



EGE ÜNİVERSİTESİ



DOKTORA TEZİ

**GÖRÜNTÜLEME KILAVUZLU VE TEDAVİYE
YÖNELİK NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE
IN VITRO UYGULAMALARI**

Bilal DEMİR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 06.09.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**GÖRÜNTÜLEME KILAVUZLU VE TEDAVİYE
YÖNELİK NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE
IN VITRO UYGULAMALARI**

Bilal DEMİR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 06.09.2017

Bornova-İZMİR

2017

Bilal DEMİR tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Görüntüleme Kılavuzlu ve Tedaviye Yönelik Nanoparçacıkların Sentezi ve *in vitro* Uygulamaları” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06/09/2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Suna Timur
Raportör Üye	: Doç. Dr. Dilek Odacı Demirkol
Üye	: Prof. Dr. Sarhan Sakarya
Üye	: Prof. Dr. Perihan Ünak
Üye	: Doç. Dr. Mustafa Emrullahoğlu

İmza


.....

.....

.....

.....

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Görüntüleme Kılavuzlu ve Tedaviye Yönelik Nanoparçacıkların Sentezi ve *in vitro* Uygulamaları” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07 / 09 / 2017

İmzası

Bilal DEMİR

ÖZET**GÖRÜNTÜLEME KILAVUZLU VE TEDAVİYE YÖNELİK
NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE *IN VITRO*
UYGULAMALARI**

DEMİR, Bilal

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Eylül 2017, 142 sayfa

Biyomedikal uygulamalardaki büyüyen ihtiyaca yönelik olarak multifonksiyonel nanopartiküllerin diğer bir tanımla tek bir partikülde hem tedavi hem de diyagnoz özelliği taşıyan teranostiklerin gelişimi hızlanmıştır. Bu bağlamda teranostiklerin etkin hücre alımını sağlamak için çeşitli kompozisyon ve biyokonjugasyonlar ile görüntüleme kılavuzlu terapi amacıyla birçok stratejiye başvurulmuştur. Bu tez projesinde, multifonksiyonel nanopartiküller, yenilikçi teranostikler olarak tasarlandı ve sentezlendi. Genel tasarım olarak, teranostiklere yönelik sentez stratejileri dünyada en çok mortalitenin ikinci görüldüğü hastalığa ilişkin olarak kanserli hücre hatlarına göre planlanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan ana nanopartiküller, yüzey modifikasyonu, polimer kaplama, enkapsülasyon ve folik asit ya da antikör ile biyokonjugasyonu ile yapılan ileri işlevselliğe ve hedefleme kabiliyetine sahip altın nanopartiküller (AuNP), karbon noktalar (CD) ve lipozomlar ve niozomları gibi veziküler sistemlerdir. Bunun için, fonksiyonel polimer kaplı AuNP'ler, FA bağlanmış niozomlar ve anti-CD44 bağlı lipozomlar ve bununla beraber moleküler baskılanmış polimer kaplı CD'ler çalışılmıştır. Tüm nanopartiküllerin sentezi sonrasında, ilgili karakterizasyon ve takibinde *in vitro* hücre temelli çalışmalar teranostiklerin toksisite, hücre alımı, biyogörüntüleme ve kemo/radyo- ya da fotodinamik terapi uygulamaları ile multimodal özellikleri incelenmiştir. Tez kapsamında elde edilen tüm sonuçlar, bu fütüristik partiküllerin aydınlatılmış karakteristikleri ve artırılmış biyokimyasal performansları sayesinde klinik amaçlar doğrultusunda etkin araçlar olabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: Teranostikler, multifonksiyonel nanopartiküller, multimodal terapi, biyogörüntüleme, biyokonjugasyon

ABSTRACT

**SYNTHESIS OF MONITORING MEDIATED AND THERAPY
ORIENTED NANOPARTICLES AND *IN VITRO* APPLICATIONS**

DEMİR, Bilal

Ph.D in Biochemistry.

Supervisor: Prof. Dr. Suna TİMUR

September 2017, 142 pages

Growing needs in biomedical applications have driven the development of multifunctional nanoparticles in other terms of theranostically engineered nanoparticles that carry both therapeutic and diagnostic properties in a single nanoparticle structure. In this regard, many strategies to point effective cellular uptake of theranostics have been approved *via* various assembling and bioconjugate architectures in the way of imaging guided targeted therapy. In this thesis project, multifunctional nanoparticles are designed and synthesized as novel theranostics. For the general concept, the synthesis strategies of theranostics were planned according to cancerous cell lines which the disease causes the most second mortality in the world. The main nanoparticles used in the thesis consist of gold nanoparticles (AuNPs), carbon dots (CDs) and vesicular systems such as liposomes and niosomes as their post-functionalization by polymer coatings, surface passivations, encapsulations and bioconjugations with folic acid (FA) and antibodies to generate efficient targeting for those theranostics. For this, functional polymer coated AuNPs, FA tagged niosomes and anti-CD44 tagged liposomes by incorporating various bioactive structures as well as molecularly imprinted polymer coated CDs to be used in active targeting and monitoring of cancer cells were studied. After the synthesis part of all those multifunctional particles, relative characterizations and the following *in vitro* cell-based studies were conducted to investigate the multimodal properties of the theranostics by toxicity, cell uptake, bioimaging and chemo/radio- or photodynamic therapy applications. Whole results indicate that those futuristic particles can be efficient tools for the clinical purposes with their illuminated characteristics and increased bioperformances.

Keywords: Theranostics, multifunctional nanoparticles, multimodal therapy, bioimaging, bioconjugation.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, üretme ve sorun çözme becerisini kazandıran, tezimin biçimlendirilmesi ve yayınlanması aşamalarında bilgileri ile yol gösteren saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Suna TİMUR'a, her konuda bana destek olan ve yakın ilgisini esirgemeyen Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL'a deneysel kısımlardaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Zinar Pınar GÜMÜŞ ve Dr. Fırat Barış BARLAS'a teşekkür ederim. Ayrıca 5 senelik lisansüstü hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bu zorlu ve yoğun süreçte omuz omuza yürüdüğüm çalışma arkadaşım Dr. Öğr. Emine GÜLER ÇELİK'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Suna Timur Research Group kapsamında İrem, Güliz, Tülay, Serdar, Dr. Murat Yavuz, Betül, Fatma ve Özge sizlere de çok teşekkürler. Bu aşamaya gelmemde katkıları olan tüm Biyokimya'daki hocalarıma da teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan başta ablam Nurcan SEPİCİ ve AİLEM'in kalan üyelerine sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora aşamasındaki Compiègne Teknoloji Üniversitesi'ndeki 9 aylık çalışmalarım süresinde beni hiçbir zaman bilimsel ve sosyal açıdan yalnız bırakmayan sevgili "Brownie Team" üyeleri Dr. Maria PANAGIOTOPOULOU ve Dr. Öğr. Paulina Medina RANGEL'e, yanı sıra Nadja, Jingjing, Sofia, Mariano, Nicolas' a ve deneylerimde bilgisini eksik etmeyen Dr. Carlo GONZATO'ya ve Dr. Bernadette TSE SUM BUI'ye ve son olarak Fransa'da bana "Moleküler Baskılanmış Polimerler" alanında ikinci danışmanlığı yapan Prof. Dr. Karsten HAUPT'a ve kardeşim gibi gördüğüm ev arkadaşım Antony ROUHBAN'a tüm destekleri için gönülden teşekkür ediyorum.

Bu çalışma Ege Üniversitesi 17/FEN/007 no' lu bilimsel araştırma projesi (BAP) tarafından desteklenmektedir. Ayrıca doktora tezi sırasında destek alınan TÜBİTAK-BİDEB 2214/A Doktora Sırası Yurtdışı Destekleme Programı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Multifonksiyonel Nanopartiküller	2
1.2 Teranostik Nanopartiküller	3
1.2.1 Teranostiklerde kullanılan taşıyıcı nanopartiküller	6
1.2.2 Teranostiklerde kullanılan biyoaktif yapılar	26
1.2.3 Teranostiklerde hedefleme stratejileri	36
1.3 Tez Çalışmasının Amacı	43
2. MATERYAL VE METOT	44
2.1 Materyal	44

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2 Bölüm-1: "Polimer Kaplı Altın Nanopartiküller: Teranostikler İçin Fonksiyonel Yapılar"	45
2.2.1 PMAA kaplı AuNP lerin sentezi	45
2.2.2 pH-duyar özellikli AuNP-PMAA ve DOX konjugasyonu	46
2.2.3 AuNP-PMAA-Cys-DOX biyokonjugatlarının karakterizasyonu	47
2.2.4 <i>In vitro</i> ilaç salım çalışması	48
2.2.5 Hücre kültürü çalışmaları	49
2.3 Bölüm-2: "Folat Reseptörü Hedefli Multimodal Veziküler Teranostikler"	50
2.3.1 Tween 80-FA konjugasyonu	50
2.3.2 Niozomların hazırlanması.....	51
2.3.3 AuNP/Protoporfirin IX enkapsüle niozomların hazırlanması	51
2.3.4 Enkapsülasyon etkinliği.....	52
2.3.5 Karakterizasyon çalışmaları	52
2.3.6 Hücre kültür çalışmaları	53
2.4 Bölüm-3: " Kanser Tanısına Yönelik Moleküler Baskılanmış Polimer Problemlerinin Geliştirilmesi ve Biyo-görüntüleme Uygulamaları"	57
2.4.1 MIPGlcA-CD kompozitlerinin sentezi	58
2.4.2 MIPGlcA-CD lerin bağlanma etkinliği	59

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.3 MIPGlcA-CD lerin karakterizasyonu.....	60
2.4.4 Hücre kültür çalışmaları	60
2.5 Bölüm-4: "Teranostik Olarak Geliştirilmiş Multimodal Lipozomlar: Aktif Hedefli Kemo/Radyoterapötik Ajanlar"	61
2.5.1 Teranostik kurkumin/CD enkapsüle lipozomların hazırlanması.....	62
2.5.2 Teranostik lipozomların ve CD lerin karakterizasyonu	63
2.5.3 Enkapsülasyon etkinliği	64
2.5.4 Hücre kültürü çalışmaları	64
2.6 İstatistiksel Analizler.....	66
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	67
3.1 Bölüm-1: "Polimer Kaplı Altın Nanopartiküller: Teranostikler İçin Fonksiyonel Yapılar"	67
3.1.1 Karakterizasyon.....	67
3.1.2 Hücre kültürü çalışmaları	74
3.2 Bölüm-2: "Folat Reseptörü Hedefli Multimodal Veziküler Teranostikler"	78
3.2.1 Tween 80-FA nın sentezi	78
3.2.2 Niozom veziküllerinin karakterizasyonu	81
3.2.3 Hücre kültürü çalışmaları	83

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3 Bölüm-3: " Kanser Tanısına Yönelik Moleküler Baskılanmış Polimer Problemlerinin Geliştirilmesi ve Biyo-görüntüleme Uygulamaları"	86
3.3.1 CD lerin sentezi ve karakterizasyonu	86
3.3.2 MIPGlcA-CD lerin karakterizasyonu	89
3.3.3 Bağlanma kapasitesi	92
3.3.4 Hücre kültürü çalışmaları	92
3.4 Bölüm-4: "Teranostik Olarak Geliştirilmiş Multimodal Lipozomlar: Aktif Hedefli Kemo/Radyoterapötik Ajanlar"	97
3.4.1 Sentezlenen CD lerin karakterizasyonu	97
3.4.2 Teranostik lipozomların karakterizasyonu	100
3.4.3 Hücre kültürü çalışmaları	101
4. GENEL DEĞERLENDİRME	107
KAYNAKLAR DİZİNİ	108
ÖZGEÇMİŞ	131

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1. 1 Nanopartiküllerin uygulamaları.....	1
1. 2 Multifonksiyonel nanopartikül tasarımındaki temel bileşenler. (Milane et al., 2011 den alınmıştır.).....	3
1.3 Teranostik nanopartiküllerin şematik diyagramı. Bu tarz multifonksiyonel nanoparçacıklar ya farklı fonksiyonlara sahip nanokristalleri bir araya getirerek ya da farklı yüzey modifikasyon stratejileri ile fonksiyonel küçük molekül kargoları nanokristallerle birleştirerek geliştirilebilir. Anorganik nanokristaller için dört farklı yöntem kullanılmaktadır: (a) lipozom ya da misel enkapsülasyonu, (b) mezopor silika kaplama, (c) katmanlı halde kendiliğinden biraraya gelme ve (d) yüzey konjugasyonu. Kısaltmalar: GNP-altın nanopartiküller, HfO-hafniyum oksit nanopartikülleri, MNP-manyetik nanopartiküller, QD-kuantum noktalar, UCNP-Upconversion nanopartikülleri.	4
1. 4 Teranostik nanopartiküllerin tasarım ve sentezinde kullanılan nanotaşıyıcı türleri.....	6
1. 5 (a) Boyut ve tabakalarına göre değişiklik gösteren veziküller. (b) Vezikül çift katmanının yapısı (solda) ve fiziksel olarak enkapsüle edilebilen veya kimyasal konjuge edilebilen biyoaktif yapılar (sağda).	8
1. 6 Niozom bileşenleri.....	13
1. 7 Niozom hazırlanmasında en çok kullanılan sürfaktanlar.....	14
1. 8 İnce film hidrasyon ve sonikasyon yöntemiyle niozom hazırlama.	15
1. 9 (a) Hem terapötik hem de görüntüleme ajanı olarak kullanılabilen multimodal QD tasarımına ilişkin şematik gösterim. (b) İnsan vücudundaki ideal bir teranostik ajan için gerekenler: 1) retiküloendotelyal sistem (RES) arındırmasından kaçmalı, 2) Spesifik hücrelere hedefli olmalı, 3) Hücrelere girmeli, 4) Terapötik ajanı dağıtmalı ve 5) Muamelenin değerlendirilmesi.	16

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

1. 10 Multimodal teranostik QD lere ilişkin olası tasarımlar: (a) QD-Apt-DOX konjugatı eşzamanlı tanı ve tedavi imkanı sunabilen QD temelli bir teranostiktir. RNA aptameri hedefleme ajanı olarak kullanılmakla birlikte, DOX ise hem tedavi hem de bi-FRET etkisi gösterebilmektedir. Aptamer arasında yüklü olan DOX, QD ile birikirken floresans sönümlenmişken, salındığında hem QD hem de DOX ışıma yapabilirler. (b) QD lere ilişkin kapsamlı teranostik tasarım rehberi şeklindeki gösterim. Ayrıca sağdaki QD-lipozom hibrit yapıları ise teranostik tedavilerde yeni bir yüz olarak ortaya çıkmaktadır.17
1. 11 Farklı metalik nanopartiküller ve onlara ait yüzey modifikasyonları, ilaç yükleme, salım ve farklı terapi modalitelerinde kullanımını gösteren genel şema.18
1. 12 Soldan sağa boyutları artan AuNP koloidal solüsyonları.20
1. 13 AuNP lerin multifonksiyonel doğasını gösteren şema. a) Folik asit, antikorlar veya peptidler gibi aktif hedefleme ligandları AuNP'ye konjuge edilebilir. PEG gibi hidrofilik polimerler ile yüzey modifikasyonu pasif hedefleme özelliklerini geliştirebilir; b) Farklı biyoaktif molekül sınıfları, doku ve hücreleri hedeflemeyi hedef alanlarına değinmek için konjuge edilebilir veya AuNP'lerle birleştirilebilir.21
1. 14 Karbon yapıları nanomateriyallerin biyomedikal uygulamalarda teranostik ajan olarak kullanım özeti.23
1. 15 CD lerin kullanım alanları: Biyotıp, optronik, sensörler ve kataliz (Wang and Hu, 2014).24
1. 16 Hidrotermal teknikle sentezlenmiş CD ler ve iki farklı eksitasyon ışıması ile Fe analizi ve hücre görüntülemeye kullanımı (Chen et al., 2016).25
1. 17 a) CD-Oxa teranostik konjugatının şematik görüntüsü (Zheng et al., 2014). b) CD-PEI / Au-PEI / pDNA kullanılarak monte edilen nano-hibridleri kullanarak hücreye naklinin gerçek zamanlı izlenmesi ve gen aktarımı için şematik bir resim (Kim et al., 2013).26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
1. 18 DOX un moleküler yapısı ve ticari intravenöz kullanım preparatı.....	27
1. 19 Radyoterapötik etkinin artırılmasında kullanılan nanopartiküller.	31
1. 20 İndirekt radyasyon terapisi ile hedef materyal üzerinde ikincil radyasyon ürünlerinin oluşması sonrası kanser hücrelerinin inaktivasyonu (http://www.mpsd.de/irt/IRT.html).	31
1. 21 Klinik veya klinik öncesi araştırmalarda seçilmiş fotosensitivatörlerin isimleri ve yapıları. Bunlardan üçü klinik PDT için düzenleyici onay aldı: Photofrin; Benzoporfirin türevi (Verteporfirin); ve PpIX un metabolik öncüsü olan aminolevulinik asit (Levulan).	33
1. 22 Uyarıcı cevaplayıcı silikon NP temelli PpIX teranostik ajanı ve kanser hücrelerine PDT uygulaması (Vivero-Escoto and Vega, 2014).....	34
1. 23 Kurkumin ve doğada bulunan analogları.....	35
1. 24 Dual reseptör hedefli kurkumin enkapsüle konjugatın kanser hücreleri üzerinde etkisinin şematik gösterimi (Song et al., 2017).	36
1. 25 Multifonksiyonel nanopartiküllerde aktif hedeflemede kullanılan yüzey modifikasyon ajanları.	38
1. 26 Direkt konjugasyon tekniğine dayalı yüzey modifikasyon yöntemleri.	39
1. 27 Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması.	40
1. 28 MIP yapılarının biyoteknolojideki kullanım alanları.	41
1. 29 Floresans işaretli MIP problemlerinin aktif hedefli görüntüleme çalışmalarındaki potansiyelini gösteren şema.	43
2. 1 MAA nın RAFT polimerizasyonu ve AuNP-PMAA nın sentezi.	46
2. 2 AuNP-PMAA-Cys-DOX partiküllerinin konjugasyon reaksiyonları.....	47
2. 3 Hücrelere iyonize radyasyon uygulamak için kullanılan LINAK.	55
2. 4 Steril kabin içerisinde hücrelere FDT uygulanması.	55

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
2. 5 Hücre görüntülerinin daha iyi alınabilmesi için kullanılan 8 kuyucuklu chamber slidelar.....	57
2. 6 MIPGlcA-CD kompozitlerinin UV irradiasyon ile sentezi.....	59
2. 7 Kurkumin/CD/anti-CD44 teranostik lipozomlarının şekilsel gösterimi.	63
3. 1 A) PMAA kaplı AuNP lerin TEM görüntüsü; B) AuNP ve PMAA kaplı AuNP (AuNP-PMAA) lerin partikül boyut ölçümleri.	68
3. 2 AuNP ve AuNP-PMAA ların A) UV-Vis spektroskopik karakterizasyonu ve B) Termal gravimetrik analiz (TGA) ölçümleri.	69
3. 3 Sistein (Cys) ve Doxorubicin (DOX) ile yapılan pH-sensitive konjugasyonun (AuNP- PMAA-Cys-DOX) UV-Vis spektroskopik ve florimetrik karakterizasyonları. Ölçümler hazırlanan stok konjugat ve aynı miktarda DOX (10µM) ile gerçekleştirildi.	71
3. 4 AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugasyonunun X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) taraması.	72
3. 5 <i>in vitro</i> koşullarda pH 5.3 ve pH 7.4 te 37 °C de AuNP-PMAA-Cys-DOX a ait ilaç salım profilleri.	73
3. 6 AuNP-PMMA-Cys-DOX partiküllerine ait çalışma şeması.	74
3. 7 A) AuNP-PMAA ve B) AuNP-PMAA-Cys-DOX ve serbest DOX a ait HeLa hücreleri üzerindeki doz bağımlı toksisite sonuçları. Hata barları ortalama standart sapmayı vermektedir (n=4).	75
3. 8 AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatının 2,5, 5 ve 10 graylerdeki radyoterapötik aktivitesi. Hata barları ortalama standart sapmayı vermektedir (n=6).	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
3. 9 HeLa hücrelerinin faz-kontrast ve floresans görüntüleme teknikleriyle AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatının serbest DOX la karşılaştırılarak yapılan hücre görüntüleme çalışması. Görüntüler 100x büyütme ile kırmızı filtre kullanılarak alınmıştır.	78
3. 10 Tween 80-FA konjugatının oluşumuna ilişkin reaksiyon şeması.....	79
3. 11 Tween 80, FA ve Tween 80-FA konjugatına ait FTIR sonuçları.	80
3. 12 PPIX a ait standart grafiği.	82
3. 13 PPIX-AuNP (A), PPIX-FA (B) ve PPIX-AuNP-FA (C) niozomal formülasyonlarına ait AFM histogramları.....	83
3. 14 Hazırlanan niozomların farklı kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi. Hata barları ortalama standart sapmayı vermektedir (n=4).....	84
3. 15 Radyoterapi, PDT ve kombine terapi ile farklı hücre hatlarında niozomların etkisi. Hata barları ortalama standart sapmayı vermektedir (n=6).....	85
3. 16 HeLa ve A549 hücrelerinin niozom formülasyonları ile muamelesi sonrası alınan floresans hücre görüntüleri. (Görüntüler kırmızı filtre kullanılarak 63x büyütme ile alınmıştır. Görüntülerdeki skala 10 µm dir.).....	86
3. 17 CD lerin sentez sürecindeki aşamaları. a) Sulu nişasta süspansiyonu b) Karbonizasyon sonrası ham CD süspansiyonu, c) Filtrasyon sonrası CD süspansiyonu, d) 1,0 mg/mL ye seyreltilmiş CD süspansiyonu, e) Karanlıkta UV ışık (366 nm) altında seyreltilmiş CD süspansiyonu.	87
3.18 CD lere ilişkin (A) partikül boyutu ve (B) farklı pH lardaki zeta potansiyel analizleri.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 3.19 A) Liyofilize CD lerin IR spektrumu. (B) CD lerin genel XPS spektrumu. (C) CD lerin C1 piklerinin yüksek rezolüsyon spektası. (D) 1,0 mg/mL CD lerin doğal emisyon spektası. Eksitasyon dalgaboyu 20 nm aralıklarla 300-500 arası değişmektedir. (E) Normalize edilmiş emisyon spektası.....89
- 3.20 (A) MIPGlcA-CD ve (B) NIP-CD partiküllerine ait NTA boyut dağılım sonuçları.90
- 3.21 (A) CD, (B) MIPGlcA-CD ve (C) NIP-CD çekirdek kabuk yapılı partiküllerinin TEM görüntüleri. MIPGlcA-CD ve NIP-CD partiküllerinin çekirdek boyutu ve polimer kabuk kalınlığı görüntülerde yer aldığı gibidir.90
- 3.22 (A) 100 µg/mL CD lerin farklı eksitasyon dalgaboylarındaki floresans spektrumları. (B) 500 µg/mL MIPGlcA-CD ve (C) 500 µg/mL NIP-CD lerin farklı eksitasyonlardaki floresans spektrumları.91
3. 23 D-GlcA için çizilen standart grafik ve MIPGlcA-CD ve NIP-CD ler için bağlanma kapasitesi sonuçları. Hata barları $\pm$ S.S. yi vermektedir. (n=3).92
3. 24 MIPGlcA-CD, NIP-CD ve CD lerin (A) HaCaT ve (B) HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. Hata barları $\pm$ S.S. yi vermektedir (n=5).93
3. 25 HaCaT hücrelerinin 100 ug/mL CD, MIPGlcA-CD ve NIP-CD ler ile muamelesi sonucu elde edilen konfokal mikroskopi görüntüleri. Görüntülerin skalası 50 µm dur.95
3. 26 HeLa hücrelerinin 100 ug/mL CD, MIPGlcA-CD ve NIP-CD ler ile muamelesi sonucu elde edilen konfokal mikroskopi görüntüleri. Görüntülerin skalası 50 µm dur.96

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 3.27 (A) Çifte floresans rengine sahip MIPGlcA-CD ve NIP-CD uygulanmış hücrelerin Image J ile analizi (Hata barları S.S. yi göstermektedir (n=10)). (B) MIPGlcA-CD (yeşil floresans) ile işaretlenmiş bir fikse edilen HeLa hücresinin konfokal görüntüsü. Nükleus boyaması PI ile yapılmıştır. (C ve D) Fikse edilmiş HaCaT ve HeLa hücrelerinin görüntülemeye kullanıldığı yüzeylerde kulture edildiği haldeki faz-konast görüntüleri.97
3. 28 CD lerin farklı konsantrasyonlardaki sulu süspansiyonlarının UV/Vis bölgede dalgaboyu taramaları.98
3. 29 (A) 250 µg/mL CD lerin emisyon spektası. Eksitasyon dalgaboyu 20 nm aralıklarla 300-480 arası değişmektedir. (B) 360 nm eksitasyon dalgaboyunda artan konsantrasyonlardaki CD floresans emisyon spektrumları.....99
3. 30 Serbest CD lerin U-87MG ve HaCaT hücreleri üzerindeki (24 saat uygulandıktan sonraki) etkisi. Hata barları S.S. yi göstermektedir (n=4).....101
3. 31 Lipozom formülasyonları olan F1, F2 ve F3 ün U-87MG hücreleri üzerindeki (24 saat uygulandıktan sonraki) etkisi. Hata barları S.S. yi göstermektedir (n=4). Kurkumin ortak enkapsülant materyal olduğu için, hesaplamalar onun üzerinden yapılmıştır.....102
3. 32 Anti-CD44 ile hedeflenen Kurkumin/CD lipozomlarının (F3) 32 µg/mL kurkumin içeren konsantrasyonunun sağlıklı HaCaT ve U-87MG gliomaları üzerindeki sitotoksik etkisi. Hata barları S.S. yi göstermektedir (n=4).....102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 3.33 Geliştirilen lipozomal formülasyonların U-87MG hücreleri ile 5 gray dozunda radyokaktif ışınlarla maruz bırakılması sonrası gösterdiği radyoterapi sonuçları. Hata barları S.S. yi göstermektedir (n=6). Kontrol (-), örnek ve radyasyon uygulanmamış, kontrol ise örnek uygulanmamış ancak 5 gray radyasyon uygulanmış hücreleri ifade etmektedir.104
- 3.34 Serbest CD ler, F2 ve F3 formülasyonlarının U-87MG ve HaCaT hücrelerindeki lokalizasyonları gösteren floresans görüntüler. Görüntü skalası 10 µm dir.104
- 3.35 CO₂ inkübatöründen bağımsız çalışan 3D holografik mikroskop sistemi.105
- 3.36 Aynı oranda kurkumin içeren F1 ve F3 örneklerinin mikroçip düzeneğinde 3D holografik mikroskop analizleri sonucu elde edilen 24 saatlik hücre sayısı (%) değişim grafiği.106

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1. 1 Lipozomların avantaj ve dezavantajları (Akbarzadeh et al., 2013).	9
1. 2 Çeşitli radyosensitizerlerin listesi.	29
2. 1 MIPGlcA-CD ların sentezi için polimerizasyon karışımı.	58
2.2 Teranostik amaçlarla kullanılacak farklı lipozomal yapıların formülasyonları	62
3.1 AuNP, PPIX-Au, PPIX-FA ve PPIX-Au-FA örneklerinin zeta potansiyel ve boyut dağılımları. Veriler en az 3 tekrarlı olup $\pm$ S.S. ^a şeklinde verilmiştir.	81
3.2 Niozomlarda PPIX Enkapsülasyon Verimi (EE) (%) (S.S.:Standart Sapma).....	82
3. 3 Farklı lipozom formülasyonlarının boyutu, çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel sonuçları. S.S. standart sapmayı göstermektedir (n=3).	100

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
AuNP	Altın nanopartikül
DOX	Doksorubisin
Cys	Sistein
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
NHS	N-Hydroxysuccinimide
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-DiphenyltetrazoliumBromide)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
SDS	Sodyum dodesil sülfat
EMCH	N-(ε-maleimidocaproic acid) hydrazide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
PBS	Tuzlu fosfat tamponu (Phosphate buffered saline)
Chol	Kolesterol
DMPC	Dimiristoilfosfatidilkolin
PE	Fosfatidiletanolamin
CD	Karbon nokta

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

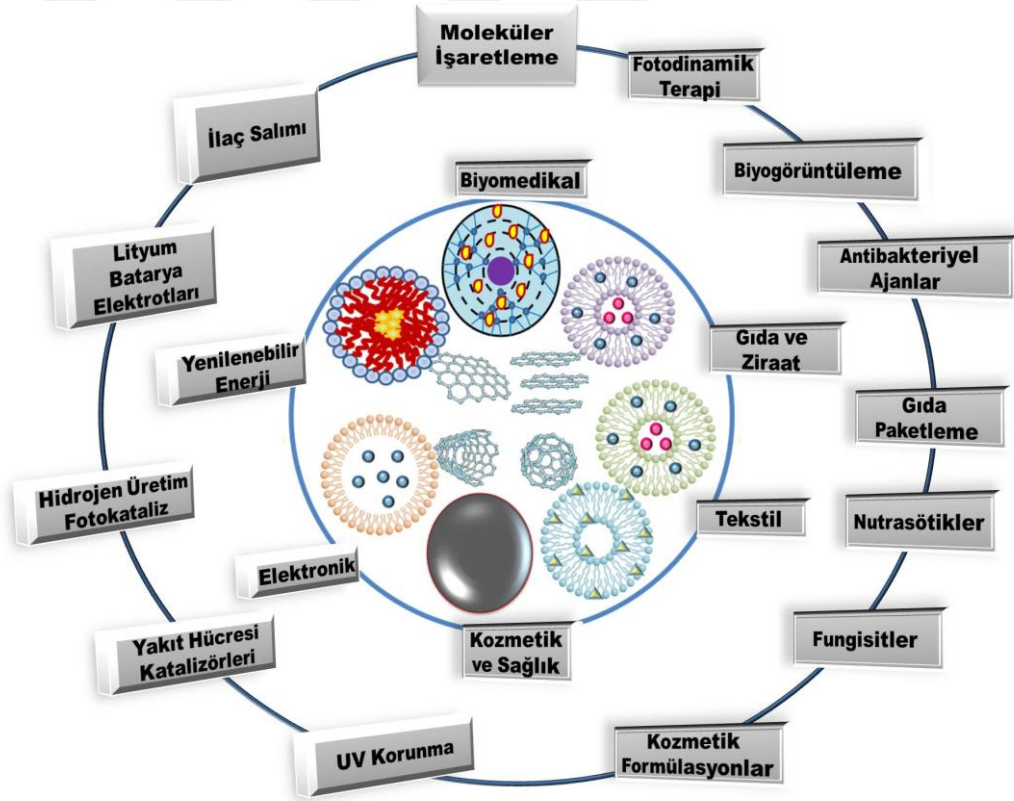
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
CDI	1,1-karbonildiimidazol
FA	Folik asit
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NIP	Nonimprinted polimer
PMAA	Polimetakrilik asit
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
DLS	Dinamik ışık saçılımı (Dynamic light scattering)
TGA	Termal gravimetrik analiz
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
RAFT	Tersinir ekleme-çıkarma zincir transferi (Reversible addition-fragmentation chain-transfer)
DTT	Ditiyotretiyol
XPS	X ışını fotoelektron spektroskopisi
DMSO	Dimetilsülfoksit
EE	Enkapsülasyon etkinliği
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LOD	Tayin sınırı (Limit of detection)
LOQ	Belirleme sınırı (Limit of quantification)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
ITO	Indium tin oxide
AFM	Atomik kuvvet mikroskopisi (Atomic force microscopy)
FBS	Fetal bovin serum
PDT	Fotodinamik terapi (Photodynamic therapy)
HA	Hyaluronik asit
GlcA	Glukuronik asit
AB	(4-acrylamidophenyl)(amino) methaniminium acetate
MAM	Metakrilamid
TEA	Trietilamin
EGDMA	Etilenglikoldimetakrilat
PFA	Paraformaldehit
RES	Retikuloendotelyal sistem

1. GİRİŞ

Nanoteknolojideki son gelişmelerle birlikte, nanomateriyaller geniş kullanım potansiyeline sahip olmasıyla önemli ölçüde dikkat çekmektedir (Gwinn and Vallyathan, 2006). Son 10 yıl boyunca, birçok farklı türdeki ve boyutları 1,0 – 100 nm arasında değişen nanopartiküller eşsiz fizikokimyasal özellikleri ve yenilikçi fonksiyonları sayesinde tıp (terapötik ve diagnostik vb.), kozmetik ve gıda alanları gibi uygulamalarda yer alması için üretilmektedir (Salata, 2004). Nanopartiküller yüzeylerinin fonksiyonel hale getirilmesi ve modifikasyonu ile daha etkin hale getirilebilirler. İnsan yaşamında da kullanılan bu nanopartiküllerden bazıları endüstriyel olarak da üretilmektedir. Bir diğer yandan ise pek çok araştırma grubu son zamanlarda bu materyallerin biyolojik etkilerini anlamak için hücre görüntüleme, terapötik ve diyagnoz üzerine yoğunlaşmaktadır. Buna yönelik olarak yapılan birçok ürün, araştırma vb. faaliyetler kapsamındaki nanopartiküllerin uygulamaları Şekil 1.1 de özetlenmiştir.



Şekil 1. 1 Nanopartiküllerin uygulamaları.

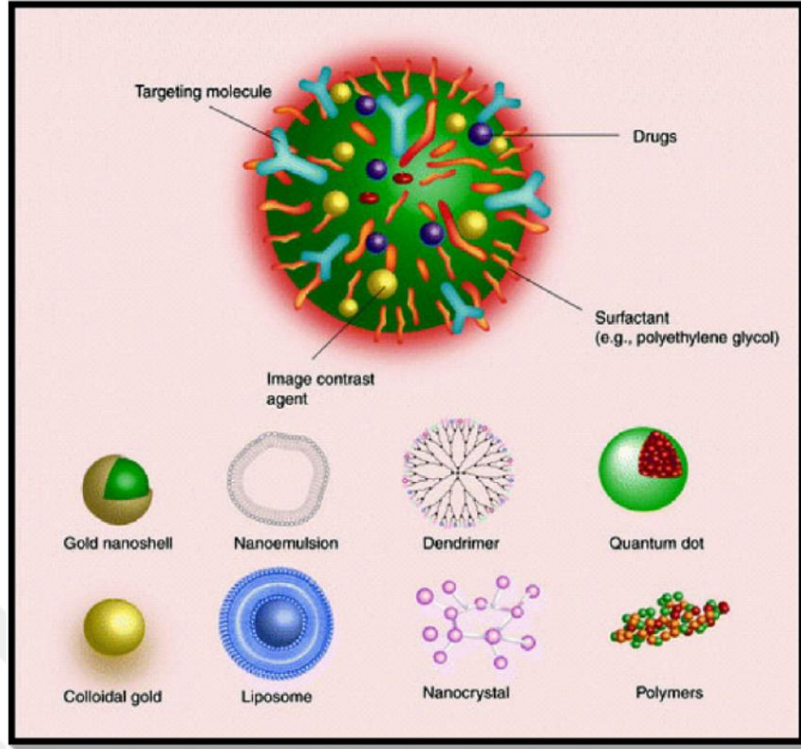
Nanoteknoloji dünyasında bilindiği üzere, nanopartiküllerin özellikleri kaynak materyallerinin ham hallerindeki özelliklerinden oldukça farklıdır.

Bu fark sadece fiziksel olmamakla birlikte, kimyasal özelliklerindeki değişimleri de barındırdığı için biyolojik uygulamalar açısından değerini artırmaktadır. Yeni keşfedilmekte olan bu dünyada alt dallarına ayrılarak nanobiyoteknoloji gibi biyo-uygulama araştırmalarında önemli keşiflere ve teknolojik gelişmelere yol açmayı sağlamıştır. Nanobiyoteknoloji alanında ise son 10 yılda popüler olan, yeniliğe ve gelişmeye müsait olup, ortaya "multifonksiyonel nanopartiküller" adlı bir grubu ortaya çıkarmıştır. Özellikle diyagnostik ve terapötik alanda kullanımı artan bu gruptaki birçok nanopartiküler yapı klinik uygulamalarda kullanıma başvurulmuş ve hatta günümüzde klinik deneyler de yürütülmektedir (Davis et al., 2008; Hrkach et al., 2012; Kim et al., 2010; Peer et al., 2007b; Sapsford et al., 2013).

Bu tez çalışmasının temel taşı oluşturan multifonksiyonel hibrit yapılar ile ilgili olarak daha detaylı bilgi bir sonraki başlıkta daha kapsamlı bir şekilde yer alacaktır.

1.1 Multifonksiyonel Nanopartiküller

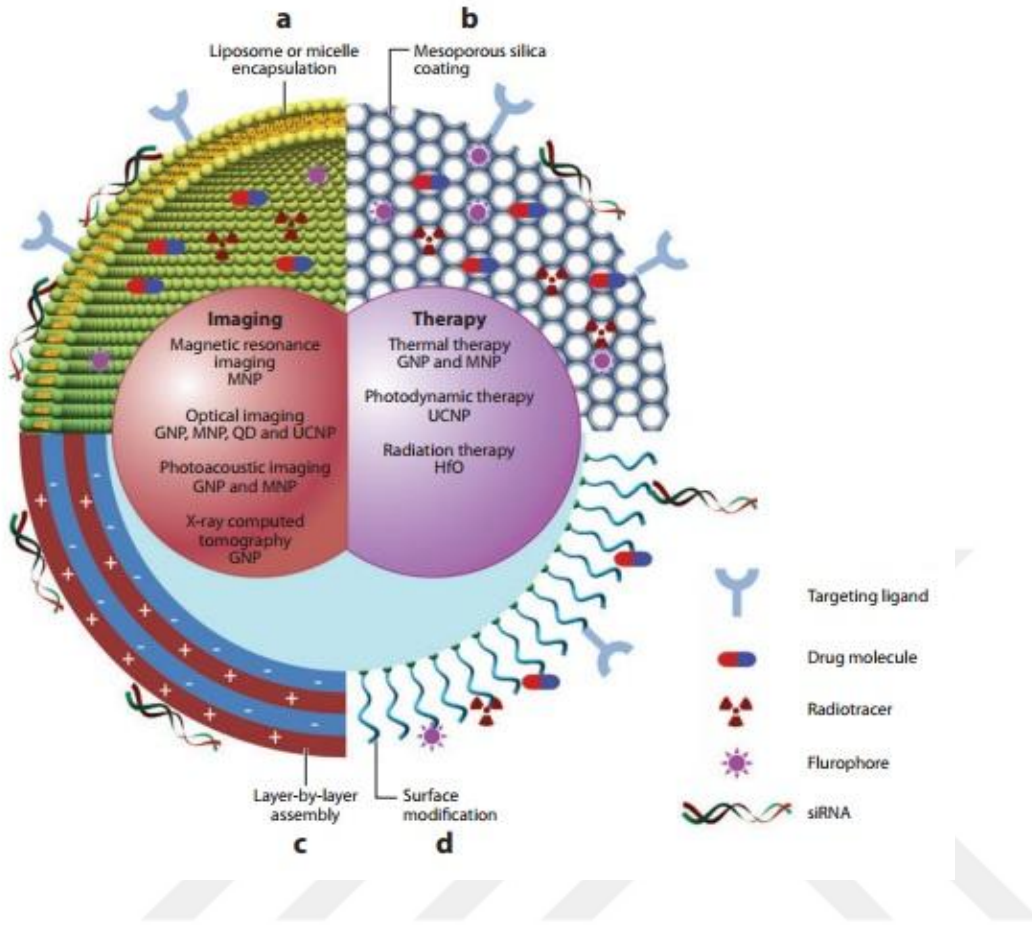
Nanobiyoteknolojik çalışmalarda hızlıca genişleyen bir alan olan nanotıp için umut vaat edici sonuçları ortaya çıkaran multifonksiyonel nanopartiküller, görüntüleme ve terapi gibi birçok hedefi gerçekleştirebilen ya da çoklu fonksiyonel birimleri içermesiyle tek bir gelişmiş fonksiyona sahip olan gelişmiş yapılar olarak adlandırılır (Bao et al., 2013) (Şekil 1.2). Bu nanopartiküllerin ortaya çıkışı nanofabrikasyon teknikleri sayesinde ilerleme kazanmıştır (Champion et al., 2007; Euliss et al., 2006; Gratton et al., 2008; Roh et al., 2005). Ayrıca temel nanopartikül sentezlerinin rutin bir hal alması ile birlikte, materyal bilimi araştırmacıları bir mühendislik yaklaşımıyla yüksek kompleksliğe sahip nanoyapı konseptlerine yönelmişlerdir (Petros and DeSimone, 2010; Yoo et al., 2011). Öte yanda medikal alandaki ihtiyaçlarda multifonksiyonel parçacıkların üzerine düşülmesinde önemli bir etken olmuştur. Bu ihtiyaçlardan en önde geleni kanser tiplerinde meydana gelen farklılıklar oluşturmakta ve bu farklılıklar da "görüntüleme aracılı/rehberli tedavi" gerekliliği doğurmaktadır. Bu tarz bir yaklaşım, genel olarak hastaların tedaviye verdiği cevap ve her bir hastanın patolojik koşulları baz alınarak planlandığı zaman ortaya "kişiselleştirilmiş tedavi" terimi ön plana çıkmaktadır. Bu terapötik devrim ile birlikte multifonksiyonel nanopartikül terimi yanında bu partiküllere artık "Tera(g)nostik" nanopartiküller adıyla da literatürde yerini almaktadır.



Şekil 1. 2 Multifonksiyonel nanopartikül tasarımındaki temel bileşenler (Milane et al., 2011 den alınmıştır).

1.2 Teranostik Nanopartiküller

Bir önceki başlıkta da belirtildiği gibi yeni bir rejim haline gelen bu materyaller, ilk olarak 2002 yılında Funkhouser tarafından literatüre "teranostik" diğer bir deyişle "terapötik + diyagnostik" terimi kazandırılmıştır (Funkhouser, 2002). Bu yapılar tedavi ve tanı gibi iki önemli fonksiyoneliteyi tek bir nanoyapı kapsamında taşıyan platformu oluştururlar. Bunun yanında temelde terapi ve diyagnoz uygulamaları için geliştirilen tek bir sistem gibi düşünülse de, daha derine inildiğinde aslında bu tarz materyallerin diyagnoz, ilaç görüntüleme, hedefe yönelik tedavi ve kontrollü ilaç salımı alanlarının bir araya geldiği bir entegrasyon ile çalıştığını söylemek daha doğru olacaktır. Teranostik nanopartiküllere ilişkin genel yapılar Şekil 1.3 teki gibidir.



Şekil 1. 3 Teranostik nanopartiküllerin şematik diyagramı. Bu tarz multifonksiyonel nanoparçacıklar ya farklı fonksiyonlara sahip nanokristalleri bir araya getirerek ya da farklı yüzey modifikasyon stratejileri ile fonksiyonel küçük molekül kargoları nanokristallerle birleştirerek geliştirilebilir. Anorganik nanokristaller için dört farklı yöntem kullanılmaktadır: (a) lipozom ya da misel enkapsülasyonu, (b) mezopor silika kaplama, (c) katmanlı halde kendiliğinden biraraya gelme ve (d) yüzey konjugasyonu. Kısaltmalar: GNP-altın nanopartiküller, HfO-hafniyum oksit nanopartikülleri, MNP-manyetik nanopartiküller, QD-kuantum noktalar, UCNP-Upconversion nanopartikülleri.

Multimodal görüntüleme kabiliyetine sahip teranostik parçacıklar, çoklu alan derinliği ya da tedavi aşamalarında daha iyi görüntüler sunabilmektedir. Bu da hastalığın diyagnoz ve prognozu için kolaylaştırıcı bir etken olmaktadır. Henüz nanorobotlardan uzak olmasına rağmen, multifonksiyonel nanopartiküller, hastalık için tanı işlevselliğine de sahip olabildiğinden rehberli tedavi için iyi bir öneri olarak nanotıp alanında daha interaktif bir yol açmaktadır. Devrim niteliğindeki bu gelişmeler ile gelenekselleşmiş medikal uygulamalar, teranostik

partiküllerin multifonksiyonelliği ile birlikte modern tıbbı geçişte büyük bir etki yaratmıştır.

Nanopartiküllerin önemli bir sınıfı, metal, metal oksit ve yarı iletken ve aynı zamanda nadir toprak mineralleri ve silika gibi inorganik yapıları olanları kapsamaktadır. Bu tarz nanopartiküller genellikle nano boyuttaki kuantum mekanik etkisine bağlı olarak eşsiz elektrik, manyetik, optik ve plasmonik özelliklere sahiptir (Giner-Casares et al., 2016; Krahne et al., 2011; Nie et al., 2010). Geçtiğimiz 10 yıl boyunca nanokristal sentezindeki ilerlemeler sayesinde, birçok nanopartikül boyut, şekil, kompozisyon ve fiziksel özellikleri daha da kontrol altında tutularak üretilebilmektedir (Champion et al., 2007b; Euliss et al., 2006; Jana et al., 2004; Xu et al., 2007). Aslında birçok anorganik nanopartikül çeşitli formlarda ticari olarak bulunabilir hale gelmiştir. Birçok türdeki anorganik nanopartiküller esasen doğa tarafından multifonksiyonel özelliktedir. Örnek olarak, altın nanopartiküller (AuNP) optik görüntüleme, fotoakustik görüntüleme ve bilgisayarlı tomografi için dikkat çekici kontrast ajanlarıdır (Cole et al., 2015; Song et al., 2016). Buna ek olarak, altın nanokabuklar ve nanokafeslerin fototermal tedavideki kullanım potansiyeli de bilinmektedir (Hirsch et al., 2003; Huang et al., 2006). Bu sayede sadece minimum optimizasyonla aynı AuNP ler görüntüleme ve tedavide kullanıma imkan sağlamıştır. Bu zamana kadar, birçok araştırma sonucunda yüzey modifikasyon teknikleri ve yüzey kimyasına ait bir kütüphane anorganik nanopartiküller için oluşturulmuştur. Boya, terapötik ajan, hedefleyici ligandları içeren küçük moleküller kontrol edilebilir düzeydeki koşullarda nanopartiküllere konjuge edilebilirler. Daha da önemlisi, nanokristaller silika/mezoporus silika, misel, lipozom ya da biyopolimerlerin katmanlı kaplanması ile farklı tasarımlar da ortaya konulabilir. Bu kaplama yöntemleri hem küçük moleküllerin fiziksel/kimyasal adsorpsiyonu hem de anorganik partiküllerin enkapsülasyon ile veziküler sistemlere yüklenmesi için yararlıdır.

Terapötik ve görüntüleme uygulamalarında aktif olarak kullanılan diğer bir materyal grubu ise organik nanopartiküllerdir (Doshi and Mitragotri, 2009; Iqbal et al., 2012; Liechty et al., 2010; Peppas et al., 2006). Buna yönelik olan farklı boyutlardaki nanopartiküller çeşitli biyobozunur polimerler kullanılarak hazırlanmıştır. Bunlara örnek olarak, polilaktik-poliglikolit ve polikaprolaktonlar ile albumin ve kollajen gibi proteinik materyaller verilebilir (Luk and Zhang, 2014; Ma et al., 2016; Panyam and Labhasetwar, 2012; Tam et al., 2010).

Yukarıda da genel olarak özetlendiği üzere multikonsiyonel özellikli teranostik yapılarda etkin bir aktivite sağlanması, temelde üç farklı element üzerine kurulu olmaktadır. Bunlar; 1) taşıyıcı seçimi 2) terapi ve/veya diyagnoz da kullanılacak materyalin seçimi ve enkapsülasyonu/bağlanması ve 3) hedefleme stratejisi şeklindedir.

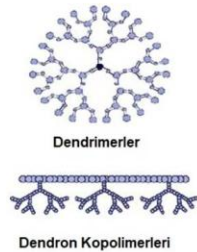
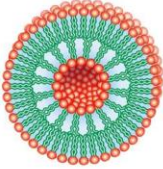
1.2.1 Teranostiklerde kullanılan taşıyıcı nanopartiküller

Multifonksiyonel özellikli nanoparçacıklar tasarımıındaki seçeneklerden doğan yeni umut vaadeden teknikler kişiselleştirilmiş tedavi ve görüntüleme kılavuzlu tedavi terimlerini ortaya çıkarmıştır. Teranostikler olarak da adlandırılan bu tarz multifonksiyonel nanopartiküllerin kullanımı ile birlikte şu şekilde avantajları beraberinde getirmektedir: 1) terapötik yararlanım, 2) yan etkilerin azaltılmasında taşıyıcının güvenliği. Bu iki özellik farmasötiklerin geliştirilmesinde ve ilaç salım sistemlerinde stabilite, çözünürlük, biyouyumluluk, biyoaktivite, seçicilik ve toksisite gibi birçok özelliğin kontrolü açısından büyük bir rol oynamaktadır (Sahoo et al., 2007).

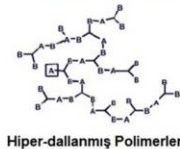
Organik Nanotaşıyıcılar

Veziküler Taşıyıcılar

Lipozom/Niozom/Polimerzom



Polimerik Taşıyıcılar

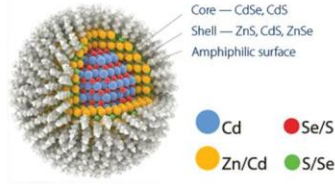


Anorganik Nanotaşıyıcılar

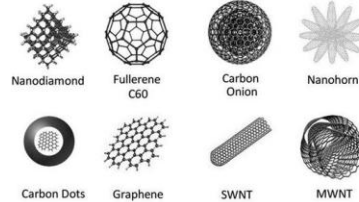
Metalik NPlar



Kuantum Noktalar



Karbon Temelli NPlar



Şekil 1. 4 Teranostik nanopartiküllerin tasarım ve sentezinde kullanılan nanotaşıyıcı türleri.

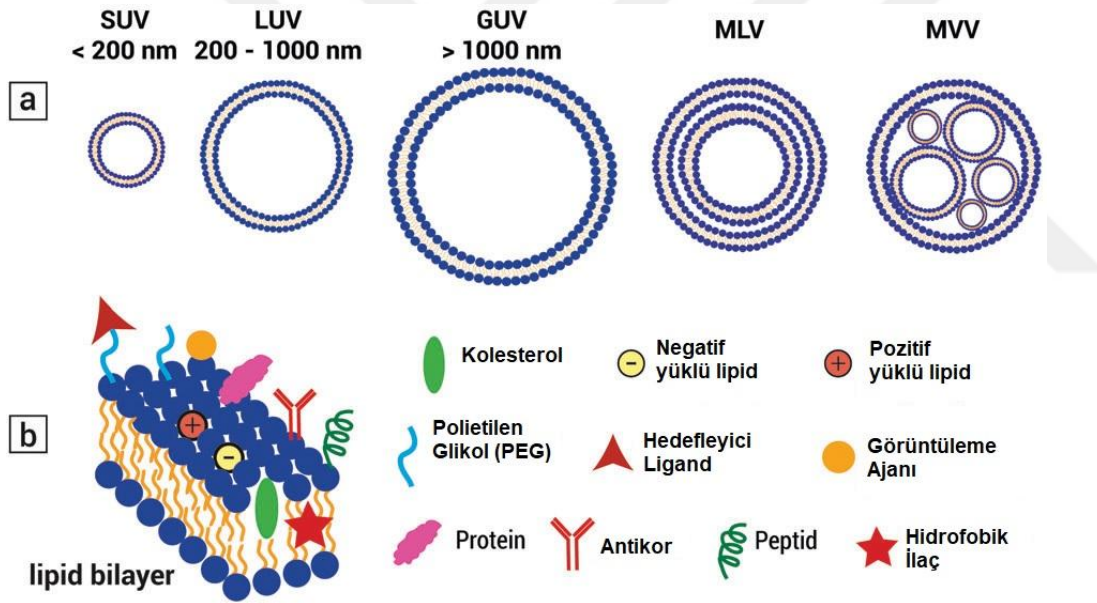
Şekil 1.4 te bu zamana kadar geliştirilen nanopartiküllerin ve polimerik yapıların taşıyıcı olarak multifonksiyonel tasarımlarda kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Bu amaçla birçok organik taşıyıcılar (lipo/polimerzomlar, , polimer nanopartiküller, dendrimerler vb.) ve anorganik taşıyıcılar (metalik nanopartiküller, kuantum noktalar ve karbon nanomateriyaller) biyomedikal uygulamalarda çokça yer almıştır (Giner-Casares et al., 2016; Liechty et al., 2010; Luk and Zhang, 2014; Ma et al., 2016; Petros and DeSimone, 2010). Bu taşıyıcı yapılara fiziksel tutuklama veya kimyasal konjugasyon ile görüntüleme ya da terapötik yükleme yapılabilir. Buna ek olarak, sonraki yüzey modifikasyonları, fizyolojik koşullar altında partiküllerin istenilen hedef bölgeye spesifitesini ve uyumluluğunu artırmak için kullanılabilir.

Taşıyıcılar, görüntüleme ve terapötik ajanların fiziksel tutuklaması için poröz yapılara ihtiyaç duymaktadırlar. Lipozomların oluşumu (Almer et al., 2013; Carter et al., 2016; Hamano et al., 2013; Palekar et al., 2013) ve amfifilik blok kopolimer misellerinin (Kelsch et al., 2012; Y. Liu et al., 2016; Quadir et al., 2014; Rabotyagova et al., 2011; Schnitzler and Herrmann, 2012; Shen et al., 2016; Venkataraman et al., 2017) oluşumu görüntüleme veya terapötik ajanların tutuklanmasında etkin materyaller olarak kanıtlanmıştır. Ancak bu durum anorganik nanopartiküller için her zaman işe yaramamaktadır. Bu durumda nanotaşıyıcının farklı şekillerde aktif madde ile yüklenmesi gerekmektedir. Bunun için ise nanotaşıyıcılar uygun intermoleküler etkileşimlere ihtiyaç duyar. Bunlar biyoaktif molekül ve taşıyıcı arasındaki π - π etkileşimleri, hidrojen bağları ve kovalent bağları ile gerçekleştirilmektedir. Özellikle, taşıyıcıda tutuklanmış olan ya da ona konjuge haldeki ilaçların salım kinetikleri, geleneksel olarak dağıtılan, oral olarak, intravenöz olarak ve sistemik ilaçlardan farklı olarak yan etkisini düşürecek şekilde farklılaşmaktadır.

Sonraki bölümlerde genel olarak tez kapsamında kullanılan ve onun yanında en çok kullanılan nanotaşıyıcılar hakkında bilgiler verilecektir. Bunlar içerisinde lipozom/niozom gibi veziküler sistemler, altın nanopartiküller (AuNPler) gibi metalik nanopartiküller, yarı-iletken kuantum noktalar ve karbon noktalar gibi karbon temelli yapılardan söz edilecektir.

