



**ALTIN NANOPARTİKÜL VE ALTIN
NANOPARTİKÜL/İNDİRGENMİŞ
GRAFEN OKSİT KOMPOZİT YAPILARININ
İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK
KANSER TEDAVİSİNDE KULLANIMI**

Abbas JAFARIZAD

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Bilim Dalı
Doç. Dr. Duygu EKİNCİ
Prof. Dr. Yadollah OMIDI**

2016

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ALTIN NANOPARTİKÜL VE ALTIN NANOPARTİKÜL/İNDİRGENMİŞ
GRAFEN OKSİT KOMPOZİT YAPILARININ İLAÇ SALIM SİSTEMİ
OLARAK KANSER TEDAVİSİNDE KULLANIMI**

Abbas JAFARIZAD

**KİMYA ANABİLİM DALI
Analitik Kimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2016**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KANSER TEDAVİSİ İÇİN İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK ALTIN
NANOPARTİKÜLLER VE ALTIN NANOPARTİKÜL/İNDİRGENMİŞ
GRAFEN OKSİT KOMPOZİT YAPILARI**

Doç. Dr. Duygu EKİNCİ danışmanlığında, Prof. Dr. Yadollah OMIDI'nin ortak danışmanlığında, Abbas JAFARİZAD tarafından hazırlanan bu çalışma, 12/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.**

Başkan : Doç. Dr. Mustafa Selman YAVUZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ümit DEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şakir AYDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ramazan ALTUNDAŞ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Önder METİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Duygu EKİNCİ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 25.03.2016 tarih ve 13/31 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

ALTIN NANOPARTİKÜL VE ALTIN NANOPARTİKÜL/İNDİRGENMİŞ GRAFEN OKSİT KOMPOZİT YAPILARININ İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK KANSER TEDAVİSİNDE KULLANIMI

Abbas JAFARIZAD

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Duygu EKİNCİ
Ortak Danışman: Prof. Dr. Yadollah OMIDI

KontROLSÜZ hücre gelişimi olarak ifade edilen hastalıkların bir sınıfını kapsayan kanser, dünya çapında en genel ölüm sebeplerinden birisidir. Kanser için en sık uygulanan tedavi, kanserli hücreleri öldürmek için ilaçların kullanıldığı kemoterapidir. Kemoterapi kanseri vücuttan uzaklaştırmak için çok etkili bir yöntem olmasına rağmen, halen çok ciddi yan etkilere sahiptir. Kemoterapinin yan etkileri, sağlıklı organlarda sitotoksik anti-kanser ilaçlarının zamanla organ zehirlenmelerine sebep olan birikmesine atfedilmektedir. Bu ciddi sorunu çözmek için şu an araştırmalar etki-tepki veren ilaç salım ajanlarının dizaynına odaklanmıştır. Günümüze kadar pH, ısı veya ışık dâhil olmak üzere farklı uyaranlara duyarlı bileşenler içeren salım araçlarının bir dizisi tasarlanmıştır. Son yıllarda, altın nanopartikül tabanlı ilaç salım sistemleri, düşük toksisite, eşsiz kimyasal/optiksel özellikler ve kolay hazırlanabilme gibi avantajları nedeniyle oldukça ilgi çekmektedirler.

Bu tez çalışmasında, seçilmiş kanser ilacının in-vitro salımına izin veren yeni bir nanoplatform geliştirmeyi amaçladık. Bu bağlamda öncelikle, mitoksantron (MTX) sonlu altın nanopartikül (SMTX-AuNPs) ve mitoksantron sonlu altın nanopartikül/indirgenmiş grafen oksit yapıları (SMTX-AuNPs/RGO) sentezlendi. Mitoksantron, sentetik ve DNA/RNA replikasyonunu önleyici bir ajandır. Üstelik meme ve beyin kanseri dâhil tümörlere karşı, çok etkili antikanser ilaçlarından biridir. Bu çalışmada, MTX ilacı tiyol bağlayıcı ile altın nanopartiküllere bağlandı. Daha sonra, fonksiyonlandırılmış Au nanopartiküller indirgenmiş grafen oksit (RGO) ile muamele edildi. Sonuç yapıları UV-vis absorpsiyon, FTIR, Raman, TEM, FESEM, AFM ve DLS gibi çeşitli analitik teknikler ile karakterize edildi. In-vitro çalışmalarında nöron, GBM hücreleri ve U-87MG kültürü kullanıldı. Kültürler MTT, RT-PCR, Dapi boyaması ve flow sitometri ile analiz edildi. Analizler, SMTX-AuNP'lerin saf MTX'e kıyasla daha anlamlı sonuçlar verdiğini gösterdi.

2016, 96 sayfa

Anahtar Kelimeler: MTX, meme kanseri, GBM, altın nanopartiküller, grafen, nanoteknoloji.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

GOLD NANOPARTICLES AND GOLD NANOPARTICLE/REDUCED GRAPHENE OXIDE COMPOSITE STRUCTURES AS DRUG DELIVERY SYSTEM FOR CANCER TREATMENT

Abbas JAFARIZAD

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Nanoscience and Nanotechnology

Nanomedicine Science

Supervisor: Doç. Dr. Duygu EKİNCİ

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Yadollah OMIDI

Cancer, a class of diseases characterized by out-of-control cell growth, is one of the most common causes of death in the world. Most frequent treatment for cancer is chemotherapy using drugs to destroy cancer cells. It is a very effective method of ridding the body of cancer; however, chemotherapy has the most severe side effects. The side effects of chemotherapy are attributed to accumulation of cytotoxic anti-cancer drugs in healthy organs which eventually cause organ toxicities over time. To address this serious issue, current research has focused on designing stimulus-responsive drug delivery agents. To date, an array of delivery vehicles was designed involving components that are responsive to different stimuli including pH, heat or light. In recent years, gold nanoparticle based drug delivery systems have attracted considerable attention due to their advantages such as low toxicity, unique chemical/optical properties and easy preparation.

In this thesis, we aim to develop a new nanopatform for the precise in vitro delivery of drug. First, mitoxantrone (MTX) terminated gold nanoparticles (SMTX-AuNPs) and mitoxantrone terminated gold nanoparticles/reduced graphene oxide (SMTX-AuNPs/RGO) structures were synthesized. Mitoxantrone is a syntetic drug and action by inhibition of DNA/RNA replication. Also, MTX are using against all type of cancer as well as breast and brain cancers. In this study, MTX drug are attached onto gold nanoparticles by thiol linker. Then, functionalized Au nanoparticles were in the proximity of the reduced graphene oxide (RGO). The resulting structures were characterized by several analytical techniques such as UV-vis absorption, FTIR, Raman, TEM, FESEM, AFM and DLS. During in-vitro studies, neuron, GBM cells and U-87MG culture wre used. Cultures were analyzed by MTT test, RT-PCR, Dapi staining and flow cytometry. Our results showed SMTX-AuNPs have greater effect on both cancer than pure MTX.

2016, 96 sayfa

Keywords: MTX, breast cancer, GBM, gold nanoparticles, graphene, nanotechnology.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi ve desteği benden esirgemeyerek, her an yanımda olan tez yöneticim ve değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Duygu EKİNCİ'ye sonsuz teşekkür ederek, kişisel ve akademik hayatta kendisine sağlıklar ve başarılar diliyorum.

Sayın Prof. Dr. Yadullah OMİDİ, Sayın Prof. Dr. Jale BARAR ve Nanobilim Tebriz Araştırma Merkezine deneyler sırasında destekleri için teşekkür ederim.

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU ve Sayın Dr. Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ bu tez çalışmasının uygulama kısımlarında büyük yardımlarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Sayın Doç. Dr. Önder METİN hocama ve Sayın Arş. Gör. Melike SEVİM'e partikül ve kompozit yapılarının üretiminde laboratuvar imkanlarını kullanıma açmaları ve sabırla yardımcı olmaları nedeniyle teşekkür ederim.

Her zaman bana umut ve öğütleri ile bir hayat yaşatan, dünyadan ayrılan rahmetli Annem Nesa hanımın ruhuna ve değerli Babam Ali beye sağlık ve sıhhat arzusuyla takdim eder teşekkür ederim.

Bu tezi, yanımda dimdik duran ve her zaman destekleriyle ilerlememi sağlayan eşim Azam'e ve çocuklarım Amir Reza oğluma ve Esmâ kızıma hediye ediyorum. Tezimin farklı kısımlarında yardımcı olan Kimya Bölümü ekip arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca ders döneminde ders aldığım Sayın Prof. Dr. Ümit DEMİR ve diğer hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sayın Prof. Dr. Ali Akber ENTEZAMİ İran Polimer Kimya babasına yüksek lisans tezimde danışmanlığımı üstlendiği için bu tezi bilge ruhlarını anarak teşekkür ve takdim ederim.

Abbas JAFARIZAD

Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETİ.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	36
3.1. Materyaller	36
3.1.1. Kimyasallar	36
3.1.2. 2,5-dioksopirolidin-1-yl 3-merkaptopropanoat sentezi (MP-NHS)	36
3.1.3. N-(2-((5,8-dihidroksi-4- ((2-((2-hidroksietil)amino)etil)amino)- 9,10- diokso-9,10- dihidroantrasen-1-yl) amino)etil)-N-(2-hidroksietil)- 3- merkaptopropanamid (SMTX) sentezi.....	37
3.1.4. Oleyilamin kaplı altın nanopartiküllerin (OAm-AuNPs) sentezi.....	38
3.1.5. Tiyol kaplı altın nanopartiküllerin (SMTX-AuNPs) sentezi	38
3.1.6. Merkaptopropionik asit kaplı altın nanopartiküllerin (MPA-AuNPs) sentezi	39
3.1.7. İndirgenmiş grafen oksit (RGO) sentezi	40
3.1.8. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezi	42
3.1.9. MPA-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezi	42
3.1.10. Hücre kültürü.....	43
3.1.11. Kanser kültürü	44
3.1.12. MTT ile sitotoksikite testi.....	46
3.1.13. Flow sitometri.....	46
3.1.14. RT PCR	47
3.2. Yöntemler.....	48
3.2.1. Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisi (UV-vis).....	48

3.2.2. İnfrared (IR) spektroskopisi	50
3.2.3. Raman spektroskopisi.....	51
3.2.4. X-Işınları kırınım (XRD) yöntemi	52
3.2.5. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	56
3.2.6. Enerji dağılımlı spektroskopi (EDS)	59
3.2.7. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	59
3.2.8. Gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC/MS).....	61
3.2.9. Temas açısı (Contact angle)	61
3.2.10. Zeta potansiyeli	62
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve BULGULAR.....	65
4.1. SMTX'in Sentezi ve Karakterizasyonu.....	65
4.2. Oleyilamin Kaplı Altın Nanopartiküllerin (OA-AuNPs) Sentezi ve Karakterizasyonu.....	67
4.3. Tiyoil Kaplı Altın Nanopartiküllerin (SMTX-AuNPs ve MPA-AuNPs) Sentezi ve Karakterizasyonu	69
4.4. İndirgenmiş Grafen Oksit (RGO) Sentezi ve Karakterizasyonu	73
4.5. SMTX-AuNPs/RGO ve MPA-AuNPs/RGO Kompozit Yapılarının Sentezi ve Karakterizasyonu	78
4.6. MCF7 Kültürü (Meme Kanseri) Bulguları.....	81
4.6.1. MTT Analiz Sonuçları.....	81
4.6.2. PCR Analizi.....	84
4.6.3. DAPI Boyaması.....	87
4.6.4. Flow Sitometri	88
4.7. U87-MG ve Nöron Kültürü Bulguları.....	89
5. SONUÇ	91
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	97

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
CHN	CHN analizi
DCC	N,N'-disikloheksilkarbonimid
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDS	Enerji Dağılımlı Spektroskopi
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptör
Et ₃ N	Trietilamine
FESEM	Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu
FITC	Floresin isotiyosiyanat
GBM	Glioblastoma Multiforme
Gc Mass	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
GO	Grafen oksit
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50
IR	İnfrared spektroskopisi
MPA	3-Merkaptopropiyonik asit
MRI	Manyetik Resonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetilldiazol-2-yl)-2,5 difenil-tetrazolium bromid
MTX	Mitoksantron
NHS	N-Hidroksisüksinimid
OAM	Oleil amin
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCR	Polimeraz Chin Reaction
PDI	Poli yayılmalılığı indeksi
PI	Poliyodid
RGO	İndirgenmiş grafen oksit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium

TCSK	Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TGA	Termo gravimetri analiz
TKASKD	Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği
UV-vis	Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi
XRD	X-Işınları Kırınım Yöntemi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanser çeşitleri ve sebeplerinin şematik gösterimi	2
Şekil 1.2. Beyin kanser dokusunun mikroskobik görüntüsü	4
Şekil 1.3. Kontrollü ilaç salım sisteminin şematik gösterimi	6
Şekil 1.4. Kanser tedavisinde nanoprobların EPR etkisi ile pasif ve aktif hedefleme yaklaşımları	7
Şekil 1.5. İlaç salımı için kullanılan farklı taşıyıcılar	9
Şekil 1.6. İlaç salımı için (a) manyetik, (b) silika ve (c) altın nanoyapılarının gösterimi	10
Şekil 1.7. Nanopartiküllerin elektriksel alan ile etkileşimi.....	11
Şekil 1.8. AuNP'lerin partikül boyutuna bağlı olarak dalga boyu ve rengindeki değişim	12
Şekil 1.9. Nanoçubuk yapısına sahip altın nanopartiküllerinin UV-vis absorpsiyon spektrumu	12
Şekil 1.10. (a) 20, (b) 40 ve (c) 80 nm çapa sahip Au nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumu	13
Şekil 1.11. Kimyasal yöntemler ile Au nanopartiküllerin sentezi	14
Şekil 1.12. Tiyol molekülleri ile stabilize edilmiş Au nanopartiküllerin sentezi	16
Şekil 1.13. Biyosensörler, fototermal terapi, doku mühendisliği, ilaç salımı ve biyo görüntüleme gibi çeşitli biyouygulamalar için grafen/nanopartikül kompozit yapılarının kullanımı	17
Şekil 1.14. Grafen tek tabakasının mikromekaniksel ayrıştırma ile üretimi.....	18
Şekil 1.15. Kimyasal buhar depozisyon yöntemi ile grafen sentezi	19
Şekil 1.16. SiC'ün ısıtılması ile grafen sentezi	20
Şekil 1.17. Grafit tabakalarının farklı uygulamalar ile ayrıştırılması	20
Şekil 1.18. Grafen oksitin indirgenmesi ile grafen sentezi	21
Şekil 2.1. Cis-platin anti kanser ilacı içeren altın nanopartiküller	24
Şekil 2.2. Altın nanopartiküller için kaydedilen UV-vis spektrumları. Bordo renk 25 nm partikül (çizgili ilaçsız, düz ilaçlı), yeşil renk 50 nm partikül	

(çizgili ilaçsız, düz ilaçlı) ve turuncu renk 90 nm partikül (çizgili ilaçsız, düz ilaçlı)	25
Şekil 2.3. Tamoksifen-PEG-tiyol-Au üretim protokolü.	26
Şekil 2.4. Dark scattering mikroskopla çekilen görüntüde reseptör ve partikülün etkileşimi gösterilmektedir.	26
Şekil 2.5. Fe ₃ O ₄ -MTX nanopartiküllerinin sentezi.....	28
Şekil 2.6. AuNCs-PLGA-GPPS-FA parçacıklarının hazırlanması.....	29
Şekil 2.7. İndirgenmiş grafen (RGO) oksit/altın nanoyıldız kompozit yapısının ilaç taşıma sistemi olarak kullanımı	30
Şekil 2.8. İlaç salımı için hazırlanan altın nanopartiküller	31
Şekil 2.9. İlaç salımı için hazırlanan altın nanopartiküller ve hücreler ile etkileşimi.....	31
Şekil 2.10. İlaç salımı için hazırlanan altın ve karbon hibrit materyali	32
Şekil 2.11. Platin tabanlı antikanser ilacının salımı için hazırlanan altın nanopartiküller	33
Şekil 2.12. IM antikanser ilacının salımı için hazırlanan altın nanopartiküller	33
Şekil 2.13. Porfirin halkaları ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller	34
Şekil 2.14. Porfirin halkaları ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller ve hücrelerde kullanımı.....	35
Şekil 3.1. Grafitin ön oksidasyon işleminin şematik gösterimi	40
Şekil 3.2. Grafit oksit sentezinin şematik gösterimi	41
Şekil 3.3. İndirgenmiş grafen oksit sentezinin şematik gösterimi	42
Şekil 3.4. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezinin şematik gösterimi.....	42
Şekil 3.5. MPA-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezinin şematik gösterimi	43
Şekil 3.6. Nöron hücre kültür görüntüsü.....	44
Şekil 3.7. U-87MG ve MCF7 hücrelerinin görünümü.....	45
Şekil 3.9. Moleküler absorpsiyon cihazları için genel bir şema	49
Şekil 3.10. Bir X-ışını tüpünün şeması	52
Şekil 3.11. (a) Bir kristal düzleminde X-ışını kırınımının meydana gelişi ve (b) kırınım olayında X-ışınlarının aldığı yolların uzunlukları arasındaki farkların ayrıntılı bir şekilde gösterimi	54
Şekil 3.12. AFM (Atomik kuvvet mikroskop) sisteminin şematik görünüşü	57
Şekil 3.13. Geçirimli elektron mikroskobu.....	60

Şekil 3.14. Temas açısı ölçümleri için kullanılan cihaz	62
Şekil 3.15. Kolloidal çözeltilerin şematik gösterimi.....	63
Şekil 3.16. Kararlı kolloidal çözeltilerin oluşumu	63
Şekil 3.17. Kolloidal partiküllerin yapısı	64
Şekil 4.1. Mitoksantron sonlu tiyol molekülünün sentez prosedürü.....	65
Şekil 4.2. MP-NHS ve SMTX molekülleri için alınan FTIR spektrumları	66
Şekil 4.3. MP-NHS ve SMTX molekülleri için alınan GC-MS spektrumları	67
Şekil 4.4. OAm-AuNP'ler için alınan (a) UV-vis absorpsiyon, (b) TEM, (c) XRD ve (d) DLS analiz sonuçları	68
Şekil 4.5. OA ve OA-AuNPs için alınan FTIR spektrumları	69
Şekil 4.6. OAm-AuNPs ve SMTX-AuNPs için alınan Raman spektrumları	70
Şekil 4.7. SMTX-AuNP'ler için alınan (a) UV-vis absorpsiyon, (b) TEM ve (c) DLS analiz sonuçları	71
Şekil 4.8. MPA-AuNP'ler için alınan UV-vis absorpsiyon spektrumu	72
Şekil 4.9. MPA-AuNPs ve SMTX-AuNPs yapıları için alınan FTIR spektrumları	73
Şekil 4.10. GO ve RGO için alınan FTIR spektrumları.....	74
Şekil 4.11. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan Raman spektrumları.....	75
Şekil 4.12. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan TGA grafikleri	76
Şekil 4.13. (a) Grafit (G), (b) grafen oksit (GO) ve (c) indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan temas açısı ölçümleri	77
Şekil 4.14. (a) Grafit (G), (b) grafen oksit (GO) ve (c) indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan FE-SEM görüntüleri	78
Şekil 4.15. İndirgenmiş grafen oksit (RGO), SMTX-AuNPs ve SMTX-AuNPs/RGO için alınan Raman spektrumları.....	79
Şekil 4.16. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için alınan TEM görüntüsü	79
Şekil 4.17. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için alınan AFM görüntüsü.....	80
Şekil 4.18. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için alınan DLS spektrumu.....	80
Şekil 4.19. MTT analizinde sonuçların od hesaplamasının yapılması	82
Şekil 4.21. 24 saat ve 48 saat MTT analiz sonuçları	83
Şekil 4.22. 4, 24 ve 48'inci saatde yapılan MDR ekspresyonu	84

Şekil 4.23. 4, 24 ve 48'inci saatde yapılan BAX ekspresyonu	85
Şekil 4.24. 4, 24 ve 48'inci saatde yapılan BCL2 ekspresyonu.....	86
Şekil 4.25. DAPI boyaması.....	87
Şekil 4.26. DNA ladder görüntüsü.....	88
Şekil 4.27. Flow sitometri sonuçları	88
Şekil 4.28. Nöron kültürü MTT analizi	89
Şekil 4.29. U87-MG kültürü MTT analizi	90



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için XRD spektrumlarından belirlenen sonuçlar.	76
Çizelge 4.2. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için belirlenen elementel analiz sonuçları.....	77
Çizelge 4.3. SMTX-AuNPs ve SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapıları için alınan DLS spektrum analiz sonuçları.....	81

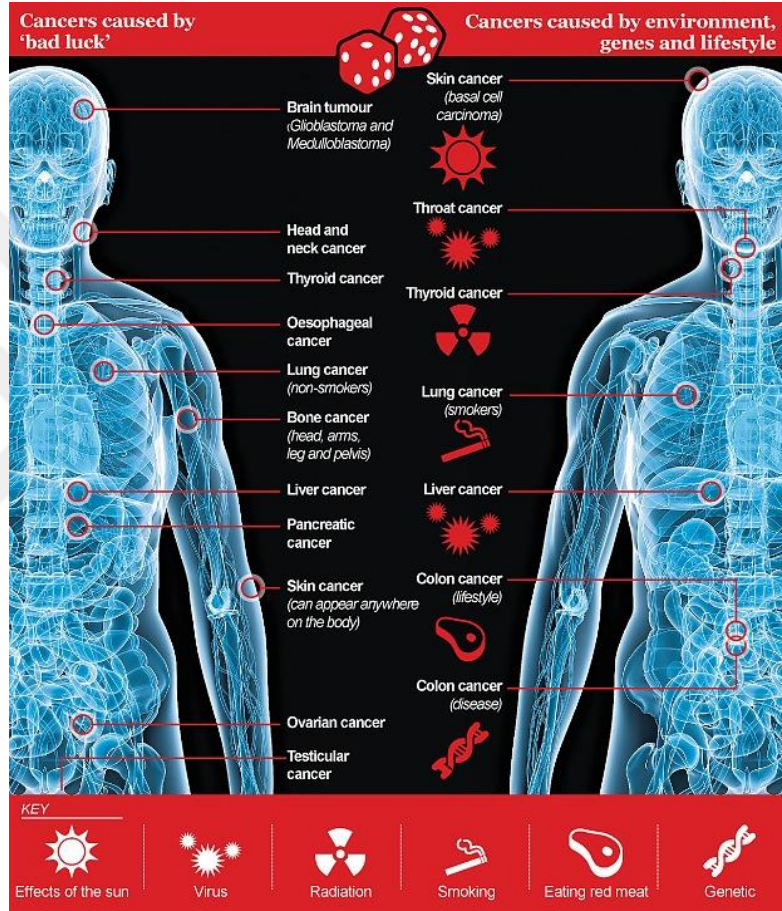
1. GİRİŞ

Kanser, sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle, çağımızın en önemli halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre 2012 yılında dünya genelinde 14.1 milyon kişiye kanser teşhisi konulurken, bu rakamın 2030 yılında 32.6 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de kanser görülme sıklığı incelendiğinde ise, kanser insidansı, yüz binde erkeklerde yaklaşık 280, kadınlarda ise yaklaşık 172 olarak belirtilmektedir. Bu da ülkemizde her yıl yaklaşık 170 bin yeni kanser hastasının teşhis edildiği anlamına gelmektedir. Eski kanser hastalarının varlığı da hesaplandığında, sağlık hizmetlerinin her basamağının planlanmasında kanser probleminin ciddi anlamda ele alınması gereği ortaya çıkmaktadır.

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Organizmanın temel yapı taşı olan sağlıklı hücreler, belirli bir hızda ve kontrol altında bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla, hücreler bu yeteneklerini kullanırlar. Ancak, sağlıklı hücreler sonsuza kadar bölünemezler; hücrelerin bölünebilme yetenekleri sınırlıdır. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve ona taksim edilen sayı kadar bölüneceğini bilir. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybederler ve kontrolsüz bölünme ile çoğalırlar. Normal olmayan şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler, kısa sürede bulundukları yerdeki doku ve organları işgal edecek tümörlerin (kitlelerin) oluşumuna neden olurlar. Tümörler normal dokuları sıkıştırabildiği gibi, içlerine sızarak onları tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir.

Kanserın sebebi henüz kesin olarak bilinmemektedir. Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü vardır ve bu risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine

bağlı olarak değişir. Bir başka risk grubu ise çevresel faktörlerdir. Çevresel faktörler, sigara/alkol kullanımı, uzun süre ve tehlikeli saatlerde güneş altında kalma, aşırı dozda röntgen ışınına maruz kalma, bazı kimyasal maddeler, bazı virüsler, hava kirliliği ve kötü beslenme alışkanlığı olarak sınıflandırılabilir.



Şekil 1.1. Kanser çeşitleri ve sebeplerinin şematik gösterimi (Knapton 2015)

Kanserler, oluşmaya başladıkları organ ve mikroskop altındaki görünüşlerine göre gruplandırılırlar (Şekil 1.1). Dünya genelinde en sık görülen kanser tipleri, akciğer (1.8 milyon, % 13.0), meme (1.7 milyon, % 11.9) ve kalın bağırsak (1.4 milyon, % 9.7) kanseridir. Kanser ölümlerinin en çok rastlandığı kanser tipleri ise, akciğer (1.6 milyon, % 19.4), karaciğer (0.8 milyon, % 9.1) ve mide (0.7 milyon, % 8.8) kanseridir.

2012 yılında, 8.2 milyon insan kanserden dolayı hayatını kaybetmiştir. Bu ölümlerin %8.1'ine, kanser tipleri arasında ikinci sırada yer alan meme kanseri sebep olmaktadır. Hayatını, kanser yüzünden kaybeden bayanlar arasında ise, meme kanseri %23'lük bir orana sahiptir. Amerika'da, her 100 bin bayandan 124.3'ü göğüs kanserine yakalanmışken; Türkiye ve İran'da bu oran sırasıyla 40.6 ve 23.5 ile daha düşük bir seviyededir. Ancak, her iki ülkede de bayanlardaki ölüm sebepleri içerisinde birinci sırada meme kanseri bulunmakta ve meme kanserinin oranı özellikle son on yıl içinde hızla artmaktadır.

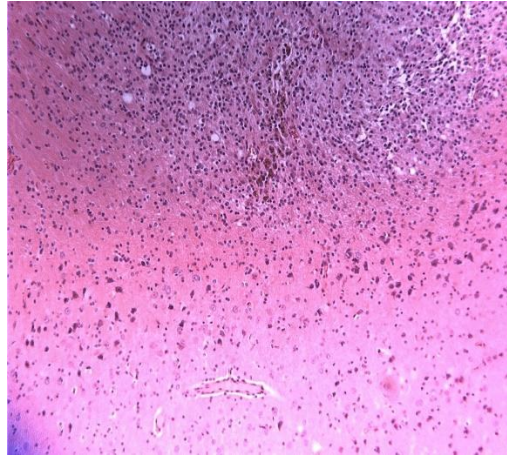
Genellikle kadınlara özgü bir hastalık gibi düşünülen meme kanseri, aslında erkeklerinde dikkat etmesi gereken bir kanser türüdür. Her yıl yaklaşık yüzbin erkekten birine meme kanseri tanısı konmaktadır. Üstelik erkeklerin kitleyi yağ bezesi olarak düşünmeleri ve çok az erkeğin durumun farkına varması nedeniyle, hastalık tanısı erkeklerde kadınlara göre daha geç konmaktadır. Bu nedenle, kanser tanısı konduğunda hastalık genellikle ilerlemiş olur, tedavisi zorlaşır ve ölüm kaçınılmaz bir sonudur.

Göğüs kanserinin oluşumu, meme hücrelerinin anormal bölünmesinden veya vücudun başka yerlerinde pasif olan kanserli hücrelerin, metastaz yardımıyla göğüs bölgesine gelip aktifleşmelerinden kaynaklanmaktadır. Meme kanserinin belirtileri, göğüs ucundan normalde veya küçük basınç uygulamasıyla kan ve benzeri sıvıların gelmesi, göğüste ağrısı olmayan bir tümör varlığı, renk değişikliği, simetrisinde veya boyutunda bozulmalar ve nefes almada zorluk olarak sıralanabilir.

Meme kanserine kıyasla daha az görülen (100 bin kişide 3.8 ile 5.1 arasında), ancak 35 yaşın altındaki kişiler arasında kanser ölümlerinin başlıca nedenlerinden birisi olan bir diğer kanser türü ise beyin kanseridir. Beyin kanseri, ya beyinde direkt başlayarak yada vücudun herhangi bir yerindeki başka bir kanserli hücrenin kopması ve kan dolaşımı ile seyahat ederek beyne ulaşması ile oluşur. Beyinde başlayan kanserler birincil beyin tümörleri olarak adlandırılırken; vücudun başka bir yerinden beyine yayılmış olan kanserler ise ikincil beyin tümörleri olarak adlandırılırlar (Ohgaki and Kleihues 2009).

Akciğer, meme, böbrek, mide, bağırsak ve cilt kanseri beyine yayılabilen kanser türleridir.

Neredeyse 100 farklı beyin tümörü bulunmaktadır ve bunlar genellikle geliştikleri hücrenin adı ile anılmaktadırlar. En yaygın görülen tür, sinir hücrelerini destekleyen gliyal hücrelerde gelişen ve gliyoma (glioblastoma multiforme, GBM) olarak adlandırılan beyin tümörüdür. Beyin tümörleri ne hızla geliştiklerine bağlı olarak derecelendirilmektedirler. Mikroskop altında bakıldığında (Şekil 1.2), tümör ne kadar anormal görünüyorsa o kadar hızlı gelişir ve daha yüksek bir dereceye sahip olur. Pratik bir kural olarak, düşük dereceli tümörler iyi huylu ve yüksek dereceli olanlar ise kötü huylu olarak kabul edilirler. İyi huylu tümörler alındıktan sonra çok nadiren tekrarlar ve yayılırlar. Ancak, tümör her ne kadar iyi huyluda olsa beyinde bulunduğu bölge hayati önem taşıyan bir bölge ise ameliyat sonrası sonuçlar maalesef yüz güldürücü olmayabilir. Kötü huylu tümörler ise çok hızlı ilerleyen, çamur kıvamında ve operasyonla alınması oldukça zor olan tümörlerdir. Tamamen alınsalar bile belli bir süreçten sonra tekrar nüksederler ve beynin diğer kısımlarına hatta omuriliğe kadar yayılabilirler.



Şekil 1.2. Beyin kanser dokusunun mikroskopik görüntüsü (Angelov *et al.* 1998)

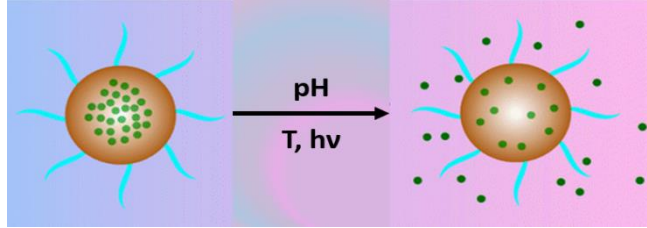
Beyin tümörü birçok kanserde olduğu gibi yaygın olarak daha ileri yaşta görülmektedir, ancak bazı spesifik tipleri daha genç kişilerde daha yaygındır (Fujisawa *et al.* 2000;

Ohgaki *et al.* 2007). Genellikle 9 yaş altı ve 55 yaş üstü daha sıklıkla görülen beyin kanserlerine beyaz ırkta ve erkeklerde daha çok rastlanır (Ostrom *et al.* 2013). Her 100 beyin tümörünün %5'i genetik doğa ile ilişkilidir (Larsen *et al.* 2010; Watts *et al.* 2014). Eğer ebeveyniniz, erkek yada kız kardeşiniz sinir sisteminde tümör tanısı almışsa, sizin beyin tümörü riskinizde diğer insanların yaklaşık iki katıdır.

Klinikte, beyin tümörü teşhisi konulmuş olan hastalarda görülen ilk belirtiler: artmış kafa içi basıncı, baş ağrısı, nörolojik bozukluklar, bulantı, kusma, görsel bozukluklar (örneğin çift görme, odaklanma bozuklukları), hafıza kaybı, motor işlev bozukluğu (kısmi felç, ayakta durmakta zorluk), konuşma bozuklukları (kekeleme, cümle kurma bozuklukları), kişilik değişikliği ve nöbetlerdir. Bu belirtiler kanser kitlesinin yerleşmiş olduğu bölgeye göre değişmektedir.

Halen tüm mekanizmaları tam olarak anlayamamış olan kanser hastalığının aydınlatılması ve her evrede tedavisinin mümkün hale gelmesi için, dünya çapında yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Kanserde yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri, cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve biyolojik tedavi yöntemleri olarak sınıflandırılabilir. Tümörün büyüklüğü, bulunduğu bölge ve hastalığın evresine bağlı olarak tercih edilen bu tedavi stratejileri arasında, kemoterapi bir çok kanser türü için en sık uygulanan tedavi yöntemlerinden biridir. En basit şekliyle kanser hücrelerinin ilaçlarla öldürülmesi olarak tanımlanan kemoterapi, tek başına yada diğer metotlar ile birlikte kullanıldığında, tümör büyümesini anlamlı ölçüde etkileyebilen ve belki de çare üretebilen bir tekniktir. Ancak, antikanser ilacının spesifik olmayan dağılımı ve sistemik toksisite gibi ciddi yan etkiler, kemoterapiyi başarısız kılmaktadır (Peer *et al.* 2007). Bu sorunlar, daha güvenli, hedefe odaklı ve etkili ajanların tasarımı ve geliştirilmesi için bilim adamlarını teşvik etmiştir. Bu bağlamda, yalnızca kanserli hücreyi hedefleyen *akıllı ilaç salım sistemleri* onların gelişmiş tedavi etkinliği ve azalan yan etkileri nedeniyle son yıllarda oldukça cazip ve heyecan uyandıran disiplinlerarası bir alan olmuştur (Moore *et al.* 2009; Wong *et al.* 2015). Zamanın doğru periyotlarında, doğru konsantrasyonlarda, doğru yerde ilacın salımını sağlayan ilaç salım sistemleri (Şekil 1.3), implante elektronik aygıtlardan polimer tabanlı malzemelere, günümüzde ise

nanoteknolojinin gelişmesiyle nanopartiküllere, nanokapsüllere kadar yayılan geniş bir çeşitliliğe sahiptirler.



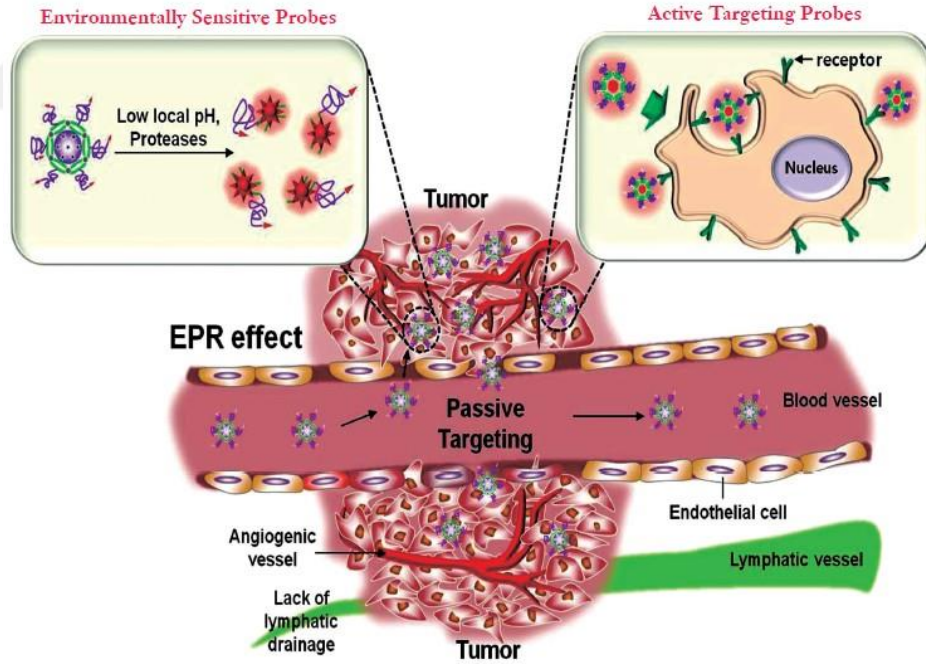
Şekil 1.3. Kontrollü ilaç salım sisteminin şematik gösterimi (Gao *et al.* 2010)

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin geçmişi 1800’lü yıllara dayanmakta olup, ilk basit implantlar etkin maddenin sıkıştırılması ile deri altına yerleştirilen pelletler halinde hazırlanmıştır. İlk nanopartikül ilaç taşıyıcı sistem ise 1969 yılında Speiser ve Birrenbach tarafından geliştirilmiştir (Kreuter *et al.* 2007; Park *et al.* 2008). Speiser ve Birrenbach o tarihlerde laboratuvarlarında sulu fazda monomerleri polimerize ederek misel kesecikleri oluşumu ile aşı ve antineoplastik etkin maddeleri için taşıyıcı sistemleri test etmişlerdir. 1980’li yıllara gelindiğinde ise nano ilaç salım sistemleri, düşük toksisite ve yüksek kemoterapi etkisi gösteren çalışmalar ile kanser terapi üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır (Grislan *et al.* 1983).

Kanserli tümörde damar gelişimi, hızlı hücre gelişiminin bir sonucu olarak düzenli değildir ve bu durum tümörün çevresinde kusurlu bir damar sisteminin oluşumuyla sonuçlanır (Szakacs *et al.* 2006). Söz konusu olan bu damar anormallikleri, poröz endotelyum ve kusurlu lenfatik drenaj sistemi ile birlikte, mimari kargaşanın bir sonucu olarak tümörün heterojen kan besleme ve yüksek doku iç basıncı gibi karakteristikler sergilemesine neden olur. Bu kusurlu yapı, tümör içerisinde yüksek molekül ağırlığına sahip makromoleküller veya kolloidal terapötiklerin yığılması ve tutunması için önemli bir fırsat sağlar (Iyer *et al.* 2006). Böylece rasgele difüze olabilen serbest ilaçlardan farklı olarak, polimerler ve nanopartiküller katı tümörleri pasif bir şekilde hedefleyebilirler. Bu olay artan geçirgenlik ve tutma etkisi (enhanced permeability and retention effect, EPR) olarak isimlendirilir (Şekil 1.4) (Pastan *et al.* 1987; Maeda *et al.*

1989; Brannon *et al.* 2012). EPR etkisi ile salımın birkaç günü içinde normal dokuda bulunan kinden 10-50 kat daha yüksek ilaç konsantrasyonunu başarmak mümkündür.

