



**KANSERE KARŞI ÇOK YÖNLÜ TEDAVİ ARACI
OLARAK MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Kübra SOLAK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Doktora Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK BİLİM DALI

**KANSERE KARŞI ÇOK YÖNLÜ TEDAVİ ARACI OLARAK
MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

(Development of Magnetic Nanoparticles
as a Versatile Treatment Tool Against Cancer)

DOKTORA TEZİ

Kübra SOLAK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Erzurum
Ağustos, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Kübra Solak tarafından hazırlanan “Kansere Karşı Çok Yönlü Tedavi Aracı Olarak Manyetik Nanopartiküllerin Geliştirilmesi” başlıklı çalışması 25/08/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı, Nanobilim ve Nanomühendislik Bilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet MAVİ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Esin ÇETİN <i>İstanbul Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Adem Kara <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliđi’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan Ceyhun

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma TÜBİTAK 1001 ve Atatürk Üniversitesi BAP kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: Tübitak-120Z958, BAP-12277

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet MAVİ danışmanlığında sunulan “Kansere Karşı Çok Yönlü Tedavi Aracı Olarak Manyetik Nanopartiküllerin Geliştirilmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	5	30
Kuramsal Temeller	2	30
Materyal ve Yöntem	3	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	2	20
Sonuç ve Öneriler	14	20
Tezin Geneli	4	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'ten büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Kübra SOLAK	Prof. Dr. Ahmet MAVİ
25.8.2023	25.8.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Kendisine danıştığım her an kıymetli zamanını bana ayıran, güler yüzüyle beni her daim destekleyen, değerli danışmanım, Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ'ye tezin her aşamasında sunduğu destek, gösterdiği yardımseverlik ve katkıları için teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve desteklerini benden hiç esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN başta olmak üzere bütün DAYTAM (Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) personelleri ve yönetimine, her tez izleme komite raporu sürecinde bana vakit ayırıp çalışmamı yönlendiren Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU ve Sayın Doç. Dr. Yağmur ÜNVER hocalarıma teşekkür ederim. Akış sitometri testlerinde bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Esin Çetin hocama rehberliği için teşekkür ederim. Bana laboratuvarının kapılarını açıp, akademik gelişimime büyük katkı sağlayan Sayın Associate Prof. Dr. Tae-Hyung Kim (김태형)'e şükranlarımı sunarım.

Doktora sürecimde tarafıma Yükseköğretim Kurulu (YÖK, 100/2000) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) bünyesinde faaliyet gösteren Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB, 2211-A) tarafından burs sağlanmıştır. Bu değerli destekleriniz, akademik yolculuğumun şekillenmesinde ve başarıyla sonuçlanmasında büyük rol oynamıştır. Tez çalışmamı 120Z958 numaralı proje ile destekleyen TÜBİTAK ve 12277 numaralı proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bugüne kadar benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, eğitim hayatım boyunca sabır, anlayış ve fedakârlıkla beni destekleyen, geceleri yolumu gözleyen, bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KANSERE KARŞI ÇOK YÖNLÜ TEDAVİ ARACI OLARAK MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Kübra SOLAK

Danışman: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Amaç: Bu çalışmada, hücre ölüm bozukluğu ile karakterize heterojen bir hastalık olan kansere karşı kemoterapi, immünoterapi ve manyetik hipertermi (MHT)'yi içeren nanoteknoloji temelli çok yönlü bir tedavi önerisi sunmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, nispeten düşük sıcaklıklarda (39 °C) uygulanan MHT'nin, ilaç ve DNA yüklü nanoparçacıklar (NP) ile birleştirilmesiyle daha etkin bir kanser hücre ölümünün gerçekleşmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada gözenekli silika ile kaplanmış çinko-demir oksit NP'ler üretildi. Gözeneklere doksorubisin (DOX) molekülü yüklendikten sonra yapıya hedefleme molekülü olan folik asit ile modifiye edilmiş olan polietilen imin (PEI) ve interferon uyarıcı DNA (ISD) dâhil edildi. Elde edilen yapı DINP olarak adlandırıldı ve TEM, SEM, XRD, XPS ve UV spektroskopisi gibi teknikler ile karakterize edildi. Çalışma, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ve kanser hücre hattı olmayan MCF-10A hücreleri ile yürütüldü. NP'lerin hücre alımı konfokal mikroskopisi ve akış sitometri ile ortaya kondu. Manyetik hipertermi uygulaması için örnekler, belirli sürelerde sabit AC manyetik alan altında tutuldu. Uygulamaların sitotoksikite ve anti-proliferatif etkilerinin yanı sıra apoptotik durumları ve neden olduğu oksidatif stres belirlendi.

Bulgular: Elde edilen TEM ve SEM verilerine göre yaklaşık 100 nm çekirdek-kabuk NP'ler üretildi. Pozitif yük dengesi ve yükleme etkinliği göz önüne alınarak, DINP hazırlamak için 1 µg ISD, 50 µg PEI-FA ve 250 µg NP kullanımının uygun olduğu bulundu. Hücrelerin 2 saat içinde %90'ın üzerinde NP aldığı belirlendi. Uygulamadan 3 saat sonra hücre içi ilaç miktarının terapötik düzeyde olduğu belirlendi. NP uygulamasından 2 saat sonra MHT uygulanmasının ideal olduğu belirlendi.

Sonuç: Önerilen çoklu terapi neticesinde MDA-MB-231 ve MCF-7 kanser hücre hatlarında, sağlıklı hücre hattı olan MCF-10A hücrelerine göre daha fazla oksidatif stres ve hücre ölüm görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: meme kanseri, kemoterapi, immünoterapi, manyetik hipertermi, çoklu terapi.

Ağustos 2023, 131 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

DEVELOPMENT OF MAGNETIC NANOPARTICLES AS A VERSATILE TREATMENT TOOL AGAINST CANCER

Kübra SOLAK

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Purpose: In this study, it is aimed to propose a nanotechnology-based multifaceted treatment approach including chemotherapy, immunotherapy, and magnetic hyperthermia (MHT) against cancer, which is a heterogeneous disease characterized by cell death disorder. For this purpose, it is targeted to achieve a more effective cancer cell death by combining MHT applied at relatively low temperatures (39 °C) with drug and DNA-loaded nanoparticles (NP).

Method: In this study, mesoporous silica coated zinc-iron oxide NPs were synthesized. Following loading of the doxorubicin molecule into the pores, the interferon-stimulatory DNA (ISD) complex and targeting molecule which is folate modified polyethylene imine (PEI) were added to the structure to form a functionalized construct. The resulting structure, shortly named as DINP, was characterized using techniques such as TEM, SEM, XRD, XPS, and UV spectroscopy. The study was conducted using MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines, as well as non-tumorigenic MCF-10A cells. The cellular uptake of NPs was demonstrated through confocal microscopy and flow cytometry. Samples were kept under constant AC magnetic field for specific period of time for the application of magnetic hyperthermia. In addition to assessing cytotoxicity and proliferative effects of the treatments, apoptotic statuses and oxidative stress were determined.

Findings: Based on the obtained TEM and SEM data, core-shell NPs of approximately 100 nm were synthesized. Considering the positive charge of NPs and drug loading efficiency, it was found that for DINP preparation, 1 µg of ISD, 50 µg of PEI-FA, and 250 µg of NPs were suitable. It was determined that cellular uptake percentage was over 90% of the NPs within 2 hours. Three hours after administration, the intracellular drug level was found to be at a therapeutic level. MHT application was found to be optimal 2 hours after NP administration.

Results: As a result of the proposed multiple therapy, more oxidative stress and cellular death were observed in MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cell lines compared to healthy cell line MCF-10A cells.

Keywords: breast cancer, chemotherapy, immunotherapy, magnetic hyperthermia, combination therapy.

August, 2023, 131 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY TUTANAĞI	i
ETİK BİLDİRİM ve İNTİHAL BEYAN FORMU	i
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
GİRİŞ.....	1
Tez Çalışmasının Hedefleri	4
Araştırma Soruları	4
Araştırmanın Önem ve Gerekçesi.....	5
KURAMSAL TEMELLER.....	6
Tümör Mikro Çevresi	6
Kanser Terapi Modelleri.....	8
Kemoterapi (ilaçlı tedavi).....	8
İmmünoterapi (bağışıklık sistemi elemanları ile tedavi)	10
Hipertermi (sıcaklığın artırılması).....	12
Nanoparçacıkların Kanser Tedavilerindeki Yeri	16
İnterferonların İmmünoterapideki Rollerini	22
Kanser Hücre Ölümü Yolları.....	25
Apoptoz	28
Ferroptoz.....	29
Diğer hücre ölüm yolları	30
MATERYAL ve METOT	32
Protokol Tasarımı ve Materyal Seçimi.....	32
Taşıyıcı Nanoyapının Hazırlanması	33
Manyetik nanoparçacıkların (MNP) üretimi ve karakterizasyonu	33

MNP'nin mezoporöz silika ile kaplanması (MSNP üretimi)	35
Floresan molekül ile işaretli MSNP'ler	38
Polietileniminin-folik asit üretimi	38
İlaç yükleme	39
DNA yüklenmesi	41
DOX salım testleri	42
DINP kararlılığının araştırılması	42
Hücre Kültürü Çalışmaları.....	42
ISD'nin kontrolü.....	43
Hücre canlılığı ve sitotoksosite	44
Hücre alım.....	44
Hücre içi DOX salımı	46
Apoptotik İndeksin Araştırılması	46
Oksidatif Stresin Araştırılması	46
Manyetik Hipertermi (MHT) Çalışmaları	47
İstatistiksel Analizler	47
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	48
Taşıyıcı Nanoyapının Hazırlanması	48
Hedefleme Molekülünün Hazırlanması ve DNA Bağlama Kapasitesi	58
İlaç ve DNA Yüklü Yapılar.....	67
DOX yükleme.....	68
Salım Deneyleri.....	73
DINP Üretme.....	74
DINP Kararlılığı	77
Hücre Kültürü Çalışmaları.....	79
Hücre Canlılığı ve Sitotoksik Aktivite	81
Hücre Alım.....	87
Hücre İçi DOX Salımı	95
Manyetik Hipertermi ve Çoklu Terapi Uygulaması	96
Apoptotik İndeks	98
Oksidatif Stres Durumu	101
İnterferon Tespiti	104
SONUÇ ve ÖNERİLER	107
KAYNAKLAR.....	109

ÖZGEÇMİŞ.....	130
---------------	-----



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hücre Hatları ve Hücrelerin Büyüme Ortamları.	43
Tablo 2. DLS Analizi Sonuçları.	73
Tablo 3. Farklı Miktarlarda Hazırlanan Örneklerin Zeta Potansiyel Değerleri.	75
Tablo 4. DOX Uygulamasına Ait IC50 Değerleri (μM).....	82



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Çalışmada takip edilen adımlar.....	3
Şekil 2. Normal meme dokusu ve meme kanseri mikroçevresinde gözlenen bazı değişiklikler.	7
Şekil 3. Kanser hücrelerinin direnç mekanizmaları	9
Şekil 4. Normal durumda ve ısı şok durumunda HSP70'in gen düzenleme mekanizması	13
Şekil 5. Tasarlanmış nanomalzemelerin (ENM) bileşenleri, kristal yapıları, boyutları ve yüzey özellikleri değiştirilerek farklı malzemeler üretilebilir.....	17
Şekil 6. NP'lerin vücut içinde temizlenme sürecini ve tümör mikroçevresi veya mukus tabakaları gibi yerel engellerle nasıl etkileşimde bulunduğunu belirleyen faktörler, boyut, şekil, yük ve yüzey kaplaması gibi faktörlerdir.	18
Şekil 7. Terapötik yaklaşımlar için tasarlanan süperparamanyetik nanoparçacıklar.	19
Şekil 8. Tümüleşik (kombine, birleşik) yaklaşımların avantajları	22
Şekil 9. STING bağımlı doğal bağışıklık sinyalinin oluşması.	24
Şekil 10. Hücre ölüm mekanizmaları.	25
Şekil 11. Temel programlanmış hücre ölümü (RCD) yolları.	26
Şekil 12. Hücre ölümünün immünojenikliği için farklı gereksinimler.	27
Şekil 13. Tümöröjenize karşı hücre ölüm modları ve bu mekanizmalarda rol alan başlıca proteinlere ait genlerin ekspresyon değişimi.	28
Şekil 14. Sağ kalım sinyalleri, bağışıklık hücreleri ve tümör mikro ortamı ile apoptoz sinyal yollarının genel görüntüsü.	29
Şekil 15. Ferroptozisin 4 kategoriye ayrılmış mekanizmasının şematik gösterimi.....	30
Şekil 16. Apoptoz, nekroptoz ve piroptoz hücre ölüm mekanizmalarının şematik gösterimi.	31
Şekil 17. Tez çalışmasında kullanılan bileşenlerin sembolik gösterimleri.	33
Şekil 18. Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm nanoparçacıkların üretildiği reaksiyon düzeneği (Schlenk sistemi).....	34
Şekil 19. CTAB ve MNP yüzeyindeki oleatlar arasında gerçekleşen hidrofobik etkileşimler.....	36
Şekil 20. Manyetik çekirdek, silika kabuk ve en son elde edilen manyetik mezoporöz silika nanoparçacıkların temsili gösterimi.	37
Şekil 21. Folik asit (FA) bağlı dallı polietilenimin (PEI) yapısını temsili çizimi.	39
Şekil 22. Doksorubisin hidrokloritin kimyasal yapısı (Medchemexpress).	40
Şekil 23. Mezoporöz manyetik silika nanoparçacıkların (MSNP) doksorubisin (DOX) ile yüklenmesine (MSNP-DOX) ve bu yapının APTES ile kabuk modifikasyonuna (MSNP-DOX-NH ₂) ait temsili gösterim.....	41
Şekil 24. DNP üretim şeması.	42
Şekil 25. İnkübatör içinde mıknatıs ile NP muamelesine ait görüntü.	45
Şekil 26. MHT uygulaması için kullanılan cihaza ait fotoğraf.	47

Şekil 27. A. Üretilen çinko-demir oksit manyetik nanoparçacıkların X ışını kırınım deseni ve B. Hekzan içerisinde dağıtılmış çinko-demir oksit manyetik nanoparçacıkların fotoğrafı.	49
Şekil 28. Üretilen $ZnFe_2O_4$ manyetik nanoparçacıkların X-Işını fotoelektron spektroskopi sonuçları.	50
Şekil 29. Üretilen $ZnFe_2O_4$ manyetik nanoparçacıkların A. Geçirimli elektron mikroskop görüntüleri ve bu görüntülerden çizilen boyut dağılımına ait B. histogram grafiği.	51
Şekil 30. $ZnFe_2O_4$ MNP'lerin (1 mg/ml, 0,5 ppm Fe) AC manyetik alan altındaki davranışı.	51
Şekil 31. $ZnFe_2O_4$ MNP'lerin (1 mg/ml, 0,5 ppm Fe) AC manyetik alan altında kaydedilen termal kamera görüntüsü.	52
Şekil 32. VSM opsiyonlu Quantum Design PPMS 9T ile kaydedilen $ZnFe_2O_4$ MNP'lerin manyetizasyon ölçümüne ait grafik.	53
Şekil 33. CTAB ile karıştırılıp su faza alınan oleik asit ile stabilize $ZnFe_2O_4$ MNP'ler.	53
Şekil 34. Gözenekli (CTAB uzaklaştırılmış) ve gözeneksiz (CTAB içeren) MSNP'lere ait FTIR spektrumu.	55
Şekil 35. Gözenekli çekirdek/kabuk yapısına sahip MSNP'lerin A. TEM, B. SEM görüntüsü ve C. su içinde dağıtılmış hali (1 mg/ml MSNP).	55
Şekil 36. MSNP'lere ait BET izoterm eğrisi.	56
Şekil 37. AC manyetik alana maruz kalan MSNP solüsyonlarının sıcaklık-zaman grafikleri. Solüsyonların başlangıç sıcaklığı A. oda şartlarıdır ve B. 36,5 °C'dir.	57
Şekil 38. VSM opsiyonlu Quantum Design PPMS 9T ile kaydedilen MSNP'lere ait manyetizasyon ölçümü grafiği.	57
Şekil 39. PBS içinde seyreltilmiş TRITC işaretli MSNP'lere (mg/ml) ait floresan spektrum ve UV ışık altında kuyuların fotoğrafı.	58
Şekil 40. 1 mg/ml PEI ve PEI-FA sulu çözeltilerine 1 M HCl ilavesi sonucu ölçülen pH değerleri.	60
Şekil 41. PEI ve PEI-FA moleküllerinin sulu çözeltilerinin (1 mg/ml) UV spektrofotometre ile dalga boyu tarama sonuçları.	61
Şekil 42. Folik asit, polietilenimin ve folik asit bağlı polietilenimine (PEI-FA) ait FTIR spektrumu.	62
Şekil 43. Farklı ortamlarda çözülen PEI-FA'nın zeta potansiyel değeri.	63
Şekil 44. DNA ve PEI-FA etkileşimine ait zeta potansiyel sonuçları.	64
Şekil 45. Farklı çözücü ortamların, PEI-FA ve DNA etkileşimine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	65
Şekil 46. PEI-FA'nın DNA bağlama yeteneğini gösteren farklı PEI-FA/DNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	66
Şekil 47. PEI-FA'nın DNA bağlama yeteneğine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	67
Şekil 48. PEI-FA/DNA'ya (50 oranı ve 1 µg DNA) ait SEM görüntüsü.	67
Şekil 49. DOX solüsyonlarına (nM) ait A. floresan spektrumu ve B. standart grafik.	68
Şekil 50. MSNP'ye DOX yükleme sonuçları.	69
Şekil 51. MSNP'lere ait A. FTIR spektrumu, B. TEM görüntüsü (MSNP-DOX-NH ₂), C. ve D. Sırasıyla MSNP-NH ₂ ve MSNP-DOX-NH ₂ 'ye ait SEM görüntüleri.	70

Şekil 52. MSNP-NH ₂ ve MSNP-DOX-NH ₂ içeren sıvıların floresan mikroskop görüntüleri.	71
Şekil 53. DOX, MSNP-NH ₂ ve MSNP-DOX-NH ₂ içeren solüsyonların dalga boyu-absorbans grafiği.	72
Şekil 54. MSNP-NH ₂ 'den DOX salımına ait floresan spektrofotometre ölçüm sonucu.....	74
Şekil 55. PEI-FA/DNA (50, w/w) ile karıştırılan MSNP-NH ₂ 'nin zeta potansiyel değerleri..	75
Şekil 56. DNP'a ait SEM görüntüsü.	76
Şekil 57. MSNP-NH ₂ 'nin DNA bağlama yeteneğine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. ..	77
Şekil 58. DNP kararlılığına ait hidradinamik çap ölçümü.	79
Şekil 59. A. Meme dokusu hücre yerleşimi ve B. Bu tez çalışması sırasında ters (invert) mikroskop ile görüntülenen hücreler.	80
Şekil 60. PEI-FA (µg/ml) uygulanan hücrelerin, hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05	81
Şekil 61. Doksorubisin (µM) uygulanmış hücrelere ait hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05	82
Şekil 62. MSNP-NH ₂ (µg/ml) uygulanmış hücrelere ait hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05	83
Şekil 63. MSNP-DOX-NH ₂ (µg/ml) uygulanmış hücrelere ait hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05	84
Şekil 64. ISD uygulanan hücrelerin, hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05	85
Şekil 65. PEI-FA+ISD uygulanan hücrelerin, hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05.....	86
Şekil 66. DOX içeren ve içermeyen MSNP'ler ile hazırlanan DNP yapılarının uygulandığı hücrelerin hücre canlılığı grafiği.	87
Şekil 67. MCF-10A hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri ve ImageJ ile ölçülen TRITC sinyal şiddetine ait grafik.....	88
Şekil 68. MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri ve ImageJ ile ölçülen TRITC sinyal şiddetine ait grafik.....	89
Şekil 69. MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri ve ImageJ ile ölçülen TRITC sinyal şiddetine ait grafik.	90
Şekil 70. MCF-10A hücrelerinin farklı sürede mıknatıs üzerinde inkübasyonuna ait görüntüsü.	91
Şekil 71. MCF-7 hücrelerinin farklı sürede mıknatıs üzerinde inkübasyonuna ait görüntüsü.	92
Şekil 72. MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sürede mıknatıs üzerinde inkübasyonuna ait görüntüsü.	92
Şekil 73. Hücre içi MSNP-TRITC@PEI-FA miktarının zaman bağımlı akış sitometri sonucu.	94
Şekil 74. Hücre içi DOX salımına ait akış sitometri sonuçları.	95
Şekil 75. Çoklu terapi uygulanmış hücrelerin CCK-8 testi ile elde edilen absorbans değerlerinin karşılaştırmasına ait grafik.....	97
Şekil 76. AC manyetik alan uygulamasına ait fotoğraf.....	98
Şekil 77. MSNP-NH ₂ uygulanmış hücrelerin AC manyetik alan altında 2 saat tutulduktan 48 saat sonra apoptozis testine ait akış sitometri sonuçları.	99
Şekil 78. Çoklu terapi uygulanmış hücrelerin AC manyetik alan altında 2 saat tutulduktan 48 saat sonra apoptozis testine ait akış sitometri sonuçları.	100
Şekil 79. Uygulama yapılmış hücrelere ait mikroskop görüntüleri.....	101

Şekil 80. MSNP-NH ₂ uygulanmış hücrelerin AC manyetik alan altında belirli süre tutulduktan 48 saat sonra oksidatif stres durumuna ait akış sitometri sonuçları.	103
Şekil 81. Çoklu terapi uygulanmış hücrelerin 48 saat sonundaki oksidatif stres durumu.....	104
Şekil 82. LyoVec ile ISD uygulanmış hücrelerin IFN ölçümüne ait ELISA sonucu.....	105
Şekil 83. ISD içeren MSNP-NH ₂ uygulanmış hücrelerin besi ortamından ölçülen IFN β miktarı.	106



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

bç	Baz çifti
BRCA	Meme kanseri geni (breast cancer gene)
DC	Dentritik hücre
DINP	DOX ve ISD yüklü MSNP
DNA	Deoksirübo nükleik asit
DNP	DOX yüklü MSNP
DOX	Doksorubisin
DPBS	Dulbecco'nun fosfatlı tuzlu tuzu
ER	Östrojen reseptörü
FA	Folik asit
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IFN	İnterferon
INP	ISD yüklü MSNP
ISD	İnterferon uyarıcı DNA
MHT	Manyetik hipertermi
MNP	Manyetik nanoparçacıkları
MSNP	Manyetik silika nanoparçacıkları
PEI	Polietilenimin
PR	Progesteron reseptörü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

Simgeler

β	Beta
$^{\circ}$	Derece
g	gram
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mV	Milivolt
M	Molar
nm	Nanometre
C	Santigrat
V	Volt

GİRİŞ

Global bir sorun olan kanser hastalığının, Türkiye’de olduğu gibi tüm dünyada en yaygın görülen ilk iki türü, akciğer ve meme kanserleridir. Dünya genelinde ve ülkemizde meme kanseri vaka sayısı her geçen yıl artmaktadır, öyle ki 2002-2019 yılları arasında meme kanseri vakaları %74,84 oranında artış göstermiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2020; WHO, 2018). Sadece 2018 yılı içinde, Türkiye’de, 5.452 kişi meme kanseri nedeniyle yaşamını yitirmiştir (WHO, 2018). Bu rakamlara karşın özellikle erken teşhis ve artan tedavi tecrübesi, birçok yaşamın kurtulmasına vesile olmaktadır (Miller et al., 2022).

Meme kanseri, akciğer ve cilt kanseri gibi beyne yayılabilen (metastaz yapan) ve böylece beyin tümörü gelişiminde rol alan (hastaların en az %10-16’sı) yayılmacı bir kanser türüdür (Leone & Leone, 2015). Kanserın başlaması ve gelişmesi için bir hücre içinde hem tümör baskılayıcıların inaktivasyonu hem de onkojenik (kanseri yapıcı) mutasyonların¹ ortaya çıkması gerekir. Meme kanseri, morfolojik ve patolojik özelliklerinde önemli değişkenlik gösteren heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri, gen ekspresyon profillerine göre farklı moleküler alt tiplere sahiptir (Mota et al., 2017; Yee et al., 2023). En yaygın görülen bu moleküler alt tipler; luminal A, luminal B, HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) pozitif ve üçlü negatif (TNBC) kanserlerdir (Harbeck et al., 2019). Luminal A kanseri, östrojen reseptörü pozitif (ER pozitif) ve progesteron reseptörü pozitif (PR pozitif) hücrelerden oluşur. Bu kanser türü, diğer moleküler alt tiplerine göre daha düşük hücre bölünme oranına sahiptir ve genellikle daha iyi bir prognoz gösterir. Luminal B kanseri, ER pozitif hücrelerden oluşur, ancak PR pozitif olmayabilir. Bu kanser türü, luminal A kanserine göre daha yüksek bir hücre bölünme oranına sahiptir ve daha agresiftir. HER2-pozitif kanser hücrelerinde aşırı miktarda HER2 proteini üretilir. Bu kanser türü, diğer moleküler alt tiplerden farklı bir tedavi yaklaşımı gerektirir. Son olarak TNBC ise hem ER hem de PR reseptörleri negatif olan hücrelerden oluşur ve HER2 proteinine de sahip değildir. Bu kanser türü diğer moleküler alt tiplerden daha agresif olabilir ve bu türün tedavi seçenekleri sınırlıdır. Özetle, meme kanserinin moleküler özellikleri arasında yer alan HER2, ER ve/veya PR reseptörlerinin aktivasyonu ve/veya BRCA (breast cancer gene) mutasyonları hastalığın eğilimini belirlemektedir (Harbeck

¹ Genetik materyallerde meydana gelen kalıcı değişiklikler. Çevresel faktörler, kimyasal maddeler, radyasyon veya hatalı DNA replikasyonu gibi çeşitli etmenler mutasyonlara neden olabilir.

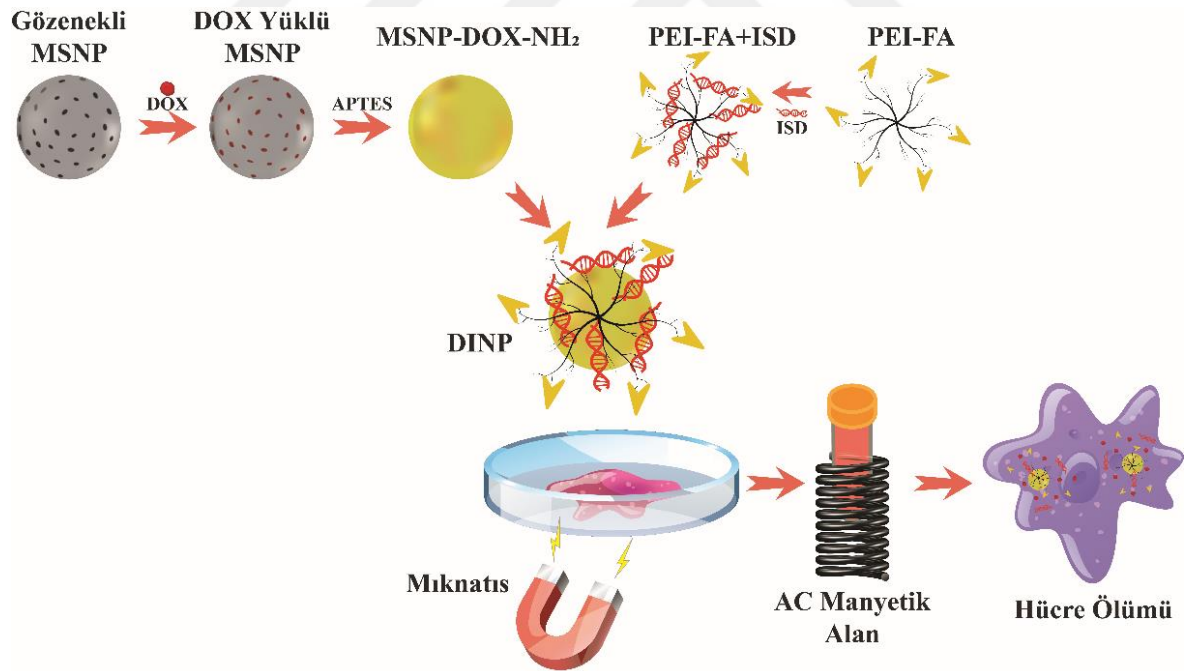
et al., 2019). Meme kanserinin bahsedilen bu moleküler alt tipleri, kanserin tanısı, prognozu ve tedavisi için önemlidir. Kanser tedavileri, kanser hücrelerini öldürmek veya kontrol altına almak için kullanılan çeşitli yöntemlerden oluşur. Kanserin türüne, evresine ve hastanın sağlık durumuna bağlı olarak tedavi planı belirlenir. Kanser tedavileri arasında kemoterapi, radyoterapi, cerrahi müdahale ve immünoterapi gibi çeşitli seçenekler bulunur.

Kanser hastalığının moleküler düzeyinin aydınlatılmaya başlanması ile araştırmaların odağı, tümör kitlesinden tümörün biyolojik karakterine doğru kaymıştır. Bu açıdan bireye özgü tasarlanmış, hastada belirmiş tümör kitlesindeki hücreye odaklanan bir kanser tedavisinde başarı oranının arttığı bilinmektedir. Bunun yanında, meme kanseri genel olarak heterojen bir hastalık olduğu için etkili bir tedavi hedeflendiğinde multidisipliner yaklaşımlar göz ardı edilmemelidir. Meme kanseri, yayılcı (metastatik) değilse ve erken teşhis edilmesi halinde %70-80 oranında tedavi edilebilir (Harbeck et al., 2019). Günümüzde meme kanserinin kontrol altına alınmasında iki önemli yaklaşım kullanılmaktadır; bölgesel (cerrahi ve radyasyon tedavisi) müdahale ve sistemik tedavi. Kanser moleküler karakteri, hangi tedavi yaklaşımının seçileceğini büyük ölçüde etkilemektedir. Sistemik tedaviler arasında endokrin tedavisi, kemoterapi, HER2 pozitif hastalar için anti-HER2 tedavisi ve son zamanlarda immünoterapi yer almaktadır (Harbeck et al., 2019). Öte yandan, mevcut tedaviler, yayılcı meme kanserinin tedavisi için tam anlamıyla yeterli değildir. Bu tip hastalarda mevcut tedaviler, semptomları kontrol altında tutmayı, yaşam süresini uzatmayı ve bir nebze dahi olsa hastanın yaşam kalitesini artırmayı hedefler. Yürütülen birçok çalışma bu hedefler doğrultusunda planlanmaktadır.

Terapötik yaklaşımların birlikte kullanımı şeklinde önerilen çoklu tedaviler, hastalıkların klinik yönetimini güçlendirmektedir (Farokhzad & Langer, 2006). Özellikle kanser gibi çok yönlü ve tedavilere dirençli türleri olan bir hastalık ile mücadelede, hastalığa birçok açıdan tek seferde yıkıcı vuruş yapabilmek tedavi etkinliğini artırmaktadır. Örneğin, hedef dokuda sıcaklık artışı ile tedaviyi amaçlayan hipertermi ve hastanın kendi savunma sistemini kullanan immünoterapinin diğer tedaviler (kemoterapi, radyoterapi vb.) ile birleştirilmesi tedavilerin etkinliğini artırmaktadır. Özellikle immünoterapi, kanser tedavisinde kullanılan cerrahi, kemoterapi, hipertermi, radyoterapi veya hedefe yönelik tedavilerin etkinliklerini artırmaktadır (D. S. Chen & Mellman, 2013). Diğer yandan kemoterapi uygulaması hipertermi ile desteklendiği takdirde, kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına duyarlılığı artırılmaktadır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda kemoterapi, hipertermi ve immünoterapinin eş zamanlı uygulanabileceği bir tedavi modeli, meme kanserine karşı etkin bir muamele olabilir. Bu tez

çalışmasının ana kapsamı Şekil 1’de gösterilmiştir. Öncelikle meme kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı kullanılan doksorubisin (DOX) isimli bir kemoterapötik ilaç ve immünoterapötik etki oluşturmak için interferon (IFN) uyarıcı DNA (ISD) molekülü, manyetik silika nanoparçacıklara (MSNP) yüklendi. ISD, hücre içi DNA sensör protein ağının merkezinde yer alan STING (interferon genlerinin uyarıcısı, STING1, ERIS, MITA, MPYS, NET23, SAVI, hMITA, hSTING, Stimulator of interferon genes, transmembrane protein 173, STING-beta, TMEM173, stimulator of interferon response cGAMP interactor 1) proteinini üzerinden proinflatuar gen ekspresyonunu indükleyen ticari bir çift zincirli DNA (dsDNA) dizisidir. Ayrıca, taşıyıcı MSNP platformunun yapısındaki manyetik özellikli NP’ler, AC (alternatif akım) manyetik alan altında sıcaklığın yükselmesini sağlayarak manyetik hipertermi (MHT) aracı olarak kullanıldı. Hedefe özgü taşıma yapabilmek üzere NP’ler, folik asit (FA) ile modifiye edildi. Bu adımda yapının kararlılığını artırmak ve ISD yüklemesini kolaylaştırmak için katyonik bir polimer olan polietilenimin (PEI), aracı molekül olarak kullanıldı. Elde edilen PEI-FA ile modifiye edilmiş, DOX ve ISD yüklenmiş MSNP yapısı kısaca **DINP** olarak adlandırıldı. Bu çalışmada, MHT ile desteklenen DINP terapisinin hedefi olarak meme kanseri seçildi.



Şekil 1. Çalışmada takip edilen adımlar.

MSNP: Mezoporöz manyetik silika nanoparçacıklar, DOX: doksorubisin, ISD: İnterferon uyarıcı DNA, FA: folik asit, PEI: polietilenimin, DINP: DOX ve ISD yüklenmiş ve PEI-FA ile modifiye edilmiş MSNP.

Bu çalışmada, hücre ölüm bozukluğu ile karakterize heterojen bir hastalık olan kansere karşı; kemoterapi, immünoterapi ve manyetik hipertermi (MHT)’yi içeren nanoteknoloji temelli çok yönlü bir tedavi önerisi sunmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, nispeten düşük

sıcaklıklarda (39 °C) uygulanan MHT'nin, ilaç ve DNA yüklü nanoparçacıklar (NP) ile birleştirilmesiyle daha etkin bir kanser hücre ölümünün gerçekleşmesi hedeflenmiştir.

Tez Çalışmasının Hedefleri

Bu tez çalışmasının hedefleri aşağıda sıralanmıştır.

- Güçlü manyetik özelliği nedeniyle AC manyetik alan altında tutulduğunda bulunduğu ortamın sıcaklığını yükseltebilen çinko-demir oksit MNP'ler üretmek,
- Geniş yüzey alanına sahip ve 100 nm'den küçük mezogözenekli silika kabuk ile MNP'leri kaplanmak,
- Hedefleme molekülü olan FA'yı, nükleik asit aktarımı amacıyla kullanılan katyonik polimer olan PEI'ye kovalent olarak bağlamak,
- Kemoteropötik DOX ilacını MSNP'lere yüklemek,
- İmmünoterapi ajanı olan ISD'yi PEI-FA'ya yüklemek,
- DOX yüklü MSNP'lere ISD yüklü PEI-FA'yı ekleyerek nihai yapı olan DNP yapısını elde etmek,
- DNP'in miknatis yardımıyla hücreler tarafından alımını ve dolayısıyla hücre içinde DOX ve ISD salımını artırmak,
- MHT ile desteklenmiş DNP uygulaması (DNP+MHT) ile kanser hücrelerini daha etkili şekilde öldürebilmektir.

Araştırma Soruları

Bu tez çalışmasında aşağıdaki sorulara cevap aranmıştır:

1. DOX ve ISD, birlikte tek bir taşıyıcıya yüklenebilir mi ve eş zamanlı taşınarak hücre içinde salımı gerçekleşebilir mi?
2. Toksik olmayan düzeyde DOX yüklü MSNP (DNP), ISD yüklü MSNP (INP) veya MHT, üçlü olarak (DNP+MHT) uygulandığında kanser hücreleri üzerinde etkili bir sitotoksikite sergileyebilir mi?
3. NP'lerin yüzeyine yapılan folik asit konjugasyonu, DNP'in hücre alımını ve üçlü terapinin etkinliğini MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri (kansere hücre hatları) üzerinde artırırken MCF-10A (tümörjenik olmayan hücre hattı) üzerindeki etkiyi azaltabilir mi?