1.2.1.1 Veziküler nanopartiküller

Veziküler nanopartiküller, yukarıda bahsedilen ilaç taşıma sistemlerindeki en eski tarihe dayanan taşıyıcı grubuna girmektedir. Bu tarz nanopartiküller genellikle küçük küresel şekilli bilayer (iki tabakalı) veziküllerin amfifilik yapılardan biraraya gelmesiyle oluşmaktadır. Genellikle veziküller, küçük unilamellar veziküller (small unilamellar vesicles, SUVs, boyut <200 nm), büyük unilamellar veziküller (large unilamellar vesicles, LUVs, boyut 200-1000 nm), multilamellar veziküller (MLV, birçok tabakayı içinde bulunduran) ve multiveziküler veziküller (MVVs, küçük vezikülleri içinde bulunduran vezikül)den oluşmaktadır. Bu veziküllerin yüzeyleri farklı ligandlar ile birlikte yüzeyleri fonksiyonel hale getirilerek akıllı, multifonksiyonel sistemler geliştirilebilir (Şekil 1.5)



Şekil 1. 5 (a) Boyut ve tabakalarına göre değişiklik gösteren veziküller. (b) Vezikül çift katmanının yapısı (solda) ve fiziksel olarak enkapsüle edilebilen veya kimyasal konjuge edilebilen biyoaktif yapılar (sağda).

Bu türdeki nanopartiküllerden en bilineni **lipozomlar** dır. Lipozomlar ilk olarak Alec Bangham ve arkadaşları tarafından 50 yıl önce keşfedilmiş ve tekli ya da çoklu istiflenmiş şekilde yanyana dizilmiş fosfolipid çift tabakalarının küresel formda ve sulu bir merkezden oluşan yapılar olarak günümüze kadar sentezlenmiştir. İlk lipozom formülasyonları doğal fosfolipidlerden oluşmaktadır (Bangham et al., 1967). Bugünlerde lipozomlar, fosfatidilkolin (PC),

fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS), fosfatidilgliserol (PG) gibi doğal veya sentetik olan fosfolipidlerden elde edilmektedir. Lipozomlar son yıllarda tıbbın pek çok uygulama alanında ilgi odağı haline gelmiştir. Lipozomların akışkanlığı, geçirgenliği ve moleküler organizasyonu gibi özellikleri üzerine yoğunlaşmış olan fizikokimyasal çalışmalar, doğal membranların yapısal elementi olarak çift katlı lipit tabakalarının önemini ortaya koymaktadır. Hücre biyolojisinde lipozom-hücre etkileşimleri, füzyon ve adhezyon gibi fizyolojik proselere bir model unsur teşkil etmektedir. Buna ek olarak, hücre-hücre füzyonunu geliştirmek, membranların fosfolipid ve kolesterol içeriğini değiştirmek ve normal olarak suda çözünebilen, fakat hücre içine geçişi zor moleküllerin transferinde kullanılabilmektedir.

Çizelge 1. 1 Lipozomların avantaj ve dezavantajları (Akbarzadeh et al., 2013).

Avantajları	Dezavantajları
Enkapsülantın terapötik indeksi ve etkinliğini artırma	Düşük çözünürlük
Enkapsülasyonla artırılmış stabilite	Kısa raf ömrü
Non-toksik, flexible, biyouyumlu, parçalanabilir, sistemik ve sistemik olmayan dağılımlar için immunolojik etki göstermez.	Hidroliz ya da oksidasyon ile fosfolipidlerin bozunması
Enkapsüle ajanın toksisitesini azaltır.	Enkapsüle ajanın sızıntısı ya da füzyonu
Toksik ilaçların hassas dokulara zararını azaltır.	Üretim maliyeti yüksek
Yan etkisi azaltılmış	Daha az stabil
Aktif hedefleme ile belirli bölgelere yönlendirme	

Lipozomlar çoğunlukla kozmetik ve farmasötik endüstrisinde kullanım potansiyeli bulmuştur. Bununla birlikte, gıda ve tarım endüstrisinde de çokça çalışılan materyaller olup, stabil olmayan (antimikrobiyal, antioksidan, aromalar ve biyoaktif elementler) maddeleri ve bunların fonksiyonunu korumak için enkapsüle edilen salım sistemlerini genişletmek için kullanılmaktadır.

Lipozomal enkapsülasyon teknolojisi (LET) belirli organlara yönelik iyileştirici maddelerin daha hızlı iletimi için tıbbi araştırmacılar tarafından kullanılan yeni yeni pazarda kendine yer bulmaktadır. Bu şekildeki ilaç dağıtım formülasyonları vücut için gerekli hayati kombinasyonları geri kazandırmak için kullanılmaktadır. LET, çok sayıda malzemeyi kapsayan lipozomlar olarak adlandırılan alt-mikroskobik baloncuk üretme metodudur. Bu "lipozomlar" kendi etrafında bir bariyer oluşturur. İnsan vücudunda üretilen ağızda ve midede enzimlere, alkali çözeltilere, sindirim sıvılarına, safra tuzlarına ve bağırsak florasına ve serbest radikallere karşı dirençli içeriklerdir.

Lipozom hazırlama yöntemleri

- Genel hazırlama yöntemleri:

Lipozom hazırlama yöntemleri genelde dört basamaktan oluşmaktadır.

- a) Organik çözgeni uçurarak lipid tabakası oluşturma
- b) Lipidlerin sulu ortamda dispersiyonu
- c) Oluşan lipozomların saflaştırılması
- d) Son ürün analizi

Lipozomlar temelde iki farklı teknik kullanılarak biyoaktif maddelerin enkapsülasyonunu sağlarlar:

- Pasif yükleme teknikleri
- Aktif yükleme teknikleri

Pasif yükleme teknikleri üç farklı yolla yapılabilir. Bunlar;

- a) Mekanik dispersiyon yöntemi
- b) Solvent dispersiyon yöntemi
- c) Deterjandan arındırma yöntemi

şeklindedir.

a) Mekanik dispersiyon yöntemi: Mekanik dispersiyon tekniği birçok farklı türden oluşmaktadır. Bunlar kısaca,

- i. Sonikasyon
- ii. French Pressure hücresi: ekstrüzyon
- iii. Frezze-Thaw
- iv. İnce film hidrasyonu ve elle çalkalama
- v. Mikroemülsifikasyon
- vi. Membran ekstrüzyonu

şeklindedir.

i. Sonikasyon: Sonikasyon, belki de SUV hazırlanması için en yaygın kullanılan yöntemdir. Burada, MLV'ler düşük atmosfer altında banyo tipi sonikatör veya bir ultrasonik prob ile sonike edilir. Bu yöntemin başlıca dezavantajları çok düşük iç hacim/kapsülleme etkinliği, enkapsülasyondaki fosfolipidlerin ve bileşimlerin muhtemel bozunması, büyük moleküllerin eliminasyonu, prob ucundan metal kirliliği ve SUV ile birlikte MLV'nin varlığıdır.

ii. French Pressure hücresi: ekstrüzyon: French pressure hücresi, küçük bir delik yoluyla MLV'nin ekstrüzyonunu içerir. French pressure vezikül yönteminin önemli bir özelliği, sonikasyonda olduğu gibi proteinlerin işlem sırasında belirgin bir şekilde iddialı görünmemesidir. İlginç bir açıklama, French pressure vezikülü önemli ölçüde sonikasyon veya deterjan çıkarılması tarafından üretilen SUV lerden daha uzun süre ve sürüklenen çözünen maddeleri tutabilmesidir. Yöntem,

kararsız malzemelerin hafifçe tutulmasını içerir. Yöntem sonikasyon yöntemine göre birçok avantaja sahiptir. Elde edilen lipozomlar sonike edilmiş SUV'lerden oldukça daha büyüktür. Metodun dezavantajı, yüksek sıcaklığın elde edilmesinin zor olması ve çalışma hacminin nispeten küçük olmasıdır (maksimum olarak yaklaşık 50 mL)(Mayer et al., 1986; Mozafari, 2005; Song et al., 2011).

iii. Freeze-thaw: SUV'ler hızla donar ve yavaşça çözülür. Kısa ömürlü sonikasyon, toplanmış materyalleri LUV'ye dağıtır. Tek katmanlı veziküllerin oluşturulması, dondurma ve çözme süreçleri boyunca SUV'un kaynaşmasının bir sonucudur. Bu tür sentez, fosfolipid konsantrasyonunun arttırılması ve maddenin iyonik kuvvetinin arttırılması yoluyla kuvvetli bir şekilde engellenmektedir. % 20 ila % 30 kapsülleme etkinlikleri elde edilebilmektedir(Llu and Yonetani, 1994; Ohsawa et al, 1985; Pick, 1981).

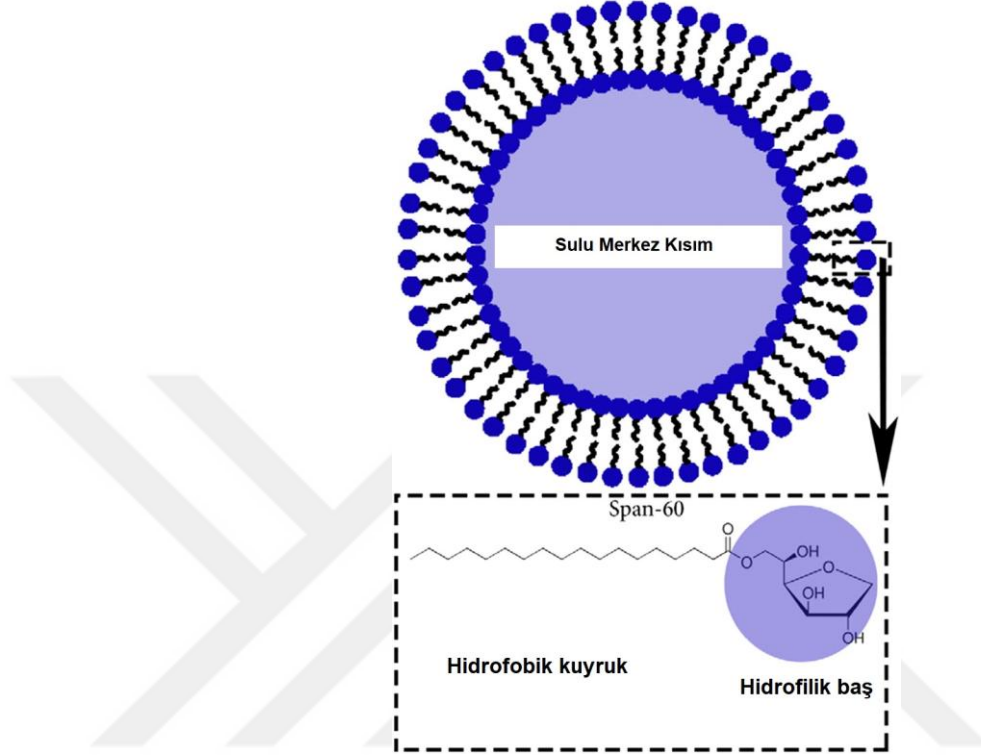
iv. İnce film hidrasyonu ve elle çalkalama: Cam balonun çeperlerinde oluşan lipit film, sulu faz eklendikten sonra elle çalkalanarak süspanse edilir. Bu yöntemle MLV' ler hazırlanır.

Niozomlar

Lipozomların yanında kullanılan diğer bir veziküler sistemde **niozomlardır**. Niozomlar bir veziküle kapsüllenen, tedavide kullanılan bir ilaç taşıma sistemidir. Veziküller iyonik olmayan çift tabakalı aktif yüzey ajanlarından oluşur ve bu yüzden niozom adını alır. Boyut olarak çok küçük ve mikroskobiktirler. Yapı olarak lipozomlara çok yakın olmalarına rağmen, lipozomlarla kıyaslandığında birçok avantaja sahiptirler. Niozomların bazı özellikleri; çözgenleri lipozomlara benzer şekilde yakalamaları, ozmotik olarak aktif ve stabil olmaları, yapısal olarak (akıcılık, içerik ve boyut) esnek olmaları ve istenilen duruma göre şekillendirilebilmeleri, ilaç moleküllerinin performansını arttırmaları, özel bölgelere erişim ilaç molekülleri korunduğu sürece daha kolay olmaları şeklindedir. Ayrıca niozomlar biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen ve immunolojik olmayan yapılardır(Gunes et al., 2017; Un et al., 2015).

Yapısal olarak niozomlar lipozomlarla çok benzerdir ve her ikisi de çift tabakadan oluşmuştur ancak niozomlardaki çift tabaka lipozomlardaki fosfolipidler yerine iyonik olmayan aktif yüzey ajanlarından oluşmuştur. Bir çok aktif yüzey ajanı suya daldırıldığında misel yapıları oluşturur ancak niozom gibi yüzey aktif maddeleri çift tabakalı veziküller oluşturur. Niozomlar hidrofilik uçları

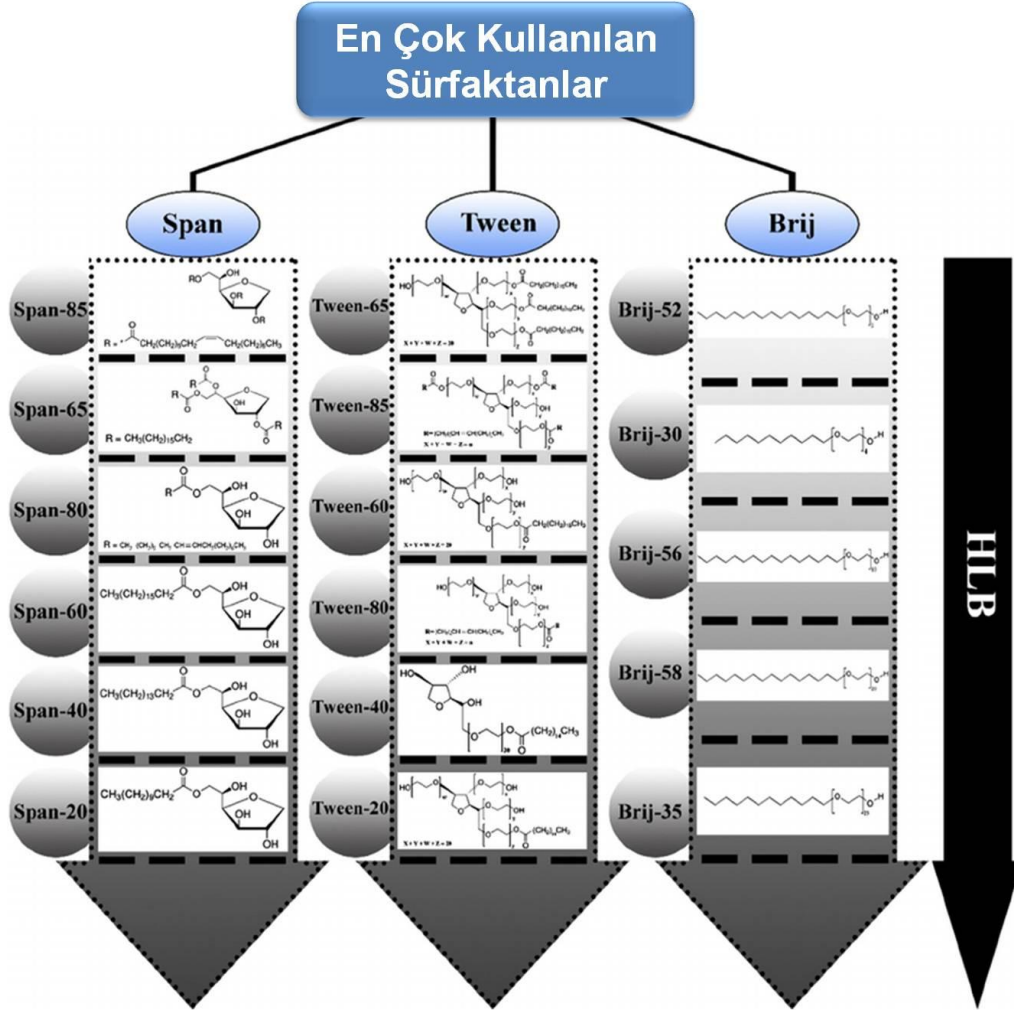
dışarıda kalan, hidrofobik kısımları içeride birbirleri ile etkileşen yüzey aktif maddelerden oluşur. Bu yüzden hidrofilik ilaçlar veziküllerin yüzeyinde tutulurken, hidrofobik ilaçlar çift tabakaya gömülür.



Şekil 1. 6 Niozom bileşenleri.

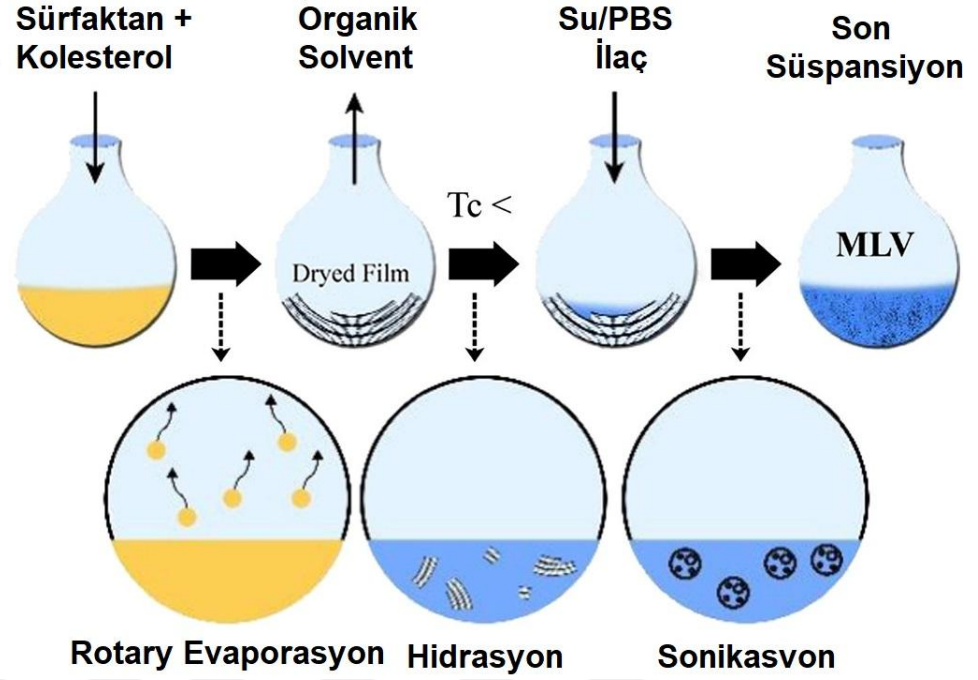
Niozomlarda kullanılan noniyonik sürfaktanlar Şekil 1.6 daki gibidir. Hidrofilik lipofilik denge (HLB) değerine göre farklı formülasyonlar amaca göre geliştirilebilmektedir (Şekil 1.7). HLB, yüzey aktif madde seçimi için zaman kazandıran bir kılavuz olarak bilinen yüzey aktif maddeler için boyutsuz bir parametredir. Ayrıca, bir yüzey aktif maddenin HLB değeri, ilacın enkapsülasyon etkinliğinin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Şimdiye kadar, niozomların uygulanmasına bağlı olarak, poligliserol alkil eterler, glikozil dialkil eterler, kron eterler, polioksietilen eterler ve esterler, örneğin Brijler, Spanlar ve Tweenler ve benzeri gibi çeşitli HLB değerlerine sahip çok sayıda iyonik olmayan sürfaktanlar kullanılmıştır. İyonik olmayan yüzey aktif maddeler için HLB aralığı 0 ile 20 arasındadır; Düşük bir HLB, hidrofilik (suda çözünür) sürfaktanı ve bir lipofilik sürfaktan (yağda çözünür) ise yüksek bir HLB'yi belirtir. HLB sayısı 3 ile 8 arasında olan sürfaktan maddeler, bilayer yüzeylerin hazırlanması ile uyumludur

ve yağ içinde su (W / O) emülsifiye edici ajanlara karşılık gelir. Ayrıca, su içinde yağ (O / W) emülsiyonlaştırıcıları, 8-18 aralığında HLB değerleri sergiler.



Şekil 1. 7 Niozom hazırlanmasında en çok kullanılan sürfaktanlar.

Niozomların hazırlama yöntemleri için ise lipozomlardaki teknikler kullanılmaktadır ve elde edilen farklı boyutlar ve katmanlardaki yapılar ilişkin tanımlamalar benzerlik göstermektedir. En çok kullanılan yöntemlerden biri olan ince film hidrasyonu ve sonikasyon teknikleri Şekil 1.8 de gösterilmiştir.



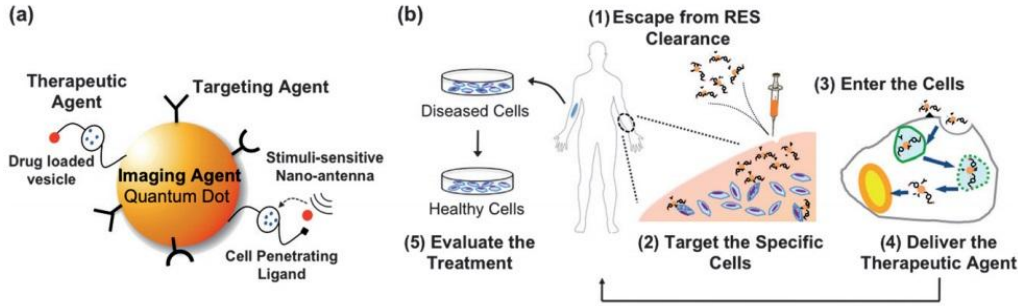
Şekil 1. 8 İnce film hidrasyon ve sonikasyon yöntemiyle niozom hazırlama.

1.2.1.2 Kuantum noktalar

Yarı iletken nanopartiküller veya kuantum noktalar (QD'ler), dar (simetrik) ayarlanabilir emisyon spektrumu, geniş absorpsiyon profili, yüksek fotostabilite, üstün parlaklık, uzun floresans ömrü, proteinler ile konjuge edilebilme özelliği olan nanokristallerdir (Chen and Liang, 2014). Buna ek olarak, QD'ler büyük Stokes kaymasına sahiptir, yani görünür ışığın bir fotonu böyle bir yarı iletkene çarptığında, bazı elektronları daha yüksek enerji durumlarına uyarılır ve taban durumlarına dönerken daha düşük enerjili bir görünür ışık yayar (Jamieson et al., 2007). Bunlar, moleküler ve hücresel işaretleme, in vivo görüntüleme, hücre izleme, gen teknolojisi, ilaç dağıtım, kanser tespiti ve tedavisi gibi birçok alanda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Pathakoti et al., 2013; Zhao et al., 2010). Sonuç olarak, 1998'de biyolojik etiketleme için koloidal kuantum noktalarının ilk gösteriminden sonra, daha sonraki yenilikler, biyomedikal uygulamalar için QD'lerin araştırılmasına odaklanmıştır (Bruchez Jr., 1998; Chan, 1998).

Kuantum noktaların hazırlanması için geliştirilen sentetik proses dizisi arasında baskın yaklaşım, bir CdSe çekirdeğini bir ZnS tabakasıyla kaplayarak en iyi kristal kalitesi ve monodispersiteyi elde etmektir. ZnS katmanı tarafından pasifleştirilmesi çekirdeği oksidasyondan korur, CdSe'nin çevre çözeltilerine sızmasını önleyerek toksisiteyi azaltır ve fotoluminesans verimini artırır. Bununla

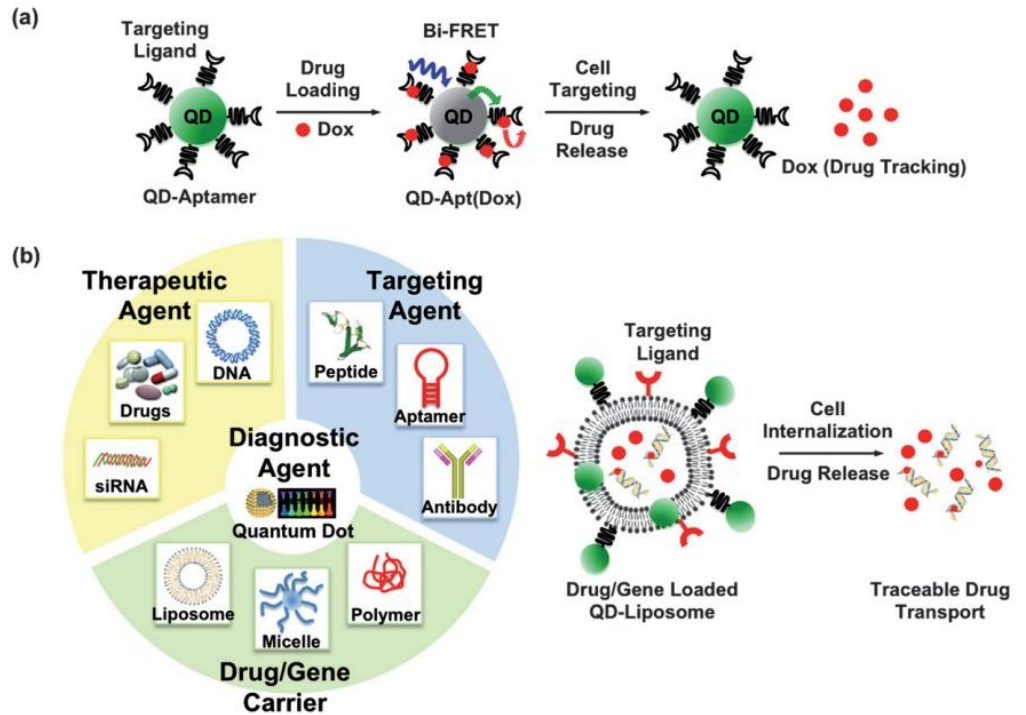
birlikte, ZnS kaplı QD'ler sadece polar olmayan organik çözücüler içinde çözünür. Biyolojik ortamın sulu yapısı nedeniyle, QD yüzey özelliklerini hidrofobikden hidrofilize hale getirmek QD'lerin biyolojik uygulamalarda yararlı olabilmesi için önemli bir adım olur. QD'lerin sentezi doğrudan sulu solüsyonda gerçekleştirilse de, sulu şemaların ürünleri büyük oranda polidispersedilir ve yüksek sıcaklık yollarıyla sentezlenenlerin kalitesini hidrofobik organik solvent/ligand karışımlarıyla nadiren eşleştirir (Rogach et al., 2000). Ayrıca, QD'ler gibi inorganik materyallerin doğuştan gelen biyolojik özgülüğe sahip olmadıkları veya hiç olmadıkları bilinmektedir. QD'lerin biyolojik afinite kazanmak için aptamerler (Bagalkot et al., 2007a), antikolar (Han et al., 2015), oligonükleotidler (Shahmuradyan and Krull, 2016), peptidler (Breger et al., 2014; Cai and Chen, 2008; Lowe et al., 2012; Lu et al., 2010; Safi et al., 2017), folatlar (Bwatanglang et al., 2016; Morosini et al., 2011; Suriamoorthy et al., 2010) ve küçük molekül ligandları (Cambi et al., 2007; Komatsuzaki et al., 2015) gibi biyolojik moleküllerle konjugasyona dayalı olmalıdır.



Şekil 1. 9 (a) Hem terapötik hem de görüntüleme ajanı olarak kullanılabilen multimodal QD tasarımına ilişkin şematik gösterim. (b) İnsan vücudundaki ideal bir teranostik ajan için gerekenler: 1) retiküloendotelyal sistem (RES) arındırmasından kaçmalı, 2) Spesifik hücrelere hedefli olmalı, 3) Hücrelere girmeli, 4) Terapötik ajanı dağıtmalı ve 5) Muamelenin değerlendirilmesi.

Belki de QD tabanlı tranostikleri geliştirmeye yönelik en başarılı örnek, Bagalkot ve diğerleri tarafından sunulan, aynı zamanlı kanser görüntüleme ve izlenebilir ilaç takibi QD-Apt-DOX olarak kısaltılan QD-aptamer (Apt) - doksorubisin (DOX) konjugatıdır (Bagalkot et al., 2007b). Hedefleme modalitesi (RNA aptameri) LNCaP hücrelerinde eksprese edilen prostata seçimli membran antijenini (PSMA) belirlemek için tanısal modaliteye (QD'ler) yönelik fonksiyonel hale getirilmiştir. Terapötik yöntem olan doksorubisin (DOX), yaygın olarak kullanılan bir antrasiklin ilacı aptamere eklenmiştir. İlaç yükleme ve salımının

sensör haline getirilmesi, Şekil 1.10 a 'da gösterildiği gibi bi-FRET (ikili verici-söndürücü) tasarımına dayanıyor: (1) ilaç yükleme durumunda: hem QD hem de DOX floresansı, QD floresansı DOX tarafından söndürülmüştür ve DOX floresansı RNA aptamer ile söndürülmüştür, (2) ilaç salım durumunda: DOX, QD-Apt kompleksinden salındı, böylece hem QD ve DOX floresansı " AÇIK ", ve (3) ilaç nakli sırasında: DOX floresansı izlenebilmiştir. Bu çok fonksiyonlu QD, spesifik olmayan PC3 hücreleriyle karşılaştırıldığında hedeflenmiş LNCaP hücrelerine karşı terapötik özgünlüğü artırmak için *in vitro* olarak gösterildi. İlacın salınması ve taşınması, DOX a ait floresan ile izlenebilir, ancak enkapsüle DOX floresanının konjugattan fiziksel ayrışma veya aptamerin enzimatik bozunmasından kaynaklanıp etkilenmediği belli değildir. *In vivo* uygulamadan önce daha fazla optimizasyon gerektirebilirse de, bu çalışma alanda heyecan verici bir gelişme sunmaktadır. QD-lipozom sisteminin, görüntüleme ve terapi için, Şekil 1.10 b 'de gösterilen başka bir çok işlevli platform oluşturabileceğini de not etmeye layıktır. QD'ler, tipik olarak, bilayer membrana dahil edilir ya da bir QD-lipid vezikül oluşturan bir lipozom üzerine işlevselleştirilir (Al-Jamal et al., 2009; Al-Jamal et al., 2008).

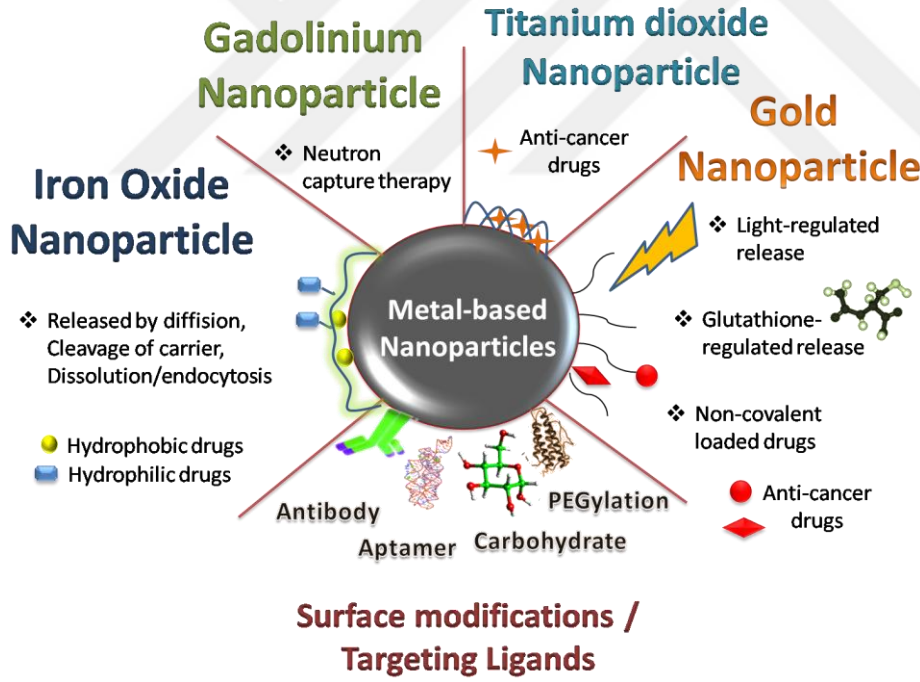


Şekil 1. 10 Multimodal teranostik QD lere ilişkin olası tasarımlar: (a) QD-Apt-DOX konjugatı eşzamanlı tanı ve tedavi imkanı sunabilen QD temelli bir teranostiktir. RNA aptameri hedefleme ajanı olarak kullanılmakla birlikte, DOX ise hem tedavi hem de bi-FRET etkisi gösterebilmektedir. Aptamer arasında yüklü olan DOX, QD ile birikirken

floresans sönümlenmişken, salındığında hem QD hem de DOX ışıma yapabilirler. (b) QD lere ilişkin kapsamlı teranostik tasarım rehberi şeklindeki gösterim. Ayrıca sağdaki QD-lipozom hibrit yapıları ise teranostik tedavilerde yeni bir yüz olarak ortaya çıkmaktadır.

1.2.1.3 Metalik nanopartiküller:Altın nanopartiküller (AuNPs)

Günümüzde, metal temelli nanoparçacıklar, yeni ilaç dağıtım sistemleri için kanser tedavisinde kullanılan başlıca taşıyıcı platformlardan biridir. Altın nanopartikül (AuNP), demir oksit nanopartikül (IO), gadolinyum (Gd) ve titanyum dioksit (TiO_2) parçacıkları, en sık kullanılan metal temelli nanoparçacıklardır (Doria et al., 2012). Metalik nanopartiküller atıl olup canlı dokuya zararlı olmasa da, ilaçla tedavi edildikten sonra vücutta birikmeleri toksisiteye neden olabilir. Bu arada, ilaç verme sistemlerinde taşıyıcı olarak metal esaslı nanopartiküllerin şematik temsili Şekil 1.11'de verilmiştir.



Şekil 1. 11 Farklı metalik nanopartiküller ve onlara ait yüzey modifikasyonları, ilaç yükleme, salım ve farklı terapi modalitelerinde kullanımını gösteren genel şema.

Altın nanopartiküller

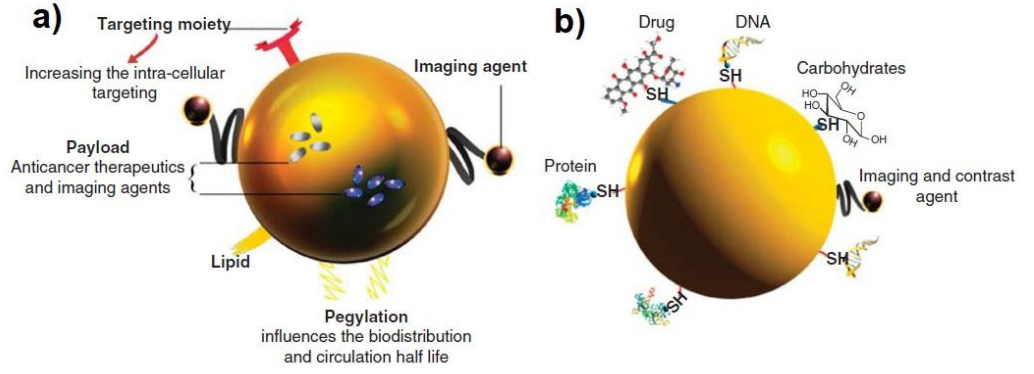
AuNP'ler potansiyel kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler olarak biyomedikal uygulamada ilgi çekici bir konu haline gelmiştir. AuNP'lerin istenilen boyut ve şekli (0.8 ila 200 nm arası) elde etmek mümkündür (Şekil 1.12). Üstelik bunların sentezi ve fonsiyonalitesi kolaylaşmıştır. En yaygın tercih edilen sentez yöntemine 1951'de bildirilen Turkevich yöntemi adı verilir. Bu teknik, kloroaurik asitin (HAuCl_4) su içinde sodyum sitrat ile indirgenmesini içerir ve önceden seçilmiş boyutta (10-147 nm arasında) sentez için gerekli olan farklı indirgeme / dengeleyici maddeler ve altın (III) türev oranlarını kullanarak küresel AuNP'ler elde etmeyi sağlar (Evanoff and Chumanov, 2004; Kimling et al., 2006). Ayrıca, AuNP'lerin yeşil sentezi de literatürde bildirilmiştir. Yeşil sentez yöntemine göre, organik çözücü içerisinde hazırlanan şifalı bitki özleri indirgeyici madde olarak kullanılır (Tiwari et al., 2011). Literatürde sentez ve stabilizasyon AuNP'leri için sözü edilen diğer yöntemler ksantatların, ditiyokarbamatların, disülfidlerin, di- ve trityollerin ve politiyoeterlerin kullanımına dayanmaktadır. Bununla birlikte, bu metotlar AuNP'lerin tıpta kullanımını planladıkları takdirde tercih edilmez (Daniel and Astruc, 2004).

Buna ek olarak, AuNP'lerin biyolojik moleküller ve anti-kanser ajanları ile yüzey modifikasyonu temel tekniklerle oluşturulabilir (Sonavane et al., 2008). Ayrıca AuNP'lerin hacmine oranla daha büyük yüzey alanı oranına bağlı olarak yüksek yoğunluklu ligandlar AuNP'lere tutturulabilir. Ayrıca, AuNP'ler biyolojik olarak uyumlu, inert ve toksik değildir. Bütün bu özellikler, AuNP'leri hedefleme ve ilaç yükleme uygulamalarında kullanmak için mükemmel bir aday yapmaktadır.



Şekil 1. 12 Soldan sağa boyutları artan AuNP koloidal solüsyonları.

İlaç salım sistemlerinde, bunlar yüzeylerinin kolay fonksiyonelleştirilmesi nedeniyle farklı şekillerde kullanılırlar (Şekil 1.13). Aktif formda olmayan ilaçların parçalanabilir bağlayıcılar vasıtasıyla kovalent bağ ile AuNP'lere konjugasyonu, salım stratejilerinden biridir. Diğer bir seçenek, salım sisteminde hidrofobik ilaçlar kullanıldığında, ilaçların AuNP'lerle kovalent olmayan etkileşimleridir. İlaçların taşınması ve bırakılması, etkin dağıtım sistemleri sağlamada kritik rol oynamaktadır. Taşıyıcı sistemlerin hücresel alımı etkin ilaç salımı için önemli bir parametredir. AuNP'lerin hücresel alımı, yük, boyut ve yüzey fonksiyoneliğine bağlıdır. İlaç yüklü AuNP'ler ilacı iç ya da dış uyaranlarla serbest bırakabilir. Nanotaşıyıcıların ilaç salım profili, hücre içi glutatyon (GSH) seviyelerine dayanır. Yüksek intraselüler GSH konsantrasyonu, çekirdekteki ya da disülfür değişimi yoluyla yer değiştirme reaksiyonları nedeniyle ilaç salımını önemli ölçüde artırır (Duncan et al., 2010; Ghosh et al., 2008; Kim et al., 2009; Patra et al., 2010; Pissuwan et al., 2011). Harici olarak kontrol edilen ilaç salımı için bir diğer kullanışlı yaklaşım ışık tetikleyici salımlardır. Özetle, AuNP'lerin ilaç salımında umut verici bir yapı sağladığını kolayca söyleyebiliriz.



Şekil 1. 13 AuNP lerin multifonksiyonel doğasını gösteren şema. a) Folik asit, antikorlar veya peptidler gibi aktif hedefleme ligandları AuNP'ye konjuge edilebilir. PEG gibi hidrofilik polimerler ile yüzey modifikasyonu pasif hedefleme özelliklerini geliştirebilir; b) Farklı biyoaktif molekül sınıfları, doku ve hücreleri hedeflemeyi hedef alanlarına değinmek için konjuge edilebilir veya AuNP'lerle birleştirilebilir.

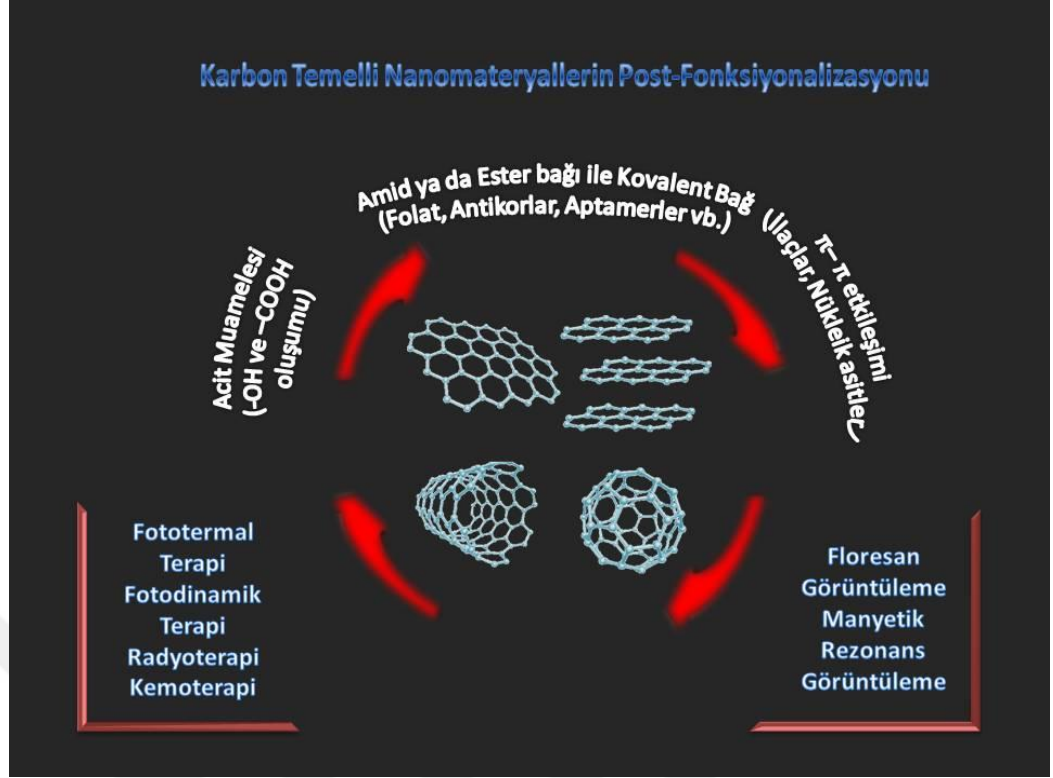
Bazı durumlarda AuNP sentezinin iyi olmasına rağmen, NP'lerin bazen kolloidal kararlılığı, uzun vadeli istikrar durumunda agregasyon problemleri yaratabilir. Ayrıca, AuNP'ler toksik olmayan materyaller olarak bilinir, ancak 1.4 nm boyutlu AuNP'ler HeLa hücrelerinin toksikliğini 15 nm AuNP'lerden daha büyük ölçüde indüklemiştir (Pan et al., 2007). Bu arada kolloidal NP'lerin toksisitesi de yüzey kimyasından kaynaklanmaktadır. Bu durumla ilgili olarak, yüzeydeki fonksiyonel grupları tam olarak kontrol etmek ve ayrıca partikül sentezinden kaynaklanan kalıntı kirleticileri (özellikle sitrat) kaldırmak önemli bir rol oynar (Freese et al., 2012; Hauck et al., 2008; Niidome et al., 2006). Dolayısıyla, polimer kaplı AuNP'lerin önemi genişletilmiş işlevselliklerin katkısı, bileşimi ve yükü açısından büyüktür. Bugüne kadar, polietilen glikol (PEG) (Spadavecchia et al., 2016) hyaluronik asit (Cheng et al., 2014), kitosan (H. Huang and Yang, 2004), tiyolat polivinilpirolidon (Fu et al., 2011), heparin (I. C. Sun et al., 2009) ve benzeri ile kaplanmış AuNP'ler ile ilgili birçok çalışma rapor edilmiştir. Ayrıca AuNP'lerin radyasyon terapisinde mükemmel bir kabiliyeti vardır. Kanserlerin yarısı için yaygın olarak kullanılan terapötik bir araç olarak bilinen radyoterapi, hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) ve süperoksit anyon ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretildiği kanser dokusu hasarına dayanmaktadır X ışınlarıyla aydınlatma üzerine. Ayrıca, altının (atom numarası, $Z = 79$) altının fotoelektrik etkisi nedeniyle karbon ($Z = 6$), gadolinyum ($Z = 64$) ve platin ($Z = 78$) gibi radyasyona duyarlı diğer elementlere göre daha iyi bir radyasyon etkisi vardır (Muddineti et al., 2015). Ayrıca, PEG, polisakkaritler, poloksaminler veya

poloksamerlerle kaplı AuNP'ler radyasyon terapisine dahil edilmiştir. Bu tarz çalışmalarla da kanıtlandığı üzere AuNP' ler taşıyıcı olmanın yanı sıra radyoterapi ve fototermal terapi çalışmalarında da kullanılabilir.

1.2.1.4 Karbon temelli nanomateriyaller: Karbon noktalar

Karbon temelli nanomalzemeler (CBN'ler), çeşitli araştırma alanlarında en çok kullanılan nanoyapılar sınıflarından biridir. Mekanik, elektriksel ve optik olarak bir araya getirilen mükemmel özelliklerinden dolayı, CBN'ler son iki on yılda nanoteknolojide ilgi çekici konuma yükseldi. Bu yapılar içinde mekanik ve elektronik nano-mühendisliğinden biyomedikal amaçlarla geniş bir uygulama yelpazesi çeşitli araştırma grupları ve endüstrilerin araştırma geliştirme departmanı tarafından gerçekleştirilebilir (Cha et al., 2013; Mauter and Elimelech, 2008; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2014). CBN'lerin kullanımı içindeki tüm bu yeni stratejik ilerlemeler arasında, grafen oksit, karbon nanotüpleri (CNT), nanodiamondlar (nanoelmas), fullerenler (buckyballs) dahil olmak üzere bu karbon allotroplarının işlevselleştirilmesi ve modifikasyonu, meydana gelebilecek çeşitli rahatsızlıklarla ilgili biyolojik sistemlerde terapötik uygulamalar yapmayı başarmışlardır.

Karbonlu nanoyapıların iyileştirilmesi için genel proses, nanoparçacıkların modifikasyondan sonra işlevsel hale getirilmesiyle başlar. Van der Waals, hidrofobik etkileşimler ve CBN'ler ve modifiye edici ajanlar arasındaki π - π etkileşimleri çekici olmakla birlikte ve kimyasal olarak da iyi bilinmektedir. Bu tür etkileşimlerin yanı sıra, bazı CBN'lerin asitle muamelesi, bir kovalent bağ oluşturarak terapötik ilaçlar, antikorlar, aptamerler veya hidrofilik floresan molekülleri için mükemmel barınaklar oluşturabilir. Bu nedenle, bu materyallerin tanımlanması ve terapötik uygulamaları CBN'lerin doğasına bağlı olarak belirli altı yazılar altında araştırılmalıdır (Şekil 1.14).



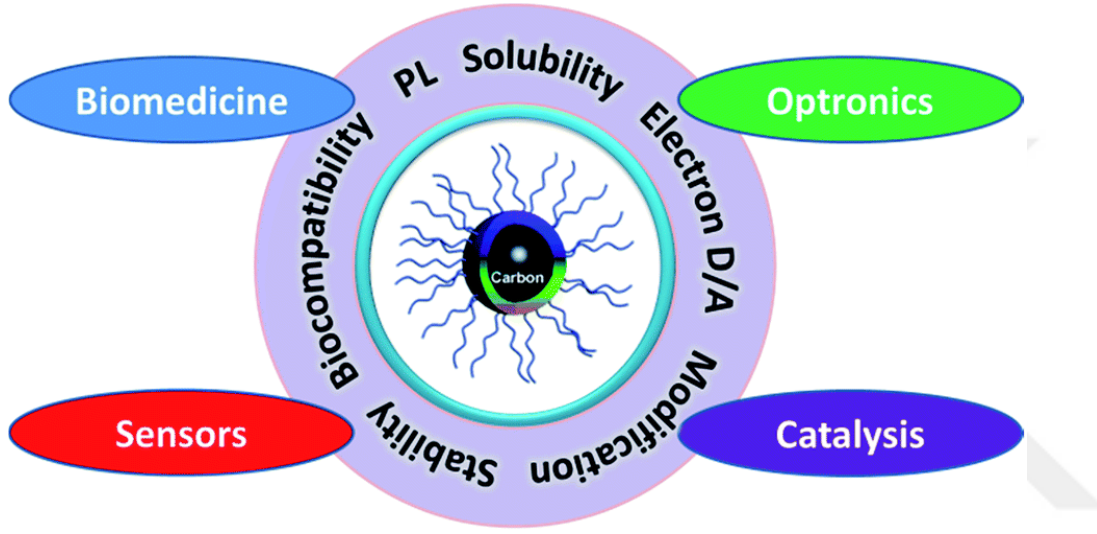
Şekil 1. 14 Karbon yapıları nanomateriyallerin biyomedikal uygulamalarda teranostik ajan olarak kullanım özeti.

Karbon Noktalar

Grafen kuantum noktalarından (GQD'ler) ve karbon kuantum noktalarından (CQD'ler, C-noktalar veya CD'ler) oluşan karbon temelli kuantum noktaları, 10 nm'nin altında boyutlara sahip karbon nanomalzemelerinin yeni bir sınıfıdır. İlk duvarlı karbon nanotüplerinin saflaştırılması esnasında, 2004'de (Xu et al., 2004) hazırlayıcı elektroforez esnasında ve daha sonra 2006'da grafit tozunun ve çimentonun lazer ablasmanı (Sun et al., 2006) yoluyla elde edildi. Büyüleyici özelliklere sahip karbon temelli kuantum noktaları benign, bol ve ucuz doğası nedeniyle bir nanokarbon üyesi olarak giderek yükselen bir yıldız haline gelmiştir (Baker and Baker, 2010). Karbon genellikle bir siyah malzemedir ve genellikle suda düşük çözünürlük ve zayıf floresans olarak düşünülmüştür. Geniş yelpazede bir ilgi odağı haline gelmeleri ve iyi çözünürlük ve kuvvetli parlaklık nedeniyle karbon temelli kuantum noktaları üzerinde yoğunlaşmıştır.

Geleneksel yarı iletken kuantum noktalarıyla ve organik boyalarla karşılaştırıldığında, fotoluminesans karbon bazlı kuantum noktalar yüksek (sulu)

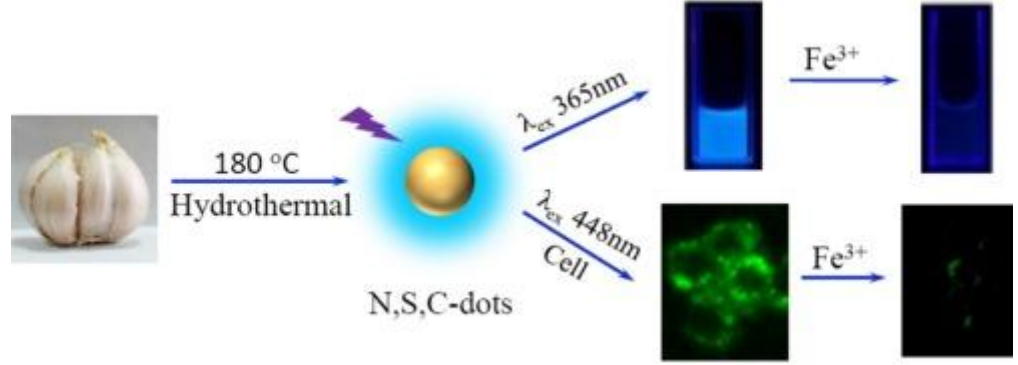
çözünürlük, sağlam kimyasal stabilite, kolay modifikasyon ve fotosönümlenmeye karşı yüksek direnç bakımından daha üstündür. Düşük toksisite ve iyi biyolojik uyumluluk gibi karbon bazlı kuantum noktalarının üstün biyolojik özellikleri, onları biyogörüntüleme, biyosensör ve biyomolekül / ilaç dağıtımında potansiyel uygulamalarda kullanıma elverişli hale getirir. Elektron vericiler ve alıcılar olarak karbon bazlı kuantum noktalarının olağanüstü elektronik özellikleri, kemilüminesans ve elektrokimyasal parlaklığa neden olur; optik, kataliz ve sensörlerde kendilerine geniş potansiyeller kazandırır (Şekil 1.15).



Şekil 1. 15 CD lerin kullanım alanları: Biyotıp, optronik, sensörler ve kataliz (Wang and Hu, 2014).

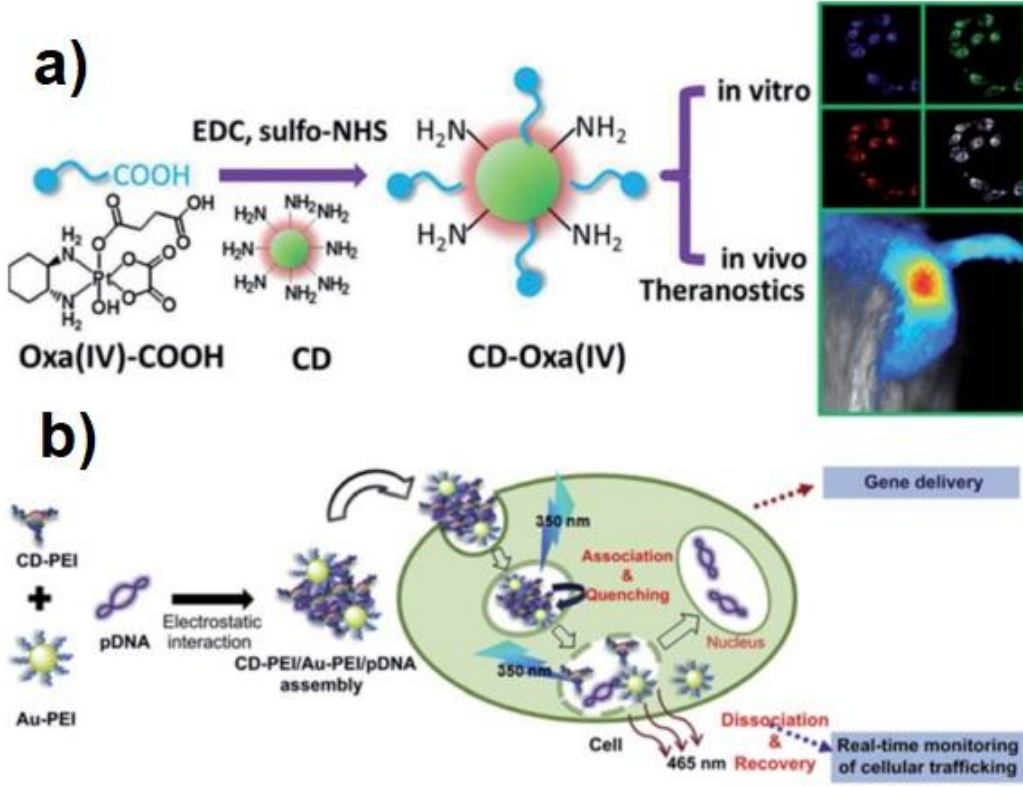
Hidrotermal karbonizasyon (HTC) veya solvotermal karbonizasyon çeşitli prekürsörlerden yeni karbon bazlı malzemeler üretmek için düşük maliyetli, çevre dostu ve toksik olmayan bir yoldur. Genellikle, bir organik prekürsör çözeltisi kapatılır ve yüksek sıcaklıkta bir hidrotermal reaktörde reaksiyona sokulur. CD'ler, glukoz (Yang et al., 2011), sitrik asit (Zhu et al., 2013), kitosan (Yang et al., 2012), muz suyu (De and Karak, 2013) ve kaz tüyü (R. Liu et al., 2015) gibi birçok prekürsörden HTC vasıtasıyla hazırlanmıştır. Mohapatra ve arkadaşları Portakal suyunun hidrotermal arıtılması ve bunu takiben santrifüjleme ile bir adımda % 26'lık kuantum verimi ile yüksek fotolüminesans CD'ler hazırladı (Sahu et al., 2012) 1,5-4,5 nm boyutlarındaki bu CD'ler, yüksek fotostabilitesi ve düşük toksisitesi nedeniyle biyolojik görüntüleme yönteminde uygulandı. Liu ve ark. , 180 ° C'de 12 saat süre ile kitosanın hidrotermal karbonizasyonu ile amino-işlevselleştirilmiş floresant CD'lerin tek adımda sentezlendiğini bildirdi (Yang et

al., 2012) Amino fonksiyonlu fluoresan CD'lerin yeni biyolojik görüntüleme ajanı olarak doğrudan kullanılabilceğini unutulmamalıdır.