2005 yılında, Abraxane ticari pazara girmek için A.B.D. Gıda ve İlaç İdaresi (the U.S. Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanan ilk pasif nanopartikül olmuştur (Nordqvist *et al.* 2013). Abraxane, kanserin çeşitli türlerinin tedavisi için anti-kanser ilacı Paclitaxel'in salımında kullanılan nanopartikül esaslı insan albüminidir. Abraxane, onun serbest haline kıyasla klinik uygulamalarda, EPR etkisi sonucu iyi sonuç veren, ümit verici bir ilaç salım sistemi olarak ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar, Abraxane ve geleneksel kemoterapinin bir kombinasyonu ile tedavi edilen pankreas kanseri hastalarında bir yıllık süreç içinde sağ kalımın %59 arttığını göstermiştir.



Şekil 1.4. Kanser tedavisinde nanoprobların EPR etkisi ile pasif ve aktif hedefleme yaklaşımları (Park *et al.* 2012)

Belirlenen klinik faydalarına rağmen EPR etkisinin birkaç sınırlaması vardır (Jain *et al.* 1994; Gottesman *et al.* 2002). Bu sınırlamalar ilaç direnci, partikül tutunmasını kontrol

etmedeki zorluk ve tümör dokusu içinde damarların heterojen geçirgenliği olarak sınıflandırılabilir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için pasif hedeflemeye alternatif bir yaklaşım olarak aktif hedefleme geliştirilmiştir. Aktif hedefleme, spesifik hücre popülasyonunu açığa çıkaran antijenler veya reseptörler ile bağlanma ve etkileşmeyi artıran nano taşıyıcının yüzeyi üzerinde spesifik moleküllerin varlığı ile başarılabılır (Tauro *et al.* 2005). Kanser terapi için araştırılan hedef ligandlar antikorlar (Hellebrekers *et al.* 2000), vitaminler (Vrijland *et al.* 2003) ve peptitlerdir (Hill *et al.* 1995). Uygun ligandın seçimi onun spesifikliği ve stabilitesine dayanır. Aktif hedefleme, tümörler içinde hedef hücreleri ile spesifik etkileşmenin bir sonucu olarak, pasif hedeflemeyi tamamlar.

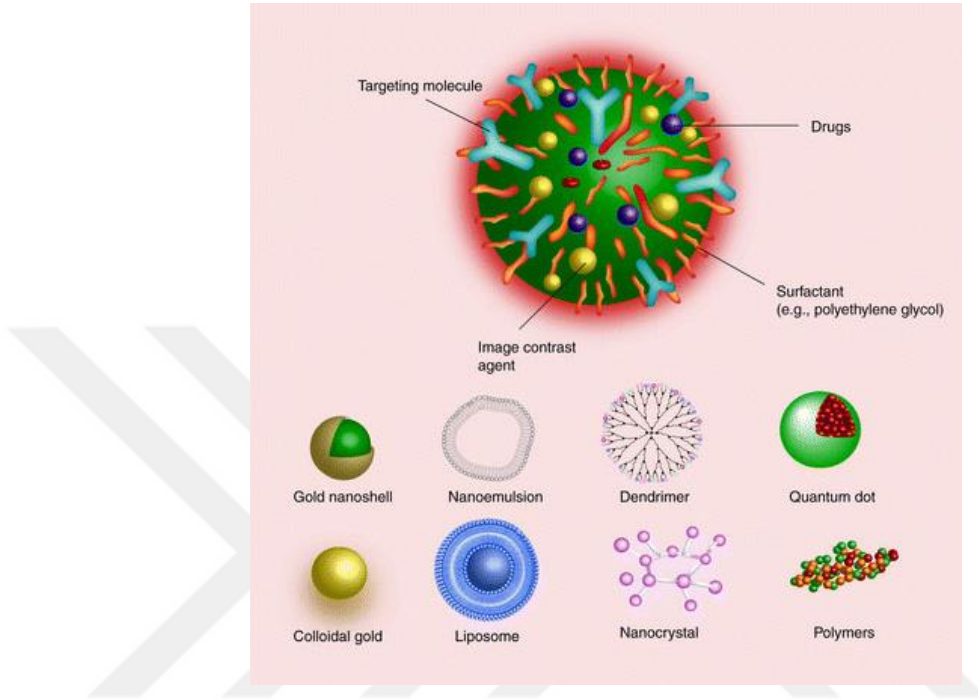
Nanopartiküller kolloidal ilaç salım sistemleri içinde artan bir şekilde baskın bir yer tutar (Brigger *et al.* 2002; Allen *et al.* 2004; Burgess *et al.* 2010). Polimer-ilâç konjugatlar, dendrimerler, miseller, lipid ve polimerik keseler ve nano kapsülleri içeren alternatif taşıyıcılarda bilimsel ve klinik araştırmaların konusudur (Şekil 1.5) (Zhang *et al.* 2008). Nanopartiküller 10-1000 nm arasında çapa sahip, içerisine ilacın yakalandığı, kapsülle çevrildiği veya yüzey üzerine adsorplandığı tek bir materyalden oluşan katı kolloidal ilaç taşıyıcılardır.

İdeal olarak bir nanopartikül ilaç taşıyıcı mümkün olduğu kadar

- biyouyumluluk,
- toksin olmayan parçalanma ürünleri,
- kolay ve maliyet etkili hazırlanabilme,
- ilacın partikül yüzeyine yüksek oranda yüklenmesi,
- optimum boyut
- kontrollü ve tümöre spesifik ilaç salımı özelliklerinin birçoğuna sahip olmalıdır.

Bu faktörler dikkate alındığında manyetik nanopartiküller (Yang *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015), karbon nanotüpler (Bianco *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2011), altın nanoyapılar (Kumar *et al.* 2013; Parween *et al.* 2013; Ajnai *et al.* 2014) veya silika nanopartiküller

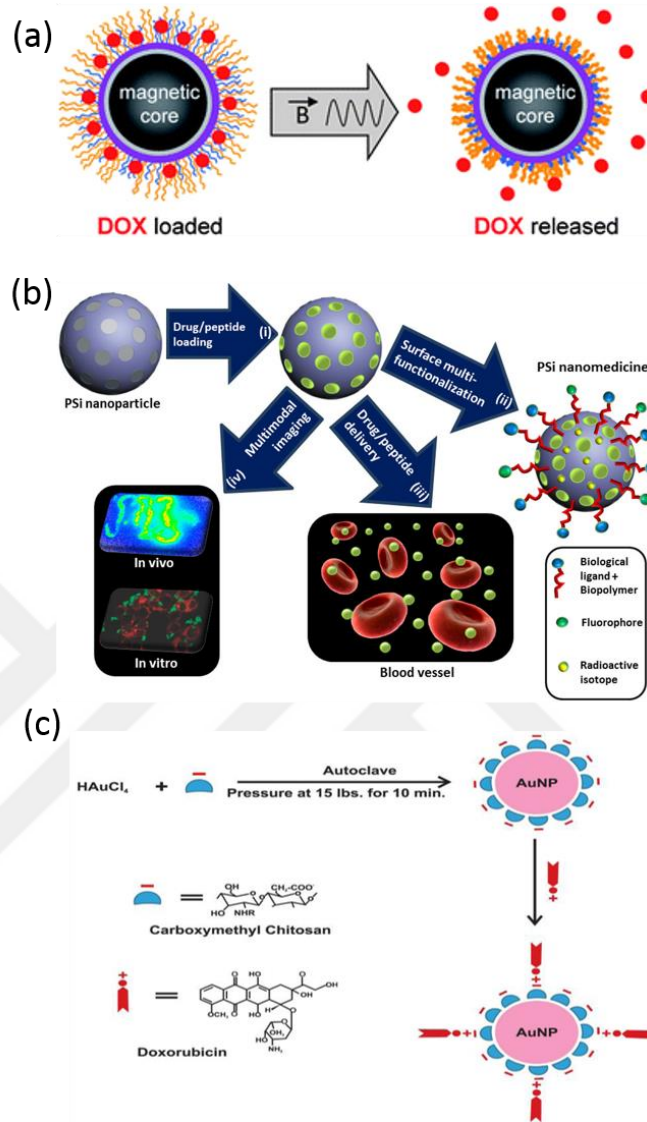
(Slowing *et al.* 2008; Argyo *et al.* 2014) gibi çeşitli nanopartikül sistemleri ilaç salımı için platform olarak kullanılabilir (Şekil 1.6).



Şekil 1.5. İlaç salımı için kullanılan farklı taşıyıcılar

Bu grup içerisinde, altın nanopartiküller (AuNPs) toksin olmamaları, biyoyumlu olmaları ve kolayca sentezlenebilmeleri nedeniyle kemoterapi salım sistemleri olarak özellikle ilgi çekicidir.

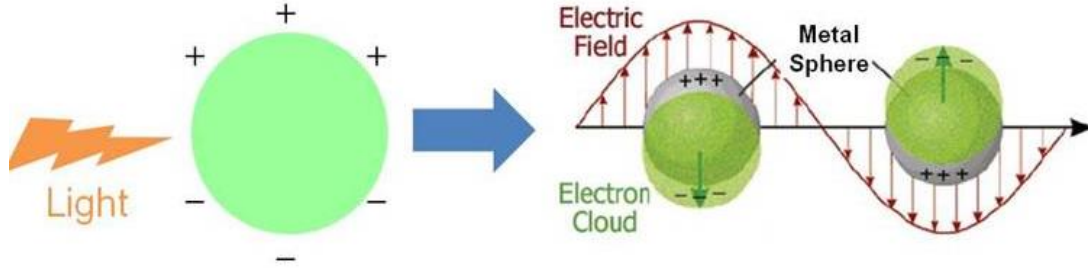
Altın nanopartiküller, kolloidler ve yüzey bilimi alanında yeni bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır. Michael Faraday'ın deneyleri ile başlayan bu alan (Faraday *et al.* 1857), Richard Adolf Zsigmondy tarafından zayıf alkali çözelti içerisinde formaldehitin, altın tuzunu indirgeyerek altın kolloidal çözeltilerinin hazırlandığı çalışma ile devam etmiştir (Zsigmondy *et al.* 1926).



Şekil 1.6. İlaç salımı için (a) manyetik, (b) silika ve (c) altın nanoyapılarının gösterimi

AuNP'leri ilginç kılan en önemli özellik, partiküllerin sergiledikleri yüzey plazmon rezonans (surface plasmon resonance, SPR) davranışıdır. Yüzey plazmon rezonans (SPR) etki, elektromanyetik bir dalga soy metal nanopartikülü ile etkileştiği zaman, nanopartikülün yüzeyindeki elektronların elektromanyetik alanın yönüne göre yüzeyin bir tarafında toplanmasıdır (Şekil 1.7). Bu elektromanyetik dalganın frekansının maksimumuna yüzey plazmon rezonans (SPR) bandı denilmektedir. Altın, gümüş ve bakır nanopartiküller görünür bölgede güçlü bir SPR piki verirken; diğer nanopartiküller UV bölgesinde geniş ve zayıf pikler göstermektedirler. Altın

nanopartiküllerin SPR piki partikül boyutu ve şekline bağlı olarak 520 nm'den 800 nm'ye kadar çok değişik dalga boylarında görülmektedir.



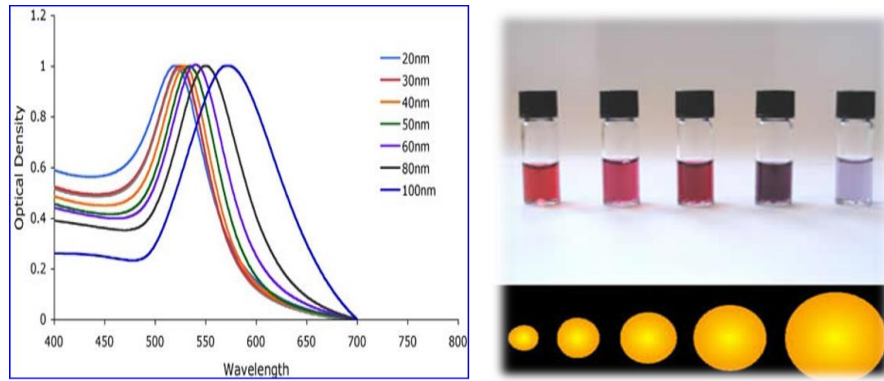
Şekil 1.7. Nanopartiküllerin elektriksel alan ile etkileşimi

Altın nanopartiküllerin SPR pikinin farklı dalga boylarında görülmesinin nedeni Mie teorisi ile açıklanmaktadır (Mulvaney *et al.* 1996; Burda *et al.* 2005).

$$C_{ext}(\lambda) = \frac{24\pi^2 R^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon''(\lambda)}{(\epsilon'(\lambda) + 2\epsilon_m) + \epsilon''(\lambda)^2}$$

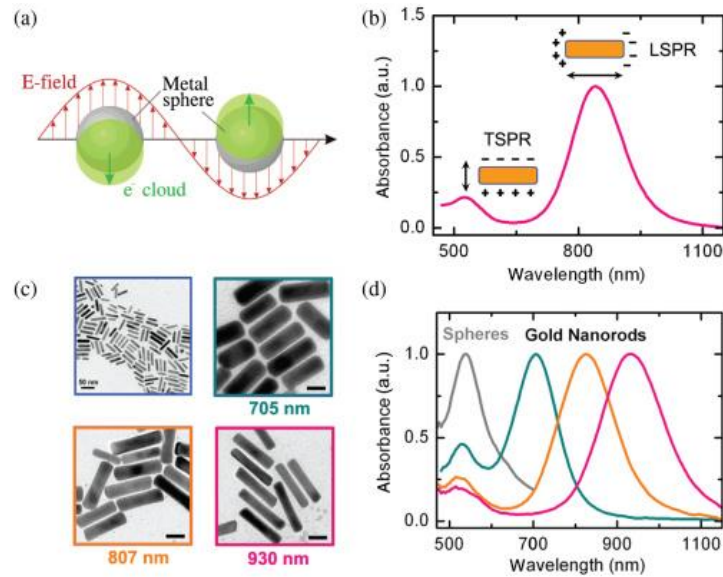
Burada, C_{ext} toplam radyasyon azalımı, R nanopartiküllerin çapı, λ radyasyonun dalga boyu, ϵ' ve ϵ'' materyalin dielektrik fonksiyonunun gerçek ve hayali kısmına bağlı frekans, ϵ_m ise ortamın dielektrik sabitidir.

Bu teoriye göre C_{ext} 'nin sabit kalması için R ile görünür bölge ışınının dalga boyunun beraber değişmesi gerekmektedir. Nanopartikülün çapı büyük olduğu zaman (R büyük olduğunda) partikül büyük dalga boylarını soğurmakta ve küçük dalga boylarını saçmaktadır. Böylece altın nanopartiküller mavi renkte görülmektedir (Şekil 1.8). Nanopartiküllerin çapı küçük olduğunda ise partikül küçük dalga boylarını saçarak kırmızı bir görünüm kazanır.

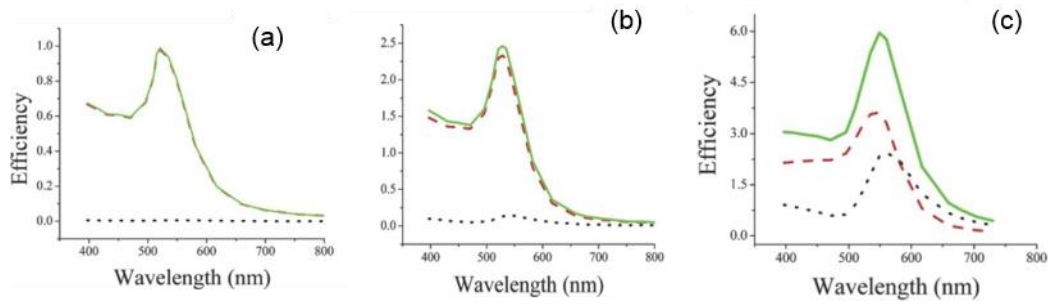


Şekil 1.8. AuNP'lerin partikül boyutuna bağlı olarak dalga boyu ve rengindeki değişim (Burda *et al.* 2005)

SPR bandı nanopartiküllerin geometrisine de bağlıdır. 40 ile 100 nm aralığında çapa sahip dairesel altın nanopartiküller yaklaşık 550 nm'de pik sergilemektedirler. Ancak altın nanopartikül, nanoçubuk yapısına sahip ise bu esnada SPR piki iki bölgede gözlenmektedir (Şekil 1.9). Bu piklerden biri görünür bölgede yaklaşık 537 nm'de ve diğeri ise IR bölgesine yakın yaklaşık 800 nm'de görülmektedir. Nanokafes ve nanoçekirdeklerin SPR pikleri ise parçacıkların boyutlarına bağlı olarak çoğunlukla 400 ile 1000 nm arasında görülmektedir.



Şekil 1.9. Nanoçubuk yapısına sahip altın nanopartiküllerinin UV-vis absorpsiyon spektrumu (Li *et al.* 2013)

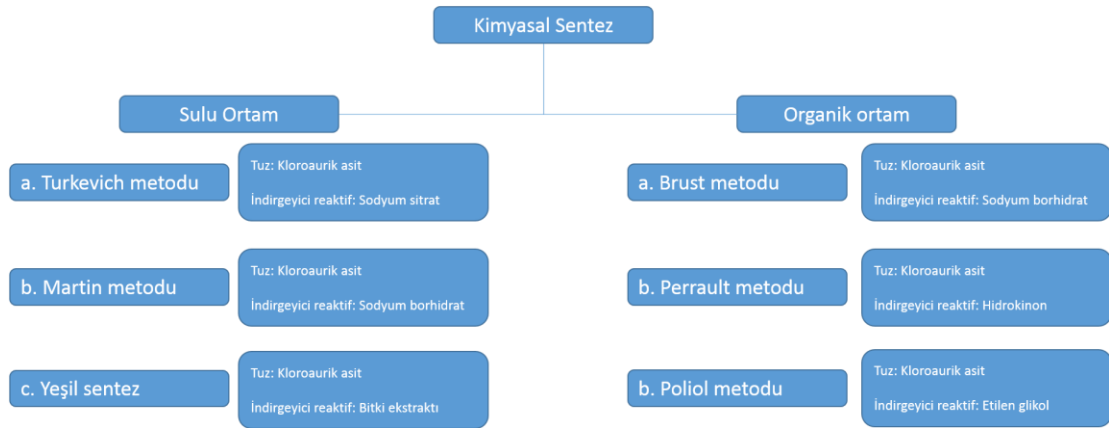


Şekil 1.10. (a) 20, (b) 40 ve (c) 80 nm çapa sahip Au nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumu

El Sayed ve çalışma arkadaşları (Burda *et al.* 2005) absorpsiyon ile saçılmanın Mie teorisine göre tamamen nanopartiküllerin boyutuyla ilgili olduğunu saptamışlardır (Şekil 1.10). 20 nm’de altın nanopartiküllerin sönümü tamamen absorbansa bağlı iken, 40 nm’nin altındaki parçacıklarda saçılma gözlenmektedir. 80 nm’de ise altın nanopartiküllerde bu sönme hem absorbansa hem de saçılmaya bağlıdır. Bu da altın nanopartiküllerin çeşitli alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Örneğin büyük nanopartiküllerin saçılmaları yüksek olduğu için röntgen amaçlı olarak kullanılırken, küçük nanopartiküllerin absorbansı yüksek olduğu için fototermal terapide kullanılmaktadırlar.

Altın nanopartiküller çok farklı yöntemler ile sentezlenebilmektedirler. Bu yöntemler arasında en çok kullanılanı kimyasal metotlardır. Kimyasal metotlar, üründe yüksek kontrol, toksik olmayan çözeltileri seçme yetisi, sıcaklık, reaktiflerin değişimi ve çözeltinin türü ile nanopartiküllerin boyutları ve şekillerinin kontrol edilebilmesi ve en önemlisi düşük sıcaklıklarda reaksiyonun gerçekleşebilmesi gibi avantajlara sahiptir.

Kimyasal yöntem ile nanopartiküller hem sulu ortamda hem de organik ortamda sentezlenebilmektedirler (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Kimyasal yöntemler ile Au nanopartiküllerin sentezi

Turkevich metodu: Bu metotta HAuCl_4 tuzunun çözeltisi hazırlanarak ortam sıcaklığı kaynama noktasına kadar yükseltilmektedir (Turkevich *et al.* 1951; Frens *et al.* 1972). Sonra bu çözeltiye trisodyum sitrat indirgeyicisi ilave edilerek Au^{3+} iyonları altın atomlarına indirgenmektedirler. Oluşan bu atomların bir araya gelmesiyle önce çekirdekler oluşmakta ve termodinamik koşullar sağlandığında çekirdekler önce kafes yapısına daha sonra da altın nanoparçacıklara dönüşmektedirler. Oluşan altın nanoparçacıkların çevresi de ortamdaki aşırı sitrat iyonları ile sarılmaktadır. Böylece zeta potansiyelinin artmasıyla sitrat iyonları stabilizatör görevi üstlenmektedir. Son yıllarda Turkevich metodu geliştirilerek, sitrat iyonlarının yerine indirgeyici olarak sodyum borhidrat, potasyum borhidrat, glikoz, fruktoz ve mono sodyum glutamat molekülleri kullanılarak da daha düşük sıcaklıkta ve yüksek reaksiyon hızıyla daha küçük nanopartiküller elde edilmektedir.

Martin metodu: Bu metot yardımıyla küçük boyutta altın nanopartiküller elde edilmektedir (Martin *et al.* 2010). Bunun için HAuCl_4 suda çözüldükten sonra sodyum borhidrat oda sıcaklığında damla damla çözeltiye ilave edilerek kırmızı renkli kolloidal altın nanopartikül çözeltisi elde edilmektedir. Martin metodunda stabilizatör kullanılmadığından dolayı, bu metotla sentezlenen nanopartiküller çok kısa bir süre sonra çökme eğilimi göstermektedirler.

Yeşil sentez: Günümüzde nanoteknolojinin ilerlemesiyle birlikte yeşil sentez yöntemi geliştirilmiştir. Yeşil sentez yöntemi, altın nanopartiküllerin sentezi için mantar, algler, bakteri ve bitki özlerinden faydalanmaktadır (Bhati *et al.* 2013; El-Rafie *et al.* 2013; Jayaseelan *et al.* 2013). Bu yöntemle Aloe vera (Chandran *et al.* 2006), Trigonella foenum-graecum (Ashwaty *et al.* 2012), Citrus sinensis peel (Kaviya *et al.* 2011), Cinnamomum zeylanicum (Smitha *et al.* 2009), Alfalfa (Gardea *et al.* 2002), Tamarind leaf (Ankamwar *et al.* 2005) ve Rosa rugosa (Dubey *et al.* 2010) gibi birçok farklı bitki ekstraktı kullanılarak altın nanopartiküllerin sentezi yapılmıştır.

Brust metodu: Yöntemde öncelikle tetra oktil amonyum bromür (TOAB) toluen içerisinde çözülür. Başka bir balonda HAuCl_4 suda çözülerek TOAB çözeltisi içerisine ilave edilir. Portakal rengini alan çözelti dekante edildikten sonra, organik faz başka bir balona alınır ve organik tiyol molekülleri ilave edilerek çözelti manyetik karıştırıcı da belli bir süre karıştırılır. Daha sonra NaBH_4 ilave edilerek altın nanopartiküllerin oluşumu sağlanır (Brust *et al.* 1994; Gu *et al.* 2012).

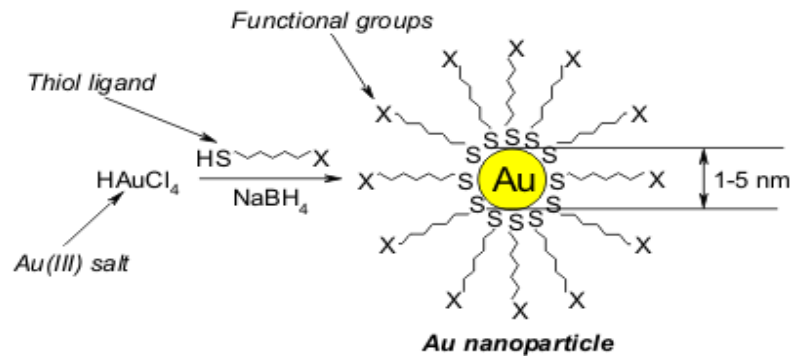
Perrault metodu: Bu metot altın nanopartiküllerin küçük boyutlarda homojen olarak dağılımına olanak sağlamıştır. Hidrokinon indirgeyicisinin kullanıldığı bu metot yardımıyla altın nanopartiküller 2 ile 200 nm arasında sentezlenmektedir (Mechler *et al.* 2010).

Poliol metodu: Bu metotta, çözücü ve indirgeyici olarak etilen glikol, kararlılığı sağlamak için polivinil pirolidin (PVP) ve ortamı bazık yapmak için NaHCO_3 kullanılmaktadır. Üçünü de içeren çözelti iki saat boyunca karıştırılır ve daha sonra HAuCl_4 çözeltisine ilave edilir. Böylece kırmızı renkli altın nanopartiküller elde edilir (Long *et al.* 2013).

Altın nanopartiküllerin kimyasal sentezi esnasında partikül boyutu ve şeklini etkileyen birçok faktör mevcuttur. Bu faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- i- İndirgenin türü ve konsantrasyonu: İndirgen güçlü olduğu zaman çekirdeklerin oluşumu hızlı olduğu için küçük nanopartiküller oluşmaktadır. Örneğin Turkevich metodunda sodyum sitrat yerine indirgeyici reaktif olarak sodyum borhidrat kullanıldığı zaman reaksiyon hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Böylelikle küçük parçacıklar elde edilmektedir (Bahadory *et al.* 2008).
- ii- Stabilizatörün türü ve konsantrasyonu: Güçlü stabilizatörler kullanıldığı zaman nanopartiküllerin boyutunun artması engellenmekte ve partiküllerin küçük boyutta kalması sağlanmaktadır (Patel *et al.* 2006; Kayleen *et al.* 2008).
- iii- Sıcaklık: Sıcaklık arttığı zaman reaksiyon hızı artmakta ve daha küçük nanopartiküller elde edilmektedir (Fischer *et al.* 2009).
- iv- Reaksiyon süresi: Reaksiyon süresi arttığı zaman daha çok çekirdek oluşmakta ve böylece küçük nanopartiküller elde edilmektedir (Pong *et al.* 2007).

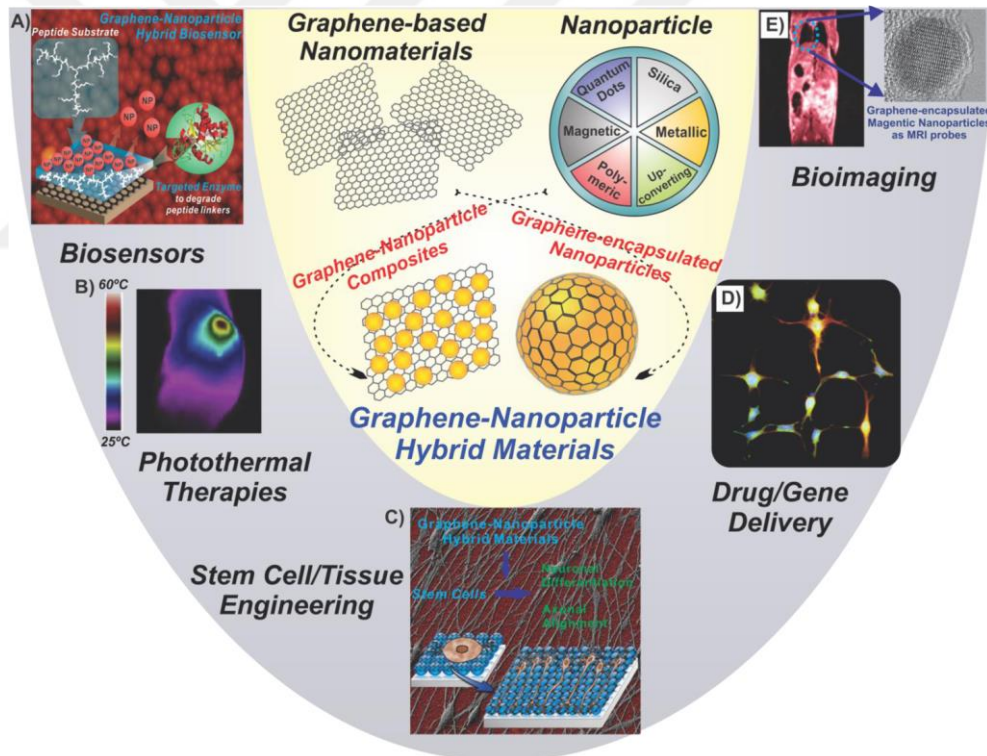
Altın nanopartikülleri kararlı halde tutabilmek için birçok farklı stabilizatör kullanılmaktadır. Bunlardan en çok tercih edilenleri küçük tiyol molekülleri veya tiyol uç grubu içeren makro polimerlerdir (Şekil 1.12). Alkanetiyoller ile altın nanopartiküllerin stabilizasyonunda, tiyol molekülleri, altın ve sülfürün karakterleri nedeniyle kovalent bağ vasıtasıyla altına kuvvetli bir şekilde bağlanır. Alkanetiyoller ile kaplı her bir partikül için kristalizasyon ve X-ışınları yapı belirleme çalışmaları tüm sülfür atomlarının iki altın atomuna köprü konformasyonunda bağlandığını göstermiştir.



Şekil 1.12. Tiyol molekülleri ile stabilize edilmiş Au nanopartiküllerin sentezi

Aminler (Masala *et al.* 2004) ve fosfinler (Sardar *et al.* 2009) gibi diğer fonksiyonel ligandlarda kararlı altın kolloitlerini oluşturabilir. Ancak onların altın yüzeyine bağlanması oldukça zayıftır ve bu ligandlar tiyoller ile kolayca yer değiştirebilirler.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, nanopartiküllerin grafen nano tabakalar gibi karbon materyaller ile kombinasyonunun, her bir materyalin tek başına kullanımı ile kıyaslandığında, biyoyugulamalar için son derece arzu edilen ve belirgin bir şekilde avantajlı ilave eşsiz fizikokimyasal özellikler sergilediğini göstermiştir (Şekil 1.13) (Sun *et al.* 2008; Shao *et al.* 2010; Pumera 2011; Lee *et al.* 2011; Bai *et al.* 2012; Shah *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013).

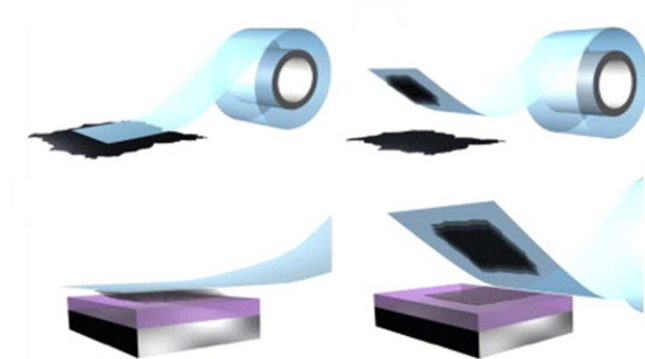


Şekil 1.13. Biyosensörler, fototermal terapi, doku mühendisliği, ilaç salımı ve biyo görüntüleme gibi çeşitli biyoyugulamalar için grafen/nanopartikül kompozit yapılarının kullanımı (Yin *et al.* 2015)

Grafen, iki boyutlu bal peteği kafes yapısı içinde sıkı bir şekilde paketlenmiş sp^2 bağlı karbon atomlarının bir tek tabakasıdır. Son yıllarda grafen, mükemmel optiksel

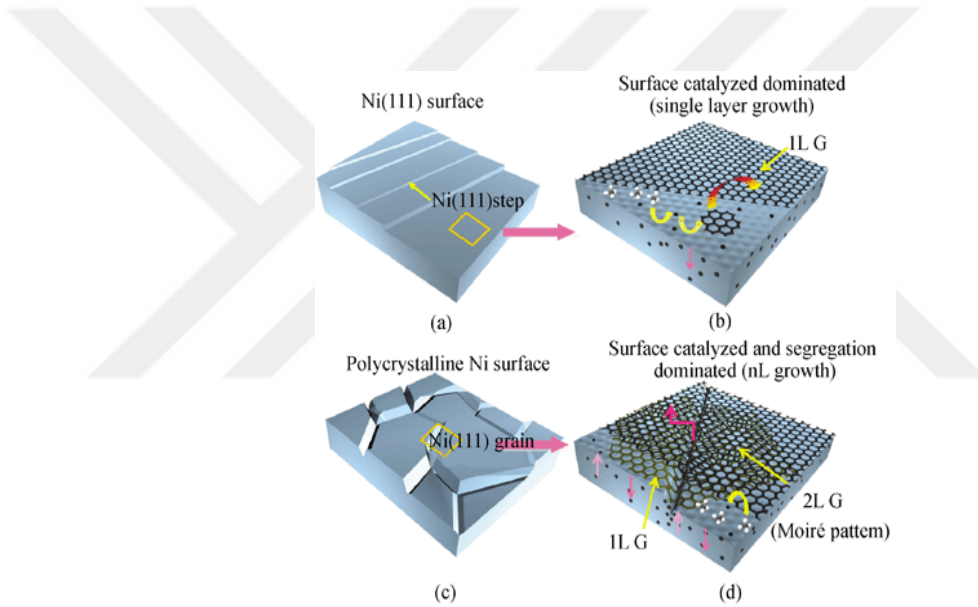
geçirgenlik ($\sim 97.7\%$), süper termal iletkenlik ($\sim 5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) (Balandin *et al.* 2008; Liang *et al.* 2011), çok yüksek spesifik alan ($2360 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (Stoller *et al.* 2008), yüksek taşıyıcı hareketler ($200000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Novoselov *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2005; Bolotin *et al.* 2008) ve göze çarpan mekaniksel sertlik ($\sim 1.0 \text{ TPa}$) (Geim and Novoselov 2007; Lee *et al.* 2008) gibi muazzam özellikleri nedeniyle fizikçiler ve kimyacıları büyüleyen bir materyal olmuştur. Böylece bu materyal, gaz sensörleri (Berger *et al.* 2004; Schedin *et al.* 2007), transistörler (Berger *et al.* 2004; Novoselov *et al.* 2004), süper kapasitörler (Vivekchand *et al.* 2008) ve enerji depolama materyallerini (Stoller *et al.* 2008) içeren birçok uygulamada silikona dayanan teknolojinin yerini alacak ümit verici bir komponent olarak kabul edilmektedir.

Geçmiş 1940'lara kadar uzanan grafenin ilk tek tabaka kristalinin üretimi, Andre Geim ve Konstantine Novoselov tarafından 2004 yılında mikromekanik ayrıştırma ile grafit yığınının tek tabakanın ayrıştırılmasıyla başarılmıştır (Şekil 1.14) (Novoselov *et al.* 2004). Grafen üretimi için oldukça basit olan bu proses, mühendislik uygulamaları için gereklilik arz eden büyük ölçek fabrikasyona hitap edememektedir. Bu doğrultuda, herbiri farklı avantajlar ve dezavantajlara sahip olan çok çeşitli metotlar grafen sentezi için geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olanları, sıcaklık gradienti ile kontrollü şartlar altında kimyasal buhar depozisyonu (CVD), silisyum karbürün ısıtılması, grafit tabakalarının ayrıştırılması ve yükseltgenme/indirgenme yöntemleridir.



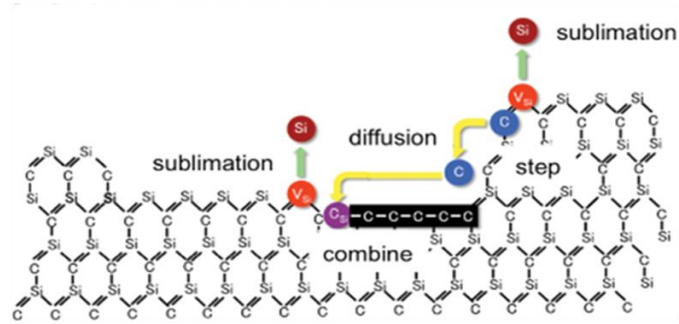
Şekil 1.14. Grafen tek tabakasının mikromekaniksel ayrıştırma ile üretimi

i- *Kimyasal Buhar Depozisyonu (CVD)*: Metan ve etan gibi karbon kaynaklarının kullanıldığı bu metotta (Park and Ruoff 2009; Reina *et al.* 2009, 2010; Li *et al.* 2009), gaz fazındaki karbon, nikel veya bakır gibi bir katalizör üzerinde ayrışır. Bu metaller, yüksek sıcaklıklarda (1000°C), içlerine karbonun difüze olabildiği çok çözünen bir ortam oluştururlar. Soğutma sırasında karbonun çözünürlüğü azalmaya başlar ve bir araya gelen karbon atomları grafenin birkaç tabakasını oluşturmak üzere birleşirler (Şekil 1.15). CVD yöntemi büyük ölçekli ve yüksek kaliteli grafen gereksinimini sağlayabilmesine rağmen, katalizörün belirli bir süre sonra deaktif olması nedeniyle kesikli bir süreç içermesi ve yüksek maliyetli olması yöntemi sınırlamaktadır.