Araştırmanın Önem ve Gerekçesi

Bilim insanları bağışıklık sisteminin kanserle mücadele yeteneğine tamamen hâkim olmasalar da immünoterapi, birçok kanser hastasının yaşam süresini uzatmaya ve hayatını kurtarmaya yardımcı olan bir destek tedavi modelidir. Genellikle meme kanseri gibi lokal ilerlemiş kanseri olan hastalar kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale ile tedavi edilmektedir. İmmünoterapi, mevcut kanser tedavilerinin daha etkili, kişiye özgü, yan etkisi daha az olma potansiyellerini güçlendirmektedir. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen NP'ler manyetik özelliklerinden dolayı takip (vücut içindeki dağılımı) ve de kanser için tedavi imkânı sunan bir araçtır. Bu tez çalışmasında yer alan DNP+MHT uygulaması ile kanser hücre ölümüne karşı sık kullanılan üç terapi taktiği birleştirildi ve ayrı ayrı uygulandığında hücrelerde gözlenen direnç (kemo-direnç veya termal rezistans gibi) mekanizmaları inaktive edilerek daha etkin bir kanser hücre ölümü gerçekleştirildi. Literatür taraması yapıldığında, önerilen üçlü tedavi yaklaşımını içeren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

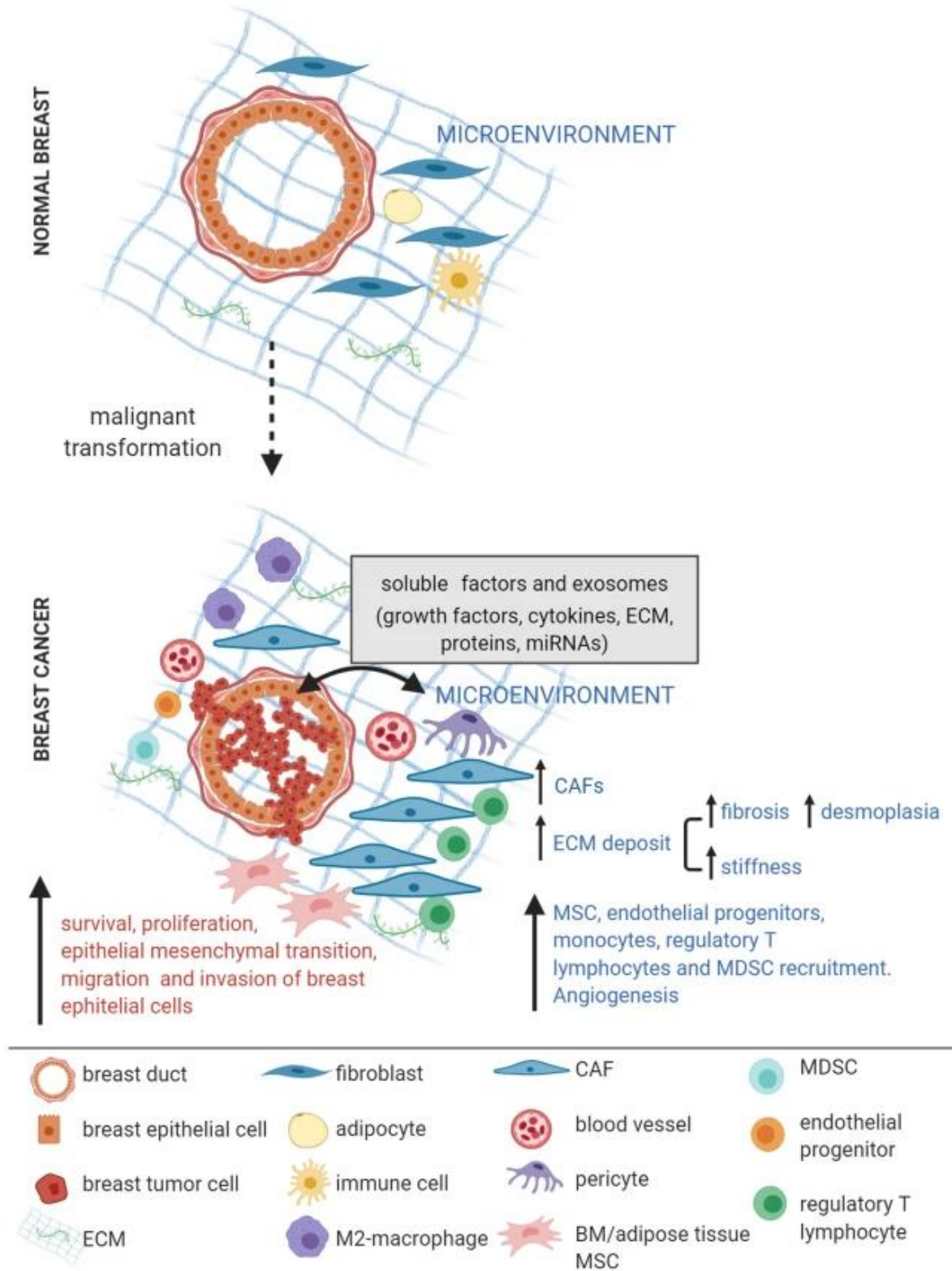
Tümör Mikro Çevresi

Meme kanseri tümör mikro çevresi, tümör hücrelerinin etrafındaki dokular ve hücrelerden oluşan bir alanı ifade eder. Bu mikro çevre, tümör hücrelerinin büyümesini, yayılmasını ve tedaviye yanıtını etkiler. Meme kanseri tümör mikro çevresi, kanser hücreleri ve çevrelerindeki normal hücreler, stroma, immün hücreler, lenfatik damarlar ve kan damarlarından oluşan karmaşık bir sistemdir (J. J. Li et al., 2021). Normal meme epitel hücreleri ile tümör mikroçevresinin bileşenleri arasındaki etkileşim (fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, mezenkimal kök hücreler, perisitler², endotel hücreleri, hücrelerarası matriks), doğrudan hücre-hücre temasları veya salgılanan moleküller aracılığıyla gerçekleşir (Şekil 2). Meme kanseri epitel hücreleri ile tümör mikroçevresi arasında etkileşim; kanser ilişkili fibroblastların oluşumu, hücrelerarası matriksin üretimi ve yeniden düzenlenmesi, artan proliferasyon, kök hücre özelliklerinin ve kanser hücrelerinin metabolizmasının yeniden programlaması yoluyla artar ve nihayetinde yeni ve tehlikeli bir bölge oluşturur. Tümör mikro çevresindeki normal hücreler, stroma ve immün hücreler bir anda kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasını destekleyici yöne kayabilir veya inhibe edebilirler. Bu nedenle tedavi yaklaşımlarında kanser hücrelerinin yanı sıra tümör mikro çevresi de dikkate alınmaktadır.

Tümör mikro çevresindeki immün hücreler, özellikle T lenfositler, meme kanseri tedavisinde önemli bir rol oynayabilir. Tümör hücreleri üzerinde programlanmış ölüm-ligand 1 (PD-L1) ekspresyonunun T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin üretimini inhibe edebileceği iyi bilinmektedir (Pan et al., 2020). Bu sebeple immünoterapide, çoğunlukla T lenfositlerinin kanser hücrelerine saldırması amaçlanmaktadır. Lenfositler, çeşitli yabancı maddelere karşı geniş bir bağışıklık hücre grubu oluşturmak üzere rastgele düzenlenir. Ancak bu sistem, kendi dokularına tepki gösterebilecek hücreler de üretebilir. Bu riski önlemek için, bağışıklık sistemi bu hücreleri etkili bir şekilde ortadan kaldırma mekanizmaları içerir. Ayrıca, aşırı bağışıklık tepkilerini önlemek için, aktive olmuş hücreler enfeksiyonun sonrasında hızla temizlenmelidir. Bu bağlamda, programlanmış hücre ölümü önemli bir rol oynar. Ayrıca tümör hücreleri üzerindeki PD-L1 ekspresyonu, dendritik hücre (DC) fonksiyonunu baskılayacaktır ve bu da T hücre inhibisyonuna yol açmaktadır (Pan et al., 2020). Bu nedenle kanser

² Küçük kan damarı duvarları ile ilişkili olan, çok güçlü mezenkimal benzeri hücrelerdir.

hastalarında PD-L1 blokajı (antikor aracılığıyla), klinik çalışmalarda da rastlanan bir destek tedavi yaklaşımıdır.



Şekil 2. Normal meme dokusu ve meme kanseri mikroçevresinde gözlenen bazı değişiklikler.

ECM: Ekstraselüler matriks, CAF: Kanser ilişkili fibroblastlar, MSC: mezenkimal kök hücreler, MDSC: myeloid türevli baskılayıcı hücreler. (Giorello et al., 2021)'den alıntılanmıştır.

Yapılan patolojik analizler, meme kanserinin prognozunu belirleme ve uygun tedavi seçeneklerini belirleme noktasında tümör mikro çevresinin oldukça önemli olduğunu ortaya koymuştur. Tümör mikro çevresi, kanser tedavisi açısından önemli bir hedef alanı haline gelmiştir. Tümör mikro çevresindeki anjiyogenez yani yeni kan damarlarının oluşumu, meme kanseri tedavisinde hedeflenen bir diğer olaydır. Tümör mikro çevresindeki lenfatik damarlar, kanser hücrelerinin yayılmasına hizmet eder. Tedavilerin mikro çevreyi nasıl etkilediği ve tümör hücrelerinin büyümesini nasıl engellediği üzerine çalışmalar sürmektedir.

Kanser Terapi Modelleri

Kemoterapi (ilaçlı tedavi)

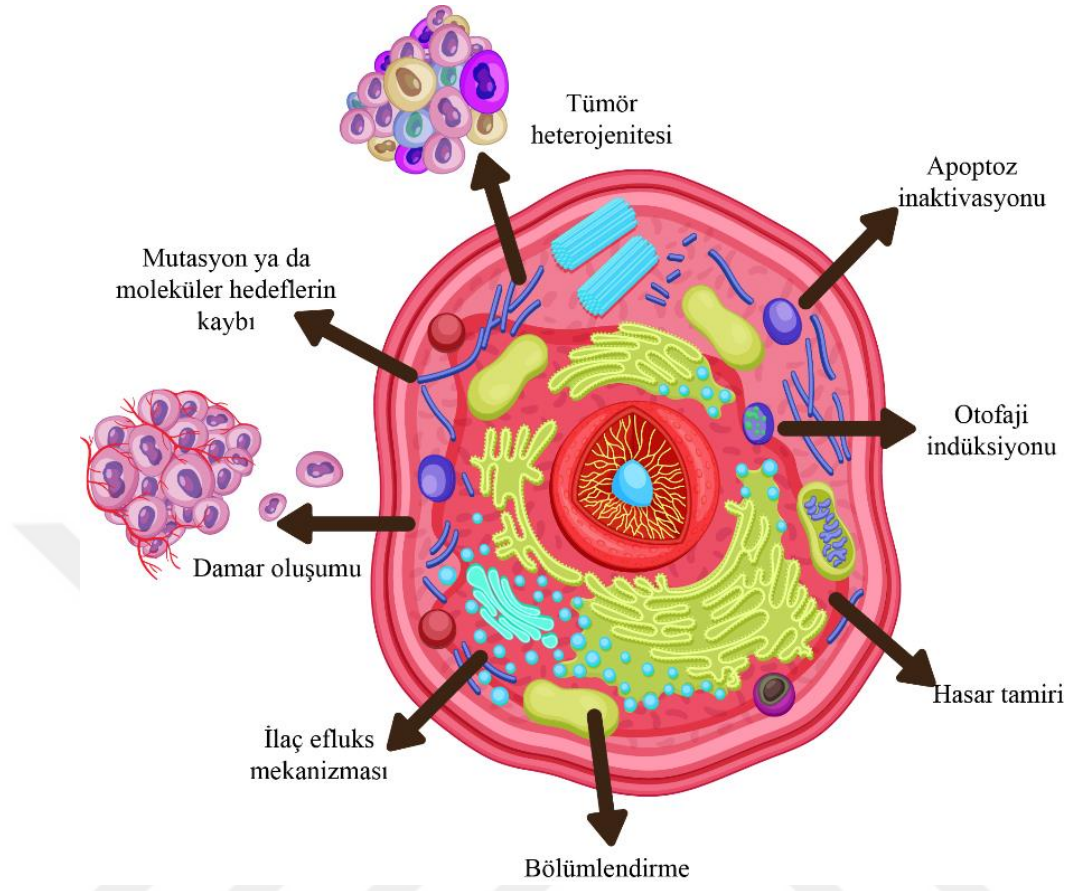
Kanser hastalığına karşı kullanılan en yaygın yöntem kimyasal ajanların kullanıldığı kemoterapidir (ilaçlı tedavi). Kemoterapide kanseri tedavi etmek, kontrol altında tutabilmek ya da kanserin yol açtığı belirtileri azaltabilmek amaçlanmaktadır. Meme kanseri için kullanılan kemoterapi ilaçları kanserin türüne, evresine ve hastanın genel sağlık durumuna göre değişebilir. Günümüzde meme kanserine karşı klinikte kullanılmak üzere Halaven (eribulin), Taxol (paclitaxel) ve Adriamycin (doksorubisin) gibi birçok FDA (Food and Drug Administration, ABD) onaylı ilaç piyasada yer almaktadır.

Kemoterapi ilaçlarının bir kısmı (doksorubisin, mitoksantron, oksaliptatin gibi) kanser antijenlerinin tümör mikro çevresine saçılması ve bağışıklık hücrelerinin bu antijenleri algılayıp kansere karşı harekete geçmesi şeklinde tanımlanabilecek immünojenik hücre ölümüne (ICD) neden olmaktadır (Lee et al., 2018). Kemoterapi, meme kanseri için birincil tedavi seçeneği olmakla beraber cerrahi veya radyasyon tedavisi sonrasında adjuvan³ tedavi olarak da kullanılabilir.

Kemoterapide karşılaşılan en büyük iki zorluk, kullanılan ilaçların ciddi yan etkilerinin olması ve kanser hücrelerinin ilaç direnç mekanizmaları nedeniyle ilaçların etki mekanizmalarından kaçabilmeleridir (Şekil 3) (Sui et al., 2013). Tedavi etkinliğini düşürse bile ilacın konsantrasyonu yan etkiyi azaltmak için sınırlandırılabilir. Diğer yandan kanser hücreleri, zararlı olduğunu düşündüğü molekül ve yapıları, hücre dışına geri göndererek (efflux), sitoplazmada ayrı kısımlarda tutarak (compartmentalization) veya uygulamanın etkisini kırarak yönde (örneğin, apoptozu indükleyen ilaca karşı apoptozu baskılayarak) metabolizmasını

³ Bir tedavi veya aşının etkinliğini artırmak veya koruma sağlamak amacıyla ek olarak kullanılan bir madde veya yöntem.

düzenleyerek kemoterapi ve hedeflenmiş terapilere karşı direnç geliştirirler (Sui et al., 2013; Vasan et al., 2019).



Şekil 3. Kanser hücrelerinin direnç mekanizmaları

Kanser hücreleri farklı yollarla, kemoterapi ve genotoksik veya metabolik stres mekanizmalarından kaçabilmektedir.

Tedavinin yan etkilerini azaltmak için kemoterapötik ilaçlar, mevcut uygulanan dozdan daha düşük dozlarda tekrarlı olarak (meronomik; az az devamlı ilaç verme) veya uygulanan bölgedeki derişimi artırmak için hedefe yönelik tasarlanan taşıyıcılar ile uygulanmaktadır. Hedefe yönelik tedavi amacıyla pasif hedefleme, aktif hedefleme ve bağışıklık hücrelerinin uyarılması ile hedefleme yapılmaktadır. Tümörün hedeflenmesine yönelik olarak yıllardır kullanılan pasif hedeflemede, tümör çevresindeki damar geçirgenliğinin fazla olması nedeniyle terapötiklerin tümöre sızması söz konusudur. Aktif hedeflemede ise tümör hücrelerinin yüzeylerindeki reseptörlere spesifik olarak bağlanan yapılar tercih edilmektedir. Bir diğer hedefleme yöntemi ise tümöre ilaç vermek yerine, vücutta anti-tümör bağışıklık hücrelerinin indüklenmesidir. Bu yolla kanser hücreleri, anti-tümör bağışıklık hücrelerinin hedefi haline gelir ve aktif bağışıklık hücreleri tarafından yok edilir.

İmmünoterapi (bağışıklık sistemi elemanları ile tedavi)

Kanser ve bağışıklık sistemi arasındaki ilişkiye dair ilk izlere M.Ö. 2667-M.Ö. 2648 yıllarında rastlanmaktadır. Imhotep'in olduğu düşünülen çalışmalarda, vücut dışında beliren şişkinliği, o bölgeye bir kesik atıp bölgenin enfekte olmasına vesile olarak şişkinliğin tedavi edilmeye çalışıldığı görülmektedir (Sarkaç, 2018). 13. yüzyılda yaşayan Peregrine Laziosi'nin bacağındaki tümör, derisini patlatıp açık yara haline dönüştükten sonra gerilemeye başlamıştır (Morano et al., 2016). Bu durum, günümüzde kendi kendine iyileşme (spontan regresyon) olarak adlandırılrsa da 13. yüzyılda bir mucize olarak algılanmıştır.

İmmünoterapiye ait ilk deneysel kanıtlar ise 1800'lü yıllarda Vautier ve Dupuytren tarafından *Clostridium perfringens* nedeniyle kangren olan hastada gerileyen tümörün raporlanmasıyla sunulmuştur (Morano et al., 2016). Benzer şekilde Karl David Wilhelm Busch, spontane regresyon gözlemlerine dayanarak bilinçli olarak efekte edilen bir tümörde küçülme gözlemlediğini bildirmiştir (Sarkaç, 2018). 1891'deki New York Memorial Hastanesi'nde çalışan William Coley, yuvarlak hücreli sarkomu teşhisi konan bir hastanın cerrahi müdahaleler sonucu kapatılamayan yaralarının *Streptococcus pyogenes* ile enfekte olması sonucunda hastanın nekrotik tümörünün tamamen kaybolduğunu bildirmiştir (Morano et al., 2016).

1900'lü yıllarda bağışıklık sistemi ile ilgili çalışmalar artmıştır. Tümörün bağışıklık sistemi ile geriletebileceğini öne süren Paul Ehrlich, immünoloji alanındaki (serum bileşimi) çalışmaları sayesinde Ilya Mechnikov ile Nobel ödülünü (1908) kazanmışlardır. Öte yandan, "Modern Tümör İmmünolojisinin Babası" olarak görülen Lloyd J Old, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) tüberküloz aşısının anti-kanser potansiyelini ortaya çıkarmıştır (Rosenthal, 2012). BCG, 1991 yılında FDA tarafından onaylandı ve hâlen yüzeysel mesane kanserinin ilk basamak tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sitotoksik T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler, virüsle enfekte, bakteriyle enfekte ve transforme olmuş kanser hücrelerini tanır ve bu hücrelerin apoptoz yoluyla ölmesini sağlar (Nagata & Tanaka, 2017). Modern anlamda kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi yoluyla ortadan kaldırılma süreci, kanser immünoterapisi olarak adlandırılmaktadır. İmmünoterapi, canlı organizmaların materyallerini hastalığa karşı kullanan bir çeşit biyoterapidir. Kanser immünoterapide ana hedefin doğrudan kanser hücrelerinin veya tümör kitlesinin olduğu düşünülse de yapılan çalışmalar, tümör mikro çevresinin de tedavi başarısında önemli rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Roma-Rodrigues et al., 2019; Q. Wang et al., 2023).

İmmünoterapinin sağladığı en önemli avantajlarından birisi, immünoterapinin kansere karşı uzun süreli koruma sağlamasıdır. Kanser hastalığı aylar/yıllar sonra tekrar edebilmektedir.

Bu nedenle sadece tümörün yok edilmesi yeterli değildir. İmmün sistem, hafıza hücrelerine sahip olduğu için karşılaştığı bir antijene karşı oluşturduğu yanıtı, daha sonra antijenle tekrar karşılaşması halinde hatırlamakta ve bu kez kanser antijenlerine karşı daha hızlı yanıt oluşturmaktadır. Bu nedenle kanser antijenlerinin bağışıklık sistemine tanıtılmasıyla kanser tedavi edilmekte ve bu yolla kansere karşı uzun süreli koruma sağlanmaktadır.

Kanser immünoterapi; i) kontrol noktası inhibitörlerinin, antikorların veya aktif bağışıklık hücrelerin (CAR-T gibi) kullanıldığı kanser hücrelerini doğrudan bağışıklık hücreleri ile hedef alan aktif yollarla veya ii) aşı, adjuvan veya sitokinlerin kullanıldığı bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerine saldırmasını amaçlayan pasif yollarla uygulanmaktadır (H. Zhang & Chen, 2018). Kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi yoluyla ortadan kaldırılmasında başlıca; CD8+ sitotoksik T lenfositler (CTL), doğal öldürücü (NK) hücreler ve doğal öldürücü T hücreler görev almaktadır (Kapadia et al., 2015). NK hücreleri antijene özgü olmayan ve yüzey reseptörleri yoluyla neoplastik⁴ hücreleri tanıyan doğal bağışıklık efektör hücrelerdir (Waldhauer & Steinle, 2008). CTL'ler ise iki yolla kanser hücrelerini tanımaktadır (Takase & Saito, 1995):

- (i) DC'ler gibi antijen sunan hücrelerin (APC'lerin) T hücre reseptörü ile etkileşim sağlayan bir sinyal ile veya
- (ii) APC'ler üzerindeki aksesuar moleküller (CD80, CD86, LFA3, vb.) ile CTL'ler üzerindeki reseptörler (CD2, CD28, LFA1, vb.) arasındaki etkileşimler sonucu ortaya çıkan uyarıcı sinyaller ile.

Normal süreçte bağışıklık sistemine ait hücreler, vücutta oluşabilecek deforme hücreleri (kanser dahil) tanıyıp onları ortadan kaldırmaktadır (immünosürveyans, immün gözetim). Ancak, immün kontrol noktası reseptörleri (PD-L1, CTLA-4) veya bağışıklık hücre inhibisyonu sağlayan TGF- β (büyüme faktörü beta) ve IL-10 (interlökin 10) gibi çeşitli araçları kullanan kanser hücreleri, immünosürveyanstan saklanabilmektedir (D. S. Chen & Mellman, 2013; Qian et al., 2018). Kanser kaçış mekanizmalarıyla mücadele edebilmek amacıyla hedeflenmiş antikorlar, kanser aşıları, uyarıcı hücre transferi, virüsler, kontrol noktası inhibitörleri, sitokinler ve adjuvanlar gibi çeşitli yaklaşımlar önerilmektedir (Van Der Burg et al., 2016). Böylece bağışıklık hücreleri güçlendirilmekte, inaktif bağışıklık uyarı olarak tümör bölgesinde bağışıklık hücreleri aktive edilmekte veya kanser hücrelerinin kontrol noktası inhibitörleri kapatılarak

⁴ Neoplastik: Yeni oluşum. Neoplastik transformasyon: Hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi.

aktif bağıışıklık hücrelerini durdurma yeteneği elinden alınmaktadır (D. S. Chen & Mellman, 2013). Örneğin, erken aşamada teşhis edilmiş üçlü negatif meme kanseri hastalarında PD-L1 inhibisyonu ile birleştirilmiş bir kemoterapi modeli çok daha etkili olmaktadır (Schmid et al., 2020).

Kanser hücrelerinde gözlenen heterojenite, eksojen antijen ile etkili bir immünoterapi başarısı elde edilmesinin önünde ciddi bir engeldir. Bunun yanında tümör mikro çevresi sayesinde kanser hücrelerinin bağıışıklık sisteminden kaçış mekanizmalarını geliştirmesi immünoterapinin başarısını sınırlandıran bir başka unsurdur. Bu sebeple, bireye özğü tedaviler ya da çoklu terapiler konusunda çalışmalar sürdürülerek tedavi başarısının artırılması hedeflenmektedir.

Hipertermi (sıcaklığın arttırılması)

Kanser tedavisinde kullanılan bir diğerk yaklaşım ise sıcaklık artışına dayanan hipertermidir. Tümörlerin termal ablasyonu⁵, neoplastik dokuları yok etmek için sıcaklığın arttırılmasından (hipertermi) veya sıcaklığın düşürülmesinden (hipotermi) yararlanan bir dizi tekniği kapsar (van der Zee, 2002). Basitçe hipertermi, bir dokunun/hücrelerin radyofrekans dalgaları, ışık veya manyetik alan kullanılarak 39-45 °C'ye ısıtılması işlemidir (Basel et al., 2012; Moy & Tunnell, 2017; Toraya-Brown et al., 2014; Wust et al., 2002). Çoğunormal doku (sinir sistemi hariç) 1 saat süreyle 44 °C'ye kadar bir sıcaklığa maruz kaldığında hasar görmez (Fajardo, 1984). Çünkü bu hasarı tolere edebilecek mekanizmalar, sağlıklı hücrelerde aktifken, genellikle kanser hücrelerinde gerçekleşen mutasyonlar neticesinde bu koruma mekanizması devre dışıdır.

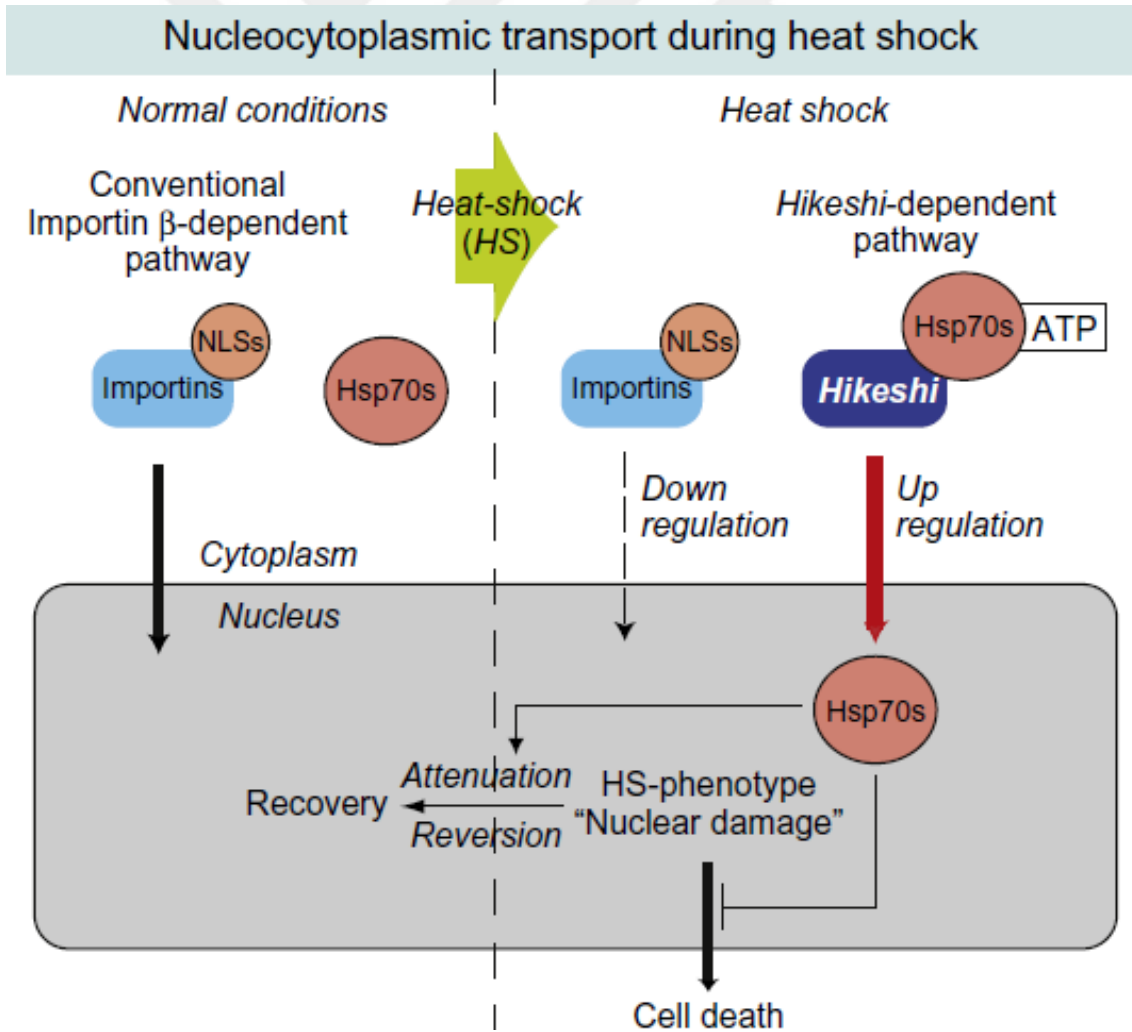
Tedavi edilen alanın boyutuna bağılı olarak hipertermi, lokal (çok küçük bir alan), bölgesel (tüm organ veya uzuv gibi vücudun daha büyük bir bölümü) veya tüm vücut olarak uygulanmaktadır (American Cancer Society, 2016; Basel et al., 2012; Institute, 2011; Obaidat et al., 2019). Özellikle ameliyat yoluyla çıkarılamayan tümörlere karşı ya da ameliyatı kaldıramayacak hastalar için lokal hipertermi uygulanmaktadır (Toraya-Brown et al., 2014). Örneğin manyetik hipertermi (MHT) yöntemi, bir çeşit lokal hipertermi metodudur.

Çalışmalar sonucunda farklı hücre hatlarının, sıcaklık artışına karşı farklı hassasiyete (termotolerans) sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum, benzer sıcaklık profillerinin uygulandığı farklı hücre hatlarında değıışken sonuçların gözlenmesine neden olmaktadır. Bu tür farklılıkların

⁵ Ablasyon: Yok etmek, hastalıklı kısımlarda hücre ölümü.

kaynağı olarak hücre hatları arasında Isı Şok Proteini (HSP) üretiminin farklılığı gösterilmektedir (Vilas-Boas et al., 2020). HSP'ler öncelikle sıcaklık olmak üzere farklı stres durumlarında hücre içi protein katlanmasında herhangi bir sorunun doğması halinde devreye giren geniş bir protein ailesidir. Özellikle HSP70 sağ kalım proteini olarak bilinmektedir (Cumming & Diamond, 2002).

Hipertermi, bazı tümör hücrelerinin immünojenitesini etkilemektedir (Wust et al., 2002). Çalışmalar, lokal hipertermi tedavisinin canlıda anti-tümör bağışıklığı artırdığını göstermektedir (Toraya-Brown et al., 2014). Artan sıcaklık nedeniyle hücre içinde katlanmamış protein yanıtı (UPR) ortaya çıkmaktadır. Bu katlanmayan proteinlerin doğru bir şekilde katlanabilmesi için hücreler, HSP'lerin ekspresyonunu artırmaktadır (Şekil 4). Hipertermi uygulanmış hücrelerde artan HSP70 ekspresyonu, bu hücrelerin NK hücreleri tarafından tanınırlığını artırmaktadır (Dayanc et al., 2008; Gehrmann et al., 2005; Moy & Tunnell, 2017). Hücrelerde HSP proteinlerindeki artış, DC gibi APC'lerin HSP üzerinden ısı stresli hücreleri algılamasına da neden olmaktadır (Toraya-Brown et al., 2014).



Şekil 4. Normal durumda ve ısı şok durumunda HSP70'in gen düzenleme mekanizması (Furuta et al., 2014)'dan alıntılanmıştır.

Nanoparçacık (NP) aracılığıyla hipertermi; ışık, manyetik alan ve radyofrekans radyasyonu ile sağlanmaktadır (Brummelhuis et al., 2023; C. Huang et al., 2021; Obaidat et al., 2019). Bu yaklaşımlar, NP'ler uygulandıktan sonra NP'lerin yoğun olarak tümör bölgesinde toplanması ve harici bir enerji kaynağı ile hiperterminin indüklenmesini kapsamaktadır. Fototermal terapi (PTT) uygulamasında, 700-900 nm aralığına yakın kızılötesi (NIR) ışığı ile NP'lerin uyarılması söz konusudur. Bu amaçla en fazla altın, bakır ve grafen NP'ler kullanılmaktadır (Moy & Tunnell, 2017; Qin et al., 2023). NIR kullanıldığı için, PTT uygulaması 1 cm penetrasyon derinliği ile sınırlıdır. Radyofrekans hipertermi (RFH), tümöre temas eden bir elektrot ile uygulanabildiği gibi altın, silika ve karbon NP'ler ile de uygulanabilir (Adibzadeh et al., 2020). MHT ise dışarıdan uygulanan bir AC manyetik alan varlığında ısı açığa çıkmasına neden olan manyetik NP'lerin kullanımını kapsar (Moroz et al., 2002; Rubia-Rodríguez et al., 2021). MHT için AC manyetik alan kaynağı gerektiği gibi, RFH için radyofrekans radyasyon üreticisi gerekir. Buna karşın, PTT için kullanılan diyot lazer, manyetik alan ve radyofrekans üreticisine göre daha ekonomiktir. Öte yandan, AC manyetik alan ile uygulanan MHT'de, PTT'deki gibi penetrasyon sorunu söz konusu değildir (Moy & Tunnell, 2017). Çünkü manyetik alanın giriciliği ışıktan daha fazladır. Arzu edilen miktarda NP tümör bölgesinde lokalize edilememesi nedeniyle RFH ve MHT yöntemlerinin tümör çevresindeki etkileri sınırlıdır. Bu nedenle birden fazla yöntemin kullanıldığı kombine yaklaşımlar yoluyla tedavinin etkinliği artırılmalıdır.

Son yıllarda FDA, birçok kombine tedavi yöntemini onaylamakta ve özellikle immünoterapi ile birleştirilmiş tedavileri desteklemektedir. Bu yönde birçok çalışma sürdürülmektedir. Mesela Pan ve ekibi hem primer tümör ablasyonu hem de mimetik metastatik tümör inhibisyonu için MHT ve kontrol noktası blokaj immünoterapisini kapsayan bir kombine tedavi yaklaşımını fareler üzerinde denemiştir (Pan et al., 2020). Bu çalışmada, deney hayvanlarının vücutlarının farklı bölgelerinde geliştirilen tümörlerden sadece birine uygulanan kombine tedavi sonucunda, tedavi edilmeyen diğer tümörün de küçüldüğü belirtilmektedir. İkinci tümörün tedaviye maruz kalmadığı halde küçülmesinin nedeni olarak; tümör antijenlerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınır hale getirilmesi ve bağışıklık hücrelerinin tümör antijenlerine karşı aktif davranabilmeleri yani anti-tümör bağışıklık hücrelerinin geliştirilmesi şeklinde açıklanmıştır. Benzer sonuca erişen farklı çalışmalara literatürde rastlanmaktadır (Moy & Tunnell, 2017).

Manyetik hipertermi

Manyetik hipertermi (MHT), dışarıdan uygulanan bir AC manyetik alan varlığında termal enerji açığa çıkmasına neden olan NP'lerin kullanımını kapsayan bir hipertermi tedavi

yöntemidir. MHT; etkin, invaziv olmayan, normal dokulara asgari düzeyde hasar veren, düşük maliyetli ve mükemmel doku penetrasyonuna sahip bir tedavi modelidir (American Cancer Society, 2016; Institute, 2011). Özellikle malign tümörlerde görülen hipoksik, besin maddelerinden yoksun ve düşük pH değerine sahip hücre içi ortam, bu hücreleri öldürmek için araştırmacıların elini güçlendirmektedir. MHT uygulaması ile kanser hücreleri doğrudan öldürülürken, normal hücreler bu durumdan daha az etkilenmektedir (American Cancer Society, 2016; Institute, 2011). Bu durum aynı zamanda normal hücrelerin daha az NP almasının bir sonucudur.

Manyetik NP'ler, süperparamanyetik özellikleri nedeniyle MHT uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Hugounenq et al., 2012; H. J. Kim & Choi, 2019; Kossatz et al., 2014; Pan et al., 2020). Farklı özelliklerde üretilen çeşitli demir oksit NP'ler, FDA tarafından onaylı bir şekilde gerek hastalıkların tedavisinde gerekse MR kontrast ajanı olarak kullanılmaktadır (Anselmo & Mitragotri, 2016). Ticari manyetik ısıtma maddesi NanoTherm™ için klinik testler cesaret verici görünmektedir, ancak terapötik etkiyi gerçekleştirmek için gereken doz nispeten yüksektir (Mahmoudi et al., 2018; Rodríguez et al., 2022; Southern & Pankhurst, 2018). Süperparamanyetik demir oksit NP'lerin MHT uygulamasıyla ilgili çok sayıda bilimsel çalışmada nispeten düşük demir konsantrasyonları (2,0-20,0 mg/ml) kullanılmıştır, ancak bazı yazarlar bu tür biyolojik uygulamalar için NP konsantrasyonlarının daha da düşürülmesini gerekli görmektedir (Lachowicz et al., 2019).

Bir malzemenin hipertermi etkinliği, uygulanan harici AC manyetik alanı altında birim kütle başına oluşturulan termik gücü temsil eden spesifik güç emilimi (SPA) ile ifade edilir (Campanini et al., 2015). AC manyetik alan enerjisinin termal enerjiye dönüşümü birkaç mekanizma ile gerçekleşir ve işlem verimliliği büyük ölçüde dış alanın frekansına, genliğine ve ayrıca NP'lerin boyutuna, şekline, bileşenlerine ve NP'ler arası etkileşimlere bağlıdır. Daha yüksek SAR⁶ değerine sahip manyetik NP'lerin elde edilmesi amacıyla demir oksit NP'lere alternatif olarak çinko, nikel veya kobalt içeren demir oksit NP'ler üretilmektedir.

Kanser hücreleri, bazı durumlarda sıcaklık artışından tıpkı sağlıklı hücrelerde olduğu gibi HSP'ler yardımıyla kaçabilir. Termotolerans, hipertermi tedavilerinde beklenen etkinin gözlenmemesindeki ilk büyük engel olarak görülmektedir. Bu nedenle HSP70 gibi proteinlerin

⁶ Specific Absorption Rate, Özgül Soğurma Değeri

üretiminin durdurulduğu hipertermi tedavileri yeni yeni önerilmektedir. Yine bu noktada termotoleransın etkisini azaltmak için kombine yaklaşımlar tercih edilmektedir.

Hipertermi ve immünoterapi ilişkisi

Hipertermi ve immünoterapi, kanser tedavisinde birlikte kullanılabilecek iki farklı tedavi yöntemidir. Hipertermi, bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivitesini artırarak immünoterapinin etkisini güçlendirebilir. Örneğin, hipertermi ile ısıtılan kanser hücreleri öldürüldüğünde, ölü hücrelerin kalıntıları bağışıklık hücreleri tarafından algılanabilir ve daha fazla bağışıklık yanıtı oluşturulabilir.

