T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ ARAŞTIRMA, GELİŞTİRME ve UYGULAMALARI ANABİLİM DALI

Fe_3O_4-PEG-KERSETİN MANYETİK NANOPARTİKÜLÜNÜN BEAS2B ve A549 AKCİĞER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Hazırlayan

Yeşim SİS

Danışman

Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN

Yüksek Lisans Tezi

Eylül, 2024

KAYSERİ

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ ARAŞTIRMA, GELİŞTİRME ve UYGULAMALARI ANABİLİM DALI

Fe_3O_4-PEG-KERSETİN MANYETİK NANOPARTİKÜLÜNÜN BEAS2B ve A549 AKCİĞER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan

Yeşim SİS

Danışman

Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN

Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2023-12897 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Eylül, 2024

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Yeşim SİS

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"Fe_3O_4-Kersetin-PEG Manyetik Nanopartikülünün Beas2B ve A549 Akciğer Hücreleri Üzerine Etkileri" adlı **Yüksek Lisans Tezi,** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Yeşim Sis **Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN**

Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN danışmanlığında, Yeşim SİS tarafından hazırlanan "Fe_3O_4-PEG-Kersetin Manyetik Nanopartikülünün Beas2B ve A549 Akciğer Hücreleri Üzerine Etkileri" adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

01.03.2023

JÜRİ **İmza**

Danışman : Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN .....

(Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ahmet CUMAOĞLU.....

(Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık

Bilimleri, Biyokimya Anabilim Dali)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hatice BEKCİ.....

(Kayseri Üniversitesi, Develi Hüseyin Şahin Meslek Yüksekokulu,

Bahçe Tarımı Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 02.03.2023 tarih ve E-42081359-050.02.04-404387 sayılı kararı ile onaylanmıştır. (Tezin sunumunun bitimindeki tarih)

01/03/2023

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi, yazılması ve gerekli laboratuvar ortamını sağlaması hususlarında göstermiş olduğu destek, yönlendirme ve yardımlarından ötürü tez danışmanım İlaç Uygulama-Araştırma Merkezi Müdürü Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Merkezimizde benden desteklerini esirgemeyen, Öğr. Gör. Gizem KURŞUNLUOĞLU, Doç. Dr. Ömer AYDIN, Doç. Dr. Şengül UYSAL, Doç. Dr. Serkan DAYAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hatice BEKCİ'ye; ayrıca Almanya'dan merkezimize gelip iş hayatımda yüksek lisansa başlamama vesile olan ve benden hiçbir yardımı esirgemeyip bana yol gösteren, deney tecrübelerini ve birikimlerini benimle paylaşan, benim bu seviyeye gelmeme yardımcı olan ve beni bu yola başlamaya cesaretlendiren ilk danışmanım olan Dr. Öğr. Üyesi Turgay YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Artık aramızda olmasada benim bugünlere kadar hayatta kalmamı, dayanmamı ve herşeye yeniden başlamamı sağlayıp herşeyi bana yeniden sabırla öğretip bu hayata ikinci kez başlamam için bana sebep veren ve bu yolda her türlü desteği kendinden taviz verse dahi benden esirgemeyen babam Muhittin SİS'e ve benim en büyük destekçim olan, bana her türlü desteği sağlayan annem Fatma SİS'e, ablam Pınar SİS'e ve abilerim Emrah SİS ve Mesut SİS'e yaşamımın her döneminde bana duydukları güven ve destek için en içten minnetimi sunarım.

Ayrıca TYL-2023-12897 proje kodu ile tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Birim Personeli'ne teşekkürlerimi sunarım.

Yeşim SİS

Kayseri, Mart/2024

Fe_3O_4 -PEG-KERSETİN MANYETİK NANOPARTİKÜLÜNÜN BEAS2B ve A549 AKCİĞER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Yeşim SİS

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi

Yüksek Lisans Tezi, Eylül 2024

Danışman: Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN

ÖZET

Manyetik nano partiküller (MNP'lar), hücresel ve moleküler düzeyde biyolojik etkileşim gösterme sebebi ile ilaçların kontrollü salımı, kanser tedavisi, hücreyi aktif ve pasif hedefleme, hücre biyolojisi araştırmalarında, hücre terapisi ve hücre etiketleme, hücre topluluklarının ayrıştırılmasında ve saflaştırılmasında, hipertermi tedavisinde, ilaç-gen dağılımı ve kanser hücrelerinin manyetik rezonansla görüntülenmesi gibi birçok alanda kullanılma potansiyeline sahiptir. MNP'lar süperparamanyetik özellikleri sayesinde dışarıdan uygulanan manyetik alan varlığında ilaçları sadece kanserli bölgelerde tutarak sağlıklı hücrelere verilen hasarı minimal düzeyde tutmaktadır.

MNP sentezlemek için birlikte çöktürme, termal ayrıştırma, hidrotermal yöntem ve mikroemülsiyon yöntemi gibi birçok yöntem vardır. Çöktürme yöntemi ile MNP sentezi, yapılması kolay ve maliyeti düşük olduğu için çok tercih edilmektedir. Bu çalışmada avantajlarından dolayı birlikte çöktürme yöntemi ile demir-oksit sentezlenmiş ve kaplayıcı olarak polietilen-glikol kullanılmıştır.

Kersetin, kalp hastalıklarına karşı koruma sağlayan, antioksidan, antienflamatuar ve antikanser özellik gösterdiği düşünülen, flavonoid sınıfının flavonoller grubuna ait bir maddedir. Kersetine, Fe_3O_4 bağlanarak manyetik özellik kazandırılmış ve polietilen-glikol yapıya bağlanarak yapının stabilitesi sağlanmıştır. Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-Kersetin ve Fe_3O_4-PEG-KERSETİN sentezlerinin karekterizasyon tayini için XRD, FTIR, NTA, Zeta-sizer ve SEM-EDX kullanılmıştır. Parçacık boyutu ortalama 96 nm ve Zeta potansiyeli -8 mV olan Fe_3O_4-PEG-KERSETİN üçlü sentezi, birlikte çöktürme yöntemi ile 80 ^{0}C'de yapılmıştır. *İn vitro* çalışmalarda Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-Kersetin, Fe_3O_4-PEG-Kersetin ve Kersetinin, Beas2B (sağlıklı akciğer hücresi) ve A549 (kanserli akciğer hücresi) hücre hatlarına olan etkileri xCELLigence cihazında incelenmiştir. Kersetin her iki hücre hattına da toksik etki gösterirken (Beas2B IC_{50}; 25 µg/mL-A549 IC_{50}; 25 µg/mL) kersetine, Fe_3O_4-PEG bağlanması sonucunda sağlıklı hücre hattına olan toksisitesinin azaltıldığı bu çalışma ile gösterilmiştir (Beas2B IC50; 564 µg/mL).

Anahtar Kelimeler: Manyetik nanopartikül; A549; XRD; NTA ve xCELLigence.

EFFECTS OF Fe_3O_4-PEG-QUERCETIN MAGNETIC NANOPARTICULE ON BEAS2B - A549 LUNG CELLS

Yeşim SİS

Erciyes Universty, Graduate School of Healthy Sciences

Department of Drug Application and Research Center

M.Sc. Thesis, July 2023

Supervisor: Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN

ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (MNPs) have the potential to be used in many areas such as controlled release of drugs, cancer treatment, active and passive targeting of cells, cell biology research, cell therapy and labeling, separation and purification of cell populations, hyperthermia, drug-gene delivert and cancer cells due to their biological interaction at the cellular and moleculer levels. Thanks to their superparamagnetic properties, MNPs keep the drugs only in cancerous areas in the presence of am externally applied magnetic field, minimizing the damage to healthy cells.

There are many methods to synthesize magnetic nanoparticles, such as co-precipitation, thermal decomposition, hydrothermal method and microemulsion method. The synthesis of magnetic nanoparticles by precipitation method is preferred because of its easy to do and low cost. In this study, iron-oxide was synthesized by co-precipitation method and polyethylene-glycol was used as a coating.

Quercetin is a substance belongs to the flavonols group of the flavonoid class, that provides protection against heart diseases and is thought to have antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties. Quercetin was given magnetic properties by binding Fe_3O_4, and its stability was attached by polyethylene-glycol (PEG). XRD, FT-IR, Zeta-sizer and NTA were used for the characterization of Fe_3O_4-Quercetin, Fe_3O_4-PEG and Fe_3O_4-PEG-Quercetin synthesis. The trible synthesis Fe_3O_4-PEG-Quercetin with an average particle size of 96 nm and Zeta-potential of -8 mV was carried out by co-precipitation method at 80 ^{0}C. In *in vitro* studies, the effects of Fe_3O_4-PEG-Quercetin on Beas2B (healthy lung cell) and A549 (cancerous lung cell) cell lines were examined on the xCELLigence system. While quercetin showed toxic effects on both cell lines (Beas2B-IC_{50}; 25 µg/mL-A549 IC_{50}; 25 µg/mL), this study showed that quercetin reduced its toxicity to h

Keywords: Magnetic Nanoparticles; A549; XRD; NTA and xCELLigence.

ealthy cells lines by binding Fe_3O_4-PEG to quercetin (Beas2B-IC50; 564 µg/mL).

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK .....
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....ii
KABUL VE ONAY SAYFASI iii
TEŞEKKÜR.....iv
ÖZET.....v
ABSTRACT.....vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR ve SİMGELER x
SEMBOLLER.....xii
TABLOLAR LİSTESİ.....xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 8
2.1. Nanoteknoloji.....8
2.2. Nanoparçacıklar 9
2.2.1. Manyetik Nanoparçacıklar (MNP'lar) 9
2.2.1.a. Manyetik Nanoparçacıkların Yüzey Modifikasyonları.....10
2.2.1.b.Polietilen-glikol (PEG).....11
2.2.1.c. Peglenmiş demir-oksit nanoparçacıkları.....11
2.3. Manyetik Demir-Oksit Nanoparçacıkları.....12
2.3.1. SPION'ların Kolloidal Özellikleri.....15
2.3.2. Nanoparçacıklarda Manyetik Özellikler.....15
2.3.2.a. Süperparamanyetik davranış.....16
2.4. Nanoparçacıklar ve klinik 18
2.4.1. Kanser ve Nanoteknoloji İlişkisi 22
2.4.2.Terapötik taşıyıcılar.....25
2.4.2.a. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde SPION'lar 25
2.5. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Sentezlenme Yöntemleri.....25

2.5.1. Birlikte Çöktürme Yöntemi 26
2.5.2. Termal Ayrıştırma Yöntemi 27
2.5.3. Hidrotermal yöntem 27
2.5.4. Mikroemülsiyon Yöntemi 28
2.5.5. Sonokimyasal metot 29
2.5.6. Poliol Sentezi 30
2.6. Flavonoidler 30
2.6.1.Flavonoidlerin sınıflandırması 32
2.6.1.a. Antosiyaninler 33
2.6.1.b. Kalkonlar 34
2.6.1.c. Flavanonlar 35
2.6.1.d. Flavonlar 35
2.6.1.e. Flavonoller 37
2.6.1.f. İzoflavonoidler 38
2.6.2. Flavonoidlerin Antikolinesteraz aktivitesi 39
2.6.3. Flavonoidlerin Antienflamatuar Aktivitesi 39
2.6.4. Flavonoidlerin İşlevleri ve Uygulamarı 40
2.7. Kersetinin Doğadaki Yeri ve Özellikleri 43
2.7.1. Kersetinin Tedavi Etkinliği 44
3.GEREÇ ve YÖNTEM 46
3.1. Fe_3O_4 Sentezi 46
3.2. Fe_3O_4 -PEG SENTEZİ 47
3.3. Fe_3O_4 -Kersetin Sentezi 48
3.4. Fe_3O_4-PEG-Kersetin Sentezi 48
3.5. Hücre Ekimi 51
3.5.1. DMEM besiyeri hazırlama: (A549-kanserli akciğer hücresi için) 51
3.5.2. RPMI besiyeri hazırlama: (BEAS2B-sağlıklı akciğer hücresi için) 51
3.5.3. Stokdan A549 ve Beas2B hücrelerinin çıkartılması aşaması: 51
3.5.4. A549 ve Beas2b hücre sayılarının hesaplanması aşaması: 52

3.5.5. A549 ve Beas2b hücrelerinin 16'lık e-plate'lere ekilmesi aşaması: 53
3.5.6.Hücrelere sentezlenen maddelerin verilmesi: 54
4. BULGULAR 58
4.1. Fe_3O_4/ Fe_3O_4-PEG/ Fe_3O_4-QUER/ Fe_3O_4-PEG-QUER Sentezlerinin Karakterizasyonu 58
4.1.1.FT-IR Sonuçları 58
4.1.2. XRD Sonuçları 61
4.1.3. NTA(Nanoparticle Tracking Analysis) Sonuçları 65
4.1.4. Zeta Potansiyel Sonuçları 69
4.1.5. SEM Görüntüleri (Taramalı Elektron Mikroskobu) 72
4.1.6. EDX(Elementel Analiz) Sonuçları 75
4.2. xCELLigence Sonuçları 77
4.2.1. Beas2B(Sağlıklı Akciğer Hücresi) Hücresine Madde/İlaç Uygulanması 78
4.2.2. A549(Kanserli Akciğer Hücresi) Hücresine Madde/İlaç Uygulanması 80
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 84
6. KAYNAKLAR 89
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

AChE : Asetilkolinesteraz

Atm : Atmosfer

BChE : Bütirilkolinesteraz

DMEM : Dulbecco'nun Değiştirilmiş Kartal Meidumu/Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA : Deoksiriboz Nükleik Asit

DOX : Doxorubicin

EMA : Avrupa İlaç Ajansı

EMU : Elektromanyetik Birim

EPR : Gelişmiş Geçirgenlik ve Retansiyon

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FT-IR : Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi

HB : Hidrojen Bağı

IONP : Demir-oksit Nanoparçacığı

K : Kelvin

Mg : Miligram

mL : mililitre

MNP : Manyetik Nanopartikül

MRI : Manyetik Rezonansla Görüntüleme

M_R : Kalıcı Mıknatıslanma

M_S : Manyetik Doyugunluk

NCL : Nano cantilever

NW : Nanotel

Nm : Nanometre

NP	: Nanoparçacık/nanopartikül
NTA	: Nanopartikül İzleme Analizi(Nanoparticle Tracking Analysis)
NS	: NanoShell
PEG	: Polietilen-glikol
pH	: Pondus Hidrogenyum
PVA	: Polivinil-alkol
PVP	: Polivinil-pirolidin
OA	: Oleik Asit
QD	: Quantum Dot
RES	: Retiküloendotelyal Sistem
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	: Roswell Park Anıt Enstitüsü/Roswell Park Memorial Institute
rxn	: Reaksiyon
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SPION	: Süperparamanyetik Demir-oksir Nanoparçacığı
TMX	: Temoksifen
UV	: Ultraviyole
XRD	: X Işınları Kırınımı
yy	: Yüzyıl
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: mikrometre
^{0}C	: Santigrad derece

SEMBOLLER

C	: Karbon
CO_2	: Karbondioksit
Fe^{2+}	: Demir +2 katyonu
Fe^{3+}	: Demir +3 katyonu
$FeCl_3.6H_2O$	: Demir-III-klorür-hekzahidrat
$FeCl_2.4H_2O$	: Demir-II-klorür-tetrahidrat
Fe_3O_4	: Manyetit
$Fe(acac)_3$	: Demir-III-asetilasetonat
$Fe(CO)_5$	: Demir-V-karbonil
KNO_3	:Potasyum nitrat
KOH	: Potasyum hidroksit
NH_3	: Amonyak
γ-Fe_2O_3	: Maghemit
α-Fe_2O_3	: Hematit

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Antosiyaninler 33

Tablo 2.2. Kalkonlar 34

Tablo 2.3. Flavanonlar 35

Tablo 2.4. Flavonlar 36

Tablo 2. 5. Flavonoller 37

Tablo 2.6. İzoflavonoidler 38

Tablo 4.1. Zeta Potansiyel değerleri 72

Tablo 4.2. Beas2B Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 78

Tablo 4.3. Beas2B Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri 79

Tablo 4.4. Beas2B Hücresine Uygululanan Fe3O4-PEG-QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri 79

Tablo 4.5. Beas2B Hücresine Uygululanan QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri 80

Tablo 4.6. A549 Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin 24-48 Saatlik IC50 Değerleri 81

Tablo 4.7. A549 Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin 24-48 Saatlik IC50 Değerleri 81

Tablo 4.8. A549 Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-PEG-QUERCETIN Maddesinin 24-48 Saatlik IC50 Değerleri 82

Tablo 4.9. A549 Hücresine Uygululanan QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri 83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hematit ve maghemit-manyetit yapısı 13

Şekil 2.2. Manyetik moment yönlenmeleri 18

Şekil 2.3. Flavonoidlerin kullanıldığı alanların şematik gösterimi 42

Şekil 3.1. Demir-oksit Sentezi 46

Şekil 3.2. Sentez Deney Düzeneği 50

Şekil 3.3. Sentezin Düzeneği ve Oluşum Mekanizması 50

Şekil 3.4. Hücre Deneyi 51

Şekil 3.5. Hücre Hazırlama 53

Şekil 3.6. E-plate'lere Hücre Ekimi 53

Şekil 3.7. Uygulanacak Maddelerin Hazırlanması 54

Şekil 3.8. Uygulanan Maddelerin Konsantrasyonları 55

Şekil 3.9. A549 için Uygulanacak maddelerin Hazırlanması 56

Şekil 3.10. A549 Hücresine Uygulanacak Maddeler ve Konsantrasyonları 57

Şekil 4.1. Fe_3O_4 IR SPECTRUM 59

Şekil 4.2. Fe_3O_4–PEG IR SPECTRUM 59

Şekil 4.3. Fe_3O_4–QUERCETIN IR SPECTRUM 60

Şekil 4.4. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN IR SPECTRUM 60

Şekil 4.5. Sentezlenen Maddelerin Toplu Grafik Gösterimi 61

Şekil 4.6. Bragg Kanunu 62

Şekil 4.7. Fe_3O_4 XRD GRAFİĞİ 62

Şekil 4.8. Fe_3O_4-PEG XRD GRAFİĞİ 63

Şekil 4.9. Fe_3O_4-QUERCETIN XRD GRAFİĞİ 64

Şekil 4.10. Fe_3O_4-PEG-QUER XRD GRAFİĞİ 64

Şekil 4.11. Tüm Sentezlerin Toplu XRD Grafiği 65

Şekil 4.12. Fe_3O_4 Maddesinin NTA Sonucu 66

Şekil 4.13. Fe_3O_4-PEG maddesinin boyut ortalanası 170.5 nm iken en şiddetli piki 61.1 nm'de vermiştir 66

Şekil 4.14. Fe_3O_4-QUERCETIN maddesinin boyut ortalanası 66.6 nm iken en şiddetli piki 46.2 nm'de vermiştir 67

Şekil 4.15. Fe_3O_4-PEG-QUER maddesinin boyut ortalanası 96.8 nm iken en şiddtli piki 56.6 nm'de vermiştir 67

Şekil 4.16. Fe_3O_4 maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü 68

Şekil 4.17. Fe_3O_4–PEG maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü 68

Şekil 4.18. F_3O_4–QUERCETIN maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü 69

Şekil 4.19. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü 69

Şekil 4.20. Fe_3O_4 maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği 70

Şekil 4.21. Fe_3O_4–PEG maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği 70

Şekil 4.22. Hem demir-oksit hem de kersetin negatif yüklü oldukları için maddenin negatifliği artmıştır. 71

Şekil 4.23. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği 71

Şekil 4.24. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği 72

Şekil 4.25. Demir-oksit(Fe_3O_4) yapısının SEM görüntüleri(Scale bar: 100nm) 73

Şekil 4.26. Fe_3O_4-PEG yapısının SEM görüntüleri(Scale bar:200;100nm) 74

Şekil 4.27. Fe_3O_4-QUER yapısının SEM görüntüleri(Scale bar:100nm) 74

Şekil 4.28. Fe_3O_4-PEG-QUER yapısının SEM görüntüleri(Scale bar:200nm) 75

Şekil 4.29. Fe_3O_4 EDX Analizi 75

Şekil 4.30. Fe_3O_4-PEG EDX Analizi 76

Şekil 4.31. Fe_3O_4-QUER EDX Analizi 76

Şekil 4.32. Fe_3O_4-PEG-QUERCETIN EDX Analizi 77

Şekil 4.33. Beas2B/Sağlıklı Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü 78

Şekil 4.34. Beas2B/Sağlıklı Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü 78

Şekil 4.35. Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü.....79

Şekil 4.36. Beas2B/Sağlıklı Akciğer Hücresine Uygulanan QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü.....80

Şekil 4.37. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü.....80

Şekil 4.38. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü.....81

Şekil 4.39. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-PEG-QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü.....82

Şekil 4.40. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü.....82

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nanoteknoloji, nanometre boyutuna sahip maddeleri inceleyen ve bu maddelerin uygulama alanlarını genişletmeyi amaçlayan bilim dalıdır. Nanometre, metrenin milyarda biri olarak ifade edilirken nano-parçacıklar 1-100 nm aralığında boyuta sahiptir. Bu boyutlardaki nano materyaller uzun zamandır kullanılıyor olmasına rağmen birçok disiplinde kullanılabilmeye uyarlanabilmesi ve sentezlenebilme imkânına sahip olması açısından son zamanlarda büyük bir önem kazanmaktadır (Polte , 2015; Kang ve ark., 1996; Appenzeller, 1991). Nanoteknolojinin bu kadar büyük bir öneme sahip olmasının esas nedenleri ise bu parçacıkların yüksek kararlık göstermesi, boyutlarının küçük olması, ilaçları taşımada kullanılabilmesi, hidrofilik ve hidrofobik ilaçları birleştirebilmesi, istenilen biçimde yüzey özelliği kazandırılabilmesi, biyoyararlanımı artırması ve ilaç hedeflemede kullanılabilme potansiyeli gibi birçok özelliğe sahip olduğundan kozmetik, biyo-medikal, farmasötik ve elektronik gibi pek çok disiplinde kullanılabilmesinden ileri gelmektedir. Nanoteknoloji ile atomik ve moleküler boyutları kontrol edebilmek mümkün olduğundan elektronik, optik ve manyetik özelliklere sahip maddeler elde edilebilmekte (Poizot ve ark.,2000; Tari ve ark., 1979; Mahmoudi ve ark., 2010) ve bu özelliklere sahip materyaller Manyetik Reazonansla Görüntüleme/MRI ve klasik tedavilerdeki dozaj-toksisite gibi sorunların önüne geçebilen hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılabilmektedirler (Langer, 1998). 1970'lerde *in vivo* çalımalarda ilaçları hedefleyebilen, yani ilacı sadece etki etmesi istenilen bölgeye taşıyabilen manyetik nanoparçacıklar(np) ve mikropartikül taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Alexiou ve ark., 2000; Senyei ve ark., 2000; Mosbach ve Schroder , 1979). Nanoteknoloji'nin potansiyeli çok büyük olduğu için ABD ve Çin

gibi ülkelerde bu sahaya ayrılan bütçe çokça yükselmiştir (Roco, 2003; Choi M ve ark., 2003; Frank ve ark., 2008; Chouhan ve Bajpai, 2009; Gelperina ve ark.,2005).

Fiziksel veya kimyasal yöntemlerle elde edilebilen nanoparçacıkların (np) boyutları farklılık gösterebilmektedir. Np'ın boyutu görüntüleme veya taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi gibi uygulama alanlarına göre değişebilmektedir (Fan ve ark., 2014; Huangho ve ark., 2012). Manyetik nanoparçacıklar (MNP'lar) manyetik hassasiyet, yüksek koersite ve özellikle süperparamanyetik özellik gösterdikleri için (Patel ve ark., 2008; Jun ve ark., 2007) biyo-ayrıştırma, hücre-virüs-protein gibi yapıları tespit edebilme, hücreyi aktif-pasif hedefleme ve kanser hücrelerinin MRI ile görüntülenmesi gibi çok önemli sahalarda kullanılabilmektedir (Kovac ve Sambucetti, 2007). MNP'ların özellikleri boyutlarına bağlı olduğu için boyutlarının homojen dağılama sahip olması çok önemlidir (Binh ve ark., 1998). MNP'lar yüzey enerjilerinin büyük olması ve manyetik etkileşimler yüzünden topaklanma eğilimi göstermekte, bunun sonucunda ise vücut nanoparçacığı yabancı bir cisim gibi algılayıp ondan kurtulmaya çalışmaktadır (Arruebo ve ark., 2007). Ancak hidrofilik bir polimer ile kaplama yapılarak veya bağlanmak istediği yüzeye uygun bir grup ile fonksiyonelleştirilerek bu sorun aşılabilmektedir (Campelj ve ark., 2009). Polietilen-glikol(PEG), Polivinilalkol(PVA) ve dekstran gibi sentetik yüzey kaplayıcıları veya karbonhidrat ve protein gibi doğal polimerler, yüzey kaplayıcılar olarak kullanılabilmektedir (Mcbain ve ark., 2008; Laurent ve ark., 2008; Dobson, 2006). PEG hidrofilik/suda çözünebilen, toksik olmayan ve yüksek yüzey akışkanlığına sahip protein dirençli bir polimerdir(Veiseh ve ark., 2010; Karakoti ve ark., 2011; Mukhopadhyay ve ark., 2012; Ahmed ve ark., 2010; Feng ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2002). Bu ve birçok özelliğinden dolayı bu tez çalışmasında yüzey kaplayıcısı olarak PEG 1000 tercih edilmiştir.

MNP'ların manyetik momentleri sıcaklığa bağlı olarak dizilim göstermekte ve sıcaklık arttıkça düzensizlik başlamaktadır; kritik bir sıcaklıktan sonra ise(Curie sıcaklığı) kristal yapının manyetizması sıfır olmaktadır. Ferromanyetik maddeler manyetik alan varlığında aşırı mıknatıslanarak manyetik alan ortadan kaldırılsa dahi bu özelliğini kaybetmeyip kalıcı bir manyetizma göstermektedirler (Fu, 2012; Margulies ve ark., 1996; Margulies ve ark., 1997).

Terapötik np'lar, silika, altın ve demir-oksit gibi inorganik veya lipozomlar, polimerik ve miseller ise organik np'lardan oluşmaktadır. İnorganik np'lar klinik öncesi çalışmalarda güzel sonuçlar verdiği için klinik olarak kullanılabilmesi içinde geliştirilmeye başlanmış ve kansızlık tedavisi, tümörlerin termal ablasyonu ayrıca intra-operatif sentiel lenf nodu görüntüleme gibi alanlarda kullanımı onaylanmıştır (Sainz ve ark., 2015; McCarthy ve Weissleder, 2008). Ayrıca inorganik np'lar termal ısıtmalı ya da manyetik rezonansla görüntüleme ve bireye özgü ilaç gibi alanlarda pek çok fayda sağlamaktayken (Torchilin, 2014; Mura ve ark., 2013) organik np'lar ise hemostas, gen terapisi ve kanser tedavisi için kullanılabilmektedir (Petros ve DeSimone, 2010; Peer ve ark., 2007).

Demir-oksit doğada fazlaca bulunan ve laboratuvar ortamında kolayca elde edilebilen üretimi ucuz, kararlı ve biyo-uyumlu bir maddedir (Lu ve ark., 2007). Manyetit, hematit ve maghemit en çok bilinen demir-oksit np'ları dahil doğada bilinen sekiz demir-oksit bileşiği mevcuttur; manyetit, siyah-kahve renkte yüzey merkezli kübik bir yapıya sahip bir birleşik iken hematit, volkanik faaliyetler sonucu oluşmuş kırmızı-kahve renge sahiptir ve maghemit ise manyetitin oksidasyona uğraması sonucunda oluşmuştur (Cornell ve ark., 2003; Gossuin ve ark., 2009; Schwertmann, 1991). Demir oksit geniş bir uygulama alanına sahip olduğu için büyük bir ilgi görmekte ve biyo-tıp, boya pigmentleri ve ferro-akışkanlar gibi alanlarda kullanılmaktadır. Demir oksitlerin yüzey alanları büyük olduğu için yüzey enerjileri de büyüktür (Goesmann ve ark., 2010) ve bu yüzden kümeleşme/topaklaşma eğilimi göstermektedirler. Kümeleşme girişimini önlemek için kaplama yapılması gerekmektedir. MNP'ler polimer, yüzey aktif madde veya inorganik bir malzeme ile kaplanabilmektedirler (Lu ve ark., 2007). Biyo-tıpta kullanılacak MNP'nin süperparamanyetik özellikte olması gerekmektedir ki aksi taktirde kalıcı manyetizasyon sebebi ile damarlarda tıkanıklık meydana gelebilmektedir (Tartaj ve ark., 2003).

IONP (demir-oksit nanoparçacık)'ları; anemide replasman tedavisi (Macdougall, 2009; Danielson, 2004), kontrast ajan olarak manyetik rezonans ile görüntüleme (Gupta AK ve Gupta M, 2005; Wang ve ark., 2001) gibi tıbbi amaçlı kullanılabilmektedirler. Kanser ve patolojik türleri görüntülemede IONP'ların manyetik alandaki davranışı baz alarak tespit edilebilmektedir. (Na ve ark., 2009; Laurent ve ark., 2008). SPION'larda (süperparamanyetik demir-oksit nanoparçacıklarda) manyetik hedefleme, manyetik alan

gradyanının uyguladığı kuvvetten kaynaklanmaktadır; terapideki etkinlik ise alan kuvveti, gradyan ve parçacıkların hacmi ve manyetizmasına bağlıdır. Biyo-uyumlu manyetik taşıyıcı kompleksi, hastaya sıvı formda enjekte edildiğinde manyetik kuvvetler arterlerde kılcal damarlardaki kan akış hızını aştığın zaman dışarıdan uygulanan manyetik alan varlığında bu taşıyıcı sistem hedef bölgede tutulabilmekte ve ortamın pH ve sıcaklık gibi fizyolojik faktörlerine bağlı olarak salım yapılabilmektedirler (Alexiou ve ark., 2000; Widder ve ark.,1978).

Hidrotermal sentez, sonokimyasal yöntem, poliol sentezi, mikro-emülsiyon ve birlikte çöktürme yöntemi gibi birçok farklı yöntem ile demir oksit sentezi yapılabilmektedir. Birlikte çöktürme yöntemi ile demir-oksit eldesi yüksek sıcaklık ve bazik bir ortamda gerçekleşmektedir. Parçacıkların şekli ve boyutu Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının oranına, reaksiyon(rxn) sıcaklığına, karıştırma hızı ve pH değeri gibi parametrelere bağlıdır (Wu ve ark., 2007). Termal ayrıştırma yöntemi ile çözücüler içinde manyetik demir-oksit np'ları sentezlenebilmekte; yüksek sıcaklıklarda oleik asit, alkol gibi çözücülerin varlığında demir kaynağı olarak $Fe(acac)_3$ ve $Fe(CO)_5$ gibi maddeler kullanılarak demir-oksit np'ları elde edilebilmektedir (Wu ve ark., 2015); hidro-termal yöntemde ise mikro-emülsiyon ve termal ayrıştırma yöntemlerinden nispeten daha yüksek sıcaklıklarda sentez gerçekleşmektedir (Wu ve ark., 2008). Hidrotermal yöntemde demir kaynağı olarak kullanılan maddenin basınçta ve yüksek sıcaklıklarda manyetite dönüştürülmesi ile süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları (SPION) elde edilirken (Khollam ve ark., 2002) mikroemülsiyon yönteminde ise yüzey aktif moleküller kullanılarak sürekli fazda(yağ fazı) nanoreaktör olarak su damlacıkları kullanılarak SPION elde edilmektedir (Sen ve ark., 2006; Gupta and Wells, 2004); sonokimyasal yöntem ise ~5000 K sıcaklıkta verimi düşük SPION elde edilebilen yeni bir yöntemdir (Kumar ve ark., 2001; Vijayakumar ve ark., 2000; Dang ve ark., 2008); poliol yöntemi ile de demir kaynağı olarak kullanılan maddenin poli-alkoller ile indirgenmesi ile gerçekleşmektedir (Fuente ve Grazu, 2012).

Latincede sarı anlamına gelen 'flavus-flavum' kelimelerinden türemiş bir kelime olan flavonoidler meyve, sebze ve çayda bol miktarda bulunmakta ve bitkilerin biyolojik aktivitelerinde yer almaktadır (Takahashi ve Ohnishi, 2004; Samanta, Das G ve Das SK, 2011). Anti-enflamatuar, anti-mutajenik, anti-oksidan ve anti-karsinojenik gibi etkiler gösteren flavonoidler, farmasötik ve tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır (Lee ve ark.,

2009; Metodiewa ve ark., 1997; Walker ve ark., 2000). Bitkilerin hemen hemen her yerinde bulunan flavonoidler, kapalı tohumlu bitki ailesinin çiçek pigmentleri olarak kolayca tanınmaktadır (Dewick, 2001). Bitkilerin ikincil metabolitleri olarak da bilinen flavonoidlerin bazıları nükleik asit ve proteinlere müdahele edebilen, anti-mikrobiyal ve farmakolojik özellik gösterebilen ve böcek öldürebilen biyoaktif bileşikler bulundurdukları için tıpta ve tarımda dikkat çekmektedir (Wink, 2004). BChE-AChe-BACE1 inhibisyonu, aterosklerozun önlenmesi, insülin reseptör aktivatörü, antitrombojenik, lipoksijenaz inhibisyonu, H1N1 influenza hastalığının inhibisyonu ve NDM-1 inhibisyonu gibi alanlarda da flavonoidler kullanılabilmektedir (Pandne ve ark., 2016). Meyve-sebze, tahıl ve çayda bulunan flavonoidlerin bir diğer özelliğ ise östrojen gibi steroid hormonlarına benzer aktivite gösterebilmeliridir (Srivastava ve Bezwada, 2015). Bazı flavonoidlerin ise lipoprotein oksidasyonu, kan-trombosit agregasyonu ve kardiyovasküler gibi damar sertleşmesinde rol oynayan etkenlerin üzerinde faydalı olduğu gözlemlemiştir (Tikkanen ve Adlercreutz, 2000; Tham ve ark., 1998). Yaşlanma, damar sertliği ve diyabet gibi hastalıklara sebep olan lipit peroksidasyonu (Pietta, 2000; Halliwell, 1991; Halliwell ve ark., 1992) kersetin ile yapılan çalışmalarda baskılanabilmiştir (Letan, 1996). Flavonidlerin oksidatif stresi önleme potansiyelleri anti-oksidan özelliklik göstermesi üzerinde etkilidir; hücreleri tepkimeye girmeye meyilli oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif etkiden koruyarak denge görevini üstlenen anti-oksidanlardır ki bu denge bozulduğu zaman kanser, diyabet ve nörodejeneratif gibi rahatsızlıklara yol açan oksidatif stres oluşmaktadır. Birçok moleküle ve proteine zarar verebilen oksidatif stresi, anti-oksidanlar radikal üreten sistemlere müdahele ederek önlemekte ve hücrelere verilebilecek zararın önüne geçerek engellemektedir (Srivastava ve Bezwada, 2015). Flavonoidler iki benzen halkasına bağlı karbon gruplarına ve bu iki benzen halkasına bağlı fonksiyonel gruplara göre antosiyaninler, izoflavonlar, flavonlar, flavonoller ya da kateşinler gibi sınıflara ayrılmakta ve bunlarda kendi aralarında kersetin, mirisetin, rütin, apigenin, hesperitin ve floretin gibi alt sınıflara ayrılmaktadırlar (Pandne ve ark., 2016).

Kersetin, kateşin, hesperitin ve naringin farklı derecelerde anti-viral etkiye sahiptirler (Wang ve ark., 1998). Kersetin, flavonoid sınıfına ait yapısında hidroksit gruplarını barındıran sudaki çözünürlüğü az olmasına rağmen alkol ve lipidlerde yüksek

çözünürlüğe sahip olan bir maddedir. Elma, üzüm, kiraz, soğan ve biber gibi meyve-sebzelerde; şarap ve yeşil-siyah çayda bulunan kersetinin anti-oksidan/-kansorejen/-enflamatuar özellikte olup olmadığı pek çok araştırmaya konu olmuştur. Soyadaki izoflavon sınıfındaki genistein ve soğandaki flavonol sınıfındaki kersetin en çok bilinen flavonoidlerdendir ve bu bileşikler yapıca birbirine benzeselerde işlevleri farklıdır (Arslan ve ark., 2005).

Kersetinin yapısında bulunan fenolik bileşikler ile serbest haldeki radikallerin reaksiyona girmesi ile düşük aktiviteye sahip radikallerin oluşması sonucunda kersetin anti-oksidan özellik gösterebilmekte (Miller, 1996). Kersetinin kanser riskinin azalttığı tahmin edilen fitoöstrojen yapıya sahip bir madde olduğu düşünülmektedir; laboratuvar çalışmalarında kersetinin meme kanseri hücrelerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Miodini ve ark., 1999). Kersetinin, insülin salgılanmasını artırıp pankreatin beta hücrelerini serbest radikallerin verdiği hasardan korumakadır (Crataegus, 1998). Astım-alerji, gut hastalığı ve prostat hastalığına karşı kersetin tedavi edici olarak kullanılabilmektedir (Arslan D ve ark., 2005).

Kanser, hücrelerin kontrolsüzce bölünmeleri sonucunca hücre sayısında aşırı bir çoğalmanın meydana gelmesiyle oluşan, dünyayı derinden etkileyen bir hastalıktır (Nayak ve Pal, 2010). Dünya genelinde akciğer kanseri erkeklerde en sık görülmekte olan kanser çeşidiyken kadınlarda ise meme ve kolektral kanserinden hemen sonra gelen kanser çeşitidir (Ferlay ve ark., 2013). Kanserin erkenden teşhis edilebilmesi tedavi açısından büyük bir önem teşkil eder çünkü bu sayede kanserin gelişmesi durdurulabilmektedir (Auyang, 2006). Klasik yöntemler ile organlardaki büyümeler ve değişimler tespit edilebilir ancak bu süreç binlerce kanser hücresinin oluşmasını beklemeye mahkum olduğundan uzun sürebilmekteyken nanoteknoloji sayesinde ise az miktarda kanser hücresi oluşmuşsa bile teşhis edebilmek mümkün hale gelmektedir. Nanoparçacıklar tek bir kanser hücresine girebilme yeteneğine sahip olduğu için kanserli hücreler kolayca tespit edilebilmektedir. (Singh, 2005) Kanseri tedavi etmede kullanılan radyoterapi, cerrahi ve kemoterapi gibi klasik yöntemler sağlıklı hücre ve dokulara da zarar verebilmekte ve toksik etki gösterebilmektedir (Nehru ve Singh, 2008). MNP'lar, hücre ve dokularla uyumunun yüksek olması ve kolay sentezlenebilmeleri gibi birçok özellikleri sayesinde sağlık alanındaki çalışmalarda büyük ilgi görmüştür. Bu maddeler yıllardır kullanılmakta ayrıca bazı türleri Avrupa

İlaç Ajansı ve Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış ve insanları tedavi etme amaçlı kullanılmıştır (Anselmo ve Mitragotri, 2016). Klinik olarak onaylanmış birçok np bazı kanser türlerinin çeşitli evrelerinde tedavi amaçlı kullanılmıştır; PEG-Doxil, FDA tarafından 1995 yılında onaylanan ve kanser tedavisinde kullanılan ilk tıp nano materyalidir (Barenholz, 2012).

Bu çalışmada avantajlarının çok olmasından dolayı birlikte çöktürme yöntemi tercih edilmiştir. Hava ortamında gerçekleştirilen sentezde $FeCl_2.4H_2O$ ve $FeCl_3.6H_2O$ maddelerinden manyetik Fe_3O_4 elde edilerek yapıya anti-kanser etkisine bakılacak olan kersetin ve yüzey kaplayıcısı olarak polietilen-glikol(PEG) bağlanmıştır. Sentezlenen maddemizin karakteristik tayini FT-IR, SEM, NTA, XRD ve Zeta-SİZER cihazlarıyla yapıldıktan sonra *in vitro* aşamaya geçilmiştir.