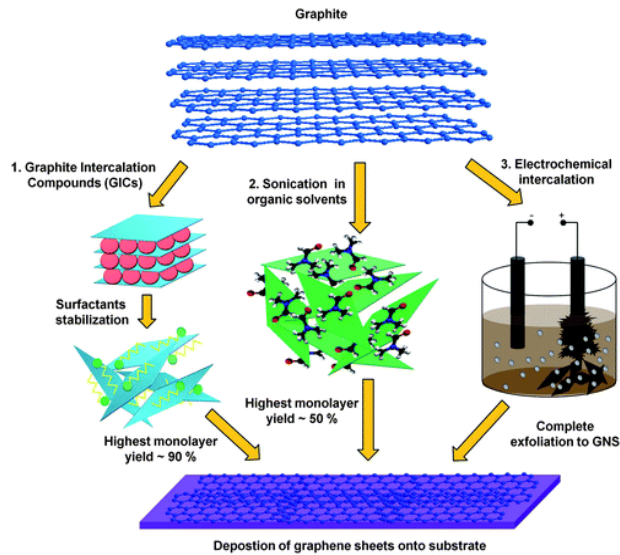
Şekil 1.15. Kimyasal buhar depozisyon yöntemi ile grafen sentezi (Zhang *et al.* 2012)

ii- *Silisyum Karbür (SiC)'ün Isıtılması*: Bu metot 1300°C gibi çok yüksek sıcaklık ve ultra yüksek vakum altında SiC yarı iletkeni ısıtılarak, yüzeyden silisyum atomlarının koparılması ve daha sonra yüzeyde kalan karbon atomlarının yeniden düzenlenerek altıgen örgülü grafen yapısını oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 1.16) (Berger *et al.* 2004; Emtsev *et al.* 2009). Yöntem metal katalizörlerden kaçınma gibi bazı avantajlar içermesine rağmen; silisyum atomlarının buharlaşması için ihtiyaç duyulan ultra yüksek vakum ve yüksek sıcaklığın sağlanabilmesi açısından oldukça maliyetlidir.



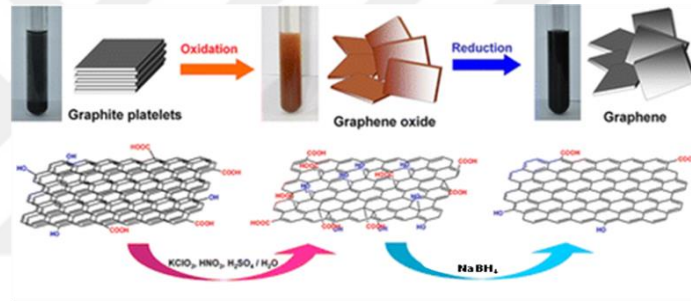
Şekil 1.16. SiC'ün ısıtılması ile grafen sentezi (Kageshima *et al.* 2012)

iii- *Grafit Tabakalarının Ayırıştırılması*: Grafit katmanlarından grafen tek tabakalarını ayırmak için, organik çözücüler içerisinde ultrasonik muamele (Bunch *et al.* 2005; Hernandez *et al.* 2008), sulu çözeltiler içinde yüzey aktif maddelerinin kullanımı (Li *et al.* 2008; Dresselhaus *et al.* 2002) veya elektriksel voltaj desteği ile eksfoliasyon (Liu *et al.* 2008) işlemleri kullanılabilir (Şekil 1.17). Bu prosesler ile hazırlanan grafenin kolloidal dispersiyonu, tabakalar arasındaki zayıf Van der Waals etkileşimleri nedeniyle, zamanla agrega olma eğilimindedir.



Şekil 1.17. Grafit tabakalarının farklı uygulamalar ile ayrıştırılması

iv- *Yükseltgenme/İndirgenme Yöntemi*: Düşük maliyetli ve uygulanması oldukça kolay olan bu yöntemin (Şekil 1.18) ilk aşamasında, grafit güçlü asitler kullanılarak Hummer metodu ile grafen oksite yükseltgenir (Hummer *et al.* 1958). Grafen oksit, saf grafen tabakaların sp^2 bağlı karbon ağına hidroksil ve epoksit gruplarının aşılmasıyla elde edilen, grafenin hidrofilik bir türevidir (Dreyer *et al.* 2010). Bu materyal, hidrazin hidrat (Stankovich *et al.* 2007), sodyum borohidrid ($NaBH_4$) (Shin *et al.* 2009) ve hidrokinon (Wang *et al.* 2008) gibi indirgeyiciler ile muamele edildiği zaman pul pul dökülen grafen tabakalarını oluşturur. Yöntem, indirgenmeye rağmen yapıda hala -OH gruplarının varlığı, makro kusurlu yapıların oluşumu ve atık kirliliği gibi bazı dezavantajlar içermektedir.

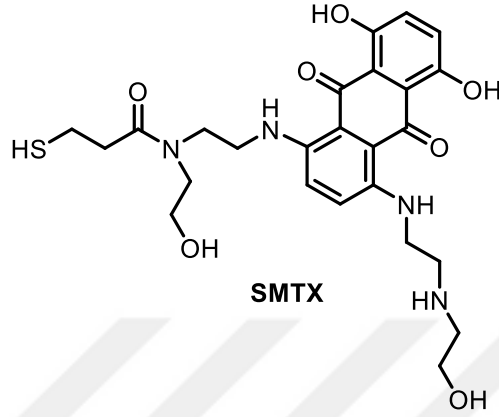


Şekil 1.18. Grafen oksitin indirgenmesi ile grafen sentezi

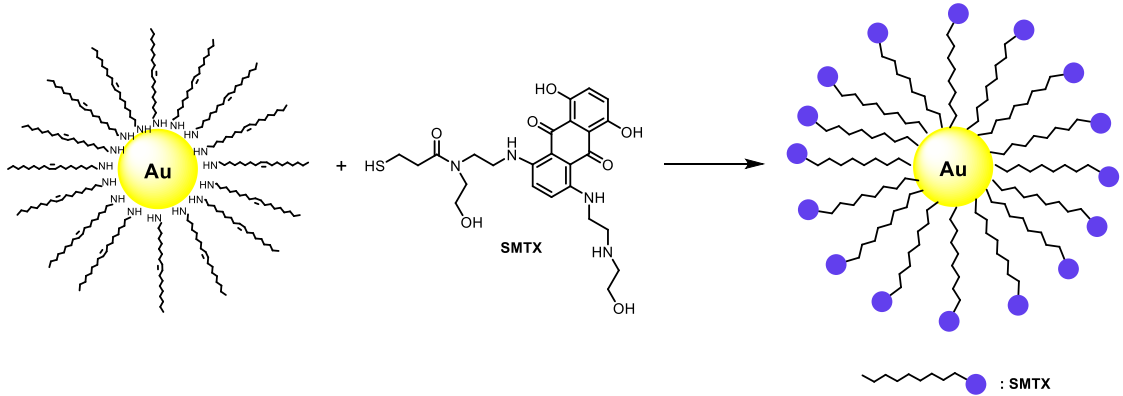
Verilen bilgiler ışığı altında, biz de bu tez kapsamında, mevcut literatür çalışmalarının ortaya koyduğu birçok avantajı tek bir noktada birleştirerek, anti kanser ilaç salımına imkan sağlayan AuNP ve AuNP/RGO yapısına dayanan nanomateryallerin sentezini ve onların *in vitro* şartlar altında kanserli hücreler için uygulanmasını araştırmayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda,

i- İlk aşamada, tiyol baş grubu ve mitoksantron anti-kanser ilacı son grubu içeren molekülün (SMTX) sentezi gerçekleştirildi. Klinik uygulamalarda şu an kullanılan kemoterapötiklerin ana bir sınıfını antrasen molekülleri oluşturmaktadır. Mitoksantron antrasen ailesinin iyi bilinen üyelerinden biridir. Mitoksantron östrojen reseptörüne bağlanarak DNA'nın replikasyonunu engeller. Açılan DNA, kendini tamamlayamadığı

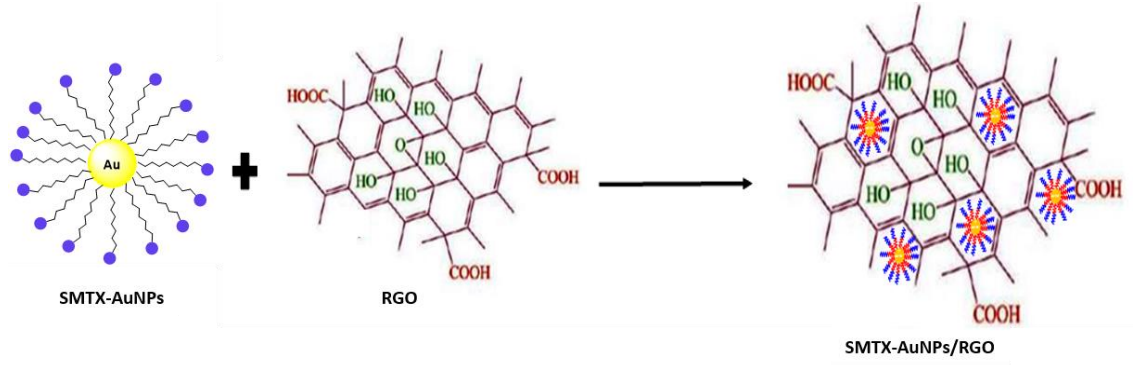
için bir apoptoz mekanizmasıyla hücrenin yok olmasına sebep olur. Ayrıca, bu ilaç topoizomerez II enzimi vasıtasıyla kanserli hücrenin bölünerek çoğalmasını engeller.



ii- İkinci aşamada sentezlenmiş olan oleyil amin kaplı altın nanopartiküllerin (OAm-AuNPs) yüzeyi yer değiştirme reaksiyonu ile SMTX molekülleri ile kaplandı ve böylece tiyol modifiye altın nanopartiküller sentezlendi (SMTX-AuNPs).



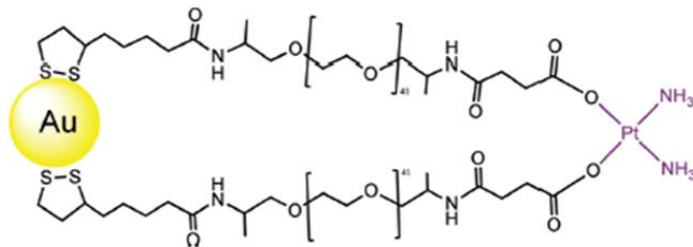
iii- Üçüncü aşamada sentezlenmiş olan indirgenmiş grafen oksit (RGO) ile SMTX-AuNP'nin etkileşimi sağlanarak SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı sentezlendi.



iv- Son aşamada ise, sentezlenen ilaç bağlı AuNP ve AuNP/RGO nanomateryallerinin in-vitro şartlar altında meme ve beyin kanser hücreleri için uygulamaları araştırıldı.

2. KAYNAK ÖZETİ

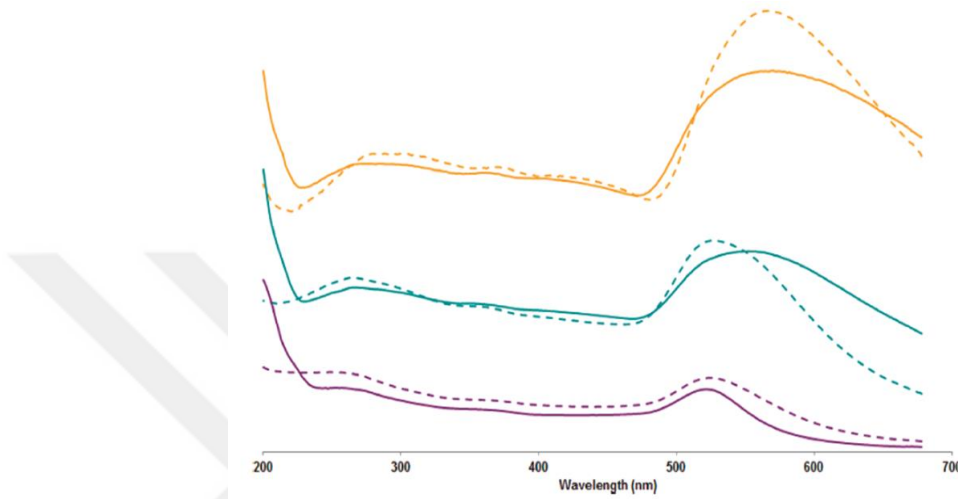
Gemma *et al.* 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, altın nanopartikülleri cis-platin anti kanser ilacıyla bağlandıktan sonra kararlılığını test etmişlerdir (Şekil 2.1). Bu çalışmada, 25, 55 ve 90 nm boyutlarına sahip küresel altın nanopartiküller sentezlenmiştir (Şekil 2.2). Altın nanopartiküllerin çevresi vücut sıvılarıyla uyumlu olması için polietilen glikol (PEG) maddesiyle kaplanmıştır. Literatürde en sık karşılaşılan ilaç salım sistemlerinden biri altın nanopartiküllerin PEG ile konjuge edildiği sistemlerdir. Suda iyi çözünen polietilen glikol altın nanopartikülleri çevrelediğinde kararlı bir yapı oluşur ve bu durum sterik engelle kararlılık olarak adlandırılır. Altın nanopartiküller ve polietilen glikol'den oluşan nanokompozit ilaç ile muamele edildiğinde daha kararlı ve daha uzun süre tümör hücrelerine etki eden bir yapı meydana gelir (Hone *et al.* 2002; Wuelfing *et al.* 2007). 25, 55 ve 90 nm boyutlarına sahip altın nanopartiküller için ilaç yükleme miktarının partikül boyutu arttıkça arttığı gözlenmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin stabilizasyon davranışı araştırılmış ve 4°C'de bekletilen nanopartiküllerin 24 gün bekletildikten sonra partikül büyüklüklerinde çok fazla bir değişimin olmadığı gözlenmiştir. 25 nm partikül için %2.4, 55 nm partikül için %3.3 ve 90 nm partikül için değişimin %4.6 olduğu bulunmuştur. Ayrıca 25 nm boyutundaki partiküllerin UV ışın absorpsiyonunun oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2.1. Cis-platin anti kanser ilacı içeren altın nanopartiküller

Sentezlenen bu altın nanopartikül sistemi akıllı olmadığı için cis-platin ilacının çok ciddi yan etkileri gözlenmiştir. Üretilen partiküllerin boyutu pH kontrollü yapılmış ve

bu amaçla sodyum sitrat kullanılmıştır. Sodyum sitratın çekirdek yapısının oluşumu ve büyümesinde önemli rolü olduğu, ayrıca parçacıklara negatif yük vererek parçacıkların birbirine yapışmasını engellediği gözlenmiştir (Gemma *et al.* 2012).

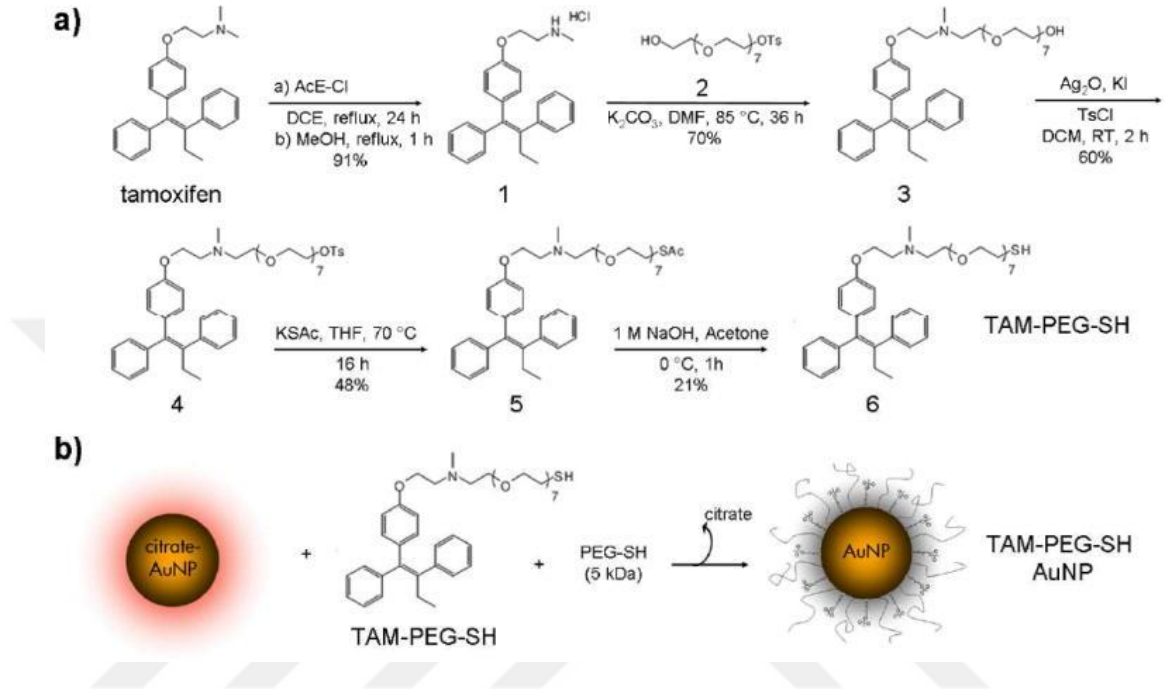


Şekil 2.2. Altın nanopartiküller için kaydedilen UV-vis spektrumları. Bordo renk 25 nm partikül (çizgili ilaçsız, düz ilaçlı), yeşil renk 50 nm partikül (çizgili ilaçsız, düz ilaçlı) ve turuncu renk 90 nm partikül (çizgili ilaçsız, düz ilaçlı)

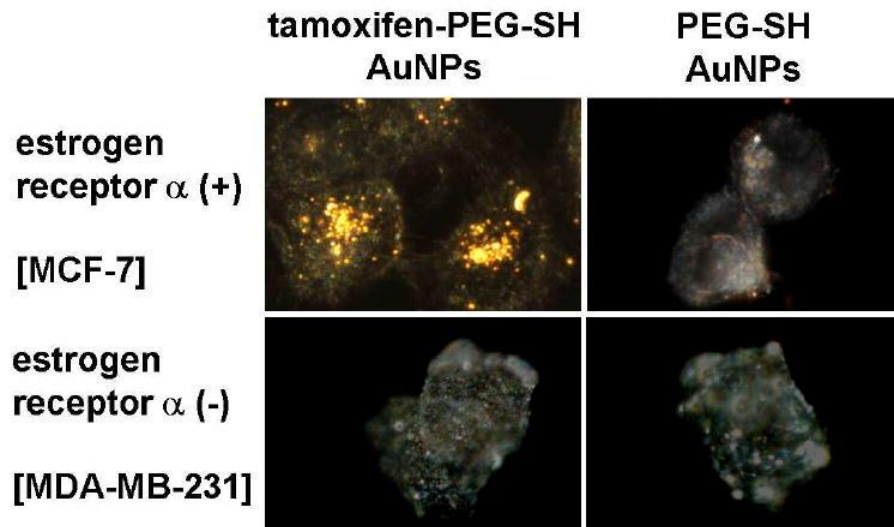
Peiris *et al.* (2015) metastatik meme kanserinde altın nanopartikülleri kullanmışlardır. Bu çalışmada üretilen nanopartiküllerle göğüsün damar yapısını hedeflemeye çalışmışlardır. Spesifik hedefleme için alfa ve beta integrin peptidini kullanmışlardır. Radio işaretleme yöntemiyle teknetium-99m'i altın nanopartiküle bağlamışlar ve radionükleik görüntüleme sistemi ile bu partiküllerin metastatik meme kanseri üzerinde etkisini araştırmışlardır. 4T1 soyu olan farelerde meme kanseri modeli yapılmış ve ufak doz nanopartikül enjeksiyonla damar yoluyla verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre partiküllerin %14 oranında 60 dakika içinde kanser bölgesinde tutuldukları tespit edilmiştir.

Dreaden *et al.* (2009) tamoksifen ilacını PEG-tiyol linkeri olan altın nanopartiküllere bağlayarak meme kanserinin tedavisi için çalışma yapmışlardır (Şekil 2.3). Bu çalışma için kullanımı yaygın olan tamoksifen ilacı altın nanopartikül sistemiyle birleştirilmiştir. Üretilen tamoksifen-PEG-tiyol-Au parçacığı estrogen reseptörlerine spesifik hedef

alma imkanı vermektedir (Şekil 2.4). Bu çalışma verilerine göre bu kompleksin kanser üzerindeki etkisi normal ilacın etkisinin 2.7 katıdır.



Şekil 2.3. Tamoksifen-PEG-tiyol-Au üretim protokolü.

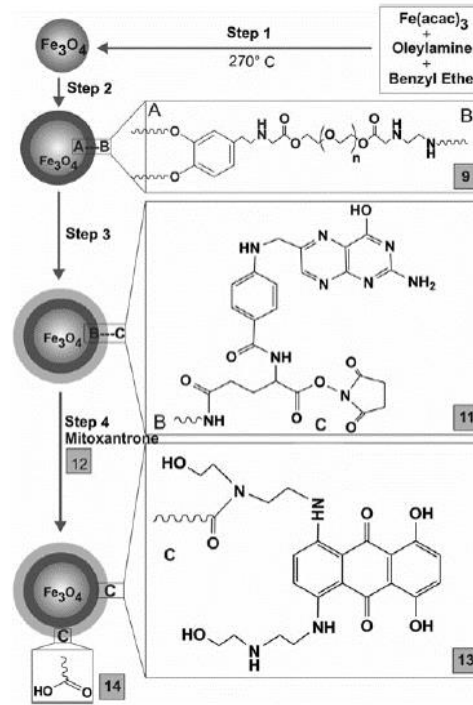


Şekil 2.4. Dark scattering mikroskopa çekilen görüntüde reseptör ve partikülün etkileşimi gösterilmektedir.

Tamoxifen-OEG-OH üretimi için N-metil tamoksifen ve etilen glikol 10 mL DMF içinde çözülmüş ve bu karışıma K_2CO_3 ilave edilmiştir. Daha sonra argon gazı atmosferinde ve $85^\circ C$ sıcaklığında 24 saat karıştırılmıştır. Isı DMF'nin buharlaşmasına neden olmaktadır. Geride kalan katı maddeye etil asetat ilave edilmiş ve sonra filtrasyon yapılmıştır.

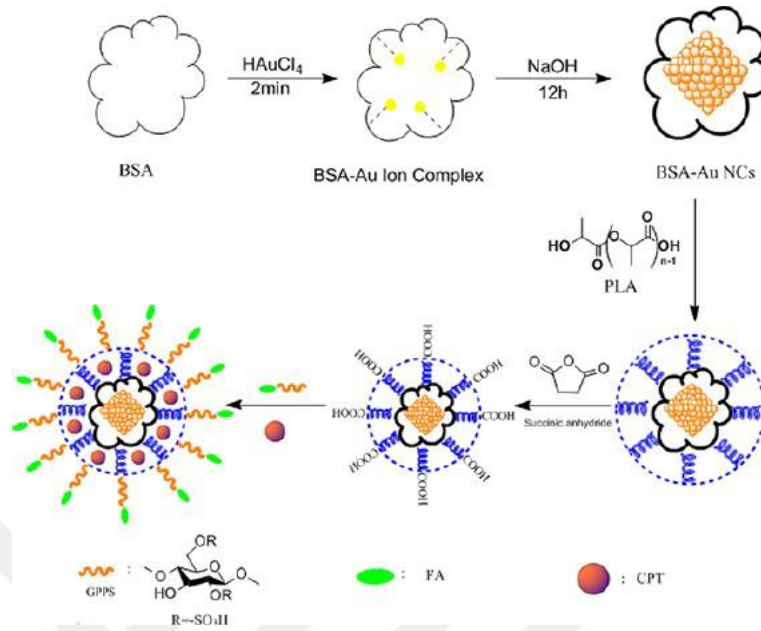
Majd *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada mitoksantron'u PEG, dopamin ve folik asitle birleştirip kansere karşı kullanmışlardır. Üretilen nanopartiküller 10^{-7} mm çapındadır. Bu parçacıklar Feacac3 ısı yöntemi kullanarak üretilmişlerdir. Üretim aşamasında ilk olarak PEG ve dopamin birleştirilir ve sonra Fe_3O_4 parçacıkları folik asitle birleştirilerek partikül son şeklini (Fe_3O_4 -DPA-PEG-FA) alır. Nanopartikül üretiminden sonra MTX bu komplekse ilave edilip fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Üretilen parçacıkların boyutunun 35 nm olduğu belirtilmiştir. Hücre toksisite testi olarak MTT ve flow sitometri uygulanmıştır.

Fe_3O_4 üretimi için, demir (III) asetilasetat (Feacac3), benzil eter ve oleyilamin karışımında çözülmüş ve sonra argon atmosferinde $120^\circ C$ 'de kurutulmuştur (Şekil 2.5). Sonra tekrar kurutulan madde $270^\circ C$ dereceye kadar ısıtılmış ve tekrar $80^\circ C$ dereceye soğutulmuştur. Bu aşamadan sonra 80 µl etanol ilave edilip santrifüj edilmiştir. Son üretilen solüsyona 30 mL hekzan ilave edilmiş ve nanopartiküller $4^\circ C$ 'de saklanmışlardır.



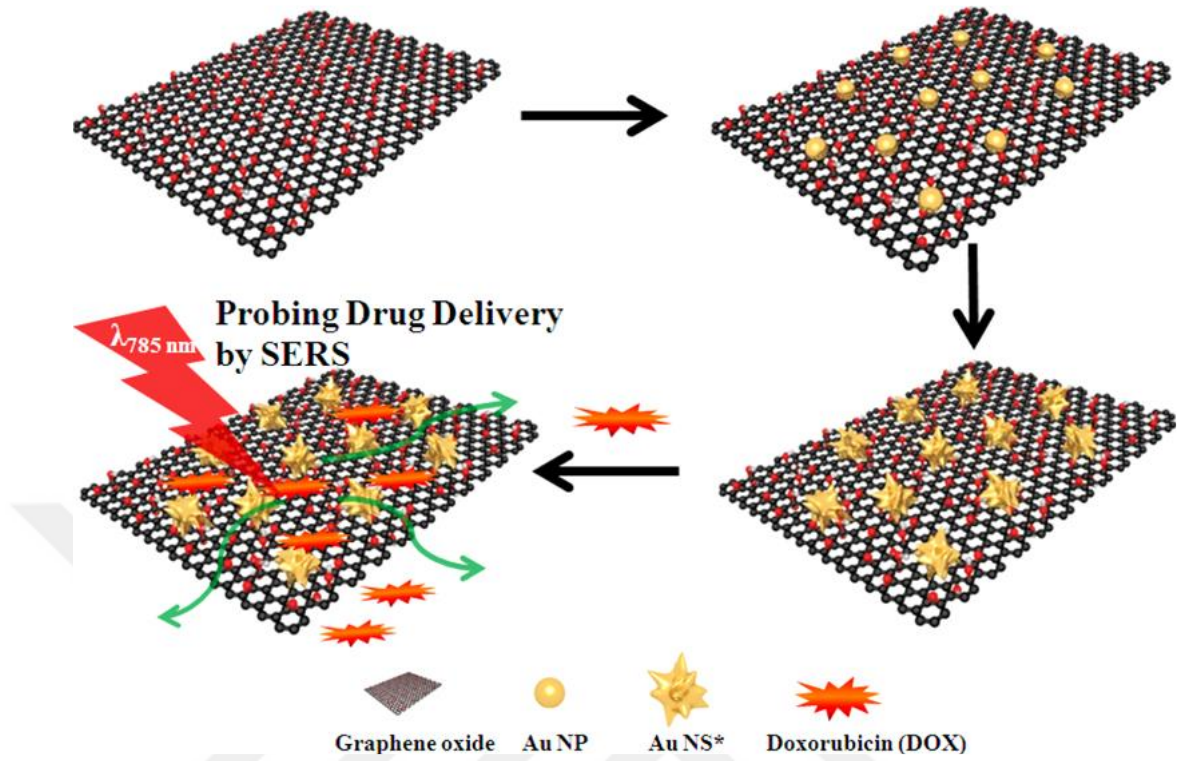
Şekil 2.5. Fe₃O₄-MTX nanopartiküllerinin sentezi

Chen *et al.* 2012 yılında nanopartikülleri amfifilik polimer ile birleştirerek kanser üzerindeki etkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada iki farklı parçacık-çekirdek taşıyıcı tasarlanmıştır. Bu amaçla altın parçacık çekirdek olarak ve yüzeyinde demir ve amfifilik polimer dış kaplayıcı olarak birlikte kullanılmıştır. AuNCs-PLGA-GPPS-FA parçacıklarına (Şekil 2.6) TEM, DLS, FTIR ve ¹H NMR analizi yapılmıştır. Anti kanser amaçla camptothecin ilacı kullanılmıştır. Partiküller in vitro deneylerde pH 5.3, 7.4 ve 9.6'da aynı ilaç salımını göstermişlerdir. Partiküllerin 15'inci saate kadar stabil olarak salım yaptıkları tespit edilmiştir. Ayrıca pH 9.6'da camptothecin ilacının daha fazla salındığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada helea kanser hattı kullanılmıştır. Sonuçlara göre folat bağları parçacığın alımını hücre içine artırarak toksisite etkisini çoğaltmıştır. Floresans görüntüler nanoparçacıkların hücre yüzeyine tutulduklarını göstermektedir.



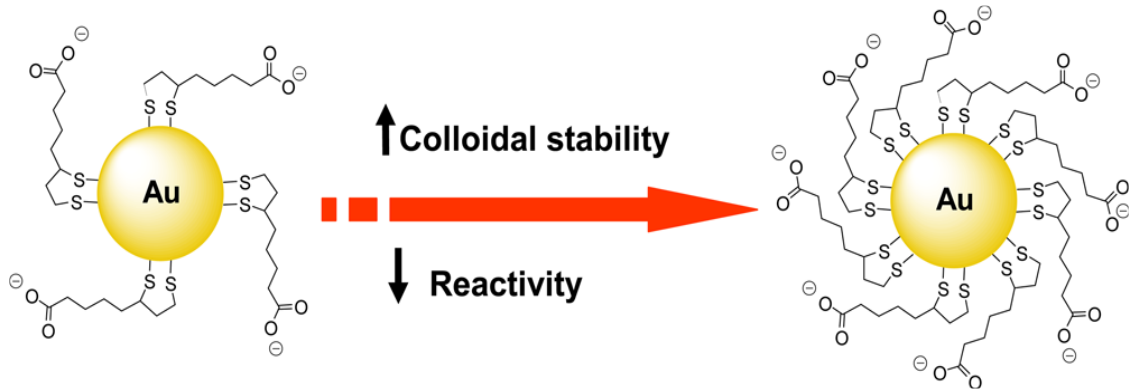
Şekil 2.6. AuNCs-PLGA-GPPS-FA parçacıklarının hazırlanması

Wang *et al.* (2014) yaptıkları bir çalışmada indirgenmiş grafen (RGO) kompozitleri yıldız görünümlü altın parçacık (AuNS) tabanlı ilaç taşıma sistemleri için kullanmışlardır (Şekil 2.7). Üretilen parçacıkların SERS yöntemi ile yüzey analizleri yapılmıştır. Bu yöntemle, RGO-AuNS parçacıklarının ışık ve yapısal özelliklerini surfaktant ve stabilizatör polimer kullanmadan kontrol edebilmişlerdir. Daha sonra kompozit yapısının ilaç yüklenebilirlik özellikleri araştırıldığında, doxorubicin ilacıyla farklı pH'larda başarılı olduğu belirlenmiştir.



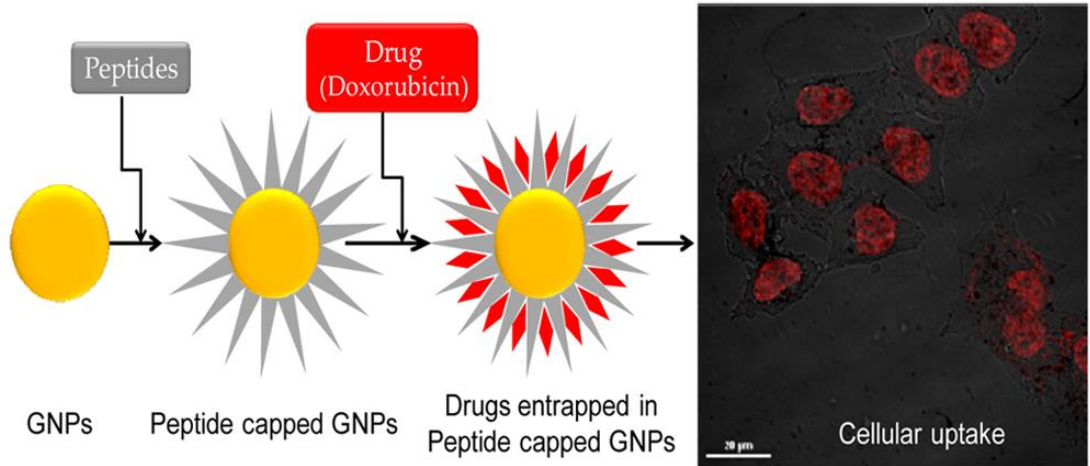
Şekil 2.7. İndirgenmiş grafen (RGO) oksit/altın nanoyıldız kompozit yapısının ilaç taşıma sistemi olarak kullanımı

Tournebize *et al.* (2012) yaptığı çalışmada altın nanoparçacıklarının yoğunluk ve bağlanma profillerinin ilaç salım sistemlerine etkisini araştırmışlardır (Şekil 2.8). 5 nm çapında olan altın nanoparçacıklar sitratla sabitlendikten sonra hidrolipoloik asitle karıştırılmıştır ($\times 28$, $\times 56$, $\times 140$ ve $\times 222$). Parçacık üretiminde sitrat bağlarıyla ditiyol bağ etkileşimi sonucunda nanoparçacıklar DHLA kaplı olarak üretilmişlerdir. Parçacıkların fazla miktardaki DHLA ile kaplanmasının fizyolojik ortamlarda yüksek direnç ve stabilite gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu makaledeki sonuçlara göre $\times 222$ DHLA konsantrasyonunun tıbbi amaçla kullanılabileceği ifade edilmiştir.



Şekil 2.8. İlaç salımı için hazırlanan altın nanopartiküller

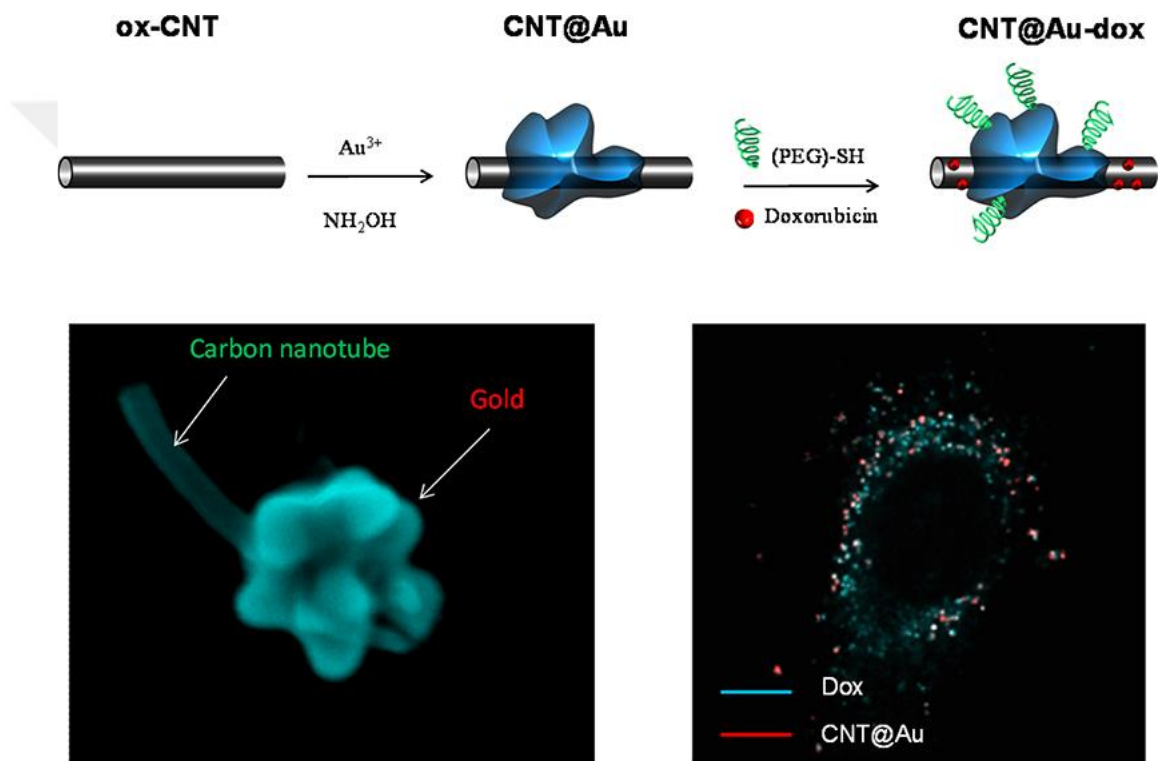
Parween *et al.* 2013 yılında yapılan çalışmada amino asit kaplı parçacıkları ilaç salım amaçlı kullanmışlardır. Bu çalışmada α,β -dehidrofenilalanin ve α -aminoisobutirik asit kullanılmıştır. Peptidlerle kaplanan nanaparçacıkların Hela hücre, fare ve dalak hücreleriyle ilgili hiç toksisite göstermediklerini ispatlamışlardır. Daha sonra antikanser ilaç yüklenen parçacıkların etkili bir şekilde Hela hücrelerini öldürdüklerini göstermişlerdir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. İlaç salımı için hazırlanan altın nanopartiküller ve hücreler ile etkileşimi

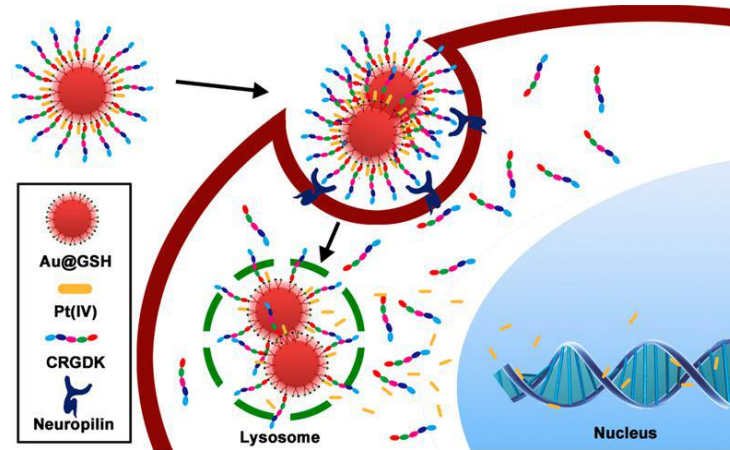
Minati *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada altın ve karbon hibrit materyalini görüntüleme ve ilaç salımı için kullanmışlardır. Altın parçacıkları, su fazında farklı katmanlı karbon

nano tüpler ile indirgenerek üretilmiştir (Şekil 2.10). Bu parçacıklar, doxorubicin anti kanser ilacı ile yüklenip A549 akciğer kanserine karşı kullanılmıştır. İlaç yüksek oranda parçacığın farklı pi-pi bağlarına tutunarak afinite göstermektedir. Bu hibrid parçacık ayrıca kırmızı ışık alanında görüntü verir ve görüntüleme sistemlerinde kullanılabilir. İn-vitro çalışmalarda doxorubicin yüksek oranda hücreye ulaşmıştır.