MHT sırasında, kanser hücreleri tarafından üretilen HSP'ler, antijen sunumu ve bağışıklık yanıtı yoluyla MHT tedavisinin etkinliğini artırmaya yardımcı olabilirler. Ayrıca, MHT tedavisi sonrasında artan HSP üretimi, kanser hücrelerinin daha iyi tanınmasına ve yok edilmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle, MHT ve immünoterapi kombinasyonu, kanser tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilebilir.

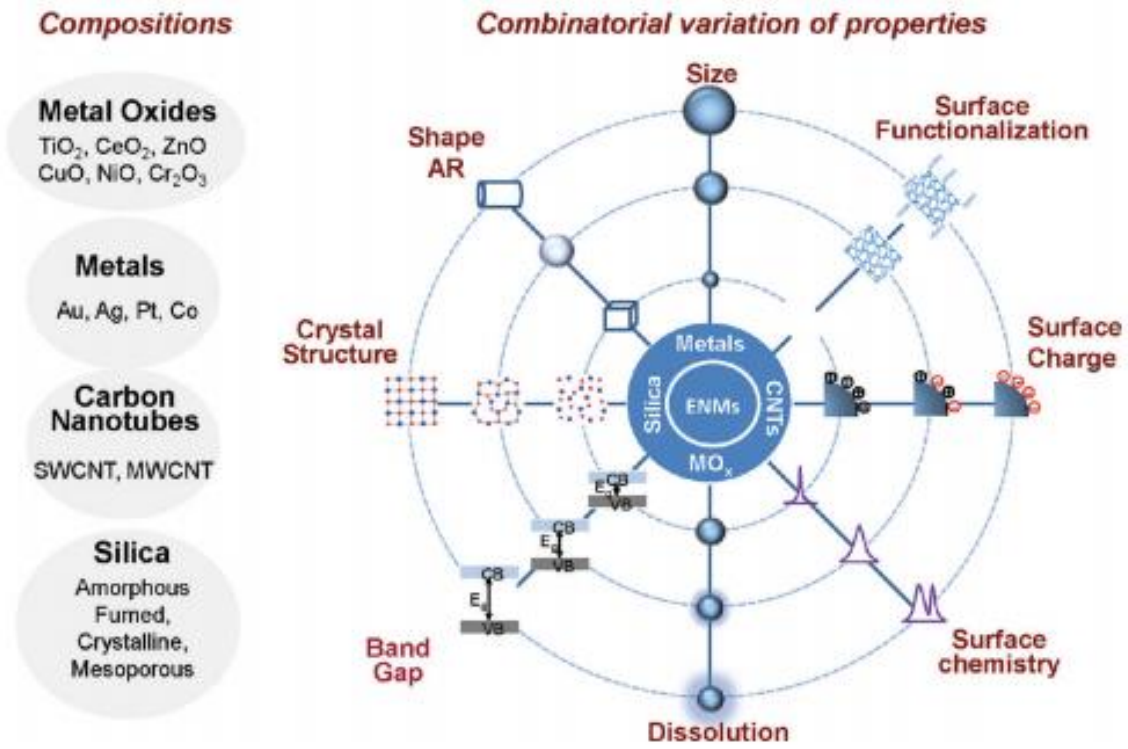
H. Wang ve ark. yaptıkları bir çalışmada, MHT sonucu tümör bölgesinde hem CD4 ve CD8 T hücrelerinin sayısının hem de IL-6 ve IFN- γ ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (H. Wang et al., 2014). Ayrıca ısı stresi altındaki kanser hücreleri, antijenler ve kemokinler içeren eksozomları ortama saçtığı için hem APC'lere antijen kaynağı sağlar hem de APC'ler ve T hücrelerinin o bölgede toplanmasına yardımcı olur (Toraya-Brown et al., 2014). MHT uygulamasının, HSP'ler yoluyla immün aktivasyona neden olduğu bilinen bir gerçektir ancak gerek MHT sonrası NF- κ B aktivasyonu gerekse CXCL10 gibi kemokinlerin üretiminin artması hücre içi farklı yolların bu süreçte dahil olabileceğini düşündürmektedir (Lee et al., 2018; Skitzki et al., 2009; L. Sun et al., 2013).

Nanoparçacıkların Kanser Tedavilerindeki Yeri

Nanoyapılar ile kanser tedavisi, nanotıp alanında yüksek anti-kanser potansiyeli olan ve oldukça dikkat çeken bir konudur. Teşhise yönelik nanoteknoloji tabanlı biyosensörler veya manyetik NP aracılı MR görüntüleme gibi faydalarının yanında nanoyapılar, ilaç taşıyıcı olarak tedaviye yönelik kullanılabilir. Bazı NP'lerin özel şartlar altında ısı üretme yeteneklerinden faydalanılarak kanser hücrelerinin kontrollü bir şekilde ısıtılması suretiyle tümör küçültülebilir. Fotodinamik tedavi, fotosensitif NP'lerin tümöre taşınarak ışığın etkisiyle kanser hücrelerinin ölümüne odaklanmaktadır. NP'lerin nanotıpta kullanım alanı her geçen gün genişlemektedir.

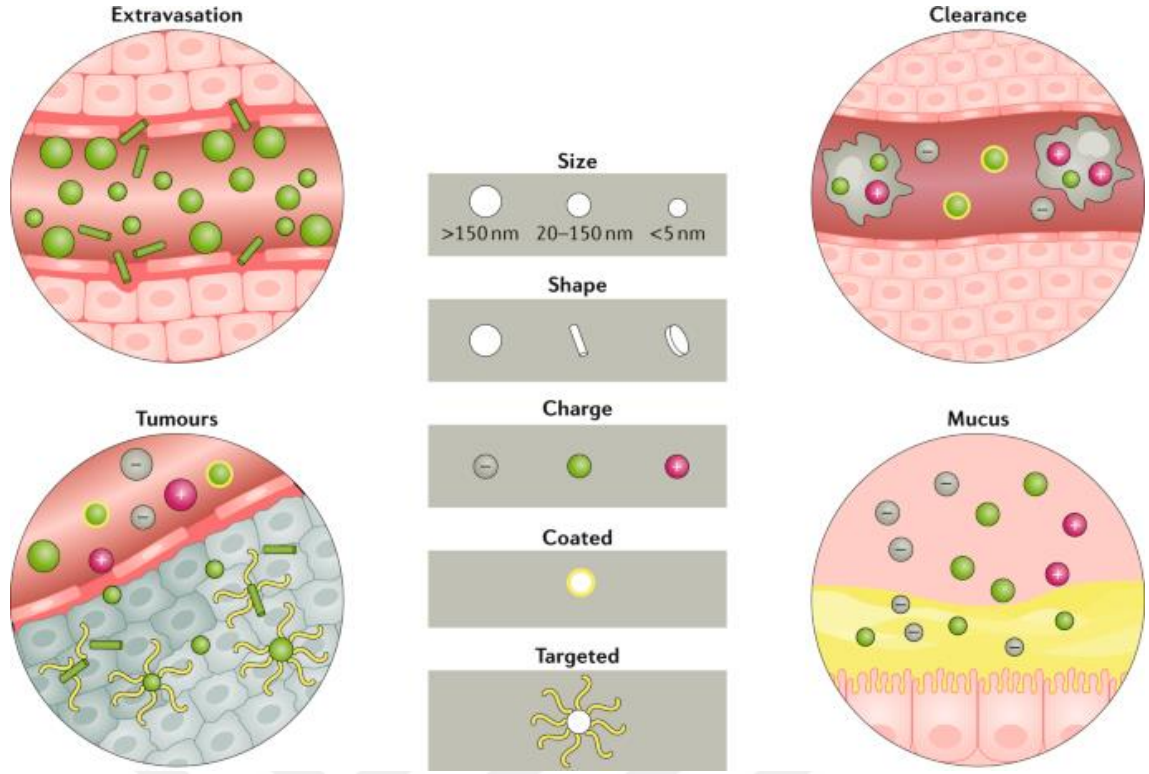
Nanotaşıyıcılar, çok yönlü özellik taşıyacak şekilde tasarlanabildiği için kombine tedavilerde kullanıma oldukça uygundur (Kapadia et al., 2015; Shao et al., 2015; Wilhelm et

al., 2016). Nanotaşıyıcılar kullanılarak hedef bölgeye kemoterapötik bir ilaç veya nükleik asit (DNA veya RNA) taşınabilir ve aynı zamanda taşıyıcının vücudun hangi bölgelerine ulaştığı izlenebilir (Ge et al., 2018). Nanomalzemeler, bileşenleri (metalden organik bileşiklere kadar çeşitli öncüller kullanılabilir) ve üretim yöntemleri değiştirilerek, yüzey özellikleri amaca uygun üretilerek veya boyut ve şekil kontrolü sağlanarak çeşitlendirilmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Tasarlanmış nanomalzemelerin (ENM) bileşenleri, kristal yapıları, boyutları ve yüzey özellikleri değiştirilerek farklı malzemeler üretilir. (Nel et al., 2013)’den alıntılanmıştır.

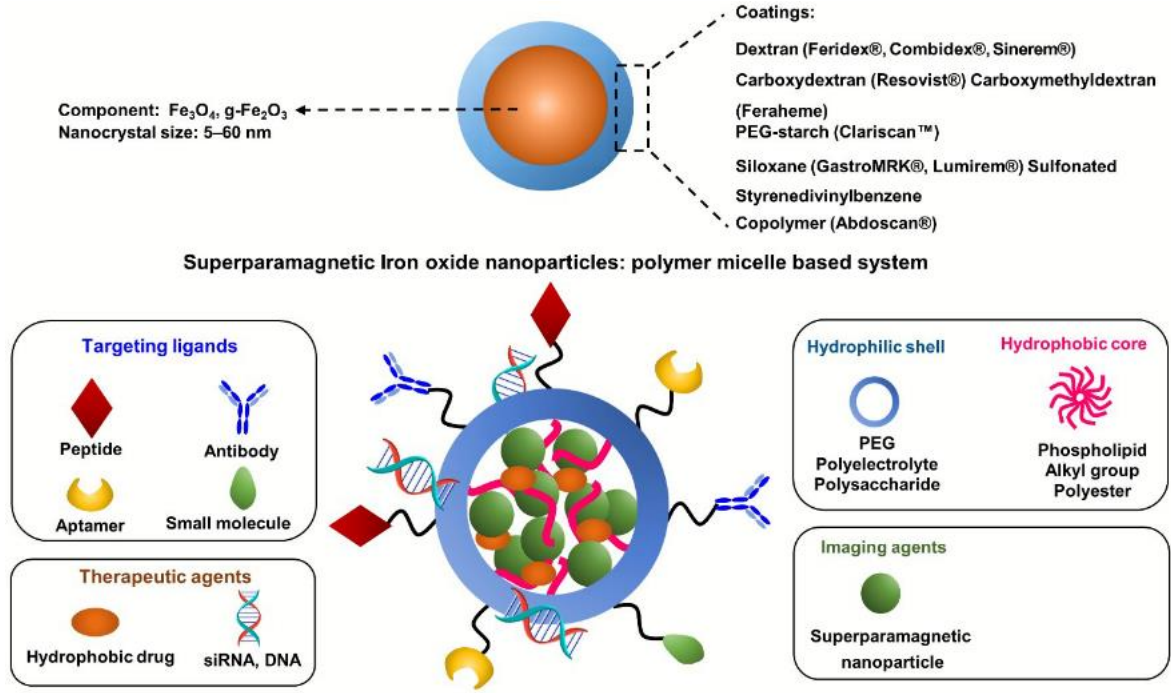
Tümör büyütülmüş bir fare modeline enjekte edilen NP’lerin ortalama %0,7’sinin tümöre ulaştığı tespit edilmiştir (Wilhelm et al., 2016). Bu oran, enjekte edilen NP sisteme göre ciddi anlamda değişmektedir (Şekil 6). Mesela hidrodinamik çapı 100 nm’nin altında olan NP’lerin ilaç dağıtım oranı, daha büyük NP’lere göre daha yüksektir. İnorganik NP’ler ilaç dağıtım oranını organik NP’lere göre %0,8’e kadar artırmaktadır. Son olarak, nötr zeta potansiyeline sahip (-10 ila +10 mV) NP’lerin ilaç dağıtım verimliliği, pozitif (>10 mV) veya negatif (<-10 mV) zeta potansiyelli NP’lere göre daha yüksek olma eğilimindedir. Aktif hedefleme yapılarak ilaç dağıtım oranı %0,9’a ve rod şeklinde NP kullanıldığında ise bu oran %1,1’e yükselmektedir (Wilhelm et al., 2016). Bu bilgilerden, hedef organa ve terapide beklenen etkiye uygun bir nanomalzemenin seçiminin, amacı başarıya taşıyacak en önemli nokta olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 6. NP'lerin vücut içinde temizlenme sürecini ve tümör mikroçevresi veya mukus tabakaları gibi yerel engellerle nasıl etkileşimde bulunduğunu belirleyen faktörler, boyut, şekil, yük ve yüzey kaplaması gibi faktörlerdir.

Küresel ve daha büyük NP'ler kan akışında merkezi bölgelere göre daha fazla kenarlarda veya damar duvarlarına yakın bölgelerde bulunma eğiliminde iken, çubuk şeklindeki NP'ler daha kolay dışarı (kan dolaşımından) çıkar (sol üst). Kaplamasız veya pozitif yüklü NP'ler makrofajlar tarafından daha hızlı temizlenir (sağ üst). Yerel dağılım açısından genel olarak, çubuk şekilli, nötr ve hedefe yönelik NP'ler tümörlere daha kolay nüfuz eder (sol alt), pozitif yüklü, daha küçük ve kaplanmış NP'ler ise mukozal engelleri daha kolay aşar (sağ alt). (Mitchell et al., 2021)'den alıntılanmıştır.

Nanotaşıyıcıların yüzeyi, hedef hücre türüne özel çeşitli moleküller ile modifiye edilmektedir. Monoklonal antikorlar (spesifik antijenlere bağlanabilen protein molekülleri), peptidler (kısa protein parçacıkları), aptamerler (özel olarak seçilmiş nükleik asitler), peptidomimetikler (peptidlerin yapısını taklit eden sentetik moleküller) veya folik asit (FA) gibi küçük moleküller kullanılarak tasarlanan yapı, kanser hücrelerine güdümlü hale gelir (Şekil 7). Bu ligandlar, kanser tedavisi alanında kullanılan çeşitli hedefe yönelik terapötik yaklaşımlarda kullanılır. Ancak, hangi ligandın kullanılacağı, kanser türüne, hedefe ve tedavi stratejisine bağlı olarak dikkatlice değerlendirilmelidir.



Şekil 7. Terapötik yaklaşımlar için tasarlanan süperparamanyetik nanoparçacıklar. Çekirdek-kabuk (üst) ve polimerik misel ile hedefleme molekülleri ile modifiye formların (alt) şematik gösterimi. (Palanisamy & Wang, 2019)’den alıntılanmıştır.

FA, hedefe yönelik kanser tedavilerinde kullanılan immünojenik olmayan ligandlardan biridir ve genellikle peptidler veya aptamerlerle birleştirilir. FA, hücrelerin yüzeyinde bulunan folat reseptörlerine spesifik olarak bağlanır (C. Chen et al., 2013). Bir ilaç taşıyıcısına veya terapötik ajanın yapısına FA dahil edilerek, artmış folat reseptörü ekspresyonu olan kanser hücrelerine daha spesifik bir şekilde hedeflenmiş teslimat sağlanabilir. Literatürde birçok çalışmada, FA-modifiye taşıyıcı sistemler ile meme kanseri hücreleri hedeflenmiştir (Soleymani et al., 2018; Yang et al., 2014; Zhou et al., 2016). İlacın doğrudan kanser hücrelerine ulaştırılması, hem yalnızca hedef hücrelerin ilaçtan etkilenmesini sağlayarak oluşacak yan etkiyi sınırlandırmaktadır hem de ilacın hedef hücrede konsantre olmasını sağlayarak hedefi etkili bir şekilde yok etmektedir. Bu amaçla, lokal tedavide kullanılmak üzere metal veya polimer yapılı NP’ler geliştirilmektedir.

Kontrollü ilaç salımı uygulamaları, i) kısa süreli veya uzun süreli (yıllarca) sürekli salımı ve ii) bir kez veya sürekli olarak hedefe (örneğin, tümör, hastalıklı kan damarı vb.) yönelik salımı kapsamaktadır. Birçok kontrollü ilaç salım formülasyonunda, hemen başlangıçta büyük miktarda ilaç salımı (burst salımı) gerçekleşir (X. Huang & Brazel, 2001). Genellikle kısa süreli gerçekleşen bu süreçte, ilk aşamalarda taşıyıcı sistemden yüksek ilaç salımı meydana gelmektedir. Bazı durumlarda elverişli olmasına rağmen, ilaç dağıtımında çoğu durumda burst salımı olumsuz bir etki olarak kabul edilir. Bu nedenle burst salımını kontrol edebilmek ve ilk etapta hızlı bir ilaç salımının önüne geçmek için pH veya ısı uyarlı polimerik kaplamalar

yapılabilir. Bunu yanında nano boyutlu gözeneklere ve geniş iç yüzey alanı ile yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip mezoporöz silika nanoparçacıklar (SNP) da ilaçları gözeneklerinde hapsederek korur ve hız kontrollü salım sağlar.

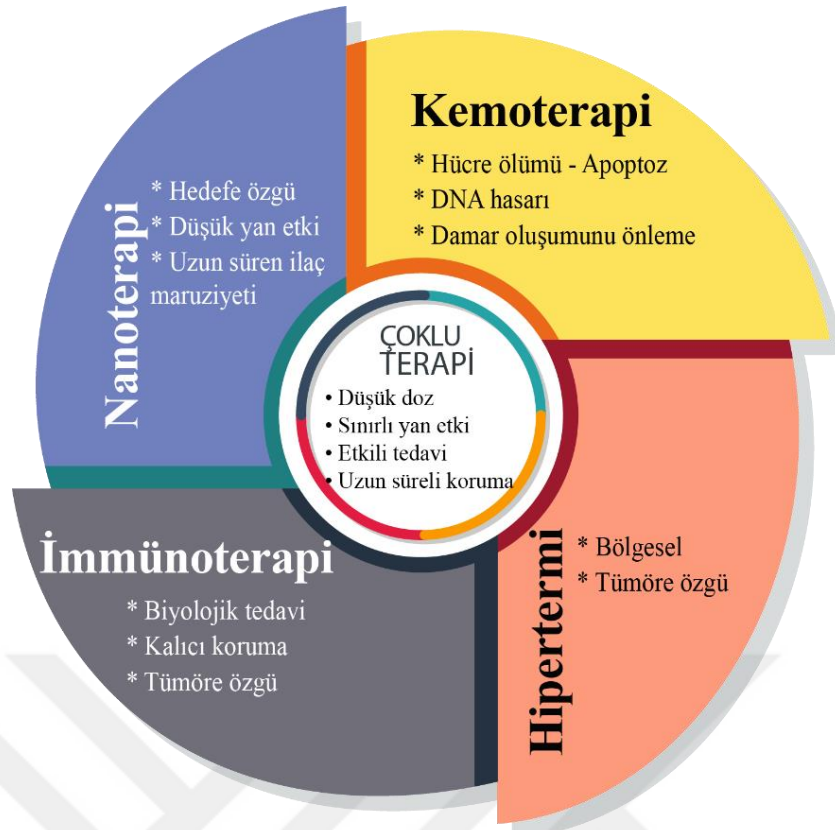
Biyouyumluluk ve düşük toksisite özellikleri nedeniyle ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan SNP'ler ile özellikle hidrofobik ilaçlar taşınabilmektedir (Heggannavar et al., 2018; T. Li et al., 2016). Bu ilaç taşıma sistemlerini içeren sınırlı sayıda klinik denemeye rastlanmaktadır ancak bu alanda araştırmalar devam etmekte ve gelecekte daha fazla klinik denemenin gerçekleşmesi beklenmektedir. SNP'ler, ilaçların kimyasal ve fiziksel stabilitesini koruyabilir ve etkinliğini artırabilir. İlaç salımını kontrol etmek ve hedeflenen bölgeye (aktif hedefleme) yönlendirmek için yüzey modifikasyonu (örneğin polimer kaplama) yapılabilir. SNP'ler, ilaç taşıma sistemlerinde kapsül, mikroküre veya nanoparçacık gibi farklı şekillerde hazırlanabilir ve oral, transdermal veya enjeksiyon yoluyla uygulanabilir. Ma ve arkadaşları ürettikleri SNP'lere DOX yükleyip bu yapıyı PEI-FA ile modifiye ederek siRNA aktarımında kullanmışlardır (Ma et al., 2013). Çalışmada FA reseptörünü yüksek (HELA) ve düşük (MCF-7) düzeyde eksprese eden hücre hatları kullanılmıştır. Kullanılan PEI-FA, pH bağımlı ilaç salımına imkân tanıdığı için ilacın doğrudan hücre içinde salımı sağlanmıştır. Tercih edilen siRNA dizisi hücre içinde hedeflenen genin baskılanmasını sağlamıştır. Bu çalışma, tek bir taşıyıcı sisteme hem ilaç hem de nükleik asitin yüklenebileceğini, yapının hedefe özgü tasarlanabileceğini, aynı zamanda ilaç ve nükleik asit salımının kontrollü bir şekilde hücre içinde gerçekleştirilebileceğini göstermektedir.

Farklı NP'ler ile birleştirilerek SNP'lerin fonksiyonları artırılabilir. Bu anlamda bir miknatis yardımıyla istenilen yöne hareket ettirilebilen ve hedef dokuda biriktirilebilen manyetik NP'ler, SNP'lerle birleştirilerek çekirdek-kabuk yapısı üretilmektedir. Manyetik SNP'ler (MSNP), hem MR görüntüleme ve MHT ajanı olarak hem de hedef spesifik ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir (Pan et al., 2020; C. Sun et al., 2008; H. Wang et al., 2014). MSNP'ler; biyo-uyumludur, sınırlı sitotoksositeye sahiptir, farklı manyetik çekirdekler (Fe, Zn, Co vb.) içerebilir. Üretimi sırasında ciddi anlamda zararlı sayılabilecek kimyasallar kullanılmaz ve bu yapılar ucuz yollarla elde edilmektedir. Son olarak MSNP'lerin çekirdek, gözenek ve yüzey olmak üzere kullanılabilir üç farklı bölgesi olduğu için birçok amaca yönelik geliştirilen farklı formlarda MSNP üretilmektedir.

Manyetik NP'ler, süperparamanyetik özellikleri nedeniyle MHT uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Hugounenq et al., 2012; H. J. Kim & Choi, 2019; Kossatz et al., 2014; Pan et al., 2020). Manyetik NP'ler, ilaç ve gen taşıma, manyetik yolla hücre, protein ve RNA saflaştırma, MR görüntüleme gibi uygulama alanlarında tercih edilmektedir. Örneğin MR

görüntüleme ve MHT'nin uygulanabileceği hibrit sistemler (Hybrid-System Sigma-Eye/MRT gibi) geliştirilmektedir ve bu sistemlerin uygulamasında MNP'ler kullanılmaktadır (Wust et al., 2002). Yüksek manyetizasyona (95 emu/g) sahip 22 nm boyutlarındaki Fe_3O_4 NP'ler çoklu terapi amacıyla kullanılmıştır (T. J. Li et al., 2013). Araştırmacılar Fe_3O_4 NP'leri radyofrekans indüklü ısı üretiminde kullanırken NP'lerin yüzeylerini hedefe özgü tasarlayıp yapıya ilaç yüklemişlerdir. Çalışmada, ilaç salımının ısı indüksiyonu ile arttığı ve önerdikleri terapi modelinin hem hücre hatları üzerinde hem de tümör modeli oluşturulmuş farelerde etkili olduğu belirtilmiştir. Öte yandan, manyetik NP'ler, lizozom içine hapsedildikten sonra manyetik alan uygulandığında lizozomal membran geçirgenliği arttığı için reaktif oksijen türleri (ROS) bağımlı sitotoksitenin ortaya çıktığı literatürde bildirilmiştir (Domenech et al., 2013). Benzer şekilde, lizozomlarında NP'ler içeren tümör hücrelerine 30 dakika MHT uygulandığında lizozom membran geçirgenliğinde ve buna bağlı olarak hücre içi ROS üretiminde artışın olduğu görülmüştür. Neticede hücrelerde büyük hasarın olduğu ve hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir (Connord et al., 2015).

Hedefe yönelik çalışmalar ile kansere karşı kullanılan tedavilerin etkinliği bir noktaya kadar arttırılmıştır ancak yeterli düzeyde etkili olan ve sınırlı yan etki sergileyen tedavi yollarının araştırılmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Ek olarak, kullanılan taşıyıcılar doz bağımlı toksisite göstermektedirler ve şu anda ortaya çıkmayan etkilerinin ilerleyen yıllarda ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (Hossen et al., 2019). Bu nedenle tedavide kullanılacak taşıyıcıların ve ilacın konsantrasyonunu sınırlandırmaya yönelik yaklaşımlar, oluşabilecek dezavantajları elemine etmeye yardımcı olacaktır. Doğrudan kullanılan ilacın veya taşıyıcı/ilac kompleksinin konsantrasyonun azaltılması ise tedavi etkinliğini azaltmaktadır. Diğer yandan kanser hücreleri, daha önce açıklandığı üzere ilaçların etki mekanizmalarını devre dışı bırakacak çeşitli savunma mekanizmaları içermektedir. Tüm bu sorunların üstesinden gelmek için tümleşik (kombine, birleşik) yaklaşımlar önerilmektedir (Şekil 8). Tümleşik tedavi yaklaşımlarında, düşük konsantrasyonda birden fazla ajanın aynı anda uygulanması ile terapilerin etkisi birleştirilmekte ve böylece tedavinin gücü artırılmaktadır (Adibzadeh et al., 2020). Çünkü kanser ilaçları kombinasyon halinde verildiğinde, farklı mekanizmalarla çalışan ilaçlar, dirençli kanser hücrelerinin gelişme olasılığını azaltmaktadır. Bu durum aynı zamanda ilaçların yüksek dozda kullanımını sınırlandırmaktadır. Ayrıca, tedavi etme yönüne ek olarak kombine tedavi, semptomları azaltmak ve hastanın yaşam süresini uzatmak için kullanılmaktadır.



Şekil 8. Tümleşik (kombine, birleşik) yaklaşımların avantajları

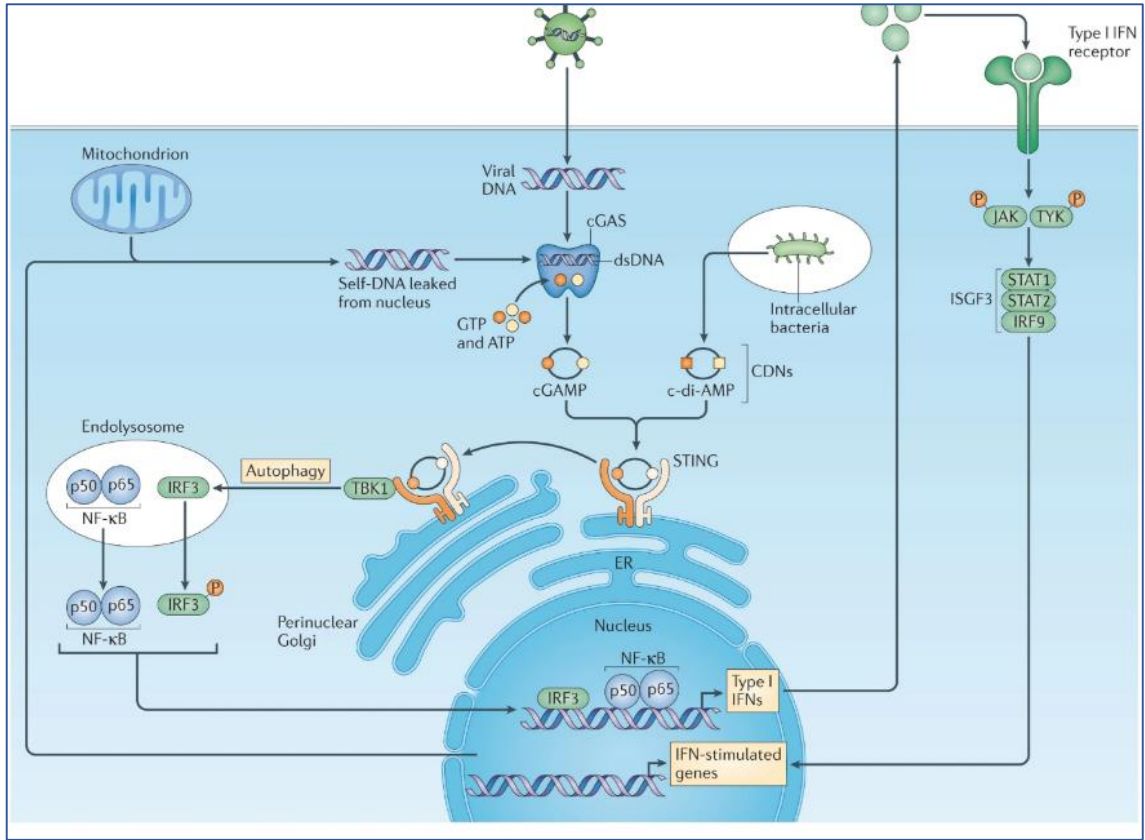
İnterferonların İmmünoterapideki Roller

İnterferonlar (IFN), immün sistemin bir parçası olan proteinlerdir ve antiviral, antitümör ve immünomodülatör etkilere sahiptir. IFN'ler, hücrelerde antiviral proteinlerin sentezini uyararak virüs replikasyonunu engelleyebilir. Bunun yanında IFN'ler, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engelleyebilir, bağışıklık sistemini uyararak (immün yanıtları uyarabilir veya baskılayabilir), tümör hücrelerine karşı immün yanıtı artırabilir ve kanser hücrelerini hedef alabilir. IFN üretimini teşvik edebilen yapılara örnek olarak siklofosfamid (kemoterapi ilacı), interleukin-2 (IL-2, bir sitokin), IL-12, poliinosinik-polisitidik asit (Poly-IC, immünostimülatör) ve Toll benzeri reseptör agonistleri (imikvimod gibi) verilebilir (Longhi et al., 2009; Patti et al., 2001; Propper & Balkwill, 2022).

IFN'ler, meme kanseri tedavisinde immünoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır (Choi et al., 2021; Mattiuz et al., 2021; L. Sun et al., 2021). Hücrelerin antijen sunumunu artırarak tümöre karşı immün yanıtı güçlendiren IFN'ler, tümör hücrelerinin büyümesini engelleyerek anti-proliferatif etki göstermekte ve apoptozu uyararak tümör hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca, IFN'ler T hücre aktivitesini artırarak antitümör yanıtı güçlendirmekte ve aynı zamanda, tümör mikroçevresindeki immünsupresyonu azaltarak, immün sistemin tümöre karşı savaşını kolaylaştırmaktadır. Bunun yanı sıra, IFN'ler kanser hücrelerinin metastaz yapmasını da engelleyerek tedavi başarısını artırmaktadır.

Yüksek immünojenik etkiye sahip halkasal dinükleotitler (CDN'ler), son yıllarda kansere karşı inflamatuvar yanıt oluşturmak amacıyla adjuvan aşı olarak önerilmektedir (Chandra et al., 2014). İnsan hücreleri, sahip olduğu DNA sensor proteinleriyle sitoplazmada beliren DNA'yı parçalayarak CDN'leri üretebilmektedir (Unterholzner, 2013). Bu nedenle araştırmacılar, hücreleri çift zincirli DNA (dsDNA) ile transfekte ederek, hücre içinde CDN'lerin açığa çıkması yoluyla, başta tip I IFN'ler olmak üzere birçok proinflamatuvar⁷ genin ekspresyonunu indüklemektedir. Çalışmalar, dsDNA ile yapılan immün uyarımın CDN'lere kıyasla daha etkili olduğunu çünkü sitoplazmada ortaya çıkan DNA'nın dizi ve uzunluğuna göre farklı sensör proteinleri ile algılandığını ve DNA'nın parçalanarak çeşitli CDN'lerin üretildiğini (CDN kokteyli oluşmaktadır) belirtmektedir. Oluşan CDN'ler veya doğrudan dsDNA, endoplazmik retikulum membranında bulunan STING adı verilen bir proteinin aktivasyonunu sağlamaktadır (Ishikawa et al., 2009). STING aktivasyonu, hücre içinde gerçekleşen bir seri fosforilasyon reaksiyonunu tetiklemekte ve nihayetinde hem hücrede apoptotik yol aktive olmakta hem de çeşitli proinflamatuvar genlerin ekspresyonu gerçekleşmektedir (Barber, 2015; Saitoh et al., 2009). Sitozolik dsDNA yolağı olarak adlandırılan bu süreçte, öncelikle TBK1 (TANK Bağlanma Kinaz 1) ve IKK ϵ (I κ B kinase ϵ , I κ B ise NF- κ B sinyal yollarının bir regülatörü) proteinlerinin fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Fosforillenen TBK1 ve IKK ϵ enzimleri IRF3 (IRF; IFN düzenleyici faktör) ve NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) isimli transkripsiyon faktörlerinin hücre çekirdeğine yönelmesini uyarmaktadır. Böylece transkripsiyon faktörleri birçok proinflamatuvar (IFN β gibi sitokinler, CXCL9 ve CXCL10 gibi kemokinler) ve pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır (Şekil 9).

⁷ Proinflamatuvar: İnflamasyon yükseltici



Şekil 9. STING bağımlı doğal bağışıklık sinyalinin oluşması.

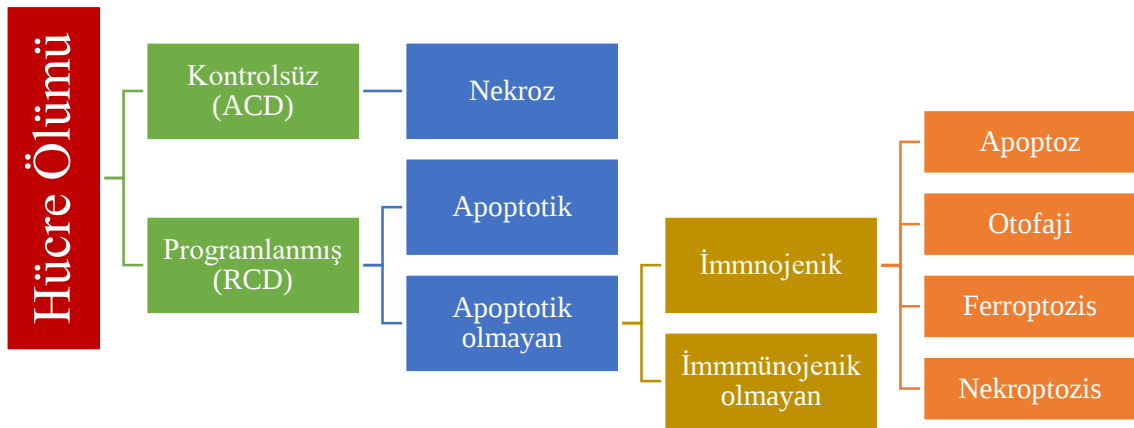
(Barber, 2015)'ten alınmıştır. Sitoplazmada beliren dsDNA, sensör proteinleri ile parçalanır ve CDN'ler üretilir. CDN'ler, STING-TBK1 yolağı üzerinden IFN- β gibi tip I IFN üretimine neden olmaktadır.

Proinflatuar genlerin ekspresyonu sonucu üretilen sitokin ve kemokinler, başta NK ve DC olmak üzere çeşitli bağışıklık hücrelerini uyarmakta ve aktive etmektedir (Barber, 2015; D. S. Chen & Mellman, 2013; Dranoff, 2004; Gajewski & Corrales, 2015; Nakamura et al., 2015). Tip 1 IFN (IFN- α , IFN- β)'lerin şiddetli indüksiyonu, bir dizi immüno-düzenleyici fonksiyona aracılık etmekte, DC aktivasyonu yoluyla T hücre yanıtını düzenlemekte ve T hücrelerinde IFN- γ ekspresyonunu teşvik etmektedir (Gajewski & Corrales, 2015; Nguyen et al., 2000). IFN'lerin üretimini artırıcı yaklaşımlar yoluyla aktif bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerini hedef alması sağlanmaktadır. Tümör bölgesinde CD3+ ya da CD8+ T hücrelerinin varlığı ve hastanın yaşam süresi arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Galon, 2006; Mellman et al., 2011). Bu hücrelerin tümör bölgesine göçleri, tedavinin başarısını artırmaktadır. IFN ekspresyonuna bağlı olarak kanser hücrelerinin T veya NK hücreleri ile yok edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Abe et al., 2013; Miyabe et al., 2014; Nakamura et al., 2015). Özellikle T hücrelerinde üretilen IFN- γ , kanser hücreleri ile mücadelede oldukça büyük bir role sahiptir (D. S. Chen & Mellman, 2013; Dranoff, 2004; Kapadia et al., 2015). IFN- γ dâhil IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β gibi birçok sitokin, anti-kanser özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde klinik denemelerde kullanılmaktadır (Dranoff, 2004). STING aktivasyonu, IFN

indüksiyonunun yanı sıra hücre içinde apoptotik yolu aktive ederek kanser hücre ölümünü uyarmaktadır (C. H. A. Tang et al., 2016). Aynı zamanda yüksek oranda IFN- β üretiminin kanser hücrelerini apoptotik yolla öldürdüğü bilinmektedir (Yoshida et al., 2004).