Şekil 1. 16 Hidrotermal teknikle sentezlenmiş CD ler ve iki farklı eksitasyon ışması ile Fe analizi ve hücre görüntülemeye kullanımı (Chen et al., 2016).

Multifonksiyonel bir teranostik ajan olarak ise (CD-Oxa), amin grupları içeren CD'lerin yüzeyine bir anti-kanser maddesinin (okside edilmiş oksaliplatin, oksa (IV) -COOH) konjugasyonu ile hazırlanmıştır. CD-Oxa, CD'lerin optik özelliklerini ve Oxa'nın terapötik performansını başarıyla bütünleştirmiştir. *In vitro* sonuçlar, CD-Oxa'nın iyi biyoyumluluk, biyolojik görüntüleme fonksiyonu ve antikanser etkilerine sahip olduğunu göstermiştir. *In vivo* sonuçlar, ilacın enjeksiyon zamanını ve dozajını özelleştirmeye yardımcı olan CD-Oxa'nın pozitifleşme sinyalini izleyerek ilacın takibini veya dağılımını izlemenin mümkün olduğunu göstermektedir (Şekil 1.17a).



Şekil 1. 17 a) CD-Oxa teranostik konjugatının şematik görüntüsü (Zheng et al., 2014). b) CD-PEI/Au-PEI / pDNA kullanılarak monte edilen nano-hibridleri kullanarak hücreye naklinin gerçek zamanlı izlenmesi ve gen aktarımı için şematik bir resim (Kim et al., 2013).

1.2.2 Teranostiklerde kullanılan biyoaktif yapılar

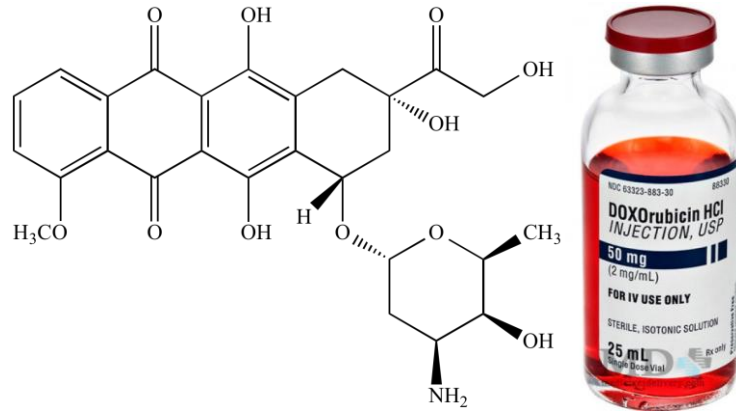
Multifonksiyonel özellikle teranostik nanopartiküllere ilişkin olarak ilk kısımda taşıyıcı seçiminden söz edilmiştir. Bu kısımda da taşıyıcı partiküllere konjuge edilebilen veya fiziksel olarak tutuklanabilen ağırlıklı olarak terapötik etkiye sahip olan biyolojik aktif materyallerden bahsedilecektir. Çok geniş yelpazeye sahip olan bu kısımda daha çok tez kapsamında kullanılan terapötik etkiye sahip materyaller söz konusu olacaktır.

Tez kapsamında kullanılan teranostik partikül tasarımları genel olarak kansere yönelik olarak tasarlanmıştır. Kanser, hücre büyümesi ve hücre döngüsü süreçlerini etkileyen DNA mutasyonlarından kaynaklanan karmaşık bir hastalık kümesidir. Kanser heterojen koşulları geniş bir yelpazede kapsamayı ve yüksek düzeyde öngörülemez olması, erken teşhis ve etkili tedavi için sayısız zorluğa neden olmakta ve kanseri 21. yüzyılda dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Yalnız Amerika Birleşik Devletleri'nde kanserin

2010 yılında 569.500 ölümle sonuçlanması beklenmiştir. Kanser için güncel tedavi teknikleri ameliyat, radyoterapi, kemoterapi hipertermi, immünoterapi, hormon tedavisi, kök hücre tedavisi ve bunların kombinasyonlarını içermektedir. Birçok durumda erken teşhis, tedavi rejimini ve terapötik müdahalenin seçimini yönlendiren önemli faktördür. Bir tümörün tespit edildiği evre, adjuvan tedaviye gerek kalmadan cerrahi olarak çıkarılıp çıkarılamayacağını veya tipik olarak ameliyat, radyasyon ve kemoterapi içeren yaklaşımların bir kombinasyonunu gerektirip gerektirmeyeceğini belirler.

1.2.2.1 Kemoterapi: Doksorubisin (DOX)

Doksorubisin, değiştirilmemiş haliyle, Food and Drug Administration'ın onayladığı kemoterapötik ilaçların en güçlü ilaçlarından biri olarak kabul edilerek büyük bir tedavi potansiyeli göstermiştir. Hızlı bölünen hücrelere karşı savaşma yeteneği ile hastalığın yavaş ilerlemesini sağlayarak, insan vücudundaki kanserli hücreler üzerindeki toksisitesi ile sınırlı olarak, on yıllardır yaygın olarak kabul görmüştür. İlaç, aglikonik ve şeker parçalarına sahip, seçici olmayan bir sınıfı anthrasiklin sınıfıdır. Aglikon, kinin-hidrokinon bitişik grupları olan bir tetrasiklik halkadan, metoksi barındıran kısa yan zincirden sonra karbonil grubundan oluşmaktadır. Şeker bileşeni (daunosamine olarak da bilinir) bir halkaya bir glikozidik bağ ile bağlanır. Bu bir 3-amino-2,3,4-trideoksi-L-fukozil grubundan oluşur.



Şekil 1. 18 DOX un moleküler yapısı ve ticari intravenöz kullanım preparatı.

DOX, DNA ile ilişkili enzimlere bağlanarak etki eder, DNA çift sarmalının baz çiftlerinin arasına girebilir. Topoizomeraz enzimler I ve II gibi çoklu moleküler hedeflere bağlanarak anti-çoğalma ile birlikte bir dizi sitotoksik etki meydana gelir ve böylece DNA hasarı oluşur. Apoptoz yolu, DNA kopmalarını

onarım girişimi başarısız olduğunda tetiklenir ve G1 ve G2 evrelerinde hücresel büyüme inhibe edilir. DOX'un, hem DNA hem de RNA polimerazın inhibisyonu ile DNA'ya interkale ettiği ve sonuç olarak DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu durduğu biliniyor (Tacar et al., 2013).

Daha önce de belirtildiği gibi, antrasiklin ilaçlarının ana yan etkileri, çok yönlü sitotoksik etkilerdir ve kardiyotoksisite en belirgini olmuştur. Faz II ve III araştırmaları sırasında 1970'lerde DOX üzerine yapılan erken klinik değerlendirmeler, akut kusma ve mide bulantısı, gastrointestinal problemler, kellik ve nörolojik sisteme ilişkin bozuklukların ortak yan etkilerini göstermiştir (genellikle halüsinasyonlara ve ışık hassasiyetine neden olur). Ne yazık ki DOX spesifik olarak tümöre yönelik değildir ve vücudun bir çok başka hücre tipinin büyümesini etkileyebilir. Bu, bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olur ve bağışık hücre sayısı azaldığında, hasta mikrobiyal enfeksiyonlara daha duyarlı hale gelir, yorgunluk ve iyileşme süresi azalır. Bu etkilerin şiddeti ve oluşumu DOX dozajına ve hastanın kemik iliğinin rejenerasyon kapasitesine bağlıdır (Chatterjee et al., 2010). DOX un küçük bir damara sürekli uygulanmasıyla, fleboskleroz (damar duvarlarının kalınlaşması) gibi problemler ortaya çıkabilir ve eğer lokal dokularda veya organlarda ekstrasvazasyon olursa, nekroz ortaya çıkabilir. Ekstrasvazasyonun diğer yan etkileri arasında selülit, tromboflebit ve ağırlı endurasyonun (dokunun patolojik sertleşmesi) eklem hareketi sınırlaması yer alır (Carvalho et al., 2009; Tacar et al., 2013). Bu sebeplerden dolayı en çok kullanılan kemoterapötik ilaç için çeşitli şekillerde nanoformülasyonlar geliştirilmiştir. Şu anda doksorubisin (Doxil®), daunorubisin (Daunoxome®) sitarabin (Depocyt®), Myocet® ve vinkristin (ONCO-TCS®) dahil olmak üzere kanser tedavisi için piyasada bulunan birkaç lipozomal formülasyon bulunmaktadır. Lipozomal DOX, meme kanseri, yumurtalık kanseri, AIDS'e bağlı Kaposi sarkomu, baş/boyun kanseri ve beyin tümörleri için klinik olarak araştırılmıştır.

1.2.2.2 Radyoterapi: Radyosensitizerler

Radyoterapi, malign lezyonların tedavisinde en önemli terapötik yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu alan son zamanlarda hızla ilerlemektedir. Radyosensitizer ve radyoprotektif ajanlar kullanılarak, radyoterapi sırası ile tümör hücrelerinin sensitizasyonunu ve normal hücrelerin korunmasını geliştirmiştir. Radyosensitizerler, tümör hücrelerini radyasyona duyarlı hale getiren ajanlardır. Bu bileşikler, moleküler düzeydeki radyasyon hasarı ile üretilen

serbest radikallerin fiksasyonunu teşvik etmektedir. Etki mekanizması, zararlı moleküllerde biyokimyasal reaksiyonların hücrel radyasyon hasarının onarılmasını önlediği oksijen etkisine benzer. OH^+ gibi serbest radikaller radyosensitizerlerin elektron afinitesi ile yakalanır ve moleküllerin onarılamaması mümkün olur. Radyoprotektörler, radyasyondan kaynaklanan normal dokulardaki hasarı azaltmak için tasarlanmış bileşiklerdir. Bu bileşikler genellikle antioksidandır ve etkinlik için önce veya radyasyon sırasında bulunmalıdır. Radyasyon verildikten sonra bile toksisitenin en aza indirgenmesi için hafifletici olarak adlandırılan diğer ajanlar kullanılabilir.

Radyasyon terapisinin amacı, normal dokulara zarar vermeyi en aza indirirken (terapötik oran) maksimum tümör hücresi öldürmeyi başarmaktır. Lokal tümör yetmezliği, kanser ölümlerinin %40 ile %60'ının nedenidir ve ölüm anındaki kanser hastalarının %60 ile %80'inde ortaya çıkabilir. Terapötik oranın iyileştirilmesine yönelik çabalar, tümör hücrelerinin radyo-duyarlılığını arttırmak veya normal hücreleri radyasyonun etkilerinden korumak için etkili bazı bileşiklerin gelişmesine neden olmuştur. Başarılı radyasyon terapisinin amacı, bu nedenle, tümör hücrelerindeki radyasyon hasarını maksimize etmek ve aynı zamanda normal hücrelerde aynı radyasyon hasarını en aza indirmektir. Bu, ya radyasyon dozunun daha iyi lokalizasyonu ya da normal hücreler için diferansiyel radyoprotektörlerin kullanılması ve/veya tümör hücrelerinin radyasyona duyarlılaştırıcı sağlamasıyla mümkün olabilir.

Çizelge 1. 2 Çeşitli radyosensitizerlerin listesi.

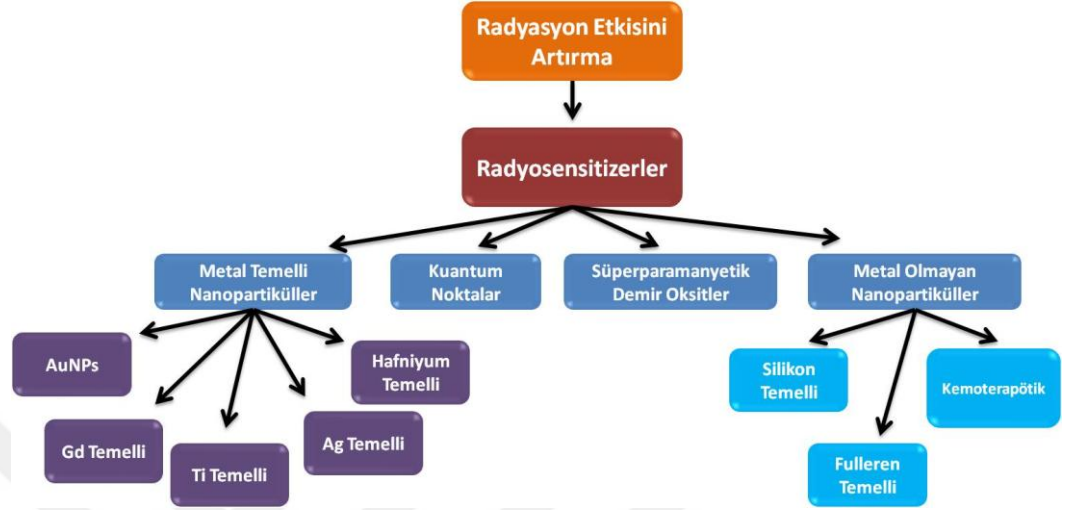
Hiperbarik oksijen
Karbojen
Nikotinamid
Metronidazol ve analogları (misonidzol, etanidazol, nimorazol)
Hipoksik sitotoksik ajanlar (mitomisin-C, tirapazamin)
Membran aktif ajanlar (procaine, lidocaine, klorpromazin)

Radyosensitif nükleozidler (5-florosaçıl, florodeoksiuridin, bromodeoksiuridin, iyododeoksiuridin, hidroksiüre, gemesitabin, fludarabin)
Teksafirin (moteksafin gadolinyum)
Sülfidral grup baskılayıcıları (N-etilamid, diamid ve dietilmaleat
Hipertermi
Yeni radyosensitizerler (paklitaksel, dokataksel, irinotekan)

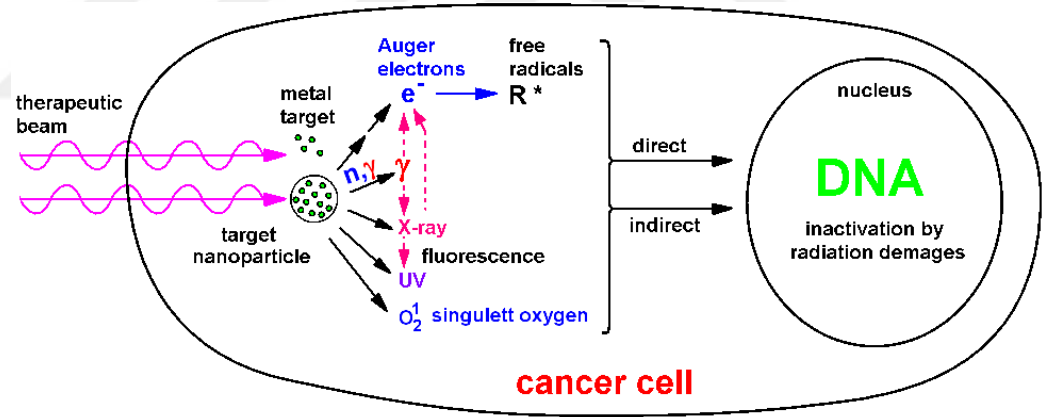
Gama ışınları veya X ışınları gibi yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyonlar esasen hücresel bileşenleri ve/veya suyu iyonize etmek için kullanılır. Alfa veya beta parçacıkları veya elektron, proton veya nötron ışınları gibi parçacık radyasyonları, bazı özel durumlarda kanser dokusunu hedeflemek için kullanılır. Su hücrelerin önemli bir bileşeni olduğu için bu molekülün radyasyon kaynaklı parçalanmaya neden olan bu iyonlaştırıcı radyasyonun ana hedefidir. Bir kimyasal çözünmeden farklı olarak, bu radyoliz sadece yüklü türevlerin değil aynı zamanda hidrojen radikali $H^{\bullet}$, hidroksil radikal $OH^{\bullet}$, süperoksitler $O_2^{\bullet -}$ gibi serbest radikallerin ve H_2O^+ ve H_2O^+ gibi yüklü su türlerinin oluşumuyla sonuçlanır. Diğer birçok hücresel bileşeni de hasar görmesine rağmen DNA, radikallerle birlikte iyonlaştırıcı radyasyonların birincil hedefidir. Serbest radikallerin membran yapılarıyla etkileşimi de apoptozu indükleyen yapısal hasarlara neden olur. Hidroksil iyonu birçok çalışmada hücresel hasarın önemli bir kaynağı olduğu ve lipid peroksidasyonunu indüklediği bilinmektedir. Lipid bilayeri ile olan etkileşim, hücrelerin geçirgen hale getirilmesi için de gösterilmiştir.

Son birkaç yıldır, özellikle metal (ağırlık olarak altın) temelli nanopartikülleri kullanarak radyoterapötik etkileri arttırmak için formülasyonların kullanımına olan ilgide önemli bir artış olmuştur. Yoğun haldeki metal parçacıkları, yüksek enerjili gama/X-ışını radyasyonlarını seçici olarak dağıtabilir ve/veya emebilir. Bu, tümör dokuları içindeki hücresel bileşenlerin daha iyi hedeflenmesini sağlar ve daha lokalize ve sinerjik şekilde hasara izin verir. Metallerin yüzeyinin gama ışımasına maruz kalması üzerine fotoelektron saçılması da arttırılmış aktivite mekanizması olarak önerilir (Şekil 1.19 ve Şekil 20). Tüm alınan sonuçların kombinasyonu, sağlıklı doku hasarını daha da

sınırlayan terapötik radyasyon dozunu belirlemede de yardımcı olur. Nanomateryal radyosensitizerlerin kullanımına Nanopartikülle Artırılmış X-ışını Terapisi veya NEXT denir (Kwatra et al., 2013; Raviraj et al., 2014).



Şekil 1. 19 Radyoterapötik etkinin artırılmasında kullanılan nanopartiküller.



Şekil 1. 20 İndirekt radyasyon terapisi ile hedef materyal üzerinde ikincil radyasyon ürünlerinin oluşması sonrası kanser hücrelerinin inaktivasyonu (<http://www.mpsd.de/irt/IRT.html>).

1.2.2.3 Fotodinamik terapi: Fotosensitizerler

Fotodinamik terapi (PDT), malign hücelere karşı seçici bir sitotoksik aktivite gösterebilen klinik olarak onaylanmış, minimal invaziv bir terapötik işlemdir. İşlem, bir fotosensitizer maddenin uygulanmasını ve ardından sensitizörün bir absorbands bandına karşılık gelen bir dalga boyunda ışımayı içerir. Oksijen varlığında, bir dizi olay doğrudan tümör hücresi ölümüne, mikro damar

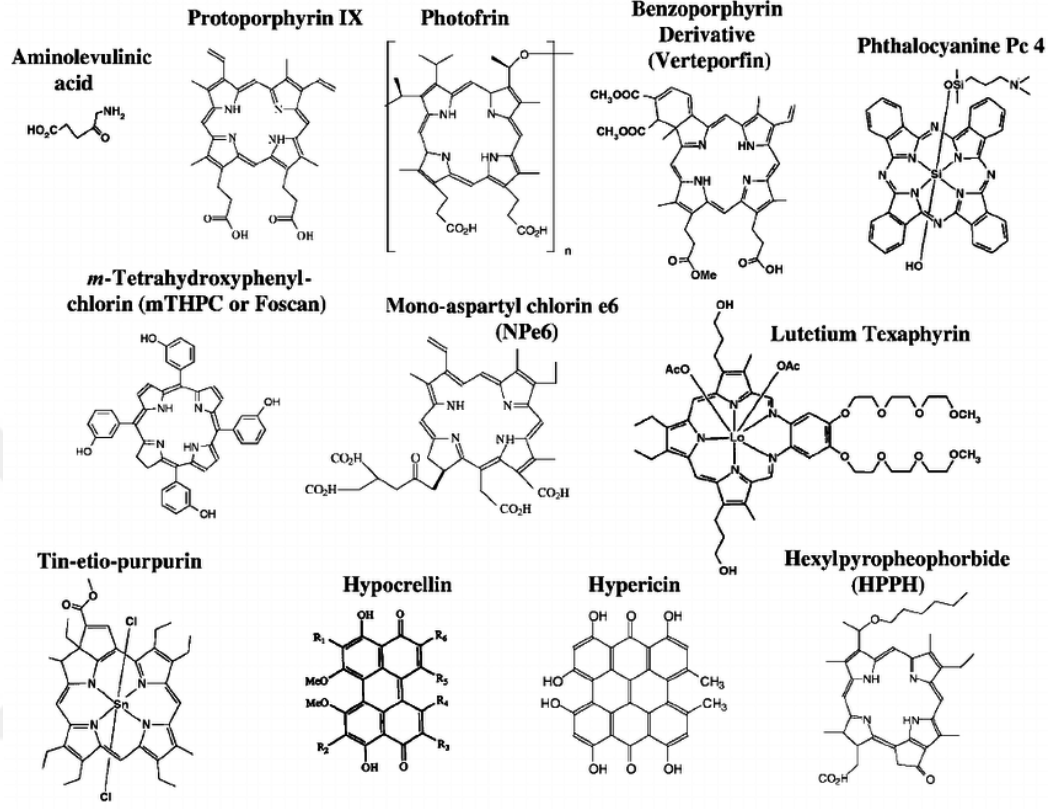
sistemine hasar vermeye ve lokal bir inflamatuvar reaksiyonun indüklenmesine yol açar. Klinik çalışmalar, özellikle erken evre tümörlerde PDT'nin iyileştirici olabileceğini ortaya koymuştur. Kullanılmayan kanserlerde sağ kalımı uzatabilir ve yaşam kalitesini önemli ölçüde artırabilir. Minimal normal doku toksisitesi, ihmal edilebilir sistemik etkiler, uzun süreli morbiditenin azalması, intrinsik veya kazanılmış direnç mekanizmaları eksikliği ve mükemmel kozmetik yanı sıra organ fonksiyonu koruyucu etkileri bu kombinasyon tedavileri için değerli bir tedavi seçeneği haline getirir. Yakın zamanlardaki teknolojik gelişmelerle PDT, kanser tedavisinin ana akımına entegre olma potansiyeline sahiptir.

PDT üç temel bileşenden oluşur - fotosensitizer (PS), ışık ve oksijen (Dougherty et al., 1998; Dougherty et al., 1978). Bunların hiçbirisi ayrı ayrı toksik değildir ancak birlikte, singlet oksijen olarak adlandırılan oldukça reaktif bir ürünün oluşumuyla sonuçlanan fotokimyasal reaksiyon başlatırlar. İkincisi, apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olacak önemli toksisiteye hızla neden olabilir. PDT'nin antitümör etkileri birbiriyle ilişkili üç mekanizmadan kaynaklanır - tümör hücreleri üzerine doğrudan sitotoksik etkiler, tümör vaskülatürüne hasar ve sistemik bağışıklığın gelişimine yol açabilecek güçlü bir inflamatuvar reaksiyonun indüksiyonu. Bu mekanizmaların katkısı göreceli olarak, kullanılan PS'nin tipi ve dozu, PS uygulaması ile ışık maruziyeti arasındaki zaman, toplam ışık dozu ve akıcılık oranı, tümör oksijen konsantrasyonu ve belki de diğer zayıf olarak fark edilen diğer değişkenlere bağlıdır. PDT'de klinik ve pre-klinik aşamalarda kullanılan PS'ler Şekil 1.21 de özetlenmiştir.

Protoporfirin IX (PpIX)

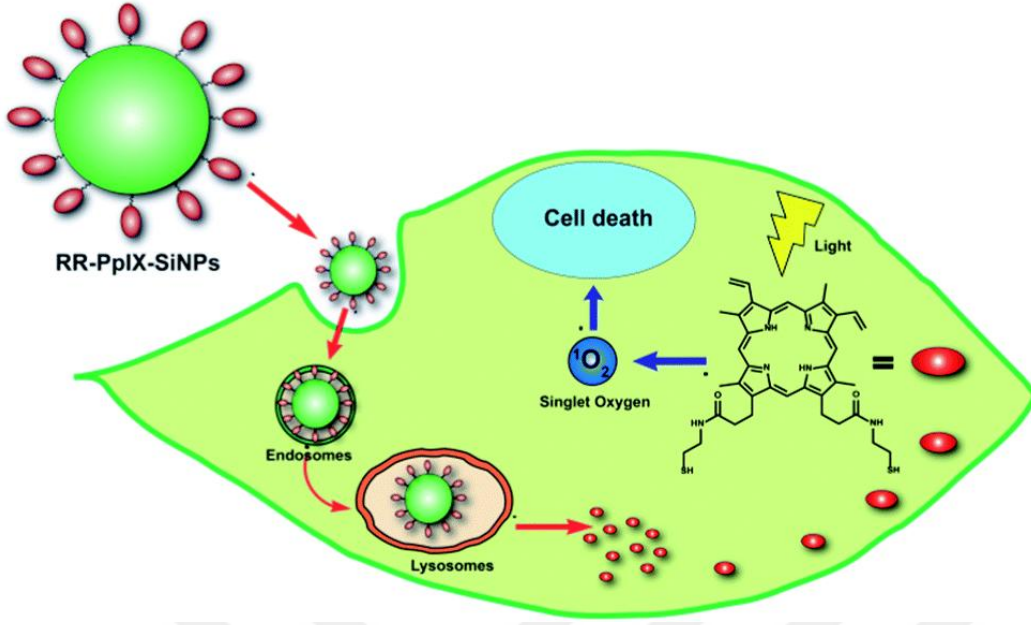
Porfirinler, tıpta fotosensitize edici ilaçlar olarak yaygın olarak uygulandıkları için dünya çapında araştırmacıların ilgisini çeken tetrapirollerin bir sınıfıdır. Deuteroporfirin IX, hematoporfirin IX, hematoporfirin türevi, mezoporfirin IX ve PpIX gibi porfirin IX türleri, yeni bir kanser tedavisi modeli olan PDT'de yaygın olarak kullanılan fotosensitizerlerdir. Protoporfirin IX, heme ler, sitokrom c ve klorofil için metabolik bir prekürsör olan 4 metil, 2 propiyonik ve 2 vinil yan zinciri içeren bir tetrapirrole sahiptir. Protoporfirin IX, protoporfirinojenin metilen köprüsünün protoporfirinojen oksidaz enzimi tarafından oksidasyonu ile üretilir. Protoporfirin IX doğal olarak dışkıda az miktarda bulunur. PpIX, ayrıca kuş yumurtalarının kahverengi pigmentlerinden (Ooporfirin) sorumludur. PpIX, Heme'ye (demir yerleştirilerek) ve klorofillere (Mg eklenmesiyle ve diğer yan zincir transformasyonu ile) geçen biyosentetik

yolda bir dal noktası olarak kullanılır. PpIX karaciğer hastalıklarını, özellikle, sodyum tuzu formunda, tedavi etmek için kullanılabilir. Bunun yanında anti-HIV aktivitesi de gösterebilir (Vzorov et al., 2002).



Şekil 1. 21 Klinik veya klinik öncesi araştırmalarda seçilmiş fotosensitizerlerin isimleri ve yapıları. Bunlardan üçü klinik PDT için düzenleyici onay aldı: Photofrin; Benzoporfirin türevi (Verteporfirin); ve PpIX un metabolik öncüsü olan aminolevulinik asit (Levulan).

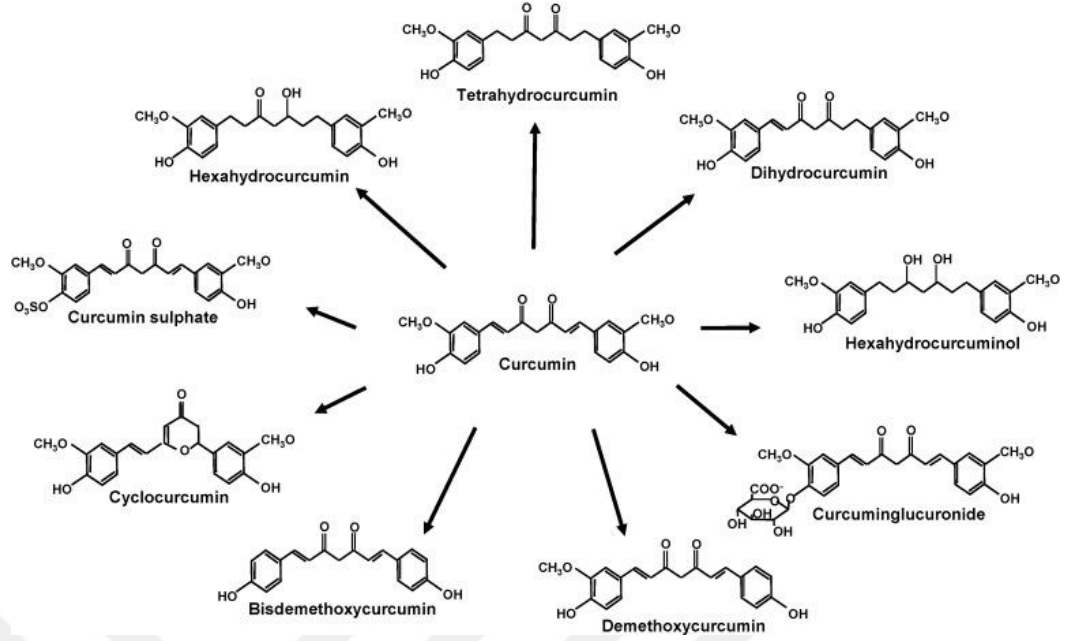
Daha önceki çalışmalarda PpIX un multimodal teranostik modalitelerinde de yer aldığı görülmüştür. Bunun için radyoterapide gadolinyum nanopartiküller ile PpIX PDT eşliğinde multimodal görüntüleme ve tedavi açısından niozomlar içerisinde biyouyumluluğu artırılmış şekilde tasarlanmıştır (Barlas et al., 2016). Ayrıca PpIX un kullanımına bir örnek olarak da uyarıcı cevaplayıcı sistemlerin PpIX konjuge silika nanopartiküller halinde kanser hücrelerine uygulanması verilebilir (Vivero-Escoto and Vega, 2014).



Şekil 1. 22 Uyarıcı cevaplayıcı silikon NP temelli PpIX teranostik ajanı ve kanser hücrelerine PDT uygulaması (Vivero-Escoto and Vega, 2014).

1.2.2.4 Doğal Bileşikler: Kurkumin

Bazı kanserler neden bazı ülkelerde diğerlerinden daha belirgindir, bu sorunun cevabı -diyet dahil- yaşam tarzının bu aşamada önemli rol oynamasıdır. Bu farklılığı oluşturan diyet alışkanlıklarından biri de zerdeçal ya da hintsafranıdır (*Curcuma longa*). Bu baharat birçok kanserin daha az görüldüğü ve zerdeçalın sıkça tüketildiği güneydoğu Asya kıtasında sıklıkla tüketilmektedir. Zerdeçal tozu Ayurveda, Unani ve Siddha tıbbında çeşitli hastalıklara yönelik evde hazırlanan preparatlar şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu toz, kurkumin (diferuloil metan), ilk önce 1815'te izole edilen, 1870'de kristalleştirilen (3,4) ve 1,6-heptadien-3,5-dion-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil) (1E, 6E) olarak tanımlanan sarı renkli bir polifenoldür. Doğa ana ve insan tarafından yapılan kurkumin analogları günümüzde tanımlanmıştır. Buna ek olarak, diferuloilmethan veya kurkumin dışında zerdeçal demetoksikurkumin (kurkumin II), bisdemetoksikurkumin (kurkumin III) ve yakın zamanda tanımlanan siklokurkumin gibi küçük fraksiyonları içerir. Bütün bu analoglar, kurkumindeki hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesi için gerekli olduğu halde, onun metoksi grupları, antienflamatuar ve antiproliferatif aktivitesi için esastır.

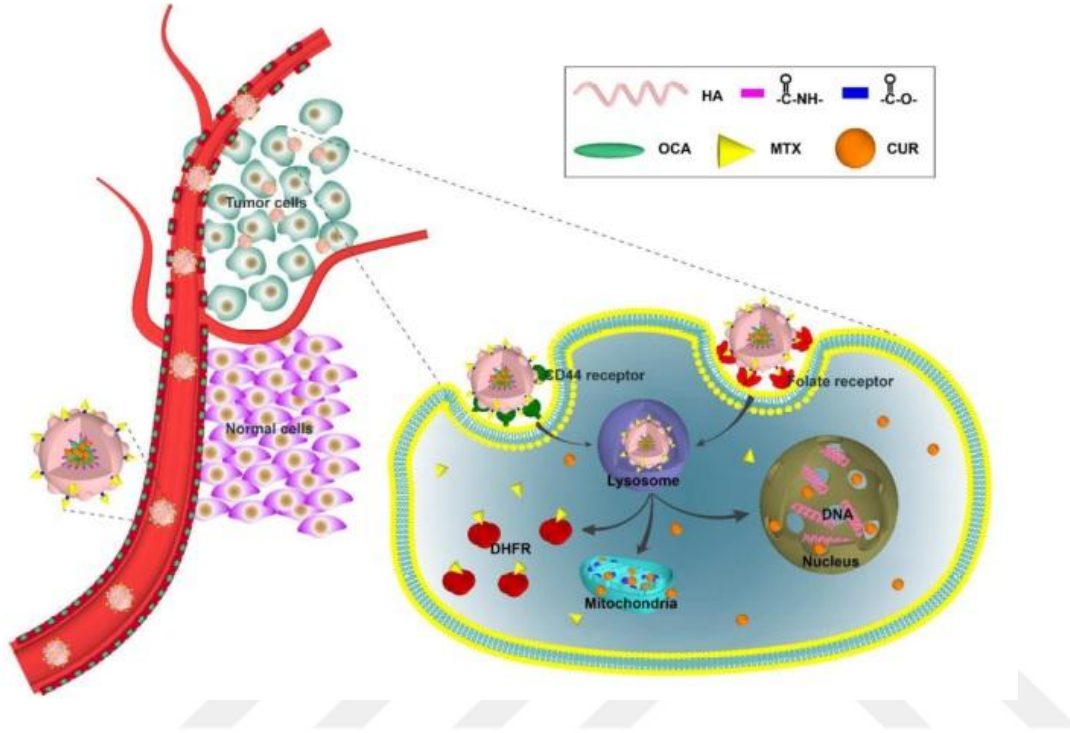


Şekil 1. 23 Kurkumin ve doğada bulunan analogları.

Hayvanlarda kurkuminin antikanserojenik özellikleri, tümör başlatma inhibisyonu (Huang et al., 1992) ve tümör teşviki (Conney et al., 1991; Huang et al., 1988) ile gösterilmiştir. Kurkumin üzerine yapılan çalışmalar, yapısal olarak direkt bir bağlantısı olmayan membran proteinlerini çeşitli sinyal yolları boyunca etkilediğini göstermiştir (Bilmen et al., 2001). Yakınlardaki bir çalışma, kurkuminin, lipidlerin fosfat grubuna hidrojen bağıyla bağlandığı transbilayer oryantasyonu ile hücresel membranın derinliklerine yerleştiğini ve dolayısıyla çift tabakada negatif kavis oluşturduğunu öne sürmektedir (Barry et al., 2009). Kurkumin ile negatif eğriliğin teşvik edilmesi, apoptotik protein tBid'in permeabilize edici aktivitesini artırarak apoptoz üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir (Epand et al., 2002). Kurkuminin çoklu sinyal yollarını bastırdığı ve hücre proliferasyonunu, istilasını, metastazı ve anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Kurkuminin kimyasal önleyici etkisi, çeşitli yollarla apoptozu uyarması yeteneğine bağlı olabilir. Kurkumin doğrudan veya dolaylı olarak hücre ölüm yollarında rol alan farklı genleri veya gen ürünlerini de kontrol eder.

Bu kadar özelliğinin yanında ilaç salım çalışmalarında da ilgi çekici hale gelen kurkumin düşük çözünürlüğe ve biyoyumumluluğa sahip olduğundan farklı taşıyıcı sistemler içerisinde enkapsüle edilerek kullanılmış ve biyolojik etkinliği artırılmıştır. Bunlardan birinde oktadesilamin ve hyaluronik asit ile enkapsüle edilmiş ve kanser hücrelerindeki CD44 ve folat reseptörlerine hedeflendirilmiş

misel yapısındaki konjugatta, kurkumin ile desteklenen terapötik etki *in vitro* ve *in vivo* olarak kanıtlanmış ve kurkuminin 350-500 nm arası eksitasyonu ile yeşil bölgede emisyon vererek hücre alımları izlenmiştir.



Şekil 1. 24 Dual reseptör hedefli kurkumin enkapsüle konjugatın kanser hücreleri üzerinde etkisinin şematik gösterimi (Song et al., 2017).

1.2.3 Teranostiklerde hedefleme stratejileri

1.2.3.1 Pasif hedefleme

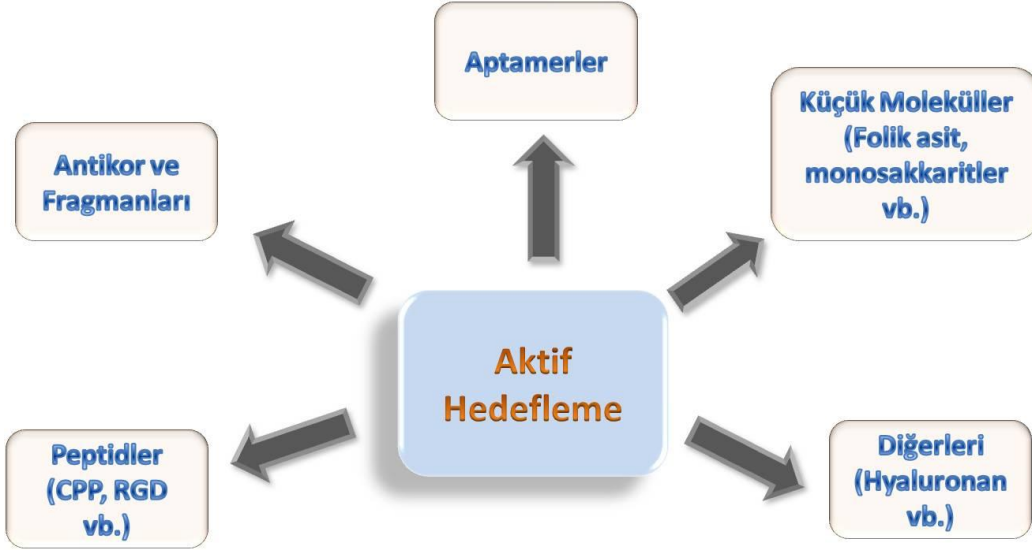
Çoğu nanopartikülün tümör kan damarlarının patofizyolojik özelliklerinden dolayı tümör içerisinde birikmesi beklenir. Besin maddelerinin aktif olarak büyüyen bir tümöre $2,0 \text{ mm}^3$ den daha büyük bir hacimle ulaştırılması difüzyonla sınırlıdır ve besin maddeleri ve oksijen sağlamak için yeni kan damarı oluşumu gerekir (Jones and Harris, 1998). Tamamlanmamış tümör damarlanması sızan damarlara neden olur ve 100 nm 'den $2,0 \text{ }\mu\text{m}$ a kadar oluşan boşluklardan makromoleküller tümör türüne bağlı olarak interstisiyuma kolayca erişir (Hobbs et al., 1998; Shubik, 1982; Yuan et al., 1995). Tümörler, normal dokulardan daha fazla bileşik tutma süresine sahiptir, çünkü tümörler iyi tanımlanmış bir lenfatik sisteme sahip değildir. Bu özellikler, tümör interstisiyumunda nanoparçacıkların pasif hedeflenmesi ve selektif birikimi için önemli bir mekanizmayı oluşturan

gelişmiş geçirgenlik ve tutma (enhanced permeation and retention, EPR) etkisi sağlar. DOX dağılımı için bir PEG kaplamalı lipozom sistemi olan Doxil® ve metastatik göğüs kanseri tedavisi için albumin bağlı paklitaksel nanopartiküller içeren Abraxane®, (ABD gıda ve İlaç İdaresi'nin temsilcisidir) formülasyonları FDA tarafından kanser tedavisi için nanotaşıyıcı temelli ilaçlar olarak onaylandı. Bu ajanlar, sistemik toksisiteyi azaltarak serbest antikanser ilaçlarınkinden yaklaşık 100 kat daha uzun ömür ile vücuda dolaşırlar.

Bununla birlikte, pasif hedefleme yaklaşımları çeşitli sınırlamalardan etkilenmektedir. EPR efektini kullanarak kanser hücrelerini hedeflemek, bütün tümörlerde uygulanabilir değildir, çünkü tümör damarlanması ve tümör damarlarının gözenekliliği tümör türüne ve durumuna göre değişebilir. Buna ek olarak, kanser hücreleri, nanoparçacıkların internalizasyonuna yol açan az sayıda belirli etkileşimi gösterebilir. Nanopartiküller ve opsoninler arasındaki etkileşimlerin engellenmesine ilaveten, yüzeylerin PEG ile kaplanması, nanoparçacıklar ve hücre yüzeyleri arasındaki etkileşimleri de azaltabilir. Bu durumda kontrol eksikliği, ilacın atılmasına ve kanser hücrelerinin çeşitli terapötik etkileri kaçınılmaz olarak azalttığı çeşitli ilaçlara (çoklu ilaç direnci, MDR) karşı direnç geliştirmesine neden olabilir. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için bir yaklaşım nanopartikül yüzeylerine hedefleme kısımları eklemektir.

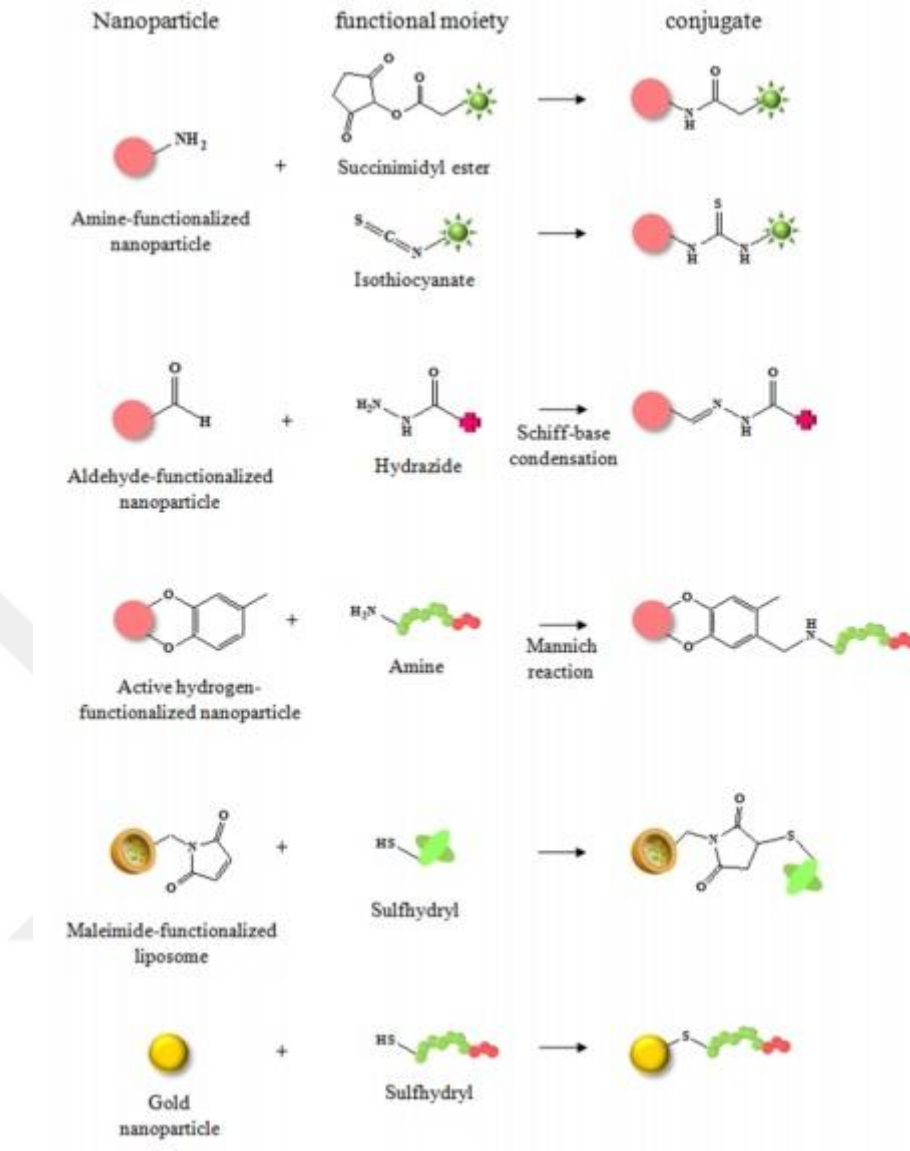
1.2.3.2 Aktif hedefleme

Hedefleme birimlerini içeren nanoparçacıklar, hücrenin içindeki reseptör aracılı endositozu ve ilaç salımını indükleyen ligand-reseptör etkileşimleri vasıtasıyla hedef hücrelere bağlanabilir. Etkin bağlanma ve internalizasyon, reseptörlerin normal hücrelere göre sadece hedef kanser hücrelerinde (hücre başına 10^4 - 10^5 kopya) ifade edilmesini ve ifade edilen tüm hedef hücrelerde homojen olmasını gerektirir (Peer et al., 2007a). Bu dağılım stratejisi, yüksek seçicilik ve dağılım verimliliği sağlarken, seçimli olmayan bağlanma ve MDR çıkış mekanizmasından kaçınmaktadır. Terapötik, diyagnostik veya bariyer önleyici özelliklere sahip birçok ligand, tek bir nanopartikül sisteminde geniş nanopartikül yüzey alanı boyunca birleştirilebilir. Multivalent hedefleme ile de bir parçacığın hedef hücreye doğru bağlanma afinitesini önemli ölçüde arttırabilmektedir. Yüzey modifikasyonları (Şekil 1.25), multimodal fonksiyonelliği sağlamak için hedefleme ligandları (örneğin, antikorlar, peptitler, küçük moleküller veya aptamerler), floresan boyalar, genler veya ilaçlarla konjugasyon yoluyla kolaylıkla sağlanabilmektedir (Yu et al., 2012).



Şekil 1. 25 Multifonksiyonel nanopartiküllerde aktif hedeflemede kullanılan yüzey modifikasyon ajanları.

Aktif hedefleme için yapılan yüzey modifikasyonlarında fonksiyonel birimlerin nanopartikül yüzeyine konjugasyonu için farklı yöntemler mevcuttur. Bu doğrultuda, hedefleme ligandları, terapötik molekülleri veya kontrast ajanlarını nanopartikül yüzeylerine konjuge etmek için geniş bir kimyasal yaklaşım yelpazesi kullanılmıştır. Bu yöntemler geleneksel biyokonjugasyon stratejileri (doğrudan konjugasyon, linker kimyası, fiziksel etkileşimler), "Click" kimyası veya hibridizasyon yöntemleri olarak kategorize edilebilir. Hedeflenen ligand konjugasyonunun birincil hedefi, nanoparçacıkla tutturulduktan sonra işlevselliğini kaybetmeden bir hedefleme parçasını bağlamaktır. Örneğin, tanımlama bölgesi göz önüne alınmadan bir antikorun bir nanopartikül ile bağlanması fonksiyonel bölgelerin kapanmasına ve hedefleme özelliklerinin azalmasına neden olabilir. İlaçlar ve siRNA gibi konjuge terapötik ajanlar, terapötik etkileri göstermek için hücrenin alımından sonra bir nanopartikül sisteminden salınacak şekilde tasarlanmalıdır. Aşağıdaki şekilde aktif hedeflemede en çok kullanılan direkt konjugasyon tekniklerinin bir özeti şeklinde listelenmiştir (Şekil 1.26).

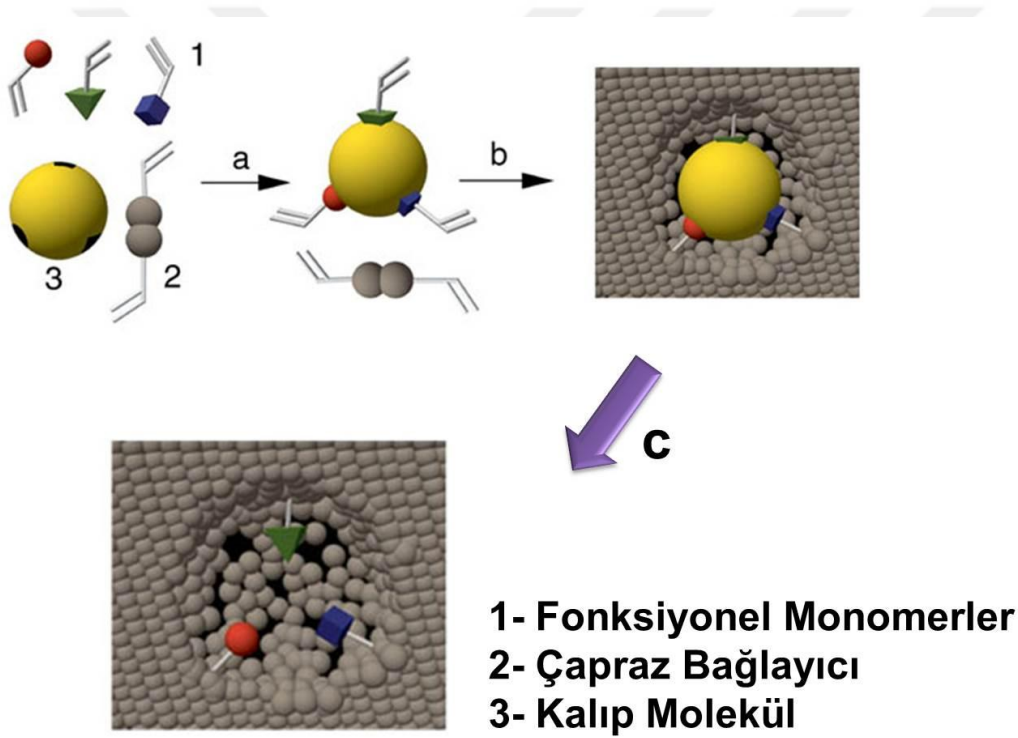


Şekil 1. 26 Direkt konjugasyon tekniğine dayalı yüzey modifikasyon yöntemleri.

1.2.3.3 Hedefleme stratejilerinde yeni bir soluk: Moleküler baskılanmış polimerler

Moleküler baskılama kısaca, üzerinde kalıp molekülü tanıma özelliği taşıyan merkezler içeren polimerlerin sentezlenmesi işlemidir. Sentez için iki temel gereksinim vardır: 1) kalıp molekül veya diğer bir deyişle baskılanacak molekül, 2) kalıp molekül ile etkileşebilecek (kovalent ya da non-kovalent bağlanma ile) işlevsel bir monomer. Bu temel gereksinimlerin yanı sıra çözücü, çapraz-bağlayıcı gibi yan gereksinimler de mevcuttur.

Moleküler baskılanmış polimerlerin oluşumu üç adımda özetlenebilir: a) Hedef (kalıp) molekül ile polimerize olabilecek fonksiyonel gruplara sahip monomerler arasında kovalent/kovalent olmayan etkileşimlere dayalı kompleks oluşumu, bu adımda kalıp molekül etrafını monomerler sararak pre-kompleks oluşturulur. b) Ortamda bulunan polimerizasyon ajanları (porojen, çapraz bağlayıcı, insiyatör) ile kalıp-monomer etkileşimi artarak kalıp molekülün polimer içerisinde bağlanma bölgeleri(kalıp moleküle seçimli boşluklar) oluşur. c) Kalıp molekül uygun yöntemler ile (çözgen ekstraksiyonu, hidroliz) polimerden uzaklaştırılır ve tekrar ortama konulduğunda bu bağlanma bölgelerine yeniden bağlanır (Bompart and Haupt, 2009).

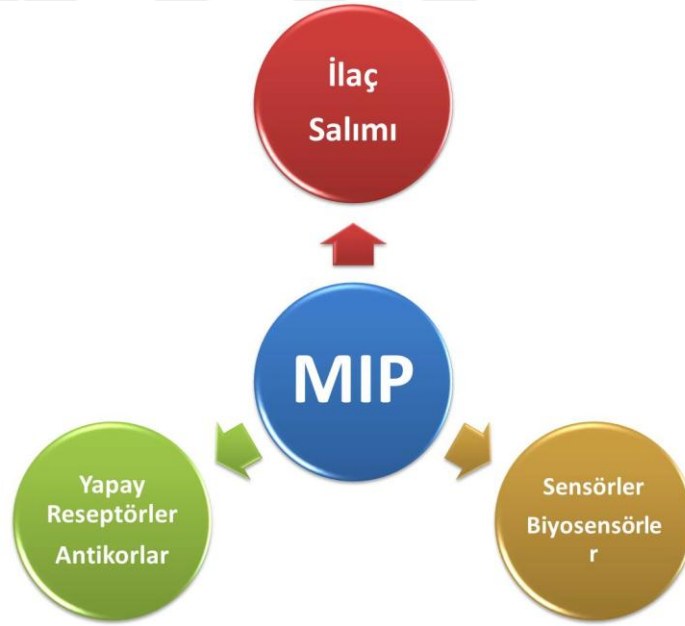


Şekil 1. 27 Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması.

Sensörler diagnostik, çevre ve gıda proseslerinde birçok biyolojik molekül kullanarak(enzim, antikor, mikrop) hedef molekülün tanınması amacıyla kullanılan analitik sistemlerdir. Ancak kullanılan bu biyomoleküllerin pH, sıcaklık ve organik çözümlere karşı dayanıksız olmaları sistemlerin pratik kullanımını kısıtlar. Moleküler damgalı polimerler ile biyosensörlerin birleştirilmesi ile oluşturulan sistemler bu zorlayıcı koşullara dayanıklıdır. MIP sensörlerinde

kullanılan transduser(reaksiyon sonucunda oluşan sinyali uygun ölçüm sistemine çeviren aparatlar) sistemlerine göre moleküler damgalı polimer sensör çalışmaları sınıflandırılabilir (Vandavelde et al., 2007).

Moleküler baskılı polimerleri MIP sensörlerinde kullanırken elektrot yüzeyine yığın polimer ya da membran formatındaki moleküler (kalıp molekül-substrat) baskılı polimerlerin uygun çözgen ya da kimyasallar yardımıyla uygun immobilizasyon yöntemiyle birleştirilmesine dayanır, oluşan reaksiyonun sinyali de uygun yöntemler ile tayin edilebilir ya da bu reaksiyon sonucu ölçülebilir bir sinyal oluşmuyorsa polimerin kendisi sinyal oluşturacak şekilde dizayn edilebilir (floresan metaloporfirinler hem kalıp molekül hem de fonksiyonel monomer olabilir bu da polimerin oluşan reaksiyon sonunda oluşturduğu sinyalin ölçümü ile analiz yapılabilir).