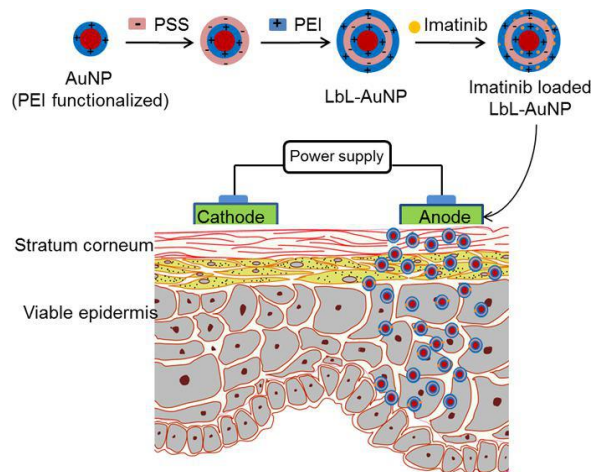
Şekil 2.10. İlaç salımı için hazırlanan altın ve karbon hibrit materyali

Kumar *et al.* (2014) yaptığı çalışmada platin tabanlı antikanser ilaçlarının etkinliğini çoğaltmak için altın nanoparçacığını kullanmışlardır (Şekil 2.11). Bu çalışmada Au@GSH (glutatiyon) parçacığına Pt tabanlı ilaç bağlanarak prostat kanserine karşı kullanılmıştır. Bu çalışmada glutatiyon antioksidan özellik sergilemektedir. Ayrıca bu kompleksin neurophil-1 reseptörüne etkisi bakılmıştır. NF-1 özel bir reseptör olarak ilaçların hücreye girişini artırmaktadır. Sonuç olarak analizlere göre Au@GSH platin tabanlı ilaçların etkisini artırmaktadır.



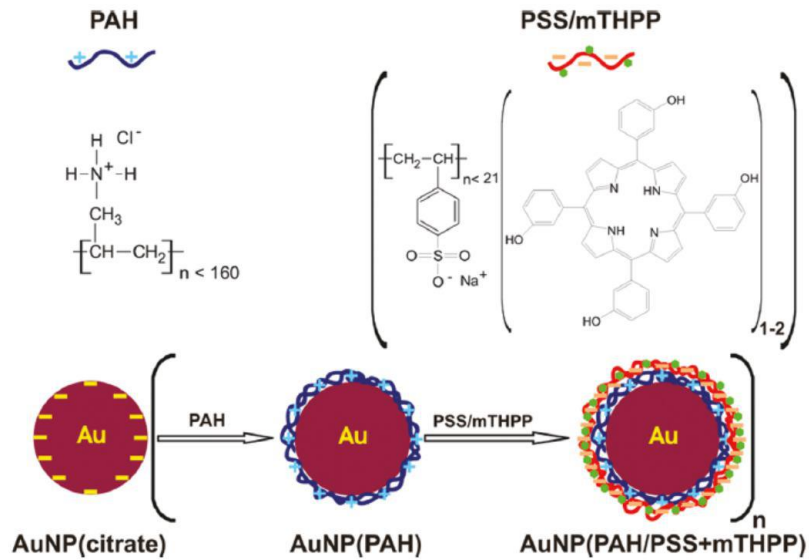
Şekil 2.11. Platin tabanlı antikanser ilacının salımı için hazırlanan altın nanopartiküller

Labala *et al.* (2014) yaptığı çalışmada altın nanoparçacıkların özelliğini kullanarak imatinib (IM) ilacını deriden geçirebilme özelliği üzerinde araştırma yapmışlardır (Şekil 2.12). Parçacıklar Turkovich yöntemi ile üretilmiş ve stabilizatör olarak polivinilpirolidon ve polietilen imin kullanılmıştır. AuNP'ler önce anyonik poli(stirensulfonat) ve sonra katyonik polietilen imin ile kaplanmış; sonrada IM ilacı tutturulmuştur. Parçacık boyutu ve zeta potansiyeli sırasıyla 98.5 ± 4.3 nm ve 32.3 ± 1.3 mV olarak belirtilmiştir. Katmanlar ilave edildikten sonra yüzey plazmon bandı 518 nm'den 530 nm'ye kaymıştır. İlacın salımını araştırmak için kulak derisi seçilmiş ve sonuca göre altına bağlı olan ilaç 6.2 kat daha geçirgenlik göstermiştir.



Şekil 2.12. IM antikanser ilacının salımı için hazırlanan altın nanopartiküller

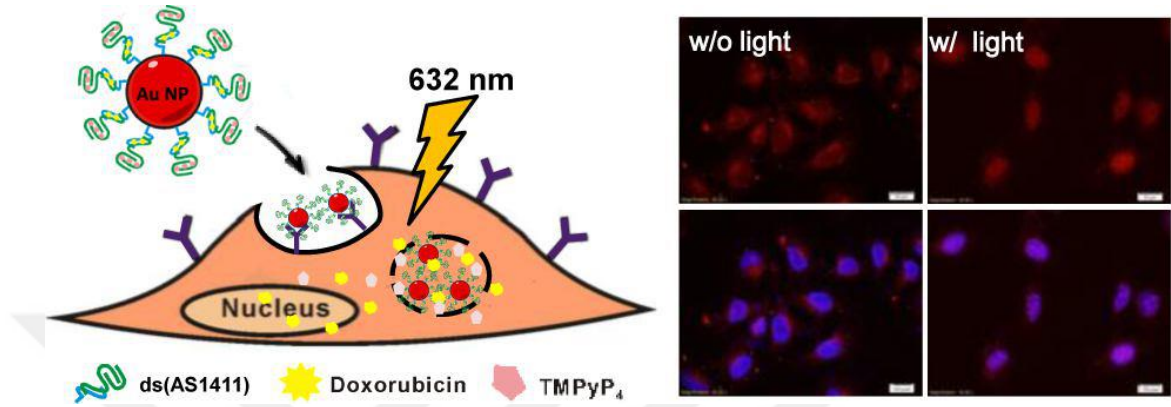
Reum *et al.* (2010) yaptığı çalışmada suda çözülmeyen ilaçların hazırlanmasında altın parçacıkları kullanmışlardır (Şekil 2.13). Bu çalışmada ışığa duyarlı olan 5,10,15,20-tetrakis(3-hidroksifenil)porfirin, mTHPP, anti kanser ilacı kullanılmıştır. Ayrıca üretilen parçacıkların boyutu 14.5 nm olarak belirtilmiştir. NP'ler soğuk kurutma yöntemi ile negatif poli elektrolit poli(stiren sulfonat) sodyum tuzu ile üretilmiştir. Araştırmalar sonucu bağlanmanın tipi pi-pi olarak saptanmıştır. İlaç yüklemede su anyon olarak ve katyon olarak da poli(allilamin hidroklorür) kullanılmıştır. Üretilen NP'ler UV-vis, zeta potansiyel, ICP-OES ve TEM ile analiz edilmiştir.



Şekil 2.13. Porphirin halkaları ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller

Shiao *et al.* (2014) yaptığı çalışmada aptamer bağlı nanopartikülleri üretmişlerdir (Şekil 2.14). Yapılan araştırmalarında hem görüntüleme hem de ilaç salım sistemi olarak farklı işlev gören parçacıklar üretilmiştir. İlaç direnci en büyük kanser hedefleme probleminde biridir. Bu çalışmada aptamer kullanılarak iki farklı ilaç salımı çalışılmıştır. Üretilen altın parçacıkların boyutunun 13 nm olduğu saptanmıştır. Aptamer 21 çift nükleotidden yapılmış ve ismi AS1411 olarak tanımlanmıştır. Kullanılan iki ilaç 5,10,15,20-tetrakis(1-metilpiridinyum-4-yl) porfirin (TMPyP4) ve doxorubicin olarak tanımlanmıştır. Hedef hücre olarak da Hela ve MCF-7R belirtilmiştir. 632 nm dalga boyunda verilen ışık bu parçacıklar tarafından serbest

oksijen radikallerinin oluşumu tetiklemektedir. Ayrıca ışığın etkisiyle anti kanser ilaç salımı gerçekleşmekte ve toksik bir şekilde hücre ölümü sağlanmaktadır.



Şekil 2.14. Porfirin halkaları ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller ve hücrelerde kullanımı

3. MATERYAL ve YÖNTEM

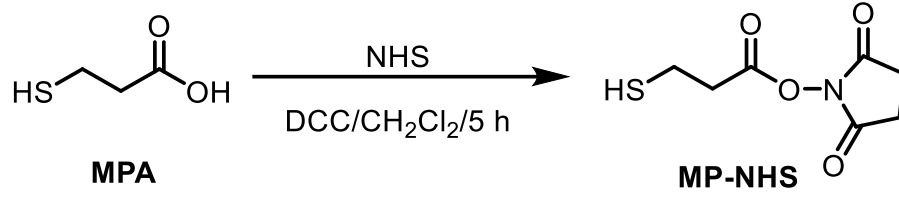
3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

3-merkaptopropionik asit (MPA), N,N'-disikloheksilkarbodiimid (DCC), N-hidroksi suksinimid (NHS), trietilamin, oleyilamin (OAm, >70%), boran tert-butilamin kompleksi (TBAB), 1,2,3,4-tetrahidronaftalin (tetralin), tetrakloroaurik (III) asit trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ve grafit Sigma-Aldrich (USA) firmasından satın alındı. Mitoksantron Ebewe Pharma GmbH (Avusturya) firmasından tedarik edildi. RPMI 1640 ve fetal bovine serum Invitrogene-Gibco (UK) firmasından satın alındı. Real time PCR için primerler (18srRNA, Akt, Caspase9, and Bax) Eurofins MWG Operon (Germany) firmasından satın alındı. SYBR®Green PCR karışımı ve anneksin V-FITC apoptosis kiti sırasıyla Applied Biosystems (USA) ve EMD Chemicals (USA) firmalarından tedarik edildi. Hücre kültür servisi (well plates, pipet ve flasks) SPL Life Sciences (South Korea) firmasından alındı. MCF-7 hücre setleri İran Ulusal Hücre Bankası'ndan satın alındı. Kullanılan tüm diğer kimyasallar analitik saflıktaydı.

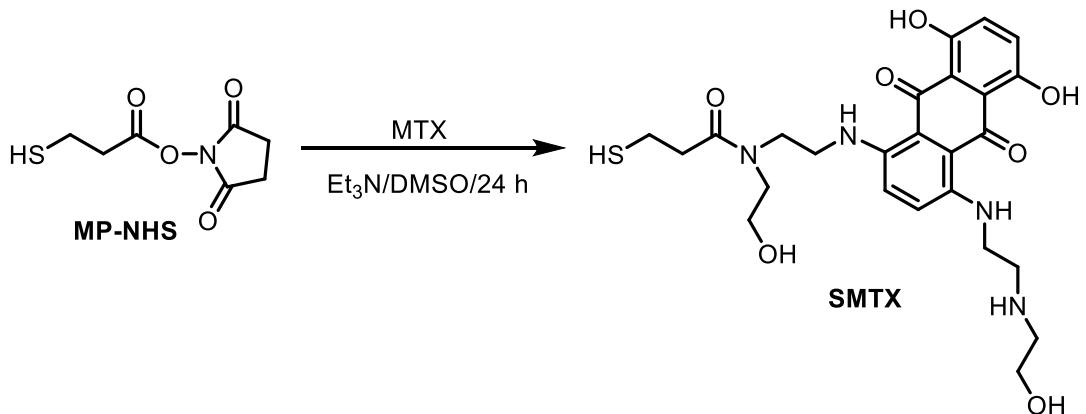
3.1.2. 2,5-dioksopirolidin-1-yl 3-merkaptopropanoat sentezi (MP-NHS)

Merkapto propionik asit (74 μL , 0.86 mmol) ve N-hidroksi suksinimid (0.39 g, 3.42 mmol) kuru diklorometan (10 ml) içerisinde çözüldü. Karışım buz banyosu ile soğutuldu. Daha sonra, bu karışıma kuru diklorometan içerisindeki DCC (0.71 g, 3.42 mmol) çözeltisi soğukta yavaş bir şekilde ilave edildi, ve karışım 5 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Çözücü buharlaştırıldıktan sonra, elde edilen katı etil asetat/n-hekzan (1:9) ile silika jel üzerinden kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. 3-merkaptopropanil-N-hidroksisuksinimid ester (MP-NHS) (80%) açık sarı katı olarak elde edildi. FTIR (KBr pellet, cm^{-1}) 3419, 3326, 2932, 2851, 1810, 1785, 1737, 1575, 1368, 1200, 1071, 994, 814.



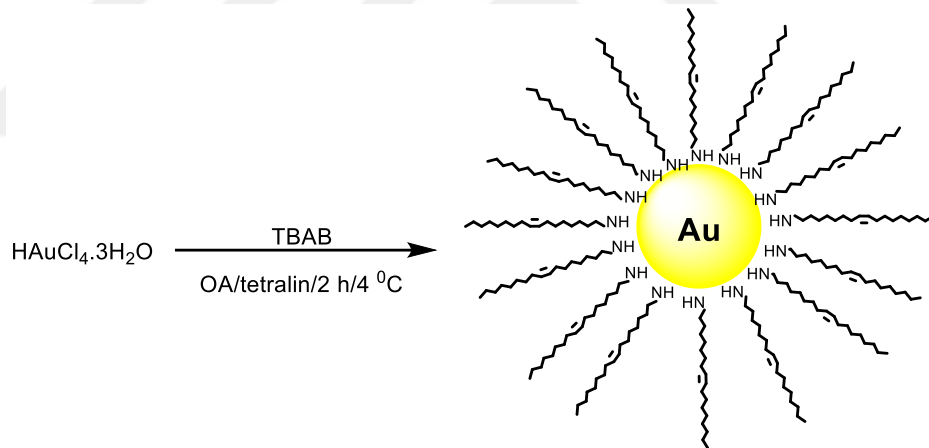
3.1.3. N-(2-((5,8-dihidroksi-4- ((2-((2-hidroksietil)amino)etil)amino)- 9,10-diokso-9,10- dihidroantrasen-1-yl) amino)etil)-N-(2-hidroksietil)- 3-merkaptopropanamid (SMTX) sentezi

Mitoksantron sonlu tiyol molekülü (SMTX) daha önce yayınlanan metotlara göre sentezlendi (Tsou 1997; Majd *et al.* 2013). MP-NHS (2.3 mg, 0.012 mmol) 5 mL DMSO içinde çözüldü ve 10 dakika N₂ atmosferi altında karıştırıldı. O zaman, trietilamin (1.6 µL, 0.012 mmol) çözeltiye ilave edildi ve tekrar 10 dakika karıştırıldı. Diğer bir balonda, trietilamin (0.0095 mL, 0.0675 mmol) ve MTX (0.006 g, 0.0112 mmol) çözeltisi hazırlandı ve 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan her iki çözelti birleştirildi ve oda sıcaklığında azot atmosferinde tüm gece karıştırıldı. DMSO uzaklaştırıldıktan sonra vizkoz bir katı elde edildi. FTIR (KBr pellet, cm⁻¹) 3425, 3000, 2915, 1658, 1564, 1437, 1407, 1314, 1200, 1025, 954, 901; GC-MS (m/z) 203 (RT 8.8 dakika).



3.1.4. Oleyilamin kaplı altın nanopartiküllerin (OAm-AuNPs) sentezi

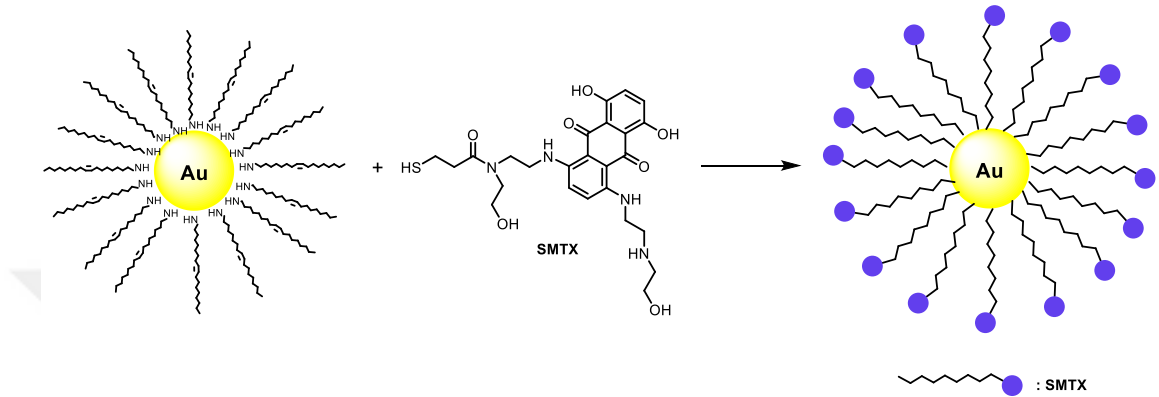
Oleyilamin kaplı altın nanopartiküller (OAm-AuNPs) daha önce literatürde tanımlanan metoda göre sentezlendi (Zhu *et al.* 2013). Kısaca, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), tetralin (15 mL) ve oleyilamin (15 mL) buz banyosunda çözüldü ve 20 dakika karıştırıldı. Benzer şekilde TBAB (0.13 g), tetralin (1 mL) ve oleyilamin (1 mL) sonikasyon işlemi yapılarak çözüldü ve o zaman bu çözelti altın çözeltisine enjekte edildi. Reaksiyon karışımı 2 saat 4°C 'de karıştırıldı. Bundan sonra, aseton (40 mL) OAm-Au nanopartiküllerini çöktürmek için çözeltiye ilave edildi 9000 rpm'de 12 dakika santrifüj işleminden sonra, OAm-Au nanopartiküller hekzan içerisinde yeniden dispers edildi ve iki kez etanol ile yıkandı. FTIR (KBr pellet, cm^{-1} 3448, 3281, 2950, 2853, 1653, 1591, 1461, 1402, 1370, 1265, 1021, 801, 722; UV-vis (hekzan, nm) 520.



3.1.5. Tiyol kaplı altın nanopartiküllerin (SMTX-AuNPs) sentezi

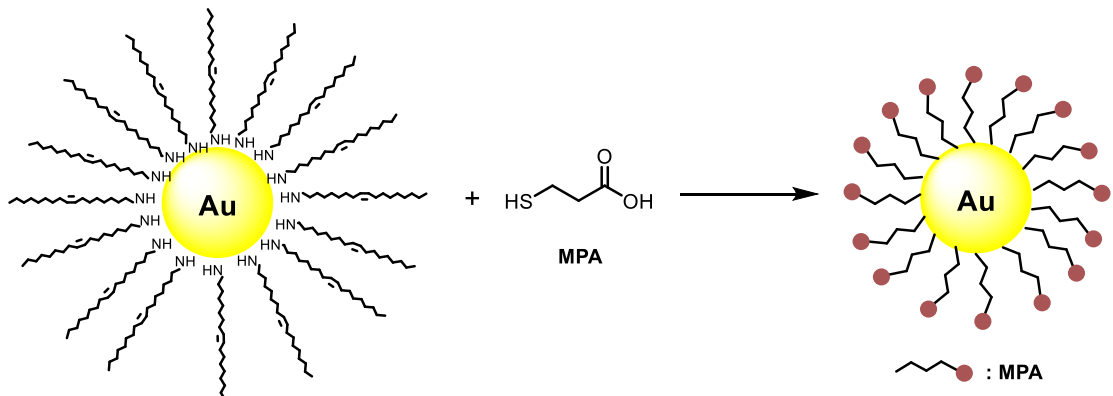
Oleyilamin kaplı altın nanopartiküller'in (OAm-AuNPs) çözücüsü buharlaştırıldıktan sonra katı partiküller 1 mL metilen klorür içinde çözüldü. Daha sonra bu çözeltiye SMTX'in metilen klorür içerisindeki çözeltisi damla damla ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında 10 saat karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra SMTX-AuNP'leri çöktürmek için 10 mL hekzan ilave edildi ve 5000 rpm'de 5 dakika süresince santrifüj edildi. İlk santrifüj işleminden sonra alınan çökelek, safsızlıkları uzaklaştırmak için iki

kez tekrar n-hekzan/metilen klorür karışımı ile 5000 rpm'de 5 dakika süresince santrifüjlendi. FTIR (KBr pellet, cm^{-1}) 3443, 2980, 2913, 2850, 2592, 2321, 2102, 1992, 1660, 1437, 1407, 1313, 1030, 954, 900, 702, 670; UV-vis (DMSO, nm) 560, 610, 660.



3.1.6. Merkaptopropionik asit kaplı altın nanopartiküllerin (MPA-AuNPs) sentezi

Oleyilamin kaplı altın nanopartiküller'in (OAm-AuNPs) hekzan çözücüsü buharlaştırıldıktan sonra katı partiküller 1 mL metilen klorür içinde dispers edildi. Daha sonra bu çözeltiye MPA'nın metilen klorür içerisindeki çözeltisi damla damla ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında 10 saat karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra MPA-AuNP'leri çöktürmek için 10 mL n-hekzan ilave edildi ve 5000 rpm'de 5 dakika süresince santrifüj edildi. Santrifüj işlemi, n-hekzan/metilen klorür çözeltisi kullanılarak iki kez tekrarlandı. FTIR (KBr pellet, cm^{-1}) 3443, 2930, 2850, 1720; UV-vis (hekzan, nm) 530.

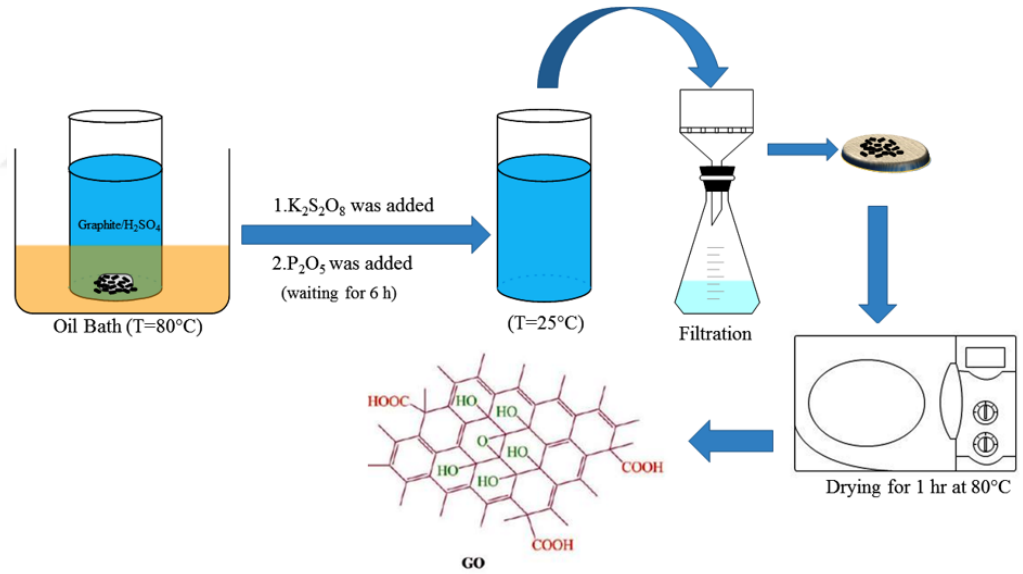


3.1.7. İndirgenmiş grafen oksit (RGO) sentezi

İndirgenmiş grafen oksit (RGO), modifiye edilmiş Hummer's metodundan yola çıkılarak üç basamaklı bir sentez yöntemiyle hazırlandı.

1. Basamak: Grafitin ön oksidasyonu

250 mL'lik bir erlen içerisine 20 g grafit, 10 g P_2O_5 , 10 g $K_2S_2O_8$ ve 50 mL H_2SO_4 eklenerek 6 saat $80^\circ C$ 'de bekletildi (Şekil 3.1). Bekleme süresi sonunda elde edilen madde süzüldü ve parlak gri renkli bir katı elde edildi. Böylece grafitin ön oksidasyon işlemi gerçekleştirilmiş oldu.

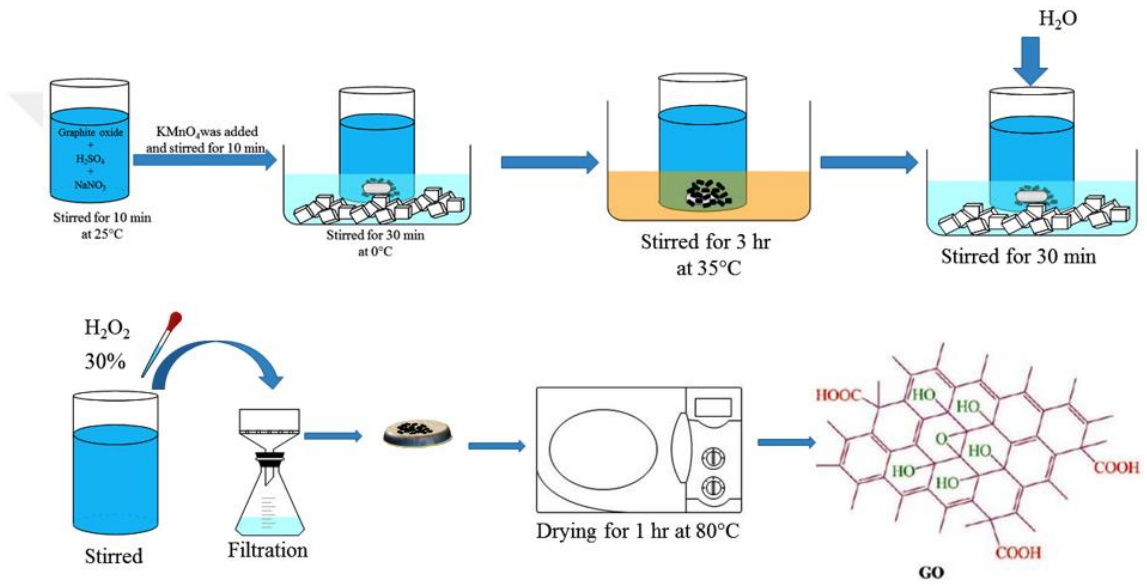


Şekil 3.1. Grafitin ön oksidasyon işleminin şematik gösterimi

2. Basamak: Grafit oksit sentezi

Ön oksidasyon sonucu elde edilen madde kullanılarak, modifiye Hummer's metodu ile grafit oksit sentezlendi (Şekil 3.2). 250 mL'lik bir erlen içerisine 1 g ön oksidasyona uğramış grafit, 1 g $NaNO_3$ ve 50 mL H_2SO_4 konularak manyetik karıştırıcı yardımıyla

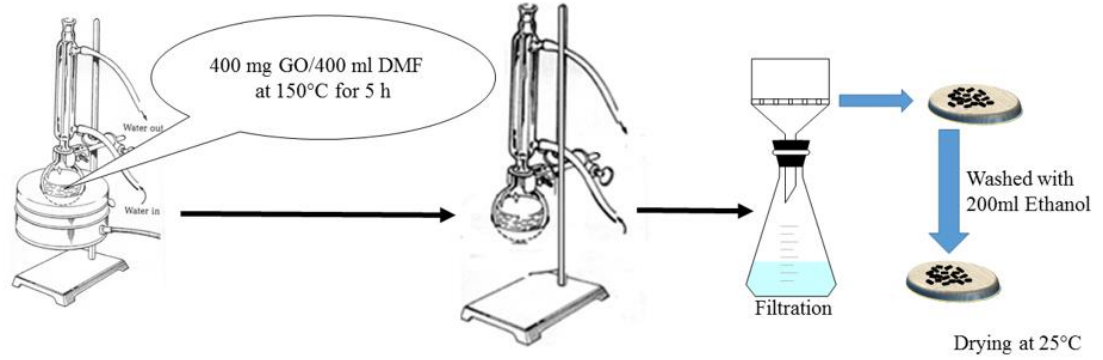
iyice karıştırıldı. Buz banyosunda 0-3°C'ye soğutuldu ve üzerine yavaşça 6 g KMnO_4 eklendi. Erlen buz banyosu içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra sıcaklık 35°C'ye çıkarılarak 3 saat karıştırıldı. Bu süreç sonunda elde edilen yoğun madde tekrar buz banyosuna alınarak 50 mL'lik saf su damla damla ilave edildi. Yaklaşık 30 dakikalık bir karıştırma sonucu koyu kahverengi bir madde elde edildi. Erlen içerisine 100 mL saf su, üzerine 8 mL %30'luk H_2O_2 damla damla ilave edildi. Süzildükten sonra saf su ile yıkanıp 80°C'de etüvde kurutulması sonucu grafit oksit elde edildi.



Şekil 3.2. Grafit oksit sentezinin şematik gösterimi

3. Basamak: İndirgenmiş grafen oksit sentezi

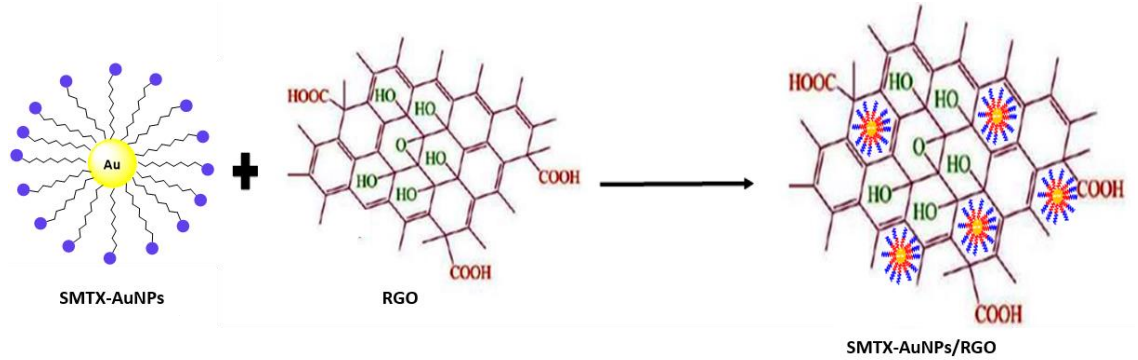
Elde edilen grafit oksitten 400 mg alınarak cam bir balonda 400 mL DMF içerisinde sonikatör yardımı ile çözünme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.3). Cam balon, ısıtıcı ceket içerisine yerleştirilerek 150°C'de 6 saat refluks edildi. Daha sonra oda sıcaklığına soğutularak süzme işlemi yapıldı. Etil alkol ile yıkama yapılarak DMF uzaklaştırıldı. Süzme işlemi sonrası bir döner buharlaştırıcı vasıtasıyla çözücü uzaklaştırıldı. Sonuç olarak RGO elde edildi.



Şekil 3.3. İndirgenmiş grafen oksit sentezinin şematik gösterimi

3.1.8. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezi

5 mg RGO, 1.5 ml DMF içerisinde 2 saat sonike edilerek çözüldü (Şekil 3.4). Daha sonra bu karışıma 5 mg SMTX-AuNPs ilave edildi ve 3 saat daha çözelti sonike edildi. Karışım falkon tüpe alındı ve 15000 rpm’de 10 dakika süresince santrifüj yapıldı. FTIR (KBr pellet, cm^{-1}) 3419, 1633, 1405, 1381, 1121, 690; UV-vis (hekzan, nm) 560.



Şekil 3.4. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezinin şematik gösterimi

3.1.9. MPA-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezi

5 mg RGO, 1.5 ml DMF içerisine ilave edildikten sonra 2 saat sonike edildi ve homojen bir çözelti hazırlandı (Şekil 3.5). Başka bir balonda 5 mg MPA-AuNPs, 1 ml DMF

içerisinde çözüldü ve homojen RGO çözeltisine ilave edildi. Karışım 3 saat süresince sonike edildi. Ürün falkon tüpüne alınıp etanol içerisinde çözüldü ve 15000 rpm’de 10 dakika süresince santrifüj edildi. FTIR (KBr pellet, cm-1) 3419, 1633, 1405, 1381,1405,1381, 1121, 1091, 614.



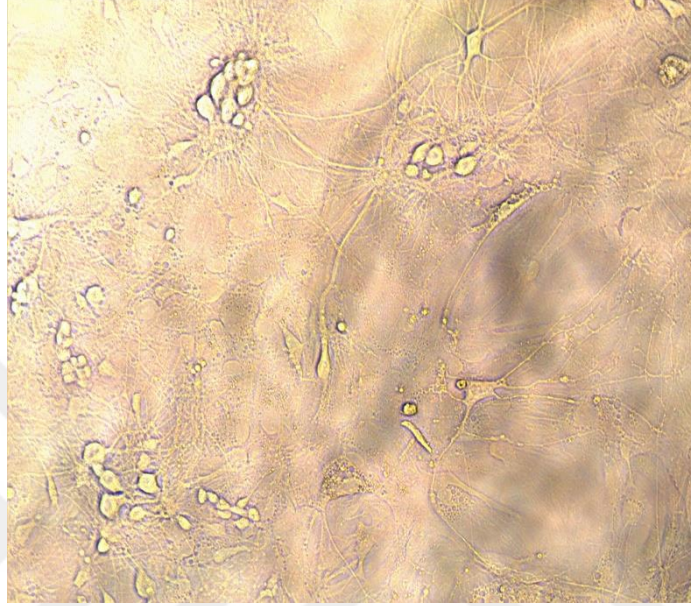
Şekil 3.5. MPA-AuNPs/RGO kompozit yapılarının sentezinin şematik gösterimi

3.1.10. Hücre kültürü

9 adet yeni doğan rat yavrusu (sprague Dawley sıçan yavrusu) öncelikle batekonla yıkandı ve steril petri kabına alınıp hızlı bir şekilde dekapite edildi (Buyukokuroglu, Gepdiremen *et al.* 2003). Kafa, gazlı beze alındıktan sonra önce deri, sonra kafatası ince makasla açıldı. Beyin kaşığı yardımıyla korteks alındı ve 2 mL DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium) solüsyonu bulunan tüpe koyuldu. Tüm korteksler toplandıktan sonra dibe çökmüş beyinler petri kabına alındı ve çift bisturi yardımıyla 20 dakika boyunca hafif dokunuşlarla parçalandı. Bu işlemle makro parçalanmadan sonra mikro parçalama aşamasına geçildi. Tekrar DMEM solüsyonuna alınan parçalanmış korteks üzerine 1/4 oranında tripsin EDTA (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve 30 dakika etüvde bekletildi (Sengul *et al.* 2011).

Alınan hücreler 3 defa 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve her seferinde üst sıvı atıldı ve yeni medyum koyularak yeniden santrifüj edildi. Elde edilen saf nöron hücreleri hazırlanan nöron solüsyonuna, NBM (Neuro Basal Medium), 1/10 FBS (Fetal Bovin Serum), 1/50 B27, 1/1000 antibiyotik konuldu ve her kuyucuk başına 1×10^5

hücre 96'lık polilisin kaplı polistiren kaplarda ekildi. Düzenli olarak her üç günde bir hücreler kontrol edilip medyum değişikliği yapıldı (Şekil 3.6).

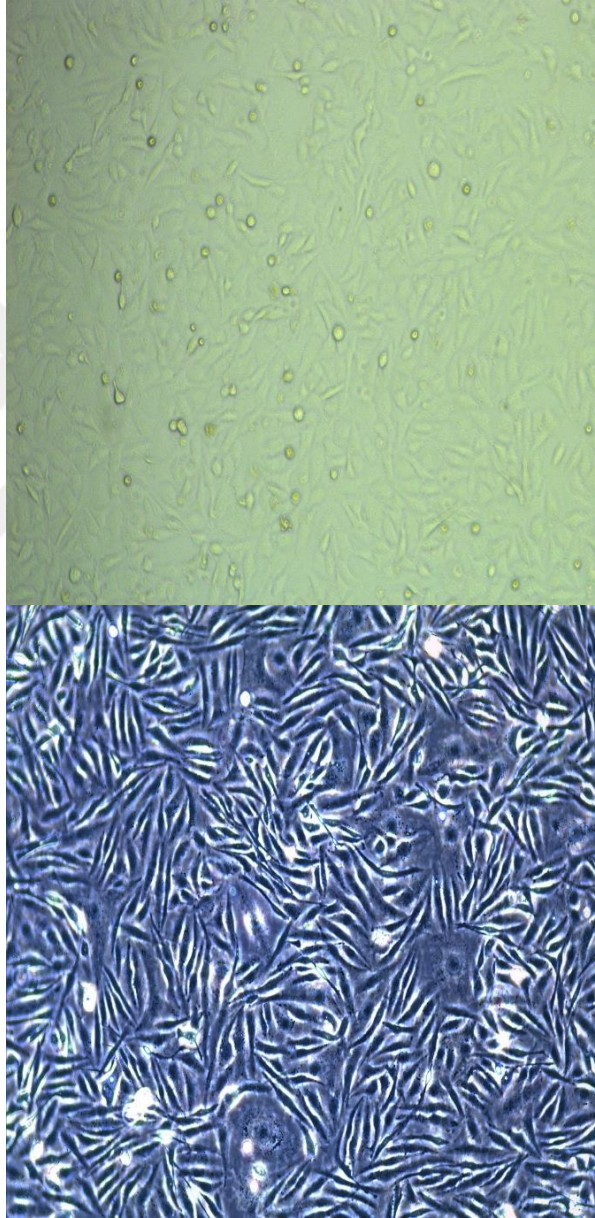


Şekil 3.6. Nöron hücre kültür görüntüsü

3.1.11. Kanser kültürü

U-87MG kanser hattı Van üniversitesinden temin edildi. Krayo falkonlarda gelen hücreler seri şekilde normal oda sıcaklığında çözündürüldü. Sıvı hale gelen hücre ve medyum 2 mL yeni medyumla karıştırılarak 1200 rpm +4 santigrat dereceli santrifüj ile 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Dibe çöken hücrelerin üstü atılarak yeni medyum DMEM, FBS, %1 antibiyotik (pensilin-streptomisin-amfotrisin B), %1 L-Glutamat ile karıştırıldı ve 25 cm² flaskda ekildi. Her 3 günde bir medyum değişikliği uygulandı. Hücreler flaskın %70'ini kaplayınca pasaj işlemi yapıldı. Bunun için hücrelerin medyumunu atılarak uzaklaştırıldı (Wang, Sun *et al.* 2015). Flask steril PBS (Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen) ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm²'lik flaskta 0.4 mL Tripsin/EDTA eklendi ve enkübe ederek 5 dakika hücrelerin kaldırılması için zaman tanındı. 1:1 oranında FBS ilave edildi ve flaskın solüsyonunda yüzen hücreler steril tüpe alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet oluşturan hücrelerin, üst sıvısı

atıldıktan sonra yeni medyum ilave edildi ve 96'lık aparatlara 100 µl gelecek şekilde ekim işlemi yapıldı ve hücre dağılımının homojen olmasına özen gösterildi. Toma camıyla, her kuyucuk başına 1×10^5 hücrenin geldiği saplandı. Aparatlar, 37 derece, %5 CO₂ enkübatörde tutuldu (Şekil 3.7) (Youn *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2015).