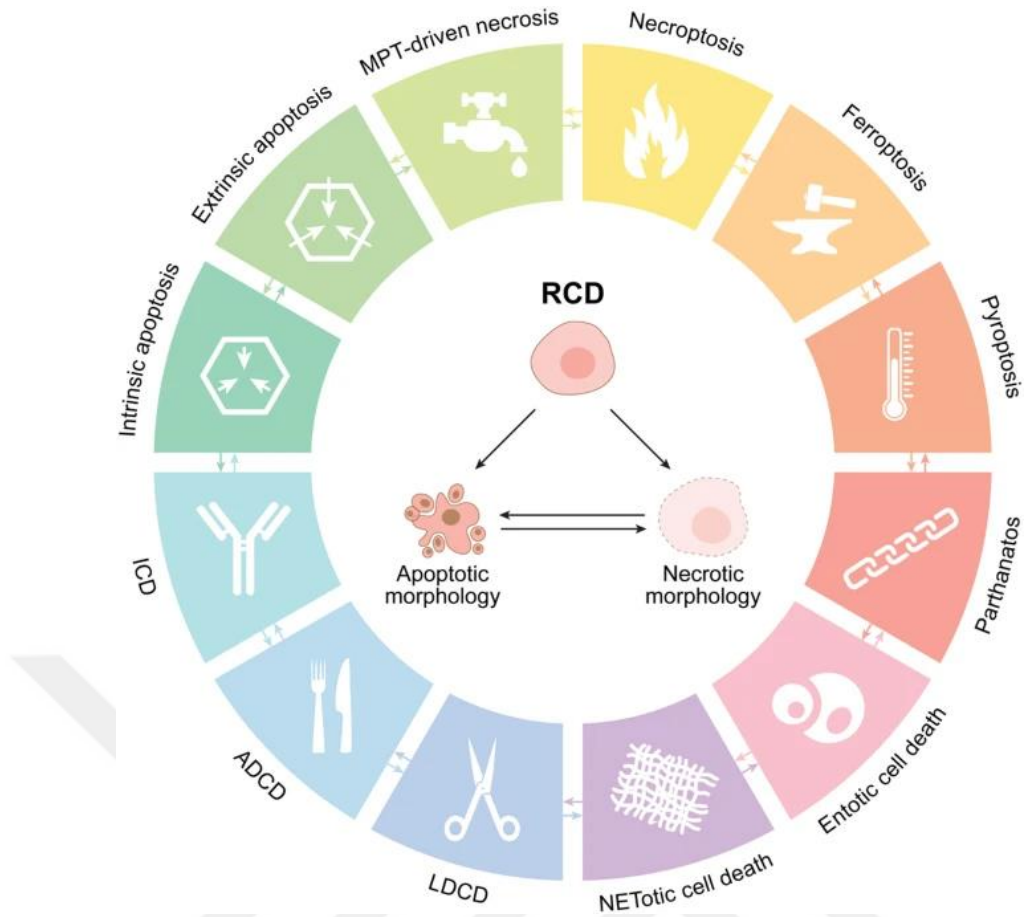
Kanser Hücre Ölümü Yolları

Hücresinin kaderi toksik uyarının gücüne ve doğasına bağlı olarak şekillenmektedir. Tasarlanan tedavi yaklaşımlarında, kanser hücrelerinin ölümü hedef alınırken, vücuttaki sağlıklı hücrelerin sıhhati göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayırarak hücre ölüm sürecini tetiklemek, amaçlanan tedavinin başarısı için oldukça önemlidir. Hücre ölümleri, uzun yıllardır kontrolsüz hücre ölümü (Accidental Cell Death, ACD) ve programlanmış hücre ölümü (Regulated Cell Death, RCD) şeklinde iki kategoride incelenmektedir (Şekil 10). Kontrolsüz hücre ölümü biyolojik olarak kontrol edilmeyen bir süreçken, programlanmış hücre ölümünde çeşitli sinyal iletiminin rol oynadığı aksiyon serileri yer alır. RCD'de, apoptotik ve apoptotik olmayan mekanizmalar yoluyla hücre ölümü düzenlenmektedir. Apoptotik olmayan yol ise immünojenik ve immünojenik olmayan hücre ölümü mekanizmalarını içermektedir (Galluzzi et al., 2017). Apoptoz, piroptoz ve nekroptoz gibi süreçleri içeren immünolojik hücre ölümü (ICD) sırasında immün yanıt gelişmektedir. İmmünolojik olmayan hücre ölümü ise nekroz gibi süreçlerde gerçekleşen hücre ölümlerini kapsamaktadır. Genellikle patolojik koşullar altında gerçekleşen ve inflamasyon ile ilişkili bu süreçte ya immünolojik yanıt ortaya çıkmaz ya da sınırlı bir immün yanıt gözlenir.



Şekil 10. Hücre ölüm mekanizmaları.

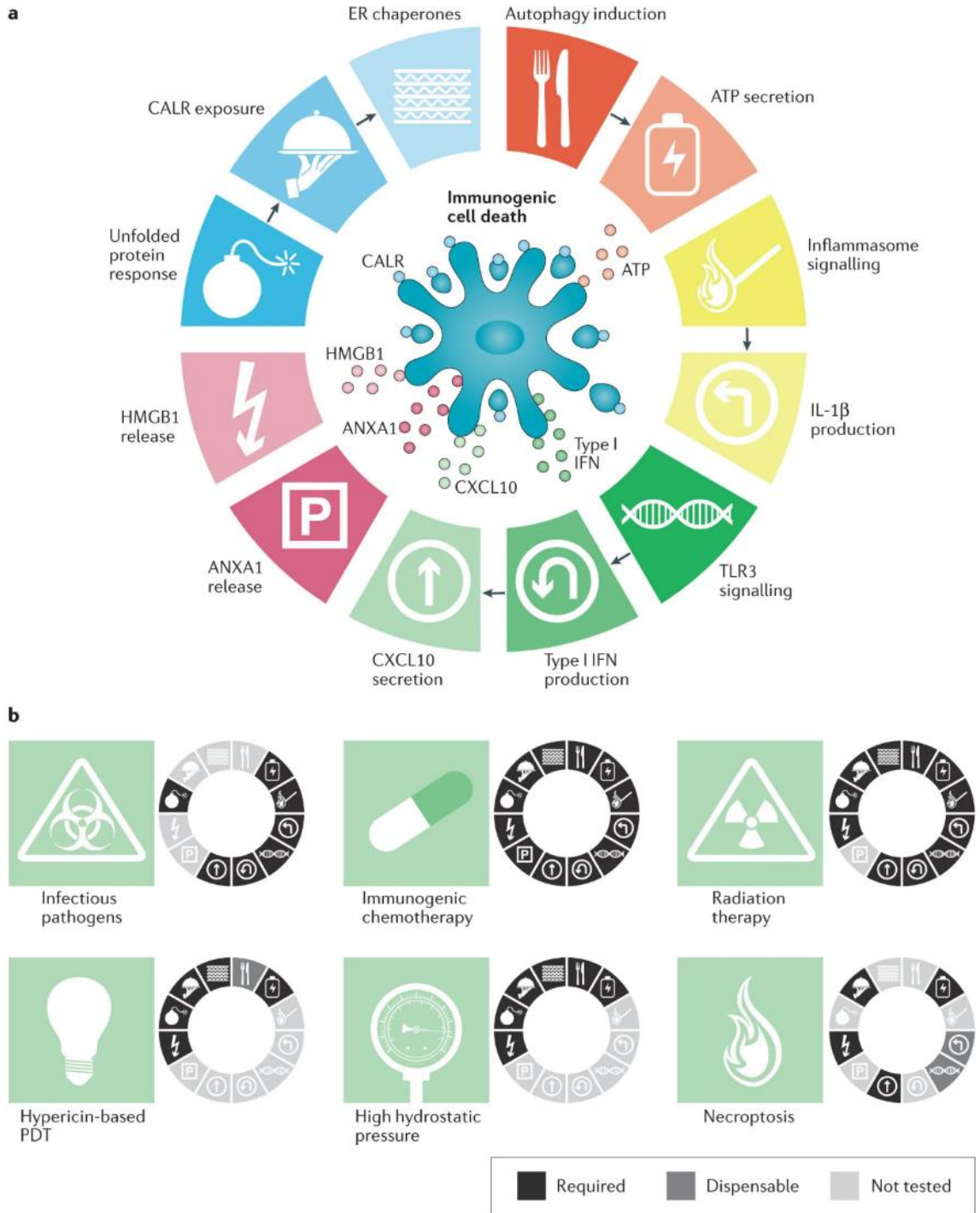
Memeli hücreleri, birçok farklı sinyal iletim mekanizmaları kullanarak hücre ölüm yollarından birini aktive eder. RCD modlarının her biri, birbiri ile ilişkili moleküler mekanizmalara sahiptir (Şekil 11).



Şekil 11. Temel programlanmış hücre ölümü (RCD) yolları.

ADCD: otofajiye bağlı hücre ölümü, ICD: immünojenik hücre ölümü, LDCD: lizozoma bağlı hücre ölümü, MPT: mitokondriyal geçirgenlik dönüşümü, NETotik: programlı netrofil ölümü. Şekil (Galluzzi et al., 2018)'den alıntılanmıştır.

Bazı kimyasallar (kemoterapötikler), hücreleri ICD yoluyla ölüme sürüklemektedir. Örneğin oksaliptatin bir sisplatin türevidir sisplatin immünojenik olmayan hücre ölümüne neden olurken oksaliptatin ICD'ye neden olan bir ilaçtır (Galluzzi et al., 2017). ICD gerçekleşmeye başladığında, genel olarak bağışıklık sistemini aktive eden çeşitli proteinler ortama saçılır ve bu maddeler bağışıklık hücreleri tarafından algılanır. CXCL10 (C-X-C motifli kemokin 10), HMGB1 (Yüksek mobilite grubu protein 1), ANXA1 (Annexin A1), tip I IFN (interferon) gibi farklı proteinler ICD'nin gerçekleştiğine dair bazı belirteçlerdir (Şekil 12).

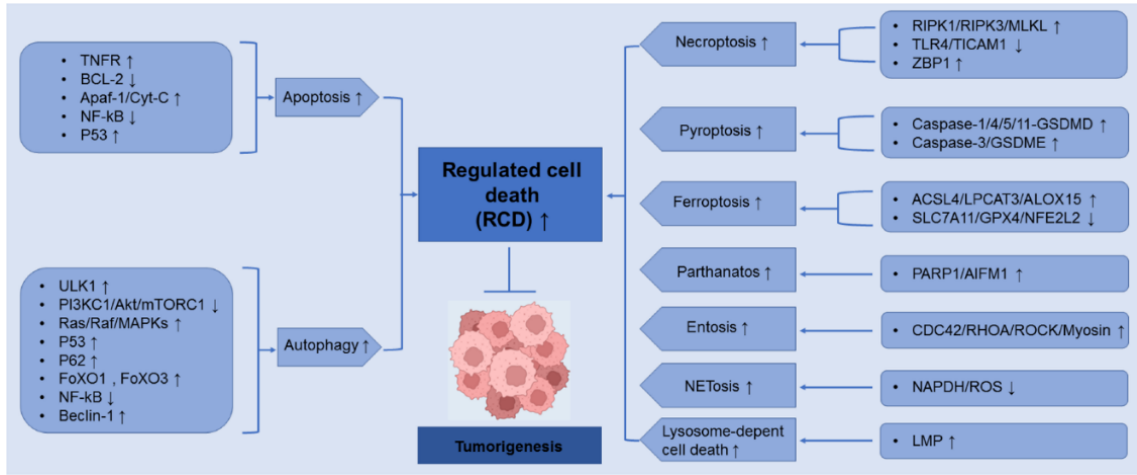


Şekil 12. Hücre ölümünün immünojenikliği için farklı gereksinimler.

a. ICD ilişkili süreçler; katlanmamış protein tepkisi ve buna bağlı olarak kalretikülün (CALR) ve diğer endoplazmik retikulum (ER) şaperonlarının hücre yüzeyinde birikmesi, otofajinin aktivasyonu ve bunun sonucunda ATP salgılanması, inflammatuar sinyalleşme üzerine interlökin-1 β (IL-1 β) salımı, CXC-kemokin ligand 10'un (CXCL10) üretimini uyaran bir tip I interferon (IFN) yanıtıyla sonuçlanan Toll benzeri reseptör 3'ün (TLR3) aktivasyonu, yüksek hareketli grup kutusu 1'in (HMGB1) ve annexin A1'in (ANXA1) ortama salınması. b. ICD'nin farklı varyantları, ölmekte olan hücrelerden farklı tehlike sinyallerinin yayılmasına bağlıdır (veya bununla ilişkilidir). PDT, fotodinamik terapi. Şekil (Galluzzi et al., 2017)'den alıntılanmıştır.

Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (NCCD), hücre ölümünün morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel açılardan tanımlanması ve yorumlanması için çeşitli kılavuzlar

yayınlanmıştır. Apoptoz, nekroz, otofaji, pyroptoz, ferroptoz, nekroptoz, paraptosis, entoptozis, autonekrozis, alkaliptozis, anoikis, ksenoptozis, citoptozis, apyoptozis, netozis gibi çok çeşitli mekanizmalar hücre ölümünü açıklamak üzere tanımlanmıştır (D. Tang et al., 2019). Bu süreçlerde; kromozomal değişiklikler, hücre membranındaki değişimler, hücre içi oksidatif stres veya antioksidan durumu, çeşitli genlerin aktivasyonu/deaktivasyonu gibi birçok faktör farklılık göstermektedir. Her bir ölüm yolunun kansere karşı mücadelede kullanılabilir birer araç olabileceği düşünülebilir ve kanser hücresinin doğasına ve uygulanacak terapi modeline göre tümör hücreleri bu yollarla ölüme sürüklenebilir (Şekil 13).



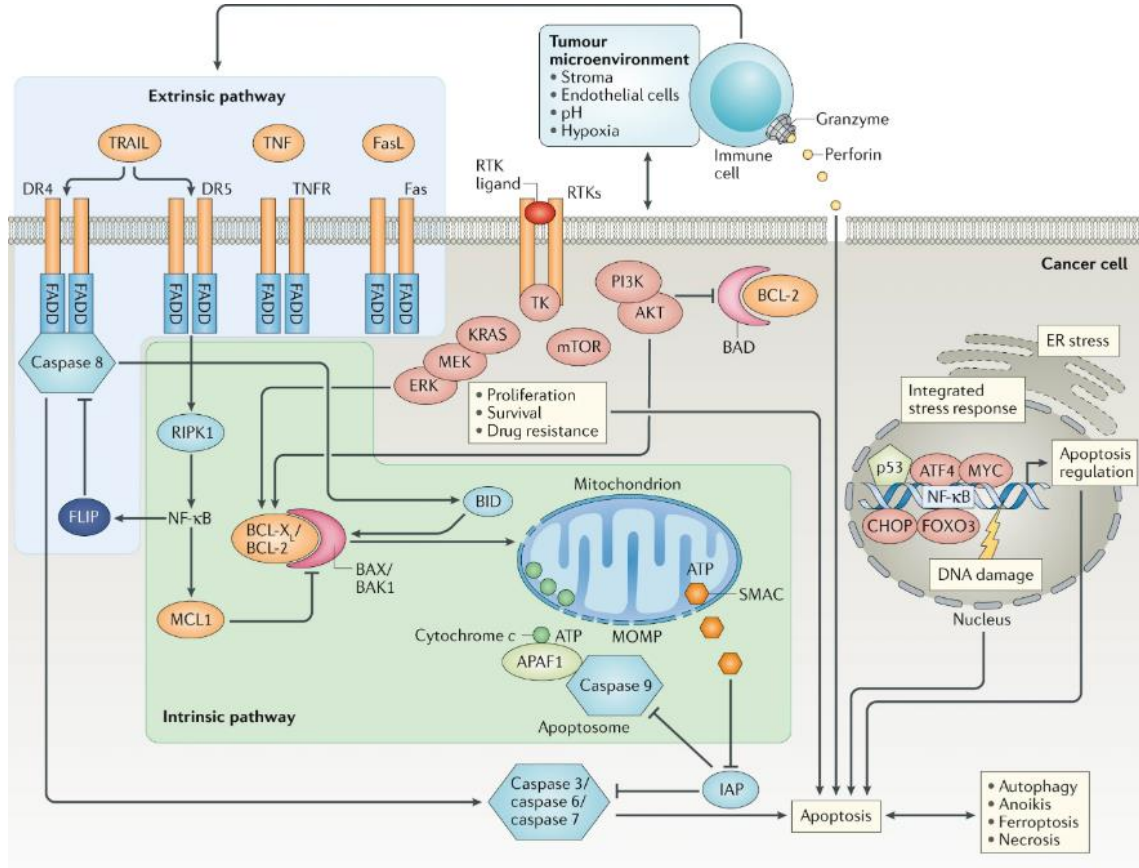
Şekil 13. Tümöröjenize karşı hücre ölüm modları ve bu mekanizmalarda rol alan başlıca proteinlere ait genlerin ekspresyon değişimi. (Peng et al., 2022)’den alıntılanmıştır.

Apoptoz

Apoptoz, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasına yönelik çok hücreli canlıların sahip olduğu doğal bir hücre ölüm sürecidir (Nagata & Tanaka, 2017). Apoptoz, çeşitli uyaranlar tarafından içsel (intrinsic denilen mitokondri aracılı) veya dışsal (extrinsic denilen ölüm reseptörü aracılı) olarak iki farklı yol aracılığıyla başlatılır (Nagata & Tanaka, 2017; Singh et al., 2019) (Şekil 14). Mitokondri aracılı apoptozis sürecinde, sitokrom C gibi mitokondriyal moleküller sürece dahil olurken ölüm reseptörü aracılı apoptozis, FAS ligandı (FASL, TNFSF6 olarak da bilinir) gibi ölüme neden olan bir faktör ve kaspaz 8 üzerinden tetiklenir. Her iki sürecin devamında, bir seri kaspaz aktivasyonu yoluyla apoptotik hücre ölümünü indüklemek için 500’den fazla sitoplazmik proteini parçalayan kaspaz 3’ün aktivasyonu gerçekleşir.

Bir hücrede apoptotik süreç başladığında nükleer yoğunlaşma, hücre büzülmesi, hücre membranında sızıntı, DNA fragmentasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi belirgin morfolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Apoptozis yıllarca kanser ile ilişkilendirilmiş ve

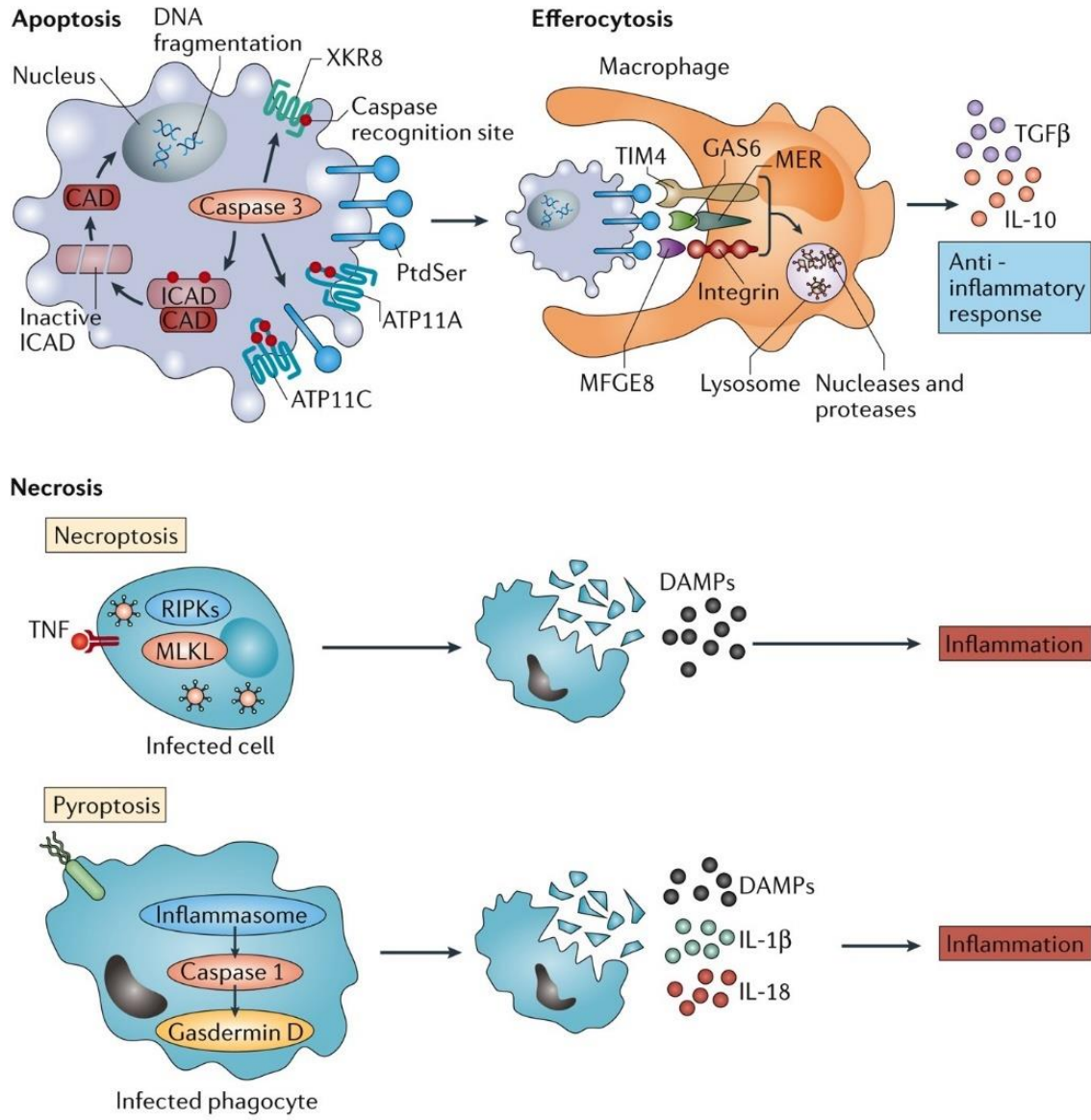
bugün apoptozise dirençli kanser türlerinin varlığı ortaya çıkmıştır. Bu tür dirençli kanser türleri ile mücadele için diğer RCD mekanizmaları aktive edilebilir.



Şekil 14. Sağ kalım sinyalleri, bağışıklık hücreleri ve tümör mikro ortamı ile apoptoz sinyal yollarının genel görüntüsü. (Carneiro & El-Deiry, 2020)'den alıntı yapılmıştır.

Ferroptoz

Ferroptoz, lipid peroksitlerin birikmesi ile karakterize bir apoptotik olmayan hücre ölüm tipidir (Dixon et al., 2012). Lipid peroksitler, demirin dâhil olduğu bir dizi tepkime ile membran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA, polyunsaturated fatty acids) oksidasyonu yoluyla oluşur. Hücre içi glutatyon peroksidaz 4 (GPX4), reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından üretilen lipid peroksitlerini azaltmak için bir antioksidan olan indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanmaktadır (Şekil 15). Sonuçta, GPX4 bozulması veya GSH tükenmesi nedeniyle lipid peroksitler biriktiğinde, ferroptoz tetiklenir (Stockwell et al., 2017; Zhao et al., 2021). Ferroptosis yolağının aktivasyonu kansere yönelik tedavi yaklaşımları arasında yer almaktadır.

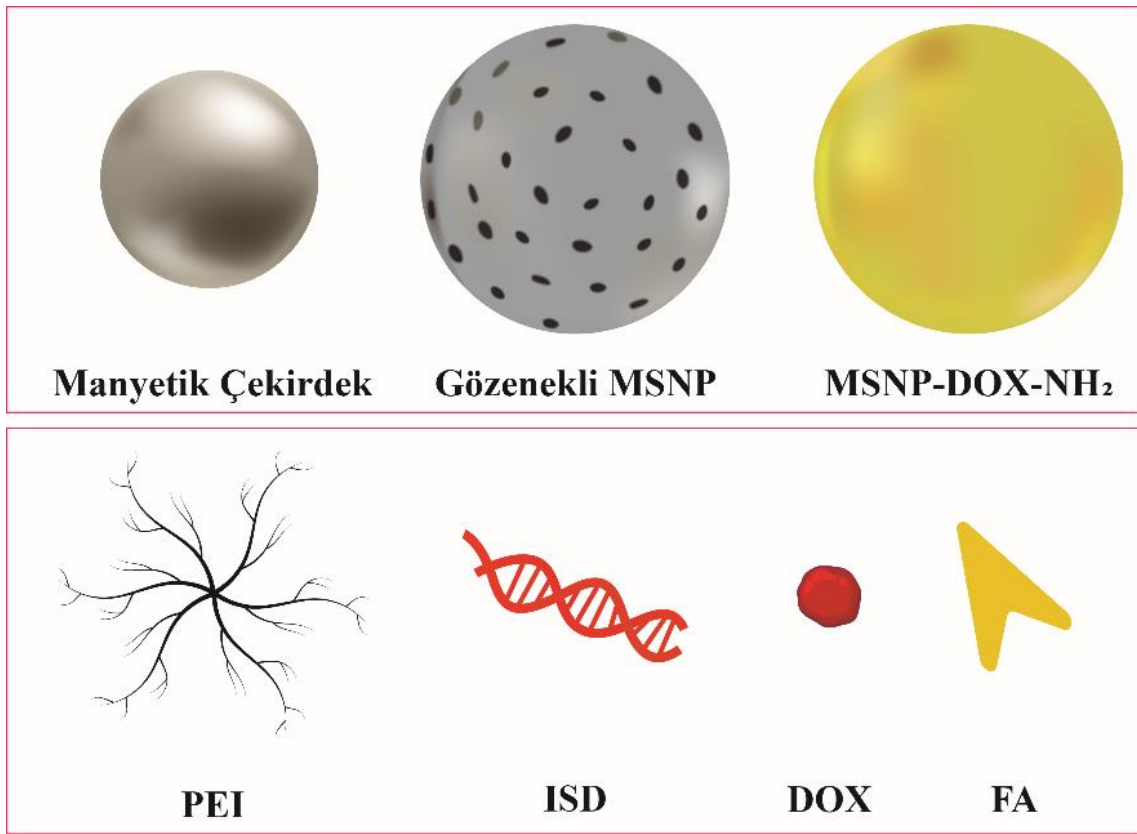


Şekil 16. Apoptoz, nekrotoz ve piroptoz hücre ölüm mekanizmalarının şematik gösterimi. Apoptotik hücreleri yutan makrofajlar, enflamasyonu bloke etmek için dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGFβ) ve interlökin-10 (IL-10) üretir. CAD: kaspazla aktive olan DNaz, ICAD: DNaz inhibitörünü, XKR8: scramblase XK ile ilişkili protein 8, PtdSer: fosfatidilserin, GAS6: growth arrest-specific protein 6, TIM4: T hücresi immünoglobulin ve müsin alanı içeren protein 4, TNF: tümör nekroz faktörü, RIPK: reseptörle etkileşime giren protein kinaz, DAMP: hasarla ilişkili moleküler modeller. Şekil (Nagata & Tanaka, 2017)'dan alıntılanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Protokol Tasarımı ve Materyal Seçimi

Bu başlıkta, tez çalışmasında kullanılan bileşenlerin rolü ve seçimi hakkında bilgi verildi (Şekil 17). Öncelikle kemoterapi ilacı olarak doksorubisin (DOX) tercih edildi, çünkü DOX, meme kanserine karşı etkili, immünojenik hücre ölümüne neden olan, floresan spektrofotometre ile ölçüm yapılabilen, çok çalışılmış ve bu sayede olası etkileri ön görülebilen bir ilaçtır. İlaç taşıyıcı yapı, kemoterapi ilacının hedef hücrelere taşınmasını sağlayan bir materyaldir. Gözenekli manyetik silika nanoparçacıklar (MSNP), DOX aktarımında çokça kullanılmış bir yapıdır. Yapının gözenekleri, ilacın korunmasını ve etkili bir şekilde salımını sağlarken manyetik kısmı hem mıknatısla yönlendirme hem de AC (Alternatif Akım) manyetik alan altında sıcaklık artışını sağlamak üzere kullanıldı. Manyetik çekirdek olarak, kısa sürede ortam sıcaklığını artırdığı bilinen çinko-demir oksit NP'ler üretildi. Hipertermi ajanı, tedavi sırasında hedeflenen bölgedeki hücre içi sıcaklığı artıran bir bileşendir. AC manyetik alan üreticisi olarak MSI Automotion cihazı kullanıldı. Bu cihaz, sabit frekansta çalışarak AC manyetik alan üretir ve hipertermi etkisi oluşturur. Manyetik hipertermi (MHT) uygulaması, kanser hücrelerinin ilaç gibi diğer tedavilere daha duyarlı hale gelmesini sağlar ve tedavilerin etkinliğini artırır. MSNP yüzeyi, hem hedefleme hem DNA yükleme alanı olarak kullanıldı. Bu tez çalışmasında hedefleme molekülü olarak folik asit (FA) kullanıldı. Bir ilaca veya ilacı içeren taşıyıcı yüzeyine FA tutturulması, ilacın hedeflenen kanser hücrelerine daha fazla taşınmasını sağlar. FA, bir katyonik polimer olan polietilenimin (PEI) yardımıyla MSNP'ye dâhil edildi. Bu sayede PEI'nin DNA bağlama, endositozdan kolay kaçış, NP'lerin kararlılığını artırma ve kontrollü ilaç salımı gibi birçok özelliğinden faydalanıldı. İmmünoterapi ajanı olarak ISD (immune stimulatory DNA) kullanıldı. Bu ajan, bağışıklık sisteminin aktivasyonunu artıran bir madde olarak işlev görür. Çalışmada meme kanseri hücre hatlarından MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) ve MDA-MB-231 (MD Anderson-Metastatic Breast-231) kullanılırken tümörojenik olmayan hat olarak MCF-10A (Michigan Cancer Foundation-10A) kullanıldı.

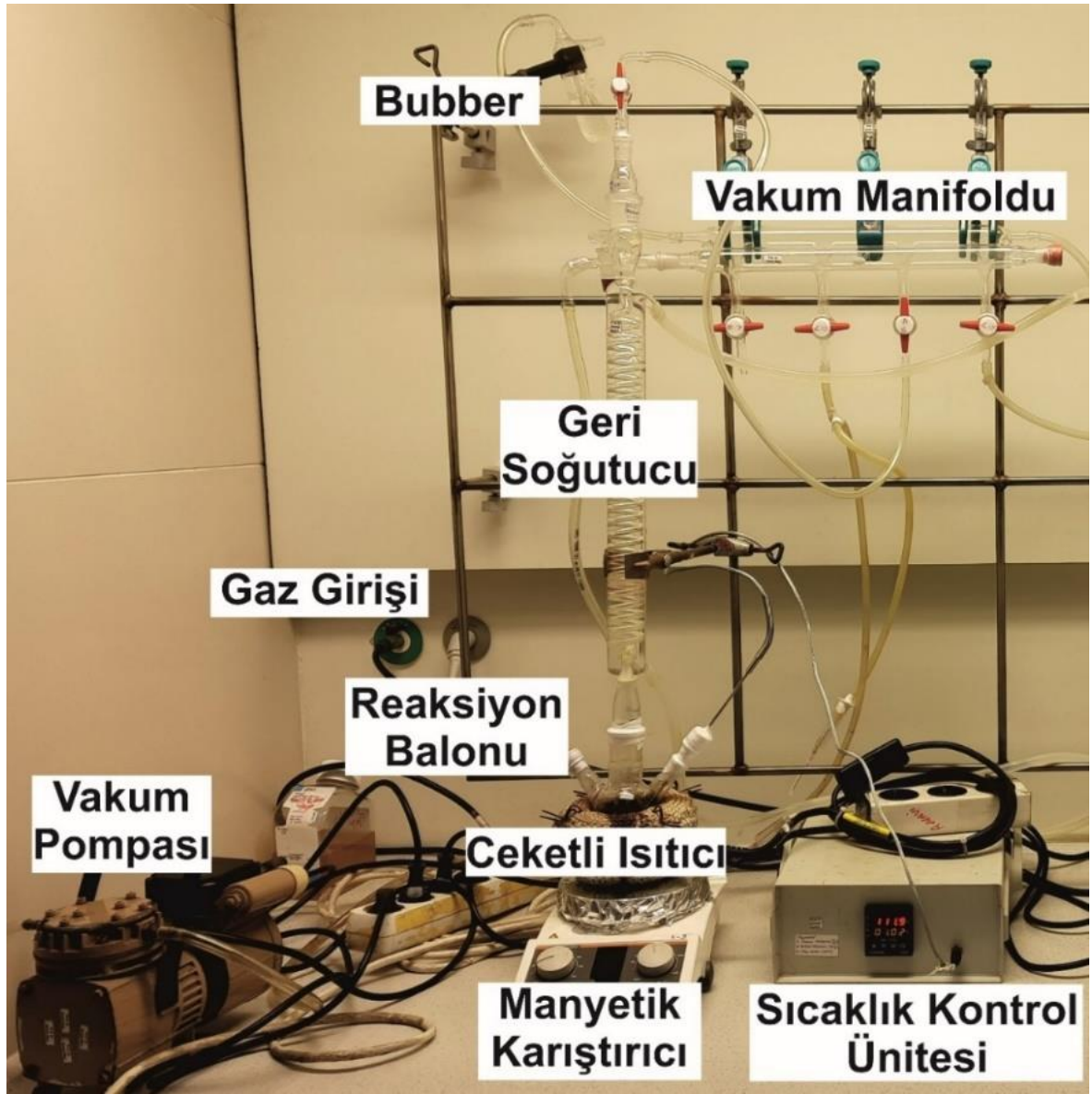


Şekil 17. Tez çalışmasında kullanılan bileşenlerin sembolik gösterimleri.

Taşıyıcı Nanoyapının Hazırlanması

Manyetik nanoparçacıkların (MNP) üretimi ve karakterizasyonu

Çinko (Zn) katkılı MNP'ler, literatürden temin edilen bir termal bozunma yönteminin modifiye edilmesiyle üretildi (H. J. Kim ve Choi, 2019; Yin vd., 2016; Solak vd., 2021). Basitçe, üç boyunlu yuvarlak tabanlı bir balonda, 15 ml benzil eter (Aldrich, W237108), 15 ml oleylamin (Aldrich, HT-OA100) ve 15 ml oleik asit (75096, Fluka) içerisinde 3 mmol $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (1,16 g, Aldrich, F300), 3 mmol ZnCl_2 (0,41 g, Sigma-Aldrich, 14422) ve 3 mmol 1,2-Dekandiol (0,520 g, Sigma-Aldrich, 260320) çözüldü. Karışım, 1000 rpm karıştırma hızıyla karıştırılırken inert gaz akışı altında 30 dakika içinde $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtıldı. Ardından çözelti, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat inert atmosfer (azot gazı, yüksek saflık) altında dehidre edildikten sonra 30 dakika içinde $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtıldı ve bu sıcaklıkta 2 saat tutuldu (500 rpm). Sıcaklık, termokupl (Ordell, Pt-100) ve sıcaklık kontrol ünitesi (Ordell, PC441) kullanılarak takip edildi (Şekil 18). Süre sonunda ısıtıcıdan hemen uzaklaştırılan balon, oda sıcaklığına soğutuldu ve karışıma etanol (Isolab, 920.026.2500) ilave edilerek MNP'ler, 20 dakika $10.000\text{ g}'de$ santrifüj işlemiyle toplandı. Etanol (35 ml) ile 3 kez yıkanan $\text{Zn}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ MNP'ler mıknatıs ile toplanarak 10 ml hekzan (Sigma-Aldrich, 208752) içinde dağıtıldı. Kullanılincaya kadar MNP'ler inert gaz koruması altında $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (Heidari Majd et al., 2013).



Şekil 18. Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm nanoparçacıkların üretildiği reaksiyon düzeneği (Schlenk sistemi).

Sistem temel olarak; sıcaklık kontrol ünitesi, termokupl, manyetik karıştırıcı, ceketli ısıtıcı, geri soğutucu, vakum pompası ve vakum manifoldundan oluşmaktadır.

MNP'lerin kristal yapısının aydınlatılması için X ışını kırınım (XRD) kristalografisi (EMPYREAN, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) kullanıldı. Analiz için heksanda dağıtılmış MNP solüsyonları, öncesinde asit ve saf su ile yıkanmış temiz camlar üzerine homojen bir film oluşturacak şekilde damlatıldı ve numuneler oda şartlarında kurumaya bırakıldı. Örnekler, Cu K α ($\lambda=1,54056$ Å) kullanılarak 10-90° aralığında 0,02° adımlı olarak tarandı (40 mA, 45 kV). Örneklerin geniş açılı XRD desenleri PANalytical programı ile analiz edildi. Kristal boyutu hesaplanırken literatürde sıklıkla yer bulan ve aşağıda sunulan Scherrer denklemi kullanıldı (Kasparis et al., 2022).

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \text{ nm}$$

Bu denklemdeki τ kristal boyutudur, K değeri 0,89 olan şekil faktörüdür (Shape factor, Fattore di forma), λ X-ışını kaynağının dalga boyudur (1,54056 Å), β maksimum yarıdaki tam genişlik (full width at half maximum, 0,5443 olarak hesaplandı) iken θ ise bu noktadaki Bragg açısıdır (35,39°).

Elde edilen MNP'lere ait atom türlerini ve karakteristik bağlanma enerjilerini belirlemek üzere X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS, Specs-Flex, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) kullanıldı. Analiz için hekzanda dağıtılmış MNP solüsyonları, öncesinde asit ve saf su ile yıkanmış temiz camlar üzerine homojen bir film oluşturacak şekilde damlatıldı ve numuneler oda şartlarında kurumaya bırakıldı. Örneklere ait spektrum (Wide-scan ya da survey spectrum) kaydedildi.

