

T. C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Çok Fonksiyonlu Süperparamanyetik Grafen Oksit Nano-Malzemelerin Hazırlanması ve
Kanser Tedavisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Nizamudin Awel HUSSEIN

MART 2018

Kimya Anabilim Dalında Nizamudin Awel HUSSIEN tarafından hazırlanan Çok Fonksiyonlu Süperparamanyetik Grafen Oksit Nano-Malzemelerin Hazırlanması ve Kanser Tedavisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Zeki ÖKTEM
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa TÜRK
Ortak Danışman

Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN

Üye : Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Üye : Doç. Dr. Servet ÇETE

Üye : Doç. Dr. Ebru Kondolot SOLAK

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezimi;

Canım annem, Hayriya Hussien'e,

Canım babam, Awel Hussien'e,

Sevgili eşim, Rehima Dessalegn'e,

Sevgili çocuklarım; Aymen, Tesnim ve Muniba'ya

ithaf ediyorum.

ÖZET

ÇOK FONKSİYONLU SÜPERPARAMANYETİK GRAFEN OKSİT NANO- MALZEMELERİN HAZIRLANMASI VE KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Nizamudin Awel HUSSIEN

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN

Ortak Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Mart 2018, 200 Sayfa

Hedefli ilaç salım sistemi, geleneksel kanser tedavi yöntemleriyle ilişkili olan yan etkileri azaltma ve etkinliği artırma kabiliyeti nedeniyle yakın zamanlarda umut verici kanser tedavisi olarak ortaya çıkmıştır. Bu tezde, MCF-7 kanser hücrelerini hedeflemek amacıyla aptamer-konjuge manyetik grafen oksit nanotaşıyıcı hazırlanmıştır. Model kanser ilacı olarak paklitaksel (PAC) kullanılmıştır. Nanotaşıyıcının biyoyumluluğu, kararlılığı, ilaç yükleme ve salım performansını artırmak amacıyla; pektin, jelatin ve hidroksipropil selüloz ile konjuge edilmiştir. Ayrıca, fototermal ve fotodinamik terapide kullanılabilmek üzere ışığa duyarlı hale getirilmesi için klorin e6 (Ce6) ile konjugasyonu yapılmıştır.

Hazırlanan nanotaşıyıcının yapısı, boyutu, yüzey morfolojisi, manyetik özelliği ve kararlılığı, FTIR, X-ışını kırınımı, TEM, SEM, Zeta-sizer, VSM ve TGA / DSC kullanılarak aydınlatılmıştır. Ayrıca, ilaç yüklenme ve salım performansları, UV absorbans spektrumu ile hesaplandı. Sitotoksikite testi L929 fibroblast normal hücre ve MCF-7 kanser hücresi kullanılarak MTT testi ile gerçekleştirildi. Fototermal (PTT) ve fotodinamik (PDT) tedavilerinin etkisi 808 ve 660 nm'lik lazer sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Üstelik, nanotaşıyıcıların kanser hücresini spesifik olarak tanıyıp tanımadığını akış sitometrisi ile belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, sentezlenen nanotaşıyıcıların süperparamanyetik, biyouyumlu, kararlı, pH'ya duyarlı ve yüksek ilaç yükleme ve salım verimliliğine sahip olduğunu göstermiştir. Manyetik grafen oksit (MGO) ve polimer konjuge MGO'ların boyutları 500 ile 800 nm arasında iken, Fe_3O_4 ise 5 - 15 nm aralığında bulunmuştur. İlaç yükleme ve *in vitro* salım analizi, % 75,75'den fazla ilaç tutuklama verimi ve pH'ya duyarlı salım göstermiştir. Hücre toksisite analizinde, % 80'den daha fazla hücre canlılığı bulunmuştur. Polimer ve Fe_3O_4 konjugasyonu, GO'nun biyouyumluluğunu artırmıştır. Üstelik, PAC ve PAC yüklü nanomalzemelerin MCF-7 kanser hücrelerine yüksek sitotoksik etkisi gözlenmiştir. PTT/PDT analizlerinde, 808 ve 660 nm'lik lazer ışınlamasıyla daha fazla kanser hücreleri öldürülmüştür. Ayrıca, Kemoterapi-PTT/PDT kombinasyonu, kemoterapi ve PTT/PDT'den daha etkili bulunmuştur. Diğer yandan, akış sitometri sonuçları, nanotaşıyıcıların MCF-7 kanser hücrelerine spesifik olarak bağlanabildiğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan

süperparamanyetik nanomalzemeler, hedefli kanser ilaç verme sistemleri için umut verici bir taşıyıcı olarak düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Manyetik Grafen Oksit, Nanomalzeme, Polimer, Biyouyumluluk, Sitotokisite, Kontrollü ve Hedefli İlaç Verme Sistemi, İlaç Salım, Fototermal Tedavi, Fotodinamik Tedavi



ABSTRACT

PREPARATION OF MULTI-FUNCTIONAL SUPERPARAMAGNETIC GRAPHENE OXIDE AND INVESTIGATION OF USABILITY IN CANCER TREATMENT

Nizamudin Awel HUSSIEN

Kırıkkale University

Graduate School of Natural Science and Applied Science

Department of Chemistry, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nuran IŞIKLAN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

March 2018, 200 pages

Targeted drug delivery has recently come out as a promising cancer therapy owing to its capability to increase efficacy and reduce the side effects, which are associated with conventional anti-cancer treatment methods. Herein, we have attempted to prepare aptamer-conjugated magnetic graphene oxide nanocarrier, which can carry Paclitaxel anti-cancer drug to target MCF-7 tumor cells. The nanocarrier was also conjugated with natural polymers such as pectin, gelatin and hydroxypropyl cellulose aiming to increase biocompatibility, colloidal stability, drug loading and release performances. Furthermore, Ce6 chromophore was attached to the nanocarrier to make the system laser sensitive for its application in photothermal and photodynamic therapies. The structure, surface morphology, magnetic property and thermal stability of the nanohybrid were

investigated using FTIR, XRD, TEM, SEM, Zeta-sizer, VSM and TGA/DSC. Moreover, drug loading and release performances were studied by UV-Vis absorption spectra. The cytotoxicity test was also performed by MTT test using L929 fibroblast normal cell and MCF-7 cancer cell lines. Moreover, the effect of photothermal and photodynamic therapies were investigated by using a laser system with 808 and 660 nm. Furthermore, flow cytometry was done to assess whether the prepared nanocarrier specifically target the cancer cell.

The results showed that the synthesized nanocarriers are superparamagnetic, biocompatible, stable, pH-responsive with high loading and release efficiency. The particle size of magnetic graphene oxide (MGO) and polymer conjugated MGO nanocarriers were found to be 500 - 800 nm, whereas, the Fe_3O_4 was 5 - 15 nm. PAC loading and release results revealed a good loading performance with entrapment efficiency greater than 75.75 % and pH responsive release. Cellular toxicity assay showed the nanocarriers are biocompatible having cell viability greater than 80 %. The conjugation of Fe_3O_4 and polymers have showed an enhancement in the biocompatibility of the nanocarriers. Besides, high cytotoxic effect was observed for PAC and PAC loaded nanocarriers on MCF-7 cancer cells. The combination of Chemotherapy-PTT/PDT was found more effective than either of chemotherapy and PTT/PDT. Furthermore, flow cytometry investigation reveals that the obtained nanocarrier can specifically bind to MCF-7 cancer cells. Therefore, based on the results the prepared superparamagnetic nanocarrier could be considered as a promising agent for cancer drug delivery systems.

Key Words: Magnetic Graphene Oxide, Nanomaterial, Polymer, Biocompatibility, Cytotoxicity, Targeted Drug Delivery, Drug Loading and Release, Photothermal Therapy, Photodynamic Therapy



TEŞEKKÜR

Tez önerisinin hazırlanmasından şüana kadar şartsız tavsiye, rehberlik ile her konuda yardımcı olan ve emeğini hiç esergemeyen danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Nuran Işıklan'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca, tezimin bu hale gelmesi için, özellikle *in vitro* hücre kültür çalışmalarındaki önemli desteği ve önerisi için ortak danışmanım, Hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Türk'e teşekkürlerimi sunuyorum. Onların teşviki, anlayışı ve profesyonel uzmanlığı olmaksızın, bu işin tamamlanması mümkün olmazdı.

Tezimi daha değerli kılmak için yaptıkları katkı ve önerileri için TİK komitesi üyeleri; Sayın Prof. Dr. Mustafa Yiğitoğlu'na ve Sayın Doç. Dr. Servet Çete'ye çok teşekkür ediyorum.

Türkiye'ye gelip Doktora eğitimi almama burs imkanları sunarak büyük bir katkıda bulunan Türkiye Cumhuriyeti Devleti ve misafirperverlik ile tanınan Türk halkına minnettarlığımı ifade etmek isterim. Ayrıca, Kırıkkale Üniversitesi BAP koordinasyon Birimine tez çalışmasına sağladığı maddi destekten (Proje No: 2017/020, 2017 ve 2017/055, 2017) dolayı teşekkür ederim.

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Merkezi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına laboratuvar deneyleri analizi sırasında yardımlarından dolayı teşekkür etmek isterim. Ayrıca, Uzman Dr. Enes GÜCÜM'e, Hacı KAZAN'a ve Zeynep ALTINIŞIK'a tez yazma esnasında yaptıkları düzeltmelerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda bana yardımlarını sunan canım babam Awel Hussien'e, canım annem Hayriya Hussien'e, sevgili eşim Rehima Dessalegn'e ve diğer tüm aile üyelerine, çalışma boyunca anlayışları, destek ve teşviklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Benim için çok stres ve rahatsızlık çekmek zorunda kalan çocuklarımı da teşekkür ediyorum. Son olarak, çalışma sürem boyunca bana yardım eden tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Kanser Tedavisi	2
1.3. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Uygulaması	3
1.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Nanomalzemeler.....	4
1.4.1. Lipozomlar	5
1.4.2. Dendrimerler	6
1.4.3. Miseller	7
1.4.4. Karbon Nanotüpler.....	7
1.4.5. İnorganik Nanoparçacıklar.....	8

1.4.6. Kuantum Noktalar	10
1.4.7. Manyetik Nanoparçacıklar	11
1.4.8. Grafen ve Grafen türevleri Nanoparçacıklar	12
1.4.9. Polimer Konjuge Nanoparçacıklar	14
1.5. Hedefli İlaç Teslimi	19
1.5.1. Pasif Hedefleme	19
1.5.2. Aktif Hedefleme	21
1.5.3. Uyarıya Duyarlı Sistemler	22
1.6. Foto Tedavi	22
1.7. Tezin Amacı ve Kapsamı	23
2. MATERYAL ve YÖNTEM	26
2.1. Materyal	26
2.1.1. Kimyasal Maddeler	26
2.1.2. Cihazlar	27
2.2. Yöntem	29
2.2.1. Fe_3O_4 'ün Hazırlanması	29
2.2.2. MGO'nun Hazırlanması	30
2.2.3. Polimerlerin MGO ile Konjugasyonu	31
2.2.4. APT'nin MGO ile Konjugasyonu	31
2.2.5. Klorin e6'nın MGO ile Konjugasyonu	32

2.2.6. Paklitaksel'in MGO'ya Yüklenmesi.....	33
2.2.7. Doksorubisin'in MGO'ya Yüklenmesi.....	33
2.2.8. ��n vitro İ��a�� Salım	34
2.2.9. ��n vitro Hücre Kültür ��alı��maları	35
2.2.9.1. Biyouyumluluk Testi	35
2.2.9.2. Nano-yapıların Antikanser Aktivitesi	36
2.2.9.3. Apoptoz ve Nekroz Analizi	37
2.2.9.4. Akış Sitometri Analizi	39
2.2.9.5. Floresan Mikroskop Analizi.....	40
2.3. İ��statistiksel Analiz.....	40
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	41
3.1. Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	41
3.1.1. FTIR Spektrum Analizi.....	41
3.1.2. X-ışını Kırınımı Analizi.....	42
3.1.3. Manyetik ��zellik Analizi.....	44
3.1.4. Yüzey Morfoloji Analizi.....	45
3.1.5. Termal Analiz	47
3.2. MGO'nun Karakterizasyonu.....	49
3.2.1. UV Spektrum Analizi	50
3.2.2. FTIR Spektrum Analizi.....	51

3.2.3. X-ışını Kırınımı Analizi	52
3.2.4. Raman Spektrum Analizi	54
3.2.5. Manyetik Özellik Analizi.....	56
3.2.6. Yüzey Morfoloji Analizi	58
3.2.6.1. TEM Analizi	58
3.2.6.2. SEM Analizi.....	59
3.2.6.3. AFM Analizi	61
3.2.6.4. MGO Yüzeyindeki Fe ₃ O ₄ 'nün Miktar Tayını.....	63
3.2.7. Zeta potansiyeli Analizi	64
3.2.8. Termal Analiz	66
3.2.8.1. Termogravimetri Analizi.....	67
3.2.8.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi	71
3.3. Polimer Konjuge MGO'nun Karakterizasyonu	72
3.3.1. Pektin Konjuge MGO'nun (MGO@PEC) Karakterizasyonu.....	72
3.3.1.1. FTIR Spektrum Analizi.....	72
3.3.1.2. X-ışını Kırınımı Analizi	74
3.3.1.3. Manyetik Özellik Analizi.....	75
3.3.1.4. Yüzey Morfoloji Analizi.....	76
3.3.1.5. Parçacık Boyutu Analizi	78
3.3.1.6. Termal Analiz	79

3.3.2. Jelatin Konjuge MGO'nun (MGO@GEL) Karakterizasyonu	81
3.3.2.1. FTIR Spektrum Analizi.....	81
3.3.2.2. X-ışını Kırınımı Analizi	82
3.3.2.3. Manyetik Özellik Analizi.....	83
3.3.2.4. Yüzey Morfoloji Analizi.....	84
3.3.2.5. Parçacık Boyutu Analizi	86
3.3.2.6. Termal Analiz	87
3.3.3. Selüloz Konjuge MGO'nun (MGO@CLS) Karakterizasyonu	90
3.3.3.1. FTIR Spektrum Analizi.....	90
3.3.3.2. X-ışını Kırınımı Analizi	91
3.3.3.3. Manyetik Özellik Analizi.....	92
3.3.3.4. Yüzey Morfoloji Analizi.....	93
3.3.3.5. Parçacık Boyutu Analizi	95
3.3.3.6. Termal Analiz	95
3.4. Klorin e6 konjuge MGO'nun Karakterizasyonu.....	98
3.4.1. UV Spektrum Analizi	99
3.4.2. FTIR Spektrum Analizi.....	101
3.4.3. X-ışını Kırınımı Analizi.....	102
3.4.4. Yüzey Morfoloji Analizi.....	103
3.4.5. Termal Analiz	104

3.5. Aptamer Konjuge MGO'nun Karakterizasyonu	106
3.6. İlaç Yüklenmesi ve Karakterizasyonu	107
3.6.1. PAC'nin MGO'ya Yüklenmesi ve Karakterizasyonu.....	107
3.6.1.1. UV Spektrum Analizi	109
3.6.1.2. FTIR Spektrum Analizi.....	110
3.6.1.3. Yüzey Morfoloji Analizi.....	112
3.6.1.4. Termal Analiz	113
3.6.2. PAC'nin Polimer Konjuge MGO'ya Yüklenmesi	115
3.6.3. Dokсорobisin'in MGO'ya Yüklenmesi ve Karakterizasyonu.....	116
3.6.3.1. UV Spektrum Analizi	117
3.6.3.2. FTIR Spektrum Analizi.....	118
3.7. <i>İn Vitro</i> İlaç Salımı.....	119
3.7.1. PAC'nin MGO'dan <i>İn Vitro</i> Salımı	119
3.7.2. PAC'nin Polimer Konjuge MGO'dan <i>İn Vitro</i> Salımı	124
3.7.3. DOX'un <i>İn Vitro</i> Salımı.....	126
3.8. Hücre Kültür Çalışmaları	128
3.8.1. MGO'ların Biyouyumluluk.....	128
3.8.2. Polimer Yüklü MGO'ların Biyouyumluluk.....	130
3.8.3. Nano-yapıların Antikanser Aktivitesi	131
3.8.4. Apoptoz ve Nekroz Analizi	134

3.9. Akış Sitometri Analizi	140
3.10. Floresan Mikroskop Analizi.....	142
3.11. Fototermal Tedavi Analizi	144
3.12. Fotodinamik Tedavi Analizi	147
4. SONUÇLAR	150
KAYNAKLAR	153
EKLER.....	196
EK. 1. Paklitaksel'in kalibrasyon eğrisi.....	196
EK. 2. Klorin e6'nın kalibrasyon eğrisi	197
EK.3. Doksorubisin'in kalibrasyon eğrisi.....	198
ÖZGEÇMİŞ.....	199

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1. Nanoteknolojinin biyomedikal alanında uygulaması.....	4
1. 2. Nanotıpta yaygın olarak kullanılan nanoparçacıklar	5
1. 3. Grafenin (a) ve grafen oksitin (b) kimyasal yapıları.....	13
1. 4. PEC'nin kimyasal yapısı.....	17
1. 5. GEL'nin kimyasal yapısı	18
1. 6. CLS'nin kimyasal yapısı.....	19
1. 7. Nanoparçacıkların artırmış geçirgenlik ve tutunma etkisi (EPR) ile tümörlere pasif hedeflenmesi	20
1. 8. Nanotaşıyıcıların sentezlenme, ilaç yüklenme ve spesifik kanser hücre hedefleme işlemlerin şematik gösterimi	25
3. 1. Fe ₃ O ₄ 'ün FTIR spektrumu	42
3. 2. Fe ₃ O ₄ 'ün X-ışını kırınımı.....	43
3. 3. Fe ₃ O ₄ 'ün seçili bölge kırınım (SAED) görüntüsü.....	44
3. 4. GO ve Fe ₃ O ₄ 'ün manyetik histeresis döngüsü.....	45
3. 5. Fe ₃ O ₄ 'ün TEM görüntüleri	47
3. 6. Fe ₃ O ₄ 'ün TGA termogramı.....	48
3. 7. Fe ₃ O ₄ 'ün DSC termogramı	49
3. 8. GO ve MGO'un UV spektrumları	50
3. 9. GO ve MGO'un FTIR spektrumları.....	52
3. 10. GO ve MGO'ların X- ışını kırınım deseni	53

3. 11. MGO'nun Seçili bölge kırınım (SAED) görüntüsü	54
3. 12. GO ve MGO'un Raman spektrumları	56
3. 13. GO ve MGO'nun manyetik histeresis döngüsü dış manyetik alana tepkileri (içteki resim).	57
3. 14. GO ve MGO'ların TEM görüntüleri	59
3. 15. GO ve MGO'ların SEM görüntüleri	60
3. 16. GO ve MGO'nun iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri	62
3. 17. MGO yüzeyindeki Fe_3O_4 'ün yüzdesi.....	63
3. 18. GO ve MGO nanomalzemelerin sudaki zeta potansiyeli.....	65
3. 19. GO'nun farklı pH'lardaki zeta potansiyeli ve çözeltilerin görüntüleri (iç resim).66	
3. 20. GO nanomalzemenin TGA/DTG termogramları	67
3. 21. MGO nanomalzemelerin TGA/DTG termogramları	70
3. 22. GO ve MGO'ların DSC termogramları	71
3. 23. MGO, PEC ve MGO@PEC'nin FTIR spektrumları	73
3. 24. MGO ve MGO@PEC'nin X-ışını kırınımı.....	74
3. 25. MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC'nin manyetik histeresis döngüsü	76
3. 26. MGO ve MGO@PEC'nin TEM görüntüleri	77
3. 27. MGO, PEC ve MGO@PEC'nin TGA/DTG termogramları	81
3. 28. MGO, GEL and MGO@GEL'nin FTIR spektrumları.....	82
3. 29. MGO ve MGO@GEL'nin X-ışını kırınımı	83
3. 30. MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin manyetik histeresis döngüsü	84
3. 31. MGO ve MGO@GEL'nin TEM görüntüleri	86
3. 32. MGO, GEL ve MGO@GEL'nin TGA termogramları	89

3. 33. MGO, CLS ve MGO@CLS'nin FTIR spektrumları	91
3. 34. MGO@CLS'nin X-ışını kırınımı.....	92
3. 35. MGO, MGO@CLS ve MGO@CLS-PAC'nin manyetik histeresis döngüsü	93
3. 36. MGO ve MGO@CLS'nin TEM görüntüleri	94
3. 37. MGO, CLS ve MGO@CLS'nin TGA termogramları	97
3. 38. Ce6'nin kimyasal yapısı.....	98
3. 39. Ce6 ve MGO@Ce6 UV spektrumları	99
3. 40. Farklı Ce6 konsantrasyonunda, Ce6'nin % EE ve % LC	100
3. 41. Ce6 ve MGO@Ce6'nin FTIR spektrumları.....	101
3. 42. MGO ve MGO@Ce6'nin X-ışını kırınımı.....	102
3. 43. MGO ve MGO@Ce6'nin TEM görüntüleri	103
3. 44. MGO ve MGO@Ce6'nin TGA termogramları	105
3. 45. MGO ve MGO@APT'nin UV absorpsiyon spektrumları	107
3. 46. PAC'nin kimyasal yapısı	108
3. 47. PAC'nin ve MGO@PAC'nin UV spektrumu.....	109
3. 48. GO ve MGO'ların yükleme kapasitesi ve tutuklanma verimleri	110
3. 49. PAC ve MGO@PAC'nin FTIR spektrumları	111
3. 50. MGO ve MGO@PAC'nin TEM görüntüleri	114
3. 51. PAC ve MGO@PAC'nin TGA (a, b) ve DSC (c) termogramları	115
3. 52. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin % LC ve % EE	116
3. 53. Doksorubisin'in kimyasal yapısı.....	117
3. 54. MGO@DOX ve DOX'un UV spektrumları	118
3. 55. MGO, DOX ve MGO@DOX'un FTIR spektrumları	119

3. 56. pH 2,0, 5,5 ve 7,4 ortamlarında MGO'nun PAC salımı.	121
3. 57. MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4 PAC salım profili, (a) pH 7,4 (b) pH 5,5.	122
3. 58. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL and MGO@CLS'nin PAC salımı (a) 7,4 pH'da, (b) 5,5 pH'da	125
3. 59. MGO@DOX'un pH 7,4 ve 5,5 ortamlarında salım profili.	127
3. 60. MGO'nun farklı konsantrasyonundaki hücre canlılığı (a), GO ve MGO'ların 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'deki hücre canlılığı (b)	129
3. 61. MGO@APT, MGO@Ce6 ve MGO@Ce6-APT'nin farklı konsantrasyonda hücre canlılığı	130
3. 62. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin hücre canlılığı.....	131
3. 63. MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un hücre canlılığı (25 ng mL^{-1} de).	132
3. 64. MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un farklı ilaç konsantrasyonunda hücre canlılığı	133
3. 65. MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC ve MGO@CLS-PAC'nin farklı ilaç konsantrasyonundaki hücre canlılığı.....	134
3. 66. Farklı MGO konsantrasyonu ile inkübe edilen L929 normal hücresi floresan mikroskopi görüntüleri: (A) kontrol, (b) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve (d) $200 \mu\text{g mL}^{-1}$	136
3. 67. Farklı MGO konsantrasyonu ile inkübe edilen L929 fibroblast normal hücrenin nekrotik hücreleri	137

3. 68. MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un 12,5 ng mL ⁻¹ konsantrasyonda çekilen MCF-7 hücrenin apoptik ve nekrotik görüntüleri.....	139
3. 69. MGO, MGO@PAC, MGO@PAC, DOX ve PAC (100 ng mL ⁻¹) ile inkübe edilen MCF-7 kanser hücrenin nekrotik hücreleri oranı.....	140
3. 70. MGO, MGO@APT, MGO@Ce6-APT, APT'in MCF-7 (a) ve L929 (b) hücreleri ile etkileşimi gösteren Akış sitometri profili.....	141
3. 71. Nanopartikül ile etkileştirilmiş MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskop fotoğrafları.	143
3. 72. MGO, MGO@APT, MGO@Ce6, MGO@Ce6-APT ve Ce6 nanoparçacıkların lazerli ve lazersiz MCF-7 hücre canlılığı (50 µg mL ⁻¹ 'de).....	145
3. 73. MGO@PAC, MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC, MGO@CLS-PAC, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-APT-PAC 50 µg mL ⁻¹ 'deki MCF-7 hücre canlılığı	146
3. 74. Ce6, MGO@Ce6, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-PAC-APT ve MGO ile inkübe edilen MCF-7 hücresinin 3 dakika boyunca 660 nm'lik lazer ile vurulduktan sonraki hücre canlılıklar.....	148
3. 75. Ce6, MGO@Ce6, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-PAC-APT ve MGO ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin lazersiz ve 3 dakika boyunca 660 nm ve 660 & 808 nm'lik lazer ile vurulduktan sonraki 50 µg mL ⁻¹ konsantrasyonunda hücre canlılıkları..	148

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

3. 1. MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi..	78
3. 2. MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi.	87
3. 3. MGO, MGO@CLS ve MGO@CLS-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi.	95
3. 4. Korsmeyer-Peppas modeli kullanılarak PAC salım profilinden hesaplanan n değerleri.	123
3. 5. Korsmeyer-Peppas modeli kullanılarak polimer konjuge MGO'ların PAC salım profilinden hesaplanan n degerleri.	126
3. 6. Korsmeyer-Peppas modeli kullanılarak MGO@DOX salım profilinden hesaplanan n değerleri.	128

SİMGELER DİZİNİ

I	X-Işınları Şiddeti
θ	X-Işınları Yansıma Açısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
α	Ayırma faktörü
$^{\circ}$	Derece
μ	Mikro
λ	Dalga Boyu

KISALTMALAR DİZİNİ

2D	İki Boyutlu
A	Amper
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AgNPs	Gümüş Nanoparçacıklar
ANOVA	Varyans Analizi
APT	Aptamer
ATP	Adenozin Trifosfat
AU	Rastgele Birim
Ce6	Klorin e6
CLS	Hidroksipropil Selüloz
CNT	Karbon Nanotüpler
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DOX	Doksorubisin
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
EE	Tutuklanma Verimleri
EPR	Artırmış geçirgenlik ve tutunma etkisi
Fe(acac) ₃	Demir (III) asetilasetonat
FITC	Floresan İzotiyosiyanit

FTIR	Fourier Dönüşümü İnfrared Spektroskopi
GEL	Jelatin
GO	Grafen Oksit
ICP-OES	İndüktif olarak Birleştirilmiş Plasma Optik Emisyon Spektrometresi
kV	Kilo Volt
LC	Yüklenme Kapasitesi
MGO	Manyetik Grafen Oksit
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
MUC1	O-glikoz ile konjuge edilmiş musin protein
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NHS	N-hidroksisüksinimid
NIR	Yakın Kızıl Ötesi
PAC	Paklitaksel
PBS	Fosfat Tampon
PDI	Çok Dağılımlılık Belirteci
PDT	Fotodinamik Tedavi
PEC	Pektin
PEG	Polietilen Glikol
PI	Propidium İyodür
POL	Polimer

PS	Fotosensitizör
PTT	Fototermal Tedavi
RMS	Ortalama Karekök
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	Roswell Park Memorial Enstitüsü
SAED	Seçili Alan Elektron Kırınımı
SS	Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
SERS	Yüzey Geliştirilmiş Raman Spektroskopi
TEM	Geçirgenlik Elektron Mikroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz,
TREG	Trietilen Glikol
UV	Ultraviyole
V	Volt
VSM	Titreşimli Numune Magnetometresi
WST1	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium, monosodium tuzu
XRD	X-ışını Kırınımı

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılması ile karakterize edilen hastalıkların bir grubudur. Kanser hücrelerinin dört ana özelliği: kontrolsüz büyüme (bölünme), çevre dokulara yayılım, metastaz (vücudun farklı yerlerine yayılım) ve ölümsüzlük (programlı hücre ölümüne karşı koruma) olarak bilinmektedir [1]. Bu hastalık, ilk aşamada bölgesel olarak başlar ancak yavaş yavaş vücuttaki uzak bölgelere yayılır. Eğer yayılma kontrol edilmezse ölümle sonuçlanabilir [2]. Kanser hem tütün, bulaşıcı organizmalar, kimyasallar ve radyasyon gibi dış faktörlerden hem de kalıtsal mutasyonlar, hormonlar ve bağışıklık koşulları gibi iç faktörlerden kaynaklanabilir. Bu faktörler, kanser gelişimini başlatmak veya öne çıkarmak için birlikte hareket edebilir. Kanserlin saptanabilir hale gelmesi 10 yıl ya da daha fazla zaman sürer [3,4].

Kanser insan hayatındaki tahrip edici sağlık problemlerinin önemli bir nedenidir. Çoğu ülkelerde en başlıca ölüm sebebidir [5,6]. ABD’de, yıllık yarım milyondan fazla insanın ölüm sebebi kanserdir ve aynı zamanda her dört ölümden biri kanser kaynaklıdır [3,7–9]. 2012 yılında Dünyada 14,1 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş ve 8,2 milyon ölüm kayıt edilmiştir [10]. Küresel olarak, kanser oranları endişe verici bir düzeyde artmaktadır. Önümüzdeki 14 yılda, yeni kanser vakalarının sayısı % 68 artacağı tahmin edilmektedir [11–13]. Sağlık Bakanlığının raporlarına göre Türkiye’de her yıl yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi kansere yakalanmaktadır [14].

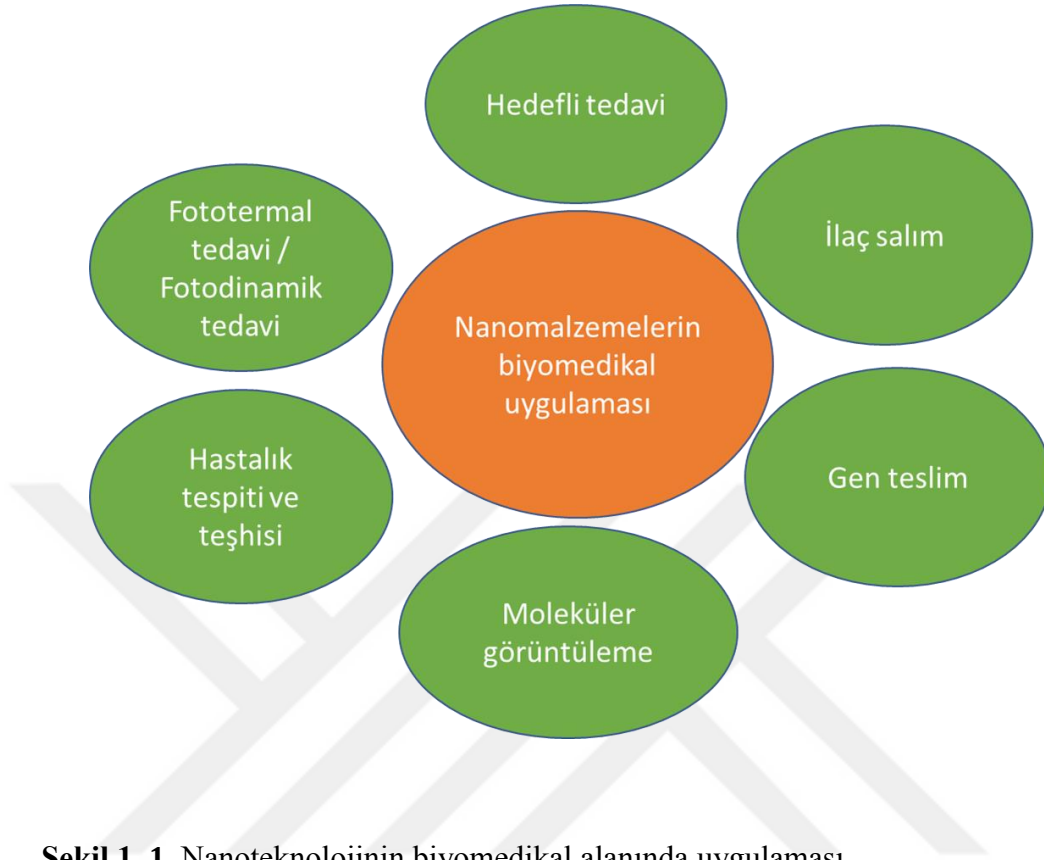
Kanser tedavisinde büyük çabalar ve gelişmeler sağlamakla birlikte, bu çok faktörlü heterojen hastalık birçok ülkede hala başlıca ölüm nedenlerinden biridir [6].

1.2. Kanser Tedavisi

Mevcut kanser tedavileri arasında cerrahi yöntemler, radyasyon ve kemoterapötik ilaçlar bulunmaktadır [15]. Cerrahi yaklaşımlar, kanserden etkilenen vücut bölümünü ameliyatla uzaklaştırma prosedürüdür. Radyoterapi, kanser hücrelerini öldürmek ve tümörleri küçültmek için yüksek dozda radyasyon kullanan kanser tedavisinin bir türüdür. Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için ilaç kullanan bir çeşit kanser tedavisidir [16]. Bu klasik kanser tedavi yöntemleri birçok sınırlamaya sahiptir ve çoğu zaman kanser tümörünün tamamını yok etmede başarısız olmaktadır. Örneğin cerrahi, yüksek ağrı, enfeksiyon ve yaraya neden olabilmektedir. Radyasyon tedavisi mide bulantısına ve saç dökülmesine yol açarken kemoterapi bulantı, kusma, yorgunluk ve enfeksiyon olasılığı gibi yan etkiler göstermektedir [17,18]. Ayrıca kemoterapötik antikanser ilaçlarının çoğu klinik uygulamalarda, asıl hedef olan tümör hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelere de toksik etki göstermesinden ve sulu ortamlardaki düşük çözünürlüklerinden dolayı, sınırlıdır [19–21]. Bu nedenle birçok çalışma, anti-tümör ilaçların özel hücresel alımını arttırma ve akıllı kontrollü salım gerçekleştirme yetenekleri olan verimli dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır [22].

1.3. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji Uygulaması

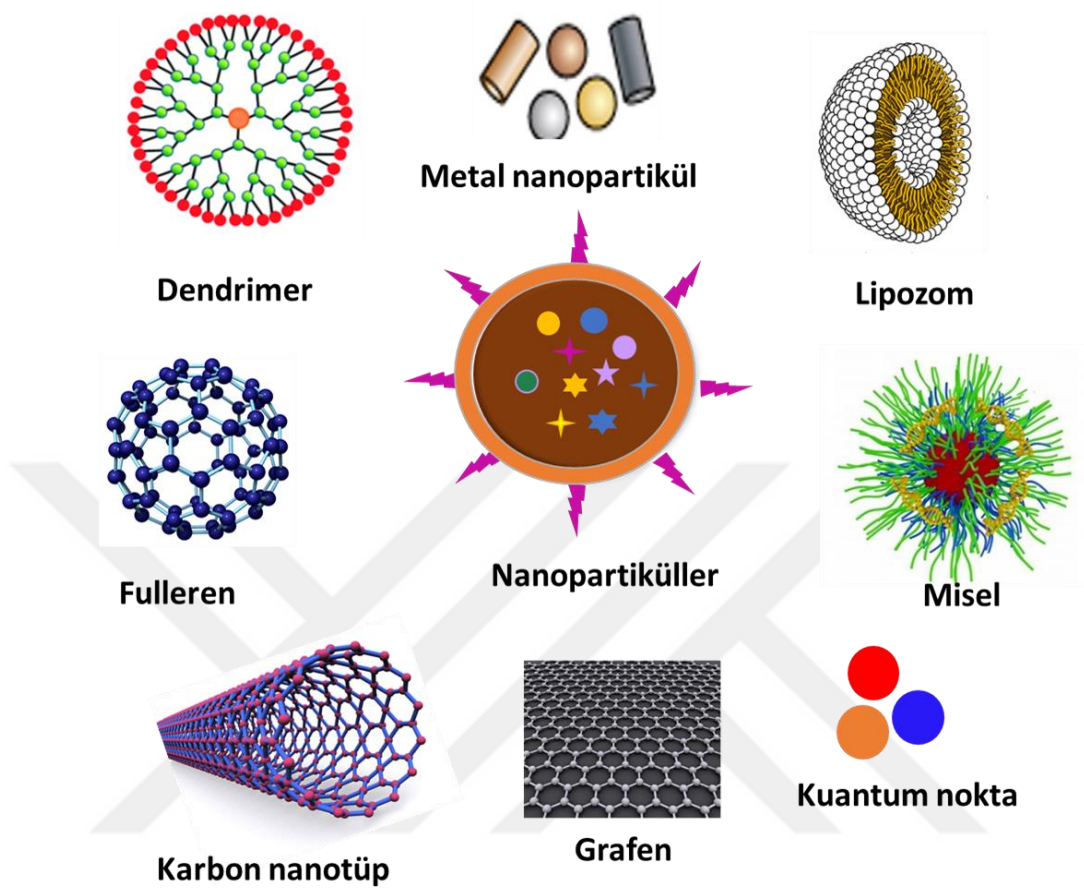
Nanoteknoloji, biyoloji, kimya, fizik, mühendislik ve tıbbı birleştiren bir araştırma alanıdır [23,24]. Nanometre boyutundaki malzemelerin yapısını, davranışını ve uygulamalarını inceleyen yeni araştırma alanlarından biridir [25]. Nanoteknoloji, nano ölçekli cihazlardan nanotıp'a kadar hayatın her alanına dokunmuş yapan bir bilim dalıdır. Hızla gelişmekte olan bu alan, dünya çapında kamu ve medya ilgisini kazanmıştır [24]. Son yıllarda özellikle nanoteknoloji, mevcut geleneksel tedavilerin sorunlarının giderilmesi için yenilikçi bir sistem sunma potansiyeli nedeniyle kanser tedavileri alanında önemli derecede ilgi çekmiştir [26]. Nanoteknolojinin kanser tedavisindeki uygulamalarında, etkili tedavi için yeni mekanizma yaratması beklenmektedir. Nano ölçekli materyallerin en önemli biyomedikal uygulamaları, moleküler görüntüleme, ilaç dağıtım, gen iletim, hedef ilaç, biyomarkır haritalama ve fototerapi alanlarını içermektedir [27]. Şekil 1.1'de nano-malezemelerin biomedikal alanında uygulamaları gösterilmiştir.



Şekil 1. 1. Nanoteknolojinin biyomedikal alanında uygulaması

1.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Nanomalzemeler

Lipozomlar, dendrimerler, miseller, kuantum noktalar, anorganik ve metalik nanoparçacıklar, fullerenler, karbon nanotüpleri ve manyetik nanoparçacıklar gibi farklı nano taşıyıcılar kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [28,29]. Her nanoparçacık kendini diğerlerinden farklı kılan özgün özelliklere sahiptir. Bu nedenle, kanser tedavisinde spesifik uygulamalar için avantaj ve dezavantajlarına bağlı olarak seçilmektedirler. Şekil 1.2’de, nanotıpta yoğun olarak kullanılmakta olan nanoparçacıklar gösterilmiştir. Ayrıca, bazı nanoparçacıkların detaylı anlatımı aşağıda verilmiştir.



Şekil 1. 2. Nanotıpta yaygın olarak kullanılan nanoparçacıklar

1.4.1. Lipozomlar

Lipozomlar, tek katmanlı ya da çok katmanlı amfifilik membran ile oluşturulan 50 ila 1000 nm aralığında olan lipit vezikülleridir [30]. Lipit yapısı bir hidrofilik baş grubu ve bir hidrofobik kuyruk ile karakterize edilebilir. Lipozomlar hidrofobik etkileşimler yoluyla lipid çift tabakaları oluşturarak hidrofilik ve hidrofobik molekülleri aynı anda taşıyabilirler [31]. Hidrofobik ve hidrofilik moleküller sırasıyla lipit çift katmanı ve içi

boş çekirdek içine yüklenebilmektedir. Bu önemli özelliğinden dolayı tek bir sistem kullanılarak kombinasyon kanser tedavisi yapılabilir [25]. Lipozomlar özellikle kanser tedavisi için ilaç taşıyıcısı olarak yaygın bir şekilde araştırılmıştır. Lipozomların ana sınırlamaları arasında düşük stabilitesi, sterilizasyon zorluğu, düşük ilaç yükleme kapasitesi ve ilaçların çok hızlı salımı bulunmaktadır [25,32] .

1.4.2. Dendrimerler

Dendrimerler, bir merkezden uzanan çok sayıda ince dalları nedeniyle neredeyse mükemmel üç boyutlu geometrik desene sahip olan dallanmış polimer makromoleküllerin eşsiz bir sınıfıdır [30,33]. Dendrimerler üç bileşenden oluşur: merkezi bir iç kısım, iç dendritik yapı (dallar) ve fonksiyonel gruplara sahip bir dış yüzey. Bu bileşenlerin çeşitli kombinasyonunda, biyolojik ve materyal bilimlerindeki uygulamalar için ideal aday olan korumalı iç çekirdeklerden farklı şekil ve boyutlarda nano ürünler üretilmektedir. Dendrimerler, nano boyutlu ve dar polidispersite indeksli olmaları, iç kısımdaki kaviterlerde ve boşluklarda çok fonksiyonel grupların bulunması gibi cazip özelliklerinden dolayı [34]; ilaçlar, oligonükleotidler, enzimler, aşılarda, genler ve farklı biyoaktif maddelerin uygulanmasında kullanılmak üzere araştırılmıştır [33,35–38].

1.4.3. Miseller

Miseller, kendilerini sulu solüsyonlarda küresel bir formda düzenleyen lipid molekülleridir. Hidrofilik ve yüklü "baş" grubuna ve hidrofobik bir kuyruğa sahip küçük moleküllerden oluşurlar [39]. Bir çekirdek ve kabuk yapısından oluşan misellerde; iç çekirdek suda az çözünen ilacı kapsayan hidrofobik kısımdır, hidrofilik olan dış kabuğu ise ilacı sulu ortamdan korur [40]. Ayrıca hidrofobik çekirdek suda az çözünen ve amfifilik ilaçları reserve ederken, hidrofilik kabuk ise çekirdeği stabilize eder, ilacın kanda dolaşım süresini uzatır ve tümör dokularında birikimi arttırır [32]. Miseller, endüstriyel ve biyolojik alanlarda, polar olmayan maddeleri sulu bir ortamdan yok etmek ya da uzaklaştırmak ve suda az çözünen ilaçları taşımak için kullanılmaktadır. Misellere dayalı ilaç salım sistemleri, hızlı ve ucuz formülasyonlar sunmaktadır [41].

1.4.4. Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler (CNT) bir karbon allotropudur. Karbon nanotüplerin yapısı; tek-duvarlı, sadece tek grafen tabakası sarılmış veya birden fazla-duvarlı, birden fazla tabaka eşmerkezli bir modele sarılmış olarak iki ana gruba ayrılabilir [42]. CNT'ler; ilaçlar, genler ve proteinler gibi biyolojik aktif maddeleri taşıyabilen iğne yapısına benzer potansiyel nanomalzemelerdir [31]. Çapları birkaç nanometreden yüzlerce nanometreye kadar olabilir [43]. Yüksek yüzey alanlarından dolayı çok çeşitli terapötik molekülleri adsorbe veya konjuge edebilme yeteneğine sahiptirler [44]. Nanotüplerin işlevselleştirilmesi onları daha çözünür, biyouyumlu hale getirir ve kovalent veya

kovalent olmayan bağlar yoluyla bazı moleküllerin yüzeylerine yüklenmesine yardımcı olur. Böylece hedefli kanser terapinin her seviyesinde iyi bir taşıyıcı olmalarını sağlar. Son 20 yılda, CNT'ler benzersiz mekanik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüşlerdir [45].

1.4.5. İnorganik Nanoparçacıklar

İnorganik nanoparçacıklar, nanometre aralığında olan metal oksit veya metalik bileşim partikülleri olarak tanımlanabilir [46]. Son on yıllarda, altın, silis, gümüş ve demir oksit gibi inorganik nanoparçacıkların nanotıpta kullanımları incelenmektedir. Birçok hastalığın tespiti, teşhisi ve tedavisi için kullanılmaktadırlar [47–50]. Bu nanoparçacıklar, hem tanısal görüntüleme hem de hedefli ilaç dağıtımında büyük bir potansiyel göstermişlerdir [51].

Tıpta altın kullanımı tüberküloz tedavisinde 1920'lere kadar uzanmaktadır [52]. Geçmiş tarihlerden bu zamana, altın nanoparçacıklar ilaç ve gen teslim araçları olarak yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. Altın nanomalzemeler, kanserin fototermal tedavisi için cazip adaylar haline getiren yakın kızıl ötesi (NIR) bölgede güçlü absorpsiyona, ideal optik özelliklere ve *in vivo* kanser biyobelirteç algılama için yüzey geliştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) özelliklerine sahiptirler [53]. Altın nanoparçacıklar 2-150 nm boyut aralığında kolaylıkla farklı şekillerde (küresel, çubuk, kübik, vb.) hazırlanabildiği ve karbonhidratlarla yüzey modifiye edilebildiği için aşı sunumunda da kullanılır [54–56].

Silika, nanotıp için en yaygın olarak araştırılan inorganik maddelerden biridir. Silika tabanlı nanoparçacıklar; seçici tümör hedefleme, gerçek zamanlı çok modlu görüntüleme ve aşı serbestleştirme gibi çeşitli uygulamalar için nano taşıyıcı olarak mükemmel özelliklere sahiptir [56–58]. Diğer yandan, silika çekirdeği ve ince altın kabuktan oluşan nano-kabuklar kanser görüntüleme ve tedavisinde uygulanmak üzere tasarlanmıştır. Çünkü, silika çekirdek ve altın kabuklar, NIR ışığını güçlü bir şekilde emer ve termal ablasyon terapisi için hücreleri öldürücü yoğun bir ısı oluşturabilmektedir [59]. Ayrıca, silika nanoparçacıkların birçok yüzey değişikliği olasılığı, ilaç veya kimyasal yüklemeyi, nanoparçacık dağılımı, kan dolaşımı ve bölgeye özgü hedeflemeyi ayarlamak için yüzey kimyasının kontrolünü sağlar. Bu özellikleri birleştiren silika nanoparçacıklar; biyomedikal görüntüleme, terapötik dağıtım ve ablasyon tedaviler için arzu edilen bir platform haline getirilebilmektedir [60,61].

Gümüş nanoparçacıklar (AgNPs) umut verici terapötik moleküller olarak tanınmaktadır. Kanser teşhisi ve tedavisinde kullanımlarını yaygınlaşmaktadır [62]. Gümüş nanoparçacıklar optik, elektriksel ve termal özelliklere sahip olmakla birlikte fotovoltalıklarından biyolojik ve kimyasal sensörlere kadar değişen ürün yelpazesine sahiptirler. Bu önemli özellikler, nanotoksikoloji araştırmalarında olduğu kadar biyomedikal, optik ve anti mikrobiyal uygulamalar da dahil olmak üzere çok sayıda yeni teknoloji için gümüş nanoparçacıkları ideal kılmaktadır [63]. Metalik haldeki gümüş inerttir, ancak nemle reaksiyona girdiğinde iyonize olur. İyonize gümüş oldukça reaktiftir; doku proteinlerine bağlandığında bakteri hücre duvarında ve nükleer membranda yapısal değişiklikler getirerek hücre bozulmasına ve ölümüne neden olur.

Gümüş aynı zamanda denatüre ederek bakteriyel DNA ve RNA'ya bağlanır ve bakteriyel replikasyonu engeller [64]. Son yıllarda, AgNP'lerin bir insan hücresindeki ATP içeriğinin azalmasına neden olmasının yanı sıra fotodinamik terapi için kullanılan reaktif oksijen türlerini (ROS) indüklediği bildirilmiştir [65–67].

1.4.6. Kuantum Noktalar

Kuantum noktalar, 2 ile 10 nm arasında değişen bir çapa sahip, 10-50 atomdan oluşan inorganik floresan yarı iletken parçacıklardır [59,68]. Çok küçük boyutları, yüksek foto kararlılığı, ayarlanabilir optik özellikleri ve çoklu modelleri nedeniyle birçok biyolojik ve biyomedikal uygulamalar için hızla popüler lüminesans problemleri haline gelmektedirler [69–71]. *In vivo* çalışmalarda optik görüntü uygulaması için incelenmiştir ve hiç bozulmadan aylarca kalabilmektedirler [72]. Kuantum noktaların kanser tedavileri için foto ve radyo sensitizasyon mekanizmalarına dayanan uygulanabilirliği de araştırılmıştır. Yüksek atom ve elektron yoğunluğu nedeniyle kanser hücrelerine lokalize ve hedefli radyo tedavi için radyosensitizör olarak etkili yüksek enerjili fotonları emebilirler [68]. Kanser tespiti ve teşhisi için kullanılabilen uzun vadeli, yüksek hassasiyetli ve çok kontrastlı görüntüleme ajanları olarak seçilmiştir. Kuantum noktalar son zamanlarda bazı kanser tipleri için onaylanmış tedavi modeli haline gelen fotodinamik terapide (PDT) uygulanan fotosensitizör olarak kullanılmaktadır [73,74]. Diğer nanoparçacıklara benzer şekilde, kuantum noktalar hedefli salım için çeşitli yüzey moleküllerinin konjugasyonu yoluyla modifiye edilebilir. Kuantum noktalar, eşzamanlı ilaç dağıtım ve

in vivo görüntüleme için ve aynı zamanda doku mühendisliği için terapötik ajanlar eklenmesine yeterli yüzey alanı sağlamaktadır [75–77].

1.4.7. Manyetik Nanoparçacıklar

Manyetik nanoparçacıklar, manyetik alan kullanılarak aktive olan nanoparçacıkların bir sınıfıdır. Bu tür parçacıkların kimyasal bileşikler genellikle, geçiş metali demir, nikel ve mangan gibi manyetik elementlerden oluşur [78]. Son yıllarda, manyetik nanoparçacıklar biyomedikal bilimdeki çeşitli *in vivo* ve *in vitro* uygulamalarda (örneğin, kanserli hipertermi, hedefli ilaç dağıtım, NMR görüntüleme ve benzeri gibi) eşsiz özellikleri ve çeşitli uygulamaları nedeniyle çok dikkat çekmiştir [79–81]. Manyetik hedefli ilaç dağıtım sistemi en popüler ve etkili sistem olarak kabul edilmektedir. Bu teknikte, ağızdan alınan veya damar yoluyla enjekte edilen ilaç taşıyıcı manyetik materyal, dış manyetik alanla kanser alanlarına yönlendirilecektir [82]. Manyetik alan tarafından yönlendirilmesinin, ilaç taşıyıcılarını etkili bir şekilde tümör dokularına sürükleyerek ilaç verme verimliliğini artırması beklenmektedir [83].

Manyetik nanoparçacıklar arasında manyetit (Fe_3O_4), toksik olmaması ve yüksek kimyasal stabilitesi nedeniyle ilaç verme, kanserli hipertermi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi bazı önemli biyomedikal uygulamalar için daha fazla ilgi çekmiştir [84,85]. Ayrıca, Fe_3O_4 nanoparçacıkları süperparamanyetik özelliğe sahiptirler [86]. Süperparamanyetik nanoparçacıklar, 15 nm'den daha küçük çapta demir oksit veya Fe_3O_4 (manyetit) parçacıkları ifade etmektedir. Süperparamanyetik nanoparçacık,

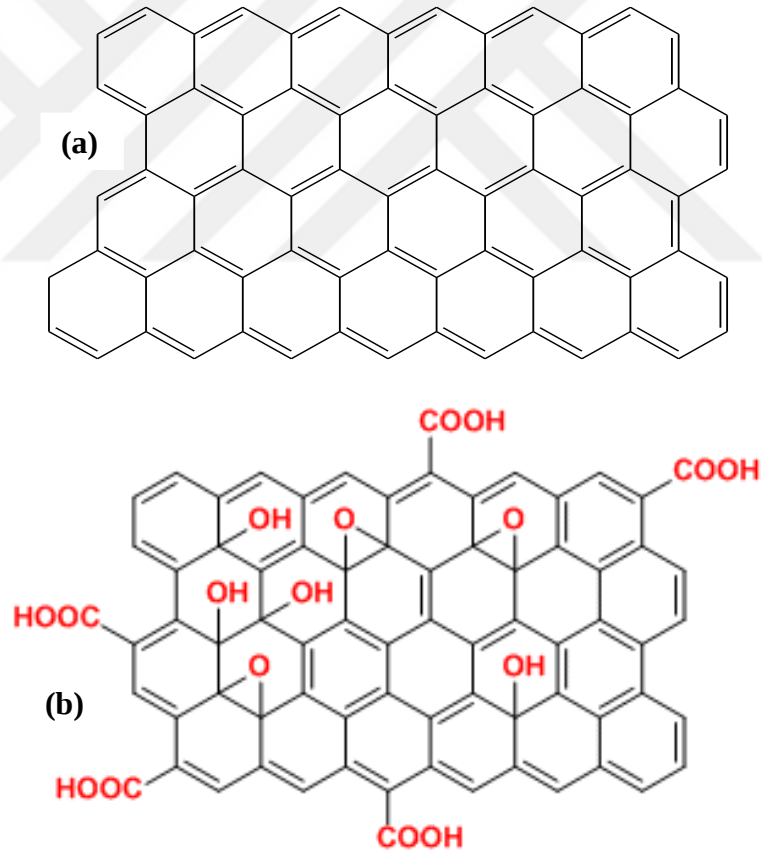
manyetik alana maruz kaldığında manyetik özelliği kazanması ancak manyetik alan kesildiğinde kalıcı bir mıknatıslanma kabiliyeti (remanence) olmaması nedeniyle tercih edilmektedir [87]. Fizyolojik ortamda düşük toksisite ve biyouyumluluk nedeniyle görüntüleme uygulamaları için popülerdirler [88–90].

1.4.8. Grafen ve Grafen türevleri Nanoparçacıklar

Grafen, iki boyutlu (2D) tabakalı elementel karbonun allotroplarından (karbon nanotüpü, fulleren, elmas) biridir [91]. Tek atom kalınlığına, düzlemsel bir yapıya ve sp^2 hibrit karbon atomlarının tek veya çok katmanlı bir tabakasına sahiptir [92–95]. 2004 yılında grafenin keşfinden [94] bu yana, fizik, kimya, nanoteknoloji ve malzeme mühendisliği gibi çeşitli bilim alanlarında en dinamik konulardan biri olmuştur [96,97]. Grafen: ilginç elektriksel, optik, mekanik ve kimyasal özelliklerinden dolayı biyotıp da dahil olmak üzere geniş bir alanda potansiyel uygulamalara sahiptir [96]. Grafen ve türevi nanomalzemeleri biyosensörlerin, doku mühendisliğinin, fototerapinin, ilaç ve gen dağıtımının geliştirilmesinde büyük umutlar vermiştir [98].

Grafen oksit (GO), tabakasında karboksilik asit, epoksit ve hidroksil gibi oksijen içeren gruplardan oluşan, kimyasal olarak modifiye edilmiş grafenin oldukça oksitlenmiş bir şeklidir [99]. Fonksiyonel grupların varlığı, GO'nun sudaki çözünürlüğünü artırır ve diğer maddelere daha fazla konjugasyonu için olanak sağlamaktadır [20,100]. GO esaslı ilaç taşıyıcıları bu avantajlı özelliklerinden dolayı, sistemik hedefleme ve kontrollü ilaç dağıtım sistemleri için uygulanma potansiyeli olan rekabetçi bir ilaç taşıyıcısı olarak

ortaya çıkmıştır [101,102]. Bu nanomalzemelerin avantajlarından biri, suda ve fizyolojik ortamlarda dağılabilme yeteneklerinin kararlı dispersiyonlar vermesidir. Özellikle, kanser tedavisi için bir ilaç teslim aracı olarak GO'nun potansiyel kullanımı, bol oksijen içeren grupları nedeniyle önemli derecede ilgi görmüştür [103]. Buna ek olarak, GO'nun mükemmel biyoyumluluk ve düşük toksisitesi, ilaç taşıyıcı olarak umut verici bir malzeme yapmıştır [104]. Şekil 1.3'te grafenin (a) ve grafen oksitin (b) kimyasal yapıları sunulmuştur.



Şekil 1. 3. Grafenin (a) ve grafen oksitin (b) kimyasal yapıları

1.4.9. Polimer Konjuge Nanoparçacıklar

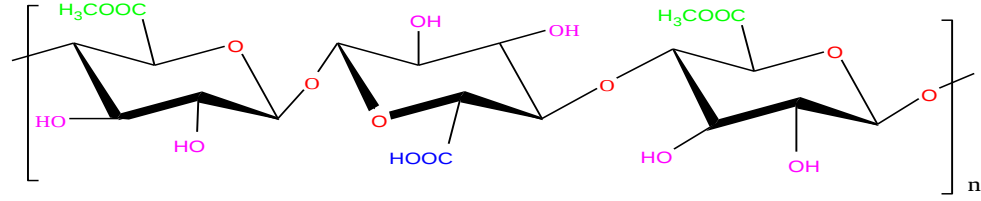
Polimerler, ilaç taşıyıcıları olarak en çok araştırma konusu olmuş materyallerden biridir [15]. Polimerlerin, ilaçların sürekli salınmasını, vücudun enzimatik ve dejeneratif koşullarından korunmasını ve pasif hedeflemede tümör hücresinde ilaç birikimini sağlayabildikleri tespit edilmiştir. Buna ek olarak, bazı ilaçların suda zayıf çözünürlüğünün üstesinden gelmek için kullanılabilmektedirler [51]. Polimer kompozitler yüksek performanslı malzemeler olarak potansiyel uygulamalarda güçlü, dayanıklı ve çok fonksiyonlu türler olarak değerlendirilmektedir [105]. Siklodekstrin, polilaktid, kitosan, selüloz ve jelatin gibi doğal biyolojik olarak bozunabilir polimerler, biyouyumluluk, yenilenebilirlik ve çevresel duyarlılık gibi mükemmel özelliklerinden dolayı kontrollü ilaç salım sistemleri için uygulanmaktadırlar. Son zamanlarda, yeşil çay fenol [106], nişasta [107], kurkumin [108] gibi birkaç fonksiyonlandırma ajanlar daha düşük sitotoksik ve daha iyi suda çözünürlük etkileri sağlamaktadırlar. Doğal malzemeler arasında pektin, nanomalzemelerin üretiminde etkili ve biyolojik olarak uyumlu indirgeyici olduğu rapor edilmiştir [109,110].

Diğer yandan, polimerler biyouyumluluğu, ilaç yükleme ve salım performansını artırmak için çeşitli nanoparçacıklar ile konjuge edilmektedirler [111,112]. Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre, biyouyumlu polimerler ile konjuge edilen nano-boyutlu grafen oksit ilaç taşıyıcısının sitotoksitesinin azaltılmasının yanı sıra yüksek yükleme verimine sahip olması ve ilacın daha kararlı olmasını sağladığı bulunmuştur [92,103,113]. GO'nun polimerle fonksiyonellendirilmesinin aglomerasyonu azaltmanın,

kararsızlığı önlemenin ve verimliliği artırmanın en etkili yollardan biri olduğu gösterilmektedir [92,114]. Fonksiyonelleştirilmiş grafene dayalı ilaç verme sistemleri üstün bir yer tutmuştur, çünkü işlevselleştirme hücre ortamında biyouyumluluk ve stabiliteyi artmaktadır, ayrıca, π - π istifleme yoluyla ilaç yüklenmesi için yeterli yüzey alan bırakmaktadır [111].