Hücre çalışmaları kısmında ise öncelikle 75 cm^2'lik flasklara Beas2B ve A549 hücreleri ekilip uygun besi-yeri (RPMI-DMEM) ortamında %5'lik CO_2 ayarlanmış inkübatörde çoğalmaları beklenmiş ve çoğalma durumu yeterli sayıya ulaştığında hücrelere Fe_3O_4-PEG-Kersetin, Fe_3O_4-Kersetin, Fe_3O_4-PEG ve Kersetin verilip hücreleri ne derece etkilediğine x-CELLigence cihazında bakılmıştır. Sentezlenen maddenin sağlıklı (Beas2B) akciğer hücresine ve kanserli(A549) akciğer hücresine etkisinin ne olduğu kıyaslanarak sağlıklı hücrelere minimal düzeyde kanserli hücrelere ise optimum düzeyde etki etmesi bu tez çalışmasının amacıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

Nano-teknoloji; atomik, makro-moleküler ya da moleküler ölçekteki araştırmalar ve geliştirmelerdir. Boyutu 100 nm'den küçük olan parçacıklar ise nano-parçacık olarak adlandırılmakta ve nano-teknolojinin temelini oluşturmaktadır. Bu boyuttaki nano-materyaller uzun zamandır kullanılmakta olmasına rağmen son zamanlarda büyük bir önem kazanmış ve pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Manyetik, elektronik ve biyo-medikal; kozmetik, farmasötik, katalitik ve çevre gibi kullanım alanları bunlara örnek olarak gösterilebilmektedir. Nano-teknoloji potansiyelinin çok büyük olması sebebiyle 2005'teki kayıtlara göre ABD de yaklaşık 1 milyar dolar, Japonya da yaklaşık 800 milyon dolar ve Kore de ise yaklaşık 200 milyon dolar bu alana araştırma-geliştirme için ayrılan bütçedir ki bu durumda bu sahadaki araştırmalara yapılan finansmanın 1999'dan bu zamana kadar yedi kat artması anlamına gelmektedir (Roco, 2003; Choi ve ark., 2003).

Nanoteknoloji, atomik ve moleküler boyutta eşsiz bir kontrol yeteneği sağladığı için elektronik, optik ve manyetik özelliklerin meydana gelmesinden dolayı büyük bir ilgi görmüştür (Poizot ve ark., 2000; Tari ve ark., 1979; Mahmoudi ve ark., 2010). Np'lar boyutları sayesinde nano-mühendislik ve fonksiyonel nano yapıların üretiminde kullanılabilmektedir. Np'lar MRI/Manyetik Rezonans ile Görüntüleme ve hedefli ilaç taşıyıcı sistemler ile tümörü tedavi etmede kullanılabilmektedir. Hedefli ilaç taşıyıcı sistemler ile klasik tedavi yönteminde kullanılan ilaçların dağılımı, etki edeceği bölgeye has olmaması yani sağlıklı bölgelere de etki edebilmesi, dozajının yüksek olması ve toksisiteye neden olması gibi birçok olumsuzlukların önüne geçebilmek söz konusudur (Langer,1998). SPION'lar, süperparamanyetik yapıları sayesinde dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında arzu edilen bölgeye hedefleme yapabilecek (Kodama, 1999) ve

manyetik alan ortadan kaldırıldığında manyetik özelliklerini kaybedecektir (Freeman ve ark., 1960).

Nanoteknoloji, kök hücreleri ya da genetiği değiştirilmiş hücreleri kullanarak bireye özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi aşamasında bu hücreleri takip etmek ve işlevsel faliyetlerini değerlendirmek amacı ile kullanılmakta ve SPION'lar ise bu sahada potansiyel aday olarak araştırılmaktadır (Arbab, 2009).

2.2. Nanoparçacıklar

Nanoparçacıklar fiziksel ve kimyasal yollar ile elde edilebilmektedir; fiziksel yöntem ile büyük parçacıklardan küçük parçacıklar elde edilirken kimyasal yöntemde ise tam tersi olarak küçük parçacıkların kimyasal tepkimeye girmeleri ile kümeleşme meydana getirip büyük parçacıklar elde edilmektedir. Kimyasal yöntemler eşit boyda parçacık üretmek için daha elverişlidir (Polte, 2015). Nano-parçacıkların multifonksiyonel biyo-uygulamaları, fiziko-kimyasal özelliklerine yani parçacık boyutuna büyük ölçüde bağlıdır (Bertrand ve ark., 2014; Huangho ve ark., 2012). Nanoparçacık boyutu her bir biyo-uygulama için farklılık gösterebilmektedir, örneğin 16 nm boyutuna sahip altın nanoparçacık lizozomal görüntülemede nanoprob olarak kullanılabilmekteyken (Fan ve ark., 2014) 2-15 nm boyutuna sahip altın nanoparçacık tümör dokularına en iyi şekilde nüfus edebilmektedir (Huangho ve ark., 2012).

2.2.1. Manyetik Nanoparçacıklar (MNP'lar)

MNP'lar yüksek-koersivite/-manyetik hasssasiyet, düşük Curie sıcaklığı ve özellikle de süperparamanyetik özelliklerine sahip olduğu için manyetik akışkanlar, katalizörler ve biyo-uygulama gibi pek çok alanda büyük bir öneme sahiptir (Patel ve ark., 2008; Jun ve ark., 2007). MNP'lar biyo-ayırma, hücre, protein ve virüs gibi yapıları tespit etme, manyetik rezonans ile görüntüleme, hipertermi tedavisi, hücreyi aktif ve pasif hedefleme, hücre terapisi ve etiketleme, hücre topluluklarının ayrıştırılmasında-saflaştırılmasında, ilaç-gen dağılımı ve kanser hücrelerinin manyetik rezonansla görüntülenmesi, ilaç taşıyıcısı sistemler ve jet yazıcılar için manyetik mürekkep üretme gibi pek çok önemli alanlarda kullanılabilmektedir(Kovac ve ark., 1982). Homojen boyut dağılımı, np'ların kristalitesini önemli ölçüde etkilemekte ve boyut kontrolü MNP'ların kullanılacak alanlar yelpazesini önemli ölçüde değiştirmektedir. Biyolojik

uygulamalarda düşük toksisite, biyo-uyumluluk önemli faktörlerdendir. Hedefe özgü taşıma sistemlerinde ilaç, antikor, protein ve enzim gibi maddeler MNP'lara entegre edilip dışarıdan manyetik alan uygulanarak organ, doku ya da tümöre yönlendirme yapılabilmektedir (Binh ve ark., 1998).

MNP'ların özellikleri parçacık boyutu ile yakından ilişkilidir, bu yüzden parçacıkların mümkün olduğunca eş boyutta olmalarına dikkat edilmelidir. MNP'ların uygulama alanlarının çoğunda manyetik özelliğinin yüksek olması ve partikül boyutunun 100 nm'den düşük olması istenmektedir.

2.2.1.a. Manyetik Nanoparçacıkların Yüzey Modifikasyonları

MNP'ların kandan istenilen bölgeye ulaşması için hem çökmelerinin hem de dağılmalarının önüne geçilmelidir bu yüzden yükü, boyutu ve kimyasal yüzeyi gerek kan döngüsünde gerekse de biyoyararlanımda hayati önem taşımaktadır (Gupta ve Wells, 2004). Yüzey enerjilerinin büyük olması ve manyetik etkileşimler nedeniyle bir araya gelme/topaklanma eğilimindedirler. Topaklanma gösterdiklerinde hidrofobik etkileşime girerek plazma proteinlerine absorbe edebilmekte ve opsonizasyan denilen bu olay sırasında opsonize edilmiş MNP'lar RES'in fagosit hücreleri ve makrofajları tarafından tanınmadığı için vücuttan atılmaktadır (Arruebo ve ark., 2007); bu yüzden hidrofilik bir polimer ile kaplama yapılması gerekmektedir. MNP'ler bu kaplayıcılarla veya uygun fonksiyonel gruplarla fonksiyonelleştirilerek biyolojik yapılara MNP'ların seçici bağlanmaları kolaylaştırabilmektedir (Campelj ve ark., 2009). Yüzeyi stabilizörlerle kaplanan MNP'lar aglere olmaktan korunmanın (Koo ve ark., 2005) yanı sıra biyo-uyumluluğu artırmak (Mcbain ve ark., 2008), korozyonu önlemek ve RES'den (Retiküloendotelyal sistem) kaçabilmek (Arruebo ve ark., 2007) gibi avantajlara sahiptir. MNP'ların fonksiyonelleştirilmesi için başlıca hidrofilik-hidrofobik etkileşimler, adsorbsiyon, kovalent bağ ve elektrostatik etkileşimler kullanılmaktadır (Barh ve ark., 2012).

Karbonhidratlar ve proteinler gibi doğal polimerler, polietilen-glikol/-imin, kitosan, polivinil alkol, dekstran gibi sentetik polimerler yüzey kaplayıcılar olarak kullanılmaktadır (Mcbain ve ark., 2008;Laurent ve ark., 2008; Dobson, 2006).

2.2.1.b.Polietilen-glikol (PEG)

PEG suda çözünebilen, nötr, hidrofilik yüzeye sahip, toksik olmayan, yüksek yüzey akışkanlığına sahip olan ve etilen oksit içeren protein dirençli bir polimerdir (Veiseh ve ark., 2010; Karakoti ve ark., 2011; Mukhopadhyay ve ark.,2012; Ahmed ve ark., 2010; Feng ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2002).

PEG-ilasyon, PEG'in başka bir molekülün ya da atomun yüzeyine yüzey adsorpsiyonu, kovalent bağ ya da hapsetme ile bağlanmasına denmektedir (Karakoti ve ark., 2011). PEG-lenmiş MNP, RES'den kaçabildiği için görüntüleme ve RES'in uygulama alanları açısından uygun değildirler (Veiseh ve ark., 2010). PEG'in manyetik nanoparçacığa sağladığı faydalar;

- Manyetik çekirdeği biyolojik çevreden ve korozyondan korur,
- Biyo-konjugasyon ve biyo-uyumluluk sağlar,
- MNP'ın aglere olmasını önler,
- Hidrofilikliğinin büyük olması sebebiyle yüzey yükünün korunmasını ve manyetik etkileşiminin azalmasını sağlar (Karakoti ve ark., 2011).

2.2.1.c. Peglenmiş demir-oksit nanoparçacıkları

PEG biyo-uyumlu bir kaplama aracı olduğu için hücre membranında çözünürlüğü yüksektir ve PEG-lenmiş SPION'larının yüksek konsantrasyonda dahi sitotoksisite göstermediği gözlemlenmiştir (Khanna ve ark., 2018).

Mukhopadhyay ve arkadaşları farklı molekül ağırlıklı PEG ile kaplanmış demir-oksit np'larını sentezlemişler ve PEG'in np üzerindeki koruyucu etkisinin üzerinde durmuşlardır; sentezledikleri np'ığın suda stabil ve yumuşak-orta derecede manyetizmaya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kaplanmamış np'lar sitokrom c ile etkileşerek protein azalmasına yol açarken PEG-lenmiş np'larda bu durum gözlemlenmediği için biyomedikal alanlarda kullanılma potansiyeli gözler önüne bu çalışma ile serilmiştir (Mukhopadhyay ve ark., 2012).

Gupta ve Wells, PEG-lenmiş SPION sentezleyip sitotoksisitelerini incelemişlerdir; bu sentezde 40-50 nm boyutuna sahip ve 45-50 emu/g manyetik doygunluğa sahip np elde etmişlerdir. PEG-lenmiş bu np'lar 1 mg/mL konsantrasyonunda bile sitotoksik etki

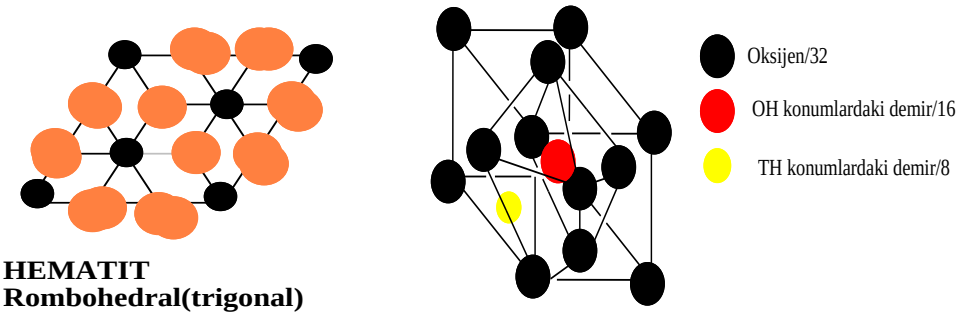
göstermemişken kaplama yapılmamış demir-oksit np'ı 250 µg/mL konsantrasyonunda yaklaşık %25-50 canlılık kaybına sebep olmuştur (Gupta ve Wells , 2004) (Rana ve ark., 2007).

PEG-lenmiş demir-oksit np'larını, yukarıda örnek verildiği gibi pek çok çalışmada avantajlarının çok olması sebebiyle tercih edilmektedir.

2.3. Manyetik Demir-Oksit Nanoparçacıkları

Demir-oksit doğada fazlaca bulunan ve laboratuvar ortamında kolayca sentezlenebilen bir bileşiktir. Demir-oksitler üretimi ucuz, kararlı ve biyo-uyumlu olması gibi avantajlara sahip olduğu için diğer malzemelere göre bir adım öndedir (Lu ve ark., 2007) ve bu gibi özellikleri sayesinde; manyetik rezonansla görüntüleme, hedefli ilaç taşıma, biyo ayırma, kanser, gen tedavisi, manyetik rezonans ile görüntüleme, manyetik ayırma teknolojileri ve manyetik hipertermi gibi sağlık alanlarında kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu için fazlaca ilgi görmektedir (Pandey ve Dahıya, 2016).

Bilinen sekiz tane demir oksit bileşiği vardır; bunlar arasından hematit (α-Fe_2O_3), manyetit(Fe_3O_4) ve maghemit(γ-Fe_2O_3) en çok demir oksit yapılarındandır. Manyetit, siyah-kahve renge sahip ferrimanyetik bir bileşik iken hematit ise volkanik faaliyetler sonucunda oluşmuş genelde ilgi duyulan kaplıca sularında bulunan kırmızı-kahve bir renge sahip antiferromanyetik bir demir-oksit yapısındadır. Maghemit ise manyetitin oksidasyona uğraması sonucu oluşan ferrimanyetik bir bileşiktir. Manyetit, yüzey merkezli kübik bir yapıya sahip, ½ oranında Fe^{2+} / Fe^{3+} atomlarını ve 32 tane O^{2-} anyonunu içeren bir bileşiktir. Tetrahedral alanlar Fe^{2+}-Fe^{3+}iyonlarını içerirken oktahedral alanlar Fe^{3+}iyonlarını içermektedir, manyetit iki ve üç değerlikli demir iyonlarını taşıması bakımından diğer demir oksitlerden ayrılmaktadır (Cornell ve ark., 2003; Gossuin ve ark., 2009; Schwertmann, 1991).



Şekil 2.1. Hematit ve maghemit-manyetit yapısı

Fe^{2+} iyonu, Co ve Mn gibi +2 değerliğe sahip iyonlarla yer değiştirirse Fe_3O_4 bileşiği hem p hem de n tipi yarı iletken olabilmektedir (Wu ve ark., 2015). α-Fe_2O_3'in doygunluk manyetizma değeri(MS) 1 emu/g'dan küçüktür ve bu yüzden zayıf bir ferromanyetizma göstermektedir ama ɣ-Fe_2O_3 ve Fe_3O_4'in MS değerleri 92 emu/g'a kadar çıkabilmektedir (Yamaura ve ark., 2004).

Demir-oksit np'ları çeşitli yöntemlerle sentezlenmektedir; birlikte çöktürme yöntemi ile hem oda koşullarında hem de yüksek sıcaklıklarda demir-oksit sentezi yapılırken (Thoidingjam ve Tiku, 2017) mikro-emülsiyon yönteminde ise bir yağ fazında dağılan su damlacıklarının nano-alanlarda çöktürülmesiyle elde edilebilmekte ve elektrokimyasal sentezde ise demir anot olarak kullanılıp elektrolitte demir-oksit np'ı çöktürülerek hazırlanabilmektedir. Ultrason, lazer piroliz gibi yöntemlerle ve çeşitli biyolojik organizmalardan ve bitkilerdeki mikroorganizmalara kadar birçok kaynaktan MNP elde etmek mümkündür (Wu ve ark., 2008; Li ve ark., 2011). Bu gibi çeşitli yöntemlerle sentezlenebilen IONP'lerin(demir-oksit nanoparçacıkları) yüzey enerjilerinin büyük olmasının yanında çok küçük boyuta sahip oldukları için çok kararsızlardır ve bu yüzden bir araya toplanma eğilimi göstermektedir. Toplanma eğilimlerini önlemek için polietilen-glikol (PEG), polivinil-pirolidin (PVP), polivinil alkol (PVA), polimetil metakrilat, poliakrilik-asit, polistiren, selüloz, dekstran, silika ve jelatin gibi çeşitli inorganik, organik ve doğal kaplayıcılar ile kaplanarak stabilitesi sağlanabilmektedir(Wu ve ark.,2008; Xu ve ark., 2014).

Kommareddi ve arkadaşları p-etilen fenol polimeri kullanarak (Kommareddi ve ark., 1996), Burke ve arkadaşları yine benzer şekilde termal ayrıştırma yöntemiyle SPION(süperparamanyetik-demir oksit nanoparçacık) sentezlemişlerdir (Burke ve ark., 2002). Hidrofilik oleik asit(OA) yüklü doxorubicin ve pluronik ile kaplanmış demir oksit np'ları, Jain ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, ilacın bağlanmadığı np ve ilacın bağlandığı np kanser hücre hattında 01- 100µg/mL konsantrasyon aralığında doza bağlı herhangi bir toksisite göstermemiştir (Jain, 2005). Bunlar gibi birçok çalışmada farklı metotlar ile demir-oksit sentezlenmiştir.

Manyetik parçacığa kaplama yapmak onun dış etkenlerden korunmasını sağlamakta ve ayrıca karboksil grupları ya da biyotin gibi kaplayıcılar ortama eklenerek işlevsellik kazandırılmaktadır (Koneracka ve ark., 1999; Mehta ve ark.,1997; Koneracka ve ark., 2002).

SPION'larda manyetik hedefleme, manyetik alan gradyanın uyguladığı kuvvetten kaynaklanmaktadır. Terapideki etkinlik; alan kuvveti, gradyan, parçacıkların hacmi ve manyetizması gibi faktörlere bağlıdır. Taşıyıcı sistemlerde genellikle Neodymium/Nd-Fe-B gibi güçlü bir mıknatıs kullanılarak manyetik alan gradyanı oluşturulmaktadır. Biyo-uyumlu ve sıvı formdaki manyetik taşıyıcı kompleksi, hastaya enjekte edildiğinde ve manyetik kuvvetler arterlerde-kılcal damarlardaki kan akış hızını aştığında bu manyetik parçacıklar dışarıdan uygulanan, gradyanları yüksek olan manyetik alanlarca hedef bölgede tutunabilmektedir. İlaç taşıyıcı sistem bu bölgede konsantre edildikten sonra pH, enzimatik aktive ve sıcaklık gibi fizyolojik şartlardaki değişikliklere bağlı olarak salım yapabilmekte ve hedef dokunun endotel hücrelerince ya da tümör hücrelerince alınabilmektedir (Alexiou ve ark., 2000; Widder ve ark., 1978).

SPION'lar genel olarak, MRI kontrast geliştirilmesi(Cunningham ve ark., 2005; Anderson ve ark., 2000), terapötik ajanların hedeflenen dokuya özgü salımları (Polyak ve ark.,2009) ve hipertemi gibi biyo-medikal alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Jalilian, 2009). SPION'lar, Gadolinyum bazlı kontrast maddelere göre gevşeme değerlerinin yüksek olması ve daha yavaş renal klirense sahip olması açısından daha caziptir (Talelli ve ark., 2009). SPION'ların dışarıdan uygulanan manyetik alan

varlığında hedefleme yapılırken parçacıkların biyolojik dağılımları izlenebilmektedir (Shubayev, 2009).

2.3.1. SPION'ların Kolloidal Özellikleri

SPION'ların stabilitesi hidro-fobik/-filik, manyetizma ve Wan der Waals kuvvetlerine bağlıdır. Küçük boyutlu parçacıkların yüzey/hacim oranının büyük olması sonucu aralarında hidrofobik etkileşimler olmakta ve bunun sonucu olarak mikron boyutta kümeleşme eğilimine girmektedirler. Mikron boyuttaki bu kümeleşmeler manyetik dipol-dipol etkileşimler sonucu artmakta ve dışarıdan uygulanan manyetik alan varlığında ise bu kümeleşme artış eğilimi daha çok şiddetlenmektedir (Hamley, 2003). Boyutu nm olan parçacıklar yüzey enerjilerini azaltmak için Wan der Waals kuvvetleri tarafından süspansiyon halinde toplanmakta ve topaklanma sonucu oluşan düşük yüzey alanı ve artmış boyut ilaç taşıyıcı sistemlerdeki verimi engelleyebilmektedir (Mahmodi ve ark., 2011).

2.3.2. Nanoparçacıklarda Manyetik Özellikler

Manyetik momentler sıcaklığa bağlı olarak hizalanmakta ve sıcaklık artıkça düzensizlik başlamakta, kritik bir sıcaklıktan (Curie Sıcaklığı; Tc) sonra ise kristalin manyetizması sıfır olmaktadır. Oda koşullarında 20 nm'nin altında olan olan parçacıklar süperparamanyetik özellik göstermektedirler ve bu parçacıkların manyetik özellikleri sentezleme yöntemi ve kristal yapısı ile yakından ilişkilendirmektedir (Fu, 2012; Margulies ve ark., 1996; Margulies ve ark., 1997).

Ferromanyetik maddeler, manyetik alan varlığında çok fazla mıknatıslanmakta ve manyetik alan ortadan kaldırıldığında mıknatıslanma özelliğini kaybetmeyip kalıcı bir manyetizma gösterebilmektedirler. Ferromanyetik maddeler dışarıdan uygulanan bir manyetik alan olsa da olmasa da manyetik momentleri düzgün ve birbirlerine paralel olacak şekilde sıralanmıştır. Ferrimanyetik maddelerde manyetik momentler paralel bir dizilim göstermemesinin yanında eş büyüklükte değildir. Ancak momentler paralel olmayıp eş büyüklükteler ise bunlara da anti-ferromanyetik denmektedir (Bayrak, 2002).

Curie sıcaklığı (850 K) manyetitin kritik sıcaklık değeridir. Partiküllerin sentezlenme yöntemi (Fu, 2012) ve kristal yapısı onların manyetik özelliğini etkilemektedir(Margulies ve ark.,1996).

2.3.2.a. Süperparamanyetik Davranış

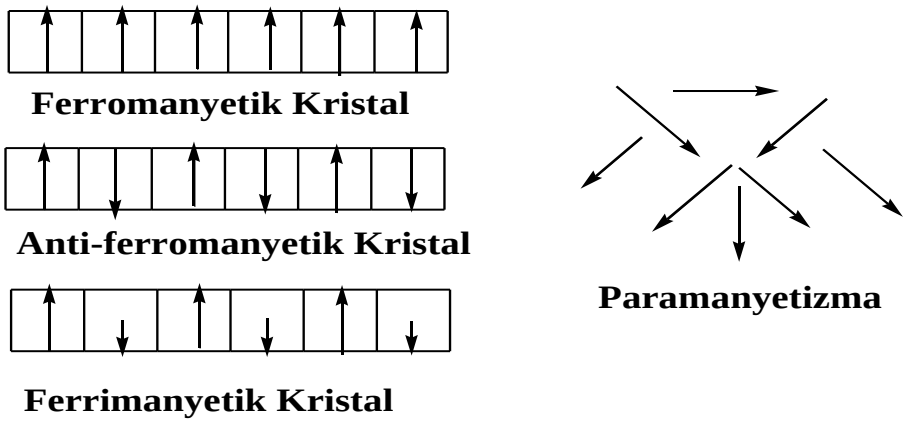
Süperparamanyetizma, MNP'ın boyutunun limitli olmasından kaynaklanmaktadır (Gubbala ve ark., 2004). Ferro-manyetik maddelerdeki atomlar arasında bulunan kuantum mekanik etkileşim sayesinde atomik manyetik momentleri paralel olarak sıralanmıştır ve bu sıralanmanın enerji sebebiyle boyut aralığı sınırlıdır. Tanecik boyutundan daha küçük olan bu aralıklara manyetik alanlar denmekte ve bu alanlar Bloch duvarları ile ayrılmakta, Bloch duvarı hareket ettiğinde mıknatıslanmanın yönü değişmektedir (Khanna ve ark., 2018). Büyük MNP'lar manyetik alanda Bloch duvarları ile bölünmüş olduğundan yani boyutları enerji kontrolüne bağlı olduğundan, zorlayıcılık ve kalıcılık gibi faktörler parçacık boyutundan önemli miktarda bağımsızdır, parçacık boyutu azaldığında ise düzgün bir şekilde sıralanma göstermezler; kritik çaptan küçük olan parçacıklar tek bir manyetik alan oluşturmakta, Bloch duvarları sayesinde mıknatıslanma değişimi kolaylaştığı için zorlayıcılık-kalıcılık artar ve boyut iyice küçüldüğünde yani süperparamanyetik çapın altında zorlayıcılık-kalıcılık sıfıra yaklaşmaktadır (Mody ve ark., 2013, (1)).

MNP'larda, süperparamanyetizma $kT \geq KV$ durumundan kaynaklanmaktadır(k: Boltzmann sabiti, T: sıcaklık, K: manyetik anizotropi sabiti, V: hacim, KV: manyetik anizotropi enerjisi, kT: termal enerji). Ferromanyetik ya da ferrimanyetik kristalleri manyetik alanın yönüne göre mıknatıslanmaktadır. Bu mıknatıslanma sonucu 'kolay/sert' yönler oluşmaktadır. Süperparamanyetik maddelerin manyetizma vektörü kolay manyetizma yönleri arasında düzensizce hareket ederek sert yönlenenleri aşabilmektedir. Kolay eksendeki manyetik momentte bulunan iki kararlı yönelim E=Kv yüksekliğindeki enerji bariyeri ile birbirlerinden ayrılmakta, eğer $Kv>>kT$ olursa kalıcı mıknatıslanma olmakta ve manyetik moment kendiliğinden değişememektedir. $Kv\sim kT$ ise ya da daha düşükse zamanla süperparamanyetizma yüzünden kendiliğinden geçiş meydana gelebilmektedir. Elektronun dönüş ve yörüngesinin açısal momentumu

arasındaki bağlantı/LS bağlantısı manyetik kristalin anizotropisinden sorumludur (Misra ve ark., 2004; Zheng ve ark., 2005).

Termal olarak uyarılan dalgalanmalar ile (f) frekansı arasındaki süre, Neel Gevşeme süresine eşittir ($\tau = (2\pi f)^{-1}$). Manyetik alan ortamdan kaldırıldığında Neel Gevşeme süresi np'ın manyetizmasının ölçülmesinden çok daha kısadır ve manyetizma süperparamanyetik durumda olduğu gibi sıfırdır. Manyetik alan np'ı paramanyetik duruma benzer şekilde vektörel yönlendirme yapmasına rağmen kararlı bir manyetizmaya ve daha yüksek manyetik duyarlılığa sahiptir. Genellikle ferromanyetik-ferrimanyetik maddeler Curie Sıcaklığı'nın üzerinde paramanyetik hale gelmekte iken süperparamanyetiklerde ise bu sıcaklığın altında paramanyetik durumuna gelmektedir (Khanna ve ark., 2018).

Süperparamanyetik np'ların iki kararlı konfigürasyonu arasındaki enerji farkı çok küçük olduğu için kalıcı mıknatıslanma göstermemekte ve bu enerji farkının az olması sebebiyle termal enerji tarafından manyetizma ortadan kalkmaktadır. Termal değişimler, doygun olan bir maddeyi demanyetizma edecek kadar güçlüdür ve süperparamanyetizma, manyetik kare değerinden daha düşüktür (M_R/M_S:1, M_R: Kalıcı mıknatıslanma ve M_S: Manyetik doygunluk). Süperparamanyetik parçacıkların birbirleriyle etkileşime girmemesi durumunda bu oran 0.5'dir (Franco ve ark., 2005). Süperparamanyetik parçacıkların etkileşime girmesi durumunda manyetik kare-M_R/M_S (0.1) ve zorlayıcılık-H_C değerleri dipolar etkileşim yüzünden azalmaktadır (Schulz ve ark., 2009). Manyetik kare değeri manyetik alanın ortadan kaldırılmasıyla manyetikliğinin büyük bir kısmını kaybetmektedir/ değeri 0.5' den 0.1'e düşmektedir. Biyomedikal alanlarda manyetik alan uygulandığında manyetik hale gelen ama manyetik alan ortadan kaldırıldığında manyetikliğini yitiren bu np'ların kullanılması idealdir. Np'ları istenilen süre boyunca hedeflenen bölgeye çekmek ve o bölgede kalmasını sağlamak için lokal bir manyetik alan gradyanı kullanılmaktadır (Arruebo ve ark., 2007; Rana ve ark., 2010).



Şekil 2.2. Manyetik moment yönlenmeleri

2.4. Nanoparçacıklar ve klinik

Terapötik nanoparçacıkları, inorganik ve organik np lar olarak ikiye ayırmak mümkündür. İnorganik np'lara; silika, altın, ve demiroksit gibi np'ları örnek gösterebilirken organik np'lara ise lipozamlar, polimerik ve mişelleri örnek vermek mümkündür. İnorganik np'lar klinik öncesi çalışmalarda başarıya ulaştığı için ve klinik çalışmalarının geliştirilmesinde de kullanılmıştır; intra-operatif sentiel lenf nodu görüntüleme, tümörlerin termal ablasyonu ve kansızlık tedavileri gibi alanlarda kullanımları onaylanmıştır (Saint ve ark., 2015; McCarthy ve Weissleder, 2008). Organik np'lar ise hemostas, uzun süreli taşıma sistemlerde depolama ve deride sistemik taşıma boyunca ajan olarak kullanılabilmektedir. İntravenöz taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan organik np'lar gen terapisi veya kanser tedavisinde kullanılan düşük molekül ağırlıklı np'lardır (Petros ve DeSimone, 2010; Peer D ve ark., 2007). Organik np'lar kontrollü salım, daha uzun süre dolaşım sisteminde kalması ve hastalıklı dokulara hedefleme yapılabilmeleri açısından tasarlanabilir olması onları, normal ilaçlardan farklı kılmaktadır (Peer ve ark., 2007; Wang ve ark., 2012). İnorganik np'lar ise termal ısıtmalı veya manyetik resonansla görüntülemede ya da bireye özgü ilaçlar sahalarında birçok fayda sağlamaktadır (Torchilin, 2014; Mura ve ark., 2013).

Nano-parçacıklar kanseri tedavi etmede büyük bir önem kazanmasının sebebi boyutlarının küçük olması sayesinde optik, fotokimyasal ve manyetik özellikler gibi bir takım özelliklerde değişmeye sebep olduğu için büyük ölçüde popülerlik kazanmıştır (Krolikowska ve ark., 2003; Kumar ve Yadav, 2009).

Klinik olarak kullanılması onaylanmış birçok np, çeşitli kanser türlerinde ve kanser evrelerinde tedavi amaçlı kullanılmıştır. Polietilen glikol-Doxil, FDA tarafında 1995'te onaylanan ve kanser tedavisinde kullanılan ilk nano-tıp materyali olduğu için önem teşkil etmektedir (Barenholz, 2012). Daha sonra ise bu alanda kullanımı kabul gören, lipozomal formülasyona sahip lipozomal-doxorubicin/DaunoXome(Fox, 1995),-vincristine/Marqibo (Silverman ve Deitcher, 2013)-irinotecan/Onivyde (Carnevale ve Ko, 2016) gibi birçoğu FDA tarafından onaylanmışken non-PEG-lipozomal doxorubicin/Myocet (Leonard ve ark., 2009) ve lipozomal mifamurtide/Mepact ise EMA tarafından onaylanmıştır (Ando ve ark., 2011).

Nanoparçacıkların sağlıkta kullanıldığı bir diğer alan ise anemide demir replasman tedavisidir (Macdougall, 2009; Danielson, 2004) ve bu tedavide demir-oksit kolloidleri kullanılarak vücutta demir konsantrasyonu artırılmaktadır (Coyne ve ark., 2010).

Demir-oksit np'larının kullanıldığı bir diğer alan ise kontrast ajan olarak kullanması onaylanmış MRI (Manyetik Rezonansla Görüntüleme)' dir (Gupta AK ve Gupta M., 2005; Wang ve ark., 2001). Görüntülemede kanser ve patoloji türlerini demir oksit np'larının manyetik alandaki davranışı göz önüne alınarak tespit edilebilmektedir (Na ve ark., 2009; Laurent ve ark., 2008). Bunun yanı sıra MRI kontrast ajanlar intravenöz ultrasonu güçlendirmek amacıyla da kullanılabilmekte ve bunun için mikron boyuttaki mikro-kabarcıklar tercih edilmektedir (Schutt ve ark., 2003; Klibanov, 2006). Mikro-kabarcıklar kapsüllenmemiş kanda hızlı çözünen hava kabarcıklarını stabilize ederek kontrası artırabilmektedir. Bu ürünlerden çok azı onaylanmıştır; Definity, SonoVue ve Optison bu alanda onaylanmış ultrason kontrast ajanlardandır (Schutt ve ark., 2003).

Nanopartiküllerin ya da lipozomların birçok klinik uygulaması vardır; ilk olarak Diprivan 1989 yılında FDA tarafından genel anestezik olarak onaylanmış (Cummings ve ark., 1984) iken influenza için Inflexal V aşısı (Herzog ve ark., 2009) ve Hepatit A'ya karşı ise Epaxal aşısı Avrupanın birçok ülkesinde onaylanmış lipozomal

sistemlerdeki aşılardır ancak bu aşıların klinik uygulamaları kaldırılmıştır (Bovier, 2008).

Lipozomlar ve lipit bazlı nano-formülasyonlar parazit ve mantar tedavilerinde klinik olarak onaylanmıştır; mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için toksisitesi çok yüksek olan amfo-terisin B'nin, lipozomal formülasyonu yapılıp AmBisome adı verilmiştir (Boswell ve ark., 1998).

Kanser tedavisinde kullanılan nano-ilaçlar yirmi yıldan daha fazla bir süredir, FDA tarafından onaylandığı için kliniksel çalışmaları çok sayıdadır, örneğin Abraxane ve Doxil yüzün üzerinde kliniksel çalışmaya konu olur iken bunun yanı sıra Onivyde, Marqibo ve MEPACT gibi ürünlerde kanser çeşidi ve terapötik ajanlarla tedavi gibi sahalarda birçok çalışmaya konu olmuştur (Anselmo ve Mitragotri, 2016).

Demir-oksit np'ları kristal yapılarına ve oksidasyona durumlarına göre adlandırılmaktadırlar; manyetit-Fe_3O_4, maghemit-ɣ-Fe_2O_3 ve hematit-α-Fe_2O_3. Bu yapılar arasında yer alan ve FDA tarafından onaylanmış, glioblastoma tedavisinde lokal doku hipertermi olarak kullanılan demir-oksit np'ı(Nanotherm ^{TM})yüksek biyo-uyumluluk ve terapötik etki göstermiştir (Bobo ve ark., 2016; Jaganjac ve ark., 2020). Kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin yanında tedavi gücünü artırma ve yan-etkilerin azaltması açısından tümöre özgü hedefleme sistemlerinin geliştirilmesi, tümöre özgü np kullanılması, tümörlü bölgede birikmeyi artırması yani EPR etkisi(tutma ve geçirgenliğin artırılması) gelecek vaad eden bir husustur (Steichen ve ark., 2014; Kalyane ve ark., 2019).

Polimerik ve misel formülasyonlar da kemoterapötik tedavilerde araştırmalara konu olmuştur, paklitaksel ve dosetaksel miseli bu araştırmalara örnek verilebilmektedir. Toksisitesi yüksek olan serbest haldeki anti-kanser ilaçlarının np'ın biyolojik dağılımdaki kontrolünden yararlanarak zararlı etkilerin giderilmesi hedeflenmektedir. Toksisitesi çok yüksek olan kamptotesinin siklodekstrin bazlı np'lar (CRLX101) ile dağılımı kontrol edildiğinde klinik öncesi çalışmalarda tolere edilebilirliği yüksek çıkmış (Weiss ve ark., 2013) ve tümör %74 oranında azalma gösterdiği için bu çalıma büyük bir ilgi görmüştür (Pham ve ark., 2015). Aynı şekilde NC-6004 nanoplatin

(Plummer ve ark., 2011) ve LiPlaCis (de Jonge ve ark., 2010) ise platinyum ile kapsüle edilmiş çok başarılı ve onaylanmış ilaç formlarıdır (Kelland ve ark., 2007).

Altın ya da demir-oksit gibi inorganik nanoparçacıkları termal ısıtma ve manyetik kontrol amaçlı kullanılabilmektedir. AuroLase, tümörleri ışığı absorbe edip termal olarak tümörleri yok etmek için tasarlanmış bu altın np akciğer tümörü üzerinde denenmiş güncel bir yöntemdir. Klinik öncesi testlere göre AuroLase hedef bölgeye dışarıdan uygulandığında yan etkileri önemli ölçüde azaltma olasılığına (Day ve ark., 2012; Hirsch ve ark., 2003) ve mükemmel tolerebilirliğe sahiptir (Stem ve ark., 2016). Demir-oksit np'ı olan Magnablate için ise yine benzer bir yöntemle termal ablasyon yerine manyetik alan kullanılarak np'lar uyarılmaktadır. Nanobiotix'in geliştirdiği Hafnium-oksit np'ları (NBTXR3) dışarıdan radyasyon verildiğinde o bölgede elektron salımı yaparak hücre ölümünü gerçekleştirmektedir. Klinik öncesi çalışmalarda hayvan deneylerinde NBTXR3, standart radyon tedavilerine benzer bir anti-tümör etkinliği göstermiştir (Maggiorella ve ark., 2012).

Organik bileşiklerden tasarlanan ThermoDox ise lipozomal doxorubicin'in sıcaklığa duyarlı olması sayesinde yüksek sıcaklığa, yaklaşık 42^0 C gibi, maruz kaldığı zaman doxorubicin salımını yapmaktadır. Klinik çalışmalarda, meme kanseri hastalarında ThermaDox yüksek tolerebilirliğe'e sahiptir (Zagar ve ark., 2014). Klinik olarak incelenen diğer iki parçacık ise LiPlaCis ve RadProTect'dir (Larsen ve ark., 2006; Kaiser ve ark., 1990).

Onaylanmış ya da hala araştırılan birçok np'ın çoğuna PEG'leme yapılmıştır (Moghimi ve ark., 2001; Gref ve ark., 1994). PEG'leme yapılan np'lar daha uzun süre sirküle edilebilmekte ve hedef bölgelere girme olasılığını artırabilmektedirler (Maeda, 2012; Fang ve ark., 2011; Torchilin, 2011). Aynı şekilde demir-oksit np'larının dextran gibi hidrofilik şeker ile kaplama yapılması da klinik olarak onaylanmış iken bir diğer örnek ise abraxane'dır. Abraxane'da ise biyolojik proteinlerle kaplama yapılması durumunda yani insan serumundaki albüminin sayesinde bağışıklık sistemini aşabilmekte ve daha uzun süre dolaşım sisteminde kalabilmektedirler (Kratz ve Elsadek, 2012).

Nano-parçacıkların biyo-dağılımının kontrol edilebilmesi, hedef bölgeye giden yoldaki engelleri kaldırmaktadır; klinik onaylı nano-ilaçlar, EPR etkisi ile tümör bölgesinde

parçacıkları biriktirenler ve lipozomal sistemleri içeren ilaçlardır. PEG-lenmiş parçacıklar dolaşımda uzun süre kalabilmesi, özellikle dokulardaki difüzyonu (Mastorakos ve ark., 2016) ve biyolojik bariyeri aşabilmesi (Tang ve ark., 2009; Suk ve ark., 2016) açısından büyük bir önem arz etmektedir.

MNP hazırlanma aşamasında PEG-ilasyon kanda uzun süre sirküle edilebilmesi (Xue ve ark., 2018), hücresel alımı kolaylaştırması (Pelaz, 2015) ve protein tanıması sağlaması açısından biyolojik etkileşimlerde çok önemlidir.

Biyo-medikal alanlarda kullanılan SPION'ların suda pH'ı nötrde ve fizyolojik tuzlulukta stabil olması gerekmekte, bu stabilitenin sağlanması için parçacıkların çökelmeyi önleyecek kadar küçük boyutta olması ve biyolojik sisteme girdiklerinde büyük kümeleşmelerin olmaması ve yapısının değişmemesi için uygun biyo-uyumlu bir polimerle kaplanması gerekmektedir (Tartaj ve Serna, 2003).

MNP'ların biyo-uyumluluğu ve toksisitesi demir, kobalt, nikel... gibi manyetik bileşenine, partikül içindeki çekirdeğin son boyutuna ve kabuğuna bağlıdır. Kandaki hareketlerinin manyetik alanla kontrol edilmesi ve hedeflenen dokuya yakın bir yere ulaşıp sabit kalması için manyetizmalarının güçlü olması gerekmektedir (Tartaj ve Serna, 2003). Ancak kobalt ve Nikel gibi güçlü manyetizmaya sahip malzemeler, hem toksik hem de oksidasyona karşı duyarlıdır ki bu yüzden çok rağbet görmemektedirler (Mahmodi ve ark., 2011).