Şekil 3.7. U-87MG ve MCF7 hücrelerinin görünümü

3.1.12. MTT ile sitotoksosite testi

Öncelikle 96 bölmeli aparatın her bir bölmesine normal hücreler mikropipetle ilave edildikten sonra üzerlerine AuNP-linker-drug ilave edildi. Daha sonra MTT (3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium brom) sıvısı ilave edildi ve 4 saat inkübe edildi. Bu prosedürde, şayet AuNP-linker-drug dozu düşük ve toksik değilse, normal hücrelerden serbest kalan NADH enzimi MTT sıvısındaki sarı tetrazolü, koyu menekşe rengindeki formazona dönüştürmektedir. Eğer doz, aşırı olur veya ilaç toksik bir davranış sergiler ise hücreler öleceğinden inkübasyon sırasında tetrazolden kaynaklanan sarı renkte herhangi bir değişim gözlenmez. İnkübasyon sırasında formazonun fazlasının kristal çökeleği, DMSO ile çözülüp daha önce başka bölmelere alınan sıvı faz üzerine eklenerek, formazonun maksimum absorbanası olan 540 nm dalga boyunda ELSA ile ölçüm yapılır.

3.1.13. Flow sitometri

Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan floresans ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur. Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresans ışığı yayarlar. Floresans yoğunluğu her bir hücre için eş zamanlı olarak birçok farklı dalga boylarında ölçülür. Floresans propları hücrelerin spesifik bileşenlerinin sayılarını rapor etmek için kullanılırken, floresans antikolar daha çok spesifik yüzey reseptörleri yoğunluklarının rapor edilmesinde kullanılır. Böylece geçiş genleri ifade eden hücreler de dahil olmak üzere farklılaşmış hücre tiplerinin alt populasyonları belirlenir. Flow sitometri aynı zamanda hücreler arası serbest kalsiyum, zar potansiyeli, pH veya serbest yağ asitlerindeki hızlı değişiklikleri de izleyebilir. Flow

sitometriler; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevrimciler ve bilgisayarları içerir. Optik kısım lazer ışığı yayar ve ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklar. Çalışmalarımızda BD FACS Calibur 342976 marka cihaz kullanıldı.

3.1.14. RT PCR

PCR hücre içinde DNA'nın kendisi eşlemesi mekanizmasına dayanır. Çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) biçiminde çözülür, kopyalanarak çoğaltılır ve tekrar bağlanır. Bu teknik;

- Çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta çözülerek tek sarmal haline gelmesi (denatürasyon),
- Primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması (primer eşleşmesi)
- Mg^{+2} iyonlarının varlığında, katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin uzaması (primer uzama)

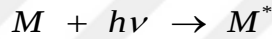
işlem döngülerinin bir çok tekrarından oluşur.

Genellikle kısa zincirlerden oluşan oligonükleotidler, birbirlerinden dizin olarak farklıdır. Primerlerin sekansı, çoğaltılacak hedef DNA'yı komşu tanımlama bölgelerine eştir. Denatürasyon, primer birleşmesi ve primer uzaması PCR metodunda bir döngü oluşturur. Her döngünün sonunda yeni sentezlenen DNA zincirleri, bir sonraki döngü için hedef zincir olabilir. Bu reaksiyonun ana ürünü, sonu oligonükleotid primerlerin 5'ucu olan ve uzunluğu primerler arası uzaklıkla tanımlanan bir dsDNA parçasıdır. Başarılı bir amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri, bir primerin bağlanma bölgeleri arasındaki uzaklıktan daha fazla uzunluğa sahip, farklı boyutlarda DNA molekülleridir. İkinci döngüde, istenen uzaklıktaki DNA zincirleri oluşturulur. Çalışmalarımızda RG 3000 Corbet marka cihaz kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisi (UV-vis)

Ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyon, genel olarak bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanmaktadır. Buradan hareket edilerek, absorpsiyon piklerinin dalga boyları, incelenen türlerdeki bağların tipleriyle ilişkilendirilebilir. Moleküler bir M türünün ultraviyole veya görünür ışını absorplaması iki basamakta cereyan eden bir olaydır. Bunlardan ilki, o türün aşağıda gösterildiği şekilde elektronik uyarılmasıyla ilgilidir.



M ile $h\nu$ fotonu arasındaki reaksiyon ürünü, elektronik olarak uyarılmış M^* ile gösterilen türdür. Uyarılmış türlerin ömürleri kısa olup (10^{-14} s) çeşitli durulma süreçleriyle başka türlere dönüşürler. En yaygın durulma tipi uyarılma enerjisinin ısıya dönüştüğü durumdur.

UV ve görünür bölgede spektrofotometrik ölçümler nitel ve nicel analizde en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Maddenin ışığı soğurma (absorplama) derecesini ölçmek ve bundan yararlanarak derişimi saptamak için, soğurma ile derişim arasındaki ilişki bilinmelidir. Monokromatik (tek dalga boylu ışımaya) ve I_0 şiddetindeki bir ışık demeti, kalınlığı b cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder. Moleküllerin seçilen dalga boyundaki ışığı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Lambert-Beer eşitliği ile verilir.

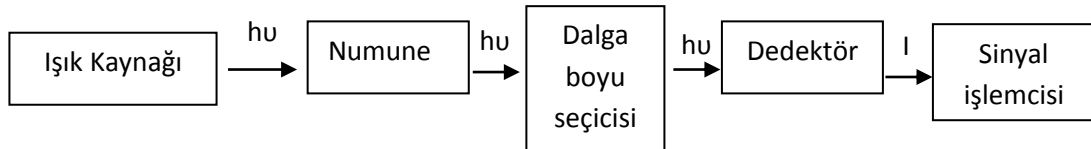
$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc = A$$

Bu eşitlikte, A ; absorbans, I_0 ; örnek kabına giren ışığın şiddeti, I ; örnek kabını terk eden ışığın şiddeti, ϵ ; Molar absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm), b ; örnek kabının kalınlığı (cm), c ; derişim (mol/L)'dir.

Örnek kabını terk eden ve kaba giren ışık şiddetleri arasındaki orana geçirgenlik (T) denir.

$$\frac{I}{I_0} = T = 10^{-abc}$$

Maddenin ışığı absorptlamasını incelemek için spektrofotometre adı verilen bir düzenek kullanılır (Şekil 3.9) ve başlıca ışık kaynağı, monokromatör, örnek kabı ve dedektörden oluşur. Bu tür cihazlarda, radyasyon kaynağı olarak UV ve görünür bölgede ışıma yapan tungsten, hidrojen veya döteryum ve ksenon lambalar gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Sıvı numuneler için örnek kabı olarak 200-320 nm dalga boyu aralığında kuartz, 320-700 nm aralığındaki bölgede ise cam küvetler kullanılabilir. Ayrıca katı numuneler için optikçe transparant elektrotlar (OTE) üzerine adsorplanmış katı materyaller ile ölçüm yapılabilir. Örneğin ışığı absorptlayıp absorptlamadığını anlamak için, ışık kaynağından gelen ışığın şiddeti dedektör ile ölçülür. UV ve görünür bölgede fotovoltaiik veya fotoiletken dedektörler, fototüpler ve fotoçoğaltıcı tüpler dedektör olarak kullanılmaktadır. Spektrofotometrelerde bu ana bileşenlerden başka ışığı toplamak, yansıtmak, bölmek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüler de kullanılır.



Şekil 3.9. Moleküler absorpsiyon cihazları için genel bir şema

Çeşitli kromofor grupların (bir molekülde belli bir dalgaboyu aralığındaki ışığın absorpsiyonundan sorumlu olan fonksiyonel gruplar) absorpsiyon bantları geniş

oldukları için birbirleriyle örtüşürler ve bu nedenle UV ve görünür bölge spektroskopisi ile nitel analiz çok yapılmaz. Diğer taraftan bu yöntem nicel analiz için oldukça uygundur. Çalışmalarımızda Philips 4000 marka cihaz kullanıldı.

3.2.2. İnfrared (IR) spektroskopisi

Bir molekülün infrared ışınlarını absorblayabilmesi için titreşim veya dönme hareketi sonucunda molekülün dipol momentinde net bir değişim meydana gelmelidir. Sadece bu şartlar altında ışının değişen elektrik alanı ile molekül etkileşebilir ve moleküldeki hareketlerin genliğinde bir değişime neden olur. O₂, N₂, Cl₂ gibi tek tip atomlu türlerin dönmesi veya titreşmesi sırasında, dipol momentlerinde net bir değişim olmaz; bu nedenle böyle bileşikler infrared bölgede absorbsiyon göstermezler.

Spektrumun infrared bölgesi, ışının 12800 ile 10 cm⁻¹ dalga sayılı veya 0.78 ile 1000 µm dalga boylu kısmını kapsar. Hem cihaz, hem de uygulama açısından infrared spektrumu yakın, orta ve uzak infrared ışınları olmak üzere üç bölgeye ayrılır. Uzak infrared bölgenin en önemli kullanım alanı, absorbsiyon ölçümlerine dayanan inorganik ve metal-organik bileşiklerin yapılarının tayinidir. Orta infrared bölge ise, organik ve biyokimyasal maddelerin yapılarının aydınlatılmasında oldukça büyük bir öneme sahiptir. Spektrumun yakın infrared (NIR) bölgesi, su, proteinler, düşük molekül kütleli hidrokarbonlar ve bazı yarıiletken maddelerin tayinlerinde kullanılır.

İnfrared absorbsiyonun ölçümünde kullanılan üç tip ticari cihaz bulunmaktadır. Özellikle kalitatif çalışmalarda kullanılan ayırımı (dispersif) optik ağı spektrofotometreler, hem kalitatif hem de kantitatif infrared ölçümlerinde kullanılan fourier dönüşümlü çok amaçlı cihazlar ve atmosferdeki birçok organik maddenin kantitatif tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiş ayırımsız fotometreler. 1980'lere kadar infrared ölçümlerinde en yaygın kullanılan cihazlar ayırımı spektrofotometrelerdi. Fakat günümüzde fourier dönüşümlü spektrometreler hız, güvenilirlik ve kullanım kolaylıkları nedeniyle bu cihazların yerini almaktadır. Orta infrared spektral bölgede fourier dönüşümlü cihazlar, kaliteli bir ayırımı cihazdan

birkaç ondalık mertebesi daha iyi sinyal/gürültü oranına sahiptir. Yakın infrared bölgesi için kullanılan cihazlar, UV-görünür bölge için kullanılan cihazlara benzer. Kuartz pencereci tungsten-halojen lambalar ışın kaynağı olarak kullanılır. Dedektörler genellikle kurşun sülfürden yapılmış fotoiletkenlerdir.

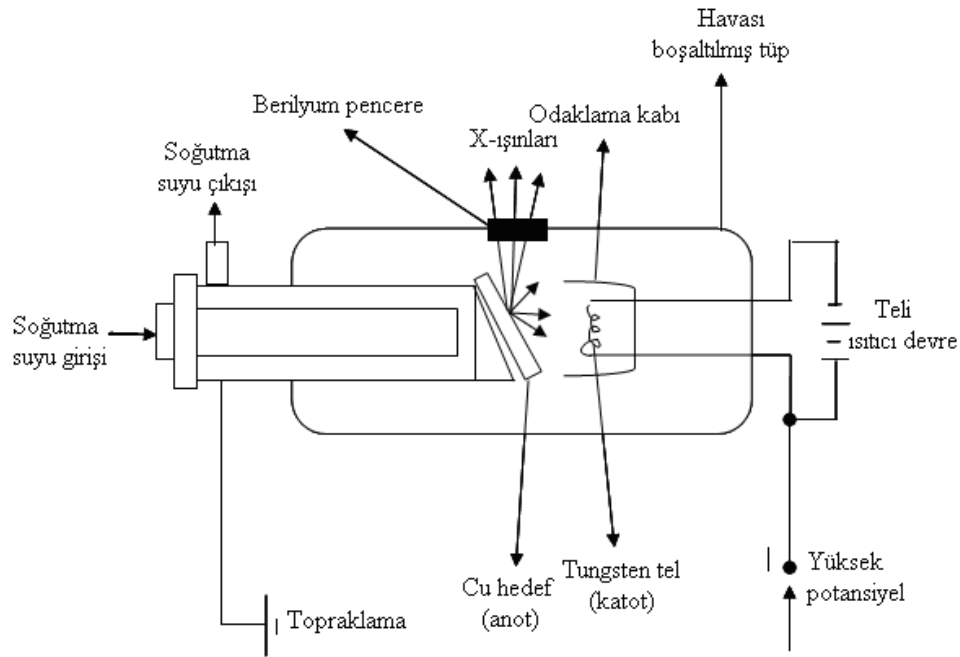
Infrared yansıma spektrometri, polimer filmler ve fiberler, gıdalar, kauçuklar, tarım ürünleri, ve birçok benzeri maddeler gibi katı numunelerle ilgili pekçok uygulama alanı bulmuştur. Yansıma spektrumları ile hem kalitatif, hem de kalitatif analiz yapılabilir. Birçok cihaz üreticileri son zamanlarda infrared adsorpsiyon cihazlarının hücre bölmelerine bir adaptör ekleyerek cihazı aynı zamanda yansıma spektrumu alabilecek hale getirmişlerdir. Çalışmamızda Unicam-4600 model cihaz kullanıldı.

3.2.3. Raman spektroskopisi

Işın demeti şeffaf bir ortamdan geçtiği zaman radyasyon gücünün bir kısmı, demetin geliş yönüne göre çeşitli açılarla her yönde saçılır. Ortamdaki tanecikler moleküler boyutlardaysa saçılan ışın gözle saptanamaz; buna "Rayleigh saçılması" denir. Ortamdaki tanecikler ışının dalga boyu ile kıyaslanabilir boyutlarda olursa saçılma, Tyndal etkisi veya bulanıklık şeklinde gözlenebilir. Hintli fizikçi C.V. Raman, bazı moleküller tarafından saçılan az miktardaki ışının dalga boyunun gelen demetin dalga boyundan farklı olduğunu ve dalga boyundaki kaymaların saçılmaya neden olan moleküllerin kimyasal yapısına göre değiştiğini keşfetti. Raman saçılmasının teorisi, IR spektroskopisine oldukça benzerdir. Bu iki teknik birbirinin tamamlayıcısı niteliğindedir, IR aktif bir grup Raman inaktif veya Raman aktif bir grup IR inaktif olabilir. Bazı sorunların çözümünde IR yöntemi, bazıları içinse Raman yöntemi avantajlıdır. Raman spektranın infraredden en önemli avantajı suyun spektrayı engellememesidir. Raman spektrumları sulu çözeltilerden elde edilebilir. Ayrıca, cam veya kuartz hücreler kullanılabilir, IR'de olduğu gibi, sodyum klorür veya diğer atmosfere karşı kararsız pencerelerle çalışma zorunluluğu yoktur. Çalışmamızda Perkin-Elmer model 12 Raman spektrometre kullanıldı.

3.2.4. X-Işınlari kırınım (XRD) yöntemi

X-ışınları kırınımı (XRD) basit inorganik katılardan, DNA ve proteinler gibi daha kompleks yapıdaki molekülleri içeren materyallerin kristal yapıları, kimyasal bileşimleri ve fiziksel özellikleri hakkında bilgi sağlayan analitik bir tekniktir. Bu çok yönlü tekniğin temeli, örnekle etkileşerek yansıyan ve kırılan X-ışınlarına ait verilerin toplanmasına dayanır. Günümüzde X-ışınları kırınım tekniği, incelenecek örnek türüne bağlı olarak kristaldeki atom düzlemleri arasındaki uzaklığın, kristal boyutunun ve kusurlarının ve ayrıca epitaksiyel filmlerdeki gerilimlerin belirlenebilmesi gibi değişik uygulamalara sahiptir. Ayrıca, kırınım piklerinin altındaki alanlar örnekte mevcut olan her bir fazın konsantrasyonuna bağlı olarak değişim gösterir. X-ışınları kırınımı, aşırı miktarlardaki X-ışını verilerini işleyebilen çok yüksek hıza sahip bilgisayarların kullanımıyla büyük ölçüde gelişmiştir.



Şekil 3.10. Bir X-ışını tüpünün şeması

XRD çalışmalarında, monokromatik X-ışınları (dalga boyu aralığı; 10^{-5} - 10^2 Å) kullanılır. Şekil 3.10'da gösterildiği gibi bir X-ışınları tüpünde ısıtılan bir katottan

(tungsten gibi) yayınlanan elektronlar 100 kV'luk elektromanyetik bir alan içinde hızlandırılırlar. Hızlandırılarak yüksek enerji kazandırılan bu elektron demeti bir anota (bakır gibi) çarptığında, elektronlar anotun elektron kabuklarına girerler (Skoog *et al.* 1998).

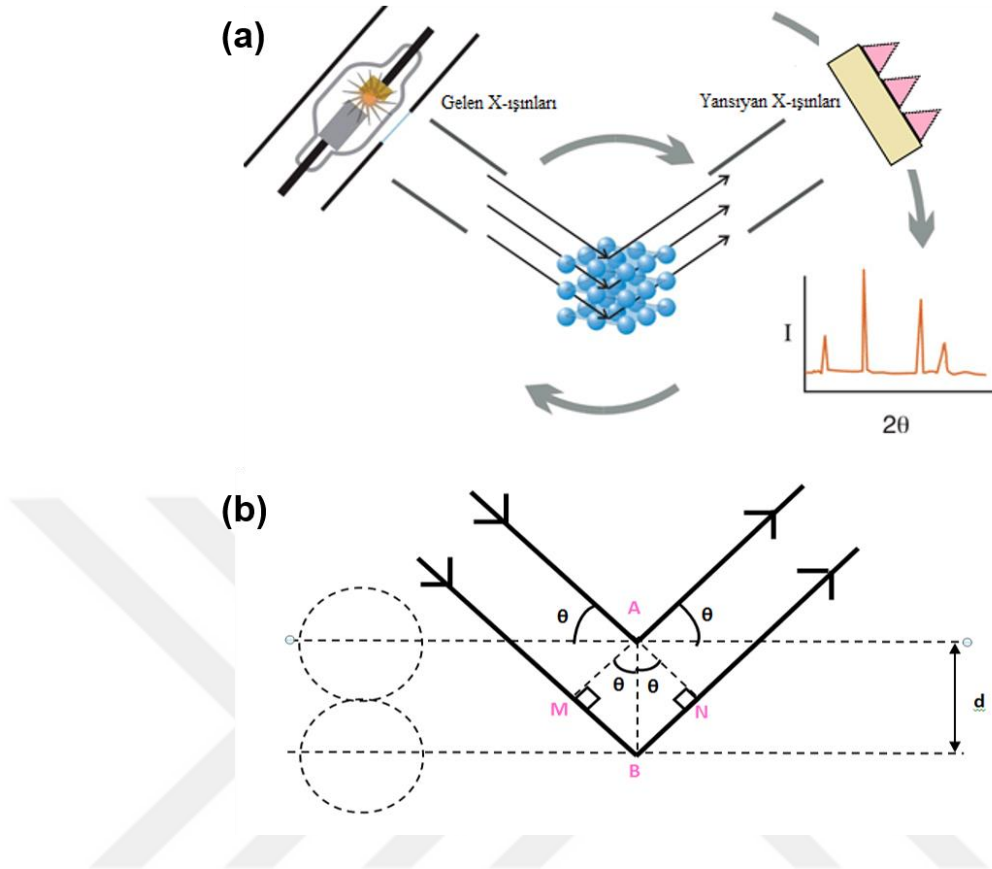
Yüksek enerjili elektron demeti çekirdeğe yakın kabuktaki bir elektrona çarparak onu yerinden çıkartırsa, elektron kaybindan dolayı atom kararsız hale geçer ve boş kalan elektronun yeri daha yüksek enerjili kabuktaki bir elektron tarafından doldurulur. Bu elektron geçişinden kaynaklanan enerji farkı, X-ışını fotonu olarak yayınlanır.

Yayınlanan enerji,

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

bağıntısıyla belirlenir. Burada; h: Planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34}$ J.s), c: ışık hızı (3×10^8 m/s), λ ise X-ışınının dalga boyudur.

Bir yarıktan geçirildikten sonra paralel hale getirilen X-ışınları, daha sonra döner bir masa üzerine yerleştirilmiş kristal düzlemine gelir (Şekil 3.11). Diğer elektromanyetik ışın türlerinde olduğu gibi, X-ışınının elektrik alan vektörüyle ışının içinden geçtiği maddenin elektronları arasındaki etkileşme sonucu saçılma meydana gelir. X-ışınları bir kristaldeki düzenli ortam tarafından saçıldığında, saçılmayı yapan merkezler arasındaki mesafe ışığın dalga boyu ile aynı mertebeden olduğu için saçılan ışınlar girişim (olumlu veya olumsuz etki) yaparlar. Bu durum genel olarak kırınım olarak adlandırılır. Kırınım olayında, gelen X-ışınları kristal yüzeyinin altındaki atom düzlemlerine de ulaşır yani kırınım yüzeysel bir olay değildir. Düzensiz yapıda (amorf) bir kristal düzlemine gelen X-ışınları demeti kristal düzlemlerine herhangi bir açıyla çarparsa, kırınım gerçekleşmez. Çünkü kristal düzlemlerinden yansıyan X-ışınlarının aldıkları yolların uzunlukları farklı olduğundan, söz konusu ışınlar arasında faz farkı oluşur ve bu ışınlar birbirlerini söndürürler. Bunun sonucu olarak herhangi bir difraksiyon piki gözlenmez.



Şekil 3.11. (a) Bir kristal düzleminde X-ışını kırınımının meydana gelişi ve (b) kırınım olayında X-ışınlarının aldığı yolların uzunlukları arasındaki farkların ayrıntılı bir şekilde gösterimi

X-ışını demetinin atom düzlemlerine Bragg açısı olarak bilinen belirli bir açı ile çarpması durumunda ise yansıyan ışınlar tarafından alınan yol, uygun geliş açısında dalga boyunun (λ) tam katlarına eşit olacağından, ışınlar aynı faza sahip olur.

Kırınıma uğrayan, yani atom düzlemlerinden yansıyan X-ışınlarının aynı fazda olması durumunda kırınım deseni oluşur. Kırınım deseni elde edebilmek için; X-ışınlarının atom düzlemlerine çarpma açısı (θ), atom düzlemleri arasındaki uzaklık (d) ve gelen X-ışınlarının dalga boyu (λ) arasında belirli bir bağıntının bulunması gerekir. Bir X-ışını demetinin birbirine paralel atom düzlemlerine, θ açısı altında çarpması durumunda kırınım meydana gelir. Yani kristal düzlemi, düzenli tek kristal yapısında ise, X-ışınları kristal düzleminde aynı fazda saçılır. Bunun sonucu olarak kırınım gözlenir. Kırınımın meydana gelişi Şekil 3.11.a'da gösterilmektedir. Burada farklı kristal düzlemlerinden yansıyan ışınların dedektöre geldiğinde aynı faz içinde olması gerekir. Bunun

gerçekleşebilmesi için de Şekil 3.11.b'de gösterilen MBN yol farkının λ dalga boyuna veya λ 'nın tam katlarına eşit olması gerekir. Yansıyan ışınlar, ancak bu durumda aynı fazda olurlar. Kırınım olayında X-ışınlarının aldığı yolların uzunlukları arasındaki farklar Şekil 3.11.b'de ayrıntılı bir biçimde görülmektedir. Buna göre, X-ışınlarının aldıkları yolların uzunlukları arasındaki fark;

$$MBN=MB+BN$$

olarak yazılabilir. AMB ve ANB dik üçgenlerinden;

$$\sin\theta = \frac{MB}{d} = \frac{BN}{d}$$

$$MB=BN=d \sin\theta$$

şeklinde yazılır. Buradan, x-ışınlarının aldıkları yolların uzunlukları arasındaki fark,

$$MB+BN=2d \sin\theta$$

olarak bulunur. Kırınımın gerçekleşmesi için bu yol farkının λ veya λ 'nın tam katlarına eşit olması gerekir. Bu nedenle;

$$2d \sin\theta = n \lambda$$

bağıntısı elde edilir. Burada; Bragg açısı (gelen ışınlarla atom düzlemlerinin yaptığı açı) ve λ (kullanılan X-ışınının dalga boyu) bilinirse d (atom düzlemleri arasındaki uzaklık) hesaplanabilir. Bragg kanunu olarak bilinen bu bağıntı X-ışını kırınımı için gerekli koşulu ifade eder. Tez kapsamında Siemens D5000 X-Ray Difraktometre kullanıldı.

3.2.5. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

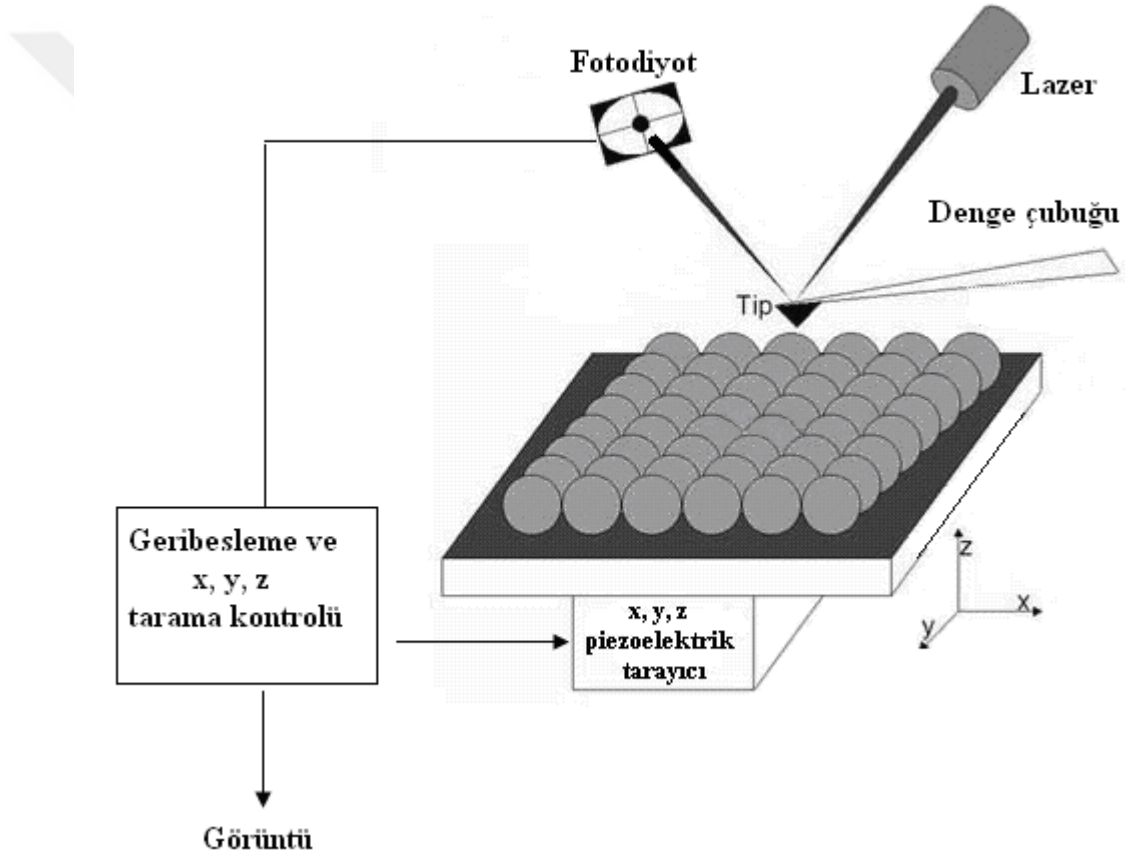
Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), 1986 yılında Binnig, Quate ve Gerber tarafından geliştirildi. AFM tekniği kullanılarak iletken, yarıiletken ve manyetik özellik gösteren örneklerin yanı sıra polimer, seramik, alaşım, camsı materyaller, sentetik ve biyolojik membranlar gibi yalıtkan olan hemen hemen her türlü numune yüzeyi hakkında da morfolojik bilgi almak mümkündür.

AFM’de tip ile örnek arasında elektrostatik, kapiler, Van der Waals, sürtünme ve magnetik kuvvet gibi güçler söz konusudur. Bundan dolayı AFM sayesinde her türlü örnek morfolojisi incelenebilir. Bu sistemde kuvvete karşı duyarlı bir ucu iğneli denge çubuğu (tip) numune üzerinde raster düzeninde tarama yapar. AFM’de silisyum, silisyum oksit veya silisyum nitrürden yapılmış keskin bir tip, genellikle silisyum oksitten yapılan kantarilever adı verilen ve belli bir kuvvet sabitine sahip denge çubuğuna tutturulmuştur. Denge çubuğu yüzeye yaklaştırıldığında, tip ile yüzey arasındaki kuvvetler denge çubuğunun z eksenini boyunca (yüzeye dik olarak) yukarı ve aşağı doğru eğilmesine neden olur ve bu yer değişimlerinin optik araçlarla ölçülmesi ile yüzey morfolojisi tespit edilir. AFM tipinin hareketinin temelini Hook yasası oluşturur. Hook yasası; denge çubuğunun z mesafesi kadar yer değiştirmesi için uygulanan kuvvet (F) ve kantarileverin yay sabiti (k) ile ifade edilir. Böylece tip ve örnek arasındaki etkileşim kuvvetleri bulunabilir.

$$F = -kz$$

Bir atomik kuvvet mikroskobunun performansı denge çubuğunun ve ucun (tipin) fiziksel niteliklerine bağlıdır. Denge çubukları oldukça küçük ve hassas parçalardır. Denge çubukları yaklaşık olarak 10-20 mikrometre uzunluğunda, on mikrometreden daha az genişlikte ve yaklaşık bir mikrometre kalınlığındadır. Piramit veya konik şekilli uçların yüksekliği ve taban genişliği birkaç mikrometredir. Genellikle, 0,001 ile 100 N/m aralığındaki bir yay sabitine sahip bir denge çubuğu kullanılarak 1-0,1 Å’luk mesafelerdeki, 10^{-11} - 10^{-6} N’luk yüzey/tip etkileşim kuvvetlerini belirlemek mümkündür.

Şekil 3.12, tipi tutan denge çubuğunun sapmasının tayininde kullanılan en yaygın yöntemi şematik olarak göstermektedir. Bir lazer demeti denge çubuğu üzerindeki bir noktadan yansıtılarak pozisyona duyarlı, hareketi tayin eden iki veya dört bölmeden oluşan fotodiyoda ulaşır. Daha sonra fotodiyod çıkışı, denge çubuğunun aşağı yukarı hareketiyle uca uygulanan kuvveti kontrol ederek kuvvetin sabit kalmasını sağlar. Başka bir deyişle optik kontrol sistemi, taramalı tünelleme mikroskopunda tünelleme akımını kontrol eden sistemle benzerlik gösterir.



Şekil 3.12. AFM (Atomik kuvvet mikroskop) sisteminin şematik görünüşü

Atomik kuvvet mikroskobu ile iki farklı yöntem kullanılarak görüntü alınmaktadır. AFM'in kullanılan en yaygın metodu olan kontak modda, denge çubuğunun ucundaki tiple yüzey arasında çok yakın bir fiziksel temas söz konusudur. Başta özellikle Van der Waals itme kuvvetlerinin etkili olduğu bu statik modda tip ve örnek arasında etkileşimi sağlayan kuvvet yaklaşık olarak 0,1-100 nN'luk bir değere sahiptir. Normal şartlar

altında Van der Waals etkileşimlerinin yanı sıra ince bir su tabakasıyla kaplı örnek yüzeyinden (kapiler çekme kuvvetleri) ve denge çubuğunun kendisinden kaynaklanan mekanik etkilerde söz konusudur. Kapiler güçlerin şiddeti, tip ile örnek arasındaki mesafe ile değişebilmesine rağmen sıkıştırılmış bir yayın kuvvetine benzer olan mekanik kuvvetlerin büyüklüğü ve yönü (itme veya çekme) ise denge çubuğunun esneklik sabitine bağlıdır. Kısacası kontak AFM modda örnek-tip etkileşiminden kaynaklanan itici Van der Waals kuvvetlerinin, mekanik ve kapiler kuvvetlerin sonucu oluşan güçlerin bileşkesi ile dengelenmesi gerekmektedir. Ancak yinede, tipin numune yüzeyine oldukça yakın olması nedeniyle aşağıya doğru olan çekici güçler baskın hale gelebilmektedir. Bunun sonucunda ise, özellikle biyolojik numuneler ve polimerler gibi yumuşak malzemelerde tip ile örnek yüzeyinin hasar görmesi ve görüntünün bozulması gibi durumlar söz konusu olabilir.

Titreşimli (tapping) mod ve non-kontak mod olarak adlandırılan dinamik yöntemler ise yüzeyin hasar görmesini önlemek amacıyla geliştirilmiştir. Tipin yüzeye sadece çok kısa sürelerde periyodik olarak temas edip uzaklaştığı titreşimli mod adı verilen bu teknikte, denge çubuğu birkaç yüz kilohertz'lik bir frekansla salınım yapmaktadır. Fotodetektör tarafından ölçülen bu salınım frekansının şiddeti ise, uç ile numune yüzeyi arasındaki etkileşim kuvvetlerine bağlı olarak artma veya azalma göstermektedir. Geri besleme mekanizması bu osilasyon şiddetini sabit tutmak için yüzey üzerindeki ucun yüksekliğini değiştirir. Buradan bulunabilecek değişim, hem numunenin özellikleri hem de etkileşim miktarı hakkında bilgi vermektedir. Diğer bir dinamik metot olan non-kontak modda, AFM atomik kuvvetlerinin (Van der Waals, elektrostatik, manyetik ve kapiler) yardımıyla denge çubuğunun aşağı ve yukarıya doğru eğilmesinden faydalanılarak yüzeye dokunmadan topografik görüntü oluşturulmaktadır. Tip ile yüzey arasındaki mesafenin 50-150 Å olduğu bu modda, başlıca Van der Waals çekim kuvvetleri etkin olmaktadır. Göreceli olarak zayıf olan bu etkileşim kuvvetleri, tipin rezonans frekansında veya ona yakın bir değerde (yaklaşık olarak saniyede yüz bin defa) titreşmesi sağlanarak tespit edilebilir. Rezonans frekansta titreşim yaptırmak için genel olarak denge çubuğunun altına monte edilen küçük bir piezo kristali kullanılır. Sonuç olarak, AFM tekniğinin yaygın olarak tercih edilen bu iki dinamik sabit temas

modu ile görüntüsü alınamayan veya çok zor alınan özellikle zayıf bağlı veya yumuşak türdeki malzemelerin yüksek rezölüsyonlu görüntülerini elde etmek için kullanılmaktadır. Bu çalışma için kullanılan cihaz Nanosurf model S'dir.

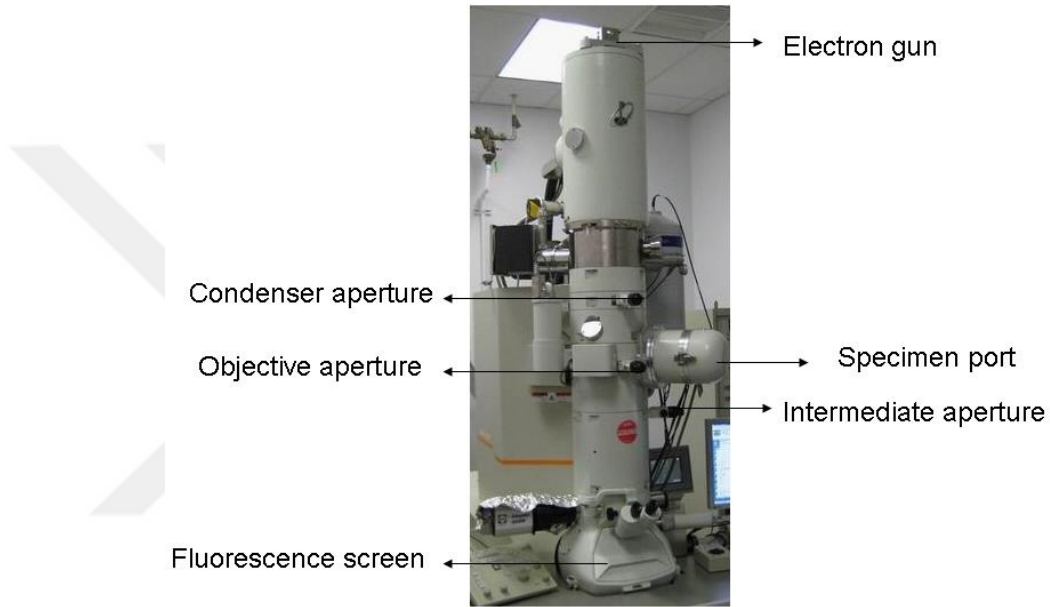
3.2.6. Enerji dağılımlı spektroskopi (EDS)

İncelenen numune yüzeyindeki bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayini, numune içinde istenilenden başka elementlerin olup olmadığı EDS tekniği ile belirlenebilir. EDS genelde taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kombine haldedir. SEM'de numune yüzeyi tarama düzeninde yüksek enerjili elektron demeti ile taranır. Yüzeyden çeşitli tür sinyaller oluşturulur. Bunlar geri saçılmış e^- 'lar, Auger e^- 'ları, ikincil e^- 'lar, X-ışını emisyonu ve değişik enerjili diğer fotonlardır. Bunlardan geri saçılmış ve ikincil e^- 'lar SEM'in temelini oluşturur. EDS'in temeli ise elektron bombardımanına maruz bırakılan numuneden elektronlarla numunenin etkileşimi sonucunda salınan X-ışının çözülmesine dayanır. Periyodik tablodaki her bir elementin farklı elektronik yapıya sahip olmasının bir sonucu olarak her element farklı bir cevap verecek ve her bir element için salınan ışınların enerjisi farklı olacaktır.