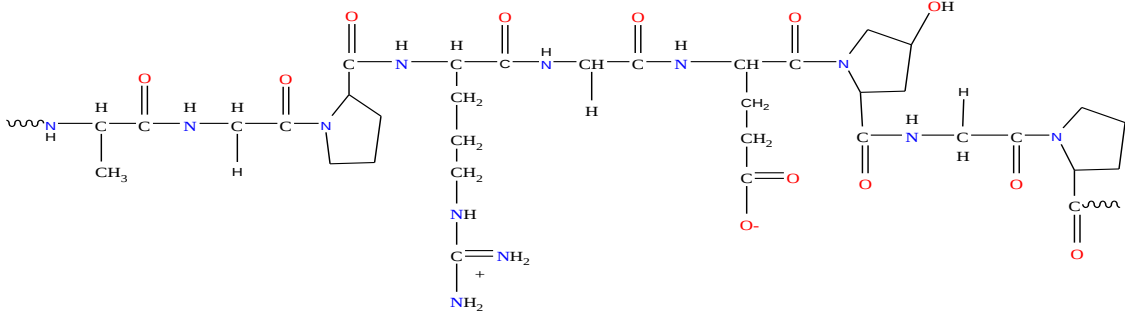
Polimer konjuge GO çeşitli ilaç dağıtım sistemleri için son birkaç yıldır araştırılmıştır. Polimerlerin GO'yu işlevselleştirilmesi, SN38 ilacını sunmak amacıyla PEG ile başarıyla modifiye edilmesi Liu ve arkadaşları tarafından ilk kez rapor edilmiştir [115,116]. Daha sonra, ilgili birkaç çalışma bildirilmiştir. Örneğin; metotreksatin ilacının etkili bir şekilde verilmesi için jelatin ile konjuge edilmiş grafen tabakası hazırlanmıştır [117]. Mianehrow ve arkadaşları GO'nun salım ortamlarındaki stabilitesini arttırmak için hidroksietil selüloz ile stabilizasyonunu araştırmışlardır [118]. Lei ve çalışma grubu daha kararlı, suda çözünürlüğü iyi ve yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olan, kitosan ve sodyum aljinatla fonksiyonelleştirilmiş GO hazırlamışlardır [112]. Pan ve arkadaşları A-5RT3 kanser hücreleri üzerinde anti-proliferasyon etkisi gösteren kamptotenin bir ilaç taşıyıcısı olarak poli (N-izopropilakrilamid) ile GO modifiyesini geliştirmişlerdir [119]. Zhang ve arkadaşları hedef spesifik MCF-7 kanser hücrelerinin tedavisi için hedefleme ajanı olarak folik asit ve sabitleyici olarak poli(etilen glikol) kullanmışlardır [120]. Şimdiye kadar GO'nun işlevselleştirilmesi, çeşitli biyomedikal uygulamalarında devam etmektedir. Bu tez çalışmasında doğal polimer olan pektin (PEC), jelatin (GEL) ve hidroksipropil selüloz (CLS) kullanılmıştır.

PEC çoğu bitkinin hücre duvarlarını oluşturan doğal bir polimerdir ve gıda, kozmetik, eczacılık ve biyomedikal endüstrilerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [121,122]. Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu olan bu polimer, ilaç dağıtımı için yaygın bir şekilde araştırılmaktadır [123]. Günümüzde, doku mühendisliği uygulamaları ve ilaç dağıtımı için taşıyıcı olarak pektin jellerinin kullanımına ilgi artmaktadır [124–127]. PEC, uygun fiziksel özellikleri, yüksek su içeriği, hücreleri, genleri, proteinleri ve ilaçları homojen olarak hareketsiz kılma yeteneği gibi önemli niteliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalar için umut vadetmektedir [128–130]. Öte yandan, muko yapışkanlık, bazik ortamlarda çözünme kolaylığı ve asit ortamlarda jel oluşturma kabiliyeti, ilaç dağıtımı için ideal bir polimer olarak pektini ön plana çıkarmaktadır. Ayrıca, pektinin, kanser patolojilerinin farklı evrelerinde yer alan galektin moleküllerini tanımlaması, özellikle hedeflenmiş tümör hücrelerinin tedavisi hususunda ilgi çekmektedir [131]. PEC'nin kimyasal yapısı, hidroksi, esterlenmiş karbonil ve eter grupları gibi önemli fonksiyonel grupları içermektedir. Bu fonksiyonel gruplar, PEC'nin GO tabakasıyla kolaylıkla konjuge olmasını sağlamaktadır. PEC'nin kimyasal yapısı Şekil 1.4'te verilmiştir.



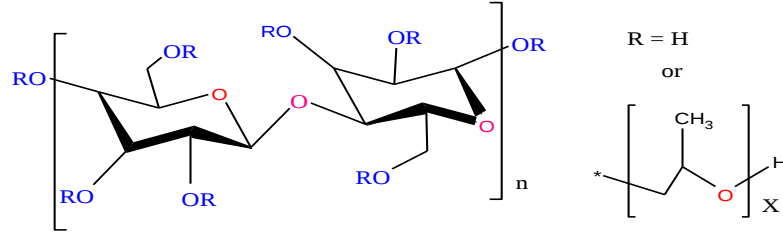
Şekil 1. 4. PEC'nin kimyasal yapısı

GEL, biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan ve biyouyumlu bir polimerdir [132,133]. Kemik, deri ve tendon gibi hayvan bağ dokularının birincil protein bileşeni olan kollajenden türetilmiş yüksek moleküler ağırlıklı bir polipeptittir [134]. Biyolojik kökenli olması, mükemmel biyolojik bozunabilirlik, biyouyumluluk gibi önemli özellikleri ve düşük maliyetli olması nedeniyle doku mühendisliğinde büyük ilgi çekmektedir [133]. GEL, ilaç salım, doku mühendisliği, ve gen terapisi için de kullanılmaktadır [135]. Ayrıca, -NH₂, -COOH ve -OH içeren aktif grupların varlığı nedeniyle, çeşitli amaçlar için başka fonksiyonel moleküller ile modifiye edilebilmektedir [136]. GEL'nin kimyasal yapısı Şekil 1.5'te sunulmuştur.



Şekil 1. 5. GEL'nin kimyasal yapısı

Neredeyse tükenmez ve yenilenebilir bir ham madde olan selülozun (CLS) oldukça önemli bir biyopolimer olduğu bildirilmektedir [137]. CLS'nin makro ve nano fiberleri, yüksek mukavemet ve sertliği, biyolojik bozunabilirliği, yenilenebilirliği ve kompozitlerinin geliştirilmesindeki uygulaması nedeniyle artan bir ilgi görmüştür [138]. Son zamanlarda, CLS esaslı akıllı malzemeler; sensörler, tıbbi ve elektronik uygulamalar için benzersiz özelliklerinden dolayı dikkat çekmiştir [139]. Bu çalışmada kullanılan, hidrokshipropil selüloz, gıda, ilaç, kağıt, seramik, plastik gibi çeşitli uygulamalarda kaplama, kapsülleme, bağlama malzemeleri, köpükleştirici maddeler, koruma kolloidleri ve topaklayıcılar olarak kullanılan en çok bilinen selüloz türevlerinden biridir [140]. Hidrokshipropil selülozun kimyasal yapısı Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1. 6. CLS'nin kimyasal yapısı

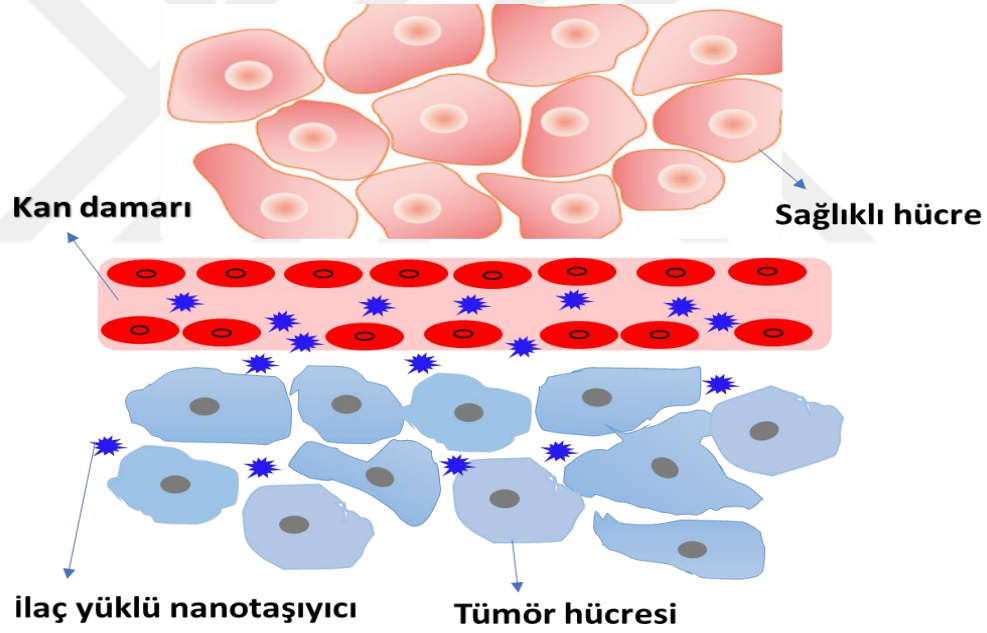
1.5. Hedefli İlaç Teslimi

Hedefli ilaç teslimi hedeflenmemiş bölgelerin (sağlıklı hücreler) aksine vücudun belli bir bölümüne (tümör hücreleri) kanser ilaçları dağıtan yeni rekabetçi kanser tedavi yöntemlerinden biridir [20]. Bu kanser hücresi hedefleme stratejisi, klasik tedavilerle ilişkili yan etkileri azaltarak verimliliği artırır [141]. Hedefli ilaç teslimi; pasif, aktif ve uyarıya duyarlı sistemler olarak üç bölümde incelenebilir [142].

1.5.1. Pasif Hedefleme

Pasif hedefleme, ilaçların pasif olarak (herhangi bir hedefleme maddesi kullanmadan) hedef bölgeye ulaşmasını sağlayan bir yöntemdir [143]. Pasif hedefleme, artırılmış geçirgenlik ve tutunma etkisi (EPR) ile çalışır. EPR etkisi belirli boyutlu moleküllerin tümör dokusunda normal dokularda olduğundan çok daha fazla birikim eğilimi gösterdiğini ifade eden bir kavramdır [144]. Bu etki, tümöre yakın kan damarlarının boyutları 100 nm ile 780 nm arasında değişen yarıklardan kaynaklanır [145]. EPR etkisi,

ilacın sirkülasyon süresini, penetrasyon hızını ve hücre ile etkileşimini etkiler ve parçacık boyutu, şekli ve yüzey yükü gibi nanoparçacık özelliklerinden etkilenir [146]. Sirkülasyon sürelerini ve hedefleme kabiliyetini artırmak için ideal parçacık boyutu çapı 10 - 100 nm olmalıdır [147]. Negatif bir yüzey yüklü nanoparçacıklar kan içinde daha uzun süre dolaşacaktır, ancak pozitif yüklü nanoparçacıklar kanser hücreleri tarafından daha kolay alınır [142,148]. Ayrıca, küresel şekilli nanoparçacıklar hızlı olarak hücre ile etkileşmektedir [149]. Şekil 1.7’de pasif hedefleme teslimi şeması verilmiştir.



Şekil 1. 7. Nanoparçacıkların artırılmış geçirgenlik ve tutunma etkisi (EPR) ile tümörlere pasif hedeflenmesi

1.5.2. Aktif Hedefleme

Aktif hedefleme, ilaç taşıyıcıların kanser hücresi yüzeyindeki molekülleri tanıyabilen spesifik hedefleme ligandı ile konjuge edilmesiyle sağlanmaktadır [150]. Bu ligand hedef hücrelerle reaksiyona girebilir ve hedef hücredeki bir reseptöre bağlanabilir [142,151]. Daha sonra, nanotaşıyıcı ilacın daha yüksek salımına yol açarak, endositoz yoluyla tümör hücresinin iç kısmına alınır [152]. Böyle bir tümör hedefleme stratejisi, sistemik toksisiteyi en aza indirgeyerek istenmeyen yan etkileri azaltacaktır [153]. Folik asit ve karbonhidratlar gibi küçük moleküller veya peptidler, proteinler, antikorlar, aptamerler ve oligonükleotidler gibi makromoleküller de dahil olmak üzere hedefleyici olarak geniş ligand çeşitleri kullanılmaktadır. Tümör tedavisinde en yaygın olarak kullanılan aktif hedefleme ligandları; folik asit [102], hiyalüronik asit [154] aptamerler [155], transferrin, antikorlar ve peptidleri [156] içermektedir.

Folik asit, hedefli ilaç dağıtım sistemleri için en yaygın kullanılan ligandlardan biridir. Hücreyi hedeflemek ve folat reseptörü vasıtasıyla endositozu arttırmak için kullanılan bir ligandır. Folat reseptörleri için yüksek afiniteye sahip, kararlı ve düşük immünojenik bir ajandır [157,158]. Hiyalüronik asit doğal olarak oluşan bir lineer polisakkarittir [119]. Transferrin, tümör hedefleme uygulamaları için kullanılan bir başka reseptör-ligand çiftidir ve reseptörü ile işleyen bir membran glikoproteinidir. Transferrin reseptörüne bağlandığında endositozu başlatır ve hücrel sitoplazma ile etkileşir [156,159]. Aptamerler ise çeşitli konformasyonlara sahip olan ve ligand bağlanması yapabilen kısa oligonükleotid RNA veya DNA'dır. Diğer hedefleme ajanlarıyla

karşılaştırıldığında, aptamerler kolaylıkla sentezlenebilmeleri, biyolojik ortamlardaki stabiliteleri, sitotoksitelerinin olmamaları, hızlı doku penetrasyonları ve hedeflere yüksek afiniteleri gibi birçok çekici özelliklere sahiptirler. Ayrıca, nükleazlar tarafından aşamalı olarak parçalanabilir ve sistem toksisitesi olmaksızın kandan temizlenebilirler [160–162].

1.5.3. Uyarıya Duyarlı Sistemler

Uyarıya duyarlı sistemler, fiziksel, kimyasal veya biyolojik uyarılarla yapı ya da konformasyonlarında değişiklikler oluşturarak ilaçları serbestleştirebilen sistemlerdir. Bu uyarılar iç veya dış uyarıcı olarak ikiye ayrılabilir. İç uyarılar, hedef dokulardaki pH ve iyonik şiddet değişikliklerini içerir [145]. Dış uyarılar fiziksel hedefleme olarak da bilinir. Fiziksel hedefleme, nanotaşıyıcıları hedef bölgeye yönlendirmek ve salınımı kontrol etmek için manyetik alan gibi harici kaynakları kullanır [142].

1.6. Foto Tedavi

Foto tedaviler, kanser hücrelerine seçici olarak öldürmek için belirli dalga boyundaki ışığı kullanmaktadırlar [163]. İki ana foto tedavi türü vardır: fototermal ve fotodinamik tedavi [163,164]. Fototermal tedavi (PTT), kanser tümörleri tedavi edebilme kapasitesine sahip, uygulanması kolay ve geleneksel tedavilerden daha üstün bir tedavidir [165]. PTT’de nanoparçacık, yakın kızılötesi ışığı (NIR) kullanarak, tümörü yok etmede umut verici bir tedavi sağlamaktadır [166]. PTT’ye dayanan

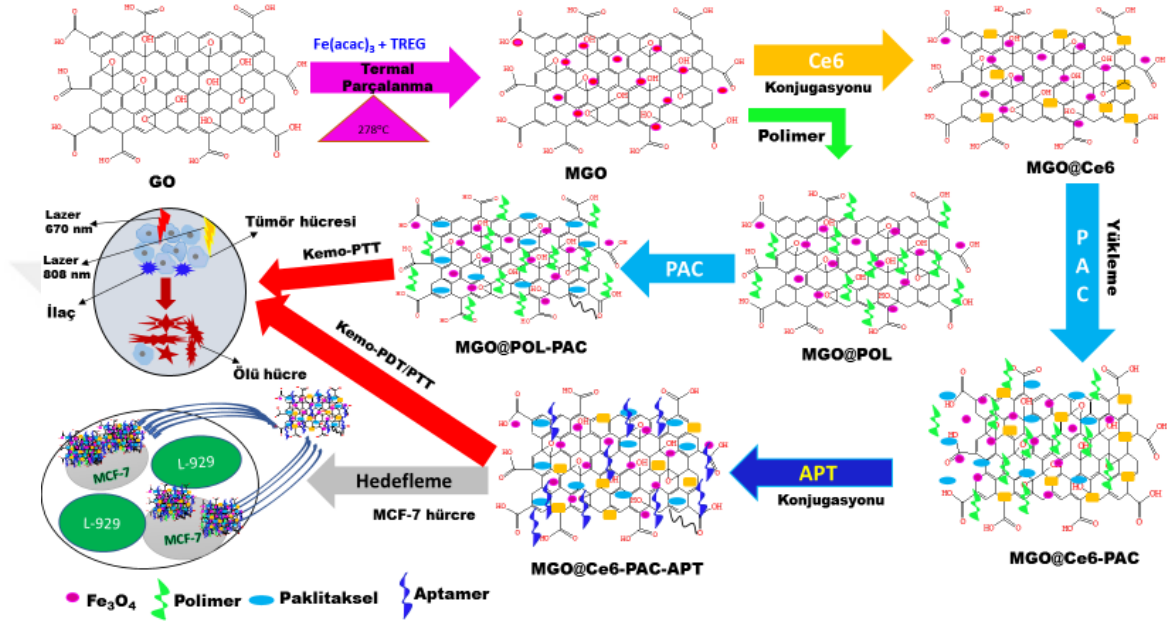
nanoparçacıklar, verimli tümör ablasyonu için çevredeki dokuya minimum etki ile umut verici bir tedavi stratejisidir [166]. NIR lazer ışınlamasının ardından, foto emici maddeler hipertermi üretmek ve daha sonra tümörleri yok etmek için elektromanyetik dalga enerjisini yerel ısıya dönüştürebilmektedir [167]. Kanser hücrelerinin tahrip edilmesi, lokalize foto-termoliz için dokuya yeterli miktarda enerji veren fototermal etkileşime bağlı olarak gerçekleşmektedir [168]. Fotodinamik terapi (PDT) ise klinik uygulamada çeşitli kanserlerin tedavisinde giderek daha fazla tanınan bir terapi [169,170]. Geleneksel tedavi yöntemlerle karşılaştırıldığında, PDT; ilgi alanının seçiciliği, direnç geliştirmeden veya toplam doz sınırlamalarını aşmadan hastaları tedavi etme yeteneği gibi çeşitli avantajlara sahiptir [171,172]. PDT kavramında, fotosensitizör (PS) uygun dalga boyları ile ışınlama üzerine reaktif oksijen türlerini (ROS) üretmek için foton enerjisini aktarır ve bu singlet oksijenleri hücreleri öldürebilmektedir. "Klorofil a" dan gelen klorlar, kırmızı ışık bölgesinde yüksek yokoluş katsayısı ve yüksek singlet oksijen kuantum verimi nedeniyle PS ajanı olarak sıkça kullanılmaktadır [173].

1.7. Tezin Amacı ve Kapsamı

GO ve türevleri nanomalzemelerin hedefli ilaç dağıtım sistemleri ve manyetik rezonans görüntüleme için uygulanması son yıllarda araştırılmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli kanser tedavileri için umut verici bir nanomateryal olarak manyetik grafen oksit (MGO) nanotaşıyıcılar henüz detaylı olarak araştırılmamıştır [22,174]. Ayrıca, Fe_3O_4 konsantrasyonlarının MGO nanomalzemelerinin hücre canlılığı, manyetik özelliği, ilaç

yükleme ve salım performansları üzerindeki etkileri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Aptamerleri spesifik hücre hedefleme ajanı olarak kullanan ilaç yükleme ve salım sistemleri hakkında az sayıda rapor bulunmaktadır [175]. Foto-kimyasal tedavi kombinasyonu üzerine yapılan bazı çalışmalar bildirilmiş olsa da, nadiren hedefli ilaç dağıtım sistemleri ile birleştirilmiştir. Paklitaksel kanser ilacıyla süperparamanyetik GO'ya dayalı ilaç salım sistemi ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Diğer yandan, grafen ve türevlerinin biyomedikal uygulamasında, GO'nun işlevselleştirilmesi, en yeni araştırma alanlarından biridir. Şimdiye kadar, etkili bir ilaç dağıtım aracı elde etmek üzere ilaç yükleme ve salım performansını, biyouyumluluğunu ve kararlılığını artırmak için MGO'yu PEC, GEL ve CLS ile işlevselleştiren bir rapor bulunmamaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada, GO tabakasının yüzeyine yüklenen Fe_3O_4 nanoparçacıkların miktarlarını değiştirerek farklı manyetik özelliği, ilaç yükleme ve salım performanslarına sahip dört süperparamanyetik nanotaşıyıcılar sentezlenmiştir. Hazırlanan nanotaşıyıcıların biyouyumluluğu, kararlılığı, ilaç yükleme ve salım performanslarını artırmak için PEC, GEL ve CLS ile konjuge edilmiştir. Diğer yandan, MGO nanomalzemeler ışığa duyarlı klorin e6 (Ce6) ve MCF-7 kanser hücrelerini tanıyabilen APT ile konjuge edilmiştir. Elde edilen nanomalzemeler UV, FTIR, Raman, DSC, TGA, VSM, TEM, Zetasizer, ICP-OES ve XRD ile karakterize edildi. Daha sonra, sentezlenen nanomalzemelerin ilaç yükleme ve *in vitro* salım performansları ve pH duyarlılıkları model kanser ilacı olarak paklitaksel kullanılarak araştırıldı. Biyouyumluluğu ve sitotoksikite çalışmaları da L929 fibroblast normal hücreleri ve MCF-7 kanser hücreleri kullanılarak, MTT yöntemi ile gerçekleştirildi. Son olarak da APT konjuge edilmiş yapılarının kanser hücrelerine bağlanması akış sitometri deneyleri

ile gerçekleştirilmiştir. Nanotaşıyıcıların sentezlenme, ilaç yüklenme ve spesifik kanser hücre hedefleme işlemleri Şekil 1.8’de özetlenmiştir.



Şekil 1. 8. Nanotaşıyıcıların sentezlenme, ilaç yüklenme ve spesifik kanser hücre hedefleme işlemlerin şematik gösterimi

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Grafen oksit, Grafen Süpermarket, ABD'den satın alındı. Demir (III) asetilasetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$, $\geq \% 99,9$) Sigma-Aldrich, ABD'den temin edildi ve saflaştırılmadan kullanıldı. Trietilen glikol (TREG, $\geq \% 99$), Merck Millipore şirketi, Almanya'dan sağlanmıştır. Pektin, esterlenmiş potasyum tuzu, (% 55-70) Slovakya'daki Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Hidroksipropil selüloz ve Jelatin a tipi, Sigma-Aldrich, ABD tarafından sağlanmıştır. Paklitaksel ($\geq \% 97$), Sigma-Aldrich, Çin'den elde edildi. 5-[FITC][PEG][PEG][PEG]GCAGTTGATCCTTGGATAACCCT GG ve 5-[FITC]AAAAAAGCAGTTGATCCTTTGGATA CCCTGG dizisine sahip olan MCF-7 kanser hücrelerini hedefleyen aptamer, Sigma ABD tarafından sentezlenmiştir. Klorin e6 (Ce6) ve doksorubisin (DOX) Santa Cruz Biotechnology, Inc. şirketi, Teksas, ABD'den tedarik edildi. Dimetil sülfoksit (DMSO), ACS derecesi Amresco'dan satın alınmıştır. Etanol ($\geq \% 99,8$) Sigma-Aldrich ABD'den temin edilmiştir.

2.1.2. Cihazlar

Spektroskopi analizleri: UV absorpsiyon spektrumları, UV spektrometresi (UV/Vis spectrometer, lambda 35, PerkinElmer, ABD) ile ölçüldü. FTIR spektrumları, IR spektrometresi (IR spectrometry vortex 70V, Bruker, ABD) ile 400-4000 cm^{-1} frekansları arasında kaydedildi. X-ışını kırınımı (XRD), 40 kV jeneratör gerilimi ve 40 mA akımında $\text{CuK}\alpha$ radyasyon ile donatılmış Rigaku D/MAX2200 / PC difraktometre kullanılarak alındı. Numuneler numune tutucu üzerine tutturulmuştur ve 20 °/dakika hızında 2-100°, 2θ aralığında taranmıştır. Raman spektrum, Raman mikroskop, SENTERRA, Bruker, ABD ile kaydedildi.

Yüzey morfoloji ve parçacık boyutu analizleri: Nano taşıyıcının yüzey morfolojisi ve tabaka boyutu: geçirgenlik elektron mikroskopisi TEM, (Electron Microscope, JEM-3010, Jeol, Japonya), Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) (JSM 5600, JEOL, Japonya) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM, Veeco, multiMode V, AS-12 E, ABD) ile incelenmiştir. Yüzey yükü, Zetasizer (Nano ZS 90, Malvern Instruments Ltd., Malvern, İngiltere) ile zeta hücresi kullanılarak ölçülmüştür. Numuneler ölçülmeden önce 0,1 mg mL^{-1} konsantrasyonda ultra deiyonize su ile hazırlandı. Tüm ölçümler 25 °C sıcaklıkta ve 73° saçılma açısında yapıldı. Grafen oksit tabakasının üzerinde konjuge olan demir oksit miktarları ICP (ICP-OES, Spectro blue, Almanya) ile ölçüldü. Öncelikle, örnekler (5 mg) 10 mL HNO_3 ile disperse edilerek mikro dalga içinde 210 °C’de yakılmıştır.

Manyetik özellikler: Titreşimli Numune Magnetometresi (VSM, Lake Shore Cryotronics, Inc.) ile Ankara Üniversitesi Süperiletken Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapıldı.

Termal analizler: Nanomalzemenin termal davranışı termogravimetrik analiz, TGA (Q500, TA Instruments Inc., Milford, MA, ABD) ile 10 °C/dk ısıtma hızında incelenmiştir. Ayrıca, Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) ölçümleri, DSC Q2000 (TA Instruments Inc., Milford, MA, ABD) kullanılarak kaydedilmiştir. DSC analizi için numuneler önce 60 °C kadar ısıtıldı sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuş, 10 °C/dk ısıtma oranında 400 °C'ye ısıtılmıştır.

Lazer ışınlaması: PTT / PDT için lazer radyasyonunun hücre öldürme etkisini incelemek üzere Diyot lazer sistemi ($\lambda = 808 \text{ nm}$, 1000 mW, ŞUA-808-1000, Kenar Mühendislik, Ankara, Türkiye) ve ($\lambda = 660 \text{ nm}$, 1000 mW, ŞUA-660-1000, Kenar Mühendislik, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır.

Hücre kültür çalışmaları: Apoptotik ve nekrotik hücre sayısı DAPI ve FITC filtreleri kullanılarak floresan mikroskop (Leica, DMI 6000, Almanya) ile incelenmiştir. Apoptotik ve nekrotik hücre miktarı rastgele mikroskopik alanlardan sayılmıştır. Hücrelerin optik yoğunluğu ELISA mikropłaka okuyucu (BioTek, ABD) ile kaydedilmiştir. Akış sitometri analizi BD FACSAria-II, (BD Bioscience, Becton, ABD) cihazı kullanılarak yapıldı.

Yukarıda listelenen cihazlara ek olarak aşağıda belirtilen cihazlar kullanılmıştır.

- ✚ Analitik terazi (OHAUS corporation, Pioneer, PA214C, ABD)
- ✚ Etüv (VacuCell ve Ecocell, MMM group, Çek Cumhuriyeti)
- ✚ Manyetik karıştırıcı (Schott instruments, GmbH, Almanya)
- ✚ pH metre (Hanna Instruments, HI221)
- ✚ Sonikator (ISO LAB, GmbH, Almanya)
- ✚ Çalkalamalı Su banyosu (LAB Companion, BS-21, LAB RepCo, ABD)
- ✚ Isıtmalı su banyosu (SONOREX digita 10P, BANDELIN, Almanya)
- ✚ Santrifüj (NÜVE NF 1215, Türkiye)

2.2. Yöntem

2.2.1. Fe₃O₄'ün Hazırlanması

Manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi için; mikro emülsiyon yöntemi [176,177], solvotermal yöntemi [178,179], sol-jel yöntemi [180,181], birlikte çökeltme yöntemi [182–184], hidrotermal sentezi [185,186], organik çözücülerde termal parçalanma [187–189], elektrokimyasal sentezi [190], ultrasonik kimyasal çöktürme [191], gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında, termal parçalanma yöntemi, yüksek kaliteli süperparamanyetik nanoparçacıkları üretebilen umut verici bir teknik olarak kabul edilmektedir [187]. Buna göre Fe₃O₄ manyetik nanoparçacıklarının sentezi, yüzey aktif maddeler kullanılmadan, demir öncüsü olan demir (III) asetilasetenoat (Fe(acac)₃)'ün trietilen glikol (TREG) içinde sıcaklıkla parçalanmasıyla

gerçekleştirilmiştir [192–194]. Bu reaksiyonda TREG, yüksek kaynama noktalı çözücü, indirgeyici, partiküllerin bir araya toplanmasını önleyici ve dengeleyici ajan olarak rol oynamaktadır [195].

Kısaca, 2 mmol $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 30 mL TREG ortamında çözüldü ve daha sonra argon atmosferinde geri soğutucu altında manyetik olarak karıştırıldı. Karışım önce yavaş yavaş 180 °C'ye ısıtıldı ve 45 dakika süreyle bu sıcaklıkta tutuldu, sonra 280 °C'ye kadar karıştırılarak kaynatıldı ve bu sıcaklıkta 60 dakika sabit tutuldu. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, manyetik nanoparçacıklardan oluşan siyah homojen bir kolloidal süspansiyon elde edildi. Nanoparçacıklar, etilasetat ilave edilerek santrifüj ile çöktürüldü. Elde edilen çökelti tekrar etanolle disperse edilerek 4 defa yıkandı ve 60 °C'de vakum etüvünde kurutuldu.

2.2.2. MGO'nun Hazırlanması

MGO'nun sentezlenmesinde Cong ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır [196]. Bu yöntemde göre 40 mg GO, 30 mL trietilen glikole (TREG) ilave edilerek 3-4 saat vorteks ve sonifikasyon yapıldı. 40 mg demir (III) asetilasetenoat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) ilave edilerek 30-45 dakika daha karıştırıldı. Sonra, argon atmosferinde geri soğutucu altında 278 °C'ye kadar yavaşça karıştırılarak kaynatıldı. Bu sıcaklıkta 60 dakika karıştırıldıktan sonra, karıştırılarak oda sıcaklığına soğuması sağlandı. Oluşan ürün mıknatıs yardımı ile toplanarak 4 kez etanol ve deionize su ile yıkandı ve 60 °C'de

vakum etüvünde kurutuldu. $\text{Fe}(\text{acac})_3$ miktarları değiştirilerek farklı bileşimde MGO yapıları elde edildi.

2.2.3. Polimerlerin MGO ile Konjugasyonu

MGO ile polimer konjugasyonu için, önce doğal polimerler (Pektin, Selüloz ya da Jelatin) ayrı ayrı dionize su ile çözüldü ve 4 mL MGO (1 mg mL^{-1} , 7,4 PBS'de) hazırlandı. Sonra, 3 mL polimer çözeltisi ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, Dionize su'da) ile 4 mL MGO (1 mg mL^{-1} , 7,4 PBS'de) 20 mL'lik tüp içinde karıştırıldı. Daha sonra, 5 dk vorteks edilip, karanlıkta 24 saat karıştırılmıştır. Elde edilen polimer konjuge nano-yapıları mıknatıs yardımıyla toplanarak 3 kez dionize su ile yıkandı ve 60°C 'de vakum etüvünde kurutuldu.

2.2.4. APT'nin MGO ile Konjugasyonu

DNA aptamer MGO ve MGO@Ce6 nano-yapıların EDC-NHS kimyası ile GO'nun COOH grupları ile APT'nin NH_2 gruplarından amid oluşumu ile kovalent olarak bağlanmıştır. APT'ler MCF-7 hücreleri tanıyabilmesi için uygun dizilimde seçilmiştir. Bu deney için iki çeşit APT kullanılmıştır. APT-3, dizgisi: ([FITC]AAAAAAAAA AAAAAAAAAAAGCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGG) ve APT-4: dizgisi: ([FITC] [PEG] [PEG] [PEG] [PEG] [PEG] GCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGG) şeklindedir. APT konjugasyonunda, önce nano taşıyıcılar EDC-NHS karışımında aktive edilmiş, daha sonra APT çözeltisi ile karıştırılmıştır. Kısaca, 1 mg MGO ya da

MGO@Ce6, 1,38 mg N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 1,92 mg 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) 1 mL 10 mM PBS (pH 7,4) çözeltisinde çözüldü. Bu çözelti karanlıkta 8 saat karıştırıldı. Daha sonra bu çözeltinin üzerine 200 μ L, 5 μ M aptamer eklendi ve 2 saat karıştırarak inkübe edildi. Aptamer ile fonksiyonlandırılmış nano-tabakaları (MGO@APT, MGO@Ce6-APT) magnet yardımı ile toplandı ve 3 kez 10 mM PBS çözeltisi ile yıkandı. Son olarak, 1 mL 10 mM PBS ile çözerek farklı konsantrasyonda Akış sitometri deneyi için kullanıldı. Kalan çözelti tekrar çöktürüp oda sıcaklığında kurutuldu [153,197].

2.2.5. Klorin e6'nın MGO ile Konjugasyonu

MGO ve klorin e6 (Ce6) konjugasyonu Huang ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır [166]. Kısaca: Ce6 farklı konsantrasyonlarda (0,5 mM, 1 mM, and 2 mM) DMSO'da çözülerek, 1 mg mL⁻¹ ya da 0,5 mg mL⁻¹ MGO sulu süspansiyonu ile oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat karıştırıldı. Konjuge olmuş MGO@Ce6 mıknatıs yardımı ile ayrıldı. Mıknatıs ile toplanan MGO@Ce6 nanomalzemeler tekrar suda disperse edilip, tekrar magnetle toplandı. Bu işlemler örnek viallerine alüminyum folya sarılarak yapılmıştır. Benzer şekilde MGO@Ce6 nano-yapıları deiyonize su ile 4 kez yıkandı ve vakum etüvünde kurutuldu. Ce6'nın yüklenme verimi 402 nm'deki UV absorbansından kalibrasyon doğrusu yardımı ile bulunmuştur.

2.2.6. Paklitaksel'in MGO'ya Yükleneesi

MGO ya da polimer ile konjuge edilmiş MGO nano-yapılarına paklitakselin (PAC) yükleneesi için önce belirli ilaç miktarları (0,25 – 1,0 mg) dimetil sülfoksit (DMSO) çözücü ile hazırlandı. Daha sonra, 1 mL MGO, MGO@Ce6 ya da polimer konjuge MGO (1 mg mL⁻¹, PBS 7,4) nanomalzemeye 1 mL PAC ilacı çeşitli konsantrasyonda ilave edilerek, karanlıkta 24 saat karıştırılmıştır [174,198]. İlaç yüklü nano-yapılar magnet ve santrifüj yardımıyla ayrılmıştır. İlaç yüklü nano-yapılar 30 °C'de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulurdu. Yüklene PAC miktarı UV spektrometresinden elde edilen kalibrasyon doğrusu ile bulundu (Bkz. EK 1). MGO, MGO@Ce6 ya da polimer konjuge MGO nano-yapısının ilaç yüklene kapasitesi ve ilacın tutuklanma verimi aşağıdaki eşitlikler ile hesaplandı [22,199].

$$\text{Yüklene kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Nano yapıdaki deneysel ilaç miktarı}}{\text{Nanoyapı miktarı}} \times 100 \quad (2,1)$$

$$\text{Tutuklanma verimi (\%)} = \frac{\text{Nano yapıdaki deneysel ilaç miktarı}}{\text{Nano yapıdaki teorik ilaç miktarı}} \times 100 \quad (2,2)$$

2.2.7. Doksorubisin'in MGO'ya Yükleneesi

Bu çalışmada ana ilaç PAC olup karşılaştırmak adına doksorubisin (DOX) kanser ilacı da kullanılmıştır. Genel olarak, DOX'un yüklene yöntemi PAC ile benzerdir. Kısaca, önce DOX'un çeşitli miktarları (0,125 – 1,0 mg mL⁻¹, PBS'de) hazırlandı. Daha sonra

0,5 ya da 1mg MGO ilave edilip, karanlıkta 24 saat karıştırılmıştır [87,196]. İlaç yüklü nano-yapılar magnet ve santrifüj yardımıyla toplandı. Bu işlemler örnek viallerine alüminyum folya sarılarak yapılmıştır. İlaç yüklü nano-yapılar 30 °C’da sabit tartıma gelinceye kadar kurutulurdu.

2.2.8. *İn Vitro* İlaç Salım

İn vitro ilaç salım davranışı çalkalamalı su banyosunu kullanarak gerçekleştirilmiştir. 1 mg ilaç yüklü nano-yapıları (MGO@PAC, MGO@CLS-PAC, MGO@PEC-PAC ve MGO@GEL-PAC) 20 mL’lik vialde 5 mL farklı pH’lardaki (2,0, 5,5, ve 7,4) tampon çözeltileri ekleyerek 37 °C’da 120 saat boyunca karanlıkta çalkalamalı su banyosunda 100 rpm hızda karıştırılmıştır. İlk 6 saat için her 1 saat, ondan sonra her 24 saatte aralıklarında 500 µL örnekleri alınıp aynı miktarda yeni tampon çözeltisi salım ortamına ilave edilerek, alınan çözeltiyi UV spektroskopisi kullanılarak, salınan ilaç miktarı absorbans değerinden hesaplanmıştır. Her bir deney 3 kez tekrarlanmıştır.

Diğer taraftan, ilaç salım mekanizması Korsmeyer-Peppas modeli ile hesaplanmıştır. Bu modele göre, ilaç salma mekanizması denklem 2,3 kullanılarak belirlenmektedir.

$$\frac{M_t}{M_n} = kt^n \quad (2,3)$$

Burada, M_t , t zamanında salınan PAC kütlesi, M_n , yüklenen PAC’nin toplam kütlesi, k, salım hızı sabiti ve n bir üs’dür. N’nin değeri salım mekanizmasını belirtir; $n < 0,45$ Fick

difüzyonu ile ilişkilidir, $n > 0,89$ 'dan sıfır-derece taşıma ve $0,45 < n < 0,89$ Fickian olmayan veya anormal difüzyon olarak bilinmektedir [200].

2.2.9. *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

2.2.9.1. Biyouyumluluk Testi

Hazırlanan nano malzemelerin (GO, MGO-1, MGO-2, MGO-3, MGO-4, MGO@Ce6, MGO@Ce6-APT, MGO@CLS, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@APT) biyouyumluluklarını değerlendirmek için, *in vitro* 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) deneyi ile, L929 fibroblast normal hücre kullanılarak incelenmiştir. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde yapıldı. MTT, metabolik aktivite ile ilgili mitokondrial enzimler tarafından suda çözünmeyen formazan boyaya indirgenmektedir. MTT'nin indirgenmesi primer olarak hücre içerisindeki glikolitik aktivite ile ilgili olmakla birlikte Nikotinamide Adenin Dinükleotid (NADH) ve Nikotinamide Adenin Dinükleotid fosfat (NADPH) varlığına bağlıdır. MTT solüsyonu canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonda bulunan tetrazolium halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleri ile parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. Canlı hücrelerde gözlenen renk değişimi Elisa okuyucuda yapılan okuma sonundaki absorbans değerlerini vermektedir.

Numuneler, 24 saat boyunca, altı farklı konsantrasyonda ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $6,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) test edilmiştir. Bu yöntemle göre: her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde sayılarak 48'lik kuyucuğa ekim yapıldı. Sonra, 24 saat boyunca 37°C 'de ve % 5 CO_2 'de inkübe edildi. Ardından, ortam atıldı ve hücreler, numuneler ile muamele edilerek aynı koşullar altında 24 saat inkübe edildi. Örnekler 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak sadece besi ortamı hücrelere uygulanmıştır. Kültür ortamı atılarak yerine $100 \mu\text{L}$ taze ortam ve $20 \mu\text{L}$ MTT (PBS 'de 5 mg mL^{-1}) eklendi. MTT'yi hücreye entegre etmek için 3,5 saat bekledikten sonra, $150 \mu\text{L}$ DMSO eklendi. Son olarak, muamele edilen hücrelerin optik yoğunluğu ELISA mikropılaka okuyucu (BioTek, ABD) tarafından 570 nm 'de değerlendirildi. Hücre canlılığı, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır [201,202].

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{örneklerin ortalama optik yoğunluğu}}{\text{kontrolün ortalama optik yoğunluğu}} \times 100 \quad (2,3)$$

2.2.9.2. Nano-yapıların Antikanser Aktivitesi

İlaç yüklü nano taşıyıcıların sitotoksik etkilerini değerlendirmek için, nanoparçacıkların sitotoksik aktivitesi, MCF-7 kanser hücreleri kullanılarak MTT testi ile incelenmiştir. Kısaca, MCF-7 kanser hücreleri 96'lık kuyucuklu levhalarda her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha önceden yüklenen ilacın serbest ilaç ile eşit olacak şekilde hazırlanan 100 ng mL^{-1} 'lik MGO, MGO@PAC, MGO@Ce6-PAC, MGO@CLS-PAC, MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC, MGO@APT-PAC, PAC, MGO@DOX ve DOX

örneklerinden belirlenen konsantrasyonlarda (3,125 ng mL⁻¹, 6,25 ng mL⁻¹, 12,5 ng mL⁻¹, 25 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹ ve 100 ng mL⁻¹) hücrelerin üzerine uygulanıp, 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 100 µL besiyeri ve 10 µL MTT çözeltisi ilave edilmiştir. 3,5 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 150 µL DMSO eklenerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının tespiti için 96'lık kuyucuklu plakanın absorbans değerleri ELİSA plaka okuyucuda 570 nm'de okutulmuştur.

Diğer taraftan, foto tedavi yöntemlerinin (PTT/PDT) MCF-7 hedef hücrelerini öldürme etkisi de incelenmiştir. Önce her bir kuyucuğa 1x10⁴ hücre olacak şekilde sayılarak 96'lık kuyucuğa ekim yapıldıktan sonra 24 saat boyunca 37 °C'de ve % 5 CO₂'de inkübe edildi. Sonra, 25, 50 ve 100 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarda numuneler ile muamele edilerek 24 saat aynı koşullarda inkübe edildi. 808 nm ve 660 nm'dek' lazerlerine (100 mW cm⁻²) ayrı ayrı ve birlikte 3 dakika maruz bırakıldıktan sonra tekrar 24 saat inkübe edildi. Kültür ortamı atılarak yerine 100 µL taze ortamı ve 20 µL MTT eklendi. 3,5 saat bekledikten sonra, 150 µL DMSO eklendi. Son olarak, muamele edilen hücrelerin optik yoğunluğu ELISA mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de okutuldu. Kontrol grupları baz alınarak % canlılık hesaplanmıştır.

2.2.9.3. Apoptoz ve Nekroz Analizi

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Bu şekilde hücrelerin apoptoz ve nekroz oranları belirlenmektedir.

Hoechst boyama (33342) hücrelerin çekirdeklerini maviye boyamaktadır. Bütün hücreleri boyamasına rağmen apoptotik hücreler daha parlak ve çekirdek homojenliği kaybolmuş ve parçalanmış olarak görünmektedirler. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler normal hücrelerden ayrılmaktadırlar. İkili boyamada kullanılan diğer boya Propidium iyodür (PI) olarak seçilmiştir. DNA'yı kırmızıya boyayarak nekrozu göstermektedir. PI normal hücrelerin zarlarından geçmez, sadece hücre zarı hasar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçerek nekroza uğramış hücreleri göstermektedir. Canlı hücreler DAPI filtresi içinde mavi renk olarak ve FITC filtresi içinde yeşil renk olarak görülmektedir.

Farklı derişimlerde nano-yapılar fibroblast L929 ve MCF-7 kanser hücreleri kullanılarak, 48 saat etkileştirildikten sonra floresan boyama yapılmıştır [17]. Kısaca, hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her plaka'da 1×10^4 hücre olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. Bu çalışmada L929 ve MCF-7 hücreleri için iki 48'lik kuyucuklu plakası kullanılmıştır. 48'lik kuyucuklu plakada her kuyucuğa 100 μ L hücre konulup 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltıp tüm kuyucuklarına 150 μ L yeni medyum koyulmuştur. Birinci 48'lik kuyucuklu plakada, yüklenen ilacı serbest ilaç miktarı ile eşit olacak şekilde her örneklerinden belli bir konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerin üzerine uygulanıp, 48 saat inkübe edilmiştir. İkinci plakada, benzer şekilde L929 fibroblast hücrelerin üzerine uygulanmıştır. Inkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılarak her kuyucuğa 10 μ L taze ortam ve 10 μ L 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium tozu (WST1) ekledi ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından, 70 μ L ikili

Çalışma solüsyonu (double staining çalışma solüsyonu) eklenip hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerdendirmeği yapılmıştır.

2.2.9.4. Akış Sitometri Analizi

Aptamer konjuge nano taşıyıcıların (MGO@APT ve MGO@Ce6-APT) hedef MCF-7 hücrelerine bağlanması, 4 °C’de 2 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi. Hücre yoğunluğu deneylerden önce hesaplandı. Yaklaşık 1×10^5 hücre, RPMI hücre ortamında süspanse edildi ve 3 dakika boyunca 1200 rpm’de santrifüj edildi ve 1x PBS kullanılarak 2 kez yıkandı. Ardından 200 µL MCF-7 hücreleri 5 ayrı tüpe yerleştirildi. Sonra, tüp 1’de sadece hücre olup, 2, 3, 4 ve 5 numaralı tüplere sırasıyla, APT (300 µM) , MGO@APT, MGO@Ce6-APT ve MGO olmak üzere 200 µL örnek eklendi ve hücrelerle karıştırıldı. Benzer şekilde, negatif kontrol hücresi (L929) ile numuneler ayrı ayrı tüpte karıştırıldı. Daha sonra, 200 µL bağlama tamponu (Annexin V, 10X) her tüp üzerine ilave edildi ve pipet ile karıştırıldı. Sonunda, tüm numune, 4 °C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, her tüp içindeki karışım çözeltisi yıkama (10 mM PBS) tamponu ile yıkandı ve akış sitosimetrinden önce 1x PBS içinde tekrar dağıtıldı. Bu deney, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ naomalzeme konsantrasyonunda yapıldı. Akış sitometri analizi, FACScan sitometresi kullanarak 10,000 olayı sayarak kaydedildi [197].

2.2.9.5. Floresan Mikroskop Analizi

Akış sitometri sonuçlarını desteklemek ve nanotaşıyıcıların hücresel alımını görüntülemek için MCF-7 kanser hücreleri ile muamele edilmiş APT, MGO@APT ve MGO@Ce6-APT'nin floresan görüntüsü Leica MDI 6000 ters (inverted) floresan mikroskopu ile çekilmiştir. İlk olarak, MCF-7 kanser hücreleri, 46 kuyucuklu bir plakaya ekilerek 24 saat inkübe edildi. Ardından, numuneler ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) ile muamele edildi ve 2 saat bekletildi. Son olarak, hücreler floresan mikroskopu ile görüntülendi.

2.3. İstatistiksel Analiz

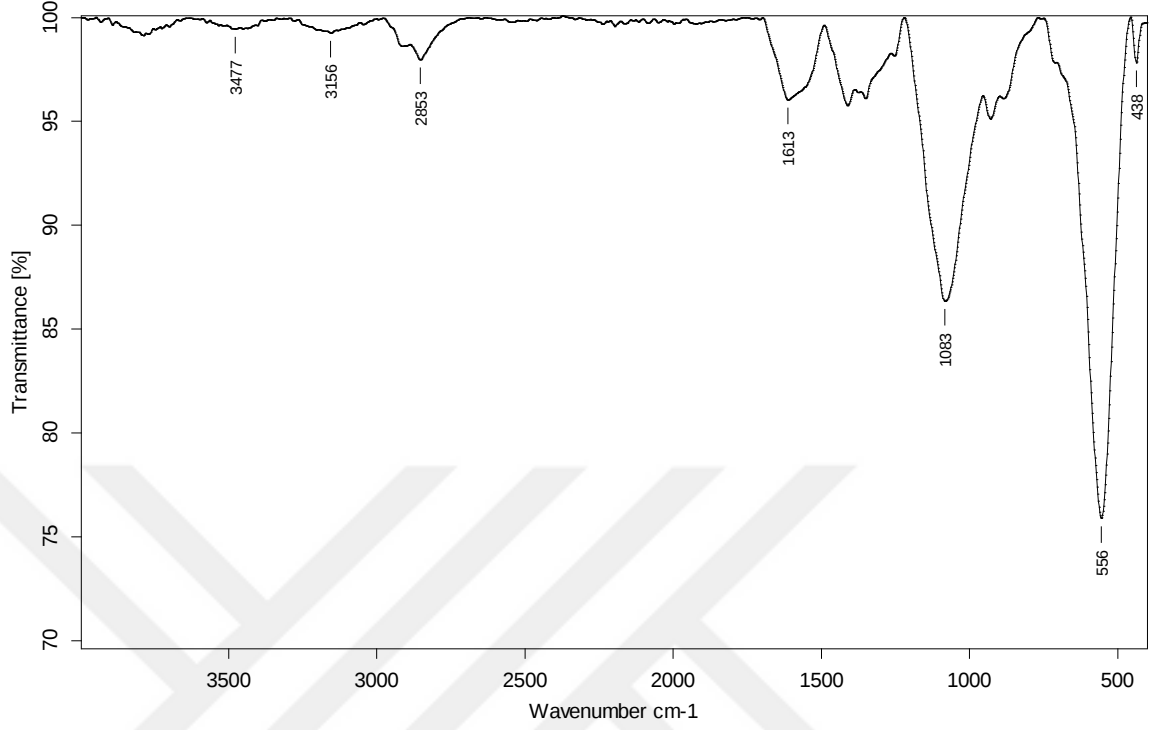
İstatistiksel hesaplamalar Student's t-testi ve tek yönlü ANOVA ile SPSS 16,0 yazılımı (IBM, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin anlamlılık düzeyi (P) $< 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak farklı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak verildi. Tüm deneyler için en az üç bağımsız ölçüm yapılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Fe₃O₄ Manyetik Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

3.1.1. FTIR Spektrum Analizi

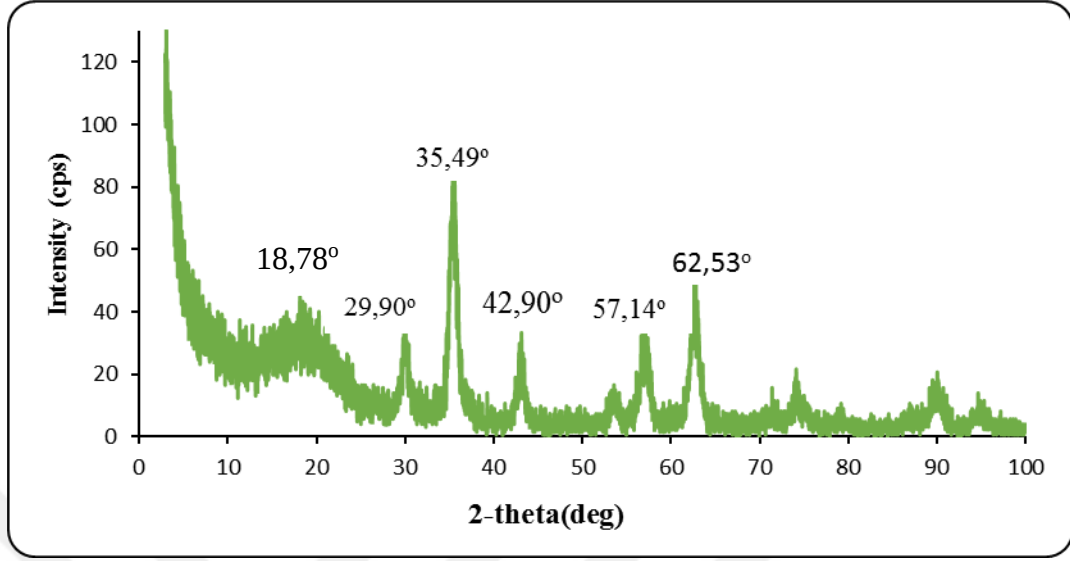
Fe₃O₄'ün FTIR spektrumu Şekil 3.1'de verilmiştir. Şekilde, 438 cm⁻¹ ve 556 cm⁻¹'deki pikler, Fe-O'nun karakteristik gerilme titreşimini göstermektedir [189]. Ayrıca, 1083, 1412, 1613 ve 2853 cm⁻¹'deki pikler, Fe₃O₄ parçacıkların yüzeyine adsorbe olmuş TREG moleküllerinden kaynaklanan, sırasıyla C-O-C gerilme titreşimi, C-OH gerilme titreşimi, -C-H eğilme titreşimi, C=O gerilme titreşimi ve C-H gerilme titreşimlerine atfedilmektedir [184,187,193]. FTIR analizi, Fe₃O₄ numunelerinin aglomerasyon olmadan suda dağılmasını sağlayan organik hidrofilik molekülün (TREG), manyetik parçacıkların yüzeyinde varlığını göstermektedir [203].



Şekil 3. 1. Fe_3O_4 'ün FTIR spektrumu

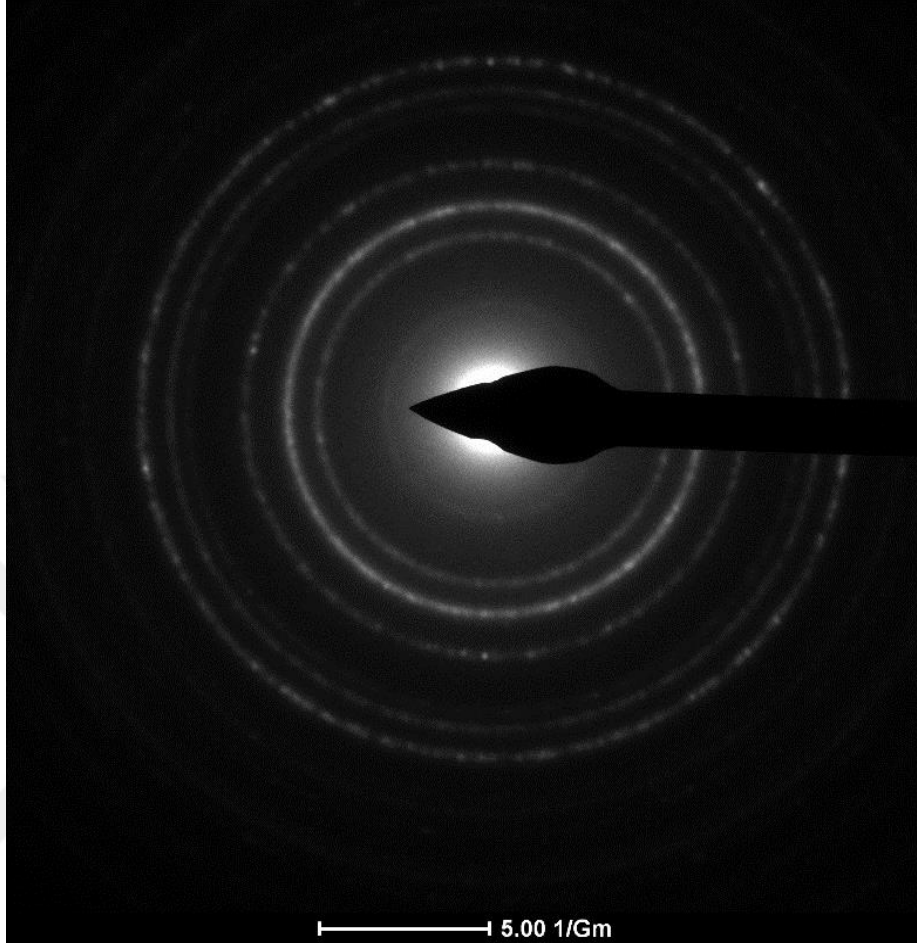
3.1.2. X-ışını Kırınımı Analizi

Fe_3O_4 nanoparçacıklarının kristal yapısını incelemek için X-ışını kırınım analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de görülebileceği gibi Fe_3O_4 'ün X-ışını kırınımı, (111), (220), (311), (400), (422), (511) ve (440) kristal düzlemlerine atfedilebilen, 2θ açısı değerleri sırasıyla $18,78^\circ$, $29,90^\circ$, $35,49^\circ$, $42,90^\circ$, $53,23^\circ$, $57,14^\circ$ ve $62,53^\circ$ olarak saptanmıştır. Bu sonuç, manyetik nanoparçacıkların standart X-ışını kırınımı verileri ile karşılaştırıldığında yüzey merkezli kübik kristal yapıyla manyetik nanoparçacıkların başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır [105,195,204–206].



Şekil 3. 2. Fe₃O₄'ün X-ışını kırınımı

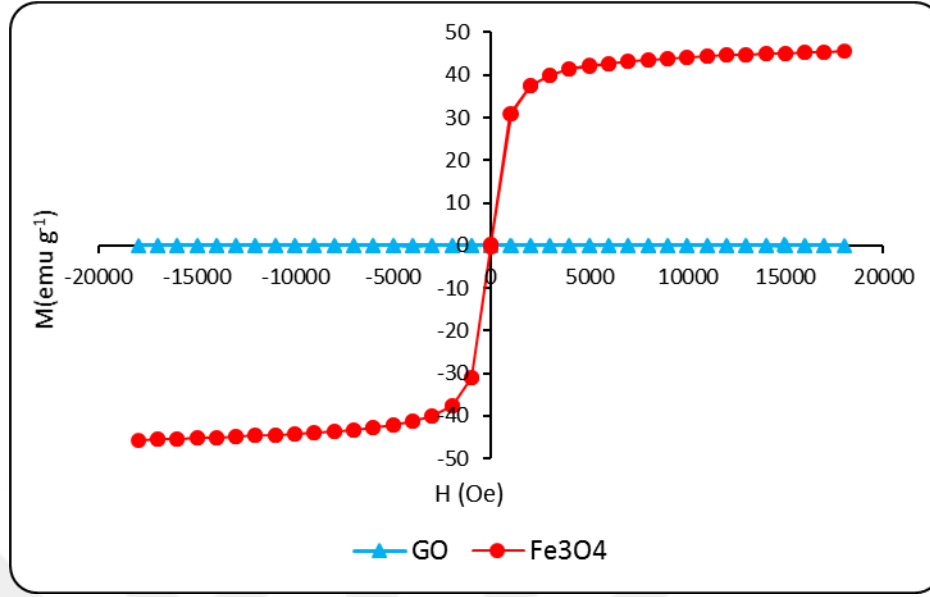
Seçili alan elektron kırınım (SAED) deseni, nano boyutlu materyallerin kristal yapısını karakterize etmek için kullanılan araçlardan biridir. SAED deseni (Şekil 3.3) Fe₃O₄ nanoparçacıkların kristal düzlemlerini sunmaktadır. Numunenin SAED deseninde, altı kat desenli net kırınım halkalara sahip olduğu gözlenmiştir. Bu halkalar, partiküllerin yüksek oranda kristallikleri nedeniyle kırınım noktalarının bir araya gelmesinden kaynaklanmaktadır [207]. Ayrıca, halkalar oldukça belirgindir ve X-ışını kırınımı analizinin sonucu ile tutarlıdır. Bu da nano boyutlu olan Fe₃O₄ parçacıkların yüksek kristalliklerini göstermektedir [208].



Şekil 3. 3. Fe₃O₄ 'ün seçili bölge kırınım (SAED) görüntüsü

3.1.3. Manyetik Özellik Analizi

Fe₃O₄ nano parçacıkların manyetik özellikleri titreşim örneklemlili manyetometre (VSM) ile araştırılmıştır. Şekil 3.4'te, oda sıcaklığında ölçülen GO ve Fe₃O₄'ün histeresis döngüleri verilmiştir. GO'nun manyetik doygunlukları, 0,0'da iken Fe₃O₄ için 45,62 emu g⁻¹ bulunmuştur. Elde edilen sonuç, hazırlanan Fe₃O₄'ün manyetik özelliğinin olduğunu göstermektedir.