2.4.1. Kanser ve Nanoteknoloji İlişkisi

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmeleri sonucunda hücre sayısında anormal bir çoğalma görülmesiyle meydana gelen ve dünyanın büyük bir kısmını etkisi altına alan bir hastalıktır (Nayak ve Pal, 2010). Çevre ve gen yapısı kanser üzerine etkili etmenlerdir; genlerden ziyade bireylerin yaşadıkları çevrenin kanser üzerine etkisinin daha büyük olduğu bir takım araştırmalara konu olmuştur. Kanserin erken evrelerde teşhis edilmesi tedavi açısından büyük bir avantaj sağlamakta ve bu sayede kanserin gelişmesi aşaması durdurulabilmektedir (Auyang, 2006). Klasik yöntemler ile (X_Ray veya CT taramalar gibi) organlardaki büyümeler ve değişimler saptanabilmekte ancak bu süreç uzun sürebilmektedir; çünkü kanseri bu yöntemlerle tespit edebilmek için

binlerce kanser hücresinin oluşması gerekmektedir. Nanoteknoloji sayesinde az miktarda kanser hücresi oluşmuşsa bile erken dönemde teşhis edebilmek mümkündür. Nanoparçacıklar tek bir tümör hücresine girebilmekte ve bu sayede kanserli hücrelere daha kolay tespit edilebilmektedir (Singh KK, 2005).

Dünya genelinde akciğer kanseri, erkeklerde en çok görülen kanser çeşidiyken kadınlarda meme ve kolorektal kanserinden sonra gelen kanser çeşididir. 2012'de yaklaşık olarak 1.8 milyon kişiye akciğer kanseri teşhisi konulmuştur ve bu rakam dünyadaki kanser oranını %12,9'una tekabül etmekte ve yine bu yılda ölüme sebebiyet veren kanser türleri arasında 1.59 milyon sayısına ulaşarak kanserden ölen toplam kişi sayısının %19.4'ünü oluşturmaktadır (Ferlay ve ark., 2013).

Hipertermi, vücutta enfeksiyon olması sebebi ile vücut ısısının artması olarakta tanımlanabilmektedir. Isının kanseri tedavi etmesi 19.yy'dan beri bilinen bir durumdur, o zamanlarda canlı bakteriler kanserli hastalara verilmiş ve az da olsa işe yaradığı gözlemlenmiştir. Kanserli hücrelerin yüksek ısıya daha duyarlı olduğu tespit edilmiş ve hücrelere sıcaklık uygulanarak kanser tedavi edilmeye çalışılmış ancak bu sıcaklık kanserli bölgenin etrafındaki doku ve organlara zarar vermiştir. Bu zararı önlemek amacı ile manyetik sıvı hipertermi kullanılmıştır. Bu noktada MNP kullanılarak istenilen bu sıcaklığın sadece kanserli bölgeye etki etmesi sağlanmış ve sağlıklı dokular hasar görmemiştir (Hervault ve Thanh, 2014).

Kanseri tedavi etmek için kullanılan radyoterapi, cerrahi ve kemoterapi gibi klasik yöntemler sağlıklı hücrelere de önemli ölçüde zarar vermektedir. Cerrahi yöntem ile kanserli bölge vücuttan çıkarılır ancak tüm kanser çeşitlerine uygulanamadığı ve kanserin tekrarlanması durumunu ortadan kaldıramadığı için çok da avantajlı bir yöntem değildir. Radyoterapide, kanserli bölgeler yakılarak tedavi edilmekte ve bu yöntem ile kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerde radyasyona maruz kalarak zarar görebilmekte ve kanserli hücrelere eşit bir şekilde radyasyon verilememe gibi dezavantajı durumlar oluşmaktadır. Kemoterapide ise kanserli bölgeleri tedavi etmek için yüksek toksisiteye sahip ilaçlar verilmekte (Nehru ve Singh, 2008) ve bu ilaçlar kanserli bölgeyi iyileştirebilecek dozda olmaz ise tedavi etmesi imkansız hale

gelebilmekte ve bu doz vücudun diğer sağlıklı doku ve organlarına büyük hasar verme potansiyeline sahip olabilmektedir.

İlaç salımında, aktif veya pasif olarak hedeflendirme yapmak mümkündür. Pasif hedeflemede terapötik maddenin nanoparçacık içine yerleştirilip pasif olarak hedef organa taşınması amaçlanırken aktif hedeflemede ise ligand kullanılarak tümörlü dokuya nanoparçacığın ulaşması amaçlanmaktadır. Bu sayede kemoterapi ve dozaj aşımı gibi sorunların önüne geçilebilmektedir (Varshosaz ve Farzan, 2015).

Nano-Cantilever (NCL), nanoshell, quantum dot, nanowire ve dendrimer kanser teşhisinde ve tedavisinde kullanılan nanoteknolojik araçlardandır; Nano-cantilever yarı iletken malzemelerden oluşur, yüzeyine yapısı değişmiş DNA proteinleri ile birleşme sağlayacak moleküller yerleştirilebilmektedir. Eğer ortamda birleşebileceği bir protein olursa mekanik gerilmeden dolayı yapısında bir eğilme meydana gelmekte ve bu eğilme sayesinde kanserin ilk evrelerinde oluşan biomarkerlar algınarak kanser ilk oluşmaya başladığı zamanlarda teşhis edilebilmektedir. Bu eğilme lazer ışığı yardımıyla gözlemlenip eğilme sonucu oluşan fiziksel özelliklerdeki değişimler algılanabilmektedir. Nanoshell (NS), merkezi silisyum çekirdekten oluşan ve üzeri altın tabaka ile kaplı olan kanser teşhisinde ve tedavisinde kullanılmak için geliştirilmiş bir nanoyapıdır. NS' lerin yüzeyine etki edeceği yapıya göre ilgili antikor veya anti-kanser ilaç yerleştirilip kanserli bölgeye yönlendirilebilmektedir. Yakın kızılötesi ışığa maruz bırakılan NS kanserli hücrelere etki ederek sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek boyutta ısı yaymaktadır (Singh, 2008). Quantum dot, yarı iletken metaryellerden yapılan boyutu 2-10 nm çapında olan nanoteknolojik bir malzemedir ve kanser tanısı ve tedavisinde floresan probları olarak kullanılmaktadır (Nayak ve Pal, 2010). QD'lar beyaz ışığı absorblayarak parçacıkların farklı renkte ışık yaymasını sağlamakta ayrıca boyutları değiştirilerek de farklı dalga boylarında floresan ışık yayması sağlanabilmektedir (Kim ve ark., 2007). Nonowire (NW), polimer, metal ve yarı iletken yapılarda oluşturulma imkanına sahip olan bir yapıdır. Silikon NW'lar biyouyumluluğu çok yüksek bir maddedir ve bu yüzden hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Tümör biomarkerlarının hassas bir şekilde algılanmasında kullanılma potansiyeline sahiptir (Kim ve ark., 2007;Choi ve ark., 2010). NW'ler ile binlerce sensörden oluşan ve birçok biomarkerı

(biyo-belirteç) aynı anda tespit edebilme yeteneğine sahip bir çip yapılabilmektedir. Dendrimer, hedefli ilaç taşıma için geliştirilen bir nano yapıdır ve dendrimerlerin yüzeyine uygun maddeler yerleştirilerek kanserli hücreler ile birleştirilebilmektedir (Nayak ve Pal, 2010).

2.4.2.Terapötik taşıyıcılar

IONP'ler; Dox, TMX, gallik asit, kersetin ve rodyum(II)-sitrat gibi kemoterapik ilaç olarak ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılmakta ve bu taşıyıcı sistemler ilaca kıyasla kanser hücrelerini öldürmede ve IONP-ilaç kompleksini, kanser hücresi içerisine almada çok daha etkilidir, bu sayede yan etkiler ve ilaç dozu azaltılabilmektedir. IONP'lerin taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesinin avantajları arasında mıknatıs kullanılarak harici olarak istenen dokulara yönlendirme yapılabilmesi, yüzeyindeki ligandlar sayesinde aktif hedefleme yapılabilmesi ya da tümöre daha uzun süre etki edebilmesi(alıkonma süresini artırabilmesi) ve geçirgenlik etkisi (EPR) sayılabilmektedir (Thoidingjam ve Tiku, 2017).

2.4.2.a. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde SPION'lar

İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan SPION'lar; nanoparçacık, nanoküre, mikroküre ve lipozomlardan oluşmaktadır. Böyle sistemlerde ilaç SPION'ların yüzeyine bağlanıp manyetik lipozomlar ve mikro-küreler içinde kapsüllenmektedir. Daha spesifik SPION ilaç taşıyıcı sistemleri; DNA moleküllerini, kemoterapötik ve hipertermik ilaçları taşımak üzere tasarlanmışken son sistemler anti-enfektif/-inflamatuar/-artritik, fotodinamik terapi ve kök hücre farklılaştırma-izleme üzerine yoğunlaşmıştır (Neuberger ve ark., 2005).

2.5. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Sentezlenme Yöntemleri

1. Birlikte Çöktürme
2. Hidrotermal
3. Termal Ayrıştırma
4. Aerosol/Buhar(Piroliz Yöntemi)
5. Sol-Jel Yöntemi
6. Gaz depozisyon yöntemi

7. Mikro emülsiyon yöntemi
8. Poliol Sentezi

Bu yöntemlerden bazıları aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır:

2.5.1. Birlikte Çöktürme Yöntemi

Demir-oksit np'larının sentezi ve manyetik özellikleri hakkındaki detaylı araştırmalar 1970'lerde yayımlanmıştır (Tari ve ark., 1979; Kaiser ve Miskolcz, 1970). Sugimoto ve arkadaşlarının yayımlamış olduğu yöntemde küresel MNP'lar, KNO_3 ve KOH ortamında birlikte çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır (Sugimoto ve Matijevic, 1980). Bir başka çalışmalarında ise sol-jel yöntemiyle manyetit, hematit ve maghemit'in boyutunu, şeklini ve yapısını analiz etmişlerdir (Itoh ve ark., 2003). Bu yöntem Fe_3O_4 ve ɣ- Fe_2O_3 elde etmenin en geleneksel yöntemidir ve bu yöntemde Fe^{2+}/Fe^{3+} iyonları oda koşullarında ya da yüksek sıcaklıklarda ve bazik bir ortamda gerçekleşmektedir. Demir-oksit np'larının boyutu ve şekli Fe^{2+}/Fe^{3+} iyonlarının oranına, rxn sıcaklığına, kullanılan tuzun türüne, pH değeri ve karıştırma hızı gibi parametrelere bağlıdır (Wu ve ark., 2007).

Nano yapıdaki malzemelerde bulunan doygunluk mıknatıslanma değeri (M_s) genellikle iyonik yapıda bir değişiklik olmadığı sürece toplu fazdan daha düşüktür (Binh ve ark., 1998). Manyetik demir-oksit'in M_s değeri deneysel verilere göre 30-80 $emu.g^{-1}$'dir ve bu değer 100 $emu.g^{-1}$ toplu manyetik değerinden çok daha düşüktür. Fe_3O_4 kararlı bir yapıda olmadığı için kolayca Fe_2O_3 'e oksitlenebilmekte ve asidik ortamda çözünebilmektedir. Kang ve arkadaşları herhangi bir yüzey aktif maddeyi ortama katmadan tek düze ve çapı yaklaşık 8.5 nm gibi küçük bir değere sahip olan parçacıklar elde edebildiklerini bildirmişler ve reaksiyonu sulu bir ortamda Fe^{2+}/Fe^{3+} iyonlarını 0.5 oranında alıp pH 11-12'de gerçekleştirmişlerdir (Kang, 1996). Oksidasyonu önlemek için polivinil alkol gibi kaplayıcıların bir sonraki adımda ortama eklenmesi ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur (Novakova ve ark., 2003; Lee ve ark., 1996).

Yaygın olarak kullanılan SPION sentezi yöntemi ise oksijensiz bir ortamda 1:2 /Fe^{2+}:Fe^{3+} iyonlarının sulu çözeltisi hazırlanıp üzerine baz eklenmesiyle rengi siyaha dönen bir çözelti elde edilmesidir (Massart, 1981).

Tek düze ve eş boyutta np elde etmenin çok zor elde edilebilmesi bu yöntemin dez avantajlarındandır (Wu ve ark., 2008).

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O$$

$$Fe_3O_4 + 2H^+ \rightarrow \gamma\text{-}Fe_2O_3 + Fe^{2+} + H_2O$$

2.5.2. Termal Ayrıştırma Yöntemi

Bu yöntem ile yüksek kristaliniteye sahip eş boyutlu ve dar boyut aralığı yelpazesine sahip manyetik demir-oksit np'ları çözücüler içinde sentezlenebilmekte ve genellikle $Fe(cup)_3$ (cup: N-nitrosofenilhidroksilamin), $Fe(acac)_3$, $Fe(CO)_5$, Fe-oleat/-üre veya Prussian mavisi gibi maddeler kullanılarak demir-oksit np'ları elde edilmektedir. Ortama stabilizörler eklenerek küçük boyutlu, genellikle 30 nm'den küçük küresel yapıda demir-oksit np'ları elde edilebilmektedir (Wu ve ark., 2015). Sun ve Zeng, 265 ^0C gibi yüksek bir sıcaklıkta $Fe(acac)_3$ maddesinden oleik asit, oleilamin ve alkol varlığındaki fenil eterde boyutları kontrol edilebilen eş dağılımlı manyetik np'leri ayrıştırma yöntemi ile sentezlemişlerdir (Sun ve Zeng, 2002).

Hyeon ve ark. $Fe(CO)_5$ 'i kullanarak 100 ^0C sıcaklıkta ortama oleik asit ekleyerek kristalitesi büyük ve eş dağılımlı np sentezi gerçekleştirmişler ve sonrasında ise bu np'ları trimetilamin oksit kullanıp oksidasyona uğratarak eş dağılımlı $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ nano kristallerine dönüştürmüşlerdir. Parçacık boyutu ise deneysel parametrelerin kontrolü ile 4-16 nm arasında değişebilmektedir (Hyeon ve ark., 2001).

Bu yöntem ile elde edilen parçacıkların eş dağılımlı ve küçük çaplı olmasının bir avantaj olması ile birlikte bu parçacıkların yalnızca non-polar çözücülerde çözünebilmesi gibi bir dezavantaja da sahiptir (Wu ve ark., 2008).

2.5.3. Hidrotermal Yöntem

Demir-oksit np'larının boyutunun ve şeklinin kontrol edilebilir olması teknoljik açıdan önemlidir. Hidro-termal sentez, 130-250 ^0C sıcaklığa sahip sulu çözeltiden 0.3-4 MPa gibi yüksek basınçta ve kapalı bir kapta kristallendirme yapılması işlemidir (Wu ve ark., 2008).

Birlikte çöktürme yöntemi ile elde edilen nanoparçacıkların sulu çözeltisi teflon bir kap içerisine alınmakta ve bu kap basınca dayanıklı çelik kap içine yerleştirilip 130-250 ^{0}C arası sıcaklıkta birkaç saat bekletilerek manyetik nanoparçacık sentezlenmektedir (Gossuin, 2009).

Wang ve arkadaşları hidrotermal yöntem ile 140 ^{0}C'de 6 saatte yüzey aktif madde kullanmadan kristalitesi yüksek, manyetik doygunluğu 85.8 emu.g^{-1} olan 40 nm boyutunda Fe_3O_4 np'larını elde etmişlerdir. Normal manyetik doygunluk olan 92 emu.g^{-1}'den biraz daha düşük doygunluğa sahip np elde etmişler ve uygun koşullar sağlandığında iyi bir kristalite ile bu sorunun giderilebileceğini ileri sürmüşlerdir (Wang ve ark., 2003). Zheng ve arkadaşları ise sodyum bis(2-etilhekzil)sulfosüksinat/AOT yüzey kaplayıcısı ile oda koşullarında süperparamanyetik olan 27 nm boyutunda Fe_3O_4 np'larını elde etmişlerdir (Zheng ve ark., 2005).

Hidrotermal yöntemde SPION üretilmesi, sulu ortamda demir kaynağı olacak maddenin otojen basınçta ve yüksek sıcaklıkta manyetite dönüştürülmesi ile gerçekleşmekte iken son zamanlarda bu yöntemi mikrodalga kullanarak genişletmişlerdir (Khollam ve ark., 2002). Bu yöntem ile eş boyutlu SPION üretilebimektedir. Grzeta ve arkadaşları demir kolin sitratın termal olarak ayrıştırılması sonucu manyetit sentezi yapmışlardır (Grzeta ve ark., 2002).

Hidrotermal sentez ile demir-oksit np'larına kristallendirme yapılarak küçük boyutlu np'ları, Daou ve arkadaşları elde etmişlerdir; 39 nm boyutuna sahip manyetik np'ları $N(CH_3)_4OH$ kullanarak, 70 ^{0}C'de birlikte çöktürme yolu ile elde etmişler ve 250 ^{0}C'de bu parçacıklara hidrotermal işlem uygulanarak 12 nm boyutuna sahip manyetik np elde etmişlerdir (Daou ve ark., 2006).

2.5.4. Mikroemülsiyon Yöntemi

Birbirleriyle homojen olarak karışmayan iki sıvının yüzey aktif madde yardımıyla mikrometre çapında sıvı damlacığının başka bir sıvıda dağıtılmasıyla oluşturulmaktadır. Yağ içinde su mikroemülsiyonu demir oksit elde etmek için çok kullanılan bir metottur. Demir oksit miktarı çöktürme yöntemine göre oldukça düşüktür (Lee ve ark.,1992). Yüzey aktif maddenin molekülleri yağ ve su fazında tek katmanlı olarak hidrofobik

kuyruk kısımları yağ fazında hidrofilik/baş kısımları su fazında izotropik olarak dağılmakta ve su-yüzey aktif madde ya da yağ-yüzey aktif madde gibi ikili sistemlerde küresel/silindirik-miseller oluşabilmektedir (Solans ve ark., 2005).

Mikroemülsiyon (Su/Yağ) yönteminde yüzey aktif moleküller kullanılarak sürekli fazda(yağ) nano-reaktör olarak su damlacıklarını kullanmasına dayanmaktadır (Sen ve ark., 2006, Inouye ve ark., 1982, Muller ve Muller, 1984, Gupta AK ve Wells, 2004). Bu yöntemde demir-oksitler misellerin merkezindeki su fazında çökertilebilmekte ve np'larının boyutu su damlacıklarının boyutu sayesinde kontrol edilebilmektedir.

Bu yöntemle, Zhang ve arkadaşları çapı 200-400 nm arasında değişen MNP üretmişlerdir ama bu yöntemde kullanılan sıcaklık düşük olduğundan yeterli miktarda SPION hazırlanamaması gibi bir sorunlarla karşılaşılmaktadır (Zhang ve ark., 2008). Hyeon ve arkadaşları ise demir kaynağı olarak Demir(III)-asetil-asetonat kullanıp yüksek sıcaklıkta mikroemülsiyon yöntemi ile iyi olarak kabul edilen bir boyutta ve kristalitesi yüksek maghemit parçacıkları elde etmişlerdir (Lee ve ark., 2005), Sun ve arkadaşları ise $Fe(acac)_3$ 'ü demir kaynağı olarak kullanarak 12 ve 16 nm boyutunda manyetit elde etmişlerdir (Sun ve Zeng, 2002).

2.5.5. Sonokimyasal Metot

Yüksek enerjili ultrasonikasyonda ~5000 K sıcaklıkta SPION sentezlemek yeni bir yoldur, bu yöntemle çeşitli np'lar hazırlanabilir ancak verimi düşüktür (Kumar ve ark., 2001; Vijayakumar ve ark., 2000; Dang ve ark., 2008).

Ultrasonun kimyasal etkileri; sıvıdaki kabarcıkların oluşup büyümesi sonra da kabarcıkların patlamasının meydana getirdiği akustik kavitasyondan kaynaklanmaktadır. Baloncuğun içe doğru çökmesiyle gaz fazında adyabatik sıkışma ya da şok dalgasının oluşması sonucu 5000 K gibi bir sıcaklık, 1800 atm basınç ve 10^{10} K/s'yi aşan soğutma hızı deneysel olarak belirlenmiş verilerdir (Suslick, 1990).

Demir(II)asetat'ın Argon atmosferinde sudaki sonikasyonu ile MNP sentezi gerçekleştirilmiştir; Pinkas ve arkadaşları az miktarda su ve Argon atmosferi altında $Fe(acac)_3$'dan sonike ile demir-oksit(Fe_2O_3) sentezlemişlerdir, yüzey alanı ve organik içeriği rxn kabındaki su miktarına bağlı olarak değişebilmektedir (Pinkas ve ark., 2008).

Hidro-filik ve biyo-uyumlu SPION elde etmek için en çok kullanılan yöntem birlikte çöktürme yöntemi olmasına rağmen parçacık boyutunun ve şeklinin kontrolünün minimum olması ve kümeleşme eğilimi gibi dez avantajlara sahip olduğu için Hidro-termal sentez ve termal ayrışma metotu ile bu sorunların önüne geçilebilmektedir. Ancak sonokimyasal metot ile bunlarla rekabet edebilecek derecede sıradışı manyetik özelliklere sahip demir-oksit np'ı üretilebilmektedir (Wu ve ark., 2008).

2.5.6. Poliol Sentezi

Hidrofilik poliol ligandları kullanılarak Fe_3O_4 hidrofilik hale getirilebilmekte ve bu yöntemle yüksek sıcaklıklara çıkılabildiği için dar boyut aralığı yelpazesine sahip parçacıklar elde edilebilmektedir (Laurent ve ark., 2008).

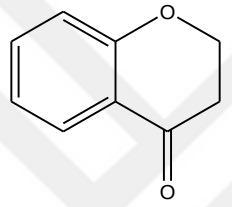
Bu yöntem, metal kaynağı olarak kullanılan maddenin polialkoller ile indirgenmesiyle gerçekleşmekte, genellikle indirgenmeye yardımcı olması için ortama alkaliler eklenmektedir. Yüksek sıcaklıklarda termal ayrışma yönteminde 1,2 hekzadekandiol ya da 1,2 oktadekandiol gibi uzun zincirli dioller kullanıldığında poliol tekniği ile bazen karıştırılabilmektedir. Dioller, demir-oksit eldesinde Fe^{3+} iyonunun kısmi indirgenmesini sağlamakta ve diol kullanmadan da oleylamin gibi indirgeyici ve stabilizörün ya da oleik asit-oleyamin(çözücü-indirgeyici) karışımının ortama eklenmesiyle rxn gerçekleşebilmektedir (Fuente ve Grazu, 2012). $Fe(acac)_3$ ile 1,2-hekzadekandiol PVP ile kaplanarak 5 nm'den küçük np sentezlenebilmektedir (Li ve ark., 2005).

Polioller, alkollerden daha polar oldukları için metal iyonları ile daha güçlü bağ yapmaktadırlar; hekzadekandiol, tetradekandiol ve propandiol gibi maddeler bu yöntemde sıklıkla kullanılmaktadır (Gubin, 2009). Trimetilen-glikol ile 15 nm, propilen glikol ile 23 nm ve etilen glikol ile de 32 nm boyutuna sahip demir-oksit np'ları elde edilmiştir (Joseyphus ve ark., 2007).

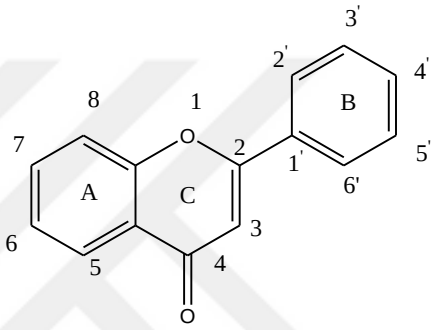
2.6. Flavonoidler

Meyve, sebze ve çayda bol miktarda bulunan flavanoidler bitkilerden elde edilmektedirler. Latincede sarı anlamına gelen 'flavus-flavum' kelimelerinden flavonoid ismi türetilmiştir. Flavonoidler bitkilerde donma sertliğine, kuraklığa ve iklim

değişikliklerine karşı koruma gibi biyolojik aktivelerde rol oynamaktadırlar (Takahashi ve Ohnishi, 2004; Samanta, Das G ve Das SK, 2011). Polifenolik yapıya sahip flavonoidler kanser, aterosekloz (damar sertliği) ve Alzheimer gibi çeşitli hastalıklarda elverişli biyokimyasal ve antioksidan etkiler göstemenin yanı sıra anti-enflamatuar, anti-mutajenik, anti-karsinojenik özellikleri ve hücresel enzim fonksiyonlarını module edebilme özelliklerine sahip olduğu için kozmetik, farmasötik ve tıbbi uygulamalarda önemli bir maddedir. Flavonoidlerin siklo-oksijenaz (COX), lipoksijenaz ve ksantin oksidaz (XO) gibi enzimleri inhibe ettiği de bilinmektedir (Burak M ve İmen Y, 1999; Lee ve ark., 2009; Metodiewa ve ark., 1997; Walker ve ark., 2000).



KROMON(BENZOPIRON)



FENIL-BENZOPIRON

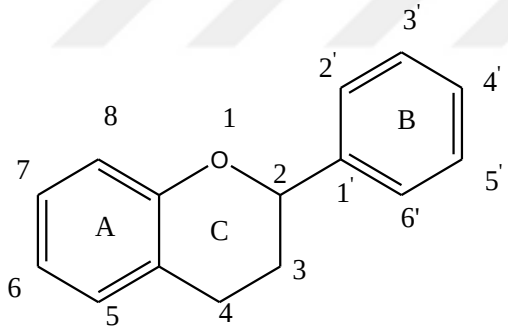
Fenil benzopiran yapısındaki flavonoidlerin A halkası, glikozun metobolize edilmesiyle oluşan asetil koenzim A'nın, malonil koenzim A'yı oluşturmasıyla ve malonil koenzim A'nın 3 molekülünün kondenzasyonu ile oluşmakta iken B ve C halkaları ise yine glikozun metobolize edilmesiyle oluşan şikimik asit üzerinden sinnamik asit gibi fenil propanoid'lerden oluşmaktadırlar (Kahraman A ve ark., 2002; Formica ve ark., 1995; Heller ve Forkmann, 1988). Fenil-benzopiron yapısındaki karbonlara OH gruplarının bağlanması sonucu flavonoid çeşitliliği artmakta ve bu hidroksil gruplarına şeker, sülfat ve metil gibi grupların konjuge edilmesiyle flavonoid konjugasyon ürünleri meydana gelmektedir; örneğin flavonol olan kersetinin üçüncü karbonundaki OH grubuna rutinozunun konjuge edilmesiyle rutin meydana gelmektedir (Sorata ve ark.; 1984).

Bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunan flavonoidler sebzelerde büyüme ve plaklara karşı mücadele etmede kullanılmaktadır (Havsteen, 2002). Molekül ağırlığı düşük fenolik

bileşikler sınıfında bulunan flavonoidler bitkiler aleminde çokca bulunmakta ve yüksek bitkilerde en karakterestik bileşiklerden birini oluşturmaktadır. Bitkilerin her yerinde bulunabilmesinin yanı sıra kapalı tohumlu bitki ailesinin çiçek pigmentleri olarak kolayca tanımlanmaktadır (Dewick, 2001). Sayılarının yaklaşık 4000 olduğu tahmin edilen flavonoidler elma, soğan, çay, kırmızı şarap, turunçgiller ve domateste bolca bulunmakta ve bir insanın günlük olarak ortalama 1 g flavonoid aldığı tahmin edilmektedir (Bors ve ark., 1990; Formica ve Regelson, 1995; Booth ve ark., 1956); Elengovan ve ark., 1994; Takahama, 1985).

Flavonoidler çiçeklerin rengi ve aromasıdan sorumlu, meyvelerde tohum ve spor çimlenmesine, fidelerin ise büyüme ve gelişmesine yardımcı olduğu uzunca bir süredir bilinmektedir (Griesbach, 2005). Bitkiyi biyotik ve abiyotik stresten koruyan flavonoidler sinyal UV filtresi gibi görev yapmanın (Takahashi ve Ohnishi T, 2004), yanı sıra dona ve ısıya dayanaklılıkta rol oynamaktadır (Samanta ve ark., 2011).

2.6.1.Flavonoidlerin sınıflandırması



ANA ISKELET

Flavonoidler C halkasının doymamışlık ve oksidasyona derecesine göre sınıflandırılmaktadırlar (Pandne ve ark., 2016);

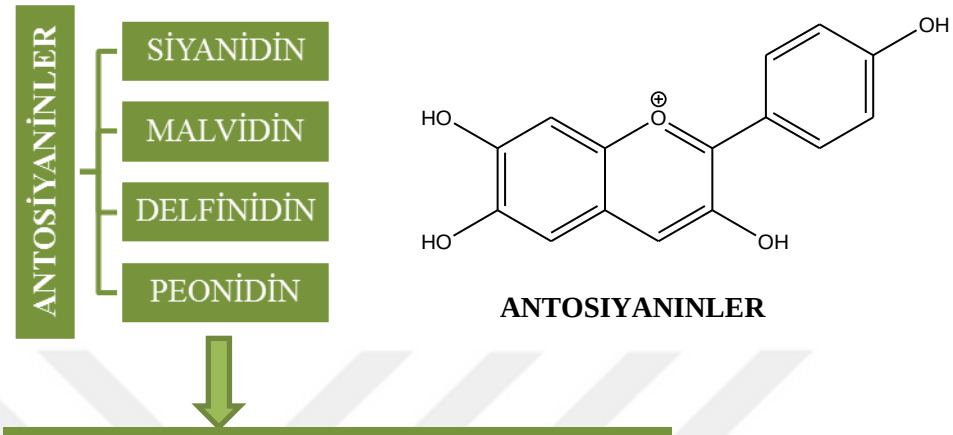
İzoflavonlar, B halkasının C halkasına 3. pozisyonda bağlı olduğu,

Neaflavonoidler, B halkasının C halkasına 4. pozisyonda bağlı olduğu,

B halkasının C halkasına 2. pozisyonda bağlı olması durumunda ise C halkasının yapısına göre flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanonoller ya da kateşin, antosiyanin gibi gruplara ayrılmaktadırlar.

2.6.1.a. Antosiyaninler

Tablo 2.1. Antosiyaninler



MEYVE

SEBZE

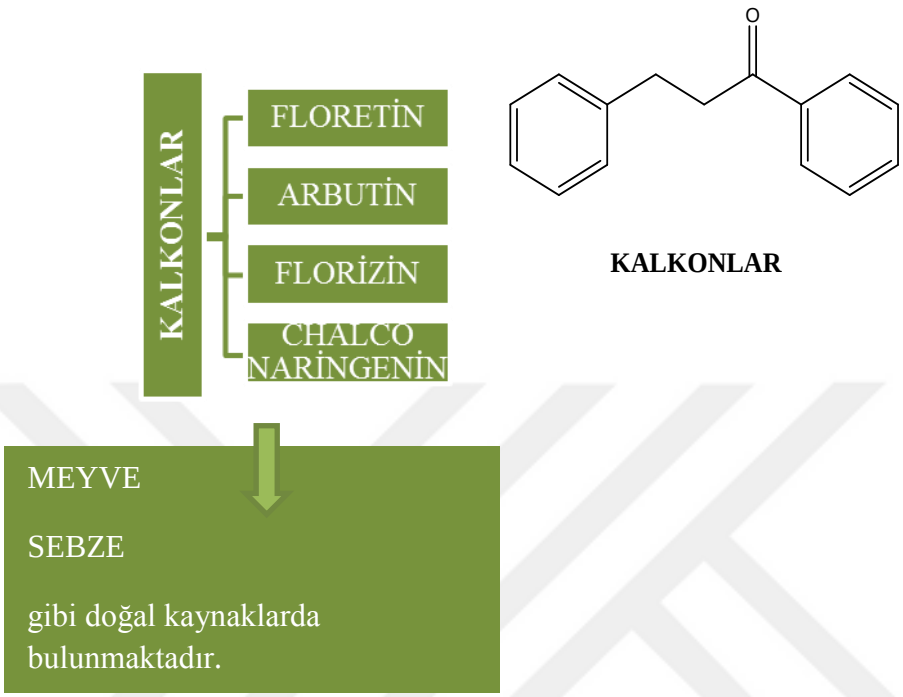
FINDIK ve KURU MEYVELER

gibi doğal kaynaklarda bulunmaktadır.

Siyah kuş üzümü, ahududu, böğürtlen, çilek ve yaban mersini gibi meyvelerde, çiçeklerde ve bitkilerde bulunan antosiyaninler renklerden sorumlu pigmentlerdir. Rengi, antosiyanine bağlı pH'a ve A-B halkalarındaki OH gruplarının hem metilasyonuna hem de asilasyonuna bağlıdır (Giusti ve Wrolsta, 2003; Iwashina, 2013).

2.6.1.b. Kalkonlar

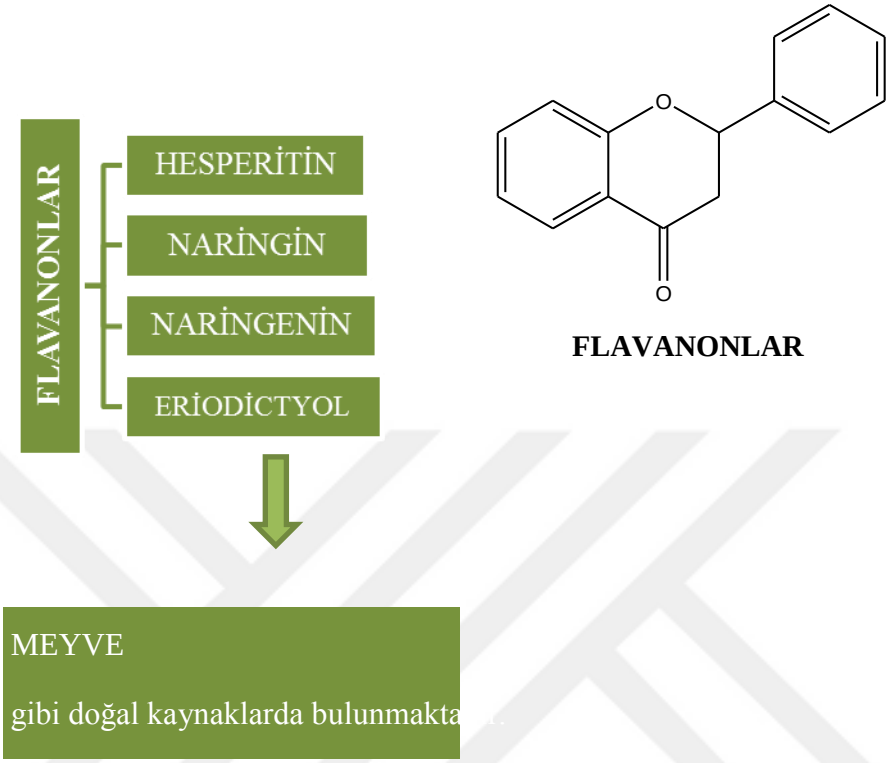
Tablo 2.2. Kalkonlar



Domates, yaban mersini, çilek ve bazı buğday ürünlerinde bulunan kalkonların flavonoid iskelet yapısında diğerlerinden farklı olarak kapanmış C halkası yapısı bulunmamakta ve bu sebeple kalkonlara açık zincirli flavonoidler de denilmektedir (Hertog ve ark., 1993; Lopez-Lazaro M, 2009).

2.6.1.c. Flavanonlar

Tablo 2.3. Flavanonlar



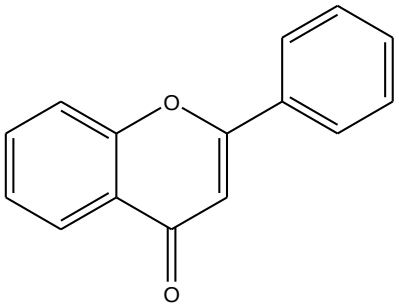
Üzüm, limon, portakal gibi turunçgillerde bulunan, bu turunçgillerin suyundaki ve kabuğundaki acı tadın oluşmasını sağlayan dihidroflavonlar olarakta isimlendirilen flavanonlar; anti-oksidan, anti-enflamatuar ayrıca kolestrol düşürücü ajanlar olarak farmakolojik etkiler göstermektedirler. Flavanonların, flavonlardan farklı olarak C halkası doymuş bir yapıdadır, (2 ve 3 pozisyonlarındaki karbonlar arasında doymamışlık yoktur) bu durum iki yapı arasındaki tek farklılıktır (Iwashina, 2013).

2.6.1.d. Flavonlar

Flavonoidlerin en önemli sınıfı olan flavonlar yapraklarda, çiçeklerde ve meyvelerde bulunmaktadırlar; kereviz, kırmızı-biber, nane ve maydanoz başlıca flavon kaynaklarıdır (Manach ve ark., 2004).

Tablo 2.4. Flavonlar





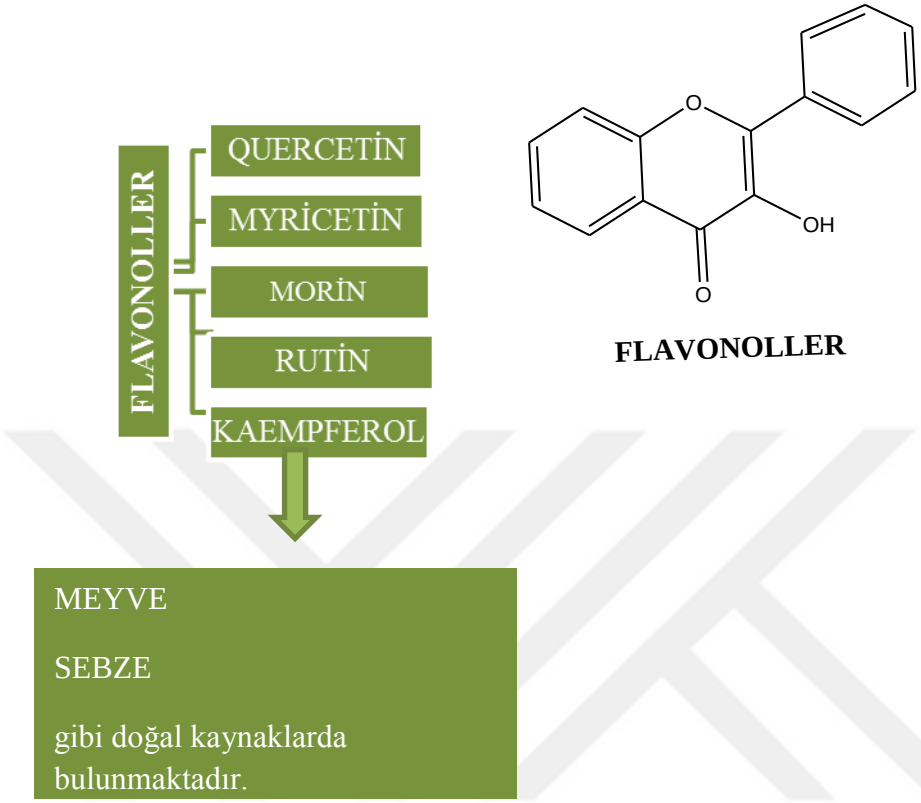
FLAVONLAR

MEYVE

gibi doğal kaynaklarda bulunmaktadı

2.6.1.e. Flavonoller

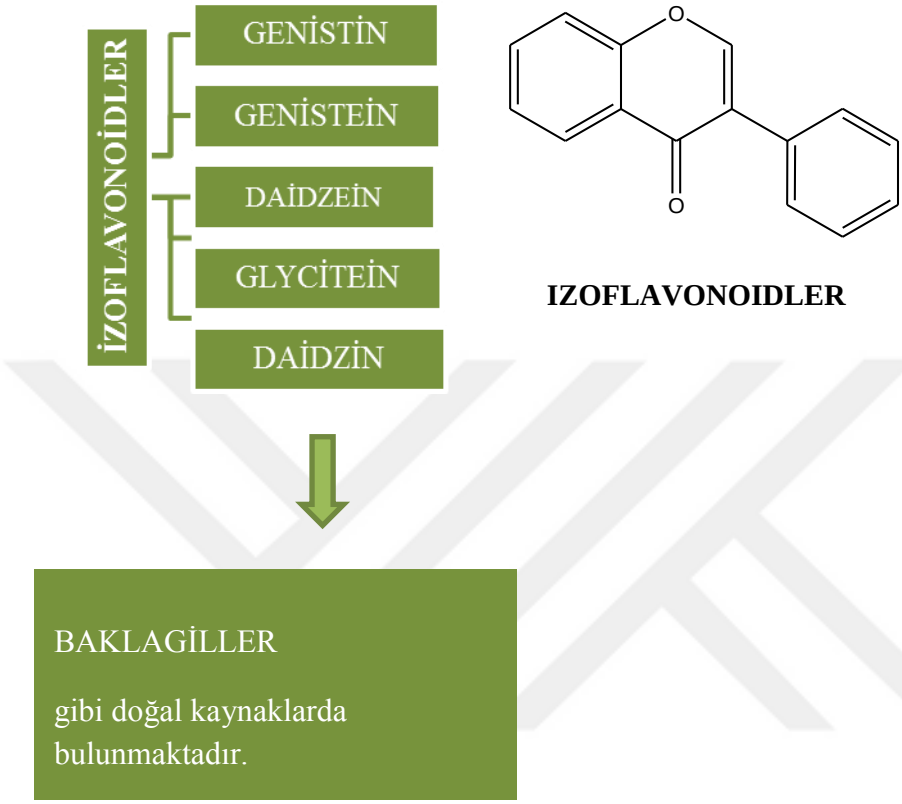
Tablo 2. 5. Flavonoller



Proantosiyaninlerin yapı taşı olan flavonoller keton grubuna sahip flavonoidlerdir. Soğan, elma, üzüm, lahana ve marul gibi meyve-sebzelerde, çay ve kırmızı şarap gibi içeceklerde bulunmaktadır. Kersetin, mirisetin ve fisetin gibi flavonoller üzerinde pek çok çalışma mevcuttur ayrıca anti-oksidan potansiyeli ve damar hastalığı riskini azalttığına dair bulgular bulunmuştur (Pandne ve ark., 2016). Flavonoller, flavonlar gibi C halkasının 3. pozisyonunda hidroksil grubu bulundurmaktadır ve flavonlar gibi metilasyon ve hidroksilasyon çeşitliliğine sahiptir. Glikosilasyon düzenlerinin farklılığı açısından meyve ve sebzelerde bulunan flavonoidlerin belki de en yaygın ve en büyük alt grubudurlar, kersetininin pek çok bitkisel gıdada bulunması buna en güzel örnektir (Pandne, 2016; Iwashin, 2013).