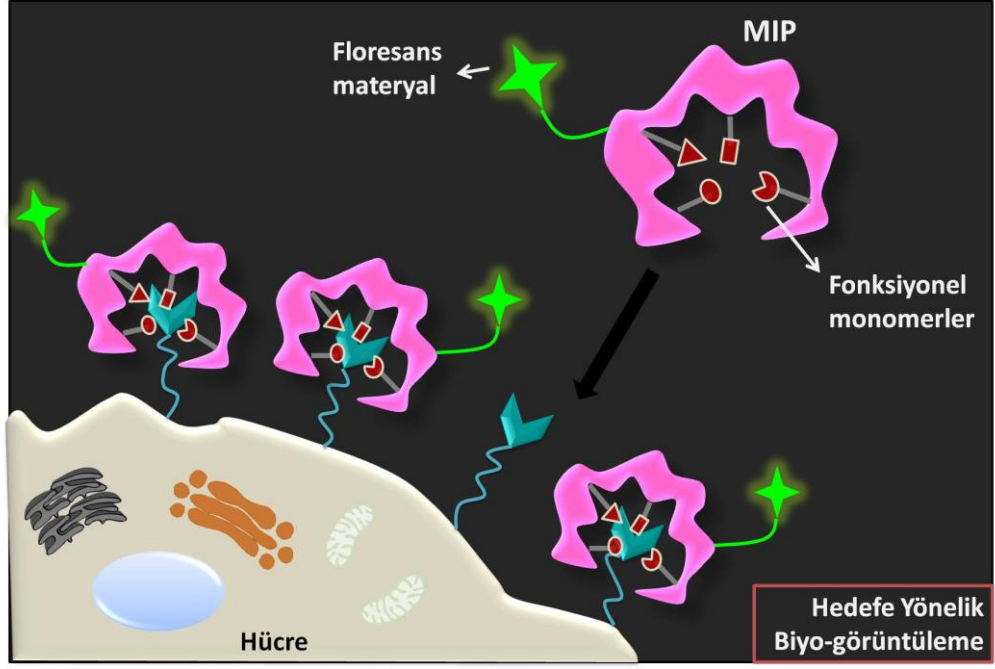


Şekil 1. 28 MIP yapılarının biyoteknolojideki kullanım alanları.

Birçok farklı alanda kullanılabilen MIP-biyosensor sistemlerinin yaygın kullanımını sınırlandıran parametreler; standart bir MIP-sensör hazırlama yönteminin olmaması, sulu sistemlerde tayin yapmaya olanak sağlayan sistemlerin olmaması, non-spesifik bağlanmaların azaltılamaması, uygun bir immobilizasyon protokolünün bulunmamasıdır (Vasapollo et al., 2011).

MIP ler üstün bağlayıcı özellikleri sayesinde yüksek afinite ve seçiciliğe dayalı olduğu için sıklıkla antikorlarla karşılaştırılırlar (Hoshino et al., 2008; Vasapollo et al., 2011). Bu yüzden bu yapılar aynı zamanda plastik antikorlar olarak adlandırılırlar. Biyolojik antikorlara karşın, MIP lerin üretimi tekrarlı, hızlı ve ekonomiktir ayrıca hayvan kullanımına gerek duyulmaz. MIP ler birçok sebepten ötürü hücre kültürü uygulamaları için potansiyel olan eşsiz reseptör materyalleridir: MIP ler fiziksel ve kimyasal olarak kararlıdır, proteazlar ile parçalanmazlar ve solventler ile denatüre olmazlar. Ayrıca istenen uygulama türüne göre geliştirilebilir. Temelde, MIP ler herhangi bir hedef molekül için tasarlanabilir. Bunun yanında, bu materyaller floresans boyalarla ve kuantum noktalarla kolaylıkla fonksiyonel hale getirilebilir ve boyutları hedefin lokalizasyonuna göre ayarlanabilir. Aslında, geçen yıllar boyunca, çeşitli yöntemler MIP lerin nanopartikül şeklinde sentezlenmesine katkı sağlamıştır ve bu sayede görüntüleme uygulamaları için en uygun formda oluşturulmuşlardır. Buna ilişkin olarak Kunath ve arkadaşları (2015) floresans işaretli MIP nanopartikülleri hücre ve doku görüntülemeye plastik antikor olarak kullanmışlardır (Kunath et al., 2015). Çalışmada model olarak hücre yüzeylerindeki hyaluronan kullanılmıştır. Sonuç olarak epitop yaklaşımı ile hem fiks edilen hem de canlı hücre (HaCaT) ve dokularda biyo-görüntüleme başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Bunun yanında aynı çalışma grubu tarafından Ton ve arkadaşlarının yaptığı bir uygulamada naftalimid (floresans özellikli) işaretli MIP ler kullanılarak karboksil içeren yapıları seçimli olarak algılayabilmektedir (Ton et al., 2015).

Sonuç olarak, MIP temelli polimerik materyaller veya bunların kompozit türevleri, sensör/biyosensör, ilaç salımı gibi birçok uygulamada kolaylıkla yer bulabilmiş ve özellikle günümüzde büyük bir sorun haline gelen kanser türlerinin tanısında antikor benzeri özellikleri sayesinde umut verici sistemler olarak görülmektedir.



Şekil 1. 29 Floresans işaretli MIP problemlerinin aktif hedefli görüntüleme çalışmalarındaki potansiyelini gösteren şema.

1.3 Tez Çalışmasının Amacı

Son yıllarda özellikle nanopartiküllerin etkin bir şekilde kullanılmaya başlaması ile sıklıkla kullanılmaya başlanan teranostik yaklaşım, teşhis ve tedavinin aynı anda yapılabilmesine olanak veren uygulamalardır. İlk başlarda hastalara enjekte edilen radyo aktif elementler veya radyofarmosotiklerin gama kameralar ile vücut içinde görüntülenip, günümüzde özellikle nanopartiküllerin eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde kemoterapi, fotodinamik terapi, fototermal terapi, radyo terapi ve gen terapisinde de etkin bir şekilde kullanılmaya başlamış ve bu alandaki çalışmalar son 10 yılda yüksek bir ivme kazanmıştır. Tez çalışması kapsamında tedavi ve görüntülemeyi mümkün kılan nanoparçacıkların tasarımı ve sentezini gerçekleştirmek ve bu teranostik özellikli nanoparçacıkların biyolojik aktivitelerini model kanser hücre hatlarında *in vitro* platformlarda test edilmesi hedeflenmektedir. Böylelikle tedavi etkinliği bulunan ilaç/doğal bileşik vb. moleküllerin diagnostik özellikli floresans metal/karbon temelli/polimerik yapılarla konjuge edilmesi ve/veya bunların niozom, lipozom, polimerler gibi taşıyıcı sistemlerle pasif/aktif hedefleme yapılarak model kanser hücre hatlarına yönlendirilmesi ile multi-fonksiyonel yapıların tasarımı gerçekleştirilecektir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Sitrat kaplı altın nanopartiküller (AuNPs) (40 nm), doksorubisin (DOX), sistein (Cys), N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), ditiyotretiyol (DTT), 4-Morfolinetansülfonik asit (MES) ve sodyum dodesil sülfat (SDS) Sigma Aldrich (Dorset, UK) ten alınmıştır. N-ε-maleimidocaproic acid hydrazide (EMCH) Thermo Fischer Scientific (California, USA) firmasından elde edilmiştir. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Penisilin/Streptomisin (10,000 UI/mL), L-Glutamin (200 mM), Tripsin/EDTA (0,05% Tripsin; 0,20 g/L EDTA) ve tuzlu fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline, PBS) hücre kültürü çalışmalarında kullanılmakta olup Lonza (Basel, İsviçre) firmasından elde edilmiştir. Fetal Bovine Serum (FBS) ise Biowest (Nuaille, Fransa) firmasından alınmıştır. Kolesterol (% 99, Chol) Avanti Polar Lipids' ten (Alabaster, Alabama, USA) alındı. 1,1 karbondiimidazol (CDI), metanol, tween 80, folik asit (FA), protoporfirin IX (PPIX) ve kloroform Sigma-Aldrich (Dorset, UK)' ten temin edildi. 10 nm boyutlu AuNP ler ise BBI Solutions (USA) tan temin edilmiştir.

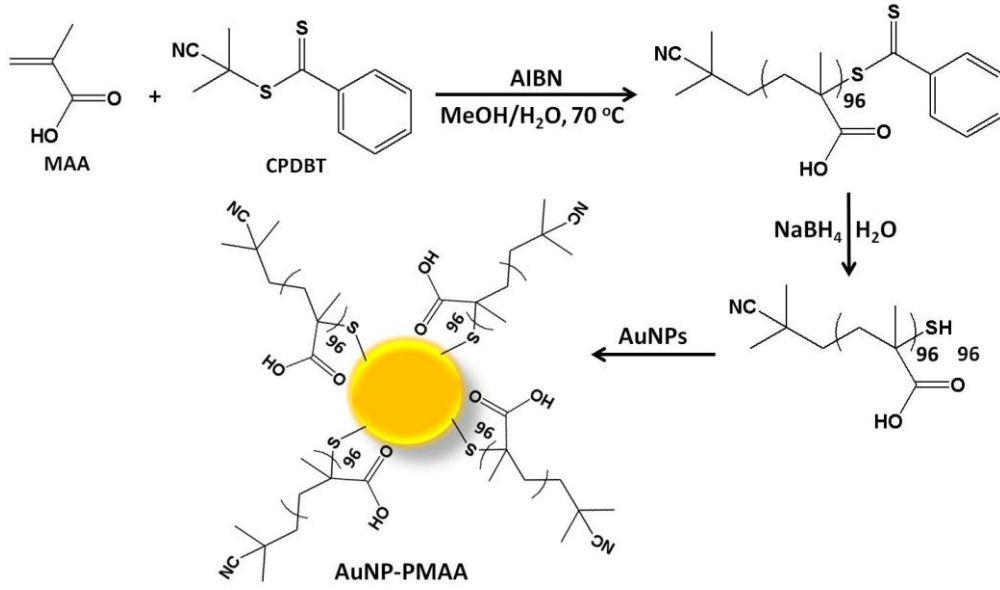
Tezin üçüncü bölümü Compiègne/Fransa da yapılmış ve buna yönelik malzeme temini şu şekildedir: Moleküler baskılanmış polimer (MIP) sentezi için anhidroz çözgenler kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan "Karbon Noktalar (CDs)" Regensburg Üniversitesi/ALMANYA'ndeki Prof. Joachim Wegener'in ekibi tarafından sentezlenmiş ve temin edilmiştir. Glisin ve paraformaldehit Applichem firmasından alınmıştır. HaCaT keratinosit hücreleri Cell Line Service ten temin edilmiştir (Eppelheim, Almanya). İnsan serviks adenokarsinoma (HeLa) hücreleri ATCC den elde edilmiştir. Cam lameller, hücre kültürü flaskları, 12-well plate, 96-well plate, penisilin/streptomisin, DMEM, FBS, % 0.25 lik Tripsin/EDTA Thermo Scientific ten temin edilmiştir (Illkirch, Fransa). Mikroskop lamları Roth Sochiel E. U. R. L. (Lauterbourg, France) den temin edilmiştir. Polimerizasyon sonrası polimer içinde kalan başlatıcı boya ların fotosönümlenmesi için 18 W floresans lamba (MAZDAFLUOR, UK) kullanılmıştır. Polimer süspansiyonları Branson Sonifier 250 ultrasonik prob ile sonikasyonu yapılmıştır. Bunların dışında kullanılan diğer materyaller Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France) veya VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) firmalarından sağlanmıştır.

2.2 Bölüm-1: "Polimer Kaplı Altın Nanopartiküller: Teranostikler İçin Fonksiyonel Yapılar"

Tez çalışmasının birinci bölümünde polimetakrilik asit (PMAA) kaplı AuNP ler sistein (Cys) ve kanser terapisinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılan doksorubisin (DOX) ile pH-duyar post-modifikasyonu yapılmış ve model hücre hattı olarak HeLa (İnsan serviks adenokarsinoma hücreleri, ATCC, USA) hücrelerinde *in vitro* testleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.1 PMAA kaplı AuNP lerin sentezi

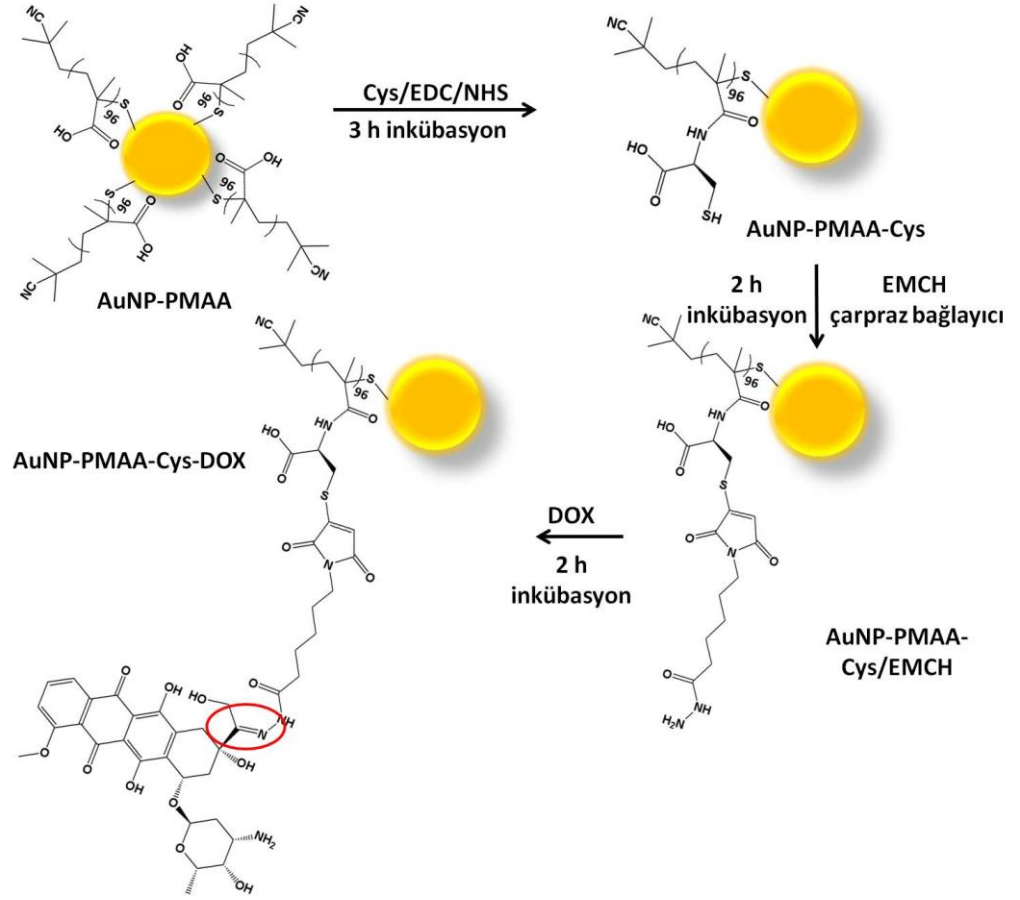
Çalışma kapsamında kullanılan PMAA kaplı AuNP ler (AuNP-PMAA) Queen Mary Üniversitesi'nden Prof. Dr. Remzi BECER tarafından hazırlanmış olup, reaksiyon akışı şekildeki gibidir. AuNP yüzey üzerine PMAA kaplamadan önce, ilk olarak PMAA için tersinir katılma-bölüşme zincir transfer polimerizasyonu (reversible addition-fragmentation transfer polymerization-RAFT) tekniği ile CPBDT ve başlatıcı olarak AIBN varlığında metanol:su (2:1) karışımında 70 °C de 12 saat boyunca polimerizasyonu yapılmıştır. Elde edilen RAFT polimeri, NaBH₄ ile 2 saat reaksiyonu sonucunda gerçekleştirilmiştir. Sonrasında AuNP solüsyonu süpernatantın kaldırılması için santrifüjlendi ve 1,0 mL su içinde çözüldü. Terminal ucu tiyollenmiş PMAA polimeri (10 mg) 1,0 mL AuNP içinde karanlıkta gece boyu karıştırılmaya bırakıldı. Bağlanmayan PMAA polimeri ise 5470 rpm de 30 dk. boyunca santrifüjlenerek AuNP-PMAA yapısından arındırıldı. İki defa daha yapılan yıkama adımından (aynı koşullardaki santrifüj ile) sonra dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering-DLS), UV/Vis spektroskopisi, termogravimetrik analizi (Thermal Gravimetric Analysis-TGA) ve geçirimli elektron mikroskobu (transmission electron microscopy-TEM) ile fizikokimyasal karakterizasyona yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Senteze ilişkin şematik gösterim Şekil 3.1 de yer almaktadır.



Şekil 2. 1 MAA'nın RAFT polimerizasyonu ve AuNP-PMAA'nın sentezi.

2.2.2 pH-duyar özellikli AuNP-PMAA ve DOX konjugasyonu

Elde edilen AuNP-PMAA ların konjugasyon adımları ise şu şekildedir: İlk olarak yapısındaki PMAA sayesinde içerdiği -COOH grupları ile Cys arasında EDC/NHS kimyası kullanılarak kovalent amid bağları oluşturuldu. 25 µL AuNP-PMAA (100 mg/mL 10 mM pH 7,4 fosfat tamponunda hazırlanmış) 48,9 mg EDC, 7,2 mg NHS ve 250 µL Cys (1,0 mg/mL pH 5,0 MES tamponunda çözülmüş stok solüsyon) 1500 µL ye MES tamponuyla tamamlandı ve 3 saat boyunca 1000 rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, pH 7,4 PBS tamponuna karşı örnek 2 saat boyunca diyalizlendi. AuNP-PMAA-Cys çözeltisi sonrasında ditiyotretiyol (DTT) (1:0,9 molar oran - Cys:DTT) ile gece boyu 1000 rpm ve oda sıcaklığı koşullarında inkübasyona bırakıldı. Cys deki -SH grupları arasında oluşabilecek S-S bağlarının indirgenmesinden sonra 3,2 mg EMCH çapraz bağlayıcı karışıma eklenerek 2 saat oda koşullarında 1000 rpm de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası karışım 6 saat pH 7,4 PBS e karşı diyalizlendi. Son aşamada ise DOX (son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde V_{son}=2,0 mL) AuNP-PMAA-Cys (EMCH) eklenerek oda koşullarında 1000 rpm de 2 h reaksiyona bırakıldı. Son konjugat olan AuNP-PMAA-Cys-DOX pH 7,4 PBS e karşı gece boyu diyalizlendi. Konjugasyon aşamaları ve pH-duyar hidrazon bağının oluşumu Şekil 3.2 de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2 AuNP-PMAA-Cys-DOX partiküllerinin konjugasyon reaksiyonları.

2.2.3 AuNP-PMAA-Cys-DOX biyokonjugatlarının karakterizasyonu

AuNP-PMAA ve AuNP-PMAA-Cys-DOX için partikül boyutu (DLS), zeta potansiyel, UV/Vis spektroskopisi, floresans spektroskopisi, TGA ve TEM kullanılarak analizler yapıldı. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli içeren DLS ölçümleri, örneklerin 10 kat saf su içerisinde seyreltildikten sonra Malvern Zetasizer NanoZS model cihazı (Malvern Ins., UK) ile yapılmıştır. Bunun için + 4 °C de tutulan örneklerden 100 µL alınarak PBS tamponuyla 1,0 mL ye tamamlandı ve 25 °C, 633 nm ve 90° saçılım açısı ayarlarında üç tekrarlı ölçümler alındı. Zeta potansiyel ölçüm sonuçları Smoluchowski eşitliğine göre cihaz tarafından hesaplanmaktadır.

TGA ölçümleri TA Instruments TGA Q500 cihazı ile azot gazı altında 5,0 mg örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metot ayarları: 100 °C den 900 °C ye

10 °C/dk, hızında artırarak yapılmıştır. AuNP-PMAA ların UV/Vis spektral özellikleri PerkinElmer UV/Vis Spectrometer Lambda 35 cihazı ile incelenmiştir.

AuNP ve AuNP-PMAA parçacıklarının TEM analizleri ise 200 kV voltaj ile JEOL 1400 ile gerçekleştirilmiştir. TEM örnekleri karbon kaplı bakır gridler üzerine su içindeki örneklerden damlatılarak hazırlanmıştır.

Spektroflorometrik ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (X-ray photoelectron spectroscopy-XPS) analizleri AuNP-PMAA nın DOX a bağlandığını kanıtlamak için DLS ölçümleri yanında yapılmıştır. Partiküllerin spektroflorometrik karakterizasyonu ise Varioskan model spektroflorometre (Thermo Fischer, USA) ile yapılmıştır. Son olarak sentezlenen AuNP-ilâç konjugatı için XPS analizleri PHI 5000 VersaProbe (Minnesota, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler öncesinde, örnekler önceden farklı alkol çözümleri ile sonikasyonla temizlendikten sonra indium tin oksit (ITO, Teknoma, Türkiye) yüzeylerinde partiküller kurutulmuştur.

2.2.4 *In vitro* ilâç salım çalışması

DOX yüklenmiş nanoparçacıkların *in vitro* salım davranışı yapay ortam hazırlanarak izlenmiştir. pH 7,4 ve 5,3 değerlerine sahip PBS tamponları sırasıyla sağlıklı ve kanserli hücre çevresini simüle etmek için kullanılmıştır. 0,5 mL AuNP-PMAA-Cys-DOX içeren diyaliz torbaları, 5,0 mL tampon ortamı içeren çözeltiye daldırılarak 37 °C de ve 100 rpm de tutulmuştur. Örneklerin *in vitro* salım profillerini incelemek için, her örnek ortamından belirli zaman aralıklarında (30. dk, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 ve 72. saatler) 0,5 mL alınarak yerine aynı miktarda aynı ortamdan eklenmiştir. Toplanan örneklerdeki DOX konsantrasyonu, DOX un floresan özellikleri kullanarak oluşturulan bir standart grafiği ile belirlenmiştir. Salınan DOX için, kümülatif ilâç salım yüzdesi (Er) aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$E_r = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_o C_n}{M(Dox)}$$

Burada M(Dox) partiküllerdeki DOX konsantrasyonunu, V_o (5,0 mL) salım hacmini, V_e (0,5 mL) değişim hacmini, C_n ise n. andaki ölçülen DOX konsantrasyonunu vermektedir.

2.2.5 Hücre kültürü çalışmaları

Kanser hücrelerine yönelik hazırlanan pH duyar AuNP-PMAA-Cys-DOX partiküllerinin hücre kültürü çalışmaları insan yumurtalık kanseri olan HeLa hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan her çalışma öncesinde HeLa hücrelerinin büyüme koşulları şu şekildedir. Hücreler, 75 cm² lik hücre kültür flasklarında DMEM (4,5 g/L glukoz içeren) hücre büyüme ortamı ile % 10 FBS ve % 1,0 penisilin/streptomisin destekli ortamda 37 °C de % 90 nemlendirilmiş ortamda CO₂ inkübatörü içerisinde yetiştirilmektedir.

2.2.5.1 Partiküllerin hücre canlılığına etkisi

AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatının HeLa hücreleri üzerindeki canlılık etkisi sitotoksikite testi ile yapıldı. Doz-bağımlı olarak gerçekleştirilen bu test için 3-(4,5 Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT) yöntemi kullanıldı (Guler et al., 2014). Flask ortamından tripsinizasyon ile alınan hücreler 96-kuyucuklu kültür ortamına transfer edildi. Kuyucuklarda hücrelerin kültivasyonu, hücreler konfluent hale gelene kadar devam edildi. Sonrasında büyüme ortamı kuyucuklardan alınarak hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreler örneklerle (AuNP-PMAA, DOX ve AuNP-PMAA-Cys-DOX değişen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca muamele edildi. Sonrasında örnekler kaldırılarak hücreler tekrardan PBS ile yıkanır. Her bir kuyucuk başına 110 µL olacak şekilde % 10 MTT çözeltisi eklenir. Hücrelerin içinde oluşacak olan formazanın çözülmesini sağlamak için 4 saat boyunca hücreler MTT ile muamele edilir. Hücre membranını parçalamak için kuyucuklara 100 µL SDS (10 mL 0,01 M HCl de hazırlanmış 1,0 g SDS) eklenir. 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kuyucuğun optik yoğunluğu spektrofotometrik mikro-plaka okuyucuda (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) 570 ve 630 nm’lerde okundu.

2.2.5.2 Radyoterapi

İlgili örneklerin varlığında ve yokluğunda pozitif ve negatif kontroller oluşturularak hücrelere radyasyon uygulaması LINAK (6 MV Doğrusal Hızlandırıcı) kullanımıyla literatür de önerildiği şekliyle gerçekleştirilmiştir (Chang et al., 2014). Uygulanan işlem aşağıdaki gibidir.

4x10³ hücre, 96 kuyucuğa ekilerek, gece boyu inkübatörde bekletilerek, ertesi gün besiyeri uzaklaştırılıp, örneklerin uygulaması gerçekleştirilmiştir. 2 saat sonra hücreler, üç farklı dozda (2,5, 5 ve 10 Gray) LINAK sistemi altında

radyosyona maruz bırakılmış ve ardından, 72 saat süresince inkübe edilerek, MTT metodu ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol grubu ile (radyasyon uygulanmamış hücreler) karşılaştırma yapılarak hesaplanmıştır.

2.2.5.3 Hücre Görüntüleme

8×10^3 HeLa hücreleri 8'li Chamber slide'lara ekilip ve 2 gün inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrasında besiyeri alınarak örnekleri içeren besiyerlerler hücrelere ilave edilerek ve 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından, her bir hücre, 3 kez PBS ile yıkanıp hücre çekirdeklerinin boyanması için DAPI çözeltisi ile 15 dk. inkübatörde bekletilmiştir. Son olarak, tekrar PBS ile 3 kez yıkanıp görüntüler Floresans mikroskop kullanımı ile kırmızı ve DAPI filtre kullanımıyla görüntülenmiştir. Sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir.

2.3 Bölüm-2: "Folat Reseptörü Hedefli Multimodal Veziküler Teranostikler"

Tez çalışmasının ikinci bölümünde ise AuNP ler protoporfirin IX ile birlikte niozom vezikülleri içerisinde enkapsüle edilip FA ile model kanser hücrelerine hedefli hale getirilmiştir. Sentez ve karakterizasyon aşamaları sonrası toksisite testleri yapılan multimodal özelliği gösterebilen partiküller radyoterapi ve fotodinamik terapi uygulamaları ile partiküllerin etkinliği test edilmiştir.

2.3.1 Tween 80-FA konjugasyonu

Denemelerde FA hedefli niozomların sentezi öncesi kullanılacak ana sürfaktan olan Tween 80 ile FA'nın konjugasyonu literatürde yer alan Tween 20 ile amino grubu içeren bir ligandın konjugasyonun yapıldığı prosedüre göre yapılıp, birkaç noktada modifikasyon yapılmıştır (R. J. Chen et al., 2003).

1,66 g Tween 80 ve 0,66 g CDI bir cam vialde 5,0 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldükten sonra, 2 saat boyunca 40 °C de 1000 rpm de çalkalama ile inkübasyona bırakılır. 2 saatlik CDI aktivasyonu sonunda DMSO üzerine 15 mL dietileter eklenerek solüsyon karıştırılır. İki faza ayrılan solüsyon daha sonra ayırma hunisine konularak tekrar çalkalanır ve faz ayrılması sağlanır. Aktif -OH gruplarına sahip Tween 80 içeren alt faz ayrıldıktan sonra aynı işlem tekrarlanır. Ekstraksiyon ile toplanan Tween 80 içeren alt faz yaklaşık 2 saat

boyunca etüvde tutularak örnek deriştirilir. Son olarak elde edilen 1,0 mL Tween 80 ile sonraki işlemler devam edilir. -OH grupları aktifleştirilen Tween 80 ile FA (1:3 molar konsatrasyonda) konjugasyonu için 0,36 g FA, 1,0 mL Tween 80 üzerine eklendikten sonra 30 mL sodyum karbonat tamponu (10 mM, pH=9,0) eklenerek oda sıcaklığında 4 saat karıştırma altında reaksiyona bırakılır. Reaksiyon sonrası porsiyonlanan Tween 80-FA konjugatı liyofilize edilerek son konjugat katı hale getirilir.

2.3.2 Niozomların hazırlanması

Niozomlar geleneksel ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Niozomların hazırlanmasında 1:1 oranında (M/M) Tween 80: Chol kullanıldı. 3:1 (v/v) oranında kloroform: metanol karışımında hazırlanan sürfaktan: Chol çözeltisi 50 mL lik yuvarlak dipli balonda hazırlanır ve rotary evaporatörde 50 °C de organik çözenler buharlaştırılarak ince film tabakası oluşturuldu. Ardından 10 mL pH sı 7,4 e ayarlı PBS, 0,387 mg/mL olacak şekilde sentezlenen Tween 80-FA film tabakasının üzerine eklendi ve balon hızlıca vortekslendi. Sürfaktan film tabakasının katmanlar halinde kalkmasıyla çok tabakalı niozom vezikülleri oluşur. Hidrasyon aşaması 50 °C de 2 saat boyunca hafif çalkalama ile gerçekleştirildi. 2 saatin sonunda veziküller 30 dk. boyunca sonikasyonda bırakıldı. Sonikasyon sonrası toplanan niozom örnekleri gece boyu + 4 °C de diyalize (MW: 10 – 12 kDa) bırakıldı. Diyaliz sonrası örnekler sonraki aşamalarda kullanılmak üzere + 4 °C de tutuldu.

2.3.3 AuNP/Protoporfirin IX enkapsüle niozomların hazırlanması

AuNP/Protoporfirin IX enkapsüle niozomlar (AuNP/PPIX) FA takılı niozomlardaki gibi hazırlanmıştır. Niozomların hazırlanmasında 1:1 oranında (M/M) Tween 80: Chol kullanıldı. 3:1 (v/v) oranında kloroform: metanol karışımında hazırlanan sürfaktan: Chol çözeltisi 50 mL lik yuvarlak dipli balonda hazırlanır ve rotary evaporatörde 50 °C de organik çözenler buharlaştırılarak ince film tabakası oluşturuldu. Ardından 10 mL pH sı 7,4 e ayarlı PBS 0,387 mg/mL olacak şekilde Tween 80-FA, 100 µM PPIX ve 500 µL AuNP (direkt ticari şişeden) içeren film tabakasının üzerine eklendi ve balon hızlıca vortekslendi. Sürfaktan film tabakasının katmanlar halinde kalkmasıyla çok tabakalı niozom vezikülleri oluşur. Hidrasyon aşaması 50 °C de 2 saat boyunca hafif çalkalama ile gerçekleştirildi. 2 saatin sonunda veziküller 30 dk. boyunca sonikasyonda bırakıldı. Sonikasyon sonrası toplanan niozom örnekleri gece boyu + 4 °C de

diyalize (MW: 10 – 12 kDa) bırakıldı. Diyaliz sonrası örnekler sonraki aşamalarda kullanılmak üzere + 4 °C de tutuldu. Hazırlanan bu örnekler sonrasında AuNP/PpIX/FA şeklinde kodlandı. Denemelerde kontrol amaçlı olarak kullanmak için AuNP/PpIX ve PpIX/FA kontrol grubu olan niozomlar hazırlandı.

2.3.4 Enkapsülasyon etkinliği

Taze hazırlanan PpIX içeren niozomlar diyaliz işlemi sonrasında enkapsüle olmayan PPIX den ayrıldı. Niozom içeriğinin dışarı çıkması için niozomlar kloroformda çözünür hale getirildi ve akabinde, bu örnekler 96 kuyucuklu plakalara eklenip absorbansları 410 nm de okunarak ve elde edilen verilerden standart grafiği kullanılarak niozomlardaki enkapsüle edilmiş PpIX miktarı hesaplandı. Standart grafik için; 1,0; 5,0; 10; 25; 50; 100 ve 200 µM PpIX solüsyonları hazırlanarak 3 tekrarlı şekilde okundu. PpIX içeren PpIX/FA; AuNP/PpIX/FA ve AuNP/PpIX niozom örnekleri 10 kat seyreltilerek ölçümleri 3 tekrarlı olarak alındı. Enkapsülasyon etkinliği (% EE) aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır:

$$\% EE = [\text{Enkapsüle PpIX} / \text{Başlangıçta Eklenen PpIX}] \times 100$$

2.3.5 Karakterizasyon çalışmaları

Bu aşamada ilk aşamada sentezlenen Tween 80-FA konjugatına yönelik karakterizasyonlar ile başlandı. Başarılı bir şekilde liyofilize edilen Tween 80-FA konjugatına yönelik ilk olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile FA bağlanma verimi hesaplandı. Bunun için Agilent HPLC sistemi 283 nm dalgaboyunda DAD dedektörü ile FA yapıdaki serbest FA miktarı ölçüldü. Kolon sıcaklığı 25 °C ye ayarlandı ve C18 kolonu (Agilent Eclipse column XDB-C18 (5 µm partikül boyutlu, 4,6x150 mm)) kullanılmıştır. Mobil faz, % 1 fosforik ait içeren saf su (A) ve asetonitril (B) (90:10, v:v). Akış hızı 1,2 mL/dk ya ayarlandı ve enjeksiyon hacmi 20 µL dir. LOD ve LOQ değerleri 1,58 ng/mL and 5,28 ng/mL.

Bunun yanında Tween 80-FA nın konjugasyonunu gösterebilmek için fourier transform infrared spektroskopisi (FT-IR) kullanıldı. Bunun için toz halindeki Tween 80-FA ve kontrol olarak FA örneği direkt olarak cihaza verildi.

AuNP ve PpIX enkapsüle niozomların bazı fizikokimyasal parametrelerinin değerlendirilmesi için de karakterizasyon çalışması yapıldı. İlk olarak hazırlanan veziküllerin parçacık boyut analizi ve yüzey zeta potansiyelleri taze örneklerle bakıldı. Bunun için + 4 °C de tutulan örneklerden 50 µL alınarak PBS tamponuyla 1,0 mL ye tamamlandı ve 25 °C, 633 nm ve 90° saçılım açısı ayarlarında üç tekrarlı ölçümler alındı. Zeta potansiyel ölçümleri ise Smoluchowski eşitliğine göre boyut analiz cihazı tarafından hesaplandı.

Boyut ve zeta potansiyel analizlerinden sonra örneklerin Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM)' unda görüntüleri alındı. AFM, atomik ya da moleküler düzeyde yüzey topolojisinin ölçülmesini ve yüksek çözünürlükte resimlerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Nanoskaladaki maddelerin boyut, şekil, rijitlik gibi çeşitli özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır. Ölçümlerde ITO-camlar kullanılmıştır. Örnek hazırlama aşaması şu şekildedir;

- ITO kaplı cam yüzeyleri temizlenmesi için deterjan solüsyonu içerisinde ITO – camlar 15 dk. sonikasyona tutuldu.
- Daha sonra sırasıyla de-iyonize su, aseton ve 2-propanol ile yıkanarak N₂ gazından geçirilerek kurutuldu.
- 0,1 mM konsantrasyonundaki niozom örnekleri ITO kaplı yüzeylere döndürerek kaplama (spin coating) ile biriktirildikten sonra AFM ölçümleri alındı.

2.3.6 Hücre kültür çalışmaları

AuNP/PpIX/FA niozomların hazırlanması ve karakterizasyonları tamamlandıktan sonra in vitro hücre kültürü uygulamaları ile geliştirilen formülasyonların sağlıklı hücrelere olan çeşitli etkileri incelenmiştir (Şekil 2.2). Proje kapsamında hücrelerin üzerinde radyoaktif fotodinamik ajanı olarak etkilerini artırmaya yönelik hazırlanan preparatlar öncelikli olarak model olarak seçilen HeLa ve A549 (akciğer kanseri hücresi, ATCC, U.S.A) hücre hatlarında test edilmiştir. İlk olarak farklı dozlarda canlılık testi yapılarak preparatların uygulanacağı toksik olmayan en yüksek ortak doz seçildikten sonra sırasıyla radyosensitivitesine, fotodinamik terapi etkinliğine ve bu iki modalitenin birlikte uygulamalarıyla kanser hücreleri üzerindeki etkileri hücre canlılığı testleri ile belirlendi. Son olarak hazırlanan niozomal preparatlar PpIX un varlığı sayesinde kırmızı filtre kullanılarak hücrelerin floresans görüntüleri alınmıştır.

HeLa ve A549 hücre hatlarının kültivasyonu, %10 FBS, %1,0 penisilin/streptomisin içeren DMEM (4,5 g/L ve L-Glutamin içeren) ortamında ve %5,0 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatör şartlarında gerçekleştirildi.

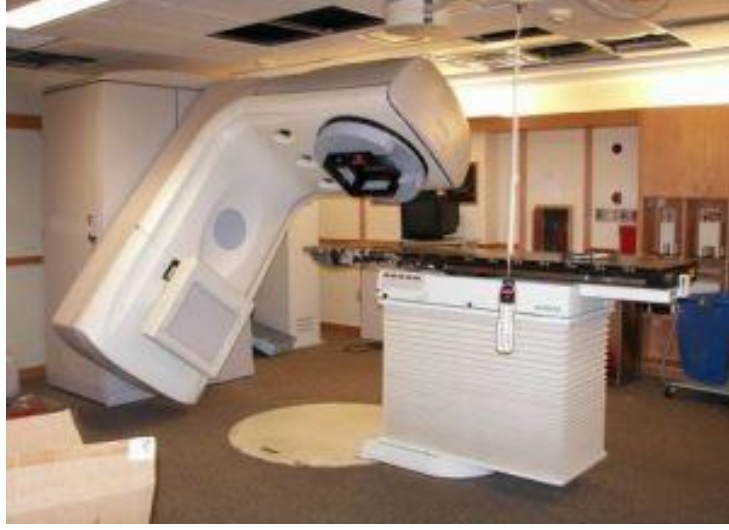
2.3.6.1 Niozomların hücre canlılığına etkisi

AuNP/PpIX/FA niozomların HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki canlılık etkisi sitotoksosite testi ile yapıldı. Doz-bağımlı olarak gerçekleştirilen bu test için MTT yöntemi kullanıldı. Flask ortamından tripsinizasyon ile alınan hücreler 96-kuyucuklu kültür ortamına transfer edildi. Kuyucuklarda hücrelerin kültivasyonu, hücreler konfluent hale gelene kadar devam edildi. Sonrasında büyüme ortamı kuyucuklardan alınarak hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreler veziküler örneklerle (PpIX/FA, AuNP/PpIX ve AuNP/PpIX/FA) değişen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca muamele edildi. Sonrasında örnekler kaldırılarak hücreler tekrardan PBS ile yıkanır. Her bir kuyucuk başına 110 µL olacak şekilde % 10 MTT çözeltisi eklenir. Hücrelerin içinde oluşacak olan formazanın çözülmesini sağlamak için 4 saat boyunca hücreler MTT ile muamele edilir. Hücre membranını parçalamak için kuyucuklara 100 µL SDS (10 mL 0,01 M HCl de hazırlanmış 1,0 g SDS) eklenir. 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kuyucuğun optik yoğunluğu spektrofotometrik mikro-plaka okuyucuda 570 ve 630 nm’lerde okundu.

2.3.6.2 Niozom preparatlarının radyosensitivitesi

İlgili örneklerin varlığında ve yokluğunda pozitif ve negatif kontroller oluşturularak hücrelere radyasyon uygulaması LINAK (6 MV Doğrusal Hızlandırıcı) literatürde önerildiği şekliyle gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Uygulanan işlem aşağıdaki gibidir:

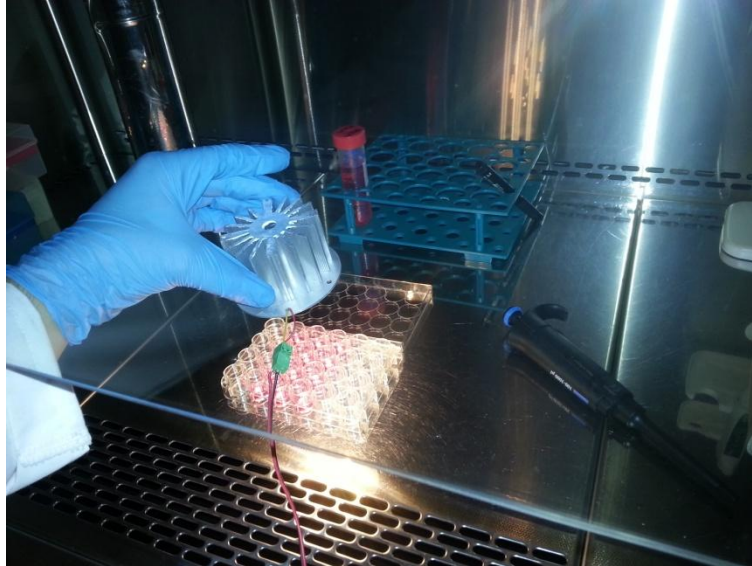
4×10^3 hücre, 96 kuyucuğa ekilerek gece boyu inkübatörde bekletildi. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılıp örneklerin uygulaması gerçekleştirildi. 2 saat sonra hücreler, 2,5 Gray dozda LINAK sistemi altında radyasyona maruz bırakıldı ve ardından, 72 saat süresince inkübe edilerek, MTT metodu ile hücre canlılığı belirlendi. Sonuçlar kontrol grubu ile (radyasyon uygulanmamış hücreler) karşılaştırma yapılarak hesaplandı.



Şekil 2. 3 Hücelere iyonize radyasyon uygulamak için kullanılan LINAK.

2.3.6.3 Niozom preparatları ile fotodinamik terapi çalışması

Fotodinamik terapi önceki bir çalışmadaki metot ile yapıldı (Morimoto et al., 2014). 8000 hücre 96 kuyucuklara ekilerek normal inkübatör şartlarında 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin üstündeki besi yeri alınıp yerine değişik içerik ve konsantrasyonda olan uygulama besi yeri eklendi. İki saat inkübe edildikten sonra hücreler beşer dakika ışığa maruz bırakıldı (Şekil 2.4). Bir gün normal şartlarda inkübatörde bekletilen hücrelerde canlılık MTT metodu ile bulunup sonuçlar kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak hesaplandı.



Şekil 2. 4 Steril kabin içerisinde hücelere FDT uygulanması.

2.3.6.4 Niozom preparatlarının radyosensitivite ve fotodinamik terapi ile kombine terapi etkinliğinin belirlenmesi

Hazırlamış olduğumuz niozom preparatlarının fotodinamik terapi ve radyoterapinin (2,5 Gy) kombine uygulamaları üzerine etkinliklerinin belirlemek için üç çalışma grubu oluşturuldu. İlk hücre grubu önce 5 dk LED (beyaz) ışığa maruz bırakılıp 24 saat inkübe edildikten sonra 2,5 Gray radyasyon ile muamele edilip 72 saat normal koşullarda inkübe edildi. İkinci grubun hücreleri önce radyasyona maruz bırakılıp 72 saat inkübe edildikten sonra 5 dk ışık ile muamele edilip 24 saat inkübatörde bekletildi. Üçüncü grubun hücreleri ise aynı anda 5 dk ışık ve 2,5 Gray radyasyon uygulanıp 72 saat inkübasyona bırakıldı. En son olarak üç grubun hücre canlılığı MTT metodu ile tespit edilip kontrol grupları ile karşılaştırmalar yapıldı.

2.3.6.5 Hücre görüntüleme

8000 A549 ve HeLa hücreleri 8'li Chamber slide'lara ekilip 2 gün inkübasyona bırakıldı (Şekil 2.5). İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyerler alınarak örnekleri içeren besiyerleri kuyucuklara ilave edilmiş ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından, her bir hücre, 3 kez PBS ile yıkanıp hücre çekirdeklerinin boyanması için DAPI çözeltisi ile 15 dk. inkübatörde bekletildi. Son olarak, hücreler tekrar PBS ile 3 kez yıkanıp görüntüler Floresans mikroskop ile yeşil ve DAPI filtre kullanımıyla görüntülendi. Sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırma yapılarak değerlendirildi.



Şekil 2. 5 Hücre görüntülerinin daha iyi alınabilmesi için kullanılan 8 kuyucuklu chamber slide'lar.

2.4 Bölüm-3: " Kanser Tanısına Yönelik Moleküler Baskılanmış Polimer Problarının Geliştirilmesi ve Biyo-görüntüleme Uygulamaları"

Tez çalışmasının üçüncü bölümü içinde gerçekleştirilen çalışma kapsamında kanser diyagnostiğine yönelik ileri stratejiler kullanılarak belirli kanser hücrelerine spesifik non-invasiv, hazırlaması kolay ve düşük maliyetli moleküler baskılanmış polimer (MIP) probları hazırlanarak optik görüntüleme teknikleriyle yeni yaklaşımlar ortaya konulacaktır. Bu süreçte, etkin seçimliliği oluşturacak farklı moleküler kalıplar ile (protein, nükleik asit ve karbohidrat türevleri gibi) yüksek spesifikliğe sahip floresans MIP ler geliştirilmiş ve bu kalıplara ilişkin model hücre hatları kullanılarak MIP probları *in vitro* ortamlarda biyo-görüntüleme çalışmaları ile test edilmiştir. Bu kapsamda hücre yüzeylerinde lokalize olan hyaluronik asit (HA) birimlerindeki glukuronik asit (GlcA) hedeflenerek MIP probları geliştirilmiştir. MIP probları, floresan özellik gösteren karbon noktaların (Carbon dots-CDs) kendi internal emisyonunu ışık kaynağı olarak kullanıldığı bir strateji ile yüzeyinin GlcA ile baskılanmış polimerin kaplanmasıyla MIPGlcA-CD partikülleri sentezlenmiştir.

2.4.1 MIPGlcA-CD kompozitlerinin sentezi

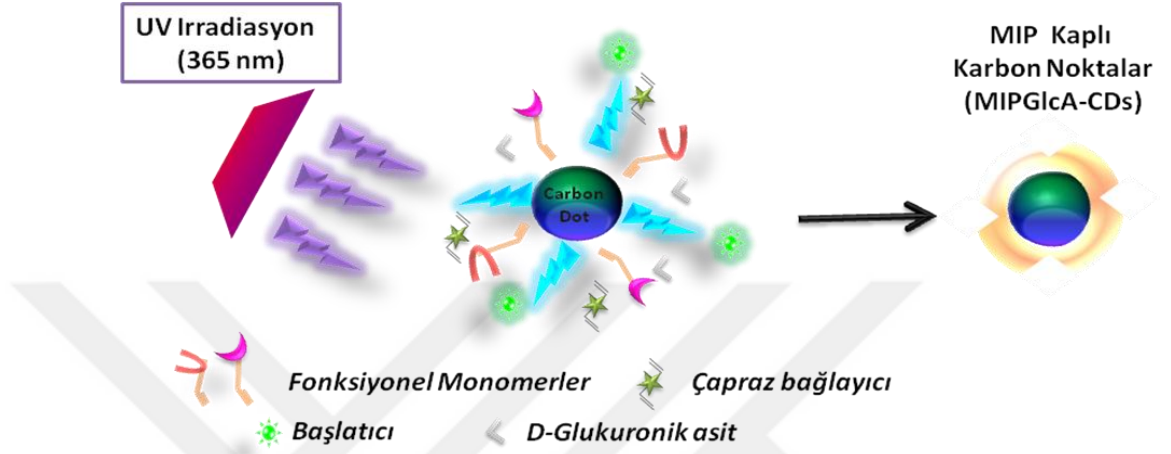
Tez projesinin üçüncü kısmı olan bu aşamada kanser hücrelerinin görüntülenmesinde floresans MIP ler sentezlenmiştir. Sentez aşamasında floresans materyal olarak CD lar kullanılmıştır. Sentez stratejisi ise daha önce Prof. Haupt ve ekibi tarafından ortaya konulan kuantum nokta gibi kendi floresans ışımasına sahip malzemeleri kullanarak gerçekleştirilen fotopolimerizasyona dayanmaktadır. Bu noktada kuantum noktalar yerine toksisitesi düşük ve çevre açısından daha iyi olan floresan özellikli CD ler kullanılmıştır. MIP kaplı CD lerin sentez aşamasında yer alan karışım Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 MIPGlcA-CD ların sentezi için polimerizasyon karışımı.

	Kalıp Molekül	Fonksiyonel Monomerler	Çapraz Bağlayıcı	Başlatıcı Sistem	Çözgen (porojen)
	D-GlcA	AB+MAM	EGDMA	Kumarin6 + TEA +CDs (emiyon=450 nm)	1,0 mL DMSO da D-GlcA + AB inkübasyonu
n (mmol)	0,022	0,022 + 0,066	0,44		
Mass (mg)	4,27	5,27 + 5,62		500 µg CDs	
Hacim (µL)			83,1	Kumarin 6=7 µL (2,85 mM DMSO içindeki stoktan) TEA=10 µL (72 mM stoktan) CDs= 100 µL (5 mg/mL PBS teki stoktan)	Vson = 2,0 mL

Çizelge 2.1 deki (4-acrylamidophenyl)(amino) methaniminium acetate (AB) yapısı Prof. Haupt ve ekibi tarafından sentezlendiği gibidir (Nestora et al., 2016).

AB fonksiyonel monomeri yanında metakrilamid (MAM) de yan monomer olarak D-GlcA kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ve başlatıcı sistem olarak trietilamin (TEA), kumarin 6 ve CD kullanılmıştır. Porojen solvent olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Sentez aşamasının şematik gösterimi Şekil 2.6 daki gibidir.



Şekil 2. 6 MIPGlcA-CD kompozitlerinin UV irradiasyon ile sentezi.

Sentez için 365 nm eksitasyon gücüne sahip iki adet UV lamba polimerizasyon örneklerine 1-2 cm olacak şekilde uzakta tutularak oda sıcaklığında karanlıkta yapılmıştır. MIPGlcA-CD partiküllerinin yanında kalıp molekülü hekzanoik asit olan CD kaplı polimerler GlcA baskılı olmayan polimerler (NIP) olarak adlandırılmıştır. Polimerizasyonun CD lerden gelen (emisyon: 450 nm) floresans ışına ile olduğunu kanıtlamak için CD içermeyen bir kontrol grubu da oluşturulmuştur.

2.4.2 MIPGlcA-CD lerin bağlanma etkinliği

Fotopolimerizasyon süreci sonrası, MIPGlcA-CD ların bağlanma kapasitesi kompozitleri kuru olarak elde ettikten sonra incelenmiştir. MIPGlcA-CD ların tanıyıcı özellikleri Dubois ve ark. tarafından geliştirilen kolorimetrik temelli bir yöntem ile çalışılmıştır (Dubois et al., 1956). Dubois yöntemi karbohidratların analizinde kullanılan bir tekniktir ve monosakkaritlerin, oligo- ve polisakkaritlerin tayininde çokça kullanılmaktadır. Yöntem genel olarak karbohidratların yüksek dozdaki asidik ortamda (sülfürik asitle) oluşan hidroksimetilfurfural yapılarının fenol ile etkileşerek altın-sarı renginde bir kompleks vermesine dayanır.

Yöntemde standart grafik oluşturmak için; 50 µL D-GlcA, 150 µL H₂SO₄ (%95) ve 30 µL % 5,0 fenol mikro kuyucuklu plakalarda 90 °C de su banyosunda 20 dk inkübe edilerek, örnekler 490 nm de spektrofotometri cihazında okunur. Bağlanma kapasitesi için farklı derişimlerdeki MIP kompozitleri 10 nmol GlcA ile 17 saat boyunca inkübe edilerek 21000 rpm de 45 dk 22 °C de santrifüjlenir ve süpernatant kolorimetrik yöntemle aynı şekilde okunur. Aynı prosedür MIP kompozitleri yanında kontrol olarak sentezlenen NIP lere de uygulanmıştır.

2.4.3 MIPGlcA-CD lerin karakterizasyonu

Sentezlenen MIPGlcA-CD kompozitlerinin fizikokimyasal karakterizasyonu için ilk olarak partikül boyutu ve zeta potansiyel analizleri DLS yöntemi ile Malvern NanoZS model partikül boyut analizi cihazı ile yapılmıştır. Sonrasında ise geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak partiküllerin morfolojik yapıları aydınlatılmıştır. Bunun yanında sentezlenen partiküllerin ve serbest CD lerin spektrofluorometrik özellikleri de floresans spektroskopisi ile incelenmiştir.

2.4.4 Hücre kültür çalışmaları

MIPGlcA-CD kompozitlerinin hazırlanması ve karakterizasyonları tamamlandıktan sonra *in vitro* hücre kültürü uygulamaları ile geliştirilen partiküllerin model hücre hatları üzerine toksisite etkileri incelenmiş ve biyogörüntüleme uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında HaCaT ve HeLa hücreleri sağlıklı ve kanser hücreleri model olarak kullanılmıştır. HeLa ve HaCaT hücre hatlarının kültivasyonu, % 10 FBS, %1,0 penisilin/streptomisin içeren DMEM ortamında ve % 5,0 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatör şartlarında gerçekleştirildi.

2.4.4.1 MIPGlcA-CD kompozitlerinin hücre canlılığına etkisi

MIPGlcA-CD lerin HeLa ve HaCaT hücreleri üzerindeki canlılık etkisi sitotoksosite testi ile yapıldı. Doz-bağımlı olarak gerçekleştirilen bu test için 3-(4,5 Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT) yöntemi kullanıldı. Flask ortamından tripsinizasyon ile alınan hücreler 96-kuyucuklu kültür ortamına transfer edildi. Kuyucuklarda hücrelerin kültivasyonu, hücreler konfluent hale gelene kadar devam edildi. Sonrasında büyüme ortamı kuyucuklardan alınarak hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreler veziküler örneklerle (MIPGlcA-CD, NIP-CD ve CD) değişen konsatrasyonlarda 24 saat boyunca muamele edildi.

Sonrasında örnekler kaldırılarak hücreler tekrardan PBS ile yıkanır. Her bir kuyucuk başına 110 μ L olacak şekilde % 10 MTT çözeltisi eklenir. Hücrelerin içinde oluşacak olan formazanın çözülmesini sağlamak için 4 saat boyunca hücreler MTT ile muamele edilir. Hücre membranını parçalamak için kuyucuklara 200 μ L DMSO eklenir. 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kuyucuğun optik yoğunluğu spektrofotometrik mikro-plaka okuyucuda 570 ve 630 nm'lerde okunur.

2.4.4.2 MIPGlcA-CD ile biyo-görüntüleme

HaCaT ve HeLa hücreleri 12 kuyucuklu plakalar içinde cam lameller üzerinde 2 gün büyüme ortamı içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyerler alınarak % 3,0 PFA ile 10 dk boyunca hücreler yüzeye fikse edildi ve fiksasyon reaksiyonunu durdurmak için hücreler üç defa glisin tamponu ile yıkandı. Sonrasında PBS ile tekrar yıkanan hücreler 90 dk boyunca soniklenmiş örneklerle CO₂ inkübatör koşullarında muamele edildi. Metanol: Su çözeltisi ile üç defa yıkanan hücreler, 10 dk boyunca PI ile inkübe edilerek cam lameller lam üzerine gliserin çözeltisi ile yapıştırılarak, mikroskop için görüntüleme örnekleri hazırlandı.