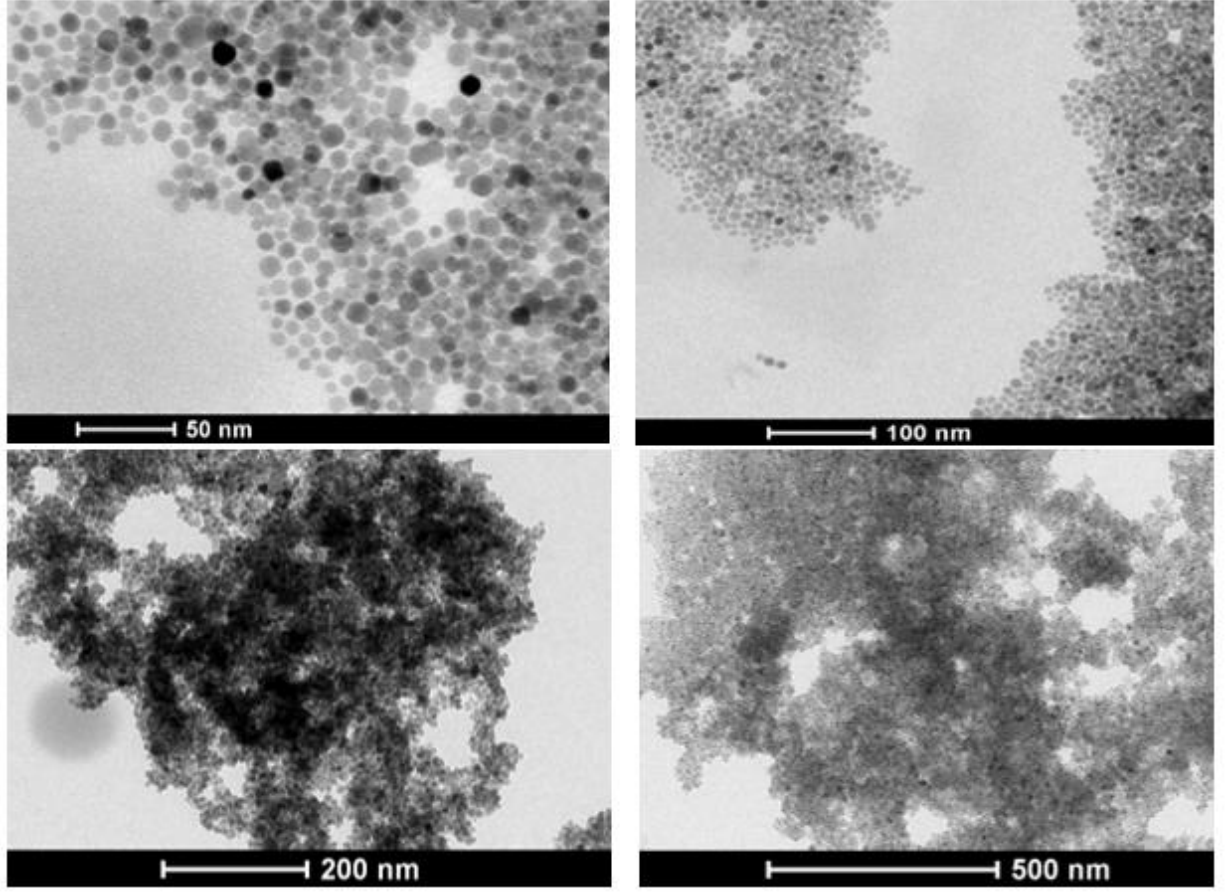
Şekil 3. 4. GO ve Fe₃O₄'ün manyetik histeresis döngüsü

3.1.4. Yüzey Morfoloji Analizi

Fe₃O₄'ün yüzey morfolojisi transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelendi. Şekil 3.5'te gösterilen Fe₃O₄'ün TEM görüntülerinde, nanoparçacıklar iyi bir şekilde dağılmış küre halindedir. Fe₃O₄'ün ortalama çapı yaklaşık 5-15 nm'dir ki bu aralık süperparamanyetik nanoparçacıkların boyut aralığı içindedir [209]. Parçacıkların çoğu, agregasyon olmaksızın düzgün bir şekilde görülmektedir; bunun ise absorbe edilmiş TREG'nin nanoparçacıkları kaplaması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir [210].

Öte yandan, Fe₃O₄ nanoparçacıklarının yüzey yükü Zetasizer ile incelenmiştir. Zeta potansiyeli ve elektrokinetik özellikleri manyetik nanoparçacıkların uygulanması açısından önemli bir parametredir [211]. Nanoparçacıkların kararlılığı zeta potansiyeli

ile ifade edilebilmektedir. Zeta potansiyeli mutlak değer olarak 25-30 mV'dan yüksek değerde ise genellikle parçacıkların elektrostatik olarak kararlı olduğu kabul edilir. Bu durum kolloidal kararlılık, sterik ve elektrostatik iticilikten kaynaklanmaktadır [212]. Sentezlenen Fe₃O₄'ün zeta potansiyelleri pH 2,0, 5,5 ve 7,4'te sırasıyla, +21,77 ± 1,1, -5,18 ± 1,0, ve -23,43 ± 1,96 mV olarak bulunmuştur. Elde edilen verilere göre, pH'daki bazik yöne doğru artış nanoparçacıkların yüzey yükünde negatif yönde artışa sebep olmuştur. Bunun bazik ortamlarda OH⁻ iyon konsantrasyonunun artmasından kaynaklandığı düşünölmektedir [212]. Asidik pH'larda ise manyetik nanoparçacıkların ortamdaki aşırı H⁺ iyon konsantrasyonu nedeniyle pozitif bir yüzey yüküne sahip olduğu rapor edilmiştir [212]. Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir [213,214]. Elde edilen bu sonuçlar, Fe₃O₄ nanoparçacıkların pH'ya duyarlı yapılar olduklarını göstermektedir.

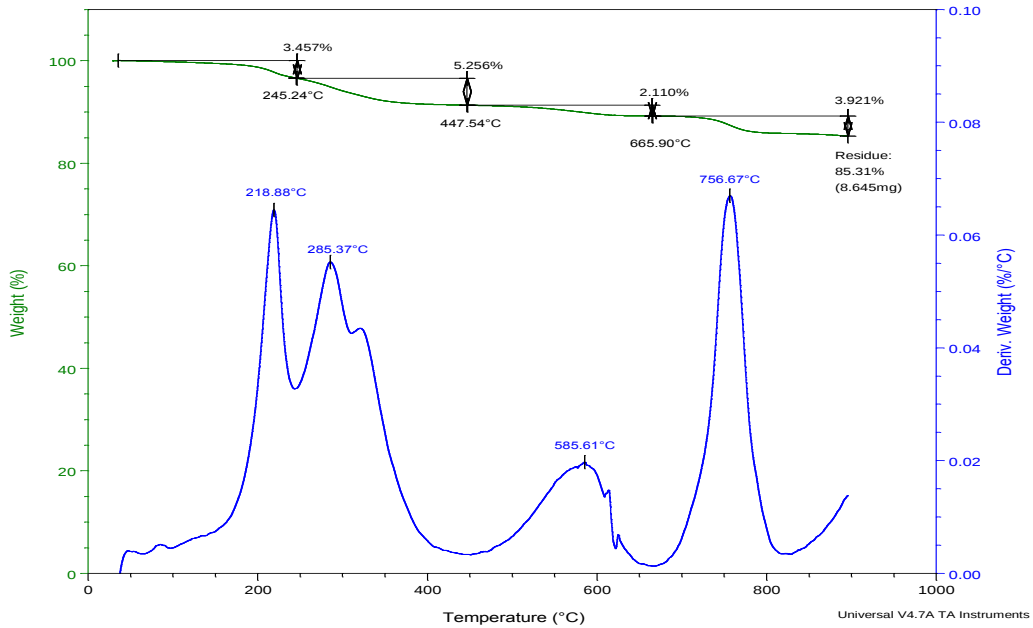


Şekil 3. 5. Fe₃O₄'ün TEM görüntüleri

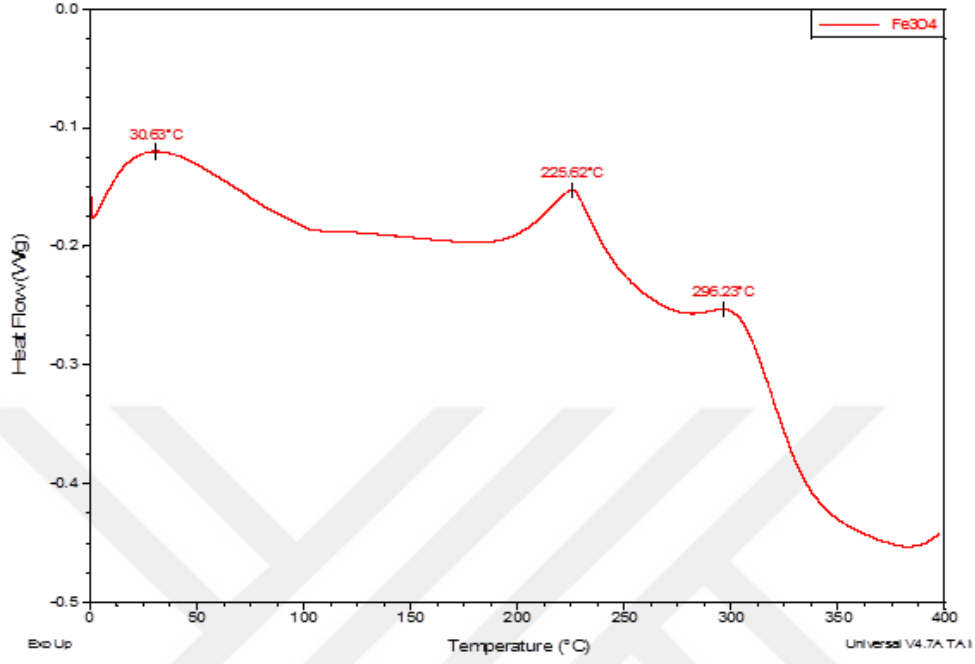
3.1.5. Termal Analiz

Fe₃O₄ nanoparçacıklarının termal davranışları, termal gravimetri analizi (TGA) ve diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) kullanılarak incelendi. Şekil 3.6'da, dört aşamalı ağırlık kaybına sahip olan Fe₃O₄ nanoparçacıkların TGA eğrisi gösterilmektedir. İlk ağırlık kaybı, 0 °C - 245 °C sıcaklık aralığında olup maksimum 218 °C'de gözlenmiştir. Bu ağırlık kaybının (% 3,5) demir oksit yüzeyine adsorbe edilen su veya

çözücü moleküllerinin buharlaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [215–217]. İkinci ağırlık kaybı, maksimum 285 °C ile 245 - 447 °C sıcaklık aralığında tespit edilmiştir. Bu ağırlık kaybı muhtemel kaynama noktası 280 °C olan adsorbe TREG'nin ayrışması ile ilişkilidir [210]. Nispeten kararlı oksijen içeren grupların (FeO-OH gibi) ayrışmasıyla ilişkili olan üçüncü ağırlık kaybı, 447 - 666 °C arasında yer almaktadır [215]. Sıcaklığın 667 °C'den yüksek olduğu son ağırlık kaybının, Fe₃O₄'ten oksijenin kısmen uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [218]. Şekil 3.7'deki DSC eğrisi, 100 °C'nin altında geniş bir pik, 225 °C'de keskin pik ve 296 °C'de omuz göstermiştir. İlk geniş pik, adsorbe suyun uzaklaşmasına atfedilebilir. TGA analizinde gözlendiği gibi, ikinci ve üçüncü pikler adsorbe TREG çözücüsünün kısmen ve tamamen ayrışmasına karşılık gelmektedir [219].



Şekil 3. 6. Fe₃O₄'ün TGA termogramı



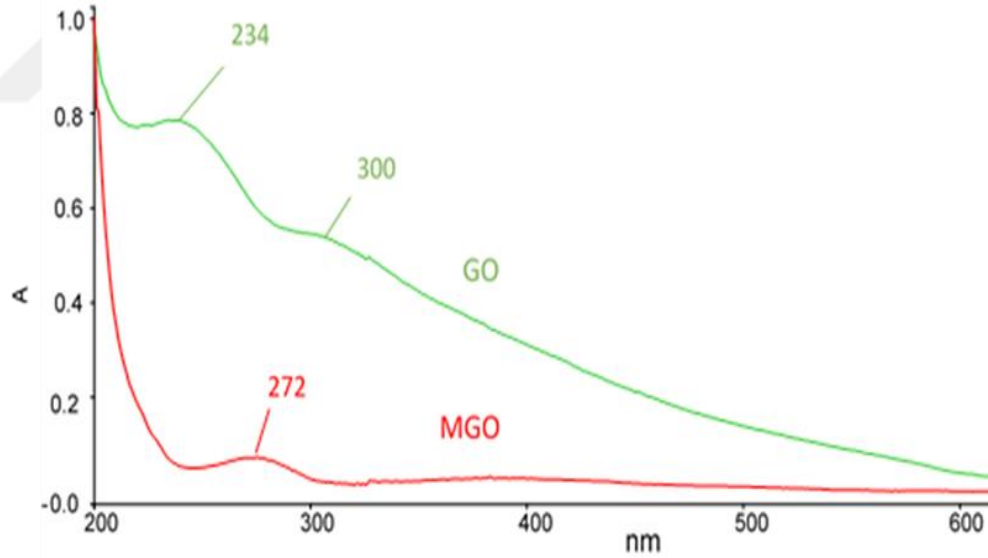
Şekil 3. 7. Fe₃O₄'ün DSC termogramı

3.2. MGO'nun Karakterizasyonu

MGO nano-yapılar, GO tabakasına Fe₃O₄ yüklenerek sentezlendi. Manyetik davranışını ve diğer önemli özelliklerini karşılaştırmak amacıyla 4 farklı MGO örneği hazırlanmıştır. Hazırlanan nano taşıyıcıların; UV, FTIR, XRD, Raman, Zetasizer, ICP-OES, TEM, SEM, AFM, DSC ve TGA analizleriyle yüzey morfolojisi, spektroskopik, manyetik ve termal özellikleri incelenmiştir.

3.2.1. UV Spektrum Analizi

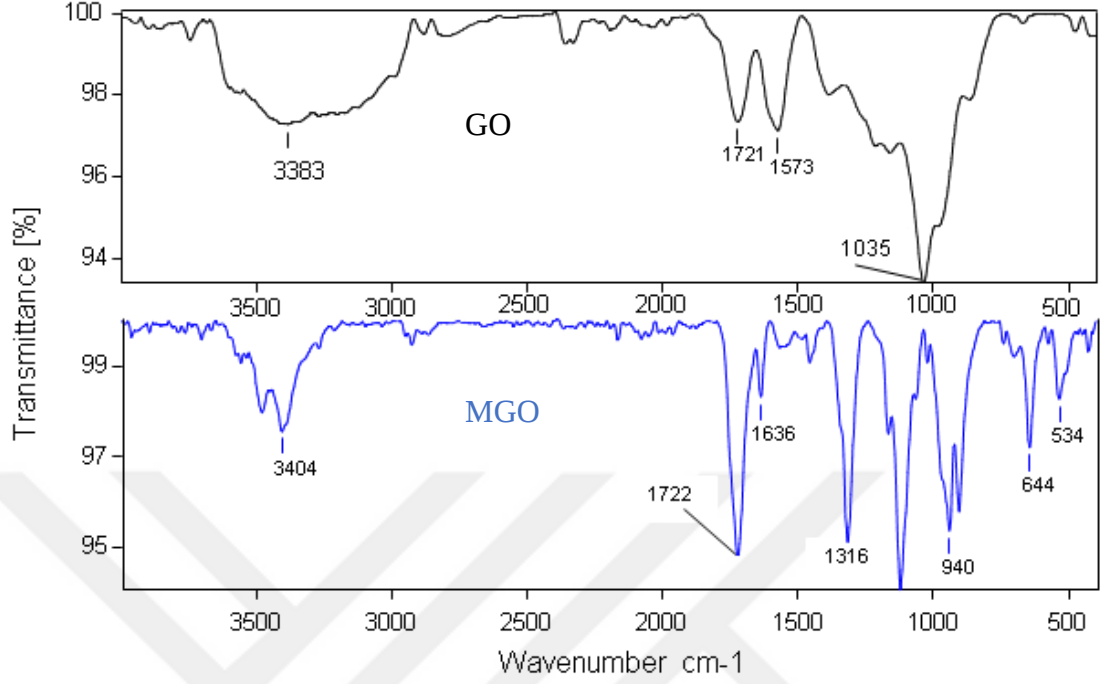
Şekil 3.8’da GO ve MGO’nun UV spektrumları sunulmuştur. GO’nun UV spektrumuna bakıldığında, 234 nm’de maksimum absorpsiyon piki ve 300 nm civarında bir omuz göstermektedir. Bu pikler aromatik C=C ve karboksilik grupların C=O bağlarının $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine atfedilebilir [113,220]. MGO’nun spektrumu ise, 272 nm’de bir geniş pik göstermektedir. GO ve MGO UV spektrumları arasında fark oluşması (kayması), Fe_3O_4 nanoparçacıkların GO tabakasının üzerinde mevcut fonksiyonel gruplardaki oksijen ile bağlanmaları gösterebilmektedir [204,221].



Şekil 3. 8. GO ve MGO’un UV spektrumları

3.2.2. FTIR Spektrum Analizi

GO ve MGO'un FTIR spektrumları Şekil 3.9'da verilmiştir. GO spektrumunda, 3383 cm^{-1} 'deki pik O-H bağı gerilmesini, 1721 cm^{-1} ve 1573 cm^{-1} 'deki pikler karboksilik grupların C=O asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1037 cm^{-1} 'deki pik ise C-O gerilme titreşimidir [209,222]. FTIR spektrumu, grafen oksiti karakterize eden hidroksi, epoksi ve karboksil grupların varlığını doğrulamaktadır. MGO'nun FTIR spektrumunda, 534 ve 644 cm^{-1} 'deki bantlar Fe_3O_4 'ün GO'ya bağlanmasının gösteren Fe-O bağı gerilme titreşimleridir [150,208]. 940 ve 1121 cm^{-1} 'deki bantlar C-O gerilme titreşimlerini temsil etmektedir [105,223]. 1722 ve 1636 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla, C=O ve C=C gerilme titreşimlerine atfedilmektedir [113]. Ayrıca, 1452 ve 1316 cm^{-1} 'deki pikler O-H eğilme titreşimi ve Fe bağalı C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [209,224]. Elde edilen sonuçlar, Fe_3O_4 ve GO'nun karboksil grubu arasında etkileşimlerin varlığını kanıtlamaktadır.

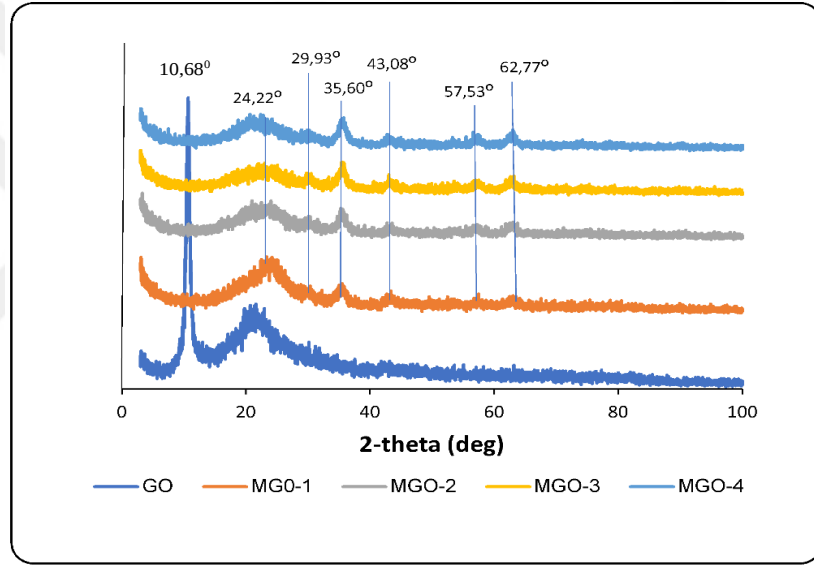


Şekil 3. 9. GO ve MGO'un FTIR spektrumları

3.2.3. X-ışını Kırınımı Analizi

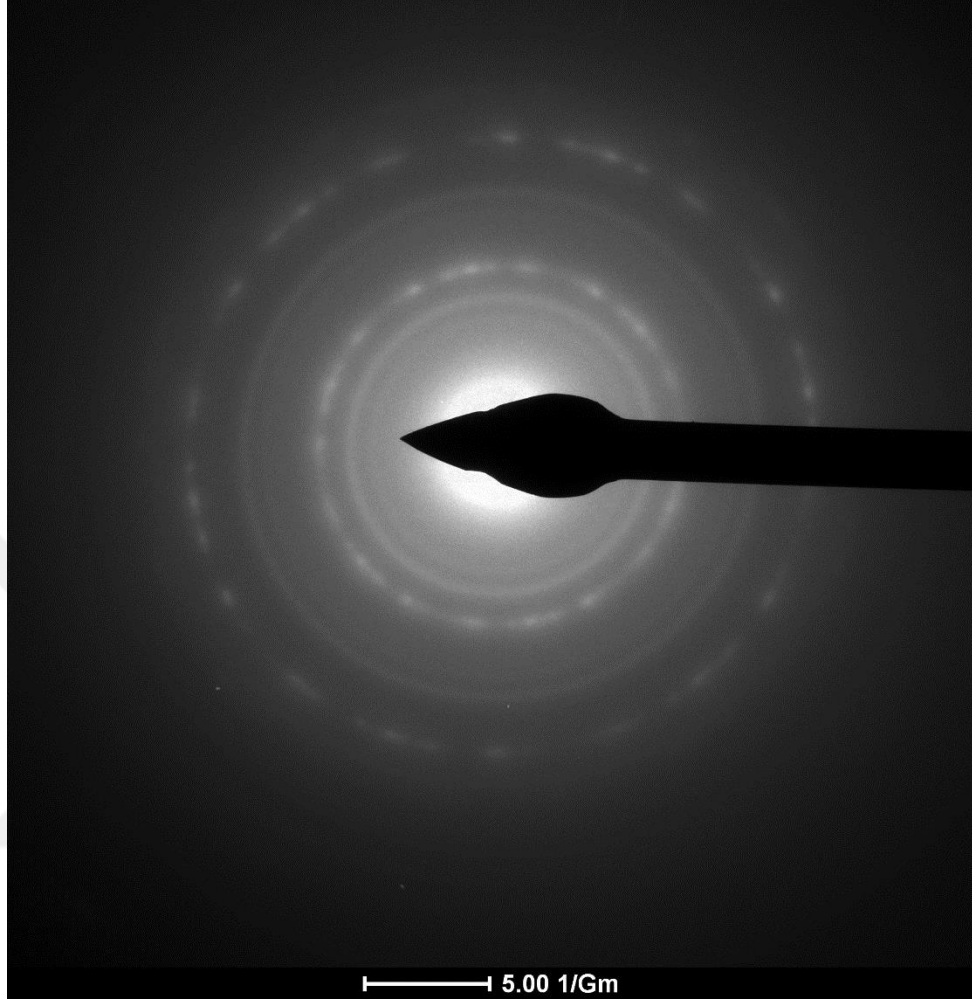
GO ve MGO'nun yapısı X-ışını kırınımı kullanılarak araştırılmıştır. GO'nun X-ışını kırınımı deseninde (Şekil 3.10), 2θ değeri $10,68^\circ$ 'de güçlü bir pik ve $20,68^\circ$ 'de zayıf bir pik görülmektedir. $10,68^\circ$ 'deki pik, (001) yansımasına atfedilirken [209,225], $20,68^\circ$ 'deki pik ise grafen tabakasının ana yapısıyla ilişkilidir [105]. Fe_3O_4 yüklendikten sonra, MGO'nun X-ışını kırınım deseni, $2\theta = 24,22^\circ$ 'de GO tabakasından kaynaklı olan bir kırınım piki göstermiştir [105,226]. Ayrıca, $2\theta = 29,98^\circ$, $35,46^\circ$, $42,92^\circ$, $57,43^\circ$ ve $62,78^\circ$ 'deki pikleri, sırası ile (220), (311), (400) (511), ve (440) kübik Fe_3O_4 'ün kristal düzlemlerine atfedilebilir [204]. Üstelik, $2\theta = 10,68^\circ$ 'deki pikin kaybolması ve ek

piklerin oluşması, GO ve Fe_3O_4 arası etkileşim kaynaklı GO yüzeyinin modifikasyonu ile açıklanabilir [208, 209]. Diğer taraftan, Fe_3O_4 'ün oranı arttıkça $2\theta = 24,22^\circ$ deki karakteristik pikin şiddeti azalmıştır. Bu düşüş, Fe_3O_4 nanoparçacıkların grafen oksit yüzeyinde biriktiğinde grafen oksit yapısının serbest tabakasının azaldığını ortaya koymaktadır. XRD sonuçları MGO'nun başarıyla hazırlandığını desteklemektedir.



Şekil 3. 10. GO ve MGO'ların X- ışını kırınım deseni

Diğer taraftan, seçili alan elektron kırınım (SAED) deseni Şekil 3.11'de sunulmuştur. Şekilde görülen halkalar belirgin olup X-ışını kırınımı analiz sonucu ile tutarlıdır. Bu da nanoparçacıkların son derece kristalize ve saf Fe_3O_4 kübik yapısına endeksli olduğunu göstermektedir [207].

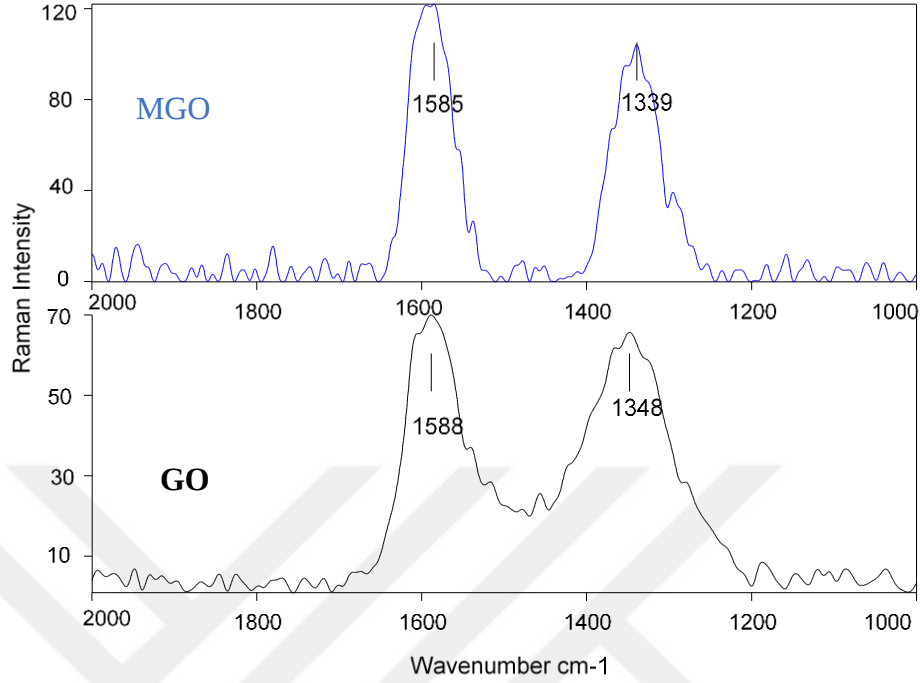


Şekil 3. 11. MGO'nun Seçili bölge kırınım (SAED) görüntüsü

3.2.4. Raman Spektrum Analizi

Raman spektroskopisi karbonlu malzemelerin karakterize edilmesi için önemli bir analiz yöntemidir. Özellikle, karbonun düzenli ve düzensiz kristal yapısını ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. GO'nun Raman spektrumu genellikle D ve G olan iki band ile gösterilmektedir. D bandı oksidasyon işlemi sırasında grafitin amorflaştırılması

nedeniyle elde edilen sp^3 karbon atomundan kaynaklanır, G modu ise sp^2 karbon atomunun titreşimi ile ilgilidir [224,227]. D/G şiddet oranı (ID/IG) grafen düzlemindeki kristalit boyutunu ve düzensizlik derecesini göstermektedir [228]. GO'nun Raman spektrumu 1348 ve 1588 cm^{-1} 'de iki bant göstermiştir (Şekil 3.12). Bunlar D ve G bantlarına işaret etmektedir. GO'nun D/G şiddet oranının değeri 1,04 olarak hesaplanmıştır. MGO'nun Raman spektrumunda ise sırasıyla, D ve G bantlarını gösteren pikler 1339 cm^{-1} ve 1585 cm^{-1} dalga sayısına kaymıştır. MGO'nun Raman spektrumunda dalga sayılarının kayması ve D/G şiddet oranının GO'nunki (1,04) ile karşılaştırıldığında 1,15'e artması, sp^2 karbon ağı içinde lokalize olan sp^3 hibrit orbitallerinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [209]. Bu sonuçlar GO tabakasının başarılı olarak fonksiyonlandırılmasına atfedilebilir.

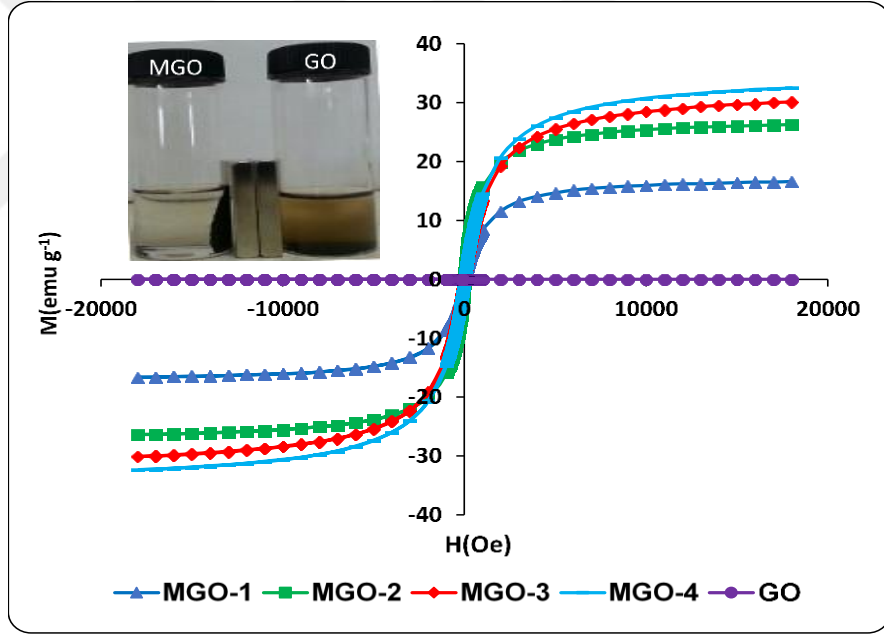


Şekil 3. 12. GO ve MGO'un Raman spektrumları

3.2.5. Manyetik Özellik Analizi

MGO nanomalzemelerin manyetik özellikleri titreşim örneklemeli manyetometre (VSM) ile yapıldı. Şekil 3.13, oda sıcaklığında ölçülen histeresis döngülerini göstermektedir. Numunelerin manyetik doygunlukları , GO, MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4 için sırasıyla 0,00, 16,60, 26,26, 30,09 ve 33,50 emu g⁻¹ olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarından, GO'nun manyetik özellik taşımadığı ve MGO'ların manyetik özelliğinin, GO tabakasına yüklenen Fe₃O₄ miktarının artırmasıyla arttığı gözlenmektedir. Histeresis eğrilerinden aynı zamanda MGO örneklerinin kalıcı mıknatıslanma (remanens) göstermediği ve süperparamanyetik özelliği taşıdığı tespit edilmiştir [229].

Ayrıca, MGO'nun süperparamanyetik davranışı dış bir manyetik alan kullanılarak test edilmiştir. Şekilden (Şekil 3.13 ek) görülebileceği gibi, GO'nun aksine, MGO nanoparçacıklar dış manyetik alanın etkisi ile mıknatısa doğru çekilirken, mıknatıs kaldırıldığında homojen bir şekilde yeniden dağılmıştır ki bu MGO'nun mükemmel süperparamanyetik özelliğini doğrulamaktadır [20]. Bu sonuçlar GO tabakasının Fe_3O_4 ile konjugasyonunun başarılı olduğunu ve nanomalzemeye manyetik özellik kazandırıldığını göstermektedir.

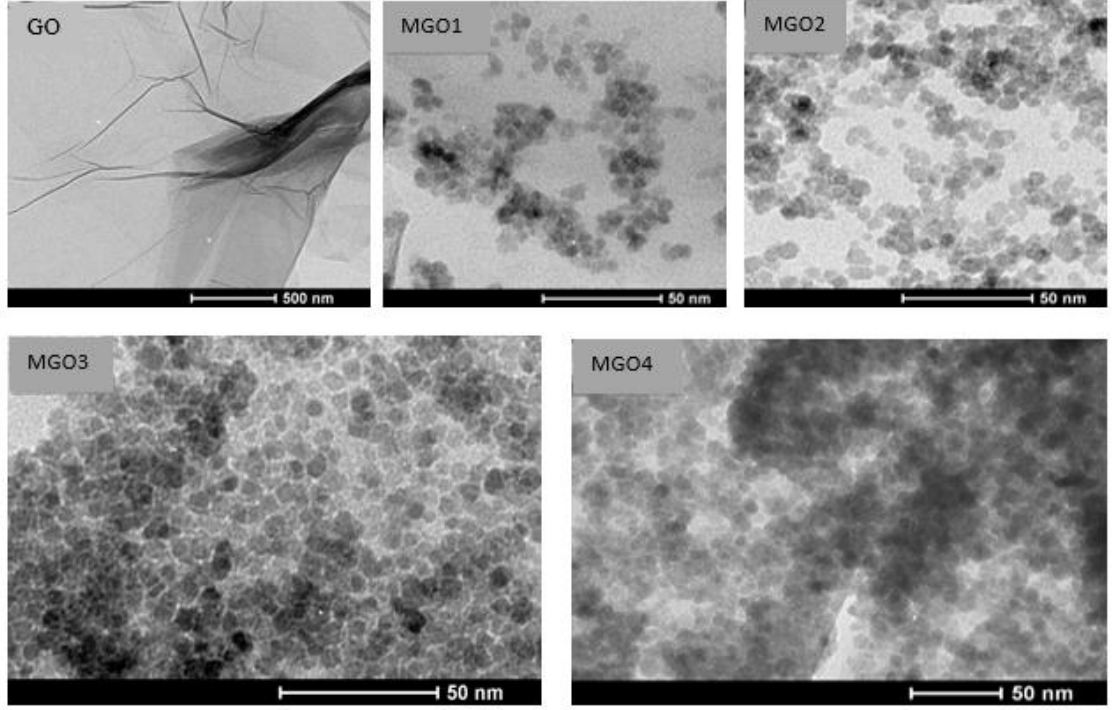


Şekil 3. 13. GO ve MGO'nun manyetik histeresis döngüsü dış manyetik alana tepkileri (içteki resim).

3.2.6. Yüzey Morfoloji Analizi

3.2.6.1. TEM Analizi

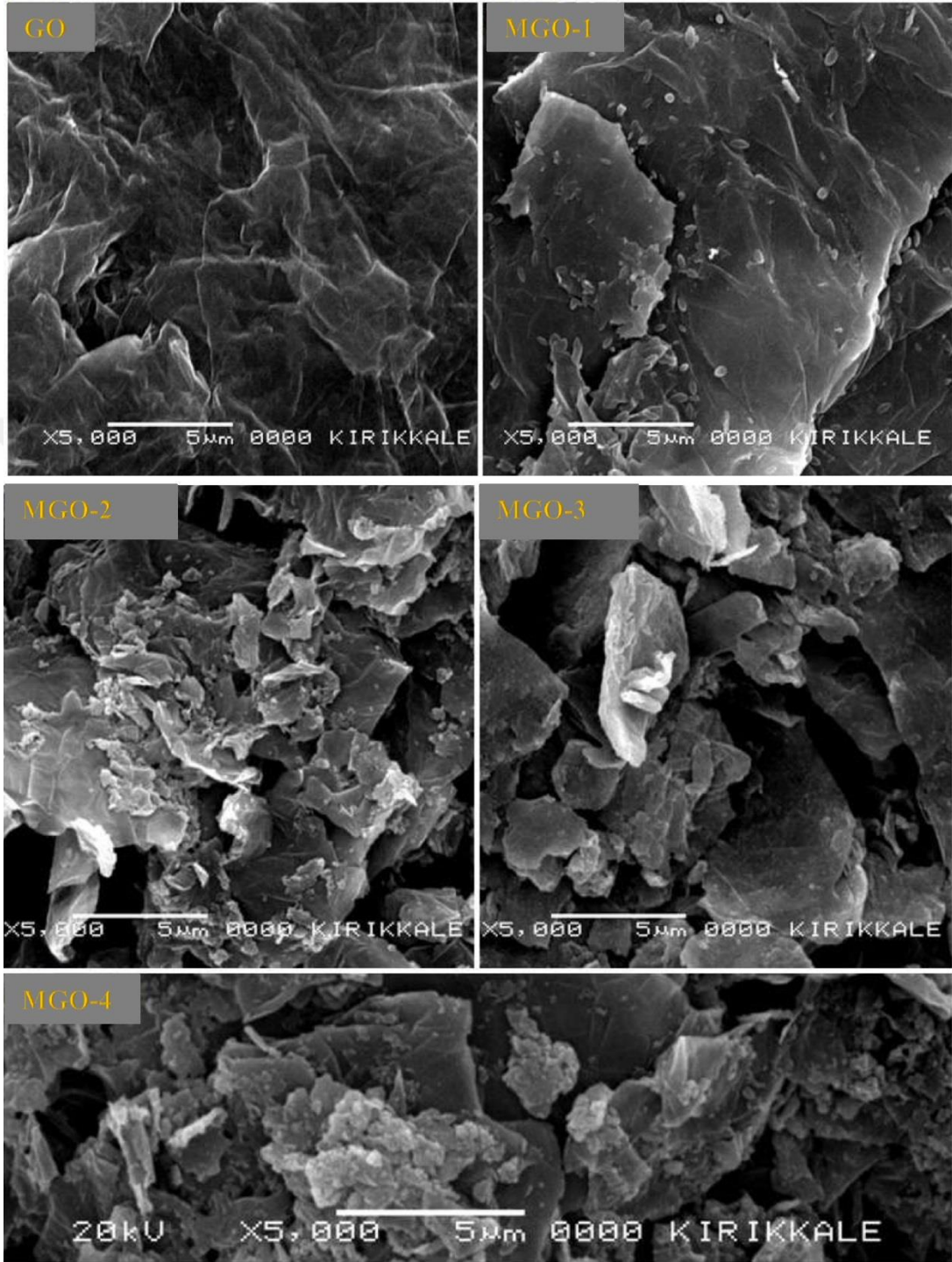
GO ve MGO'nun yüzey morfolojileri TEM, SEM ve AFM ile incelenmiştir. Şekil 3.14'te GO ve MGO tabakalarının TEM görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerden GO'nun pürüzsüz ince tabakalar halinde olduğu görülebilmektedir. MGO'nun TEM görüntüleri iki boyutlu GO nano-tabakalar üzerine Fe_3O_4 nanoparçacıkların girişiyle yüzeyinin pürüzlü hale geldiğini göstermektedir. MGO tabakalarının boyutları 500-800 nm arasındadır. Fe_3O_4 'ün boyutlarının ise 5-15 nm olduğunu hesaplanmıştır ki bu aralık süperparamanyetik nanoparçacıkların boyut aralığı içindedir [192,209]. Şekillerden görülebileceği gibi GO ve MGO arasında, GO yüzeyinde Fe_3O_4 yüklenmesini doğrulayan morfolojik fark vardır. Ayrıca, Fe_3O_4 oranı arttıkça, GO nano tabakasının yüzeyi üzerine bağlanan Fe_3O_4 yoğunluğunun orantılı olarak arttığı TEM görüntüsünden kolayca görülmektedir. Bu sonuç, yukarıda tartışılan MGO nano taşıyıcıların manyetik davranışıyla tutarlıdır.



Şekil 3. 14. GO ve MGO'ların TEM görüntüleri

3.2.6.2. SEM Analizi

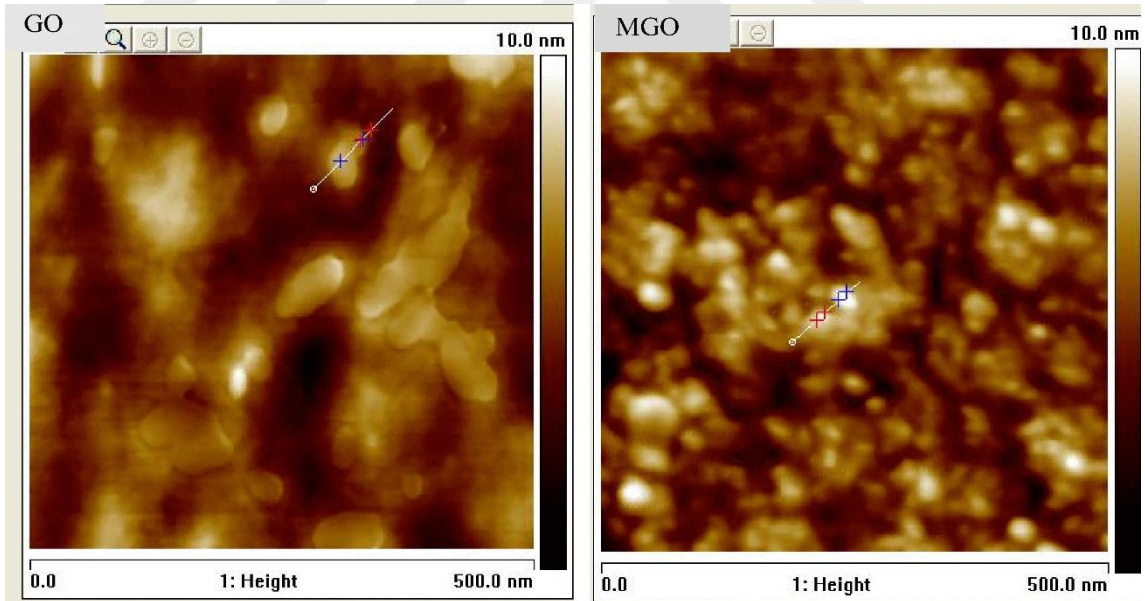
GO ve MGO'nun yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak da incelenmiştir. SEM görüntülerinde (Şekil 3.15), TEM görüntülerinde olduğu gibi, GO'nun üst üste yığılmış pürüzsüz ince tabakalar halinde olduğu ve Fe_3O_4 partiküllerinin GO'nun yüzeyine dağılmasıyla MGO yüzeyinin pürüzlü hale geldiği görülmektedir.



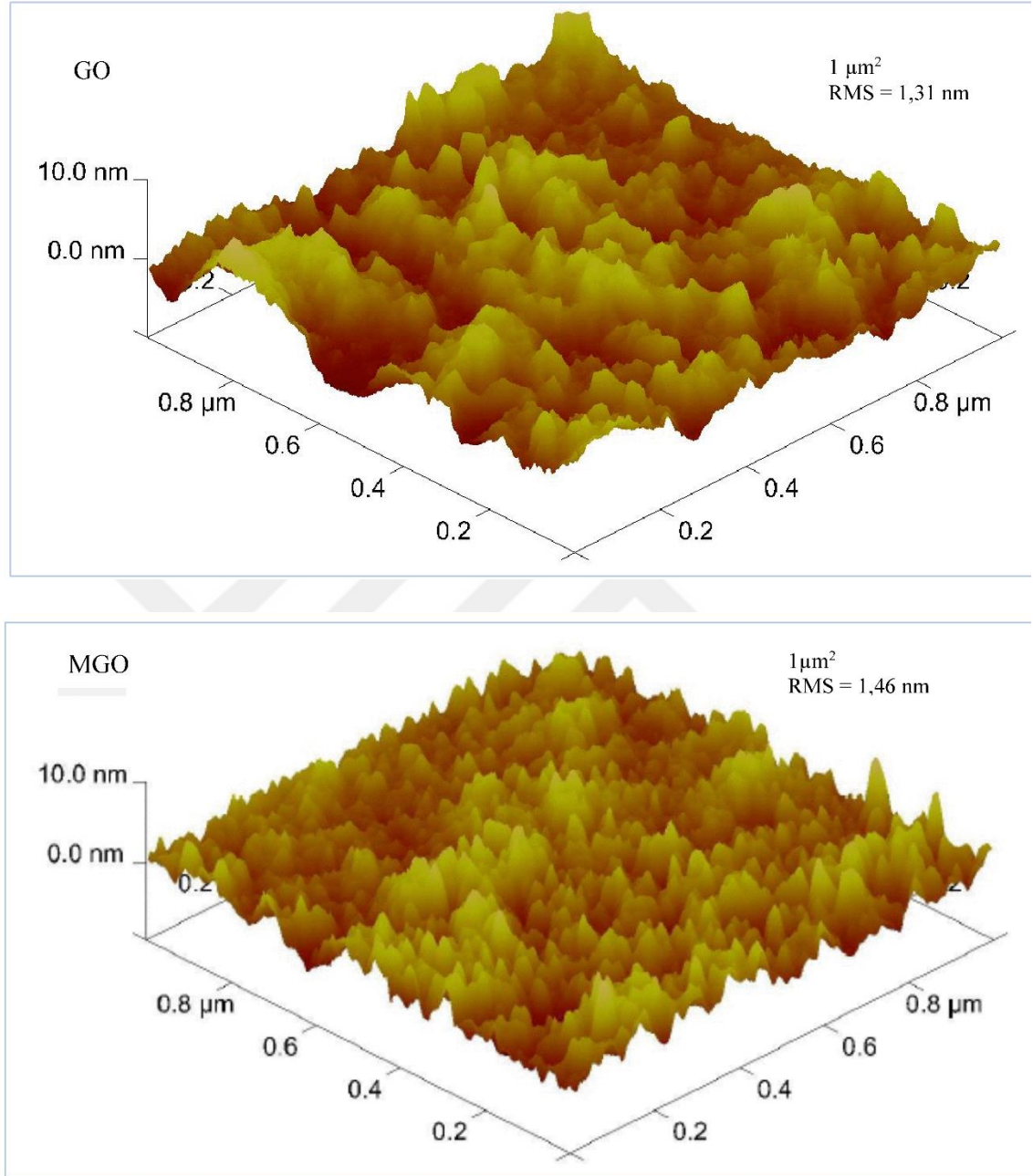
Şekil 3. 15. GO ve MGO'ların SEM görüntüleri

3.2.6.3. AFM Analizi

GO ve MGO'nun morfolojisi, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile araştırılmıştır. Şekil 3.16'da GO ve MGO'nun iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri sunulmuştur. Elde edilen AFM görüntüsü, GO üzerinde yüklü olan Fe_3O_4 boyutlarının 15 nm'den daha az olduğunu göstermektedir. Ayrıca, GO ve MGO'nun yüzey pürüzlülüğü (RMS olarak) ölçülmüştür. $1 \mu\text{m}^2$ alanda ölçülen GO ve MGO'nun yüzey pürüzlülüğü sırasıyla 1,31 ve 1,46 nm olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuç, GO yüzeyine Fe_3O_4 yüklenmesiyle yüzey pürüzlülüğünün arttığını göstererek TEM sonuçlarını doğrulamıştır.



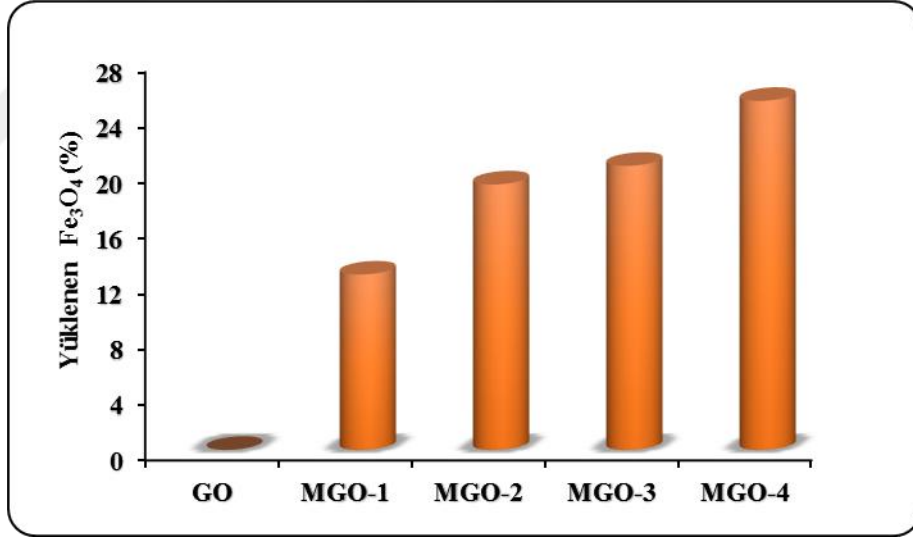
Şekil 3. 16. GO ve MGO'nun iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri



Şekil 3.16. (devamı) GO ve MGO'nun iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri

3.2.6.4. MGO Yüzeyindeki Fe₃O₄'nün Miktar Tayını

MGO yüzeyindeki Fe₃O₄ miktarı ICP-OES ile ölçülmüştür. Hazırlanan dört farklı MGO nanomalzemelerine yüklenen Fe₃O₄'ün yüzdesi Şekil 3.17'de verilmiştir. Şekilde görülebileceği gibi, GO yüzeyinde yüklü olan Fe₃O₄'ün yüzdesi MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4 için sırasıyla % 12,63, % 19,12, % 20,46 ve % 25,14 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuç beklendiği gibi GO tabakasının yüzeyinde kaplanan Fe₃O₄ miktarlarının orantılı olarak arttığını göstermektedir.

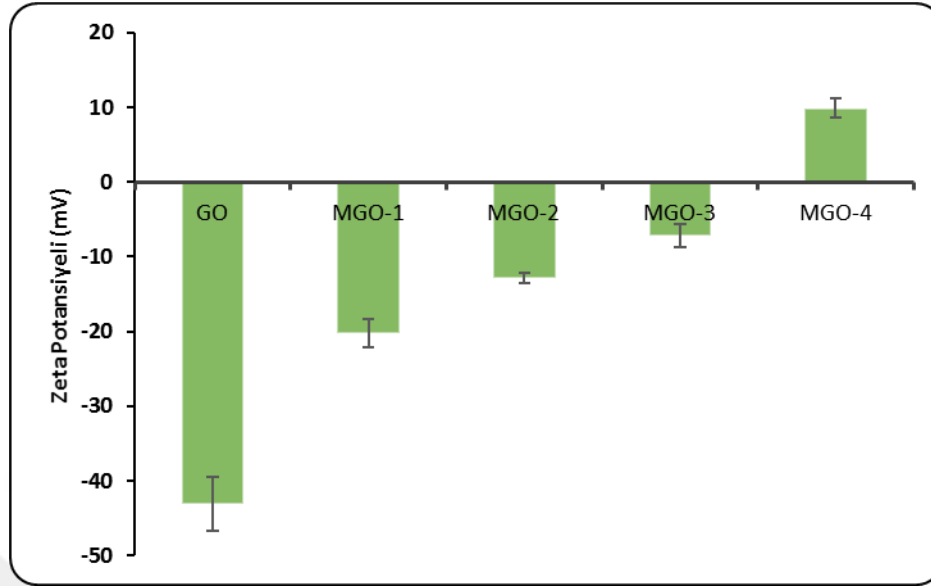


Şekil 3. 17. MGO yüzeyindeki Fe₃O₄'ün yüzdesi

3.2.7. Zeta potansiyeli Analizi

Zeta potansiyeli kolloidal kararlılığını karakterize etmek için önemli bir faktördür. Ayrıca, partiküllerin yüzey yüklerinin ölçülmesini sağlar. Genel olarak, yüksek pozitif ve negatif zeta potansiyeli olan nanoparçacıklar dağılma stabilitesi göstermektedir. Yüksek zeta potansiyeli olan nanoparçacıklar, parçacıklar arası yüksek elektrostatik itme kuvvetinden dolayı depolanma süresinde koagüle olmazlar [230].

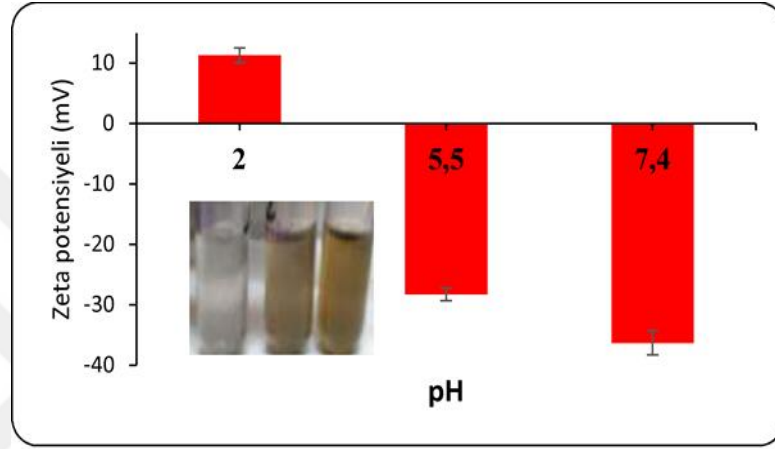
GO ve MGO'nun yüzey yükü Zetasizer kullanılarak incelenmiştir. GO ve MGO'nun sulu çözeltideki zeta potansiyelleri, Şekil 3.18'de sunulmuştur. GO'nun zeta potansiyeli $-43,13 \pm 3,6$ mV olarak tespit edilmiştir. Bu değerin GO yüzeyindeki negatif yüklü hidrofilik karboksil, epoksi ve hidroksil gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir [204]. Bununla birlikte, MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4'ün zeta potansiyeli, sırasıyla $-20,17 \pm 1,9$ mV, $-12,9 \pm 0,67$ mV, $-7,2 \pm 1,57$ mV ve $+9,91 \pm 1,32$ mV olarak kaydedildi. Zeta potansiyel sonuçları, yüklü Fe_3O_4 miktarı arttıkça nano taşıyıcıların yüzey yükünde önemli bir artış olduğunu göstermektedir. GO tabakasının yüzey yükü, yüklenen Fe_3O_4 oranına göre artması, GO tabakasına Fe_3O_4 bağlanmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3. 18. GO ve MGO nanomalzemelerin sudaki zeta potansiyeli

Diğer taraftan, GO ve MGO'nun pH'ya duyarlılığını incelemek için farklı pH'larda (2,0, 5,5 ve 7,4) zeta potansiyeli incelenmiştir. GO'nun zeta potansiyeli (Şekil 3.19) pH 2,0, 5,5 ve 7,4 için sırasıyla, $+11,3 \pm 1,2$, $-28,3 \pm 1,0$ ve $-36,3 \pm 2,0$ mV olarak tespit edilmiştir. Kullanılan çözeltinin pH'sının artmasıyla GO tabakasının zeta potansiyelinin önemli ölçüde negatif yönde arttığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlar GO'nun pH'ya duyarlılığını göstermektedir. Ayrıca, zayıf asit ve bazik ortamda GO'nun yüksek zeta potansiyel değerleri, GO'nun iyi bir stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir. Fan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada benzer sonuçlar bulunmuştur [204]. GO'nun farklı pH ortamında gösterdiği renkler Şekil 3.19(ek)'te verilmiştir. Beyaz renkli olan pH 2,0'deki çözeltiyken, açık kahverengi ve kahverengi olanlar pH 5,5 ve 7,4 ortamında hazırlanan çözeltilerdir. Benzer şekilde, MGO-1'in zeta potansiyeli pH 2,0, 5, 5 ve 7,4 için sırasıyla

+15,4 $\pm$ 1,0 mV, -11,2 $\pm$ 1,7 mV ve -27,1 $\pm$ 3,5 mV olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar MGO'nun pH'ya duyarlılığını ve bazik ortamda daha kararlı olduğunu göstermektedir.



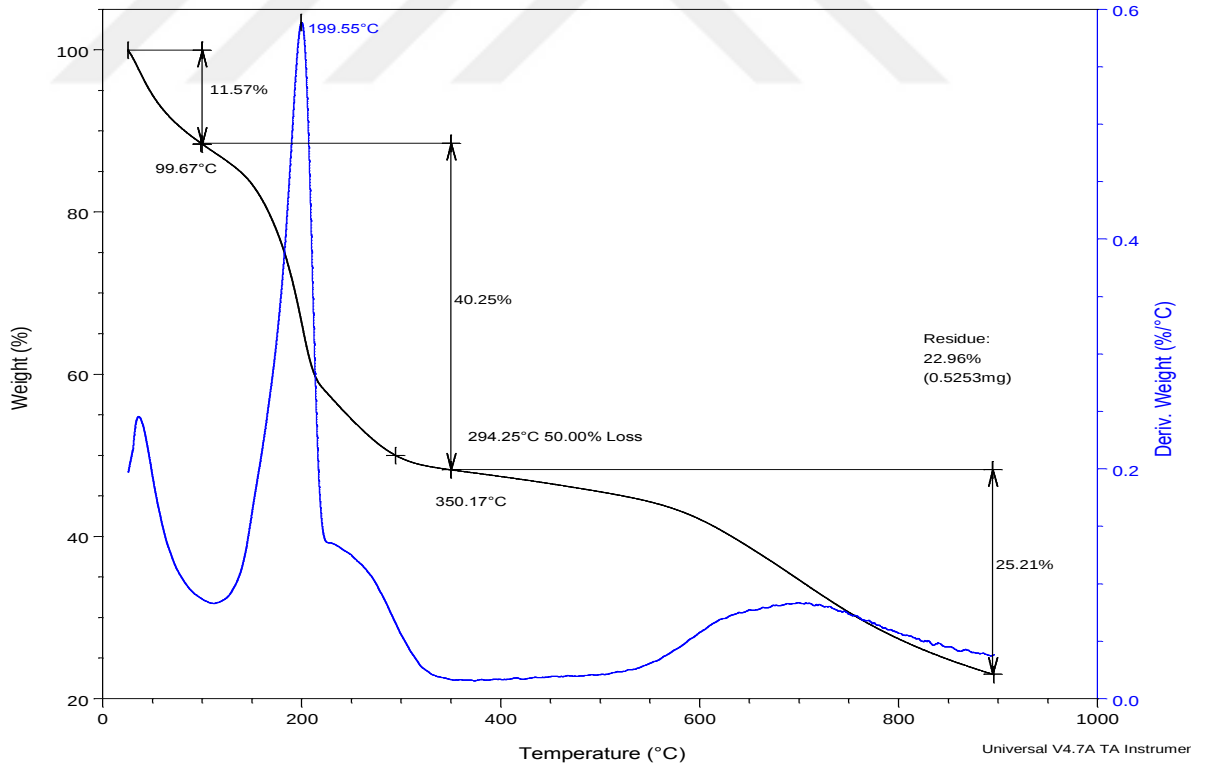
Şekil 3. 19. GO'nun farklı pH'lardaki zeta potansiyeli ve çözeltilerin görüntüleri (iç resim)

3.2.8. Termal Analiz

GO ve MGO nanomalzemelerin termal davranışları termal gravimetri analizi (TGA) ve diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) kullanılarak incelenmiştir. TGA ve DSC analizleri numunelerin bileşimini belirlemek ve termal stabilitesini ayırt etmek için bir araçtır [224].

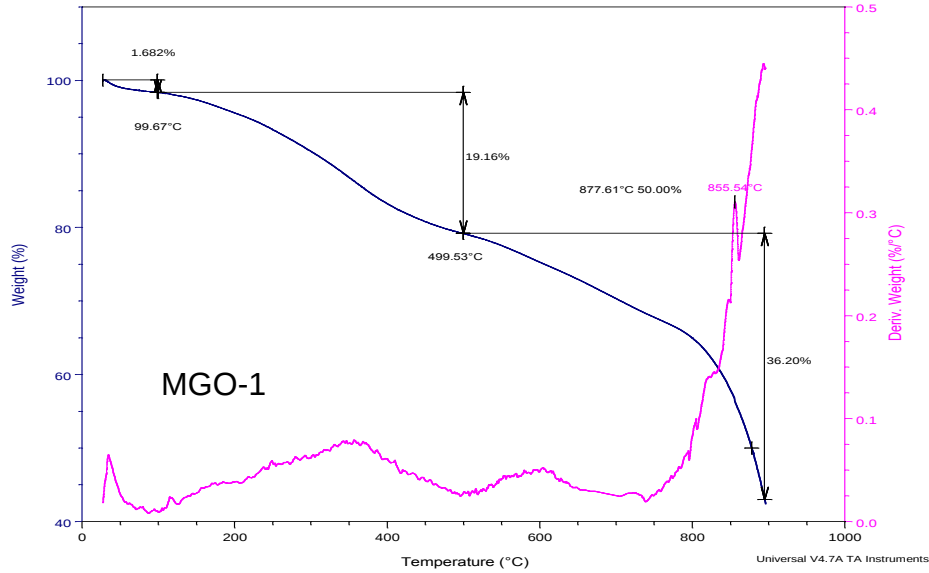
3.2.8.1. Termogravimetri Analizi

GO'nun TGA termogramı Şekil 3.20'de verilmiştir. GO'nun TGA termogramında kütle kayıplarının üç bölgede olduğu görülmektedir. 100 °C altında görülen ilk kütle kaybı fiziksel adsorbe edilen suyun ayrışmasına atfedilebilir [231]. 199,55 °C merkezli, 150 ve 340 °C arası olan ikinci kütle kaybı karboksil, hidroksil ve epoksi gibi oksijen içeren grupların CO, CO₂ ve H₂O şeklinde uzaklaşmasından kaynaklanmıştır [102,224]. 350 ve 900 °C aralığında gözlenen üçüncü kütle kaybının ise karbon bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [232].