Karbon kaplı bir bakır grid üzerine damlatılan hekzanda dağıtılmış MNP'ler, oda şartlarında kurutulduktan sonra geçirimli elektron mikroskobu (TEM, Hitachi HighTech HT7700, DAYTAM) ile görüntülendi. TEM görüntüleme ile MNP'lere ait yapısal (şekil, boyut) bilgiler edinildi.

Son olarak, tolüen (Sigma-Aldrich, 24529) içinde dağıtılan MNP solüsyonunun indüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS, Agilent 7800, DAYTAM) ile demir ve çinko içeriği ölçüldü. Farklı Fe içeriğine sahip MNP solüsyonları, AC manyetik alan (MSI Automation, manyetik hipertermi sistemi) altında tutuldu ve fiber optik bir temokupl kullanılarak örneklerin zamanla sıcaklık değişimi grafik edildi. AC manyetik alanda tutulmuş olan bu tüplerin termal kamera (Seek Shot Pro, 320x240 Pixel) ile fotoğrafları çekildi. Elde edilen sıcaklık-zaman grafiği ve aşağıdaki denklemlerle (Muro-Cruces et al., 2019) faydalanılarak MNP'lerin SAR değerleri hesaplandı.

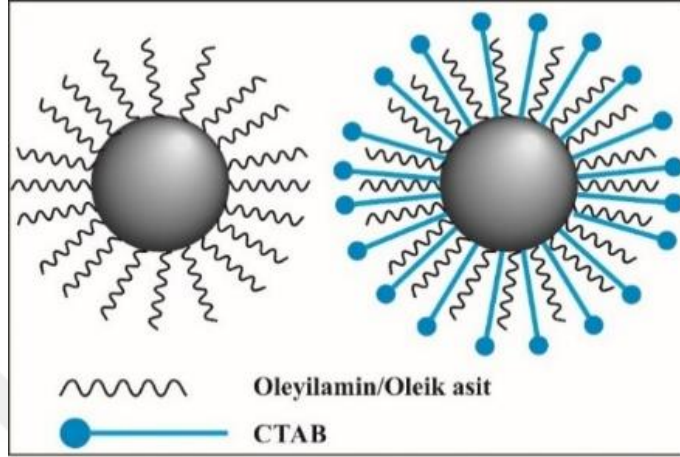
$$SAR = \frac{C_{tolüen} \times m_{örnek}}{m_{Fe}} \times \frac{dT}{dt}$$

Bu formülde c özgül ısıyı temsil etmektedir ve tolüen için bu değer 1,717 kJ.kg⁻¹.K⁻¹ olarak alınmıştır. $m_{örnek}$, örneğin toplam kütle (mg), m_{Fe} ise örnekteki demirin toplam kütle (ICP-MS sonuçlarında elde edilen veriden demir miktarı mg cinsinden hesaplanmıştır) ifade etmektedir. Denkleminde yer alan dT ve dt , sırasıyla, sıcaklık (°C) ve süre (saniye) değişimini belirtmektedir. Elde edilen SAR değeri, J.sn⁻¹.g⁻¹ biriminden watt/kg'a çevrilerek sunulmuştur.

MNP'nin mezoporöz silika ile kaplanması (MSNP üretimi)

Mezoporöz manyetik silika nanoparçacıklar (MSNP), literatürde bulunan bir protokol takip edilerek üretildi (J. Kim et al., 2008). Öncelikle, hekzan içerisinde saklanan MNP

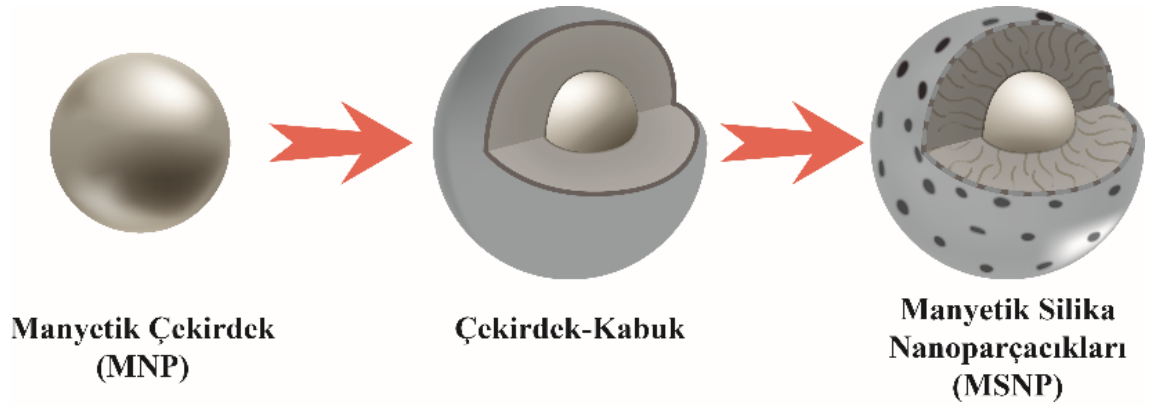
solüsyonunda ne kadar MNP olduğunu belirlemek için, darası alınmış armudi balona 1 ml MNP solüsyonu alınıp evaporatör ile hekzan çektirildi. Armudi balon tartıldıktan sonra, 10 mg/ml MNP olacak şekilde kloroform içinde ultra-sonik su banyosu yardımıyla MNP dağıtıldı. Ardından 1 g setiltrimetilamonyum bromür (CTAB, Merck, 8.14119.0500), 0,55 M olacak şekilde 5 ml su (ultra saf su, 25 °C’de 18 mΩ) ile karıştırılırken bu ortama 0,5 ml MNP solüsyonu ilave edildi (Şekil 19). Karışım 65 °C’de 10 dakika tutularak kloroform uzaklaştırıldı.



Şekil 19. CTAB ve MNP yüzeyindeki oleatlar arasında gerçekleşen hidrofobik etkileşimler.

Siyah sulu çözelti şeklinde elde edilen MNP@CTAB karışımı, 0,3 ml NaOH (2M, Merck, 1.06462.1000) çözeltisi içeren 45 ml ultra saf su içinde 3 boyunlu bir reaksiyon balonuna aktarıldı ve 3 dakika ultra-sonik su banyosunda tutuldu. Ceketli ısıtıcıya alınan balondaki reaksiyon karışımı, bir geri soğutucu sistemi altında karıştırılarak (1400 rpm) 15 dakika içinde 70 °C’ye ısıtıldı. Sıcaklık 70 °C’ye ulaştıktan sonra reaksiyon balonuna 0,5 ml tetraetilortosilikat (TEOS, Aldrich, 86578) ve 3 ml etil asetat (Sigma-Aldrich, 27227) karışımından, 3 dakika aralıklarla 350 µl ekleme şeklinde yarım saat boyunca ilave edildi. Karışım, 70 °C’de 2,5 saat daha tutuldu. Süre sonunda oda şartlarına soğutulan sıvı 10.300 g’de 45 dakika santrifüj edilerek silika kaplı MNP’ler (MSNP) toplandı (Şekil 20). MSNP pelleti, 35 ml ultra saf su ile 3 kez yıkandı ve tüpün ağzı açık bırakılarak oda şartlarında kurutuldu. MSNP’ler oda şartlarında kuru olarak saklandı.

Gözenekli yapının elde edilmesi için 20 mg MSNP, 50 ml %5 asetik asit (glacial, Merck, 100056) içeren etanol ile gece boyunca çalkalandı (Solak et al., 2021). Gözenekli MSNP, 10.300 g’de 45 dakika santrifüj edilerek toplandı. Pellet, 35 ml ultra saf su ile 3 kez yıkandı ve tüpün ağzı açık bırakılarak oda şartlarında kurutuldu. MSNP’ler (Şekil 20) oda şartlarında kuru olarak saklandı. Steril şartların gerektiği deneylerde kullanılacak olan MSNP’ler, steril kabin içinde ağzı açık tutularak kurutuldu.



Şekil 20. Manyetik çekirdek, silika kabuk ve en son elde edilen manyetik mezoporöz silika nanoparçacıkların temsili gösterimi.

MSNP'lerin, CTAB çıkarma öncesi ve sonrası FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Bruker VERTEX 70v, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) ölçümü yapıldı. Numuneler, elmas ATR modunda $400-4000\text{ cm}^{-1}$ arasında 2 cm^{-1} adım aralıklı olarak vakum altında tarandı.

MSNP'nin morfolojik karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss Sigma 30, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) kullanıldı. Bu amaçla örnekler suda dağıldıktan sonra temizlenmiş camlara damlatıldı ve gece boyu oda şartlarında kurutuldu. Camlar, paladyum kaplaması yapıldıktan sonra SEM'in örnek tutucu alanına yerleştirildi. MSNP'lere ait SEM görüntüsü vakum altında alındı. Bunun yanında çekirdek/kabuk yapısının aydınlatılması için grid üzerinde kurutulan örneklerin TEM görüntüleri kaydedildi.

MSNP'lerin AC manyetik alan altında ortam sıcaklığını değiştirme yeteneklerinin ölçümü için yine manyetik hipertermi sistemi kullanıldı. Bu kez MSNP'leri içeren %10 FBS içeren DMEM solüsyonu, AC dış manyetik alan (250 kHz) altında tutuldu ve zamana bağlı sıcaklık değişimi fiber optik sıcaklık sensörü ile ölçüldü.

Örneklerin manyetik histerezis döngüleri, Vibrating Sample Magnetometer (VSM Quantum Design PMS9T, Gebze Teknik Üniversitesi) kullanılarak oda sıcaklığında ($T=305\text{ K}$), -20 kOe ila $+20\text{ kOe}$ arasında uygulanan manyetik alanda belirlendi ($\text{Oe}=\text{Oersted}$, $\text{T}=\text{Tesla}$ ve $1\text{ kOe}=1000\text{ Oe}$, $1\text{ T}=10000\text{ Oe}$).

Malzemenin boyut dağılımını ve yüzey yükünü belirlemek üzere DLS (Dynamic Laser Scatter, Malvern), tekniği kullanıldı. DLS ölçümü yapmak için, örnekler bir sıvı (su, tampon veya hücre büyütme ortamı gibi) içinde dağıtıldı. Süspansiyonlar bir ultra-sonik banyoda tutulduktan sonra veriler $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, He-Ne lazer ışık kaynağından (633 nm) iletilen ışıktan 90° açı ile toplandı.

Floresan molekül ile işaretli MSNP'ler

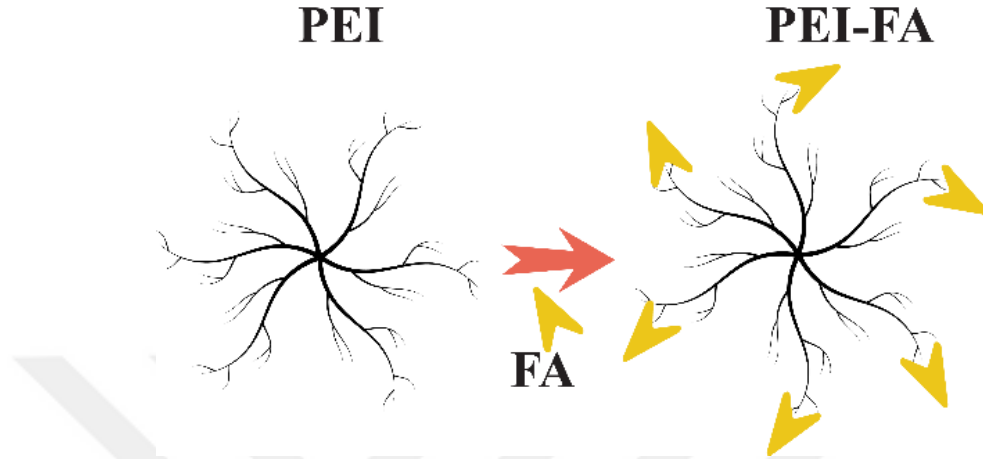
Floresan etiket olarak TRITC mixed isomer (5/6-tetramethyl-rhodamine isothiocyanate, Thermo Scientific™, Cat. No: 46112) ticari ürünü satın alındı. Floresan etiketli silika kaplı MNP'lerin üretimi literatürde çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle bu adımda, üretici firmanın önerdiği protokol ve literatür incelenerek bir protokol çıkarıldı (Liong et al., 2008; X. Song et al., 2011; Thermoscientific, 2010; Yang et al., 2014; L. Zhang et al., 2012). Basitçe, 2 ml susuz etanol içinde 100 µl APTES (APTS, APTES, 3-Triethoxysilylpropylamine, (3-Aminopropyl)triethoxysilane, Sigma-Aldrich) ve 1 mg TRITC, ultrason su banyosunda tutularak çözüldükten sonra inert atmosferde 2 saat karanlık şartlarda karıştırıldı. Süre sonunda, azot gazı akışı sağlanarak etanol uzaklaştırıldı. Kuruyan TRITC-APTES yapısı 0,5 ml TEOS ile karıştırıldı. Bu solüsyon, MSNP üretimi basamağında anlatılan silika kaplama protokolündeki TEOS ilavesi adımıyla kullanıldı. Diğer tüm adımlar MSNP üretiminde anlatıldığı gibi uygulandı.

Floresan molekülün doplama başarısı, floresan spektrofotometre (Agilent Cary Eclipse, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) ve floresan mikroskop (ZEISS, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) ile ortaya kondu. Bu amaçla 3 tekrarlı olarak dilüsyon serileri şeklinde farklı derişimde MSNP-TRITC solüsyonları hazırlandı ve solüsyonların floresan şiddeti (intensity) floresan spektrofotometre ile ölçüldü (Ex/Em: 555/580 nm). Kuyuların fotoğrafı kabinli UV cihazında (UVP, UVGL-58 Handheld UV lamp, 6 watt, 254/363 nm, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) çekildi. Ayrıca 1 mg/ml derişimde MSNP-TRITC solüsyonu lam-lamel arasına alınarak floresan mikroskop ile (kırmızı kanal) görüntülendi. Benzer görüntü miknatıs üzerinde 10 dakika bekletilen örnek için de kaydedildi.

Polietileniminin-folik asit üretimi

Folik asitin (FA) dallı polietilenimin (Branched PEI) yapılarına bağlanabilmesi, yani PEI-FA'nın üretimi için literatürde yer alan bir yol izlendi (J. Wang & Liu, 2016). Bu çalışma için 25 kDa PEI molekülü kullanıldı. Öncelikle FA (100 mg), DMSO (5 ml, dimetil sülfoksit) içerisinde çözüldü. Daha sonra FA solüsyonuna EDC (70 mg, (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)) ve 200 mg N-hidroksisüksinimit (NHS, Sigma) içeren DMSO (5 ml) eklendi. Çözelti karanlıkta 2 saat inkübe edildi ve 800 mg PEI içeren 20 ml sulu çözelti, aktive edilmiş FA karışımına ilave edildi. Daha sonra, ortamın pH değeri NaOH çözeltisi (0,2 M) ile 8'e ayarlandı. Karışım üç gün boyunca karanlık şartlarda karıştırıldı ve PEI-FA (Şekil 21) molekülü 30.000 MWCO membran içeren bir santrifüj yoğunlaştırıcısı (Corning® Spin-X® UF, 20 ml) ile saflaştırıldı. Bu amaçla, 14 ml karışım

yoğunlaştırıcıya alındı ve 4.000 g'de gün boyu santrifüj edildi. Tüm karışım bu şekilde yoğunlaştırıldıktan sonra nihai karışım ultra saf su ile yıkanarak bağlanmayan FA ile birlikte diğer safsızlıklar ortamdaki uzaklaştırıldı. Liyofilize (CHRIST Alpha 1-4 Ldplus, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) edilen ve toz haline getirilmiş örnek, karanlık ortamda oda şartlarında saklandı.



Şekil 21. Folik asit (FA) bağlı dallı polietilenimin (PEI) yapısını temsili çizimi.

PEI ve FA arasında kurulan bağın PEI'nin tüm amin gruplarını kapatmadığını test etmek üzere, PEI ve PEI-FA moleküllerin tamponlama kapasiteleri belirlendi. Bu amaçla 10 ml PEI ve PEI-FA solüsyonları (1 mg/ml) hazırlandı ve solüsyon pH değerleri 12'ye ayarlandı. Ardından, 1 M HCl (150 µl) ile titre edilen solüsyonların, eklenen HCl miktarına bağlı pH değişim grafiği hazırlandı. Kontrol olarak saf su kullanıldı.

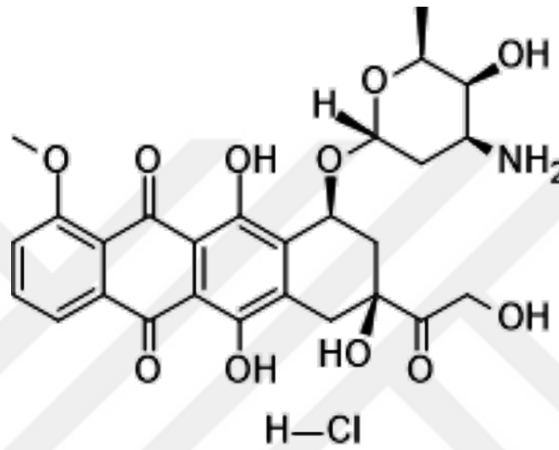
Sentez başarısı FTIR ve Ultraviyole spektroskopisi (Shimadzu UV-3600 Plus, DAYTAM, Atatürk Üniversitesi) ile doğrulandı. FTIR ölçümleri daha önce anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

PEI-FA'nın DNA bağlayabilme yeteneği zeta potansiyel ölçümü ve agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Farklı miktarlarda PEI-FA ve DNA karışımları hazırlanarak oda şartlarında inkübe edildi ve karışımlar Malvern zeta potansiyel ölçümü cihazına yerleştirildi. Agaroz jel elektroforezinde ise 20 µl etidyum bromür (Sigma) içeren %2'lik, 200 ml (1x TAE) jeller hazırlandı ve yükleme boyası (ABT) ile karıştırılan 50 µl örnekler kuyulara yüklendi. Uygun bir belirteç (50 bç DNA Ladder RTU-GeneDireX) ile 1xTAE tamponuyla 1 saat (60 V) yürütme işlemi (Biorad) gerçekleştirildi. Jel sonuçları kemilüminesans jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad Gel Doc XR+) ile görüntülendi ve Image Lab 6.1 programı ile işlendi.

İlaç yükleme

Steril ultra saf su içerisinde 10 mg DOX (Doksorubisin hidroklorit, CAS No: 23214-92-8, Cat. No: HY-15142A, Medchemexpress, Şekil 22) çözülerek stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok DOX solüsyonu 100'er µl şeklinde bölünüp -80 °C'de folyoya sarılı olarak 6

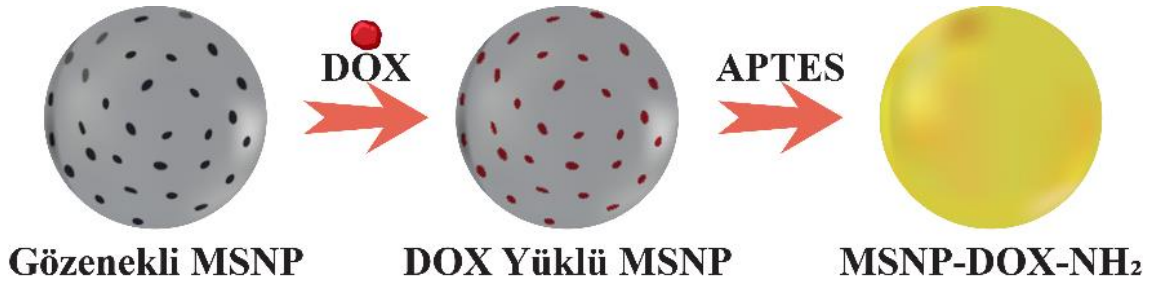
ay boyunca saklandı. Tarihi geçen DOX solüsyonları atıldı ve taze stoklar hazırlandı. DOX çözeltisi, amber renkli tüpler içinde, PBS (son hacim 5 ml) ile 50, 100, 200, 400, 500, 800, 1.000, 1.500, 1.600, 2.000, 2.500, 3.200, 5.000, 6.400, 10.000, 12.800 ve 15.000 nM'a seyreltildi ve bu DOX çözeltileri standart grafik hazırlamak üzere kullanıldı. Hazırlanan tüpler 25 °C'de 3 gün tutuldu ve her gün floresan spektrofotometre ile ölçüm yapıldı. Uyarım için 470 nm dalga boyu kullanıldı ve 490-750 nm aralığında emisyon verisi toplandı. Standart grafik hazırlanırken emisyon için en yüksek değer olan 595 nm'de ölçülen değerler kullanıldı. Bu işlem üç kez yapılmış ve standart grafik bu tekrarlı ölçüm sonuçlarının ortalaması ile hazırlanmıştır.



Şekil 22. Dokсорubisin hidrokloritin kimyasal yapısı (Medchemexpress).

Kullanılan MSNP'nin DOX yükleme kapasitesi, farklı oranlarda (kütlece) MSNP (0,1, 0,25, 0,5 ve 1 mg) içerecek şekilde hazırlanan karışımlar ile süpernatantta kalan DOX'un (başlangıç derişimi 1 µg/ml) ölçülmesiyle belirlendi. Numuneler, karanlık ortamda ve oda şartlarında 24 saat çalkalandı. Böylece kütlece 0,01-1 olan DOX/MSNP oranında karışımlar hazırlandı ve MSNP miktarına göre DOX yükleme oranı incelendi. Yüklenen DOX miktarının ölçümü için örnekler santrifüj edildi. Süpernatantlar floresan spektrofotometrede ölçüldü (Ex: 470 nm ve Em: 595 nm).

İlaç yükleme amacıyla DOX (1 ml, 1 mg/ml) ve 20 mg MSNP son hacim 20 ml olacak şekilde DPBS içinde 24 saat karanlık oda şartlarında (amber renkli tüpler folyo ile sarıldı) 150 rpm çalkalama hızında karıştırıldı. Süre sonunda ilaç yükleme yüzdesinin hesaplanması için 1 ml örnek alındı ve kalan karışıma 12 µl APTES eklenerek karışım 8 saat (Heggannavar et al., 2018) daha bu şekilde çalkalandı (Şekil 23). Aynı işlem DOX içermeyen NP üretimi için de yapıldı.



Şekil 23. Mezoporöz manyetik silika nanoparçacıkların (MSNP) doksorubisin (DOX) ile yüklenmesine (MSNP-DOX) ve bu yapının APTES ile kabuk modifikasyonuna (MSNP-DOX-NH₂) ait temsili gösterim.

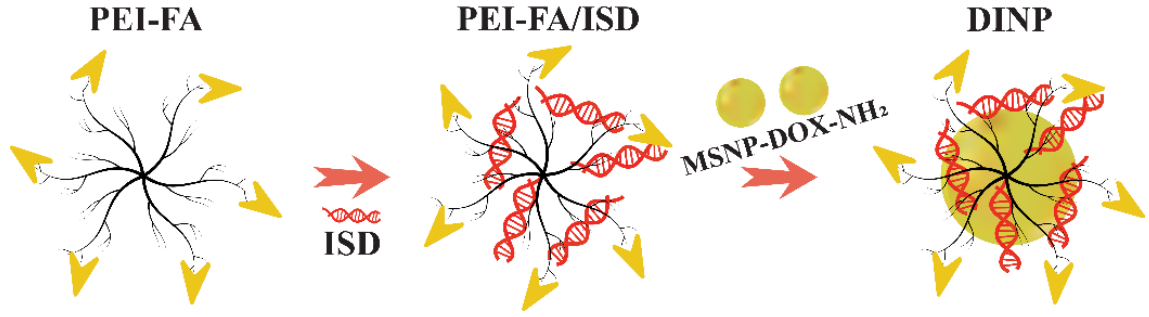
Tüpler santrifüj edildi ve yapıya dahil olmayan tüm molekülleri uzaklaştırmak için MSNP'ler DPBS ve steril saf su ile birer kez yıkandı. Tüm süreçte steril malzemeler kullanıldı ve tüp açma işlemleri steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. DOX yükleme oranı hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı (T. Li et al., 2016).

$$\text{İlaç Yükleme} = [(Toplam\ DOX - Süpernatanttaki\ DOX) \div Nanoparçacık\ miktarı] \times 100$$

DNA yüklenmesi

STING aktivatörü (ISD) ile hazırlanacak gruplar için öncelikle ISD ve PEI-FA karıştırıldı ve kompleksin pozitif yüklü ve kararlı olduğu şartları belirlemek üzere zeta potansiyel ölçümü yapıldı. Çalışmada, yüksek konsantrasyonlu olması ve ISD gibi kısa dizilerden oluşması sebebiyle DNA yükleme şartlarının belirlenmesi adımlarında salmon sperm DNA (10 mg/ml, ThermoScientific) kullanıldı. Gruplar hazırlanırken ISD veya salmon sperm DNA (1 µg/µl) ve PEI-FA (1 mg/ml) endotoksin ve nükleaz içermeyen steril suda çözülerek hazırlandı.

ISD'nin DOX yüklü MSNP'ler ile birleştirilmesi yoluyla DOX ve ISD yüklü nanoparçacıklar (DINP) elde edildi (Şekil 24). DINP hazırlanırken 250 µg MSNP-DOX-NH₂ (250 µl), 1 µg ISD (50 µl) ve PEI-FA/DNA oranı 50 (50 µg PEI-FA, 50 µl) DPBS ortamında (son hacim 1 ml) 15 dakika inkübe edildi. Bu şekilde hazırlanan yapı, farklı hacimlerde ilgili kültür kaplarına eklemek suretiyle hücre kültürü deneylerinde kullanıldı. Bu adımda DINP ile eş zamanlı olarak üretilen sadece DOX yüklü PEI-FA ile sarılı MSNP'ler DNP olarak adlandırılırken, ISD yüklü PEI-FA ile sarılı MSNP'ler ise INP olarak adlandırıldı.



Şekil 24. DINP üretim şeması.

Agaroz jel, %2 ya da %3 oranında olacak şekilde tartılan agarozun gerekli miktardaki (100-200 ml) 1xTAE içerisinde çözülmesi ve mikrodalga fırında kaynatılması yoluyla hazırlandı. Karışım 40 °C'ye soğutulduktan sonra son derişim 5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür solüsyonu eklendi ve jel katılaşımaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra DNA içeren örnekler yükleme boyası (ABT, 2 µl) ile karıştırıldı ve kuyucuklara yüklenerek bir belirteç (GENEDIREX, DM012-R500) ile birlikte 90 dakika (60 V) yürütüldü. Jel sonuçları kemilüminesans jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad Gel Doc XR+) ile görüntülendi ve Image Lab 6.1 programı ile işlendi.

DOX salım testleri

MSNP'ler DOX ile yüklenip APTES ile inkübe edildikten sonra DOX salımı, pH 7,4 ve pH 6,0 olmak üzere iki farklı pH değerinde araştırıldı. Ayrıca sıcaklığın DOX salımına etkisini gözlemek üzere 37 °C ve 42 °C'de inkübasyon deneyleri yapıldı. Tüplere paylaştırılmış ve uygun sıcaklıklarda inkübe edilmiş olan örnekler, önceden belirlenen sürelerde toplandı ve alınan örnek hacmine eş miktarda tampon çözeltisi tüplere ilave edildi. Toplanan örnekler santrifüj edildi ve süpernatantlar floresan spektrofotometrede DOX miktarını ölçmek (Ex/Em: 470/595 nm) üzere kullanıldı.

DINP kararlılığının araştırılması

DINP yapısının serum varlığında kararlılığı %10 serum (FBS) içeren ve içermeyen ortamlar ile çalışıldı. 15, 30 ve 45 dakika 37 °C'ye ayarlı bir su banyosunda inkübe edilen örneklerin hidrodinamik çapları zetametre ile (Malvern) ölçüldü.

Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada tüm deneyler için insana ait üç hücre hattı kullanıldı. Tümöröjenik olmayan hücre hattı olarak MCF-10A kullanılırken meme kanseri hücre hatlarından lümen benzeri (östrojen reseptörü pozitif, ERα ve ERβ) MCF-7 ve üçlü negatif MDA-MB-231 meme hücre hatları kullanıldı. Hücreler 37 °C, %90 nem içeren %5 CO₂ şartlarına sahip inkübatörde

yetiştirildi. Hücreler uygun medyumlarda (Tablo 1) büyütüldü ve gerek duyulduğunda DMSO (%5) içeren dondurma çözeltisi ile sıvı azot tankında kullanılıncaya kadar saklandı.

Tablo 1. Hücre Hatları ve Hücrelerin Büyüme Ortamları.

Hücre Hattı	Büyüme Ortamı
MCF-7	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), %10'luk bir nihai derişimde fetal sığır serumu, %1 Penisilin-Streptomisin (1x) ve 1 mg/ml Normicin ile desteklenmiş ortam.
MDA-MB-231	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), %10'luk bir nihai derişimde fetal sığır serumu, %1 Penisilin-Streptomisin (1x) ve 1 mg/ml Normicin ile desteklenmiş ortam.
MCF-10A	DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ve Ham's F-12 Nutrient Mixture, 100 ng/ml kolera toksin (Sigma C-8052), insülin (Sigma I-1882), hidrokortizon (Sigma H-0888), at serumu (%5), epidermal büyüme faktörü (EGF, Invitrogen 16050-122) %1 Penisilin-Streptomisin (1x) ve 1 mg/ml Normicin ile desteklenmiş ortam (Harvard University, 200).

ISD'nin kontrolü

İnterferon uyarıcı DNA (ISD, Invivogen), ürünün satın alındığı firmanın (Invivogen) önerdiği transfeksiyon aracı olan LyoVec aracılığıyla MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine gönderildi. Hücrelerde STING yolağının ISD ile uyarılıp uyarılmadığı, ELISA testiyle (Human IFN- β ELISA Kit, BT Lab, E0154Hu) IFN β miktarı ölçülerek belirlendi.

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri, 300 μ l büyüme ortamı ile 48 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi (30.000 hücre/kuyucuk) ve gece boyu inkübe edildi. Her grup için 4 kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. ISD (1 μ g), satın alındığı firmanın (Invivogen) önerdiği şekilde, bir transfeksiyon aracı olan LyoVec (100 μ l) ile birleştirildi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücrelere 15 μ l LyoVec+ISD uygulandı (Cao et al., 2020). Bu adımda muamelesiz ve LyoVec+ISD uygulanmış hücre grupları planlandı. Üretici firma, LyoVec+ISD uygulanmış hücrelerin 16-48 saat inkübe edilmesini tavsiye ettiği için 12, 24 ve 48. saatlerde hücre büyüme ortamları toplandı (100 μ l). Belirlenen saatlerde örnek toplandıktan sonra hücrelere 100 μ l taze büyüme ortamı eklendi. ELISA testi protokolü için kit üretici firmanın tavsiyesi takip edildi.

Bunun yanında, ISD'nin hücreler üzerine etkisi toksisite testi ile belirlendi. Firmanın önerdiği şekilde 4 µl ISD (1 mg/ml), LyoVec (400 µl) ile karıştırılıp 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücre ekili kuyulara, kuyuda 200, 100, 50 ve 25 ng ISD olacak şekilde (sırasıyla 1, 0,5, 0,25 ve 0,125 ng/ml) farklı dozlarda ISD uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra CCK-8 testi yapıldı.

Hücre canlılığı ve sitotoksisite

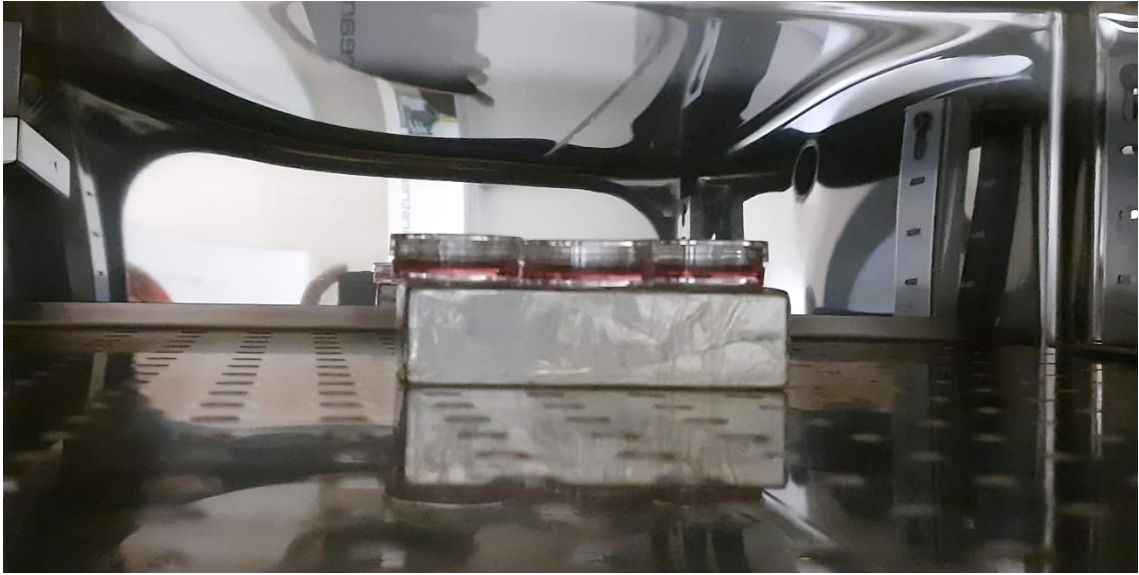
Sitotoksisite ve proliferasyonun araştırılması için CCK-8 testi tercih edildi. Bu boya MTT, MTS veya WST-1'den daha hassastır, sitotoksik değildir, boyanın dondur-çöz aşamaları yoktur ve 5 °C'de 1 yıl kararlı kalabilmektedir. CCK-8 testi, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen ve ilgili muamelelere tabi tutulmuş hücrelere 24, 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından uygulandı. Kısaca, CCK-8 çözeltisi (10 µl) 200 µl fenol kırmızısı içermeyen medyum ile karıştırıldı ve karışım hücrelere eklendikten sonra hücreler 2 veya 3 saat inkübatörde tutuldu. Ardından numunelerin absorbans değerleri bir plaka okuyucu ile 450 nm'de okundu. CCK-8 testi sonunda hücre canlılığı hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı (T. Li et al., 2016).

$$\%Canlılık = [(Muamele_{Abs}) \div (Kontrol_{Abs})] \times 100$$

Hücresel alım

Hücreler tarafından MSNP alımının ortaya konması için floresan etiketli MSNP kullanıldı. Öncelikle floresan etiketli MSNP, PEI-FA veya sadece PEI ile modifiye edildikten sonra MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine uygulandı. Kullanmadan önce, lameller poli-D-Lizin (GIBCO, A3890401) ile kaplandı. Kaplama işlemi, 50 µg/ml'ye PBS tamponu ile seyreltilen poli-D-Lizin solüsyonunun camlar ile 1 saat oda şartlarında inkübe edilip camların PBS (2 kez) ve saf su (3 kez) ile yıkanması şeklinde gerçekleştirildi. Camlar, kurutulduktan sonra kullanıldı.

Hücreler, konfokal mikroskop ile görüntüleme çalışmalarında kullanılan 12 mm yuvarlak lamellere (poli-D-Lizin kaplı) uygulamadan 24 saat önce ekildi. Hücresel alım çalışmalarında kullanılan NP derişimleri literatürde değişiklik (10-200 µg/ml) göstermektedir (Pan et al., 2020; B. P. Shah et al., 2014). Bu nedenle hücrelere 25, 50 ve 100 µg/ml derişimlerde floresan etiketli MSNP uygulandı. Muamele edilmiş hücreler, 4 saat (T. Li et al., 2016) boyunca inkübatörde tutulduktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskop ile incelendi ve FA varlığının hücresel alıma etkisi araştırıldı. Mıknatıs uygulamalarında NP'ler ile muamele edilmiş kültür kapları bir mıknatıs üzerinde belirli sürelerde tutulu (Şekil 25).



Şekil 25. İnkübatör içinde mıknatıs ile NP muamelesine ait görüntü.

Tüm adımlarda karşıt boyama olarak hücre çekirdeği, DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Biomatik) ile boyandı. Uygulamanın morfolojik etkisinin ortaya konması için hücre iskeleti Flash Phalloidin™ Green 488 (Biolegend, 424201) ile boyandı. Boyama işleminde firmanın önerdiği protokol takip edildi. Kısaca hücreler %2 PFA (paraformaldehit) ile 30 dakika oda şartlarında tutularak fikse edilip %0,3 Triton X-100 (oda şartlarında 5 dakika) ile permeabilize edildi. Örnekler sırayla %5 FBS içeren PBS (15 dakika, oda şartları), Flash Phalloidin™ Green 488 (1:200 seyreltilerek, karanlık oda şartlarında, 20 dakika) ve DAPI (15 dakika, 37 °C’de) ile inkübe edildi. Her adım sonrası hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve görüntülemeye giderken camların üzerine Cell Staining Buffer (Biolegend) eklendi. Sonuçta hücrelerde MSNP-TRITC kırmızı, hücre çekirdeği (DAPI) mavi ve hücre iskeleti yeşil renkli olarak görüntülendi.

