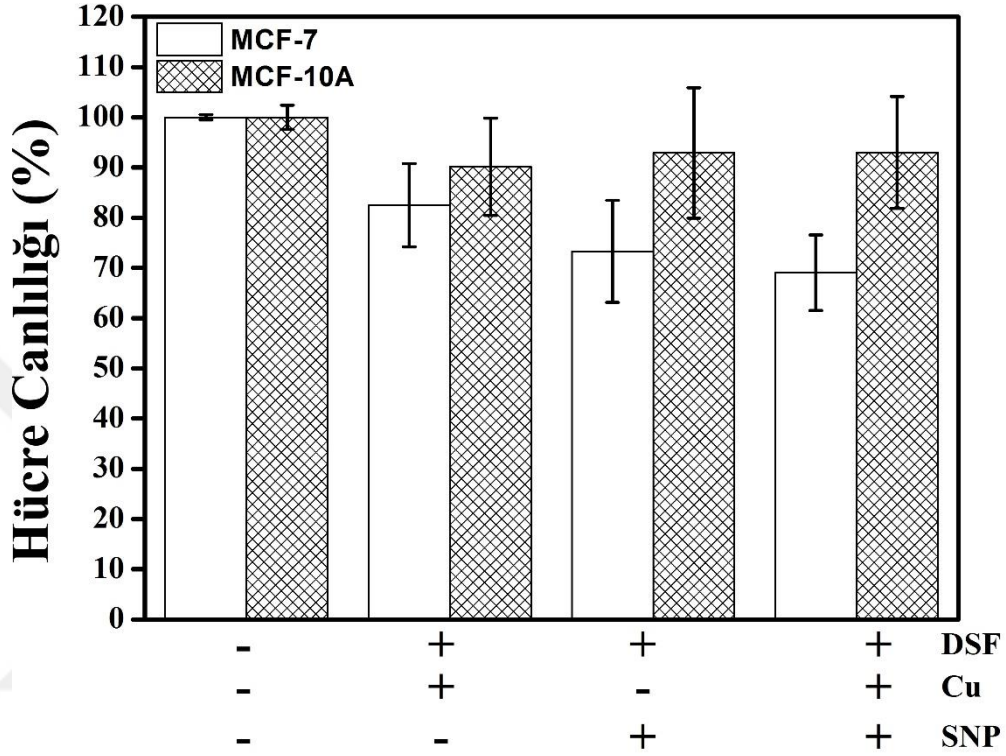


Şekil 4.29. 60 µg/mL mMDPF uygulamasının morfolojik etkisi (Ölçek 50 µm'dir)

Liu ve arkadaşları DSF enkapsülasyonu için lipozom sistemini (Lipo-DS) meme kanseri kök hücrelerine karşı kullanmışlardır (Peng Liu *et al.* 2014). In vitro ve in vivo olarak yürüttükleri çalışma sonucunda Lipo-DS'nin bakır ile kombinasyonunun düşük dozda NF-κB inhibisyonu yoluyla meme kanseri kök hücrelerini hedef aldığını ortaya koymuşlardır. Vurguladıkları nokta, bakır varlığında DSF bağımlı ROS artışı neticesinde NF-κB ve ALDH inhibisyonunun kanser için seçici olduğudur. Bir başka çalışmada DSF-PLGA, bakır ile kombinlenerek karaciğer kanserine uygulanmış ve Cu ile uygulanan DSF-PLGA'nın kanser kök hücrelerini hedef aldığı belirtilmiştir (Z. Wang *et al.* 2016). Cu varlığında sitotoksik etkinin artması, Cu bakımından zengin tümör hücrelerinde DSF varlığında şekillenen Cu(DETC)₂'nin neden olduğu proteazom ilişkili apoptozisin indüklenmesinden kaynaklanır (L. Zhang *et al.* 2015). Bunun yanında DSF-Cu ikili uygulaması ROS indükleyici ve NF-κB yolağı inhibitörüdür (Yip *et al.* 2011).

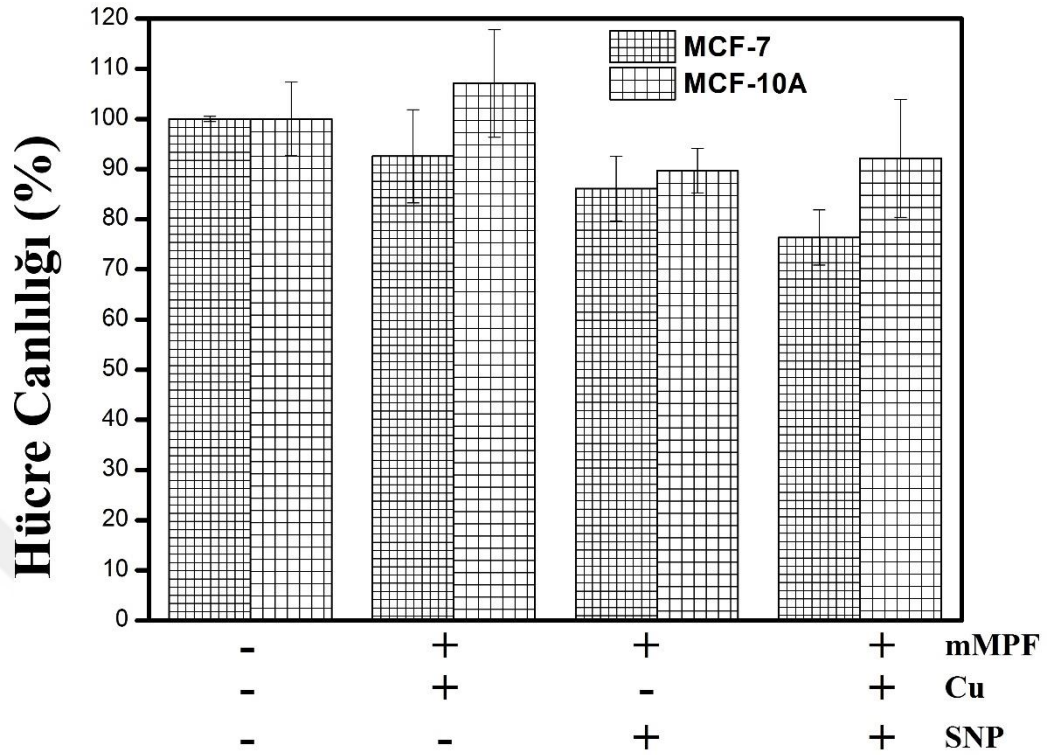
Bu nedenle öncelikle DSF'nin (1 µM) Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) ile ayrı ayrı ve birlikte kullanıldığı uygulamalar yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre MCF-10A

hücreleriyle karşılaştırıldığında MCF-7 hücreleri üzerine DSF+Cu+SNP'nin toksik etkisi daha fazla olmaktadır (Şekil 4.30).