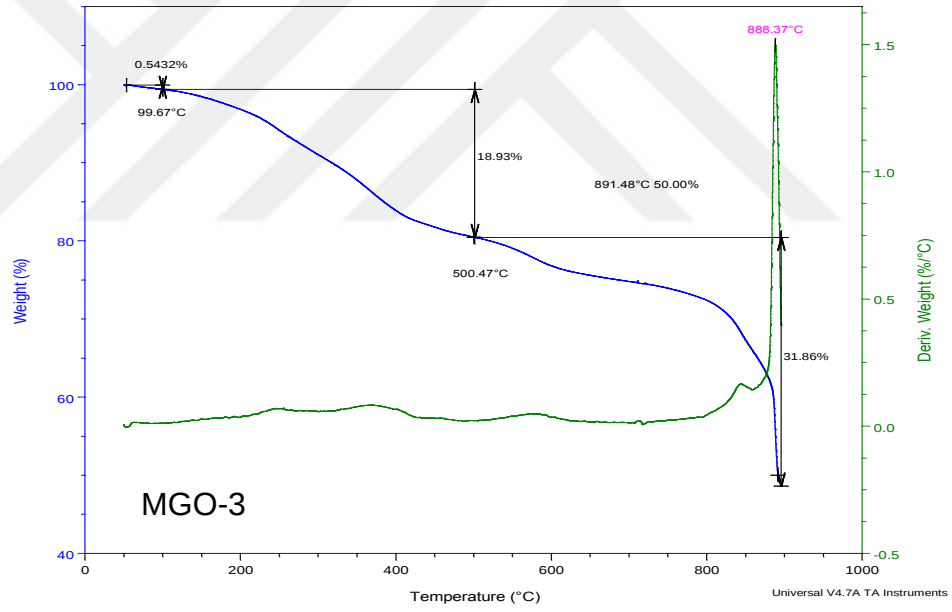
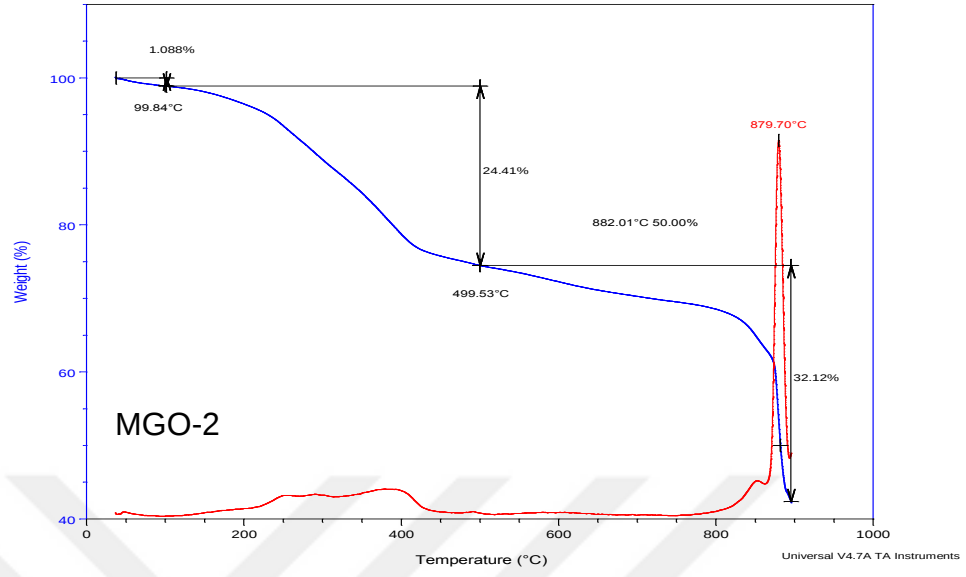


Şekil 3. 20. GO nanomalzemenin TGA/DTG termogramları

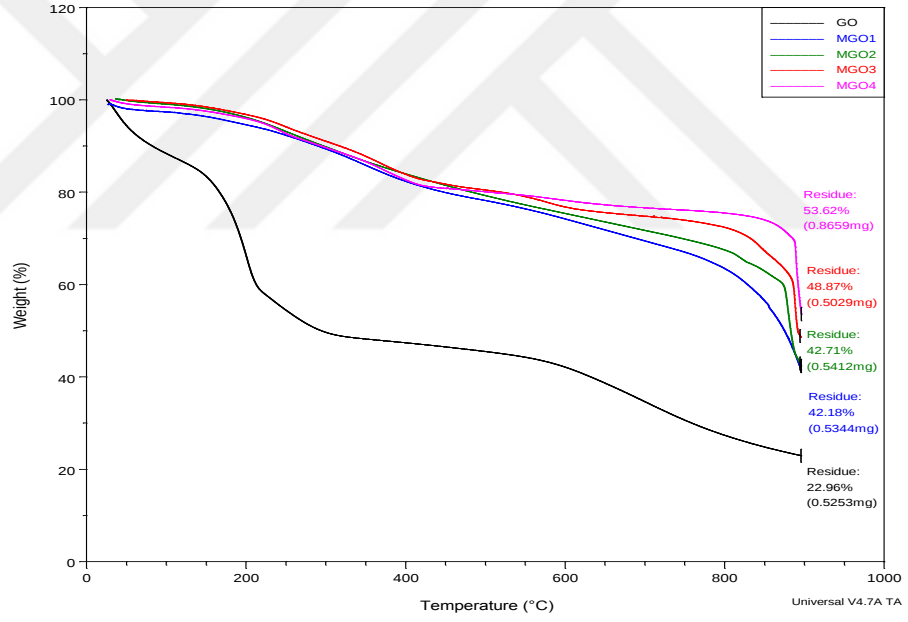
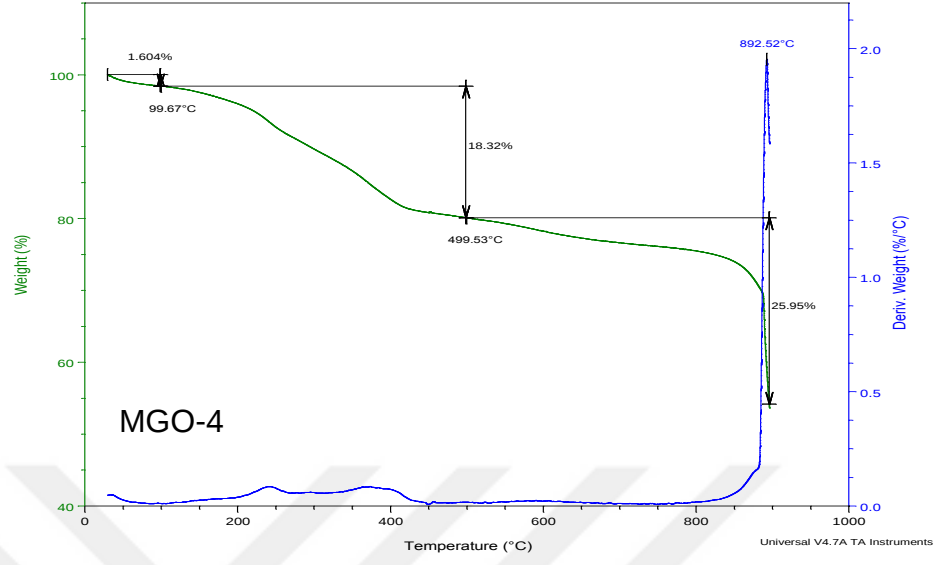
MGO'nun TGA termogramı (Şekil 3.21), GO ile benzer kütle kaybı eğilimini göstermiştir. Bununla birlikte, kütle kaybının miktarı ve sıcaklar farklıdır. GO, 100 °C sıcaklıkta % 11,40 kütle kaybederken, tüm MGO'larda % 2'den daha az kütle kaybı gözlenmiştir. Kalıntı yüzdesi karşılaştırıldığında, GO için kalan miktar % 22,96 iken, MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4 için sırasıyla % 42,18, % 42,71, % 48,2 ve % 53,62 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, GO'ya göre MGO'ların daha yüksek termal stabiliteye sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca, yüklenmiş demir miktarı artışı ile nano malzemenin termal stabilitesi artmıştır. Öte yandan, % 50 kütle kayıp sıcaklığı dikkate alındığında; GO için bu değer 294,25 °C iken, MGO-1 MGO-2, ve MGO-3 için sırasıyla 877,61 °C, 882,01 °C ve 891,48 °C olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, GO yüzeyine Fe₃O₄ yüklenmesiyle, MGO'nun termal dayanıklılığının arttığını göstermiştir.



Şekil 3. 21. MGO nanomalzemelerin TGA/DTG termogramları



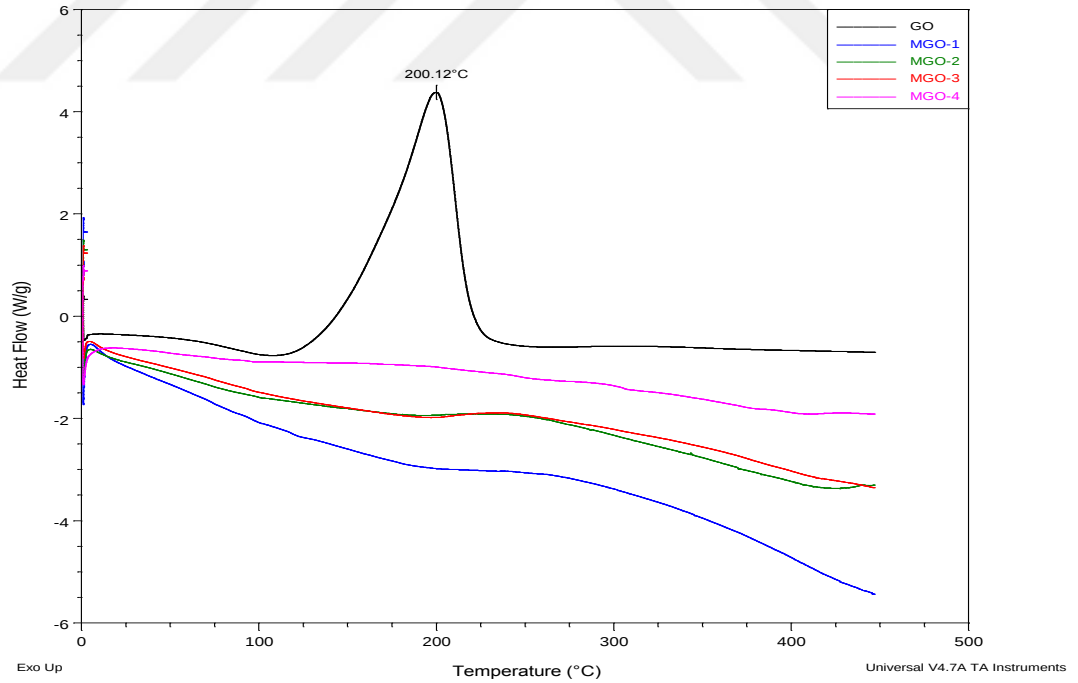
Şekil 3.21. (devamı) MGO nanomalzemelerin TGA/DTG termogramları



Şekil 3.21. (devamı) MGO nanomalzemelerin TGA/DTG termogramları

3.2.8.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi

GO and MGO'nun termal özellikleri DSC analizi ile de incelenmiştir. Şekil 3.22'de GO'nun DSC termogramı 200 °C merkezli güçlü bir ekzotermik pik gösterilmiştir. Bu pik karboksil, hidroksil ve epoksi gibi oksijen içeren fonksiyonel grupların uzaklaşmasına atfedilebilen 199,55 °C merkezli TGA pikine karşılıklı gelmektedir. MGO'nun termogramında, ani ısı kaybı (ekzotermik pik) bulunmadan 400 °C'ye kadar kademeli bir düşüş görülmektedir. Bu sonuç GO'nun yüzeyine bağlanmış Fe_3O_4 nanoparçacıkları nedeniyle MGO'nun termal stabilitesinin arttığını göstermektedir [22].



Şekil 3. 22. GO ve MGO'ların DSC termogramları

3.3. Polimer Konjuge MGO'nun Karakterizasyonu

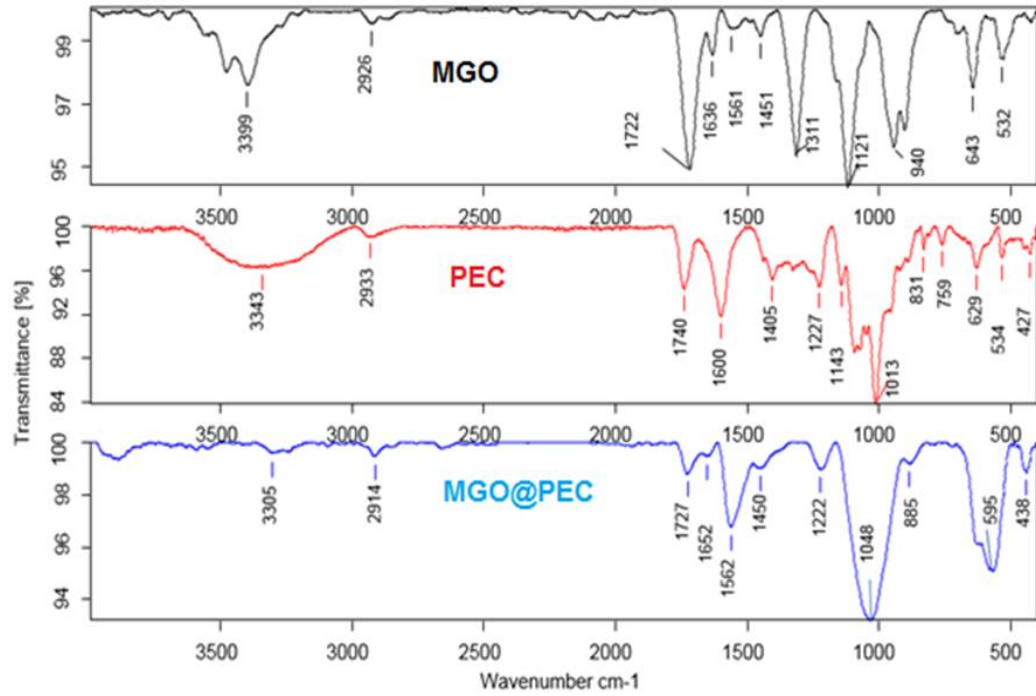
GO'nun polimerle fonksiyonlandırılması, aglomerasyonu azaltmanın, kararsızlığı önlemenin ve verimliliği artırmanın en etkili yollarından biri olarak gösterilmektedir [92,233]. Ayrıca, GO'nun polimerle fonksiyonlandırılması hücre ortamında biyouyumluluğu ve stabiliteyi artırabilmektedir. Bu nedenle, seçilen üç doğal polimer PEC, GEL ve CLS kullanılarak GO ile konjugasyonu yapılmıştır. Konjuge edilen bu nanomalzemelerin karakterizasyonu aşağıda verilmiştir.

3.3.1. Pektin Konjuge MGO'nun (MGO@PEC) Karakterizasyonu

3.3.1.1. FTIR Spektrum Analizi

Şekil 3.23'te, MGO, PEC ve MGO@PEC'nin FTIR spektrumları sunulmuştur. MGO'nun FTIR spektrumu, 3399 cm^{-1} 'de (O-H gerilmesini), 2926 cm^{-1} 'de (C-H gerilmesini), 1722 cm^{-1} 'de (C=O asimetrik gerilmesini), 1636 cm^{-1} (C=C gerilmesini), 1561 cm^{-1} (C = O simetrik gerilmesini), 1451 cm^{-1} (O-H eğilmesini), 1311 cm^{-1} 'de (Fe bağlı C-O gerilmesini), 1121 ve 940 cm^{-1} 'de (C-O epoksi ve hidroksil gerilmesini) karakteristik pikleri göstermektedir. Ayrıca, 643 cm^{-1} ve 532 cm^{-1} 'de gözlemlenen iki pik, Fe-O bağ etkileşimlerine karşılık gelmektedir [209,234]. PEC spektrumunda, 3343 cm^{-1} ve 2933 cm^{-1} 'deki pikler O-H ve C-H bağı gerilme titreşimini göstermektedir [235]. 1740 cm^{-1} 'deki esterifiye karbonil grubuna karşılık gelen PEC'nin karakteristik pikidir [123]. 1600, 1405, 1227, 1143 ve 1013 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla, C=O gerilmesine, O-

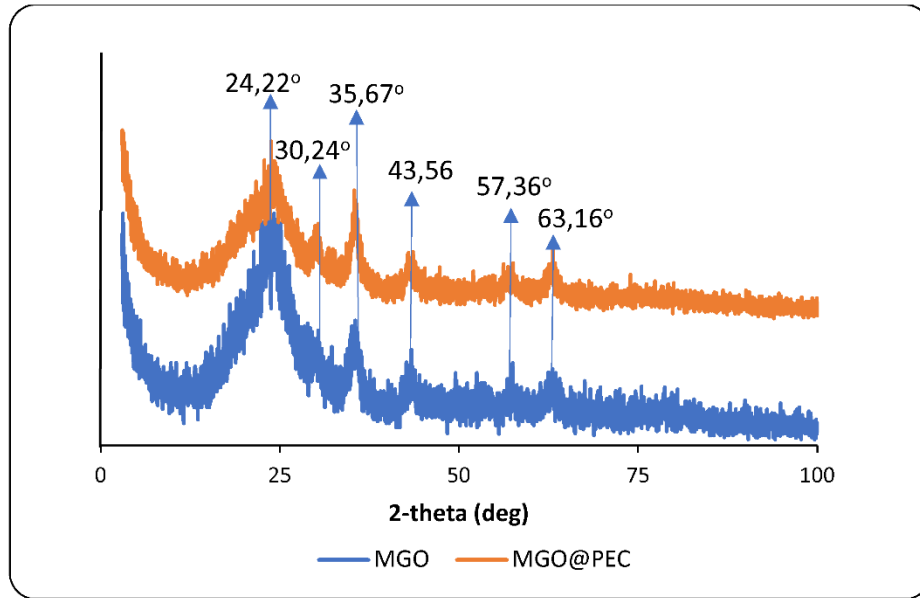
H eğilmesine, C-OH gerilmesine, asimetrik metoksi grubuna ait C-O gerilmesine ve C-O-C gerilmesine karşılık gelmektedir [236]. MGO@PEC'nin spektrumu, MGO ve PEC'nin karakteristik piklerinin çoğunu, bazı durumlarda az bir kayma ile göstermektedir. Spektrumdan görülebileceği gibi, 3305 cm^{-1} 'deki pik O-H gerilmesine atfedilebilir, ancak PEC'in redüksiyon özellikleri nedeniyle pikin kuvveti zayıftır [237]. 1048 cm^{-1} 'deki geniş pik, MGO ile etkileşim yüzünden PEC'de 1013 ve 1143 cm^{-1} 'de olan C-O gerilmesinin bir araya gelmesinin sonucudur. Ayrıca, 1222 cm^{-1} ve 885 cm^{-1} 'deki, C-OH gerilmesine ve C-H düzlem dışı eğilmesine karşılıklı gelen, pikler sadece pektin yapısına ait olup PEC'nin başarılı bir şekilde konjuge edildiğini doğrulamaktadır.



Şekil 3. 23. MGO, PEC ve MGO@PEC'nin FTIR spektrumları

3.3.1.2. X-ışını Kırınımı Analizi

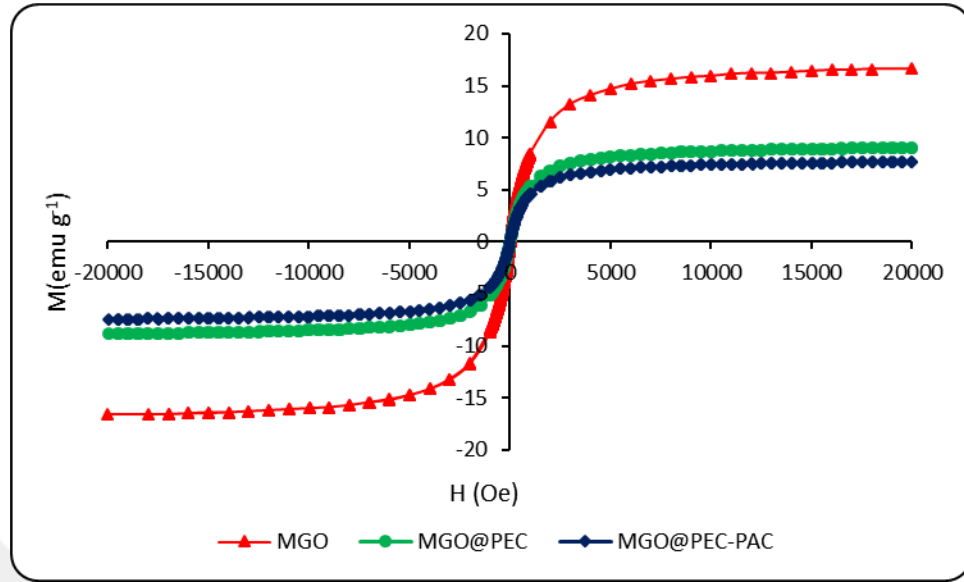
MGO@PEC nanotaşıyıcının X-ışını kırınımı analizi sonucu saptanan $24,22^\circ$, $30,24^\circ$, $35,67^\circ$, $43,56^\circ$, $57,24^\circ$ ve $63,12^\circ$ lık 2θ değerlerindeki difraksiyon pikleri Şekil 3.24'te sunulmuştur. $24,22^\circ$ lık 2θ değerindeki difraksiyon piki, ana grafen tabakasının kırınımı ile ilişkilidir [105,226]. Geri kalan pikler, Fe_3O_4 'ün kübik kristal yapısının (220), (311), (400), (511), (440) düzlemlerine karşılık gelmektedir [195]. PEC'nin ise X-ışını kırınımı karakteristik pikleri gözlenmemiştir. Bunun nedeni, konjuge edilen PEC konsantrasyonunun X-ışını kırınımı saptama limitlerinden daha düşük olması olabilir. Benzer sonuçlar Kadam ve ark. tarafından da elde edilmiştir [238].



Şekil 3. 24. MGO ve MGO@PEC'nin X-ışını kırınımı

3.3.1.3. Manyetik Özellik Analizi

MGO'nun manyetik özelliklerine PEC ve PAC yüklemesinin etkisini değerlendirmek için, MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC'nin manyetik özellikleri VSM ile analiz edildi. Şekil 3.25'te gösterildiği gibi, MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC'nin maksimum manyetik doygunlukları 16,62, 9,04 ve 7,67 emu g⁻¹ olarak bulunmuştur. Beklendiği gibi MGO'nun manyetik özellikleri PEC ve PAC konjugasyonundan etkilenmiştir. MGO'nun manyetik doygunluğu PEC konjugasyonu ile 7,58 emu g⁻¹ azaldı ve PAC yüklendiğinde 1,37 emu g⁻¹ daha azalma kaydedildi. Bunun nedeni, konjuge PEC ve PAC, MGO parçacığını örtererek dış manyetik alana olan tepkilerini azaltmış olabileceği düşünüldü [239]. Ayrıca, PEC ve PAC eklenmesi, parçacıkların bileşen oranını değiştirir, özellikle de manyetik özelliği sahip MGO'nun oranını azaltır. Diğer taraftan, tüm naoparçacıklarının histeresis eğrilerinden kalıcı mıknatıslanma görülmemiştir ve bu da parçacıkların süperparamanyetik özelliklerini göstermiştir [229].

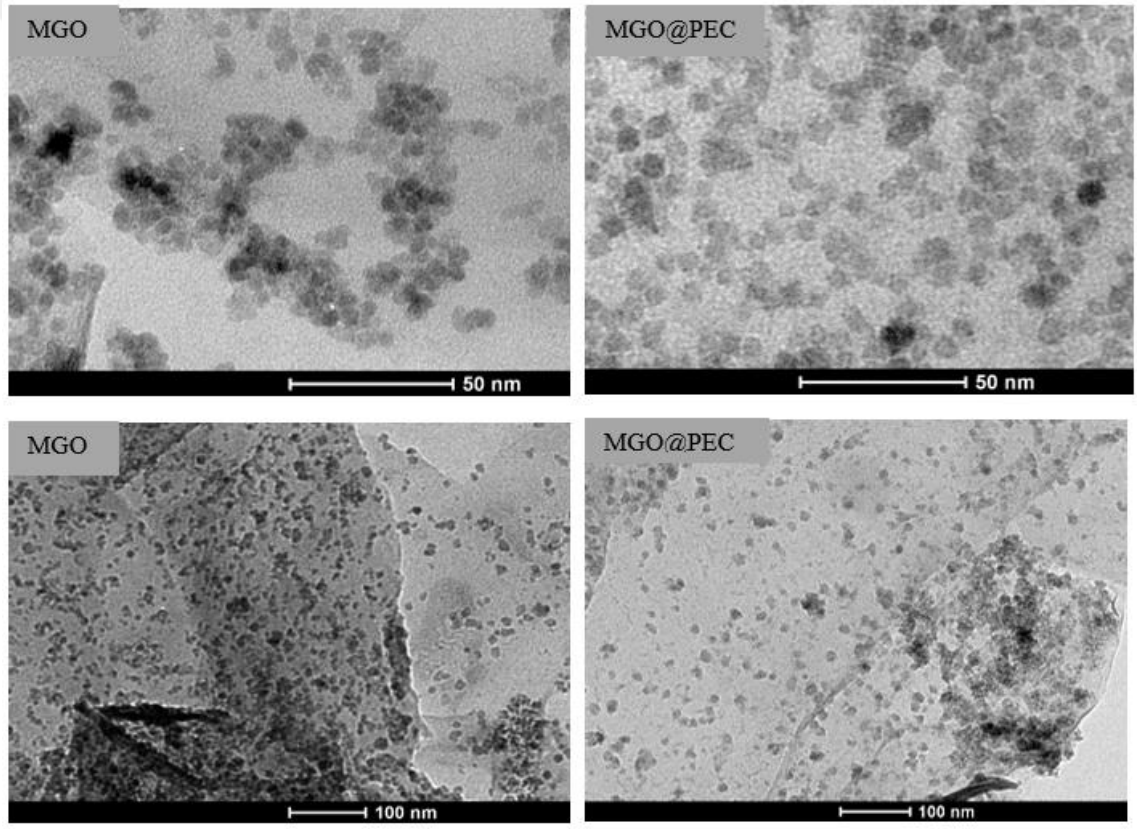


Şekil 3. 25. MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC'nin manyetik histeresis döngüsü

3.3.1.4. Yüzey Morfoloji Analizi

MGO ve MGO@PEC nanomalzemenin yüzey morfolojisi TEM kullanılarak incelendi. MGO ve MGO@PEC'nin TEM görüntülerinden (Şekil 3.26) görülebileceği gibi, MGO'nun yüzey tabakası nispeten siyah noktalar şeklinde dağılan parlak renktedir. Bununla birlikte, MGO@PEC'nin yüzeyi, şişmiş gibi görülen Fe_3O_4 partikülleri ile bulanık bir tabaka olarak görülüyor. Bu, tabakada dağılan siyah Fe_3O_4 partikülleri kaplayan polimerden kaynaklanmaktadır. Diğer yandan, PEC konjugasyonunun yüzey yükü üzerindeki etkisi Zetasizer kullanılarak incelenmiştir. MGO'nun (su içinde) zeta potansiyeli $-20,17 \pm 1,9$ mV iken nanomalzemenin koloidal stabilitesini arttıran PEC konjugasyonu ile $-26,03 \pm 2,9$ mV'e yükselmiştir. Bu sonuç, PEC konjugasyonunun,

nano taşıyıcının yüzey yükünü önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Ayrıca, MGO@PEC'nin pH'ya duyarlılığı da incelenmiştir. Elde edilen sonuç MGO@PEC nano-yapıları'nın pH 2,0, 5,5 ve 7,4 çevre koşullarında, sırasıyla, $11,63 \pm 0,9$ mV, $-16,70 \pm 2,0$ mV ve $-28,45 \pm 0,8$ mV zeta potansiyel değerleri ile pH'ya duyarlı olduğunu göstermiştir.



Şekil 3. 26. MGO ve MGO@PEC'nin TEM görüntüleri

3.3.1.5. Parçacık Boyutu Analizi

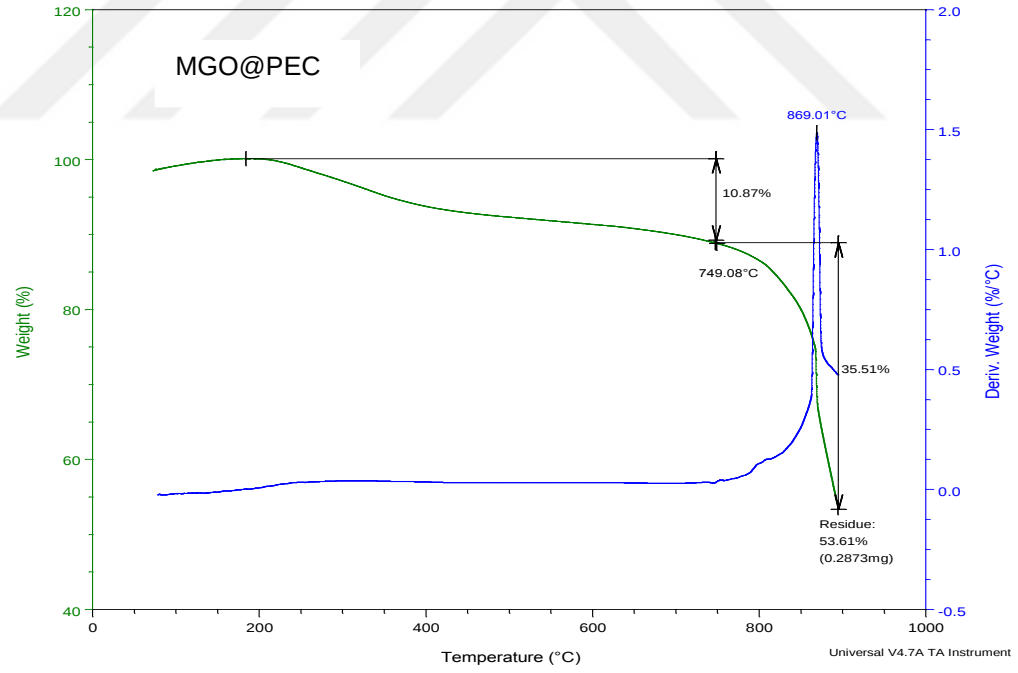
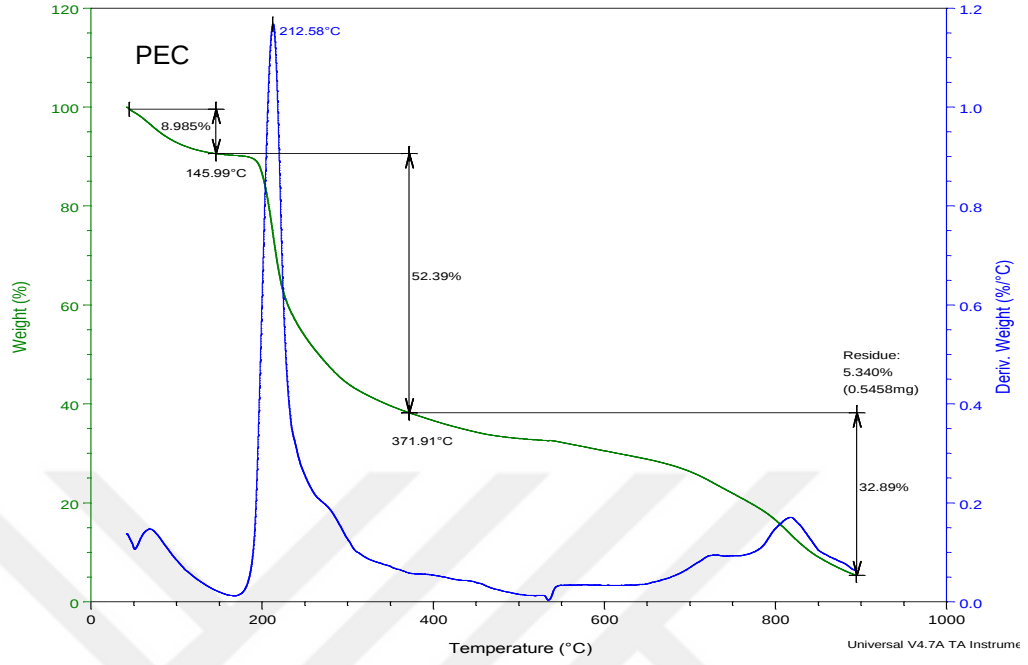
MGO ve MGO@PEC'nin parçacık boyutu analizi Zeta sizer ile ölçülmüştür. Çizelge 3.1, MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksini göstermektedir. Çizelgeden görülebileceği üzere, MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC nanoparçacıklarının ortalama boyutları sırasıyla 509 ± 55 nm, 534 ± 42 nm ve 533 ± 55 nm'dir. Elde edilen veriler MGO'nun parçacık boyutunda PEC konjugasyonu ile biraz genişleme göstermiştir. Bu artış, bazı PEC zincirlerinin GO tabakasının kenarındaki karboksilik gruplarıyla konjuge gerektirilmesiyle açıklanabilir.

Çizelge 3. 1. MGO, MGO@PEC ve MGO@PEC-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi. Sonuçlar, $n = 3$ 'n ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

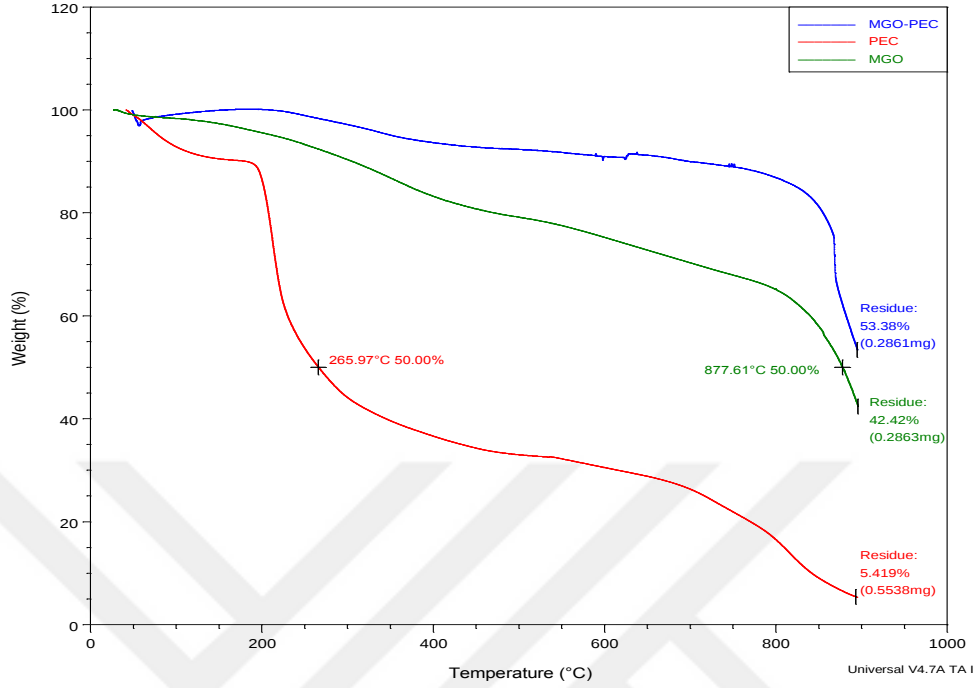
Taşıyıcılar	Boyut (nm)	PDI
MGO	$509,00 \pm 55,57$	$0,526 \pm 0,28$
MGO@PEC	$534,47 \pm 41,95$	$0,545 \pm 0,12$
MGO@PEC-PAC	$532,90 \pm 54,62$	$0,588 \pm 0,09$

3.3.1.6. Termal Analiz

PEC ve MGO@PEC'nin termal özellikleri TGA kullanılarak incelendi. Şekil 3.27'de PEC, MGO ve MGO@PEC'nin TGA termogramları sunulmuştur. TGA termogramı PEC için üç aralıkta kütle kaybı göstermiştir. 0 – 145 °C sıcaklık aralığında olan ilk kütle kaybı (% 8,9), adsorbe suyun buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. 145-370 °C arasındaki ikinci bölgedeki kütle kaybı, OH, COOH ve COOCH₃ gibi oksijen içeren grupların ayrışmasına atfedilebilir. Son kütle kaybı (370 – 900 °C), karbon moleküllerinin kısmen bozulmasından kaynaklanmaktadır. MGO@PEC'nin TGA termogramı, 750 °C'ye kadar hafif bir kütle kaybı (% 10,8) ile önemli termal kararlılık artışı göstermiştir. 745 ile 900 °C arasında gözlenen ikinci kaybın, karbon moleküllerin bir kısmının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, PEC, MGO ve MGO@PEC'nin TGA termogramları karşılaştırıldığında PEC'nin yüklenmesiyle nano taşıyıcının termal stabilitesinin arttığını açıkça görebiliyoruz.



Şekil 3. 27. MGO, PEC ve MGO@PEC'nin TGA/DTG termogramları



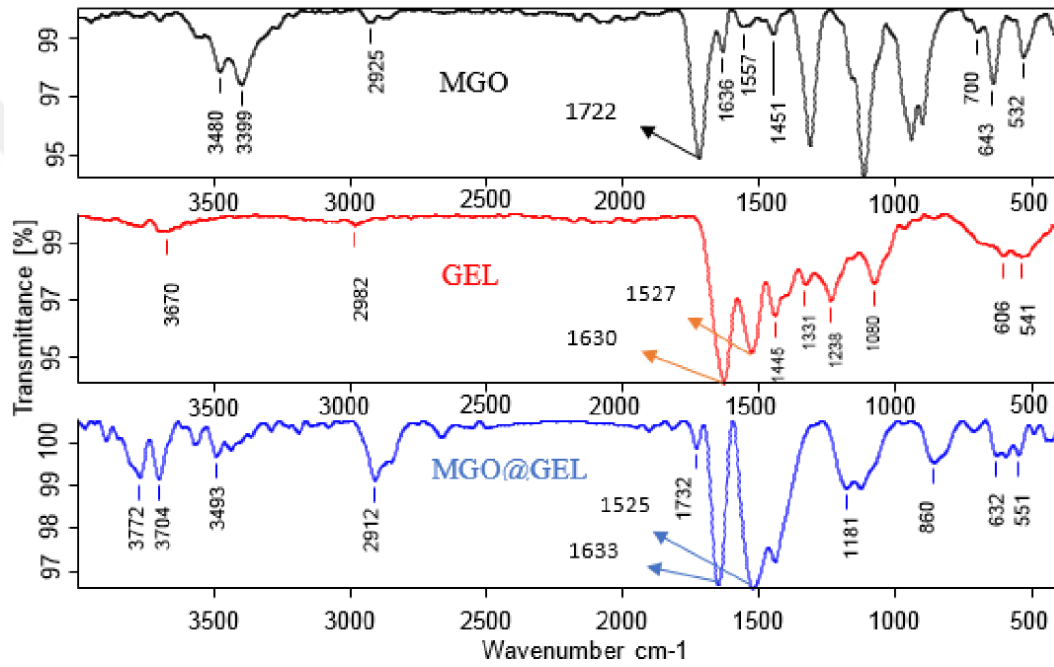
Şekil 3.27. (devamı) MGO, PEC ve MGO@PEC'nin TGA/DTG termogramları

3.3.2. Jelatin Konjuge MGO'nun (MGO@GEL) Karakterizasyonu

3.3.2.1. FTIR Spektrum Analizi

MGO, GEL ve MGO@GEL'nin FTIR spektrumu Şekil 3.28'de gösterilmiştir. MGO'nun spektrumu, O-H gerilmesi ($3300-3500\text{ cm}^{-1}$ 'de), C=O gerilmesi (1722 cm^{-1} 'de) C-O epoksi ve hidroksi gerilmeleri ($950-1125\text{ cm}^{-1}$ 'de) ile farklı oksijenli fonksiyonel grupların varlığını ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, aromatik yapının C=C gerilme titreşimleri 1636 cm^{-1} 'de bulunmaktadır. GEL spektrumu, diğer pikler ile birlikte amid I gerilme titreşimi (C=O, 1630 cm^{-1}), amid II eğilme titreşimi (N-H, 1527 cm^{-1}), amid III düzlem içi eğilme titreşimi (N-H, 1238 cm^{-1}) ve N-H gerilme

titreşimlerini (3670 cm^{-1}) göstermektedir [135,240–242]. MGO@GEL spektrumu, jelatinin karakteristik pikleri olan C=O gerilme titreşimi (1630 cm^{-1} 'de) ve C-N gerilme titreşimi (1525 cm^{-1} 'de) göstererek MGO tabakası üzerindeki jelatin konjugasyonunu doğrulamıştır.

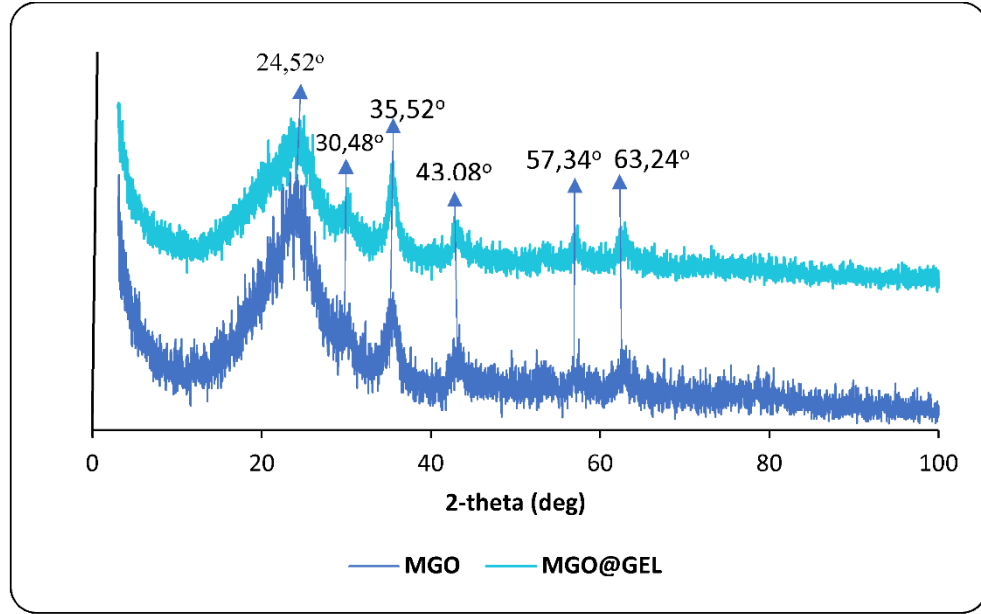


Şekil 3. 28. MGO, GEL and MGO@GEL'nin FTIR spektrumları

3.3.2.2. X-ışını Kırınımı Analizi

GEL ve MGO@GEL'nin X-ışını kırınımı analizi Şekil 3.29'da verilmiştir. MGO ve MGO@GEL'nin X-ışını kırınım desenleri, $24,52^\circ$, $30,48^\circ$, $35,42^\circ$, $43,08^\circ$, $57,34^\circ$ ve $63,24^\circ$ 'luk 2θ değerlerinde kırınımlar göstermiştir. Elde edilen, $30,48^\circ$, $35,42^\circ$, $43,08^\circ$,

57,34° ve 63,24°'deki 2θ değerleri sırasıyla, Fe₃O₄'ün saf kübik kristal yapısının (220), (311), (400), (511), (440) düzlemlerine karşılık gelmektedir. 24,52°'deki geniş 2θ değeri GO tabakasının kırınımından kaynaklanmıştır. Ayrıca, 20° civarında olan GEL'nin kırınımı, 24,52°'deki MGO'nun geniş 2θ değeriyle birleşmiş olabileceği düşünülmüştür [243,244].

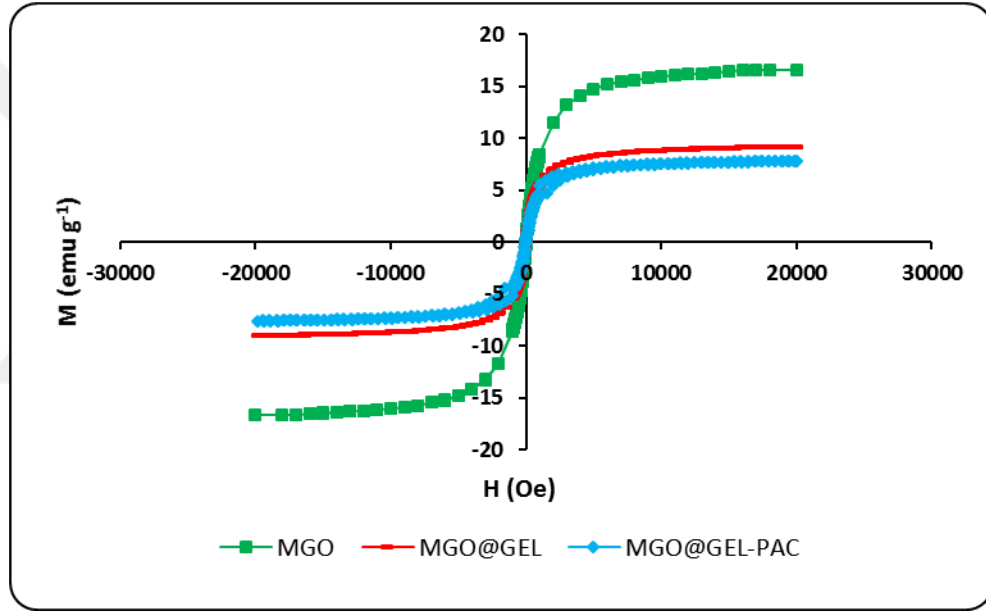


Şekil 3. 29. MGO ve MGO@GEL'nin X-ışını kırınımı

3.3.2.3. Manyetik Özellik Analizi

MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin histeresis döngüsü Şekil 3.30'da gösterilmiştir. MGO'nun manyetik özellikleri GEL ve PAC konjugasyonunun etkisiyle azalmıştır. Şekilde görüleceği gibi MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin

manyetik doygunlukları 16,62, 9,20 ve 7,81 emu g⁻¹ olarak bulunmuştur. MGO@PEC'nin manyetik özelliği bölümünde bahsedildiği gibi polimerlerin ve ilaçların konjuge edilmesi ana malzemenin manyetik özelliğini azalmaktadır. Diğer taraftan, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin histeresis eğrilerinde kalıcı mıknatıslanma görülmemesi süperparamanyetik özellik gösterdiğini kanıtlamıştır [229].

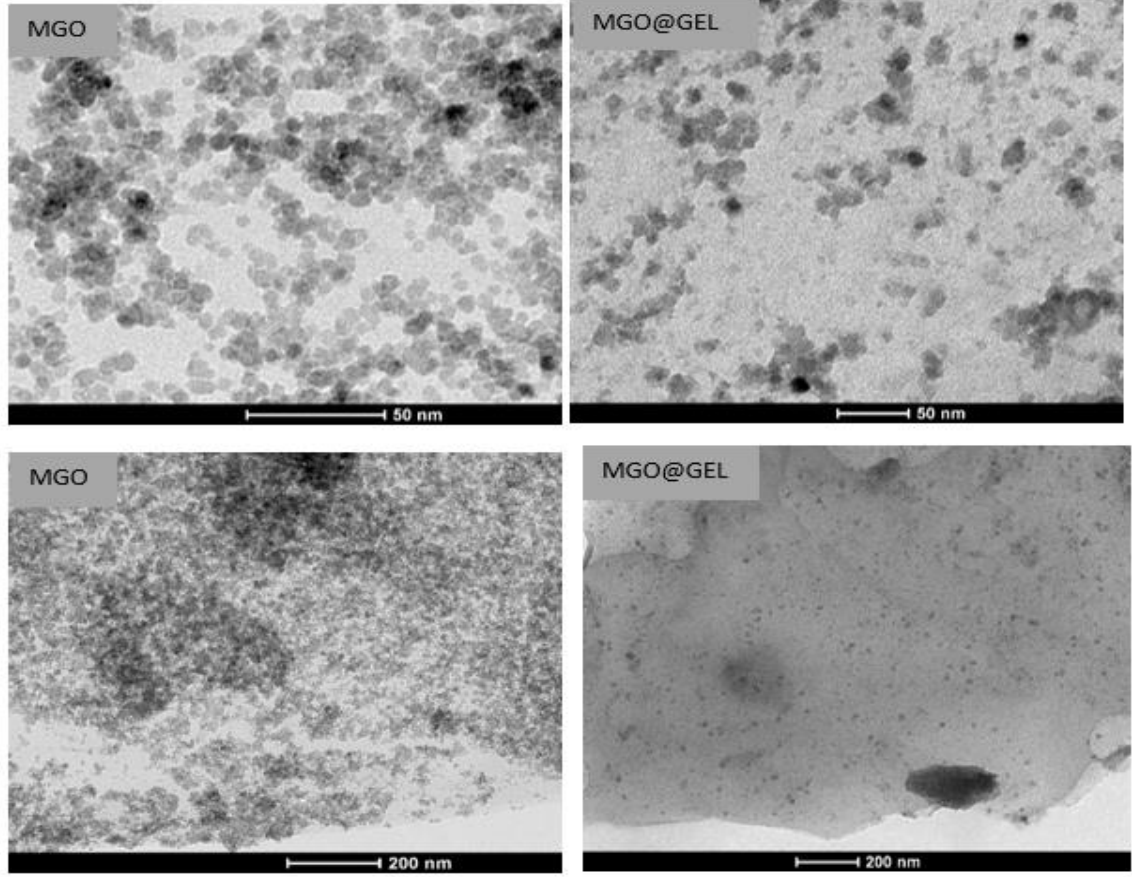


Şekil 3. 30. MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin manyetik histeresis döngüsü

3.3.2.4. Yüzey Morfoloji Analizi

MGO@GEL nanomalzemenin yüzey morfolojisi TEM ile araştırılmıştır. Şekil 3.31'de MGO ve MGO@GEL'nin TEM görüntüleri sunulmuştur. GEL konjugasyonundan sonra, MGO'nun yüzeyi biraz bulanıklaşmıştır. MGO'nun yüzey kalınlığı, yüzeyindeki

GEL dağılımı nedeniyle yüzey örtüsü oluşturarak artmıştır. Diğer yandan, nanomateryalin yüzey yükünü değerlendirmek için MGO@GEL'nin zeta potansiyeli incelenmiştir. İnceleme sonucu, MGO'nun zeta potansiyeli $-20,17 \pm 1,9$ mV ve MGO@GEL'ninki $-24,6 \pm 4,4$ mV olduğu saptanmıştır. Jelatinin konjugasyonunda amino grupları gibi pozitif yüklü gruplar zeta potansiyel değerini arttırırken karboksilik asit gibi negatif yüklü gruplar zeta potansiyeli'nin azalmasına neden olur [245]. Bu durumda, negatif yük artışı görülmüştür ki GEL'nin konjugasyonunu doğrulamıştır. Ayrıca, sentezlenen nanotaşıyıcının pH'ya duyarlılığı da araştırılmıştır. Buna göre, MGO@GEL'nin zeta potansiyeli pH 2,0, 5,5 ve 7,4'te sırasıyla, $+14,30 \pm 2,0$, $-10,4 \pm 0,5$ ve $-21,2 \pm 1,0$ mV olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuç, MGO@GEL nanotaşıyıcının pH'ya duyarlı olduğunu göstermiştir.



Şekil 3. 31. MGO ve MGO@GEL'nin TEM görüntüleri

3.3.2.5. Parçacık Boyutu Analizi

Çizelge 3.2'de MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksini verilmiştir. MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC nanoparçacıklarının ortalama boyutları sırasıyla 509 ± 55 nm, $545,8 \pm 64,15$ nm ve $548,1 \pm 49,87$ nm olarak bulunmuştur. MGO'nun parçacık boyutu GEL konjugasyonu ile birlikte yüzey alan artışı göstermiştir. GEL zincirlerinin GO tabakasının ucundaki karboksilik gruplarıyla konjugasyonu bu artışın bir nedeni olarak

düşünülmüştür. Ayrıca, bu artış, ilacın yüklenme kapasitesi artırmak için önemli bir faktördür.

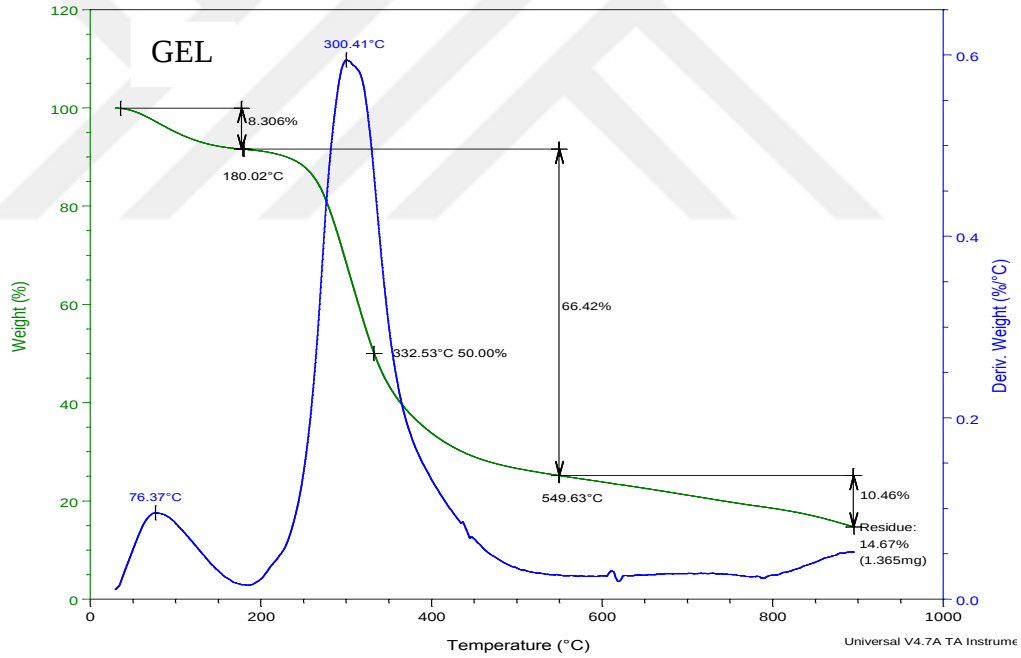
Çizelge 3. 2. MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi. Sonuçlar, n = 3'ün ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Taşıyıcılar	Boyut (nm)	PDI
MGO	509,0 $\pm$ 55,57	0,526 $\pm$ 0,28
MGO@GEL	545,8 $\pm$ 64,15	0,22 $\pm$ 0,14
MGO@GEL-PAC	548,1 $\pm$ 49,87	0,37 $\pm$ 0,16

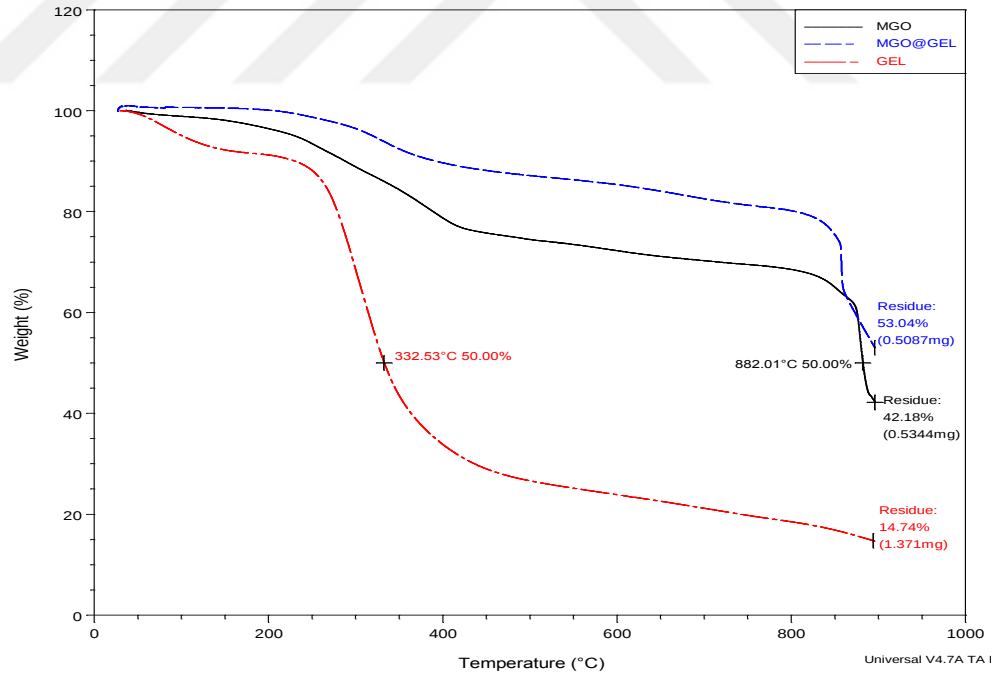
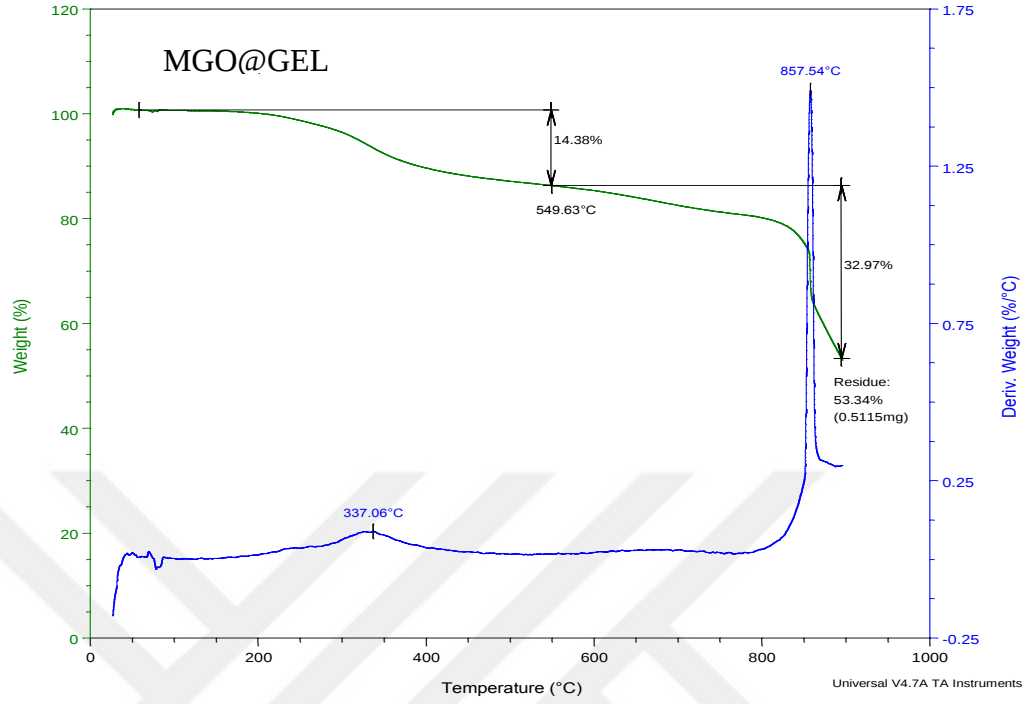
3.3.2.6. Termal Analiz

GEL ve MGO@GEL'nin termal özelliklerini incelemek için TGA analizi yapılmıştır. Şekil 3.32'de, GEL, MGO ve MGO@GEL'nin TGA ve DTG termogramları verilmiştir. TGA termogramında GEL'nin kütle kaybının üç bölgede olduğu görülmektedir. 40 °C - 180 °C sıcaklık aralığında görülen ilk kütle kaybı (% 8,3) adsorbe suyun ayrılmasına atfedilebilir. 180 °C - 550 °C sıcaklık aralığında olan ikinci kütle kaybının, jelatin ana zincirinin bozulmasından ve 550 °C - 900 °C sıcaklık aralığında görünen hafif kütle kaybının ise, karbon bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Jelatinin yapısal ayrışmasına karşılık gelen 180 °C - 550 °C aralığında % 66,42'lik kütle kaybı gözlenmiştir [244,246]. Diğer taraftan, DTG eğrileri, 300,41 °C'de ana jelatin yapısının

bozulmasına karşılık gelen endotermik bir pik göstermiştir. MGO@GEL'nin TGA termogramında iki aşamalı kütle kaybı görülmüştür. İlk kütle kaybı (% 14,38), 50 °C – 550 °C aralığında olup jelatin ve diğer oksijen içeren grupların kısmen degrade olmasından kaynaklanmaktadır. 550 °C ve 900 °C arasındaki ikinci kütle kaybı karbon yapısının kısmen bozulması (CO ve CO₂ olarak ayrışması) nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Sonuçlar, MGO yüzeyinde GEL konjugasyonu ile termal kararlılığın arttığını açıkça göstermektedir.