PFA solüsyonu 1X PBS ile hazırlanıp –20 °C’de bir yıla kadar saklandı. %4 PFA hazırlarken 4 g PFA tozu (Sigma-Aldrich) 80 ml PBS içinde çözülüp, karışım 60°C sıcaklıkta (çeker ocak içinde) kaynama olmaksızın karıştırıldı. PFA tozu hemen çözünmediği için renksiz bir çözelti oluşuncaya kadar karışıma 5 M NaOH damla damla eklendi. Karışım oda sıcaklığına soğutulup 0,45 µm’lik filtreden geçirildi. Hacim, 1X PBS ile 100 ml’ye tamamlandıktan sonra karışımın pH değeri 7,0-7,4 arasında olacak şekilde ayarlandı. Don-çöz yapmamak için çözelti küçük hacimlere bölünerek -20 °C’de saklandı. Çalışma sırasında %4 PFA, 1:1 hacimde PBS ile seyreltilerek %2 PFA hazırlandı.

Triton X-100 çözeltisi yine PBS tamponu ile hazırlandı. Bunun için 100 ml PBS içine 300 µl Triton X-100 eklenip karışım 15 dakika ultra-sonik su banyosunda tutuldu.

Hücre içi DOX salımı

DNP (DOX yüklü PEI-FA ile sarılı MSNP'ler) ile muamele edilen ve tripsin ile toplanan hücrelerde DOX miktarı, akış sitometri ile belirlendi. Uygulama adımı, DOX ilacı (0,5 μ M) ve ilaç yüklü MSNP'ler (50 μ g/ml) hücreleri öldürmeyecek ancak DOX varlığını ölçebileceğimiz dozlarda uygulandı. Uygulamadan 3 saat sonra hücre medyumları çekildi ve taze medyum eklendi. Medyum değişiminden 3 saat sonra ise ilk ölçüm alındı. Hücre süspansiyonlarındaki DOX miktarı 48. saate kadar ölçüldü.

Apoptotik İndeksin Araştırılması

Apoptozisin erken safhasında hücrelerin membran asimetrisinin kaybolmasından dolayı membran fosfolipidi olan fosfatidilserin (apoptotik yapıların “beni ye” sinyali olarak bilinir) plazma membranının dışında belirlemektedir (Nagata & Tanaka, 2017). Anneksin V antikoru, fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanmakta ve böylece apoptotik hücre oranı belirlenebilmektedir. Ek olarak ortamdaki ölü hücrelerin belirlenebilmesi amacıyla prodium iyodid (PI) kullanılmaktadır. Bu nedenle apoptozun belirlenmesi amacıyla Anneksin V Apoptosis Deteksiyon Kiti (Biolegend, 640914) kullanıldı. Basitçe, uygulama yapılmış hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile toplanıp santrifüj edildi. Hücre pelleti Cell Staining Buffer (Biolegend) ile yıkandı ve ardından kit içeriğinde bulunan Binding Buffer (100 μ l) içinde tekrar süspanse edildi. Hücrelere Anneksin V FITC (2,5 μ l) ve PI (5 μ l) eklenip oda şartlarında ve karanlıkta 15 dakika inkübasyondan sonra hücreler akış sitometri cihazına yüklendi. DOX ve PI floresan boyaların birlikte ölçüldüğü bir akış sitometri deneyinde, DOX floresansı PC5.5 kanalında ölçülürken, PI floresansı PE kanalında ölçüldü. Kit içeriğindeki Anneksin V ise FITC etiketli olduğu için, FITC kanalı kullanıldı.

Oksidatif Stresin Araştırılması

Oksidatif stres indeksi, firmanın önerdiği protokole göre ROS Detection Kit ile belirlendi. Bu kit, canlı hücre içindeki hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesini ölçen bir florojenik boya olan hücre geçirgen reaktif DCFDA'yı (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) kullanır. Difüzyon yoluyla hücreye geçen DCFDA, hücresel esterazlarla DCF (2',7'-dichlorofluorescein)'ye çevrilir. DCF, yüksek derecede floresan bir bileşiktir ve 485/535 nm'de uyarım/emisyon yaparak floresan spektroskopisi ile tespit edilmektedir. Bu testte, uygulama yapılmış hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile toplanıp santrifüj edildi. Hücre pelleti, 10 μ M DCFDA içeren besiyeri içinde dağıtılıp 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler kit içeriğinde yer alan tampon ile yıkayıp tekrar bu tamponda süspanse edilerek akış sitometri cihazı ile test edildi.

Manyetik Hipertermi (MHT) Çalışmaları

MHT sistemi olarak MSI Automotion (Şekil 26) cihazı kullanıldı. MHT şartlarının optimizasyonu için öncelikle sadece MSNP kullanıldı ve ideal şartlar belirlendikten sonra MHT uygulaması, DINP muamelesiyle birleştirildi.



Şekil 26. MHT uygulaması için kullanılan cihaza ait fotoğraf.

Öncelikle MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine farklı derişimlerde MSNP uygulandı ve hücreler, 2 saat inkübe edildi. Tripsin/EDTA ile toplanan hücreler pellet halinde (üzerine 0,5 ml medyum eklenerek) MHT cihazına yerleştirildi. Farklı sürelerde 250 kHz'de (coil çapı 15 cm, %100 güç) AC manyetik alan uygulandı. MHT'nin ardından kültür kaplarına ekilen hücrelere CCK-8, apoptoz ve ROS gibi gerekli testler uygulandı.

İstatistiksel Analizler

Veriler toplandıktan sonra istatistik hesaplamalar ve verilerin görselleştirilmesi amacıyla OriginPro 2023 programı kullanıldı. Deney grupları en az 3 örnek içerecek şekilde tasarlandı. Gruplar arası karşılaştırma yapılırken one-way ANOVA (analysis of variance) kullanıldı ve gruplar arasındaki fark Tukey testi ile belirlendi. Veri seçiminde aykırı değer belirlemesi yapılırken programın 'Outliers' belirleme yönteminden (Grubbs test) faydalanıldı.

Fotoğraflara ait nicel verilerin toplanması ImageJ programı ile gerçekleştirildi.

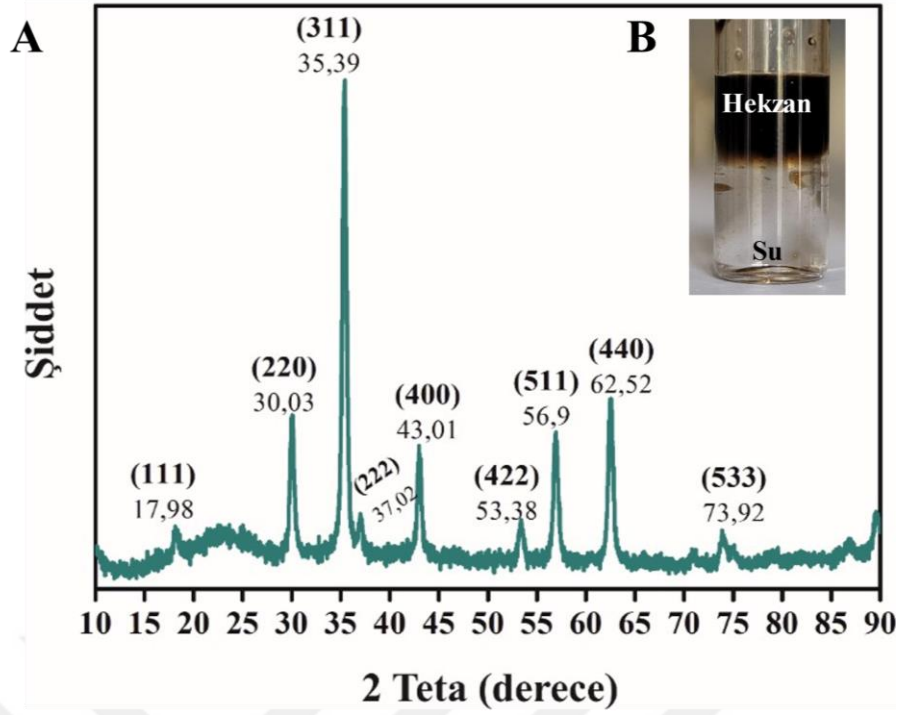
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Taşıyıcı Nanoyapının Hazırlanması

Demir (Fe) oksit manyetik nanoparçacıklar (MNP), biyouyumluluk ve sınırlı toksisite nedeniyle güvenilirdir. Bu yapıya manyetik doygunluğu artırmak için farklı metal iyonları dahil edilmektedir. Çinko (Zn) içeren demir oksit MNP'lerin, manyetizasyon doygunluğunun yüksek olduğu bilinmektedir (H. J. Kim & Choi, 2019; Yin et al., 2016). Aynı zamanda Zn-Fe oksit MNP'ler, AC manyetik alan altında tutulduğunda daha hızlı bir şekilde Fe oksit MNP'lerin eriştiği sıcaklığa erişebilmektedir (Kasparis et al., 2022). Birlikte çöktürme, sol-jel veya termal bozunma gibi yöntemlerle Zn içeren demir oksit MNP'ler üretilmektedir (Borade et al., 2020). Her yöntemin farklı üstünlükleri veya dezavantajları bulunmaktadır.

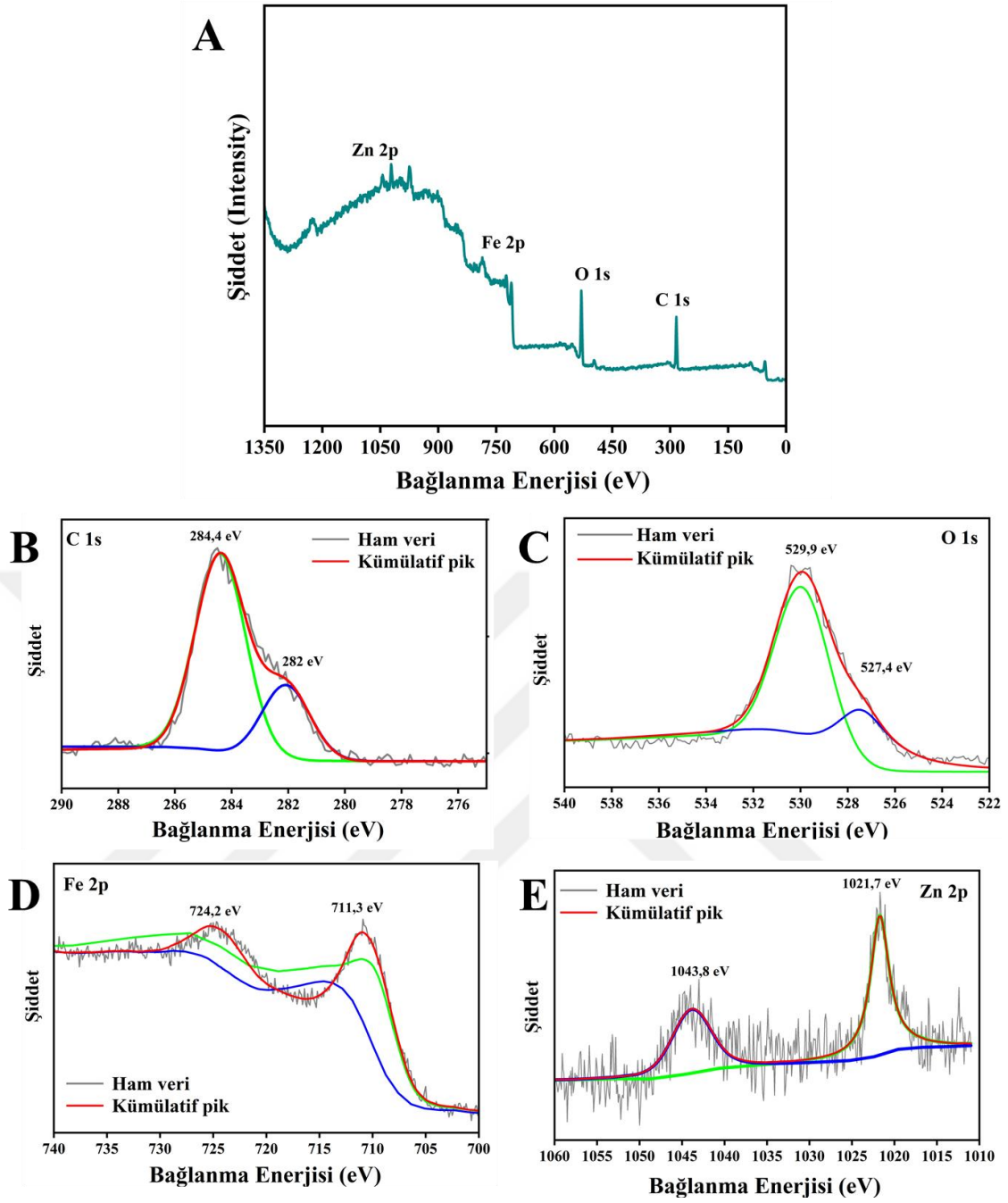
Bu tez çalışmasında organik çözücü içinde dağılabilen, kararlı Zn-Fe oksit ($Zn_xFe_{3-x}O_4$) MNP'ler, termal bozunma yöntemi ile üretildi (Şekil 27). Sentezde çözücü ortam olarak benzil eter tercih edildi ve bu sayede istenilen sıcaklık olan 300 °C'ye erişilebildi. 1,2-heksadekan-diyol termal bozunma yöntemiyle yapılan MNP sentezinde, MNP'lerin dispersiyonunu stabilize etmek, boyut kontrolünü sağlamak ve reaksiyon ortamının uygunluğunu (homojenlik, viskozite, termal iletkenlik) artırmak için kullanılan önemli bir alkol türevidir. Oleylamin ve oleik asit, MNP sentezinde yüzey aktif maddeler olarak görev yaparak MNP dispersiyonunu kararlı hale getirirler. Bu süreçte oleylamin, metal iyonlarının kararlılığını sağlarken, oleik asit MNP yüzeylerini kaplar ve büyümeyi kontrol eder. Birlikte kullanıldıklarında, bu iki bileşen MNP sentezinde istenen boyut, dispersiyon ve yüzey özelliklerinin elde edilmesine yardımcı olur. Kullandığımız yöntem ile tek seferde $276,00 \pm 12,73$ mg $Zn_xFe_{3-x}O_4$ MNP elde edilmektedir.

$Zn_xFe_{3-x}O_4$ MNP'lerin XRD ölçümü (Şekil 27), malzemenin yüksek kristal yapıda olduğunu göstermektedir. Scherrer denklemi ile $Zn_xFe_{3-x}O_4$ MNP'lerin kristal boyutu 15,4 nm olarak hesaplandı. XRD deseninde gözlenen 2θ açılarında $30,03^\circ$, $35,39^\circ$, $43,01^\circ$, $53,38^\circ$, $56,9^\circ$, $62,52^\circ$, ve $73,92^\circ$ pikleri sırasıyla (220), (311), (400), (422), (511), (440) ve (533) Miller indekslerine sahip kristal düzlemlerine karşılık gelmektedir. Bu sonuçlar, üretilen malzemenin tek (single) kristal yapıda olmadığını göstermektedir (PANalytical, 98-007-6981 referans kodu). Piklerin dar bir biçimde uzanması ise yapının kristal boyutu ve kusursuz kafes örgüsü ile ilişkilidir (Ungár, 2004; Unni et al., 2017). Yüksek pik şiddetleri ise kristal yapının saflığını göstermektedir (Ebadi et al., 2021). Tüm keskin ve şiddetli pikler literatürde yer alan sonuçlar ile tam uyuşmaktadır (H. Song et al., 2015).



Şekil 27. A. Üretilen çinko-demir oksit manyetik nanoparçacıkların X ışını kırınım deseni ve B. Hekzan içerisinde dağıtılmış çinko-demir oksit manyetik nanoparçacıkların fotoğrafı.

MNP'lerin oksidasyon seviyelerinin belirlenmesi için XPS tekniği kullanıldı. Genel spektrumda (Şekil 28 A) Zn, Fe, O ve C pikleri sunuldu. Ölçüm sonucu elde edilen kısmi tarama verileri, C-C bağındaki karbon atomunun 1s durumunda ~284,8 eV bağlanma enerjisine sahip olduğu bilgisi kullanılarak normalize edildi (Cardiff University, 2023; Davydov et al., 2014). 1043,78 ve 1021,7 eV'deki pikler sırasıyla Zn 2p_{1/2} ve Zn 2p_{3/2}'ye atfedilir, bu da Zn'nin numunede esas olarak 2⁺ oksidasyon durumunda bulunduğunu göstermektedir (H. Song et al., 2015). Bunun dışında, 724,2 ve 711,3 eV'de bulunan Fe 2p tepe noktaları, Fe 2p_{1/2} ve Fe 2p_{3/2} spektrumlarına atfedilir, bu da Fe'nin oksidasyon durumunun numunede 3⁺ olduğunu gösterir. Ek olarak, 1s oksijenin spektrumu, 536 ve 529,9 eV'de bulunan pikler kafes oksijeninin Zn ve Fe ile bağlı olduğunu göstermektedir (Zn-O ve Fe-O olarak gösterilir). Bu sonuçlar ile XRD sonuçları beraber değerlendirildiğinde, üretilen Zn_xFe_{3-x}O₄ MNP'lerin ZnFe₂O₄ kapalı formülüne sahip olduğu anlaşılmaktadır.

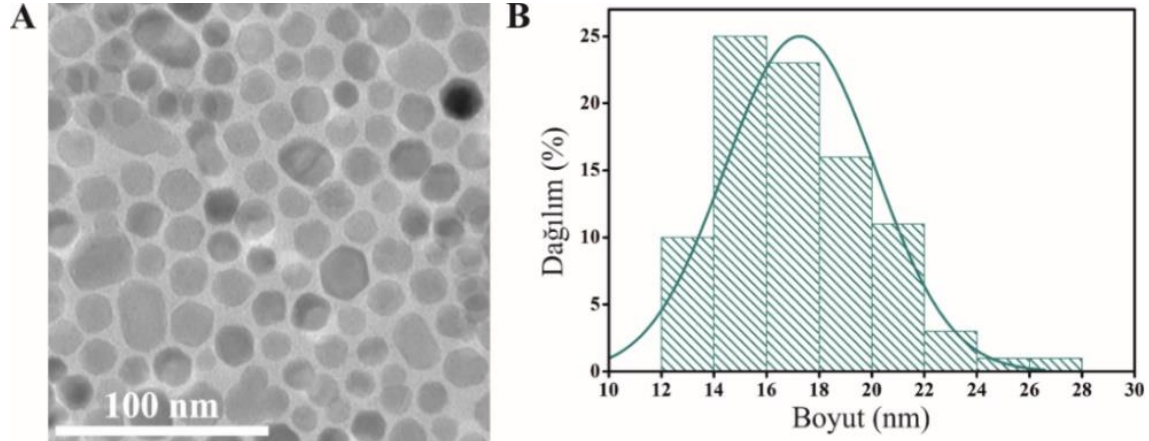


Şekil 28. Üretilen ZnFe_2O_4 manyetik nanoparçacıkların X-Işını fotoelektron spektroskopisi sonuçları.

A. genel spektrum ve B, C, D ve E sırasıyla karbon, oksijen, demir ve çinko yapılarına ait kısmi spektrumları belirtmektedir.

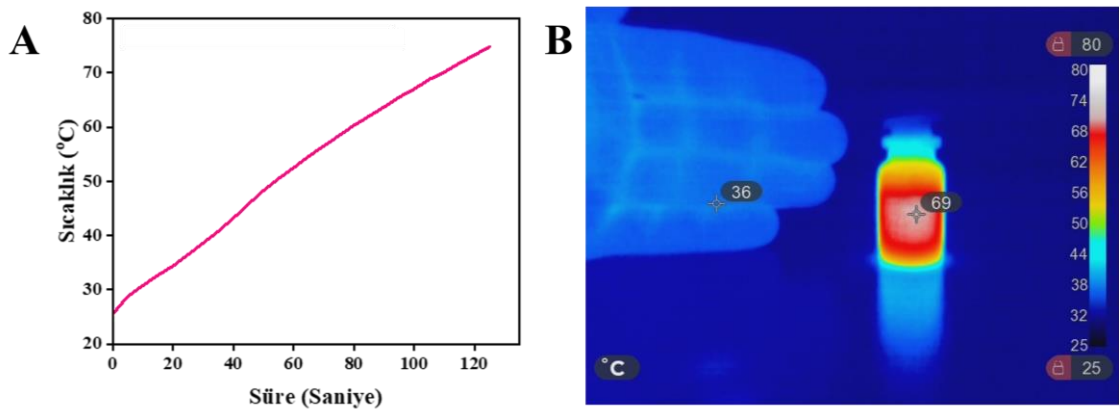
Kaydedilen TEM görüntüleri, elde edilen ZnFe_2O_4 MNP'lerin neredeyse monodispers, çoğunlukla altıgen formda ve ortalama 18 nm olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 29). NP boyutu açısından TEM görüntüleri ile XRD sonuçları uyushmaktadır. Önceki çalışmalarımızda sadece metal asetilasetonat öncülü ile MNP üretildiğinde 10 nm'den küçük boyutlara MNP'lerin elde edildiği gözlemlendi (Çelik et al., 2022; Solak et al., 2021). Bu çalışmada ZnFe_2O_4 MNP'lerin üretiminde ise öncül olarak hem metal asetilasetonat hem de metal klorür bileşikleri kullanıldı. Bu durum daha büyük MNP'lerin üretilmesini sağladı. Çünkü metal klorür, metal

asetilasetonattan daha kararlıdır ve daha yüksek sıcaklıkta bozunur. Bu nedenle, reaksiyon ortamına metal klorürün eklenmesi, daha yavaş çekirdeklenmeye, dolayısıyla, karışımda oluşan çekirdeklerin etrafına daha fazla metal öncüsünün birikmesine ve bu yolla daha büyük MNP'lerin oluşmasına neden olmaktadır (Cheng et al., 2019).



Şekil 29. Üretilen ZnFe₂O₄ manyetik nanoparçacıkların A. Geçirimli elektron mikroskop görüntüleri ve bu görüntülerden çizilen boyut dağılımına ait B. histogram grafiği.

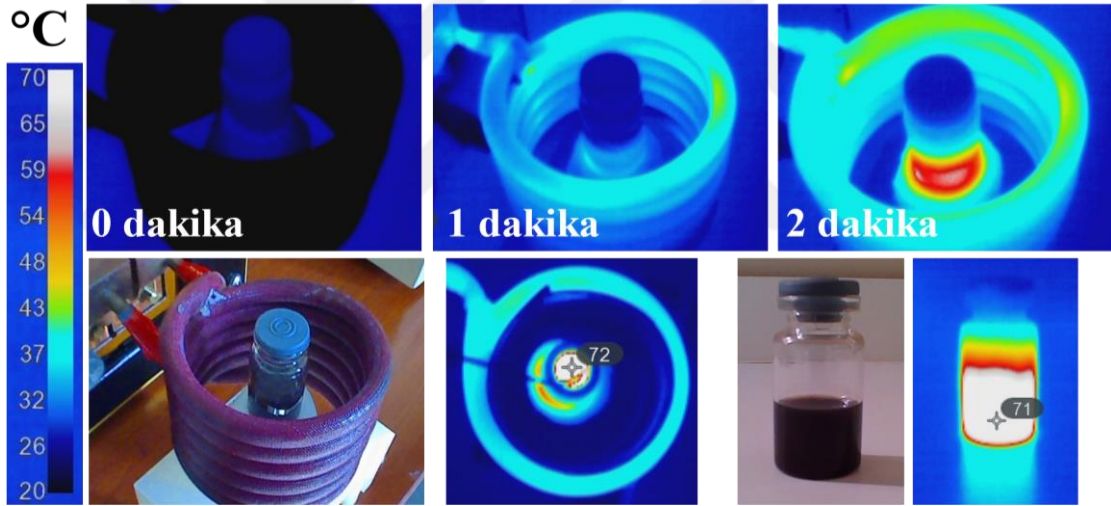
ZnFe₂O₄ MNP'lerin MHT çalışmalarında kullanılabilirliğini araştırmak üzere tolüen (kaynama noktası: 110,6 °C) içinde dağıtılan MNP'ler (1 mg/ml) AC manyetik alan altında tutuldu (Şekil 30 A) ve cihazdan alınan tüp termal kamera ile görüntülendi (Şekil 30 B). Literatürde saniyeler (10 mg/ml, 180 saniye) içinde 80 °C'ye erişebilen MNP'lerin (CoFe₂O₄@MnFe₂O₄) varlığı duyurulmuştur (Pan et al., 2020). Tolüen içinde dağıtılan ZnFe₂O₄ MNP solüsyonunda, ICP-MS ile ölçülen demir miktarı 3525,553 ppm ve çinko miktarı 171,15 ppm olarak belirlendi. MNP'lerin ortam sıcaklığını artırma hızı (ΔT) 0,945 °C/dakika olarak belirlendi (1 mg/ml, 0,5 ppm Fe). Termal kamera görüntülerinden görüldüğü üzere sıvı numunenin her bölgesinin ısınması, MNP'lerin homojen dağıldığını doğrulamaktadır.



Şekil 30. ZnFe₂O₄ MNP'lerin (1 mg/ml, 0,5 ppm Fe) AC manyetik alan altındaki davranışı. A. Sıcaklık zaman grafiği ve B. termal kamera görüntüsü. Sıcaklık ölçeği °C'dir.

AC manyetik alan altında MNP'ler saniyeler içinde ortam sıcaklığını çok yüksek değerlere çıkarabilmektedir. Kaydedilen termal kamera görüntüleri ile 0,5 ppm Fe içeren MNP

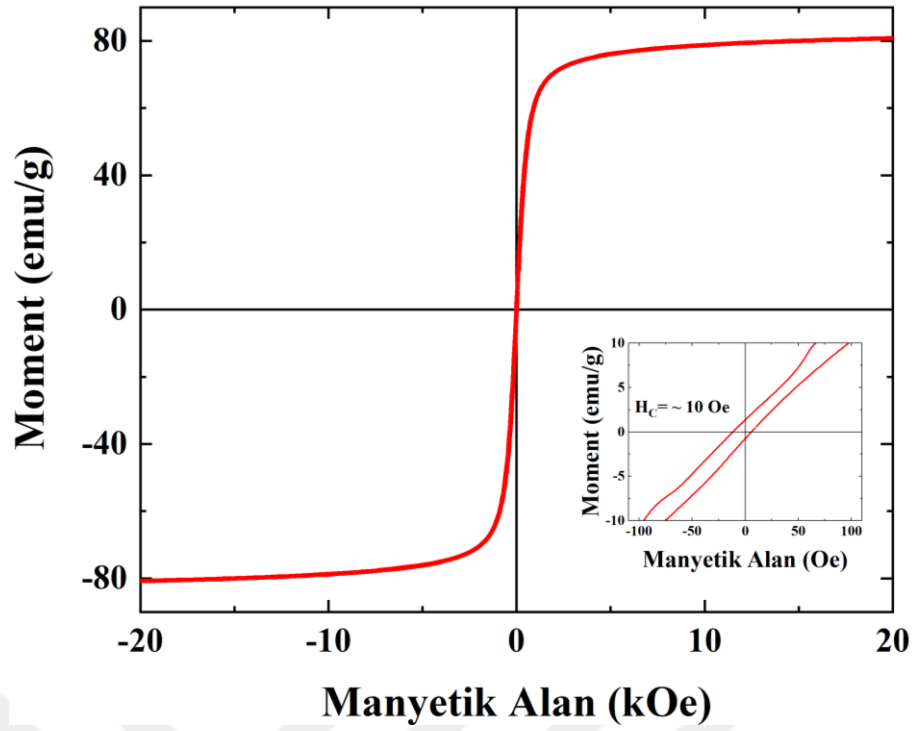
karışımının, 2 dakika içinde 72 °C'ye eriştiği gözlenmiştir (Şekil 31). Literatürde birlikte çöktürme yöntemi ile üretilen MNP'lerin, MHT uygulamalarında kısa sürede yüksek sıcaklık artışı sağladığı bilinmektedir (Campanini et al., 2015). Campanini ve arkadaşları, birlikte çöktürme yöntemiyle elde edilen MNP'ler arasında güçlü dipolar etkileşimlerin kurulduğunu, bu nedenle büyük agregatların oluştuğunu ve böylece birlikte çöktürme yönteminin ısıtma eğiliminin daha iyi olduğunu belirtmektedir. Termal bozunma yoluyla elde edilen MNP'lerde organik tabakanın (oleylamin ve oleik asit) varlığı, dipol etkileşimin zayıf olmasına neden olur ve bu durumda MNP'ler bulunduğu organik bir çözücü içinde daha iyi dağılmaktadır. MNP'lerin daha iyi dağılmaları, MNP'lerin ortamı ısıtma derecesini düşürmektedir. Buna karşın benzer bir şekilde termal bozunma yoluyla üretilen nanoparçacıkların, “ısıyla indüklenebilen bir promotör yardımı ile kontrollü gen ekspresyonu” amacına yönelik olarak kullanıldığı literatürde yer almaktadır (H. J. Kim & Choi, 2019). Bu bilgiler doğrultusunda ürettiğimiz MNP'lerin 1 mg/ml derişiminde 2 dakika içinde 72 °C'ye erişmesi başarılı bir durumdur.



Şekil 31. ZnFe_2O_4 MNP'lerin (1 mg/ml, 0,5 ppm Fe) AC manyetik alan altında kaydedilen termal kamera görüntüsü.

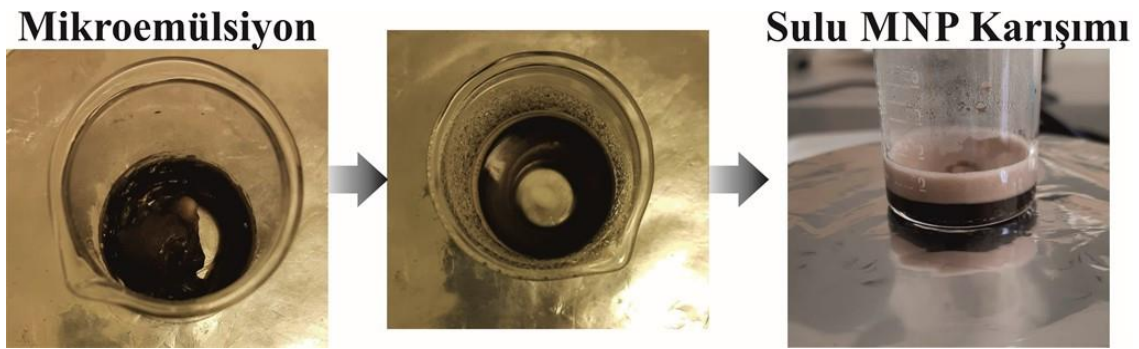
Sıcaklık ölçeği °C'dir ve çözücü tolüendir.

Sıcaklık-zaman grafiği kullanılarak ZnFe_2O_4 MNP'lerin SAR değeri $19,429 \pm 6,272$ W/kg olarak hesaplandı. Son olarak VSM sonuçları ile ZnFe_2O_4 MNP'lerin manyetik doygunluklarının 80 emu/g'ye yakın değerlere eriştiği görüldü (Şekil 32). Literatürde yer alan kaplanmamış (bare) MNP'ler de bu veya daha düşük manyetik doygunluk değerlerine sahiptir (Ebadi et al., 2021; Hadadian et al., 2022; Mohamed et al., 2021). VSM grafiği ile aynı zamanda MNP'lerin süperparamanyetik olduğu elde edilen grafiğin “S” formunda olmasıyla net bir şekilde anlaşılmaktadır (Ebadi et al., 2021).



Şekil 32. VSM opsiyonlu Quantum Design PPMS 9T ile kaydedilen ZnFe_2O_4 MNP'lerin manyetizasyon ölçümüne ait grafik.

Kloroform içinde dağıtılan, oleik asit ve oleylamin ile stabilize edilen hidrofobik ZnFe_2O_4 MNP'ler, sulu bir CTAB çözeltisi ile karıştırılarak ve organik çözücünün buharlaştırılmasıyla su fazına aktarıldı (Şekil 33). Bu basit yöntemi kullanarak, yüzey aktif maddenin (CTAB) hidrofobik kuyruğu, nanokristallerin yüzeyindeki hidrofobik ligantlarla güçlü bir şekilde etkileşime girer ve CTAB'nin hidrofilik yüklü uç grubu, nanokristalleri suda dağılılabılır hale getirir. Bu yöntem ile MNP'lerin sulu ortama transferi, çözeltide görünür çökelti veya agregat oluşturmadığından dolayı oldukça etkilidir.



Şekil 33. CTAB ile karıştırılıp su faza alınan oleik asit ile stabilize ZnFe_2O_4 MNP'ler.

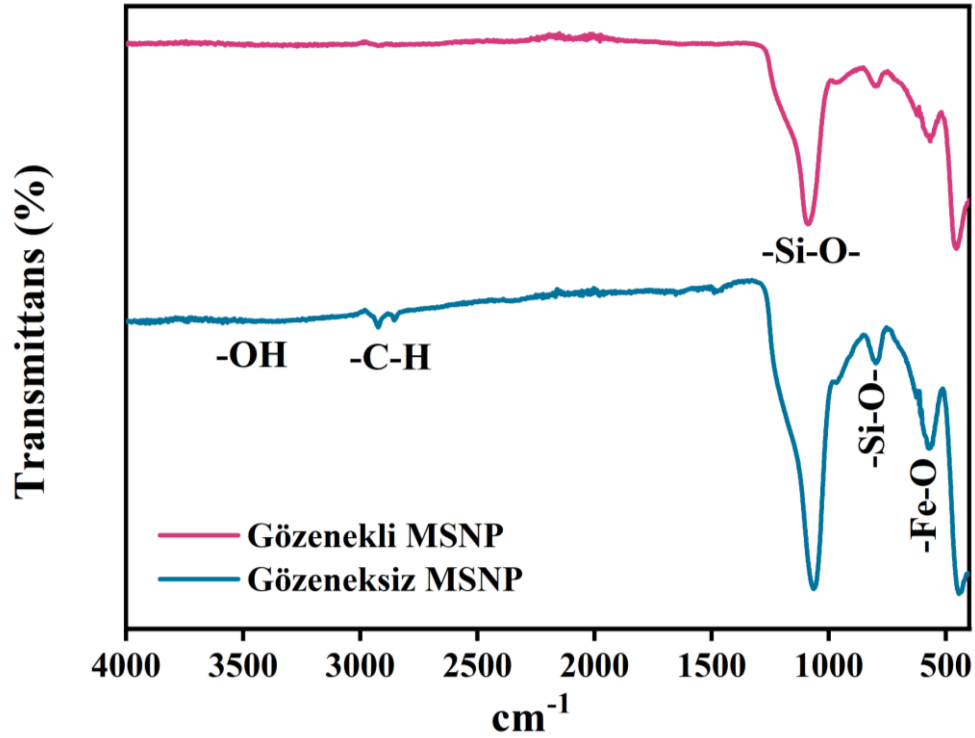
Reaksiyonun devamında ortama TEOS eklenir. Hidrolize TEOS molekülleri, CTAB kaplı nanokristaller ve serbest yüzey aktif madde miselleri arasındaki etkileşim, mezo yapıyı oluşturmak için TEOS'un baz-katalizli yoğunlaşmasını teşvik eder. MNP'lerin mezoporöz silika ile kaplanması aşamasında, TEOS'taki hidrofobik gruplar, kullanılan CTAB'in organik

kuyrukları ile hizalanır ve hidrofilik kısımlar Gouy–Chapman⁸ bölgesini bozarak farklı bir büyüme davranışına neden olur (Kobler et al., 2008; Suteewong et al., 2010). Literatürde CTAB dışında farklı materyaller (SDS, Tween 80, Triton X-100) denenmiştir ancak CTAB’in iyi tekrarlanabilirliğe sahip kararlı yağ/su mikroemülsiyonların oluşmasını sağladığı bildirilmektedir (Cichos & Karbowiak, 2014). CTAB sürfaktanı aynı zamanda gözenekli bir silis tabakasının oluşmasını sağlayan bir şablon görevi de görmektedir (Cichos & Karbowiak, 2014). Bu noktada mezoporöz NP’lerin oluşumu için farklı yaklaşımlar önerilmektedir. Bunlardan birisi olan La Mer teorisine göre NP’lerin oluşumu, monomer derişim artışı, çekirdeklenme ve büyüme şeklinde üç aşamada gerçekleşmektedir (Ding et al., 2012). Bu nedenle reaksiyon sırasında TEOS’un tek seferde ilavesi yerine adım adım ilave edilmesi, ortama devamlı monomer sağlaması açısından büyümeyi kontrol ederek çekirdek içermeyen silika NP’lerin oluşumunu önlemektedir (Ding et al., 2012). TEOS molekülleri, yan ürün olarak etanol üreten TEOS/su damlası arayüzünde hidrolize edilir (Suteewong et al., 2010). Bunun yanında MSNP’lerin morfolojisi, solüsyonun sıcaklığına büyük ölçüde bağlıdır. Sıcaklık çok düşük olduğunda, yavaş silika oluşumu ve neticesinde daha büyük boyutlu malzemeler elde edilmektedir. Nanoboyutta MSNP’lerin üretimi için 65-80 °C reaksiyon sıcaklığı önerilmektedir (Liong et al., 2008). Ortama eklenen etilasetat ise reaksiyonun pH değerini yavaş yavaş düşürerek boyut ve morfoloji kontrolü noktasında yardımcı olmaktadır (Suteewong et al., 2010).