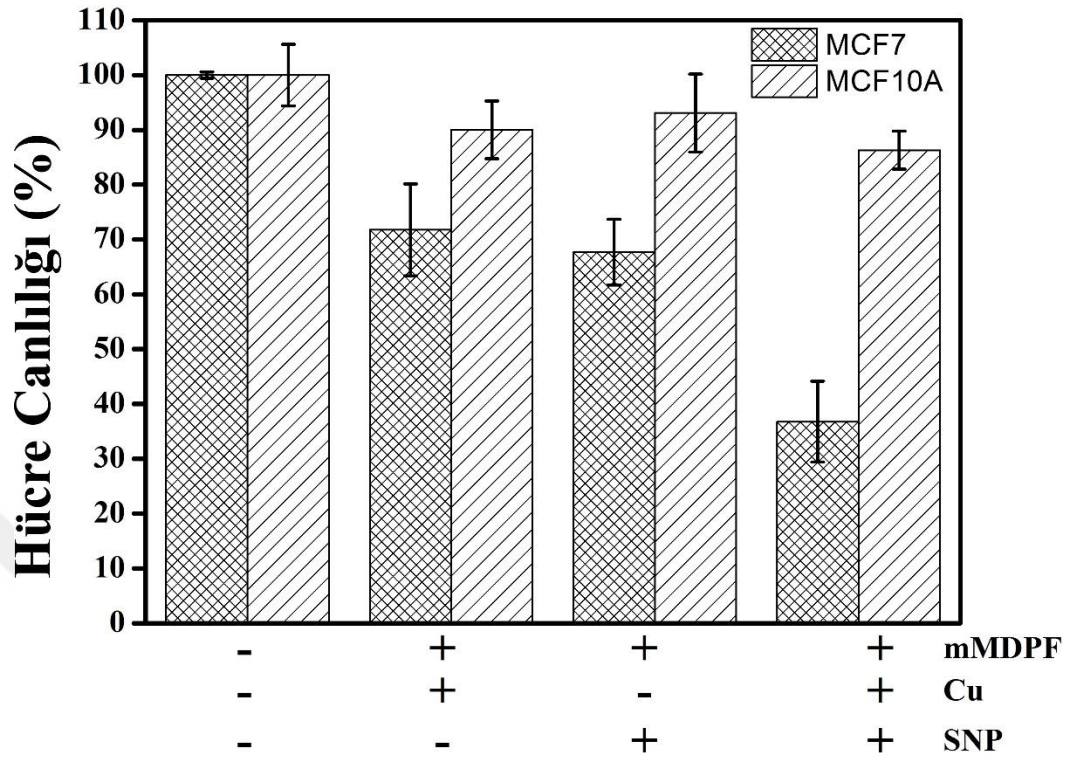
Şekil 4.30. DSF (1 μ M)'ın Cu (5 μ M) ve SNP (0,5 mM) ile kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine 24 saatlik toksik etkisi

Çalışmamızda kontrol amaçlı olarak ilaç içermeyen taşıyıcı sistemin (mMPF) Cu ve SNP ile kombinasyonunun etkisi araştırılmıştır. Elde ettiğimiz bulgular, mMPF+Cu+SNP'nin MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde canlılığı anlamlı düzeyde etkilemediğini göstermektedir (Şekil 4.31). Böylece DSF yokluğunda, çalışılan konsantrasyonlarda Cu ve SNP'nin MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde önemli bir etkiye neden olmadığı anlaşılmıştır.



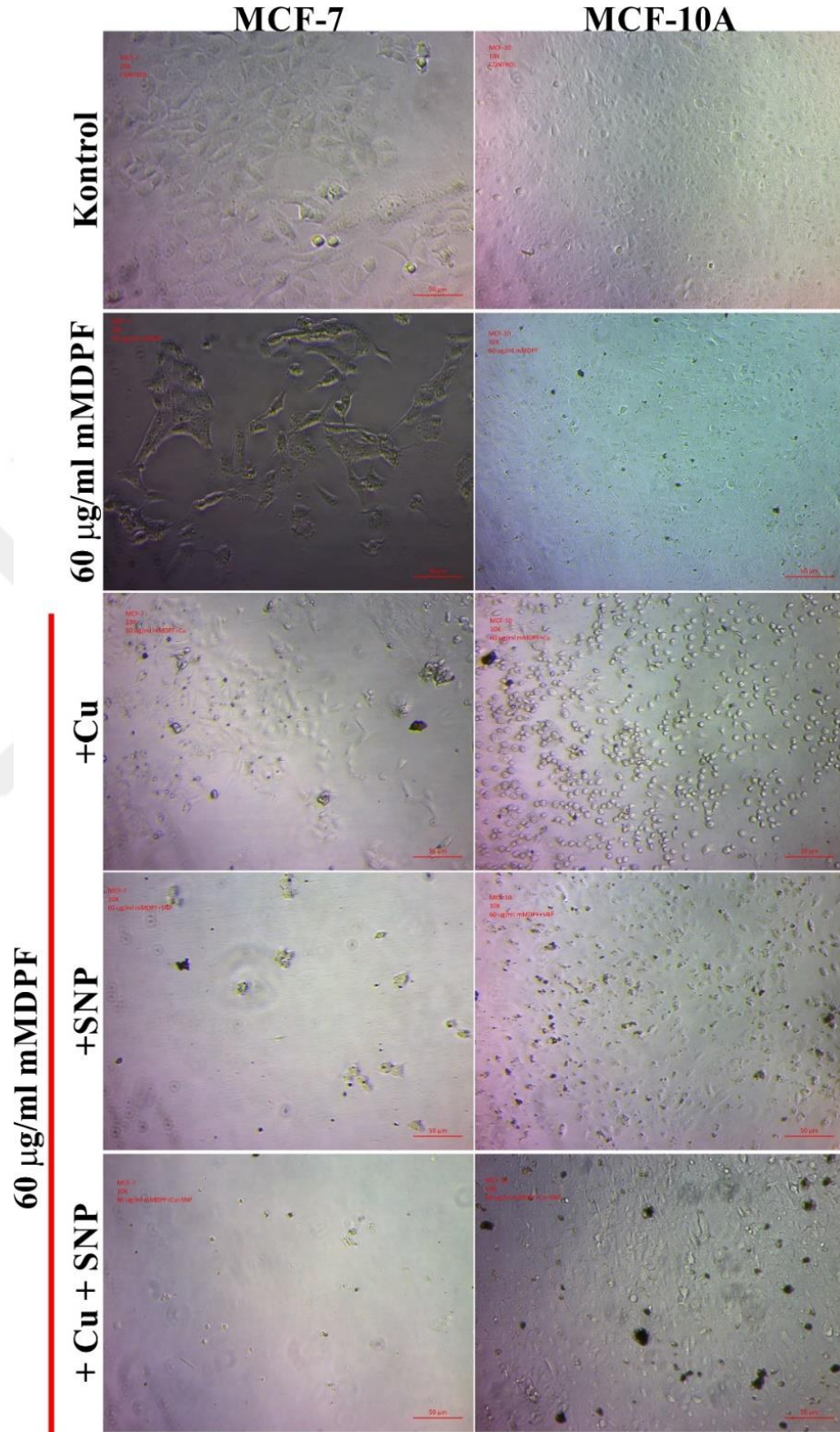
Şekil 4.31. mMPF'in (60 µg/mL) Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) ile kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine 24 saatlik toksik etkisi

Çalışmamızın bir sonraki adımında mMDPF, Cu ve/veya SNP ile birlikte MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine uygulanmış ve 24 saat sonundaki canlılık oranı MTS testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.32). mMDPF'in (60 µg/mL) Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) ile kombinasyonu, MCF-10A hücreleri için yaklaşık %10 oranında toksisite göstermiştir. Aynı dozlarda MCF-7 hücrelerine yapılan uygulama sonucunda MCF-7 hücrelerinin canlılık oranının %40'ın altına düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.32. mMDPF (60 $\mu\text{g/mL}$)'in Cu (5 μM) ve SNP (0,5 mM) ile kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine 24 saatlik toksik etkisi

60 $\mu\text{g/mL}$ mMDPF, Cu ve SNP uygulamalarında 24 saat sonra hücrelerin görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.33). mMDPF, Cu ve SNP uygulanan gruplarda MCF-7 hücrelerinin büyük oranda öldüğü, MCF-10A hücrelerinin ise belirlenen dozda yapılan uygulamalardan fazla etkilenmediği belirlenmiştir.



Şekil 4.33. 60 µg/mL mMDPF, Cu (5 µM) ve SNP (0,5 mM) uygulaması 24 saat sonra hücrelerin 10X büyütme görüntüleri (Ölçek 50 µm'dir)

Sonuç olarak DSF varlığında Cu ve SNP kaynaklı sitotoksik etki artmaktadır. İlaç taşımayan mMPF’lerde DSF bulunmadığından mMPF varlığında Cu ve SNP kaynaklı sitotoksiste sınırlıdır. Ayrıca her uygulamada kanser hücrelerinin sağlıklı kontrollere göre daha fazla öldüğü gözlenmiştir. Bu durumda mMDPF meme kanseri tedavisinde hedef spesifik olarak çalışan ideal bir tedavi ajanı olarak umut vaat edicidir.