2.5 Bölüm-4: "Teranostik Olarak Geliştirilmiş Multimodal Lipozomlar: Aktif Hedefli Kemo/Radyoterapötik Ajanlar"

Tezin son bölümünde ise daha önceki niozom çalışması gibi iki biyoaktif malzemenin çifte enkapsülasyonu yapılmış ve antikör ile kanser hücrelerine aktif olarak hedefli hale getirilmiştir. Çalışma kapsamında terapötik olarak kanser tedavisine yönelik olarak literatürde sıklıkla kullanılan kurkumin ve teranostik yapının diyagnostik kısmı için floresan özellikli karbon noktalar (CDs) kullanılmıştır. Belirlenen lipozom kompozisyonu ile beraber çifte enkapsülasyonu yapılan kurkumin/CD yüklü veziküllerin, sonrasında kanser hücrelerine hedefli hale getirilmesi için anti-CD44 antikoru ile konjugasyonu yapılmıştır. Sentez sonrası karakterizasyon ve *in vitro* hücre kültür çalışmaları tamamlanarak, tezin son bölümü de tamamlanmıştır. Çalışmada kullanılan CD ler Atatürk Erzurum Üniversitesi'nden Ayşe Merve Şenol'dan temin edilmiştir.

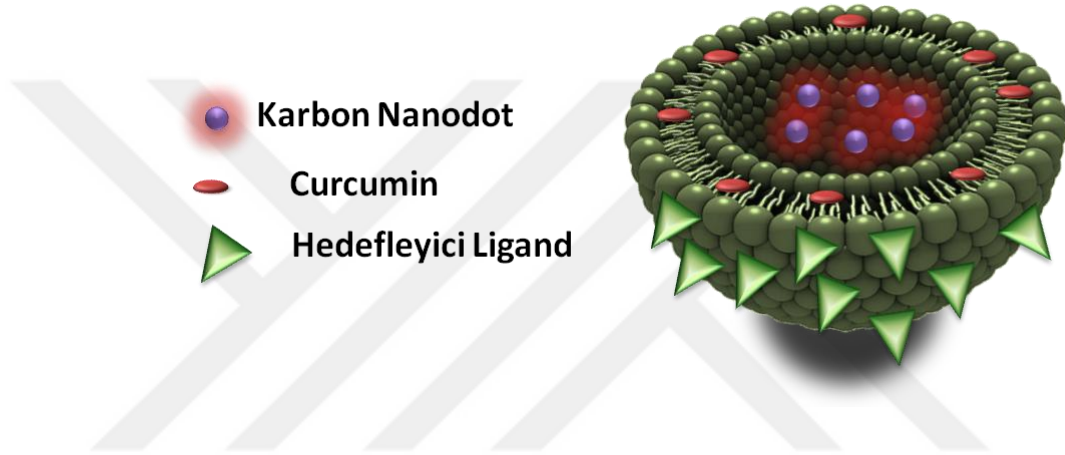
2.5.1 Teranostik kurkumin/CD enkapsüle lipozomların hazırlanması

Lipozomlar geleneksel ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Lipozomların hazırlanmasında Çizelge 2.2 deki oranlar kullanıldı. 3:1 (v/v) oranında kloroform: metanol karışımında hazırlanan kurkumin içeren lipid çözeltisi 50 mL lik yuvarlak dipli balonda hazırlanır ve rotary evaporatörde 45 °C de organik çözümler buharlaştırılarak lipid film tabakası oluşturuldu. Ardından pH sı 7,4 e ayarlı PBS film tabakasının üzerine son konsatrasyonu 300 µg/mL olacak şekilde etanol içerisinde süspanse edilmiş (sonikasyon ile) CD ler eklendi ve balon hızlıca vortekslenildi. Lipid film tabakasının katmanlar halinde kalkmasıyla çok tabakalı lipozom vezikülleri oluşur. Hidrasyon aşaması 40 °C de 2 saat boyunca hafif çalkalama ile gerçekleştirildi. 2 saatin sonunda veziküller T_m (jel-kristal faz geçiş sıcaklığı) üzerinde (40 °C) iken örnekler Hamilton şırıngalarına alınarak ekstrüzyon işlemine başlandı. Ekstrüzyon işlemi 80 nm por çaplı polikarbonat membranlar kullanılarak, 11 kez örneğin membrandan geçirilmesiyle gerçekleştirildi. Ekstrüzyon sonrası toplanan lipozom örnekleri gece boyu + 4 °C de diyalize (MW: 6000 – 8000 kDa) bırakıldı. Diyaliz sonrası örnekler sonraki aşamalarda kullanılmak üzere + 4 °C de tutuldu. Sonraki aşamada geliştirilmesi planlanan kurkumin/CD/Anti-CD44 lipozomları diyalizden alınan kurkumin/CD lipozomları kullanılarak post-modifikasyon yapılmıştır. Bunun için 48 mg EDC, 7,2 mg NHS ve 7,2 µg/mL anti-CD44 ilk olarak 2,0 mL lik ependorflar kullanılarak 15 dakika oda sıcaklığında 500 µL pH 6 MES tamponu içerisinde 1000 rpm de termal çalkalayıcı ile inkübasyonu yapıldı. Sonrasında üzerine 1500 µL kurkumin/CD lipozom solüsyonu eklenerek 3 saat boyunca 1000 rpm de termal çalkalayıcı da oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Reaksiyon sonrası -NH₂ grupları yüzeyde bulunan lipozomlar ile -COOH grupları aktifleşmiş anti-CD44 bağlanmış olup, fazla EDC/NHS i uzaklaştırmak için örnek 6 saat boyunca oda sıcaklığında diyalizlenmiştir. Son olarak elde edilmesi planlanan teranostik yapı Şekil 2.7 deki gibidir.

Çizelge 2. 2 Teranostik amaçlarla kullanılacak farklı lipozomal yapıların formülasyonları

İçerik	Kurkumin Lipozom (F1)	Kurkumin/CD Lipozom (F2)	Kurkumin/CD/Anti-CD44 Lipozom (F3)
DMPC	3,0 mg/mL	3,0 mg/mL	2,25 mg/mL

PE	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,15 mg/mL
Kolesterol (Chol)	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL	0,375 mg/mL
Kurkumin	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL	0,375 mg/mL
Karbon Nokta (CD)	-	0,3 mg/mL	0,225 mg/mL
Anti-CD44	-	-	7,2 µg/mL



Şekil 2. 7 Kurkumin/CD/anti-CD44 teranostik lipozomlarının şekilsel gösterimi.

2.5.2 Teranostik lipozomların ve CD lerin karakterizasyonu

İlk olarak dışarıdan temin edilen CD lerin spektrofotometrik karakterizasyonları yapılmıştır. UV/Vis spektrometrik ölçümler 200 µL örnek ile UV-Vis Microplate spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek) kullanılarak yapılmıştır. CD lerin floresans ölçümleri ise Varioskan spektrofluorometre (Thermo Fischer) ile 3,5 mL lik küvetler kullanılarak 3,0 mL örnek hacmi ile saf su içinde ölçümler alınmıştır.

CD lerin ve lipozomların karakterizasyonu için partikül boyutu ve zeta potansiyel analizleri DLS yöntemi ile Malvern NanoZS (USA) model partikül boyut analizi cihazı ile yapılmıştır.

2.5.3 Enkapsülasyon etkinliği

Diyaliz sonrası elde edilen lipozom örneklerinden 100 µL alınarak üzerine 900 µL metanol eklenerek veziküler yapıların dekompozisyonu vorteks ve 10 dk. sonikasyon ile sağlanmıştır. Lipozom örneklerindeki kurkumin açığa çıkartılarak enkapsülasyon verimi analizi için hazırlanmıştır. Sonrasında, gerekli kurkumin analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (% EE) aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır:

$$\% EE = [\text{Enkapsüle kurkumin} / \text{Başlangıçta eklenen kurkumin}] \times 100$$

2.5.4 Hücre kültürü çalışmaları

Kurkumin/CD enkapsüle teranostik veziküllerin hazırlanması ve karakterizasyonları tamamlandıktan sonra *in vitro* hücre kültürü uygulamaları ile geliştirilen formülasyonların kanser hücrelerine olan çeşitli etkileri incelenmiştir. Tez kapsamında hücrelerin üzerinde kemo/radyoterapötik ajanı olarak etkilerini artırmaya yönelik hazırlanan preparatlar öncelikli olarak model olarak seçilen HaCaT ve U-87MG (nörogloma, ATCC, U.S.A) hücre hatlarında test edilmiştir. İlk olarak farklı dozlarda canlılık testi yapılarak preparatların uygulanacağı toksik olmayan en yüksek ortak doz seçildikten sonra radyosensitivitesi kanser hücreleri üzerindeki etkileri hücre canlılığı testleri ile belirlendi. Son olarak hazırlanan veziküler preparatlar CD lerin varlığı sayesinde kırmızı filtre kullanılarak (ikincil tekrarlı floresans) hücrelerin floresans görüntüleri alınmıştır.

HaCaT ve U-87MG hücre hatlarının kültivasyonu, %10 FBS, %1,0 penisilin/streptomisin içeren DMEM (4,5 g/L ve L-Glutamin içeren) ortamında ve % 5,0 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatör şartlarında gerçekleştirildi.

2.5.4.1 Teranostik lipozomların hücre canlılığına etkisi

Teranostik lipozomların U-87MG üzerindeki canlılık etkisi sitotoksisite testi ile yapıldı. Doz-bağımlı olarak gerçekleştirilen bu test için MTT yöntemi kullanıldı. Flask ortamından tripsinizasyon ile alınan hücreler 96-kuyucuklu

kültür ortamına transfer edildi. Kuyucuklarda hücrelerin kültivasyonu, hücreler konfluent hale gelene kadar devam edildi. Sonrasında büyüme ortamı kuyucuklardan alınarak hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreler veziküler örneklerle (Kurkumin, Kurkumin/CD ve Kurkumin/CD/anti-CD44) değişen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca muamele edildi. Sonrasında örnekler kaldırılarak hücreler tekrardan PBS ile yıkanır. Her bir kuyucuk başına 110 µL olacak şekilde %10 MTT çözeltisi eklenir. Hücrelerin içinde oluşacak olan formazanın çözülmesini sağlamak için 4 saat boyunca hücreler MTT ile muamele edilir. Hücre membranını parçalamak için kuyucuklara 100 µL SDS (10 mL 0,01 M HCl de hazırlanmış 1,0 g SDS) eklenir. 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kuyucuğun optik yoğunluğu spektrofotometrik mikro-plaka okuyucuda 570 ve 630 nm’lerde okundu.

2.5.4.2 Teranostik lipozomların radyosensitivitesi

İlgili örneklerin varlığında ve yokluğunda pozitif ve negatif kontroller oluşturularak hücrelere radyasyon uygulaması LİNAK (6 MV Doğrusal Hızlandırıcı) literatürde önerildiği şekliyle gerçekleştirildi. Uygulanan işlem aşağıdaki gibidir:

4×10^3 hücre, 96 kuyucuğa ekilerek gece boyu inkübatörde bekletildi. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılıp örneklerin uygulaması gerçekleştirildi. 2 saat sonra hücreler, 2,5 Gray dozda LİNAK sistemi altında radyasyona maruz bırakıldı ve ardından, 72 saat süresince inkübe edilerek, MTT metodu ile hücre canlılığı belirlendi. Sonuçlar kontrol grubu ile (radyasyon uygulanmamış hücreler) karşılaştırma yapılarak hesaplandı.

2.5.4.3 Hücre görüntüleme

8000 U-87MG ve HaCaT hücreleri 8’li Chamber slide’lara ekilip 2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyerleri alınarak örnekleri içeren besiyerleri kuyucuklara ilave edilmiş ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından, her bir hücre, 3 kez PBS ile yıkanıp hücre çekirdeklerinin boyanması için DAPI çözeltisi ile 15 dk. inkübatörde bekletildi. Son olarak, hücreler tekrar PBS ile 3 kez yıkanıp görüntüler Floresans mikroskop ile kırmızı ve DAPI filtre kullanımıyla görüntülendi. Sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırma yapılarak değerlendirildi.

2.6 İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasındaki tüm denemeler en az üç tekrarlı şekilde yapılmıştır. Özellikle çıkarılanlar dışındaki tüm veriler $\pm$ S.S. (Standart Sapma) şeklinde verilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi, tek yönlü ANOVA (Varyans Analizi) ile Tukey' in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirildi. İki grup arasında farklılığın $P < 0,05$ değerinden küçük olduğu takdirde anlamlı, eğer $P < 0,01$ veya $0,001$ ise anlamlı fark derecesinin arttığı düşünülmüştür.



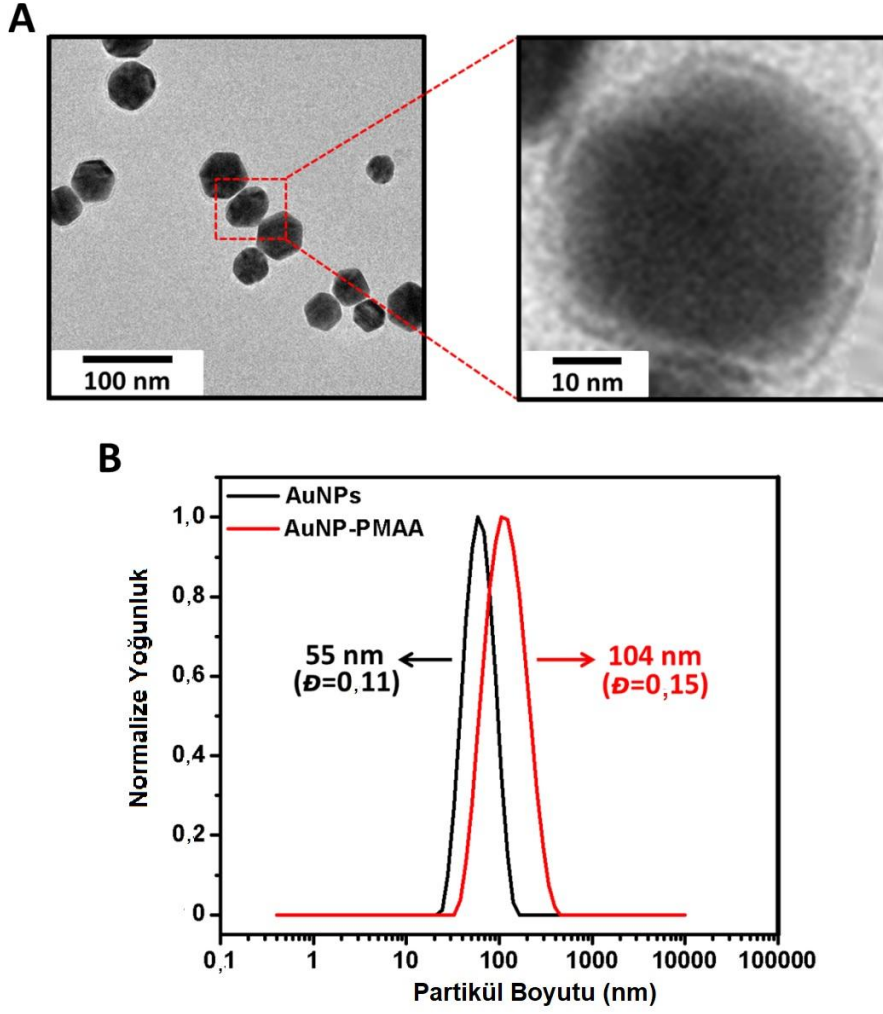
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Bölüm-1: "Polimer Kaplı Altın Nanopartiküller: Teranostikler İçin Fonksiyonel Yapılar"

3.1.1 Karakterizasyon

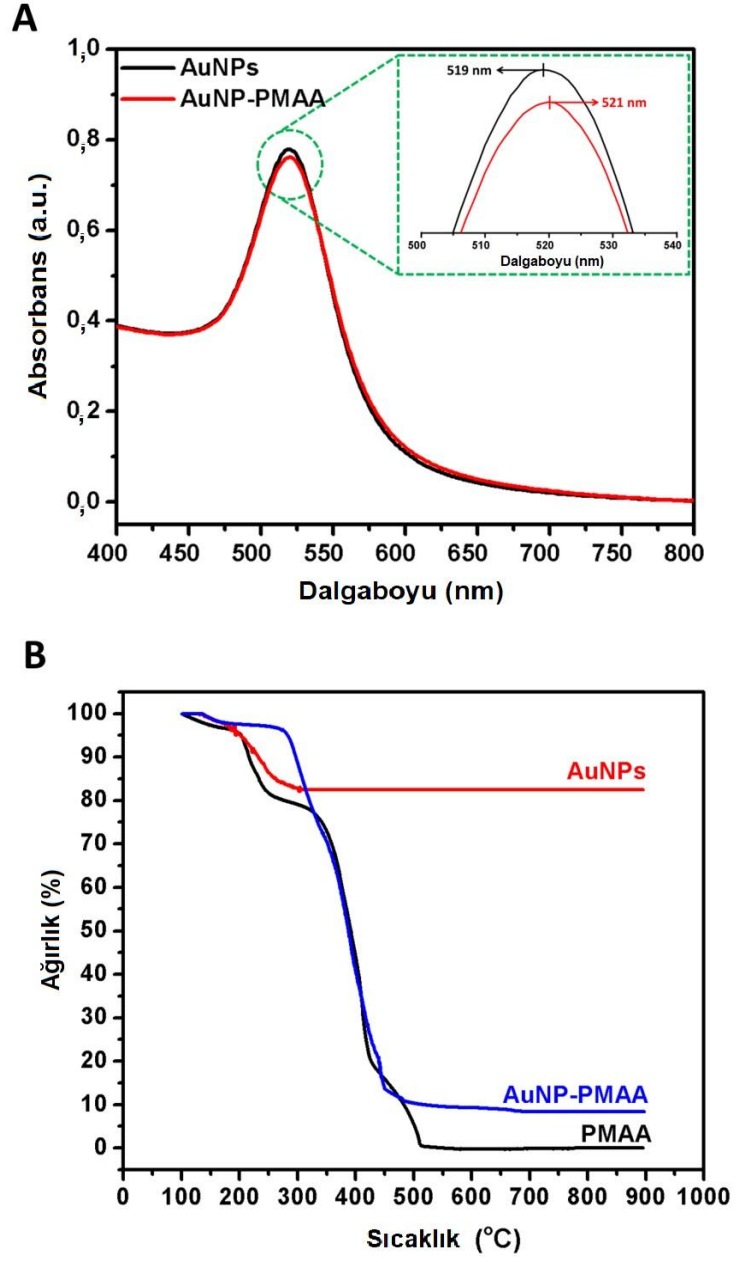
PMAA fonksiyonizasyonu önce, AuNP çözeltisi santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve aynı hacimde su ile tekrar disperse edildi. Ardından PMAA kaplı altın nanopartiküller gece boyunca PMAA ve AuNP'lerin karanlıkta karıştırılması ile hazırlandı. İlk olarak, elde edilen PMAA kaplı AuNP'ler boyut ve yüzey plazmon rezonans maksimum bandı (SPRmax) değer değişiminin incelenmesi açısından DLS ve UV/Vis spektroskopisi ile karakterize edildi. AuNP'lerin SPRmax bandı genellikle nanopartikül boyutu, şekli, toplanması ve ayrıca dielektrik ortamına uygundur. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi, SPRmax bandının konumu PMAA'nın yüzeye adsorbe edilmesi nedeniyle 519'dan 521 nm'ye kaymıştır. Dahası, UV absorpsiyon piki, tiyol ile son bulan PMAA ile kaplanmış AuNP'lerin hala küre biçiminde olduklarını ve ayrıca UV absorbansında herhangi geniş geniş bir kayma olmadığı için herhangi bir agregasyon göstermediğini doğrulamıştır. PMAA ile kaplanmış AuNP'ler, DLS kullanılarak boyut ve zeta potansiyeli açısından karakterize edildi. AuNPs ve PMAA-AuNP arasındaki hidrodinamik hacmi içinde belirgin bir artış yüzeyi üzerine PMAA başarıyla immobilizasyon işaret yoktu. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi, PMAA ile kaplandıktan sonraki altın nanopartiküllerin boyutu, polidispersite indeksi (PDI) 0,15 ile $55,7 \pm 0,2$ nm'den $104 \pm 0,7$ nm'ye ve dar bir partikül boyutu dağılımına işaret etmektedir.

Ayrıca, sulu solüsyonda karboksil grubunun ($\text{RCOOH} \leftrightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+$) deprotonasyonundan dolayı negatif zeta potansiyelinin büyüklüğü $-26,9 \pm 0,2$ 'den $-43,6 \pm 0,8$ mV'a yükselmiştir. TEM görüntülerine göre, PMAA kaplı altın nanopartiküllerin boyutu $52 \pm 1,4$ ila $65 \pm 2,6$ nm arasında değişmektedir. Monodisperse nanoparçacıkların ortalama boyutu ise $57 \pm 1,8$ nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 1 A) PMAA kaplı AuNP lerin TEM görüntüsü; B) AuNP ve PMAA kaplı AuNP (AuNP-PMAA) lerin partikül boyut ölçümleri.

AuNP'lere immobilize edilen PMAA polimerinin miktarını belirlemek için, her bir malzeme termal profilini analizlemede TGA ölçümleri gerçekleştirildi. Şekil 3.2B'de görüldüğü gibi, PMAA kaplı AuNP, PMAA polimerinin yüzeyden ayrışması nedeniyle yaklaşık 650 °C'ye kadar kütle kaybına sebep olmuş ve kalan fraksiyon ise sentetik nanoparçacıkların Au çekirdeğine sahiptir. Sonuç olarak, PMAA kaplanmış AuNP'lerin polimerin %87,4'ünü içerdiği gözlenmiştir.



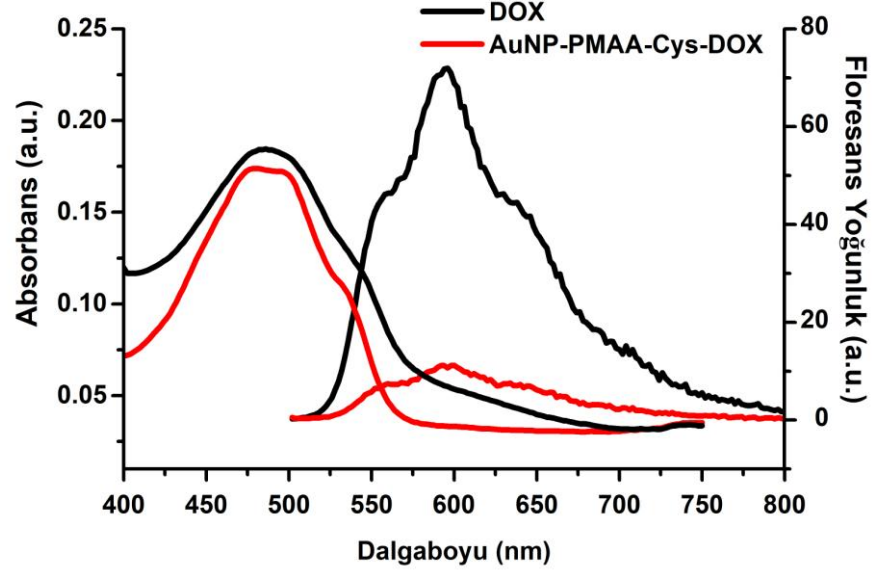
Şekil 3. 2 AuNP ve AuNP-PMAA ların A) UV-Vis spektroskopik karakterizasyonu ve B) Termal gravimetrik analiz (TGA) ölçümleri.

Dr. Remzi BECER ve ekibi tarafından başarılı bir şekilde sentezlenen PMAA kaplı AuNP (AuNP-PMAA) parçacıkların eldesi sonrasında pH duyar bir yüzey oluşturabilmek için bu parçacıklar EDC/NHS kimyası ile birlikte Cys aminoasidi ile kimyasal konjugasyonu yapılmıştır. Sonraki aşamalarda da DOX

ile pH duyar hidrazon bağı oluşturduktan sonra AuNP-PMAA-Cys-DOX sentezi gerçekleştirilmiştir.

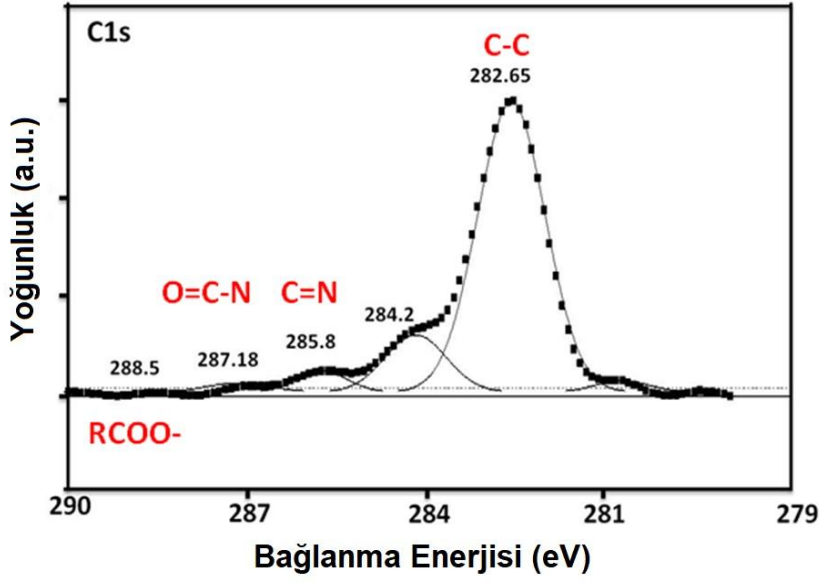
AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatının başlangıç karakterizasyon adımı olarak spektrofotometrik özellikler araştırılmıştır. Konjugatın floresan ve UV/Vis spektrumu Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Konjugasyon prosedürünün öncesi ve sonrasında DOX'un spektral özelliklerini karşılaştırmak için, serbest DOX ve AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatı aynı konsantrasyonda kullanılmıştır. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi DOX, AuNP-PMAA-Cys'e konjuge edildiğinde 600 nm'de floresan emisyonunu (eksitasyon:480 nm) gösterebilir. Burada, konjugasyon adımlarından kaynaklanan floresans yoğunluğunun ve absorpsiyon piklerinin azaltılması ile DOX konjugasyonu kanıtlandı. Diğer çalışmalarda benzer bulgular polimer kuantum nokta ve PEG ile birleştirilmiş paladyum nanopartiküllerinin konjugasyonu ile gösterildiği gibi ortaya çıkmıştır (Du et al., 2015; Shanthi et al., 2015). Bununla birlikte, DOX kendi spektral özelliklerini Bununla birlikte, DOX spektral özelliklerini görünür alanda koruyabilir, bu nedenle bu sorun, DOX'in AuNP-PMAA partikülleri üzerindeki bağlanma verimliliğini (BE%) hesaplamada yararlı olabilir. Dolayısıyla, 480 nm'de absorbansı okurken 2,5-100 µM DOX konsantrasyon aralığında $y = 0.0068x + 0.012$ ($R^2 = 0.999$) denklemiyle standart bir eğri oluşturuldu. Daha sonra yeni sentezlenen 1,25 mg/mL AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatı ölçüldü ve tekrarlanabilir sonuçlar Cys uzatılmış ve polimer kaplı AuNP'lerin 25,5 µM DOX'u bağlayabileceğini gösterdi. Bağlanma verimi aşağıdaki formülle hesaplanmış olup, %51 şeklinde bulunmuştur.

Bağlanma Verimi %: $(\text{Konjugattaki DOX miktarı} / \text{Başlangıçtaki DOX miktarı}) \times 100$



Şekil 3. 3 Sistein (Cys) ve Doxorubicin (DOX) ile yapılan pH-sensitive konjugasyonun (AuNP-PMAA-Cys-DOX) UV-Vis spektroskopik ve florimetrik karakterizasyonları. Ölçümler hazırlanan stok konjugat ve aynı miktarda DOX (10 μ M) ile gerçekleştirildi.

AuNP-PMAA ve AuNP-PMAA-Cys-DOX a ait partikül boyutları sırasıyla 104,9 $\pm$ 0,7 nm (polydispersity index (PDI): 0,15) ve 147 $\pm$ 25 nm (PDI: 0,43) şeklindedir. AuNP-PMAA ve AuNP-PMAA-Cys-DOX a ait yüzey yükleri ise sırasıyla -43,6 $\pm$ 0,8 mV ve -22,7 $\pm$ 12 mV. Negatif olarak yüzey yüklü NP'lerin plazma protein adsorpsiyonunda azalma ve düşük oranda spesifik olmayan hücre alımını sergilediği bilinmektedir (Alexis et al., 2008; He et al., 2010). Ayrıca yüklü NP'ler, NP'lerin doğal agregasyon eğiliminin üstesinden gelmek için birbirlerini itebilir (Aggarwal et al., 2009). Dolayısıyla, yeni sentezlenmiş AuNP-PMAA ve bunların DOX konjuge formlarının, PDI değerleri ile desteklenen iyi dağılım kararlılığı sayesinde kanserli dokuda EPR etkisi ile birikimi için uygun olabileceğini göstermektedir.

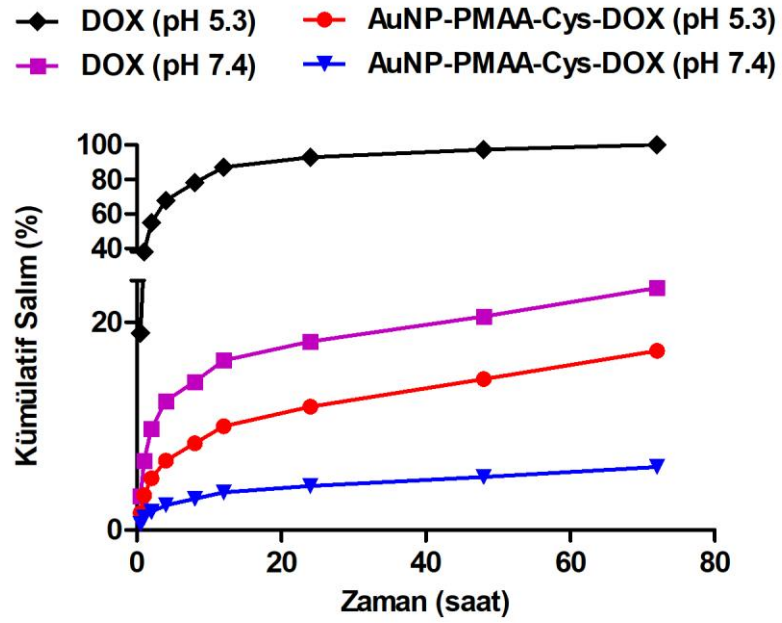


Şekil 3. 4 AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugasyonunun X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) taraması.

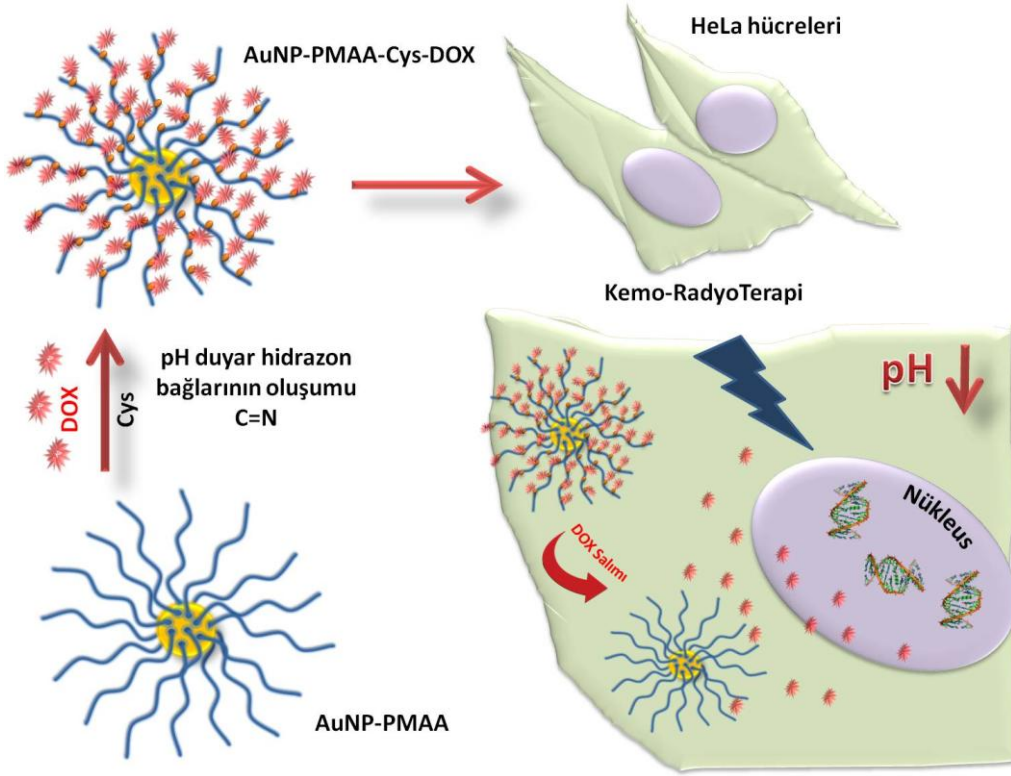
Fizikokimyasal parametrelere ek olarak, AuNP-PMAA-Cys-DOX'in XPS'i, son konjugattaki karakteristik bağları bağlama enerjileri yoluyla kanıtlamak için kullanıldı. Şekil 3.4'deki XPS spektrumu, AuNP-PMAA'nın karboksil kalıntıları ile Cys'in amino grubu ve pH duyar bağ olarak hidrazon arasındaki bir amid bağı da dahil olmak üzere, konjugasyon adımlarında kullanılan kritik bağlar hakkında detaylı bilgiyi göstermektedir. Spektrumda, 282,65 eV'lik bağlanma enerjisi tipik C-C bağlarını ortaya çıkarmaktadır. Normal olarak C-C bağlanma enerjisi yaklaşık 284 eV (Rück-Braun et al., 2013) gösterir. Bununla birlikte, bir yüzey üzerinde karbonun kimyasal adsorpsiyonunun bağlanma enerjisini 282,6 eV'de gösterebildiği ispatlanmıştır. Ayrıca O=C-N amid bağı, 287,8 eV'de 285,8'lik bir kayma ve bağlanma enerjisi ile önceki çalışmalarda saptanan tipik hidrazon bağı (C=N) sunmaktadır. Ayrıca, 288,5 eV'lik bağlama enerjisinde küçük bir omuz, RCOOH gruplarını gösterir. Bu ise, PMAA üzerindeki Cys artıkları veya konjuge olmamış karboksil grubundan gelmektedir. XPS ölçümleri ile de konjugattaki spesifik amid ve hidrazon bağlarını net olarak kanıtlanmıştır.

Karakterizasyon adımlarına ek olarak, DOX-konjuge edilmiş, polimer kaplı AuNP'lerin *in vitro* serbest salım profilleri, bu partiküllerin iletim taşıyıcıları olarak potansiyel kullanımını araştırmak üzere üretildi. Tümör alanlarının ana karakteristik özelliklerinden biri, hafif asitli mikro çevreye sahip olmasıdır (Wong et al., 2011) Bu nedenle, bu çalışma, kemoterapötik yaklaşımların kullanılmasında

bir araç olarak AuNP-PMAA'yı kullanarak pH duyarlı bir DOX konjugasyonunu üretmeyi amaçlamıştır. Tipik bir hidrazon bağından oluşturulmuş bir ilaç ve bir taşıyıcı arasındaki pH'ya duyarlı bağların birçoğu, kanser hücrelerinin hücre dışı pH ortamını model alarak pH 5,3'te ve pH 7,4'te sağlıklı hücrelerin ortamını modellediği gibi değerlendirildi (Romero-Garcia et al., 2014) Görüldüğü gibi Şekil 3.5'de, serbest DOX, pH 5,3'te % 100 serbest salıma ulaşarak tipik salınma profilini ortaya koymuştur. Öte yandan, AuNP-PMAACys-DOX konjugatının kümülatif salım profilinin, serbest DOX salımına göre pH 5,3'de daha kontrol edilebilir olduğu görülmüştür (Şekil 3.5). Benzer şekilde, pH 7,4'te de benzer bir durum gözlemlendi. Konjugattan pH 7,4'te DOX salımı, 72 saat boyunca yaklaşık % 6,0 civarında idi. Bu değerli veriler, formülasyonun daha düşük sıcaklıklarda tutulması sayesinde AuNP-PMAA-Cys-DOX'in yavaş salınımı ve kullanılabilirliği uzun süre potansiyelini gösterdi.



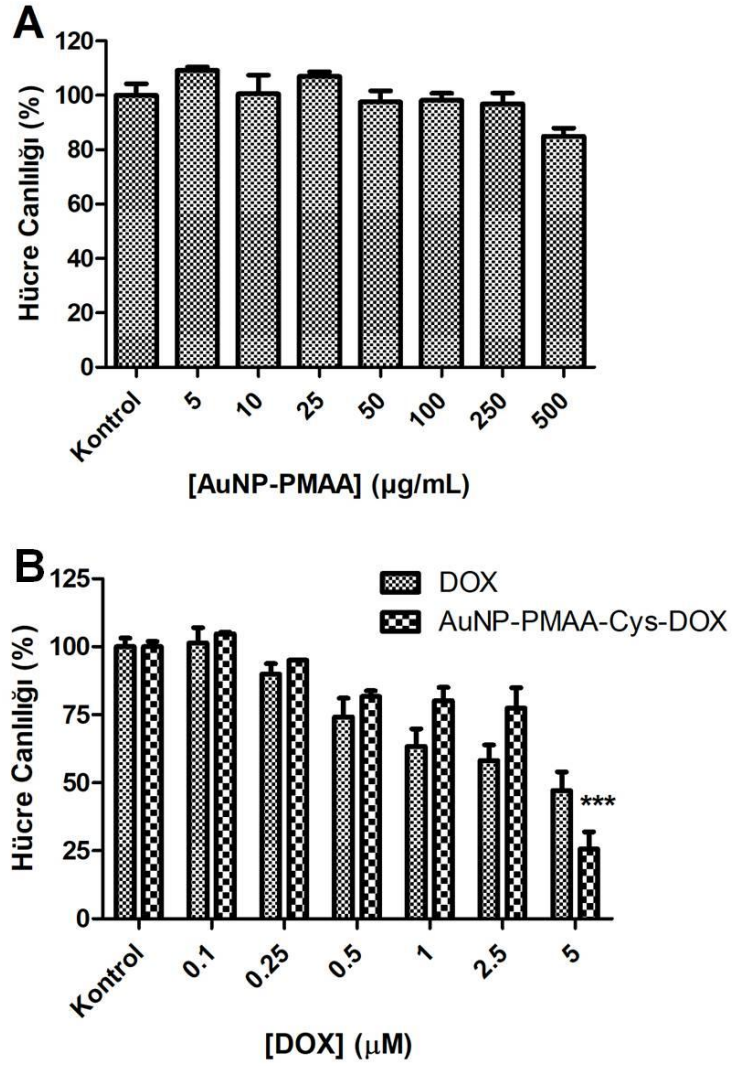
Şekil 3. 5 *in vitro* koşullarda pH 5,3 ve pH 7,4 te 37 °C de AuNP-PMAA-Cys-DOX a ait ilaç salım profilleri.



Şekil 3. 6 AuNP-PMMA-Cys-DOX partiküllerine ait çalışma şeması.

3.1.2 Hücre kültürü çalışmaları

Sırasıyla HeLa hücrelerinde gerçekleştirilen toksisite, radyoaktivite ve hücre görüntüleme çalışmalarının sonuçları aşağıdaki gibidir. Bu çalışmada model kanser hücre hattı olarak HeLa hücreleri ile diğer parametrelerin değerlendirilmesinden önce, hücrelerin doz bağımlı canlılığı AuNP-PMMA, DOX ve AuNP-PMMA-Cys-DOX konjugatı için 24 saat boyunca 37 °C'de nemlendirilmiş koşullar altında ve %5,0 CO₂ koşullarında incelenmiştir. Günümüze değin, AuNP'lerin hem sağlıklı hem de kanserli hücreler üzerinde çok fazla toksik etki göstermediği bilinmektedir (Demir et al., 2014; Unak et al., 2012). Bu adımda, AuNP-PMMA yapıları başlangıçta canlılık üzerine etkileri açısından test edilmiştir. HeLa hücreleri. Şekil 3.7A, polimer kaplı AuNP parçacıklarının hücre canlılığı üzerindeki etkisini göstermektedir. Açıkça görülebileceği gibi, polimer kaplı AuNP'ler, 500 µg/mL parçacıklara kadar (%84) HeLa hücreleri üzerinde toksik etki göstermez (Şekil 3.7B).



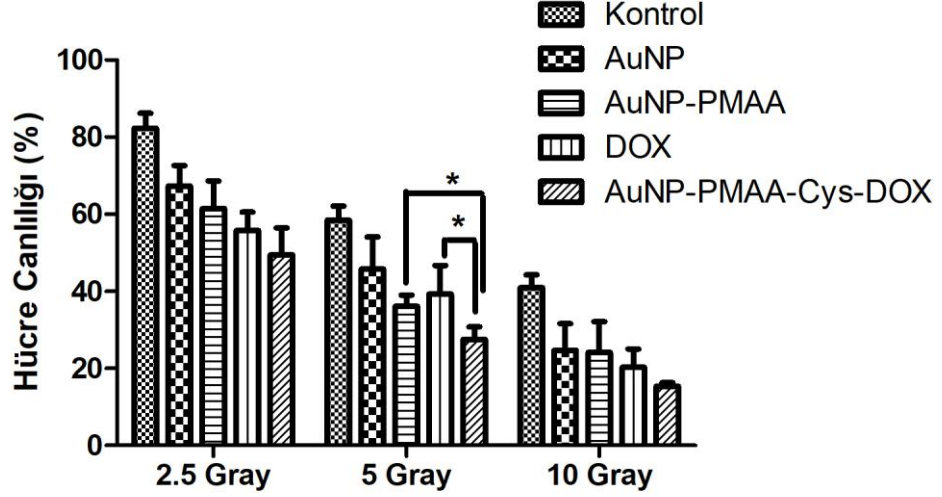
Şekil 3. 7 A) AuNP-PMAA ve B) AuNP-PMAA-Cys-DOX ve serbest DOX a ait HeLa hücreleri üzerindeki doz bağımlı toksisite sonuçları. Hata barları ortalama $\pm$ S.S. yi vermektedir (n=4).

Serbest DOX'un hücre canlılığı profili, 1,0 µM DOX'a kadar AuNP-PMAA-Cys-DOX'a yakındır (konjugat için 50 µg/mL AuNP-PMAA'ya eşdeğerdir). DOX 5,0 µM'ye kadar daha etkili gözükse de, son konsantrasyonda serbest DOX (% 47,11) ve AuNP-PMAA-Cys-DOX (% 25,6, $p < 0.001$) arasında anlamlı bir düşüş vardır. Serbest DOX'un verilmesinin hücre zarı boyunca basit difüzyona dayandığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra, birçok nanotaşıyıcının hücre alımı hücre tipine ve taşıyıcının fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı endositik yollar ile gerçekleşmektedir. Fonksiyonel partiküllerin hücre içine alınımından sonra, partiküller hücrede parçalanır ve terapötik maddenin dağılımı asidik koşullar altında sağlanır. *In vitro* DOX salınım profili diğer çalışmalar gibi benzer davranış sergilediğinden, bu profilin etkisi de sitotoksititeye ilişkin fikir

verebilir. Dahası, serbest DOX'un kümülatif ilaç salım profillerinde asidik koşullar altında kolayca serbest kalabileceği daima gösterilmiştir. Bununla birlikte, nanotaşıyıcı sistemleri 24 saatlik toksisite testlerinde daha etkili olurlar. Olgumuzda, önerilen terapötik platformun etkin konsantrasyonunu 5,0 μM DOX konsantrasyonu olarak gözlemleyebiliriz. Dolayısıyla, pH-duyar bir bağ ile oluşturulan DOX konjugatı, sürekli salımı ve toksik olmayan bir taşıyıcı mimariye sahip olması sayesinde kemoterapide iyi bir potansiyel olabilir.

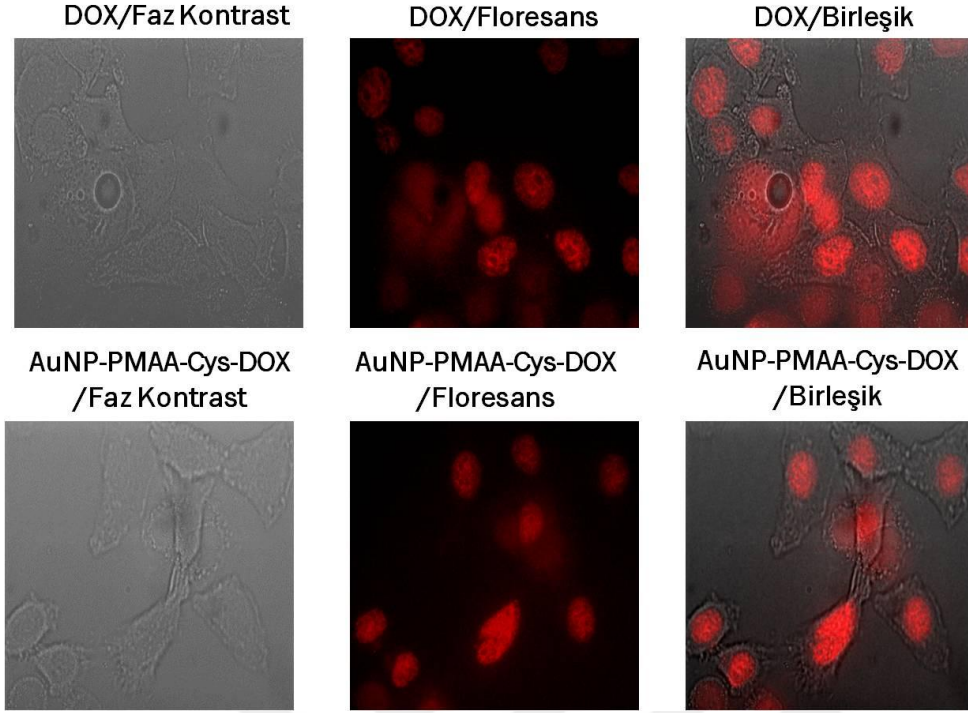
Bunu takiben, AuNP ve DOX'un her iki yönteminin güçlendirici yönlerini kullanarak kemoterapi ve radyoterapi kombinasyonu için pH-duyar bir hidrazon bağlantısı oluşturarak kolay ve etkili bir şekilde konjuge edilmiştir. AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugasyonunun radyosensitif etkilerini araştırmak için, HeLa hücreleri üç farklı iyonize radyasyonla (2,5, 5,0 ve 10 Gray) muamele edildi. Buna ek olarak, serbest DOX (5,0 μM), AuNP-PMAA ve sitratla kaplanmış AuNP (hem AuNP-PMAA hem de AuNPPMAA ile aynı konsantrasyonda) AuNP-PMAA-Cys-DOX (5,0 μM eşdeğeri) ile kapsamlı ve kontrollerle birlikte radyoterapötik etkiler test edilmiştir. Şekil 3.8'de gösterildiği gibi, AuNP-PMAA-Cys-DOX (%27) için iyonize radyasyonun 5,0 Gray i, serbest DOX (% 40), AuNP-PMAA (%36,3) ve ayrıca sitratla kaplı AuNP'ler arasında önemli bir fark olduğunu ortaya koymuştur (%46) diğer dozlarla kıyaslandığında ($p < 0,05$). Bu arada bulgularımızı destekleyen başka bir çalışmada DOX kanser hücrelerine uygulandığında benzeri sonuçlar alınmıştır (Xu et al., 2012). 2,5 ve 10 Gray ışınması sırasında, sitrat kaplı AuNP'lerden AuNP-PMAA-Cys-DOX'e kadar olan örneklerin hücre canlılıklarının benzer sonuçlar verdiği görüldü. Bu sonuçlar aynı zamanda istatistiksel olarak da karşılaştırılmıştır, ancak şekilden görüleceği üzere, her iki radyasyon dozu için uygulanan örnekler arasında dramatik bir değişiklik yoktur. Dahası, 5,0 μM 'lik serbest DOX konsantrasyonu, 2,5 Gray de ek bir terapötik etki göstermemiştir. Bu numunenin hücre canlılığı sitotoksisite testine benzerdir. Radyasyon seviyesinin artması sırasında hem AuNP-PMAA hem de DOX kontrol grubuna göre anlamlı bir etki ortaya çıkmıştır. Giriş bölümünde belirtildiği gibi, AuNP'lerin radyosensitif etkisi, bu çalışmada açıkça gösterilmiştir. Beklendiği gibi, AuNP-PMAA-Cys-DOX partikülleri, 5,0 Gray radyasyon altında HeLa hücreleri üzerinde serbest DOX a göre terapötik etkinliğini daha da arttırmayı başarmıştır. Diğer rapor edilen çalışmalarda, DOX, HeLa hücreleri ve V79 hamster hücre dizisi için radyosensitizer olarak kullanılmıştır (Bonner and Lawrence, 1990; Jagetia and Nayak, 2000). Jagetia ve Nayak, DOX'un 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik (5,8 μM 'a eşittir) DOX'u HeLa'ya ekleyerek DOX'un radyasyon etkisi 0-3,0 gray ışınlama dozları aralığında hücreler üzerine araştırmalar yapmıştır. Bu çalışmaya göre, artan radyasyon dozları kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında hücre canlılığında kademeli bir düşüş sağlamıştır. Bu sonuçlar, aynı zamanda, serbest DOX grubunun hücre canlılığında azalma ile ilgili bulgularımızı desteklemektedir. Bu çalışmalarda gösterildiği gibi, 10 Gray gibi yüksek radyasyon dozları, terapötik moleküller olmayan kontrol grupları için

azalmış hücre canlılığına neden olabilir. Bununla birlikte, örnekler, sadece kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 10 Grayde HeLa hücrelerine toksisitesini önemli ölçüde göstermiştir ($p < 0,001$).



Şekil 3. 8 AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatının 2,5, 5 ve 10 graylerdeki radyoterapötik aktivitesi. Hata barları ortalama standart sapmayı vermektedir ($n=6$).

Sentezlenen AuNP-PMAA-Cys-DOX için son çalışma olarak DOX konjugatlarının internalizasyonunu izlemek için 2 saat boyunca konjugatların toksik olmayan konsantrasyonları HeLa hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 3.9'dan görülebileceği gibi, aynı dozdaki DOX, HeLa hücrelerinin çekirdeğinde serbest DOX olarak kolaylıkla lokalize edilebilir. DOX'un benzersiz spektroskopik özellikleri ile floresan görüntülemenin yanı sıra, faz kontrast görüntüleri görüntülerin üst üste binmesi ve polimer kaplı AuNP konjugatının hücrelerin izlenmesinde de etkili olduğunu göstermek için çekilmiştir. Önerilen konjugatın bu özelliği, bir teranostik nanoparçacık olarak uygun ve faydalı bir aday olabileceğini ortaya koymaktadır.

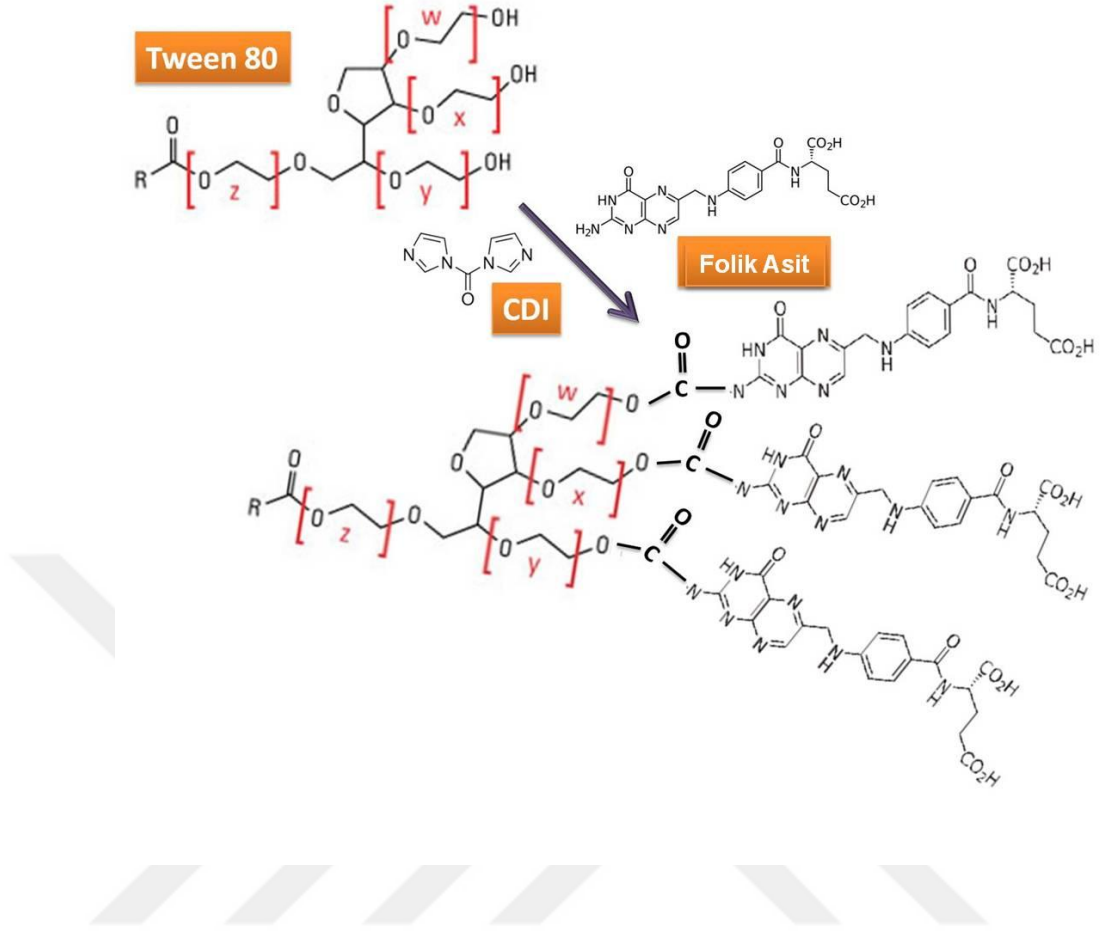


Şekil 3. 9 HeLa hücrelerinin faz-kontrast ve floresans görüntüleme teknikleriyle AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatının serbest DOX la karşılaştırılarak yapılan hücre görüntüleme çalışması. Görüntüler 100x büyütme ile kırmızı filtre kullanılarak alınmıştır.

3.2 Bölüm-2: "Folat Reseptörü Hedefli Multimodal Veziküler Teranostikler"

3.2.1 Tween 80-FA nın sentezi

Tween 80 ve FA arasında yapılan konjugasyon aşamasında ilk olarak CDI ile Tween 80 deki -OH grupları aktifleştirilerek FA daki -NH₂ grupları ile arasında kovalent bağ oluşturulmuştur. Konjugasyon aşamasında Tween 80 deki -OH in miktarı kadar reaksiyon ortamına FA eklenmiştir (Tween 80 (3 adet -OH grubu): FA (1 adet -NH₂ grubu), 1:3) .Reaksiyona ilişkin şematik gösterim Şekil 3.10 deki gibidir.