İlaçlar gibi çeşitli kargo moleküllerini MSNP’lere yükleyebilmek için yapıda bulunan yüzey aktif maddenin MSNP’lerden uzaklaştırılması ve gözeneklerin oluşması gerekmektedir. CTAB’in ekstrakte edilmesi için kullanılan metotlardan biri, malzemelerin asidik alkol içinde ısıtılması, diğeri ise kalsinasyondur. Kalsinasyon, organik maddelerin tümünü yok edeceği için floresan boya ları da yok etmektedir. Ek olarak kalsinasyon suda zayıf bir şekilde dağılabilen geri dönüşü olmayan NP agregasyonuna da neden olmaktadır (Liong et al., 2008). Bu nedenle çalışmada yüzey aktif maddeleri çıkarmak için asetik asit içeren alkol çözeltisi kullanıldı. CTAB çıkarma öncesi ve sonrası MSNP’lere ait FTIR spektrumunda CTAB yapısında yer alan -C-H zincirine ait pikler 2848 ve 2917 cm⁻¹’de görülürken (Solak et al., 2021), CTAB uzaklaştırma işleminden sonra bu pikler kayboldu (Şekil 34). Bu durum CTAB’in yapıdan tamamen uzaklaştırıldığını göstermektedir. Bununla birlikte 1083 ve 801 cm⁻¹’de silika

⁸ Gouy-Chapman bölgesi, bir sıvı-yüzey arayüzünde, yüzey yakınındaki iyonların elektriksel etkilerinin belirgin hale geldiği bölgedir.

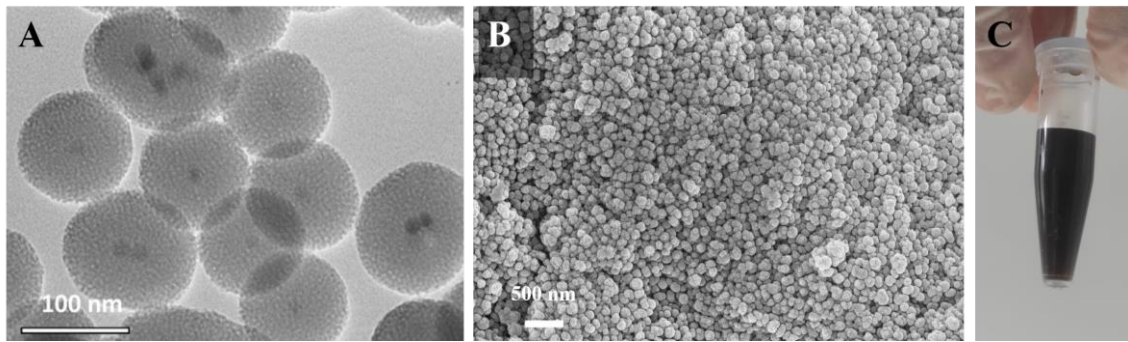
kaplamayı belirten -Si-O pikleri görüldü (Y. Li et al., 2022; Solak et al., 2021). Son olarak demir oksit varlığını işaret eden Fe-O bağ absorpsiyonu yaklaşık 569 cm^{-1} noktasında bir pik olarak görünmektedir (Ebadi et al., 2021).



Şekil 34. Gözenekli (CTAB uzaklaştırılmış) ve gözeneksiz (CTAB içeren) MSNP'lere ait FTIR spektrumu.

MSNP: Mezoporöz manyetik silika nanoparçacıklar.

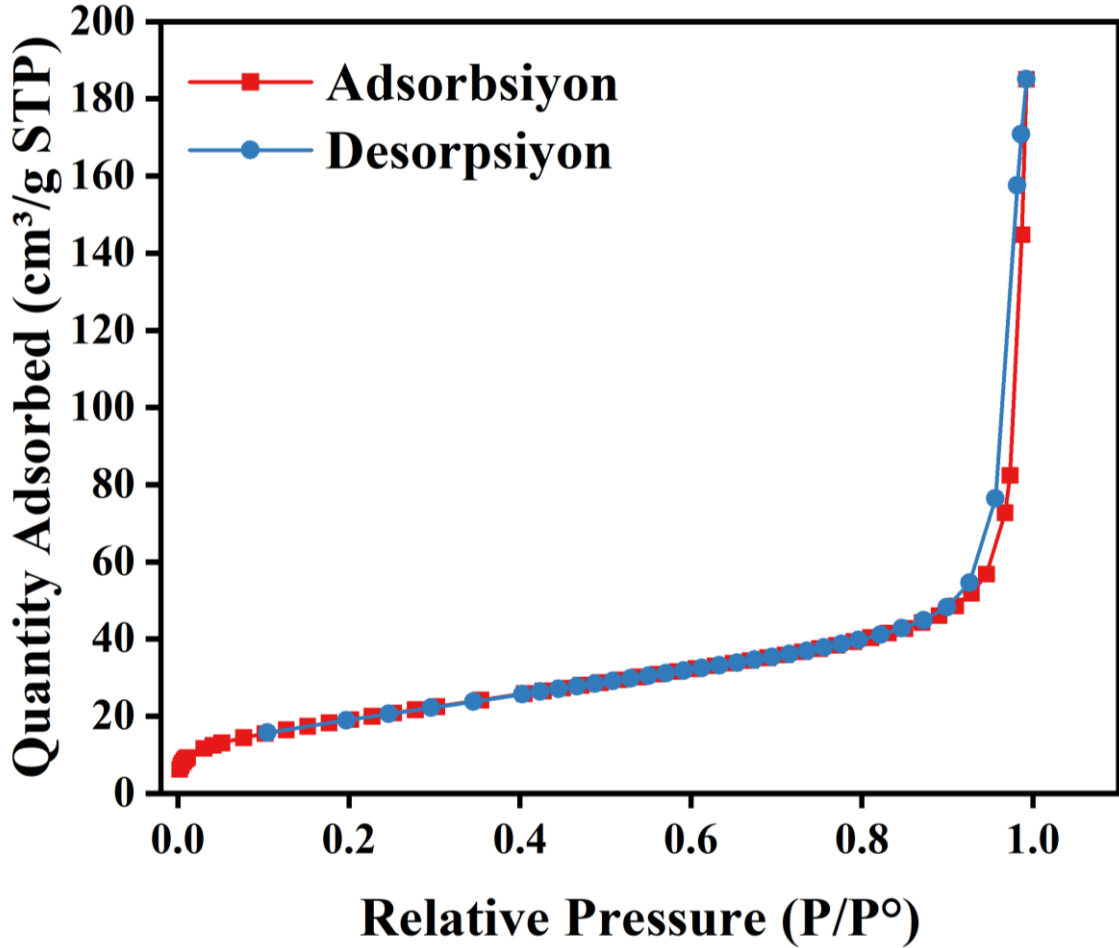
TEM görüntüsü alınan gözenekli MSNP'lerin, çekirdek/kabuk formunda olduğu belirlendi (Şekil 35 A). Tek veya çok çekirdekli yapıların oluşmasına rağmen, MSNP'lerin boyutunun genel olarak 100 nm dolaylarında olduğu gözlemlendi. MSNP'lerin dağılımını ve morfolojik yapısını anlamak üzere SEM görüntüleri incelendi (Şekil 35 B). Bu sayede MSNP'lerin oldukça küresel ve monodispers bir dağılım sergiledikleri gözlemlendi. Elde edilen MSNP'ler su ortamında homojen bir şekilde dağılmaktadır (Şekil 35 C).



Şekil 35. Gözenekli çekirdek/kabuk yapısına sahip MSNP'lerin A. TEM, B. SEM görüntüsü ve C. su içinde dağıtılmış hali (1 mg/ml MSNP).

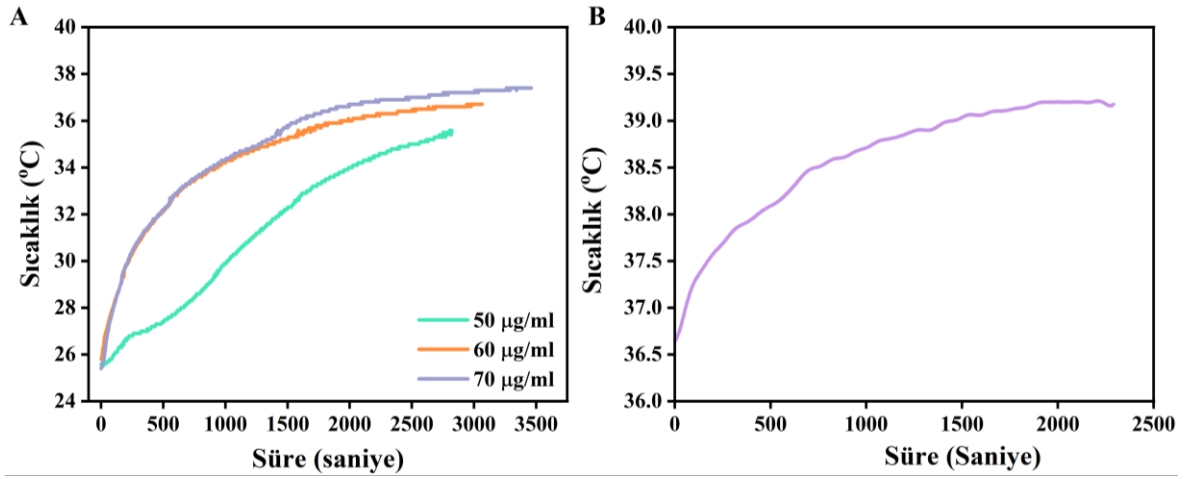
Ölçek TEM görüntüsünde 100 nm, SEM görüntüsünde 500 nm'dir.

Gözenekli yapının yüzey alanının belirlenmesi için yapılan BET ölçüm sonucunda (Şekil 36), MSNP'ler ortalama 83,85 nm'dir. Bu boyut TEM görüntüleri ile uyushmaktadır. Ek olarak MSNP'deki por çaplarının 5,17 nm olduğu belirlendi. Bu boyut, yapıyı mezogözenek (gözenek boyutu 2-50 nm) sınıfına dâhil etmektedir (ALothman, 2012). Aynı zamanda bu gözenek yapı, DOX yükleme için uygundur. Ayrıca MSNP'lerin BET yüzey alanının 71,55 m²/g olduğu belirlendi.



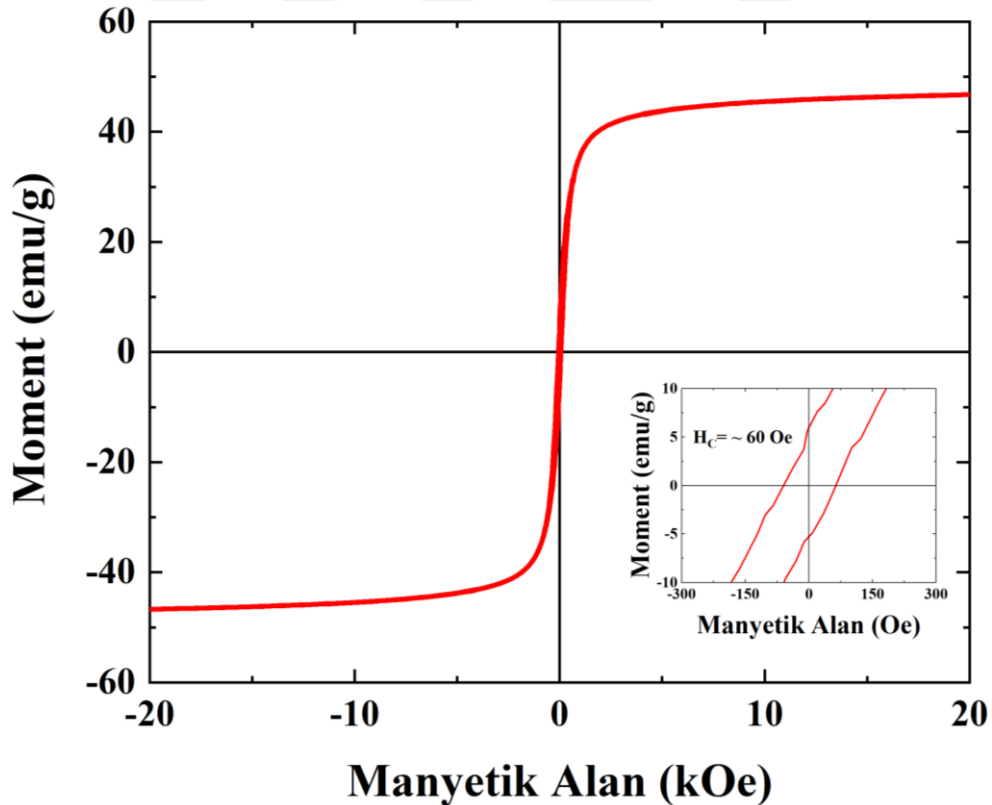
Şekil 36. MSNP'lere ait BET izoterm eğrisi.

Çok küçük MNP'ler, gözeneklere yüklenen moleküllerin gözenek sistemine veya dışarıya kütle transferine daha kolay imkân verdiği için MNP boyutunun olabildiğince küçük ölçülerde ayarlanması çok önemlidir. Ancak boyut ne kadar küçük ise MNP'lerin AC manyetik alan altında termal enerji üretme kapasitesi de o kadar düşük olacaktır. Bu nedenle ürettiğimiz MSNP'lerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan solüsyonları AC manyetik alan altında tutulduğunda, ortamın sıcaklık artış hızının doz bağımlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 37 A). Ayrıca 37 °C'de inkübe edilen MSNP'lerin (70 µg/ml) %10 FBS içeren DMEM'de zamana bağlı sıcaklık değişimine ait grafik (Şekil 37 B), bu yapıların ortam sıcaklığını artırabildiğini göstermektedir.



Şekil 37. AC manyetik alana maruz kalan MSNP solüsyonlarının sıcaklık-zaman grafikleri. Solüsyonların başlangıç sıcaklığı A. oda şartlarıdır ve B. 36,5 °C'dir.
%10 FBS içeren DMEM içerisinde farklı derişimde dağıtılan MSNP'ler 2400 saniye (40 dakika) AC manyetik alan altında tutuldu.

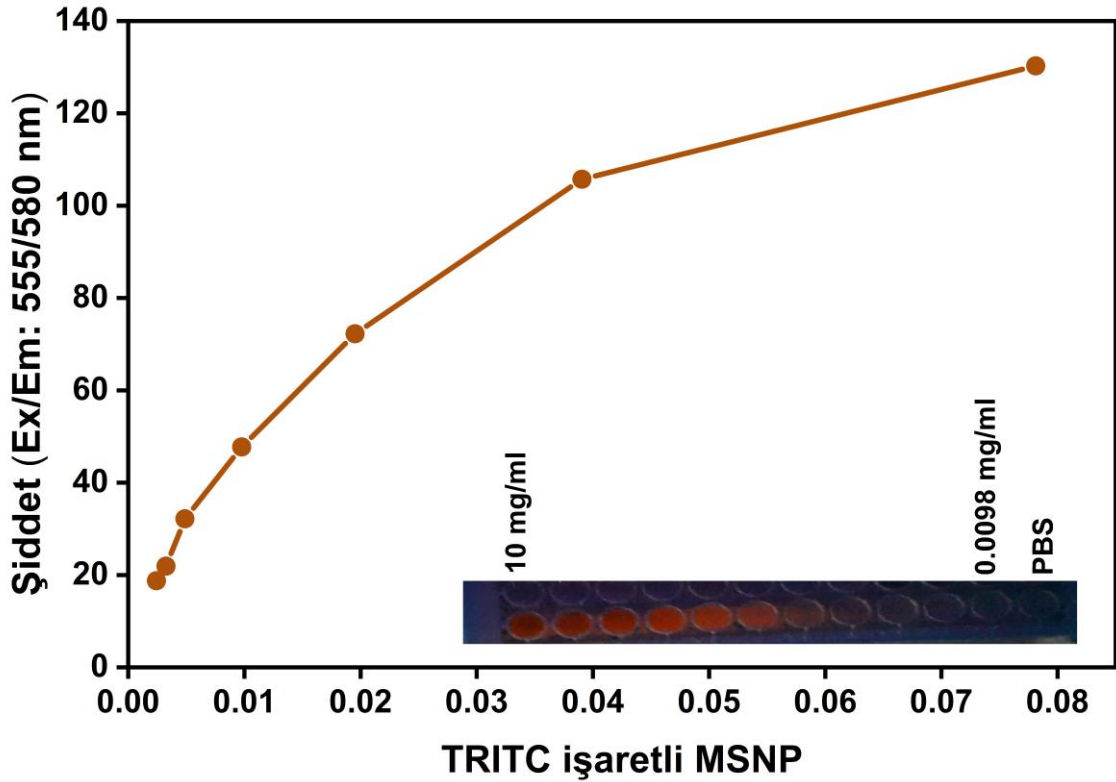
VSM ölçümü ile MSNP'lerin manyetik doygunluğunun, yaklaşık 40 emu/g olduğu belirlendi (Şekil 38). MSNP'lerdeki kabuk varlığı manyetik doygunluğun, beklendiği üzere, (MNP'lerle kıyaslandığında, Şekil 32) düşmesine neden olmuştur. Yapının süperparamanyetik özelliğini koruduğu, eğrinin "S" kavisli yapısından anlaşılmaktadır.



Şekil 38. VSM opsiyonlu Quantum Design PPMS 9T ile kaydedilen MSNP'lere ait manyetizasyon ölçümü grafiği.

MSNP üretimi sırasında floresan bir molekülün reaksiyona dahil edilmesi şeklinde yapılan etiketleme işlemi, materyallerin boyutunu ve şeklini etkilemeden floresan işlevsellik

sağlamaktadır ve MSNP'lerin hücresel alımının floresan mikroskobu ile izlenmesine olanak tanımaktadır (Liong et al., 2008). Bu amaçla TRITC işaretli MSNP üretimi yapıldı. Farklı derişimlerde hazırlanan TRITC işaretli MSNP solüsyonlarının floresan spektrofotometrede doz bağımlı floresan şiddete sahip olduğu belirlendi (Ex/Em: 488/532 nm, Şekil 39). Bu sonuç, TRITC molekülünün, MSNP yapısına dâhil edildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 39. PBS içinde seyreltilmiş TRITC işaretli MSNP'lere (mg/ml) ait floresan spektrum ve UV ışık altında kuyuların fotoğrafı.

Hedefleme Molekülünün Hazırlanması ve DNA Bağlama Kapasitesi

Sentetik katyonik bir polimer olan polietilenimin (PEI), fizyolojik pH'da yüksek pozitifliği nedeniyle, hücre membranına elektrostatik olarak yapışır (Saito & Saitoh, 2012). PEI, fosfat gruplarından ötürü anyonik olan nükleik asitlerle de elektrostatik olarak etkileşmektedir (Yin et al., 2014). Bu nedenle PEI, nükleik asit (DNA veya RNA) transferi çalışmalarında çok yaygın biçimde tercih edilmektedir (Akinc et al., 2005; Han et al., 2000). PEI'nin çok sayıdaki katyonik yükleri, yüksek bir transfeksiyon aktivitesi ve yüksek yükleme kapasitesi sağlamasına rağmen moleküler ağırlığı yüksek olan PEI'ler canlı organizmalar üzerinde doz bağımlı sitotoksik etki gösterir (Moghimi et al., 2005; Werth et al., 2006). Bunun yanında PEI, hücre yüzeyindeki negatif yüklü proteoglikanlarla etkileşir ve bu durum nükleik asit taşıma verimini düşürerek istenmeyen biyo-agregasyona neden olabilir.

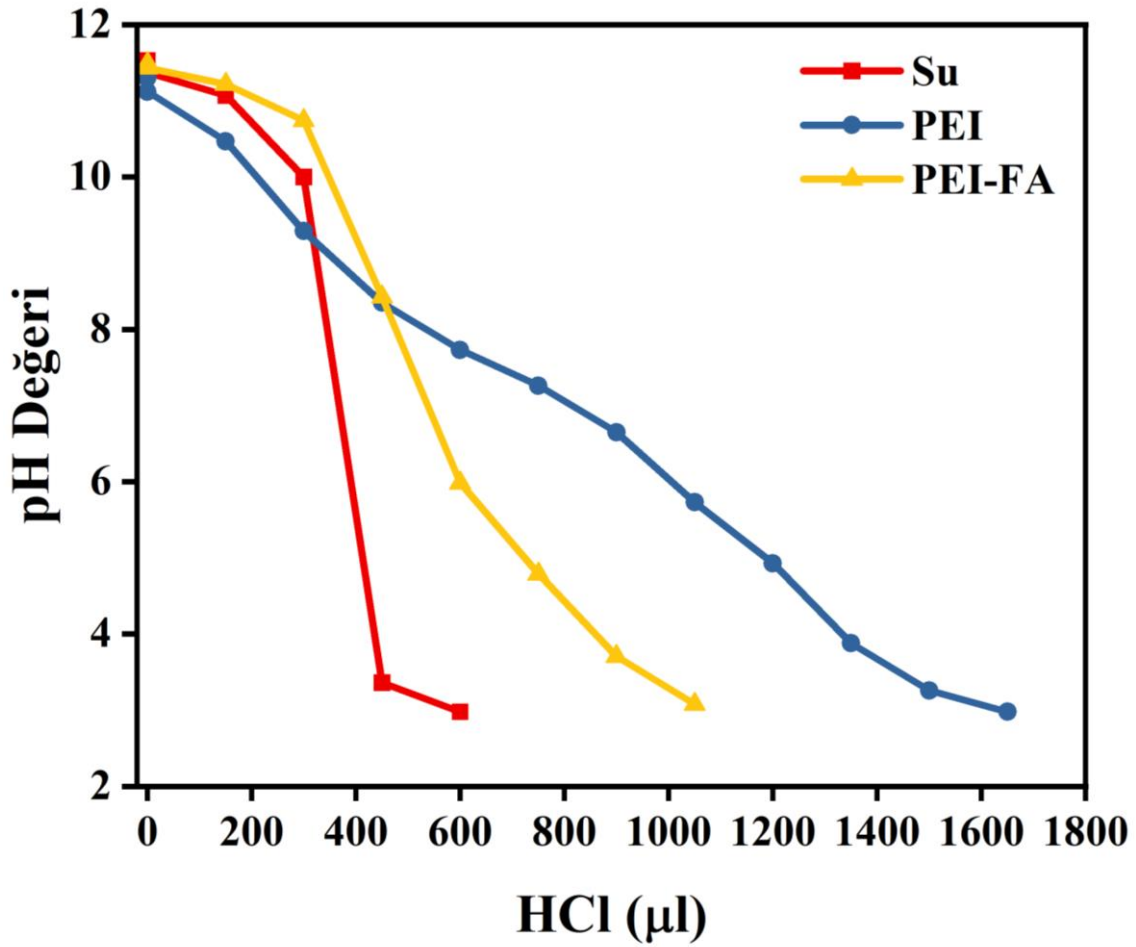
PEI'nin sitotoksosite mekanizması, yüksek protonlama kapasitesi ile özdeşleşen proton sünger etkisi (proton sponge effect) ile ilişkilidir. Endositoz sonucu hücre içine alınan PEI'den, ortamın pH değerinin düşüşünden dolayı proton ayrıldıkça hücre içinde proton pompalama aktivitesi artar ve ozmotik şişme sonucunda endositoz kesesi parçalanır. Aktarım çalışmalarında endozomal kaçışa sağladığı bu katkı PEI'yi özel kılmaktadır. PEI sitotoksitesini PEI'nin moleküler ağırlığına, polimer sıklığına ve kimyasal modifikasyon içerip içermemesine bağlıdır (Xia et al., 2009). Çok düşük moleküler ağırlıkta PEI kullanımı nükleik asit aktarımında başarısızlığa neden olduğu için genellikle 10-25 kDa olan PEI yapıları nükleik asit aktarımı çalışmalarında tercih edilmektedir (Xia et al., 2009) (H. Yang et al., 2014). (Moghim et al., 2005).

Nükleik asitler PEI ile aktarılabilirdiği gibi NP'lerin yüzeyine tutturulmuş PEI ile de aktarılabilir. Literatürde, modifiye edilmiş PEI kullanan nükleik asit aktarım çalışmalarına rastlanmaktadır (Y. Li et al., 2014; Z. Li et al., 2017; Yang et al., 2014). Ayrıca, floresan etiketlemenin PEI'nin DNA bağlama özelliğini yok etmediğini ve PEI'nin, nükleer çevrede ve interfaz hücrelerindeki nükleolusta hızla biriktiği bilinmektedir. Bu çalışmalar, PEI yapısındaki herhangi bir modifikasyon neticesinde PEI'nin nükleik asit taşıma yeteneğini yitirmediğini göstermektedir. Ek olarak Saito ve arkadaşlarının çalışması PEI'nin sitoplazmada bazı bölgelerde de lokalize olabildiğini ortaya koymaktadır (Saito & Saitoh, 2012). Bu durum ise sadece çekirdeğe değil, sitoplazmaya hedef moleküllerin ulaştırılması amacıyla da PEI'nin kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında literatürde de sıklıkla kullanılan 25 kDa moleküler ağırlığındaki dallanmış PEI tercih edildi. Çalışmada kullanılacak olan PEI; güvenli bir şekilde ISD taşınması, folik asit (FA) ile konjugasyon, MSNP'nin suda dağılımının artırılması, ISD'nin erken ve pH 7,4'te salımının sınırlandırılması ve son olarak ISD'nin sitoplazmada salımı için endositoz kaçışı gibi birçok amaca hizmet etmektedir.

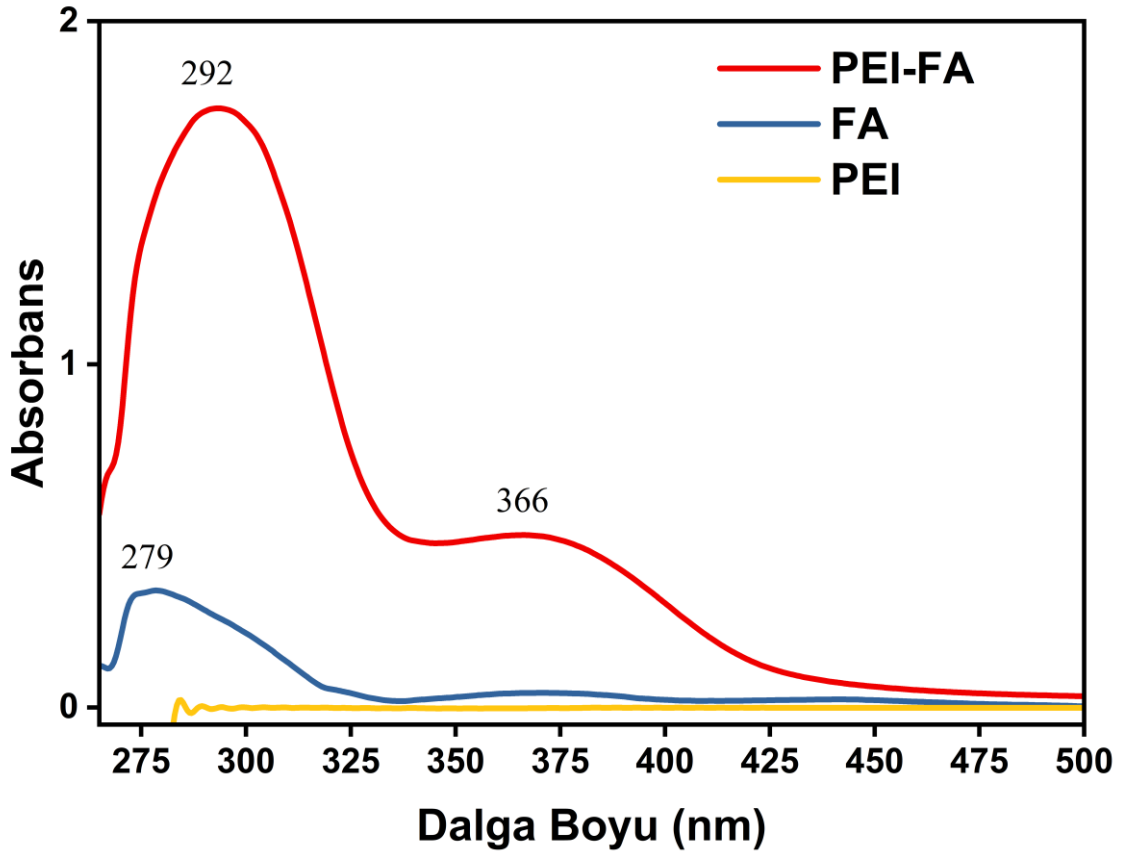
Öte yandan FA, meme kanseri hücrelerinin hedeflenmesi için sıkça kullanılan bir moleküldür (Parker et al., 2005). PEI yapısında meydana gelen herhangi bir değişiklik onun tamponlama yeteneğini, dolayısıyla nükleik asit taşıma ve hücre içine aktarma (transfeksiyon) özelliğini etkilemektedir (Warriner et al., 2018). PEI ve FA arasında kurulan bağın PEI'nin tüm amin gruplarını kapatmadığını ve elde edilecek konjuge yapının DNA yükleyip yükleyemeyeceğini test etmek üzere, PEI ve PEI-FA moleküllerin tamponlama kapasiteleri ölçüldü. Elde edilen grafik (Şekil 40), FA ile modifikasyon sonrası PEI'nin azalan serbest NH₂ grupları nedeniyle tamponlama kapasitesinde düşüş olduğunu göstermektedir. Buna rağmen asit ilavesi ile pH değerindeki azalmanın keskin ve hızlı bir şekilde olmadığı gözlemlendi. Bu

durum, PEI'ye göre daha düşük olsa bile, PEI-FA'nın tamponlama kapasitesinin var olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, PEI-FA'nın proton sünger etkisi ile hücre içinde DNA'nın salımına hizmet edeceğini ortaya koymaktadır.



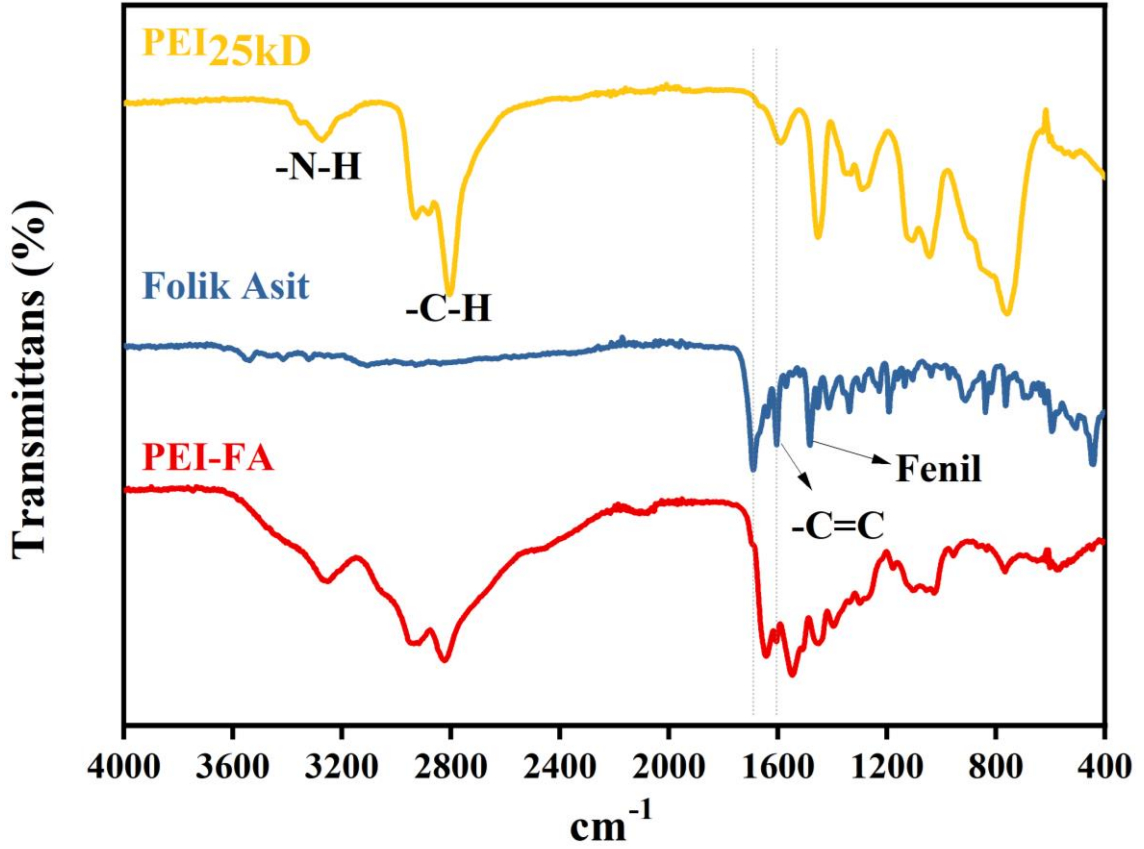
Şekil 40. 1 mg/ml PEI ve PEI-FA sulu çözeltilerine 1 M HCl ilavesi sonucu ölçülen pH değerleri.

Sulu FA ve PEI-FA çözeltilerinin UV spektrofotometre sonuçları incelendiğinde (Şekil 41), FA'nın 279 nm dolaylarında gözlenen absorbans pikinin PEI-FA'da 292 nm'ye kaydığı gözlemlendi. Tipik olarak FA, yaklaşık olarak 280 nm ve 366 nm dalga boylarında emilim piklerine sahiptir. 280 nm dolaylarındaki pikin kayması, FA'nın PEI'deki amin gruplarıyla etkileşimine atfedilmektedir (J. M. Li et al., 2013; Okamoto-Schalch et al., 2020).



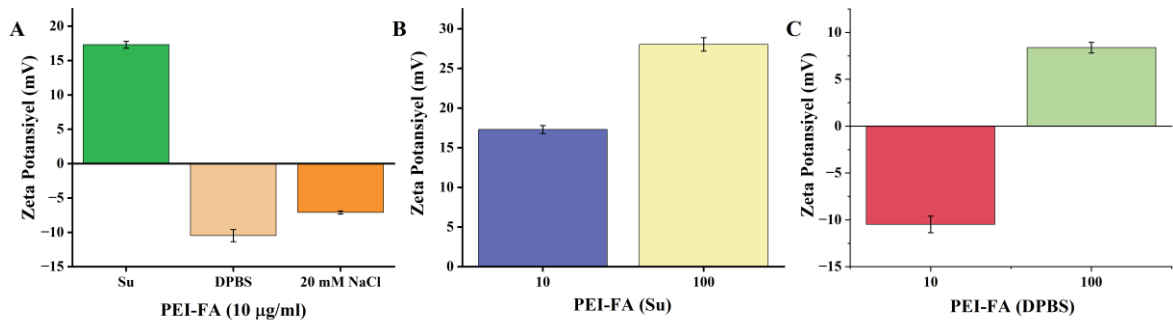
Şekil 41. PEI ve PEI-FA moleküllerinin sulu çözeltilerinin (1 mg/ml) UV spektrofotometre ile dalga boyu tarama sonuçları.

PEI'ye FA bağlama başarısı FTIR spektroskopisi ile doğrulandı (Şekil 42). Sentezlenen PEI-FA'ya ait FTIR sonucunda PEI'nin yapısında bulunan amin ve -C-H gruplarına ait pikler PEI-FA yapısında da gözlemlendi. FA yapısının aromatik C=C çift bağı ve fenil halkası sırasıyla 1605 cm^{-1} ve 1483 cm^{-1} 'de yer alan pikler olarak karşımıza çıkmaktadır. FA'ya ait karboksil (1691 cm^{-1}) ve PEI yapısındaki amin grupları (1587 cm^{-1}) arasında kurulan yeni amid bağına ait pik ise PEI-FA'ya ait spektrumda 1644 cm^{-1} 'de belirmektedir.



Şekil 42. Folik asit, polietilenimin ve folik asit bağlı polietilenimine (PEI-FA) ait FTIR spektrumu.

Üretilen PEI-FA'nın DNA bağlama yeteneği önce zeta potansiyel ölçümü ile araştırıldı. Bu doğrultuda, DNA ve PEI-FA'nın ayrı ayrı zeta potansiyel değerleri ölçüldü. DNA'nın (1 µg/ml) nükleaz içermeyen sudaki zeta potansiyelinin $-10,60 \pm 1,38$ mV olduğu belirlendi. Bunun yanında PEI-FA'nın (10 µg/ml) farklı tamponlar içindeki zeta potansiyel değerleri incelendiğinde PEI-FA'nın su içinde zeta potansiyeli pozitif ($17,30 \pm 0,50$) ölçülürken, DPBS içinde zeta potansiyeli PEI-FA derişimine göre değişmektedir (Şekil 43). Yüksek PEI-FA derişiminde (100 µg/ml) ölçülen pozitif zeta potansiyel değerine ($8,37 \pm 0,57$) karşın, düşük (10 µg/ml) PEI-FA içeren karışımın zeta potansiyelinin negatifleşmesinin ($-10,48 \pm 0,89$) nedeni, tampon çözücülerde var olan iyonların PEI-FA ile etkileşimlerinden dolayı olabilir.



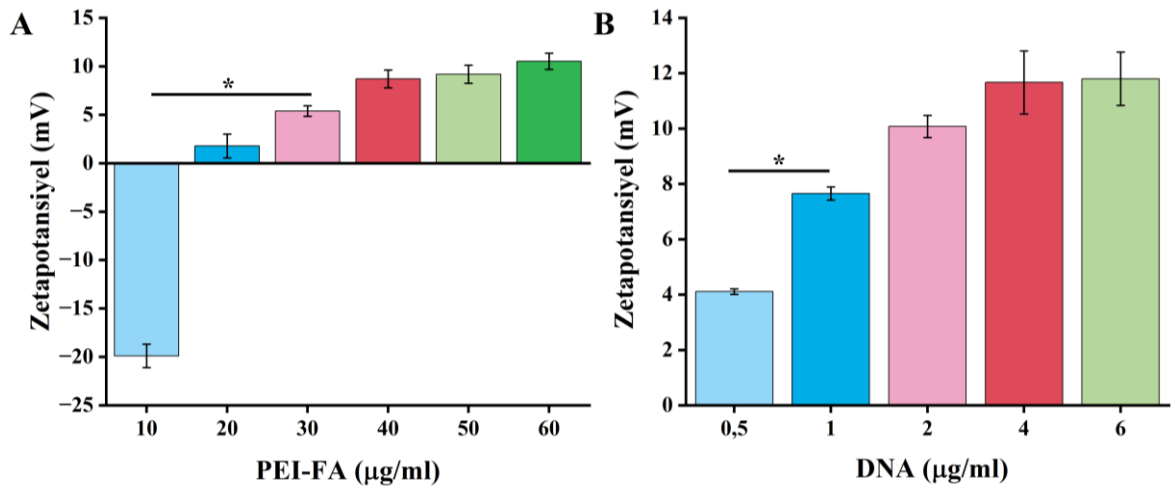
Şekil 43. Farklı ortamlarda çözölen PEI-FA'nın zeta potansiyel değeri.