2.6.1.f. İzoflavonoidler

Tablo 2.6. İzoflavonoidler



İzoflavonoidler; başlıca soya fasülyesi ve diğer baklagillerde bulunmaktadırlar, bazı türlerinin ise mikroplarda bulunduğu rapor edilmiştir. Bitki-mikrop etkileşimlerinde fitoaleksinlerin önemli bir rol üstlendiği tespit edilmiştir (Matthies ve ark., 2013; Aoki ve ark., 2000; Dixon ve Ferreira, 2002). İzoflavonoidlerin bazı hastalıklarla mücadele edebilme potansiyeli vardır; genistein ve daidzein gibi izoflavonlar belirli hayvan türlerinde östrojenik aktivite gösterdikleri için fito-östrojenler olarak kabul edilmektedirler. Szkudelska ve Nogowski, genisteinin çeşitli hastalık yolaklarını etkilebilen hormonal ve metabolik değişiklikleri tetikleme etkisini incelemişlerdir (Burak M ve Imen Y, 1999; Szkudelska ve Nogowski, 2007).

2.6.2. Flavonoidlerin Antikolinesteraz aktivitesi

Merkezi sinir sisteminde çok önemli bir enzim olan asetilkolinesteraz (AChE) enziminin inhibe edilmesi orta dereceli AD'nin sempotik rahatlama tedavilerinden biri olan nöral asetilkolin düzeylerinde artışa yol açmaktadır (Perry ve ark., 1978) ve bu yüzden AD (Aort Darlığı) ile mücadele edebilmek için kolinesterazın inhibisyonu çok önemlidir (Pandne ve ark., 2016). Bazı flavonoidlerin antikolinesteraz aktiviteleri üzerine çalışmalar yapılmıştır; kersetin ve rütin gibi çeşitli flavonoidlerin *invitro* inhibitör çalışmaları yapılmış ve kersetinin asetilkolinesteraz ve butirilkolinsteraz enzimlerine karşı konsantrasyona bağlı inhibisyon yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Macluraksantonun, 8.47 ve 29.8 µm'lık IC50/ %50 inhibatör konsantrasyon değerleri ile AChE ve BChE enzimlerinin spesifik en güçlü inhibatörü olduğu saptanmış ve enzim kinetik çalışmalarında kersetinin her iki enzimi de rekabetçi bir şekilde inhibe ettiğini, macluraksantonun ise sadece BChE' ye karşı rekabetçi davrandığını göstemiştir (Pandne ve ark., 2016; Sheng ve ark., 2009).

2.6.3. Flavonoidlerin Antienflamatuar Aktivitesi

Endojen bir enzim olan siklooksijenaz (COX), araşidonik asitin prostaglandin-tromboksanlara dönüşümünü katalize etmektedir (Smith ve ark., 2000). COX, yapısal bir enzim olan COX1 ve indüklenen yapısal bir enzim olan COX2 olmak üzere iki formda bulunmaktadır. COX1 mide mukozasının bütünlüğünü koruyan ve vasküler homeostazdan sorumlu olan prostaglandinlerin oluşumunu sağlamakta, COX2' ise iltihaplanmayı ve ağrıyı tetiklemek için prostaglandinlerini sentezlemektedir (Kurumbail ve ark., 1996; Kujubu ve ark., 1991). Flavonoidlerin silico yöntemi ile COX2 ile bağlanmaları ve iki ya da üç çift bağ içeren flavon ve flavonollerin COX2'nin inhibatörü olarak görev yapabileceği üzerine çalışmalar yapılmıştır (D'Mello ve ark., 2011). Madeswaran ve arkadaşları in silico yöntem ile rutin, ksantotoksin, farobin A gibi flavonoidlerin COX aktivitesini incelemişler ve bu flavonoidlerin daha iyi aldoz redüktaz inhibatör etkinliğine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Madeswaran ve ark., 2012).

2.6.4. Flavonoidlerin İşlevleri ve Uygulamarı

Bitkilerdeki organik bileşiklerin çoğu büyüme ve gelişme aşamalarına katılmaz, ikincil metabolitler olarak da adlandırılın flavonoidler ise bitkiler aleminde farklı şekillerde dağılmışlardır (Croteau ve ark., 2000). İn vitro incelemer sayesinde bitki doku kültürünün ve ana bitkinin aynı bileşikleri üretebilme potansiyellerini araştırmak için yeni bir pencere aralamıştır (Anand, 2010). Flavanoidlerin anti-alerjik, anti-enflamatuar ve anti-viral gibi biyolojik aktivite gösterebildiğine dair pek çok çalışma mevcuttur. Bu özelliklerinin yanı sıra radikal oluşumunu azaltabilme ve serbest radikalleri temizleyebilme özelliklerinden dolayı flavonoidlerin anti-oksidan kapasitesi üzerine pek çok çalışmalar yapılmıştır (Srivastava ve Bezwada, 2015; Ren ve ark., 2003). Ren ve arkadaşları flavonoidler ve anti-kanser maddeler hakkındaki makalelerinde, kanserojonlerin önlenmesinde flavonoidlerin Sitokrom P450 üstündeki etkilerini ve P450 izozimlerinin prokarsinojen üretimini inhibe etmek için kullandıklarını söylemişlerdir (Ren ve ark., 2003).

Flavonoidler üzerine yapılan diğer bir çalışma ise anti-oksidan özellikleri üzerinedir ve bu çalışmalarda flavonoidlerin, oksidatif stresi önleme potansiyelleri üzerinde durulmuştur (Kitagawa ve ark., 1992; Katan ve Hollman, 1998). Hücreleri, reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif etkiden koruyan anti-oksidanlar denge görevi görmektedir. Oksijen türleri ve anti-oksidanların arasındaki dengenin bozulması sonucu kanser, diyabet, yaşlanma ve nörodejeneratif gibi rahatsızlıklara sebebiyet veren oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres birçok moleküle ve proteine de zarar verebilmekte, anti-oksidanlar radikal üreten sistemlere müdahele ederek hücrelerin bu serbest radikallerden zarar görmesini önlemektedir (Srivastava ve Bezwada, 2015). Flavonoidlerin sebest radikalleri yakalayarak anti-oksidan özellik gösterebilmesinde yapısındaki üç grubun etkili olduğu ileri sürülmektedir; B halkasındaki o-dihidroksi/kateşol grup, C halkasındaki 4-okzo ve 2-3 çift bağı ve 3-5 hidroksil grupları sırasıyla radikal hedef yeri, elektron delokalizasyonu ve radikal yakalama-metal şelatlama yapmaktadırlar (Bors ve ark., 1990). Bu üç fonksiyonel gruba aynı anda sahip olan kersetin gibi flavonoidler diğerlerine göre yüksek aktivite göstermektedirler; 0.1 mM kersetinin malondialdehit(MDA) oluşmasındaki inhibisyon oranı %70 iken rutinin

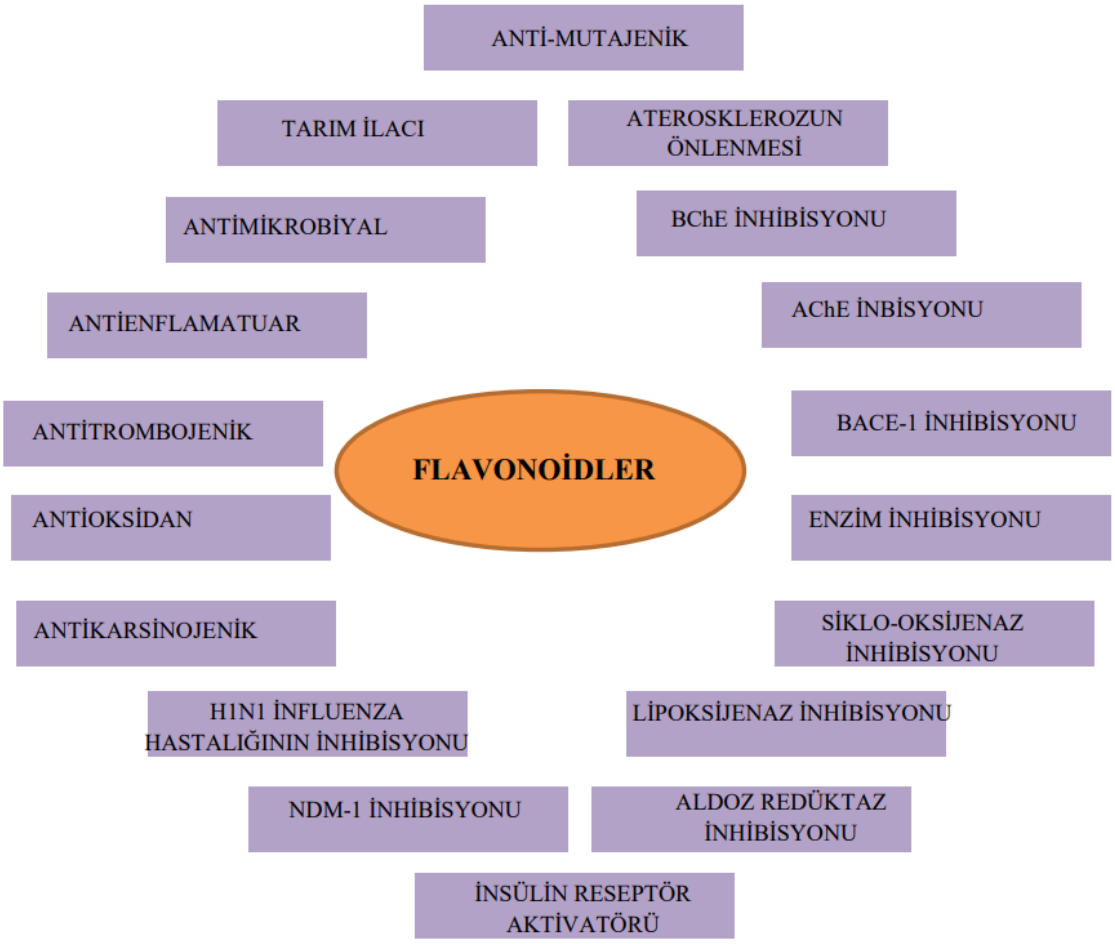
etkisi %64'dür (Ratty ve Das, 1988). Flavanoidler lipofilik anti-oksidan olmasına rağmen yine lipofilik bir anti-oksidan olan α-tokoferol/vitamin E'ye göre daha hidrofiliktir. Vitamin E'nin kroman halkası, membran fosfolipitlerinin ester-karbonil grupları ile HB (Hidrojen Bağı) yaparken ona göre daha hidrofilik olan flavonoidler ise membranın polar yüzeyine yakın bir şekilde yerleşmekte ve bu sayede peroksil radikallerini lipit fosfolipitlere göre daha hızlı yakalamaktadırlar. Lipofilik olan askorbik asit/vitamin C ise membranın polar yüzeyine yerleşip antioksidan işlevi görmektedir (Terao ve ark., 1994). Membrandaki serbest radikalleri, flavonoidler ve Vitamin-C/-E anti-oksidanları sinerjik olarak etki edip temizlemektedirler. Kersetinin, askorbik asit ve α-tokoferol'den daha güçlü bir anti-oksidan olduğu düşünülmektedir (Takahama, 1985; Terao ve ark., 1994).

Pietta, lipit peroksidasyonu önlemek için flavonoidlerin etkili olduğunu ve yaşlanma, damar sertliği(ateroskleroz), diyabet ve inflamasyon gibi hastalıklara lipit peroksidayonunun sebep olduğunu bulmuştur (Pietta, 2000; Halliwell, 1991; Halliwell ve ark., 1992). Kersetin ile yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir (Letan, 1996); mirisetin ve rutin gibi başka flavonoidlerinde süperoksit radikalleri engellemeye yardımcı olmaktadırlar (DeGroot, 1994; Grace, 1994).

Flavonoidlerin anti-mikrobiyal etkinlikleri de vardır ve birçok araştırmacı flavonoidlerin anti/-viral/-bakteriyel/-fungal özellikteki flavonoidleri izole edip tanımlamışlardır (Pandne ve ark., 2016). Flavonoidlerin anti-viral etkisini Wang ve arkadaşları viral enfeksiyon tedavisinde göstermişlerdir. Kersetin, kateşin, hesperitin ve naringin farklı derecelerde anti-viral etkiye sahiptirler (Wang ve ark., 1998). KerSetin ve apigenin sergilediği anti-bakteriyel etki sayesinde pek çok çalışmaya konu olmuştur (Wu ve ark., 2008). Li ve Xu lotus yapraklarını ekstrakte etmeleri sonucu elde ettikleri kersetinin diş eti çekilmesi (periodontit) tedavisi için umut vaad eden anti-bakteriyel bir ajan olabileceğini bildirmişlerdir (Wu ve ark., 2008).

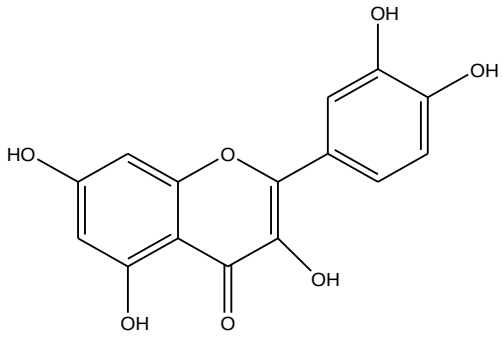
Flavonoidlerden bazıları başta östrojen hormonu olmak üzere streoid hormonlarına benzer aktiviteler gösterebilmektedirler. Bu tür flavonoidler meyve-sebze, çay ve tahıllarda bulunanlardandır (Srivastava ve Bezwada R 2015). Klinik çalışmalarda genistein, daidzein ve equol gibi flavonoidler östrojenik aktiviteleri açısından ve kanser,

osteoporoz, kardiyovasküler bozukluklar gibi kronik hastalıkları tedavi etmedeki potansiyelleri açısından incelenmişlerdir (Wiseman, 2000; Metzner ve ark., 2009). Genisteinin, kadınlarda menopoz sonrası kemik kaybını önlemede etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bazı flavonoidlerin ise lipoprotein oksidasyonu, kan-trombosit agregasyonu ve kardiyovasküler gibi damar sertliği ile ilişkili etkenler üzerinde faydalı olduğu gösterilmiştir (Tikkanen ve Adlercreutz, 2000; Tham ve ark., 1998). Comalada ve arkadaşları kersetin başta olmak üzere flavonoidlerin bağışıklık işlevleri üzerindeki etkilerini inceleyip bazı flavonoidlerin iltihaplanma sürecini en başından önlemeye ve bağışıklık sistemini düzeltmeye yardımcı olabildiklerini göstermişlerdir (Comalada ve ark., 2005). *Spilanthes panikulata* bitkisinin yapraklarından elde edilen flavonoid ve tanenlerin, anti-enflamatuar etkileri rapor edilmiştir (Hossain ve ark., 2012).



Şekil 2.3. Flavonoidlerin kullanıldığı alanların şematik gösterimi

2.7. Kersetinin Doğadaki Yeri ve Özellikleri



QUERCETIN

Suda çözünür bitki pigmentleri sınıfına ait, flavonoidlerin alt sınıfında bulunan kersetin doğada elma, kiraz, üzüm, ahududu, domates, kuruyemişler, yeşil yapraklı sebzeler, yeşil ve siyah çay, baklagiller, yeşil-mavi algler, soğan, biber ve şarapta bulunmaktadır. Kersetin, kalp rahatsızlıklarını engelleyebildiği ve antioksidan-antikanser özellik gösterebildiği düşünülen bir bileşiktir. Kersetinin biyolojik etkilerini bulmak için insan, hayvan ve *in vivro* çalışmaları yapılarak bu maddenin anti-oksidan, anti-kanserojen ve antienflamatuar özellikte olup olmadığı birçok araştırmaya konu olmuştur (Arslan ve ark., 2005).

Soyadaki izoflavon sınıfındaki genistein ve soğanda bulunan flavonol sınıfına ait kersetin en çok tanınan flavonoitlerdir. Bu bileşikler yapısal olarak birbirlerine benzeselerde işlevleri farklıdır (Arslan ve ark., 2005). Bir aglikon olan kersetin, rutin ve hiperozit gibi flavonoidler yapıca birbirlerine benzemektedirler, aralarındaki tek fark ise benzen halkalarında bulunan OH gruplarına yerine şeker grubu bulundurmalarıdır ve bu yüzden kersetine, rutinin şekersiz hali de denilmektedir. Aglikona bağlı glikozitlerin çeşitliliği nedeniyle doğada yaklaşık 179 türden fazla kersetin glikoziti mevcuttur (Miller, 1996).

Hollandalı araştırmacılar soğan ve çaydaki kersetinin biyoyararlanımı üzerine bir çalışma yapmışlar ve dokuz kişiye on iki gün boyunca bir diyet uygulamışlardır; dördüncü, sekizinci ve on ikinci günlerde bu kişilerden bir kısmına100 mg kersetine eş

değer olan kızarmış soğan, diğer kısmına ise 100 mg kersetin vermişlerdir. Soğandaki kersetin glikozitlerinin adsorpsiyonu %52 bulunmuştur ve yine bu araştırmacılar tarafandan elmadaki kersetin adsorpsiyonuna bakılıp soğandaki kersetin adsorpsiyonunun yarısı kadar olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, soğanda bulunan rakamın yüksek olmasını glikozitleri taşıyan barsaktaki şeker taşıyıcılarının sebep olduğunu söylemişler (Hollman, 1997) ve bu sav başka bir çalışma ile kanıtlanmıştır (Gee ve ark., 1998).

2.7.1. Kersetinin Tedavi Etkinliği

Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma pro-oksidanları oluşturmakta (Whitehead, 1995) ve DNA, lipitler ve proteinler gibi biyolojik moleküllerin pro-oksidanların sebep olduğu hasardan korunmaları için anti-oksidanlara gereksinim duyulmaktadır. Pro-oksidanların çok fazla oluşması durumunda kanser gibi birçok hastalığa sebep olan oksidatif stres ya da oksidatif hasar meydana gelmektedir. Anti-oksidanlar yaygın olarak kullandığımız gıdalarda; vitaminler, flavonoidler ve polifenoller şeklinde bulunmaktadırlar (Stavric, 1994). Flavonoidler yıllar önce de araştırılmasına rağmen anti-oksidan, anti-enflamatuar, anti-viral ve anti-allerjik özellikleri açısından son zamanlarda büyük önem kazanmıştır. Sayılarının ise dört binin üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Stavric, 1994-a; Stavric, 1994-b; Bors ve ark., 1990).

Kersetinin yapısındaki fenolik bileşikler ile serbest radikallerin reaksiyona girmesi ile aktivitesi düşük fenoksi radikallerinin oluşması sonucu kersetin anti-oksidan özellik göstermektedir. Oksijen içermeyen radikaller parçalanmakta ve ksantin oksidaz enzimi kersetin ile inhibi edilmektedir (Miller, 1996). Anti-enflamatuar etki açısından ise sikoloksijenaz ve lipoksijenaz gibi enflamasyona neden olan enzimleri ile lipid peroksidayonunu durdurmaktadır (Kim ve ark., 1998). Kersetin, ksantin oksidazı inhibe ettiği için ürik asit oluşumunu azaltabilirliği açısından gut hastalığını tedavi etme potansiyeli vardır (Bronner, 1985).

Kardiyolojistlere göre LDL kolestrolünün zarar görmesi kalp damar hastalıklarına yol açmakta ve kersetin de güçlü bir anti-oksidan olarak bu hasarın önüne geçebilmektedir (Hertog ve ark., 1994). 1980'lerde kersetinin hayvanlarda kanser riskini azalttığı rapor edilmiş (Pamukcu ve ark., 1980), ancak sonra bunun üzerine yapılan çalışmalar ile bu

sav doğrulanamamıştır (Hirono ve ark., 1981). Kersetinin fitoöstrojen yapıya sahip bir madde olduğu düşünülür ve bu yapıdaki maddelerinde kanser riskini azalttığı düşünülmektedir, laboratuar ortamanında ise kersetinin meme kanseri hücrelerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Miodini ve ark., 1999).

Kersetin, insülin salgılanmasını artırarak pankreatin beta hücrelerini, serbest radikallerin verdiği hasardan koruyup şeker hastalığında çeşitli sorunlara neden olan sorbital rxn zincirini bloke ettiği bildirilmiştir (Crataegus, 1998). Ayrıca glikozu sorbitole dönüştüren ksantin oksidaz enziminin salgılanmasını azaltmakta, mast hücrelerini ve bazofilik histamin parçalanmasını bloke etmektedir. Astım gibi iltahaplanma ve alerjik, gut hastalığı ve prostat iltihabı gibi durumlarda kersetin kullanılabilmektedir (Arslan ve ark., 2005).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyde Kullanılacak Malzemeler

- $FeCl_2.4H_2O$
- $FeCl_3.6H_2O$
- %25'lik NH_3
- Kersetin
- PEG 1000

3.1. Fe_3O_4 Sentezi



Şekil 3.1. Demir-oksit Sentezi

1:2 (n/n) oranında $FeCl_2.4H_2O$: $FeCl_3.6H_2O$ alındı (Yoo ve ark., 2017; Shah ve ark., 2019);

- 0,64 g $FeCl_2.4H_2O$ ve 1,51 g $FeCl_3.6H_2O$ 100 mL'lik ağzı dar erlene alınıp üzerine 10 mL saf su eklendi ve içerisine manyetik balık atılarak 80 ^{0}C ve 300

rpm dönme hızına ayarlanmış manyetik karıştırıcının üzerindeki yağ banyosuna konuldu,

- 15 dakika sonra %25'lik NH_3'dan 3 mL eklendi ve ekleme anında açık kahve olan rxn rengi gümüşi siyaha dönmeye başladı ve madde dipte yoğunlaşmaya/çökmeye başladı (Amonyaktan gelen Azot'tan kaynaklan Hidrojen Bağı oluşması sonucu renk dönüşümü gözlemlendiği düşünülmektedir),
- 15 dakika daha karıştırıcıda bekleyen sentez bu sürenin sonunda yağ banyosundan alındı ve 50 mL'lik falkon tüplere konuldu, 3900 rpm'de ve oda koşullarında (24 ^{0}C) 5 dk santrifüj yapıldı ve bu aşamada 2 kez saf su ile yıkama yapıldı,
- 60 ^{0}C'ye ayarlanmış etüvde kurumaya bırakıldı.
- Madde kuruduktan sonra SEM görüntüsü alınıp XRD, FT-IR, NTA ve Zeta potansiyeli analizleri yapıldı.

Maddenin oluşma durumuna göre sıcaklık, dönme hızı, NH_3 ekleme zamanı ve süre gibi parametreler literaturden farklı olarak değiştirilip denenmiş ve uygun sonuca gidilmiştir.

3.2. Fe_3O_4 -PEG SENTEZİ

Dorniani ve arkadaşlarının 0.2 g kuru demir-oksiti alıp %1'lik (w/V) PEG ile karıştırdığı tarif bu senteze uyarlanmıştır (Dorniani ve ark., 2014). Kurumuş demir-oksit yerine henüz sentezi devam eden demir-oksitin üzerine %1'lik PEG1000 eklenmesi hususunda bu tarifin dışına çıkılıp deneme yanılma yoluyla sentez gerçekleştirilmiştir;

- 0.64 g $FeCl_2.4H_2O$ ve 1.51 g $FeCl_3.6H_2O$ 100 mL'lik ağzı dar erlene alınıp üzerine 10 mL saf su eklendi ve içerisine manyetik balık atılarak 80 ^{0}C ve 300 rpm dönme hızına ayarlanmış üzerinde yağ banyosu bulunan manyetik karıştırıcıya alındı,
- 15 dakika sonra %25'lik NH_3'dan 3 mL eklendi ve ekleme anında rengin siyaha dönmeye başladı ve madde dipte yoğunlaşmaya/çökmeye başladı,
- 15 dakika sonra önceden hazırlanmış 0.5 gr PEG 1000 alınıp 5 mL(%10'luk PEG(w/V)) etanolde çözüldü ve rxn kabına eklendi (Totelde 0.2 gr kuru demir

oksit alınıp üzerine %1'lik PEG-Etanol çözeltisi konulduysa yaklaşık 2.15 gr olan demir-oksit karışımına oran orantıdan %10'luk PEG konulmalıdır),

- 1 saat boyunca karıştırmaya devam ettikten sonra 3900 rmp'de 5 dakika santrifüj ve iki kez de yıkama yapıldıktan sonra kuruması için 60 ^{0}C'ye ayarlanmış etüve alındı, kuruduktan sonra karakterizasyon analizleri yapıldı.

3.3. Fe_3O_4 -Kersetin Sentezi

Dorniani ve arkadaşlarının 0.2 g kuru demir-oksiti alıp %2'lik(w/V) kersetin ile karıştırdığı tarif yukarıdaki sentezde olduğu gibi uyarlanmıştır (Dorniani ve ark., 2014);

- 0.0595 g $FeCl_2.4H_2O$ ve 0.140 g $FeCl_3.6H_2O$ 30 mL'lik cam viale alınıp üzerine 930 µL saf su eklenip 100 mL'lik erlene alındı ve içerisine manyetik balık atılarak 80 ^{0}C ve 300 rpm dönme hızına ayarlanmış üzerinde yağ banyosu bulunan manyetik karıştırıcıya alındı (madde miktarları kersetin için azaltıldığından çökme esnasında herhangi bir sorunla karşılaşmamak için rxn kabı değiştirilmiştir) (1:2),
- 15 dakika sonra %25'lik NH_3'dan 280 µL eklendi ve ekleme anında rengin siyaha dönmeye başladı ve madde dipte yoğunlaşmaya/çökmeye başladı,
- 15 dakika sonra önceden hazırlanmış 0.00625 gr kersetin alınıp 3125 µL (%2'lik kersetin) etanolde çözüldü ve rxn kabına eklendi,
- 1 saat boyunca karıştırmaya devam ettikten sonra 3900 rpm'de 5 dakika santrifüj ve iki kez de yıkama yapıldıktan sonra kuruması için 60 ^{0}C'ye ayarlanmış etüve alındı, kuruduktan sonra karakterizasyon analizleri yapıldı.

3.4. Fe_3O_4-PEG-Kersetin Sentezi

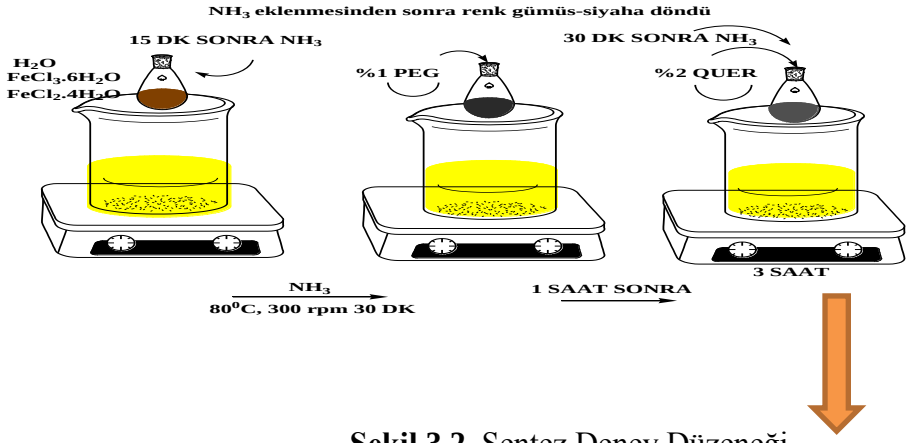
- 0.0595 g $FeCl_2.4H_2O$ ve 0.140 g $FeCl_3.6H_2O$ 30 mL'lik cam viale alınıp üzerine 930 µL saf su eklenip 100 mL'lik erlene alındı ve içerisine manyetik balık atılarak 80 ^{0}C ve 300 rpm dönme hızına ayarlanmış üzerinde yağ banyosu bulunan manyetik karıştırıcıya alındı,
- 15 dakika sonra %25'lik NH_3'dan 280µl eklendi ve ekleme anında rengin siyaha dönmeye başladı ve madde dipte yoğunlaşmaya/çökmeye başladı,

- 15 dakika sonra önceden hazırlanmış PEG1000-Etanol çözeltisi rxn kabına eklendi; 0.05 gr PEG 1000 alınıp 5 mL(%1'lik PEG) etanolde çözülerek rxn kabına ilave edildi (Tarifte totelde 0.2 g kuru demir-oksit ile %1'lik PEG rxna girdiği için madde miktarları buna göre ayarlanmıştır),
- 1 saat karışmaya devam edildikten sonra %2'lik kersetin-etanol çözeltisi de rxn kabına eklendi,
- 30 dk sonra %25'lik NH_3'dan 350 µL eklendi ve renkte yine koyulaşma gözlendi,
- 2.30 saat boyunca karıştırmaya devam ettikten sonra 3900 rmp'de 5 dakika santrifüj ve iki kez de yıkama yapıldıktan sonra kuruması için 60 ^{0}C'ye ayarlanmış etüve alındı, kuruduktan sonra analizleri yapıldı.

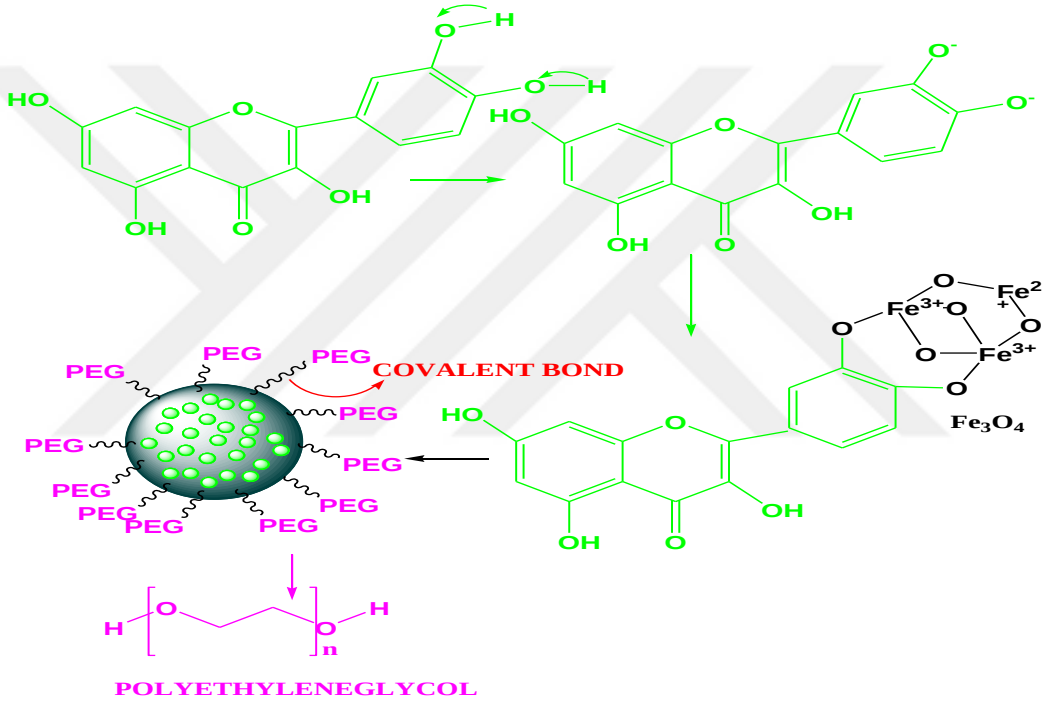
$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O$$

$$Fe_3O_4 + 2H^+ \rightarrow \gamma\text{-}Fe_2O_3 + Fe^{2+} + H_2O$$

Maddenin oluşma durumuna göre sıcaklık, dönme hızı, NH_3 ekleme zamanı ve süre gibi parametler literaturden farklı olarak değiştirilip denenmiş ve uygun sonuca gidilmiştir. ERÜ/ Ziya Eren İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan FT-IR cihazı ile iyice kuruyan sentezlenmiş maddeler havan ile öğütülerek ölçümü alındı ve yapının oluştuğu, yapıya eklenen PEG ve kersetin yapısındaki spesifik bağların IR Spektrumunda gözlemlenene kadar deney aşamasında değişiklikler yapıldı ve yapının IR'ye göre oluştuğu gözlemlendikten sonra XRD ile kristal yapısına, merkezimizdeki NTA ile parçacık boyutuna, Zeta potansiyeline, elementel analizine ve SEM görüntülerine baktırılmıştır. Metot deneme-yanılma ile oluşturulduktan ve yapının oluştuğu gözlemlendikten sonra hücre kültürü aşamasına geçilmiştir.

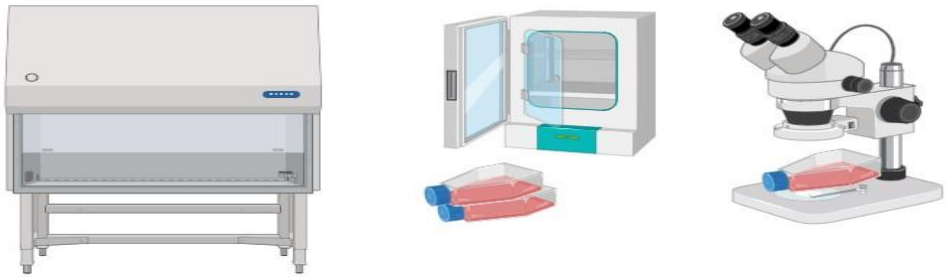


Şekil 3.2. Sentez Deney Düzeneği



Şekil 3.3. Sentezin Düzeneği ve Oluşum Mekanizması

3.5. Hücre Ekimi



Şekil 3.4. Hücre Deneyi

3.5.1. DMEM besiyeri hazırlama: (A549-kanserli akciğer hücresi için)

1. 44,5 mL DMEM besiyeri
2. 500 µL antibiyotik(penisilin)

} %10(v/v)'luk fotal bovine serum içeren DMEM besiyeri bu şekilde hazırlanmıştır.

3. 5 mL fotal bovine serum

3.5.2. RPMI besiyeri hazırlama: (BEAS2B-sağlıklı akciğer hücresi için)

1. 44,5 mL RPMI besiyeri
2. 500 µL antibiyotik(penisilin)

} %10(v/v)'luk fotal bovine serum içeren RPMI besiyeri bu şekilde hazırlanmıştır.

3. 5 mL fotal bovine serum

3.5.3. Stokdan A549 ve Beas2B hücrelerinin çıkartılması aşaması:

ERÜ-Ziya Eren İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden A549 ve Beas2B hücreleri tahsis edilmiştir. -80 ^{0}C'de muhafaza edilen A549 ve Beas2B hücrelerine hızlıca uygun besiyeri ilave edilerek eritildikten sonra 15 mL'lik steril falkonlara alınıp oda koşullarında 25 ^{0}C sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücreler dibe çöktürüldükten sonra süpernatant kısmı atılıp 1 mL uygun besiyeri içerisine konularak pipetaj yapılmıştır. 75 cm^2'lik flasklara 6 mL uygun besiyeri konulduktan sonra falkondaki hücreler ilave edilmiştir. Flasklar, %5 CO_2 ve 37 ^{0}C'ye ayarlanmış inkübatörde çoğalmaya bırakılmışlardır.

Mikroskop yardımıyla flasklardaki çoğalma durumu belli aralıklarla gözlemlenmiş ve çoğalma durumunun yeterli olduğu düşünüldüğünde flasklardaki hücreler 15 mL'lik falkonlara alınarak santrifüj edilmiştir, süpernatant kısmı atılarak içerisine 1 mL/1000 µL uygun besiyeri ilave edilmiştir. 10 µL trypan blue ve 10 µL hücre bir epondorfa alınıp pipetajlanarak sayım kartuşuna alınmıştır.

3.5.4. A549 ve Beas2b hücre sayılarının hesaplanması aşaması:

Sayım kartuşuna alınan hücreler 16 kuyucuklu e-platin her kuyucuğunda yaklaşık 10.000 hücreye tekabül edecek sayıya ulaşma durumu hesaplanmış ve hücrelerin bu sayıya ulaştığı gözlemlendiğinde e-plate için ekme aşamasına geçilmiştir (16 kuyucuk bulunan e-plate olası aksiliklere karşı 20 kuyucuk ve her kuyucukda yaklaşık 10.000 hücre olacak şekilde hesaplanmıştır). Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-QUER, Fe_3O_4-PEG-QUER ve Kersetin, maddeleri hücrelere verilmiştir.

1000 µL'de 3.940.000 hücre varsa

X 3.000.000 hücre vardır

X=764,42 ~ 765 µL hücre almalıyız

765 µL stokta 3.000.000 hücre varsa

X de 600.000 hücre vardır(3*20*10.000)

X=153 µL bu stoktan hücre almalıyız ve üzerine 6000 µL besiyeri koymalıyız(Beas 2b)

1000 µL'de 2.710.000 hücre varsa

X 2.500.000 hücre vardır

X=922,51 ~ 950 µL hücre almalıyız

950 µL stokta 2.500.000 hücre varsa

X de 600.000 hücre vardır

X= 222 µL bu stoktan hücre almalıyız ve üzerine 6000 µL besiyeri koymalıyız(A549)

1000 µL'de 4.740.000 hücre varsa(Beas2b)

X de 200.000 hücre vardır(1*20*10.000)

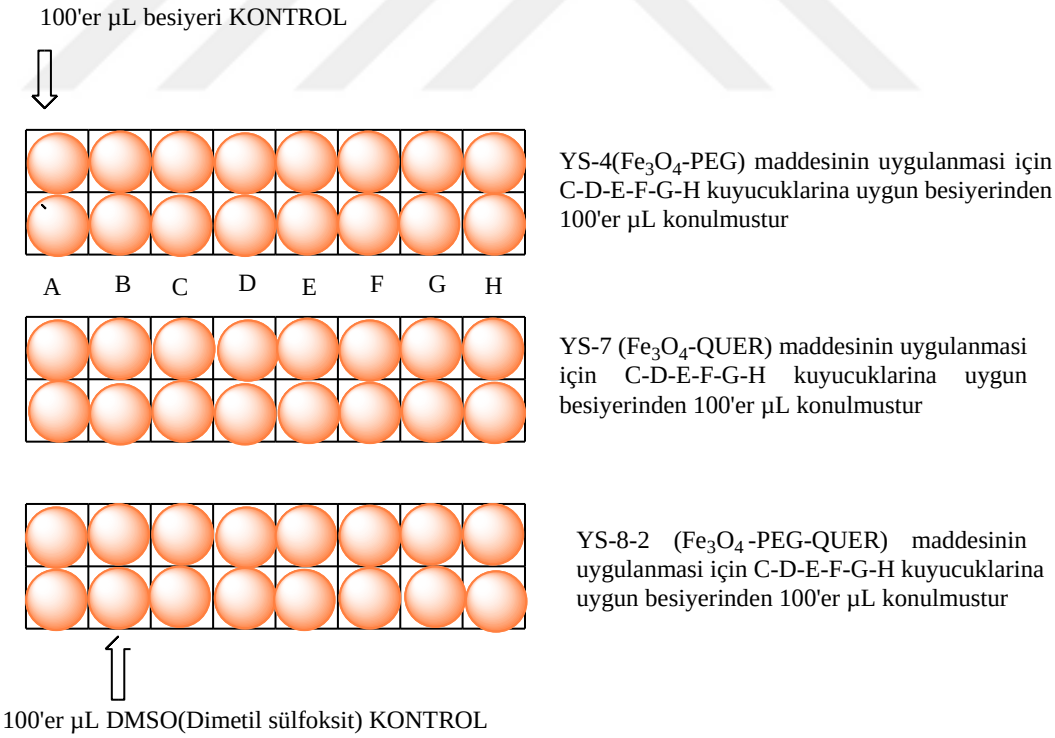
X= 42,19 µL~ 45 µL hücre stoğundan almalıyız ve üzerine 1955 µL besiyeri eklemeliyiz. Sonrasında ise 100'er µL e-plate'in kuyucuklarına ekilmiştir (Kersetin ana maddesinin hücreye verilmesi aşaması için Beas2b ve A549 hücre hesaplamaları benzer şekilde yapılmıştır).