Şekil 3. 32. MGO, GEL ve MGO@GEL'nin TGA termogramları

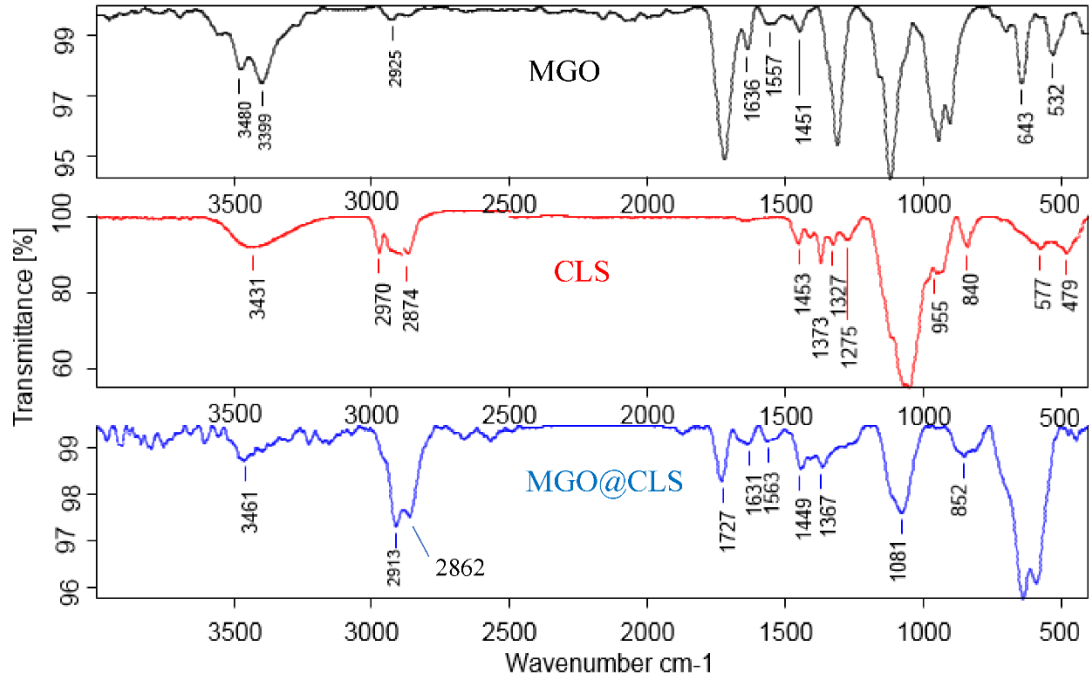


Şekil 3.32. (devamı) MGO, GEL ve MGO@GEL'nin TGA termogramları

3.3.3. Selüloz Konjuge MGO'nun (MGO@CLS) Karakterizasyonu

3.3.3.1. FTIR Spektrum Analizi

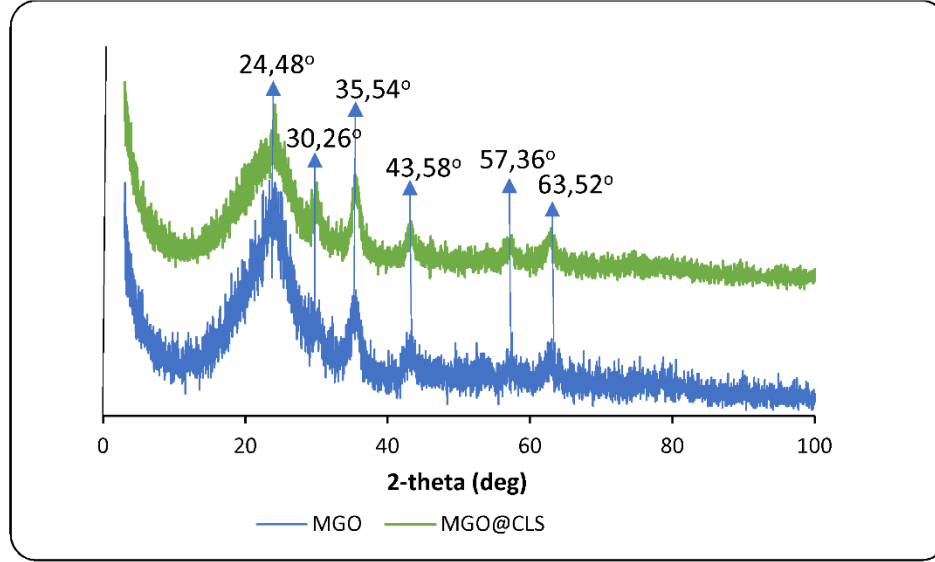
MGO, CLS ve MGO@CLS nanomalzemelerinin FTIR spektrumları Şekil 3.33'te sunulmuştur. CLS'nin FTIR spektrumunda, 3431 cm^{-1} (O-H gerilmesi), 2970 cm^{-1} ve 2874 cm^{-1} (CH_2 gruplarının asimetrik ve simetrik titreşim gerilmesi), 1453 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$ eğilmesi), 1373 cm^{-1} (CH eğilmesi), 1275 cm^{-1} (O-H eğilmesi), 1048 cm^{-1} ve 955 cm^{-1} 'de (C-O gerilmesi) karakteristik pikleri görülmektedir [137,247]. MGO@CLS'nin FTIR spektrumunda, MGO'daki O-H ve C-O gruplarının karakteristik pikleri, CLS'nin hidroksil grupları ve MGO'un karboksil grupları arasındaki zayıf etkileşiminden dolayı küçük bir kayma ile yerlerini korumuşlardır. Ayrıca, CLS'nin varlığını doğrulayan CLS'ye ait 2862 , 1367 ve 852 cm^{-1} 'de ilave pikler gözlenmiştir.



Şekil 3. 33. MGO, CLS ve MGO@CLS'nin FTIR spektrumları

3.3.3.2. X-ışını Kırınımı Analizi

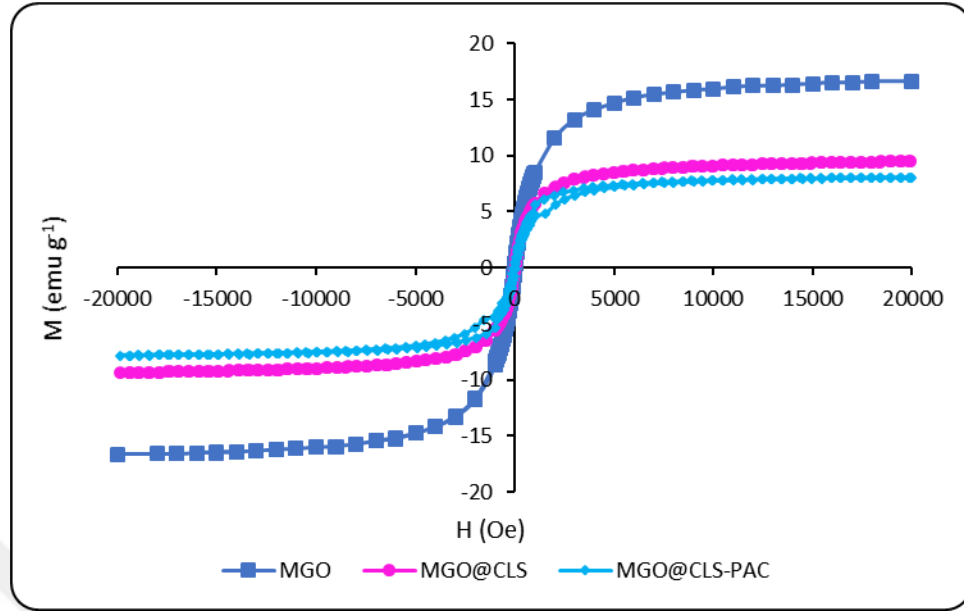
CLS ve MGO@CLS'nin XRD X-ışını kırınımı Şekil 3.34'te gösterilmiştir. MGO@CLS'nin difraksiyon desenlerinde, MGO tabakasının kırınımına ve (220), (311), (400), (511), (440) Fe_3O_4 'ün kübik kristal yapısının düzlemlerine karşılık gelen, sırasıyla $24,48^\circ$, $30,26^\circ$, $35,54^\circ$, $43,58^\circ$, $57,36^\circ$ ve $63,52^\circ$ 2θ değerlerinde pikleri gözükmemektedir. CLS'nin X-ışını kırınımının 20° civarında olması bekleniyordu [248,249]. Bununla birlikte, $24,48^\circ$ 'deki MGO'nun geniş piki ile örtüşmüş olabileceği veya düşük konsantrasyon nedeniyle görülemediği düşünülmektedir.



Şekil 3. 34. MGO@CLS'nin X-ışını kırınımı

3.3.3.3. Manyetik Özellik Analizi

Şekil 3.35, MGO, MGO@CLS ve MGO@CLS-PAC'nin histeresis döngüsü göstermiştir. Şekilde görüleceği gibi MGO, MGO@GEL ve MGO@GEL-PAC'nin manyetik doygunlukları 16,62, 9,50 ve 8,06 emu g⁻¹ olarak bulunmuştur. CLS ve PAC'nin konjugasyonu MGO'nun manyetik özelliği yarıya düşürmüştür. Ayrıca, histeresis eğrileri nanotaşıyıcıların süperparamanyetik özellik taşıdığını göstermektedir.

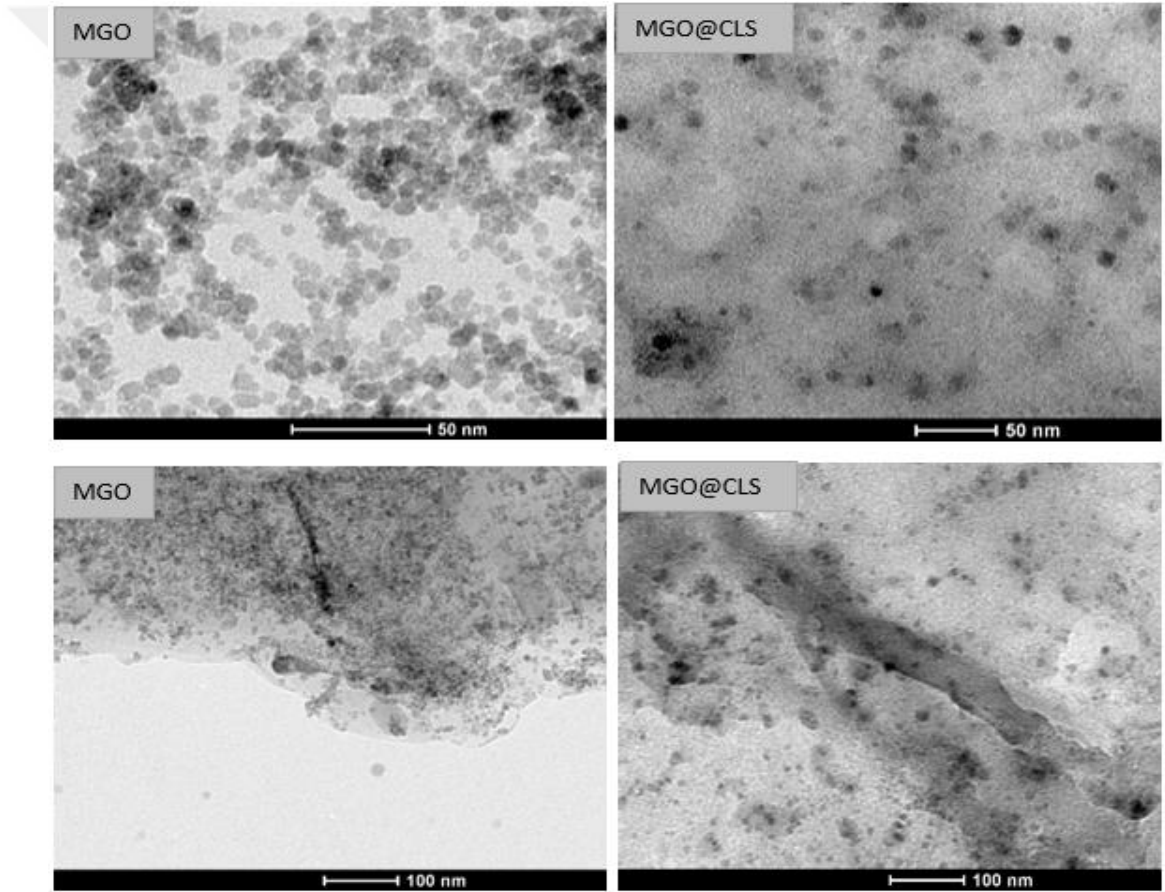


Şekil 3. 35. MGO, MGO@CLS ve MGO@CLS-PAC'nin manyetik histeresis döngüsü

3.3.3.4. Yüzey Morfoloji Analizi

MGO@CLS'nin yüzey morfolojisi TEM kullanılarak incelenmiştir. TEM görüntülerinde (Şekil 3.36), MGO'nun ve MGO@CLS'nin yüzey morfolojisi arasındaki farklılıkları açıkça görülmektedir. MGO@CLS'nin yüzeyi, CLS konjugasyonu nedeniyle pürüzsüz, koyu ve kalın bir tabaka haline gelmiştir. MGO yüzeyinde bulunan Fe_3O_4 partikülleri, selüloz tarafından tamamen kaplanmıştır ve net olarak görünemez olmuştur. Yüzeyin zeta potansiyeli nano-yapıların yüzey yükünü değerlendirmek için araştırılmıştır. Elde edilen sonuca göre, MGO tabakası üzerine CLS'nin konjugasyonu, mutlak zeta potansiyel değerini artırarak yüzey yükünü değiştirmiştir. Konjugasyon sonrasında, MGO'nun zeta potansiyel değeri $-20,17 \pm 1,9$ mV'den $-30,73 \pm 2,1$ mV'ye yükselmiştir.

Bu da nanomalzemenin kolloidal kararlılığının artışının bir göstergesidir. Öte yandan, nano yapıların pH duyarlılığı incelemek için, zeta potansiyeli 2,0, 5,5 ve 7,4 pH çevre koşullarında ölçülmüştür. Buna göre, 7,4, 5,5 ve 2,0 pH ortamları için yüzey yükleri sırasıyla $-25,60 \pm 1,79$, $-11,05 \pm 0,55$ ve $+10,41 \pm 3,0$ mV olarak bulunmuştur. Sonuç, MGO@CLS nano-yapıların pH'ya duyarlı olduğunu kanıtlamıştır.



Şekil 3. 36. MGO ve MGO@CLS'nin TEM görüntüleri

3.3.3.5. Parçacık Boyutu Analizi

MGO, MGO@CLS ve MGO@CLS-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksini Çizelge 3.3'te sunulmuştur. MGO, MGO@CLS ve MGO@CLS-PAC'nin parçacıklarının ortalama boyutları sırasıyla 509 ± 55 nm, $522,1 \pm 65,63$ nm ve $522,53 \pm 45,47$ nm'dir. CLS'nin konjugasyonu MGO'nun yüzey alanı biraz genişlemiştir. Bunun nedeni, belirtildiği gibi CLS zincirlerinin GO tabakasının kenarındaki karboksilik gruplarıyla konjugasyonu olduğunu düşünülmüştür.

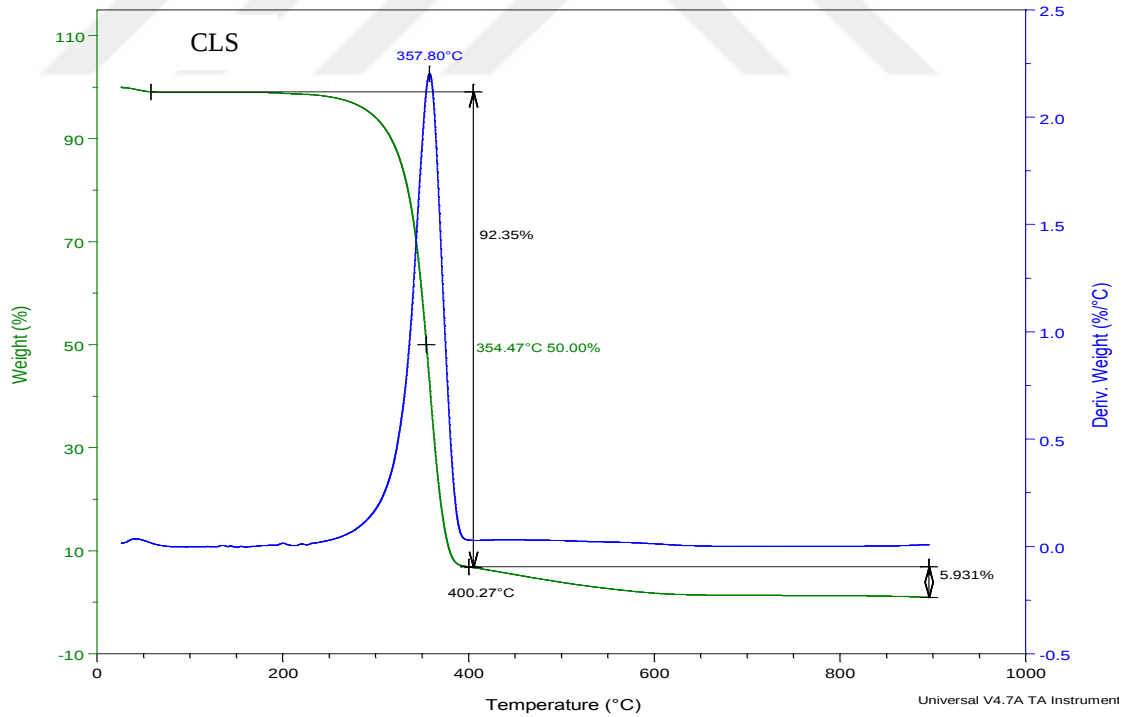
Çizelge 3. 3. MGO, MGO@CLS ve MGO@CLS-PAC'nin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi. Sonuçlar, $n = 3$ 'ün ortalama $\pm$ SS olarak verildi.

Taşıyıcılar	Boyut (nm)	PDI
MGO	$509,0 \pm 55,57$	$0,526 \pm 0,28$
MGO@CLS	$522,1 \pm 65,63$	$0,40 \pm 0,15$
MGO@CLS-PAC	$522,53 \pm 45,57$	$0,38 \pm 0,13$

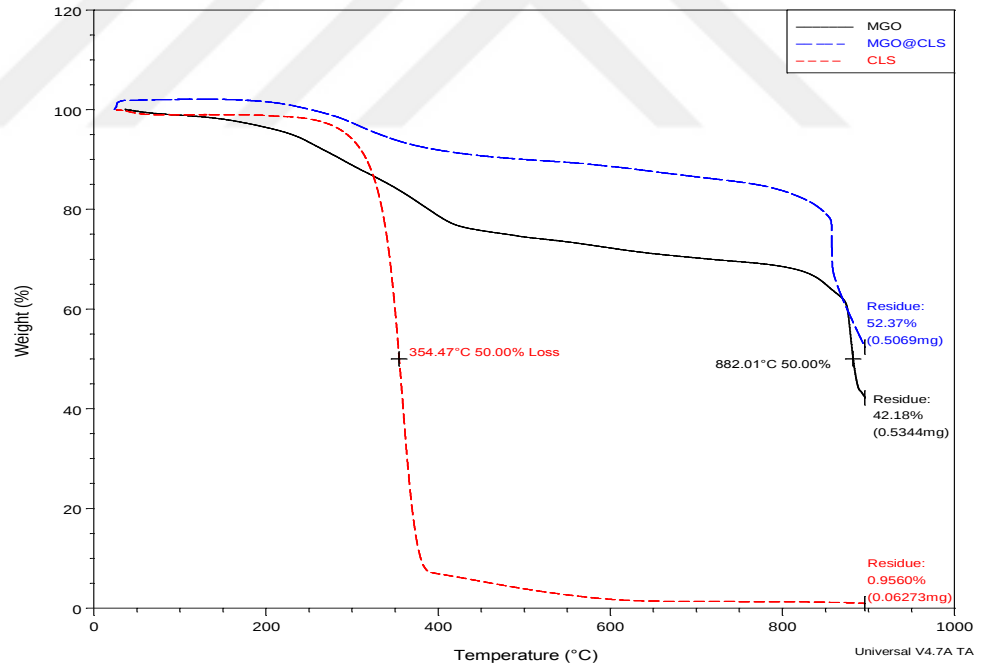
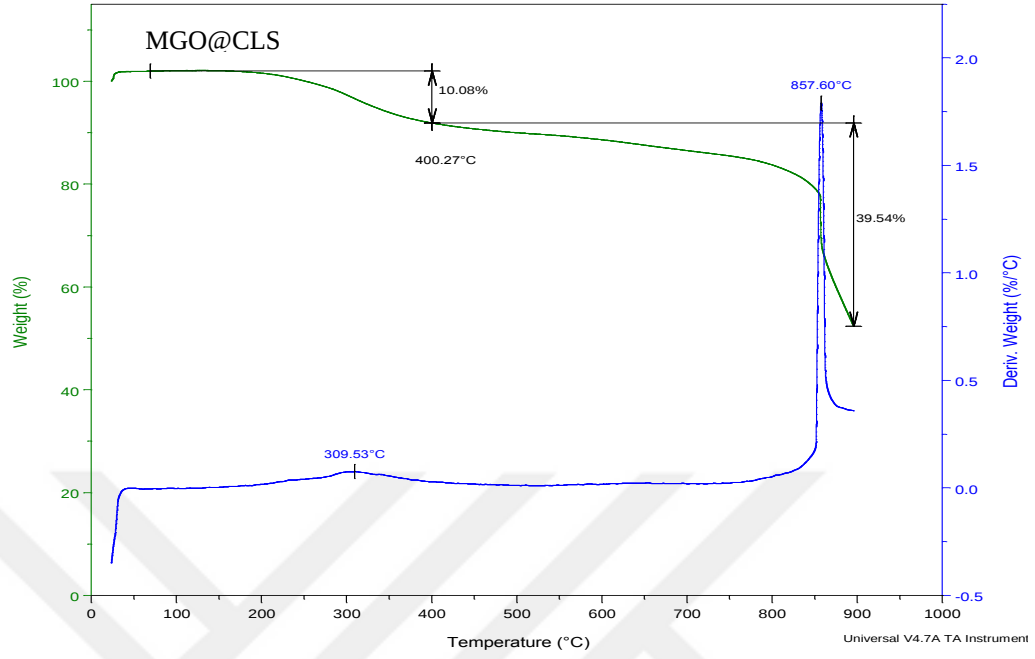
3.3.3.6. Termal Analiz

CLS ve MGO@CLS'nin termal özellikleri TGA kullanılarak araştırılmıştır. MGO, CLS ve MGO@CLS'nin TGA / DTG termogramı Şekil 3.37'de gösterilmiştir. CLS'nin TGA eğrisi, iki termal bozunma aşamasını içermektedir. CLS'nin karakteristik fonksiyonel

gruplarının çoğunun parçalanmasına bağlı olan ilk ve ana kütle kaybı (% 92,35), 150-400 °C sıcaklık aralığında gözlenmiştir. 400 ile 900 °C'deki hafif kütle kaybı ana kimyasal yapısında kalan karbon oksidasyonu nedeniyle ortaya çıkmıştır. MGO@CLS'nin TGA eğrisi de iki aşamalı ayrışma göstermiştir; bununla birlikte, CLS'nin aksine, ilk aşamada hidroksipropil grubunun kısmen bozunmasından kaynaklanabilen hafif (% 10,08) kütle kaybı gözlenmiştir. Kütle kaybının ikinci aşamasında (400-900 °C), selüloz fonksiyonel grupların ve ana yapıdaki karbonun kısmen parçalandığı düşünülmektedir. Bu sonuç, MGO@CLS'nin CLS ve MGO'dan daha kararlı olduğunu kanıtlamıştır.



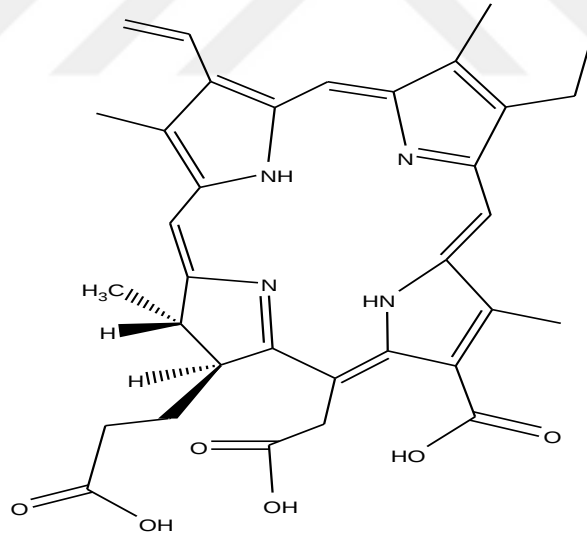
Şekil 3. 37. MGO, CLS ve MGO@CLS'nin TGA termogramları



Şekil 3.37. (devamı) MGO, CLS ve MGO@CLS'nin TGA termogramları

3.4. Klorin e6 konjuge MGO'nun Karakterizasyonu

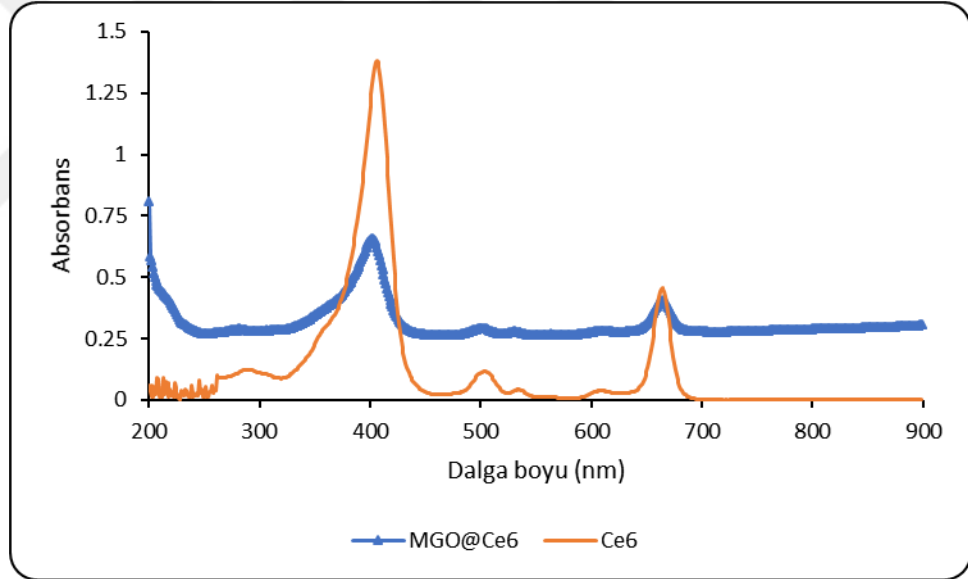
Fotodinamik tedavi (PDT) için ışığı absorplayacak fotoduyarlı bir bileşiğe (PS) ihtiyaç duyulmaktadır [163,250]. Ce6, NIR ışığı ile aktivasyonu, vücuttan nispeten hızlı eliminasyon ve yüksek singlet oksijen üretim verimliliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır [167,251]. Ayrıca, dünya çapındaki birçok ülkede, en iyi bilinen ve PDT için çok araştırılan fotosensitizör olan klorin e6; net bir yapıya, güçlü fotodinamik aktiviteye ve daha düşük sitotoksisiteye sahiptir [252]. Ce6'nın molekül formülü $C_{34}H_{36}N_4O_6$ 'dur. Şekil 3.38'de Ce6'nın kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 3. 38. Ce6'nın kimyasal yapısı

3.4.1. UV Spektrum Analizi

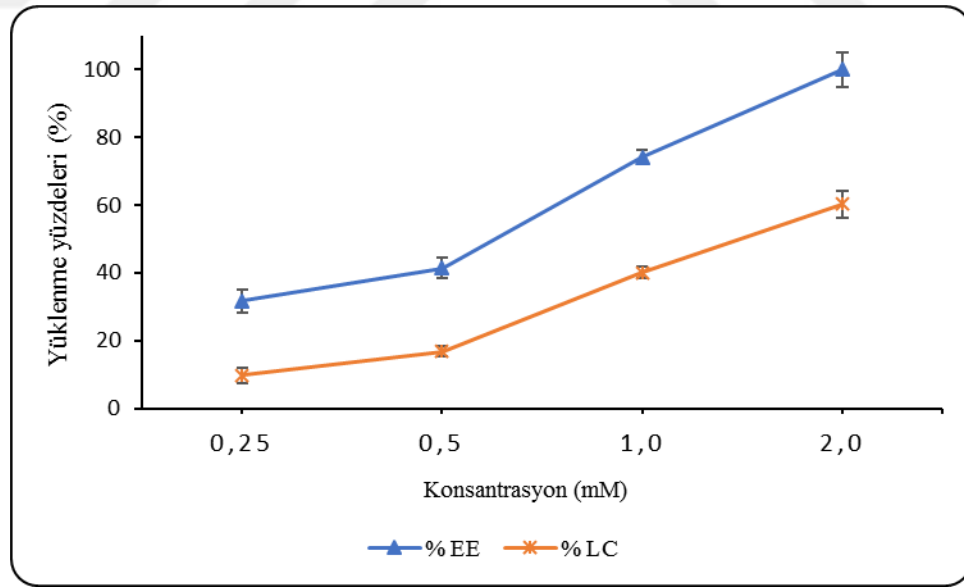
Ce6 ve MGO@Ce6 absorpsiyon spektrumları Şekil 3.39’da verilmiştir. Ce6’nın UV spektrumu 402 nm ve 665 nm’de iki ana absorpsiyon piki içermektedir. MGO@Ce6’nın UV spektrumuna bakıldığında Ce6’nın 402 nm ve 665 nm’deki pikleri yerlerini korumuşlar ancak şiddetleri azalmıştır. Elde edilen spektrumdan MGO üzerine Ce6 yüklendiği doğrulanmıştır.



Şekil 3. 39. Ce6 ve MGO@Ce6 UV spektrumları

Ce6’nın konjugasyon verimliliği UV spektrometresi ile incelenmiştir. Ce6’nın 402 nm’deki pikini kullanılarak alınan kalibrasyon doğrusundan regresyon $R^2 = 0,9959$ bulunmuştur (Bkz Ek 2). Ce6’nın yüklenme kapasitesi ve tutuklanma verimi elde edilen

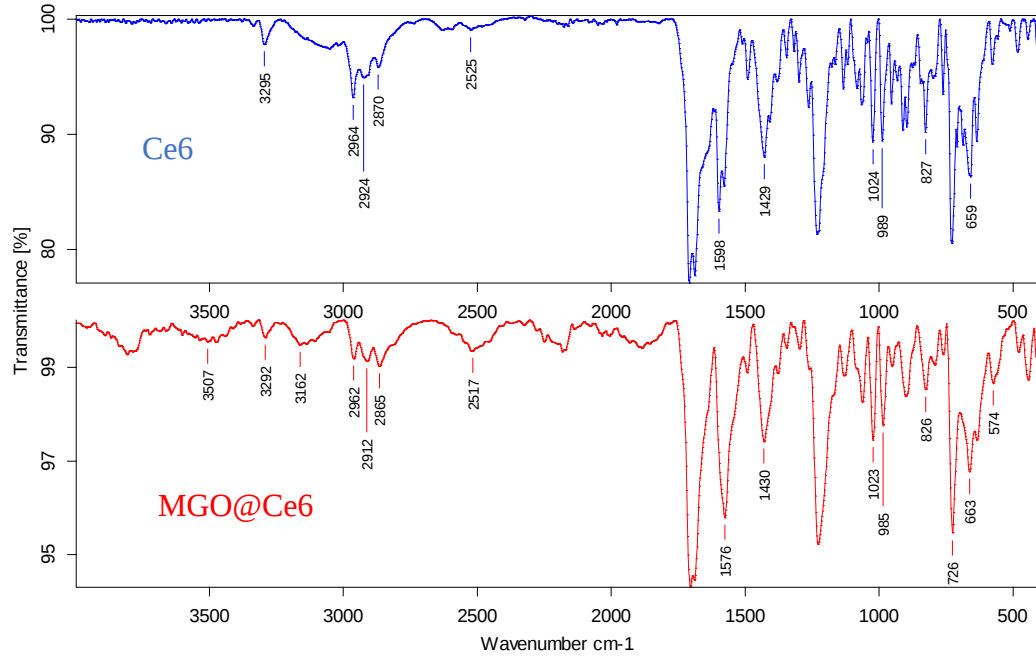
kalibrasyon doğrusu yardımıyla hesaplanmıştır. Ce6'nın yüklenme verimliliği artırmak için çeşitli metotlar kullanılmıştır. En son olarak, tutuklanma verimi (EE) ve yüklenme kapasitesi (LC) sırasıyla % 75 ve % 41 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, Ce6'nın konsantrasyonu ile tutuklanma verimi ve yüklenme kapasitesi arasındaki ilişki incelenmiştir. Şekil 3.40 incelendiğinde Ce6'nın tutuklanma verimi ve yüklenme kapasitesinin Ce6 konsantrasyonu artışı ile arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen yüklenme verimi, MGO'nun polimerik miseller ve silis nanoparçacıkları gibi diğer fotosensitizörlerin taşıyıcılarına kıyasla daha yüksek yüklenme etkinliğine sahip olduğunu göstermektedir [253]. Elde edilen sonuçlar MGO'nun Ce6 nano taşıyıcısı olarak PDT için çok umut verici bir nanomalzeme olduğunu kanıtlanmıştır.



Şekil 3. 40. Farklı Ce6 konsantrasyonunda, Ce6'nın % EE ve % LC

3.4.2. FTIR Spektrum Analizi

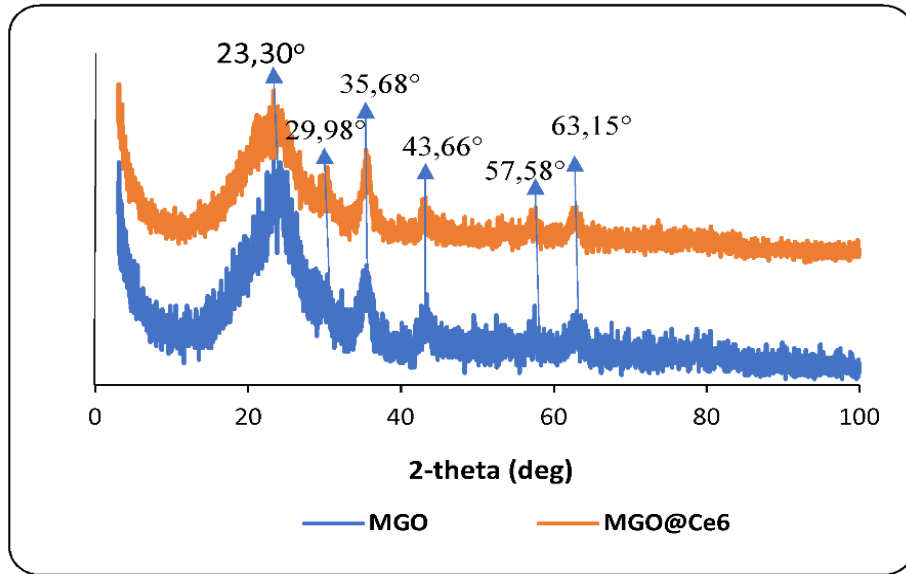
Şekil 3.41’de, MGO, Ce6 ve MGO@Ce6 FTIR spektrumları sunulmuştur. Ce6’nın spektrumu, 3292, 2964, 2925, 2871, 2525, 1709, 1688, 1598, 1429, 1232 ve 729 cm^{-1} ’de pikler göstermiştir. 3292 cm^{-1} ve 2850-2950 cm^{-1} ’deki pikler O-H ve C-H gerilme titreşimlerine atfedilebilir [254]. 1429 cm^{-1} ’deki pikin N-H eğilmesine ve 1709 cm^{-1} , 1688 cm^{-1} ve 1598 cm^{-1} ’deki piklerin ise, sırasıyla karboksil grubunun C=O, C=N ve C=C bağlarının gerilme titreşimine ait olduğunu düşünülmektedir [255]. 729 cm^{-1} ’de gözlenen pikin N-H bağının düzlem dışı eğilmesine karşılık gelmektedir. MGO@Ce6’nın FTIR spektrumu Ce6’nın tüm karakteristik piklerini göstererek Ce6’nın MGO üzerinde başarılı bir şekilde konjuge edildiği kanıtlamıştır.



Şekil 3. 41. Ce6 ve MGO@Ce6’nın FTIR spektrumları

3.4.3. X-ışını Kırınımı Analizi

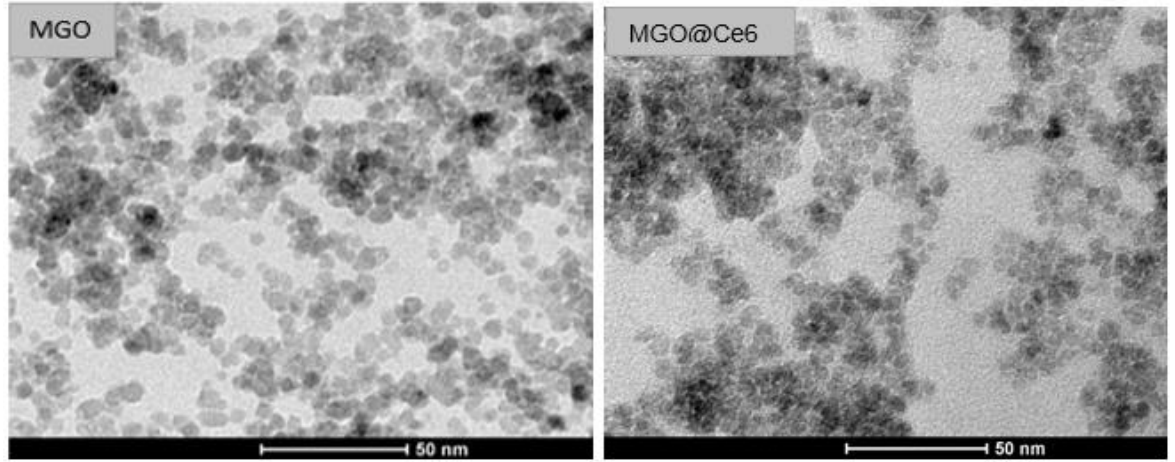
MGO@Ce6'nın yapısını karakterize etmek için X-ışını kırınımı analizi yapılmıştır. Şekil 3.42, MGO ve MGO@Ce6'nın tipik X-ışını kırınım desenleri sunmuştur. MGO'nun grafen tabakasının kırınımı ile ilişkilendiren, 23,30°de geniş bir bandı ve kübik Fe₃O₄'ün standart X-ışını kırınım verilerine karşılık gelen 29,98°, 35,68°, 43,66°, 57,58° ve 63,15°de keskin pikleri göstermektedir. MGO@Ce6'nın difraktogramı MGO'nunkine benzer olarak bulunmuştur ve Ce6'nın X-ışını kırınımı açıkça görülmemiştir. Bu durumun, şiddetli olan MGO'nun X-ışın kırınımının Ce6'nın piklerini örtmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 3. 42. MGO ve MGO@Ce6'nın X-ışını kırınımı

3.4.4. Yüzey Morfoloji Analizi

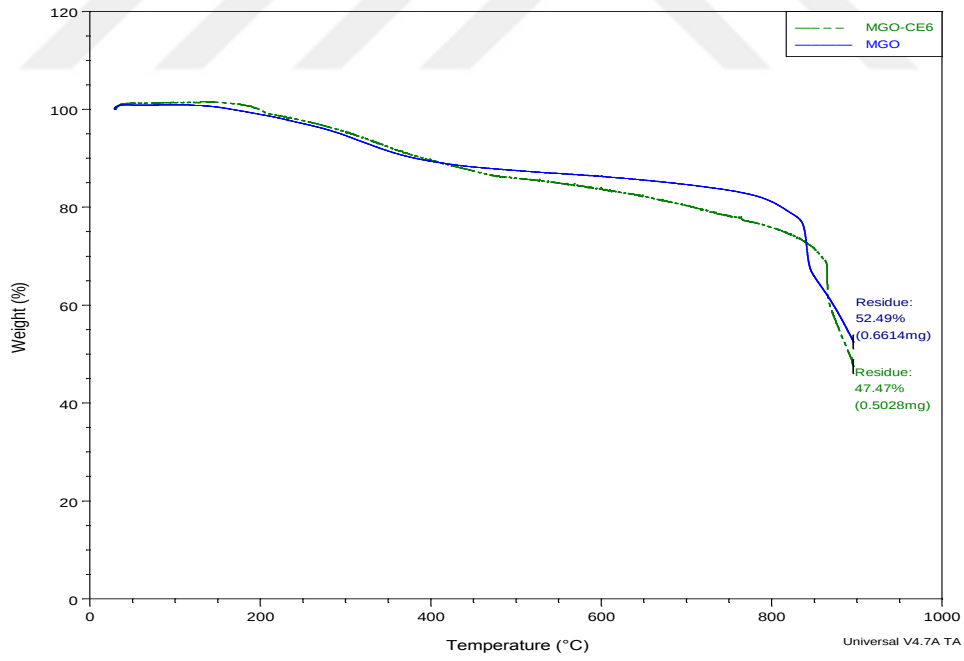
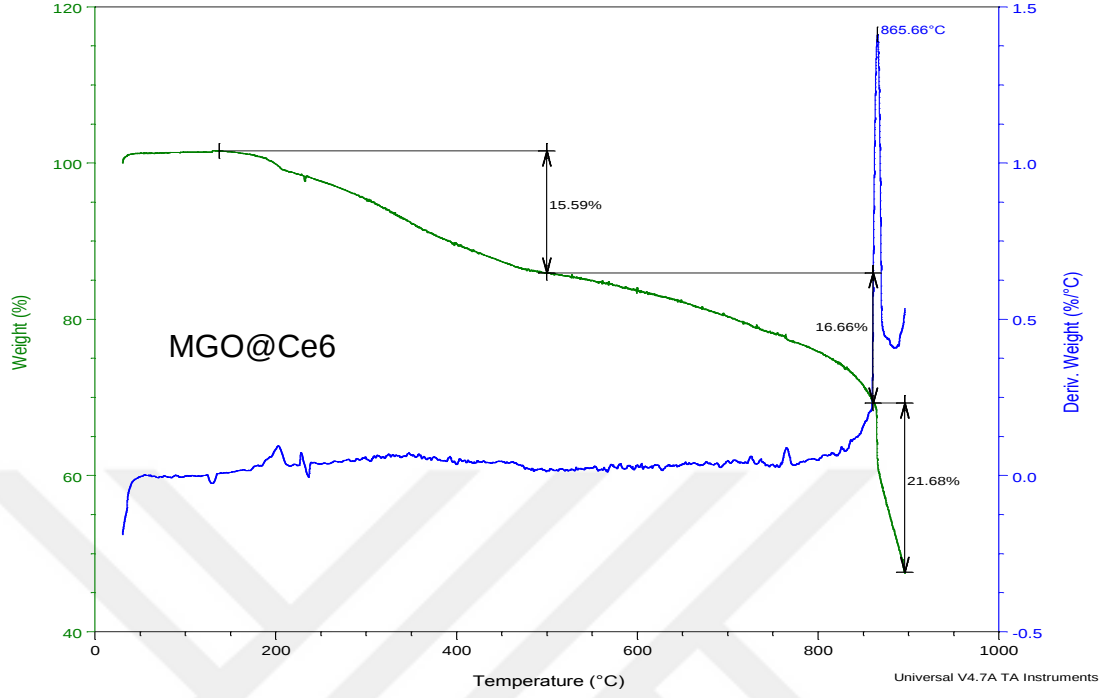
Ce6'nın MGO ile konjugasyonun etkisini araştırmak için yüzey morfoloji analizi; TEM ve Zetasizer ile incelenmiştir. MGO ve MGO@Ce6'nın TEM görüntüleri Şekil 3.43'te verilmiştir. Şekilden görüleceği gibi, Ce6 yüklenmesiyle yüzey görüntüsünde önemli değişiklik görülmemiştir. Ancak, yüzey yükü zetasizer ile ölçüldüğünde, farklı değerler alınmıştır. MGO'nun sudaki zeta potansiyeli $-20,17 \pm 1,9$ mV iken MGO@Ce6 zeta potansiyeli beklendiği gibi, negatif yüklü Ce6 yüklenmesiyle yüksek negatif değere ($-28,65 \pm 2,85$ mV) kaymıştır.



Şekil 3. 43. MGO ve MGO@Ce6'nın TEM görüntüleri

3.4.5. Termal Analiz

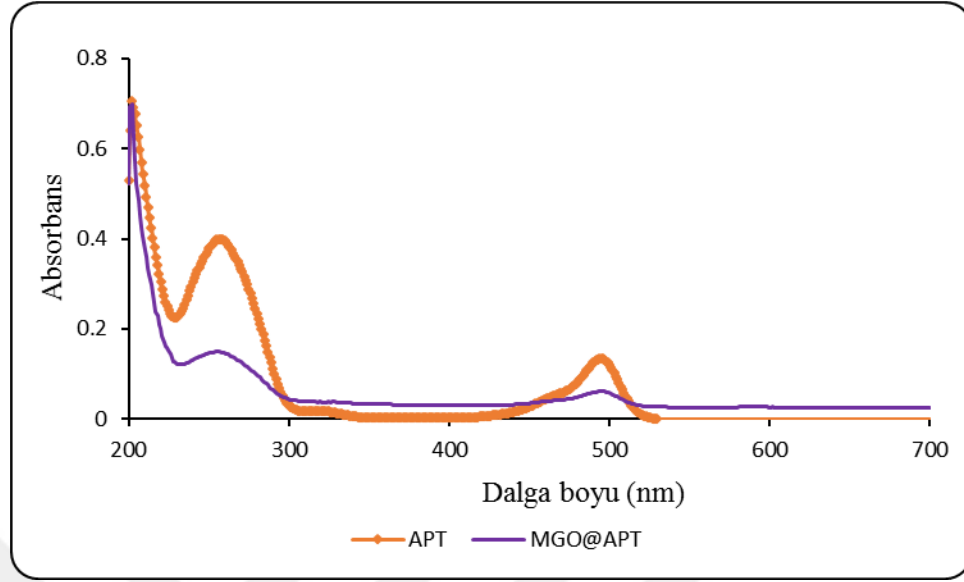
MGO@Ce6'nın termal davranışları TGA ile incelenmiştir ve Şekil 3.44'te sunulmuştur. TGA termogramında, iki bozunma bölgesi bulunmaktadır. İlk bozunma, 500 °C altında olup OH, COOH ve CO gibi oksijen içeren grupların uzaklaşmasından, 500 ve 900 °C arası olan ikinci ise ana yapısından karbonun kısmi bozunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [228, 234]. MGO ve MGO@Ce6'nın TGA termogramı arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Bu sonuç, MGO'nun termal davranışının Ce6 konjugasyonundan etkilenmediğini göstermektedir.



Şekil 3. 44. MGO ve MGO@Ce6'nın TGA termogramları

3.5. Aptamer Konjuge MGO'nun Karakterizasyonu

Hedefli ilaç verme, spesifik hücreleri veya dokuyu tanıyabilen bir hedefleme ajanı kullanarak ilaçların vücudun belirli bir bölümüne iletilmesidir [150]. Aptamer (APT), kanser tedavisinde kullanılan hedefleyici ajanlardan biridir [155]. APT; proteinler, nükleik asitler, hücreler ve dokular dahil olmak üzere çeşitli moleküler hedeflere spesifik olarak bağlanabilen kısa, sentetik, tek sarmal oligonükleotittir [256]. Bu çalışmada MCF-7 kanser hücresindeki O-glikoz konjuge edilmiş musin protini (MUC1) tanıyabilen aptamer kullanılmıştır. Hazırlanan MGO@APT'nin yapısı UV spektrometresi ile aydınlatılmıştır. Şekil 3.45'te APT ve MGO@APT'nin UV spektrumları verilmiştir. APT'nin 261 nm ve 500 nm'de iki karakteristik pikleri bulunmaktadır. Bu pikler MGO@APT'nin spektrumunda şiddetleri azalması dışında açık olarak görülebilmektedir. Elde edilen bulgular APT'nin konjugasyonunu kanıtlamıştır.



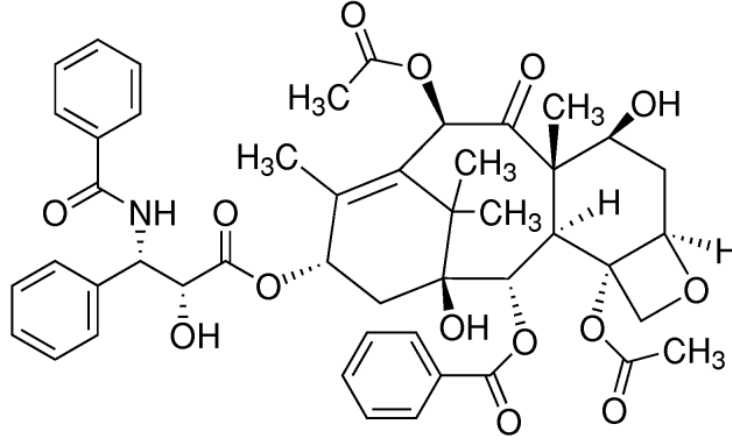
Şekil 3. 45. MGO ve MGO@APT'nin UV absorpsiyon spektrumları

3.6. İlaç Yüklenmesi ve Karakterizasyonu

3.6.1. PAC'nin MGO'ya Yüklenmesi ve Karakterizasyonu

PAC kanser hücrelerine yüksek sitotoksikite gösteren, yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır [257]. PAC taxus drevifoliaden elde edildiğinden bu yana kanser tedavisinde önemli roller oynamaktadır [258–260]. PAC, meme kanseri, yumurtalık kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri ve boyun kanseri gibi geniş bir kanser türüne karşı aktiftir [261]. PAC'nin molekül formülü $C_{47}H_{51}NO_{14}$ şeklindedir ve kimyasal yapısı Şekil 3.46'da gösterilmiştir.

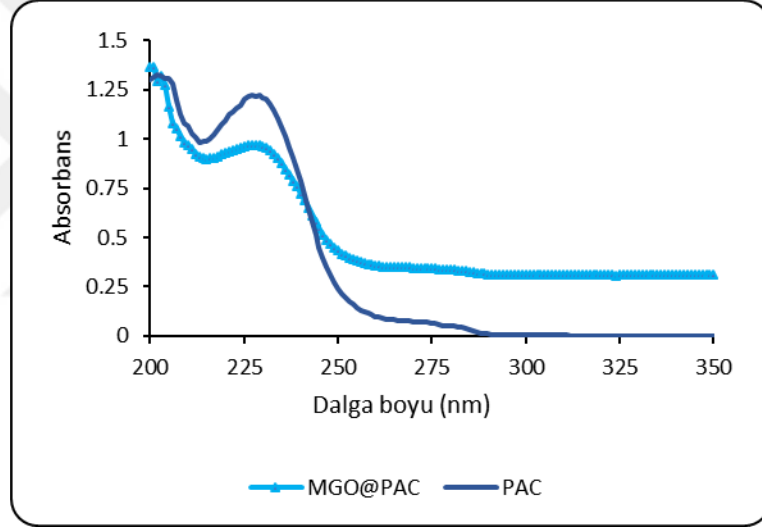
MGO nanomalzeme hidrofobik karbonlar ve aromatik grupları içermektedir. Ayrıca, nanomalzemeyi amfifilik hale getiren -OH ve -COOH gibi oksijen içeren grupları vardır [262]. MGO nanomalzemenin ve PAC'nin hidrofobik ve aromatik grupları arasındaki hidrofobik etkileşimler ve fiziksel π - π istiflemeler yoluyla PAC, MGO yüzeyine yüklenebilmektedir [198,263]. Π - π istifleme, nanotaşıyıcının ve ilacın aromatik gruplarının p-orbitalleri arasındaki moleküller arası örtüşme ile gerçekleştirir [264]. Aynı zamanda, nanomalzemenin -OH ve -COOH gibi aktif işlevsel grupları PAC'deki -OH, -C=O ve -NH grupları ile etkileşime girerek hidrojen bağı oluşturmaktadırlar [265].



Şekil 3. 46. PAC'nin kimyasal yapısı

3.6.1.1. UV Spektrum Analizi

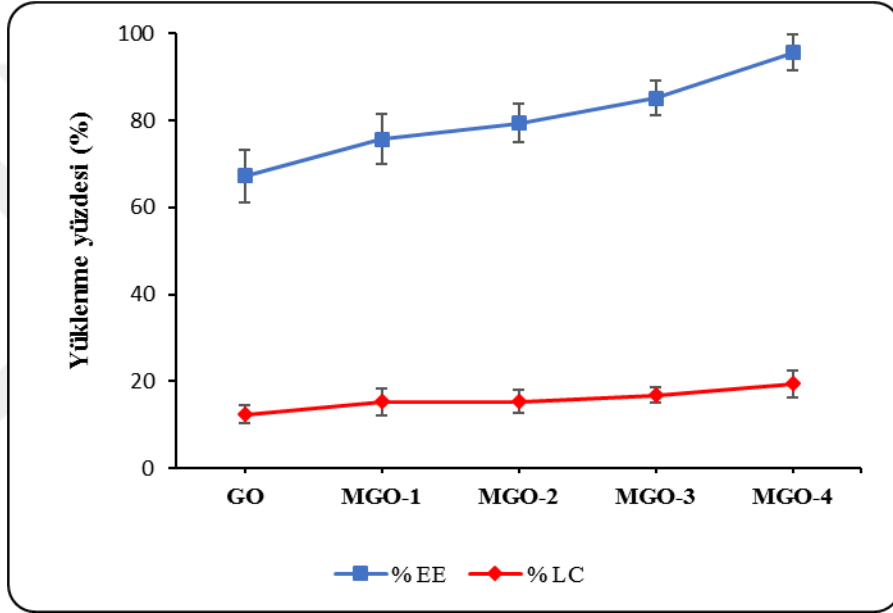
MGO üzerinde PAC yüklenmesi UV absorpsiyon spektrumunda 231 nm'deki PAC'nin karakteristik absorpsiyon piki ile doğrulanmıştır. Şekil 3.47'de PAC ve PAC@MGO'nun UV spektrumları sunulmuştur. Şekil incelendiğinde 231 nm'deki PAC'nin karakteristik piki MGO@PAC'nin spektrumunda kolayca görünmektedir.



Şekil 3. 47. PAC'nin ve MGO@PAC'nin UV spektrumu

Diğer yandan, PAC'nin yüklenme performansı GO ve dört farklı MGO nano taşıyıcıları kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 3.48'de PAC'nin tutuklanma verimleri (EE) ve yüklenme kapasitesi (LC) verilmiştir. Şekil'den görüleceği gibi, GO, MGO-1, MGO-2, MGO-3, ve MGO-4'ün tutuklanma verimi sırasıyla % 67,12 $\pm$ 6,0, % 75,96 $\pm$ 5,8, % 79,30 $\pm$ 4,4 % 85,04 $\pm$ 4,0 ve % 95,75 $\pm$ 4,1 bulunmuştur. Benzer şekilde, yüklenme

kapasitesi için sırasıyla % $12,42 \pm 2,0$, % $17,26 \pm 2,0$, % $18,28 \pm 2,3$, % $19,33 \pm 1,8$ ve % $21,38 \pm 1,9$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, GO üzerinde yüklenen Fe_3O_4 artırıldığında, ilaç yükleme performansı artmıştır. Bu durum sentezlenen MGO nano malzemenin çok iyi bir ilaç taşıyıcısı olabileceğini göstermektedir.

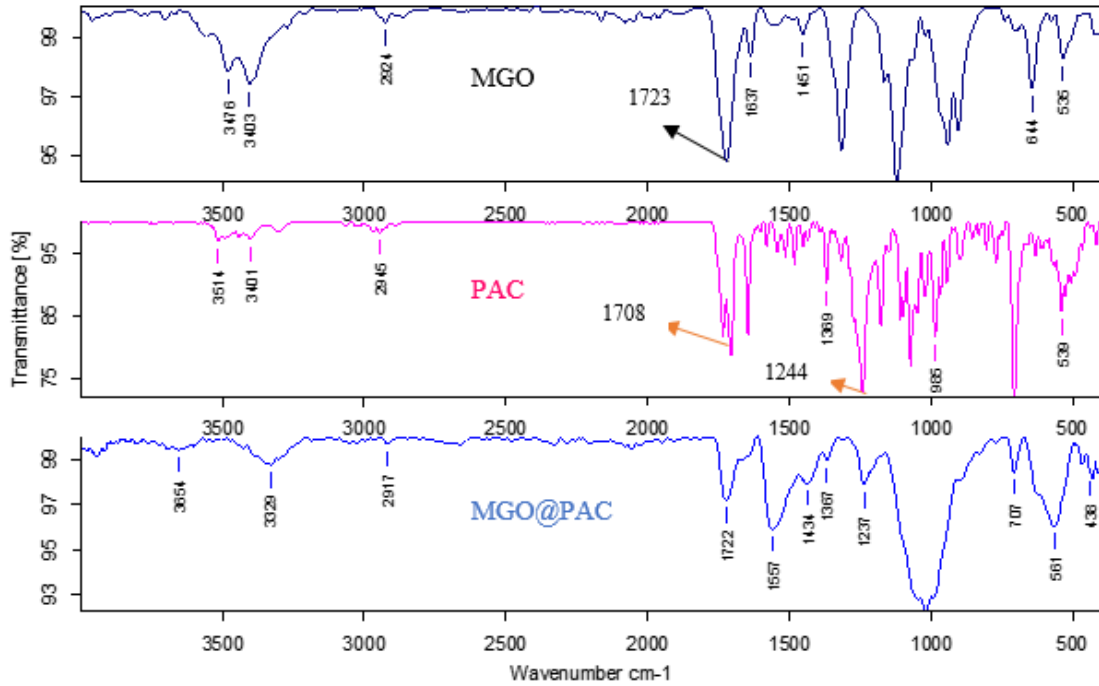


Şekil 3. 48. GO ve MGO'ların yükleme kapasitesi ve tutukama verimleri

3.6.1.2. FTIR Spektrum Analizi

PAC ve MGO@PAC'nin FTIR spektrumları Şekil 3.49'da verilmiştir. PAC'nin FTIR spektrumundaki $3515\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler N-H gerilme titreşimleri, 3303 cm^{-1} 'deki O-H gerilme titreşimi ve $2970\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan pikler CH_2 asimetrik ve simetrik gerilme titreşimleri olarak belirlenmiştir [266]. 1734 ve 1707 cm^{-1} 'de yer alan pikler,

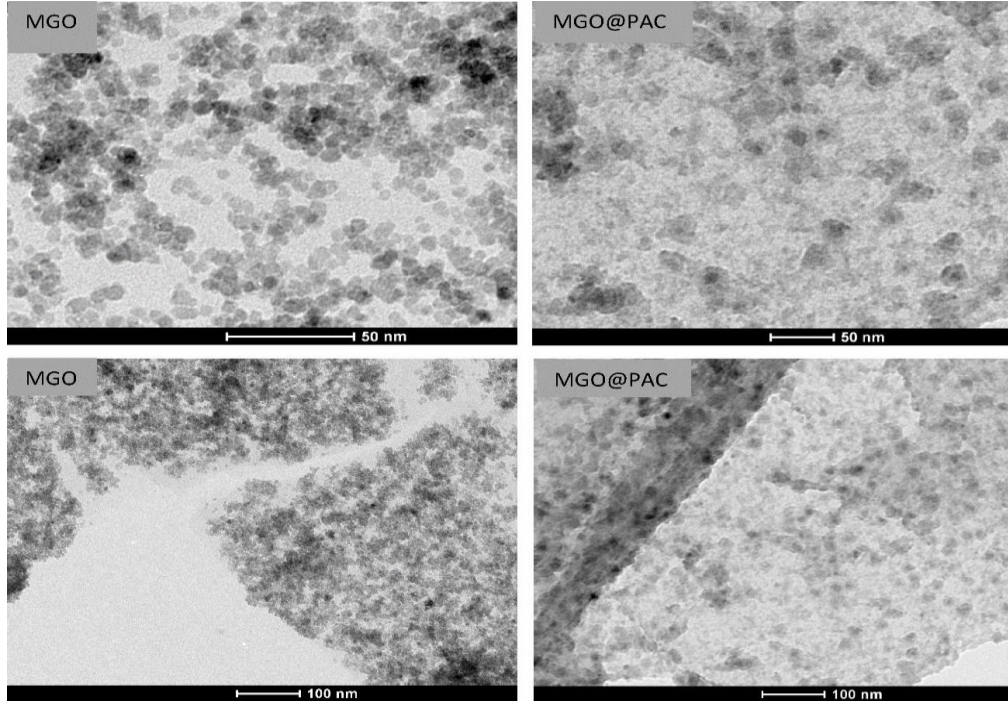
ester ve keton gruplarında bulunan C=O'nun gerilme titreşimine atfedilmiştir [267,268]. Amid C=O gerilme titreşimleri 1645 cm^{-1} civarındayken, CH_3 deformasyonu ve C-N gerilme titreşimleri sırasıyla 1369 ve 1242 cm^{-1} 'de bulunmaktadır. 1072 cm^{-1} , 985 cm^{-1} ve 705 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla C-O-C gerilme titreşimi, C-H düzlem içi ve düzlem dışı deformasyonuna atfedilmiştir [269]. MGO@PAC spektrumunda, 3654 civarındaki geniş pikin PAC'ten gelen N-H bağının gerilme titreşimine ait olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, 1369 ve 705 cm^{-1} 'deki PAC'nin karakteristik piklerinin aynı bölgede çıkması MGO nanotaşıyıcı üzerine PAC ilacın başarıyla yüklendiğini doğrulamıştır.