4.4.3. Klonojenik deney

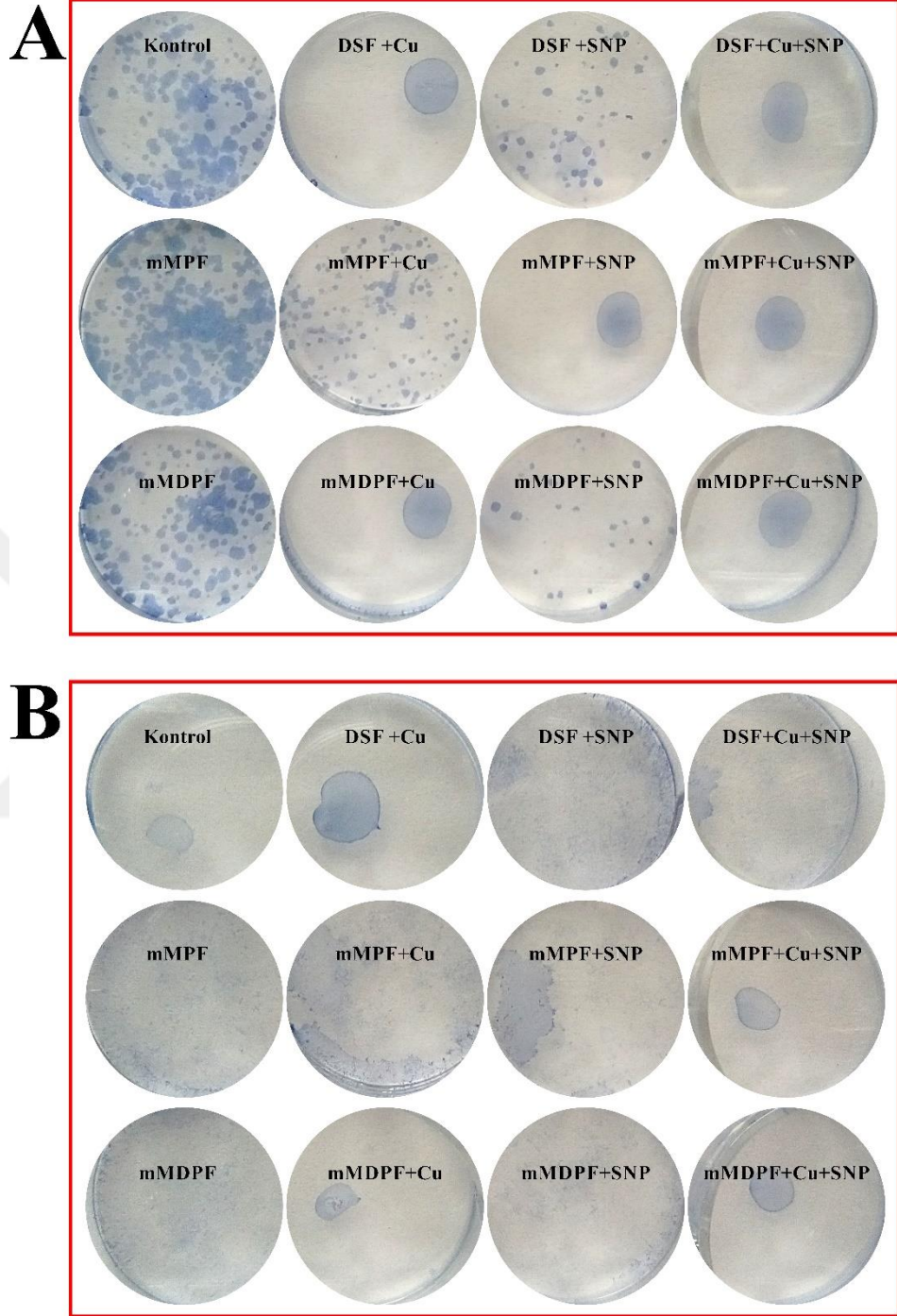
Hücrelerin üreme ve koloni oluşturma yeteneklerinin araştırılması için MCF-7 ve MCF-10A hücreleri, Cu ve SNP ile birlikte veya ayrı ayrı olarak DSF, mMPF ve mMDPF ile muamele edilmiştir. Hücresel alım için 12 saat beklendikten sonra taze medyum ile hücreler yeniden inkübe edilmiştir. Yaklaşık on gün sonunda MCF-7 hücrelerinin koloni formlarının daha küresel ve belirgin olduğu ancak MCF-10A hücrelerinin yüzeyde yayılarak çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.34). İki hücre hattının koloni oluşumunda gözlenen bu farklılığa literatürde de rastlanmıştır (Peng Liu *et al.* 2014). Yüzeye yayılarak çoğaldığı için MCF-10A hücrelerinde koloni sayımı yapılamamıştır.

DSF+Cu uygulamasının kanser hücrelerinin koloni formlarında küçülmeye neden olduğu ve koloni sayısını azalttığı bilinmektedir (Allensworth *et al.* 2015; Y. Yang *et al.* 2015). Yaptığımız çalışmada DSF’nin Cu ve SNP ile uygulandığı gruplar karşılaştırıldığında, Cu varlığında DSF’nin hücre ölümünü artırdığı gözlenmiştir. DSF+SNP uygulaması kanser hücrelerinin koloni yeteneğini DSF+Cu grubuna kıyasla daha az etkilemiştir. Şekil 4.34’te sunulan fotoğraflardan elde edilen bulgular doğrultusunda MCF-7 hücrelerinin kontrol grubunda ~120 koloni varken DSF+Cu, DSF+SNP ve DSF+Cu+SNP için sırasıyla 1, 55 ve 1 koloni sayılmıştır. MCF-10A hücrelerinde de DSF+SNP uygulaması önemli etki göstermemiştir. Sonuç olarak DSF için yapılan klonojenik deneyde, MCF-7 hücrelerinde en fazla etkilenen grup DSF+Cu+SNP üçlü uygulamasında gözlenmişken bu uygulama MCF-10A hücrelerinde sınırlı etki göstermiştir (Şekil 4.34).

Hem MCF-7 hem de MCF-10A hücre hatlarına DSF içermeyen mMPF'nin koloni oluşumuna bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.34). MCF-7 hücrelerine ait klonojenik sonuçlarında, kontrol grubunda yaklaşık 120 koloni sayılmışken mMPF'in tek başına uygulandığı grupta 118 koloni sayılmıştır. MCF-7 hücrelerinde mMPF+Cu uygulanan grupta ortalama 68 koloni oluşumu gözlenmiştir. İlginç bir biçimde mMPF+SNP uygulanan MCF-7 hücrelerinde tıpkı mMPF+Cu+SNP grubunda olduğu gibi koloni oluşumu gözlenmemiştir. MCF-10A hücrelerinde en fazla etki mMPF+Cu+SNP uygulanan grupta gözlenmiştir, fakat kontrolle farkı çok azdır.

Sonuç olarak;

- mMDPF kanser seçici etkiye sahiptir,
- mMDPF+Cu ve mMDPF+Cu+SNP uygulaması MCF-7 hücrelerinin koloni oluşumunu önlemiştir,
- mMDPF+SNP uygulaması MCF-7 hücrelerinde koloni sayısını azaltmış, MCF-10A hücrelerine etki etmemiştir,
- Sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir (L. Duan *et al.* 2014; P Liu *et al.* 2013; Yip *et al.* 2011).



Şekil 4.34. Klonojenik deney

mMDPF (60 $\mu\text{g/mL}$), mMPF (60 $\mu\text{g/mL}$), Cu (5 μM) ve SNP (0,5 mM) uygulanmış **(A)** MCF-7 ve **(B)** MCF-10A hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatürdeki çalışmalar, DSF'in çeşitli kanser tiplerine karşı oldukça yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirtmektedir. Jivan ve arkadaşlarının yaptığı DSF-metfomin uygulamasının, yine Duan ve arkadaşlarının kullandığı DSF-DOX kombine uygulamasının neticesinde DSF'in diğer ilaçların seçici toksisitesini artırdığı ortaya konmuştur (X. Duan *et al.* 2013; Jivan *et al.* 2015). Bu açıdan multi fonksiyonel ilaç taşıyıcı sistemler, DSF ile birlikte farklı ilaçların aktarımı ve bunların birlikte kullanımı için ideal platform konumundadır.