3.5.5. A549 ve Beas2b hücrelerinin 16'lık e-plate'lere ekilmesi aşaması:



Şekil 3.5. Hücre Hazırlama

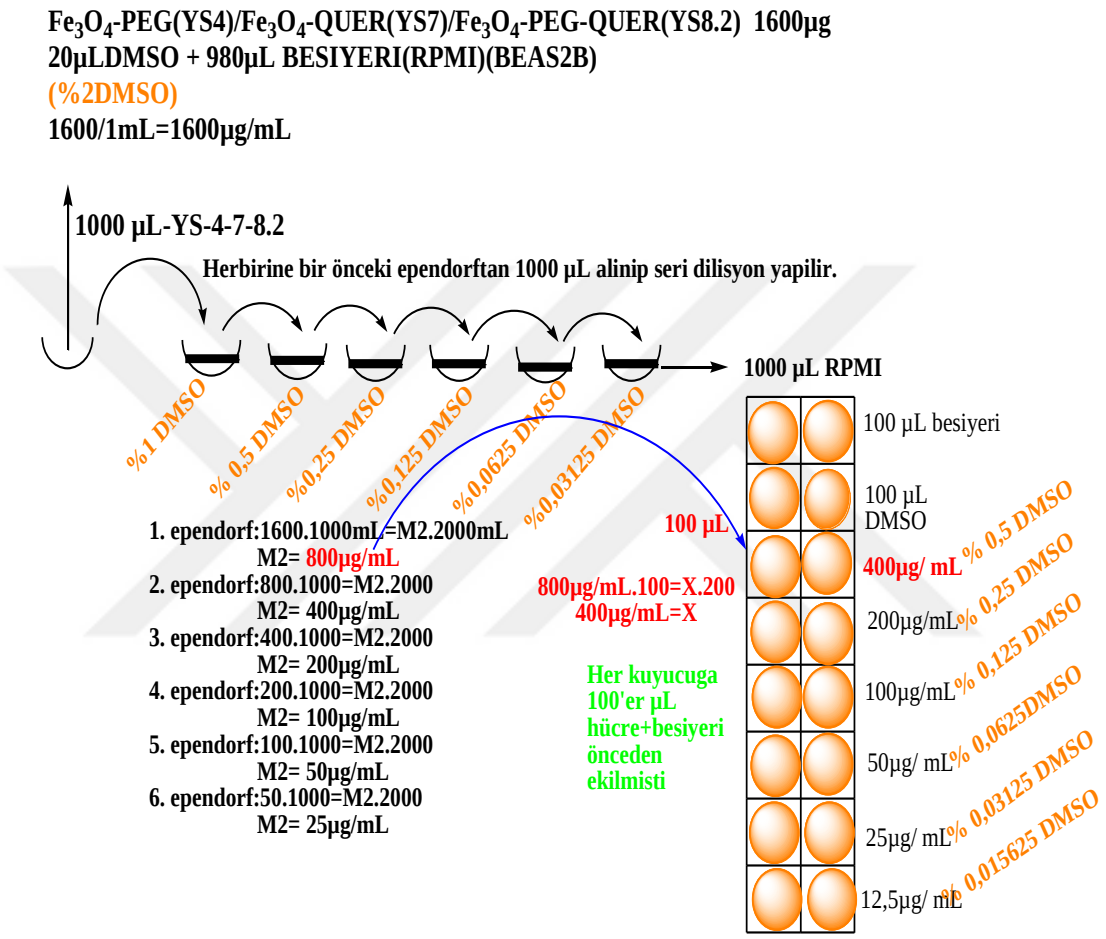
15 mL'lik steril falkon tüplere altışar mL uygun besiyeri (RPMI/DMEM) ve 153 µL Beas2B ve 222 µL A549 hücrelerinden eklenerek pipetajlanmıştır. Cihaz 16 kuyucuklu/3 e-plate için uygun bölmeye sahip olduğundan 3 eplate alınarak e-plate'in her kuycuğuna hazırlanan besiyeri-hücre karışımından 100'er µL eklenmiş ve %5 CO_2 ve 37 ^{0}C'ye ayarlanmış inkübatör içersindeki xCELLigence cihazına e-plate'ler yerleştirilip 240 nm'de okuma yapılmıştır (Şekil;9).



Şekil 3.6. E-plate'lere Hücre Ekimi

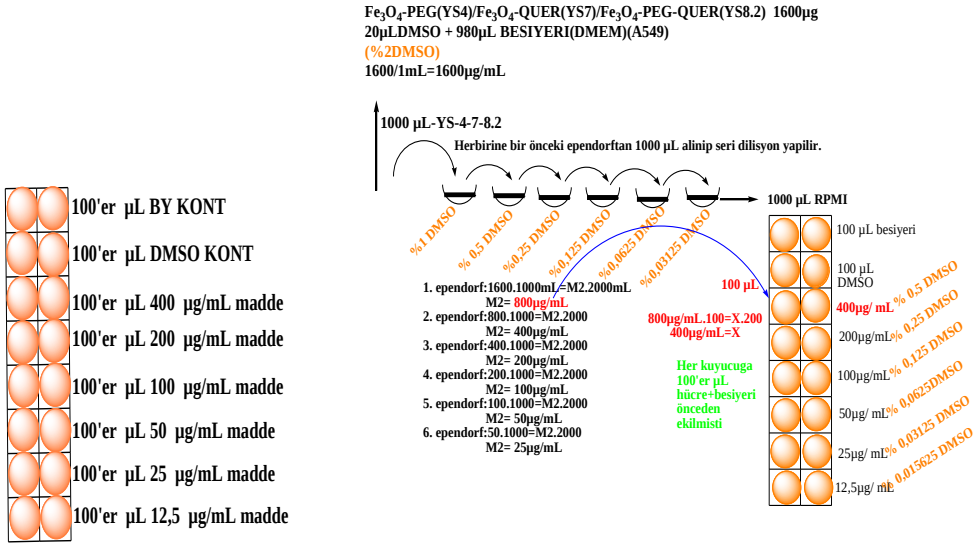
3.5.6.Hücrelere sentezlenen maddelerin verilmesi:

xCELLigence cihazındaki e-plate bölmesine konulan e-plate'lere ekilmiş olan hücrelerin, hücre indexi takip edilerek cell indexi yaklaşık olarak 1'i aştığında (hücreler platoya girmeden önce) e-plate'ler inkübatörden alınıp etkinliğine bakılacak maddeler hücrelere verilerek tekrar cihaza yerleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Uygulanacak Maddelerin Hazırlanması

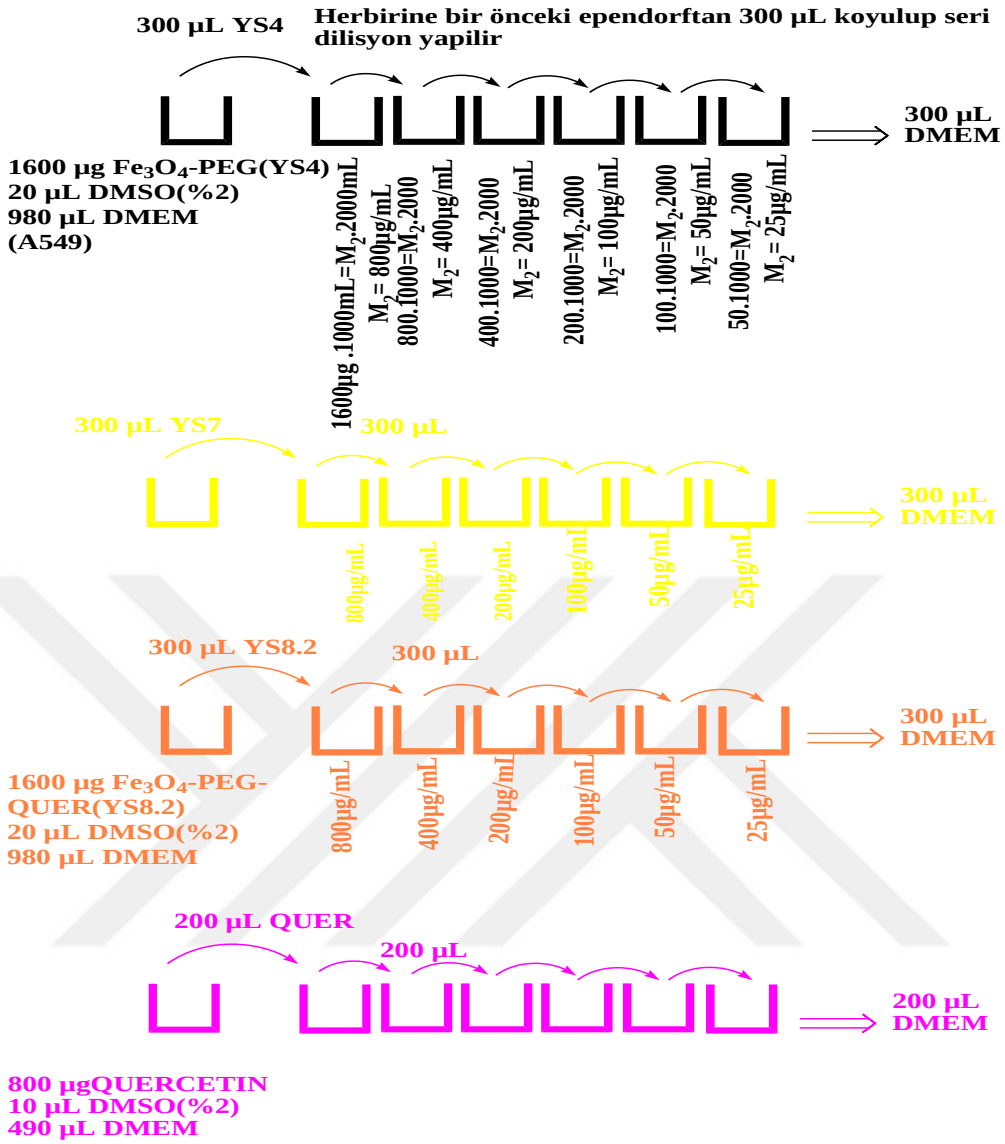
Sağlıklı akciğer hücresine(Beas2B) uygulanacak maddeler (Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-KERSETİN ve Fe_3O_4-PEG-KERSETİN) yukarıdaki şekilde gösterildiği gibi 6 farklı konsantrosyonda hazırlanmış ve önceden e-plate'e ekimi yapılmış hücrelere 100'er µL verilmiştir (Şekil;10). E-plate'lere başta 100'er µL besiyeri-hücre stoğu konulduğundan sonrasında ise yine 100'er µL madde verildiği için konsantrosyon yarıya düşmüş ve en yüksek konsantrosyon 400 µg/ml iken en düşük konsantrasyon ise 12,5 µg/ml olmuştur.



Şekil 3.8. Uygulanan Maddelerin Konsantrasyonları

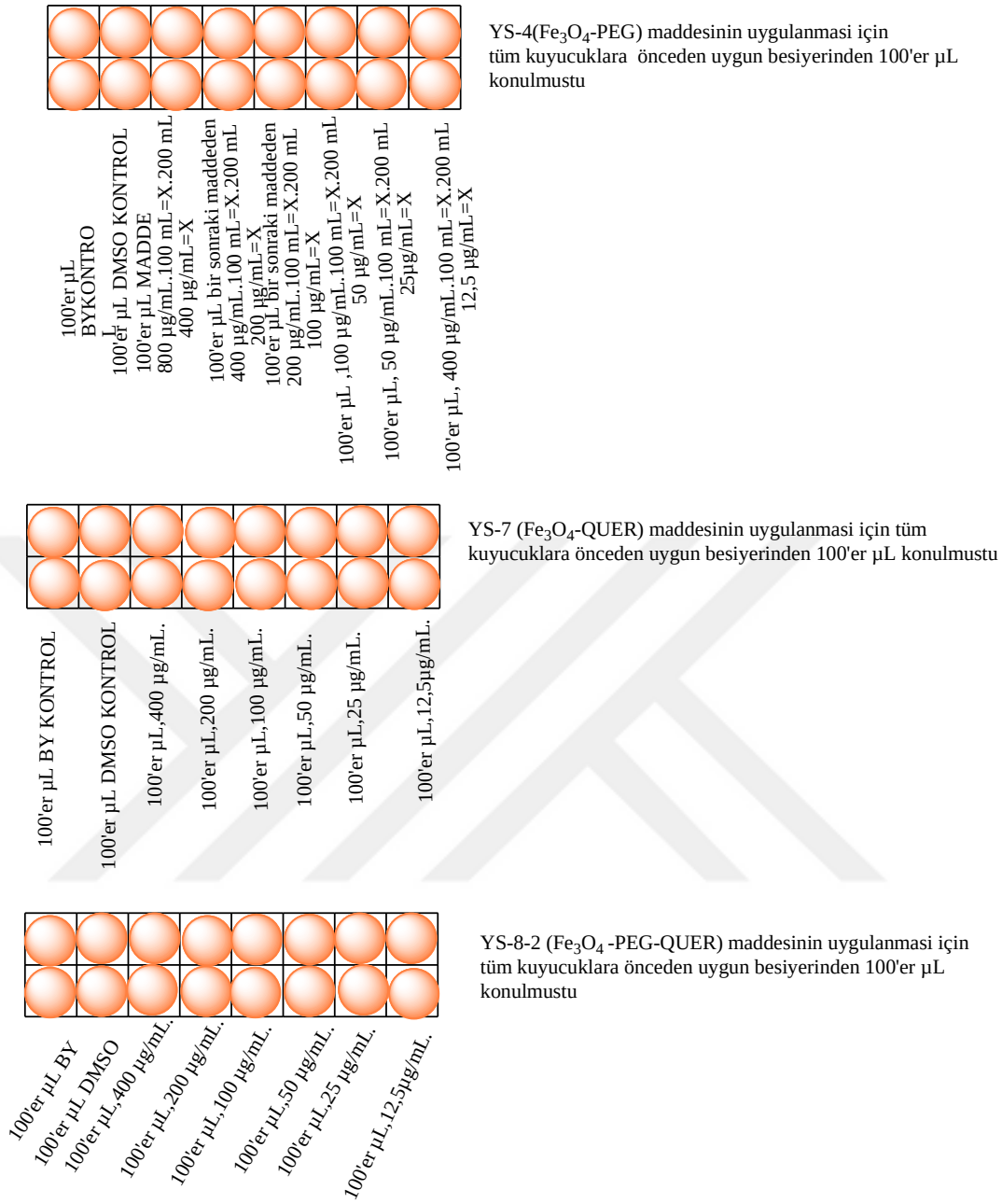
Kanserli akciğer hücresine (A549) uygulanacak maddeler, yukarıdaki şekilde gösterilen biçimde (Beas2B hücresine uygulanan maddelere benzer şekilde) hazırlanmıştır (Şekil 11). A ve B kuyucuklarına sırasıyla yüzer µL besiyeri/DMEM ve DMSO (konrol grupları) konulmuştur. 6 farklı konsantrosyonda hazırlanmış olan maddeler (800, 400, 200, 100, 50 ve 25 µg/ml) C, D, E, F, G, H kuyucuklarında bulunan hücrelere uygulanmıştır. E-plate'lere başta 100'er µL besiyeri-hücre stoğu konulduğundan sonrasında ise yine 100'er µL madde verildiği için konsantrosyon yarıya düşmüş ve hücrelere uygulanan maddelerin en yüksek konsantrosyonu 400 µg/ml olurken en düşük konsantrasyonu ise 12,5 µg/ml olmuştur (Şekil; 12).

Kersetin ana maddesinin hücrelere uygulanması aşamasında yine 100'er µL uygun besiyeri e-platelere ekilmiştir (RPMI-Beas2B/ DMEM-A549). E-plate'ler xCELLigence cihazına yerleştirilmiş ve hücreler yeterince çoğalıp platoya girmeden önce kersetin (ana madde), yine aynı konsantrasyonlarda olacak şekilde (400, 200, 100, 50, 25 ve 12,5 µg/ml) hücrelere verilmiş ve okuma yapılmıştır.



Şekil 3.9. A549 için Uygulanacak maddelerin Hazırlanması

Etkinliğine bakılacak olan YS4(Fe_3O_4-PEG), YS7(Fe_3O_4-QUER) ve YS8-2(Fe_3O_4-PEG-QUER) sentezlerinden ve etken madde kersetinden 1600µg tartılıp üzerine 980 µL uygun besiyeri (RPMI/DMEM) ve 20µL DMSO(dimetil-sülfoksit) konularak 1600 µg/mL konsantrasyonunda etken maddeler hazırlanmış ve önceden 1000'er ve 300'er µL besiyeri konulmuş ependorflara sırasıyla 1000'er ve 300'er µL etken madde pipetajlanarak konulmuş ve önceki ekimde olduğu gibi seri dilüsyon yapılmıştır (Şekil;12-13).



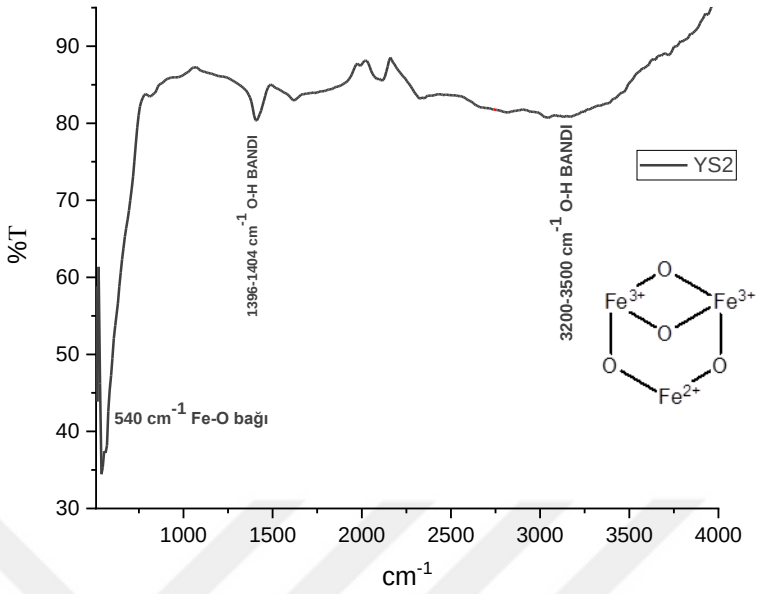
Şekil 3.10. A549 Hücresine Uygulanacak Maddeler ve Konsantrasyonları

4. BULGULAR

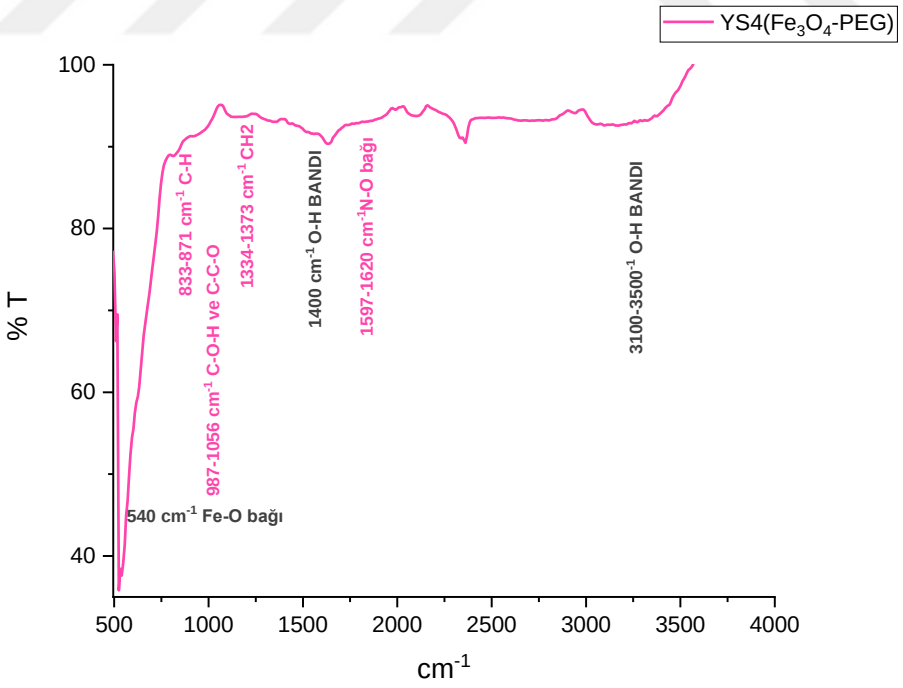
4.1. Fe_3O_4/ Fe_3O_4-PEG/ Fe_3O_4-QUER/ Fe_3O_4-PEG-QUER Sentezlerinin Karakterizasyonu

4.1.1.FT-IR Sonuçları

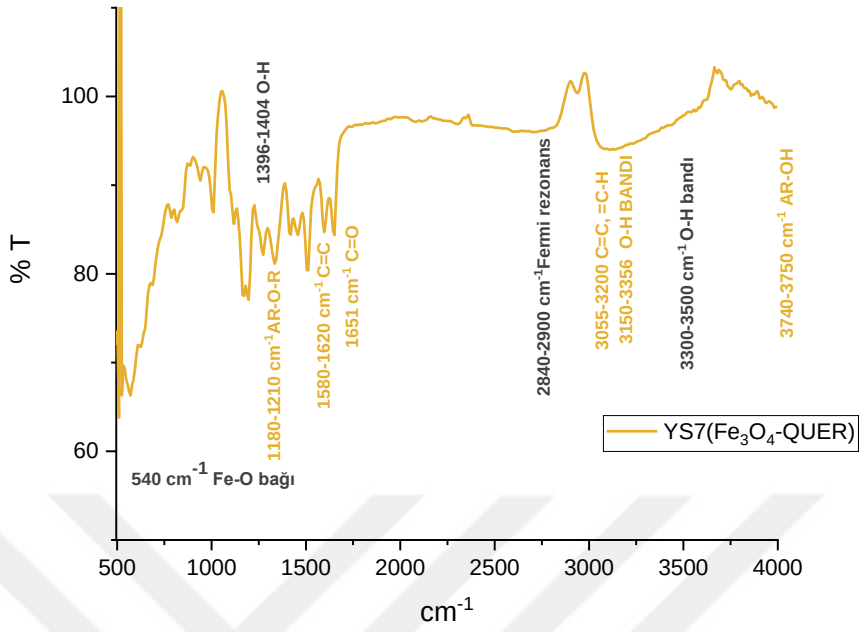
Infared ışınlarını maddeye göndererek 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında % Transmitans'ına (Geçirgenlik) karşı oluşan pikler analiz edilmiştir. Yapıda bulunan bağların atomları arasında bulunan elektronegatiflik farkına göre pikler oluşmuştur, elektronegatiflik ne kadar fazla ise, Fe-O bağında olduğu gibi, pik şiddeti o kadar büyük gelmiştir (Şekil;14). FT-IR ile Fe-O, C=C, C=O, O-H gibi maddemizde bulunan spesifik piklere bakılmıştır.



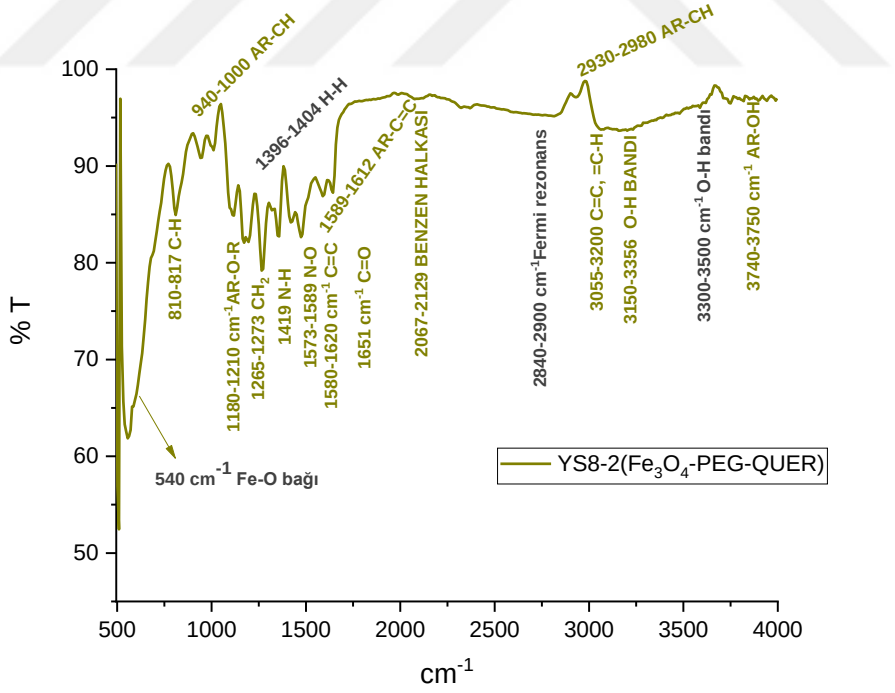
Şekil 4.1. Fe_3O_4 IR SPECTRUM



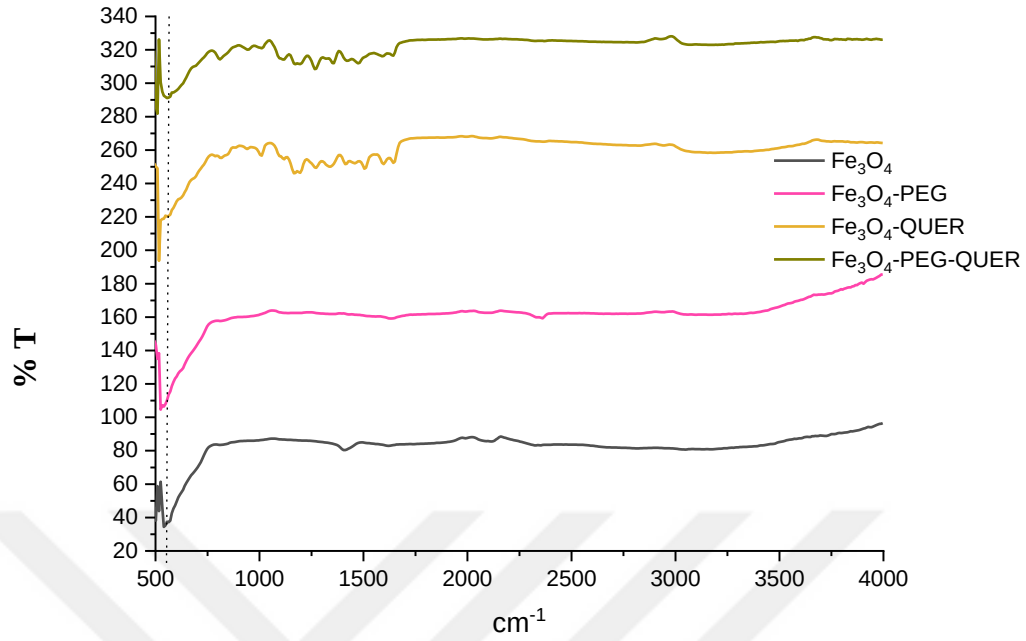
Şekil 4.2. Fe_3O_4–PEG IR SPECTRUM



Şekil 4.3. Fe_3O_4–QUERCETIN IR SPECTRUM



Şekil 4.4. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN IR SPECTRUM



Şekil 4.5. Sentezlenen Maddelerin Toplu Grafik Gösterimi

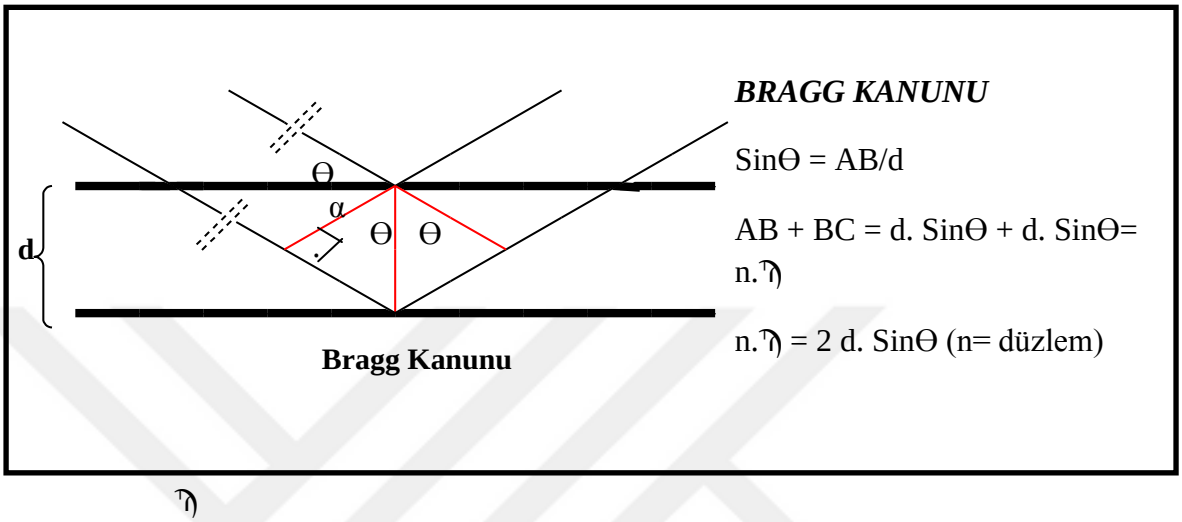
540-555 cm^{-1} ٦ aralığında demir oksit yapısındaki Fe-O bağı pik verirken(Shah ve ark., 2017), 3200-3500 ٦ aralığında O-H bağı piki gözlemlenmiştir (Shah ve ark., 2019). 1651 cm^{-1} ٦ aralığında kersetinden gelen C=O bağı (Bukhari ve ark., 2009) ve 1597-1620 ٦ aralığında N-O bağı piki görülürken (Kumar ve ark., 2014; Shah ve ark., 2017), 1344-1375 cm^{-1} CH_2 piki ve C-C-O / C-O-H 987-1056 cm^{-1} piki görülmüştür. C-H piki 833-871 cm^{-1}ve 1589-1612 cm^{-1} C=C AR.HALKA (Cheng ve ark., 2015) pik vermiştir (Şekil;14-18).

4.1.2. XRD Sonuçları

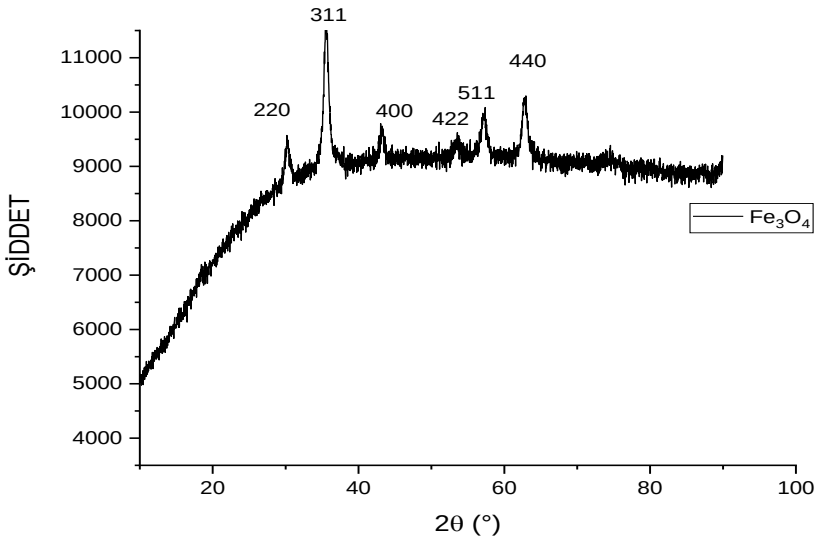
Bu çalışmada avantajlarının çok olmasından dolayı birlikte çöktürme yöntemi tercih edilmiştir. Hava ortamında gerçekleştirilen sentezde $FeCl_2.4H_2O$ ve $FeCl_3.6H_2O$ su ile çözdürülerek manyetit haline getirilmiştir. Anti-kanser etkisine bakılacak olan kersetin ve PEG sentezlenen demir-oksite 80^0C'lik yağ banyosunda bağlanmıştır.

Sentezlenen maddemizin karakteristik tayini aşamasında ise Fe_3O_4 partikülleri nanometre boyutunda olduğu için ve bu boyuta da tekabül eden X-ışını (0.01-10nm) kullanılarak yani XRD (X-ışınları Difraktometresi) kullanılarak maddemizin kristal yapısı belirlenmiştir. Demir iyonlarının, Tetrahedral ve Oktahedral alanlarındaki

dağılımı, düzlemler arasındaki mesafe (d) ve kübik yapıya Θ açısıyla gelen X ışının kırınımını baz alarak Bragg Yasası'ndan atomlar arasındaki mesafelerin H, K ve L değerleri HighScore programından hesaplanarak manyetitin kristal yapısının oluşup oluşmadığı tespit edilmiştir (Şekil 20-24).

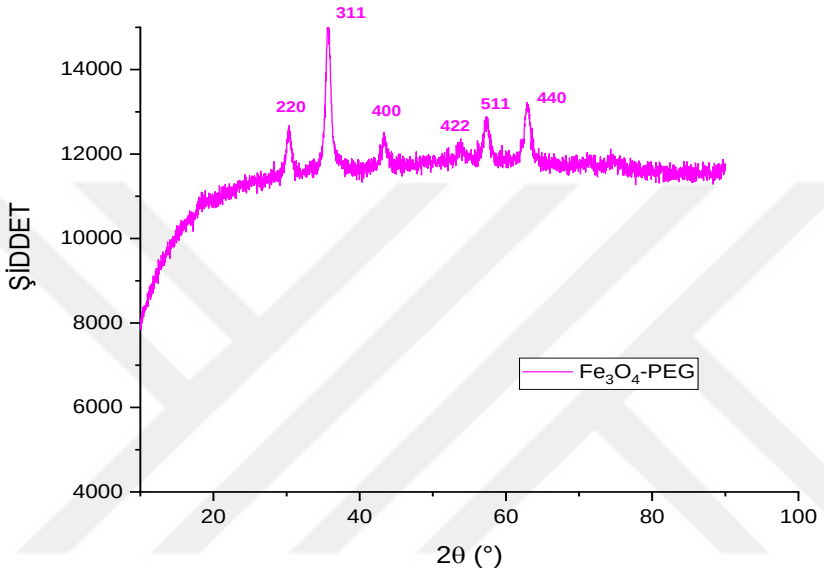


Şekil 4.6. Bragg Kanunu

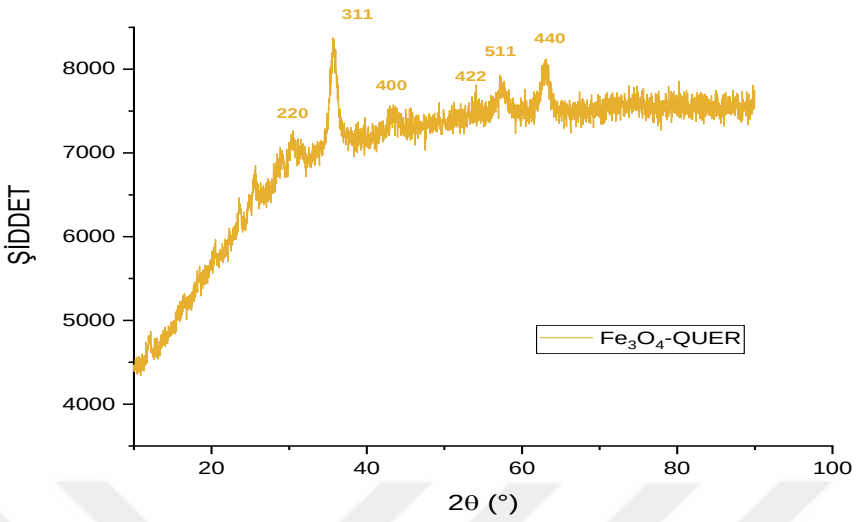


Şekil 4.7. Fe_3O_4 XRD GRAFİĞİ

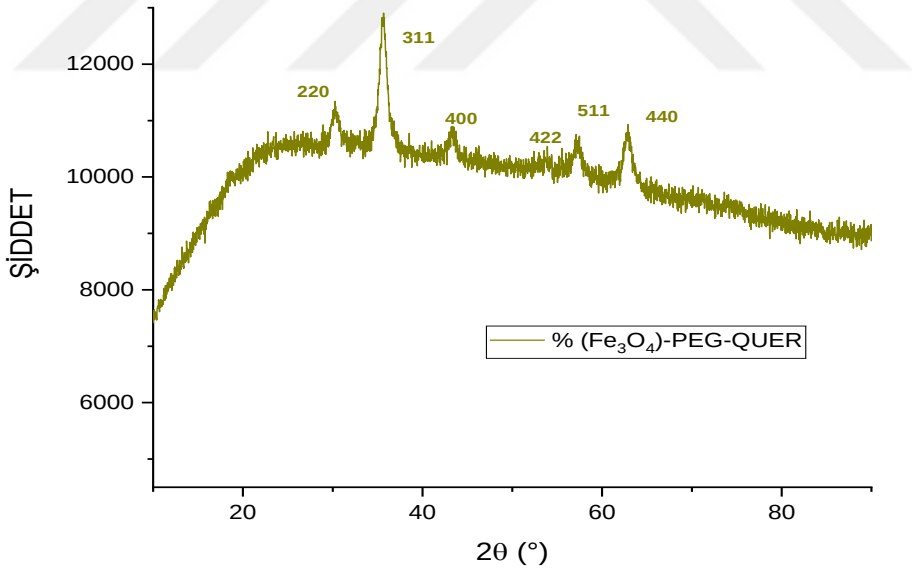
Fe_3O_4 yapısında 30, 35, 43, 53, 57 ve 62(62,87) 2Θ değerleri olan (ICPDS No: 88-0315); Bragg yansımaları ise 220, 311, 400, 422, 511, 440 olan kübik kristal yapı oluşmuştur (Dorniani ve ark., 2012). Sentez sırasında eklenen PEG ve kersetin maddelerinin demir oksitin kübik yapısını koruyup bağ yaptığı XRD grafiklerinin aynı açıda şiddet vermesinden de anlaşılabilmektedir (Şekil; 24).