3.2.7. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (Şekil 3.13), görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro yapısal incelenmesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen çok özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Bir başka deyişle, nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütme malzemenin kristalagrofik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasını olanaklı kılan bir tekniktir. Yüksek ayırma gücü, aynı anda kırınım ve görüntü bilgilerinin alınabilmesi gibi üstünlüklerine rağmen, bu tekniğin de belli sınırlamaları vardır: Üç boyutlu bir numuneden alınan iki boyutlu ve kırınım kökenli görüntülerin yorumlanması uzmanlık gerektirir. Özellikle biyolojik ve polimerik malzemelerde öne çıkan ışın hasarı (beam, damage) etkisi numune özelliklerinin değişmesine yol açabilmektedir. En büyük kısıtlama ise numune hazırlamada ortaya

çıkar. Elektron mikroskopta incelenecek numune kesinlikle katı malzeme olmak zorundadır ve 3 mm çapında, 100 mm'den daha ince ve elektron geçirgenliğine sahip (bir kaç mm) bir disk olarak hazırlanma zorunluluğu sorun yaratabilir. Dolayısıyla elektron geçirgenliğine uygun olarak hazırlanamamış bir numuneden bir görüntü kontrastı elde etmek mümkün olamamaktadır.



Şekil 3.13. Geçirimli elektron mikroskobu

TEM'de görüntü ve kırınım bilgisini elde etmenin temel prensibi, ortasında çok küçük bir delik bulunan numuneye paralel bir elektron demeti göndermek ve numuneden doğrudan geçen kırınımına uğramamış ışınları (TB) ve numunenin belirli düzlemlerinden Bragg şartlarına uygun açılarda kırınımına uğramış (DB) ışınları numunenin altında toplamak esasına dayanır. Sırasıyla sadece geçen ışın demetini ve kırınımına uğramış ışınlardan birini kullanarak yapılan görüntüleme teknikleri olan aydınlık alan ve karanlık alan görüntüleri numunelerdeki mikron altı boyutlardaki oluşumların incelenmesinde, var olan ikinci fazların ayırt edilmesinde en çok kullanılan yöntemlerdir. Yüksek çözünürlüklü kafes görüntülemesi (HRLI) kristal numunelerdeki atomik düzlemlerin izdüşümlerini görüntülemeye kullanılan daha ileri bir tekniktir. Malzemelerin kristal yapılarının belirlenmesinde ise seçilmiş alan kırınım yöntemi

kullanılır. Yüksek açılı huzme kırınımı (CBED) ise malzemelerin tam kristalografik analizinde (nokta ve uzay guruplarının belirlenmesi) kullanılabilen çok gelişmiş bir başka kırınım tekniğidir. Yüksek açılı açılal karanlık alan (HAADF) detektörüne sahip Taramalı-Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM) HAABF ve HAADF görüntülerinin eldesinde kullanılır. STEM görüntülerinde taramalı elektron mikroskobuna benzer bir mantıkla numuneyi tarayan bir ışıandan alınan sinyallerle görüntü eldesi biraz zaman almakla birlikte, mercek hatalarından arındırılmış görüntüler elde edilmesiyle önemli bir avantaj olarak görülebilir. Çalışmalarımızda 100kb LEO 900 cihazı kullanılmıştır.

3.2.8. Gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC/MS)

Gaz kromatografi/kütle spektroskopisi, iki güçlü analitik tekniğin kombinasyonudur. Gaz kromatografisi, karışımındaki bileşenleri ayırır. Kütle spektroskopisi, her bir bileşenin yapısal olarak tanımlanmasında yardımcı olur. Çok düşük miktarlardaki örneklerin tanımlanması, güçlü yapısal analiz, hızlı analiz süresi gibi önemli avantajları bulunmaktadır. Gaz kromatografisinde karışımındaki maddeler birbirinden ayrıldıktan sonra iyonlaştırarak kütle spektrometresinde karışımındaki maddelerin kütlelerine bağlı olarak elementler tayin edilir.

GC-MS sistemi çok bileşenli karışımlardaki elementlerin belirlenmesinde, gaz fazında bulunan ya da gazlaştırılabilen numunelerin kütle kromatografik yöntemle ayrımını sağlar. Elde edilen spektrumlar yardımıyla ileri seviye (organik, inorganik ve biyolojik) moleküler yapı tayinlerinde, kalitatif ve kantitatif çalışmalar için kullanılan yüksek performanslı ve yüksek hızlı bir gaz kromatografisi kütle spektrometresi sistemidir. Analizler için GC-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, Canada) cihazı kullanıldı.

3.2.9. Temas açısı (Contact angle)

TZM-2 adında bir mikroskop ve CiOMS3MP adında bir kamera bulunduran bu cihaz İtalyan bir şirket tarafından yapılmıştır (Şekil 3.14).

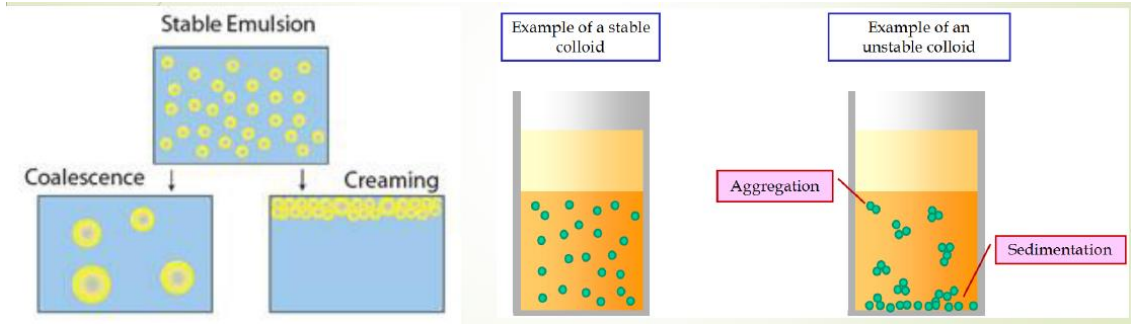


Şekil 3.14. Temas açısı ölçümleri için kullanılan cihaz

Cihazın uygulaması, numune yüzeyine çözeltiden bir damla damlatılır ve damla ile numune yüzeyi arasında oluşan açı ölçülür. Bu cihazda ölçüm yapmak için, teflon fitreler yüzeyine önceden su içerisinde dispers edilmiş grafen, grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit çözeltileri damlatılarak 50°C’de 12 saat kurutuldu ve her numune analizi beş kere tekrar edildi.

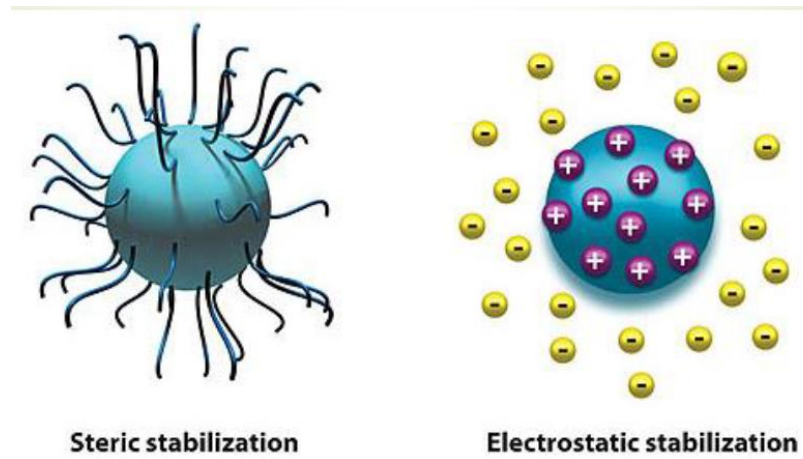
3.2.10. Zeta potansiyeli

Maddenin, katı, sıvı ve gaz hali homojen bir şekilde karıştırılarak kolloid çözeltileri oluşturulur. Kolloid sistem içerisindeki partiküller birleşerek toplanırlar (Şekil 3.15). Oluşan topaklar ya çökerler yada köpük halinde çözelti yüzeyinde kalırlar. Bu topaklar oldukça büyüdüktan sonra pıhtılaşırlar. Topaklar sonikatör etkisiyle eski haline dönerken pıhtılaşanlar sonikatörle eski haline dönmezler.



Şekil 3.15. Kolloidal çözeltilerin şematik gösterimi

Parçacıklar arasındaki itici kuvvetler aglomerasyon ve topaklaşmanın oluşumunu engeller. İtici kuvvetler ne kadar fazlaysa çözelti o kadar kararlıdır. İtici kuvvetlerin artması istenmektedir, bunun için de iki metot vardır (Şekil 3.16). Birinci yöntem, polimerik maddelerin kolloid çözeltilerine eklenmesine dayanır. İkinci yöntem ise; çözelti ortamına asit ya da baz ilave edilerek partikül yüzeyindeki yüklerin oluşumu ile çözeltinin kararlı hale getirilmesidir.

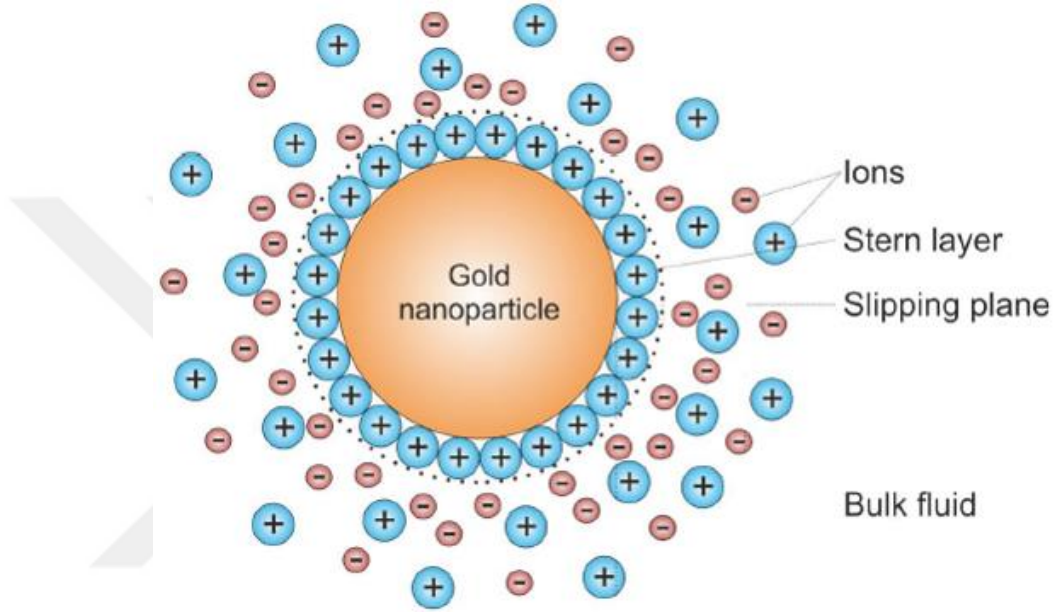


Şekil 3.16. Kararlı kolloidal çözeltilerin oluşumu

Bir kolloidal partikül etrafında üç tabaka vardır;

1. Birinci tabaka, yükler çekici kuvvetlerin etkisiyle düzenli bir şekilde oluşurlar.

2. İkinci tabaka, yüklerin çekici kuvvetleri azaldığından uzak mesafede olurlar ve düzenli halde değildir.
3. Üçüncü tabaka da ise çekici kuvvet oldukça azaldığından yükler arası mesafe fazladır ve düzenli değildir.



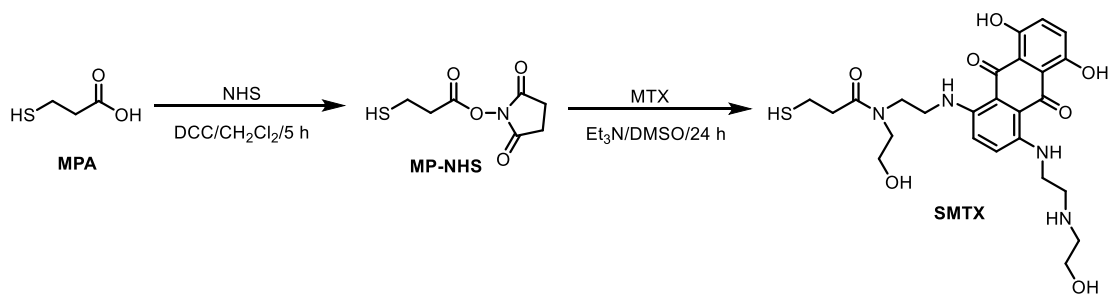
Şekil 3.17. Kolloidal partiküllerin yapısı

İkinci tabakanın en son noktasında olan potansiyele zeta potansiyeli denir. Kolloidlerin kararlılıklarının incelenmesi zeta potansiyel yardımıyla yapılır. Eğer zeta potansiyeli $+30\mu V$ ya da $-30\mu V$ olursa elde edilen partikül kararlıdır. Çalışmalarımızda Nanotracer wave marka cihaz kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve BULGULAR

4.1. SMTX'in Sentezi ve Karakterizasyonu

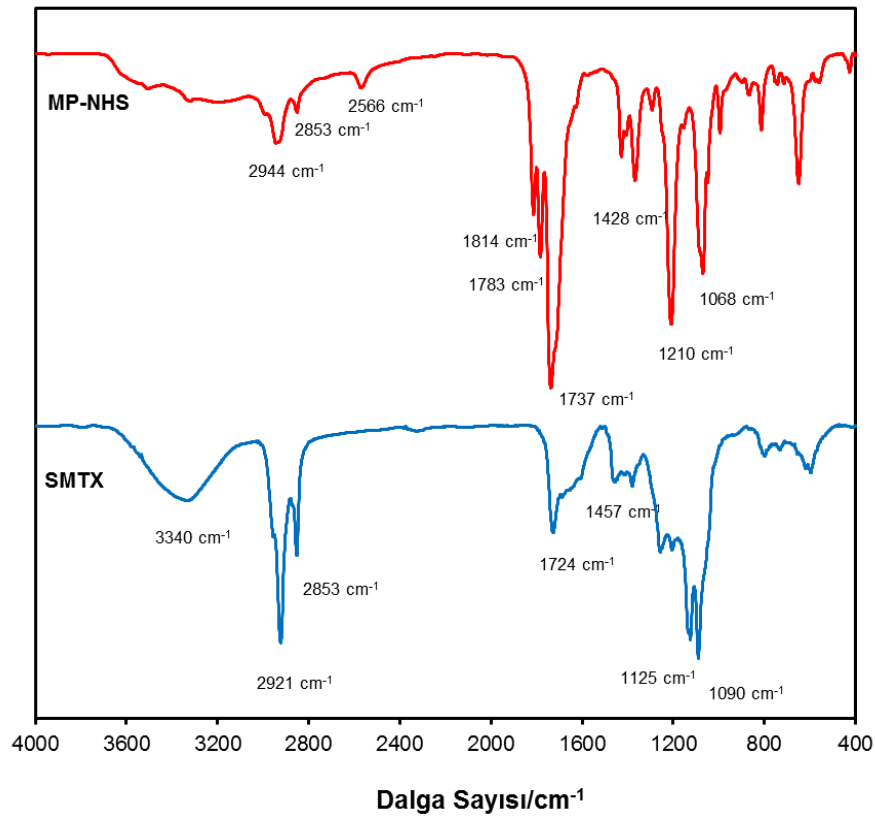
Mitoksantron sonlu tiyol molekülü (SMTX) iki adım bir prosedür kullanılarak sentezlendi. SMTX'in sentez şeması Şekil 4.1'de verilmektedir. İlk adımda, merkaptopropiyonik asit ve NHS kuru diklorometan içerisinde azot atmosferi altında çözüldü ve buz banyosu kullanılarak ortam 0°C'ye soğutuldu. DCC azot atmosferinde kuru diklorometan içerisinde çözüldü ve 0°C'de reaksiyon karışımına yavaş bir şekilde ilave edildi. Reaksiyon karışımı 0°C'de 1 saat ve oda sıcaklığında 4 saat karıştırıldı. Ürün kolon kromatografisi ile izole edildi. Etil asetat/n-hekzan ile saflaştırma sonucu aktif ester (MP-NHS) elde edildi. İkinci adımda, MP-NHS ve trietilamin DMSO içerisinde çözüldü ve N₂ atmosferi altında karıştırıldı. Diğer bir balonda trietilamin ve MTX çözeltisi hazırlandı ve aktif ester çözeltisine ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında tüm gece karıştırıldı. Madde, DMSO uzaklaştırıldıktan sonra vizkoz katı olarak elde edildi. Sentezlenen moleküllerin yapıları, MP-NHS ve SMTX, FTIR ve GC-MS spektroskopik teknikleri ile analiz edildi.



Şekil 4.1. Mitoksantron sonlu tiyol molekülünün sentez prosedürü

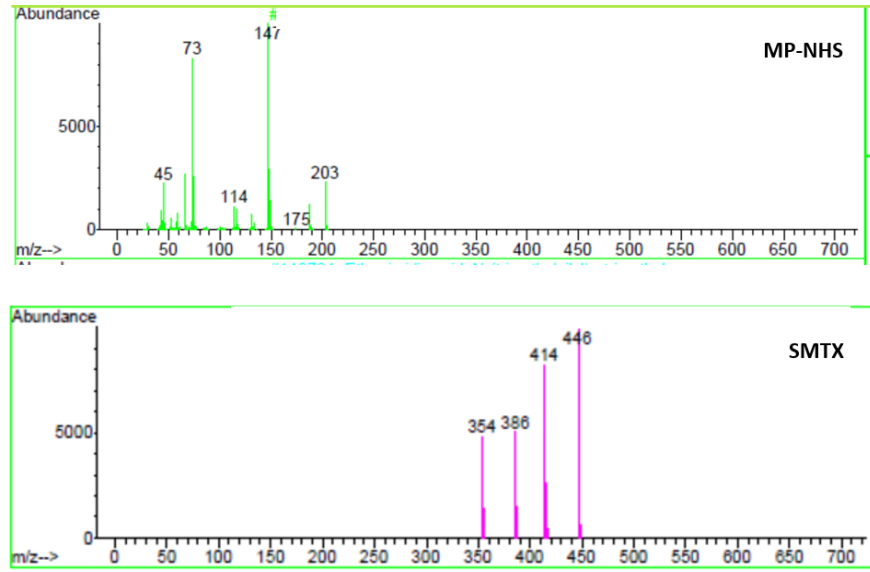
MP-NHS ve SMTX molekülleri için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.2'de görülmektedir. MP-NHS için 2944, 2853 ve 2566 cm⁻¹ dalga sayısında sırasıyla $\nu(\text{C-H})_{\text{sym}}$, $\nu(\text{C-H})_{\text{asym}}$ ve $\nu(\text{S-H})$, gerilimlerine karşılık gelen pikler gözlenmektedir. Spektrumun aşağı alanı incelendiğinde ise 1814, 1783 ve 1737 cm⁻¹ civarında amid ve karbonil gruplarından kaynaklanan pikler görülmektedir. Ayrıca 1210 ve 1068 cm⁻¹

dalga sayısında C-O gerilimlerinden kaynaklanan pikler açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır. SMTX'in IR spektrumu incelendiğinde ise, yapıya mitoksantron molekülünün katılması nedeniyle –OH gerilmelerinden kaynaklanan geniş bir bant 3340 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ayrıca yapıdaki amid gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan karakteristik amid band gerilimi 1457 ve 1381 cm^{-1} 'de görülmektedir.



Şekil 4.2. MP-NHS ve SMTX molekülleri için alınan FTIR spektrumları

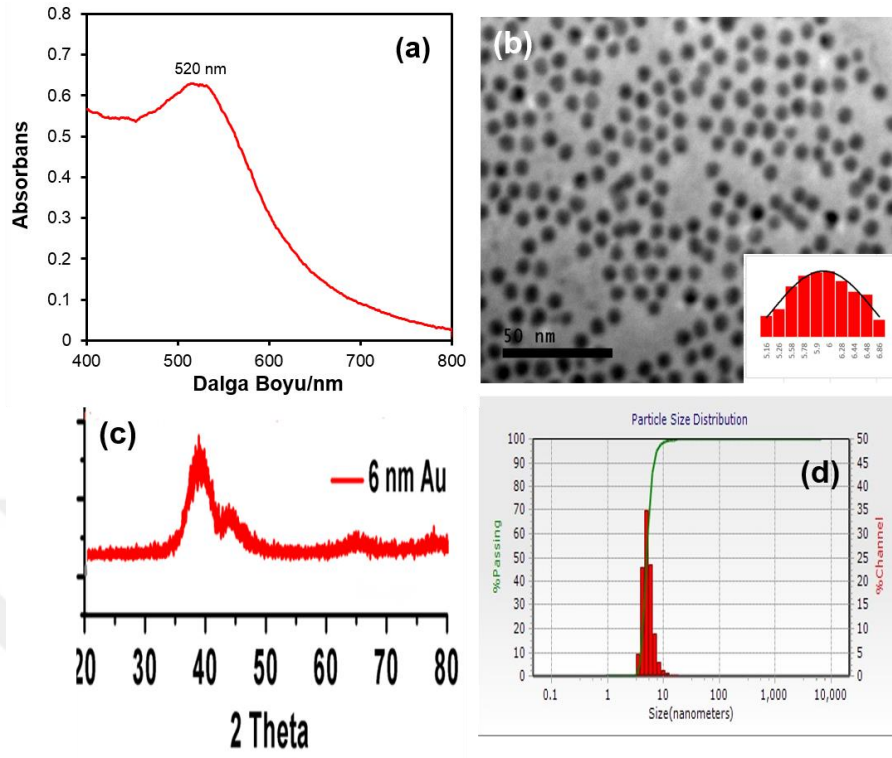
Moleküller için alınan GC-MS spektrumları incelendiğinde de MP-NHS ve SMTX yapıları ile uyumlu olarak sırasıyla 203 ve 446 m/z değerlerinde piklerin varlığı görülmektedir (Şekil 4.3). Ayrıca spektrumlarda moleküllerin parçalanması nedeniyle daha düşük m/z değerlerinde piklerin varlığı belirlenmiştir.



Şekil 4.3. MP-NHS ve SMTX molekülleri için alınan GC-MS spektrumları

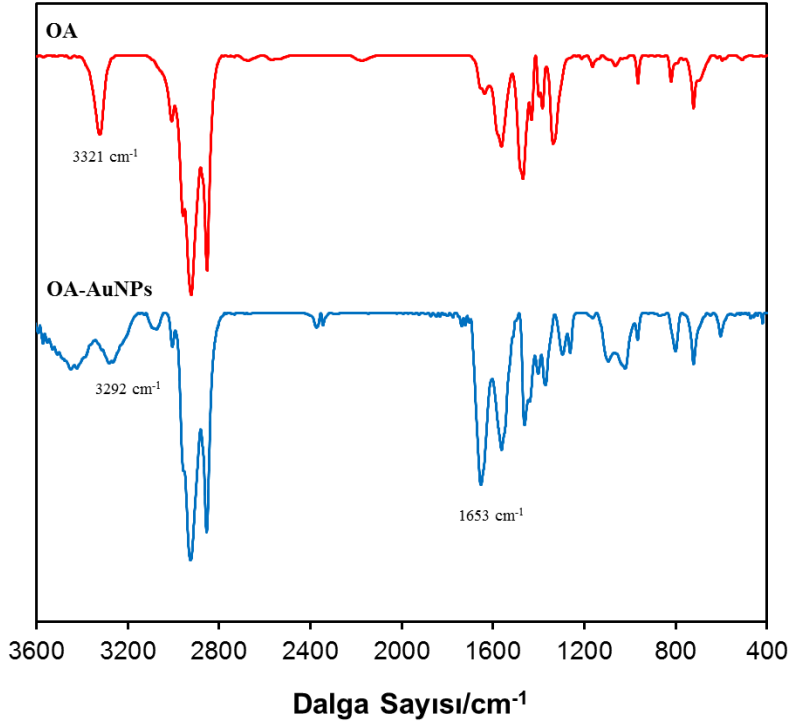
4.2. Oleyilamin Kaplı Altın Nanopartiküllerin (OA-AuNPs) Sentezi ve Karakterizasyonu

Dar boyut dağılımına sahip monodispers altın nanopartiküller altın metal tuzunun oleyilamin ile direkt reaksiyonu sonucu hazırlanabilir. Tipik sentez prosedüründe oleyilamin kaplı altın nanopartiküller (OAm-AuNPs) daha önce tanımlanan prosedür kullanılarak hazırlandı. Sentezde oleyilamin stabilizatör ve BTB ise indirgeyici reaktif olarak kullanıldı. Şekil 4.4.a, sentezlenen oleyilamin kaplı altın nanopartiküllerin hekzan içerisinde UV-vis spektrumunu göstermektedir. Partiküllerin absorpsiyon spektrumu 520 nm'de altın nanopartiküllerin karakteristik yüzey plazmon (SPR) bandını sergilemektedir. Partiküllerin TEM görüntüleri incelendiğinde ise, elde edilen partiküllerin boyutunun küresel bir biçim ve dar boyut dağılımı ile 5-7 nm arasında değiştiği belirlendi (Şekil 4.4.b). XRD analizi altının hegzagonal merkezli yapısı ile uyumlu olarak 38° civarında (111) kafes düzlemine karşılık gelen geniş bir pik sergilemektedir (Şekil 4.4.c). Scherrer eşitliği kullanılarak belirlenen kristal boyutuda TEM ile uyumlu olarak 7 nm olarak belirlendi. DLS analizi partiküllerin 6.9 nm partikül boyutu, 7.4 mV zeta potansiyeli ve pozitif polariteye sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.4.d).



Şekil 4.4. OAm-AuNP'ler için alınan (a) UV-vis absorpsiyon, (b) TEM, (c) XRD ve (d) DLS analiz sonuçları

Şekil 4.5, saf oleyilamin (OAm) ve oleyilamin kaplı altın nanopartiküllerin (OAm-AuNPs) FTIR spektrumlarını göstermektedir. Oleyilaminin IR spektrumu ile oleyilamin kaplı AuNP'lerin spektral özellikleri oldukça benzerdir. Sadece birkaç bant altın nanopartikülün yüzey etkisi nedeniyle farklılık göstermiştir. Örneğin oleyilaminin IR spektrumunda N-H gerilme modu nedeniyle 3321 cm^{-1} 'de gözlenen bant, OAm-Au nanopartiküller için 3292 cm^{-1} 'e kaymıştır. Oleyilaminin altına bağlanmasından sonra $2850\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ civarındaki C-H gerilme bantları için herhangi bir kayma belirlenmemiştir. Ayrıca, 1066 ve 1460 cm^{-1} 'deki bantlar oleyilamindeki C=C ve C-C salınım modlarına atfedilmektedir.

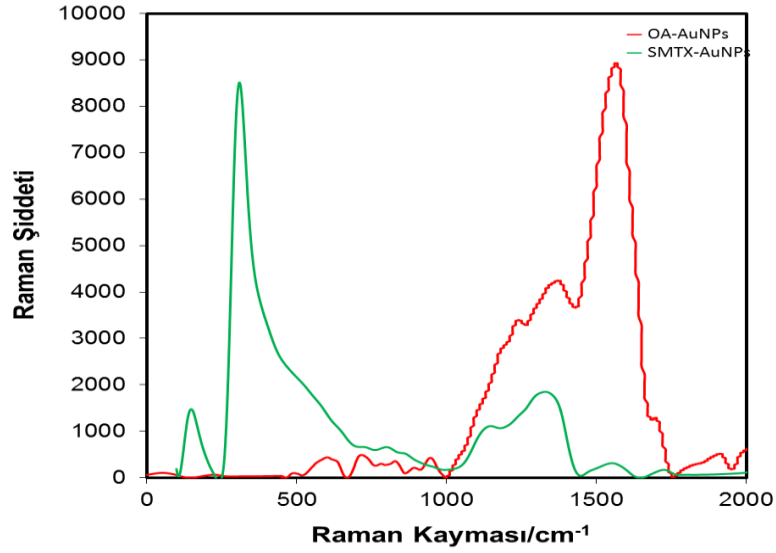


Şekil 4.5. OA ve OA-AuNPs için alınan FTIR spektrumları

4.3. Tiyoil Kaplı Altın Nanopartiküllerin (SMTX-AuNPs ve MPA-AuNPs) Sentezi ve Karakterizasyonu

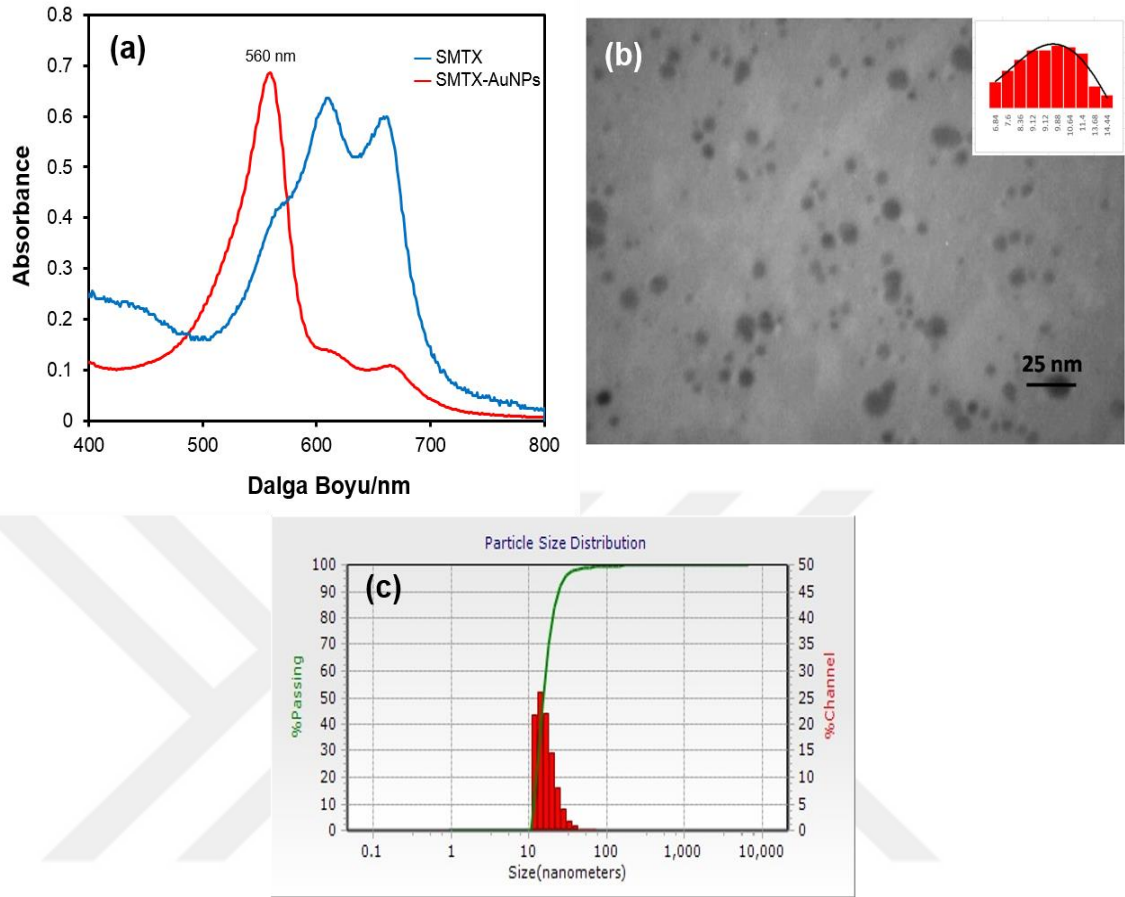
Oleyilamin molekülleri nanopartiküllere zayıf bir şekilde adsorplanır ve bu nedenle altın partiküller üzerindeki oleyilamin molekülleri, nanopartikül çözeltisine tiyoller ilave edildiğinde kolayca tiyoil molekülleri ile yer değiştirebilirler. Bu bağlamda, tiyoil kaplı altın partiküller oleyilamin kaplı altın nanopartiküller'in (OAm-AuNPs) çözücüsü buharlaştırıldıktan sonra metilen klorür içinde çözülüp, bu çözeltiye SMTX'in metilen klorür içerisindeki çözeltisi damla damla ilave edilerek hazırlandı. Karıştırma işleminden sonra SMTX-AuNP'leri çöktürmek için hekzan ilave edildi ve santrifüj yapıldı. Sentezlenen tiyoil kaplı partiküller çeşitli teknikler ile karakterize edildi. Öncelikle tiyoil moleküllerinin oleyilamin molekülleri ile yer değiştirdiğini ispat etmek için her iki partikül için Raman spektrumları alındı (Şekil 4.6). Spektrumda açık bir şekilde 327 cm⁻¹'de altın yüzeyine koordine olmuş Au-S bağının titreşimsel modlarından birine atfedilen Raman piki görülmektedir. Bu piki OAm-AuNP

spektrumunda görülmemesi partiküllerin çevresinin tiyoller ile kaplandığının kesin bir ispatıdır.



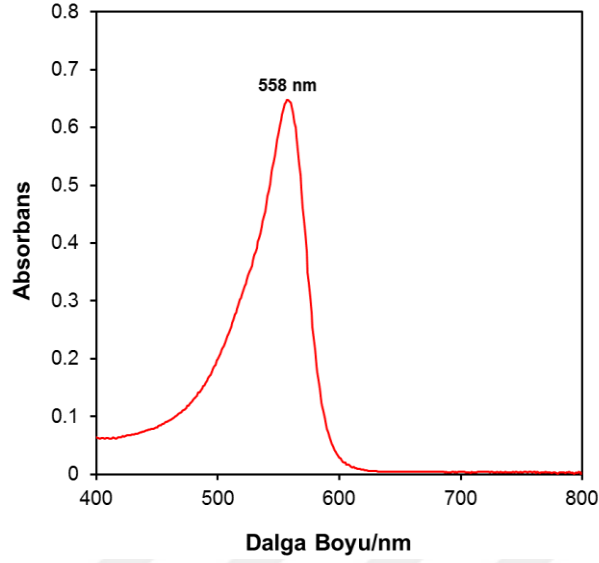
Şekil 4.6. OA-AuNPs ve SMTX-AuNPs için alınan Raman spektrumları

SMTX kaplı AuNP'lerin ve karşılaştırma için STMX molekülünün UV-vis spektrumları Şekil 4.7.a'da verilmektedir. Oleilamin ile SMTX molekülü yer değiştirdiği zaman partiküllerin karakteristik SPR bandının 520 nm'den 560 nm'ye kaydığı açık bir şekilde görülmektedir. SPR bandının kırmızıya kayması partiküllerin kısmen agregasyonuna atfedilmektedir. Bu durum yüzey ligandlarının yerdeğiştirmesi ile partiküllerin hazırlanması hakkında daha önce yayınlanan sonuçlar ile uyumludur (Shi *et al.* 2007). Ayrıca spektrumda SMTX'in absorpsiyon spektrumu ile uyumlu olarak 614 ve 667 nm'de omuzların varlığı belirlendi. Bu piklerde altın partiküllerin çevresinde mitoksantron içeren tiyol moleküllerinin varlığına işaret etmektedir. SMTX-AuNP'ler için alınan TEM görüntüsü de ligand değişiminden sonra partiküllerin çok azda olsa aglomera olduğu sonucunu desteklemektedir (Şekil 4.7.b). Partikül boyutlarının daha geniş bir dağılım ile ortalama boyutunun 10.1 ± 2.5 nm olduğu belirlendi. Benzer şekilde DLS ölçümleride partiküllerin hidrodinamik çapının yaklaşık 13.7 nm olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7.c).



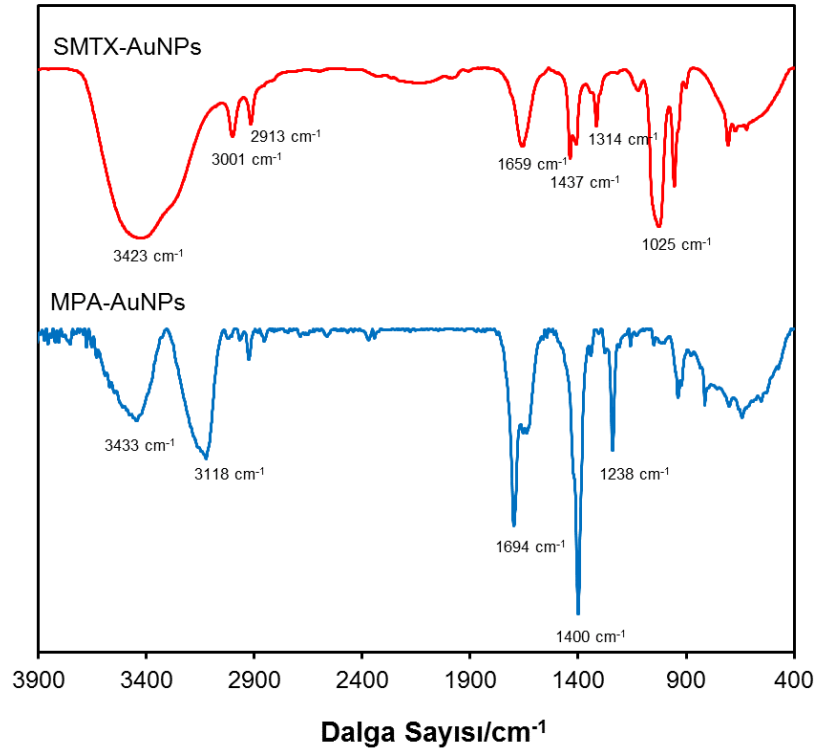
Şekil 4.7. SMTX-AuNP'ler için alınan (a) UV-vis absorpsiyon, (b) TEM ve (c) DLS analiz sonuçları

Kanser hücre çalışmalarında partiküllere bağlı mitoksantron anti-kanser ilacının etkisini net olarak görebilmek için, mitoksantron ilacını içermeyen merkaptopropiyonik asit (MPA) ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller (MPA-AuNPs) sentezlendi. Bu amaç için referans partiküllerin sentezi daha önce bahsedilen prosedüre benzer bir şekilde, oleyilamin kaplı altın nanopartiküller'in (OAm-AuNPs) çözeltisine merkaptopropiyonik asit ilave edilerek yapıldı. Oleyilamin ile merkaptopropiyonik asitin yer değiştirme reaksiyonundan sonra elde edilen partiküller santrifüj ile saflaştırıldı ve UV-vis absorpsiyon spektroskopisi ile karakterize edildi. Şekil 4.8, MPA-AuNP'ler için alınan UV-vis spektrumunu göstermektedir. Görüldüğü gibi partiküller yaklaşık 558 nm'de karakteristik SPR pikini sergilemektedir. Üstelik, partikül çevresinde mitoksantron molekülü olmadığı için 600-700 nm civarında herhangi bir pikde gözlenmemektedir.