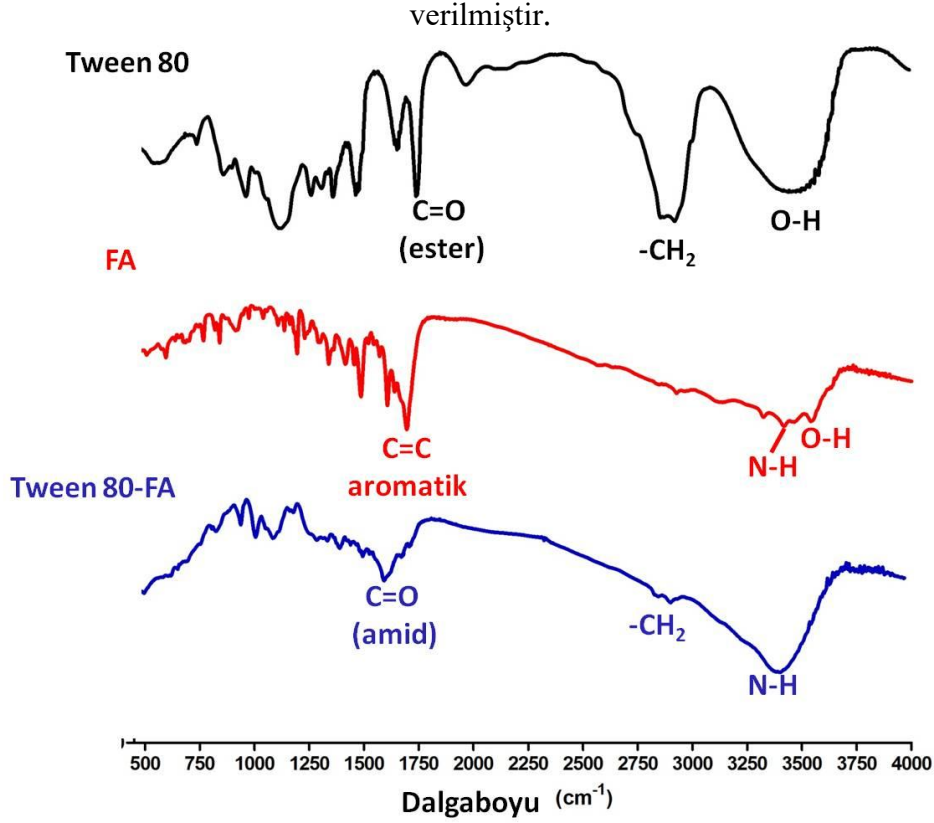


Şekil 3. 10 Tween 80-FA konjugatının oluşumuna ilişkin reaksiyon şeması.

Bu yapının karakterizasyonuna yönelik ilk olarak FA'nın bağlanma verimi HPLC ile belirlenmiştir. FA, Tween 80 ile konjuge edildiğinde FA'nın verdiği pikte kayma ve değişme olduğu için bağlanma verimi liyofilize haldeki konjugatta bulunan serbest FA miktarı üzerinden gidilmiştir. FA için standart grafik 0,5 - 10 ppm arası elde edilmiş ve denklem $y=26,687x-1.471$ ($R^2=0,999$) şeklindedir. Bağlanma verimi için 1,0 mg Tween 80-FA konjugatı tartılıp çözüldükten HPLC'ye verilmiştir. Sonuç olarak % 98,025 FA'nın bağlandığı HPLC ile kanıtlanmıştır. Bu sonuca bakarak her bir hidroksil grubu için konulan FA'nın %100'e yakın olarak tamamen bağlandığı söylenebilir.

Sonrasında Tween 80-FA'daki oluşan karbamat bağının oluşumunu kanıtlamak için FT-IR spektroskopisi kullanıldı. Kontrol olarak serbest FA kullanıldı.

Sonuçlar Şekil 3.11'de



Şekil 3. 11 Tween 80, FA ve Tween 80-FA konjugatına ait FTIR sonuçları.

FA, bir pteridin halkası, p-amino benzoik asit ve glutamik asitten oluşmaktadır. Serbest FA ya ait FTIR analizine bakıldığında fenil ve pteridin halkalarındaki COOH, C=O ve aromatik C=C yapıları gibi en çok bulunan karakteristik pikler 1700 ve 1610 cm⁻¹ civarında açıkça görülmektedir. Ayrıca literatürdeki verilere göre Tween 80 e ait FTIR pikindeki 2900-3000 cm⁻¹ arasındaki iki pik, yapısındaki asimetrik ve simetrik metilen (-CH₂) gruplarının varlığını 2932 ve 2873 cm⁻¹ kanıtlamaktadır (Ren et al., 2012). Ayrıca FA daki 3450 ve Tween 80-FA konjugatındaki 3448 cm⁻¹ civarı olan pik ise N-H bağına ait olduğu düşünülmektedir. 3500 ve 3600 cm⁻¹ civarındaki FA ya ait pikler ise O-H bağına ait olduğu daha önceki çalışmalarımızdan da bilinmektedir (Akbulut et al., 2015). Bunun yanında Tween 80 deki geniş bir alana yayılan pikin yapının uçlarında yer alan primer alkol kısmına ait karakteristik O-H grubuna ait olduğu bilinmektedir (Ren et al., 2012). Konjugatta ise benzer bölgede daha keskin bir pikin varlığı ise N-H pikine ait olduğu söylenebilir. Ayrıca konjugatta yer alan C=O amide II tipi bağı gösteren 1631 cm⁻¹ konjugasyonun başarılı olduğunu da kanıtlamaktadır.

3.2.2 Niozom veziküllerinin karakterizasyonu

Nanopartiküllerin kaderi genellikle parçacık boyutu ve boyut dağılımından etkilenirler. Nanopartiküllerin mükemmel bir fiziksel stabiliteye ulaşmada partikül boyut dağılımı önemli bir noktadır. Zeta potansiyel, süspansiyon ve dispersiyon çözeltilerinde materyalin yüzey yükünün bir fonksiyonudur. Zeta potansiyel analizleri ile özellikle veziküllere ilişkin çalışmalarda veziküler partikülün hücre ortamındaki gireceği yol kontrol altına alınabilir.

Proje kapsamında niozomlar hazırlandıktan sonra boyut ve zeta potansiyel analizleri gerçekleştirildi. Çizelge 3.1' de gösterildiği üzere PPIX-Au, PPIX-FA ve PPIX-Au-FA ve tek başına AuNP lerin boyutları ve zeta potansiyelleri verilmiştir. Çizelgeden tüm veziküler yapıların boyutlarının birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Literatürde de kanıtlandığı üzere hızlıca yapılan vorteks işlemi sonrası sonikasyon ile veziküllerin boyutları 100 nm nin altına indirilebilmektedir. Ancak çoklu dağılım indeksleri (PDI) gereği az miktarda da olsa büyük veziküllerin varlığı homojeniteyi etkilemektedir. Partikül boyutları, örnekteki sayıca fazla olan vezikül boyutuna göre verilmiştir. Ayrıca niozomların yüzey yüklerinin fazla olması stabiliteyi korumak için önemli parametredir.

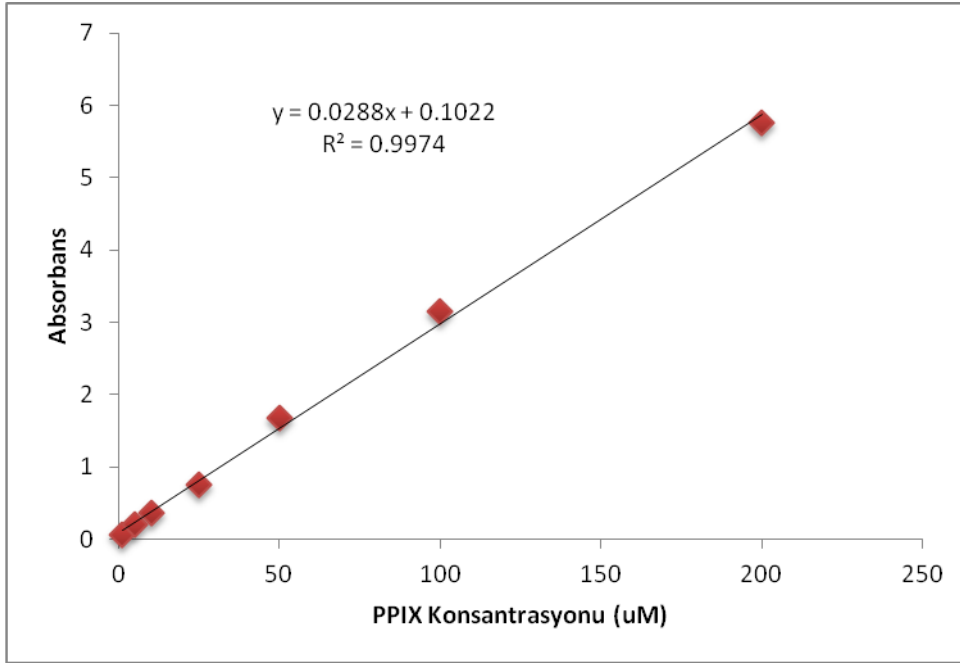
Çizelge 3. 1 AuNP, PPIX-Au, PPIX-FA ve PPIX-Au-FA örneklerinin zeta potansiyel ve boyut dağılımları. Veriler en az 3 tekrarlı olup $\pm$ S.S.^a şeklinde verilmiştir.

	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
AuNP	8 $\pm$ 2	0,143	-42 $\pm$ 7
PPIX-Au	69 $\pm$ 10	0,697	-48,5 $\pm$ 8
PPIX-FA	70 $\pm$ 13	0,636	-46 $\pm$ 8
PPIX-Au-FA	93,6 $\pm$ 17	0,546	-50 $\pm$ 9

^a $\pm$ S.S. değerleri ayrı günlerde taze olarak hazırlanmış örneklerin sonuçlarından hesaplanmıştır.

Partikül boyutu ve yüzey yükü belirlenen veziküllerin içerdiği protoporfirin miktarı için spektrofotometrik olarak % enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. Öncesinde 1,0-200 μ M aralığında çizilen PPIX standart grafiği kullanılarak

niozomlardaki PPIX miktarı Çizelge 3 2. deki gibi verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü üzere hazırlanan üç farklı formülasyon içinde benzer oranlarda enkapsülasyon verimi elde edilmiştir. Hazırlama aşamasında 100 µM olarak eklenen PPIX için enkapsülasyon verimleri direkt olarak içerdikleri konsantrasyonu vermektedir. Sonraki çalışmalar için hazırlanan stoğun 85 µM PPIX içeriğe sahip olduğu kabul edilmiş ve hücrelere uygulanmıştır.

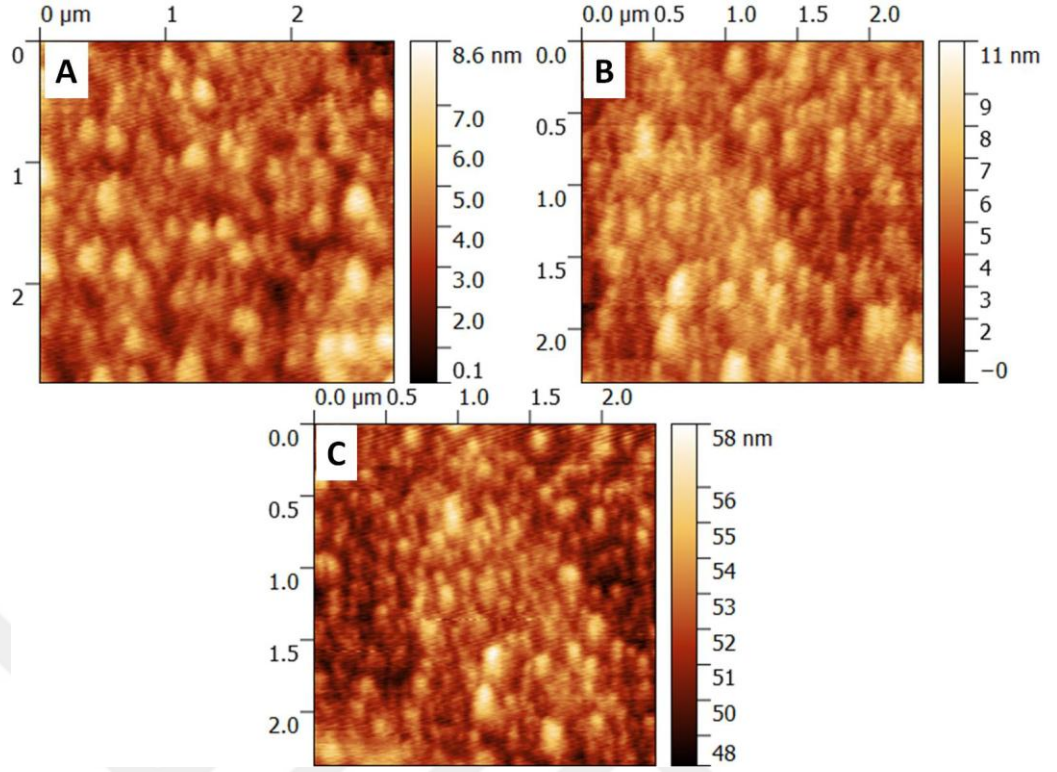


Şekil 3. 12 PPIX a ait standart grafiği.

Çizelge 3. 2 . Niozomlarda PPIX Enkapsülasyon Verimi (EE) (%) (S.S.:Standart Sapma)

Örnekler	% EE	% S.S.
PPIX-FA	86,31	1,08
PPIX-Au-FA	86,57	0,97
PPIX-Au	84,16	4,26

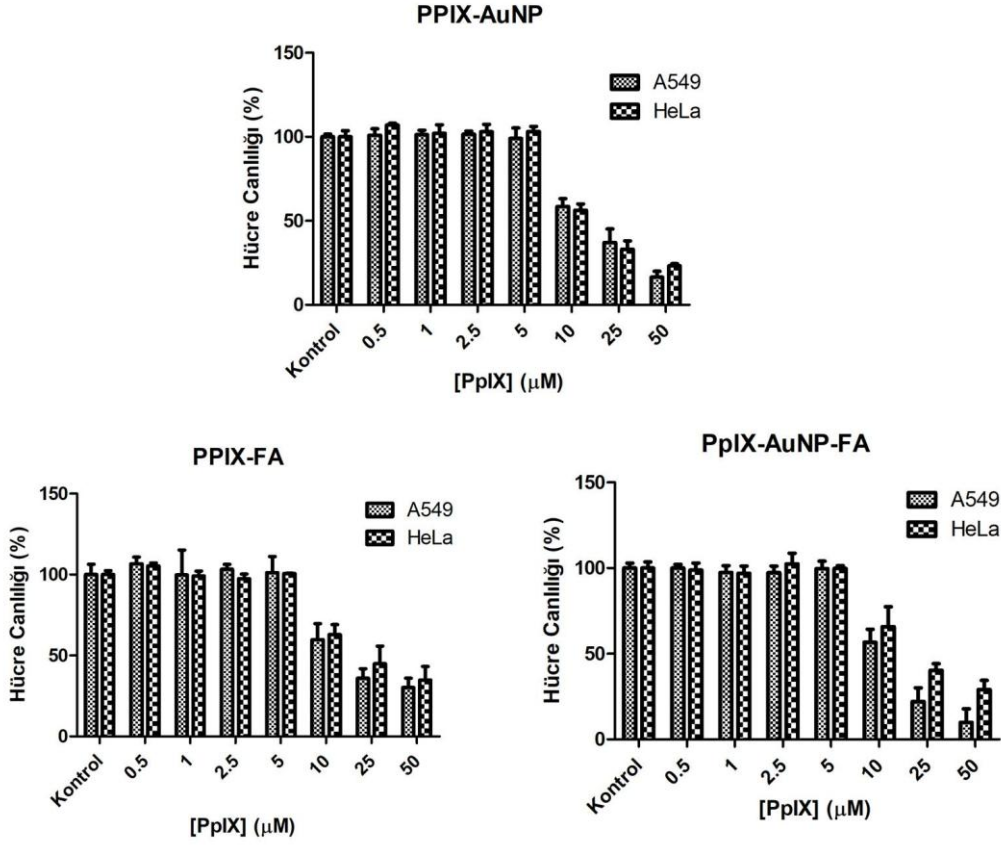
Diğer karakterizasyon tekniklerinin yanında partiküllerin şekilsel yapısı ile ilgili analizler AFM tekniği ile yapıldı. PPIX-AuNP, PPIX-FA ve PPIX-AuNP-FA niozom veziküllerinin AFM histogramları Şekil 3.13 deki gibidir. Sonuçlara göre, DLS analizindeki verilere oranla benzer şekilde yapı karmaşıklıkça histogram yüksekliklerindeki artma ve morfolojinin küresel olması veziküllerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 3. 13 PPIX-AuNP (A), PPIX-FA (B) ve PPIX-AuNP-FA (C) niozomal formülasyonlarına ait AFM histogramları.

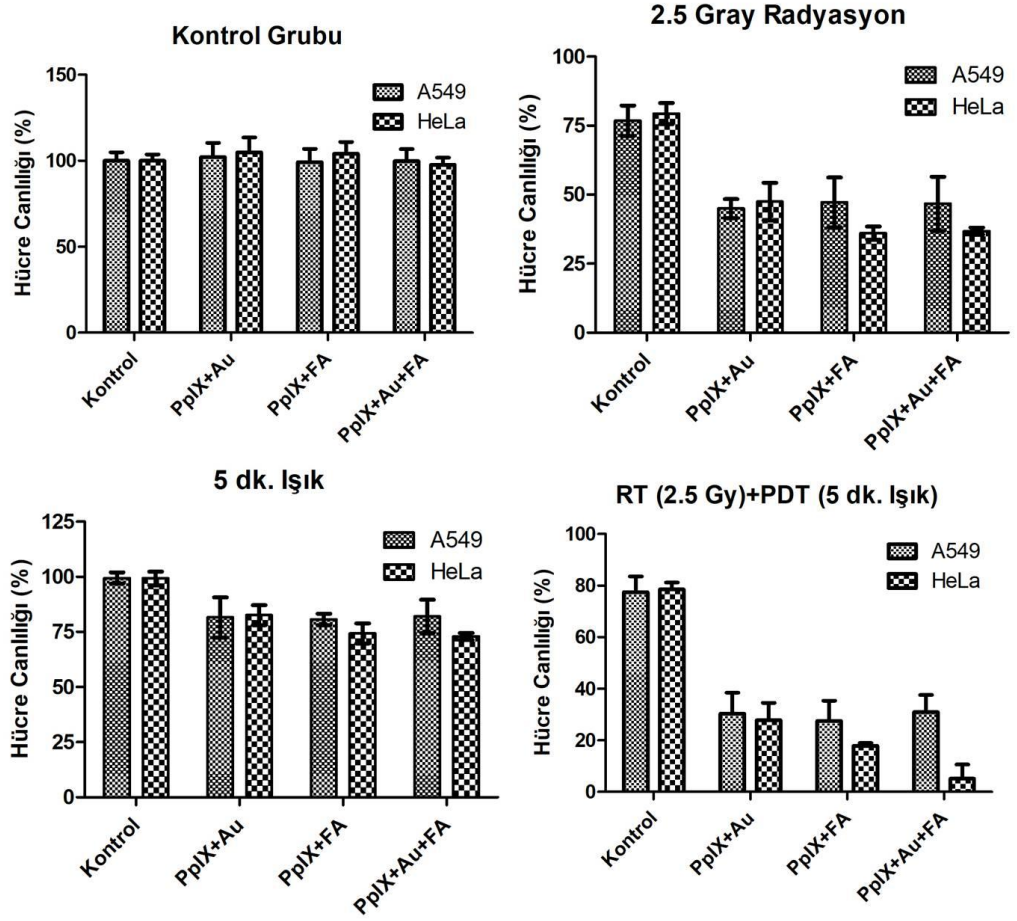
3.2.3 Hücre kültürü çalışmaları

Sırasıyla HeLa ve A549 hücrelerinde gerçekleştirilen toksisite, radyoaktivite/fotodinamik terapi ve hücre görüntüleme çalışmalarının sonuçları aşağıdaki gibidir. Radyoaktivite ve fotodinamik terapi ve kombine terapi denemeleri öncesi hücrelerde ışık ve radyasyon etkisine maruz kalmaksızın 24 saat süresince muamele edildiğin partiküllerin toksik olmayan en yüksek dozu hücrelere bu etkenler eşliğinde verilmiştir.



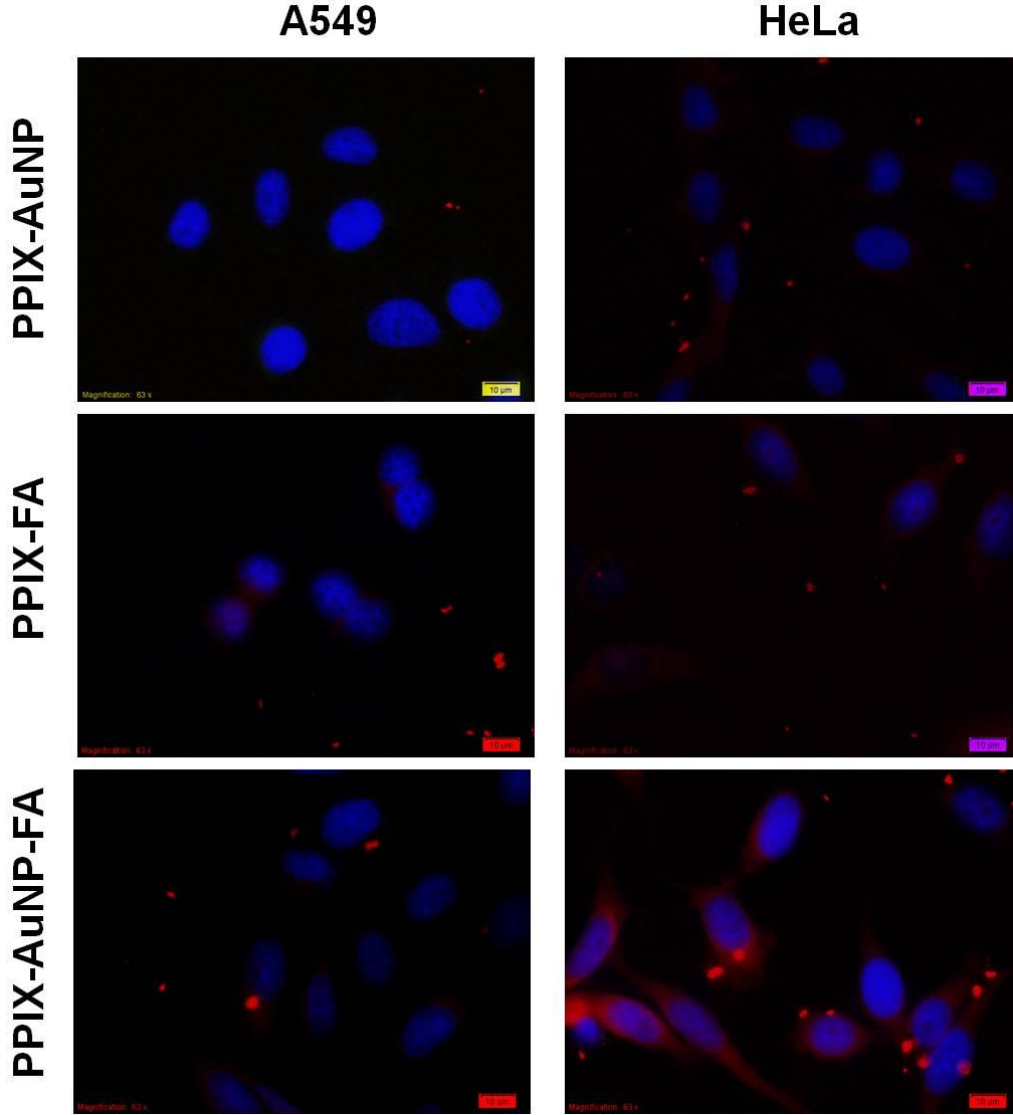
Şekil 3. 14 Hazırlanan niozomların farklı kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi. Hata barları ortalama standart sapmayı vermektedir (n=4).

Toksisite sonuçları gereği sonraki aşamada 5,0 μ M PPIX içeren niozomlar radyasyon, fotodinamik terapi ve kombine terapi uygulamaları ile multipleks özellikli veziküllerin aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçlara göre FA hedefli olmayan veziküllerde hücre hatları arasında herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Tek başına 2,5 Gray radyasyon ve 5 dk. boyunca uygulanan ışık ile ayrı yapılan denemelerde ise HeLa hücrelerinin canlılığı düşse de istatistiksel olarak net bir fark ortaya çıkarmamaktadır. Ancak kombine terapi uygulamasıyla FA reseptörü açısından negatif olarak kullanılan A549 hücrelerinin canlılık oranı, HeLa (FA reseptör pozitif) hücrelerine göre anlamlı olarak daha fazladır ($p<0.001$).



Şekil 3. 15 Radyoterapi, PDT ve kombine terapi ile farklı hücre hatlarında niozomların etkisi. Hata barları ortalama standart sapmayı vermektedir (n=6).

Son olarak yapılan floresans hücre görüntüleme çalışması ile de multipleks özellikli PPIX-AuNP-FA niozomlarının kontrol gruplarına kıyasla daha etkin bir şekilde FA reseptörü fazla bulunan HeLa hücrelerine alımı gösterilmiştir.



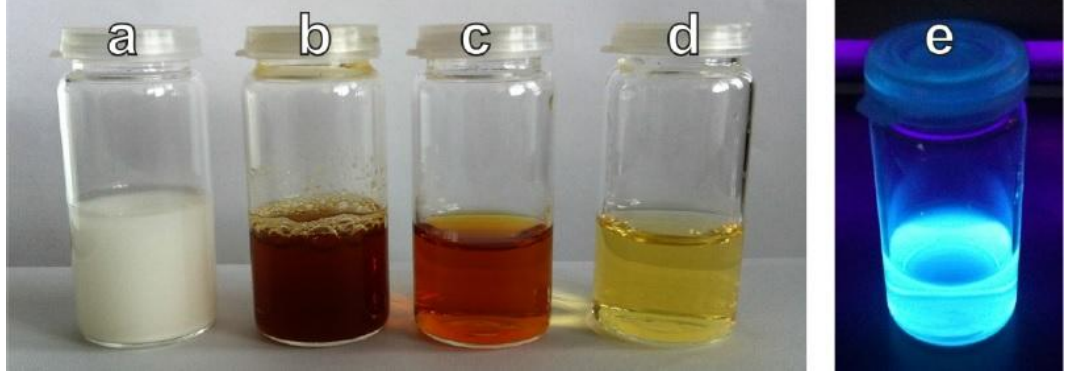
Şekil 3. 16 HeLa ve A549 hücrelerinin niozom formülasyonları ile muamelesi sonrası alınan floresans hücre görüntüleri. (Görüntüler kırmızı filtre kullanılarak 63x büyütme ile alınmıştır. Görüntülerdeki skala 10 μ m dir.)

3.3 Bölüm-3: "Kanser Tanısına Yönelik Moleküler Baskılanmış Polimer Problarının Geliştirilmesi ve Biyo-görüntüleme Uygulamaları"

3.3.1 CD lerin sentezi ve karakterizasyonu

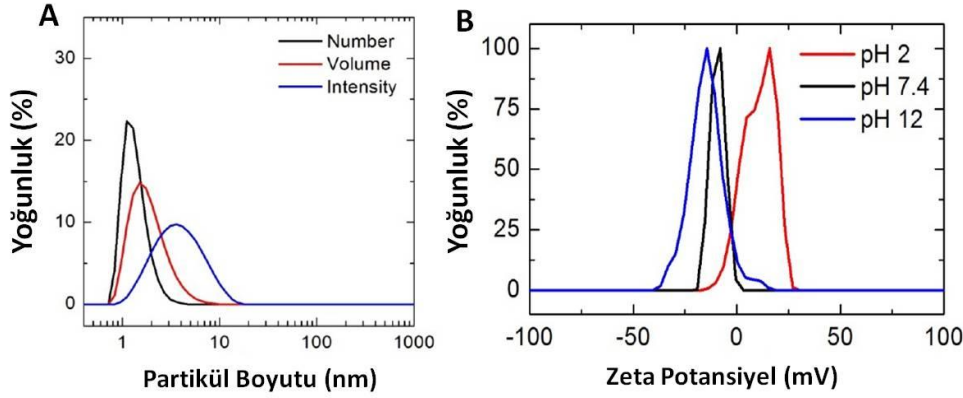
Bir önceki bölümde belirtildiği üzere bu çalışmada kullanılan CD ler Prof. Joachim Wegener ve ekibi tarafından sentezlenmiştir. Kullanılan CD lere ilişkin genel sonuçları aşağıdaki gibi verilmiştir. Sentez aşamasında kullanılan azot doplanması ile CD lerin fotoluminesans özelliklerini artırma yönünde bir strateji kullanılmıştır. Azot doplama için sentez sırasında triptofan (Trp) amino asidi

kullanılarak N modifiye CD ler hazırlanmıştır. Karbon kaynağı olarak nişastadan yola çıkılarak sentezlenen CD lerin sentez aşamaları Şekil 3.17 de verilmiştir.



Şekil 3. 17 CD lerin sentez sürecindeki aşamaları. a) Sulu nişasta süspansiyonu b) Karbonizasyon sonrası ham CD süspansiyonu, c) Filtrasyon sonrası CD süspansiyonu, d) 1,0 mg/mL ye seyreltilmiş CD süspansiyonu, e) Karanlıkta UV ışık (366 nm) altında seyreltilmiş CD süspansiyonu.

Literatürdeki verilerle de karşılaştırıldığında CD'lerin UV ışık altında mavi renkte emisyon yaydığı bilinmektedir. Sentezin başarılı olduğu konusundaki ilk ipuçlarını veren bu testten sonra morfolojik ve yapısal karakterizasyonuna geçilmiştir. Sentez sırasındaki prekürsör moleküllerin varlığının yanında bu partiküllere ait boyut, yüzey yükü gibi karakteristiklerde incelenmiştir. Bunun yanı sıra CD'lerin kimyasal kompozisyon ve spektroskopik özellikleri de incelenmiştir. Hidrodinamik çapın partiküllerin boyut ve yüzey özellikleri ile direk bir ilişkisi vardır. Hidrate kabukları sayesinde hücrelere kolaylıkla girebildikleri için CD'ler bu konuda çok önemli bir rol oynarlar. Bu kısımda sentezlenen CD'lere ilişkin ilk veriler olan partikül boyutu ve pH ya bağımlı zeta potansiyel sonuçları Şekil. 3.18 de verilmiştir.



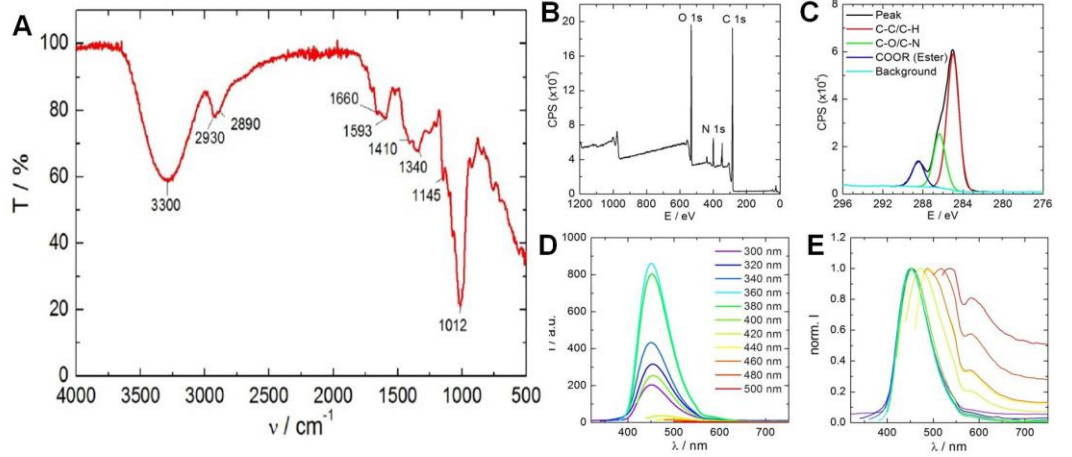
Şekil 3. 18 CD lere ilişkin (A) partikül boyutu ve (B) farklı pH lardaki zeta potansiyel analizleri.

Hidrodinamik partikül boyutu sonuçlarına bakıldığında, "intensity", "volume" ve "number" verileri bize parçacık boyutunun 0,8 ile 10 nm arasında olduğunu söylemektedir. "Intensity" değeri için ortalama partikül boyutu $4,4 \pm 0,4$ nm şeklindedir. Buna ek olarak Şekil 3.18B de görüldüğü gibi CD lerin yüzey yükleri üç farklı pH da (pH 2,0, pH 7,4 ve pH 12) çalışılmıştır. Şekilden de görüleceği üzere nötral pH da (pH 7,4) CD lerin kısmen negatif yüklü olduğu ($-9,3 \pm 3,5$ mV) görülmektedir. pH değerinin 12 ye yükseltilmesi ile birlikte yüzey yükünün daha negatif olduğu ($-14,7 \pm 8,3$ mV) görülmüştür. Bu artışın sebebi yüzeydeki grupların deprotonlanması ile açıklanabilir. Yüzeydeki bu küçük artışın sebebinin az miktarda bulunan amin gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna zıt olarak yüksek asiditeye sahip pH 2,0 ortamındaki zeta potansiyel ölçümlerinde ise yüzey potansiyelinin $10,6 \pm 7,6$ mV olduğu görülmüştür. Bu etki yüzeydeki karboksil gibi grupların ağırlıklı olduğunu ve hepsinin protonlanarak negativiteyi ortadan kaldırdığını kanıtlamaktadır.

Partikül yüzeyindeki kimyasal birimler ise infrared spektroskopisi (IR) ve XPS ile aydınlatılmıştır. Bu metotların seçilme sebebi, Raman spektroskopisinin CD nin kendi floresansı yüzünden hatalı sonuç vermeye elverişli olmasındandır. CD lere ait tipik IR spektrumu şekil 3.19 A da gösterilmiştir. Spektrumda -OH grubuna ait (gerilme-titreşim) $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ arası görülen karakteristik pikler kendini göstermektedir. 2930 ile 2890 cm^{-1} (simetrik ve asimetrik C-H gerilme-titreşim), ve 1410 ile 1340 cm^{-1} (C-H deformasyon titreşimleri) piklerinin yanında, 1660 ile 1593 cm^{-1} piklerinde ise amid I ve II gerilme titreşimleri görülmektedir. C-O gerilme titreşimleri ise 1145 ve 1012 cm^{-1} deki piklerden kendini göstermektedir. Bunun yanında, XPS ile birlikte CD deki kimyasal bağlayıcı yapılara yönelik yapının aydınlatılması sağlanmıştır. Genel XPS

spektrumu karbonun (C 1s, 285 eV), azotun (N 1s, 400 eV) ve oksijenin (O 1s, 532 eV) varlığını açıkça ortaya koymaktadır. C1 spektrumuna ait grafikteki 285,0 eV, 286,3 eV ve 288,5 eV pikleri sırasıyla COOR, C-O/C-N ve C-C/C-H kimyasal yapılarına ilişkindir. Özetle hem IR hem de XPS verileri CD'lerin yüzey yapısında Trp den kaynaklı olarak azotlu grupların varlığını göstermektedir.

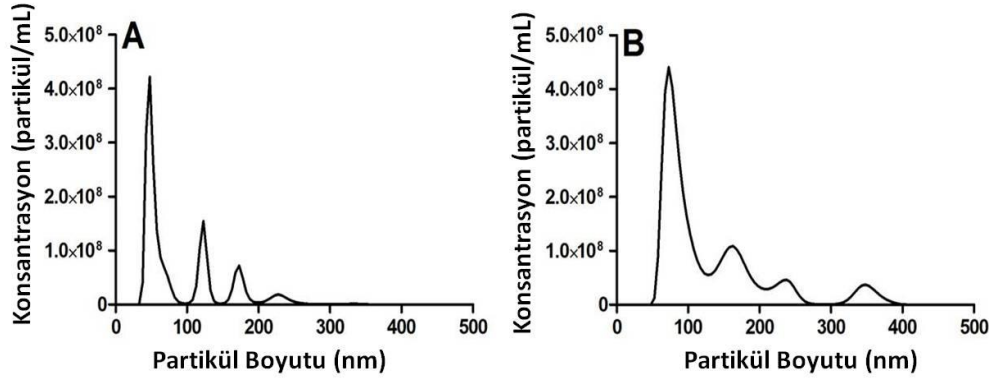
CD lerin spektroskopik karakteristiklerine baktığımızda ise 300-400 nm arası dalgaboyunda uyarıldığında değişen oranlarda ancak sadece 450 nm de emisyon piki verdikleri görülmüştür. En yüksek floresans yoğunluk ise 360 nm deki eksitasyon ile elde edilmiştir. Eksitasyon dalgaboyu arttıkça emisyon dalgaboyunda da artış gözlenmekte ancak floresans yoğunlukta da büyük oranda düşme gözlenmiştir.



Şekil 3. 19 A) Liyofilize CD lerin IR spektrumu. (B) CD lerin genel XPS spektrumu. (C) CD lerin C1 piklerinin yüksek rezolüsyon spektrumu. (D) 1,0 mg/mL CD'lerin doğal emisyon spektrumu. Eksitasyon dalgaboyu 20 nm aralıklarla 300-500 nm arasında değişmektedir. (E) Normalized edilmiş emisyon spektrumu.

3.3.2 MIPGlcA-CD lerin karakterizasyonu

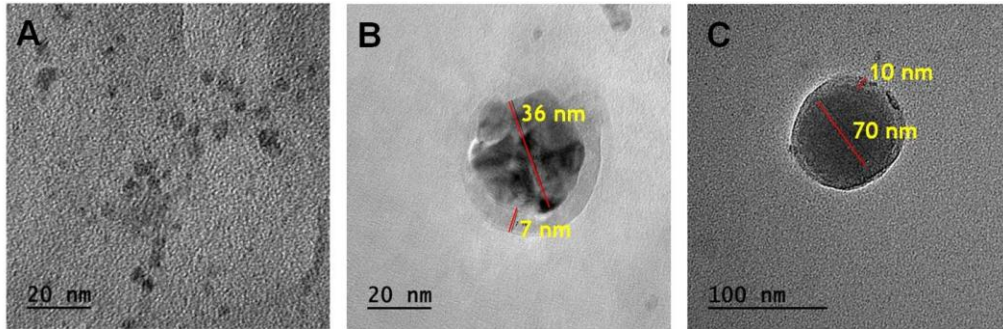
Çekirdek-kabuk yapılı MIPGlcA-CD partiküllerinin sentezi sonrasında, bu partiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonları üzerine çalışılmıştır. MIP, NIP ve CD lerin hidrodinamik boyut dağılımları NanoSight NanoTracking Analyzer (NTA) sistemi ile ölçülmüştür. Bu tekniğin avantajı partiküllerin de tek tek davranışının incelenmesidir. NTA sonuçları Şekil 3.20 de olduğu gibidir.



Şekil 3. 20 (A) MIPGlcA-CD ve (B) NIP-CD partiküllerine ait NTA boyut dağılım sonuçları.

Şekil 3.20 den de görüleceği üzere, MIP partiküllerinin boyutu en çok 48 nm olarak yer almaktadır. Bunun yanında NIP lerin boyutları MIP lere oranla daha büyük çıkmıştır. En çok partikül popülasyonu 82 nm civarında görülmektedir. Sonrasında MIPGlcA-CD ve NIP-CD için yüzey yüklerine bakılmıştır. Sırasıyla bu partiküllere ait zeta potansiyel sonuçları, $24 \pm 1,62$ mV ve $19 \pm 1,73$ mV dir. Yüzeydeki pozitiflik fonksiyonel monomer olan AB nin yapısındaki serbest pozitif yüklenmiş amino (NH^{3+}) gruplarından olduğu düşünülmektedir.

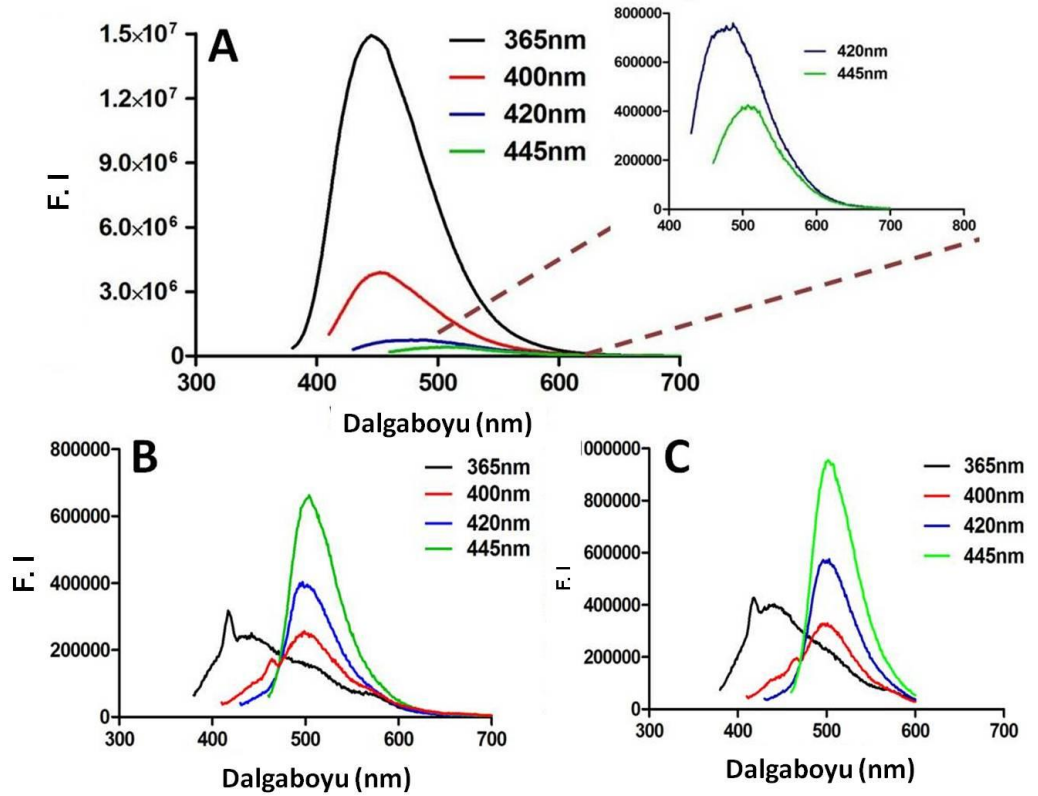
Sonraki karakterizasyon için TEM yöntemiyle partiküllerin morfolojik yapıları analiz edilmiştir. Şekil 3.21 de serbest CD lerin, MIPGlcA-CD ve NIP-CD lerin yapıları net olarak gözükmemektedir.



Şekil 3. 21 (A) CD, (B) MIPGlcA-CD ve (C) NIP-CD çekirdek kabuk yapıları partiküllerinin TEM görüntüleri. MIPGlcA-CD ve NIP-CD partiküllerinin çekirdek boyutu ve polimer kabuk kalınlığı görüntülerde yer aldığı gibidir.

Şekil 3.21 de görüldüğü üzere CD lerin boyutu genellikle literatürde de belirtildiği gibi ortalama 3,0-10 nm arasındadır. Ek olarak, MIPGlcA-CD (Şekil 3.21 B) ve NIP-CD lerin çekirdek-kabuk yapıları net olarak görünmektedir. Ayrıca TEM görüntülerindeki boyutlar yaklaşık olarak NanoSight sonuçları ile birbirine yakın olduğu görülmüştür.

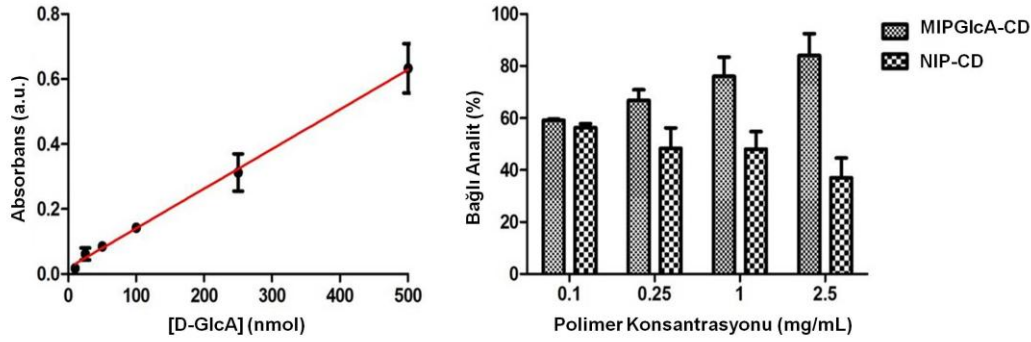
Yapısal karakterizasyon sonrası partiküllerin floresans özellikleri de spektrofotometri ile incelenmiştir. CD lerin artan dalgaboylarındaki uyarımlar ile maviden kırmızıya doğru floresans verebildikleri birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan CD ler ise 300-500 nm arası uyarılmıştır ve 365-445 nm floresans ışına yapabildikleri görünmüştür. Dahası, MIP ve NIP yapılarının oluşturulmasından sonra floresans emisyonları belirgin bir düzeyde düşse de görüntüleme için gerekli ışınımı verebildikleri görülmüştür. Ayrıca partiküller arasında hapsolmuş kumarin 6 yapıları sayesinde ise hem mavi hem de yeşil floresans bölgede görüntüleme yapılabileceği açıkça ortaya konmuştur (Şekil 3.22).



Şekil 3. 22 (A) 100 µg/mL CD lerin farklı eksitasyon dalgaboylarındaki floresans spektrumları. (B) 500 µg/mL MIPGlcA-CD ve (C) 500 µg/mL NIP-CD lerin farklı eksitasyonlardaki floresans spektrumları.

3.3.3 Bağlanma kapasitesi

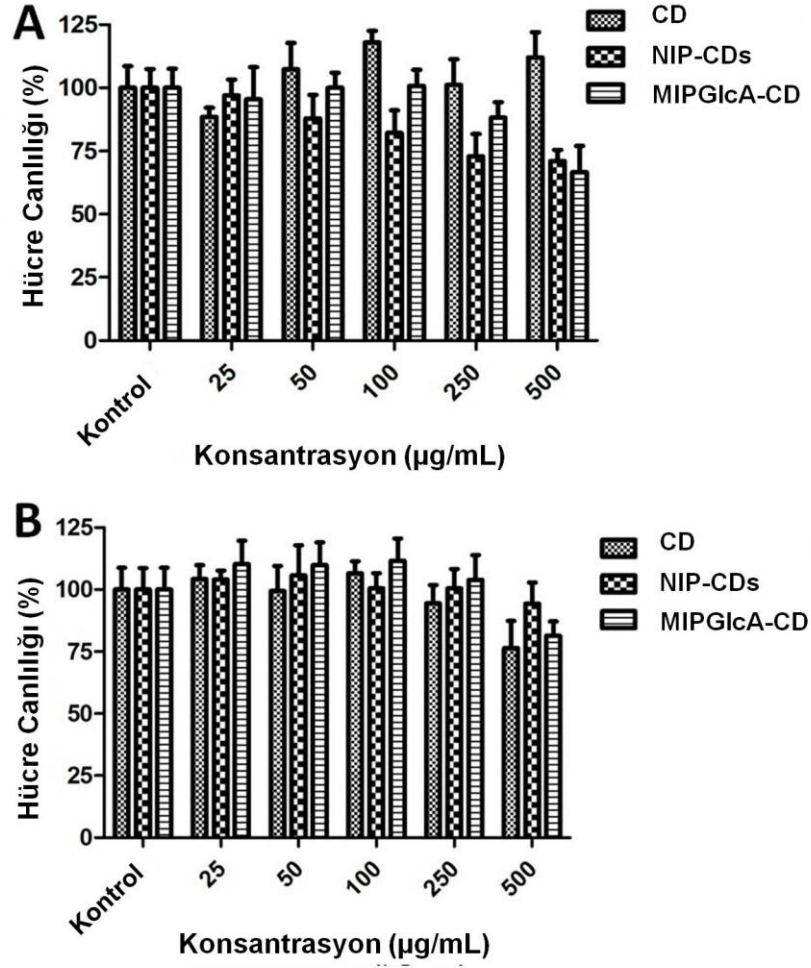
GlcA ya seçimli olarak tasarlanan MIP kaplı CD lerin bağlanma kapasitesini incelemek için, karbohidrat analizinde çokça kullanılan ve ekonomik olan kolorimetrik Dubois yöntemi kullanılmıştır. Bağlanma kapasitesi bakılmadan önce sadece D-GlcA ile 10-500 nmol arası konsantrasyonlar kullanılarak standart grafik çizilmiştir (Şekil 3.23). Grafığe ilişkin lineerlik denklemi $y = 0.0012x + 0.018$ ($R^2 = 0.998$) şeklindedir. Sonrasında ise 0,1; 0,25; 1,0 ve 2,5 mg/mL polimer süspansiyoları ile 10 nmol GlcA geceboyu inkübe edilmiş ve sonuçlar Şekil 9 daki gibi bulunmuştur. NIP-CD ler için de yapılan denemeler sonucunda artan polimer konsantrasyonu ile MIPGlcA-CD partiküllerinde bağlanmanın arttığı görülmüştür. Kontrol grubu olan NIP-CD ler için ise olduğu düzeyde kalmaktadır. Bu da geliştirilen partiküllerin amaca yönelik hizmet ettiğini göstermektedir.



Şekil 3. 23 D-GlcA için çizilen standart grafik ve MIPGlcA-CD ve NIP-CD ler için bağlanma kapasitesi sonuçları. Hata barları $\pm$ S.S. yi vermektedir. (n=3).

3.3.4 Hücre kültürü çalışmaları

Sırasıyla HeLa ve HaCaT hücrelerinde gerçekleştirilen toksisite ve hücre görüntüleme çalışmalarının sonuçları aşağıdaki gibidir.



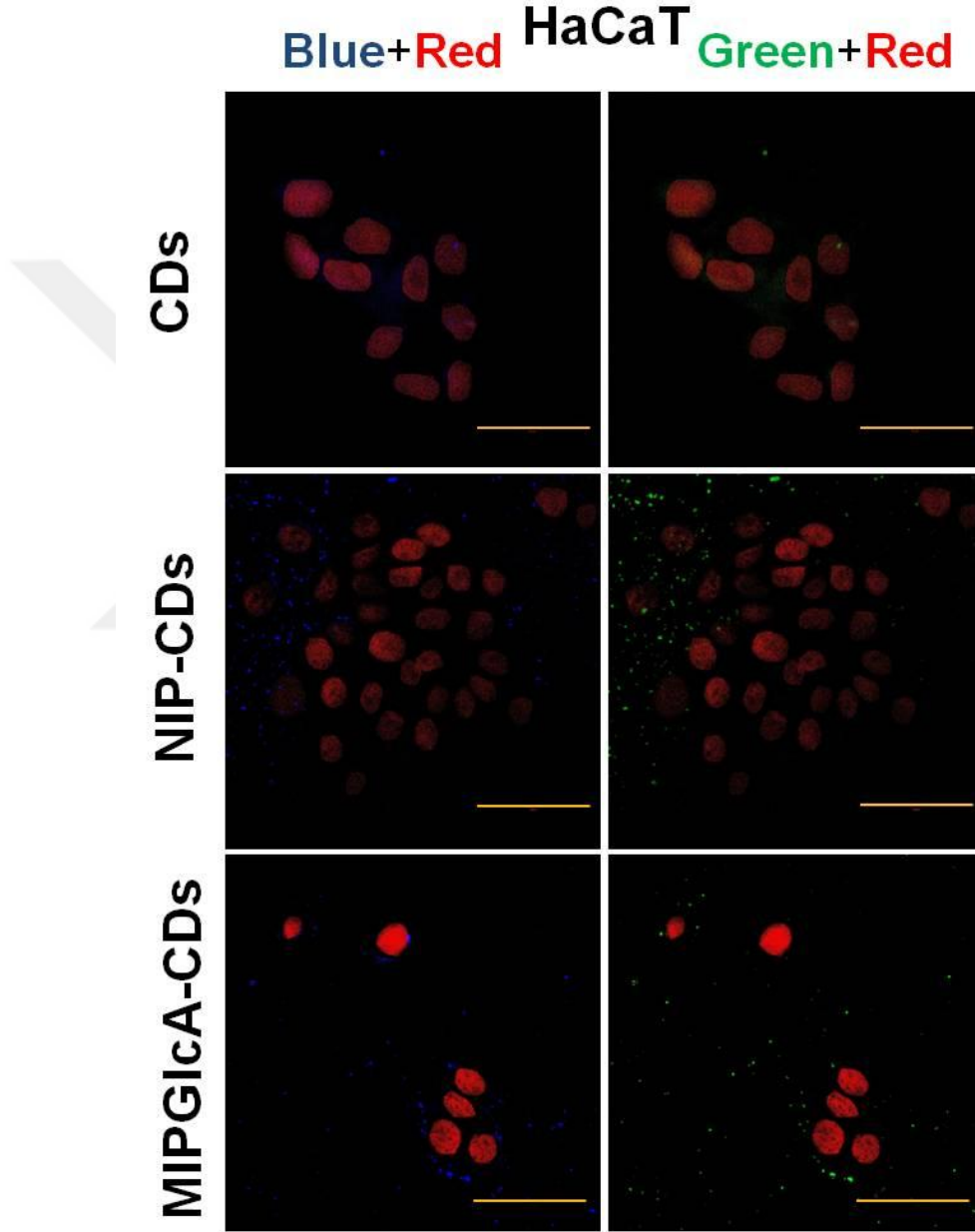
Şekil 3. 24 MIPGlcA-CD, NIP-CD ve CD lerin (A) HaCaT ve (B) HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi. Hata barları $\pm$ S.S. yi vermektedir (n=5).