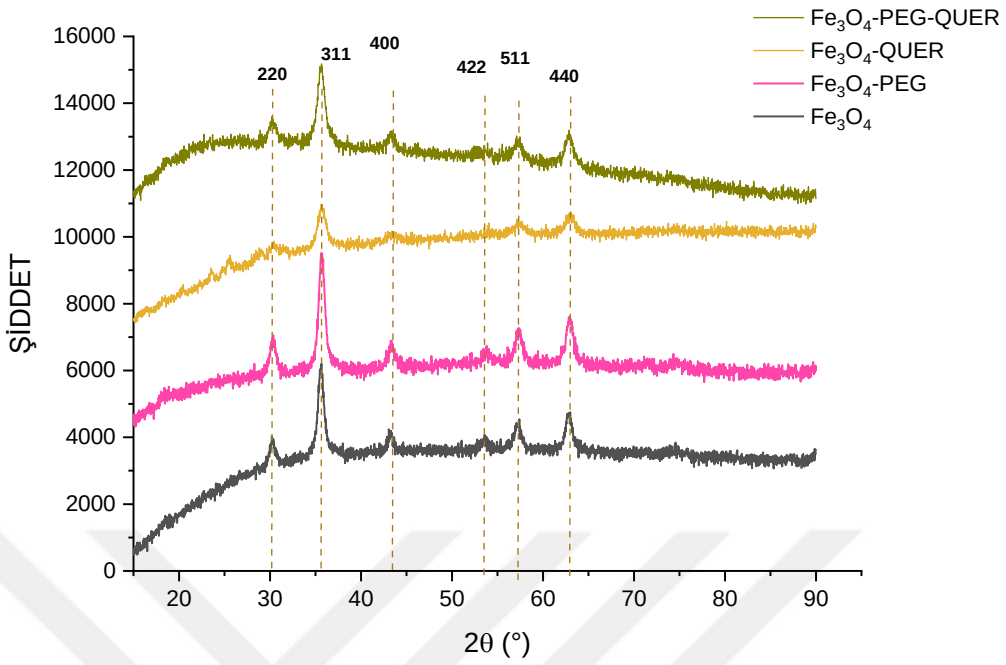
Şekil 4.8. Fe_3O_4-PEG XRD GRAFİĞİ



Şekil 4.9. Fe_3O_4-QUERCETIN XRD GRAFİĞİ



Şekil 4.10. Fe_3O_4-PEG-QUER XRD GRAFİĞİ



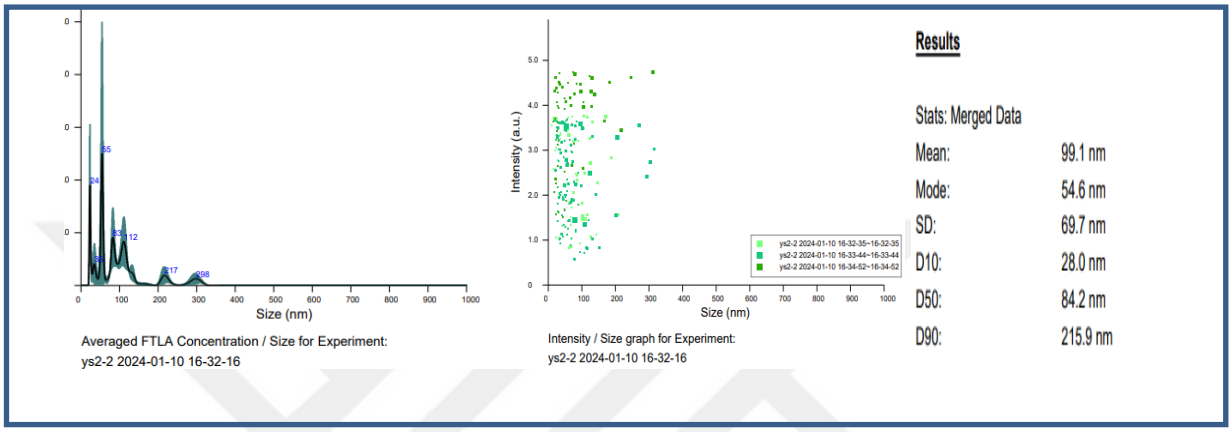
Şekil 4.11. Tüm Sentezlerin Toplu XRD Grafiği

4.1.3. NTA(Nanoparticle Tracking Analysis) Sonuçları

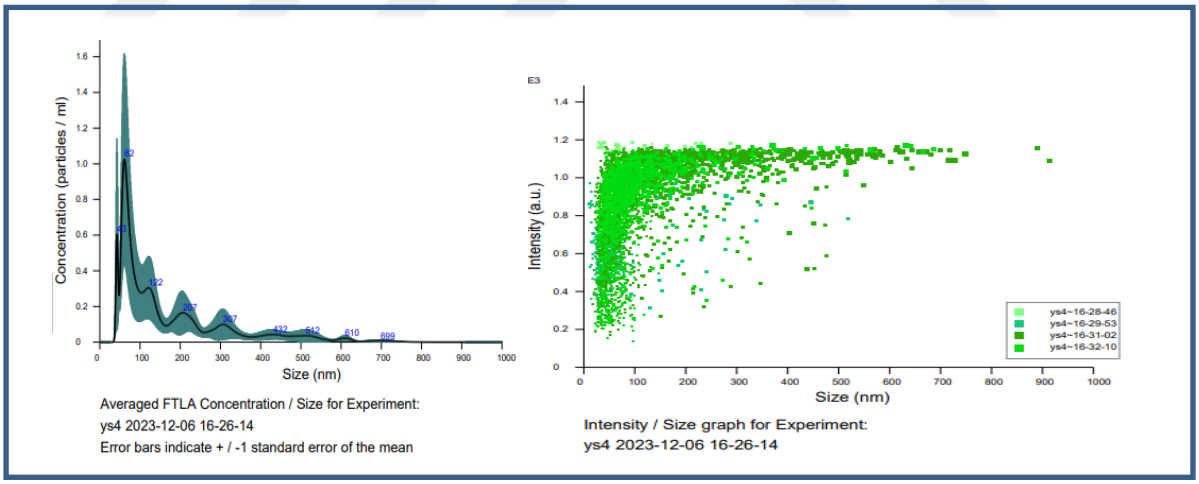
NTA analizi ile MNP'nin nanometre cinsinden boyut analizi yapılmıştır; sentezlenen Fe_3O_4, Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-QUER ve Fe_3O_4-PEG-QUER maddelerinden 1 mg tartılıp 2000 µL etanol içerisinde çözdürülüp NTA cihazında boyut analizleri yapıldı. NTA cihazında örneğe gönderilen lazer ışınının örnekteki taneciklere çarparak saçılmalarını ve Brown hareketlerini analiz ederek boyut ölçümü yapmaktadır. Blue405 lazer tipi olan NTA cihazını, oda sıcaklığına (24 ^{0}C) ve şırınga pompa hızı 100'e ayarlarak, sentezlenen maddeler cihaza verildi ve ölçümler dört tekrarlı yapıldı ancak ilk ölçüm şırıngada önceki analizlerden kalabilecek örnek olması ihtimaline karşı ortalamaya katılmadı. Sonraki üç ölçümün ortalaması baz alındı.

Fe_3O_4 boyut analizinde boyut ortalama 99.1 nm iken 54.6 nm'de en şiddetli piki(mod) vermiştir. 54,6 nm büyüklüğündeki parçacıkların sayısı fazla olduğundan demir oksit bu noktada en güçlü piki vermiştir (Şekil 5). Demir oksit, PEG ile kaplandığında polimerin yapıya bağlanmasıyla boyutta artış gözlenmiş ve ortalama boyut 170,5 nm'ye yükselmiştir (Şekil 6). Kersetin, demir oksit yapısına bağlandığında parçacık boyutu Fe^{2+}/ Fe^{3+} miktarlarının azaltılmasından dolayı küçülmüş ve daha dar bir yelpazede

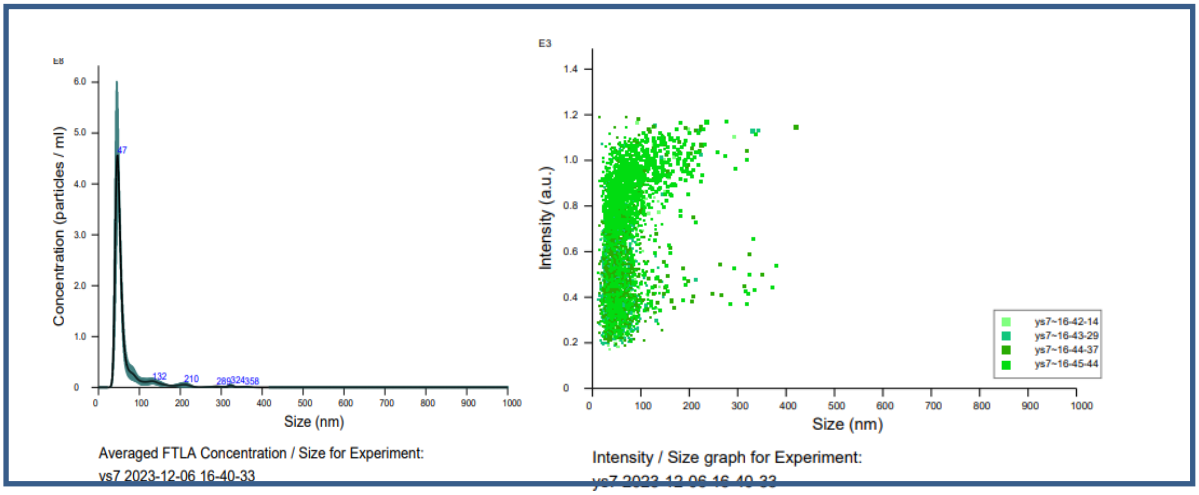
dağılım göstermiştir, yine 1:2 oranında Fe^{2+}/ Fe^{3+} katyonları ortama katılarak demir-oksit sentezlenmiştir ancak kersetin pahalı bir madde olduğundan kersetin için sadece miktarlar düşürülmüştür (Ortalama boyut: 66,6 nm) (Şekil 7). PEG, Demir oksit-Kersetin yapısına bağlandığında parçacık boyutu, Demir oksit-Kersetin yapısına göre artış göstermiş ancak parçacık boyutu np'ların bulunduğu 1-100 nm aralığında kalmıştır (Şekil 8).



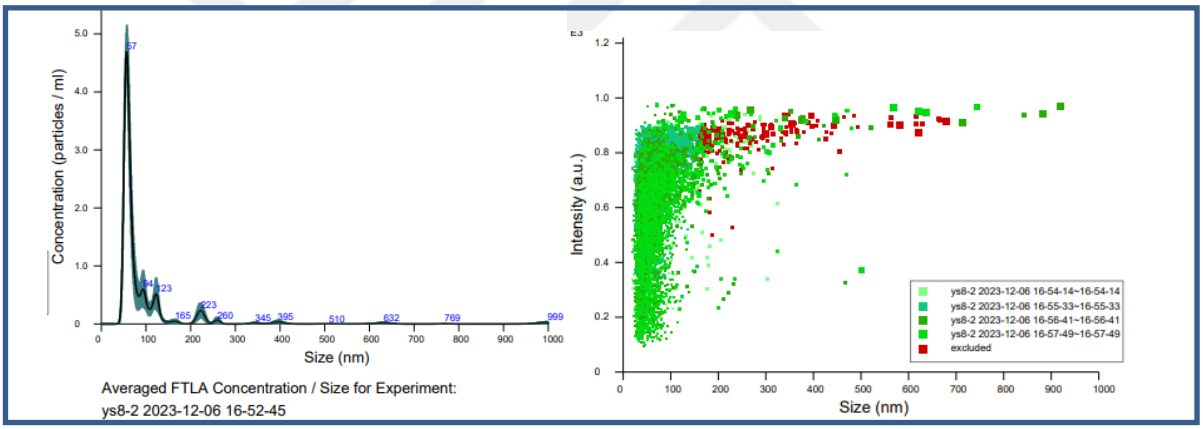
Şekil 4.12. Fe_3O_4 Maddesinin NTA Sonucu



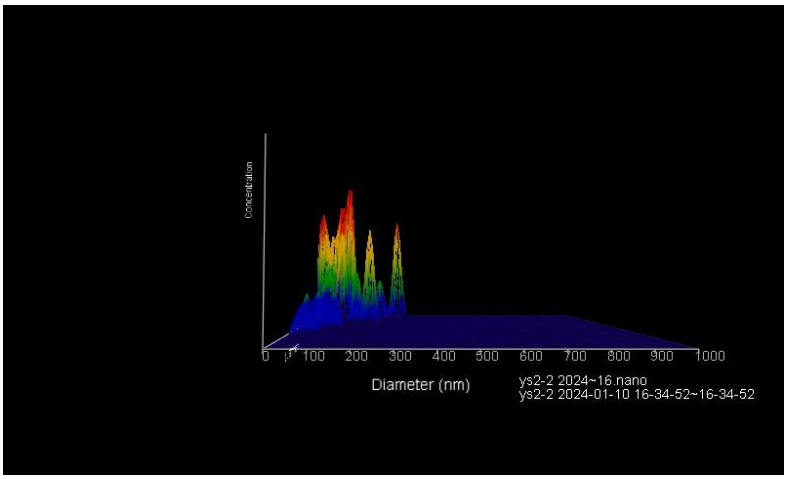
Şekil 4.13.Fe_3O_4-PEG maddesinin boyut ortalanası 170.5 nm iken en şiddetli piki 61.1 nm'de vermiştir



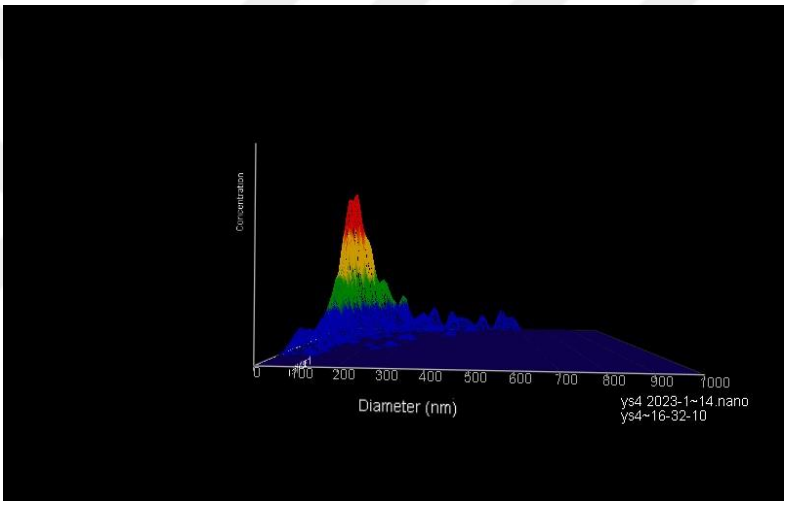
Şekil 4.14. Fe_3O_4-QUERCETIN maddesinin boyut ortalanası 66.6 nm iken en şiddetli piki 46.2 nm'de vermiştir



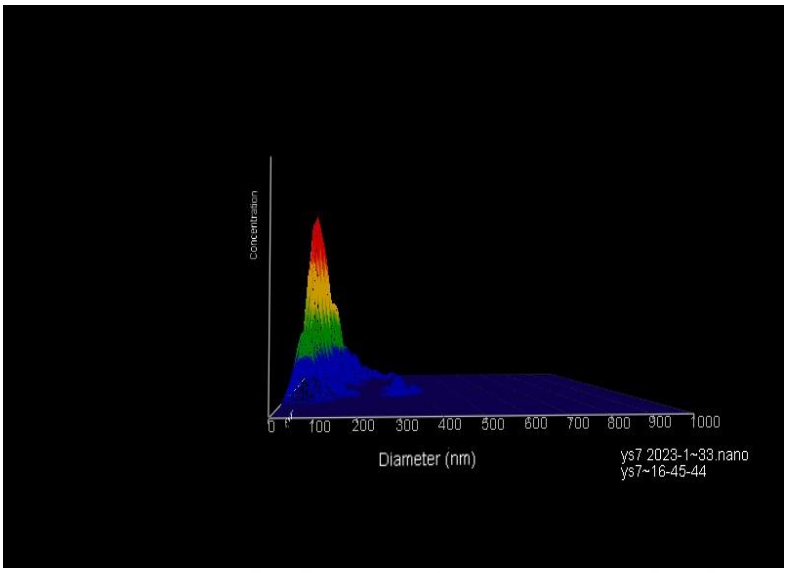
Şekil 4.15. Fe_3O_4-PEG-QUER maddesinin boyut ortalanası 96.8 nm iken en şiddtli piki 56.6 nm'de vermiştir



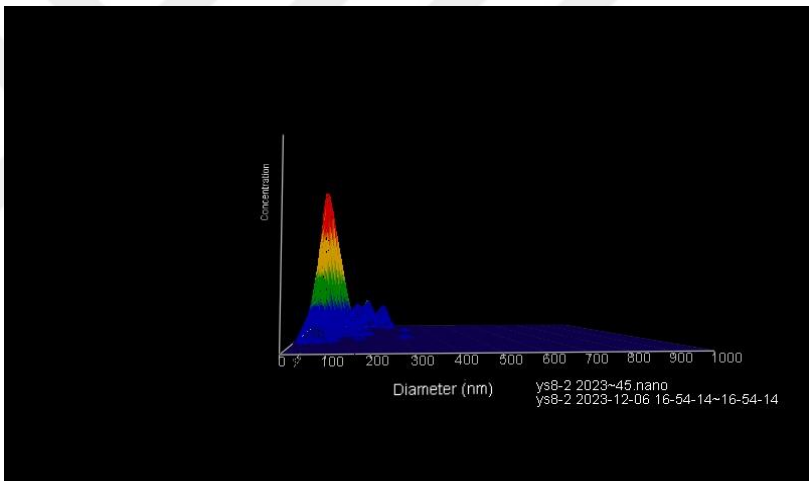
Şekil 4.16. Fe_3O_4 maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü



Şekil 4.17. Fe_3O_4–PEG maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü



Şekil 4.18. F_3O_4–QUERCETIN maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü



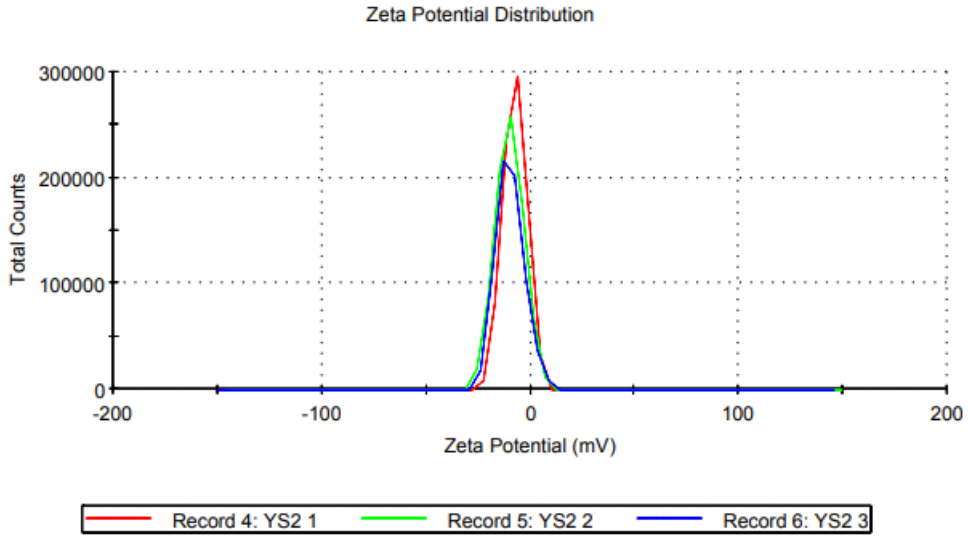
Şekil 4.19. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN maddesinin boyut analizinin 3 boyutlu görüntüsü

4.1.4. Zeta Potansiyel Sonuçları

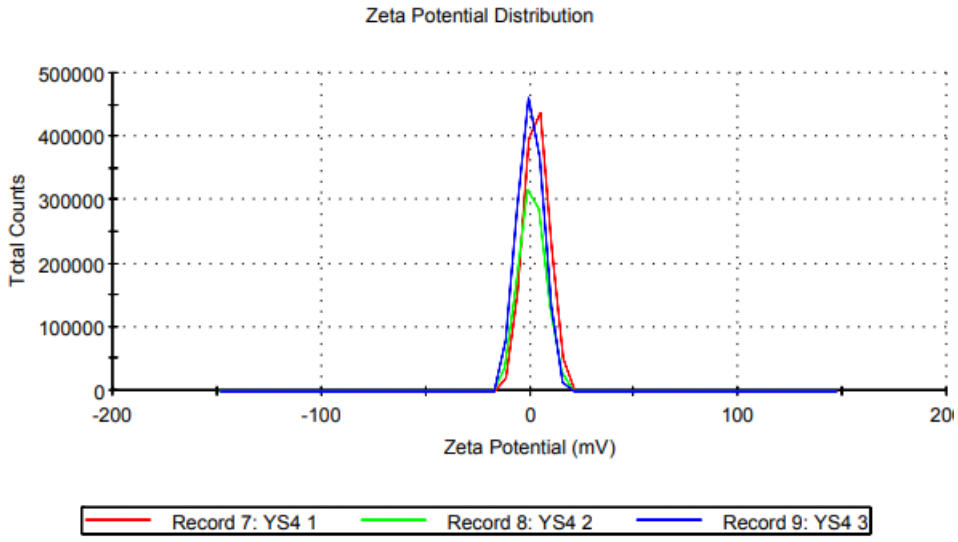
Zeta-Sizer cihazı ile Fe_3O_4, Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-QUER ve Fe_3O_4-PEG-QUER maddelerinin Zeta Potansiyellerine bakılmıştır. Hücreye uygulanacak olan maddelerin elektrostatik etkileşim ile negatif olan hücreye nüfuz edebilmeleri açısından Zeta-Potansiyellerine bakılmıştır.

1 mg Fe_3O_4, Fe_3O_4-PEG ve Fe_3O_4-PEG-QUER maddelerinden tartılarak 1000 µL etanol içerisinde çözdürülerek cihaza verilirken Fe_3O_4-QUER maddesi de yine 1 mg tartılıp 2000 µL etanol içerisinde çözdürülerek cihaza verilmiştir (Madde çok yoğun olduğu için sağlıklı sonuç edebilmek adına 10 kat daha etanol ile seyreltilmiştir; 1000 µL olarak

hazırlanan maddeden 10 µL alınıp 990 µL etanol ile seyreltilmiştir). Oda koşullarında üç tekrarlı olarak yapılan ölçümlerin ortalamaları baz alınmıştır.

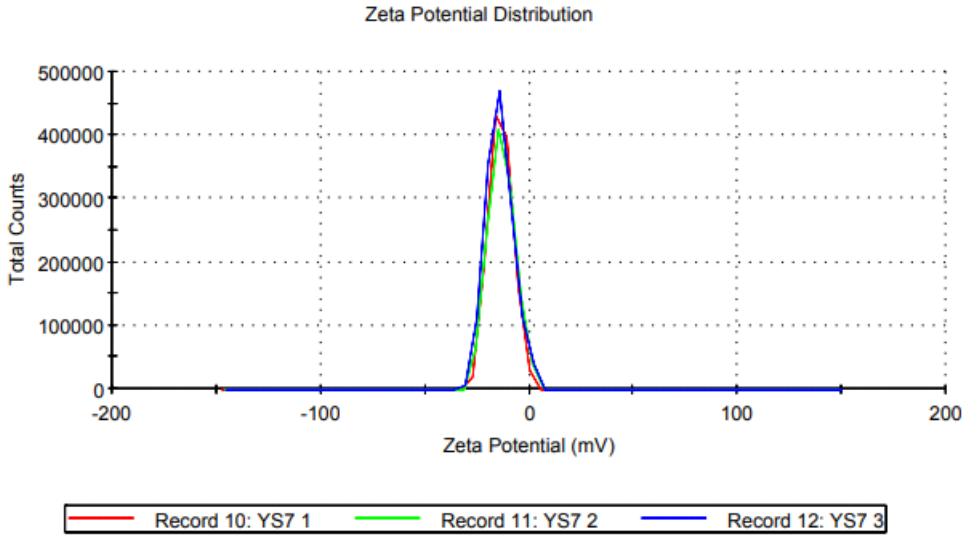


Şekil 4.20. Fe_3O_4 maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği

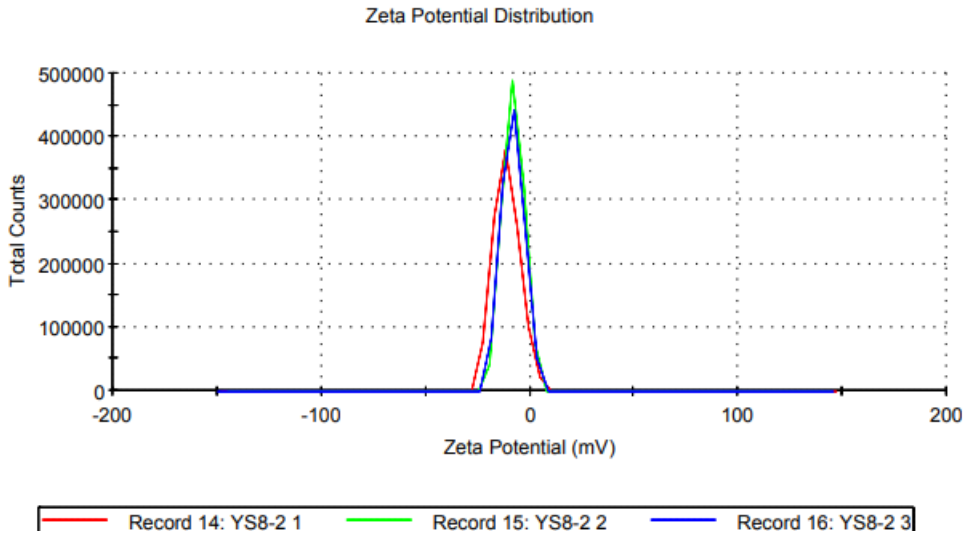


Şekil 4.21. Fe_3O_4–PEG maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği

Polietilen-glikol, nötr yüklü bir madde olduğu için negatif olan demir-oksit maddesini pozitif alana doğru kaydırmıştır.

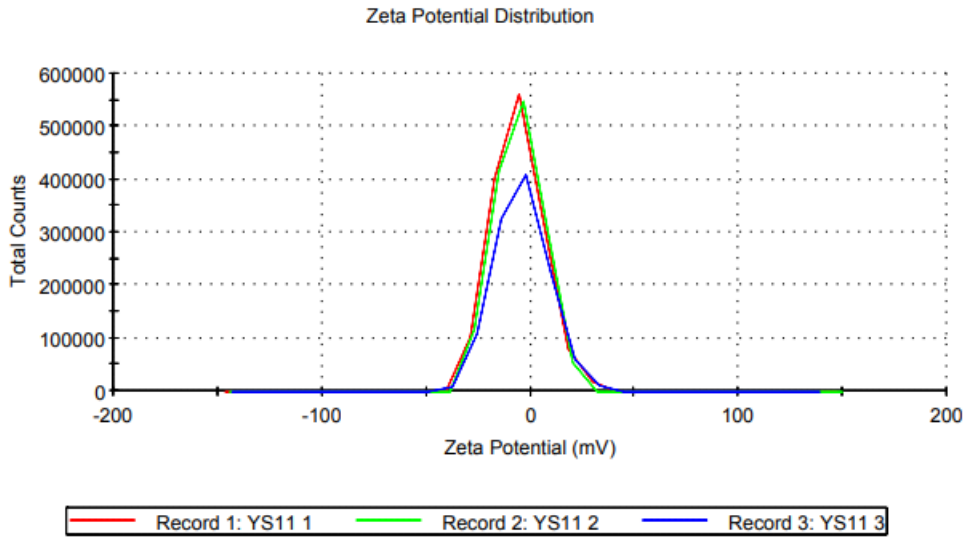


Şekil 4.22. Hem demir-oksit hem de kersetin negatif yüklü oldukları için maddenin negatifliği artmıştır.



Şekil 4.23. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği

Polietilen-glikol maddenin negatifliğini yine azaltmıştır ve bu sebeple PEG miktarı artıralarak madde nötral alana doğru kaydırılmaya çalışıldı ancak PEG nötr olduğu, artı yüklü bir madde olmadığı için her ne kadar negatifliği düşürse de birkaç deneme sonucunda da yük nötre kaymadı (Hücre negatif yüklü olduğu için elektrostatik etkileşim ile de hücreye nüfus edilebilmesi açısından bu denemeler yapılmıştır).



Şekil 4.24. Fe_3O_4–PEG-QUERCETIN maddesinin Zeta-Potansiyel Grafiği

.PEG miktarı 3 katına çıkarıldığında Zeta-potansiyeli -4.04 mV çıkmıştır, bu analizin asıl amacı yükü pozitif alana kaydırmak olduğu için FT-IR ile istenen pikler gözlemlendiğinde Zeta potansiyeline bakılmıştır ve istenilen sonuç elde edilemediği için diğer analizleri yapılmamıştır.

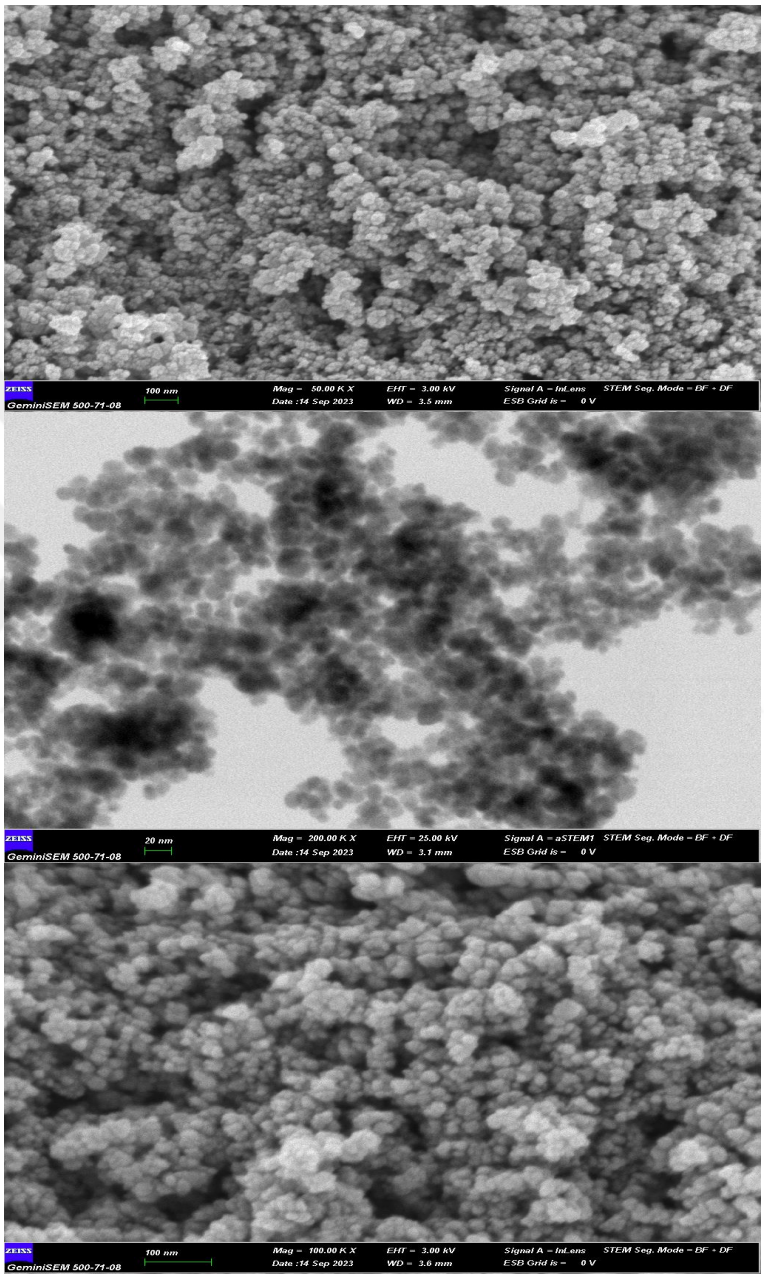
Tablo 4.1. Zeta Potansiyel değerleri

Sentezlenen madde ismi	Zeta Potansiyelleri	Birim
Fe_3O_4	-9.74	mV(milivolt)
Fe_3O_4-PEG	0.183	mV
Fe_3O_4-QUER	-14	mV
Fe_3O_4-PEG-QUER	-8.18	mV
Fe_3O_4-PEG-QUER(deneme)	-4.04	mV

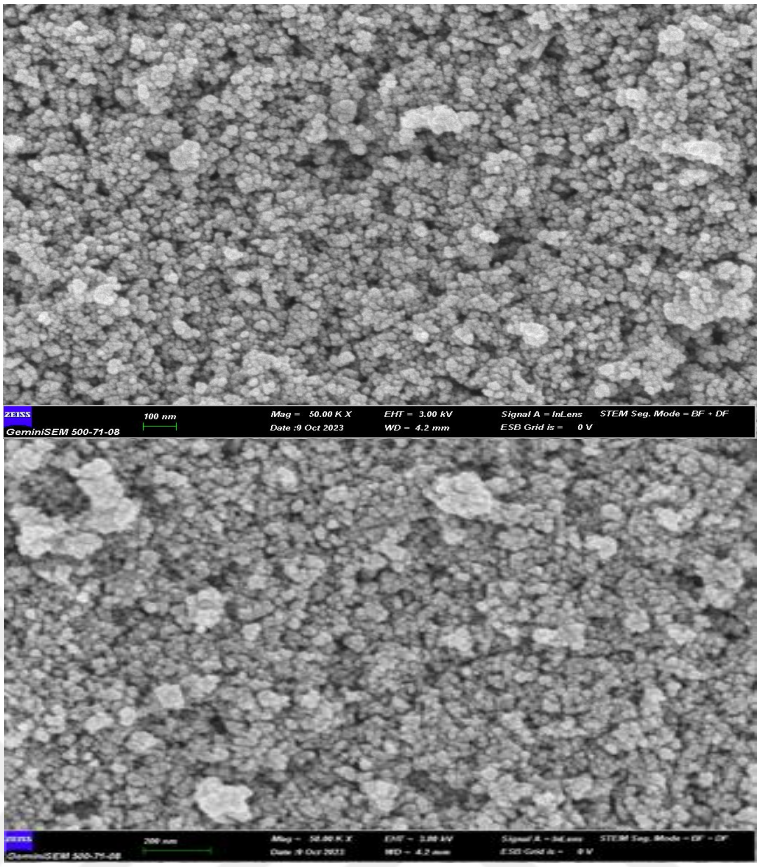
4.1.5. SEM Görüntüleri (Taramalı Elektron Mikroskobu)

Sentezlenen demir oksit yapılarının morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analiz edilmiştir (Şekil;37-41). Kersetin içeren veya içermeyen fonksiyonelleştirilmiş

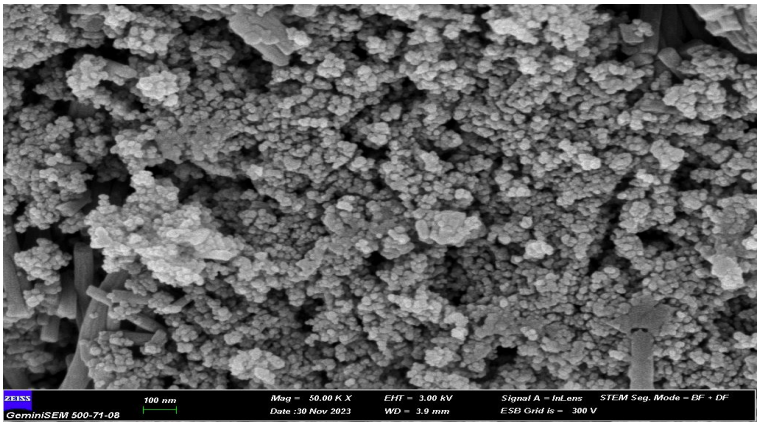
MNP'ların yüksek çözünürlüklü elektron mikroskobu görüntüleri 100-200 nm skalasında gösterilmektedir. Görüntülerden parçacıkların düzgün boyut dağılımına sahip küresel bir şekilde olduğu gözlemlenmiştir. Nanoparçacıklar, manyetik etkileşimler nedeniyle resimlerde de görüldüğü üzere topaklanma eğilimi göstermişlerdir.



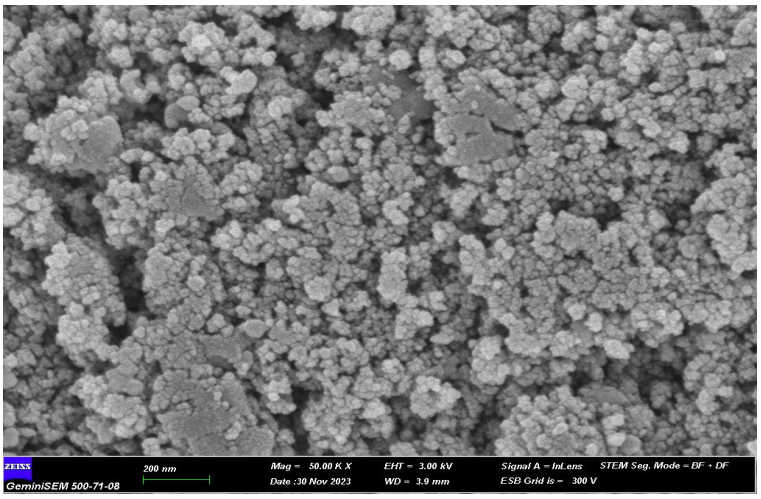
Şekil 4.25. Demir-oksit(Fe_3O_4) yapısının SEM görüntüleri(Scale bar: 100nm)



Şekil 4.26. Fe_3O_4-PEG yapısının SEM görüntüleri(Scale bar:200;100nm)



Şekil 4.27. Fe_3O_4-QUER yapısının SEM görüntüleri(Scale bar:100nm)

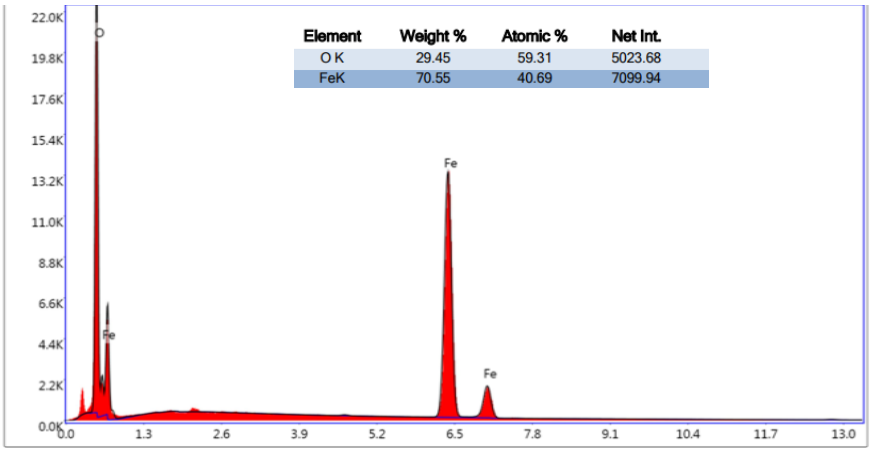


Şekil 4.28. Fe_3O_4-PEG-QUER yapısının SEM görüntüleri(Scale bar:200nm)

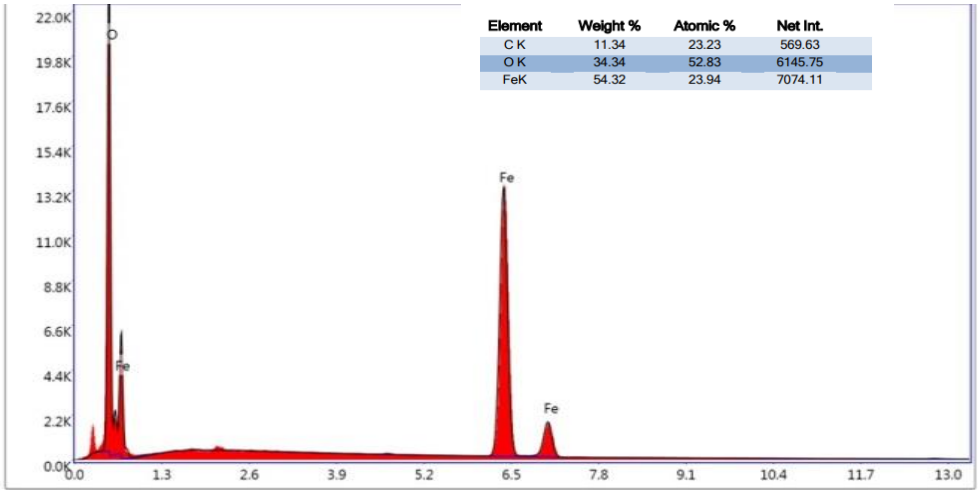
Demir-oksit maddesinin boncuk boncuk şeklindeki yapısı demir-oksite bağlanan her madde de gözlemlenmiştir.

4.1.6. EDX(Elementel Analiz) Sonuçları

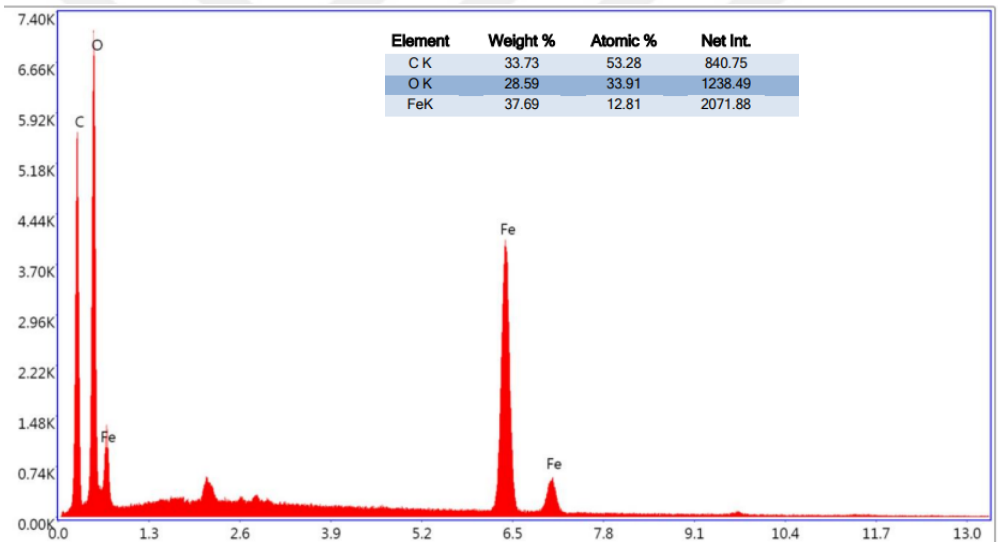
Elementel analiz cihazı ile sentezlenen maddenin yapısında bulunan elementlerin yapıda gözlemlenip gözlemlenmediğine ve elementlerin yüzde oranlarına bakılmıştır. Fe piki, manyetit np'ın varlığını doğrulamıştır (Şekil; 41-44). Yapıya hem PEG hemde Kersetin bağlandığında ise demir yüzdelerinde azalmalar görülmüştür (Şekil; 42, 43 ve 44).