Şekil 4.8. MPA-AuNP'ler için alınan UV-vis absorpsiyon spektrumu

Sentezlenen tiyol kaplı altın nanopartiküllerin, SMTX-AuNPs ve MPA-AuNPs, FTIR spektrumları Şekil 4.9'da verilmektedir. MPA-AuNPs için 3433 cm^{-1} 'de gözlenen pik COOH grubunun -OH gerilmesine karşılık gelmektedir. Ayrıca 1694 cm^{-1} 'de C=O gerilmesi nedeniyle şiddetli bir pikin varlığı görülmektedir. C-O gerilmesi nedeniyle 1238 ve 1400 cm^{-1} 'de piklerin varlığı belirlenmiştir. SMTX-AuNPs'nin FTIR spektrumu incelendiğinde ise, Şekil 4.2'de verilen spektruma oldukça benzer bir spektrum karşımıza çıkmaktadır. Spektrumda mitoksantron molekül yapısında bulunan -OH ve -CH grupları nedeniyle 3323 cm^{-1} 'de oldukça yayvan bir pik yanısıra metil asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerine atfedilen 3001 ve 2913 cm^{-1} 'de pikler görülmektedir. Ayrıca yapıda amid gruplarının varlığına işaret eden karakteristik amid band gerilimide 1659 cm^{-1} 'de görülmektedir. SMTX-AuNPs'nin IR spektrumunda C-N ve C-O gerilmeleri nedeniyle sırasıyla 1437 , 1314 ve 1025 cm^{-1} civarında piklerin varlığıda gözlenmiştir.



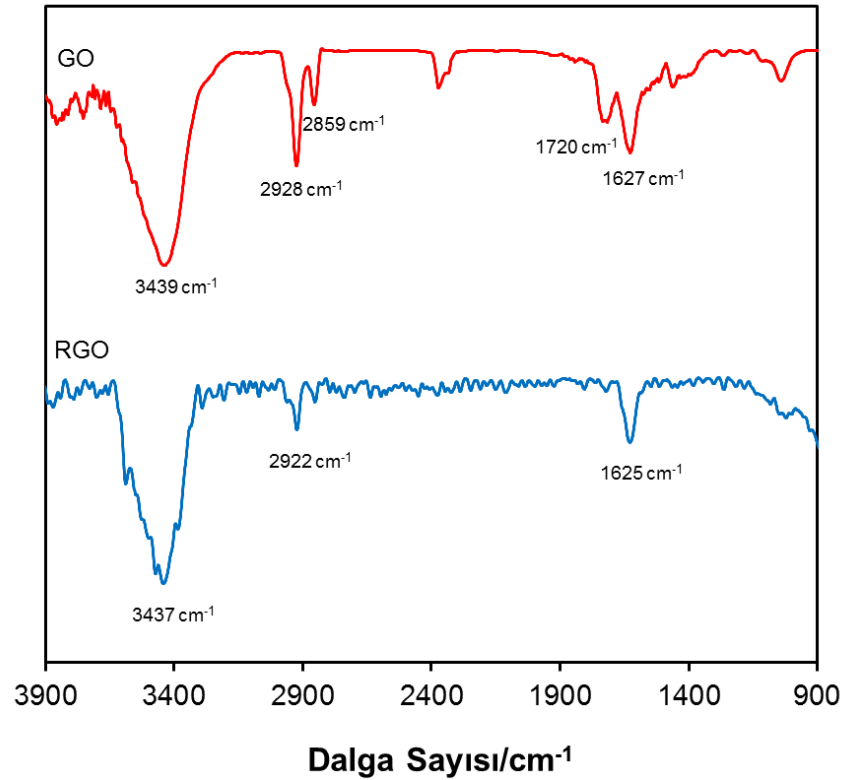
Şekil 4.9. MPA-AuNPs ve SMTX-AuNPs yapıları için alınan FTIR spektrumları

4.4. İndirgenmiş Grafen Oksit (RGO) Sentezi ve Karakterizasyonu

İndirgenmiş grafen oksit (RGO), modifiye edilmiş Hummer's metodundan yola çıkılarak sentezlendi. Bu işlem için öncelikle grafitin, $K_2S_2O_8$ ve H_2SO_4 ilavesi ile ön oksidasyon işlemi yapıldı. Daha sonra ön oksidasyona uğramış olan grafit çeşitli oksidantlar yardımıyla ikinci kez okside edildi. Son aşamada indirgenmiş grafen oksit sentezi için, elde edilen grafen oksit saflaştırıldıktan sonra DMF içerisinde kaynatılarak indirgenme işlemi gerçekleştirildi. Sonuç grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) yapıları FTIR, Raman, XRD, TGA, SEM, elementel analiz ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edildi.

GO ve RGO için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.10'da verilmektedir. GO'nun spektrumunda 3439 cm^{-1} 'deki geniş pik yapıdaki karbon atomlarının oksidasyonu ile oluşan -OH gerilmelerine karşılık gelmektedir. Spektrumda C=C gerilme pikleri yaklaşık 1627 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ayrıca spektrumda C-O-C, C-OH ve C=O

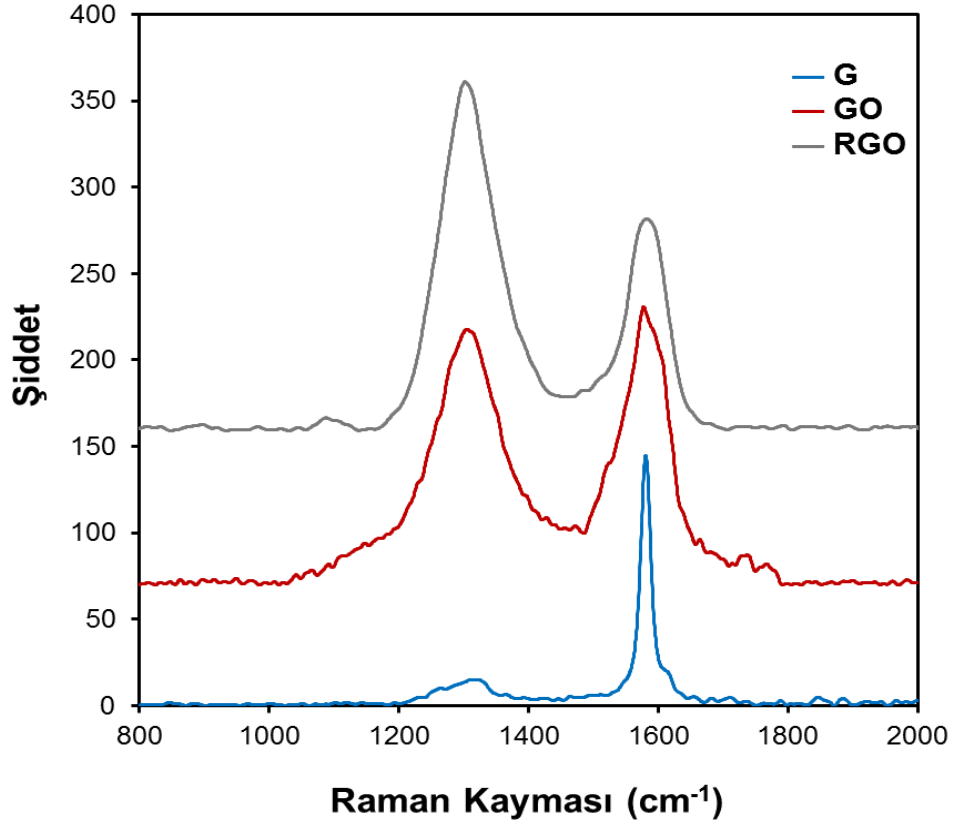
gerilmelerinden kaynaklanan sırasıyla 1056, 1220 ve 1720 cm^{-1} 'de pikler görülmektedir. RGO için alınan spektrumda indirgenme sonucu karbonil, epoksi ve hidroksil fonksiyonel gruplarının yapıda azalması nedeniyle bu gruplara karşılık gelen piklerin şiddetinin azaldığı belirlendi.



Şekil 4.10. GO ve RGO için alınan FTIR spektrumları

Raman spektroskopisi karbona dayanan materyallerin karakterizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu nedenle GO ve RGO yapıları Raman spektroskopisi ile karakterize edildi (Şekil 4.11). Referans olarak alınan grafit (G)'in Raman spektrumunda kusurlara işaret eden D-bandı ve yapının düzeni hakkında bilgi veren G-bandı sırasıyla 1312 ve 1577 cm^{-1} 'de belirgin bir şekilde görülmektedir. GO için alınan spektruma bakıldığında bu bantların genişlediği ve yaklaşık 8-10 cm^{-1} kadar kırmızıya kaydığı belirlendi. Ayrıca yapının düzeni hakkında bilgi veren I_D/I_G pik şiddetleri oranının grafit için 0.32'den grafen oksit için 1.53 değerine arttığı belirlendi. RGO

için alınan spektrum GO için kaydedilen spektruma oldukça benzerdir; spektrumlar arasındaki en büyük fark I_D/I_G pik şiddetleri oranında gözlemlendi.



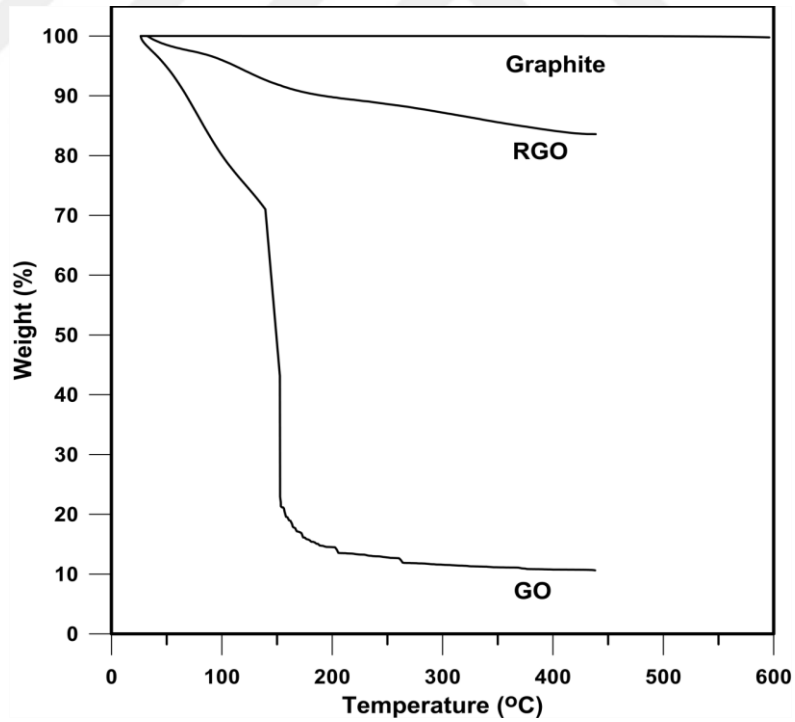
Şekil 4.11. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan Raman spektrumları

Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için XRD spektrumları (Çizelge 4.1) incelendiğinde ise saf grafitin $2\theta=26.0^\circ$ ($d=0.34$ nm) değerinde keskin bir pik sergilediği görüldü. Grafen oksit için bu pik tamamen kaybolurken, $2\theta=9.6^\circ$ ($d=0.8$ nm) değerinde yeni bir pikin ortaya çıktığı belirlendi. İndirgenmiş grafen oksit için ise $2\theta=23.0^\circ$ ($d=0.4$ nm) değerinde yeniden grafitte gözlenen pike benzer bir şekilde yayvan bir pikin ortaya çıktığı görüldü.

Çizelge 4.1. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için XRD spektrumlarından belirlenen sonuçlar.

Numune	2 θ	d-mesafesi (nm)
G	26.0°	0.34
GO	9.6°	0.8
RGO	23.0°	0.4

Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için TGA analizleri incelendiğinde (Şekil 4.12), sıcaklık artışına rağmen grafit yapısında herhangi bir değişim gözlenmedi. Ancak GO için 160°C’de hızlı bir parçalanmanın olduğu belirlendi. RGO içinde bu parçalanmanın 300°C’de gerçekleştiği bulundu.



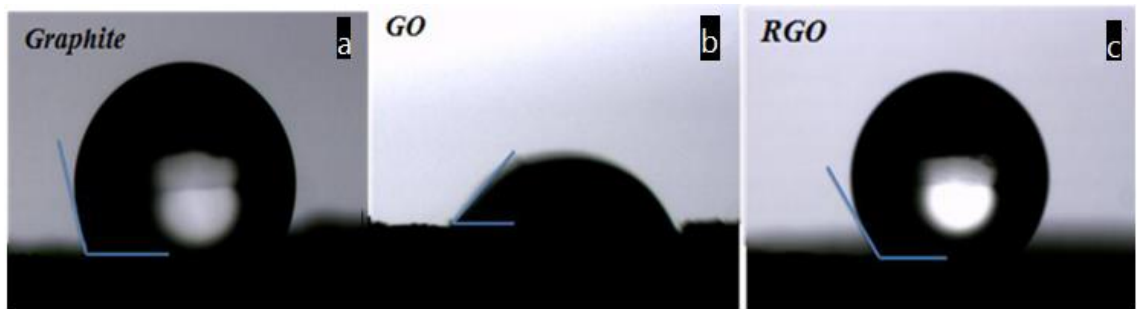
Şekil 4.12. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan TGA grafikleri

Yapıların elementel analiz sonuçlarında Çizelge 4.2’de verilmektedir. Görüldüğü gibi GO ve RGO yapısında oksidasyon sonucu yapılarda oluşan oksit grupları nedeniyle oksijen varlığı belirlenmiştir. GO için %36 oranında gözlenen oksijen oranı, indirgenme sonucu RGO için yaklaşık %16 değerine azalmıştır.

Çizelge 4.2. Grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için belirlenen elementel analiz sonuçları

Numune	%C	%O	%H	C/O	Deneysel Formül
G	99.8	-	-	-	C
GO	61.8	36.0	2.2	2.29	(C ₂₃₈ H ₁₀₀ O ₁₂₅) _n
RGO	78.6	15.5	5.8	6.71	(C ₆₇₆ H ₆₀₀ O ₁₀₀) _n

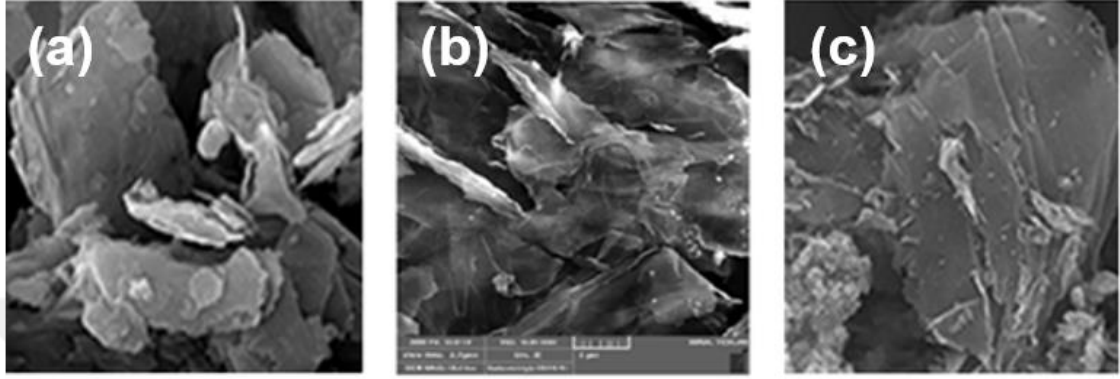
Karbon yapılarının oksidasyon öncesi ve indirgenme sonrası yapılarındaki hidrofilik hidrofobik dönüşümü analiz etmek için grafit (G), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) için temas açısı ölçümleri alındı (Şekil 4.13). Grafit için yapının hidrofobik olması sebebiyle yüksek bir temas açısı değeri (104°) belirlendi. Diğer yandan oksidasyon sonucu yapıya suyu seven oksijen gruplarının bağlanması nedeniyle, GO için 55°’lik bir temas açısı değeri ölçüldü. GO’nın DMF içerisinde indirgenmesi elde edilen RGO karbon yapısı için de 110°’lik bir temas açısı belirlendi.



Şekil 4.13. (a) Grafit (G), (b) grafen oksit (GO) ve (c) indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan temas açısı ölçümleri

Karbon yapılarının yapısal morfolojileri SEM ile araştırıldı (Şekil 4.14). Alınan SEM görüntüleri grafitin yaprak görüntüsünde tabakalardan oluştuğunu göstermektedir. GO

için materyalin kırışık bir yapıya sahip olduğu, RGO için ise tabakalı bir yapının olduğu belirlendi

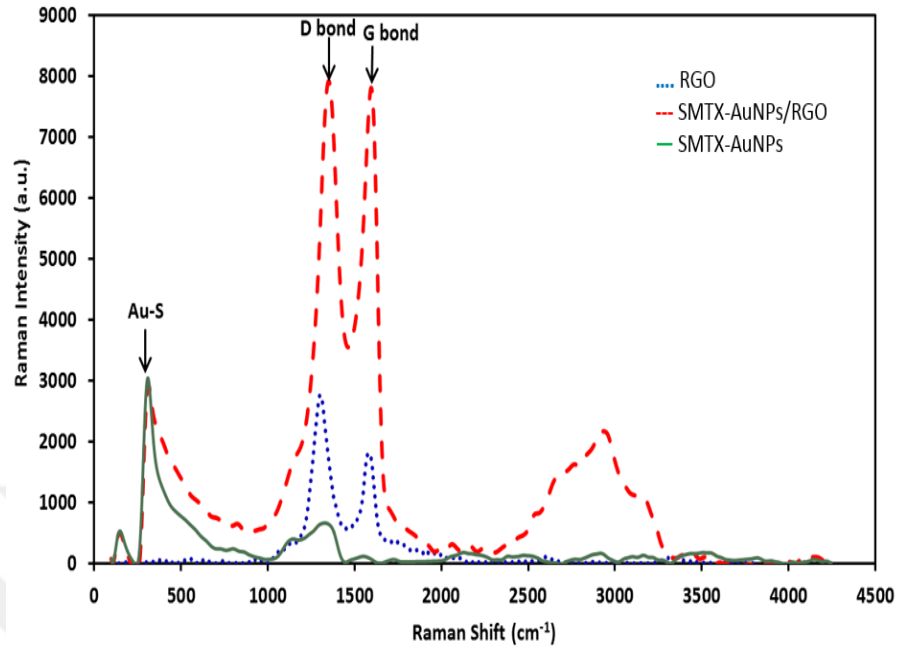


Şekil 4.14. (a) Grafit (G), (b) grafen oksit (GO) ve (c) indirgenmiş grafen oksit (RGO) için alınan FE-SEM görüntüleri

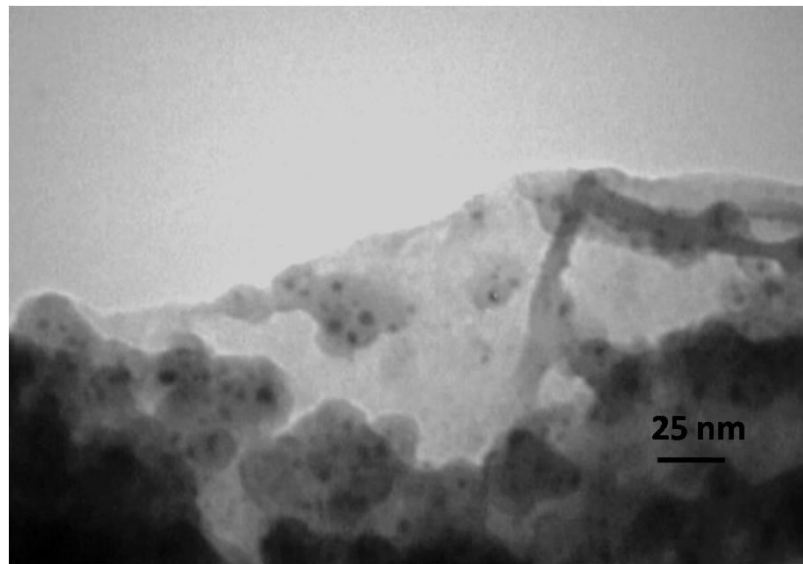
4.5. SMTX-AuNPs/RGO ve MPA-AuNPs/RGO Kompozit Yapılarının Sentezi ve Karakterizasyonu

RGO, DMF içerisinde 2 saat sonike edildikten sonra bu karışıma SMTX-AuNPs ve MPA AuNPs ilave edildi ve çözeltiler 3 saat daha sonike edildi. İndirgenmiş grafen oksit/altın nanopartikül kompozit yapıları santrifüj ile saflaştırıldıktan sonra Raman, TEM, AFM ve DLS teknikleri ile karakterize edildi.

RGO, SMTX-AuNPs ve SMTX-AuNPs/RGO için alınan Raman spektrumları (Şekil 4.15) incelendiğinde RGO için spektrumda sadece karbon yapısının gerilmelerinden kaynaklanan D ve G bantları 1332 ve 1677 cm^{-1} değerinde görülmektedir. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı içinde D ve G bantları belirgin bir şekilde görülmektedir. Ayrıca yapıda metalik altına bağlı tiyol grupları ve SMTX molekülü nedeniyle C-S, C-OH gerilmelerinden kaynaklanan 327 ve 3200 cm^{-1} civarında pikler görülmektedir.

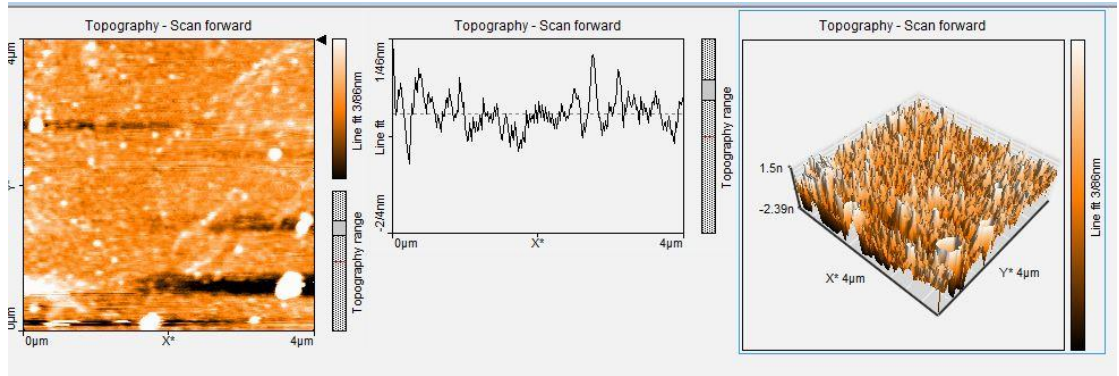


Şekil 4.15. İndirgenmiş grafen oksit (RGO), SMTX-AuNPs ve SMTX-AuNPs/RGO için alınan Raman spektrumları



Şekil 4.16. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için alınan TEM görüntüsü

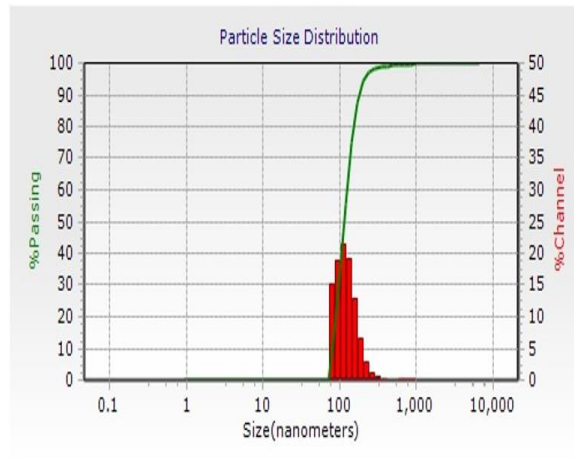
SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için TEM görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.16) indirgenmiş grafen oksit filmi üzerinde altın nanopartiküllerinin varlığı açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.17. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için alınan AFM görüntüsü

SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için AFM topografi görüntüsü incelendiğinde (Şekil 4.17) yüzey üzerinde indirgenmiş grafen oksit filminin varlığı belirlendi.

SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için DLS spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.18) kompozit yapısının nanopartiküllere kıyasla oldukça büyük bir partikül dağılımı (199-254 nm) gösterdiği belilendi. Yapıya RGO eklendiği zaman zeta potansiyeli, iletkenlik ve mobilite değerlerinin arttığı belirlendi (Çizelge 4.3).



Şekil 4.18. SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı için alınan DLS spektrumu

Çizelge 4.3. SMTX-AuNPs ve SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapıları için alınan DLS spektrum analiz sonuçları

Numune	Zeta Potansiyeli (mV)	Partikül boyut dağılımı			Polarite	İletkenlik (S/cm)	Mobilité (Scm/V)
		d10	d50	d90			
SMTX-AuNPs	28.6	11.41	13.65	19.17	pozitif	19	0.05
SMTX-AuNPs/RGO	130.5	199.9	224.5	253.8	pozitif	50	2.73

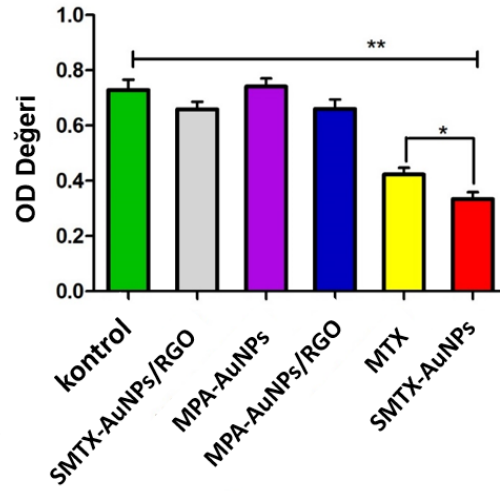
4.6. MCF7 Kültürü (Meme Kanseri) Bulguları

Sentezlenen nanopartikül ve kompozit yapılarının kanser hücrelerinde araştırılması amacıyla çalışmalar yapıldı. Bu doğrultuda öncelikle MCF7 hücre kültürü hazırlanarak in vitro deneylerde kullanıldı. Kültür ortamına verilmek üzere kontrol grubu, 5 µg/ml MTX, 10 µg/ml SMTX-AuNPs, 10 µg/ml SMTX-AuNPs/RGO, 10 µg/ml MPA-AuNPs ve 10 µg/ml MPA-AuNPs/RGO olarak hazırlandı. Flow sitometri, gen ekspresyon ve dapi boyasıyla apoptoz parametrelerine bakıldı.

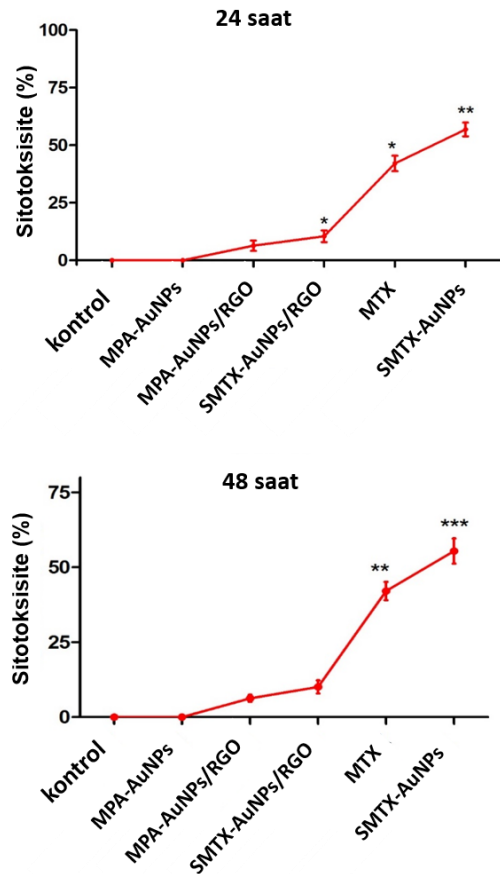
4.6.1. MTT Analiz Sonuçları

Analizler 24 ve 48 saat olmak üzere 2 farklı saatte yapıldı. İlaç 24 saat ve 48 saat hücrelere temas ettikten sonra MTT analizi yapıldı.

Sitotoksosite sonuçlarına göre, SMTX-AuNPs grubu kontrole göre $p < 0.01$ anlamlılık gösterirken; MTX ve MPA-AuNPs/RGO grupları $p < 0.05$ anlamlılık göstermektedir (Şekil 4.19). 24 saat ve 48 saat sitotoksosite sonuçları aşağıda verilmektedir (Şekil 4.20). 48 saat sonuçları 24 saat sonuçlarına yakınlık göstermektedir, ancak çok anlamlı değildir.



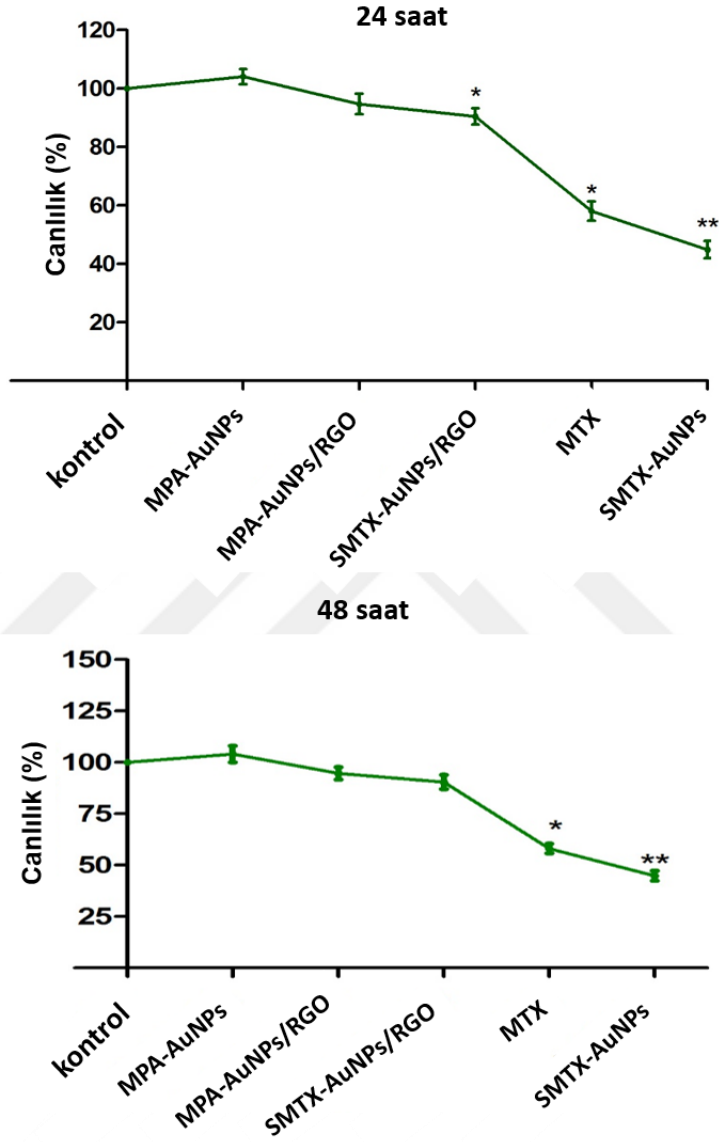
Şekil 4.19. MTT analizinde sonuçların od hesaplamasının yapılması



Şekil 4.20. 24 ve 48 saat MTT analiz sonuçları

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

MTT sonuçlarına göre 24 saat ve 48 saat süreleri için canlılık değeri hesaplandı (Şekil 4.21).



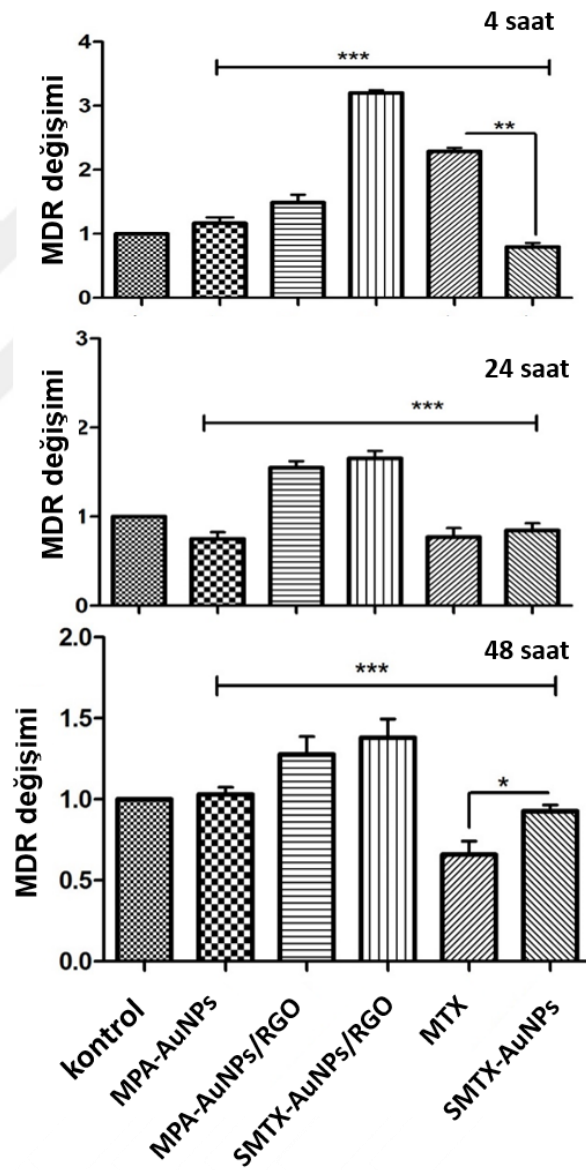
Şekil 4.21. 24 saat ve 48 saat MTT analiz sonuçları

*p<0.05, **p<0.01

Elde edilen sonuçlara göre, SMTX-AuNPs ve MTX gruplarının anlamlı derecede kanserli hücreler üzerinde etkili oldukları ve indirgenmiş grafen oksit ile hazırlanan kompozit yapılarının anlamlı sonuç vermediği tespit edilmiştir.

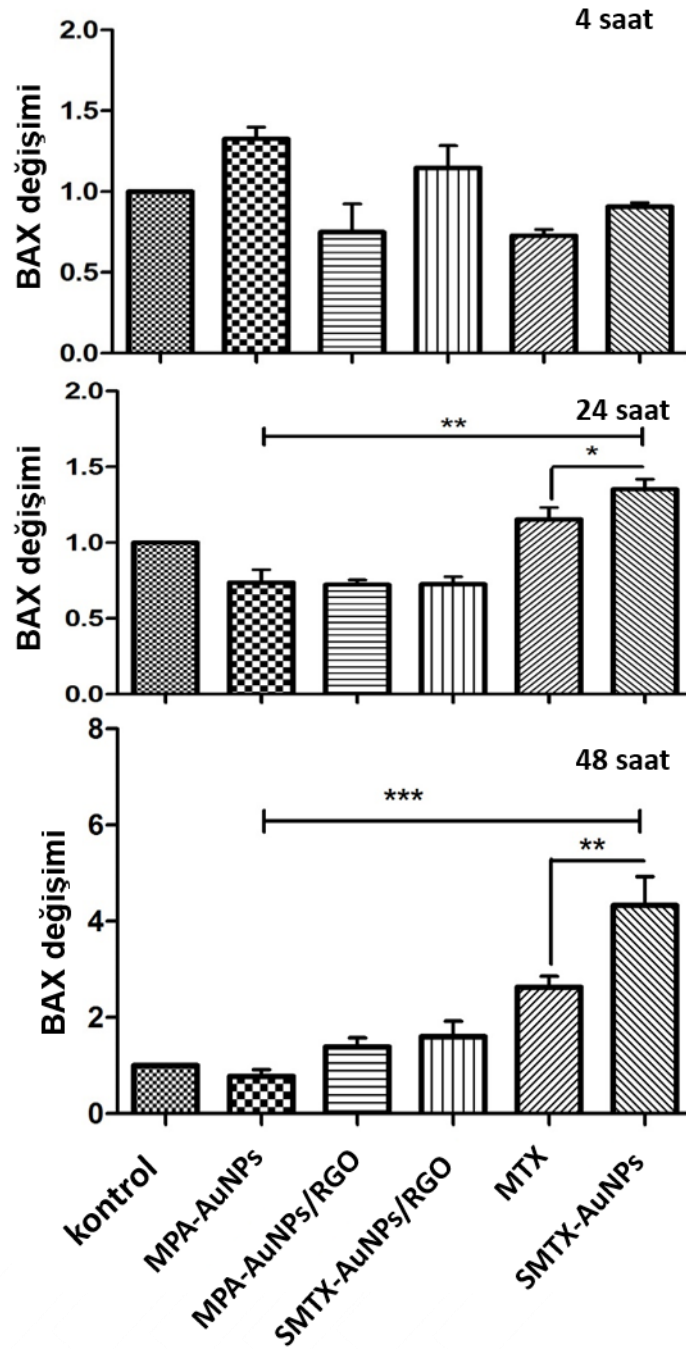
4.6.2. PCR Analizi

Altın nanopartiküllerin kanser üzerine etki mekanizmalarını anlamak için gen ekspresyonuna bakıldı. Bu amaçla MDR geni ilaç direncini belirlemek için, BAX proapoptotik geni olarak deneyler yapıldı. BCL2 antiapoptotik gen ekspresyonu 4, 24 ve 48 saat olmak üzere 3 farklı saatde yapıldı ve sonuçlar analiz edildi (Şekil 4.22).