Literatürdeki birçok veriye göre CD lerin kuantum noktalar gibi düşük konsantrasyonlarda toksik olmadığı bilinmekle birlikte, 1,0 mg/mL ye kadar hücre canlılığını düşürmedikleri kanıtlanmıştır. Çevre dostu ve nontoksik olan CD ler kullanılarak sentezlenen MIPGlcA-CD ve NIP-CD lerin ise dış pozitif yükü dolasıyla artan dozlarda hücre canlılığını azaltıcı yönde etkidikleri göze çarpmaktadır. HaCaT için 100 µg/mL, HeLa için ise 250 µg/mL sonrasında dramatik bir toksisite gözlenmiştir (Şekil 3.24). Son olarak yapılan floresans hücre görüntüleme çalışması ile de multipleks özellikli CD lerin hücre membranının glikozilasyonu ile sağlanan hedefleme stratejisi sayesinde biyo-görüntüleme uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

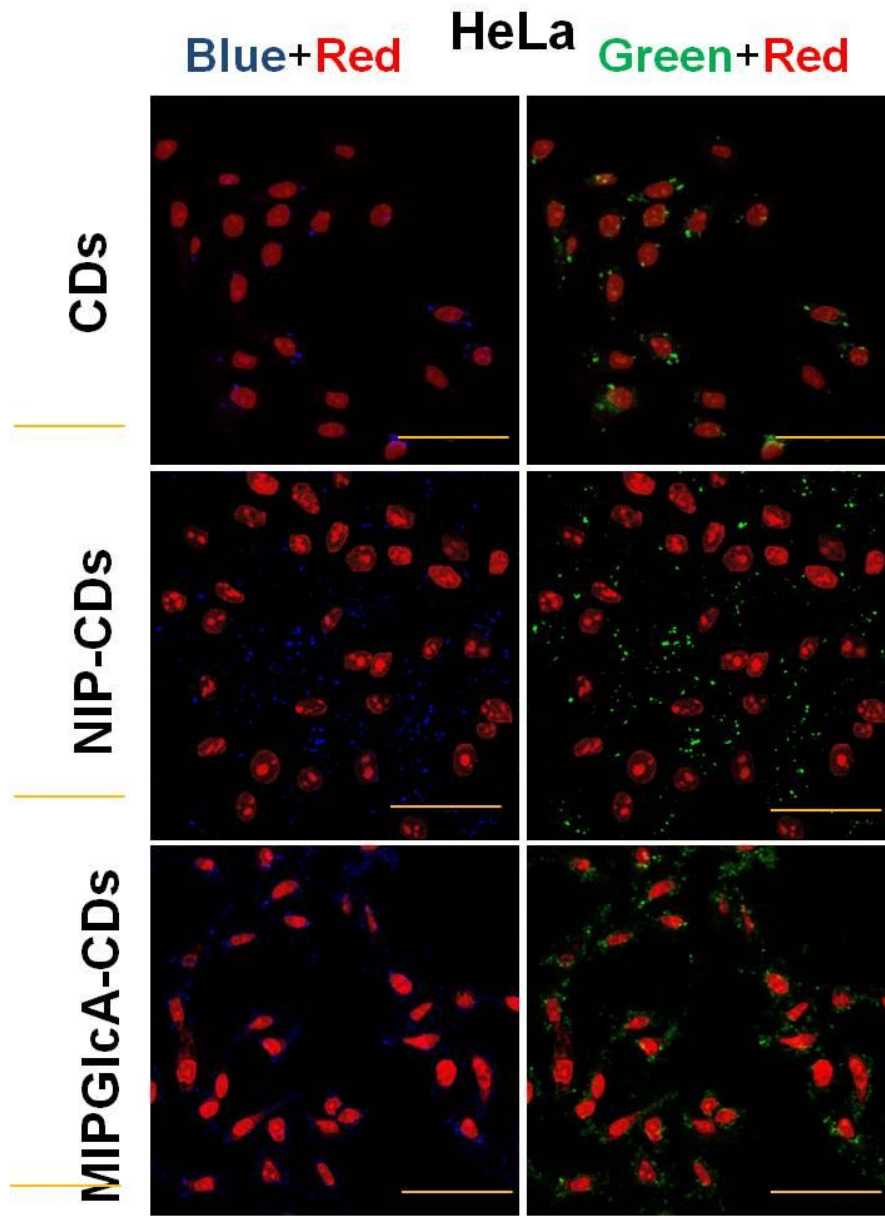
Standart bir immüno-boyama protokolü, keratinositler ve HeLa hücreleri üzerinde HA'nın tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için hücre görüntüleme için floresans MIP'lerin uygulanmasına yönelik uyarlanmıştır. İlk olarak, hücreler, düşük arka plan floresansı olan PFA ile fiksasyonu yapılmıştır. Fiksasyonu durdurmak ve seçimli olmayan bağlanmayı azaltmak için glisin ile bir bloklama basamağı yapılır. Son olarak, hücreler MIP ve kontrol NIP nanokompozitleri ve modifiye olmamış CD'ler ile fikse edildikten sonra (genellikle immünoassaylerde yapılır) inkübe edilir. Parçacıkların dağılımı ve lokalizasyonu, konfokal floresan spektroskopisi ile analiz edilmiştir (Şekil 3.25). Fiksasyon muamelesinin sadece pasif dağılım yapabileceği bilinmektedir. Nanopartikül hidrofobik görünecek şekilde, nanoparçacık üzerindeki ligand tabakası membrana uyum sağlayarak, yüzey yüklerinin yeniden düzenlenmesine izin verirse, şans eseri, membrandaki gözenek oluşumundan kaçınılabılır. Modifiye olmamış CD'ler, Şekil 3.25'da gösterildiği gibi hücre zarı içinden geçer. Daha önce belirtildiği gibi, hücre üzerinde HA kalıntılarına yönelik yüzey modifikasyonu ve hedefleme stratejileri, CD-MIPGlcA parçacıkları üzerindeki GlcA boşluklarının varlığına bağlı afinite temelli bir psödoimmüno-işaretlemeye dayalıdır. Şekil 3.25'e göre, bu durum HeLa hücrelerinde güzel bir şekilde ortaya çıkmıştır.

Daha sonra, CD-MIPGlcA için spesifiklik farkı çift renkli görüntüleme ile konfokal görüntülerden başarıyla desteklenmiştir. (Şekil 3.26A). Dahası, MIPGlcA-CD'lerin NIP-CD'lere kıyasla bağlanması ve iki hücre çizgisi arasındaki bağlanma farkı Şekil 3.26A'da gösterilmiştir. Image J yazılımı ile her bir hücrenin etrafında (kalan arka planları içermeksizin) bir görüntü analizi ile elde edilen bu sonuçlar, 5 farklı görüntüden ortalama 20 hücreye uygulandıktan sonra renk yoğunlukları normalleştirilmiş veriler halinde elde edilmiş ve tek yönlü ANOVA (Tukey'nin test sonrası çoklu karşılaştırma ile) testi uygulanmıştır. HeLa hücrelerindeki görüntülerle yapılan analiz sonuçları CD-NIP'lere karşı % 85'lik bir yüzdeyle gelişmiş CD-MIPGlcA'ya olan bağlanma afinitesini istatistiksel olarak ($p < 0,001$) ayırt eder. Benzer şekilde, CD-MIPGlcA ile muamele edilmiş HaCaT'lere karşı, CD-MIPGlcA ile muamele edilmiş HeLa hücrelerine göre % 70'lik nispi bir yüzdesel ($p < 0,001$) bir fark daha vardır. Dahası, bu analiz yöntemi, sentezlenmiş nanokompozitlerin çift renk özellikleriyle bu çalışmanın bir başka uygunluğunu ortaya koymuştur. Kendilerini mavi olarak gösteren UV ışığıyla aydınlatılmış parçacıklar, insan üzerindeki gerçek görüntüleme uygulamaları sırasında bir dereceye kadar ciddi zararlı etkiler yaratabilir, böylece hücre canlılığı kaybı olmaksızın daha güvenli bir alanda (UV-NIR arasında) ikinci renk etkinliğini ortaya koyabilmektedir.

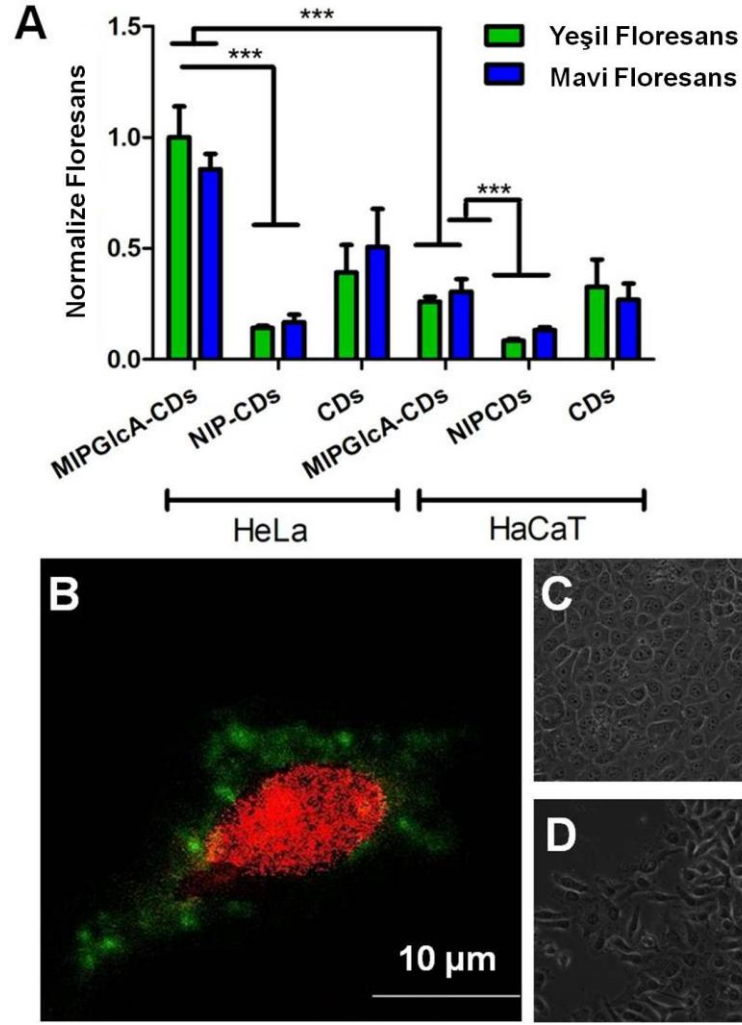
Glikoz, galaktoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin ve N-asetilnöraminasit (sialik asit) gibi hücre yüzeyi üzerindeki şeker moleküllerine yönelik daha önceki seçicilik bağlanma deneyleri, MIPGlcA'nın GlcA'ya karşı çok seçici olduğunu göstermiştir. Bu, hücrelerdeki MIPGlcA'nın yeşil veya mavi noktalarının büyük olasılıkla GlcA'yı hedeflediği anlamına gelmektedir.



Şekil 3. 25 HaCaT hücrelerinin 100 ug/mL CD, MIPGlcA-CD ve NIP-CD ler ile muamelesi sonucu elde edilen konfokal mikroskopi görüntüleri. Görüntülerin skalası 50 µm dur.



Şekil 3. 26 HeLa hücrelerinin 100 ug/mL CD, MIPGlcA-CD ve NIP-CD ler ile muamelesi sonucu elde edilen konfokal mikroskopi görüntüleri. Görüntülerin skalası 50 μm dur.

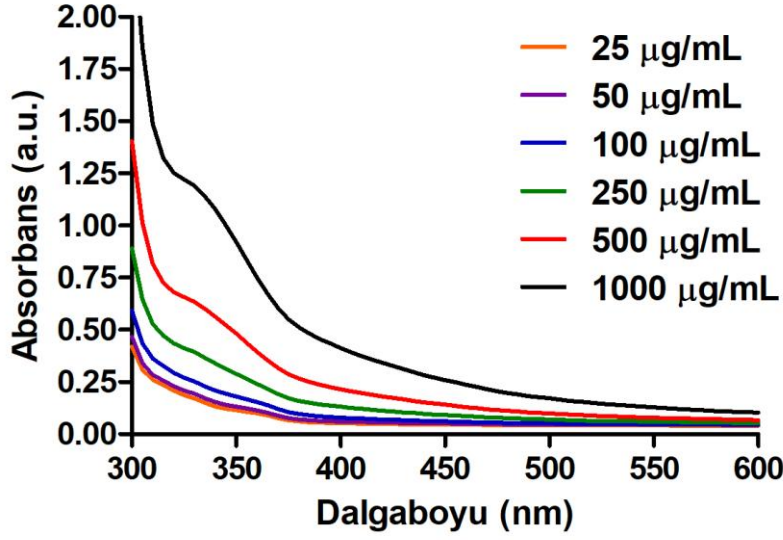


Şekil 3. 27 (A) Çifte floresans rengine sahip MIPGlcA-CD ve NIP-CD uygulanmış hücrelerin Image J ile analizi (Hata barları S.S. yi göstermektedir (n=10)). (B) MIPGlcA-CD (yeşil floresans) ile işaretlenmiş bir fikse edilen HeLa hücresinin konfokal görüntüsü. Nükleus boyaması PI ile yapılmıştır. (C ve D) Fikse edilmiş HaCaT ve HeLa hücrelerinin görüntülemeye kullanıldığı yüzeylerde kültive edildiği haldeki faz-kontast görüntüleri.

3.4 Bölüm-4: "Teranostik Olarak Geliştirilmiş Multimodal Lipozomlar: Aktif Hedefli Kemo/Radyoterapötik Ajanlar"

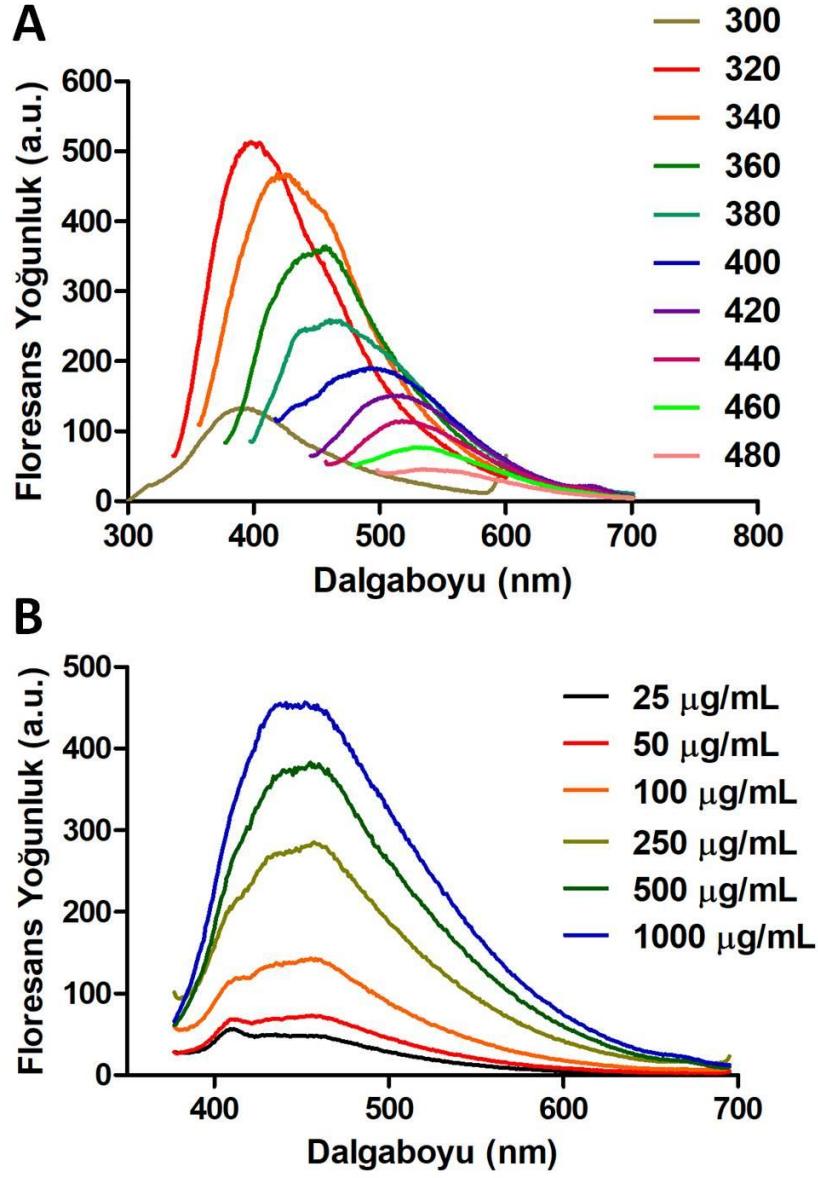
3.4.1 Sentezlenen CD lerin karakterizasyonu

Materyal ve metot bölümünde de belirtildiği gibi tezin son bölümünde kullanılan CD'ler Atatürk Üniversitesi'nden Ayşe Merve Şenol tarafından sentezlenmiş ve sonraki fizikokimyasal ve spektroskopik karakterizasyon aşamalarına geçilmiştir.



Şekil 3. 28 CD lerin farklı konsantrasyonlardaki sulu süspansiyonlarının UV/Vis bölgede dalgaboyu taramaları.

Hidrotermal tekniklerle doğal kaynaklardan hazırlanan CD lerin yüzey yapısında farklanmalar oluşturabilmek için ham haldeki CD ler etanolle uzun süre sonikasyonu sonrası evaporatörde katı hale getirilerek yüzeyinin hidrofilik karakterini artırmak istenmiştir. Şekil 3.28 deki CD lerin absorpsiyon spektrası görülmektedir. Artan konsantrasyon ile birlikte 325 nm civarında CD lere ilişkin bir absorpsiyon piki ortaya çıkmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalardan yola çıkarak CD lerde karakteristik olan bu pikin yapısında barındırdığı C=O gruplarının varlığından dolayı olduğu söylenebilir (Aslandaş et al., 2015). Elde edilen bu spektra ise literatürde sentezlenmiş birçok CD yapısıyla benzerlik göstermesi sentezin başarılı olduğunun kanıtlarından biri olarak gösterilebilir.



Şekil 3. 29 (A) 250 µg/mL CD lerin emisyon spektası. Eksitasyon dalgaboyu 20 nm aralıklarla 300-480 arası değişmektedir. (B) 360 nm eksitasyon dalgaboyunda artan konsantrasyonlardaki CD floresans emisyon spektrumları.

Bir önceki bölümdeki çalışma kapsamında sentezlenen N doplanmış CD lerde olduğu gibi burada da artan dalgaboylarındaki uyarılmalar ile emisyon dalgaboyunun da arttığı gözlemlenmiştir. 300-500 nm arası eksitasyonlar ile emisyon piklerinin de 390-550 nm arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 3.29).

3.4.2 Teranostik lipozomların karakterizasyonu

Teranostik kapsamda optik görüntüleme ile partiküllerin lokalizasyonunu gösterecek olan fotolüminesans özellikli CD lerin spektroskopik karakterini belirledikten sonra, bu partiküller lipozomlarda kurkumin aktif maddesiyle enkapsüle edilerek terapi ve diyagnoz anlamında geliştirilmiştir. Çalışmanın hedefi son ürün olarak F4 olarak kodlandırılan kurkumin ve CD yapılarını içeren ve anti-CD44 ile dış yüzeyi CD44 reseptörlerine hedeflendirilmiş veziküler sistemlerdir. Ancak hem karakterizasyon için hem de hücre kültürü çalışmalarında kontrol olarak kullanmak için sadece kurkumin enkapsüle lipozomlar (F1) ve kurkumin ve CD lerin birlikte enkapsüle olduğu F2 formülasyonu da hazırlanmıştır. Önceki deneylerde de yapıldığı üzere, ilk olarak veziküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ilgili fikir edinebilmek için DLS tekniği ile partikül boyutu ve yüzey yükleri incelenmiştir. Bununla ilgili sonular Çizelge 3.3 teki gibidir.

Çizelge 3. 3 Farklı lipozom formülasyonlarının boyutu, çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel sonuçları. S.S. standart sapmayı göstermektedir (n=3).

Örnek	Partikül Boyutu±S.S. (nm)	PDI	Zeta Potansiyel±S.S. (mV)
CD	7,2± 2,4	0,264	-9,0±2
F1	76± 23	0,3	-29± 2
F2	70± 25,8	0,548	-26,7± 5,32
F3	81,12± 16,43	0,728	-18± 4,24

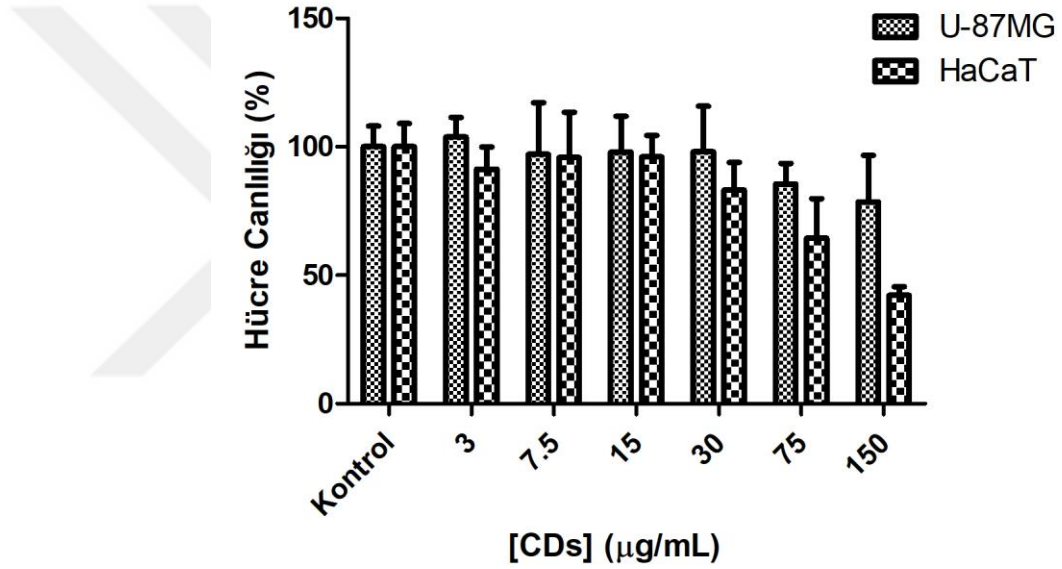
Çizelge 3.3 te görüldüğü üzere CD ler kuantum noktalara benzer özellikte olmaları ile bilinmekte ve bu benzerlik spektral ve hatta boyutsal özelliklerini de kapsamaktadır. Daha önceki çalışmada kullanılan CD ler gibi buradaki CD ler de 10 nm den küçük hidrodinamik çapa sahiptirler. Bu da bilindiği gibi hücrelere kolay nüfuz edebilmesi açısından önemli bir parametredir. Lipozom formülasyonlarının fizikokimyasal parametrelerine bakıldığında kullanılan ekstrüzyon tekniği sonucunda partikül boyutlarının 80 nm civarı olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapıya eklenen her bir modifikasyon sonrası yüzey

yükündeki düşüş son ürün ola teranostik lipozomların başarılı bir şekilde sentezlendiğine ilişkin fikir vermektedir.

3.4.3 Hücre kültürü çalışmaları

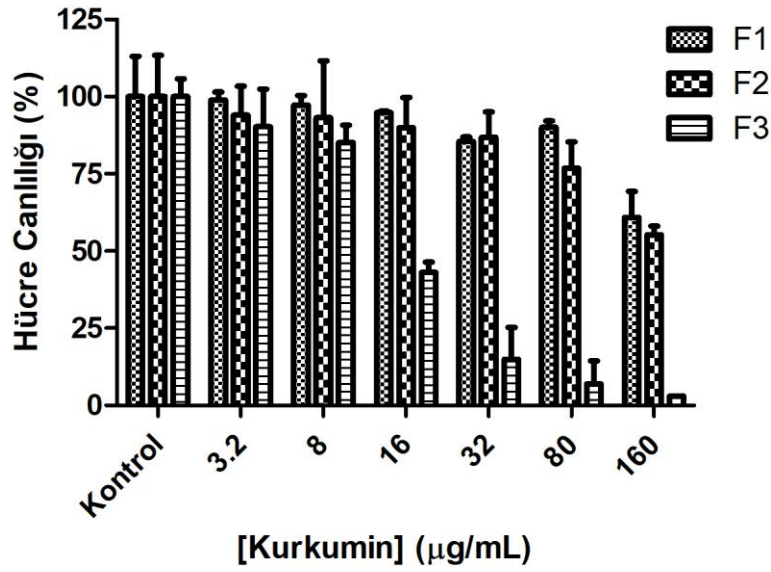
3.4.3.1 Teranostik lipozomların hücre canlılığına etkisi

İlk denemeler sentezlenen CD lerin hücre canlılığı üzerine olan etkisini incelemek olmuştur. Şekil 3.30 da görüldüğü üzere U-87MG ler için 150 $\mu\text{g/mL}$ ye kadar hücre canlılığı değişmezken HaCaT için daha toksik gelmişlerdir.

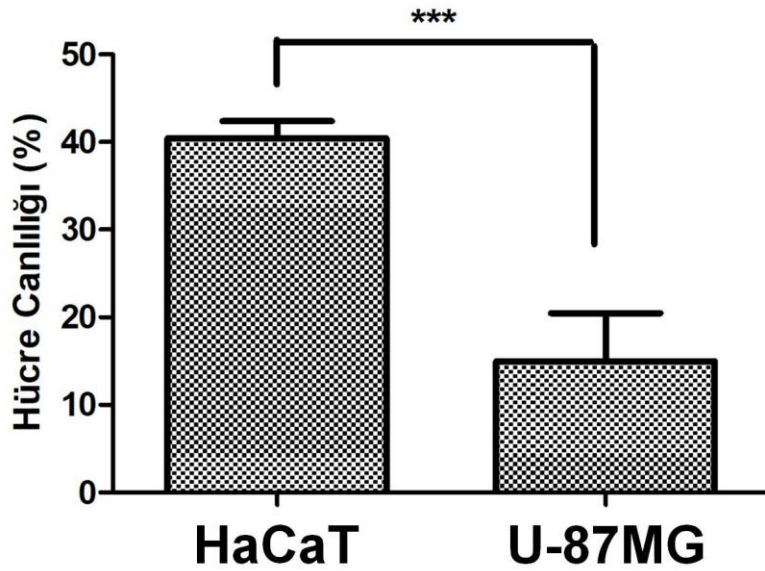


Şekil 3. 30 Serbest CD lerin U-87MG ve HaCaT hücreleri üzerindeki (24 saat uygulandıktan sonraki) etkisi. Hata barları S.S. yı göstermektedir (n=4).

U-87MG ye yönelik hazırlanan lipozomal formülasyonların gliomalar üzerindeki sitotoksik etkileri Şekil 3.31 deki gibidir. Buna göre teranostik özellikli tasarlanan F3 formülasyonu büyük bir farkla hücrelerdeki metabolik aktiviteyi tamamen giderdiği gözlenmiştir. Ayrıca F3 formülasyonuna ait IC50 değeri hesaplanmış ve 0,4 μM kurkumin (15,6 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyonunun etkin olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca şekil 4.xx te 32 $\mu\text{g/mL}$ kurkumin konsantrasyonu için HaCaT hücreleriyle karşılaştırma yapılmış ve U-87MG ler için daha etkin olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 3. 31 Lipozom formülasyonları olan F1, F2 ve F3 ün U-87MG hücreleri üzerindeki (24 saat uygulandıktan sonraki) etkisi. Hata barları S.S. yı göstermektedir (n=4). Kurkumin ortak enkapsülant materyal olduğu için, hesaplamalar onun üzerinden yapılmıştır.

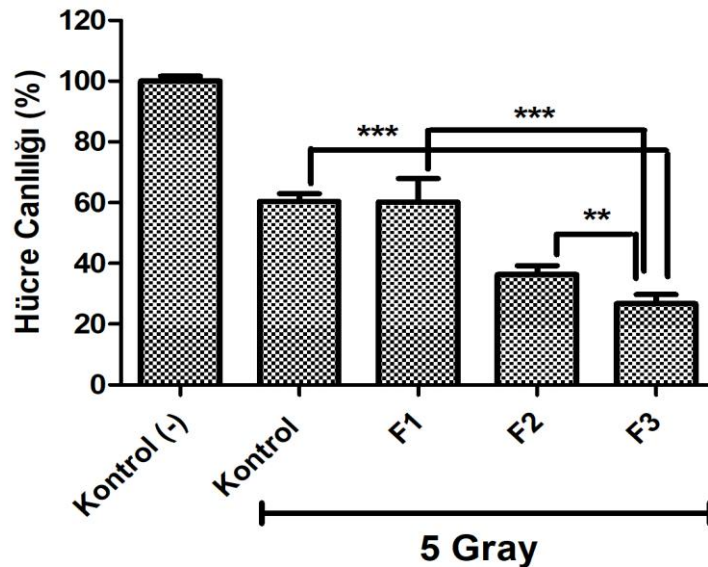


Şekil 3. 32 Anti-CD44 ile hedeflenen Kurkumin/CD lipozomlarının (F3) 32 µg/mL kurkumin içeren konsatrasyonunun sağlıklı HaCaT ve U-87MG gliomaları üzerindeki sitotoksik etkisi. Hata barları S.S. yı göstermektedir (n=4).

3.4.3.2 Teranostik lipozomların radyoterapötik aktivitesi

Giriş kısmında bahsedilen radyosensitizer etki gösteren materyallerden biri de doğal kaynaklı terapötik ajanlardan olan kurkumindir. Ancak kurkuminin yanında karbon temelli yapılarında radyoterapötik aktivite potansiyeli olduğu daha önceden tartışılmıştır. Literatürde aslında çokça yeni olan karbon materyallerin radyasyon aktiviteleri üzerine yeterli sayıda çalışma olmaması buradan elde edilecek sonuçlar için heyecan verici olmaktadır. Genellikle bu kısımdaki birkaç çalışma karbonnanotüp (CNT) lerin radyasyona tümör içinde maruz bırakılması sonrası ortaya çıkardığı terapötik etkileri konu edinmiştir (Yang et al., 2007; Zhang et al., 2014). Bunun yanı sıra CD ler için ise yakın tarihte yayınlanan bir çalışma CD lerin Gd için taşıyıcı etkisi gösterdiği ve Gd sayesinde radyoterapötik olarak kullanılabilirliği incelenmiştir (Du et al., 2017).

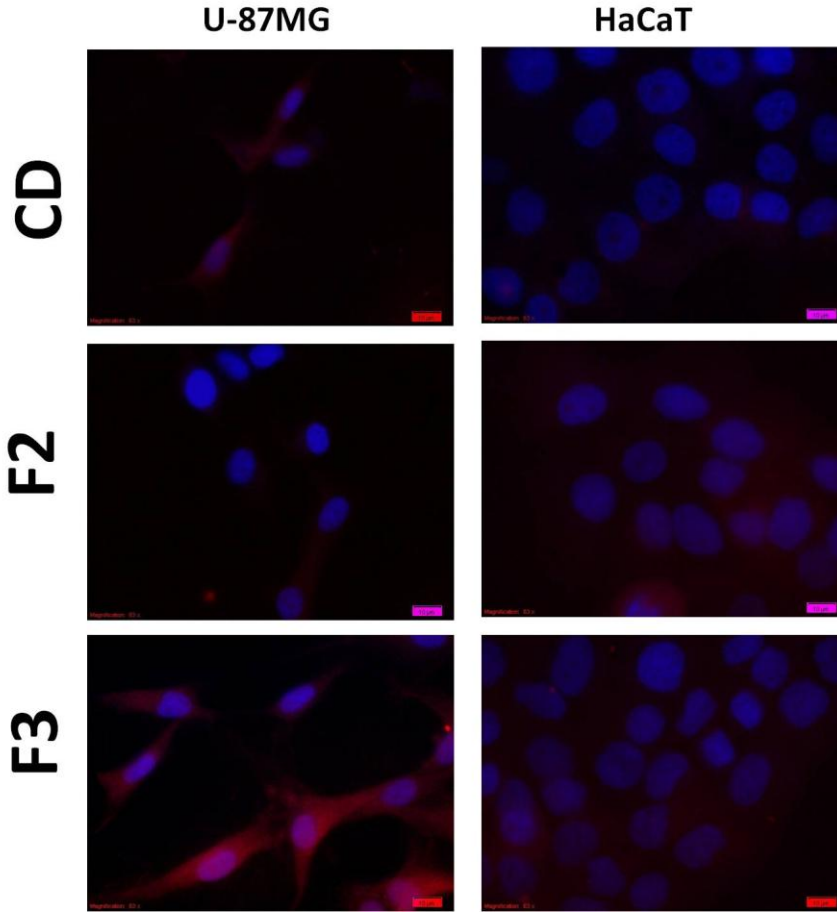
Şekil 3.33 te de yer aldığı gibi burada sadece kurkumin içerikli F1, CD ve kurkumin içeren F2 ve F2 nin anti-CD44 ile hedefli versiyonu olan F3 formülasyonlarının radyosensitiviteleri U-87MG hücreleri ile karşılaştırılmıştır. 5 gray dozundaki radyasyon ile muamele sonrası kontrole ve F1 formülasyonuna göre CD içeren F2 ve F3 daha etkin toksisite göstermiştir. Lipozom çevresinin antikor kaplı olması ile de en düşük hücre canlılığı belirgin bir şekilde en düşük değerini almıştır. MTT testi ile 24 saat lik kemoterapötik aktivitesi değerlendirilen F3 formülasyonunun radyoterapötik etkisi ile multimodal bir teranostik ajanın geliştirildiği söylenebilir ve pre-klinik araştırmalarda kullanılmak üzere uygun bir aday olabilir.



Şekil 3. 33 Geliştirilen lipozomal formülasyonların U-87MG hücreleri ile 5,0 Gray dozunda radyokaktif ışınlar maruz bırakılması sonrası gösterdiği radyoterapi sonuçları. Hata barları S.S. yi göstermektedir (n=6). Kontrol (-), örnek ve radyasyon uygulanmamış, kontrol ise örnek uygulanmamış ancak 5,0 Gray radyasyon uygulanmış hücreleri ifade etmektedir.

3.4.3.3 Hücre görüntüleme

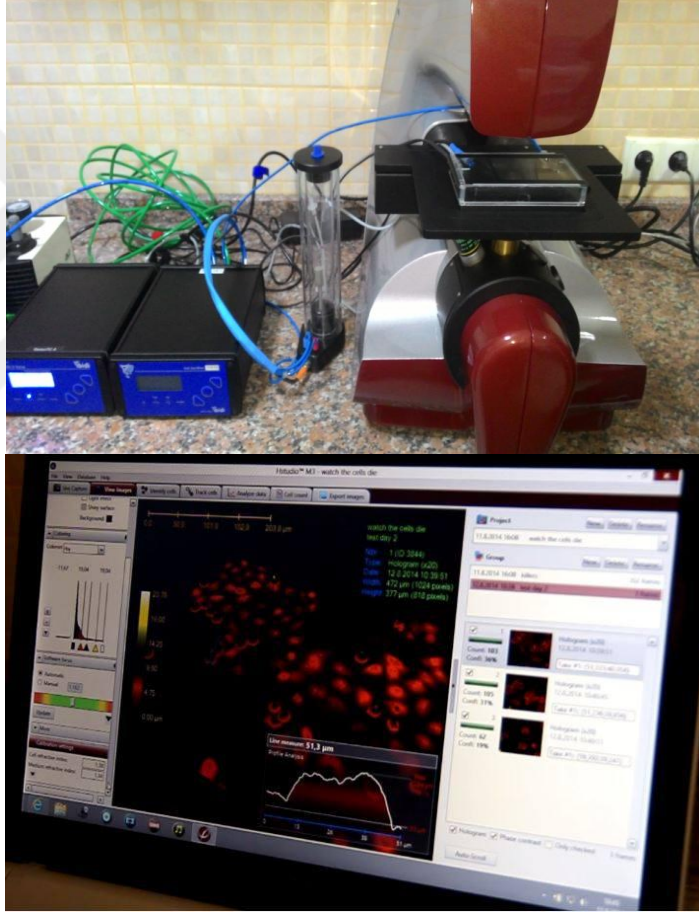
CD lerin intrinsik floresans özellikleri kullanılarak CD içerikli yapıların ve serbest CD nin hücre alım profili floresans mikroskopisi ile iki hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. Hedefli lipozomal formülasyon olan F3 den beklenildiği üzere en iyi hücre alımını U-87MG hücreleri ile sergilemektedir.



Şekil 3. 34 Serbest CD ler, F2 ve F3 formülasyonlarının U-87MG ve HaCaT hücrelerindeki lokalizasyonları gösteren floresans görüntüleri. Görüntü skalası 10 µm dir.

3.4.3.4 Teranostik lipozomların mikro-çipler altında 3D holografik mikroskop ile çalışmaları

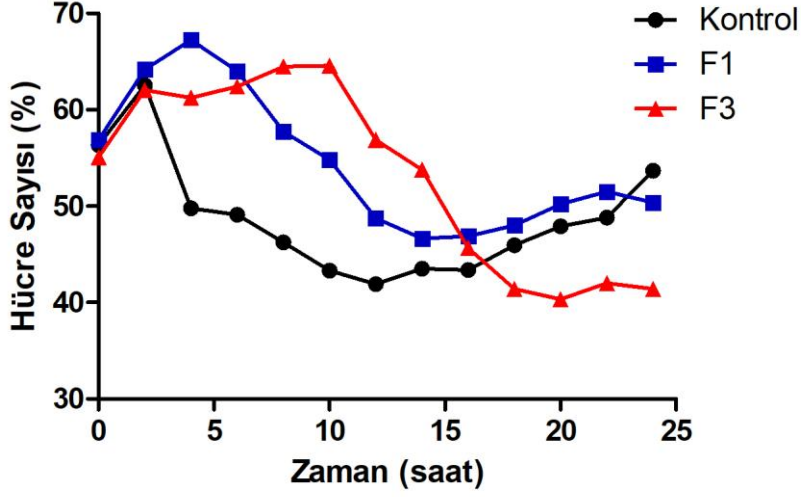
Gelişen hücre analiz sistemleri ile birlikte farklı yaklaşımlar ve daha az madde ile daha etkin araştırma ve test olanakları günümüzde yaygınlaşmaya başlamaktadır. Bunlardan biri olan ve hatta ikinci akış sitometrisi olarak görülen 3D holografik mikroskop sistemleri ile kamera altında hücresel aktivitelerin rahatlıkla izlenebileceği ve buna ilişkin hücresel morfolojik parametrelerin ortaya konulması sağlanmıştır. Çalışmanın son aşaması olarak, klasik hücre kültürü teknikleri ile elde edilen toksisite ve hücre alımı sonuçlarını mikroçiplerde denemek için şekildeki düzenek kurulmuştur (Şekil 3.35).



Şekil 3. 35 CO₂ inkübatöründen bağımsız çalışan 3D holografik mikroskop sistemi.

Şekil 3.36 sadece kurkumin enkapsüle (F1) ve son teranostik yapı (F4) olan lipozomların zamana karşı hücre sayısındaki değişimini kontrole karşı ortaya koymaktadır. Bu çalışmadaki temel terapötik aktivitenin kurkuminden geldiği için CD içeren F2 örneğine gerek duyulmamıştır. Ayrıca bu iki örnek arasındaki fark daha temel ve anlaşılır sonuçlar vermesi düşünülmüştür. Mikroskop altındaki

mikrokanallarda hücreler ekildikten sonra, örnek uygulanmayan kontrol grubu ve F1 ve F3 formülasyonlarının uygulandığı test grupları oluşturuldu. 16. saatten sonraki farklanmalara bakıldığında son teranostik lipozomal formülasyon olan F3 ün 24 saat sonunda hücre sayısını düşürdüğü gözlenmiştir.



Şekil 3. 36 Aynı oranda kurkumin içeren F1 ve F3 örneklerinin mikroçip düzeneğinde 3D holografik mikroskop analizleri sonucu elde edilen 24 saatlik hücre sayısı (%) değişim grafiği.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Tez kapsamında sentezlenecek olan teranostik nanoparçacıklar için ilk aşamada fonksiyonel polimer kaplı AuNP ler pH-sensitive ilaç salımı yapabilecek şekilde sentezlendi. Karakterizasyon ve ilaç salım profili sonuçları model kemoterapötik ilaç olarak kullanılan DOX pH-sensitive özellik taşıyan hidrazon bağı sayesinde istenilen özellikleri taşıdığı doğrulandı. HeLa hücreleri ile yapılan toksisite, radyoaktivite ve hücre görüntüleme çalışmaları, sentezlenen AuNP-PMAA-Cys-DOX konjugatının potansiyel bir teranostik ajan olabileceğini göstermiştir. Çalışmaların devamı olan ikinci aşamada ise multipleks özelliğe sahip olabilecek şekilde protoporfirin IX (PPIX) ve AuNP lerin folik asit ile HeLa hücrelerine hedeflendirilmesi doğrultusunda niozom vezikülleri iinde enkapsülasyonu yapıldı. Karakterizasyon ve enkapsülasyon verimi sonuçları model fotodinamik terapi ajanı olan PPIX nin yapıda yer aldığı doğrulandı. HeLa ve A549 hücreleri ile yapılan toksisite, radyoaktivite/fotodinamik terapi ve hücre görüntüleme çalışmaları, sentezlenen PPIX-AuNP-FA niozomlarının potansiyel bir teranostik ajan olabileceğini göstermiştir. Tez kapsamında kanser hücrelerine hedefli MIPGlcA-CD partikülleri yeni bir strateji ile sentezlenerek multipleks bir görüntüleme ajanı geliştirilmiştir. Karakterizasyon ve bağlanma verimi sonuçları geliştirilen MIP-CD çekirdek-kabuk yapısının oluşturulduğunu ve D-GlcA ya affinitesi olduğu yapılan kontrol denemeleriyle kanıtlandı. HeLa ve HaCaT hücreleri ile yapılan toksisite ve hücre görüntüleme çalışmaları, sentezlenen MIPGlcA-CD partiküllerinin potansiyel bir diyagnostik ajan olabileceğini göstermiştir.

Tez boyunca polimer kaplı metalik nanopartiküller, karbon temelli yapılar ve veziküler sistemlerin farklı hedefleme stratejileriyle donatılarak testlerinin yapılmasından sonraki aşamada son olarak antikör ile işaretlenerek kanser hücrelerine yönlendirilen teranostik lipozomların sentezi ve biyolojik uygulamaları ele alınmıştır. Terapötik olarak kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılan kurkumin ile floresans özellikli CD lerin birlikte enkapsülasyonu sayesinde deneylerde kullanılan nörogloma (U-87MG) hücrelerine olan toksisitesi diğer kurkumin preparatlarına oranla yüksek derecede etki gösterdiği MTT ve görüntüleme çalışmalarıyla kanıtlanmıştır. 3D holografik mikroskobu ile yapılan ek denemelerde hücresel araştırmalarda yeni bir soluk olan mikroçip sistemleri kullanılmış ve etkin sonuçlar alınmıştır. Sonuç olarak, sentezlenen anti-CD44 işaretli kurkumin/CD enkapsüle lipozomların gelecekte de kanser araştırmalarında potansiyeli yüksek bir aday olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., and McNeil, S. E.**, 2009, Nanoparticle Interaction With Plasma Proteins As It Relates To Particle Biodistribution, Biocompatibility And Therapeutic Efficacy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61:428-437pp.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., and Nejati-Koshki, K.**, 2013, Liposome: Classification, Preparation, And Applications., *Nanoscale Research Letters*, 8:102pp.
- Akbulut, H., Guler, B., Timur, S., and Yagci, Y.**, 2015, Synthesis, Characterization And Targeted Cell Imaging Applications Of Poly(p-phenylene)s With Amino And Poly(ethylene Glycol) Substituents, *RSC Advances*, 5:60861–60869pp.
- Al-Jamal, W. A. T., Al-Jamal, K. T., Tian, B., Cakebread, A., Halket, J. M., and Kostarelos, K.**, 2009, Tumor Targeting Of Functionalized Quantum Dot Liposome Hybrids By Intravenous Administration, *Molecular Pharmaceutics*, 6:520–530pp.
- Al-Jamal, W. T., Al-Jamal, K. T., Bomans, P. H., Frederik, P. M., and Kostarelos, K.**, 2008, Functionalized-quantum-dot-liposome Hybrids As Multimodal Nanopartides For Cancer, *Small*, 4:1406–1415pp.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., and Farokhzad, O. C.**, 2008, Factors Affecting The Clearance And Biodistribution Of Polymeric Nanoparticles, In *Molecular Pharmaceutics*, 5:505–515pp.
- Almer, G., Frascione, D., Pali-Schöll, I., Vonach, C., Lukschal, A., Stremnitzer, C., Diesner, S. C., Jensen-Jarolim, E., Prassl, R., and Mangge, H.**, 2013, Interleukin-10: An Anti-inflammatory Marker To Target Atherosclerotic Lesions via PEGylated Liposomes, *Molecular Pharmaceutics*, 10:175–186pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aslandaş, A. M., Balci, N., Arik, M., Şakiroğlu, H., Onganer, Y., and Meral, K.,** 2015, Liquid Nitrogen-assisted Synthesis Of Fluorescent Carbon Dots From Blueberry And Their Performance In Fe³⁺ Detection, *Applied Surface Science*, 356:747–752pp.
- Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P. W., Langery, R., and Farokhzad, O. C.,** 2007a, Quantum Dot-aptamer Conjugates For Synchronous Cancer Imaging, Therapy, And Sensing Of Drug Delivery Based On Bi-fluorescence Resonance Energy Transfer, *Nano Letters*, 7:3065–3070pp.
- Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P. W., Langery, R., and Farokhzad, O. C.,** 2007b, Quantum Dot-aptamer Conjugates For Synchronous Cancer Imaging, Therapy, And Sensing Of Drug Delivery Based On Bi-fluorescence Resonance Energy Transfer, *Nano Letters*, 7:3065–3070pp.
- Baker, S. N., and Baker, G. A.,** 2010, Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights, *Angewandte Chemie - International Edition*, 49:6726-6744pp.
- Bangham, a. D., De Gier, J., and Greville, G. D.,** 1967, Osmotic Properties And Water Permeability Of Phospholipid Liquid Crystals, *Chemistry and Physics of Lipids*, 1:225–246pp.
- Bao, G., Mitragotri, S., and Tong, S.,** 2013, Multifunctional Nanoparticles For Drug Delivery And Molecular Imaging., *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15:253–282pp.
- Barlas, F. B., Demir, B., Guler, E., Senisik, A. M., Arican, H. A., Unak, P., and Timur, S.,** 2016, Multimodal Theranostic Assemblies: Double Encapsulation Of Protoporphyrine-IX/Gd³⁺ In Niosomes, *RSC Advances*, 6:30217–30225pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barry, J., Fritz, M., Brender, J. R., Smith, P. E. S., Lee, D. K., and Ramamoorthy, A.**, 2009, Determining The Effects Of Lipophilic Drugs On Membrane Structure By Solid-state NMR Spectroscopy: The Case Of The Antioxidant Curcumin, *Journal of the American Chemical Society*, 131:4490–4498pp.
- Bilmen, J. G., Khan, S. Z., Javed, M. U. H., and Michelangeli, F.**, 2001, Inhibition Of The SERCA Ca²⁺ Pumps By Curcumin: Curcumin Putatively Stabilizes The Interaction Between The Nucleotide-binding And Phosphorylation Domains In The Absence Of ATP, *European Journal of Biochemistry*, 268:6318–6327pp.
- Bompart, M., and Haupt, K.**, 2009, Molecularly Imprinted Polymers And Controlled/living Radical Polymerization, *Australian Journal of Chemistry*, 62:751–761pp.
- Bonner, J. A., and Lawrence, T. S.**, 1990, Doxorubicin Decreases The Repair Of Radiation-induced DNA Damage., *International Journal of Radiation Biology*, 57:55–64pp.
- Breger, J. C., Sapsford, K. E., Ganek, J., Susumu, K., Stewart, M. H., and Medintz, I. L.**, 2014, Detecting Kallikrein Proteolytic Activity With Peptide-quantum Dot Nanosensors, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6:11529–11535pp.
- Bruchez Jr., M.**, 1998, Semiconductor Nanocrystals As Fluorescent Biological Labels, *Science*, 281:2013–2016pp.
- Bwatanglang, I. birma, Mohammad, F., Yusof, N. A., Abdullah, J., Hussein, M. Z., Alitheen, N. B., and Abu, N.**, 2016, Folic Acid Targeted Mn:ZnS Quantum Dots For Theranostic Applications Of Cancer Cell Imaging And Therapy, *International Journal of Nanomedicine*, 11:413–428pp.
- Cai, W., and Chen, X.**, 2008, Preparation Of Peptide-conjugated Quantum Dots For Tumor Vasculature-targeted Imaging., *Nature Protocols*, 3:89–96pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cambi, A., Lidke, D. S., Arndt-Jovin, D. J., Figdor, C. G., and Jovin, T. M.,** 2007, Ligand-conjugated Quantum Dots Monitor Antigen Uptake And Processing By Dendritic Cells, *Nano Letters*, 7:970–977pp.
- Carter, K. A., Wang, S., Geng, J., Luo, D., Shao, S., and Lovell, J. F.,** 2016, Metal Chelation Modulates Phototherapeutic Properties Of Mitoxantrone-Loaded Porphyrin-Phospholipid Liposomes, *Molecular Pharmaceutics*, 13:420–427pp.
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., and Moreira, P. I.,** 2009, Doxorubicin: The Good, The Bad And The Ugly Effect, *Curr Med Chem*, 16:3267–3285pp.
- Cha, C., Shin, S. R., Annabi, N., Dokmeci, M. R., and Khademhosseini, A.,** 2013, Carbon-based Nanomaterials: Multifunctional Materials For Biomedical Engineering, *ACS Nano*, 7:2891-2897pp.
- Champion, J. A., Katare, Y. K., and Mitragotri, S.,** 2007a, Making Polymeric Micro- And Nanoparticles Of Complex Shapes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:11901–11904pp.
- Champion, J. A., Katare, Y. K., and Mitragotri, S.,** 2007b, Particle Shape: A New Design Parameter For Micro- And Nanoscale Drug Delivery Carriers, *Journal of Controlled Release*, 121:3–9pp.
- Chan, W. C.,** 1998, Quantum Dot Bioconjugates For Ultrasensitive Nonisotopic Detection, *Science*, 281:2016–2018pp.
- Chang, J. W., Park, K. H., Hwang, H. S., Shin, Y. S., Oh, Y. T., and Kim, C. H.,** 2014, Protective Effects Of Korean Red Ginseng Against Radiation-induced Apoptosis In Human HaCaT Keratinocytes, *Journal of Radiation Research*, 55:245–256pp.
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., & Karliner, J. S.,** 2010, Doxorubicin Cardiomyopathy, *Cardiology*, 115:155-162.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, R. J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis, K. A., Kam, N. W. S., Shim, M., Li, Y., Kim, W., Utz, P. J., and Dai, H.,** 2003, Noncovalent Functionalization Of Carbon Nanotubes For Highly Specific Electronic Biosensors., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:4984–4989pp.
- Chen, Y., and Liang, H.,** 2014, Applications Of Quantum Dots With Upconverting Luminescence In Bioimaging, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 135:23-32pp.
- Chen, Y., Wu, Y., Weng, B., Wang, B., and Li, C.,** 2016, Facile Synthesis Of Nitrogen And Sulfur Co-doped Carbon Dots And Application For Fe(III) Ions Detection And Cell Imaging, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 223:689–696pp.
- Cheng, D., Han, W., Yang, K., Song, Y., Jiang, M., and Song, E.,** 2014, One-step Facile Synthesis Of Hyaluronic Acid Functionalized Fluorescent Gold Nanoprobes Sensitive To Hyaluronidase In Urine Specimen From Bladder Cancer Patients, *Talanta*, 130:408–414pp.
- Cole, L. E., Ross, R. D., Tilley, J. M., Vargo-Gogola, T., and Roeder, R. K.,** 2015, Gold Nanoparticles As Contrast Agents In X-ray Imaging And Computed Tomography., *Nanomedicine (London, England)*, 10:321–341pp.
- Conney, A. H., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T. F., Manchand, P. S., Laskin, J. D., and Huang, M. T.,** 1991, Inhibitory Effect Of Curcumin And Some Related Dietary Compounds On Tumor Promotion And Arachidonic Acid Metabolism In Mouse Skin, *Advanced Enzyme Regulation*, 31:385–396pp.
- Daniel, M. C. M., and Astruc, D.,** 2004, Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties And Applications Toward Biology, Catalysis And Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104:293–346pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Davis, M. E., Chen, Z. G., and Shin, D. M.**, 2008, Nanoparticle Therapeutics: An Emerging Treatment Modality For Cancer., *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7:771–782pp.
- De, B., and Karak, N.**, 2013, A Green And Facile Approach For The Synthesis Of Water Soluble Fluorescent Carbon Dots From Banana Juice, *RSC Advances*, 3:8286p.
- Demir, B., Barlas, F. B., Guler, E., Gumus, P. Z., Can, M., Yavuz, M., Coskunol, H., and Timur, S.**, 2014, Gold Nanoparticle Loaded Phytosomal Systems: Synthesis, Characterization And In Vitro Investigations, *RSC Advances*, 4:34687–34695pp.
- Doria, G., Conde, J., Veigas, B., Giestas, L., Almeida, C., Assunção, M., Rosa, J., and Baptista, P. V.**, 2012, Noble Metal Nanoparticles For Biosensing Applications, *Sensors*, 12:1657–1687pp.
- Doshi, N., and Mitragotri, S.**, 2009, Designer Biomaterials For Nanomedicine, *Advanced Functional Materials*, 19:3843–3854pp.
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbely, M., Moan, J., and Peng, Q.**, 1998, Photodynamic Therapy, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90:889–905pp.
- Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., and Mittleman, A.**, 1978, Photoradiation Therapy For The Treatment Of Malignant Tumors, *Cancer Research*, 38:2628–2635pp.
- Du, F., Zhang, M., Gong, A., Tan, Y., Miao, J., Gong, Y., Zou, S., Zhang, L., Zhang, L., Wu, C., Sun, M., and Ju, H.**, 2017, Engineered Gadolinium-doped Carbon Dots For Magnetic Resonance Imaging-guided Radiotherapy Of Tumors, *Biomaterials*, 121:109–120pp.
- Du, W., Yuan, Y., Wang, L., Cui, Y., Wang, H., Xu, H., and Liang, G.**, 2015, Multifunctional Bioconjugate For Cancer Cell-Targeted Theranostics, *Bioconjugate Chemistry*, 26:2571–2578pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K. J., Rebers, P. A., and Smith, F.,** 1956, Colorimetric Method For Determination Of Sugars And Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28:350–356pp.
- Duncan, B., Kim, C., and Rotello, V. M.,** 2010, Gold Nanoparticle Platforms As Drug And Biomacromolecule Delivery Systems, *Journal of Controlled Release*, 148:122–127pp.
- Epand, R. F., Martinou, J. C., Fornallaz-Mulhauser, M., Hughes, D. W., and Epand, R. M.,** 2002, The Apoptotic Protein TBid Promotes Leakage By Altering Membrane Curvature, *Journal of Biological Chemistry*, 277:32632–32639pp.
- Euliss, L. E., DuPont, J. A., Gratton, S., and DeSimone, J.,** 2006, Imparting Size, Shape, And Composition Control Of Materials For Nanomedicine., *Chemical Society Reviews*, 35:1095–104pp.
- Evanoff, D. D., and Chumanov, G.,** 2004, Size-Controlled Synthesis Of Nanoparticles. 2. Measurement Of Extinction, Scattering, And Absorption Cross Sections, *The Journal of Physical Chemistry B*, 108:13957–13962pp.
- Freese, C., Uboldi, C., Gibson, M. I., Unger, R. E., Weksler, B. B., Romero, I. A., Couraud, P. A., and Kirkpatrick, C.,** 2012, Uptake And Cytotoxicity Of Citrate-coated Gold Nanospheres: Comparative Studies On Human Endothelial And Epithelial Cells, *Particle and Fibre Toxicology*, 9:23 (1-11pp).
- Fu, X., Yang, H., Zhang, X., Li, X., Xu, L., and Jia, Y.,** 2011, One-step Method For Preparation Of PH-responsive Gold Nanoparticles With Block Copolymer Shell Structures By UV Irradiation, *Polymer Bulletin*, 67:1059–1072pp.
- Funkhouser, J.,** 2002, Reinventing Pharma: The Theranostic Revolution, *Current Drug Discovery*, 2:17–19pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., and Rotello, V. M.,** 2008, Gold Nanoparticles In Delivery Applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60:1307-1315pp.
- Giner-Casares, J. J., Henriksen-Lacey, M., Coronado-Puchau, M., and Liz-Marzán, L. M.,** 2016, January, Inorganic Nanoparticles For Biomedicine: Where Materials Scientists Meet Medical Research, *Materials Today*, 19:19-28pp.
- Gratton, S. E. A., Williams, S. S., Napier, M. E., Pohlhaus, P. D., Zhou, Z., Wiles, K. B., Maynor, B. W., Shen, C., Olafsen, T., Samulski, E. T. and Desimone, J. M.,** 2008, The Pursuit Of A Scalable Nanofabrication Platform For Use In Material And Life Science Applications, *Accounts of Chemical Research*, 41:1685–1695pp.
- Guler, E., Barlas, F. B., Yavuz, M., Demir, B., Gumus, Z. P., Baspinar, Y., Coskunol, H and Timur, S.,** 2014, Bio-active Nanoemulsions Enriched With Gold Nanoparticle, Marigold Extracts And Lipoic Acid: In Vitro Investigations, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121:299–306pp.
- Gunes, A., Guler, E., Un, R. N., Demir, B., Barlas, F. B., Yavuz, M., Coskunol, H., and Timur, S.,** 2017, Niosomes Of Nerium Oleander Extracts: In vitro Assessment Of Bioactive Nanovesicular Structures, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 37:158–165pp.
- Gwinn, M. R., and Vallyathan, V.,** 2006, Nanoparticles: Health Effects - Pros And Cons, *Environmental Health Perspectives*, 114:1818–1825pp.
- Hamano, N., Negishi, Y., Omata, D., Takahashi, Y., Manandhar, M., Suzuki, R., Maruyama, K., Nomizu, M., and Aramaki, Y.,** 2013, Bubble Liposomes And Ultrasound Enhance The Antitumor Effects Of AG73 Liposomes Encapsulating Antitumor Agents, *Molecular Pharmaceutics*, 10:774–779pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Han, H.-S., Niemeyer, E., Huang, Y., Kamoun, W. S., Martin, J. D., Bhaumik, J., Chen, Y., Roberge, S., Cui, J., Martin, M. R., Fukumura, D., Jain, R. K., Bawendi, M. G., and Duda, D. G.,** 2015, Quantum Dot/antibody Conjugates For In Vivo Cytometric Imaging In Mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112:1350–1355pp.
- Hauck, T. S., Ghazani, A. A., and Chan, W. C. W.,** 2008, Assessing The Effect Of Surface Chemistry On Gold Nanorod Uptake, Toxicity, And Gene Expression In Mammalian Cells, *Small*, 4:153–159pp.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., and Yin, C.,** 2010, Effects Of Particle Size And Surface Charge On Cellular Uptake And Biodistribution Of Polymeric Nanoparticles, *Biomaterials*, 31:3657–3666pp.
- Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J., and West, J. L.,** 2003, Nanoshell-mediated Near-infrared Thermal Therapy Of Tumors Under Magnetic Resonance Guidance., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:13549–13554pp.
- Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., and Jain, R. K.,** 1998, Regulation Of Transport Pathways In Tumor Vessels: Role Of Tumor Type And Microenvironment, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:4607–4612pp.
- Hoshino, Y., Kodama, T., Okahata, Y., and Shea, K. J.,** 2008, Peptide Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody., *Journal of the American Chemical Society*, 130:15242–15243pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hrkach, J., Von Hoff, D., Ali, M. M., Andrianova, E., Auer, J., Campbell, T., De Witt, D., Figa, M., Figueiredo, M., Horhota, A., Low, S., McDonnell, K., Peeke, E., Retnarajan, B., Sabnis, A., Schnipper, E., Song, J. J., Song, Y. H., Summa, J., Tompsett, D., Troiano, G., Van Geen Hoven, T., Wright, J., LoRusso, P., Kantoff, P. W., Bander, N. H., Sweeney, C., Farokhzad, O. C., Langer, R., and Zale, S., 2012, Preclinical Development And Clinical Translation Of A PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle With A Differentiated Pharmacological Profile, *Science Translational Medicine*, 4:128ra39-128ra39pp.