Şekil 3. 49. PAC ve MGO@PAC'nin FTIR spektrumları

3.6.1.3. Yüzey Morfoloji Analizi

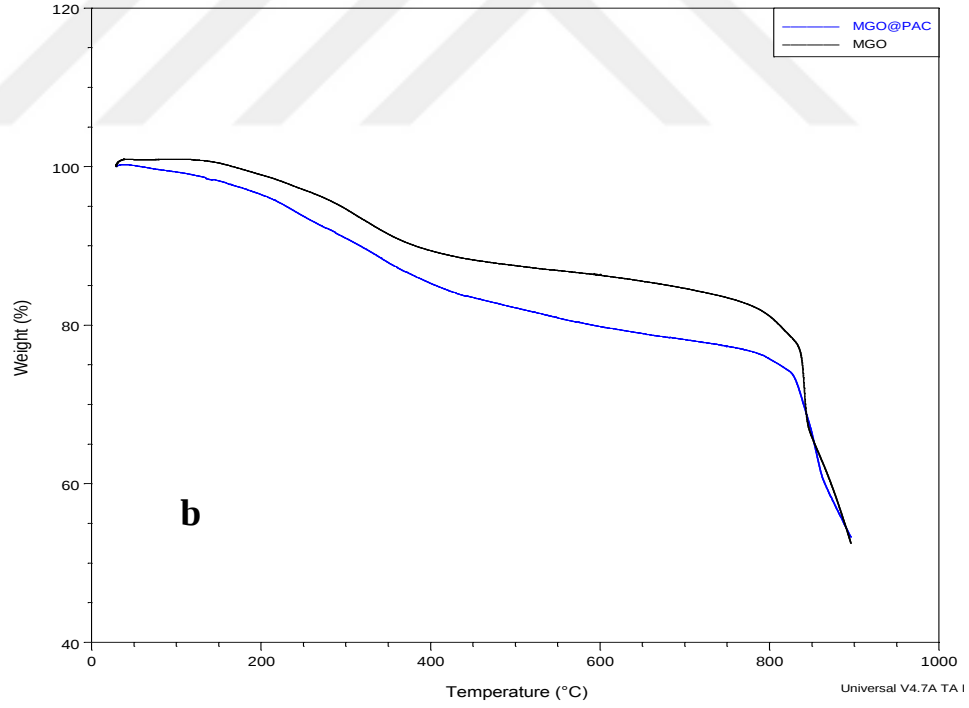
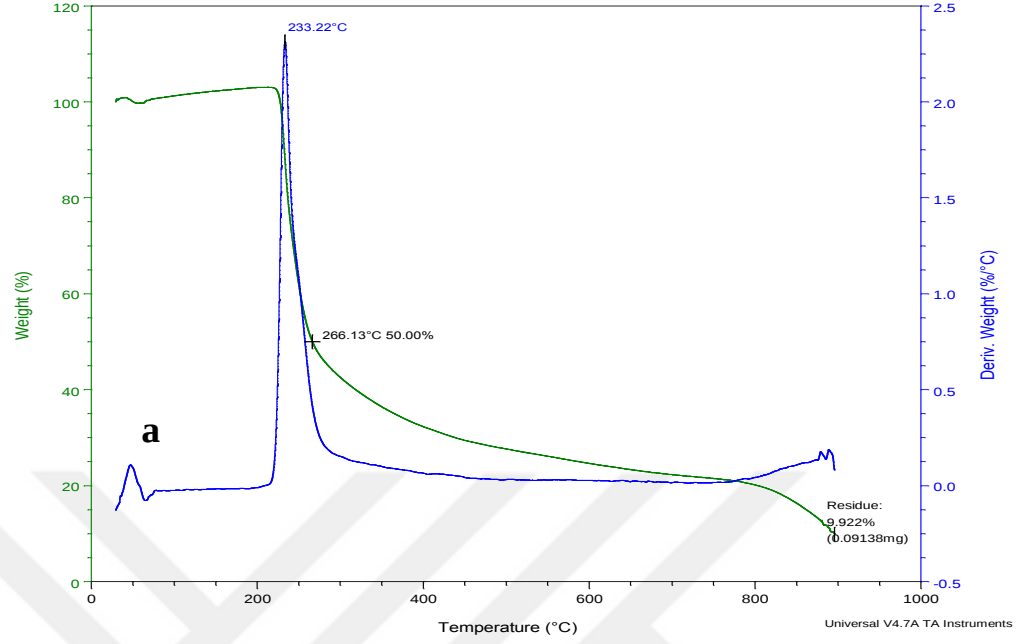
MGO nano taşıyıcı üzerinde PAC ilacı yüklendikten sonra MGO'nun yüzey morfolojisi TEM ve Zetasizer ile incelenmiştir. Şekil 3.50'de MGO ve MGO@PAC'nin TEM görüntüsü verilmiştir. TEM görüntüsünde, PAC MGO yüzeyinin Fe_3O_4 nanoparçacıklarının (siyah noktalar) olduğu yerlerde daha fazla kaplamıştır. Bu görüntü PAC'nin Fe_3O_4 üzerinde daha fazla yüklenebildiğini işaret edebilir. Bu sonuç yukarıda verilen MGO'ların PAC yükleme performansları ile tutarlıdır. Öte yandan, MGO@PAC'nin zeta potansiyeli incelendiğinde, MGO@PAC'nin yüzey yükü deiyonize su içinde $-20,17 \pm 1,9$ mV'den $-27,01 \pm 1,8$ mV'ya artmıştır. Yüzey yükünün artması PAC'nin MGO yüzeyinde yüklenmesini doğrulamıştır.



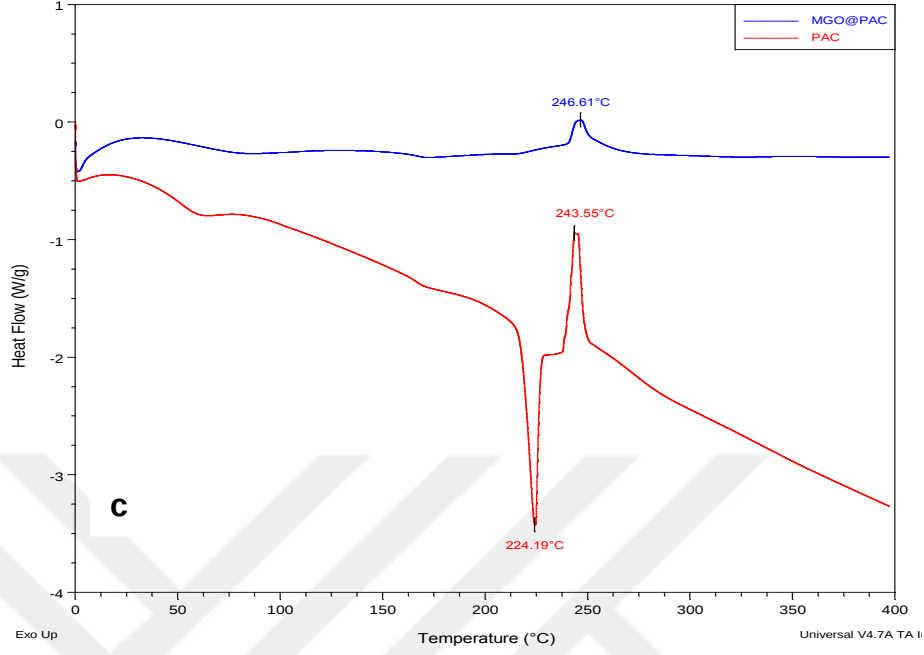
Şekil 3. 50. MGO ve MGO@PAC'nin TEM görüntüleri

3.6.1.4. Termal Analiz

PAC ve MGO@PAC'nin termal özellikleri TGA ve DSC analizleriyle araştırılmıştır. Şekil 3.51'de PAC ve MGO@PAC'nin TGA ve DSC termogramları verilmiştir. PAC'nin TGA termogramında (Şekil 3.51a), PAC'nin bozulmasına atfedilen 233,22 °C'de kütle kaybı (% 65) görülmektedir. Ayrıca, 900 °C'de PAC'nin % 90 kütle kaybı olmuştur. Bu sonuç PAC'nin yüksek sıcaklığa dayanamadığını göstermektedir. MGO@PAC'nin TGA termogramına bakıldığında (Şekil 3.51b), MGO@PAC'nin termal dayanımı MGO'ya göre daha azdır, bu durum ise PAC'nin yüklendiğini doğrulamaktadır. Diğer yandan, PAC'nin DSC termogramı ilacın erime noktasına karşılık gelen 223,83 °C'de karakteristik pik göstermektedir. Ayrıca bozunma noktasına atfedilen ekzotermik pik 243,55 °C'de bulunmaktadır [261,270,271]. MGO@PAC'nin DSC termogram ise (Şekil 3.51c), PAC'nin bozunma noktasına karşılıklı gelen 246,61 °C'de düşük şiddetli bir ekzotermik pik göstermiştir. Elde edilen veriler, PAC'nin MGO üzerinde yüklendiğini desteklemektedir.



Şekil 3. 51. PAC ve MGO@PAC'nin TGA (a, b) ve DSC (c) termogramları

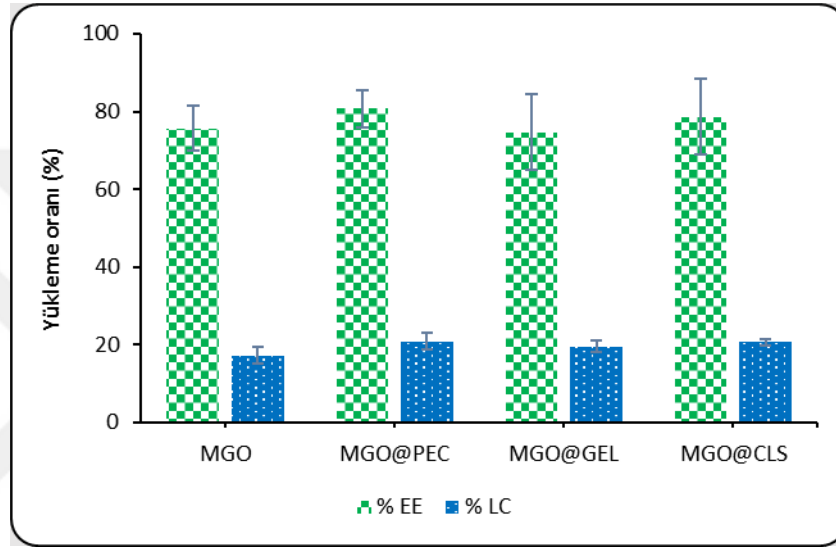


Şekil 3.51. (devamı) PAC ve MGO@PAC'nin TGA (a, b) ve DSC (c) termogramları

3.6.2. PAC'nin Polimer Konjuge MGO'ya Yüklenmesi

Polimerlerin konjuge edilmesinin ilaç yüklenmesinde göstereceği etkiyi araştırmak için MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin ilaç yükleme performansı incelenmiştir. Elde edilen, veriler Şekil 3.52'de verilmiştir. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin % EE oranı sırasıyla % $75,68 \pm 5,8$, % $80,77 \pm 4,8$, % $74,69 \pm 5,8$ ve % $78,57 \pm 6,9$ olarak bulunmuştur. MGO nanomalzemenin polimer ile konjugasyonu, belirgin olarak yükleme performansını etkilememiştir. MGO@GEL'nin yükleme performansı MGO'ya göre hemen hemen aynıdır, ancak, MGO@PEC ve MGO@CLS'ninki biraz yüksek bulunmuştur. Bazı polimer zincirlerin MGO kenarında bulunan karboksilik asit gruplar ile konjugasyonu ile taşıyıcının yüzey alanı artabilir. Bu

durum daha fazla ilaç yüklenmesine yol açmaktadır. Ayrıca, konjuge edilen polimerin yapısı üzerindeki aktif fonksiyonel gruplar ile ilaç arasındaki hidrojen bağ etkileşimi gözlenen ilaç yükleme performansı artışına neden olabileceği düşünülmüştür [118] .

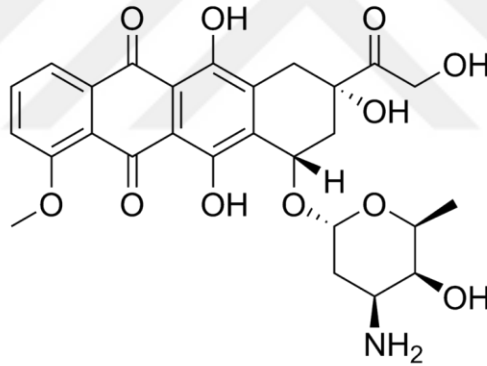


Şekil 3. 52. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin % LC ve % EE

3.6.3. Doksorobisin'in MGO'ya Yüklenmesi ve Karakterizasyonu

DOX, çeşitli kanser tümörlerine karşı mükemmel anti-tümör etkisiyle klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan ilaçlardandır [272,273]. Günümüzde, nanotıpın bir parçası olarak azalmış toksisite ve yüksek tedavi etkinliği göstererek birçok kanser hastalarını tedavi etmek için kullanılmaktadır [274]. Meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, nöroblastoma kanseri, lösemi vb. gibi kanser tedavisinde en çok kullanılan ilaçlardan biridir. DOX'un molekül formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}$ şeklindedir ve kimyasal

yapısı Şekil 3.53'te verilmiştir. DOX, fiziksel π - π istifleme ve hidrofobik etkileşimler yoluyla MGO yüzeyine yüklenebilmektedir [22]. Ayrıca, MGO ve DOX arası hidrojen bağ etkileşimleri vardır. DOX'un MGO'ya yüklendikten sonra PAC'deki gibi UV absorbans spektrometresi kullanılarak yüklenme kapasitesi ve tutuklanma verimleri hesaplanmıştır. DOX ilacı UV absorpsiyonunda beş tane karakteristik pik göstermiştir. Bu piklerden 474 nm'de bulunan pik kullanılarak lineer regresyon ($R^2 = 0,997$) ile normalize eğrisi çizilmiştir (Bkz Ek 3). DOX'un tutuklanma verimi ve yüklenme kapasitesi sırasıyla $\% 72,47 \pm 6,4$ ve $\% 34,03 \pm 4,8$ bulunmuştur.

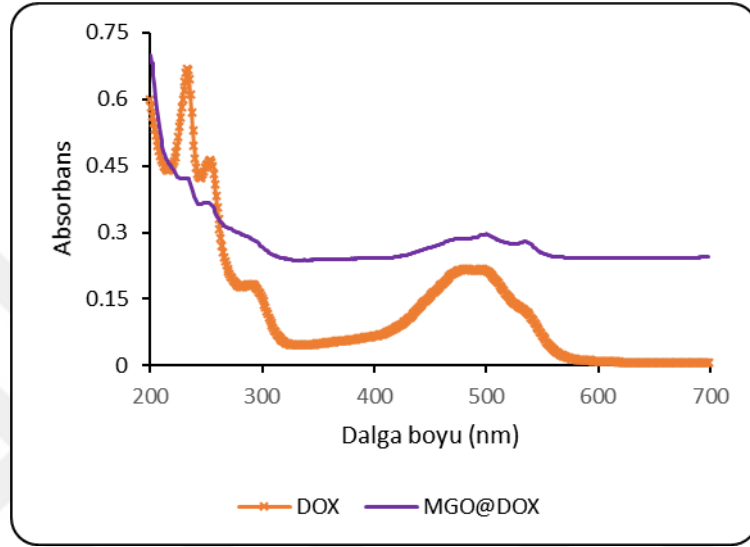


Şekil 3. 53. Doksorubisin'in kimyasal yapısı

3.6.3.1. UV Spektrum Analizi

GO üzerinde DOX'un yüklenmesi UV ve FTIR spektrumları ile incelenmiştir. Şekil 3.54'te DOX, ve MGO@DOX'un UV spektrumları sunulmuştur. MGO@DOX'un spektrumunda DOX'un karakteristik beş piki; 233 nm, 253 nm, 291 nm, 474 nm, 499

nm ve 533 nm’de bulunmaktadır. Bu piklerde şiddet azalması dışında yerlerinde bir kayma olmamıştır. Sonuçlar, DOX’un MGO üzerinde yüklendiğini desteklemektedir.

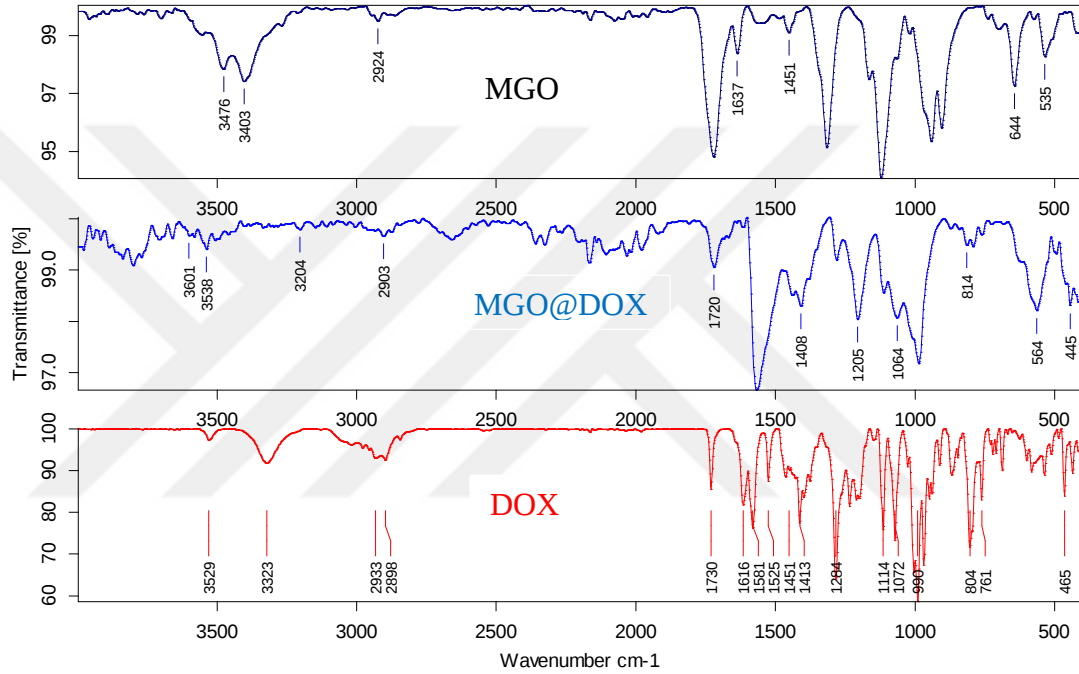


Şekil 3. 54. MGO@DOX ve DOX’un UV spektrumları

3.6.3.2. FTIR Spektrum Analizi

Şekil 3.55 MGO, MGO@DOX ve DOX’un FTIR spektrumlarını göstermektedir. DOX’un FTIR spektrumunda, 3529 ve 3323 cm^{-1} ’deki pikler N-H ve O-H bağlarının titreşim gerilmesine karşılık gelirken, 2950 ve 2890 cm^{-1} arasındaki pikler metilen grubunun ($-\text{CH}_2$) asimetrik ve simetrik gerilmesiyle ilişkilidir [275,276]. Ayrıca, 1730 cm^{-1} ’de C = O gerilmesi, 1616 ve 1581 cm^{-1} ’de primer aminin N-H eğilmesi, 1413 cm^{-1} ’de alkollerin O-H eğilmesi, 1284 cm^{-1} ’de C-N gerilmesi, 1114 ve 1072 cm^{-1} ’de C-O gerilmeleri ve 675-900 cm^{-1} ’de düzlem dışı O-H eğilmesi ile ilişkilendirilmektedir [277].

MGO@DOX'un FTIR spektrumu MGO'ya kıyasla gördüğümüzde, 3538 cm^{-1} 1205 cm^{-1} ve 864 cm^{-1} 'de pikler gözlenmiştir. Bu pikler DOX'un MGO'ya yüklenmesini doğrulamaktadır.



Şekil 3. 55. MGO, DOX ve MGO@DOX'un FTIR spektrumları

3.7. *İn Vitro* İlaç Salımı

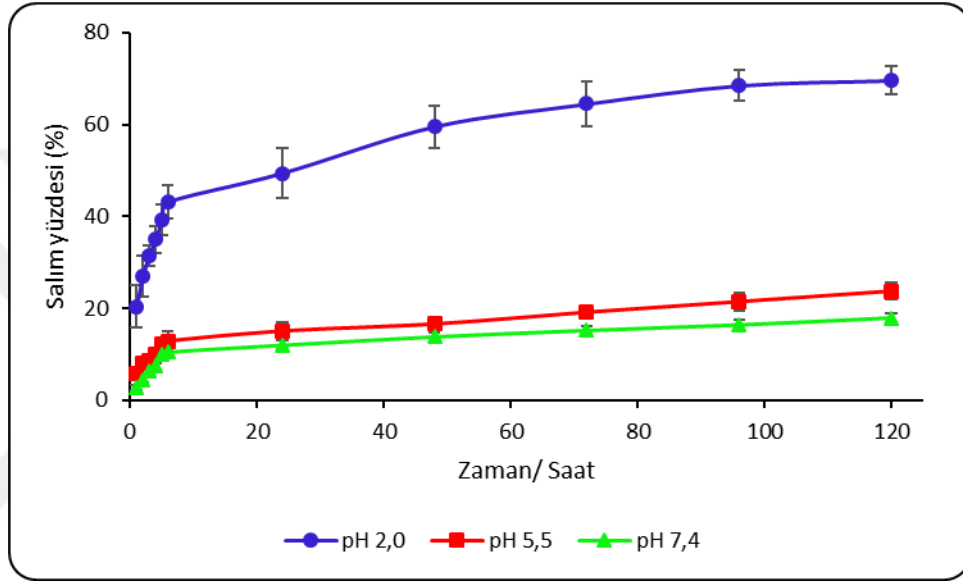
3.7.1. PAC'nin MGO'dan *İn Vitro* Salımı

Hazırlanan nano yapıların *in vitro* ilaç salım kapasiteleri ve pH'ya duyarlılıkları, pH 7,4, (normal fizyolojik ortam pH'sı), pH 5,5 (kanser hücresinin endomozal pH'sı) ve pH 2,0

(mide ortamı pH'sı) incelenmiştir. Şekil 3.56'da pH 2,0, 5,5 ve 7,4'deki MGO@PAC'nin PAC salım profili gösterilmektedir. Şekil incelendiğinde, PAC'nin salımı iki aşamada gerçekleşmiştir. Birinci aşama ilk 6 saat içinde gerçekleşmiş ve hızlı PAC salımı izlenmiştir. Bu salım oranı kısmen yüksek spesifik yüzey alanına sahip MGO nanoparçacıklar yüzeyine adsorbe olan PAC'nin salınmasına bağlı olabilir. İkinci aşamada, PAC'nin salım hızı yavaş yavaş giderek sabit bir değere ulaşmıştır. İlaç salım sisteminde, ilacın ikili salım aşamasından (bi-phasic) oluşması tedavide önemli bir rol oynayacaktır. İlk aşamada salınan ilaç hızla hastalığı tedavi edebilir ve yavaş salımlı aşaması iyileştirici etkisinin pekiştirilmesini sağlar [278].

MGO'nun PAC salımı pH 7,4, 5,5, ve 2,0 ortamlarında sırasıyla % $17,89 \pm 1,0$, % $23,72 \pm 1,8$ ve % $69,59 \pm 3,0$ olarak bulunmuştur (Şekil 3.56). Düşük pH'larda (2,0 ve 5,5) salınan ilaç miktarı, bazik ortama (pH 7,4) göre, önemli ölçüde daha yüksektir. PAC'nin salım artışı istatistiksel olarak analiz edildi ve anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Sonuç, MGO'nun ilaç salımında kanser hücre tedavisi için önemli bir faktör olan pH'ya duyarlı olduğunu göstermektedir. Gözlenen pH duyarlılığının nedeni, asidik ortamda MGO'nun işlevsel gruplarının protonlanması sonucu, ilaç ve taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetlerinin kısmen ayrışması olabilir [279]. Bu asidik ortamdaki hidrojen bağ etkileşimlerinin azalması salınan paklitaksel miktarını artırabilmektedir. Öte yandan, nötr ve bazik koşullarda ilaç ve nano taşıyıcı arasında nispeten daha güçlü hidrojen bağlanma etkileşiminin olması, düşük bir PAC salımıyla sonuçlandığı düşünülmektedir [280]. Bu sonuç tümör spesifik ilaç verme sistemleri için çok önemlidir çünkü tümör dokularının hücre ortamı asidiktir. Genellikle, kanser ilaçları, asidik endozomlar ve

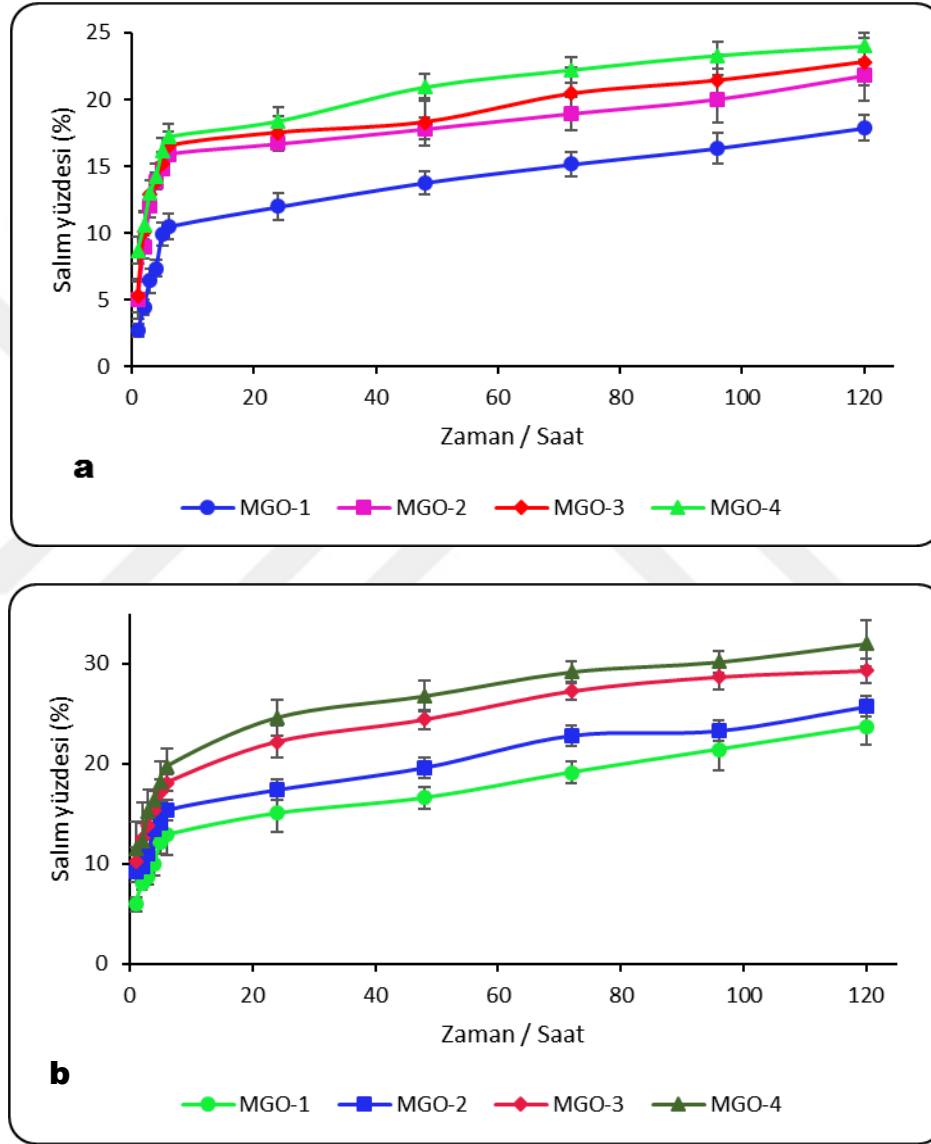
lizozomlar'dan taşınıp bir tümör hücresi içine teslim edilebilmektedir. Bu asidik tümör ortamı normal dokulara karşı olan yan etkileri azaltmak suretiyle, pH ile aktive edilmiş MGO ilaç salımının elde edilmesini sağlamaktadır [204].



Şekil 3. 56. pH 2,0, 5,5 ve 7,4 ortamlarında MGO'nun PAC salımı. Veriler, ortalama $\pm$ SS, $P < 0,05$ ($n = 3$) olarak ifade edildi.

Ayrıca, MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4'ün PAC salım performansları pH 5,5 ve 7,4'de araştırılmıştır. Şekil 3.57a'da, MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4'ün pH 7,4 ortamındaki PAC salım yüzdeleri sırasıyla $\% 17,89 \pm 1,0$, $\% 21,80 \pm 1,9$, $\% 22,82 \pm 1,7$ ve $\% 24,0 \pm 0,9$ olarak gösterilmiştir. Aynı şekilde, pH 5,5'te (Şekil 3.57b) PAC salım yüzdeleri, $\% 23,72 \pm 1,8$, $\% 25,72 \pm 2,5$, $\% 29,29 \pm 1,2$ ve $\% 32,02 \pm 2,3$ olarak

bulunmuştur. Ayrıca, bütün MGO'lar pH 5,5'te daha fazla PAC salımı göstererek, pH'ya duyarlı oldukları doğrulanmıştır.



Şekil 3. 57. MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4 PAC salım profili, (a) pH 7,4 (b) pH 5,5. Veriler, ortalama $\pm$ SS, $P < 0,05$ ($n = 3$) olarak ifade edildi.

Diğer taraftan, MGO parçacıklarından ilaç salma mekanizması Korsmeyer-Peppas modeli ile değerlendirilmiştir. Çizelge 3.4'te pH 5,5 ve 7,4'teki MGO-1@PAC, MGO-2@PAC, MGO-3@PAC ve MGO-4@PAC'nin Korsmeyer-Peppas modeline göre n değerleri sunulmuştur. Elde edilen sonuç gösterdiği gibi, tüm nano taşıyıcılar için n 'nin değeri, hem pH 5,5 hem de 7,4'te 0,45'ten düşük bulunmuştur. Bu n değeri PAC'nin salım mekanizması Fick difüzyonu olduğunu göstermiştir; yani, nano taşıyıcılardan PAC salımı esas olarak ilacın difüzyonuna bağlıdır [200].

Çizelge 3. 4. Korsmeyer-Peppas modeli kullanılarak PAC salım profilinden hesaplanan n değerleri.

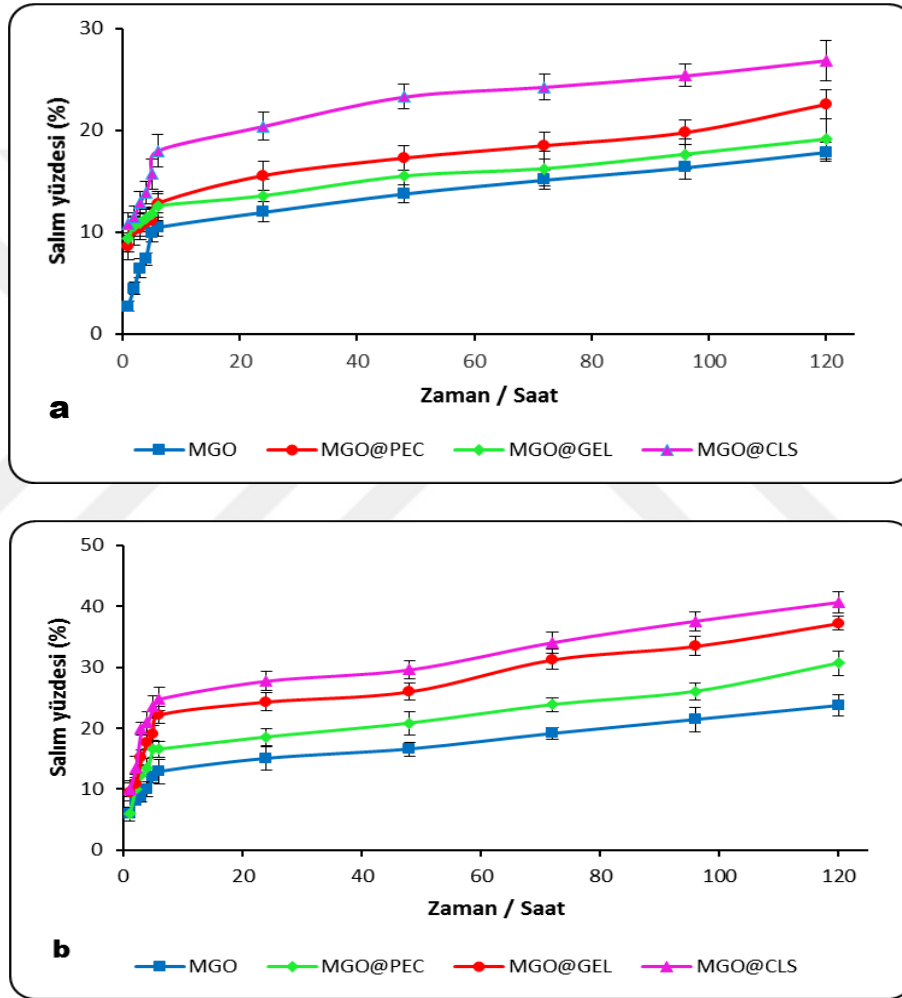
Taşıyıcılar	Ortamın pH'sı	n değerleri	Regresyon (r)
MGO-1@PAC	5,5	0,250	0,9503
	7,4	0,314	0,9402
MGO-2@PAC	5,5	0,206	0,9613
	7,4	0,171	0,9317
MGO-3@PAC	5,5	0,207	0,9752
	7,4	0,178	0,9366
MGO-4@PAC	5,5	0,210	0,9686
	7,4	0,190	0,9412

3.7.2. PAC'nin Polimer Konjuge MGO'dan *In Vitro* Salımı

MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin ilaç salım kabiliyeti, polimer konjugasyonun salım performansı üzerindeki etkisini değerlendirmek için araştırılmıştır. Ayrıca, nano taşıyıcıların farklı pH ortamlardaki salım özelliklerini incelemek için, pH 5,5 ve 7,4 içinde yapıldı. Şekil 5.58'de, 5,5 ve 7,4 pH ortamındaki MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin PAC salım değerleri sunulmuştur. Salım profilinden görülebileceği gibi, polimer konjuge nano taşıyıcıların salım performansında bir miktar artma gözlenmiştir. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS nano taşıyıcılar pH 7,4'de PAC salım sonuçları (Şekil 5.58a) sırasıyla, $17,89 \pm 1,0$, $22,55 \pm 2,0$, $19,15 \pm 1,4$, ve $26,88 \pm 2,0$ olarak hesaplanmıştır. Polimer konjugasyonu etkisiyle gelen salım farkları istatiksel olarak incelenmiş ve elde edilen hesaplama sonucunda anlamlı ($P < 0,05$) olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, MGO@CLS en iyi salım yapan taşıyıcıyı olarak bulunmuştur.

Diğer taraftan, MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin 5,5 pH'daki salım yüzdeleri (Şekil 5.58b), sırasıyla $23,72 \pm 1,8$, $30,65 \pm 2,1$, $37,23 \pm 1,2$ ve $40,66 \pm 1,8$ olarak bulunmuştur. Alınan sonuçlara göre, pH 5,5 salım ortamında, tüm nano taşıyıcıların salım performansı istatiksel olarak anlamlı bir artış ile pH'ya duyarlı özellik göstermişlerdir. Hazırlanan MGO ve polimer konjuge MGO nano-yapıların pH'ya duyarlı ilaç salımında, nano-yapıları ve PAC arasında hidrojen bağ etkileşimlerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Asidik ortamda, PAC'nın salım hızının artması, asidik ortamda MGO fonksiyonel grupların protonlanması ve bunun sonucunda

ilaç ve taşıyıcı arasındaki hidrojen bağının kısmen ayrışması olabilir. Ayrıca, nötr ve bazik koşullarda nanotaşıyıcı ve ilaç arasında nispeten daha güçlü hidrojen bağlanma etkileşimi PAC salımının azalmasına neden olabilir [204,279].



Şekil 3. 58. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL and MGO@CLS'nin PAC salımı (a) 7,4 pH'da, (b) 5,5 pH'da. Veriler, ortalama $\pm$ SS, $n = 3$ ve $P < 0,05$ olarak ifade edildi.

Diğer taraftan, polimer konjuge MGO'larından ilaç salma mekanizması Korsmeyer-Peppas modeli ile değerlendirilmiştir. pH 5,5 ve 7,4'te MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC ve MGO@CLS-PAC'nin Korsmeyer-Peppas modele göre hesaplanan n değerleri Çizelge 3.5'te verilmiştir. Tüm nano taşıyıcılar hem pH 5,5 hem de 7,4'te 0,45'ten az n değeri göstererek PAC'nin salım mekanizması Fick difüzyonu olduğunu kanıtlanmıştır [200].

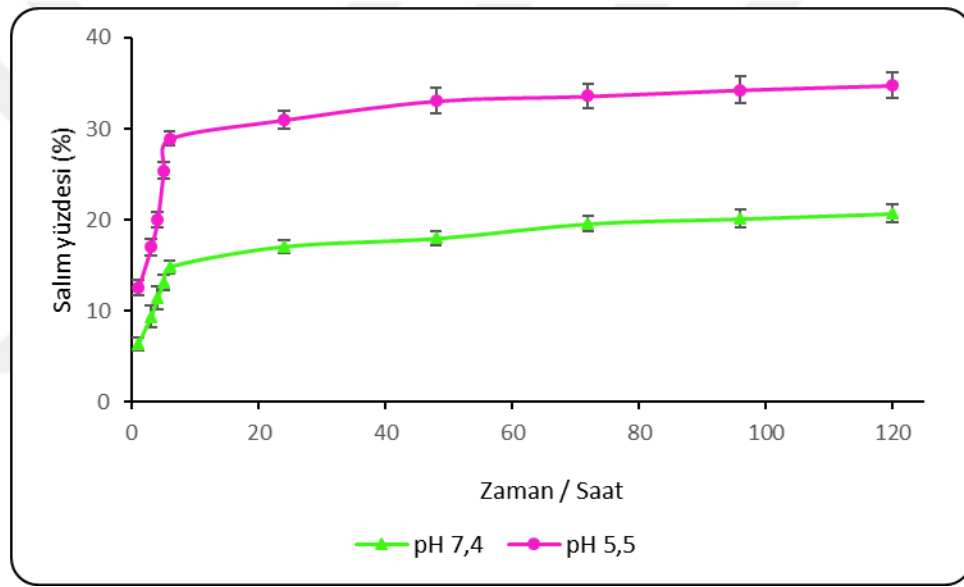
Çizelge 3. 5. Korsmeyer-Peppas modeli kullanılarak polimer konjuge MGO'ların PAC salım profilinden hesaplanan n degerleri.

Taşıyıcılar	Ortamın pH'sı	n değerleri	Regresyon (r)
MGO@PEC-PAC	5,5	0,237	0,9405
	7,4	0,187	0,9859
MGO@GEL-PAC	5,5	0,245	0,9440
	7,4	0,134	0,9762
MGO@CLS-PAC	5,5	0,196	0,9551
	7,4	0,192	0,9646

3.7.3. DOX'un *İn Vitro* Salımı

DOX'un *in vitro* salımını incelemek için DOX yüklü MGO (MGO@DOX) nano-yapıları pH 7,4 (PBS), ve pH 5,5 (asetik asit/asetat tampon) ortamında, 474 nm dalga boyun'daki UV absorbans spektrumu kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.59'da, pH 5,5

ve 7,4'deki MGO@DOX'un salım profili verilmiştir. DOX'un 5 gün içinde salınan miktarı pH 5,5 ve 7,4 ortamlarında sırasıyla % $34,78 \pm 1,4$ ve % $20,71 \pm 1,0$ olarak bulunmuştur. Bu sonuç, MGO'nun ilaç salımında kanser hücre tedavisi için önemli bir faktör olan pH'ya duyarlı olduğunu göstermektedir, aynı zamanda, literatürdeki benzer çalışmaların değerleri ile uyumlu sonuçlar bulunmuştur [174,281].



Şekil 3. 59. MGO@DOX'un pH 7,4 ve 5,5 ortamlarında salım profili. Veriler, ortalama $\pm$ SS, n = 3 ve P < 0,05 olarak ifade edildi.

MGO@DOX'un ilaç salım mekanizması değerlendirmek için Korsmeyer-Peppas modeli kullanılmıştır. Çizelge 3.6'da, pH 5,5 ve 7,4'te Korsmeyer-Peppas modele göre hesaplanan n değerleri verilmiştir. Elde edilen sonuca göre ($n < 0,45$) MGO@DOX'un ilaç salım mekanizması Fick difüzyonu olduğunu kanıtlanmıştır [200].

Çizelge 3. 6. Korsmeyer-Peppas modeli kullanılarak MGO@DOX salım profilinden hesaplanan n değerleri.

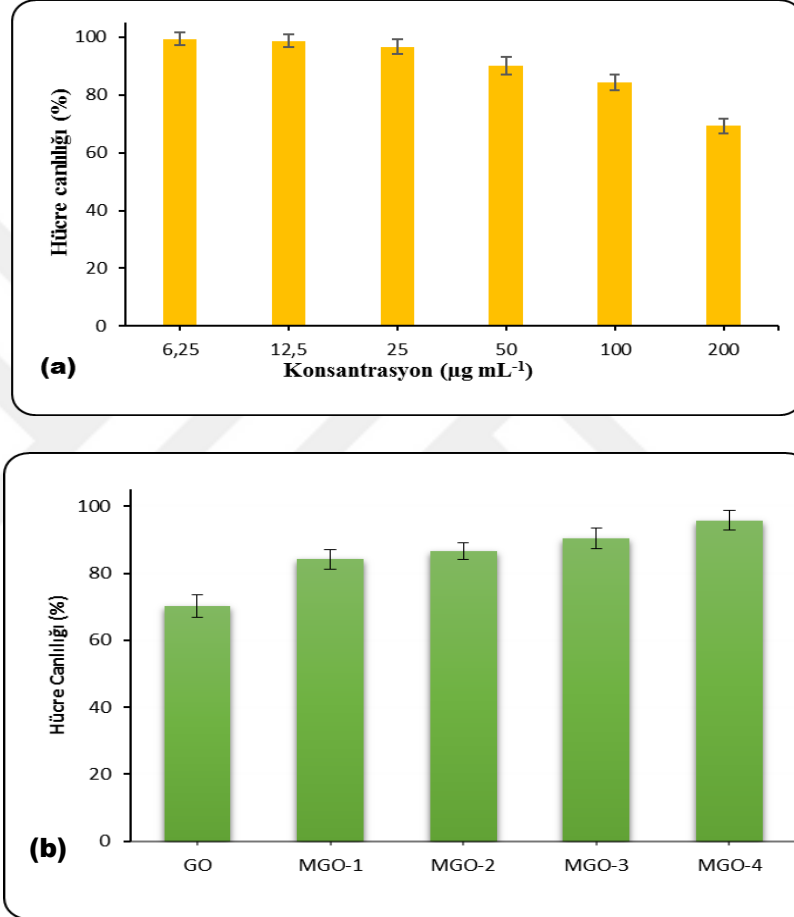
Taşıyıcı	Ortamın pH'sı	n değerleri	Regresyon (r)
MGO@DOX	5,5	0,190	0,9413
	7,4	0,201	0,9390

3.8. Hücre Kültür Çalışmaları

3.8.1. MGO'ların Biyoyumluluk

MGO nanomalzemenin biyoyumluluklarını değerlendirmek için *in vitro* sitotoksosite MTT deneyi ile, L929 fibroblast normal hücre kullanılarak incelenmiştir. MGO'nun biyoyumluluğuna Fe₃O₄ konsantrasyonlarının etkisini incelemek için, farklı Fe₃O₄ oranlı (MGO-1, MGO-2 MGO-3, ve MGO-4) örnekleri uygulanmıştır. Numuneler, 24 saat boyunca, altı farklı konsantrasyonda (200 µg mL⁻¹, 100 µg mL⁻¹, 50 µg mL⁻¹, 25 µg mL⁻¹, 12,5 µg mL⁻¹ ve 6,5 µg mL⁻¹) test edilmiştir. Şekil 3.60a'da gösterildiği gibi, nano- yapıların canlılıkları konsantrasyona bağlıdır. Numunenin konsantrasyonu arttıkça, biyoyumluluğu azalmıştır. Bu sonuçtan, hazırlanan MGO nanoparçacıkların 1-200 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında biyoyumlu olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, GO tabaka üzerine yüklenmiş Fe₃O₄ miktarının etkisi de incelenmiştir (Şekil 3.60b). Grafen oksit üzerine yüklenmiş Fe₃O₄ miktarı arttıkça nanoparçacığın biyoyumluluğu artmıştır. MGO-1, MGO-2, MGO-3 ve MGO-4'nün hücre canlılığı sırasıyla, % 84,16 ±

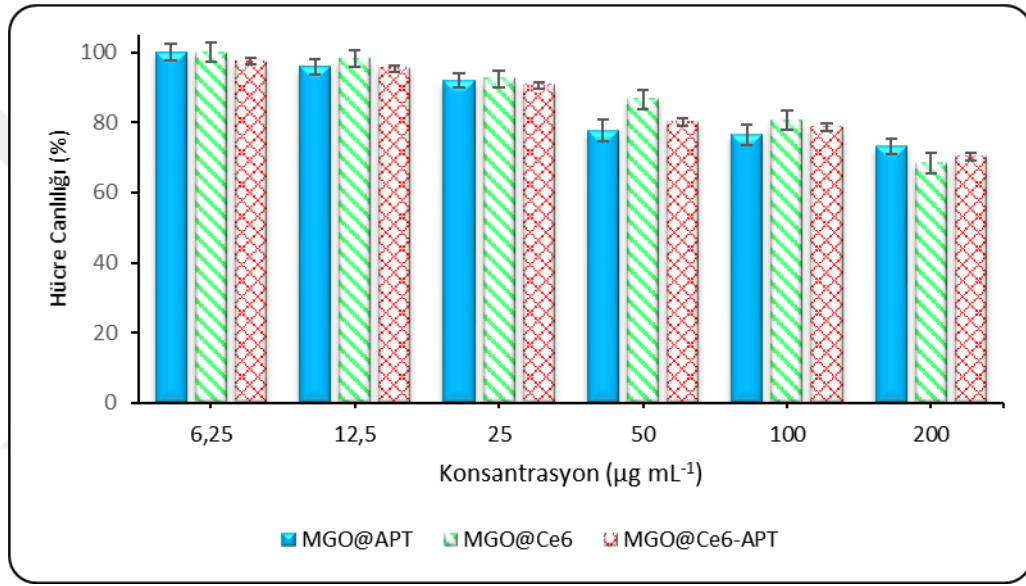
3,0, % $86,65 \pm 2,4$, % $90,45 \pm 3,0$ ve % $95,82 \pm 3,0$ olarak bulunmuştur. Yukarıdaki verilerden, MGO'ların GO'dan daha biyoyumlu olduğunu söylenebilir.



Şekil 3. 60. MGO'nun farklı konsantrasyonundaki hücre canlılığı (a), GO ve MGO'ların 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'deki hücre canlılığı (b)

Diğer yandan, PDT için fotosensitizör olarak uygulanan Ce6 ve MCF-7 kanser hücresinine hedefleyici olan APT ile kojuge edilen MGO'ların biyoyumlulukları aynı

metot kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 3.61’de MGO@Ce6 ve MGO@APT’nin L929 fibroblast hücresi ile muamele edildikten sonra bulunan hücre canlılığı verilmiştir. Şekilden görüleceği gibi nanomalzemelerinin hücre canlılığı verilen konsantrasyonda yüksek bulunmuştur ki bu sonuç da biyoyoumlu olduklarını göstermiştir.

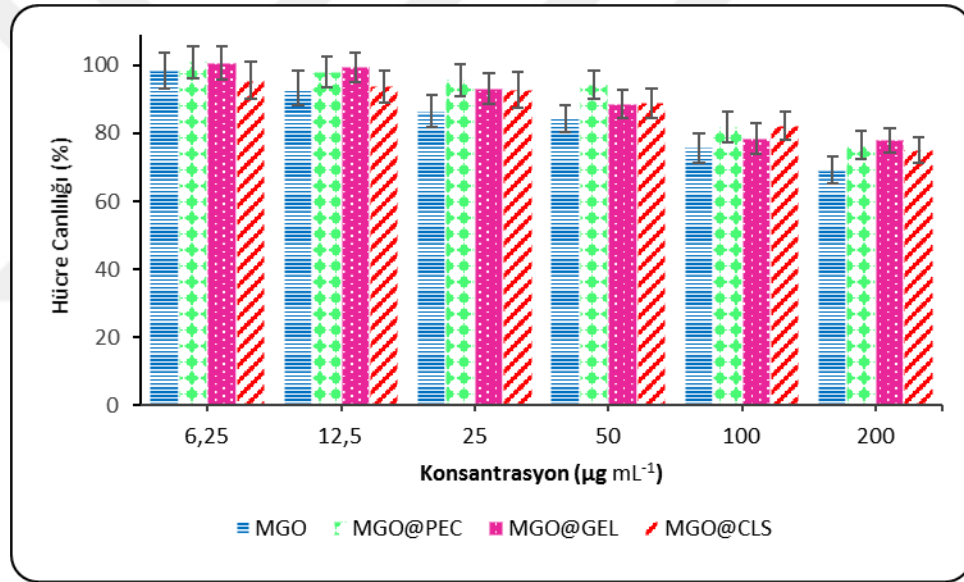


Şekil 3. 61. MGO@APT, MGO@Ce6 ve MGO@Ce6-APT’nin farklı konsantrasyonda hücre canlılığı

3.8.2. Polimer Yüklü MGO’ların Biyoyoumluluk

MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS nanomalzemelerinin biyoyoumluluklarını değerlendirmek için, *in vitro* sitotoksosite MTT deneyi ile, L929 fibroblast normal hücre kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.62’de görüldüğü gibi, nano-yapıların biyoyoumluluğu

polimer konjugasyonu ile artmıştır. Ayrıca, canlılıkların yüzdesi konsantrasyona bağlıdır. Numunenin konsantrasyonu arttıkça, biyoyumluluğu azalmıştır. Düşük konsantrasyonda (12,5 ve 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), hemen hemen tüm hücreler canlıdır. Ancak, yüksek konsantrasyonda (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) hücre inhibisyonu bir miktar gözlenmektedir. Bu sonuçtan, hazırlanan polimer konjuge MGO nano-yapıların biyoyumlu olduğu sonucuna varılabilir [117].

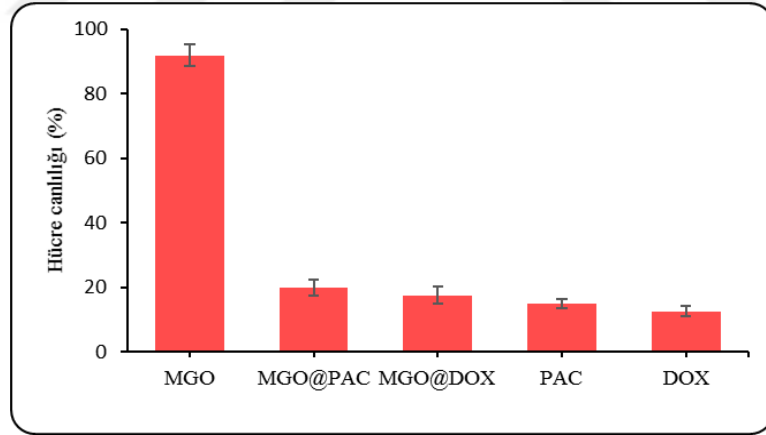


Şekil 3. 62. MGO, MGO@PEC, MGO@GEL ve MGO@CLS'nin hücre canlılığı

3.8.3. Nano-yapıların Antikanser Aktivitesi

İlaç yüklü MGO'nun ve serbest ilaçların MCF-7 kanser hücresi üzerinde sitotoksitesini incelemek için MTT analizi kullanılmıştır. MCF-7 hücresi, 72 saat boyunca 3,125 ile

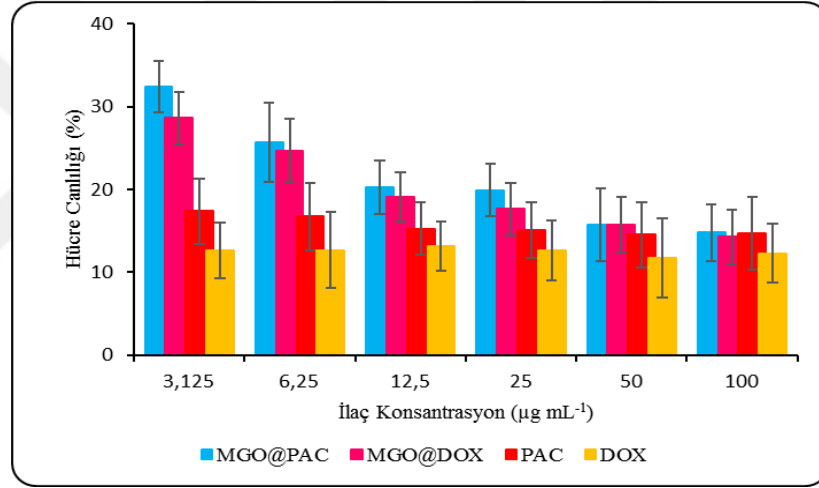
100 ng mL⁻¹ konsantrasyon aralığında örnekler ile inkübe edildikten sonra hücre canlılıkları okunmuştur. Şekil 3.63'te MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un, 25 ng mL⁻¹ ilaç konsantrasyonda, hücre canlılığı eğrisi verilmiştir. Şekilden görülebileceği gibi, hücre canlılığı yüzdesi MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX için sırasıyla % 92,0 ± 3,23, % 19,92 ± 2,43, % 17,63 ± 2,54, % 15,11 ± 1,42 ve % 12,62 ± 1,57 olarak bulunmuştur. Kullanılan ilaç miktarı çok az olmasına rağmen ilaçların ikisi de hücre büyümesini aşırı derecede inhibe etmiştir. Ayrıca, ilaç yüklü MGO'lar (MGO@PAC ve MGO@DOX) hücrelerin % 80'den fazla öldürerek etkisini göstermiştir. Diğer yandan, ilaçsız olan MGO beklendiği gibi kanser hücrelerini etkilememiştir.



Şekil 3. 63. MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un hücre canlılığı (25 ng mL⁻¹ de).

Ayrıca, Şekil 3.64'te MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un hücre canlılığının konsantrasyona karşı etkileri gösterilmiştir. MGO@DOX ve MGO@PAC

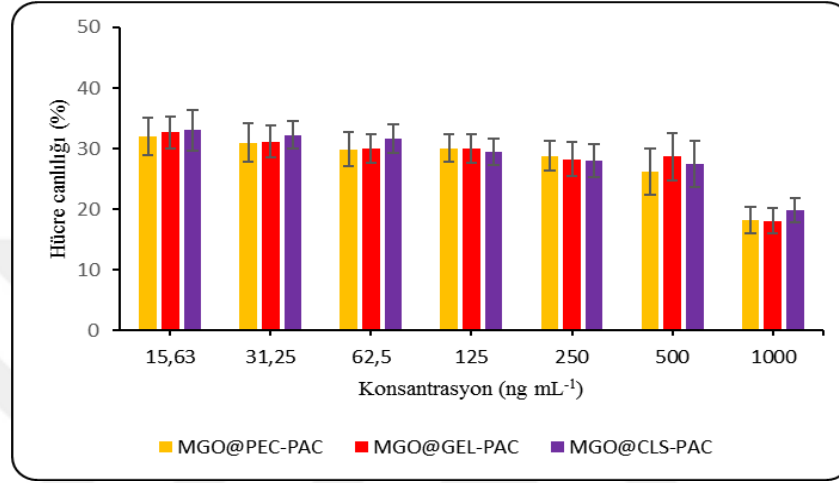
konsantrasyona karşı önemli değişimler göstermiştir. Yüklenen ilaç konsantrasyonu artıkça önemli ölçüde hücre canlılığı azalmıştır. Ancak, serbest PAC ve DOX kullanılan deneylerde çalışılan konsantrasyon aralığında hücre canlılığında fazla değişim görülmemektedir. Hemen hemen tüm konsantrasyonlar hücrelerin % 80'den fazlasını öldürmüştür. Bu sonuca göre, ilaçların çok etkili olduğu ve hücre büyümesini inhibe etmek için düşük ilaç miktarlarının yeterli olduğu söylenilebilir.



Şekil 3. 64. MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un farklı ilaç konsantrasyonunda hücre canlılığı

Diğer yandan, ilaç yüklü polimer konjuge MGO'ların MCF-7 kanser hücresine karşı etkisi MTT deneyi ile araştırılmıştır. Şekil 3.65'te, MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC ve MGO@CLS-PAC'nin hücre canlılığı eğrisi verilmiştir. Yukarıdakine benzer

şekilde ilaç yüklü polimerli nanomalzemeler önemli ölçüde MCF-7 kanser hücrelerini öldürmüştür.



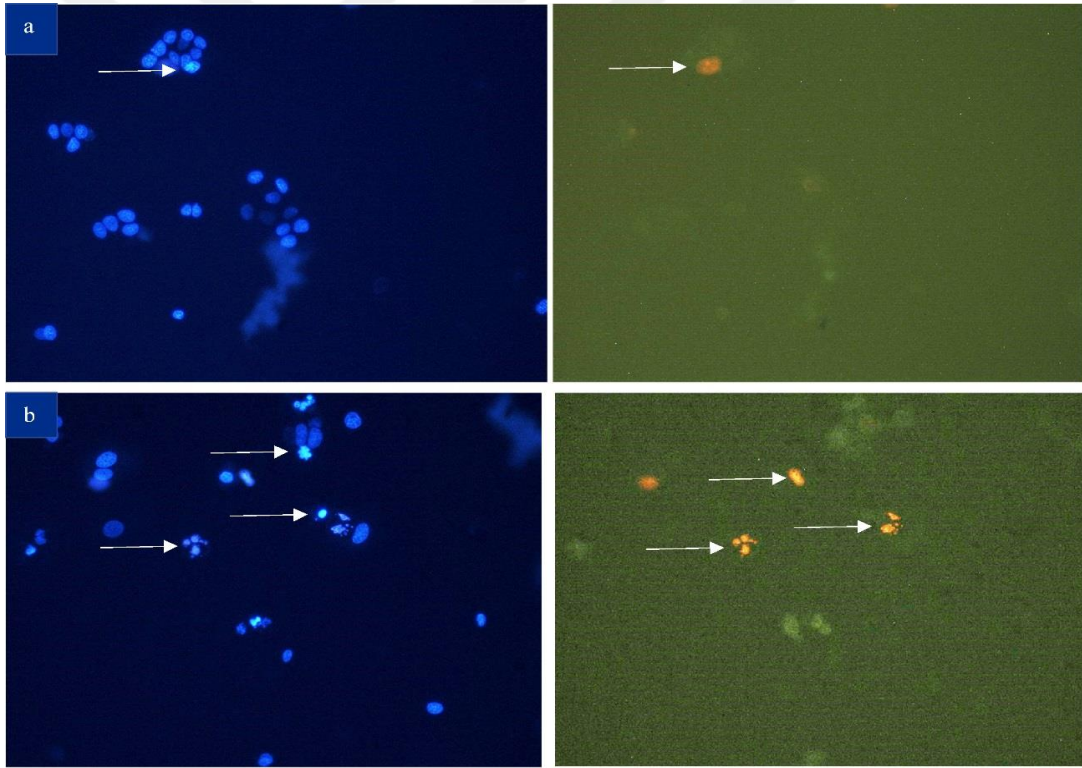
Şekil 3. 65. MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC ve MGO@CLS-PAC'nin farklı ilaç konsantrasyonundaki hücre canlılığı

3.8.4. Apoptoz ve Nekroz Analizi

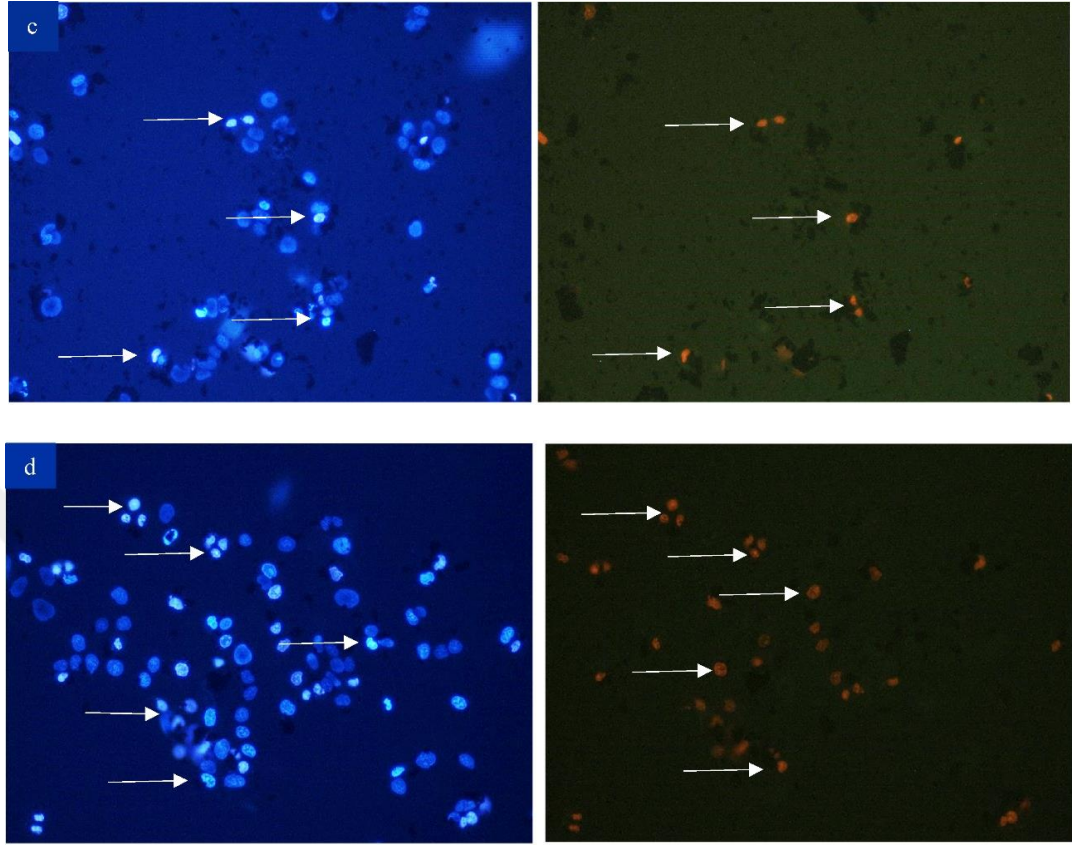
Hücrelerin ölümü apoptoz ve nekroz olarak iki türdür. Apoptoz, normal fizyolojik koşullar altında gerçekleşen hücre ölümüdür. Aynı zamanda, programlı ve "istenen" hücre ölümü olarak da bilinmektedir. Nekroz ise, hücre bileşenlerinin düzensiz sindirimiyle sonuçlanan enfeksiyon, toksinler veya travma gibi dış faktörlerden kaynaklanan "istenmeyen" hücre ölümüdür [282]. Kısaca, apoptozlar, hücrenin doğal olarak (dış etkilerinden kaynaklanmayan) ölenlerin sayısını gösterirken nekrozlar ise, ilaç gibi dış faktörlerin öldürme etkisini göstermektedir. Apoptotik ve nekrotik endeksler

çift boyama yöntemi kullanılarak L929 fibroblast ve MCF-7 hücreleri üzerinde çeşitli örnek konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Şekil 3.66'da farklı konsantrasyonda çekilen L929 hücrenin apoptik ve nekrotik görüntüleri sunulmuştur. Alınan verilere göre nekrotik hücre yüzdesinin artan MGO'nun konsantrasyonu ile arttığı görülmüştür. Bununla birlikte, tüm konsantrasyonlarda apoptik hücrelerin miktarı yüksektir.