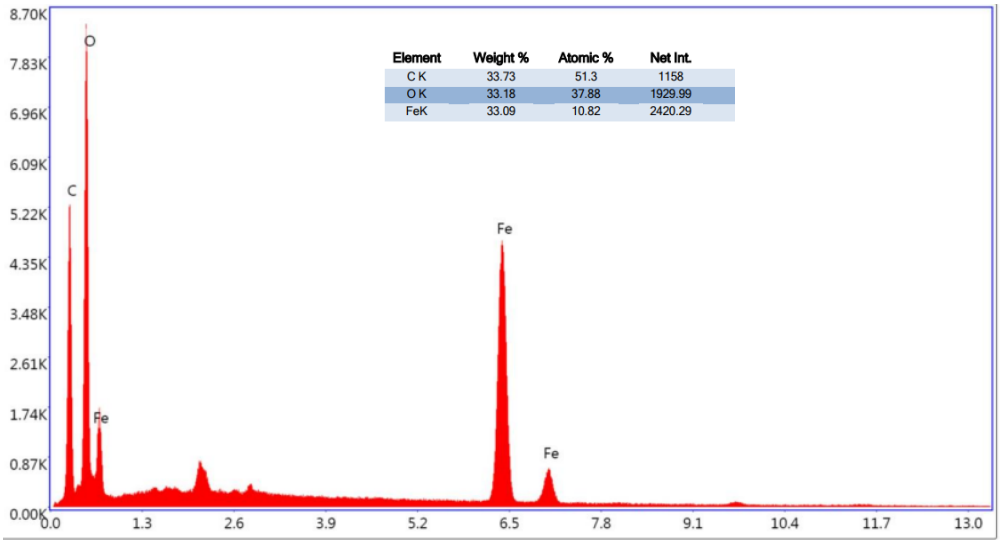
Şekil 4.29. Fe_3O_4 EDX Analizi



Şekil 4.30. Fe_3O_4-PEG EDX Analizi



Şekil 4.31. Fe_3O_4-QUER EDX Analizi



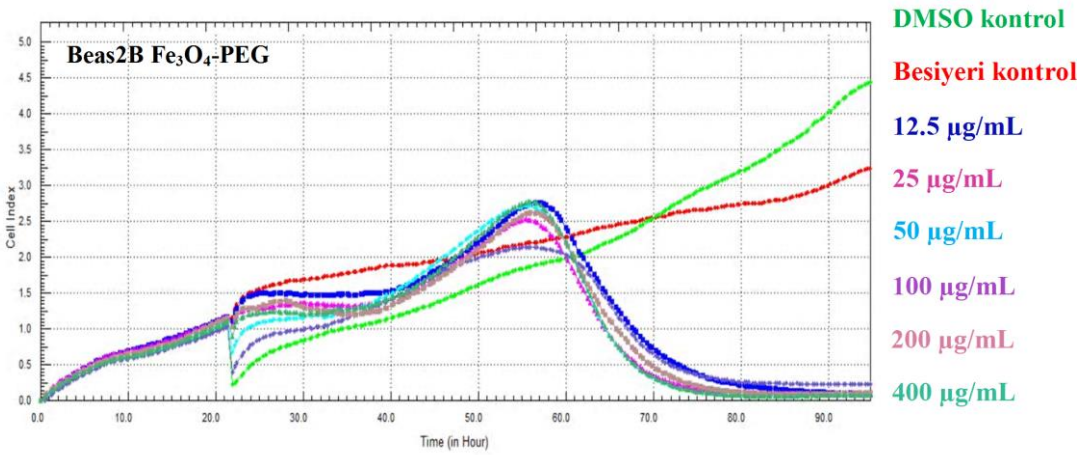
Şekil 4.32. Fe_3O_4-PEG-QUERCETIN EDX Analizi

4.2. xCELLigence Sonuçları

ERÜ-İlaç Uyguluma ve Araştırma Merkezinde'nden Beas2B ve A549 hücre hatları tahsis edilmiştir. ERÜ-İlaç Uyguluma ve Araştırma Merkezinde bulunan, gerçek zamanlı hücre analizörü-xCELLigence cihazında, sentezlenen maddelerin ve ana madde olan kersetinin hücre hatlarına olan etkileri 240 nm'de absorbansları ölçülmesi ile gözlemlenmiştir. Sentezlenen maddelerin Beas2B ve A549 hücre hatlarına olan etkileri RTCA programının software'inde 24-48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri hesaplandı.

Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-QUER ve Fe_3O_4-PEG-QUER ve Kersetin maddelerinin 400 µg/mL ile 12,5 µg/mL arasındaki dozlarının Beas2B ve A549 hücre hatlarına etkisi ile cell indexi arasındaki ilişki, xCELLigence ile 96 saat boyunca incelenmiştir. Ana madde olan kersetin çok düşük dozlarda hem sağlıklı hücreleri hem de kanserli hücreleri öldürürken (Şekil; 48 ve 52) Fe_3O_4-PEG-QUER sağlıklı hücreye (Beas2B) uygulanan en yüksek dozajdan (564.33 µg/mL, 500.104 µg/mL, 500.104 µg/mL) daha yüksek bir değerde 110 saatten fazla sürede etki etmiştir (Şekil;47 ve 51). Kanserli hücreye, (A549) ise 289 µg/mL ve 160 µg/mL dozajlarında 72 saatten daha kısa bir sürede etki etmiştir.

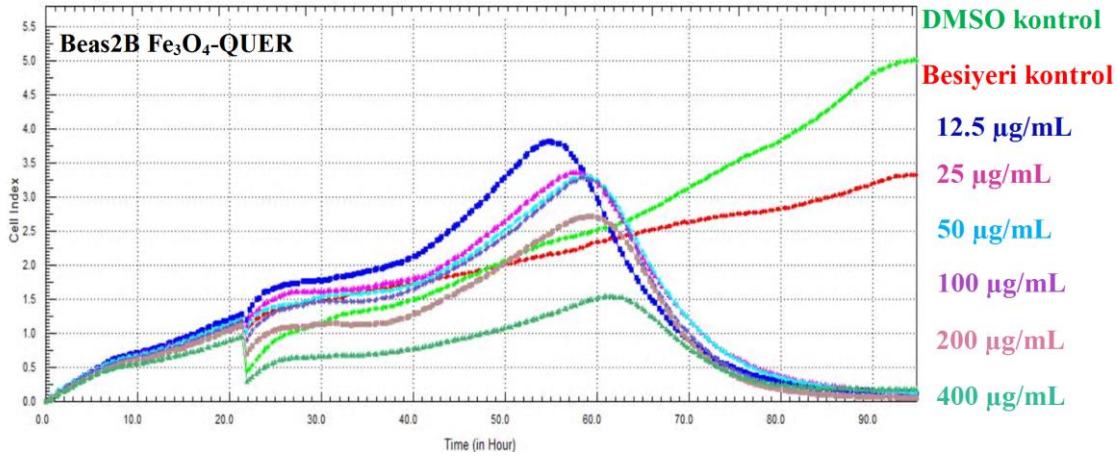
4.2.1. Beas2B(Sağlıklı Akciğer Hücresi) Hücresine Madde/İlaç Uygulanması



Şekil 4.33. Beas2B/Sağlıklı Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.2. Beas2B Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50

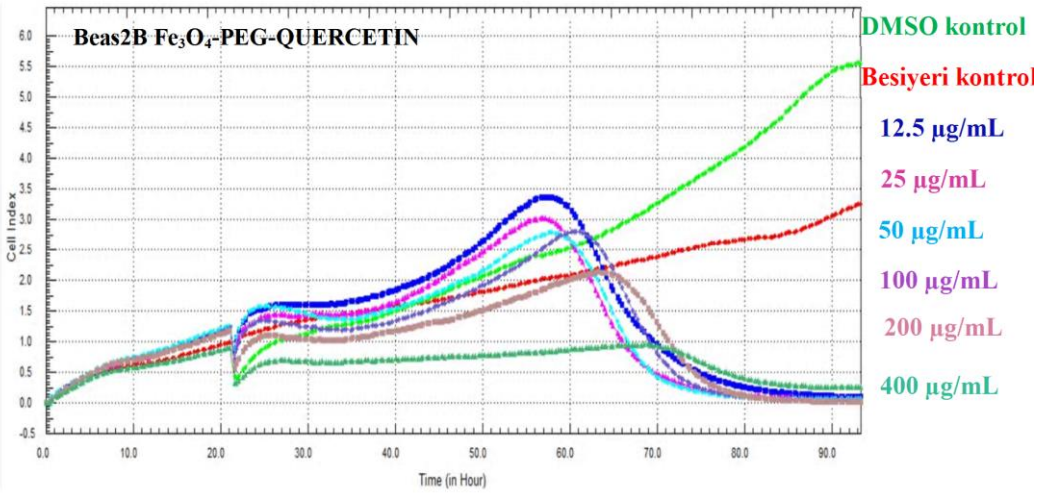
24th IC_{50}	48th IC_{50}	72th IC_{50}
394 µg/mL	394 µg/mL	360 µg/mL



Şekil 4.34. Beas2B/Sağlıklı Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.3. Beas2B Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri

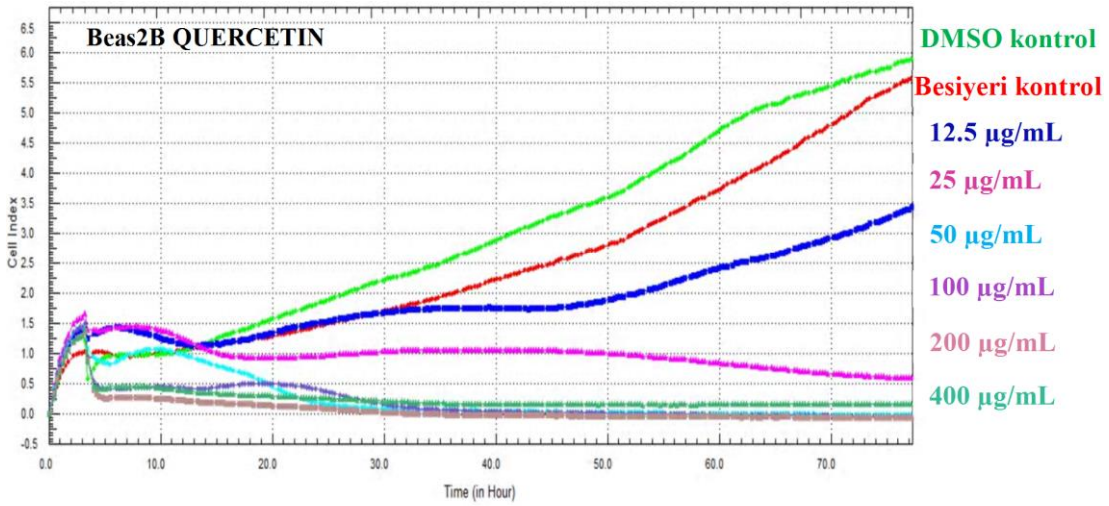
24th IC_{50}	**48th IC_{50}**	**72th IC_{50}**
603 µg/mL	170 µg/mL	363 µg/mL



Şekil 4.35. Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.4. Beas2B Hücresine Uygululanan Fe3O4-PEG-QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri

24th IC_{50}	**48th IC_{50}**	**72th IC_{50}**
564 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL

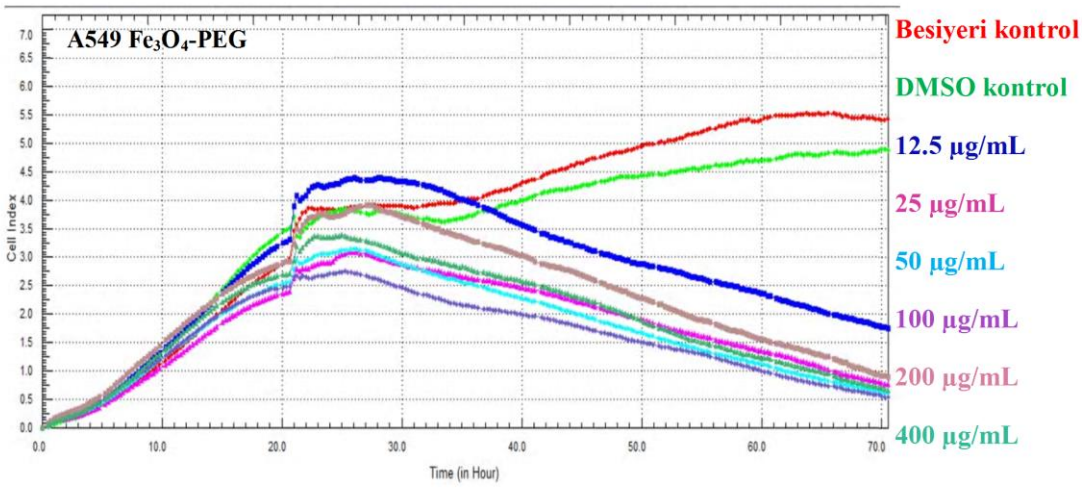


Şekil 4.36. Beas2B/Sağlıklı Akciğer Hücresine Uygulanan QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.5. Beas2B Hücresine Uygululanan QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri

24th IC_{50}	48th IC_{50}	72th IC_{50}
25 µg/mL	25 µg/mL	24 µg/mL

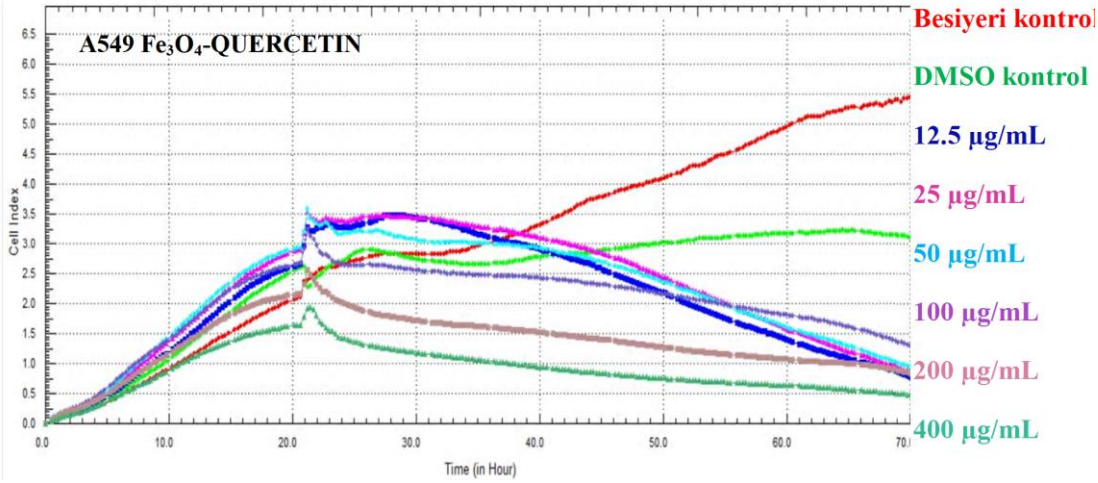
4.2.2. A549(Kanserli Akciğer Hücresi) Hücresine Madde/İlaç Uygulanması



Şekil 4.37. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.6. A549 Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-PEG Maddesinin 24-48 Saatlik IC50 Değerleri

24th IC_{50}	**48th IC_{50}**
27 µg/mL	19 µg/mL

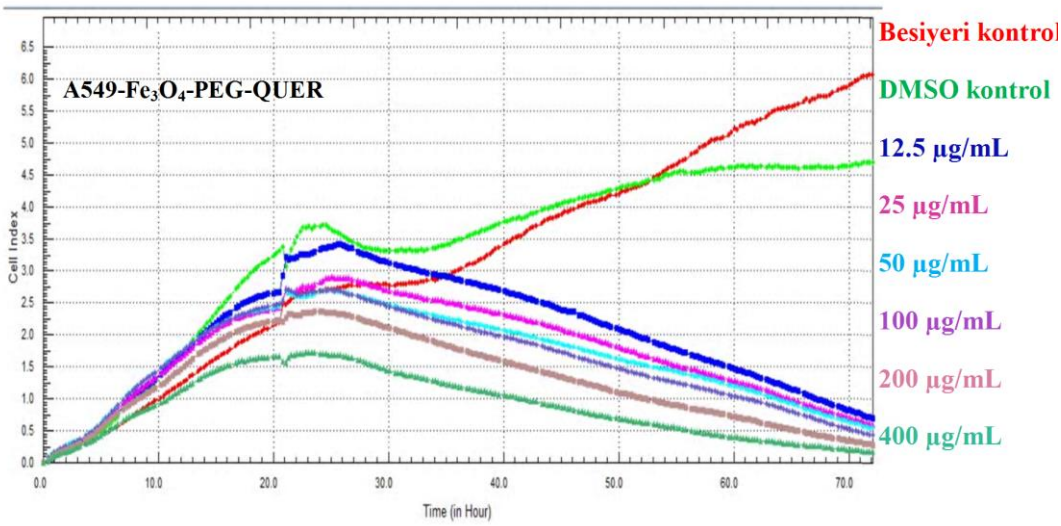


A549 Fe_3O_4-

Şekil 4.38. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.7. A549 Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-QUERCETIN Maddesinin 24-48 Saatlik IC50 Değerleri

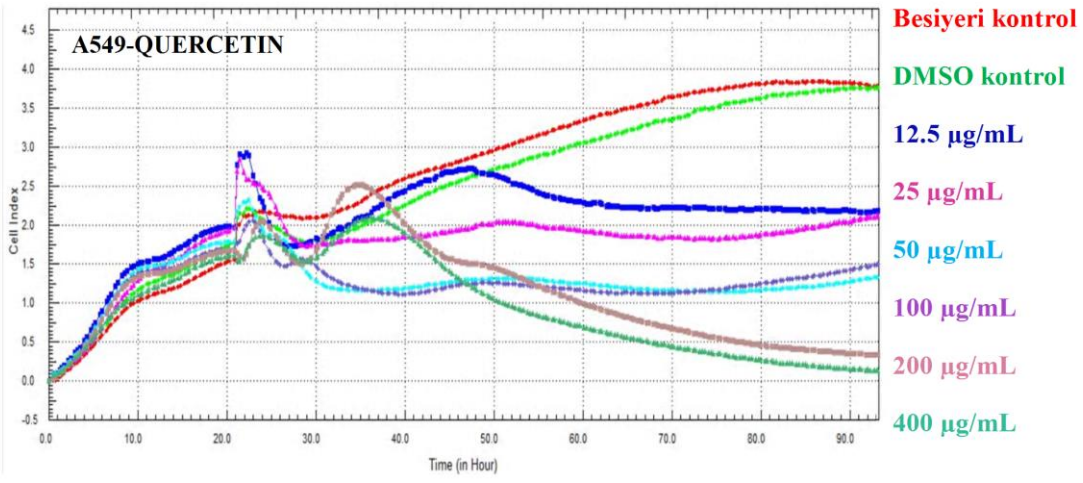
24th IC_{50}	**48th IC_{50}**
161,214 µg/mL	182 µg/mL



Şekil 4.39. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan Fe_3O_4-PEG-QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.8. A549 Hücresine Uygululanan Fe_3O_4-PEG-QUERCETIN Maddesinin 24-48 Saatlik IC50 Değerleri

24th IC_{50}	**48th IC_{50}**
289 µg/mL	160 µg/mL



Şekil 4.40. A549/Kanserli Akciğer Hücresine Uygulanan QUERCETIN Maddesinin Farklı Dozlardaki Etkisinin xCELLigence Görüntüsü

Tablo 4.9. A549 Hücresine Uygululanan QUERCETIN Maddesinin 24-48-72 Saatlik IC50 Değerleri

24th IC_{50}	**48th IC_{50}**	**72th IC_{50}**
25 µg/mL	25 µg/mL	134 µg/mL

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Manyetik IONP'lar özellikle oksidatif hasara bağlı hastalıklarda önemlidir (Zhu ve ark., 2015; Chorny ve ark., 2010). Bununla birlikte, kimyasal bileşim, yüzey yükü, parçacık boyutu ve yüzeyin kaplanması gibi nanomateryallerin antioksidan aktivitesini güçlü bir şekilde etkileyen çeşitli faktörler vardır (Sandhir ve ark., 2015; Verma ve ark., 2014; Circu ve ark., 2016). Yüzey kaplaması biyolojik olarak uyumlu olmalı, toksik olmamalı ve hedefe yönelik ilaç dağıtımına izin verebilmelidir (Santiago ve ark., 2013; Lam ve ark., 2016).

MNP'ların kullanıldığı biyomedikal uygulamalarda, metal ve metal oksitlerine polimerik bir kaplayıcı ile kaplama yapıldığında stabil ve biyouyumlu nanoparçacıkları elde edilmiştir. Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklarında Fe, hücreler tarafından geri dönüşümlü olarak kullanılmaktadır (Bulte ve Kraitchman, 2004; Chomoucka ve ark., 2010).

Bu çalışma, nanopartiküllerin boyut dağılım yelpazesinin daraltılmasını ve aktif dağıtımını iyileştirmek için polimer stabilizatör olarak polietilen glikol (PEG) kullanılarak hazırlanan manyetit nanopartiküller ile ilgilidir. Bu çalışmada çekirdek olarak manyetit, çekirdek yüzeyinde kaplama olarak ise PEG seçilmiştir. Bu yazıda, XRD, FTIR, SEM, NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), Zeta potansiyeli ve demir oksit bileşiklerinin sitotoksisitesi ile sulu ortama salınma özelliğinden elde edilen sonuçlar tartışılacaktır.

PEG, PVA ve PVP; peptit, karbonhidrat ya da protein gibi kaplayıcılar ile kaplanmış süperparamanyetik özellikteki Fe_3O_4 maddesi, ilaç yüklemesi ve kontrollü salım yapmayı kolaylaştırmaktadır (Reddy ve ark., 2012).

Kanser ölüme sebebiyet veren nedenlerin başlarında gelmekte ve kanser kaynaklı ölümlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Nano yapıların hedeflenen bölgeye antikanser etkisi gösterebilmesi zor bir araştırmadır; pek çok araştırmacı ticari antikanser ilaçlarını manyetite entegre etmişlerdir (Shen ve ark., 2013; Ding ve ark., 2012). Bu manyetite entegre edilen ilaç sistemlerinin çözünürlük, kan dolaşımında az sirküle edilebilme ve azalmış ilaç klirensi gibi bazı zorlukları mevcuttur. Bu yüzden bu gibi sorunları aşabilmek için etkili bir ilaç taşıyıcı sistem mekanizması formüle edilmelidir (Schladt ve ark., 2011). Kersetin, meyvelerde ve sebzelerde bulunan çokça tanınan bir flavonoiddir (Kumari ve ark., 2010; Wu ve ark., 2008). Kersetin, antikanser, anti-enflamatuar, ve anti-oksidan olarak pek çok sahada kullanılabilmektedir (Chakraborty, 2012). Bu kullanım alanlarının yanısıra anti-kanser özellik de göstermektedir; kolon, meme ve akciğer kanseri üzerinde olan etkinliği yüksektir (Kakran ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012). Benzer şekilde, kersetin yüklü Fe_3O_4 nanopartiküllerinin fizikokimyasal özellikleri antikanser ajan olarak kullanılabilmesi açısından uygundur (Barreto ve ark., 2011). Bu bizi kersetin ile konjuge manyetit nanoparçacıklarını sentezlemeye ve bunların *in vitro* antikanser aktivitelerini incelemeye motive ediyor.

MNP'ların boyutları ve şekli sentezlenme yöntemine göre farklılık göstermektedir. MNP'lar, solvotermal, mikrodalga ve termal ayrıştırma yöntemi gibi susuz ortamlarda sentezlenirse hidrofobik oldukları için biyouygulama alanında kullanılması uygun değildir (Ding ve ark., 2012). Sentezlemesi kolay olan çökeltme yöntemi ile hidrofilik, uygun maliyetli ve çevre dostu MNP'lar sentezlenebilmektedir (Pereira ve ark., 2012). Ancak bu yöntem ile elde edilen MNP'nin homojen bir boyut dağılımına sahip olamaması ve düşük stabilite göstermesi gibi kısıtlamaları vardır (Qu ve ark., 2012).

Bu çalışmada çöktürme yöntemi ile Fe_3O_4, Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-QUER ve Fe_3O_4-PEG-QUER nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Sentezlenen nanoparçacıkların FT-IR ile Fe-O, N-H, N-O, C=C, C=O, C_6H_6 ve O-H gibi maddemizde bulunan spesifik piklerin oluştuğu gözlemlenmiştir. XRD ile 2Ɵ açılarına ve Bragg yansımalarına bakarak demir-oksitin kübik kristal yapısının oluştuğu gözlemlenmiştir (HighScore Plus/ICPDS No: 88-0315). IONP'ye PEG ve Kersetin bağlandığında da bu değerleri koruduğu gözlemlenmiştir.

EDX analizi ile sentezlenen maddelerin yapısında bulunan demir elementinin yapıda yüzde kaç oranında bulunduğuna, yapıya PEG ve Kersetin bağladığında demir yüzdelerinin azalıp azalmadığına elementel analiz ile bakılmış, SEM ile de yapıların görüntüleri alınmıştır

NTA analizi ile IONP yapılarının boyut analizi yapılmıştır; Fe_3O_4 ortalama 99 nm iken yapıya PEG bağlanmasıyla ortalama boyut 170 nm'ye kadar yükselmiştir. Fe_3O_4-QUER maddesinin boyut ortalaması 66.6 nm iken Fe_3O_4-PEG-QUER yapısının ortalama boyutu 96.8 bulunmuştur.

Jarzebski ve arkadaşları yaptıkları IONP (Fe_3O_4) sentezinde NTA sonuçlarında ortalama piki 208 nm, en şiddetli pik 154 nm bulmuşlardır (405 nm dalga boyuna sahip lazer ışın kullanmışlar) (Jarzebski ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında ise IONP için ortalama boyut 99.1 nm ve en şiddetli pik ise 54.6 nm bulunmuştur; tanecik boyutu 1-100 nm olan nanoparçacık boyut aralığına girmektedir.

Zeta-Sizer analizi ile sentezlenen maddenin Zeta-Potansiyellerine bakılmıştır; IONP -9.74 mV; IONP-PEG 0.183 mV; IONP-Quer -14 mV; IONP-PEG-QUER ise -4.04 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre negatif yüklü olan manyetite, nötr olan polietilen glikol bağlandığında yük nötr alana kaymış, yine negatif olan kersetin yapıya bağlandığında ise negatiflik artmıştır. Pozitif yüklü ya da nötr olan parçacık negatif yüklü parçacığa göre elektrostatik etkileşim ile hücreye daha kolay girebilir/daha düşük dozajlarda etkileyebilir; sentezlediğimiz nötral olan IONP-PEG np kanserli hücreye çok düşük konsantrasyonda etkilemiştir.

Khashan ve arkadaşları $FeCl_2.4H_2O$: $FeCl_3.6H_2O$ (2:1) maddelerinden IONP sentezlemişlerdir. Kaplayıcı olarak PEG4000 kullanmışlardır. Khashan ve arkadaşlarının sentezlediği IONP, bu çalışmada elde edilen IONP'ığından birazcık daha pozitif bölgeye kaymıştır (Khashan S ve ark., 2017).

Nurbaş M ve arkadaşları $FeCl_2.4H_2O$: $FeCl_3.6H_2O$ (2:1) maddelerinden IONP sentezlemişler ve NH_3 yerine ortama NaOH eklemişlerdir. Yaklaşık 35 nm boyutunda elde ettikleri np'ın Zeta potansiyelini -24.80 mV olarak bulmuşlardır (Nurbas M ve ark., 2017). Bulunan değer bu tez çalışmasında elde edilen IONP'ığından daha negatif (Tez kapsamında elde ettiğimiz IONP'ığın zeta potansiyeli ise -9.74 mV'dur) ve

parçacık boyutu Zeta-sizer'a göre bu tez çalışmasında elde edilen IONP'ığından daha küçüktür, ancak bu tez çalışmasında elde edilen IONP boyutu NTA ile ölçülmüştür.

xCELLigence ile Fe_3O_4-PEG, Fe_3O_4-QUER ve Fe_3O_4-PEG-QUER nanoparçacıklarının 400-12.5 µg/mL aralığındaki dozlarının Beas2B ve A549 hücre hatlarına olan etkilerine 48-72 saat boyunca bakılmıştır. Ana madde olan kersetin hem sağlıklı hücreyi hem de kanserli hücreyi ~25 µg/mL gibi çok düşük dozlarda öldürürken, yani sağlıklı hücreye de toksik etki gösterirken Fe_3O_4-PEG-QUER sağlıklı hücreye uygulanan en yüksek dozajdan daha yüksek bir değerde (yaklaşık 500 µg/mL) 110 saatten daha uzun bir sürede hücrelere ancak etki edebilmiş ve kanserli hücreleri toplam 48 saatte 289,09 µg/mL, 160,443 µg/mL dozajlarında öldürmüştür. Kersetini, demir-oksit ve PEG ile fonksiyonelleştirmemizin sonucunda sağlıklı hücreye olan toksisitesi, IC50 değerlerindede görüldüğü gibi, düşürülmüştür. Fe_3O_4-PEG, hidrofilik ve nötre yakın yükü olmasına rağmen sağlıklı hücreye 72 saatte uygulanan en yüksek konsantrasyona yakın değerlerde (~390 µg/mL) etki ederken kanserli hücreye 48 saatte çok düşük dozajlarda etki etmiş, ancak yapıya kersetin eklediğimizde ise sağlıklı hücreye uyguladığımız konsantrasyondan çok daha yüksek bir değerde etki etmiştir (~500 µg/mL). Fe_3O_4-QUER negatif yapısına rağmen boyutunun üçlü kombinasyondan daha küçük olması sebebi ile kanserli hücrede etkili olmuş ve sağlıklı hücreye ise ilk 24 saatten sonra toksik etki göstermiştir.

Verma ve arkadaşları, $FeCl_2$ ve $FeCl_3$'den 0.4 M HCl ile 0.5 M NaOH kullanarak IONP sentezlemişler, IONP'ğa Kersetin ve PLGA bağlamışlardır. A549 hücre hattına PLGA-MNP ve MNP maddelerinden 10-250 µg/mL dozajlarında vermişler ve xCELLigence (Roche) ile analiz yapmışlardır. Kersetin suda çözünmediği için hücreye uygulamamışlardır. Uyguladıkları MNP'ın azda olsa hücre indexini düşürdüğünü ancak PLGA ile kaplı MNP'ın hücre indexinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını gözlemlemişlerdir. Ürettikleri MNP parçacık boyutunu TEM'una göre yaklaşık 9 nm, MNP-PLGA boyutunu ise yaklaşık 54 nm bulmuşlardır (Verna ve ark., 2013). Ürettikleri PLGA ile kaplanmış parçacık boyutu tarafımızca sentezlenen MNP-PEG parçacık boyutundan daha küçük olduğu için parçacık boyutu ve hücreye nüfuz edebilme açısından kıyaslama yapılamamıştır. PLGA negatif yüklü bir polimer olduğu için manyetitin negatifliğini yükseltmiş ve hücreye girişi zorlaştırmış olabilir, bizim çalışmamızda nötr olan PEG kullanıldığında manyetit nötral alana kaymış ve bu yüzden

A549 hücre hattı için 24 saatlik IC50 ve 48 saatlik IC50 değerleri sırasıyla yaklaşık 27-19 µg/mL gibi çok küçük dozajlarda etkili çıkmıştır. Verma ve arkadaşları, sentezledikleri maddeleri sağlıklı hücre hattı üzerine uygulamamışlardır.

Arami ve arkadaşları $FeCl_2.4H_2O$:$FeCl_3.6H_2O$ (2:1) maddelerinden ve %25'lik NH_4OH'den IONP sentezlemişlerdir. Fe_3O_4, Fe_3O_4-PEG-LAC(Fe_3O_4-Polietilenglikol-Laktid), Fe_3O_4-PEG-LAC-Kitosan (Boyut:37.2 nm, Zeta Pot:+75 mV) maddelerinin, sırasıyla 1-250/0.01-500 µg/mL aralığındaki dozajlarını MTT ile MCF-7 ve K562(Kronik Myeloid Lösemi) hücre hatlarına uygulamışlardır (Arami ve ark., 2017). MTT sonuçlarına göre bu hücre hatlarına uyguladıkları maddelerin toksisitesi düşük çıkmıştır. Kitinin türevlerinden biri olan kitosan, pozitif yüklüdür, PEG ise nötrdür; demir oksite bağlanan bu iki yapının etkisi ile np'ın zeta potansiyeli pozitif olmasına rağmen hücrede etkili olmamıştır. Zeta-Sizer ile ölçülen parçacık boyutları ise bu tez çalışmasında elde edilen maddelerin boyutundan daha küçüktür. Parçacık boyutu, bu tez çalışmasında elde edilen maddelerden küçük olan ve zeta potansiyeli ise pozitif çıkan bu komplekse kersetin gibi negatif bir madde eklense dahi yükünün negatif alana kayma olasılığı düşüktür, bu yüzden bu komplekse kersetin de bağlasalardı hücre üzerinde daha etkili sonuçlar alabilirlerdi.

6. KAYNAKLAR

Ahmed MA, Okasha N, Mansour SF, El-dek SI. 'Bi-modal improvement of the physico-chemical characteristics of PEG and MFe_2O_4 sub nanoferrite' J. Alloys Compd, 496 2010; (1-2): pp. 345-350.

Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lubbe AS. 'Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting' Cancer Research, 2000;60 (23):6641-6648.

Anand S. 'Various approaches for secondary metabolite production through plant tissue culture' Pharmacia 2010;1: 1-7

Ando K, Mori K, Corradini N, Redini F, Heymann D. 'Mifamurtidefor the treatment of nonmetastatic osteosarcoma.' Expert OpinPharmacother. 2011; 12(2): 285-292.

Anselmo AC. 'Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic'. Bioeng. Transl. Med. 2016; 1:10-29.

Aoki T, Akashi T, Ayabe S. 'Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis' , J Plant Res, 2000; 113: 475-488.

Appenzeller T. 'The man who dared to think small'. Science. 1991; 254: 1300.

Arami S, Rashidi MR, Mahdavi M, Fathi M, Entezami AA. 'Synthesis and characterization of Fe_3O_4-PEG-LAC-chitosan-PEI nanoparticle as a survivin siRNA delivery system', Human and Experimental Toxicology 2017; 36(3): 227-237.

Arbab AS, Janic B, Haller J, Pawelczyk E, Liu W, Frank JA. 'In vivo cellular imaging for translational medical research', Current Medical Imaging Reviews 2009;5 (1): 19-38.

Arruebo M, Pacheco RF, Ibarra MR, Santamaria J. 'Magnetic nanoparticles for drug delivery', Nano Today, 2007;2: pp. 22-32.

Arslan D, Ünver A, Özcan M. 'Kersetin', Dergipark, Volume: 2005;3:2: 16-21.

Auyang YS. 'Cancer Causes and Cancer Research on Many Levels of Complexity', (2006), http://www.creatingtechnology.org/biomed/, 06.02.2024.

Barbé C, Bartlett J, Kong L, Finnie K, Lin HQ, Larkin M, Calleja S, Bush A, Calleja G. 'Silica particles: a novel drug-delivery system' Adv Mater 2004;16: 1959-1966.

Barenholz YC. 'Doxil®—thefirst FDA-approved nano-drug: lessons learned' J Control Release.2012;160(2):117-134.

Barh D, Blum K, Madigan MA. 'OMICS: Biomedical Perspectives and Applications' , CRC Press, Taylor and Francis Group LLC, 2012.

Barreto ACH, Santiago VR, Mazzetto SE, Denardin JC, Lavin R. 'Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy.' P.B.A. Fechine, J. Nanopart. Res. 2011;13:6545-6549.

Bayrak M. 'Temel Elektrik ve Manyetizma', Nobel Yayın, 2002.

Bertrand N, Wu J, Xu X-Y, Kamaly N, Farokhzad OC. 'Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology'. Adv. Drug Delivery Rev. 2014; 66: 2-25.

Bharde AA, Parikh RY, Baidakova M, Jouen S, Hannoyer B, Enoki T. 'Bacteria-Mediated Precursor-Dependent Biosynthesis of Superparamagnetic Iron Oxide and Iron Sulfide Nanoparticles ',Langmuir. 2008; 24**:** 5787-5795.

Binh VT, Purcell ST, Semet V, Feschet F. 'Nanotips and nanomagnetism' Appl. Surf. Sci.. 1998; 803:130-132.

Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. 'Nanoparticle-based medicines: A review of FDA-approved materials and clinical trials to date'. Pharm. Res. 2016; 33: 2373-2387.

Bomatí-Miguel O, Mazeina L, Navrotsky A, Veintemillas-Verdaguer S. 'Calorimetric Study of Maghemite Nanoparticles Synthesized by Laser-Induced Pyrolysis': Chem. Mater. 2008; 20**:** 591-599.

Booth AN, Murray CW, Jones FT, Deeds F. 'The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body' ,Federation Pro c. 1956;18:251-257.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. 'Flavonoid as antioxidants: Det ermination of radical- scavenging efficiencies', Methods in Enzimology, 1990;186:343-355.

Boswell G, Buell D, Bekersky I. 'AmBisome (liposomal amphotericinB): a comparative review.' J Clin Pharmacol,1998;38(7):583-592.

Bovier PA. 'Epaxal®: a virosomal vaccine to prevent hepatitis Ainfection.' Expert Rev Vaccines.2008;7:1141-1150.

Bronner C. 'Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells', Agents Actions 1985; 16:147-155.

Bukhari SB, Memon S, Mahroof-Tahir M, Bhanger MI. 'Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-quercetin complex', Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,Volume 2009; (71)5: 1901-1906.

Bulte JWM, Kraitchman DL.. 'Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging.' NMR in Biomedicine, vol. 2004;(17) 7: 484-499,

Bunker A. 'Poly(ethylene glycol) in drug delivery, why does it work, and can we do better? all atom molecular dynamics simulation provides some answers'. Physics Procedia, 2012;34: 24-33.

Burak M, Imen Y. 'Flavonoids and their antioxidant properties' Turkiye Klin Tip Bil Derg 1999;19:, 296-304.

Burke NAD, Stover HDH, Dawson FP. 'Magnetic Nanocomposites: preparation and characterization of polymer-coated iron nanoparticles' Chem. Mater, 2002;14: 4752-4761.

Čampelj S, Makovec D, Drofenik M. 'Functionalization of magnetic nanoparticles with 3-aminopropyl silane' ,J. Magn. Magn. Mater, 2009;321:1346-1350.

Carnevale J, Ko AH. ‘MM-398 (nanoliposomal irinotecan): emer-gence of a novel therapy for the treatment of advanced pancreaticcancer.’ Future Oncol.2016;12:453-464.

Chakraborty S, Stalin S, Das N, Choudhury ST, Ghosh S, Swarnakar S. ‘The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat.’ Biomaterials 2012;33: 2991-2997.

Cheng HA, Drinnan CT, Pleshko N, Fisher OZ. ‘Pseudotannins self-assembled into antioxidant complexes’, Soft Matter, 2015;11: 7783-7791.

Choi M, Biswas P, Fissan H, Pui DYH. ‘Special Issue on Nano-particles: Technology and Sustainable Development’ J. Nanopart. Res.2003.

Chomoucka J, Drbohlavova D, Huska V, Adam R, Kizek, Hubalek J. ‘Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering.’ Pharmacological Research, 2010; (62)2: 144- 149,

Chouhan R, Bajpai AK. ‘Real time in vitro studies of doxorubicin release from PHEMA nanoparticles’. J Nanobiotechnology 2009; 7 (5): 7-15.

Comalada M, Camuesco D, Sierra S. ‘In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway’, Eur J Immunol 2005;35: 584-592.

Cornell RM, Schwertmann U. ‘The Iron Oxides’ , Wiley-VCH 2nd Edition, 2003.

Coyne DW, Auerbach M. ‘Anemia management in chronic kidney disease: intravenous iron steps forward.’ Am J Hematol.2010;85(5):311-312.

Crataegus O. ‘Common Name: Hawthorne. Alternative Medicine Review’, 3(2): 138-139. April 1998.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. ‘Natural products (secondary metabolites). In Biochemistry and Molecular Biology of Plants’, 2000: 1250-1318.

Cummings G, Dixon J, Kay N. ‘Dose requirements of ICI35,868 (propofol,‘Diprivan’) in a new formulation for induction of anaesthesia.’ Anaesthesia, 1984;39(12):1168-1171.

D'Mello P, Gadhwal M, Joshi U. 'Modeling of COX-2 inhibitory activity of flavonoids', () Int J Pharm Pharm Sci 2011;3: 33-40.