Effect of radiation therapy upon cells, (n.d.). Retrieved August 30, 2017, from <http://www.mpsd.de/irt/IRT.html>.

Huang, H., and Yang, X., 2004, Synthesis Of Chitosan-stabilized Gold Nanoparticles In The Absence/presence Of Tripolyphosphate, *Biomacromolecules*, 5:2340–2346pp.

Huang, M. T., Smart, R. C., Wong, C. Q., and Conney, A. H., 1988, Inhibitory Effect Of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, And Ferulic Acid On Tumor Promotion In Mouse Skin By 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate, *Cancer Research*, 48:5941–5946pp.

Huang, M. T., Wang, Z. Y., Georgiadis, C. A., Laskin, J. D., and Conney, A. H., 1992, Inhibitory Effects Of Curcumin On Tumor Initiation By Benzo[a]pyrene And 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, 13:2183–2186pp.

Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., and El-Sayed, M. A., 2006, Cancer Cell Imaging And Photothermal Therapy In The Near-infrared Region By Using Gold Nanorods, *Journal of the American Chemical Society*, 128:2115–2120pp.

Iqbal, M. A., Md, S., Sahni, J. K., Baboota, S., Dang, S., and Ali, J., 2012, Nanostructured Lipid Carriers System: Recent Advances In Drug Delivery, *Journal of Drug Targeting*, 20:813–830pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jagetia, G. C., & Nayak, V.**, 2000, Effect Of Doxorubicin On Cell Survival And Micronuclei Formation In HeLa Cells Exposed To Different Doses Of Gamma-radiation, *Strahlentherapie Und Onkologie*, 176:422–428pp.
- Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., and Seifalian, A. M.**, 2007, November, Biological Applications Of Quantum Dots, *Biomaterials*, 28:4717-4732pp.
- Jana, N. R., Chen, Y., and Peng, X.**, 2004, Size- And Shape-controlled Magnetic (Cr, Mn, Fe, Co, Ni) Oxide Nanocrystals Via A Simple And General Approach, *Chemistry of Materials*, 16:3931–3935pp.
- Jones, A., and Harris, A. L.**, 1998, New Developments In Angiogenesis: A Major Mechanism For Tumor Growth And Target For Therapy, *Cancer Journal from Scientific American*, 4:209–217pp.
- Kelsch, A., Tomcin, S., Rausch, K., Barz, M., Mailänder, V., Schmidt, M., Landfester, K., and Zentel, R.**, 2012, HPMa Copolymers As Surfactants In The Preparation Of Biocompatible Nanoparticles For Biomedical Application, *Biomacromolecules*, 13:4179–4187pp.
- Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., and Chan, W. C. W.**, 2010, Nanomedicine, *New England Journal of Medicine*, 363:2434–2443pp.
- Kim, C., Ghosh, P., and Rotello, V. M.**, 2009, Multimodal Drug Delivery Using Gold Nanoparticles, *Nanoscale*, 1:61-67pp.
- Kim, J., Park, J., Kim, H., Singha, K., and Kim, W. J.**, 2013, Transfection And Intracellular Trafficking Properties Of Carbon Dot-gold Nanoparticle Molecular Assembly Conjugated With PEI-pDNA, *Biomaterials*, 34:7168–7180.
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., and Plech, A.**, 2006, Turkevich Method For Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *Journal of Physical Chemistry B*, 110:15700–15707pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Komatsuzaki, A., Ohyanagi, T., Tsukasaki, Y., Miyanaga, Y., Ueda, M., and Jin, T.**, 2015, Compact Halo-ligand-conjugated Quantum Dots For Multicolored Single-molecule Imaging Of Overcrowding GPCR Proteins On Cell Membranes, *Small*, 11:1396–1401pp.
- Krahne, R., Morello, G., Figuerola, A., George, C., Deka, S., and Manna, L.**, 2011, April, Physical Properties Of Elongated Inorganic Nanoparticles, *Physics Reports*, 501:75-221pp.
- Kunath, S., Panagiotopoulou, M., Maximilien, J., Marchyk, N., Sängner, J., and Haupt, K.**, 2015, Cell And Tissue Imaging With Molecularly Imprinted Polymers As Plastic Antibody Mimics, *Advanced Healthcare Materials*, 4:1322–1326pp.
- Kwatra, D., Venugopal, A., and Anant, S.**, 2013, Nanoparticles In Radiation Therapy: A Summary Of Various Approaches To Enhance Radiosensitization In Cancer, *Translational Cancer Research*, 2:330–342pp.
- Liechty, W. B., Kryscio, D.R., Slaughter, B. V. and Peppas, N. A.**, 2010, Polymers For Drug Delivery Systems, *Annual Reviews of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1:149–173pp.
- Liu, R., Zhang, J., Gao, M., Li, Z., Chen, J., Wu, D., and Liu, P.**, 2015, A Facile Microwave-hydrothermal Approach Towards Highly Photoluminescent Carbon Dots From Goose Feathers, *RSC Advances*, 5:4428–4433pp.
- Liu, Y., Zhou, C., Wang, W., Yang, J., Wang, H., Hong, W., and Huang, Y.**, 2016, CD44 Receptor Targeting And Endosomal PH-Sensitive Dual Functional Hyaluronic Acid Micelles For Intracellular Paclitaxel Delivery, *Molecular Pharmaceutics*, 13:4209–4221pp.
- Llu, L., and Yonetani, T.**, 1994, Preparation And Characterization Of Liposome-Encapsulated Haemoglobin By A Freeze-Thaw Method, *Journal of Microencapsulation*, 11:409–421pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lowe, S. B., Dick, J. A. G., Cohen, B. E., and Stevens, M. M.**, 2012, Multiplex Sensing Of Protease And Kinase Enzyme Activity Via Orthogonal Coupling Of Quantum Dot-peptide Conjugates, *ACS Nano*, 6:851–857pp.
- Lu, S., Xu, X., Zhao, W., Wu, W., Yuan, H., Shen, H., Zhou, C., Li, L. S., and Ma, L.**, 2010, Targeting Of Embryonic Stem Cells By Peptide-conjugated Quantum Dots, *PLoS ONE*, 5:e12075.
- Luk, B. T., and Zhang, L.**, 2014, Current Advances In Polymer-based Nanotheranostics For Cancer Treatment And Diagnosis, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6: 21859-21873pp.
- Ma, Y., Mou, Q., Wang, D., Zhu, X., and Yan, D.**, 2016, Dendritic Polymers For Theranostics., *Theranostics*, 6:930–947pp.
- Mauter, M. S., and Elimelech, M.**, 2008, August, Environmental Applications Of Carbon-based Nanomaterials, *Environmental Science and Technology*, 42:5843-5859pp.
- Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, M. J., and Cullis, P. R.**, 1986, Techniques For Encapsulating Bioactive Agents Into Liposomes, *Chemistry and Physics of Lipids*, 40:333–345pp.
- Milane, L., Ganesh, S., Shah, S., Duan, Z. F., and Amiji, M.**, 2011, Multi-modal Strategies For Overcoming Tumor Drug Resistance: Hypoxia, The Warburg Effect, Stem Cells, And Multifunctional Nanotechnology, *Journal of Controlled Release*, 155:237–247pp.
- Morimoto, K., Ozawa, T., Awazu, K., Ito, N., Honda, N., Matsumoto, S., and Tsuruta, D.**, 2014, Photodynamic Therapy Using Systemic Administration Of 5-aminolevulinic Acid And A 410-nm Wavelength Light-emitting Diode For Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus-infected Ulcers In Mice, *PLoS ONE*, 9:e105173.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morosini, V., Bastogne, T., Frochot, C., Schneider, R., François, A., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M.,** 2011, Quantum Dot-folic Acid Conjugates As Potential Photosensitizers In Photodynamic Therapy Of Cancer., *Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 10:842–851pp.
- Mozafari, M. R.,** 2005, Liposomes: An Overview Of Manufacturing Techniques, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10:711–719pp.
- Muddineti, O. S., Ghosh, B., and Biswas, S.,** 2015, Current Trends In Using Polymer Coated Gold Nanoparticles For Cancer Therapy, *International Journal of Pharmaceutics*, 484:252-267pp.
- Nestora, S., Merlier, F., Beyazit, S., Prost, E., Duma, L., Baril, B., Greaves, A., Haupt, K., and Tse Sum Bui, B.,** 2016, Plastic Antibodies For Cosmetics: Molecularly Imprinted Polymers Scavenge Precursors Of Malodors, *Angewandte Chemie - International Edition*, 55:6252–6256pp.
- Nie, Z., Petukhova, A., and Kumacheva, E.,** 2010, Properties And Emerging Applications Of Self-assembled Structures Made From Inorganic Nanoparticles, *Nature Nanotechnology*, 5:15–25pp.
- Niidome, T., Yamagata, M., Okamoto, Y., Akiyama, Y., Takahashi, H., Kawano, T., Katayama, Y., and Niidome, Y.,** 2006, PEG-modified Gold Nanorods With A Stealth Character For In Vivo Applications, *Journal of Controlled Release*, 114:343–347pp.
- Ohsawa, T., Miura, H., and Harada, K.,** 1985, Improvement Of Encapsulation Efficiency Of Water-soluble Drugs In Liposomes Formed By The Freeze-thawing Method, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33:3945–3952pp.
- Palekar, R. U., Myerson, J. W., Schlesinger, P. H., Sadler, J. E., Pan, H., and Wickline, S. A.,** 2013, Thrombin-targeted Liposomes Establish A Sustained Localized Anticlotting Barrier Against Acute Thrombosis, *Molecular Pharmaceutics*, 10:4168–4175pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., and Jähnen-Dechent, W.,** 2007, Size-dependent Cytotoxicity Of Gold Nanoparticles, *Small*, 3:1941–1949pp.
- Panyam, J., and Labhasetwar, V.,** 2012, Biodegradable Nanoparticles For Drug And Gene Delivery To Cells And Tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64:61-71pp.
- Pathakoti, K., Hwang, H.-M., Xu, H., Aguilar, Z. P., and Wang, A.,** 2013, In Vitro Cytotoxicity Of CdSe/ZnS Quantum Dots With Different Surface Coatings To Human Keratinocytes HaCaT Cells, *Journal of Environmental Sciences*, 25:163–171pp.
- Patra, C. R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., and Mukherjee, P.,** 2010, Fabrication Of Gold Nanoparticles For Targeted Therapy In Pancreatic Cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62:346-361pp.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., and Langer, R.,** 2007a, Nanocarriers As An Emerging Platform For Cancer Therapy, *Nature Nanotechnology*, 2:751–760pp.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., and Langer, R.,** 2007b, Nanocarriers As An Emerging Platform For Cancer Therapy., *Nature Nanotechnology*, 2:751–760pp.
- Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., and Langer, R.,** 2006, Hydrogels In Biology And Medicine: From Molecular Principles To Bionanotechnology, *Advanced Materials*, 18:1345–1360pp.
- Petros, R. A., and DeSimone, J. M.,** 2010, Strategies In The Design Of Nanoparticles For Therapeutic Applications, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9:615–627pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pick, U.**, 1981, Liposomes With A Large Trapping Capacity Prepared By Freezing And Thawing Of Sonicated Phospholipid Mixtures, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 212:186–194pp.
- Pissuwan, D., Niidome, T., and Cortie, M. B.**, 2011, January, The Forthcoming Applications Of Gold Nanoparticles In Drug And Gene Delivery Systems, *Journal of Controlled Release*, 149:65-71pp.
- Quadir, M. A., Morton, S. W., Deng, Z. J., Shopsowitz, K. E., Murphy, R. P., Epps, T. H., and Hammond, P. T.**, 2014, PEG-polypeptide Block Copolymers As PH-responsive Endosome-solubilizing Drug Nanocarriers, *Molecular Pharmaceutics*, 11:2420–2430pp.
- Rabotyagova, O. S., Cebe, P., and Kaplan, D. L.**, 2011, Protein-based Block Copolymers, *Biomacromolecules*, 12:269–289pp.
- Raviraj, J., Bokkasam, V. K., Kumar, V. S., Reddy, U. S., and Suman, V.**, 2014, Radiosensitizers, Radioprotectors, And Radiation Mitigators, *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 25:83–90pp.
- Ren, W., Tian, G., Jian, S., Gu, Z., Zhou, L., Yan, L., Jin, S., Yin, W., and Zhao, Y.**, 2012, TWEEN Coated NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄ Core/shell Upconversion Nanoparticles For Bioimaging And Drug Delivery, *RSC Advances*, 2:7037-7041pp.
- Rogach, A. L., Nagesha, D., Ostrander, J. W., Giersig, M., and Kotov, N. A.**, 2000, “Raisin Bun”-type Composite Spheres Of Silica And Semiconductor Nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 12:2676–2685pp.
- Roh, K.-H., Martin, D. C., and Lahann, J.**, 2005, Biphasic Janus Particles With Nanoscale Anisotropy., *Nature Materials*, 4:759–763pp.
- Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Bez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., and Prado-Garcia, H.**, 2014, Tumor Cell Metabolism, *Cancer Biology & Therapy*, 12:939–948pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rück-Braun, K., Petersen, M. Å., Michalik, F., Hebert, A., Przyrembel, D., Weber, C., Ahmed, S. A., Kowarik, S., and Weinelt, M.,** 2013, Formation Of Carboxy- And Amide-terminated Alkyl Monolayers On Silicon(111) Investigated By ATR-FTIR, XPS, And X-ray Scattering: Construction Of Photoswitchable Surfaces, *Langmuir*, 29:11758–11769pp.
- Safi, M., Domitrovic, T., Kapur, A., Zhan, N., Aldeek, F., Johnson, J. E., and Mattoussi, H.,** 2017, Intracellular Delivery Of Luminescent Quantum Dots Mediated By A Virus-Derived Lytic Peptide, *Bioconjugate Chemistry*, 28:64–74pp.
- Sahoo, S. K., Parveen, S., and Panda, J. J.,** 2007, The Present And Future Of Nanotechnology In Human Health Care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3:20–31pp.
- Sahu, S., Behera, B., Maiti, T. K., and Mohapatra, S.,** 2012, Simple One-step Synthesis Of Highly Luminescent Carbon Dots From Orange Juice: Application As Excellent Bio-imaging Agents, *Chemical Communications*, 48:8835-8837pp.
- Salata, O. V,** 2004, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology*, 6:1–6pp.
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H., and Medintz, I. L.,** 2013, Functionalizing Nanoparticles With Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 113:1904–2074pp.
- Schnitzler, T., and Herrmann, A.,** 2012, DNA Block Copolymers: Functional Materials For Nanoscience And Biomedicine, *Accounts of Chemical Research*, 45:1419–1430pp.
- Shahmuradyan, A., and Krull, U. J.,** 2016, Intrinsically Labeled Fluorescent Oligonucleotide Probes On Quantum Dots For Transduction Of Nucleic Acid Hybridization, *Analytical Chemistry*, 88:3186–3193pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shanthi, K., Vimala, K., Gopi, D., and Kannan, S.,** 2015, Fabrication Of A PH Responsive DOX Conjugated PEGylated Palladium Nanoparticle Mediated Drug Delivery System: An In Vitro And In Vivo Evaluation, *RSC Advances*, 5:44998–45014pp.
- Shen, T., Guan, S., Gan, Z., Zhang, G., and Yu, Q.,** 2016, Polymeric Micelles With Uniform Surface Properties And Tunable Size And Charge: Positive Charges Improve Tumor Accumulation, *Biomacromolecules*, 17:1801–1810pp.
- Shubik, P.,** 1982, Vascularization Of Tumors: A Review, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 103:211–226pp.
- Sonavane, G., Tomoda, K., and Makino, K.,** 2008, Biodistribution Of Colloidal Gold Nanoparticles After Intravenous Administration: Effect Of Particle Size, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66:274–280pp.
- Song, H., Geng, H., Ruan, J., Wang, K., Bao, C., Wang, J., Peng, X., Zhang, X., and Cui, D.,** 2011, Development Of Polysorbate 80/Phospholipid Mixed Micellar Formation For Docetaxel And Assessment Of Its In Vivo Distribution In Animal Models, *Nanoscale Research Letters*, 6:354 (1-12pp).
- Song, J., Kim, J., Hwang, S., Jeon, M., Jeong, S., Kim, C., and Kim, S.,** 2016, “Smart” Gold Nanoparticles For Photoacoustic Imaging: An Imaging Contrast Agent Responsive To The Cancer Microenvironment And Signal Amplification Via PH-induced Aggregation, *Chemical Communications*, 52:8287–8290pp.
- Song, L., Pan, Z., Zhang, H., Li, Y., Zhang, Y., Lin, J., Li, Y., Su, G., Ye, S., Xie, L., and Hou, Z.,** 2017, Dually Folate/CD44 Receptors-targeted Self-assembled Hyaluronic Acid Nanoparticles For Dual-drug Delivery And Combination Cancer Therapy, *Journal of Material Chemistry B*, 5:6835–6846pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Spadavecchia, J., Movia, D., Moore, C., Maguire, C. M., Moustauoui, H., Casale, S., Volkov, Y., and Prina-Mello, A.,** 2016, Targeted Polyethylene Glycol Gold Nanoparticles For The Treatment Of Pancreatic Cancer: From Synthesis To Proof-of-concept In Vitro Studies, *International Journal of Nanomedicine*, 11:791–822pp.
- Sun, I. C., Eun, D. K., Na, J. H., Lee, S., Kim, I. I. J., Youn, I. C., Ko, C. Y., Kim, H. S., Lim, D., Choi, K., Messersmith, P. B., Park, T. G., Kim, S. Y., Kwon, I. C., Kim, K. and Ahn, C. H.,** 2009, Heparin-Coated Gold Nanopartieles For Liver-Specific CT Imaging, *Chemistry - A European Journal*, 15:13341–13347pp.
- Sun, Y. P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. a S., Pathak, P., Meziani, M. J., Harruff, B. A., Wang, X., Wang, H., Luo, P. G., Yang, H., Kose, M. E., Chen, B., Veca, L. M., and Xie, S. Y.,** 2006, Quantum-sized Carbon Dots For Bright And Colorful Photoluminescence, *Journal of the American Chemical Society*, 128:7756–7757pp.
- Suriamoorthy, P., Zhang, X., Hao, G., Joly, A. G., Singh, S., Hossu, M., Sun, X., and Chen, W.,** 2010, Folic Acid-CdTe Quantum Dot Conjugates And Their Applications For Cancer Cell Targeting, *Cancer Nanotechnology*, 1:19–28pp.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., and Dass, C. R.,** 2013, Doxorubicin: An Update On Anticancer Molecular Action, Toxicity And Novel Drug Delivery Systems, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65:157–170pp.
- Tam, J. M., Tam, J. O., Murthy, A., Ingram, D. R., Ma, L. L., Travis, K., Johnston, K. P., and Sokolov, K. V.,** 2010, Controlled Assembly Of Biodegradable Plasmonic Nanoclusters For Near-infrared Imaging And Therapeutic Applications, *ACS Nano*, 4:2178–2184pp.
- Tiwari, A. D., Mishra, A. K., Mishra, S. B., Arotiba, O. A., and Mamba, B. B.,** 2011, Green Synthesis And Stabilization Of Gold Nanoparticles In Chemically Modified Chitosan Matrices, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48:682–687pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ton, X. A., Acha, V., Bonomi, P., Tse Sum Bui, B., and Haupt, K.,** 2015, A Disposable Evanescent Wave Fiber Optic Sensor Coated With A Molecularly Imprinted Polymer As A Selective Fluorescence Probe, *Biosensors and Bioelectronics*, 64:359–366pp.
- Un, R. N., Barlas, F. B., Yavuz, M., Ag Seleci, D., Seleci, M., Gumus, Z. P., Guler, E., Demir, B., Can, M., Coskunol, H., and Timur, S.,** 2015, Phyto-Niosomes: *In Vitro* Assessment Of The Novel Nanovesicles Containing Marigold Extract, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 64:927–937pp.
- Unak, G., Ozkaya, F., Ilker Medine, E., Kozgus, O., Sakarya, S., Bekis, R., Unak, P., and Timur, S.,** 2012, Gold Nanoparticle Probes: Design And In Vitro Applications In Cancer Cell Culture, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90:217–226pp.
- Vandeveld, F., Leïchlé, T., Ayela, C., Bergaud, C., Nicu, L., and Haupt, K.,** 2007, Direct Patterning Of Molecularly Imprinted Microdot Arrays For Sensors And Biochips, *Langmuir*, 23:6490–6493pp.
- Vasapollo, G., Sole, R. Del, Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., and Mele, G.,** 2011, Molecularly Imprinted Polymers: Present And Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12:5908-5945pp.
- Venkataraman, S., Tan, J. P. K., Ng, V. W. L., Tan, E. W. P., Hedrick, J. L., and Yang, Y. Y.,** 2017, Amphiphilic And Hydrophilic Block Copolymers From Aliphatic N-Substituted 8-Membered Cyclic Carbonates: A Versatile Macromolecular Platform For Biomedical Applications, *Biomacromolecules*, 18:178–188pp.
- Vivero-Escoto, J. L., and Vega, D. L.,** 2014, Stimuli-responsive Protoporphyrin IX Silica-based Nanoparticles For Photodynamic Therapy In Vitro, *RSC Advances*, 4:14400-14407pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vzorov, A. N., Dixon, D. W., Trommel, J. S., Marzilli, L. G., and Compans, R. W.**, 2002, Inactivation Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 By Porphyrins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:3917–3925pp.
- Wang, Y., and Hu, A.**, 2014, Carbon Quantum Dots: Synthesis, Properties And Applications, *Journal of Materials Chemistry C*, 2:6921-6939pp.
- Wong, L., Kavallaris, M., and Bulmus, V.**, 2011, Doxorubicin Conjugated, Crosslinked, PEGylated Particles Prepared Via One-pot Thiol-ene Modification Of A Homopolymer Scaffold: Synthesis And In Vitro Evaluation, *Polymer Chemistry*, 2:385–393pp.
- Xu, W. H., Han, M., Dong, Q., Fu, Z. X., Diao, Y. Y., Liu, H., Xu, J., Jiang, H. L., Zhang, S. Z., Zheng, S., Gao, J. Q., and Wei, Q. C.**, 2012, Doxorubicin-mediated Radiosensitivity In Multicellular Spheroids From A Lung Cancer Cell Line Is Enhanced By Composite Micelle Encapsulation, *International Journal of Nanomedicine*, 7:2661–2671pp.
- Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., and Scrivens, W. A.**, 2004, Electrophoretic Analysis And Purification Of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments, *Journal of the American Chemical Society*, 126:12736–12737pp.
- Xu, Z., Hou, Y., and Sun, S.**, 2007, Magnetic Core/shell Fe₃O₄/Au And Fe₃O₄/Au/Ag Nanoparticles With Tunable Plasmonic Properties, *Journal of the American Chemical Society*, 129:8698–8699pp.
- Yang, J., Li, W., Li, Q., Wu, S., Yu, B., Jing, X., and Li, W.**, 2007, Oxygen Adsorption By Carbon Nanotubes And Its Application In Radiotherapy., *IET Nanobiotechnology / IET*, 1:10–14pp.
- Yang, Y., Cui, J., Zheng, M., Hu, C., Tan, S., Xiao, Y., Yang, Q., and Liu, Y.**, 2012, One-step Synthesis Of Amino-functionalized Fluorescent Carbon Nanoparticles By Hydrothermal Carbonization Of Chitosan, *Chemical Communications*, 48:380–382pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, Z.-C., Wang, M., Yong, A. M., Wong, S. Y., Zhang, X.-H., Tan, H., Chang, A. Y., Li, X., and Wang, J.,** 2011, Intrinsically Fluorescent Carbon Dots With Tunable Emission Derived From Hydrothermal Treatment Of Glucose In The Presence Of Monopotassium Phosphate, *Chemical Communications*, 47:11615-11617pp.
- Yoo, J.-W., Irvine, D. J., Discher, D. E., and Mitragotri, S.,** 2011, Bio-inspired, Bioengineered And Biomimetic Drug Delivery Carriers, *Nature Reviews Drug Discovery*, 10:521–535pp.
- Yu, M. K., Park, J., and Jon, S.,** 2012, Targeting Strategies For Multifunctional Nanoparticles In Cancer Imaging And Therapy, *Theranostics*, 2:3–44pp.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Jain, R. K., and Torchilin, V. P.,** 1995, Vascular Permeability In A Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence And Cutoff Size, *Cancer Research*, 55:3752–3756pp.
- Zhang, B. T., Zheng, X., Li, H. F., and Lin, J. M.,** 2013, Application Of Carbon-based Nanomaterials In Sample Preparation: A Review, *Analytica Chimica Acta*, 784:1-17pp.
- Zhang, L., Yuan, H., Inscoc, C., Chtcheprov, P., Hadsell, M., Lee, Y., Lu, J., Chang, S., and Zhou, O.,** 2014, Nanotube X-ray For Cancer Therapy: A Compact Microbeam Radiation Therapy System For Brain Tumor Treatment, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 14:1411–1418pp.
- Zhao, Y., Liu, S., Li, Y., Jiang, W., Chang, Y., Pan, S., Fang, X., Wang, Y. A., and Wang, J.,** 2010, Synthesis And Grafting Of Folate-PEG-PAMAM Conjugates Onto Quantum Dots For Selective Targeting Of Folate-receptor-positive Tumor Cells, *Journal of Colloid and Interface Science*, 350:44–50pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zheng, M., Liu, S., Li, J., Qu, D., Zhao, H., Guan, X., Hu, X., Xie, Z., Jing, X., and Sun, Z.,** 2014, Integrating Oxaliplatin With Highly Luminescent Carbon Dots: An Unprecedented Theranostic Agent For Personalized Medicine, *Advanced Materials*, 26:3554–3560pp.
- Zhou, F., Xing, D., Ou, Z., Wu, B., Resasco, D. E., and Chen, W. R.,** 2014, Cancer Photothermal Therapy In The Near-infrared Region By Using Single-walled Carbon Nanotubes., *Journal of Biomedical Optics*, 14:21009.
- Zhu, S., Meng, Q., Wang, L., Zhang, J., Song, Y., Jin, H., Zhang, K., Sun, H., Wang, H., and Yang, B.,** 2013, Highly Photoluminescent Carbon Dots For Multicolor Patterning, Sensors, And Bioimaging, *Angewandte Chemie - International Edition*, 52:3953–3957pp.

ÖZGEÇMİŞ

İLETİŞİM BİLGİLERİM

Adres : Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü,
35100
BORNOVA/İZMİR

Cep Telefonu : 0(538) 579 15 77

E-Posta : blldmr@gmail.com, blldmr@yandex.com

EĞİTİM BİLGİLERİM

Doktora : Ege Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü – Biyokimya
Anabilim Dalı (2014 – Devam ediyor/Tez aşamasında)

- Doktora " Görüntüleme Kılavuzlu ve Tedaviye Yönelik Nanoparçacıkların Sentezi ve in vitro Uygulamaları" başlıklı konu ile tez çalışmama devam etmekteyim. (Tez danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR)

Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü – Biyokimya
Anabilim Dalı

(2012 – 2014)

- Yüksek lisansta “Hücre çoğalması üzerine etkili olabilecek seçilmiş bitki ekstraktlarının eldesi ve in vitro testleri: Bitkisel lipozomal preparatlara ilişkin çalışmalar” konusu ile tez çalışmamı tamamladım. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR)

Lisans : Ege Üniversitesi – Fen Fakültesi – Biyokimya Bölümü/
Biyoteknoloji
Ağırlıklı Biyokimyagerlik (2008 – 2012)

- Lisans bitirme projesi kapsamında “Mikrobiyal Biyosensör Hazırlanmasında Montmorillonitin İmmobilizasyon Matriksi Olarak Uygulamaları” başlıklı konu ile çalıştım. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR)

Lise : Gaziosmanpaşa Plevne (Yabancı Dil Ağırlıklı) Lisesi (2004 – 2008)

(2. likle bitirdim.)

YABANCI DİL

İngilizce Okuma : İyi Seviye
Yazma : İyi Seviye
Konuşma : İyi Seviye

Fransızca Okuma : Orta Seviye
Yazma : Orta Seviye
Konuşma : Orta Seviye

Japonca Okuma : Başlangıç
Yazma : Orta Seviye (Katakana ve Hiragana ile)
Konuşma : Başlangıç

BECERİLERİM

İşletim Sistemleri : MS Windows XP Professional (iyi), MS Windows Vista(iyi), MS Windows 7 (iyi)

Kullanılan Programlar : MS Office Programları (iyi), Originlab (iyi), Smartdraw (iyi)

EĞİTİM, KURS VE SEMİNERLER

Konusu : Perfusion Based Cell Culture Assays: Physical Principals, Cell preparation/seeding in flow chambers, Setup and handling of pump systems, Microscopical analysis of cells. (Ibidi Company-Münih/Almanya)

Başlangıç Tarihi : 18.10.2016-19.10.2016

Konusu : Novel Fluidic Technologies and Applications with an Emphasis on Collaboration Workshop (İzmir/Türkiye)

Başlangıç Tarihi : 21.04.2014

Konusu : 1. Ege Nanoteknoloji Günleri (İzmir/Türkiye)

Başlangıç Tarihi : 18.04.2013

Konusu : Geleneksel III. Kök Hücre Sempozyumu (İzmir/Türkiye)
Başlangıç Tarihi : 30.04.2011

Konusu : Biyoloji-Kimya-Biyokimya Oryantasyon Eğitimi
(İzmir/Türkiye)
Başlangıç Tarihi : 10.05.2010

Konusu : Nanoteknoloji Sempozyumu (İzmir/Türkiye)
Başlangıç Tarihi : 02.11.2009

Konusu : 1. Kök Hücre Sempozyumu (İzmir/Türkiye)
Başlangıç Tarihi : 27.03.2009

Uluslararası Hakemli Dergilerde Bulunan Yayınlar (27):

- Filiz Tasci, Serkan Sayin, Didem Ag Selec, **Bilal Demir**, Hacı Azak, Hüseyin Bekir Yıldız, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, "A Novel Immobilization Matrix for the Biosensing of Phenol: Self Assembled Monolayers of Calixarenes", Turkish Journal of Biochemistry, 2017, 1-8.
- Aybike Gunes, Emine Guler, Rabia Nur Un, **Bilal Demir**, F. Baris Barlas, Murat Yavuz, Hakan Coskunol, Suna Timur, "Niosomes of Nerium oleander extracts: In vitro assessment of bioactive nanovesicular structures" Journal of Drug Delivery Science and Tehnology" 2017, 37, 158-165.
- Fatma Cetin Telli, **Bilal Demir**, Firat Baris Barlas, Emine Guler, Suna timur, Yesim Salman, "Novel glyconanoconjugates: synthesis, characterization and bioapplications" RSC Advances, 2016, 6, 105806-105813.
- Z. Pinar Gumus, V. umut Celenk, Emine Gulr, **Bilal Demir**, Hakan Coskunol, Suna timur, "Determination of Cocaine and Benzoylcegonine In Biological Matrices By HPLC and LC-MS/MS" Turkish Journal of Biological Chemistry, 2016 DOI: 10.18596/jotcsa.82665 2016.
- **Bilal Demir**, Tulay Yilmaz, Emine Guler, Z. Pinar Gumus, Hüseyin Akbulut, Ebru Aldemir, Hakan Coskunol, Demet Goen Colak, Ioan Cianga, Shuhei Yamada, Suna Timur, Takeshi Endo, Yusuf Yagci, " Polypeptide with electroactive endgroups as sensing platform for the abused drug ‘Methamphetamine’ by bioelectrochemical method" *Talanta*, 2016, 161, 789-796.

- Gokhan Yilmaz, **Bilal Demir**, Suna Timur, C. Remzi Becer, " Poly(methacrylic acid)-Coated Gold Nanoparticles: Functional Platforms for Theranostic Applications" *Biomacromolecules*, 2016, DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00706.
- K. Volkan Ozdokur, **Bilal Demir**, Ece Atman, Alper Yalin Tatli, Buket Yilmaz, Dilek Odaci Demirkol, Suleyman Kocak, Suna Timur, F. Nil Ertas, " A Novel Ethanol Biosensor on Pulsed Deposited MnOx-MoOx Electrode Decorated with Pt Nanoparticles" *Sensors and Actuators B*, 2016, 237, 291-297.
- Emine Guler, Guliz Bozokalfa, **Bilal Demir**, Z. Pinar Gumus, Bahar Guler, Ebru Aldemir, Suna Timur, Hakan Coskunol, " An Aptamer Folding based Sensory Platform' Decorated with Nanoparticles for Simple Cocaine Testing" *Drug Testing and Analysis*, 2016, DOI 10.1002/dta.1992.
- Firat Baris Barlas, **Bilal Demir**, Emine Guler, Ahmet Murat Senisik, H. Armagan Arican, Perihan Unak, Suna Timur, "Multimodal theranostic assemblings: Double encapsulation of protoporphyrine IX/Gd3+ in niosomes", *RSC Advances*, 2016, 6, 30217–30225.
- Guliz Bozokalfa, Huseyin Akbulut, **Bilal Demir**, Emine Guler, Pinar Zinar Gumus, Ebru Aldemir, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, Hakan Coskunol, Suna Timur, Yusuf Yagci, " A polypeptide functional surface for the aptamer immobilization: Electrochemical cocaine bio-sensing", *Analytical Chemistry*, 2016, 88, 4161-4167.
- Saniye Soylemez, **Bilal Demir**, Gizem Oyman Eyrilmez, Seçkin Kesici, Aytül Sağlam, Dilek Odacı Demirkol, Salih Ozcubukcu, Suna Timur, Levent Toppare, " Influence of Rgd and Tat Architecture on the Formation of Bio-functional Layers on Gold/Ito Surface and Their Effect on Cell Adhesion", *RSC Advances*, 2016, 6, 2695–2702.
- Hacer Azak, Firat Baris Barlas, Huseyin Bekir Yildiz, Kadri Gulec, **Bilal Demir**, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, " Folic acid modified conducting polymer: Electrochemical detection of the cell attachment", *Macromolecular Bioscience*, 2015, 16, 545-552.
- Melis Kesik, Bilal Demir, F. Baris Barlas, Caner Geyik, Sevki Can Cevher, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, Ali Cirpan, Levent Toppare, "Multi-Functional Fluorescent Scaffold as a Multicolour Probe: Design and Application in Targeted Cell Imaging", *RSC Advances*, 2015, 5, 83361–83367.

- Huseyin Akbulut, Guliz Bozokalfa, Duygu N. Asker, **Bilal Demir**, Emine Guler, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, and Yusuf Yagci, "Polythiophene-g-poly(ethylene glycol) with Lateral Amino Groups as a Novel Matrix for Biosensor Construction", ACS Applied Materials and Interfaces, 2015, 7, 20612-20622.
- Emine Guler , Huseyin Akbulut , Guliz Bozokalfa , **Bilal Demir** , Gizem Oyman Eyrilmez , Murat Yavuz , Dilek Odaci Demirkol , Hakan Coskunol , Takeshi Endo , Shuhei Yamada , Suna Timur , Yusuf Yagci, "Bioapplications of Polythiophene-g- Polyphenylalanine-Covered Surfaces", Macromolecular Chemistry and Physics, 2015, 216, 1868-1878.
- Yudum Tepeli, **Bilal Demir**, Suna Timur, Ulku Anik, " An electrochemical cytosensor based on a PAMAM modified glassy carbon paste electrode", RSC Advances, 2015, 5, 53973-53978.
- Caner Geyik, Mustafa Ciftci, **Bilal Demir**, Bahar Guler, Ali Ozkaya, Z. Pinar Gumus, F. Baris Barlas, Dilek Odaci Demirkol, Hakan Coskunol, Suna Timur, Yusuf Yagci, "Controlled Release of an Anti-cancer Drug-Paclitaxel by Using Nano-structured Amphiphilic Star-Hyperbranched Blockcopolymers" Polymer Chemistry 2015, 6, 5470-5477.
- Z. Pinar Gumus, Emine Guler, **Bilal Demir**, F. Baris Barlas, Murat Yavuz, Dilara Colpankan, A. Murat Senisik, Serap Teksoz, Perihan Unak, Hakan Coskunol, Suna Timur, " Herbal Infusions of Black Seed and Wheat Germ Oil: Their Chemical Profiles, in vitro Bio-investigations and Effective Formulations as Phyto-Nanoemulsions", Colloids and surfaces B: Biointerfaces 2015, 133, 73-80.
- Gizem Oyman Eyrilmez, Sean Doran, Eljesa Murtezi, **Bilal Demir**, Dilek Odaci Demirkol, Hakan Coskunol, Suna Timur, Yusuf Yagci, "Selective Cell Adhesion and Biosensing Applications of Bio-active Block Copolymers Prepared by CuAAC/Thiol-ene Double Click Reactions" Macromolecular Bioscience 2015, 15, 1233-1241.
- Rabia Nur Un, F. Baris Barlas, Murat Yavuz, Didem Ag Selec, Muharrem Selec, Z. Pinar Gumus, Emine Guler, **Bilal Demir**, Mustafa Can, Hakan Coskunol and Suna Timur, Phyto-Niosomes: In vitro Assessment of the Novel Nanovesicles Containing Marigold Extract, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2015, 64, 927-937.

- Filiz DEMİR, **Bilal DEMİR**, Esra Evrim YALÇINKAYA, Serdar ÇEVİK, Dilek ODACI DEMİRKOL, Ülkü ANIK, Suna TİMUR, “Amino Acid Intercalated Montmorillonite: Electrochemical Biosensing Applications”, RSC Advances, 2014, 4, 50107 - 50113.
- **Bilal DEMİR**, F. Barış BARLAS, Emine GÜLER, Pınar Zinar GÜMÜŞ, Mustafa CAN, Murat YAVUZ, Hakan COŞKUNOL, Suna TİMUR, “Gold Nanoparticle Loaded Phytosomal Systems: Synthesis, Characterization and *in vitro* Investigations”, RSC Advances, 2014, 4, 34687 – 34685.
- F. Barış BARLAS, Didem AĞ ŞELECI, Melek ÖZKAN, **Bilal DEMİR**, Muharrem ŞELECI, Muhammet AYDIN, M. Atilla TAŞDELEN, Suna TİMUR, Serdar ÖZÇELİK, Yusuf YAĞCI, “Folic Acid Modified Clay/Polymer Nanocomposites for Selective Cell Adhesion”, Journal of Materials Chemistry B 2014, 2, 6412 - 6422.
- Emine GÜLER, F. Barış BARLAS, Murat YAVUZ, **Bilal DEMİR**, Z. Pınar GÜMÜŞ, Yücel BAŞPINAR, Hakan COŞKUNOL, Suna TİMUR, “Bio-active Nanoemulsions Enriched with Gold Nanoparticle, Marigold Extracts and Lipoic Acid: *in vitro* investigations”, Colloids and Surfaces B, 2014, 121 – 299 – 306.
- K. Volkan ÖZDOKUR, **Bilal DEMİR**, Elvin YAVUZ, Furkan ULUS, Çiğdem ERTEN, İrem AYDIN, Dilek O. DEMİRKOL, Levent PELİT, Suna TİMUR, F. Nil ERTAŞ, “Pyranose Oxidase and Pt-MnOx Bionanocomposite Electrode Bridged by Ionic Liquid for Biosensing Applications” , Sensors and Actuators B, 2014, 197, 123-128
- İrem ÇAKAR, K. Volkan ÖZDOKUR, **Bilal DEMİR**, Elvin YAVUZ, Dilek O. DEMİRKOL, Suna TİMUR, Fatma Nil ERTAŞ, “Molybdenum oxide/Platinum Modified Glassy Carbon Electrode: A Novel Electrocatalytic Platform for the Monitoring of Electrochemical Reduction of Oxygen and Its Biosensing Applications” , Sensors and Actuators B, 2013, 185, 331 – 336.
- **Bilal DEMİR**, Muharrem ŞELECI, Didem AĞ, Serdar ÇEVİK, Esra Evrim YALÇINKAYA, Dilek O. DEMİRKOL, Ülkü ANIK, Suna

TİMUR, “Amine Intercalated Clay Surfaces for Microbial Cell Immobilization and Biosensing Applications”, RSC Advances, 2013, 3, 7513 – 7519.

Ulusal/Uluslararası Toplantılarda Sunulan Bildiriler:

- **Bilal DEMİR**, Muharrem ŞELEÇİ, Didem AĞ, Esra Evrim YALÇINKAYA, Dilek O. DEMİRKOL, Suna TİMUR, “FIA-based Microbial Bio-detector: Design and Application” , 8th. Agean Analytical Chemistry Days, 16 – 20 September 2012, Urla – Izmir/TURKEY (PP)
- İrem ÇAKAR, K. Volkan ÖZDOKUR, **Bilal DEMİR**, Elvin YAVUZ, Süleyman KOÇAK, Dilek O. DEMİRKOL, Suna TİMUR, F. Nil ERTAŞ, “Molybdenum oxide/Platinum modified glassy carbon electrode and its biosensing applications” 10th. International Electrochemistry Meeting, 8-13 September 2013, Selçuk – Konya/TURKEY (**Oral Presentation**)
- K. Volkan ÖZDOKUR, İrem AYDIN, Elvin YAVUZ, Furkan ULUS, Çiğdem ERTEN, **Bilal DEMİR**, Levent PELİT, Suna TİMUR, F. Nil ERTAŞ, “Manganese-oxide/Platinum Modified Glassy Carbon Electrode: An Electrocatalytic Platform for the Monitoring of Electrochemical Reduction of Oxygen and Its Biosensing Application” 6 th. Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 10 – 14 September 2013, Trabzon/TURKEY (PP)
- **Bilal DEMİR**, Filiz DEMİR, Esra Evrim YALÇINKAYA, Dilek O. DEMİRKOL, Suna TİMUR, “Amino acid Intercalated Montmorillonite Scaffolds for Enzymatic Biosensing Applications” 6th. International Workshop on Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing (SMCBS), 8 – 12 November 2013, Łochów/POLAND (PP)
- Suna TİMUR, Emine GÜLER, **Bilal DEMİR**, Cell Culture on Chip, Biyosensör Sistemlerinde Nanopartiküller ve Mikroakışkanlar, Lisansüstü Yaz Okulu, 31 Ağustos-07 Eylül 2014, Bodrum-Muğla, TÜRKİYE. (**Oral Presentation**)
- **Bilal Demir**, Emine Güler, Hakan Coşkunol, Suna Timur, **Bio-investigation of formulated natural products via microfluidic cell**

culture, 2nd Novel fluidic technologies and applications workshop, 9-10 April 2015, Izmir, TURKEY. (**Oral Presentation**)

- Ceren TÜRKCAN, **Bilal DEMİR**, Fırat Barış BARLAS, Süleyman GÜLCEMAL, Dilek ODACI DEMİRKOL, Suna TİMUR, Sinan AKGÖL, "Synthesis and Characterization of Nanoparticles as a Cell Imaging Probe: Usability of Aminoacid Grafted Polymeric Nanoparticles" 9th National Affinity Techniques Symposium AFFTECH 2015, 6-8 September 2015, Mugla, TURKEY.
- **Bilal DEMİR**, Fırat Baris BARLAS, Emine GULER, Zinar Pınar GUMUS, Mustafa CAN, Murat YAVUZ, Hakan COSKUNOL, Suna TIMUR, " Gold nanoparticle Loaded Calendula Phytosomes: Synthesis, Characterization and In vitro Investigations", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- Emine GULER, Huseyin AKBULUT, Guliz BOZOKALFA, **Bilal DEMİR**, Gizem OYMAN EYRILMEZ, Murat YAVUZ, Dilek ODACI DEMİRKOL, Hakan COSKUNOL, Takeshi ENDO, Shuhei YAMADA, Suna TIMUR, Yusuf YAGCI, " Design of Electro and Bioactive Surfaces for Biomolecule and Cell Attachment", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- Huseyin Akbulut, Guliz Bozokalfa, Duygu N. Asker, **Bilal Demir**, Emine Guler, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur and Yusuf Yagci, "Amine-functionalized hybrid conducting copolymer as a biofunctional matrix for biosensing applications", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- F. Barış Barlas, **Bilal Demir**, Emine Guler, Perihan Unak, A. Murat Şenışık, H.Armağan Arıcan, Suna Timur, "Multimodal Theranostic Assemblings: Double Encapsulation of Protoporphyrine-IX/Gd³⁺ in Niosomes", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- **Bilal Demir**, Emine Güler, Fırat Barış Barlas, Hakan Coşkunol, Suna Timur, " Veziküler Sistemlerde Hazırlanmış Bitkisel Ürünler: Hücre Görüntüleme ve Farklı Tedavilerde Kullanılabilecek Doğal Preparatlar", Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinler Arası Yeni Yaklaşımlar, 17-18 Eylül 2015, İzmir/TÜRKİYE.
- Emine Güler, **Bilal Demir**, Fırat Barış Barlas, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coşkunol, Suna Timur, "Biyo-fonksiyonel Yüzeylerin Tasarımı:

Hücre Spesifik Platformlar ve Nano Problar", Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinler Arası Yeni Yaklaşımlar, 17-18 Eylül 2015, İzmir/TÜRKİYE.

- Fırat Barış Barlas, **Bilal Demir**, Emine Güler, Perihan Ünak, Ahmet Murat Şenışık, H.Armağan Arıcan, Suna Timur, "Teranostik Gadolinyum Nanoparçacıkların Tasarımı ve In vitro Uygulamaları", Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinler Arası Yeni Yaklaşımlar, 17-18 Eylül 2015, İzmir/TÜRKİYE.
- Bahar Güler, **Bilal Demir**, Caner Geyik, Fırat Barış Barlas, Mustafa Çiftçi, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coşkunol, Suna Timur, Yusuf Yağcı, "Nano Yapılı Amfifilik Çok Dallanmış Blok Kopolimerlerin Bir Anti-kanser İlaç Modelinin Kontrollü Salımında ‘Kargo’ Molekül Olarak Kullanımı", Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinler Arası Yeni Yaklaşımlar, 17-18 Eylül 2015, İzmir/TÜRKİYE.
- Gizem Oyman Eyrilmez, Sean Doran, Eljesa Murtezi, **Bilal Demir**, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coskunol, Suna Timur, Yusuf Yagci, "Electrochemical Monitoring of Selective Cell Adhesion via RGD modified Bio-active Block Copolymers", 11th Workshop on Biosensors & Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food & Clinical Analysis, 26-30 September 2015, Regensburg/GERMANY.
- Emine Guler, Begum Kinay, Ece D. Aydin, **Bilal Demir**, Baris F. Barlas, Pinar Z. Gumus, Hakan Coskunol, Suna Timur, "Liposomal Fluorescent Probes for Monitoring of Drug Abuse", 11th Workshop on Biosensors & Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food & Clinical Analysis, 26-30 September 2015, Regensburg/GERMANY.
- **Bilal Demir**, Maria Panagiotopoulou, Micheal M. Lemberger, Carlo Gonzato, Bernadette Tse Sum Bui, Suna Timur, Joachim Wegener, Karsten Haupt, "Molecularly Imprinted Polymer Coated Carbon Dots for Cancer Cell Targeting and Imaging", Affinity2017-22nd Meeting of International Society of Molecular Recognition, 25-29 June 2017, Paris/France (**Oral Presentation**).

Kitap Bölümleri:

- Uluslararası Katılımlı Elektrokimya Çalıştayı: Nanoyapı Modifiye Elektrokimyasal ve Biyoelektrokimyasal Sistemler, Sultan, S. C., Anık, Ü., Timur, S., (Ed)/**Bilal Demir**, Fulya Ekiz Kanık, Dilek Odacı Demirkol, "Dendrimerle Modifiye Enzim Elektrotlarının Hazırlanması,

Karakterizasyonu ve İletken Polimerlerin Elektrokimyasal Biyosensör Hazırlanmasında Kullanımı”, 2013.

- III. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, Özlem Karakoç (Ed)/Suna Timur, **Bilal Demir**, Emine Güler, “Biyosensörlerden Lab-on-a-chip sistemlerine”, 2014, Ayvalık/Balıkesir.
- III. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, Özlem Karakoç (Ed)/**Bilal Demir**, Emine Güler, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, “Amperometrik Enzim Sensörleri”, 2014, Ayvalık/Balıkesir.
- Bahar Guler, **Bilal Demir**, Emine Guler, Kadri Gulec, Ozan Yesiltepe, Dilek Odaci Demirkol and Suna Timur, " Targeting and imaging of cancer cells using nanomaterials" Chapter 7 of "Nanobiomaterials in Medical Imaging/Applications of Nanobiomaterials (Volume 8)" Editor: Alexandru Mihai Grumezescu, 2016, Elsevier, pp209-251.
- Emine Guler, **Bilal Demir**, Bahar Guler, Dilek O. Demirkol, Suna Timur, "Biofunctionalized Nanomaterials for Targeting Cancer Cells" Chapter 3 of "Nanostructures for Cancer Therapy" Multivolume set Editor: Alexandru Mihai Grumezescu, 2017, Elsevier *In press*.

Projeler:

- Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) : “Hücre çoğalması üzerine etkili olabilecek seçilmiş bitki ekstraktlarının eldesi ve in vitro testleri: Bitkisel lipozomal preparatlara ilişkin çalışmalar” konulu 13FEN024 No lu proje/**Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Suna Timur**.
- Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı SAN-TEZ projesi: “Veziküler Sistemlerde Hazırlanmış Doğal Ürünler” konulu proje/**Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Suna Timur**. Proje No: 0395.STZ.2013-2
- Ege Üniversitesi Aliye Üster Vakfı: “Hücre proliferasyonunu arttırmaya yönelik altın nanopartiküller ile zenginleştirilmiş bitkisel lipozomal preparatlar” konulu proje/**Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Suna Timur**.

- TÜBİTAK-BİDEB 2214/A Yurtdışı Araştırma Projesi: "Kanser Tanısına Yönelik MIP Problarının Geliştirilmesi ve Biyo-görüntüleme Uygulamaları" / **Proje Yürütücüsü: Bilal Demir.**
- Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) : “Görüntüleme Kılavuzlu ve Tedaviye Yönelik Nanoparçacıkların Sentezi ve *in vitro* Uygulamaları” konulu 17FEN007 No lu proje/**Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Suna Timur.**
- **Tübitak-Bideb Üniversite Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması**, 1. ve 2. aşamalardan sonra proje final sergisi, ‘ *μ -HEALTH ASSISTANT: Biyokimya Testlerinde Mikro Laboratuvarlar*’ 2015.

STAJ DENEYİMLERİ

Kurum	: İstanbul Teknik Üniversitesi – Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji ve Genetik Araştırmalar Merkezi(MOBGAM)
Bölüm	: Biyoteknoloji Laboratuvarı, Bakteriyoloji Laboratuvarı
Kurum	: Malatya Gözde Hastanesi
Bölüm	: Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı

ÖDÜLLER

- **En iyi poster ödülü:** Emine GULER, Huseyin AKBULUT, Guliz BOZOKALFA, **Bilal DEMİR**, Gizem OYMAN EYRILMEZ, Murat YAVUZ, Dilek ODACI DEMIRKOL, Hakan COSKUNOL, Takeshi ENDO, Shuhei YAMADA, Suna TIMUR, Yusuf YAGCI, " Design of Electro and Bioactive Surfaces for Biomolecule and Cell Attachment", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- **BİDEB - 2214/A** Doktora Sırası Yurtdışı Araştırma Bursu (2016-2017; 9 ay) - Université de Technologie de Compiègne, Yurtdışı danışmanı: Prof. Karsten Haupt.

- **Genç Araştırmacı Ödölü** - Ödöl "Molecularly Imprinted Polymer Coated Carbon Dots for Cancer Cell Targeting and Imaging" başlıklı sözlü sunuma ithafen Affinity2017 sırasında "International Society of Molecular Recognition" tarafından verilmiştir. Affinity2017-22nd Meeting of International Society of Molecular Recognition" Paris/France.