Kararsız yapıya sahip DSF, in vitro ve in vivo uygulamalarda çeşitli taşıyıcı sistemler ile kullanılmıştır. Ancak bu sistemlerin boyutu genellikle ~200 nm veya daha büyüktür. Bununla beraber PLGA veya PEG ile hazırlanan DDS'ler negatif yüzeye sahiptir (X. Duan *et al.* 2013; Fasehee *et al.* 2016; L. Zhang *et al.* 2015). Bu özellikler DDS'in dolayısıyla da ilacın negatif yüzeye sahip hücreler tarafından alımını zorlaştırmaktadır. Ayrıca birçok DDS'nin ilaç yükleme oranı memnun edici düzeyde değildir. Bu çalışmada, DSF'nin mezoporozsilika nanoparçacıklara %4,35 oranında yüklenebileceği ortaya konmuştur.

Fe₃O₄ MNP'lerin mıknatıs tarafından çekilebilmesi, onların fiziksel hedefleme aracı olarak kullanılmasının sebebidir. Mezogözenekli silika kaplama yapılarak ilacın Fe₃O₄ MNP'lerin üzerine tutunabileceği gözenekli yapı hazırlanmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Silika kaplama, MNP'lerin biyo-uyumluluğunu arttırmış ve suda dağılmalarını sağlamıştır. Gözeneklere disülfiram ilacı yüklendikten sonra platformun PEI ile sarılması, ilacın istenmeyen salımını önlenmiştir. PEI, kontrollü ilaç salımının yanında ilaç taşıyıcı sistemin RES elemanlarından kaçışını sağlar, kan dolaşımındaki ömrünü uzatır ve yapısında bulundurduğu -NH₂ grubu sayesinde NP'lerin yüzeyini pozitif yapar. Yüzeydeki -NH₂ fonksiyonel gruplar kullanılarak ilaç taşıyıcı sistemin yüzeyine FA takılmıştır (Şekil 4.10 ve Şekil 4.12). FA, ilaç taşıyıcı sistemin kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden daha fazla etkilemesi için aktif hedefleme aracı olarak

kullanılmıştır. Bu çalışmada MCF-7 kanser hücrelerinin MCF-10A hücrelerine kıyasla daha fazla mMDPF aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.27).

Sıcaklık ve pH parametreleri değiştirilerek ilaç salım deneyleri yürütülmüş ve endozomal pH olan pH=6,0'da ilaç salımının çok daha hızlı gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu durum kanser hücrelerinde ilacın hızla salınmasını sağlamak ve ilacı lizozomal degradasyondan korumaktadır.

mMDPF uygulanan MCF-7 hücrelerinin canlılık oranı MCF-10A hücrelerine göre çok daha düşüktür (Şekil 4.26, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29). Üstelik mMDPF, Cu ve/veya SNP ile birlikte uygulandığında bile bu durum değişmemiştir (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33). İlacın Cu ve SNP ile birlikte uygulanması ile toksisitesinin kanser spesifik olarak arttığı gözlenmiştir. In vitro bulgularımıza göre çok düşük konsantrasyonlarda mMDPF, Cu ve SNP kullanarak sağlıklı hücrelere etki etmeden meme kanseri hücreleri yok edilebilir. Üstelik sistemin manyetik ve FA tabanlı hedefleme imkânı sunması, önerilen yöntemin spesifikliğini artırmaktadır.

Sonuç olarak geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemi meme kanseri tedavisi için umut verici bir araçtır. Detaylı etkiler daha kapsamlı çalışmalar ile araştırılabilir. mMDPF'ler manyetik hipertermi tedavisi ile birleştirilebilir. Uygulamalar kobaylarda yapılarak, ilaç sisteminin in vivo etkileri ortaya konabilir.

KAYNAKLAR

- Access, O., Shah, B. P., Pasquale, N., De, G., Tan, T., Lee, K., Biology, C., States, U., Heart, D. and States, U. , 2014. Core/Shell Nanoparticle-Based Peptide Therapeutics and Combined Hyperthermia for Enhanced Cancer Cell Apoptosis. *ACS Nano*, 8 (9), 9379–9387.
- ACS. , 2017. Cancer Facts & Figures 2017. American Cancer Society.
- Ahn, T., Kim, J. H., Yang, H. M., Lee, J. W. and Kim, J. D. , 2012. Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. *Journal of Physical Chemistry C*, 116 (10), 6069–6076.
- Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M. and Langer, R. , 2005. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *Journal of Gene Medicine*, 7 (5), 657–663.
- Allensworth, J. L., Evans, M. K., Bertucci, F., Aldrich, A. J., Festa, R. A., Finetti, P., Ueno, N. T., Safi, R., McDonnell, D. P., Thiele, D. J., Van Laere, S. and Devi, G. R. , 2015. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Molecular Oncology*, 9 (6), 1155–1168.
- ALothman, Z. A. , 2012. A Review : Fundamental Aspects of Silicate. *Materials*, 5 (2874–2902).
- Andrade, A. L., Souza, D. M., Pereira, M. C., Fabris, J. D., Domingues, R. Z., Federal, U., Gerais, D. M. and Horizonte, B. , 2009. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach (Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas revestidas com sílica através de um processo sol-gel), 55, 420–424.
- Argyó, C., Weiss, V., Bräuchle, C. and Bein, T. , 2014. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery. *Chemistry of Materials*, 26 (1), 435–451.
- Babu, M. S., Shetty, C. S. C., Aiyappa, M. R. and Sameer, S. , 2014. Disulfiram Ethanol Reaction with Ischemic Stroke. *European Journal of General Medicine*, 11 (3), 190–192.
- Baeza, A., Guisasola, E. and Ruiz-herna, E. , 2012. Magnetically Triggered Multidrug Release by Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 24 (3), 517–524.
- Bardin, C., Astier, A., Vulto, A., Sewell, G., Vigneron, J., Trittler, R., Daouphars, M., Paul, M., Trojniak, M. and Pinguet, F. , 2011. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: A European consensus conference. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 69 (4), 221–231.
- Bayat, A., Shakourian-Fard, M., Ehyaei, N. and Hashemi, M. M. , 2014. A magnetic supported iron complex for selective oxidation of sulfides to sulfoxides using 30% hydrogen peroxide at room temperature. *RSC Adv.*, 4 (83), 44274–44281.
- Benjaminsen, R. V, Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M. and Andresen, T. L. , 2013. The Possible “Proton Sponge ” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21 (1), 149–157.
- Bikiaris, D., Karavelidis, V. and Karavas, E. , 2009. Novel Biodegradable Polyesters.