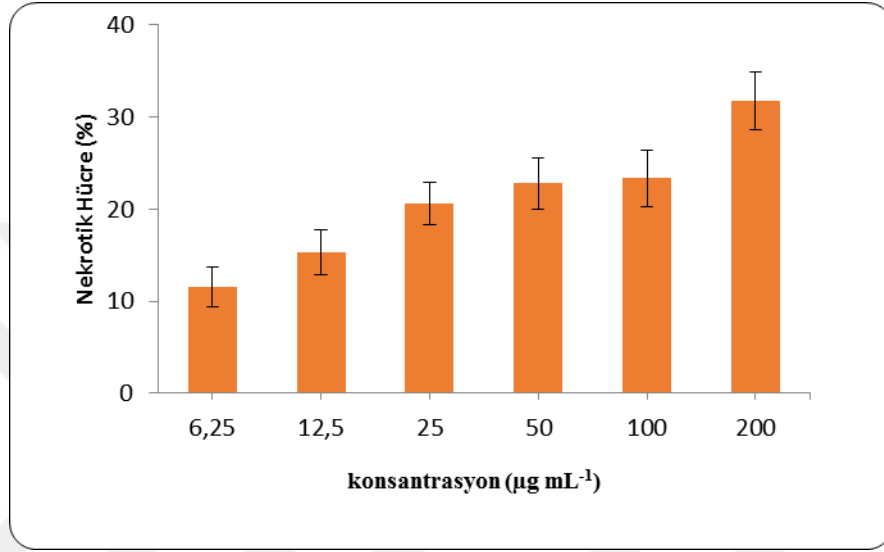
Şekil 3. 66. Farklı MGO konsantrasyonu ile inkübe edilen L929 normal hücresi floresan mikroskopi görüntüleri: (A) kontrol, (b) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve (d) 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Şekil 3.66. (devamı) Farklı MGO konsantrasyonu ile inkübe edilen L929 normal hücresi floresan mikroskopi görüntüleri: (A) kontrol, (b) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (c) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve (d) 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Oklar apoptik ve nekrotik hücreleri göstermektedir.

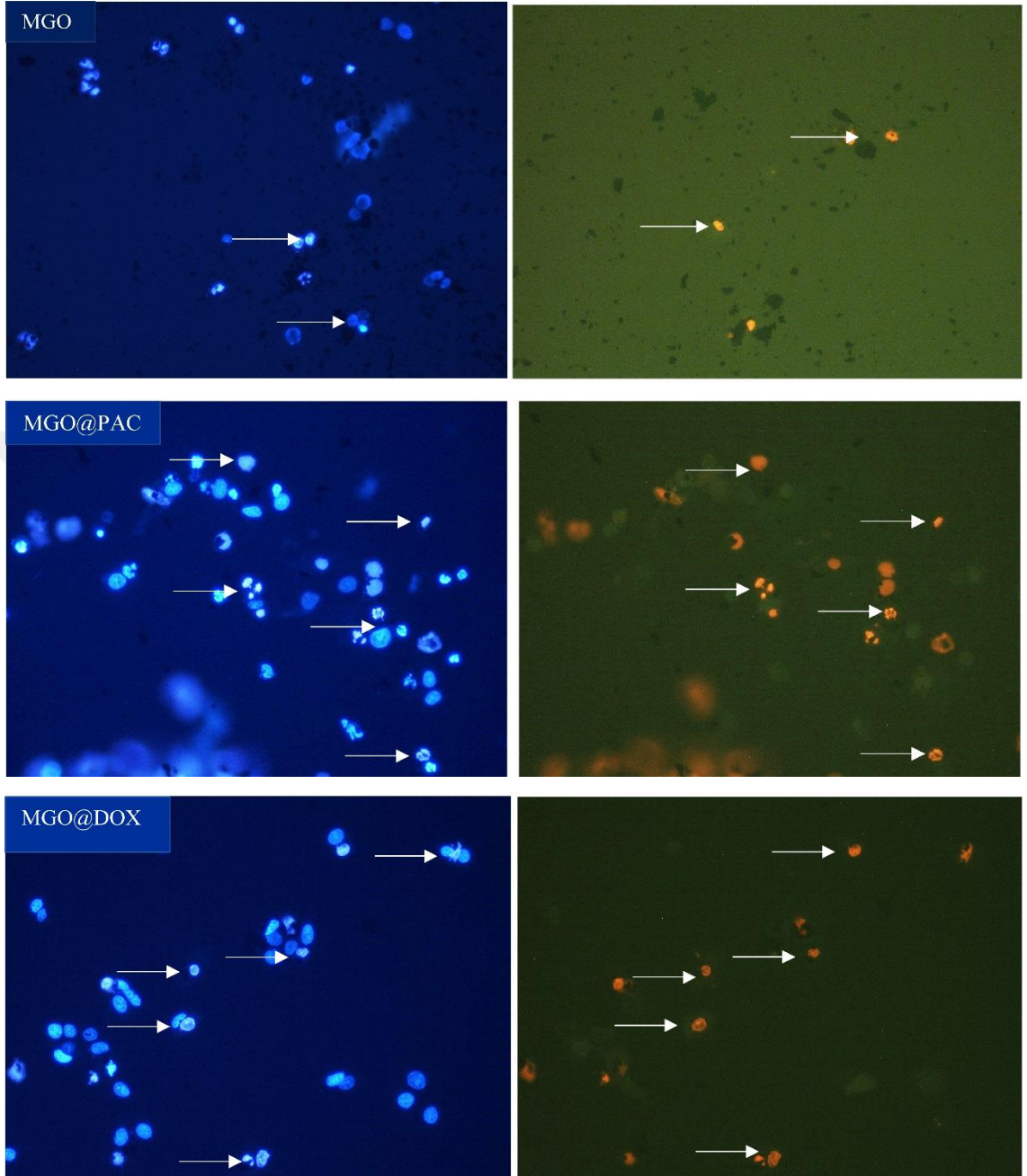
Ayrıca, farklı konsantrasyonda L929 fibroblast normal hücresi ile inkübe edilen MGO'nun görüntülerinden nekrotik hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. Şekil 3.67'de gösterildiği gibi, MGO'nun nekrotik yüzdesi 6,25, 12,5 25, 50, 100, ve 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ numune konsantrasyonda % 11,54 $\pm$ 2,12, % 15,25 $\pm$ 2,43, % 20,67 $\pm$ 2,3, % 22,83 $\pm$ 2,8, % 23,33 $\pm$ 3,12 ve % 31,78 $\pm$ 3,16 olarak bulunmuştur. Sonuç, beklendiği gibi

nekrotik hücre yüzdesi MGO'nun konsantrasyonu ile artmıştır ve yukarıda (Şekil 3.60'ta) verilen MGO'nun hücre canlılığı ile tutarlıdır.

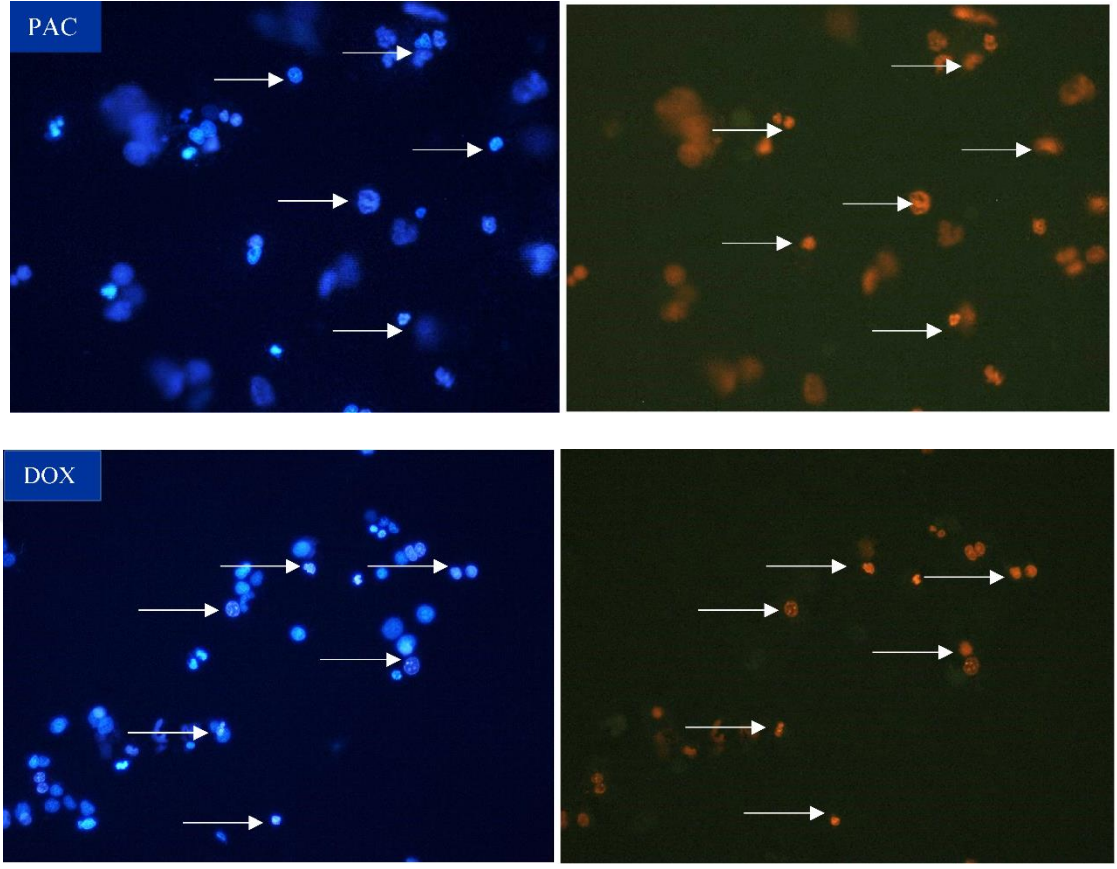


Şekil 3. 67. Farklı MGO konsantrasyonu ile inkübe edilen L929 fibroblast normal hücrenin nekrotik hücreleri

Başka bir çalışmada, MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un belli bir konsantrasyonda ($12,5 \text{ ng mL}^{-1}$) çekilen MCF-7 hücrenin apoptik ve nekrotik görüntüleri, Şekil 3.68'de sunulmuştur. Alınan verilere göre, MGO'nun nekroz oranı değerlere göre düşüktür. Bu da MGO'nun biyoyumluluğunu desteklemektedir. Genel olarak, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX örneklerin konsantrasyonu arttıkça nekrotik oranı artmıştır, ancak, apoptozunu düzenli bir şekilde etkilememiştir. Nekrozların konsantrasyona bağlı artması ilaç yüklü olan MGO'nun ve serbest ilaçların hücre büyümesini etkili olarak inhibe ettiklerini kanıtlamaktadır.



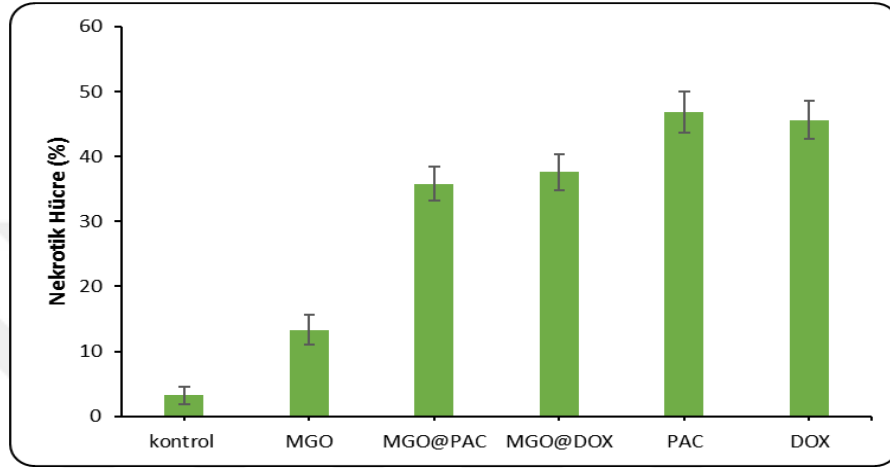
Şekil 3. 68. MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un $12,5 \text{ ng mL}^{-1}$ konsantrasyonda çekilen MCF-7 hücrenin apoptik ve nekrotik görüntüleri. Oklar nekroz hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.68. (devamı) MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un $12,5 \text{ ng mL}^{-1}$ konsantrasyonda çekilen MCF-7 hücrenin apoptik ve nekrotik görüntüleri. Oklar nekroz hücreleri göstermektedir.

Ayrıca, MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un farklı konsantrasyonda nekrotik hücre yüzdelerini hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.69'da verilmiştir. MGO, MGO@PAC, MGO@DOX, PAC ve DOX'un nekrotik hücre oranları sırasıyla $\% 23,33 \pm 2,34$, $\% 35,75 \pm 2,61$, $\% 37,57 \pm 2,76$, $\% 46,83 \pm 3,13$ ve $\% 45,64 \pm 2,96$ bulunmuştur. Bu sonuç, ilacın etkisinden dolayı daha fazla hücrelerin öldüğünü ifade

etmektedir. Benzer şekilde, yukarıda, *in vitro* sitotoksosite bölümünde verilen sonucu desteklemektedir.

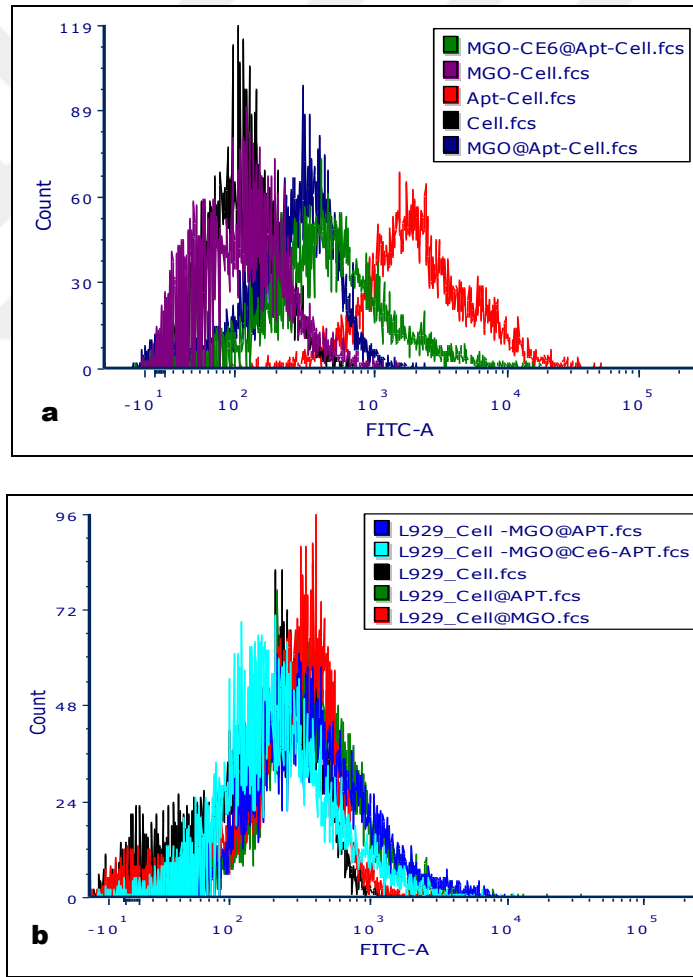


Şekil 3. 69. MGO, MGO@PAC, MGO@PAC, DOX ve PAC (100 ng mL⁻¹) ile inkübe edilen MCF-7 kanser hücrenin nekrotik hücreleri oranı

3.9. Akış Sitometri Analizi

Akış sitometri analizi, FITC etiketli APT'nin MCF-7 kanser hücrelerine spesifik olarak bağlanıp bağlamadığını incelemek için yapılmıştır. Negatif kontrol olarak L929 normal hücre kullanılmıştır. Akış sitometri profilleri Şekil 3.70'de sunulmuştur. Akış sitometri profilinden görülebileceği gibi, MCF-7 ile muamele edilen MGO için herhangi bir kayma gözlenmezken APT, MGO@APT ve MGO@Ce6-APT, için kaymalar görülmüştür (Şekil 3.70a). Bu kaymalar nanoparçacıkların hücreyle etkileşime oranı göstermektedir. Burada, MGO@APT, MGO@Ce6-APT ve APT sırasıyla % 30,0, %

55,2 ve % 91,1'i MCF-7 hücreleriyle bağlanmıştır. Diğer taraftan, L929 normal fibroblast hücresi ile muamele edildiğinde, tüm nano taşıyıcılar için hiç bir kayma gözlenmemiştir (Şekil 3.70b). Elde edilen sonuç, aptamer ve aptamer konjuge nano taşıyıcılar MCF-7 kanser hücreleri ile spesifik bağlanma kabiliyetini göstermiştir [153,256,283]. Bu da sentezlenen nanomalzemenin hedefli ilaç dağıtım sistemleri için umut verici bir nano taşıyıcısı olacağını kanıtlamaktadır.

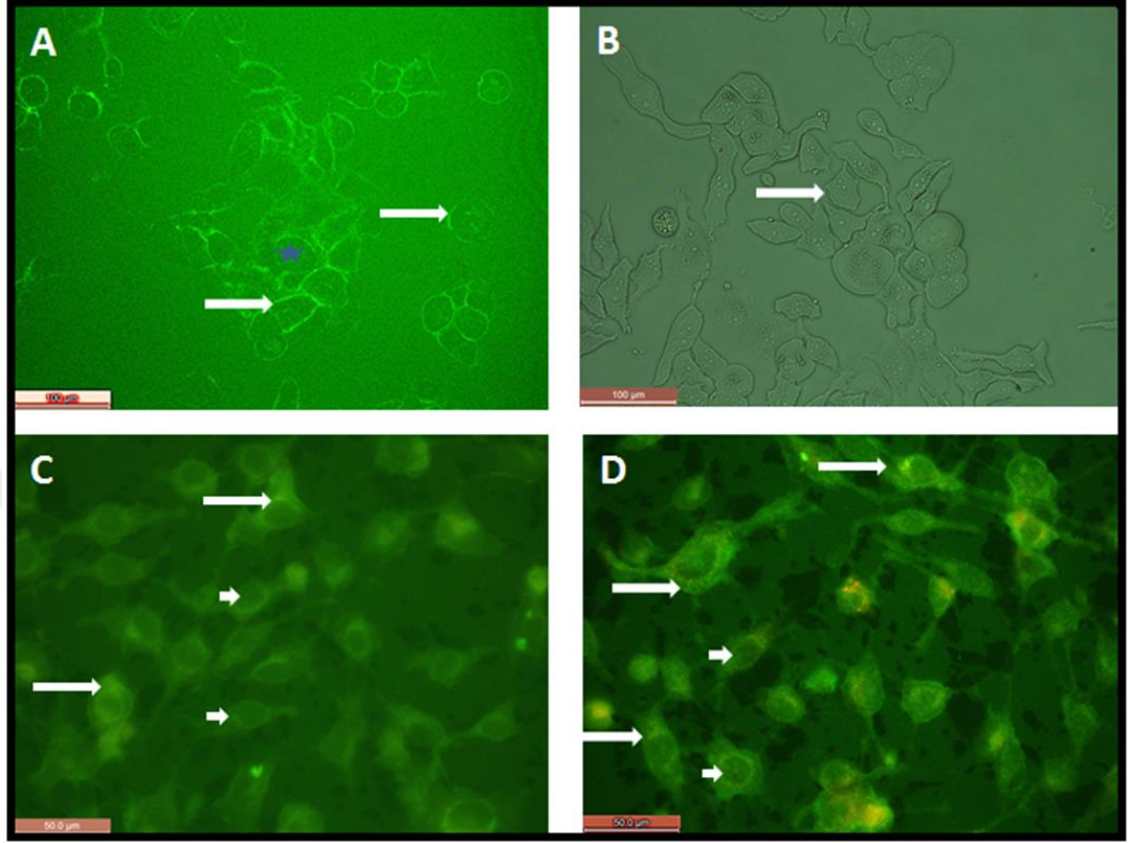


Şekil 3. 70. MGO, MGO@APT, MGO@Ce6-APT, APT'in MCF-7 (a) ve L929 (b)

hücreleri ile etkileşimi gösteren Akış sitometri profili

3.10. Floresan Mikroskop Analizi

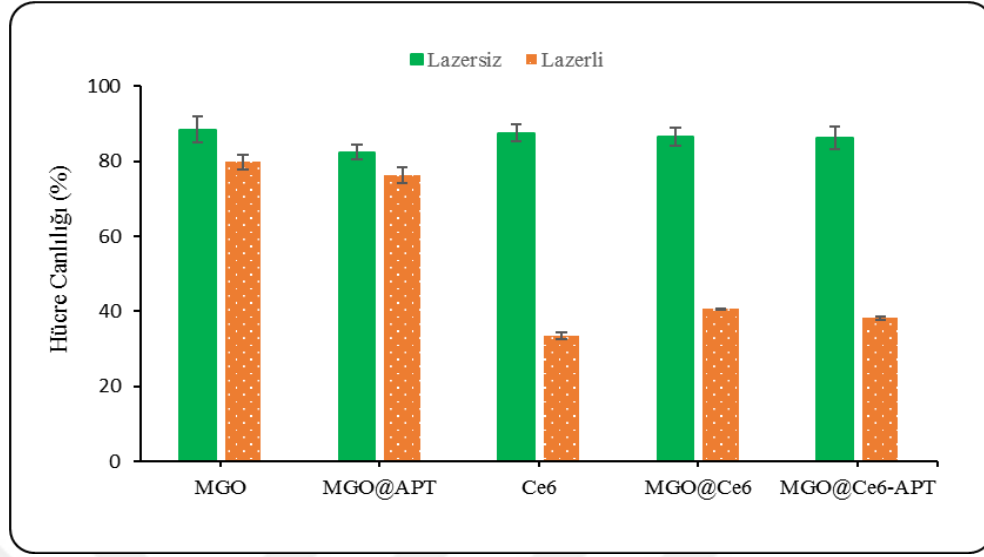
APT'nin MCF-7 kanser hücrelerine spesifik olarak hedeflenmesini desteklemek ve nanotaşıyıcıların hücre alımını araştırmak için MCF-7 kanser hücreleri ile muamele edilmiş APT, MGO@APT ve MGO@Ce6-APT'nin floresans görüntüsü incelenmiştir. Şekil 3.71'de, APT, MGO@APT ve MGO@Ce6-APT ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin görüntüleri sunulmuştur. MCF-7 kanser hücrelerinin floresan görüntüsünde (Şekil 3.71B), hücrenin floresan emisyonunun yokluğundan dolayı sinyalleri görülmemiştir [160]. APT ile muamele edilen hücrenin görüntüsü (Şekil 3.71 A), hücre zarının kenarlarında floresans sinyalleri (parlak yeşil renk) göstermiştir ve bu da APT'nin hücrelerin yüzeyine bağlandığını kanıtlamaktadır [153]. MGO@APT ve MGO@Ce6-APT ile muamele edilen MCF-7 hücre görüntülerinde (Şekil 3.71C ve D) ise sinyaller çekirdeğin etrafında görülmüştür. Bu görüntü, APT'nin MCF-7 hücresi ile spesifik etkileşim nedeniyle nanotaşıyıcılarının zar içerisine sitoplazmaya alımını desteklemektedir [154,167]. Bu sonuçlar, APT, MGO@APT ve MGO@Ce6-APT nanotaşıyıcılarının MCF-7 kanser hücrelerini spesifik olarak hedefleyebildiğini doğrulamaktadır. Ayrıca, yukarıda tartışılan akış sitometrisinin sonucuyla tutarlıdır.



Şekil 3. 71. Nanopartikül ile etkileştirilmiş MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskop fotoğrafları. A) Sadece APT ile etkileştirilmiş hücreler, ok hücrelerin membran zarına bağlanmış floresan işaretli APT'leri gösterir, yıldız; hücre sitoplazmasını göstermektedir. B) MCF-7 hücrelerinin normal ışık fotoğrafları, ok bir hücreyi göstermektedir. C) MGO@APT, ok; hücre sitoplazması içerisinde floresan aptemer takılı partiküllerin floresan görüntüsü, kısa ok; hücre çekirdeğini göstermektedir. D) MGO@APT-Ce6'nın hücre sitoplazmasındaki görüntüsü, kısa ok hücre çekirdeğini göstermektedir.

3.11. Fototermal Tedavi Analizi

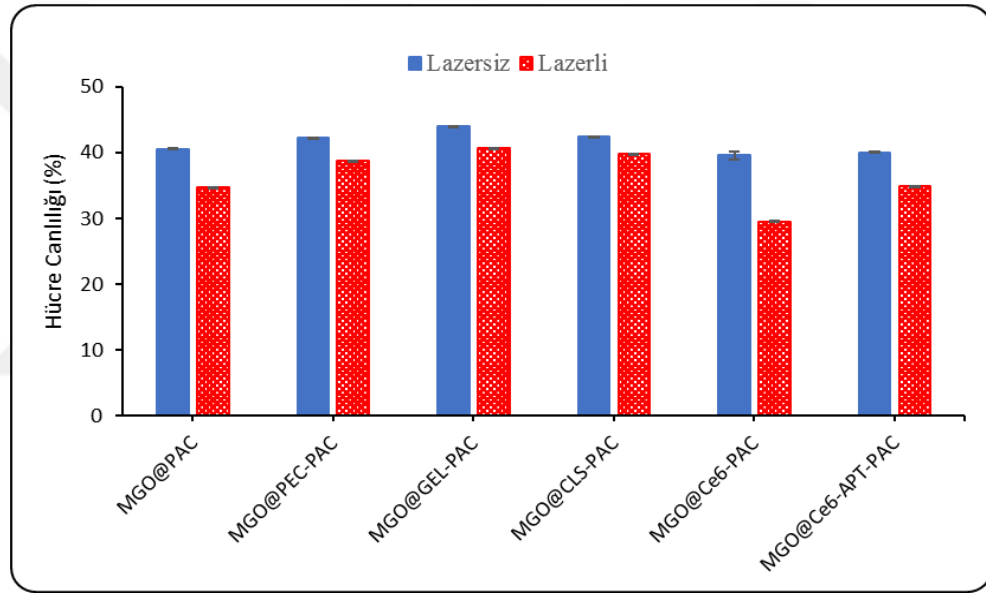
Nanoparçacıkların PTT için kullanabilirliğini değerlendirmek için NIR lazer ışınları (808 nm, 1W / 0,32 cm²) ile kanser hücrelerini öldürme etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada MTT testi ile MCF-7 kanser hücrelerini kullanılarak yapılmıştır. Karşılaştırma amacıyla, lazerli ve lazersiz olarak üç konsantrasyonda test edilmiştir. Şekil 3.72’de MGO, MGO@APT, MGO@Ce6, MGO@Ce6-APT ve Ce6 nanoparçacıkların 50 µg mL⁻¹’deki hücre canlılığı verilmiştir. Şekilden görüleceği gibi Ce6, MGO@Ce6 ve MGO@Ce6-APT için lazer kullanmadan ~ % 13, ~ % 14 ve ~ % 14 kanser hücreleri öldürürken lazer NIR ışınma ile ~ % 67, ~ % 60 ve ~ % 62 öldürmüştür. NIR lazerin etkisi Ce6, MGO@Ce6 ve MGO@Ce6-APT gibi Ce6 konjuge nanoparçacıklar’da önemli ölçüde görülmüştür [167,173]. Ancak, MGO ve MGO@APT için lazer ışınmanın etkisi azdır. Örneğin, MGO’nun lazerli ve lazersiz sonuçları karşılaştırıldığında, lazer ışınması ile sadece % 8 kanser hücre öldürme etkisi artmıştır.



Şekil 3. 72. MGO, MGO@APT, MGO@Ce6, MGO@Ce6-APT ve Ce6 nanoparçacıkların lazerli ve lazersiz MCF-7 hücre canlılığı (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'de)

Öte yandan, PTT ve Kemoterapinin sinerjik etkisini araştırmak için, ilaç yüklü nanopartiküller MTT testi ile lazersiz / lazerli olarak değerlendirildi. Yukarıdaki testte olduğu gibi ilacın ve lazerin hücre öldürme verimi incelemek için MCF-7 kanser hücresi kullanıldı. Şekil 3.73'te, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MGO@PAC, MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC, MGO@CLS-PAC, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-APT-PAC ve PAC ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin canlılığı lazerli ve lazersiz olarak verilmiştir. Şekilde görülebileceği gibi, ilaç yüklü nanotaşıyıcılarla muamele edilen MCF-7 tümör hücreleri önemli hücre ölümüyle ($\geq \% 60$) sonuçlanırken, lazerle ışınlığında daha fazla hücre ölümü gözlenmiştir [168]. Örneğin, lazerle ışınlamadan önce MGO@PAC ve MGO@PEC-PAC'nin hücre canlılığı 40,5 ve 42,3 iken, lazer ışınlaması nedeniyle

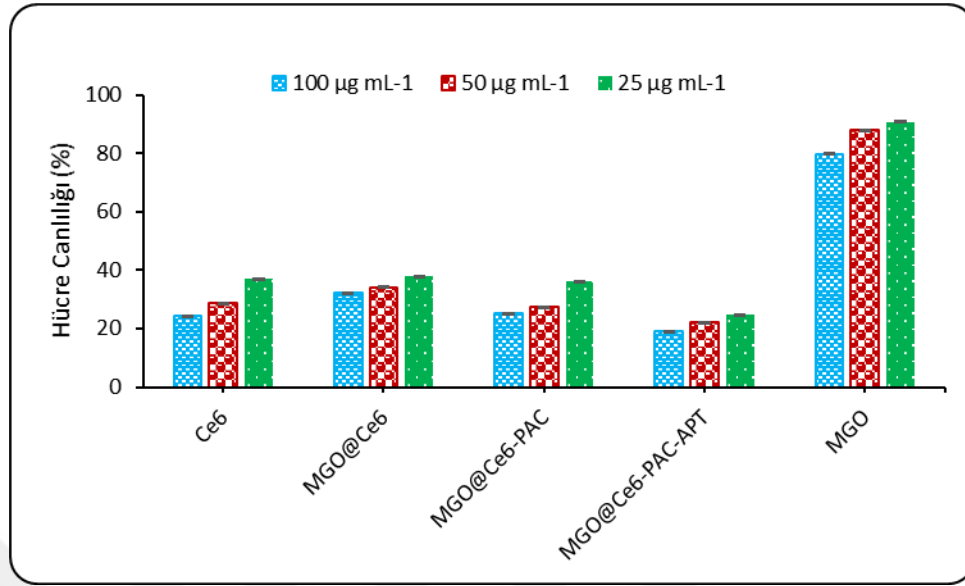
34,7 ve 38,7'ye düşmüştür. Ancak, Ce6'ya konjuge nano taşıyıcılar lazer ışınlamasında daha fazla kanser hücrelerini öldürdüğü görülmüştür. Bu sonuçtan Ce6'nın NIR ışınlamasına MGO'ya göre daha duyarlı olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, birleştirilmiş kemo-PTT yöntemi bu iki yöntemden (Kemoterapi ve PTT) daha etkili bulunmuştur.



Şekil 3. 73. MGO@PAC, MGO@PEC-PAC, MGO@GEL-PAC, MGO@CLS-PAC, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-APT-PAC 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'deki MCF-7 hücre canlılığı

3.12. Fotodinamik Tedavi Analizi

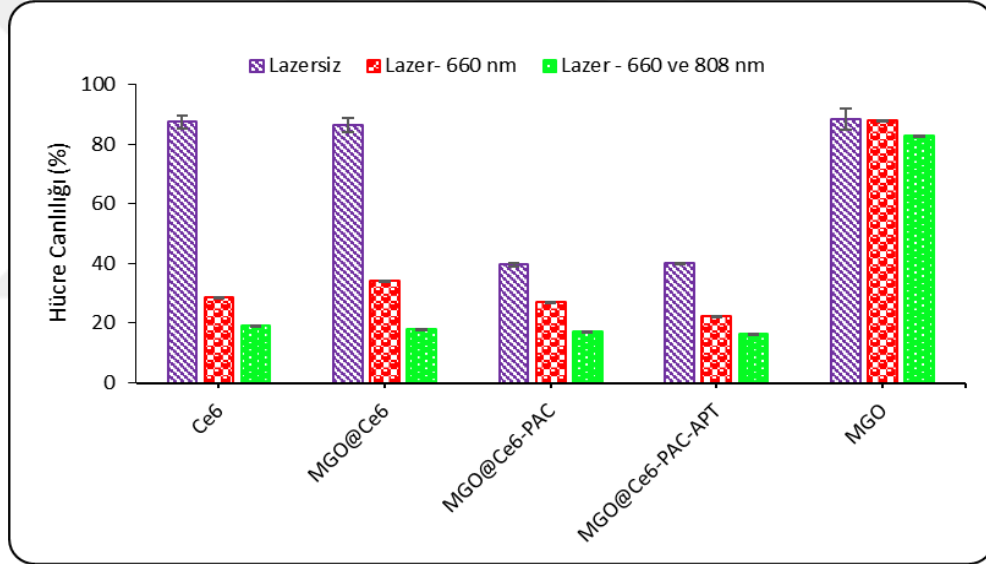
Fotodinamik terapi, lazer radyasyonu ile uyarılan fotosensitizör tarafından üretilen yüksek derecede toksik singlet oksijen ile tümör hücrelerini öldürerek tedavi etme yöntemidir [163]. Nanoparçacıkların, PDT yöntemi ile Ce6 fotosensitizör kullanılarak MCF-7 kanser hücrelerini öldürme etkileri incelenmiştir. Kontrol olarak MGO kullanılmıştır. Şekil 3.74'te, 3 dakika boyunca 660 nm'lik lazer ile vurulduktan sonraki Ce6, MGO@Ce6, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-PAC-APT ve MGO ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin hücre canlılıkları sunulmuştur. Şekilden görülebileceği gibi, MGO'nun hücre canlılığı, tüm konsantrasyonlarda % 80'den yüksektir. Bu sonuç, vurulan 660 nm'lik lazer radyasyonuna karşı MGO'nun duyarsızlığı nedeniyle, lazer radyasyonundan etkilenmediği ve singlet oksijen üretiminin olmadığını gösterir. Bununla birlikte, Ce6 ve Ce6 konjuge nanotaşıyıcılar (Ce6, MGO@Ce6, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-PAC-APT) lazer radyasyonu nedeniyle önemli derecede hücre öldürme etkileri göstermiştir. Hücre canlılıklarının, tüm konsantrasyonlarda % 35'ten daha az olduğu bulunmuştur. Örneğin, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda Ce6, MGO@Ce6, MGO@Ce6-PAC ve MGO@Ce6-PAC-APT'nin hücre canlılığı sırasıyla % 24,23, % 32,24, % 25,28 ve % 19,04 olarak bulunmuştur. Sonuç, lazer ışınlamasıyla Ce6'dan yeterli miktarda singlet oksijen üretildiğini ve önemli derecede kanser hücrelerini öldürüldüğünü göstermiştir. Ayrıca, nanotaşıyıcıların konsantrasyonları arttıkça öldürme etkisi de artmıştır, ancak gözlenen fark dikkat çekici değildir. Bu da, düşük Ce6 konsantrasyonunun bile kanser hücrelerini öldürmekte gerekli olan singlet oksijenleri üretmek için yeterli olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 74. Ce6, MGO@Ce6, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-PAC-APT ve MGO ile inkübe edilen MCF-7 hücresinin 3 dakika boyunca 660 nm’lik lazer ile vurulduktan sonraki hücre canlılıkları.

Diğer taraftan, hem PTT, hem de PDT için nanotaşıyıcıların etkinliğini değerlendirmek amacıyla MCF-7 kanser hücrelerinin hücre canlılığı, 660 ve 808 nm’ye maruz bırakılarak incelenmiştir. Ayrıca, kanser hücrelerini öldürmede tüm etkileri analiz etmek için ilaç yüklü nanotaşıyıcılar da dahil edilmiştir. Lazersiz deneyde; ilaçsız nano-yapılar (Ce6, MGO@Ce6 ve MGO) için yüksek hücre canlılığı bulunmuştur. Ancak, MGO@Ce6-PAC ve MGO@Ce6-PAC-APT’ler, yüklü ilaca bağlı olarak kanser hücrelerini öldürme etkileri göstermiştir. Lazerli çalışmada; Ce6 yüklü nanotaşıyıcılar radyasyonla Ce6’dan singlet oksijen üretimi nedeniyle kanser hücrelerini öldürme kabiliyeti göstermiştir. Bununla birlikte, 660 ve 808 nm lazerlerin birlikte

kullanılmasıyla kanser hücrelerini öldürme etkisi artmıştır. Örneğin, MGO@Ce6-PAC'nin hücre canlılığı lazersiz, 660 nm ve 660&808 nm'deki lazer vurulduğunda, sırasıyla % 39,59, % 27,25, % 17,20 bulunmuştur. Sonuçlardan, hem PDT/PTT hem de ilaç kullanıldığında tedavi veriminin çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, hazırlanan ilaç yüklü Ce6 konjuge nanotaşıyıcıların PTT/PDT ve ilaç dağıtım sistemleri için çok amaçlı ajan olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.



Şekil 3.75 Ce6, MGO@Ce6, MGO@Ce6-PAC, MGO@Ce6-PAC-APT ve MGO ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin lazersiz ve 3 dakika boyunca 660 nm ve 660 & 808 nm'lik lazer ile vurulduktan sonraki 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hücre canlılıkları.

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- ❖ Fe_3O_4 manyetik parçacıkları termal parçalanma yöntemi ile hazırlanmış ve kimyasal yapısı XRD, FTIR, TEM, RAMAN, Zetasizer, TGA/DSC ve VSM ile aydınlatılmıştır.
- ❖ GO'nun yüzeyi üzerinde Fe_3O_4 parçacıkları yüklenerek farklı manyetik özelliği taşıyan dört çeşit MGO nanomalzemeleri sentezlenmiş ve UV, FTIR, XRD, TEM, SEM, RAMAN, ICP-OES, Zetasizer, AFM, VSM ve TGA/DSC ile karakterize edilmiştir.
- ❖ MGO malzemelerin 500-800 nm ve Fe_3O_4 parçacıkların 5-15 nm boyut aralığında bulunmuştur.
- ❖ MGO nanomalzemelerin süperparamanyetik özellik taşıdığı, termal dayanıklılığının arttığı, pH'ya duyarlı ve bazik ortamda daha kararlı olduğu tespit edilmiştir.
- ❖ Fe_3O_4 parçacıkları GO'ya göre daha biyouyumlu bulunmuştur.

- ❖ MGO nanomalzemelerin aglomerasyonunu azaltmak, kararsızlığı önlemek ve biyoyumluluğu artırmak için doğal polimerler (PEC, GEL ve CLS) ile konjuge edilmiş ve karakterize edilmiştir.
- ❖ Polimerlerin MGO ile konjugasyonu, biyoyumluluğu, ilaç yükleme ve salım performansını, termal dayanıklılığı ve pH'ya duyarlılığı artırmıştır.
- ❖ PDT için fotosensitizörler olarak kullanılan klorin e6 (Ce6) MGO ile konjuge edilmiş ve elde edilen nanomalzemenin (MGO@ Ce6) yapıları aydınlatılmıştır.
- ❖ Hazırlanan tüm nanomalzemelerin biyoyumluluğu, L929 fibroblast normal hücre kullanılarak test edilmiş ve hemen hemen hepsi yüksek hücre canlılığı (> % 75) göstererek biyoyumlu bulunmuştur.
- ❖ MCF-7 kanser hücrelerine hedeflemek amacıyla, spesifik hücreleri veya dokuyu tanıyabilen aptamer MGO ve MGO@Ce6 nanomalzemeleri ile fonksiyonlandırılmış ve hedefleme kabiliyeti akış sitometri ile incelenmiştir.
- ❖ Model antikanser ilaç olarak paklitakselin MGO ve fonksiyonlandırılmış MGO nano-yapılarına yüklenmiş ve tutuklanma verimi, yüklenme kapasitesi, salınma yüzdesi ve hücre öldürme etkisi tespit edilmiştir.
- ❖ *In vitro* ilaç salım sonuçları; pH 7,4 ortamına göre, kanser pH'sında (pH 5,5'te) daha fazla PAC salım yüzdeleri göstermiştir.

- ❖ PAC ile karşılaştırmak için kullanılan DOX kanser ilacı MGO nanomalzeme üzerinde yüklenmiş ve pH'ya duyarlı salım tespit edilmiştir.
- ❖ Hücre sitotoksitesi, MCF-7 kanser hücresi kullanılarak incelenmiş ve hücre canlılığı yüzdesi MGO, MG@PAC, MG@DOX, PAC ve DOX için sırasıyla % $92,0 \pm 3,23$, % $19,92 \pm 2,43$, % $17,63 \pm 2,54$, % $15,11 \pm 1,42$ ve % $12,62 \pm 1,57$ bulunmuştur.
- ❖ Elde edilen *in vitro* sitotoksite sonuçları çok az PAC miktarının bile hücre büyümesini aşırı derecede inhibe ettiğini göstermiştir.
- ❖ Akış sitometri analizinde, aptamer ve aptamer konjuge nanotaşıyıcılar MCF-7 kanser hücreleri ile spesifik bağlanma kabiliyetini göstermiş ve sentezlenen nanomalzemenin hedefli ilaç dağıtım sistemleri için umut verici bir nanotaşıyıcısı olabileceğini tespit edilmiştir.
- ❖ PTT/PDT çalışmalarında, nano parçacıkların 808 ve 660 nm lazer ile daha fazla kanser hücrelerini öldürme etkisi görülmüştür. Ayrıca, Ce6'nın MGO'ya göre lazer ışımasına daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.
- ❖ Birleştirilmiş kemoterapi-PTT/PDT yöntemi her iki yöntemden daha etkili bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Barreto, J.A., Malley, W.O., Kubeil, M., Graham, B., Stephan, H., Spiccia, L., Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. Adv. Mater. 23, 18–40, 2011.
- [2] Misra, R., Acharya, S., Sahoo, S.K., Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discov Today 15, 842–850, 2010.
- [3] Cancer Facts & Figures 2014. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2014.html> (Erişim tarihi: 30.11.2017).
- [4] Cancer Facts & Figures 2015. American cancer Society. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2015.html>. (Erişim tarihi: 30.11.2017).
- [5] Siegel, R.L., Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J. Clin. 66 (1), 7–30, 2016.
- [6] Mulens, V., Morales, P., Barber, D.F., Development of Magnetic Nanoparticles for Cancer Gene Therapy : A Comprehensive Review. ISRN Nanomater 2013, 14. 2013.
- [7] Wang, C., Ravi, S., Garapati, U.S., Das, M., Howell, M., Mallela, J., Multifunctional chitosan magnetic-graphene (CMG) nanoparticles: a theranostic platform for tumor-targeted co-delivery of drugs, genes and MRI contrast agents.

J. Mater. Chem. B. 1, 4396–4405, 2013.

- [8] Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127 (12), 2893–2917, 2010.
- [9] Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J. Clin.* 63 (1), 11–30, 2013.
- [10] Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., Jemal, A., Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65 (2), 87–108, 2015.
- [11] The JAMA Network Journals. Estimating the global burden of cancer in 2013, 14.9 million new cases worldwide. ScienceDaily. <www.sciencedaily.com/releases/2015/05/150528124405.htm>. (Erişim tarihi: 30.11.2017)
- [12] Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., et al., Global Burden of Disease Cancer Collaboration, The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 505–527, 2015.
- [13] World Health Organization, Cancer Research UK. World cancer factsheet. World Heal. Organ. 2012, 4, 2014.
- [14] T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Kanseri İstatistikleri Kısa Rapor. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2013. <http://kanseri.gov.tr/faaliyetleri/kanseri-istatistikleri/1445-t%C3%BCrkiye-kanseri-istatistikleri-rapor-k%C4%B1sa.html>.

(Erişim tarihi: 11, 30, 2017).

- [15] Peer, D, Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nat. Nanotechnol. 2 (12), 751–760, 2007.
- [16] National Cancer Institute. Types of cancer treatment: Chemotherapy. Nih. 1–4, 2016. <http://www.cancer.gov/aboutcancer/%5Ctreatment/types/chemotherapy>. (Erişim tarihi: 11. 30. 2017).
- [17] Society AC. Cancer Treatment and Cancer Treatment Side Effects. Am. Cancer Soc. 1–8. 2017. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects.html>. (Erişim tarihi: 11. 30. 2017).
- [18] HCN. Potential Serious Side Effects of Conventional (Mainstream / Orthodox) Cancer Treatment Consequences of Ionizing Radiation Therapy. <http://www.healingcancernaturally.com/sideeffects-conventional-treat.html> (Erişim tarihi: 11. 30. 2017).
- [19] Lim, E., Huh, Y., Yang, J., Lee, K., Suh, J., pH-Triggered Drug-Releasing Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy Guided by Molecular Imaging by MRI. Adv. Mater. 23, 2436–2442, 2011.
- [20] Wang, Z., Zhou, C., Xia, J., Via, B., Xia, Y., Zhang, F., Li Y., Xia, L., Fabrication and characterization of a triple functionalization of graphene oxide with Fe₃O₄, folic acid and doxorubicin as dual-targeted drug nanocarrier. Colloids Surfaces B

Biointerfaces 106, 60–65, 2013.

- [21] Lim, E.K., Jang, E., Lee, K., Haam, S., Huh, Y.M., Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology. *Pharmaceutics* 5 (2), 294–317, 2013.
- [22] Yang, X., Wang, Y., Huang, X., Ma, Y., Huang, Y., Yang, R., et al. Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity. *J. Mater. Chem.* 21 (10), 3448, 2011.
- [23] Gao, Z., Zhang, L., Sun, Y., Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. *Journal of Controlled Release* 162, 45–55, 2012.
- [24] Jabir, N.R., Tabrez, S., Ashraf, G.M., Shakil, S., Damanhour, G.A., Kamal, M.A., Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *International Journal of Nanomedicine* 4391–4408, 2012.
- [25] Alexis, F., Rhee, J., Richie, J.P., Radovic-moreno, A.F., New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol. Oncol.* 26. 74–85, 2008.
- [26] Bae, K.H., Chung, H.J., Park, T.G., Nanomaterials for Cancer Therapy and Imaging. *Mol. Cells.* 31, 295–302, 2011.
- [27] Silva, J., Fernandes, A.R., Baptista, P.V., Application of Nanotechnology in Drug Delivery, 127–154, 2014.
- [28] Parhi, P., Mohanty, C., Sahoo, S.K., Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. *Drug Discov. Today* 17, 1044–1052, 2012.

- [29] Kanapathipillai, M., Brock, A., Ingber, D.E., Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 79, 107–118, 2014.
- [30] Bharali, D.J., Khalil, M., Gurbuz, M., Simone, T.M. Mousa, S.A., Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. *Int. J. Nanomedicine* 4, 1–7, 2009.
- [31] Mody, N., Tekade, R.K., Mehra, N.K., Chopdey, P., Jain, N.K., Dendrimer, Liposomes, Carbon Nanotubes and PLGA Nanoparticles: One Platform Assessment of Drug Delivery Potential 15 (2), 388–399, 2014.
- [32] Bamrungsap, S., Zhao, Z., Chen, T., Wang, L., Li, C., Fu, T., Tan, W., Nanotechnology in Therapeutics A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *Medscape* 7 (8), 1253–1272, 2012.
- [33] Lu, H., Wang, J., Wang, T., Zhong, J., Bao, Y., Hao, H., Recent Progress on Nanostructures for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanomaterials* 2016, 1-12, 2016.
- [34] Kesharwani, P., Jain, K., Jain, N.K., Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 39 (2), 268–307, 2014.
- [35] Bhadra, D., Yadav, A.K., Bhadra, S., Jain, N.K., Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. *Int. J. Pharm.* 295, 221–233, 2005.

- [36] Kono, K., Liu, M., Fréchet, J.M.J., Design of dendritic macromolecules containing folate or methotrexate residues. *Bioconjug. Chem.* 10 (6), 1115–1121, 1999.
- [37] Dutta, T., Aghase, H.B., Vijayarajkumar, P., Joshi, M., Jain, N.K., Dendrosome-based gene delivery. *J. Exp. Nanosci.* 1 (2), 235–428, 2006.
- [38] Chaplot, S.P., Rupenthal, I.D., Dendrimers for gene delivery - A potential approach for ocular therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (4), 542–556, 2014.
- [39] Hussein, G.A., Pitt, W.G., Micelles and Nanoparticles for Ultrasonic Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (10), 1137–1152, 2008.
- [40] Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., Kadam, V., Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (6), 714–729, 2010.
- [41] Lee, R., Shenoy, D., Sheel, R., Micellar Nanoparticles: Applications for Topical and Passive Transdermal Drug Delivery. *Handb. Non-Invasive Drug Deliv. Syst.*, 37–58, 2010.
- [42] Sanginario, A., Miccoli, B., Demarchi, D., Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biosensors* 7 (1), 1–23, 2017.
- [43] Siegal, M.P., Overmyer, D.L., Provencio, P.P., Precise control of multiwall carbon nanotube diameters using thermal chemical vapor deposition. *Appl. Phys. Lett.* 80 (12), 2171–2173, 2002.

- [44] Elhissi, A.M.A., Ahmed, W., Hassan, I.U., Dhanak, V.R., D'Emanuele, A., Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Drug Delivery. *J. Drug Deliv.* 2012, 1–10, 2012.
- [45] Marchesan, S., Kostarelos, K., Bianco, A., Prato, M., The winding road for carbon nanotubes in nanomedicine. *Mater. Today* 18 (1), 12–19, 2015.
- [46] Fadeel, B., Garcia-Bennett, A.E., Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (3), 362–674, 2010.
- [47] Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Daniel, W.L., Massich, M.D., Patel, P.C., Mirkin, C.A., Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chemie - Int. Ed.* 49 (19), 3280–3294, 2010.
- [48] Giner-Casares, J.J., Henriksen-Lacey, M., Coronado-Puchau, M., Liz-Marzán, L.M., Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meets medical research. *Mater Today* 19 (1), 19–28, 2015.
- [49] Na, H. Bin., Song, I.C., Hyeon T., Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Adv. Mater.* 21 (21), 2133–2148, 2009.
- [50] Huang, H.C., Barua S, Sharma G, Dey SK, Rege K., Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J. Control Release* 155 (3), 344–357, 2011.
- [51] Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J. Control Release*

166 (2), 182–94, 2013.

- [52] Bhattacharya, R., Mukherjee, P., Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (11), 1289–306, 2008.
- [53] Drbohlavova, J., Chomoucka, J., Adam, V., Ryvolova, M., Eckschlager, T., Hubalek, J., Kizek, R., Nanocarriers for anticancer drugs - New trends in nanomedicine. *Curr. Drug Metab.* 14 (5), 547–64, 2013.
- [54] D’souza, M.J., Tawde, S.A., Akalkotkar, A., Chablani, L., D’souza, M., Chiriva-Internati, M., Nanotechnology in vaccine delivery. *Mol. Vaccines From Prophyl. to Ther.* 60, 727–741, 2014.
- [55] Gregory, A.E., Titball, R., Williamson, D., Vaccine delivery using nanoparticles. *Front Cell Infect Microbiol.* 3, 1–13, 2013.
- [56] Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.X., Mitter, N., Yu, C., Middelberg, A.P.J., Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32 (3), 327–337, 2014.
- [57] Ow, H., Larson, D.R., Srivastava, M., Baird, B.A., Webb, W.W., Wiesner, U., Bright and Stable Core – Shell Fluorescent Silica Nanoparticles. *Nano Lett.* 5, 113-117, 2005.
- [58] Benezra, M., Penate-medina, O., Zanzonico, P. B., Schaer, D., Ow, H., Burns, A., Destanchina, E., Longo, V., Herz, E., Iyer, S., et al., Multimodal Silica Nanoparticles Are Effective Cancer-Targeted Probes in a Model of Human Melanoma. *J. Clin. Invest.* 121 (7), 1–13, 2011.

- [59] Kim, K.Y., Nanotechnology Platforms and Physiological Challenges for Cancer Therapeutics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 3 (2), 103–110, 2007.
- [60] Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W.C., Kummel, A.C., Synthesis and Surface Functionalization of Silica Nanoparticles for Nanomedicine. *Surf. Sci. Rep.* 69, 132–158, 2014,
- [61] Bharti, C., Gulati, N., Nagaich, U., Pal, A., Mesoporous Silica Nanoparticles in Target Drug Delivery System: A Review. *Int. J. Pharm. Investig.* 5 (3), 124. 2015.
- [62] He, Y., Du, Z., Ma, S., Liu, Y., Li, D., Huang, H., Jiang, S., Cheng, S., Wu, W., Zhang, K., Zheng X., Effects of Green-Synthesized Silver Nanoparticles on Lung Cancer Cells in Vitro and Grown as Xenograft Tumors in Vivo. *Int. J. Nanomedicine* 11, 1879–1887, 2016.
- [63] Oldenburg, J.S., Silver Nanoparticles: Properties and Applications <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html> (Erişim tarihi: 11. 7. 2017).
- [64] Rai, M., Yadav, A., Gade, A., Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 27 (1), 76–83, 2009.
- [65] Kang, K., Lim, D. H., Choi, I. H., Kang, T., Lee, K., Moon, E. Y., Yang, Y., Lee, M. S., Lim, J. S., Vascular Tube Formation and Angiogenesis Induced by Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 205 (3), 227–234, 2011.

- [66] Kim, S., Choi, J. E., Choi, J., Chung, K. H., Park, K., Yi, J., Ryu, D. Y., Oxidative Stress-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles in Human Hepatoma Cells. *Toxicol. Vitro.* 23 (6), 1076–1084, 2009.
- [67] Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J., Autrup, H. PVP-Coated Silver Nanoparticles and Silver Ions Induce Reactive Oxygen Species, Apoptosis and Necrosis in THP-1 Monocytes. *Toxicol. Lett.* 190 (2), 156–162, 2009.
- [68] Wang, B., Qiao, W., Wang, Y., Yang, L., Zhang, Y., Shao, P. Cancer Therapy Based on Nanomaterials and Nanocarrier Systems. *J. Nanomater.* 2010, 9, 2010.
- [69] Chan, W.C., Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science.* 281 (5385), 2016–2018, 1998.
- [70] Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M., Simon, S. M., Long-Term Multiple Color Imaging of Live Cells Using Quantum Dot Bioconjugates. *Nat. Biotechnol.* 21 (1), 47–51, 2002.
- [71] Akerman, M. E., Chan, W. C. W., Laakkonen, P., Bhatia, S. N., Ruoslahti, E. Nanocrystal Targeting in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (20), 12617–12621, 2002.
- [72] Cai, W., Chen, X. Nanoplatfroms for Targeted Molecular Imaging in Living Subjects. *Small* 3 (11), 1840–1854, 2007.
- [73] Thakur, M., Kumawat, M. K., Srivastava, R., Multifunctional Graphene Quantum

- Dots for Combined Photothermal and Photodynamic Therapy Coupled with Cancer Cell Tracking Applications. *RSC Adv.* 7 (9), 5251–5261, 2017.
- [74] Juzenas, P., Chen, W., Sun, Y. P., Coelho, M. A. N., Generalov, R., Generalova, N., Christensen, I. L., Quantum Dots and Nanoparticles for Photodynamic and Radiation Therapies of Cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (15), 1600–1614, 2008.
- [75] Howarth, M., Takao, K., Hayashi, Y., Ting, A. Y., Targeting Quantum Dots to Surface Proteins in Living Cells with Biotin Ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (21), 7583–7588, 2005.
- [76] Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Nakamura, S., Suga, M., Yamaguchi, Y., Suzuki, K., Yasuhara, M., Yamamoto, K. Quantum Dots Targeted to the Assigned Organelle in Living Cells. *Microbiol. Immunol.* 48 (12), 985–994, 2004.
- [77] Hild, W. A., Breunig, M., Goepferich, A., Quantum Dots - Nano-Sized Probes for the Exploration of Cellular and Intracellular Targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2), 153–168, 2008.
- [78] Hong, T.C., Synthesis and Characterizations of Magnetic Nanoparticle, BSc thesis, University Malaysia Sarawak, 2011.
- [79] Nene, A.G., Takahashi, M., Somani, P.R., Fe₃O₄ and Fe Nanoparticles by Chemical Reduction of Fe(Acac)₃ by Ascorbic Acid: Role of Water. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 6, 20-28, 2016.
- [80] Singamaneni, S., Bliznyuk, V. N., Binek, C., Tsymbal, E. Y., Magnetic

Nanoparticles: Recent Advances in Synthesis, Self-Assembly and Applications. J. Mater. Chem. 21 (42), 16819 -16845, 2011.

- [81] Akbarzadeh, A., Samiei, M., Davaran, S. Magnetic Nanoparticles : Preparation , Physical Properties, and Applications in Biomedicine. Nanoscale Res. Lett. 7 (1), 144-157, 2012.
- [82] Yang, J. H., Ramaraj, B., Yoon, K. R., Preparation and Characterization of Superparamagnetic Graphene Oxide Nanohybrids Anchored with Fe₃O₄ Nanoparticles. J. Alloys Compd. 583, 128–133, 2014.
- [83] Yang, X., Chen, Y., Yuan, R., Chen, G., Blanco, E., Gao, J., Shuai, X., Folate-Encoded and Fe₃O₄-Loaded Polymeric Micelles for Dual Targeting of Cancer Cells. Polymer (Guildf). 49 (16), 3477–3485. 2008.
- [84] Lemine, O. M., Omri, K., Zhang, B., Mir, L. El, Sajieddine, M., Alyamani, A., Bououdina, M. Sol – Gel Synthesis of 8 Nm Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles and Their Magnetic Properties. SUPERLATTICES Microstruct. 52 (4), 793–799, 2012.
- [85] Cai, W., Wan, J., Facile Synthesis of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles in Liquid Polyols. 305, 366–370, 2007.
- [86] Teo, P. S. ., Lim, H. N. ., Huang, N. M. ., Chia, C. H. ., Harrison, I., Room Temperature in Situ Chemical Synthesis of Fe₃O₄/graphene. Ceram. Int. 38 (8),

6411–6416, 2012.