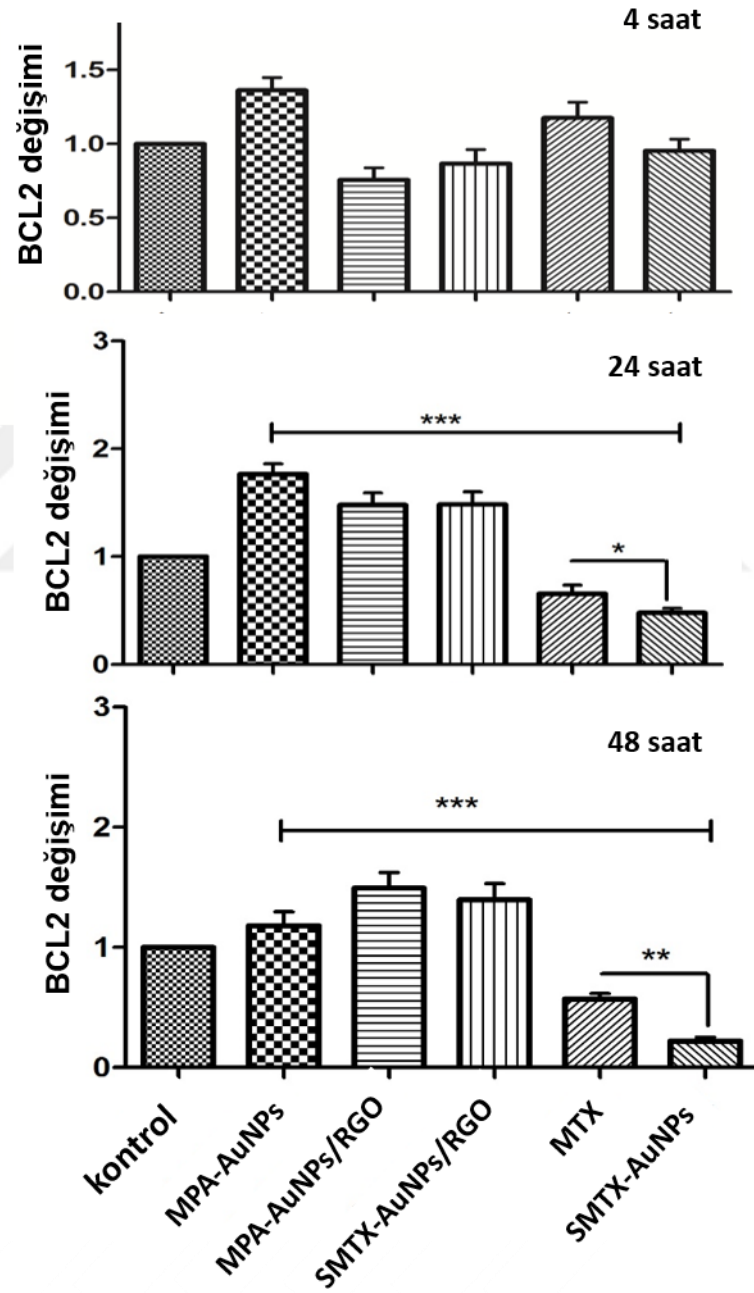
Şekil 4.22. 4, 24 ve 48'inci saatde yapılan MDR ekspresyonu

Alınan gen ekspresyonuna göre SMTX-AuNPs grubu kontrol grubuna göre $p<0.001$ anlamlılık göstermektedir. Ayrıca SMTX-AuNPs grubu 4 saatin sonunda saf MTX'e kıyasla $p<0.05$ anlamlılık göstermektedir ve saf maddeden daha etkili bir şekilde ilaç direncini ortadan kaldırmıştır.



Şekil 4.23. 4, 24 ve 48'inci saatde yapılan BAX ekspresyonu

BAX gen ekspresyonu için zaman ilerledikçe gen üzerindeki etki belirgin bir şekilde gözlenmektedir (Şekil 4.23). Yapılan analize göre SMTX-AuNPs grubu belirgin olarak bu gen ekspresyonunu artırmıştır ve saf MTX göre 24 saat sonunda $p<0.05$ anlamlılık ve 48 saatin sonunda $p<0.01$ anlamlılık göstermiştir.

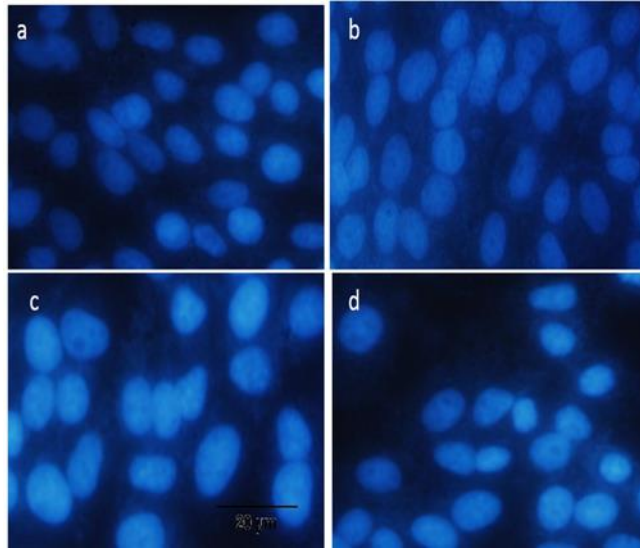


Şekil 4.24. 4, 24 ve 48'inci saatde yapılan BCL2 ekspresyonu

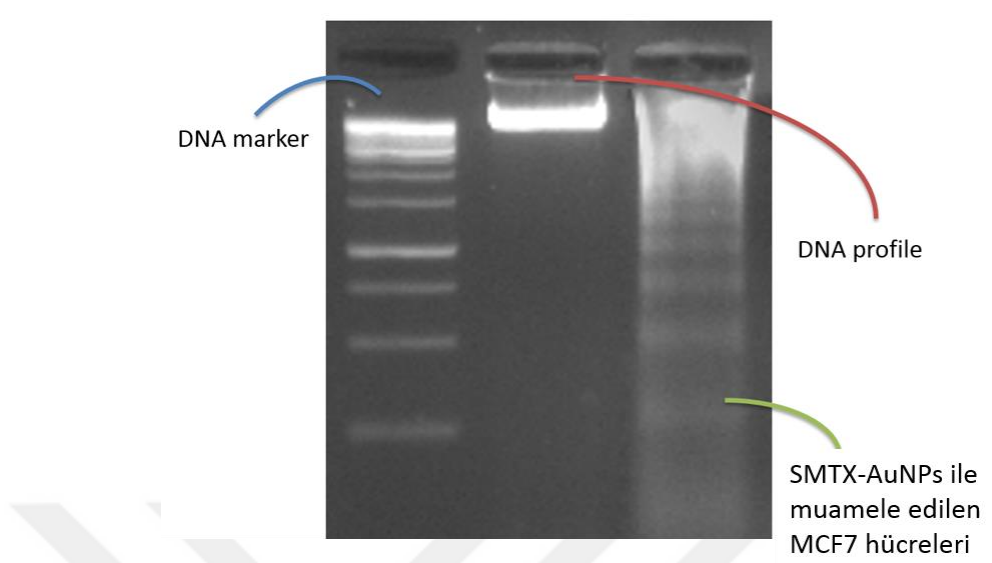
BCL2 gen ekspresyon sonuçlarına göre (Şekil 4.24), SMTX-AuNPs grubu anti apoptotik gen ekspresyonunu baskılamış ve kontrole göre 24 ve 48 saatlerde $p<0.001$ anlamlılık göstermiştir. Ayrıca saf MTX göre $p<0.01$ oranında anlamlılık arz etmektedir.

4.6.3. DAPI Boyaması

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla çekirdeği görünür hale gelebilir. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayrımı, boyamada çekirdek morfolojisine bakılarak yapılır. Bu histokimya boyamasında DAPI “4,6-diamidin-2’-fenilindol” boyası kullanılarak apoptoza girmiş hücreler açığa çıkarılmıştır (Şekil 4.25). Sadece SMTX-AuNPs ve MTX gruplarında DNA fragmentasyonu görülmektedir. Bu sonuçlar DNA ladderle ispatlanmıştır (Şekil 4.26).



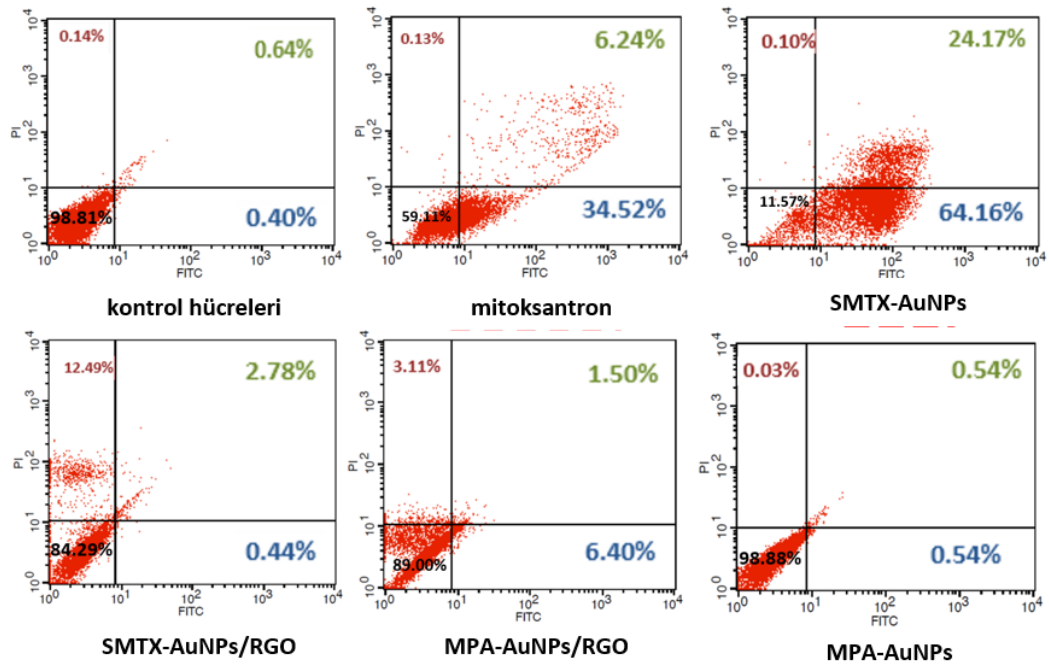
Şekil 4.25. DAPI boyaması



Şekil 4.26. DNA ladder görüntüsü

4.6.4. Flow Sitometri

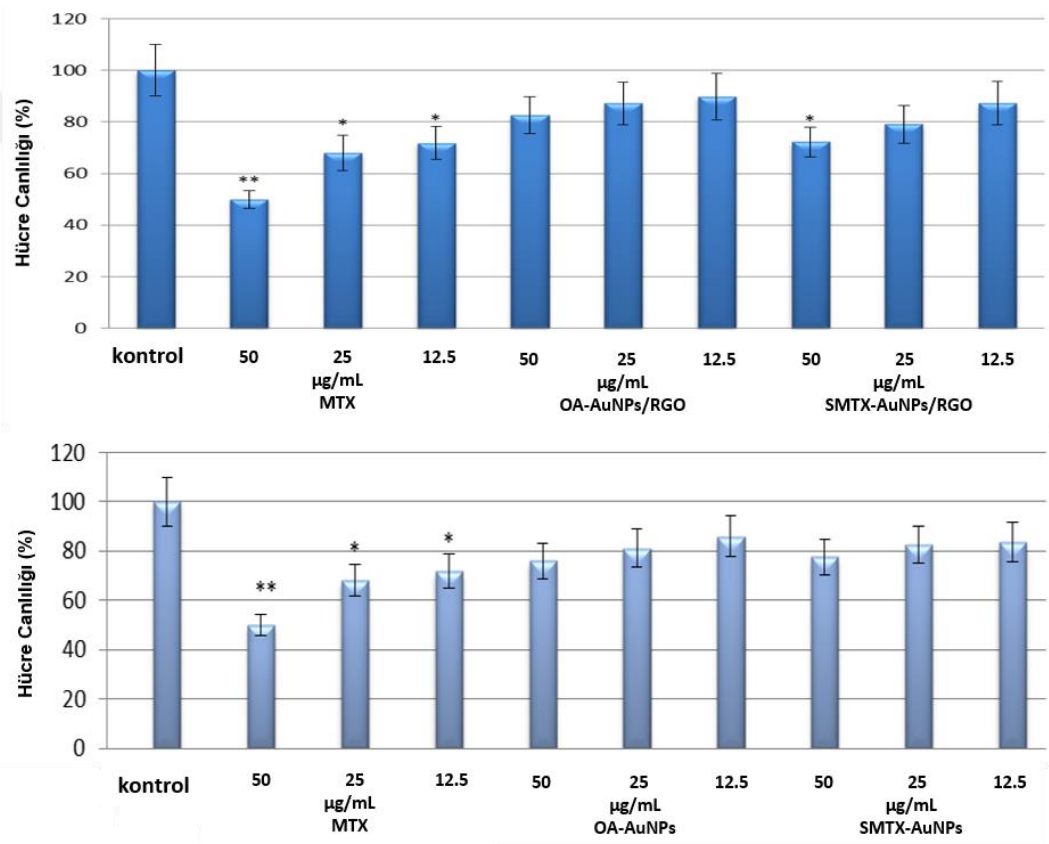
Alınan sonuçlara göre AuSMTX ve MTX grubunun daha fazla apoptoz oranına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.27). Üstelik bu sonuçlar RT-PCR ile uyumludur.



Şekil 4.27. Flow sitometri sonuçları

4.7. U87-MG ve Nöron Kültürü Bulguları

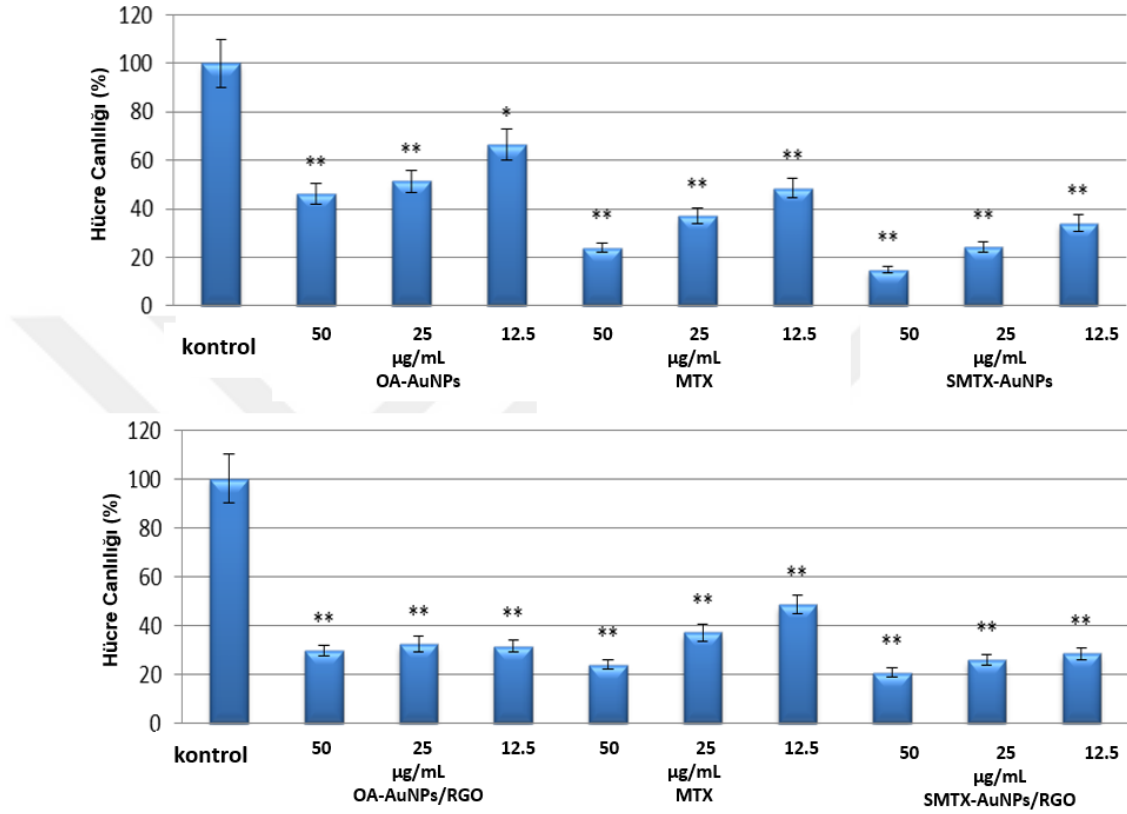
U87-MG kanser hücreleri, nöron hücre kültürü amacı için kullanıldı. Bu hücrelere nanomateriyallerin karşılaştırılması amacıyla 50, 25 ve 12.5 $\mu\text{g/mL}$ MTX, SMTX-AuNPs, OA-AuNPs, SMTX-AuNPs/RGO ve OA-AuNPs/RGO ilave edildi. Kontrol gruplarına sadece medyum eklendi.



Şekil 4.28. Nöron kültürü MTT analizi

Nöron hücrelerine MTT sitotoksosite analizi yapıldı (Şekil 4.28). Bu analiz 24 saat hücrelere ilaç uygulandıktan sonra yapıldı ve oluşan kristaller belirlendi. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Bulgulara göre saf MTX ilacının 50 μg kullanımında kontrole göre $p < 0.001$ 'den daha anlamlı olduğu ve kompozit yapılarında kontrol grubuna göre $p < 0.05$ 'den daha anlamlı olduğu gözlemlendi. Bu durum MTX ilacının nöronları yüksek bir oranda öldürdüğüne işaret etmektedir. OA-AuNPs/RGO

ilavesi ise anlamlı bir fark göstermemektedir, ancak detaylı incelendiğinde kompozitin nöronlara karşı azda olsa bir toksisite etkisi gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.29. U87-MG kültürü MTT analizi

U87-MG hücrelerine 24 saat ilaç uygulandıktan sonra MTT sitotoksosite analizi yapıldığında ise (Şekil 4.29), saf MTX ilacının tüm dozlarının kontrole göre $p < 0.001$ 'den daha anlamlı olduğu tespit edildi. Bu durum, MTX ilacının hem nöronların hem de kanser hücrelerinin yüksek bir oranda ölümüne neden olduğuna işaret etmektedir. OA-AuNPs grubu ise saf MTX grubuna kıyasla daha az oranda kanser hücrelerini öldürmüştür.

5. SONUÇ

Tez çalışması, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisi olan kanser için, güvenilir, biyouyumlu, yüksek stabiliteye sahip ve en önemlisi hedefe ulaşmadan ilacın salımını engelleyen moleküler ilaç salım sisteminin inşasını amaçlamıştır. Glioblastoma multiforme en sık görülen beyin kanser türüdür. Meme kanseri ise bayanlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Bu hastalıkların geliştirilmiş mevcut tedavilere cevap oranları oldukça düşüktür. Bu alanda yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Mitoksantron bir antrasiklin türevi olup antrosenedion grubundan sentetik bir antineoplastiktir. Mitoksantron'un etki mekanizması tam anlaşılmamakla birlikte tümör hücresinde DNA ve RNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etki gösterdiği ileri sürülmektedir. Mitoksantron aynı zamanda RNA oluşumunu engellerken; zarar görmüş DNA'nın tamirinden sorumlu bir enzim olan topoizomerez II enziminide güçlü bir şekilde inhibe eder.

Bu bağlamda tez kapsamında, öncelikle mitoksantron anti-kanser ilacı son grubu ve tiyol baş grubu içeren molekülün (SMTX) sentezini gerçekleştirdik. Daha sonra sentezlenmiş olan oleil amin kaplı altın nanopartiküllerin (OA-AuNPs) yüzeyi yer değiştirme reaksiyonu ile SMTX molekülleri ile kaplandı ve böylece ilaç yüklenmiş altın nanopartiküllerin sentezi yapıldı (SMTX-AuNPs). Son aşamada ise, sentezlenmiş olan indirgenmiş grafen oksit (RGO) ile SMTX-AuNP'nin etkileşimi sağlanarak SMTX-AuNPs/RGO kompozit yapısı sentezlendi. Sentezlenen ilaç bağlı AuNPs ve AuNPs/RGO nanomateryallerinin in-vitro şartlar altında meme ve beyin kanser hücreleri için uygulamaları araştırıldı.

Yapılan çalışmalar sonucunda, SMTX-AuNPs ve MTX gruplarının RGO kompozit gruplarına kıyasla anlamlı derecede kanserli hücreler üzerinde etkili olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

- Ajnai, G., Chiu, A., Kan, T., Cheng, C.C., Tsai, T.H., Chang, J., 2014. Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. *J Exp Clin Med*;6(6): 172-178
- AK Iyer, G Khaled, J Fang, H Maeda. 2006. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*. 11 (17-18): 812-818
- Allen, T. M., Cullis, P. R., 2004. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* 30: 3-1818
- Angelov, G., Gourdon, C., Line, A., 1998. "Simulation of flow hydrodynamics in a pulsed solvent extraction column under turbulent regimes. *Chemical Engineering Journal*, 71(1): 1-9.
- Ankamwar, B., Chaudhary, M., Sastry, M., 2005. Synthesis and Reactivity in Inorganic. *Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 35: 19-26.
- Argyo, B., Weiss, V., Bräuchle, C., Bein, T., 2014. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as a Universal Platform for Drug Delivery, *Chem. Mater.*, , 26 (1), pp 435–451
- Aswathy Aromal, S., Philip, D., 2012. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. *Chemical Engineering Journal*, 97, 1-5.
- Balandin, A.A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., Lau, C.N. 2008. Superior Thermal Conductivity of Single-layer Graphene. *Nano Letter*, 83: 902-903.
- Berger, C., Song, Z., Li, T., Li, X., Ogbazghi, A.Y., Feng, R., Dai, Z., Alexei, N., Conrad, M.E.H., First, P.N., De Heer, W.A. 2004. Novel Hybrid Materials based on Graphene: Synthesis and Characterization. *Journal of Physical Chemistry*, 108: 19912-19916.
- Berger, C., Song, Z., Li, X., Wu, X., Brown, N., Naud, C., Mayou, D., Li, T., Hass, J., Marchenkov, A. N., Conrad, M.E.H., First, P.N., De Heer, W.A. 2006. Electronic Confinement and Coherence in Patterned Epitaxial Graphene. *Science*, 312: 1191-1196.
- Bhati-Kushwaha, H.; Malik, C.P. 2013. fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation *Turkish Journal of Biology*, 37: 645-654.
- Bianco, A. Kostarelos, K. Prato, M. 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9: 674–679
- Bolotin, K.I., Sikes, K.J., Jianga, Z., Klima, M., Fudenberg, G., Hone, J., Kim, P., Stormer, H.L. 2008. Ultrahigh Electron Mobility in Suspended Graphene. *Solid State Communications*, 146: 351-355.
- Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O. 2012. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 206-212 ().
- Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, 54, 631-651
- Bunch, J.S., Yaish, Y., Brink, M., Bolotin, K., McEuen, P. L., 2005. "Coulomb Oscillations and Hall Effect in Quasi-2D Graphite Quantum Dots", *Nano Letters*, 5: 287-290.
- Burda, C., Chen, X., Narayanan, R., El-Sayed, M. A., 2005. Coherence in Patterned Epitaxial Graphene. *Chem. Rev.*, 105: 10-25.

- Burgess, P., Hutt, P.B., Farokhzad, O.C., Langer, R., Minick, S. and Zale, S. 1996. On firm ground: IP protection of therapeutic nanoparticles. *Nat. Biotechnol*, 28: 12-67
- Chen, N. P. 2016. Some results on approximating spaces. *Journal of Computational Analysis and Applications* 21(2): 254-263.
- Dreaden, T. J., Davis, J. M., De Beer, Z. W., Ploetz, R. C., Soltis, P. S., Wingfield, M. J., & Smith, J. A. 2014. Phylogeny of ambrosia beetle symbionts in the genus *Raffaelea*. *Fungal Biology* 118(12): 970-978.
- Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G. 1981. Intercalation Compounds of Graphite. *Advances in Physics*, 30 (2): 139-326.
- Dreyer D.R., Park S., Bielawski C.W., Ruoff R.S. 2010. The Chemistry of Graphene Oxide. *Chemical Society Reviews*, 39 (1): 228-240.
- Dubey, S.P.; Lahtinen, M.; Sillanpää, M. 2010. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, *Nano Letters*, 364, 34-41.
- Emtsev, K.V., Bostwick, A., Horn, K., Jobst, J., Kellogg, G.L., Ley, L., McChesney, J.L., Ohta, T., Reshanov, S.A., Röhrl, J., Rotenberg, E., Schmid, A.K., Waldmann, D., Weber, H.B., Seyller, T. 2009. Towards Wafer-size Graphene Layers by Atmospheric Pressure Graphitization of Silicon Carbide. *Nature Materials*, 8 (3): 203-207.
- Gao, W., Chan, J.M., Farokhzad, O.C., 2010. pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 7: 1913–1920
- Geim, A.K., Novoselov, K.S. 2007. The Rise of Graphene. *Nature Materials*, 6: 183-191.
- Gemma, M., Pasin, L., Oriani, A., Agostoni, M., Palonta, F., Ramella, B., Bussi, M. and Beretta, L. 2016. Swallowing Impairment During Propofol Target-Controlled Infusion. *Anesthesia and Analgesia* 122(1): 48-54.
- Grislain, L., Couvreur, P., Lenaerts, V., Roland, M., Deprez-Decampeneere, D. and Speiser, P. 1993. Pharmacokinetics and Distribution of a Biodegradable Drug-Carrier. *Int. J. Pharm.* 15 (3): 335-345
- Hellebrekers, B. W., Trimbos-Kemper, T. C., Trimbos, J. B. M., Emeis, J. J., & Kooistra, T. 2000. Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation Fertility and Sterility. *Chem. Mater.*, 74: 203-212
- Hernandez, Y., Nicolosi, V., Lotya, M., Blighe, F.M., Sun, Z., De, S., McGovern, I.T., Holland, B., Byrne, M., Gun'ko, Y.K., Boland, J.J., Niraj, P., Duesberg, G., Krishnamurthy, S., Goodhue, R., Hutchison, J., Scardaci, V., Ferrari, A.C., Coleman, J.N. 2008. High-yield Production of Graphene by Liquid-phase Exfoliation of Graphite. *Nature Nanotechnology*, 3 (9): 563-568.
- Hill-West, J.L., Dunn, R.C., Hubbell, J.A. 1995. Local Release of Fibrinolytic Agents for Adhesion Prevention *J. Surg. Res.* 59: 759-763
- Hummers, W.S., Offeman, R.E. 1958. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80 (6), 1339-1339.
- Kageshima, H., Hibino, H., Tanabe, S., 2012, The physics of epitaxial graphene on SiC(0001), *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24: 214- 321
- Kaviya, S.; Santhanalakshmi, J.; Viswanathan, B.; Muthumary, J.; Srinivasan, K. 2011. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. *nanolatter* 79: 594-598.

- Knapton, S, 2015. Most cancers are caused by bad luck not genes or lifestyle say scientists. *Science News*, 76: 45-765
- Kreuter, J. 2007. Nanoparticles – a historical perspective. *Int. J. Pharm*, 331(1). 1-10
- Kumar, A. Zhang, X. Liang, X. 2013. Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnology Advances*, 31: 593–606
- Kumar, S., Tadakamadla, J., Idris, A., Busaily, I.A.A. and AlIbrahim, A.Y.I. 2016. Knowledge of Teething and Prevalence of Teething Myths in Mothers of Saudi Arabia. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 40(1): 44-48.
- Labala, S., Mandapalli, P.K., Bhatnagar, S. and Venuganti, V.V.K. 2015. Encapsulation of albumin in self-assembled layer-by-layer microcapsules: comparison of coprecipitation and adsorption techniques. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 41(8): 1302-1310.
- Lee, C., Wei, X., Kysar, J.W., Hone, J. 2008. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer. *Nano Letters*, 80: 2767-2769.
- Li, J., Guo, H., Li, Z.Y., 2013. Microscopic and macroscopic manipulation of gold nanorod and its hybrid nanostructures. *Photonics Research*, 1: 28-41
- Li, X., Cai, W., An, J., Kim, S., Nah, J., Yang, D., Piner, R., Velamallanni, A., Jing, I., Tutuc, E., Banerjee, S.K., Colombo, L., Ruoff, R.S., 2009. Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils. *Science*, 324: 1312-1314.
- Li, X., Wang, X., Zhang, L., Lee, S., Dai, H. 2008. Chemically Derived, Ultrasoft Graphene Nanoribbon Semiconductors. *Science*, 319: 1229-1232.
- Liang, Q., Yao, X., Wang, W., Liu, Y., Wong, C.P. 2011. A Three-Dimensional Vertically Aligned Functionalized Multilayer Graphene Architecture: An Approach for Graphene-Based Thermal Interfacial Materials. *ACS Nano*, 53:, 2392-2401.
- Liu, N., Luo, F., Wu, H., Liu, Y., Zhang, C., Chen, J. 2008. One-Step Ionic-Liquid-Assisted Electrochemical Synthesis of Ionic-Liquid-Functionalized Graphene Sheets Directly from Graphite. *Advanced Functional Materials*, 18: 1518-1525.
- Maeda, H. Matsumura, Y. 1989. Tumortropic and Lymphotropic Principles of Macromolecular Drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6 (3): 193-210
- Majd, S., Dolmage, T.E., Green, R.H., Bradding, P., Singh, S.J. and Evans, R.A. 2015. Is It Feasible to Assess Dynamic Hyperinflation during an Incremental Treadmill Test in Patients with Severe Asthma?. *Thorax* 70: A57-A57.
- Minati, L. 2015. Experimental Implementation of Networked Chaotic Oscillators Based on Cross-Coupled Inverter Rings in a CMOS Integrated Circuit. *Journal of Circuits Systems and Computers* 24: 9-23
- MM. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates. 2002. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP dependent transporters. *Drug Discov*, 2: 48-556
- Moore, M.C., Peppas, N.A., 2009. Micro- and nanotechnologies for Intelligent and Responsive Biomaterial-based Medical Systems. *Adv Drug Deliv. Rev.* 61: 1391– 1401.
- Nordqvist, Joseph. 2013. Abraxane Improves Survival Among Pancreatic Cancer Patients. *Medical News Today*. 2: 428-55
- Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S.V., Grigorieva, I.V., Firsov, A.A. 2004. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science*, 306: 666-669.

- Ohgaki, H. and P. Kleihues. 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science* 100: 2235-2241.
- Park, S., Ruoff, R.S. 2009. Chemical Methods for the Production of Graphenes. *Nature Nanotechnology*, 4: 217-224
- Parween, T., Jan, S., Mahmooduzzafar, S., Fatma, T. and Siddiqui, Z.H. 2016. Selective Effect of Pesticides on Plant-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(1): 160-179.
- Parween, S., Ali, A., Chauhan, V.S., 2013. Non-natural Amino Acids Containing Peptide-Capped Gold Nanoparticles for Drug Delivery Application, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, , 5 (14): 6484–6493
- Pastan, I., Gottesman, M. 1987. Multiple-Drug Resistance in Human Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 316 (22): 1388-1393
- Peiris, J.M., Cowling, B.J., Wu, J.T., Feng, L., Guan, Y., Yu, H. and Leung, G.M. 2016. Interventions to reduce zoonotic and pandemic risks from avian influenza in Asia. *Lancet Infectious Diseases* 16(2): 252-258.
- Reina, A., Jia, X., Ho, J., Nezich, D., Son, H., Bulovic, V., Dresselhaus, M.S., Kong, J., 2010. Large Area, Few-Layer Graphene Films on Arbitrary Substrates by Chemical Vapor Deposition. *Nano Letters*, 9 (1): 30-35.
- Reina, A., Thiele, S., Jia, X., Bhaviripudi, S., Dresselhaus, S.M., Schaefer, J.A., Kong, J., 2009. Growth of Large-area Single- and Bi-layer graphene by Controlled Carbon Precipitation on Polycrystalline Ni Surfaces. *Nano Research*, 2(6): 509-516.
- Reum, J.C., Jennings, S. and Hunsicker, M.E. 2015. Implications of scaled N-15 fractionation for community predator-prey body mass ratio estimates in size-structured food webs. *Journal of Animal Ecology* 84(6): 1618-1627.
- Schedin, F., Geim, A.K., Morozov, S.V., Hill, E.W., Blake, P., Katsnelson M.I., Novoselov, K.S. 2007. Detection of Individual Gas Molecules Adsorbed on Graphene. *Nature Materials*, 6: 652-655.
- Sengul, M.C., Kenar, A.N., Hanci, E., Sendur, İ., Sengul, C. and Herken, H. 2016. Practice of Acute and Maintenance Electroconvulsive Therapy in the Psychiatric Clinic of a University Hospital from Turkey: between 2007 and 2013. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* 14(1): 57-63.
- Shiao, C.C., Wu, P.C., Huang, T.M., Lai, T.S., Yang, W.S., Wu, C.H., Lai, C.F., Wu, V.C., Chu, T.S. and Wu, K.D. 2015. Long-term remote organ consequences following acute kidney injury. *Critical Care* 19: 21-74
- Shin, H.J., Kim, K.K., Beneyad, A., Yoon, S.M., Park, H.K., Jung, I.S., Jin, M.H., Jeong, H.K., Kim, J.M., Choi, J.Y. 2009. Efficient Reduction of Graphite Oxide by Sodium Borohydride and Its Effect on Electrical Conductance. *Advanced Functional Materials*, 19 (12): 1987-1992.
- Slowing, I.I., Escoto, J.L., Wu, C., Y. Lin. 2008. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1278–1288
- Smitha, S.L.; Philip, D.; Gopchandran, K.G. 2009 *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74: 735-739.
- Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.T., Ruoff, R.S., 2007. Synthesis of Graphene-based

- Nanosheets via Chemical Reduction of Exfoliated Graphite Oxide. *Carbon*, 45: 1558-1565.
- Stoller, M.D., Park, S., Zhu, Y., An, J., Ruoff, R.S. 2008. Graphene-Based Ultracapacitors. *Nano Letters*, 8 (10): 3498-3502.
- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. and Gottesman, M.M. 2006. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5 (1): 219-234
- Tauro J.R. and R.A. 2005. Gemeinhart Extracellular Protease Activation of Chemotherapeutics from Hydrogel Matrices: A New Paradigm for Local Chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics* 23: 34-43
- TJ Park, JG Martin, RJ Linhardt. 2008. Pharmacological Applications of Biocompatible Carbon Nanotubes and Their Emerging Toxicity Issues. *Spring Science and Business Media.*, 8: 283-316
- Tournebize, J., Gibaja, V., Puskarczyk, E., Popovic, B. and Kahn, J.P. 2016. Myocarditis associated with cannabis use in a 15-year-old boy: A rare case report. *International Journal of Cardiology* 203: 243-244.
- Vivekchand, S.R.C., Rout, C.S., Subrahmanyam, K.S., Govindaraj, A., Rao, C.N.R., 2008. "Graphene-based Electrochemical Supercapacitors. *Journal of Chemical Sciences*, 120: 9-13.
- Vrijland, W.W., Jeekel, J., Van Geldorp, H.J., Swank, D.J. and Bonjer, H.J. 2003. Abdominal adhesions - Intestinal obstruction, pain and infertility Surgical Endoscopy 17: 1017-1022
- Wang, G.X., Yang, J., Park, J., Gou, X.L., Wang, B., Liu, H., 2008. Facile Synthesis and Characterization of Graphene Nanosheets. *J. Phys. Chem. C*, 112 (22): 8192-8195.
- Wong, P.T. and Choi, S.K. 2015. Mechanisms of Drug Release in Nanotherapeutic Delivery Systems. *Chem. Rev*, 115: 3388-3432.
- Yang, C., Guo, W., Cui, L., An, N., Zhang, T., Lin, H., and Qu. F., 2002. pH-Responsive Magnetic Core-Shell Nanocomposites. *DrugDelivery journal*. 5: 287-290
- Yin, P.T., Shah, S., Chhowalla, M., Lee, K., 2015. Design, Synthesis, and Characterization of Graphene-Nanoparticle Hybrid Materials for Bioapplications. *Chem Rev*. 115: 2483-2531
- Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S. and Farokhzad, O.C. 2008. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol*. 83: 761-129
- Zhang, W., Zhang, Z., Zhang. Y., 2011. The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. *Nanoscale Research Letters*, 6:55-5
- Zhang, Y., Tan, Y.W., Stormer, H.L., Kim, P. 2005. Experimental Observation of the Quantum Hall Effect and Berry's Phase in Graphene. *Nature*, 438: 201-204.
- Zhang, Y., Gao, T., Xie, S., Dai, B., Fu, L., Gao, Y., Chen, Y., Liu, M., Liu. Z., 2012. Different growth behaviors of ambient pressure chemical vapor deposition graphene on Ni(111) and Ni films: A scanning tunneling microscopy study. *Nano Research* 12: 402-411
- Zhao, W., Odellius, K., Edlund, U., Zhao C and Albertsson, A., 2015. In Situ Synthesis of Magnetic Field-Responsive Hemicellulose Hydrogels for Drug Delivery *Biomacromolecules*, 16 (8): 2522-2528

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında İran’da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Liseyi İran’nın Tabriz şehrinde okudu. 2001 yılında Tabriz Üniversitesi’nde başladı ve 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Tabriz Üniversitesinde Yüksek Lisansa başladı ve 2008 yılında mezun oldu. 2012 yılında Atatürk Üniversitesinde doktora başladı