- Synthesis and Application as Drug Carriers for the Preparation of Raloxifene HCl Loaded Nanoparticles. *Molecules*, 14 (7), 2410–2430.
- Buzea, C., Pacheco, I. I. and Robbie, K. , 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2 (4), MR17-MR71.
- Cai, H., An, X., Cui, J., Li, J., Wen, S., Li, K., Shen, M., Zheng, L., Zhang, G. and Shi, X. , 2013. Facile Hydrothermal Synthesis and Surface Functionalization of Polyethyleneimine-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5 (5), 1722–1731.
- Casasús, R., Marcos, M. D., Martínez-Máñez, R., Ros-Lis, J. V., Soto, J., Villaescusa, L. A., Amorós, P., Beltrán, D., Carmen Guillem, A. and Latorre, J. , 2004. Toward the development of ionically controlled nanoscopic molecular gates. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (28), 8612–8613.
- Cauda, V., Schlossbauer, A. and Bein, T. , 2010. Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol). *Microporous and Mesoporous Materials*, 132 (1–2), 60–71.
- Cen, D., Brayton, D., Shahandeh, B., Meyskens, F. L. and Farmer, P. J. , 2004. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (27), 6914–6920.
- Cen, D., Gonzalez, R. I., Buckmeier, J. A., Kahlon, R. S., Tohidian, N. B. and Meyskens, F. L. , 2002. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1 (3), 197–204.
- Center for Substance Abuse Treatment. , 2009. Incorporating Alcohol Pharmacotherapies Into Medical Practice. Center for Substance Abuse Treatment, 114, 126.
- Chanda, A. and Mohanta, D. , 2016. Nanotechnology- A Potent Pharmacological Tool. *International Journal of Research in Advent Technology*, 4 (3), 6–16.
- Chen, D., Cui, Q. C., Yang, H. and Dou, Q. P. , 2006. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Research*, 66 (21), 10425–10433.
- Chen, F.-H., Zhang, L.-M., Chen, Q.-T., Zhang, Y. and Zhang, Z.-J. , 2010. Synthesis of a novel magnetic drug delivery system composed of doxorubicin-conjugated Fe₃O₄ nanoparticle cores and a PEG-functionalized porous silica shell. *Chemical Communications*, 46 (45), 8633.
- Chen, X., Soeriyadi, A. H., Lu, X., Sagnella, S. M., Kavallaris, M. and Gooding, J. J. , 2014. Dual bioresponsive mesoporous silica nanocarrier as an “AND” logic gate for targeted drug delivery cancer cells. *Advanced Functional Materials*, 24 (44), 6999–7006.
- Chen, X., Zhang, L., Hu, X., Lin, X., Zhang, Y. and Tang, X. , 2015. Formulation and preparation of a stable intravenous disulfiram-loaded lipid emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117 (6), 869–878.
- Chicea, D., Indreaa, E. and Cretu, C. M. , 2012. Assessing Fe₃O₄ nanoparticle size by DLS, XRD and AFM. *Journal Of Optoelectronics And Advanced Materials*, 14 (5), 460–466.
- Corrie, P. G. , 2007. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 36 (1), 24–28.
- Cui, L., Lin, H., Yang, C., Han, X., Zhang, T. and Qu, F. , 2014. Synthesis of

- Multifunctional Fe₃O₄@mSiO₂@Au Core–Shell Nanocomposites for pH-Responsive Drug Delivery. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014 (36), 6156–6164.
- Cvek, B. and Dvorak, Z. , 2007. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 3155–3167.
- Cvek, B. and Dvorak, Z. , 2008. The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discovery Today*, 13 (15–16), 716–722.
- Doroschuk, V. O., Grogul, A. B., Mandzyuk, Y. S., Makukha, O. G. and Grytsyk, N. O., 2016. Cloud point extraction of disulfiram for its HPLC-MS/MS determination in synthetic urine. *Chemical Papers*, 70 (10), 1316–1321.
- Duan, L., Shen, H., Zhao, G., Yang, R., Cai, X., Zhang, L., Jin, C. and Huang, Y. , 2014. Inhibitory effect of Disulfiram/copper complex on non-small cell lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446 (4), 1010–1016.
- Duan, X., Xiao, J., Yin, Q., Zhang, Z., Yu, H., Mao, S. and Li, Y. , 2013. Smart pH-sensitive and temporal-controlled polymeric micelles for effective combination therapy of doxorubicin and disulfiram. *ACS Nano*, 7 (7), 5858–5869.
- El-Sayed, A., Futaki, S. and Harashima, H. , 2009. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *The AAPS Journal*, 11 (1), 13–22.
- Eom, Y., Abbas, M., Noh, H. and Kim, C. , 2016. Morphology-controlled synthesis of highly crystalline Fe₃O₄ and CoFe₂O₄ nanoparticles using a facile thermal decomposition method. *RSC Adv.*, 6 (19), 15861–15867.
- Fan, Y. and Moon, J. , 2015. Nanoparticle Drug Delivery Systems Designed to Improve Cancer Vaccines and Immunotherapy. *Vaccines*, 3 (3), 662–685.
- Fasehee, H., Dinarvand, R., Ghavamzadeh, A., Esfandyari-Manesh, M., Moradian, H., Faghihi, S. and Ghaffari, S. H. , 2016. Delivery of disulfiram into breast cancer cells using folate-receptor-targeted PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo investigations. *Journal of Nanobiotechnology*, 14 (1), 32.
- Föll, H., Carstensen, J. and Frey, S. , 2006. Porous and nanoporous semiconductors and emerging applications. *Journal of Nanomaterials*, 2006, 1–10.
- Gerweck, L. E. and Seetharaman, K. , 1996. Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue : Potential Exploitation for the Treatment of Cancer Advances in Brief Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue : Potential Exploitation for the Treatment of Cancer1, (617), 1194–1198.
- Gnanaprakash, G., Philip, J. and Raj, B. , 2007. Effect of divalent metal hydroxide solubility product on the size of ferrite nanoparticles. *Materials Letters*, 61 (23–24), 4545–4548.
- Gobbo, O. L., Sjaastad, K., Radomski, M. W., Volkov, Y. and Prina-Mello, A. , 2015. Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Theranostics*, 5 (11), 1249–63.
- Han, R., Yi, H., Shi, J., Liu, Z., Wang, H., Hou, Y. and Wang, Y. , 2016. pH-Responsive drug release and NIR-triggered singlet oxygen generation based on a multifunctional core–shell–shell structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 (36), 25497–25503.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. , 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144 (5), 646–674.

- Harris, R. A., Shumbula, P. M. and Van Der Walt, H. , 2015. Analysis of the interaction of surfactants oleic acid and oleylamine with iron oxide nanoparticles through molecular mechanics modeling. *Langmuir*, 31 (13), 3934–3943.
- Hayashi, K., Moriya, M., Sakamoto, W. and Yogo, T. , 2009. Chemoselective Synthesis of Folic Acid- Functionalized Magnetite Nanoparticles via Click Chemistry for Magnetic Hyperthermia. *Chemistry of Materials*, 21 (7), 1318–1325.
- Hayashi, K., Nakamura, M., Miki, H., Ozaki, S., Abe, M., Matsumoto, T., Sakamoto, W., Yogo, T. and Ishimura, K. , 2014. Magnetically responsive smart nanoparticles for cancer treatment with a combination of magnetic hyperthermia and remote-control drug release. *Theranostics*, 4 (8), 834–844.
- He, Q. and Shi, J. , 2011. Mesoporous Silica Nanoparticle Based Nano Drug Delivery Systems: Synthesis, Controlled Drug Release and Delivery. *Materials Chemistry*, 21, 5845–5855.
- Hilgenbrink, A. R. and Low, P. S. , 2005. Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94 (10), 2135–2146.
- Huang, G., Chen, H., Dong, Y., Luo, X., Yu, H., Moore, Z., Bey, E. A., Boothman, D. A. and Gao, J. , 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy. *Theranostics*, 3 (2), 116–126.
- Huang, H. and Lovell, J. F. , 2017. Advanced Functional Nanomaterials for Theranostics. *Advanced Functional Materials*, 27 (2).
- Hui, C., Shen, C., Tian, J., Bao, L., Ding, H., Li, C., Tian, Y., Shi, X. and Gao, H. J. , 2011. Core-shell Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles synthesized with well-dispersed hydrophilic Fe₃O₄ seeds. *Nanoscale*, 3 (2), 701–705.
- Huth, S., Lausier, J., Gersting, S. W., Rudolph, C., Plank, C., Welsch, U. and Rosenecker, J. , 2004. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *Journal of Gene Medicine*, 6 (8), 923–936.
- Islam, M. S., Choi, W. S. and Lee, H. , 2014. Controlled Etching of Internal and External Structures of SiO₂ Nanoparticles Using Hydrogen Bond of Polyelectrolytes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 9563–9571.
- Janib, S. M., Moses, A. S. and MacKay, J. A. , 2010. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (11), 1052–1063.
- Janjetovic, K., Misirkic, M., Vucicevic, L., Harhaji, L. and Trajkovic, V. , 2008. ". *European Journal of Pharmacology*, 583 (1), 1–10.
- Jiang, W., Wu, J., Tian, R. and Jiang, W. , 2016. Synthesis and characterization of magnetic mesoporous core-shell nanocomposites for targeted drug delivery applications. *Journal of Porous Materials*, 24 (1), 257–265.
- Jing, G., Zhong, Y., Zhang, L., Gou, J., Ji, X., Huang, H., Zhang, Y., Wang, Y., He, H. and Tang, X. , 2014. Increased dissolution of disulfiram by dry milling with silica nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41 (8), 1328–1337.
- Jivan, R., Damelin, L. H., Birkhead, M., Rousseau, A. L., Veale, R. B. and Mavri-Damelin, D. , 2015. Disulfiram/copper-disulfiram Damages Multiple Protein Degradation and Turnover Pathways and Cytotoxicity is Enhanced by Metformin in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116 (10), 2334–2343.
- Kai, S. , 1982. Human Aldehyde Dehydrogenase: Mechanism of Inhibition by Disulfiram. *SCIENCE*, 216, 2–4.