- [87] Chomoucka, J., Drbohlavova, J., Huska, D., Adam, V., Kizek, R., Hubalek, J., Magnetic Nanoparticles and Targeted Drug Delivering. *Pharmacol. Res.* 62 (2), 144–149, 2010.
- [88] Hyeona, Y., Seo, S., Na, K., MRI Contrast Agent-Based Multifunctional Materials : Diagnosis and Therapy. 2011 (2011), 1–8, 2011.
- [89] Wahajuddin, Arora, S., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetic Nanoplatfroms as Drug Carriers. *Int. J. Nanomedicine* 7, 3445–3471, 2012.
- [90] Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Development, Surface Modification and Applications in Chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (1–2), 24–46, 2011.
- [91] Singh, V., Joung, D., Zhai, L., Das, S., Khondaker, S. I., Seal, S., Graphene Based Materials: Past, Present and Future. *Prog. Mater. Sci.* 56 (8), 1178–1271, 2011.
- [92] Zhang, S., Yang, K., Feng, L., Liu, Z., In Vitro and in Vivo Behaviors of Dextran Functionalized Graphene. *Carbon N. Y.* 49 (12), 4040–4049, 2011.
- [93] Kim, H., Abdala, A. A., MacOsco, C. W. Graphene/polymer Nanocomposites. *Macromolecules* 43 (16), 6515–6530, 2010.
- [94] Loh, K. P., Bao, Q., Ang, P. K., Yang, J., The Chemistry of Graphene. *J. Mater. Chem.* 20 (12), 2277–2289, 2010.

- [95] Pinto, A. M., Gonc, I. C., Magalhães, F. D., Graphene-Based Materials Biocompatibility : A Review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 111, 188–202, 2013.
- [96] Geim, a K. GRAPHENE: STATUS AND PROSPECTS. *Science* 324, 1–8, 2009.
- [97] Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J., Lin, Y., Graphene and Graphene Oxide: Biofunctionalization and Applications in Biotechnology. *Trends Biotechnol.* 29 (5), 205–212, 2011.
- [98] Yang, K., Hu, L., Ma, X., Ye, S., Cheng, L., Shi, X., Li, C., Li, Y., Liu, Z., Multimodal Imaging Guided Photothermal Therapy Using Functionalized Graphene Nanosheets Anchored with Magnetic Nanoparticles. *Adv. Mater.* 24 (14), 1868–1872, 2012.
- [99] Goenka, S., Sant, V., Sant, S. Graphene-Based Nanomaterials for Drug Delivery and Tissue Engineering. *J. Control. Release* 173 (1), 75–88, 2014.
- [100] Gao, Y., Zou, X., Zhao, J. X., Li, Y., Su, X. Graphene Oxide-Based Magnetic Fluorescent Hybrids for Drug Delivery and Cellular Imaging. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 112, 128–133, 2013.
- [101] Zhang, R., Olin, H., Carbon Nanomaterials as Drug Carriers: Real Time Drug Release Investigation. *Mater. Sci. Eng. C* 32 (5), 1247–1252, 2012.
- [102] Zhao, X., Liu, P., Biocompatible Graphene Oxide as a Folate Receptor-Targeting Drug Delivery System for the Controlled Release of Anti-Cancer Drugs. *RSC*

Adv. 4 (46), 24232–24239, 2014.

- [103] Sun, X., Liu, Z., Welscher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., Dai, H., Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. *Nano Res* 1 (3), 203–212, 2008.
- [104] Akhavan, O., Ghaderi, E. Photocatalytic Reduction of Graphene Oxide Nanosheets on TiO₂ Thin Film for Photoinactivation of Bacteria in Solar Light Irradiation. *J. Phys. Chem. C* 113 (47), 20214–20220, 2009.
- [105] Kassaei, M. Z., Motamedi, E., Majidi, M. Magnetic Fe₃O₄-Graphene Oxide/polystyrene: Fabrication and Characterization of a Promising Nanocomposite. *Chem. Eng. J.* 172 (1), 540–549, 2011.
- [106] Abdullah, M. F., Zakaria, R., Zein, S.H.S., Green Tea Polyphenol–reduced Graphene Oxide: Derivatisation, Reduction Efficiency, Reduction Mechanism and Cytotoxicity. *RSC Adv.* 4 (65), 34510, 2014.
- [107] Liu, K., Wang, Y., Li, H., Duan, Y., A Facile One-Pot Synthesis of Starch Functionalized Graphene as Nano-Carrier for pH Sensitive and Starch-Mediated Drug Delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 128, 86–93, 2015.
- [108] Hatamie, S., Akhavan, O., Sadrnezhad, S. K., Ahadian, M. M., Shirolkar, M. M., Wang, H. Q., Curcumin-Reduced Graphene Oxide Sheets and Their Effects on Human Breast Cancer Cells. *Mater. Sci. Eng. C* 55, 482–489, 2015.
- [109] Zahran, M. K., Ahmed, H. B., El-Rafie, M. H., Facile Size-Regulated Synthesis

- of Silver Nanoparticles Using Pectin. *Carbohydr. Polym.* 111, 971–978, 2014.
- [110] Khazaei, A., Rahmati, S., Hekmatian, Z., Saeednia, S., A Green Approach for the Synthesis of Palladium Nanoparticles Supported on Pectin: Application as a Catalyst for Solvent-Free Mizoroki-Heck Reaction. *J. Mol. Catal. A Chem.* 372, 160–166, 2013.
- [111] Kundu, A., Nandi, S., Das, P., Nandi, A. K., Fluorescent Graphene Oxide via Polymer Grafting: An Efficient Nanocarrier for Both Hydrophilic and Hydrophobic Drugs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (6), 3512–3523, 2015.
- [112] Lei, H., Xie, M., Zhao, Y., Zhang, F., Xu, Y., Xie, J., Chitosan/sodium Alginate Modified Graphene Oxide-Based Nanocomposite as a Carrier for Drug Delivery. *Ceram. Int.* 42 (15), 17798–17805, 2016.
- [113] Pan, Y., Bao, H., Sahoo, N. G., Wu, T., Li, L., Water-Soluble poly(N-Isopropylacrylamide)-Graphene Sheets Synthesized via Click Chemistry for Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* 21 (14), 2754–2763, 2011.
- [114] Miao, W., Shim, G., Lee, S., Lee, S., Choe, Y. S., Oh, Y. K., Safety and Tumor Tissue Accumulation of Pegylated Graphene Oxide Nanosheets for Co-Delivery of Anticancer Drug and Photosensitizer. *Biomaterials* 34 (13), 3402–3410, 2013.
- [115] Liu, Z., Robinson, J. T., Sun, X., Dai, H. PEGylated Nano-Graphene Oxide for Delivery of Water Insoluble Cancer Drugs. *J Am Chem Soc*, 130 (33), 10876–

10877, 2008.

- [116] Wang, T., Zhang, Z., Gao, J., Yin, J., Sun, R., Bao, F., Ma, R., Synthesis of Graphene Oxide Modified Poly (Sebacic Anhydride) Hybrid Materials for Controlled Release Applications. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 63, 726–732, 2013.
- [117] An, J., Gou, Y., Yang, C., Hu, F., Wang, C., Synthesis of a Biocompatible Gelatin Functionalized Graphene Nanosheets and Its Application for Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C*, 33 (5), 2827–2837, 2013.
- [118] Mianehrow, H., Moghadam, M. M., Sharif, F., Mazinani, S. Graphene - Oxide Stabilization in Electrolyte Solutions Using Hydroxyethyl Cellulose for Drug Delivery Application. *Int. J. Pharm.* 484 (1–2), 276–282, 2015.
- [119] Jung, H. S., Lee, M.-Y., Kong, W. H., Do, I. H., Hahn, S. K., Nano Graphene Oxide – Hyaluornic Acid Conjugate for Target Specific Cancer Drug Delivery. *RSC Adv.* 14197–14200, 2014.
- [120] Zhang, L., Xia, J., Zhao, Q., Liu, L., Zhang, Z. Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs. *Small* 6 (4), 537–544, 2010.
- [121] Munarin, F., Tanzi, M. C., Petrini, P., Advances in Biomedical Applications of Pectin Gels. *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (4), 681–689, 2012.

- [122] Saurabh Sahu, R. K. D. Novel Hybrid Nanostructured Materials of Magnetite Nanoparticles and Pectin. *J. Magn. Mater.* 323 (7), 980–987, 2011.
- [123] Ngenefeme, F.-T. J., Eko, N. J., Mbom, Y. D., Tantoh, N. D., M Rui, K. W. A One Pot Green Synthesis and Characterisation of Iron Oxide-Pectin Hybrid Nanocomposite. *Open J. Compos. Mater.* 3, 30–37, 2013.
- [124] Liu, L., Won, Y. J., Cooke, P. H., Coffin, D. R., Fishman, M. L., Hicks, K. B., Ma, P. X., Pectin/poly(lactide-Co-Glycolide) Composite Matrices for Biomedical Applications. *Biomaterials* 25 (16), 3201–3210, 2004.
- [125] Mishra, R. K., Datt, M., Pal, K., Banthia, A. K., Preparation and Characterization of Amidated Pectin Based Hydrogels for Drug Delivery System. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (6), 2275–2280, 2008.
- [126] Sriamornsak, P., Puttipatkhachorn, S., Chitosan-Pectin Composite Gel Spheres: Effect of Some Formulation Variables on Drug Release. *Macromol. Symp.* 216, 17–21, 2004.
- [127] Munarin, F., Petrini, P., Farè, S., Tanzi, M. C., Structural Properties of Polysaccharide-Based Microcapsules for Soft Tissue Regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (1), 365–375, 2010.
- [128] Munarin, F., Giuliano, L., Bozzini, S., Tanzi, M. C., Petrini, P. Mineral Phase Deposition on Pectin Microspheres. *Mater. Sci. Eng. C* 30 (3), 491–496, 2010.

- [129] Munarin, F., Guerreiro, S. G., Grellier, M. A., Tanzi, M. C., Barbosa, M. A., Petrini, P., Granja, P. L. Pectin-Based Injectable Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 12 (3), 568–577, 2011.
- [130] Munarin, F., Petrini, P., Tanzi, M. C., Barbosa, M. a., Granja, P. L., Biofunctional Chemically Modified Pectin for Cell Delivery. *Soft Matter* 8, 4731-4739, 2012.
- [131] Munarin, F., Tanzi, M. C., Petrini, P., Advances in Biomedical Applications of Pectin Gels. *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (4), 681–689, 2012,
- [132] Zheng, Y., Liu, Zhimin, Jing, Yanfeng Li, Jie Zhan, H., An Acetylcholinesterase Biosensor Based on Ionic Liquid Functionalized Graphene – Gelatin - Modified Electrode for Sensitive Detection of Pesticides. *Sensors Actuators B Chem.* 210 (April 2015), 389–397, 2015.
- [133] Liu, H., Cheng, J., Chen, F., Bai, D., Shao, C., Wang, J., Xi, P., Zeng, Z., Gelatin Functionalized Graphene Oxide for Mineralization of Hydroxyapatite: Biomimetic and in Vitro Evaluation. *Nanoscale* 6 (10), 5315 –5322, 2014.
- [134] Fakirov, S., Cagiao, M. E., Baltá Calleja, F. J., Sapundjieva, D., Vassileva, E., Melting of Gelatin Crystals below Glass Transition Temperature: A Direct Crystal-Glass Transition as Revealed by Microhardness. *Int. J. Polym. Mater.* 43 (3–4), 195–206, 1999.
- [135] Piao, Y., Chen, B. One-Spot Synthesis and Characterization of Reduced Graphene Oxide – Gelatin Nanocomposite Hydrogels. *RSC Adv.* 6, 6171–6181, 2016.

- [136] Chenga, Z., Daib, Y. Kangb, X., Lia, C., Huanga, S., Liana, H., Houa, Z., Lin, J., Gelatin - Encapsulated Iron Oxide Nanoparticles for Platinum (IV) Prodrug Delivery , Enzyme - Stimulated Release and MRI. *Biomaterials* 35 (24), 6359–6368, 2014.
- [137] Ciolacu, D., Ciolacu, F., Popa, V. I., Amorphous Cellulose – Structure and Characterization. *Cellul. Chem. Technol.* 45, 13–21, 2011.
- [138] Htmf, F., Kal, S., Dufresne, A., Cher, M., Ka, B. S., Avérous, L., Njuguna, J., Cellulose-Based Bio- and Nanocomposites : A Review. 2011 (2011), 1–28, 2016.
- [139] Ramesh, S., Kim, J., Kim, J. H. Characteristic of Hybrid Cellulose-Amino Functionalized POSS-Silica Nanocomposite and Antimicrobial Activity. *J. Nanomater.* 2015, 1-9, 2015.
- [140] Sudharsan Reddy, K., Prabhakar, M. N., Kumara Babu, P., Venkatesulu, G., Kumarji Rao, U. S., Chowdoji Rao, K., Subha, M. C. S. Miscibility Studies of Hydroxypropyl Cellulose/Poly(Ethylene Glycol) in Dilute Solutions and Solid State. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, 2012, 1–9, 2012.
- [141] Guo, M., Yan, Y., Zhang, H., Yan, H., Cao, Y., Liu, K., Wan, S., Huang, J., Yue, W., Magnetic and pH-Responsive Nanocarriers with Multilayer Core-shell Architecture for Anticancer Drug Delivery. *J. Mater. Chem.* 18 (42), 5104–5112, 2008.
- [142] Yu, X., Trase, I., Ren, M., Duval, K., Guo, X., Chen, Z., Design of Nanoparticle-

- Based Carriers for Targeted Drug Delivery. *J. Nanomater.* 2016, 1–15, 2016.
- [143] Singh, R., W., L. J., Nanoparticle-Based Targeted Drug Delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 86 (3), 215–223, 2009.
- [144] Maeda, H., Sawa, T., Konno, T., Mechanism of Tumor-Targeted Delivery of Macromolecular Drugs, Including the EPR Effect in Solid Tumor and Clinical Overview of the Prototype Polymeric Drug SMANCS. *J. Control. Release* 74 (1–3), 47–61, 2001.
- [145] Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J., Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *J. Control. Release* 200, 138–157, 2015.
- [146] Liu, D., Auguste, D. T., Cancer Targeted Therapeutics: From Molecules to Drug Delivery Vehicles. *J. Control. Release* 219, 632–643, 2015,
- [147] Gujral, S., Khatri, S. A Review on Basic Concept of Drug Targeting and Drug Carrier System. *Int. J. Adv. PHARMACY, Biol. Chem.* 2 (1), 130–136, 2013.
- [148] Guo, X., Shi, C., Yang, G., Wang, J., Cai, Z., Zhou, S. Dual-Responsive Polymer Micelles for Target-Cell-Specific Anticancer Drug Delivery. *Chem. Mater.* 26 (15), 4405–4418, 2014.
- [149] Li, Y., Kröger, M., Liu, W. K. Shape Effect in Cellular Uptake of PEGylated Nanoparticles: Comparison between Sphere, Rod, Cube and Disk. *Nanoscale* 7 (40), 16631–16646, 2015.

- [150] Yang, X., Zhang, X., Ma, Y., Huang, Y., Wang, Y., Chen, Y. Superparamagnetic Graphene oxide-Fe₃O₄ Nanoparticles Hybrid for Controlled Targeted Drug Carriers. *J. Mater. Chem.* 19 (18), 2710, 2009.
- [151] Baea, Y.H., Parkb, K., Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and Possibility. *J Control Release* 153 (3), 198–205, 2012.
- [152] Yang, X., Wang, Y., Huang, X., Ma, Y., Huang, Y., Yang, R. Multi-Functionalized Graphene Oxide Based Anticancer Drug-Carrier with Dual-Targeting Function and pH-Sensitivity. *J. Mater. Chem.* 1-7, 2010.
- [153] Lu, Y., Wu, P., Yin, Y., Zhang, H., Cai, C., Aptamer-Functionalized Graphene Oxide for Highly Efficient Loading and Cancer Cell-Specific Delivery of Antitumor Drug. *J. Mater. Chem. B* 2 (24), 3849–3859, 2014.
- [154] Li, F., Park, S.-J., Ling, D., Park, W., Han, J. Y., Na, K., Char, K., Hyaluronic Acid-Conjugated Graphene Oxide/photosensitizer Nanohybrids for Cancer Targeted Photodynamic Therapy. *J. Mater. Chem. B* 1 (12), 1678, 2013.
- [155] Zhu, H., Li, J., Zhang, X. B., Ye, M., Tan, W., Nucleic Acid Aptamer-Mediated Drug Delivery for Targeted Cancer Therapy. *ChemMedChem* 10 (1), 39–45, 2015.
- [156] Steichen, S. D., Caldorera-Moore, M., Peppas, N. A., A Review of Current Nanoparticle and Targeting Moieties for the Delivery of Cancer Therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (3), 416–427, 2013.

- [157] Park, E. K., Lee, S. B., Lee, Y., M. Preparation and Characterization of Methoxy Poly(ethylene Glycol)/poly(ϵ -Caprolactone) Amphiphilic Block Copolymeric Nanospheres for Tumor-Specific Folate-Mediated Targeting of Anticancer Drugs. *Biomaterials* 26 (9), 1053–1061, 2005.
- [158] Chan, P., Kurisawa, M., Chung, J. E., Yang, Y. Y. Synthesis and Characterization of Chitosan-G-Poly(ethylene Glycol)-Folate as a Non-Viral Carrier for Tumor-Targeted Gene Delivery. *Biomaterials* 28 (3), 540–549, 2007.
- [159] Ponka, P., Lok, C. N., The Transferrin Receptor: Role in Health and Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (10), 1111–1137, 1999.
- [160] Wu, P., Gao, Y., Zhang, H., Cai, C. Aptamer-Guided Silver–Gold Bimetallic Nanostructures with Highly Active Surface-Enhanced Raman Scattering for Specific Detection and Near-Infrared Photothermal Therapy of Human Breast Cancer Cells. *Anal. Chem.* 84, 7692–7699, 2012.
- [161] Iliuk, A. B., Hu, L., Tao, W. A. Aptamer in Bioanalytical Applications. *Anal. Chem.*, 83 (12), 4440–4452, 2011.
- [162] Peng, L., Wu, C., You, M., Han, D., Chen, Y., Fu, T., Ye, M., Tan, W. Engineering and Applications of DNA-Grafting Polymer Materials. *Chem. Sci.* 4 (5), 1928–1938, 2013.
- [163] Oh, J., Yoon, H., Park, J. H. Nanoparticle Platforms for Combined Photothermal and Photodynamic Therapy. *Biomed. Eng. Lett.* 3 (2), 67–73, 2013.

- [164] Robinson, J. T., Tabakman, S. M., Liang, Y., Wang, H., Ultra-Small Reduced Graphene Oxide with High Near-Infrared Absorbance for Photothermal Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 6825–6831, 2011.
- [165] Iancu, C., Photothermal Therapy of Human Cancers (PTT) Using Gold Nanoparticles. *Biotechnol. Mol. Biol. Nanomedicine* 1 (1), 53–60, 2013.
- [166] Qin, X. C., Guo, Z. Y., Liu, Z. M., Zhang, W., Wan, M. M., Yang, B. W., Folic Acid-Conjugated Graphene Oxide for Cancer Targeted Chemo-Photothermal Therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 120, 156–162, 2013.
- [167] Zhang, D., Wu, M., Zeng, Y., Wu, L., Wang, Q., Han, X., Liu, X., Liu, J., Chlorin e6 Conjugated Poly(dopamine) Nanospheres as PDT/PTT Dual-Modal Therapeutic Agents for Enhanced Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7 (15), 8176–8187, 2015.
- [168] Sharkar, S. M., Lee, J. E., Kim, S. H., Jeong, J. H., In, I., Lee, H., Park, S. Y. pH Triggered in Vivo Photothermal Therapy and Fluorescence Nanoplatform of Cancer Based on Responsive Polymer-Indocyanine Green Integrated Reduced Graphene Oxide. *Biomaterials* 61, 229–238, 2015.
- [169] Huang, Z., Xu, H., Meyers, A. D., Musani, A. I., Wang, L., Tagg, R., Barqawi, A. B., Chen, Y. K., Photodynamic Therapy for Treatment of Solid Tumors--Potential and Technical Challenges. *Technol. Cancer Res. Treat.* 7 (4), 309–320, 2008.
- [170] Weihong Tan, Hui Wang, Yan Chen, Xiaobing Zhang, Haizhen Zhu, Chaoyong

- Yang, and R. Y., Molecular Aptamers for Drug Delivery. *Trends Biotechnol.* 29 (12), 634–640, 2011.
- [171] Huang, P., Xu, C., Lin, J., Wang, C., Wang, X., Zhang, C., Zhou, X., Guo, S., Cui, D., Folic Acid-Conjugated Graphene Oxide Loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy. *Theranostics* 1, 240–250, 2011.
- [172] Lovell, J. F., Liu, T. W. B., Chen, J., Zheng, G., Activable Photosensitizers for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* 110 (5), 2839–2857, 2010.
- [173] Kim, J. Y., Choi, W. Il, Kim, M., Tae, G., Tumor-Targeting Nanogel That Can Function Independently for Both Photodynamic and Photothermal Therapy and Its Synergy from the Procedure of PDT Followed by PTT. *J. Control. Release* 171 (2), 113–121, 2013.
- [174] Ma, X., Tao, H., Yang, K., Feng, L., Cheng, L., Shi, X., Li, Y., Guo, L., Liu, Z. A Functionalized Graphene Oxide-Iron Oxide Nanocomposite for Magnetically Targeted Drug Delivery, Photothermal Therapy, and Magnetic Resonance Imaging. *Nano Res.* 5 (3), 199–212, 2012.
- [175] Li, Z., Liu, Z., Yin, M., Yang, X., Yuan, Q., Ren, J., Qu, X., Aptamer-Capped Multifunctional Mesoporous Strontium Hydroxyapatite Nanovehicle for Cancer-Cell-Responsive Drug Delivery and Imaging. *Biomacromolecules* 13 (12), 4257–4263, 2012.

- [176] Wongwailikhit, K., Horwongsakul, S., The Preparation of Iron (III) Oxide Nanoparticles Using W/O Microemulsion. *Mater. Lett.* 65 (17–18), 2820–2822, 2011.
- [177] Chin, A. B., Yaacob, I. I., Synthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles via W/o Microemulsion and Massart's Procedure. *J. Mater. Process. Technol.* 191 (1–3), 235–237, 2007.
- [178] Hou, Y., Yu, J., Gao, S., Solvothermal Reduction Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 13 (8), 1983–1987, 2003.
- [179] Ou, P., Xu, G., Xu, C., Zhang, Y., Hou, X., Han, G., Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles by a Simple Solvothermal Method. *Mater. Sci. -pol.* 28 (4), 817–822, 2010.
- [180] Lemine, O. M., Omri, K., Zhang, B., El Mir, L., Sajieddine, M., Alyamani, A., Bououdina, M., Sol–gel Synthesis of 8nm Magnetite (Fe_3O_4) Nanoparticles and Their Magnetic Properties. *Superlattices Microstruct.* 52 (4), 793–799, 2012.
- [181] Xu, J., Yang, H., Fu, W., Du, K., Sui, Y., Chen, J., Zeng, Y., Li, M., Zou, G., Preparation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles by Sol-Gel Method. *J. Magn. Magn. Mater.* 309 (2), 307–311, 2007.
- [182] Petcharoen, K., Sirivat, A. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles via the Chemical Co-Precipitation Method. *Mater. Sci. Eng. B*

Solid-State Mater. Adv. Technol. 177 (5), 421–427, 2012.

- [183] Lopez, J. A., González, F., Bonilla, F. A., Zambrano, G., Gómez, M. E., Synthesis and characterization of Fe₃O₄ magnetic nanofluid. *Rev. Latinoam. Metal. Mater.* 30 (60), 60–66, 2010.
- [184] Wei, Y., Han, B., Hu, X., Lin, Y., Wang, X., Deng, X. Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and Their Magnetic Properties. *Procedia Eng.* 27 (2011), 632–637, 2012.
- [185] Mizutani, N., Iwasaki, T., Watano, S., Yanagida, T., Tanaka, H., Kawai, T. Effect of Ferrous / Ferric Ions Molar Ratio on Reaction Mechanism for Hydrothermal Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *October 31 (5)*, 713–717, 2008.
- [186] Takami, S., Sato, T., Mousavand, T., Ohara, S., Umetsu, M., Adschiri, T. Hydrothermal Synthesis of Surface-Modified Iron Oxide Nanoparticles. *Mater. Lett.* 61 (26), 4769–4772, 2007.
- [187] Maity, D., Choo, S. G., Yi, J., Ding, J., Xue, J. M., Synthesis of Magnetite Nanoparticles via a Solvent-Free Thermal Decomposition Route. *J. Magn. Magn. Mater.* 321 (9), 1256–1259, 2009.
- [188] Chin, S., Pang, S., Tan, C., Green Synthesis of Magnetite Nanoparticles (via Thermal Decomposition Method) with Controllable Size and Shape. *J. Mater. ...* 2 (3), 299–302, 2011.

- [189] Pang, S. C., Khoh, W. H., Chin, S. F., Synthesis and Characterization of Magnetite/Carbon Nanocomposite Thin Films for Electrochemical Applications. *J. Mater. Sci. Technol.* 27 (10), 873–878, 2011.
- [190] Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P., Herrasti, P., Magnetite Nanoparticles: Electrochemical Synthesis and Characterization. *Electrochim. Acta* 53 (8), 3436–3441, 2008.
- [191] Wu, S., Sun, A., Zhai, F., Wang, J., Xu, W., Zhang, Q., Volinsky, A. A., Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Synthesis from Tailings by Ultrasonic Chemical Co-Precipitation. *Mater. Lett.* 65 (12), 1882–1884, 2011.
- [192] Wan, J., Cai, W., Meng, X., Liu, E., Monodisperse Water-Soluble Magnetite Nanoparticles Prepared by Polyol Process for High-Performance Magnetic Resonance Imaging. *Chem. Commun. (Camb)*. 4 (47), 5004–5006, 2007.
- [193] Maity, D., Kale, S. N., Kaul-Ghanekar, R., Xue, J. M., Ding, J. Studies of Magnetite Nanoparticles Synthesized by Thermal Decomposition of Iron (III) Acetylacetonate in Tri(ethylene Glycol). *J. Magn. Magn. Mater.* 321 (19), 3093–3098, 2009.
- [194] Liu, H. L., Ko, S. P., Wu, J. H., Jung, M. H., Min, J. H., Lee, J. H., An, B. H., Kim, Y. K. One-Pot Polyol Synthesis of Monosize PVP-Coated Sub-5 Nm Fe₃O₄ Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Magn. Magn. Mater.* 310, 815–817, 2007.

- [195] Salem, N. M., Awwad, A. M. A Novel Approach for Synthesis Magnetite Nanoparticles at Ambient Temperature. *Nanosci. Nanotechnol.* 3 (3), 35–39, 2013.
- [196] Cong, H.-P., He, J.-J., Lu, Y., Yu, S.-H. Water-Soluble Magnetic-Functionalized Reduced Graphene Oxide Sheets: In Situ Synthesis and Magnetic Resonance Imaging Applications. *Small* 6 (2), 169–173, 2010.
- [197] Ocsoy, I., Isiklan, N., Cansiz, S., Özdemir, N., Tan, W., ICG-Conjugated Magnetic Graphene Oxide for Dual Photothermal and Photodynamic Therapy. *RSC Adv.* 6 (36), 30285–30292, 2016.
- [198] Swain, A. K., Pradhan, L., Bahadur, D., Polymer Stabilized Fe₃O₄-Graphene as an Amphiphilic Drug Carrier for Thermo-Chemotherapy of Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (15), 8013–8022, 2015.
- [199] Justin, R., Chen, B., Characterisation and Drug Release Performance of Biodegradable Chitosan-Graphene Oxide Nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 103 (1), 70–80, 2014.
- [200] Isiklan, N., Küçükbalcı, G., Microwave-Induced Synthesis of Alginate – Graft-Poly (N -Isopropylacrylamide) and Drug Release Properties of Dual pH- and Temperature-Responsive Beads. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82, 316–331, 2012.
- [201] Türk, M., Rzayev, Z. M. O., Khalilova, S. A., Bioengineering Functional Copolymers. XIV. Synthesis and Interaction of poly(N-Isopropylacrylamide-Co-

- 3,4-Dihydro-2H-Pyran-Alt-Maleic Anhydride)s with SCLC Cancer Cells. *Bioorganic Med. Chem.* 18 (22), 7975–7984, 2010.
- [202] Mirahmadi, F., Tafazzoli-Shadpour, M., Shokrgozar, M. A., Bonakdar, S., Enhanced Mechanical Properties of Thermosensitive Chitosan Hydrogel by Silk Fibers for Cartilage Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 33 (8), 4786–4794, 2013.
- [203] Vega-Chacón, J., Picasso, G., Avilés-Félix, L., Jafelicci, M., Influence of Synthesis Experimental Parameters on the Formation of Magnetite Nanoparticles Prepared by Polyol Method. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (1), 15014, 2016.
- [204] Fan, X., Jiao, G., Zhao, W., Jin, P., Li, X., Magnetic Fe₃O₄-Graphene Composites as Targeted Drug Nanocarriers for pH-Activated Release. *Nanoscale* 5 (3), 1143–1152, 2013.
- [205] Chen, Y., Xu, P., Shu, Z., Wu, M., Wang, L., Zhang, S., Zheng, Y., Chen, H., Wang, J., Li, Y., Sh' J., Multifunctional Graphene Oxide-Based Triple Stimuli-Responsive Nanotheranostics. *Adv. Funct. Mater.* 24 (28), 4386–4396, 2014.
- [206] Shan, Y., Xu, X., Chen, K., Gao, L., Preparation and Characterization of Magnetic Graphene Oxide. *Adv. Mater. Res.* 774, 532–535, 2013.
- [207] Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., Kim, S.-J., The Chemical and

- Structural Analysis of Graphene Oxide with Different Degrees of Oxidation. Carbon 5, 38–49, 2013.
- [208] Chin, S. F., Iyer, K. S., Raston, C. L., Fabrication of Carbon Nano-Tubes Decorated with Ultra Fine Superparamagnetic Nano-Particles under Continuous Flow Conditions. Lab. Chip 8 (3), 439–442, 2008.
- [209] Wang, G., Chen, G., Wei, Z., Dong, X., Qi, M. Multifunctional Fe₃O₄/graphene Oxide Nanocomposites for Magnetic Resonance Imaging and Drug Delivery. Mater. Chem. Phys. 141 (2–3), 997–1004, 2013.
- [210] Cai, Wei and Wan, J., Facile Synthesis of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles in Liquid Poyols. J. Colloid Interface Sci. 305, 366–370, 2007.
- [211] Liu, F., Niu, F., Peng, N., Su, Y., Yang, Y., Synthesis, Characterization, and Application of Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ Nanoparticles. RSC Adv. 5 (23), 18128–18136, 2015.
- [212] Shete, P. B., Patil, R. M., Ningthoujam, R. S., Ghosh, S. J., Pawar, S. H., Magnetic Core-shell Structures for Magnetic Fluid Hyperthermia Therapy Application. New J. Chem. 37 (11), 3784-3792, 2013.
- [213] Sarkar, A., Biswas, S. K., Pramanik, P., Design of a New Nanostructure Comprising Mesoporous ZrO₂ Shell and Magnetite Core (Fe₃O₄@mZrO₂) and Study of Its Phosphate Ion Separation Efficiency. J. Mater. Chem. 20 (21), 4417-4424, 2010.

- [214] Arias, J. L., Reddy, L. H., Couvreur, P., Fe₃O₄/chitosan Nanocomposite for Magnetic Drug Targeting to Cancer. *J. Mater. Chem.* 22 (15), 7622-7632, 2012.
- [215] Yin, T., Huang, P., Gao, G., Shapter, J. G., Shen, Y., Sun, R., Yue, C., Zhang, C., Liu, Y., Zhou, S., et al. Superparamagnetic Fe₃O₄-PEG2K-FA@Ce6 Nanoprobes for in Vivo Dual-Mode Imaging and Targeted Photodynamic Therapy. *Sci. Rep.* 6, 36187, 2016.
- [216] Sneha, M., Sundaram, M., Preparation and Characterization of an Iron Oxide-Hydroxyapatite Nanocomposite for Potential Bone Cancer Therapy. *Int. J. Nanomedicine* 99–106, 2015.
- [217] Sundar, S., Mariappan, R., Piraman, S., Synthesis and Characterization of Amine Modified Magnetite Nanoparticles as Carriers of Curcumin-Anticancer Drug. *Powder Technol.* 266, 321–328, 2014.
- [218] Vuong, T. K. O., Tran, D. L., Le, T. L., Pham, D. V., Pham, H. N., Ngo, T. H. Le, Do, H. M., Nguyen, X. P., Synthesis of High-Magnetization and Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles via Thermal Decomposition. *Mater. Chem. Phys.* 163 (March), 537–544, 2015.
- [219] Bhuvaneswari, S., Pratheeksha, P. M., Anandan, S., Rangappa, D., Gopalan, R., Rao, T. N., Efficient Reduced Graphene Oxide Grafted Porous Fe₃O₄ Composite as a High Performance Anode Material for Li-Ion Batteries. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (11), 5284-5294, 2014.

- [220] Paredes, J. I., Villar-Rodil, S., Solís-Fernández, P., Martínez-Alonso, A., Tascón, J. M. D., Atomic Force and Scanning Tunneling Microscopy Imaging of Graphene Nanosheets Derived from Graphite Oxide. *Langmuir* 25 (10), 5957–5968, 2009.
- [221] Gilje, S., Kaner, R. B., Wallace, G. G., Li, D. A. N., Mu, M. B., Muller, M. B., Gilje, S., Kaner, R. B., Wallace, G. G., Processable Aqueous Dispersions of Graphene Nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* 3 (2), 101–105, 2008.
- [222] Xie, G., Xi, P., Liu, H., Chen, F., Huang, L., Shi, Y., Hou, F., Zeng, Z., Shao, C., Wang, J., A Facile Chemical Method to Produce Superparamagnetic Graphene Oxide-Fe₃O₄ Hybrid Composite and Its Application in the Removal of Dyes from Aqueous Solution. *J. Mater. Chem.* 22 (3), 1033–1039, 2012.
- [223] Ciszewski, M., Mianowski, A., Nawrat, G., Szatkowski, P. Reduced Graphene Oxide Supported Antimony Species for High-Performance Supercapacitor Electrodes. *ISRN Electrochem.* 2014, 1–7, 2014.
- [224] Urbas, K., Aleksandrak, M., Jedrzejczak, M., Jedrzejczak, M., Rakoczy, R., Chen, X., Mijowska, E., Chemical and Magnetic Functionalization of Graphene Oxide as a Route to Enhance Its Biocompatibility. *Nanoscale Res. Lett.* 9 (1), 656, 2014.
- [225] Fu, C., Zhao, G., Zhang, H., Li, S., A Facile Route to Controllable Synthesis of Fe₃O₄ / Graphene Composites and Their Application in Lithium-Ion Batteries. *J. Electrochem. Sci* 9, 46–60, 2014.

- [226] Yu, L., Wu, H., Wu, B. Magnetic Fe₃O₄-Reduced Graphene Oxide Nano-Composites-Based Electrochemical Biosensing. *Nano Micro Lett.* 6 (3), 258–267, 2014.
- [227] Ferrari, A. C., Meyer, J. C., Scardaci, V., Casiraghi, C., Lazzeri, M., Mauri, F., Piscanec, S., Jiang, D., Novoselov, K. S., Roth, S., et al. Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. *Phys. Rev. Lett.* 97 (18), 1-6, 2006.
- [228] Jin, Z., McNicholas, T. P., Shih, C. J., Wang, Q. H., Paulus, G. L. C., Hilmer, A. J., Shimizu, S., Strano, M. S., Click Chemistry on Solution-Dispersed Graphene and Monolayer CVD Graphene. *Chem. Mater.* 23 (14), 3362–3370, 2011.
- [229] Nadeem, M., Ahmad, M., Akhtar, M. S., Shaari, A., Riaz, S., Naseem, S., Masood, M., Saeed, M. A., Magnetic Properties of Polyvinyl Alcohol and Doxorubicine Loaded Iron Oxide Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery Applications. *PLoS One* 11 (6), 2016.
- [230] Wahajuddin, Arora, S., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetic Nanoplatfroms as Drug Carriers. *Int. J. Nanomedicine* 7, 3445–3471, 2012.
- [231] Ji, Z., Shen, X., Song, Y., Zhu, G., In Situ Synthesis of Graphene/cobalt Nanocomposites and Their Magnetic Properties. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 176 (9), 711–715, 2011.
- [232] Yadav, M., Rhee, K. Y., Park, S. J., Hui, D., Mechanical Properties of Fe₃O₄/GO/chitosan Composites. *Compos. Part B Eng.* 66, 89–96, 2014.

- [233] Miao, W., Shim, G., Lee, S., Lee, S., Choe, Y. S., Oh, Y. K., Safety and Tumor Tissue Accumulation of Pegylated Graphene Oxide Nanosheets for Co-Delivery of Anticancer Drug and Photosensitizer. *Biomaterials* 34 (13), 3402–3410, 2013.
- [234] Tian, Y., Yu, B., Li, X., Li, K., Facile Solvothermal Synthesis of Monodisperse Fe₃O₄ Nanocrystals with Precise Size Control of One Nanometre as Potential MRI Contrast Agents. *J. Mater. Chem.* 21 (8), 2476-2481, 2011.
- [235] Mishra, R. K., Datt, M., Banthia, A. K. Synthesis and Characterization of pectin/PVP Hydrogel Membranes for Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech* 9 (2), 395–403, 2008.
- [236] Umoren, S. A., Obot, I. B., Madhankumar, A., Gasem, Z. M., Performance Evaluation of Pectin as Ecofriendly Corrosion Inhibitor for X60 Pipeline Steel in Acid Medium: Experimental and Theoretical Approaches. *Carbohydr. Polym.* 124, 280–291, 2015.
- [237] Thi Tran, T. T., Thi Le, H. N., Van Tran, H., Thi Tran, L., Thi Vu, T. H., Tithonia Diversifolia Pectin – Reduced Graphene Oxide and Its Cytotoxic Activity. *Mater. Lett.* 183, 127–130, 2016.
- [238] Kadam, A. A., Jang, J., Lee, D. S., Facile Synthesis of Pectin-Stabilized Magnetic Graphene Oxide Prussian Blue Nanocomposites for Selective Cesium Removal from Aqueous Solution. *Bioresour. Technol.* 216 (September 2016), 391–398,

2016.

- [239] Ebrahimi, E., Akbarzadeh, A., Abbasi, E., Khandaghi, A. A., Abasalizadeh, F., Davaran, S., Novel Drug Delivery System Based on Doxorubicin-Encapsulated Magnetic Nanoparticles Modified with PLGA-PEG₁₀₀₀ Copolymer. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 44 (1), 290–297, 2016.
- [240] Yang, C., Xu, L., Zhou, Y., Zhang, X., Huang, X., Wang, M., Han, Y., Zhai, M., Wei, S., Li, J., A Green Fabrication Approach of gelatin/CM-Chitosan Hybrid Hydrogel for Wound Healing. *Carbohydr. Polym.* 82 (4), 1297–1305, 2010.
- [241] Singh, B. R., DeOliveira, D. B., Fu, F.-N., Fuller, M. P., Fourier Transform Infrared Analysis of Amide III Bands of Proteins for the Secondary Structure Estimation. *Biomol. Spectrosc.* III 1890, 47–55, 1993.
- [242] Kong, J., Yu, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assignment. 39 (8), 549–559, 2007.
- [243] Karthika, A., Kavitha, L., Surendiran, M., Kannan, S., Gopi, D., Fabrication of Divalent Ion Substituted Hydroxyapatite/gelatin Nanocomposite Coating on Electron Beam Treated Titanium: Mechanical, Anticorrosive, Antibacterial and Bioactive Evaluations. *RSC Adv.* 5 (59), 47341–47352, 2015.
- [244] Jalaja, K., Sreehari, V. S., Kumar, P. R. A., Nirmala, R. J., Graphene Oxide Decorated Electrospun Gelatin Nanofibers: Fabrication, Properties and

Applications. Mater. Sci. Eng. C 64 (July), 11–19, 2016.

- [245] K, J., Naskar, D., Kundu, S. C., James, N. R., Fabrication of Cationized Gelatin Nanofibers by Electrospinning for Tissue Regeneration. RSC Adv. 5 (109), 89521–89530, 2015.
- [246] Hossan, J., Gafur, M. A., Kadir, M. R., Mainul, M., Preparation and Characterization of Gelatin- Hydroxyapatite Composite for Bone Tissue Engineering. 57 (1), 113–122, 2014.
- [247] Chen, C. T., Huang, Y., Zhu, C. L., Nie, Y., Yang, J. Z., Sun, D. P., Synthesis and Characterization of Hydroxypropyl Cellulose from Bacterial Cellulose. Chinese J. Polym. Sci. (English Ed. 32 (4), 439–448, 2014.
- [248] Trivedi, M. K., Influence of Biofield Treatment on Physicochemical Properties of Hydroxyethyl Cellulose and Hydroxypropyl Cellulose. J. Mol. Pharm. Org. Process Res. 3 (2), 1-7, 2015.
- [249] Mianehrow, H., Moghadam, M. H. M., Sharif, F., Mazinani, S., Graphene-Oxide Stabilization in Electrolyte Solutions Using Hydroxyethyl Cellulose for Drug Delivery Application. Int. J. Pharm. 484 (1–2), 276–282, 2015.
- [250] Hsi, R. A., Rosenthal, D. I., Glatstein, E., Photodynamic Therapy in the Treatment of Cancer: Current State of the Art. Drugs 57 (5), 725–734, 1999.
- [251] Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P., Reynolds, J. V.,

Nanodrug Applications in Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 8 (1), 14–29, 2011.

- [252] Li, X., Wen, J., Jiang, J., Zhao, X., Zhou, T., Fan, G., Quantification of a Novel Photosensitizer of Chlorin e6-C15-Monomethyl Ester in Beagle Dog Plasma Using HPLC: Application to Pharmacokinetic Studies. *Molecules* 22 (5), 693–705, 2017.
- [253] Dong, H., Zhao, Z., Wen, H., Li, Y., Guo, F., Shen, A., Pilger, F., Lin, C., Shi, D., Poly(ethylene Glycol) Conjugated Nano-Graphene Oxide for Photodynamic Therapy. *Sci. China Chem.* 53 (11), 2265–2271, 2010.
- [254] Gladkova, O. L., Parkhats, M. V., Gorbachova, A. N., Terekhov, S. N. FTIR Spectra and Normal-Mode Analysis of Chlorin e6 and Its Degradation-Induced Impurities. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 76 (3–4), 388–394, 2010.
- [255] Bharathiraja, S., Moorthy, M. S., Manivasagan, P., Seo, H., Lee, K. D., Oh, J., Chlorin e6 Conjugated Silica Nanoparticles for Targeted and Effective Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 19 (May), 212–220. 2017.
- [256] Liu, Q., Jin, C., Wang, Y., Fang, X., Zhang, X., Chen, Z., Tan, W., Aptamer-Conjugated Nanomaterials for Specific Cancer Cell Recognition and Targeted Cancer Therapy. *NPG Asia Mater.* 6 (4), e95, 2014.

- [257] Sofias, A. M., Dunne, M., Storm, G., Allen, C., The Battle of “nano” paclitaxel. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016.
- [258] Donehower, R. C., The Clinical Development of Paclitaxel: A Successful Collaboration of Academia, Industry and the National Cancer Institute. *Stem Cells* 14 (1), 25–28, 1996.
- [259] Huizing, M. T., Misser, V. H., Pieters, R. C., ten Bokkel Huinink, W. W., Veenhof, C. H., Vermorken, J. B., Pinedo, H. M., Beijnen, J. H., Taxanes: A New Class of Antitumor Agents. *Cancer investigation*. 13(4) 381–404, 1995.
- [260] Vasanti, S., Preeti, S., Paclitaxel Nanoparticles - An Approach to Improve the Bioavailability. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 27 (1), 200–208, 2014.
- [261] Martins, K. F., Messias, A. D., Leite, F. L., Duek, E. A. R., Preparation and Characterization of Paclitaxel-Loaded PLDLA Microspheres. *Mater. Res.* 17 (3), 650–656, 2014.
- [262] More, M. P., Patil, M. D., Pandey, A. P., Patil, P. O., Deshmukh, P. K., Fabrication and Characterization of Graphene-Based Hybrid Nanocomposite: Assessment of Antibacterial Potential and Biomedical Application. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 45 (8), 1496–1508, 2017.
- [263] Xu, Z., Wang, S., Li, Y., Wang, M., Shi, P., Huang, X. Covalent Functionalization of Graphene Oxide with Biocompatible Poly(ethylene Glycol)

- for Delivery of Paclitaxel. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (19), 17268–17276, 2014.
- [264] Rana, V. K., Choi, M. C., Kong, J. Y., Kim, G. Y., Kim, M. J., Kim, S. H., Mishra, S., Singh, R. P., Ha, C. S., Synthesis and Drug-Delivery Behavior of Chitosan-Functionalized Graphene Oxide Hybrid Nanosheets. *Macromol. Mater. Eng.* 296 (2), 131–140, 2011.
- [265] Muthoosamy, K., Bai, R. G., Manickam, S. Graphene and Graphene Oxide as a Docking Station for Modern Drug Delivery System. *Curr. Drug Deliv.* 11 (6), 701–718, 2014.
- [266] Mahapatra, C., Padala Narasimha Murthy, P. K. D., Sahoo, S. K., Anjan, Mahapatra, K., Monalisa, D., Statistical Approach in Designing , Formulation and Optimization of Paclitaxel Loaded Statistical Approach in Designing , Formulation and Optimization of Paclitaxel Loaded Mucoadhesive Microcapsules. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 5 (12), 2016.
- [267] Ahmad, J., Mir, S. R., Kohli, K., Chuttani, K., Mishra, A. K., Panda, A. K., Amin, S. Solid-Nanoemulsion Preconcentrate for Oral Delivery of Paclitaxel: Formulation Design, Biodistribution, and γ Scintigraphy Imaging. *Biomed Res. Int.* 2014, 1-13, 2014.
- [268] Hiremath, J. G., Khamar, N. S., Palavalli, S. G., Rudani, C. G., Aitha, R., Mura, P., Paclitaxel Loaded Carrier Based Biodegradable Polymeric Implants: Preparation and in Vitro Characterization. *Saudi Pharm. J.* 21 (1), 85–91, 2013.

- [269] Renuga Devi, T. S., Gayathri, S. FTIR And FT-Raman Spectral Analysis of Paclitaxel Drugs. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2 (2), 106–110, 2010.
- [270] Central, P., PLGA / TPGS Nanoparticles for Controlled Release of Paclitaxel : Effects of the Emulsifier and Drug Loading Ratio. *Pharm. Res.* 20 (11), 1864–1872, 2003.
- [271] Brittain, H.G., Profiles of drug substances, excipients, and related methodology, 1st ed., FLOREY, K., Ed., els: Milford, New Jersey 08848, 2009.
- [272] Zhang, B., Yang, X., Wang, Y., Zhai, G. Heparin Modified Graphene Oxide for pH-Sensitive Sustained Release of Doxorubicin Hydrochloride. *Mater. Sci. Eng. C*, 75, 198–206, 2017.
- [273] Huang, Y., Lu, Y., Chen, J., Magnetic Graphene Oxide as a Carrier for Targeted Delivery of Chemotherapy Drugs in Cancer Therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* No. June, 34–40, 2016.
- [274] Patil, R., Portilla-Arias, J., Ding, H., Konda, B., Rekechenetskiy, A., Inoue, S., Black, K. L., Holler, E., Ljubimova, J. Y., Cellular Delivery of Doxorubicin via pH-Controlled Hydrazone Linkage Using Multifunctional Nano Vehicle Based on poly(Cellular Delivery of Doxorubicin via pH-Controlled Hydrazone Linkage Using Multifunctional Nano Vehicle Based Poly(β -L-Malic Acid). *Int. J. Mol. Sci.* 13 (9), 11681–11693, 2012.

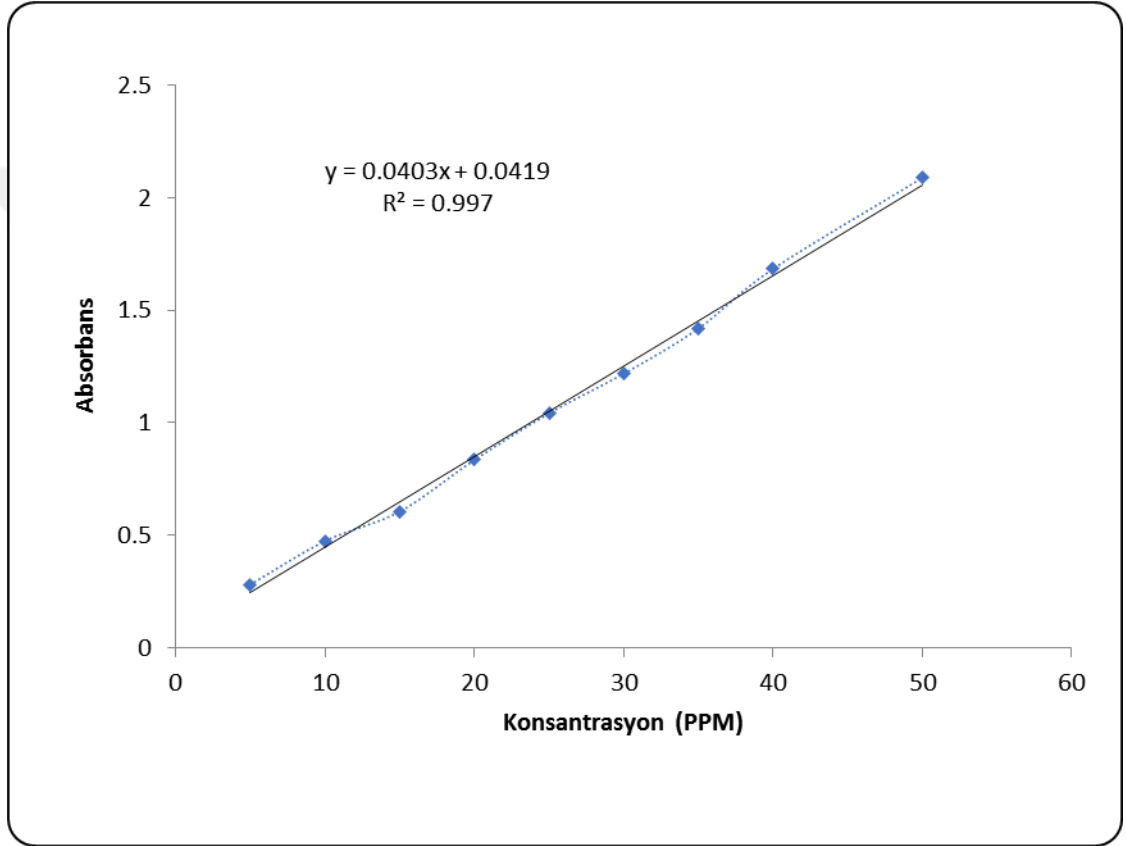
- [275] Chouhan, R., Bajpai, A., Real Time in Vitro Studies of Doxorubicin Release from PHEMA Nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* 7 (5) 1-12, 2009.
- [276] Somanathan, T., Krishna, V. M., Saravanan, V., Kumar, R., Kumar, R. MgO Nanoparticles for Effective Uptake and Release of Doxorubicin Drug: pH Sensitive Controlled Drug Release. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 1–11, 2016.
- [277] Depan, D., Shahan, J., Misra, R. D., Controlled Release of Drug from Folate-Decorated and Graphene Mediated Drug Delivery System: Synthesis, Loading Efficiency, and Drug Release Response. *Mater. Sci. Eng. C* No. 31, 1305–1312, 2011.
- [278] Xu, J., Ma, L., Liu, Y., Xu, F., Nie, J., Ma, G., Design and Characterization of Antitumor Drug Paclitaxel-Loaded Chitosan Nanoparticles by W/O Emulsions. *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2), 438–443, 2012.
- [279] Khoee, S., Bafkary, R., Fayyazi, F., DOX Delivery Based on Chitosan-Capped Graphene Oxide-Mesoporous Silica Nanohybride as pH-Responsive Nanocarriers. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 81 (2), 493–504, 2017.
- [280] Cheng, J. P., Ma, R., Shi, D., Liu, F., Zhang, X. B., Rapid Growth of Magnetite Nanoplates by Ultrasonic Irradiation at Low Temperature. *Ultrason. Sonochem.* 18 (5), 1038–1042, 2011.
- [281] Huang, Y., Lu, Y., Chen, J., Magnetic Graphene Oxide as a Carrier for Targeted Delivery of Chemotherapy Drugs in Cancer Therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* 427

(June), 34–40, 2016.

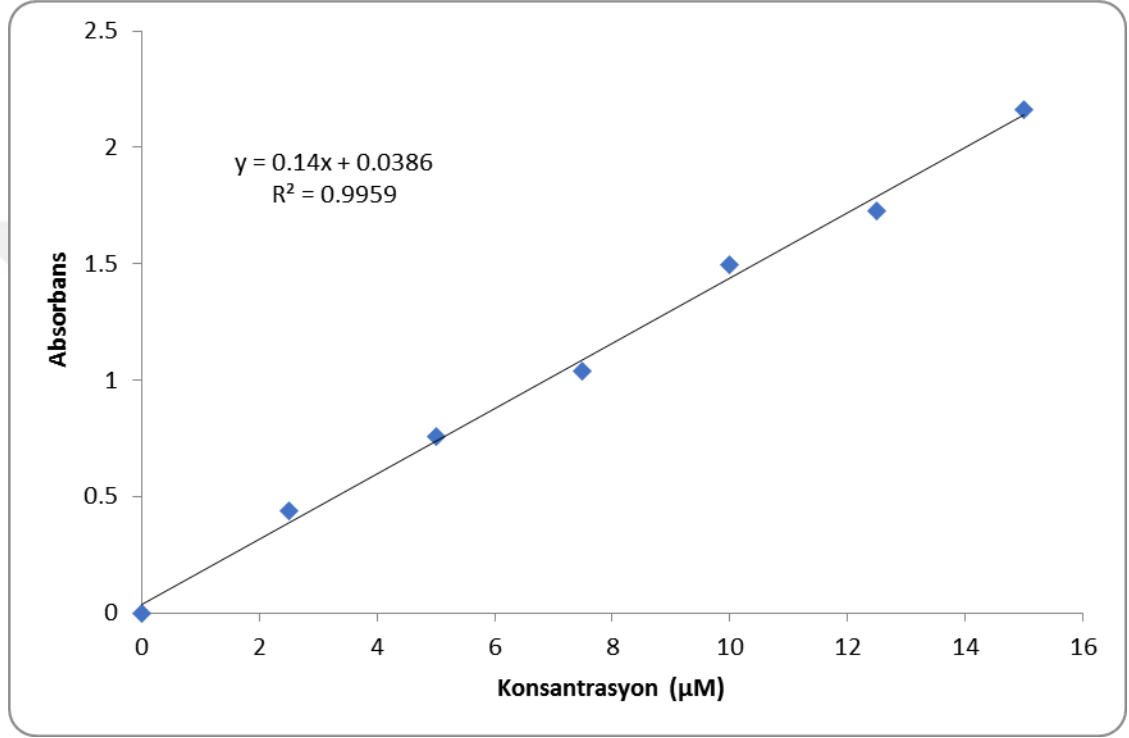
- [282] Fink, S. L., Cookson, B. T., Fink, S. L., Cookson, B. T. Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* 73 (4), 1907–1916, 2005.
- [283] Jiang, F., Liu, B., Lu, J., Li, F., Li, D., Liang, C., Dang, L., Liu, J., He, B., Badshah, S. A., Lu, C., He, X., Guo, B., Zhang, X.B., Tan, B., Lu, A., Zhang, G., Progress and Challenges in Developing Aptamer-Functionalized Targeted Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (10), 23784–23822, 2015.

EKLER

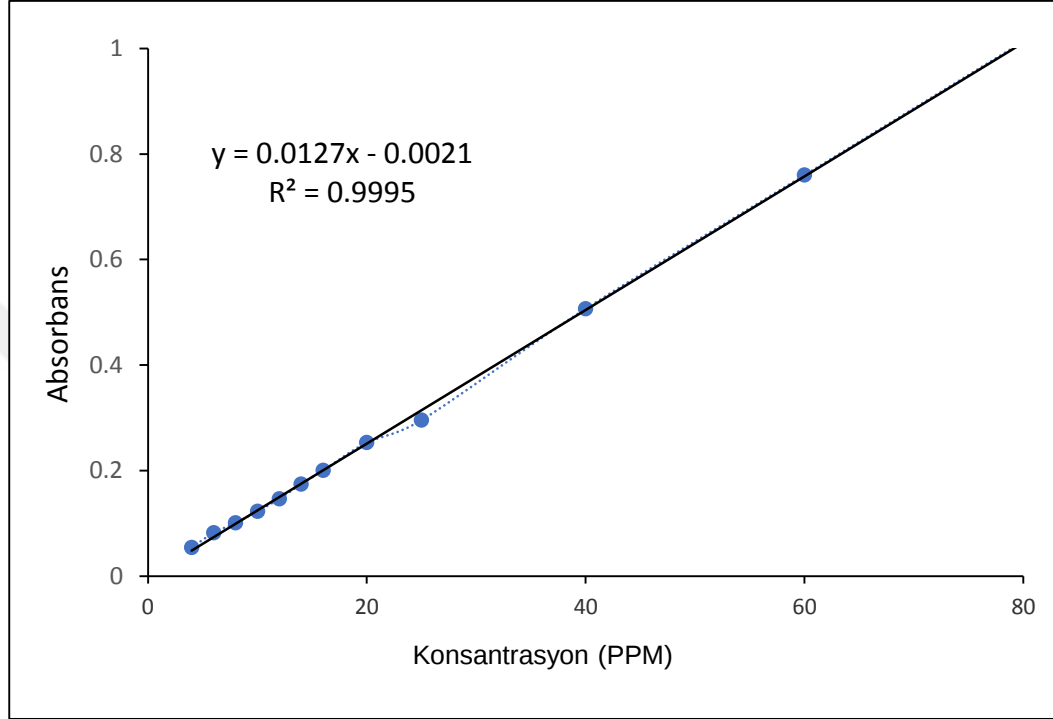
EK. 1. Paklitaksel'in kalibrasyon eğrisi



EK. 2. Klorin e6'nın kalibrasyon eğrisi



EK.3. Doksorubisin'in kalibrasyon eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nizamudin Awel HUSSIEN

Doğum Tarihi : 1983

Yabancı Dil : İngilizce

: Türkçe

Eğitim Durumu

Lisans : Jimma Üniversitesi (2006)

Yüksek Lisans : Haramaya Üniversitesi (2011)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar

: Dire-Dawa Üniversitesi (2006- 2012)

Yayınları (SCI)

Nizamudin Awel Hussien, Nuran Işıklan & Mustafa Türk (2018). Pectin-conjugated magnetic graphene oxide nanohybrid as a novel drug carrier for paclitaxel delivery. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, DOI: 10.1080/21691401.2017.1421211

Nizamudin Awel Hussien, Nuran Işıklan & Mustafa Türk (2018). Aptamer-functionalized magnetic graphene oxide nanocarrier for targeted drug delivery of paclitaxel. Material Chemistry and Physics, 221, 479-488.

Nizamudin A. Hussien, Ahmed M. Mohammed, M. Tessema, F. B. Dejene, Mesfin Redi-Abshiro (2012). Solvent Polarity and Excitation Wavelength Dependence of the Dual Fluorescence in *N, N*-Diethyl-4-Nitrosoaniline. Journal of Fluorescence 22 (1) 451–456.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler :

Nizamudin Awel HUSSEIN, Nuran IŞIKLAN and Mustafa Türk (2017). Aptamer Conjugated Graphene Oxide Based Nanocarrier for Specific Targeting MCF-7 Cancer Cell. 13th Nanoscience & Nanotechnology Conference (NanoTR-13), BIO OR-15-2433.

Nizamudin Awel HUSSEIN, Nuran IŞIKLAN and Mustafa Türk (2017). Multifunctional Pectin-Conjugated Magnetic Graphene Oxide Nanocarrier for the Treatment of Cancer. 13th Nanoscience & Nanotechnology Conference (NanoTR-13), BIO P-07-2434.

Araştırma Alanları

Nanomalzeme, İlaç salım, Polimer, Biyomalzeme karakterizasyonu, Floresans, Teorik bilişimsel hesaplamalar