Dang F, Enomoto N, Hojo J, Enpuku K. 'A novel method to synthesize monodispersed magnetite nanoparticles' Chemistry Letters 2008:37 (5): 530-531.

Danielson BG. 'Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intra-venous iron agents.' J Am Soc Nephrol.2004;15(suppl 2):S93-S98.

Daou TJ, Pourroy G, Be´gin-Colin S, Greneche JM, Ulhaq-Bouillet C, Legare P. 'Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles' , Chem. Mater. 2006;18:4399-4407.

Day ES, Zhang L, Thompson PA. 'Vascular-targeted photo-thermal therapy of an orthotopic murine glioma model.' Nanomedi-cine.2012;7(8):1133-1148.

de Jonge MJ, Slingerland M, Loos WJ. 'Early cessation of the clinical development of LiPlaCis, a liposomal cisplatin formulation.' Eur J Cancer.2010;46(16):3016-3021.

DeGroot H. 'Reactive oxygen species in tissue injury', Hepatogastroenterology 1994;41: 328-332.

Dewick PM. 'The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids', In Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach, 2nd ed, 2001: 137-186

Ding G, Guo Y, Lv Y, Liu X, Xu L, Zhang X. 'A double-targeted magnetic nanocarrier with potential application in hydrophobic drug delivery.' Colloids Surf. B: Biointerf. 2012;91: 68-77.

Ding HL, Zhang YX, Wang S, Xu JM, Xu SC, Li GH. 'Fe_3O_4@SiO_2 Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core Sizes and Shell Thicknesses.' Chem. Mater. 2012;24: 4572-4580.

Dixon R and Ferreira D. 'Molecules of interest: genistein' Phytochemistry 2002;60: 205-211.

Dobson J. 'Magnetic nanoparticles for drug delivery', Drug Develop. Res, 2006;67:55-60.

Dorniani D, Hussein MZB, Kura AU, Fakurazi S, Shaari AH, Ahmad Z. 'Preparation of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles coated with gallic acid for drug delivery', Int J Nanomedicine, 2012:7:5745-56.

Dorniani D, Kura AU, SHHA-Ali, Hussein MZB, Fakurazi S, Shaari AH, Ahmad Z. 'In Vitro Sustained Release Study of Gallic Acid Coated with Magnetite-PEG and Magnetite-PVA for Drug Delivery System', The Scientific World Journal, 2014; 11:416354.

Elengovan V, Sekar N, Govindasamy S. 'Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20 methylcholanthrene-induced tumorigenesis', Cancer Lett. 1994;87:107-113.

Fan R, Chen XH, Gui Z, Liu L, Chen ZY. 'A new simple hydrothermal preparation of nanocrystalline magnetite Fe_3O_4', Materials Research Bulletin, 36, 497-502, 2001.

Fan YB, Li FY, Chen DY, 'Scavenger Receptor-recognized and Enzyme-responsive Nanoprobe for Fluorescent Labeling of Lysosomes in Live Cells'. Biomaterials 2014;35: 7870-7880.

Fang J, Nakamura H, Maeda H. 'The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect.' Adv Drug Deliv Rev.2011;63(3):136-151.

Feng B, Hong RY, Wang LS, Guo L, Li HZ, Ding J. 'Synthesis of Fe_3O_4/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging' ,Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Asp, 2008;328:52-59.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 'Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan 2012'. International Journal of Cancer, 2014;136(5): 78-85.

Filippousi M, Papadimitriou SA, Bikiaris DN, Pavlidou E, Angelakeris M, Zamboulis D, Tian H, Van Tendeloo G. Novel 'Core-shell magnetic nanoparticles for taxol encapsulation in biodegradable and biocompatible block copolymers:

Preparation, characterization and release properties' International journal of pharmaceutics, vol. 2013;(448)1: 221-230,

Formica JV, Regelson W. 'Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids' ,Fd. Chem.Toxic. 1995;33 (12):1061-1080.

Fox JL. 'FDA advisors okay NeXstar's DaunoXome.' Nat Biotechnol.1995;13(7):635-636.

Franco V, Conde CF, Conde A. 'Relationship between coercivity and magnetic moment of superparamagnetic particles with dipolar interaction' Phys. Rev. B, 2005;72 174424 1-10.

Frank G, Langer R, Farokhzad OC. 'Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block coploymers'. PNAS 2008; 105 (7): 2586.

Freeman MW, Arrott A, Watson JHL. 'Magnetism in medicine',Journal of Applied Physics, 1960;31 (5): S404-S405.

Fu CÇ 'Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characteristics, Magnetic Behavior, And Biomedical Applications', Yüksek Lisans Tezi, New Jersey Institute of Technology, New Jersey, 2012.

Fuente JM, Grazu V. 'Nanobiotechnology Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles', 1. Baskı, Elsevier, 2012;7:35-79.

Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJ. 'Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway', Free Rad Bio Med 1998; 25:19-35.

Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. 'The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis.' Am J RespirCrit Care Med. 2005; 172 (12): 1487-1490.

Giusti M, Wrolstad R. 'Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems', Biochem Eng J 2003;14: 217-225.

Goesmann H, Feldmann C. 'Nanoparticle Function Materials', Angew. Chem. Int. Ed, 2010;49: 1362-1395.

Gossuin Y, Gillis P, Hocq A, Vuong Q, Roch A. 'Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles', John Willey sons, 2009;1: 299-310.

Grace PA. ‘Ischaemia-reperfusion injury’ , Br J Surg 1994;81: 637-647.

Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. ‘Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres’, Science, Vol. 1994; 263: 1600-1603.

Griesbach R. ‘Biochemistry and genetics of flower color’ , Plant Breed Rev 2005;25: 89-114.

Grzeta B, Ristic M, Nowik I, Music S. ‘Formation of nanocrystalline magnetite by thermal decomposition of iron choline citrate’, Journal of Alloys and Compounds 2002;334: 304-312.

Gubbala S, Nathani H, Koizol K, Misra RDK. ‘Magnetic properties of nanocrystalline Ni-Zn, Zn-Mn, and Ni-Mn ferrites synthesized by reverse micelle technique’ Physica B, 2004;348: pp. 317-328.

Gupta AK, Gupta M. ‘Synthesis and surface engineering of ironoxide nanoparticles for biomedical applications.’ Biomaterials.2005;26(18):3995-4021.

Gupta AK, Wells S. ‘Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies’ ,IEEE Trans. Nanobiosci, 2004;3 (1):66-73.

Halliwell B. ‘Drug antioxidant effects. A basis for drug selection?’ Drugs 1991;42, 569-605.

Halliwell B, Gutteridge J, Cross C. ‘Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?’ , J Lab Clin Med 1992;119: 598-620.

Hamley IW. ‘Nanotechnology with soft materials, Angewandte Chemie’. International Edition 2003;42 (15): 1692-1712.

Hans ML, Lowman AM. ‘Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting’ Current Opinion in Solid State Materials Science, 2002;6 (4): pp. 319-327.

Havsteen B. ‘The biochemistry and medical significance of the flavonoids’ , Pharmacol Ther 2002;96, 67-202.

Heller W, Forkmann G. ‘Flavonoids: Advances in Research (J.B. Harborne ed.)’. Chapman Hall, London, 1988: 399.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. 'Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study', Nutr Cancer 1994;22:175-84.

Hertog MGL, Hollman PC, Van De PB. 'Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices', J Agric Food Chem 1993;41: 1242-1246.

Hervault A, Thanh NTK. 'Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer', Nanoscale, vol. 2014;6: 11 553-11 573,

Herzog C, Hartmann K, Kunzi V, Kürsteiner O, Mischler R, Lazar H, Glück R. 'Eleven years of Inflexal® V—a virosomal adjuvanted influenza vaccine.' Vaccine. 2009;27(33):4381-4387.

Hirono I, Ueno I, Hosaka S, Takanashi H, Matsushima T, Sugimura T, Natori S. 'Carcinogenicity examination of quercetin questionnaire and rutin in ACI rats', Cancer Lett 1981;13:15-21.

Hirsch LR, Stafford R, Bankson J, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL. 'Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance.' Proc Natl Acad Sci.2003;100(23):13549-13554.

Hollman PCH, van Trijp JMP, Mengelers MJB, de Vries JH, Katan MB. 'Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man', Cancer Lett 1997;114:139-140.

Hossain H, Shahid-Ud-Daula A, Jahan I, Nimmi I. 'Evaluation of antinociceptive and antioxidant potential from the leaves of Spilanthes paniculata growing in Bangladesh',, Int J Pharm Phytopharmacol Res 2012;1: 178-186.

Huang K, Ma HL, Liu J, Huo SD, Kumar A, Wei T, Zhang X, Jin SB, Gan YL, Wang PC, He ST, Zhang XN, Liang XJ. 'Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo'. ACS Nano 2012; 6: 4483-4493.

Hyeon T, Lee SS, Park J, Chung Y, Na HB. 'Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process' J. Am. Chem. Soc. 2001;123: 12798.

Inouye K, Endo R, Otsuka Y, Miyashiro K, Kaneko K, Ishikawa T. 'Oxygenation of ferrous-ions in reversed micelle and reversed micro-emulsion', The Journal of Physical Chemistry 1982;86 (8): 1465-1469.

Itoh H, Sugimoto T. 'Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles', Journal of Colloid and Interface Science 2003;265 (2):283-295.

Iwashina T. 'Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales', (Review). Bull Natl Mus Nat Sci 2013;39, 25-51.

Jafarova Z. 'Kersetinin Analjezik Etkisi ve Farklı Analjezik İlaçlarla Sinerjistik Etkileşimi'. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Ağustos 2019.

Jaganjac M, Sunjic SB, Zarkovic N. 'Utilizing iron for targeted lipid peroxidation as anticancer option of integrative biomedicine: A short review of nanosystems containing iron.' Antioxidants 2020; 9, 191-199.

Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Pelecky DLL, Labhasetwar V. 'Iron Oxide nanoparticles for sustained delivery of anti-cancer agents',Mol. Pharm, 2005;2 (3): 194-205

Jarzebski M, Koscınskı M, Bialopiotrowıcz T. 'Determining the size of nanoparticles in the example of magnetic iron oxide core-shell systems', IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 2017;885: 012007.

Joseyphus RJ, Kodama D, Matsumoto T, Sato Y, Jeyadevan B, Tohji K. 'Journal of Magnetism and Magnetic Materials'2007;310, 2393-2395.

Jun Y, Choi J, Cheon J. 'Heterostructured magnetic nanoparticles: their versatility and high performance capabilities', Chemical Communications, 1203-1214, 2007.

Kaiser E, Chiba P, Zaky K. 'Phospholipases in biology and medicine.' Clin Biochem.1990;23(5):349-370.

Kaiser R, Miskolcz G. 'Some applications of ferrofluid magnetic colloids', IEEE Transactions on Magnetics MAG6 1970; (3): 694-705.

Kakran M, Sahoo NG, Li L. 'Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion.' Colloids Surf. B: Biointerf. 2011;88: 121-128.

Kalyane D, Raval N, Maheshwari R, Tambe V, Kalia K, Tekade, RK. 'Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer.' Mater. Sci. Eng. C 2019; 98: 1252-1276.

Kang YS, Risbud S, Rabolt JF, Stroeve P. 'Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and γFe_2O_3 particles'. Chem Mater. 1996; 8: 2209-2211.

Karakoti AS, Das S, Thevuthasan S, Seal S. 'PEGylated inorganic nanoparticles' Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 2011; 50,1980-1994.

Katan MB, Hollman PCH. 'Dietary flavonoids and cardiovascular disease', Nutr Metab Cardiovasc Dis 1998;8: 1-4.

Kelland L. 'The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.' Nat Rev Cancer.2007;7(8):573-584.

Khanna L, Verma NK, Tripothi SK. 'Burgeoning tool of biomedical applications superparamangetic nanoparticles' Journal of Alloys compeunds, 2018; 752, 332-353.

Khashan S, Dagher S, Tit Nacir, Alazzam A, Obaidat I. 'Novel method for synthesis of Fe_3O_4@TiO_2 core/shell nanoparticles', Surface Coatings Technology 2017;322: 92-98

Khollam YB, Dhage SR, Potdar HS, Deshpande SB, Bakare PP, Kulkarni SD, Date SK. 'Microwave hydrothermal preparation of submicron-sized spherical magnetite (Fe_3O_4)powders', Materials Letters 2002;56 (4): 571-577.

Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. 'Effects of naturally-occurring flavonoids on epidermal cyclooxygenase from guinea pigs', Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1998; 58:17-25.

Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Noh MS, Woo M, Kim BG, Lee KH, Sohn BH, Park SB, Lee JL, Cho MH. 'Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energydependent endocytosis in A549 cells', J. Vet. Sci. (2006), 7(4), 321-326.

Kitagawa S, Fujisawa H, Sakurai H. 'Scavenging effects of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by electron spin resonance spectrometry', Chem Pharm Bull 1992; 40: 304-307.

Klibanov AL. ‘Microbubble contrast agents: targeted ultrasound imaging and ultrasound-assisted drug-delivery applications.’ InvestRadiol, 2006;41(3):354-362.

Kodama RH. ‘Magnetic nanoparticles’ Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999;200 (1-3):359-372.

Kommareddi NS, Tata M, John VT, McPherson GL, Herman MF. ‘Synthesis of superparamagnetic polymer-ferrite composites using surfactant microstructures’, Chem. Mater, 1996;8:801-809.

Koneracka M, Kopcansky P, Antalik M, Timko M, Ramchand CN, Lobo D, Mehta RV, Upadhyay RV. ‘Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles’Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999;201:pp. 427-430.

Koneracka M, Kopcansky P, Timko M, Ramchand CN, Sequeira A. de, Trevan M. ‘Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles’ Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 2002;18 (1-3): 13-18.

Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. ‘Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review’,Nanomedicine, 2005;1:193-212.

Kovac Z, Sambucetti CJ. ‘Magnetic Ink for Magnetic Ink Jet Printing, Colloids and Surfaces in Reprographic Technology’, 1982;27: 543-552,

Kratz F, Elsadek B. ‘Clinical impact of serum proteins on drug delivery’. J Control Release, 2012;161(2):429-445.

Krolikowska A, Kudelski A, Michota A, Bukowska J. ‘SERS studies on the structure of thioglycolic acid monolayers on silver and gold’ J Surf. Sci. 2003: 532-5 227.

Kujubu D, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW. ‘TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue’ , J Biol Chem 1991;266: 12866-12872.

Kumar RV, Koltypin Y, Xu XN, Yeshurun Y, Gedanken A, Felner I. ‘Fabrication of magnetite nanorods by ultrasound irradiation’, Journal of Applied Physics 2001;89 (11): 6324-6328.

Kumar SR, Priyatharshni S, Babu VN, Mangalaraj D, Viswanathan C, Kannan S, Ponpandian N. ‘Quercetin conjugated superparamagnetic magnetite nanoparticles for in-vitro analysis of breast cancer cell linnes for chemotherapy applications’, Journal of Colloid and Interface Science 2014; 436:234-242.

Kumar V, Yadav SK. 'Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications'. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2009; 84: 151-168.

Kumari A,Yadav SK, Pakade YB, Singh B, Yadav SC. 'Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin.' Colloids Surf. B: Biointerf. 2010;80: 184-199.

Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stalligins WC. 'Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase 2 by anti-inflammatory agents', 1996; Nature 384, 644-648.

Langer R. 'Drug delivery and targeting', Nature, 1998;392 (6679): 5-10.

Larsen JE, Henriksen JR, Bæksted M, Andresen TL, Jacobsen GK, Jùrgensen K. 'Liposome-based drug delivery using secretory phospholipase A2 as a tumor-specific release mechanism: preclinical evaluation of efficacy, pharmacokinetics, and individual patientexpression profiles.' Clin Cancer Res.2006;12(suppl 19):B24-B24.

Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst LV, Muller RN. 'Magnetic iron oxide nanopar-ticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical char-acterizations, and biological applications.' Chem Rev, 2008;108(6):2064-2110.

Lee J, Isobe T, Senna M. 'Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation' ,Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.. 1996; 109: 121.

Lee KM, Sorensen CM, Klabunde KJ. 'Synthesis And Characterization Of Stable Colloidal Fe_3O_4 Particles In Water-In-Oil Microemulsions', IEEE, 1992;7803, 067837.

Lee Y, Lee J, Bae CJ, Park JG, Noh HJ, Park JH, Hyeon T. 'Large-scale synthesis of uniform and crystalline magnetite nanoparticles using reverse micelles as nanoreactors under reflux conditions', Advanced Functional Materials 2005;15 (3): 503-509.

Lee YK, Yuk DY, Lee JW, Lee SY, Ha TY, Oh KW, Yun YP, Hong JT. 'Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of β-amyloid generation and memory deficiency'. Brain Res 2009;1250: 164-174.

Leonard R, Williams S, Tulpule A, Levine A, Oliveros S. 'Improv-ing the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focuson liposomal doxorubicin (MyocetTM).' Breast.2009;18(4):218-224.

Letan A. 'The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives', J Food Sci 1966;31: 395-399.

Li B, Shan M, Di X, Gong C, Zhang L, Wang Y, Wu G. 'A dual ph- and reduction-responsive anticancer drug delivery system based on Peg-SS-poly(amino acid) block copolymer'. RSC Advances, 2017;7(48): 30242-30249.

Li X, Xu H, Chen ZS, Chen G. 'Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications' J, Nanomater. 2011: 270974.

Li Z, Wei L, Gao MY, Lei H. 'One-pot reaction to synthesize biocompatible magnetite nanoparticles', Advanced Materials, 2005;17:1001-1005.

López-Lázaro M. 'Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin', Mini Rev Med Chem 2009;9, 31-59.

Lu A, Salabas EL, Schüth F. 'Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization and Application', Angew. Chem. Int. Ed, 2007;46: 1222-1244,

Macdougall IC. 'Evolution of iv iron compounds over the last cen-tury.' J Renal Care.2009;35(suppl 2):8-13.

Madeswaran A, Umamaheswari M, Asokkumar K, Sivashanmugam T, Subhadradevi V, Jagannath P. 'In-silico docking studies of cyclooxygenase inhibitory activity of commercially available flavonoids' , Asian J Pharm Life Sci 2012;2: 174-181.

Maeda H. 'Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond.' J Control Release.2012;164(2):138-144.

Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, Pottier A, Deutsch E, Bourhis J, Borghi E, Levy L. 'Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles.' Future Oncol.2012;8(9):1167-1181

Magnetic recording on nanostructures, https://www.tu-chemnitz.de/physik/OFGF/research/magnetic_recording.php, 02.01.2023.

Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Stroeve P, Sohrabi A. 'Templated growth of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by temperature programming in the presence of poly(vinyl alcohol)' Thin Solid Films, 2010;518 (15):4281-4289.

Mahmudi M, Sant S, Wang B, Laurent S, Sen T. 'Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy', Advanced Drug Delivery Reviews 2011;63:24-46.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez l. 'Polyphenols: food sources and bioavailability', Am J Clin Nutr 2004;79: 727-747.

Margulies DT, Parker FT, Rudee ML, Spada FE, Chapman JN, Aitchison PR, Berkowitz AE. 'Origin of the Anomalous Magnetic Behavior in Single Crystal Fe_3O_4 Films, Physical Review Letters,' 1997;79 (25): 5162-5165.

Margulies DT, Parker FT, Spada FE, Goldman RS, Li J, Sinclair R, Berkowitz AE. 'Anomalous moment and anisotropy behavior in Fe_3O_4 films, Physical Review B,' 1996;53 (14): 9175-9187.

Massart R. 'Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media', IEEE Transactions on Magnetics 1981;17 (2): 1247-1248.

Mastorakos P, Song E, Zhang C. Berry S, Park HW, Kim YE, Park JS, Lee S, Suk JS, Hanes J. 'Biodegradable DNA nano-particles that provide wide spread gene delivery in the brain.' Small.2016;12:678-685.

Matthies A, Clavel T, Gütschow M, Engst W, Engst D, Blaut M. Braune A. 'Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine', Appl Envrion Microbiol 2008;74: 4847-4852.

Mcbain SC, Yiu HPH, Dobson J. 'Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery' ,Int. J. Nanomed, 2008;3 (2): pp. 169-180.

McCarthy J. and Weissleder R. 'Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy',Adv Drug Deliv Rev. 2008 Aug 17;60(11): 1241-1251.

Mehta RV, Upadhyay RV, Charles SW, Ramchand CN. 'Direct binding of protein to magnetic particles' Biotechnology Techniques, 1997;11 (7): pp. 493-496.

Metodiewa D, Kochman A, Karolczak S. 'Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N, diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action', Biochem Mol Biol Int 1997;41: 1067-1075.

Metzner J, Frank T, Kunz I, Burger D, Riegger C. 'Study on the pharmacokinetics of synthetic genistein after multiple oral intake in postmenopausal women', Arzneimittelforschung 2009;59: 513-520.

Miller AL. 'Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage', Alt Med Rev 1996; 1:103.

Miodini P, Fioravanti L, di Fronzo G, Capelletti V. 'The two phytooestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function', Br J Cancer 1999;80:1150-5.

Misra RDK, Gubbala S, Kale A, Egelhoff WF. Jr. 'A comparison of the magnetic characteristics of nanocrystalline nickel, zinc, and manganese ferrites synthesized by reverse micelle technique' ,Mater. Sci. Eng. B, 2004;111: pp. 164-174.

Mody VV, Singh A, Wesley B. 'Basics of magnetic nanoparticles for their application in the field of magnetic fluid hyperthermia', Eur. J. Nanomed, 5 (1) (2013), pp. 11-21

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 'Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice.' Pharmacol Rev.2001;53(2):283-318.

Moreira ACG, Martins IM, Fernandes I, Barreiro MF, Rodrigues AE. 'Microencapsulation of red and white thyme oil in poly(lactic-co-glycolic) acid: assessment of encapsulation efficiency and antimicrobial capacity of the produced microcapsules'. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2016;94(3): 469-475.

Mosbach K, Schroder U. 'Preparation and application of magnetic polymers for targeting of drugs' FEBS Letters, 1979;102 (1) pp. 112-116.

Mukhopadhyay A, Joshi N, Chattopadhyay K, De G. 'A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome C'ACS Appl. Mater. Interfaces, 2011;4 (1): pp. 142-149.

Muller BW, Muller RH. 'Particle-size distributions and particle-size alterations in microemulsions', Journal of Pharmaceutical Sciences 73 (7) (1984) 919-922.

Mura S, Nicolas J, Couvreur P. 'Stimuli-responsive nanocarriers fordrug delivery.' Nat Mater.2013;12(11):991-1003.

Na HB, Song IC, Hyeon T. ‘Inorganic nanoparticles for MRI contrastagents.’ Adv Mater.2009;21(21):2133-214.

Nayak KA and Pal D. ‘Nanotechnology for Targeted Delivery in Cancer Therapeutics’, Seemanta Institute of Pharmaceutical Sciences, 2010;1 : 1-10.

Nehru MR and Singh PO. ‘Nanotechnology and Cancer Treatment’ , Asian J. Exp. Sci, Vol 2008;(22)2:4 -50.

Neuberger T, Schopf B, Hofmann H, Hofmann M, Rechenberg B. ‘Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system’, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2005;293 :483-496.

Novakova AA, Lanchinskaya VY, Volkov AV, Gendler TS, Kiseleva TY, Moskvina MA. ‘Magnetic properties of polymer nanocomposites containing iron oxide nanoparticles’ ,J. Magn. Magn. Mater.. 2003; 258-259: 35.

Nurbas M, Ghorbanpoor H, Avcı H. ‘An eco-friendly approach to synthesis and characterization of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles using platanus orientalis l. leaf extract’, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 12, No. 4, October-December 2017: 993 -1000.

Oylar Ö ve Tekin İ. ’Kanserin Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi’, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi 2011; Cilt 16; Sayı 1; 1-8.

Pamukcu AM, Yalciner S, Hatcher JF, Bryan GT. ‘Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (Pteridium aquilinum)’, Cancer Res 1980;40:3468-3472.

Pandey P, Dahıya MA. ‘Brıef revıew on ınorganıc nanopartıcles’. J Crit Rev 2016; 3 (3):18-26.

Pandne AN, Diwan AD, Chandra SR. ‘Flavonoids: an overview’, Journal of Nutritional Science, 2016;5, e47: 1-15,

Patel D, Moon JY, Chang Y, Kim TJ, Lee GH. ‘Poly(d,llactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vivo study as MRI contrast agent’, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008; 91: 313-314.

Patil RM, Thorat ND, Shete PB, Bedge PA, Gavde S, Joshi MG, Tofail SAM, Bohara RA. 'Comprehensive Cytotoxicity Studies of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles'. Biochem. Biophys. Rep. 2018; 13:63-72.

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. 'Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.' NatNanotechnol.2007;2(12):751-760.

Pelaz B, Del Pino P, Maffre P, Hartmann R, Gallego M, Rivera-Fernández S, De La Fuente JM, Nienhaus GU, Parak WJ. 'Surface functionalization of nanoparticles with polyethylene glycol: effects on protein adsorption and cellular uptake' ACS Nano, 2015; 9:6996-7008, 10.1021/acsnano.5b01326.

Pereira C, Pereira A.M, Fernandes C, Rocha M, Mendes R, García MPF, Guedes A, Tavares PB, Greneche JM, Araujo JP, Freire C. 'Superparamagnetic MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles: Tuning the Particle Size and Magnetic Properties through a Novel One-Step Coprecipitation Route.' Chem. Mater. 2012;24: 1496-1503.

Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH. 'Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia' , (1978),Br Med J 2, 1457-1459.

Petros RA, DeSimone JM. 'Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications.' Nat Rev Drug Discov.2010;9(8):615-627.

Pham E, Birrer M.J, Eliasof S, Garmey G, LazarusD, Lee R, Man S, Matulonis A, Peters G, Xu P, Krasner C, Kerbel S. 'Translational impact of nanoparticle-drug conjugate CRLX101 with or without bevacizumab in advanced ovarian cancer.' Clin Cancer Res.2015;21(4):808-818.

Pietta PG. 'Flavonoids as antioxidants', J Nat Prod 2000;63:1035-1042.

Pinkas J, Reichlova V, Zboril R, Moravec Z, Bezdicka P, Matejkova J. 'Sonochemical synthesis of amorphous nanoscopic iron(III) oxide from $Fe(acac)_3$' , Ultrason. Sonochem. 2008;15: 257-264.

Plummer R, Wilson R.H, Calvert H, Boddy A.V, Griffin M, Sludden J, Tilby MJ, Eatock M, Pearson DG, Ottley CJ, Matsumura Y, Kataoka K, Nishiya T. 'A

phase I clinical study ofcisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours.' Br J Cancer.2011;104(4):593-598.

Poizot P, Laruelle S, Grugeon S, Dupont L, Tarascon JM. 'Nano-sized transition-metaloxides as negative-electrode materials for lithium-ion batteries', Nature, 2000;407 (6803):496-499.

Polte J. 'Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective', CrystEngComm, 2015; 17: 6809-6830.

Qu H, Ma H, Riviere A, Zhoub W, O'Connor JC. 'One-pot synthesis in polyamines for preparation of water-soluble magnetite nanoparticles with amine surface reactivity.' J. Mater. Chem. 2012;22: 3311-3319.

Rana S, Gallo A, Srivastva RS, Misra RDK. 'On the suitability of nanocrystalline ferrites as a magnetic Carrier for drug delivery: functionalization, conjugation and drug release kinetics', Acta Biomater, 2007;3:233-242.

Rana S, Philip J, Raj B. 'Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry' Mater. Chem. Phys, 2010;124:264-269.

Ratty AK and Das NP. 'Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroksidation: Structure-activity relationship', Biochem Med Met BioI. 1988;39:69-79.

Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. 'Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications.' Chem. Rev. 2012;112: 5818-5825.

Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 'Flavonoids: promising anticancer agents', Med Res Rev 2003;23: 519-534.

Roco MC. 'Broader Societal Issues of Nanotechnology', J. Nanopart.Res.2003;5: 181-189.

Sainz V, Conniot J, Matos A.I, Peres C, Zupancic E, Moura L, Silva C, Florindo F, Gaspar S. 'Regulatory aspects on nanomedicines'. Biochem Biophys Res Commun.2015;468(3):504-510.

Samanta A, Das G, Das SK. 'Roles of flavonoids in plants' , Carbon, 2011; 100(6):66-75.

Schladt TD, Schneider K, Schild H, Tremel W. ‘Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment.’ Dalton Trans. 2011;40: 6315-6325.

Schulz DL, Sailer RA, Caruso AN. ‘Superparamagnetic transition metal iron oxygen nanoparticles’, U. S. Patent No. 2009;20090194733.

Schutt EG, Klein DH, Mattrey RM, Riess JG. ‘Injectable microbubblesas contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals.’ Angew Chem Int Ed.2003;42(28):3218-3235.

Schwertmann U. ‘Solubility and dissolution of iron oxides’, Plant and Soil 1991;130: 1-25.

Sen T, Magdassi S, Nizri G, Bruce IJ. ‘Dispersion of magnetic nanoparticles in Suspension’, Micro Nano Letters 2006;1 (1): 39-42.

Senyei A, Widder K, Czerlinski G. ‘Magnetic guidance of drug-carrying microspheres’ ‚Journal of Applied Physics, 1978;49 (6): 3578-3583.

Shah ST, Yehya WA, Saad OS. Simarani K, Chowdhury Z, Alhadi AA, Al-Ani LA. ‘Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles with Gallic Acid as Potential Antioxidant and Antimicrobial Agents’, Nanomaterials 2017; 7(10): 306-315.

Shah ST, Yehye WA, Chowdhury ZZ, Simarani K. ‘Magnetically directed antioxidant and antimicrobial agent: synthesis and surface functionalization of magnetite with quercetin’ Peer J 7: e7651 2019.

Sharifi I, Shokrollahi H, Doroodmand MM, Safi R. “Magnetic and structural studies on $CoFe_2O_4$ nanoparticles synthesized by co-precipitation, normal micelles and reverse micelles methods” Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2012;324: 1854-1861.

Shen JM, Yin Y, Tian XZ, Gao FY, Xu S. ‘Inkjet printing based assembly of thermoresponsive core-shell polymer microcapsules for controlled drug release.’ ACS Appl. Mater. Interf. 2013;5: 7014-7020.

Sheng R, Lin X, Zhang J, Chol KS, Huang W, Yang B, He Q, Hu Y. 'Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors', Bioorg Med Chem 2009; 17: 6692-6698.

Shivani T and Tiku AS. 'New developments in breast cancer therapy: role of iron oxide nanoparticles' Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol. 2017; 8: 023002.

Shubayev VI, Pisanic Ii TR, Jin S. 'Magnetic nanoparticles for theragnostics, Advanced Drug Delivery', Reviews 2009;61 (6): 467-477.

Silverman JA, Deitcher SR. 'Marqibo®(vincristine sulfate liposomeinjection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamicsof vincristine.' Cancer Chemother Pharmacol, 2013;71(3):555-564.

Singh A and Sahoo SK. 'Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics', Drug discovery today, 2014;(19) 4: 474-481.

Singh KK. 'Nanotechnology in Cancer Detection and Treatment', Technology in Cancer Research and Treatment, 2005;4 : 583 - 584.

Smith R, DeWitt D, Garavito R. 'Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology', Ann Rev Biochem 2000;69: 145-182.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. 'Nano-emulsions', Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2005;10: 102-107.

Sorata Y, Takahama U, Kimura M. 'Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of hematoporphyrin' ,Biochim . Biophys. Acta. 1984;799: 313-317.

Srivastava N, Bezwada R. 'Flavonoids: The Health Boosters', White Paper. Hillsborough, NJ: Indofine Chemical Company, 2015.

Stavric B. 'Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen' , Clin. Biochem , 1994;27(4):245 248.

Stavric B. 'Role of chemopreventers in human diet' ,Clin. Biochem. 1994;27(5) :319-332.

Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas, NA. 'A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics.' Eur. J. Pharm. Sci. 2014;48: 416-427.

Stern JM, Solomonov VVK, Sazykina E, Schwartz JA, Gad SC, Goodrich GP. 'Initial evaluation of the safety of nanoshell-directed photothermal therapy in the treatment of prostate disease.' Int J Toxicol.2016;35:38-46.

Sugimoto T, Matijevic E. 'Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels', Journal of Colloid and Interface Science 1980;74 (1): 227-243.

Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. 'PEGylation as a strategyfor improving nanoparticle-based drug and gene delivery.' Adv Drug Deliv Rev.2016;99:28-51.

Sun SH, Zeng H. 'Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticies', Journal of the American Chemical Society 2002;124 (28): 8204-8205.

Szkudelska K, Nogowski L. 'Genistein - a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes' , J Steroid Biochem Mol Biol 105, 37-45.

Takahama U. 'Inhibition of lipoxygenase dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidativefunction', Phytochemistry. 2007;24(7): 1443-1446.

Takashi A and Ohnishi T. 'The significance of study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station', 2004, Biol. Sci. Space, 18(4), 255-260.

Tang BC, Dawson M, Lai SK, Wang Y, Suk JS, Yang M, Zeitlin P, Boyle P, Fu J, Hanes J. 'Biodegradable polymer nano-particles that rapidly penetrate the human mucus barrier.' Proc Natl Acad Sci.2009;106(46):19268-19273.

Tari A, Chantrell RW, Charles SW, Popplewell J. 'Magnetic-properties and stability of a ferrofluid containing Fe_3O_4 particles', Physica B C, 1979;97 (1):57-64.

Tartaj P, Serna CJ. 'Synthesis of monodisperse superparamagnetic Fe/silica nanospherical composites', Journal of the American Chemical Society 2003;125 (51):15754-15755.

Terao J, Piskula M, Yao Q. 'Protective effect of epica tec hin, epicatechin gall ate and quercetin on lipid peroxidation in pho spolipid bilayers', Arc. Biochem. Biophys. 1994;308(1):278-284.

Tham D, Gardner C, Haskell W. 'Clinical review 97: potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence', J Clin Endocrinol Metab 1998;83: 2223-2235.

Thoidingjam S and Tiku AB. ‘New developments in breast cancer therapy: role of iron oxide nanoparticles’, Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol. 2017; 8: 023002.

Tikkanen MJ, Adlercreutz H. ‘Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention?’ , Biochem Pharmacol 2000;60: 1-5.

Torchilin V. ‘Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect.’ Adv Drug Deliv Rev.2011;63(3):131-135.

Torchilin VP. ‘Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate sys-tems for drug delivery.’ Nat Rev Drug Discov.2014;13(11):813-827.

Torchilin VP, Trubetskoy VS. ‘Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating’ , Adv. Drug Deliv. Rev, 1995;16:141-155.

Varshosaz J, Farzan M. ‘Nanoparticles for targeted delivery of therapeutics and small interfering RNAs in hepatocellular carcinoma’. World J Gastroenterol 2015; 21 (42): 12022-41.

Veiseh O, Gunn JW, Zhang M. ‘Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging’, Adv. Drug Deliv. Rev, 2010;62: 284-304.

Verma NK, Crosbie-Staunton K, Satti A, Gallagher S, Ryan KB, Doody T, McAtamney C, MacLoughlin R, Galvin P, Burke CS, Volkov Y, Gun’ko YK. ‘Magnetic core-shell nanoparticles for drug delivery by nebulization.’ Journal of Nanobiotechnology 2013;4: 1-11.

Vijayakumar R, Koltypin Y, Felner I, Gedanken A. ‘Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe_3O_4 particles’, Materials Science and Engineering A—Structural Materials Properties Microstructure and Processing 2000;286 (1): 101-105.

Walker E, Pacold M, Perisic O, Stephens L, Hawkins P, Wymann M, Williams R, ‘Structural determinations of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine’, Mol Cell 2000;6:909-919.

Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. ‘Nanoparticle delivery of can-cer drugs.’ Annu Rev Med.2012;63:185-198.

Wang H, Xia Y, Yang Z, Natschke S, Lee K. 'Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents', Adv Exp Med Biol 1998;439:191-225.

Wang J, Sun J, Sun Q, Chen Q. 'One-step hydrothermal process to prepare highly crystalline Fe_3O_4 nanoparticles with improved magnetic properties' , Mater. Res. Bull. 2003;38, 1113-1119.

Wang Y-XJ, Hussain SM, Krestin GP. 'Superparamagnetic ironoxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging.' Eur Radiol.2001;11(11):2319-2331.

Weiss GJ, Chao J, Neidhart JD, Ramanathan RK, Bassett D, Neidhart JA, Choi J, Chow W, Chung V, Forman J, Garmey E, Hwang J, Kalinoski L, Koczywas M, Longmate J, Melton J, Morgan R, Oliver J, Peterkin J, Ryan L, Schluep T, Synold W, Twardowski P, Davis E, Yen Y. 'First-in-human phase 1/2a trial of CRLX101,a cyclodextrin-containing polymer-camptothecin nanopharmaceutical in patients with advanced solid tumor malignancies.' Invest New Drugs.2013;31(4):986-1000.

Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, and Hale A. 'Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum', Clin. Chem. 1995;41/1 : 32-35,

Widder KJ, Senyei AE, Scarpelli DG. 'Magnetic microspheres — model system for site specific drug delivery invivo',Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1978;158 (2) : 141-146.

Wink M. 'Phytochemical diversity of secondary metabolites'. In Encyclopedia of Plant and Crop Science, New York: Marcel Dekker, Inc. 2004;915-919.

Wiseman H. 'The therapeutic potential of phytoestrogens', Exp Opin Investig Drugs 2000;9:1829-1840.

Wu D, Kong Y, Han C, Chen J, Hu L, Jiang H, Shen X. 'D-Alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin' , Int J Antimicrob Agents 2008;32: 421-426.

Wu TH, Yen FL, Lin LT, Tsai TR, Lin CC, Cham TM. 'Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles.' Int. J. Pharm. 2008;346: 160-169.

Wu W, He Q, Hu R, Huang J, Chen H. 'Rare Metal Mater'. Eng. 2007; 34**:** 238-245.

Wu W, He Q, Jiang C. 'Magnetic İron Oxide Nanoparticles; Synthesis and Surface Functionalization Strategies' , Nono Review, Nanoscale Res Lett, 2008; 31: 397-415.

Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim W. 'Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications', Science and Technology of Advanced Materials, 2015;16: 1-43.

Xu JK, Zhang FF, Sun JJ, Sheng J, Wang, Sun M. 'Bio and Nanomaterials Based on Fe_3O_4' , Molecules, 2014;19(12): 21506-21528.

Xue W, Liu Y, Zhang N, Yao Y, Ma P, Wen H, Huang S, Luo Y, Fan H. 'Effects of core size and PEG coating layer of iron oxide nanoparticles on the distribution and metabolism in mice' Int. J. Nanomedicine, 2018;13:5719-5731, 10.2147/IJN.S165451.

Yamaura M, Camilo RL, Sampaio LC, Macedo MA, Nakamura M, Toma HE. 'Preparation and characterization of (3- aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles', Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2004;279:210-221.

Yoo E, Cheng HA, Nardacci LE, Beamana DJ, Drinnanb CT, Lee C, Fishbeinc KW, Spencer RG, Fisher OZ, Doirona AL. 'Activatable interpolymer complex-superparamagnetic iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agents sensitive to oxidative stress', Biointerfaces 2017;158: 578-588.

Zhang DE, Tong ZW, Li SZ, Zhang XB, Ying AL. 'Fabrication and characterization of hollow Fe_3O_4 nanospheres in a microemulsion', Materials Letters 2008;62 (24): 4053-4055.

Zhang Y, Kohler N, Zhang M. 'Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake' .Biomaterials, 2002;23:1553-1561.

Zheng W, Gao F, Gu H. ‘Magnetic polymer nanospheres with high and uniform magnetite content’, J. Magn. Magn. Mater, 2005;288:403-410

Zheng Y, Cheng Y, Bao F, Wang Y. ‘Synthesis and magnetic properties of Fe_3O_4 nanoparticles’, Mater. Res. Bull. 2006;41: 525-535.

EKLER

Yeşim SİS tez

ORİJİNALLİK RAPORU

%3	%2	%2	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	repositori.usu.ac.id İnternet Kaynağı	%1
2	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Kayiş, Kaan. "Kaempferolün Analjezik Etki Mekanizmasına Katkıda Bulunan Sistemlerin Incelenmesi", Anadolu University (Turkey), 2022 Yayın	<%1
5	Kumbicak, Umit. "Bakir-cinko Alasim Nanopartikullerinin in Vitro Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Arastirilmasi", Bursa Uludag University (Turkey), 2022 Yayın	<%1
6	de Brito, Ana Filipa Marques. "Glut-1: Um Alvo terapeutico Para Os Tumores primarios Do figado?", Universidade de Coimbra (Portugal), 2021 Yayın	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Eğitim Durumu	2009-2014 : Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (Tokat)
İş Tecrübesi	
	2013 : ERÜ Gülser ve Dr. Mustafa GÜNDOĞDU MERKEZ LABORATUVARI(45 İŞ GÜNÜ/STAJ)
	2019-* : Erciyes Üniversitesi / Personel
Yabancı Diller	İngilizce : Orta Derece
Bilgisayar Bilgisi	Microsoft Office Programları (World, Excel, Powerpoint)