- Kaku, T., Jiang, M. H., Hada, J., Morimoto, K. and Hayashi, Y. , 2001. Sodium nitroprusside-induced seizures and adenosine release in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 413 (2–3), 199–205.
- Kalantari, M., Kazemeini, M., Tabandeh, F. and Arpanaei, A. , 2012. Lipase immobilisation on magnetic silica nanocomposite particles: effects of the silica structure on properties of the immobilised enzyme. *Journal of Materials Chemistry*, 22 (17), 8385.
- Kim, J., Lee, J. E., Lee, J., Yu, J. H., Kim, B. C., An, K., Hwang, Y., Shin, C.-H., Park, J.-G. and Hyeon, J. K. and T. , 2006. Magnetic fluorescent delivery vehicle using uniform mesoporous silica spheres embedded with monodisperse magnetic and semiconductor nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 688–689.
- Kim, J. Y., Cho, Y., Oh, E., Lee, N., An, H., Sung, D., Cho, T. M. and Seo, J. H. , 2016. Disulfiram targets cancer stem-like properties and the HER2/Akt signaling pathway in HER2-positive breast cancer. *Cancer Letters*, 379 (1), 39–48.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., Shay, J. W., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. and Shay, J. W. , 1994. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *SCIENCE*, 266, 2011–2015.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., Petersen, D., Deitrich, R. A., Hurley, T. D. and Vasiliou, V. , 2012. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacological Reviews*, 64 (3), 520–539.
- Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C. and Beck, J. S. , 1992. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, 359 (6397), 710–712.
- Kumar, R., Chen, H., Escoto, J. L. V., Lin, V. S., March, R. V., Re, V., Recei, M. and June, V. , 2006. Template Removal and Thermal Stability of Organically Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles, (8), 4319–4327.
- Lai, J., Mu, X., Xu, Y., Wu, X., Wu, C., Li, C., Chen, J. and Zhao, Y. , 2010. Light-responsive nanogated ensemble based on polymer grafted mesoporous silica hybrid nanoparticles. *Chemical Communications*, 46 (39), 7370.
- Lai, J., Shah, B. P., Garfunkel, E. and Lee, K. , 2013. Versatile fluorescence resonance energy transfer-based mesoporous silica nanoparticles for real-time monitoring of drug release. *ACS Nano*, 7 (3), 2741–50.
- Lakomaa, E. L., Sato, S., Goldberg, A. M. and Frazier, J. M. , 1982. The effect of sodium diethyldithiocarbamate treatment on copper and zinc concentrations in rat brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 65 (2), 286–290.
- Lewis, D. J., Deshmukh, P., Tedstone, A. A., Tuna, F. and O'Brien, P. , 2014. On the interaction of copper(ii) with disulfiram. *Chemical Communications*, 50 (87), 13334–13337.
- Li, T., Shen, X., Chen, Y., Zhang, C., Yan, J., Yang, H., Wu, C., Zeng, H. and Liu, Y. , 2015. Polyetherimide-grafted Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles as theranostic agents for simultaneous VEGF siRNA delivery and magnetic resonance cell imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4279–4291.
- Li, T., Shen, X., Geng, Y., Chen, Z., Li, L., Li, S., Yang, H., Wu, C., Zeng, H. and Liu,

- Y. , 2016. Folate-Functionalized Magnetic-Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug/Gene Codelivery to Potentiate the Antitumor Efficacy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8 (22), 13748–13758.
- Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W. C. and Kummel, A. C. , 2014. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surface Science Reports*, 69 (2–3), 132–158.
- Liou, M.-Y. and Storz, P. , 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.*, 44 (5).
- Liu, P., Brown, S., Goktug, T., Channathodiyil, P., Kannappan, V., Hugnot, J.-P., Guichet, P.-O., Bian, X., Armesilla, A. L., Darling, J. L. and Wang, W. , 2012. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br. J. Cancer*, 107 (9), 1488–1497.
- Liu, P., Kumar, I. S., Brown, S., Kannappan, V., Tawari, P. E., Tang, J. Z., Jiang, W., Armesilla, A. L., Darling, J. L. and Wang, W. , 2013. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 109 (7), 1876–85.
- Liu, P., Wang, Z., Brown, S., Kannappan, V., Tawari, P. E., Jiang, W., Irache, J. M., Tang, J. Z., Armesilla, A. L., Darling, J. L., Tang, X. and Wang, W. , 2014. Liposome encapsulated Disulfiram inhibits NF κ B pathway and targets breast cancer stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 5 (17), 7471–7485.
- Liu, X., Chen, Q., Yang, G., Zhang, L., Liu, Z., Cheng, Z. and Zhu, X. , 2015. Magnetic nanomaterials with near-infrared pH-activatable fluorescence via iron-catalyzed AGET ATRP for tumor acidic microenvironment imaging. *J. Mater. Chem. B*, 3 (14), 2786–2800.
- Liu, X., Wang, L., Cui, W., Yuan, X., Lin, L., Cao, Q., Wang, N., Li, Y., Guo, W., Zhang, X., Wu, C. and Yang, J. , 2016. Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget*, 7 (36), 58516–58530.
- Lu, C., Bhatt, L. R., Jun, H. Y., Park, S. H. and Chai, K. Y. , 2012. Carboxyl–polyethylene glycol–phosphoric acid: a ligand for highly stabilized iron oxide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 19806–19811.
- Lu, Y., Yin, Y., Mayers, B. T. and Xia, Y. , 2002. Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through a Sol-Gel Approach. *Nano Letters*, 2 (3), 183–186.
- Luo, X., Wang, Y., Lin, H. and Qu, F. , 2016. DOX-Fe₃O₄ @mSiO₂-PO-FA nanocomposite for synergistic chemo- and photothermal therapy. *RSC Adv.*, 6 (113), 112232–112240.
- Ma, L.-J., Wang, X.-Y., Duan, M., Liu, L.-Z., Shi, J.-Y., Dong, L.-Q., Yang, L.-X., Wang, Z.-C., Ding, Z.-B., Ke, A.-W., Cao, Y., Zhang, X.-M., Zhou, J., Fan, J. and Gao, Q. , 2017. Telomere length variation in tumor cells and cancer-associated fibroblasts: potential biomarker for hepatocellular carcinoma. *The Journal of Pathology*, (October), 407–417.
- Ma, X., Zhao, Y., Ng, K. W. and Zhao, Y. , 2013. Integrated hollow mesoporous silica nanoparticles for target drug/siRNA co-delivery. *Chemistry - A European Journal*, 19 (46), 15593–15603.
- Maeda, H., Nakamura, H. and Fang, J. , 2013. The EPR effect for macromolecular drug

- delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (1), 71–79.
- Mahendra Kumar Trivedi. , 2015. Spectroscopic Characterization of Disulfiram and Nicotinic Acid after Biofield Treatment. *J Anal Bioanal Tech*, 6 (5).
- Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A. L., Colla, R., Ciucis, C. De, Marinari, U. M., Pronzato, M. A., Traverso, N., Domenicotti, C., Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A. L., Colla, R., Ciucis, C. De, Marinari, U. M., Pronzato, M. A., ... Domenicotti, C. , 2016. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–16.
- Mascolo, M. C., Pei, Y. and Ring, T. A. , 2013. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. *Materials*, 6, 5549–5567.
- McConville, C., Tawari, P. and Wang, W. , 2015. Hot melt extruded and injection moulded disulfiram-loaded PLGA millirods for the treatment of glioblastoma multiforme via stereotactic injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 494 (1), 73–82.
- McCrudden, C. and McCarthy, H. , 2013. Cancer gene therapy—key biological concepts in the design of multifunctional non-viral delivery systems. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/cancer-gene-therapy-key-biological-concepts-in-the-design-of-multifunctional-non-viral-delivery-syst>
- Metin, Ö., Aydoğan, Ş. and Meral, K. , 2014. A new route for the synthesis of graphene oxide-Fe₃O₄ (GO-Fe₃O₄) nanocomposites and their Schottky diode applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 585, 681–688.
- Mohapatra, S., Rout, S. R., Maiti, S., Maiti, T. K. and Panda, A. B. , 2011. Monodisperse mesoporous cobalt ferrite nanoparticles: synthesis and application in targeted delivery of antitumor drugs. *Journal of Materials Chemistry*, 21 (25), 9185.
- Möller, B. K., Kobler, J. and Bein, T. , 2007. Colloidal Suspensions of Nanometer-Sized Mesoporous Silica. *Advanced Functional Materials*, 17, 605–612.
- Mulay, I. L., Roy, R., Knox, B. E., Suhr, N. H. and Delaney, W. E. , 1971. Trace-Metal Analysis of Cancerous and Non- cancerous Human Tissues. *Journal of the National Cancer Institute*, 47 (1), 1–13.
- Najlah, M., Ahmed, Z., Iqbal, M., Wang, Z., Tawari, P., Wang, W. and McConville, C. , 2016. Development and characterisation of disulfiram-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of non-small cell lung cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 112, 224–233.
- Narvekar, M., Yi Xue, H., Young Eoh, J. and Lun Wong, H. , 2014. Nanocarrier for Poorly Water-Soluble Anticancer Drugs—Barriers of Translation and Solutions. *AAPS PharmSciTech*, 15 (4), 822–833.
- Nechushtan, H., Hamamreh, Y., Nidal, S., Gotfried, M., Baron, A., Shalev, Y. I., Nisman, B., Peretz, T. and Peylan-Ramu, N. , 2015. A phase IIb trial assessing the addition of disulfiram to chemotherapy for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer. *The Oncologist*, 20 (4), 366–7.
- NIH., 2015. *Cancer Types*. *National Cancer Institute*. Retrieved from

- <https://www.cancer.gov/types>
- Parker, N., Jo, M., Westrick, E., Je, V., Lewis, D., Low, P. S. and Leamon, C. P. , 2005. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay, 338, 284–293.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. and Langer, R. , 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2 (12), 751–760.
- Richardson, D. R. and Ponka, P. , 1997. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1331 (1), 1–40.
- Safari, J. and Zarnegar, Z. , 2014. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18 (2), 85–99.
- Sandberg, T., Rosenholm, J. and Hotokka, M. , 2008. The molecular structure of disulfiram and its complexation with silica. A quantum chemical study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 861 (1–3), 57–61.
- Sanna, V., Pala, N. and Sechi, M. , 2014. Targeted therapy using nanotechnology: Focus on cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 9 (1), 467–483.
- Science, W. of. , 2017. Citation Report. Retrieved December 8, 2017, from http://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=C3qWVnLyB3LV4jX8LpX&page=1&cr_pqid=1&viewType=summary&colName=WOS
- Shanehsazzadeh, S., Oghabian, M. A., Allen, B. J., Amanlou, M., Masoudi, A. and Daha, F. J. , 2013. Evaluating the effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for a long-term magnetic cell labeling. *Journal of Medical Physics*, 38 (1), 34–40.
- Sharma, R., Kumar, V., Bansal, S. and Singhal, S. , 2015. Assortment of magnetic nanospinels for activation of distinct inorganic oxidants in photo-Fenton's process. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 402, 53–63.
- Sheng-Nan, S., Chao, W., Zan-Zan, Z., Yang-Long, H., Venkatramana, S. S. and Zhi-Chuan, X. , 2014. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chin. Phys. B Vol.*, 23 (3), 37503-1-37503-19.
- Singh, R. and Lillard, J. W. , 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86 (3), 215–223.
- Soghoian, S. and Tarabar, A. , 2016. Disulfiram Toxicity. Retrieved January 6, 2016, from <http://emedicine.medscape.com/article/814525-overview>
- Song, W., Tang, Z., Lei, T., Wen, X., Wang, G., Zhang, D., Deng, M., Tang, X. and Chen, X. , 2016. Stable loading and delivery of disulfiram with mPEG-PLGA/PCL mixed nanoparticles for tumor therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12 (2), 377–386.
- Song, W., Tang, Z., Shen, N., Yu, H., YanjieJia, Zhang, D., Jiang, J., He, C., Tian, H. and Chen, X. , 2016. Combining disulfiram and poly(l-glutamic acid)-cisplatin conjugates for combating cisplatin resistance. *Journal of Controlled Release*, 231, 94–102.
- Steitz, B., Hofmann, H., Kamau, S. W., Hassa, P. O., Hottiger, M. O., von Rechenberg, B., Hofmann-Antenbrink, M. and Petri-Fink, A. , 2007. Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size

- distribution, colloidal properties and DNA interaction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311 (1 SPEC. ISS.), 300–305.
- Subastri, A., Durga, A., Harikrishna, K., Sureshkumar, M., Jeevaratnam, K., Girish, K. S. and Thirunavukkarasu, C. , 2016. Exploration of disulfiram dealings with calf thymus DNA using spectroscopic, electrochemical and molecular docking techniques. *Journal of Luminescence*, 170, 255–261.
- Suh, J. J., Pettinati, H. M., Kampman, K. M. and O'Brien, C. P. , 2006. The Status of Disulfiram. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 26 (3), 290–302.
- Sun, C., Lee, J. S. H. and Zhang, M. , 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (11), 1252–1265.
- Sun, S., Hao Zeng, D. B. R., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X. and Li, G. , 2004. Monodisperse MFe_2O_4 ($M=Mn, Fe, Co, Ni$ and Zn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 273–279.
- Sun, X., Sun, K. and Liang, Y. , 2015. Hydrothermal synthesis of magnetite: investigation of influence of aging time and mechanism. *Micro & Nano Letters*, 10 (2), 99–104.
- Suteewong, T., Sai, H., Lee, J., Bradbury, M., Hyeon, T., Gruner, S. M. and Wiesner, U. , 2010. Ordered mesoporous silica nanoparticles with and without embedded iron oxide nanoparticles: structure evolution during synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, 20 (36), 7807.
- Tawari, P. E., Wang, Z., Najlah, M., Tsang, C. W., Kannappan, V., Liu, P., McConville, C., He, B., Armesilla, A. L. and Wang, W. , 2015. The cytotoxic mechanisms of disulfiram and copper(II) in cancer cells. *Toxicol. Res.*, 4 (6), 1439–1442.
- Uyulur, F. , 2015. Mechanistic Investigation of the Inhibitory Disulfiram: Copper effect in S phase. Master, Medical Genetics, University of Glasgow.
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G. and Haisma, H. J. , 2011. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151 (3), 220–228.
- Vasir, J. K. and Labhasetwar, V. , 2005. Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4 (4), 365–374.
- Wan, L., Zhao, Q., Zhao, P., He, B., Jiang, T. and Zhang, Q. , 2014. Versatile hybrid polyethyleneimine – mesoporous carbon nanoparticles for targeted delivery. *Carbon*, 79, 123–134.
- Wang, C., Wang, X., Lu, T., Liu, F., Guo, B., Wen, N., Du, Y., Lin, H., Tang, J. and Zhang, L. , 2016. Multi-functionalized graphene oxide complex as a plasmid delivery system for targeting hepatocellular carcinoma therapy. *RSC Adv.*, 6 (27), 22461–22468.
- Wang, G., Zhang, X., Skallberg, A., Liu, Y. and Hu, Z. , 2015. Polyetherimide-grafted $Fe_3O_4@SiO_2$ nanoparticles as theranostic agents for simultaneous VEGF siRNA delivery and magnetic resonance cell imaging. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4279–4291.
- Wang, X., Zhou, L., Ma, Y., Li, X. and Gu, H. , 2009. Control of aggregate size of polyethyleneimine-coated magnetic nanoparticles for magnetofection. *Nano Research*, 2 (5), 365–372.
- Wang, Y., Wang, K., Zhang, R., Liu, X., Yan, X., Wang, J. and Al, W. E. T. , 2014. Synthesis of Core-Shell Graphitic Carbon@Silica Nanospheres with Dual-Ordered Mesopores for Cancer-Targeted Photothermochemotherapy. *ACS Nano*, 8

- (8), 7870–7879.
- Wang, Z., Tan, J., McConville, C., Kannappan, V., Tawari, P. E., Brown, J., Ding, J., Armesilla, A. L., Irache, J. M., Mei, Q.-B., Tan, Y., Liu, Y., Jiang, W., Bian, X. and Wang, W. , 2016. Poly lactic-co-glycolic acid controlled delivery of disulfiram to target liver cancer stem-like cells. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1–17.
- Wei, Z., Wu, Y., Zhao, Y., Mi, L., Wang, J., Wang, J., Zhao, J., Wang, L., Liu, A., Li, Y., Wei, W., Zhang, Y. and Liu, S. , 2016. Multifunctional nanoprobe for cancer cell targeting and simultaneous fluorescence/magnetic resonance imaging. *Analytica Chimica Acta*, 938, 156–164.
- WHO. , 2014. Cancer Country Profiles - Turkey. Retrieved from http://www.who.int/entity/cancer/country-profiles/tur_en.pdf?ua=1
- Wiggins, H. L., Wymant, J. M., Solfa, F., Hiscox, S. E., Taylor, K. M., Westwell, A. D. and Jones, A. T. , 2015. Disulfiram-induced cytotoxicity and endo-lysosomal sequestration of zinc in breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 93 (3), 332–342.
- Wu, W., He, Q. and Jiang, C. , 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3 (11), 397–415.
- Xu, Z., Shen, C., Hou, Y., Gao, H. and Sun, S. , 2009. Oleylamine as both reducing agent and stabilizer in a facile synthesis of magnetite nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 21 (9), 1778–1780.
- Yang, C., Guo, W., Cui, L., An, N., Zhang, T., Guo, G., Lin, H. and Qu, F. , 2015. Fe₃O₄@mSiO₂ core-shell nanocomposite capped with disulfide gatekeepers for enzyme-sensitive controlled release of anti-cancer drugs. *J. Mater. Chem. B*, 3, 1010–1019.
- Yang, H., Li, Y., Li, T., Xu, M., Chen, Y., Wu, C., Dang, X. and Liu, Y. , 2015. Multifunctional Core/Shell Nanoparticles Cross-linked Polyetherimide-folic Acid as Efficient Notch-1 siRNA Carrier for Targeted Killing of Breast Cancer. *Scientific Reports*, 4 (1), 7072.
- Yang, H.-M., Lee, H. J., Jang, K.-S., Park, C. W., Yang, H. W., Heo, W. Do and Kim, J.-D. , 2009. Poly(amino acid)-coated iron oxide nanoparticles as ultra-small magnetic resonance probes. *Journal of Materials Chemistry*, 19 (26), 4566.
- Yang, Y., Deng, Q., Feng, X. and Sun, J. , 2015. Use of the disulfiram/copper complex for breast cancer chemoprevention in MMTV-erbB2 transgenic mice. *Molecular Medicine Reports*, 12 (1), 746–752.
- Yin, P. T., Shah, S., Pasquale, N. J., Garbuzenko, O. B., Minko, T. and Lee, K. , 2016. Stem cell-based gene therapy activated using magnetic hyperthermia to enhance the treatment of cancer. *Biomaterials*, 81, 46–57.
- Yip, N. C., Fombon, I. S., Liu, P., Brown, S., Kannappan, V., Armesilla, A. L., Xu, B., Cassidy, J., Darling, J. L. and Wang, W. , 2011. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NFκB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *British Journal of Cancer*, 104 (10), 1564–74.
- Zhang, J., Li, X., Rosenholm, J. M. and Gu, H. , 2011. Synthesis and characterization of pore size-tunable magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 361, 16–24.
- Zhang, L., Jiang, Y., Jing, G., Tang, Y., Chen, X. and Yang, D. , 2013. A novel UPLC – ESI-MS / MS method for the quantitation of disulfiram , its role in stabilized

- plasma and its application. *Journal of Chromatography B*, 937, 54–59.
- Zhang, L., Tian, B., Li, Y., Lei, T., Meng, J., Yang, L., Zhang, Y., Chen, F., Zhang, H., Xu, H., Zhang, Y. and Tang, X. , 2015. A Copper-Mediated Disulfiram-Loaded pH-Triggered PEG-Shedding TAT Peptide-Modified Lipid Nanocapsules for Use in Tumor Therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7 (45), 25147–25161.
- Zhang, Z., Balogh, D., Wang, F., Sung, S. Y., Nechushtai, R. and Willner, I. , 2013. Biocatalytic release of an anticancer drug from nucleic-acids-capped mesoporous SiO₂ using DNA or molecular biomarkers as triggering stimuli. *ACS Nano*, 7 (10), 8455–8468.
- Zhdanov, D. D., Pokrovsky, V. S., Pokrovskaya, M. V., Alexandrova, S. S., Eldarov, M. A., Grishin, D. V., Basharov, M. M., Gladilina, Y. A., Podobed, O. V. and Sokolov, N. N. , 2017. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4⁺ T lymphocytes. *Cancer Medicine*, 6 (11), 2697–2712.
- Zhu, Y., Fang, Y. and Kaskel, S. , 2010. Folate-Conjugated Fe₃O₄@SiO₂ Hollow Mesoporous Spheres for Targeted Anticancer Drug Delivery. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114 (39), 16382–16388.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra SOLAK, 1993 yılında Erzurum’da doğdu. 2006-2010 yılları arasında Erzurum Lisesi’nde eğitim gördü. 2011 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2015 yılında mezun oldu. Stajını 2013 yılında Yeditepe Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü’nde nanobiyoteknoloji alanında yaptı. 2015 -2017 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini hâlen sürdürmektedir.

YAYINLARI

Solak K., Mavi A., Ergon T., Sezen A., Algur Ö.F. “Nanomaterials And The Microbial Sphere, Nanoscience and Nanotechnology Letters, 2016”

Chafik A., Essamadi A., Çelik S., Solak K., Mavi A. “Purification and characterization of glutathione peroxidase from erythrocytes of camel (*Camelus dromedarius*), (Kabul aldı), 2016”

BİLDİRİLERİ

Ünver Y., Kaysim M.G., Solak K., Işkil R., Kılıç D., Karakurt M.C., Fındıkkıran N.E. “Recombinant Honey Bee Prepromelittin Production by *Pichia pastoris*, International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences (ICANAS), 2016”

Akbaş N., Aydın T., Solak K., Cakir A., Mavi A., Adem Kara, Kazaz C. “*Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* Bitkisinin Metanol Ekstresi ve Saf Metabolitleri Helichrysin A ve Astragalinin İmmün Sistemdeki Rolü, BİHAT, 2016”

PROJELER

TÜBİTAK

2017-2018, Sülfanilamid Bağlanmış Manyetik Nanopartiküllerle ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Tyr-SA}$) Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırması (TÜBİTAK-117Z603). (Bursiyer, 6 ay).

2015-2016, YBCO Süper İletken Düzlemsel Mikrodalga Rezonatörünün Performansının İyileştirilmesi ve Fiziksel Özelliklerinin Araştırılması (TÜBİTAK-113R018). (Bursiyer, 12 ay).

KURUMSAL (BAP)

Catechin’in STING Aktivasyonuna Etkisi, (BAP-2015.412). (Araştırmacı). Başlama ve Bitiş Tarihi: 30.01.2016-30.01.2018.

Disulfiram Yüklenmiş Mezoporozsilika Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin İlaç Depolama Kapasitesi ve İlaç Salınım Kinetiği, (BAP-2015.202). (Araştırmacı). Başlama ve Bitiş Tarihi: 23.06.2015-23.06.2017.