A. 10 µg/ml PEI-FA içeren su, DPBS ve 20 mM NaCl içeren DPBS solösyonları, B. 10 ve 100 µg/ml PEI-FA içeren su solösyonları ve C. 10 ve 100 µg/ml PEI-FA içeren DPBS çözeltileri.

Aynı şartlarda PEI-FA ve DNA karıştırdığında, PEI-FA+DNA kompleksinin yüzey yükü araştırıldı (Şekil 44). Suyun kullanıldığı grupta yüzey yükü pozitif (+15,40 mV) olsa bile hücre kültürü deneylerinde hücreler için uygun bir pH'da bir tamponun kullanımı daha doğru olacaktır. Bu nedenle PEI-FA+DNA kompleksinin hazırlanması adımlarında DPBS tamponu kullanıldı.

Değişen PEI-FA miktarının yüzey yüküne etkisini araştırmak üzere DNA miktarı (1 µg) ve son hacim (1 ml DPBS) sabit tutularak PEI-FA miktarı değiştirildi (10-60 µg). Ölçüm sonucunda PEI-FA miktarının artması ile zeta potansiyelin pozitif yönde arttığı ortaya kondu (Şekil 44 A). Daha yüksek derişimlere çıkılamamasının nedeni, devam eden süreçte hücre kültürü deneylerinde hücrelere yüksek miktarda PEI-FA'nın verilemeyecek olmasıdır. 40, 50 ve 60 µg PEI-FA kullanılan gruplarda yüzey yükü pozitifliğindeki artışın, diğer gruplar arasındaki artışa göre daha anlamsız olduğu gözlemlendi. Bu nedenle devam eden çalışmalarda 50 µg PEI-FA kullanımına ve nihayetinde PEI-FA/DNA oranının 50 olarak sabit tutulmasına karar verildi.

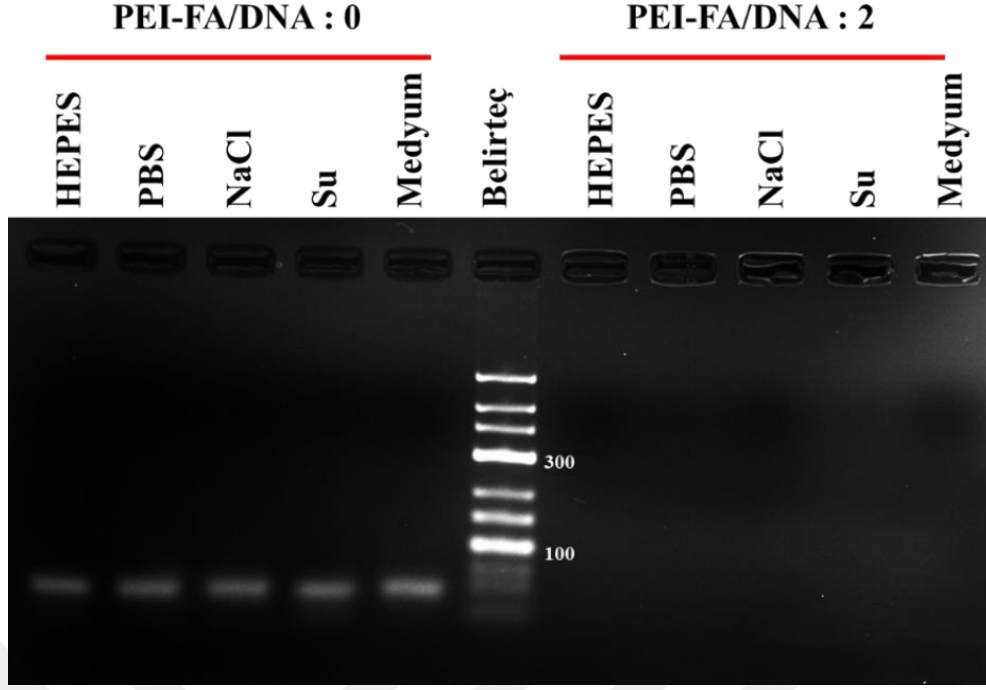
Bu sonuçların ardından, PEI-FA/DNA oranı 50'de sabit tutulması halinde, DNA miktarının değişmesi ile zeta potansiyelin nasıl değişeceği incelendi (Şekil 44 B). Elde edilen değerlere göre DNA miktarı arttıkça, PEI-FA/DNA oranı sabit olsa bile zeta potansiyeli artmaktadır. Ancak artan DNA miktarı ile zeta potansiyelinde orantılı bir artış yoktur. Zeta potansiyel ölçümü sonuçlarında, PEI-FA/DNA oranı 50 olduğunda 2, 4 ve 6 µg DNA kullanımı arasında istatistiki açıdan anlamlı fark gözlenmedi. 6 µg üzeri DNA miktarının denenmemesinin nedeni, hücre kültüründe muhtemel nükleik asit sitotoksitesinin önüne geçmektir. Aynı sebeple devam eden çalışmalarda 1 veya 2 µg DNA kullanıldı.



Şekil 44. DNA ve PEI-FA etkileşimine ait zeta potansiyel sonuçları.

A. 1 µg DNA ile değişen derişimlerde PEI-FA ve B. PEI-FA/DNA oranı 50’de sabit tutularak değişen DNA miktarı denendi. Çözücü olarak DPBS kullanıldı ve son hacim 1 ml’dir.

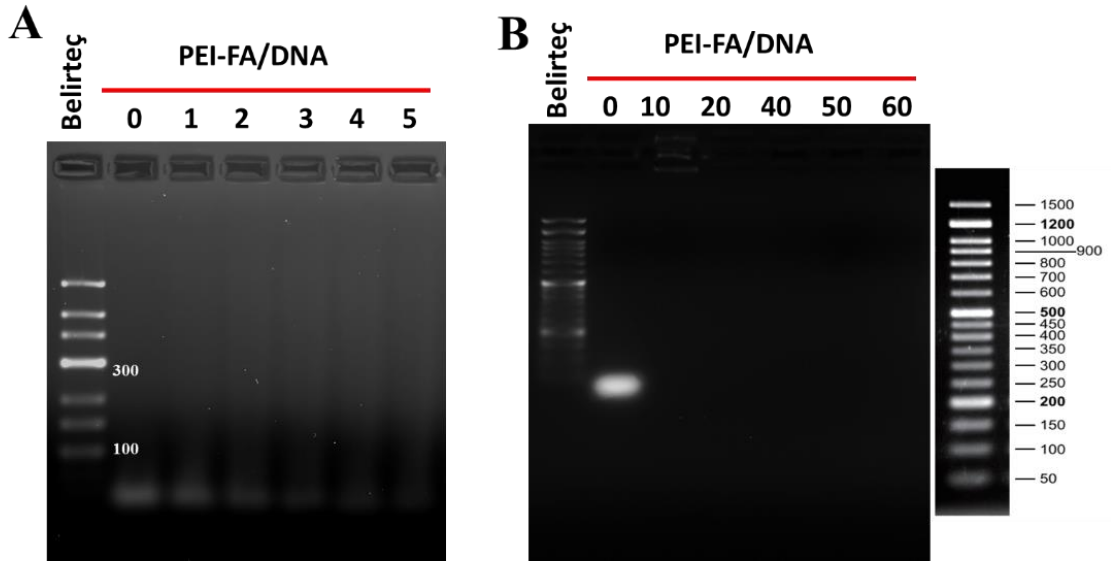
Zeta potansiyel ölçümlerinden sonra PEI-FA ve DNA etkileşimi agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 45). Eşit miktar DNA’nın farklı çözücülerle karıştırılmasına (PEI-FA yokluğunda) ait elektroforez görüntüsünde, aynı miktar DNA aynı yerde ve aynı bant şiddetinde görülmektedir. PEI-FA içeren örneklere ait kuyularda ise DNA’ya ait parlak bant gözlenmedi. Bu durum PEI-FA’nın DNA’yı koruması ve bu sayede jeldeki etidyum bromürün DNA ile etkileşememesinden dolayı olabilir. Etidyum bromürün DNA’ya erişmemesi, PEI-FA’nın nükleazlara karşı da DNA’yı koruyabileceğini belirtebilir. Ek olarak PEI-FA/DNA oranının 2 olduğu örneklerin DNA miktarları Nanodrop ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda PEI-FA’nın DNA bağlama kapasitesi HEPES (20 mM), PBS, NaCl (20 mM, PBS içinde), nükleaz içermeyen saf su ve serum içermeyen hücre büyüme medyumları ortamlarında hesaplandı ve sırasıyla %19,9±2,9, %7,7±5,8, %13,1±6,2, %9,6±1,3 ve %6,5±0,7 olarak bulundu. En yüksek DNA bağlama oranı HEPES ortamında ve en düşük DNA bağlama oranı ise serum içermeyen hücre büyüme medyumunda gözlemlendi.



Şekil 45. Farklı çözücü ortamların, PEI-FA ve DNA etkileşimine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Örnekler, 100 µl sıvı içinde 2 µg DNA (0,05 µg/µl) içerecek şekilde hazırlandı. PEI-FA içeren örnekler hazırlanırken, nükleaz içermeyen saf su içinde çözülmüş 0,5 µg/µl derişimine sahip PEI-FA solüsyonu kullanıldı. Çözücü ortamlar; HEPES (20 mM), PBS, NaCl (20 mM, PBS içinde), nükleaz içermeyen saf su ve serum içermeyen hücre büyüme medyumudur.

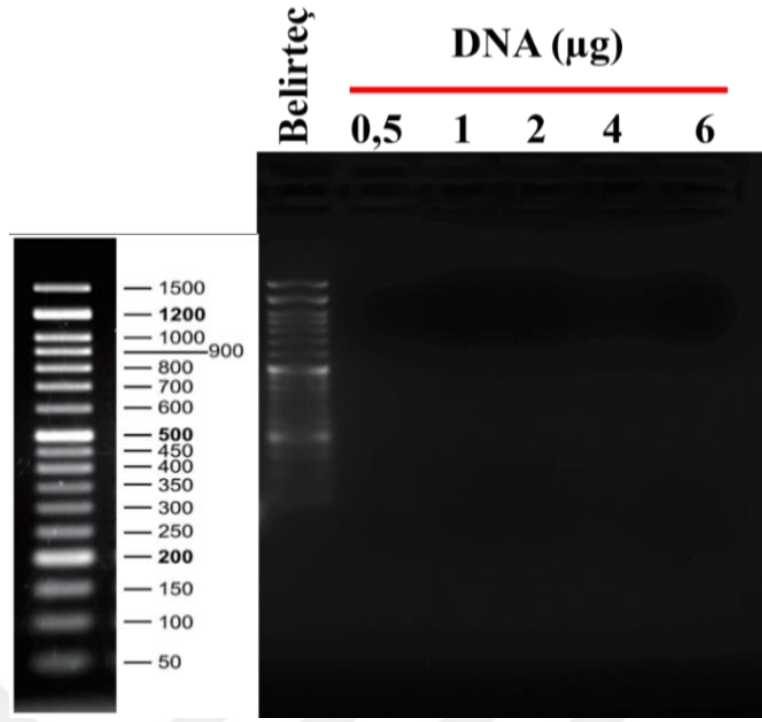
Ardından farklı oranlarda PEI-FA/DNA solüsyonlarına ait görüntüden, PEI-FA/DNA oranının 4 ve üzeri olduğu tüm örneklerde, DNA'nın PEI-FA tarafından tutulduğu, bu sayede jelde bulunan etidyum bromürün DNA ile etkileşmediği, jelde parlak bantların görülmemesinden anlaşılmaktadır (Şekil 46). Bir çalışmada, grafen oksit ve polietilen glikol ile birleştirilmiş PEI-FA yapısı siRNA ile karıştırılmış ve kütlece PEI-FA/RNA oranı 15'e kadar olan şartlarda jelde bant görülmüştür (Y. Wang et al., 2020). Wang ve ark. ait bu çalışma ile kıyaslandığında, grafen oksit ve polietilen glikol kullanmadığımız için PEI-FA/DNA ağırlık oranı 10'dan itibaren bant gözlenmemesi olasıdır. Şekil 44 A'da PEI-FA/DNA oranı 10 iken zeta potansiyelin negatif olduğu belirlendi. Bu durum ortamda serbest DNA moleküllerinin varlığı ve PEI-FA'nın tüm DNA'yı sarmadığı şeklinde yorumlanabilir. PEI-FA/DNA oranı 10 olan örneklerin yüklendiği jel sonucunda DNA'ya ait parlak gözlenmemiştir (Şekil 46 B). Bu durumun nedeni serbest DNA'nın jelde görünmeyecek derişimde olmasından ya da negatif iyonların PEI-FA+DNA ile zeta potansiyeli etkileyecek düzeyde etkileşiminden dolayı olabilir.



Şekil 46. PEI-FA'nın DNA bağlama yeteneğini gösteren farklı PEI-FA/DNA örneklerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

A. 2 µg DNA içeren tüm örneklerde (son hacim 150 µl, PBS) PEI-FA/DNA oranı 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 olan solüsyonlar ve B. Jelde örnek yükleme sırası, soldan sağa doğru; belirteç, 2 µg DNA içeren tüm örneklerde PEI-FA/DNA oranı 0, 10, 20, 40, 50 ve 60 olan solüsyonlar. En sonda B jeline kullanılan belirtecin kullanım kılavuzunda yer alan bant görüntüsü sunuldu.

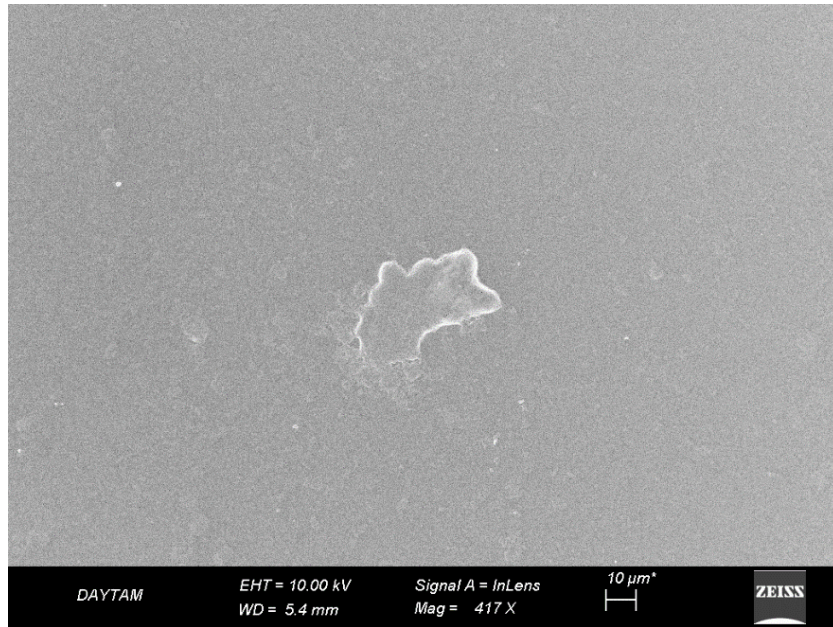
Zeta potansiyel (Şekil 44) sonuçları da göz önüne alınarak, PEI-FA/DNA ağırlık oranı 50 olan şartlarda DNA miktarı değiştirilerek örnekler jele yüklendiğinde yine tüm gruplarda bant varlığı gözlenmedi (Şekil 47). Bu durum seçilen oranda (50), artan DNA derişimlerinde bile tüm DNA moleküllerinin PEI-FA tarafından bağlanabildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 47. PEI-FA'nın DNA bağlama yeteneğine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

İlk kare, kullanılan belirtecin kullanım kılavuzunda yer alan bant görüntüsüdür. Sağdaki jelde örnek yükleme sırası soldan sağa doğru; belirteç, PEI-FA/DNA oranı 50 olan 0,5, 1, 2, 4 ve 6 µg DNA içeren solüsyonlar.

Son olarak ISD ile birleştirilmiş olan PEI-FA'nın SEM görüntüleri incelendi. Bazı noktalarda yığılma söz konusu iken genel olarak düz bir yüzeyin varlığı gözlemlendi (Şekil 48).



Şekil 48. PEI-FA/DNA'ya (50 oranı ve 1 µg DNA) ait SEM görüntüsü.

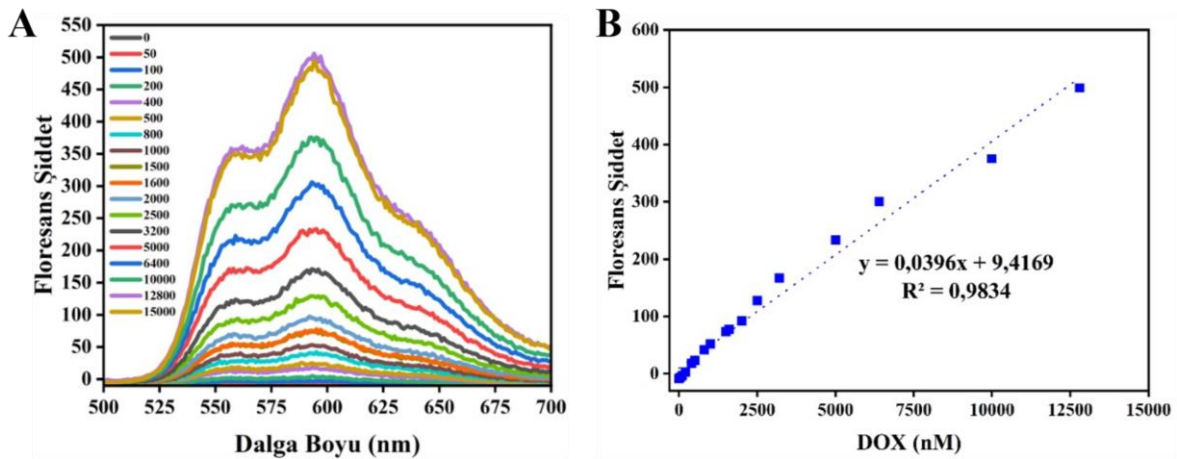
İlaç ve DNA Yüklü Yapılar

Doksorubisin (DOX), uzun süredir kansere karşı kullanılan, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış kemoterapötik bir ilaçtır (NIH, 2018). DOX, kanser hücrelerinin

büyümesini yavaşlatarak veya durdurarak çalışan, DNA içine enterkalasyon yapan bir kemoterapötiktir. Hastalara hidroklorür tuzu şeklinde damardan uygulanan DOX, kan dolaşımı yoluyla eriştiği tümör hücrelerini etkilediği gibi sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir (kemik iliğindeki kan hücrelerinin sayısının azalması gibi) (NIH, 2014). Bu nedenle DOX ve benzeri ilaçların klinik kullanımı oldukça risklidir. DOX gibi kanser tedavisinde etkin ilaçların güvenli kullanımı için akıllı ilaç taşıma sistemleri önerilmektedir.

DOX yükleme

PBS içinde çözülmüş DOX'un nanomolar altı derişimlerde bile ölçülebileceği literatürden bilinmektedir (S. Shah et al., 2017). DOX'un miktar ölçümü için daha hassas sonuç vermesi ve daha düşük derişimleri belirleyebilmenin mümkün olması nedeniyle ölçüm tekniğinde floresan spektrofotometre kullanıldı. 0-15.000 nM DOX solüsyonlarının 470 nm uyarım (Ex) sonucu elde edilen emisyon (Em) taramasına ait grafik Şekil 49 A'da, 595 nm'de okunan değerlere göre hazırlanan standart grafik ise Şekil 49 B'de sunuldu. Hazırlanan solüsyonlarda DOX ölçümü 3 gün sürdürüldü ve böylece günlerce sürecek olan ilaç yükleme ve salım çalışmalarında, PBS içindeki DOX'un oda şartlarında 3 gün süreyle kararlı olduğu belirlendi. Grafikten (Şekil 49 A) görüleceği üzere çok yüksek derişim nedeniyle 12,8 ve 15 μM 'lık DOX solüsyonları arasında fark gözlenmedi. Bu nedenle floresan şiddet ölçümü yapılırken yüksek derişimli DOX solüsyonları seyreltilti. İlaç yükleme işleminin ardından gözeneklere yüklenen ilaç miktarının tayini için bu standart grafikten (Şekil 49 B) elde edilen denklem kullanıldı.

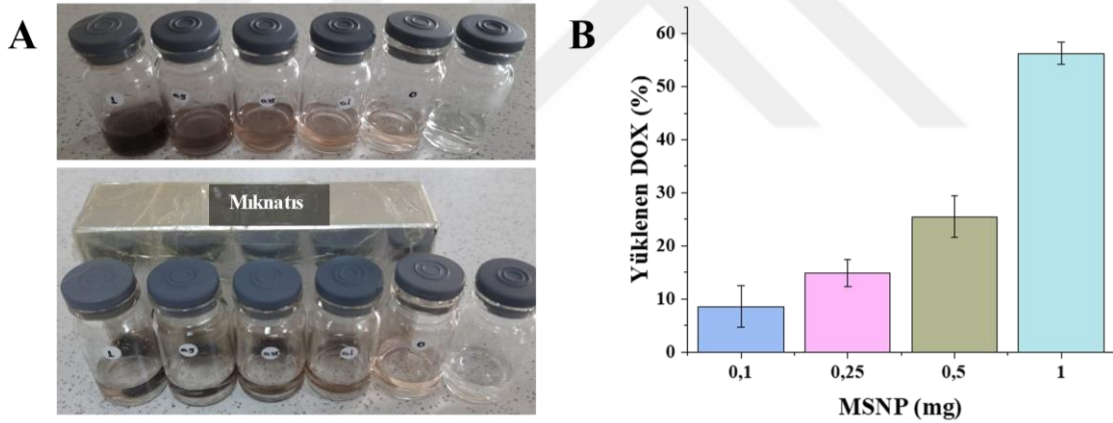


Şekil 49. DOX solüsyonlarına (nM) ait A. floresan spektrumu ve B. standart grafik.

DOX solüsyonları, PBS içinde karanlık oda şartlarında inkübe edildi ve Ex/Em:470/500-700 nm'de tarandı. Standart grafik, Ex/Em: 470/595 nm değerlerinden alınan veri ile oluşturuldu.

Farklı miktarda MSNP ile karıştırılan DOX solüsyonlarına, 24 saat sonra bir mıknatıs tutulup MSNP'ler toplandı (Şekil 50). Bu solüsyonlarda DOX varlığını işaret eden kırmızı rengin, solüsyona eklenen MSNP miktarı ile doğru orantılı olarak azaldığı gözlemlendi. Sadece

MSNP içeren tüpler kör (Ex/Em_{470/595} nm: 4,936) olarak kullanıldı ve sadece DOX (Ex/Em_{470/595} nm: 17,401) içeren tüpler ise %100 ilaç olarak kabul edildi. Şekil 50’da sunulduğu üzere, ortamdaki DOX’un (standart grafikten elde edilen denklemden faydalanılarak 77 nM olarak hesaplandı) yaklaşık %56’sı, 1 mg MSNP tarafından tutulmaktadır. MSNP miktarı arttıkça hem solüsyondaki DOX kaynaklı turuncu renk şiddeti hem de mıknatıs tutulduktan sonra sıvıda kalan yüzde DOX miktarı azalmaktadır. Bu durum DOX’un MSNP’ye yüklendiğini göstermektedir. Çalışma sırasında daha yüksek DOX yükleme oranlarına çıkmak için başlangıç DOX miktarı arttırılmış ve beklendiği üzere MSNP’lerin yüklediği DOX miktarı artmıştır. Ancak bu yolla üretilen DOX yüklü MSNP’lerin (MSNP-DOX) sitotoksitesinin çok fazla olduğu gözlenmiştir. Hücrelere uygulanan MSNP-DOX derişimi düşürülerek sitotoksiste azaltılabilir ancak bu durumda MHT uygulamasında istenilen sıcaklığa erişmek için ortamda yeterince manyetik kaynak (MSNP) bulunmayacaktır. Bu nedenle, sitotoksiste sonuçları göz önüne alınarak, MSNP içindeki DOX miktarını düşürerek, MSNP-DOX üretimi için 20 mg MSNP ile 1 mg DOX’un karıştırılması (son hacim 20 ml) uygun görülmüştür. Su ortamında DOX yüklü MSNP’lerin APTES ile kolayca kaplanabilmekte ve APTES kaplama, PBS ortamında NP’lerin kolloidal kararlılığını artırmaktadır (Y. Wang et al., 2016).

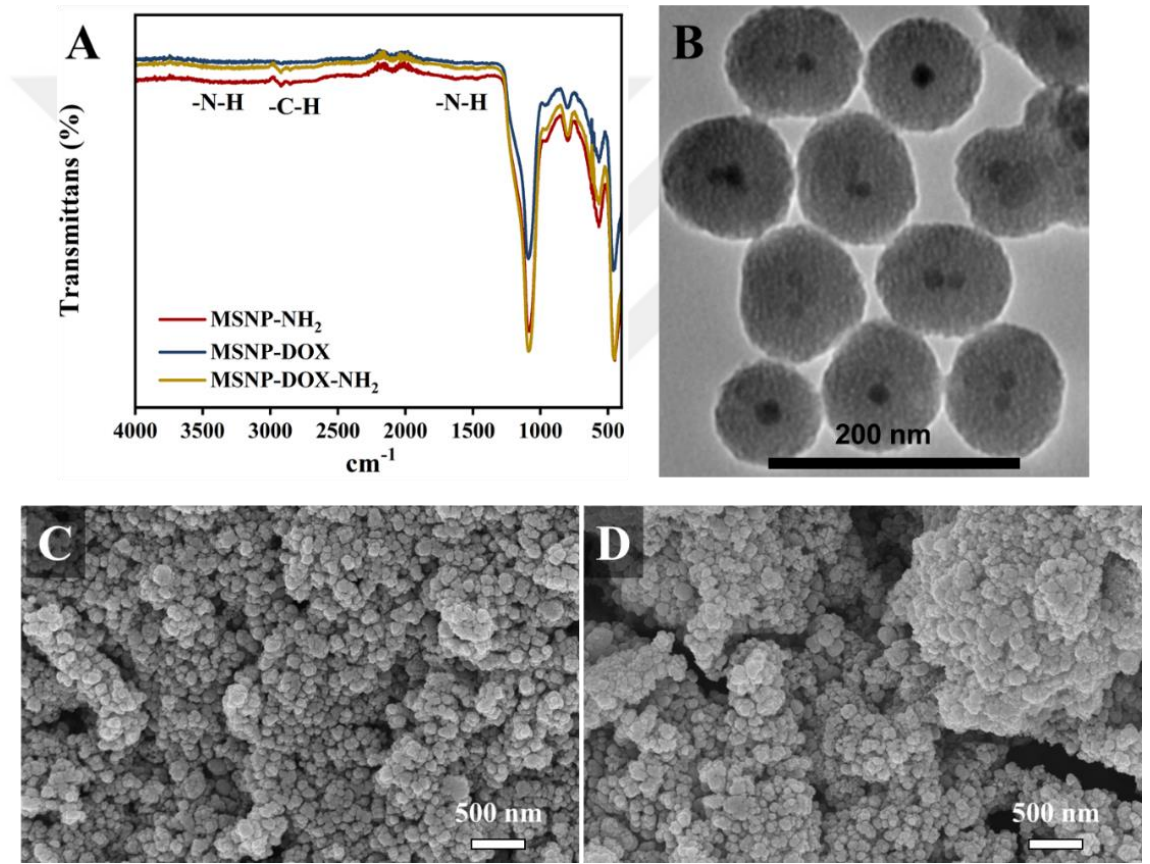


Şekil 50. MSNP’ye DOX yükleme sonuçları.

A. Mıknatıs yok (üst) iken ve mıknatıs var (alt) iken DOX ve MSNP içeren karışımlara ait fotoğraflar ve B. Başlangıç DOX (77 nM) miktarının yüzde MSNP’ye yüklenme grafiği.

Literatürde, ilaç yüklenen MSNP’lerin yüzeyindeki silanol gruplarından kaynaklanan geri dönüşümsüz bir ilaç yüklü MSNP agregasyonu bildirilmektedir (Liong et al., 2008). Agregasyon, yüzeylere hidrofilik moleküllerin aşılmasıyla önlenmektedir. Bu amaçla hem hidrofilik yüzeyin elde edilmesi hem de sonraki adımda kullanılacak olan DNA’nın MSNP yüzeyine etkileşimini artırması amacıyla (sağlayacağı pozitiflikten dolayı) DOX yüklü MSNP’lerin yüzeyi, yüzeye amin grubu sağlayan APTES ile modifiye edildi (MSNP-DOX-NH₂). APTES, silika kabuğun yüzeyini kolayca -NH₂ ile işlevselleştirebilmektedir (Cichos & Karbowiak, 2014). MSNP-DOX ve MSNP-DOX-NH₂’ye ait FTIR spektrum sonuçlarında, -

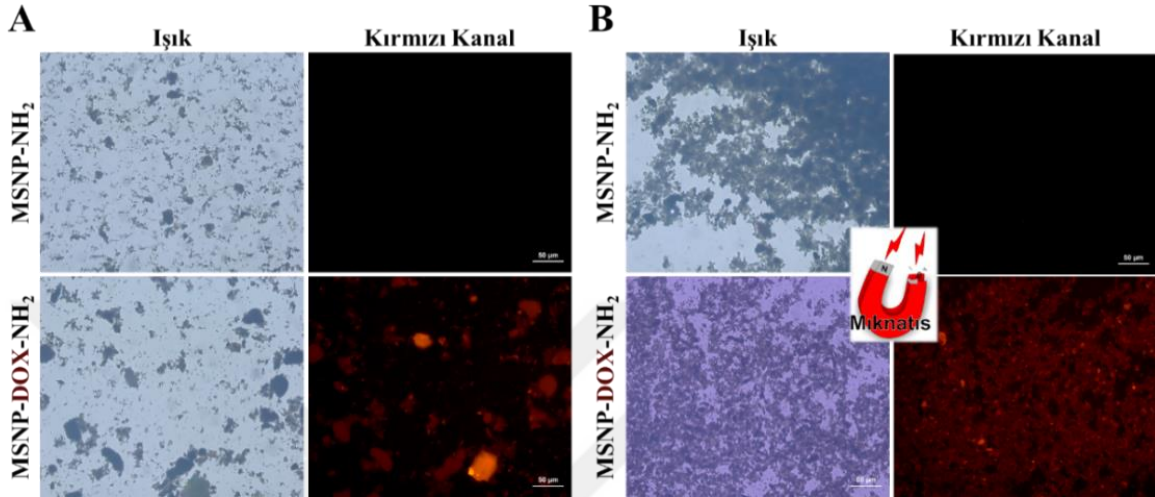
CH₃-CH₂ varlığında beliren 2800-2900 cm⁻¹ arasındaki pikler gözlemlendi (Şekil 51 A). Ayrıca 1450-1600 cm⁻¹ arasında beliren pikler -NH- varlığını belirtmektedir (Bhavsar et al., 2020; Y. Li et al., 2022; Zabihi et al., 2015). MSNP-DOX yapıların FTIR spektrumlarında, DOX'a ait piklerin belirgin olarak görülmemesi DOX'un miktarının düşük olmasına ve DOX'un yüzeyde kalmayıp MSNP gözeneklerine hapsolmesine bağlı olabilir. MSNP-DOX-NH₂'ye ait TEM görüntüleri (Şekil 51 B) MSNP'ye ait görüntülerle (Şekil 35 A) karşılaştırıldığında, MSNP-DOX-NH₂ yapısında gözeneklerin belirsizleştiği görülmektedir. Bu durum gözeneklerde DOX'un varlığından dolayı olabilir. Hem ilaç yükleme hem de APTES ile modifikasyon işleminin NP'lerin boyut ve dağılımında olumsuz bir etki oluşturmadığı anlaşılmaktadır. Bu durum SEM görüntüleriyle de doğrulanmıştır (Şekil 51 C ve D).



Şekil 51. MSNP'lere ait A. FTIR spektrumu, B. TEM görüntüsü (MSNP-DOX-NH₂), C. ve D. Sırasıyla MSNP-NH₂ ve MSNP-DOX-NH₂'ye ait SEM görüntüleri.

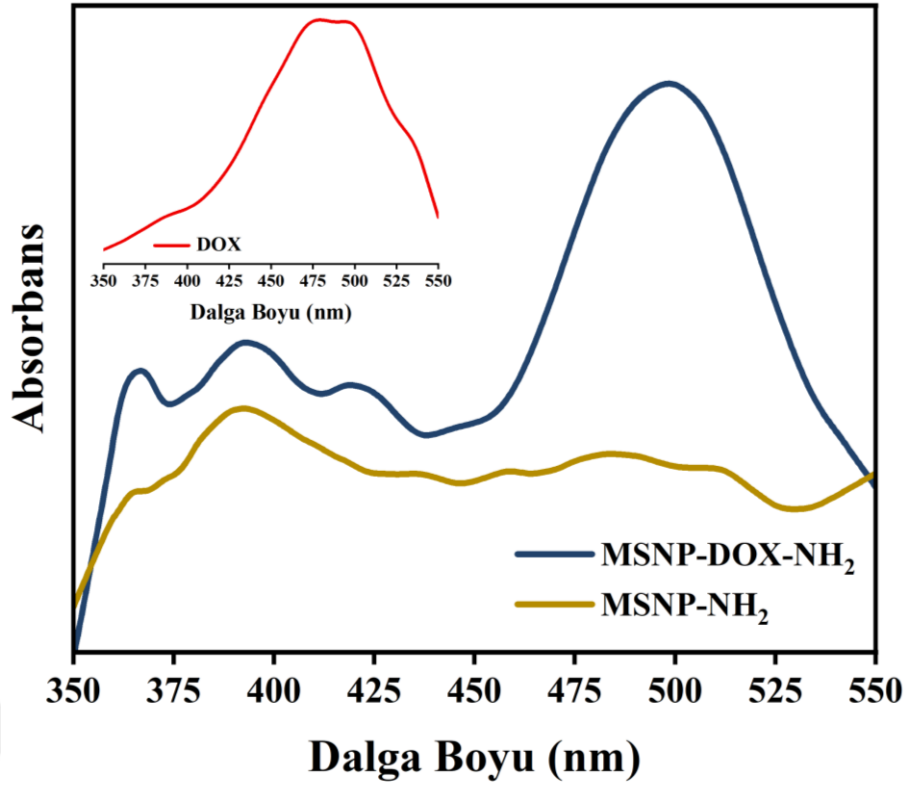
Gerek FTIR gerekse elektron mikroskopları ile yapılan gözlem, DOX varlığını kanıtlamamaktadır. Bu nedenle DOX içeren MSNP'ler lam-lamel arasında bir floresan mikroskop ile incelenmiştir (Şekil 52). Bu aşamada bir grup örnek mıknatıs üzerinde tutularak DOX'un MSNP'ler ile hareket edebildiği ortaya konmuştur. Hem ışık hem kırmızı kanalda kaydedilen fotoğraflarda, mıknatıs tutulmayan MSNP-DOX-NH₂'lerin daha dağınık ve ara ara kümelenmiş bir halde olduğu gözlemlendi. Buna karşın mıknatıs üzerinde bekletilen lamlardan

alınan görüntüde MSNP-DOX-NH₂'lerin birbirlerine daha yakın durduğu ve kısmen bir hizalanmanın olduğu belirlendi. Mıknatıs yokken gözlenen büyük kümelerin, mıknatıs tutulduktan sonra gözlenmemesi, yine NP'lerin manyetik alan (mıknatıs) varlığında hizalanmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca kırmızı rengin MSNP-NH₂'lerde yokken MSNP-DOX-NH₂'lerde gözlenmesi, MSNP-DOX-NH₂'lerde DOX'un varlığını kanıtlamaktadır.



Şekil 52. MSNP-NH₂ ve MSNP-DOX-NH₂ içeren sıvıların floresan mikroskop görüntüleri. Görüntüleme, A. mıknatıs tutulmadan ve B. 10 dakika mıknatıs tutulduktan sonra yapıldı. Ölçek 50 µm'dir.

Bunun yanında DOX varlığı UV spektrofotometre ile de doğrulandı (Şekil 53). DOX solüsyonunda gözlenen 500 nm'deki pikin, MSNP-DOX-NH₂'de de gözlenmesi, DOX'un yapıya yüklendiğini kanıtlamaktadır (J. Wang et al., 2018).



Şekil 53. DOX, MSNP-NH₂ ve MSNP-DOX-NH₂ içeren solüsyonların dalga boyu-absorbans grafiği.

Son olarak DPBS tamponunda dağıtılan MSNP, MSNP-NH₂ ve MSNP-DOX-NH₂'lerin (0,1 mg/ml) DLS analizi sonuçları incelendi. İlaç yükleme aşamasında, karışıma APTES ilavesi sayesinde yüzeye katılan -NH₂ gruplarından dolayı MSNP'ye (-31,1±11,5 mV) kıyasla, hem MSNP-NH₂'lerde (-17,5±5,35 mV) hem de MSNP-DOX-NH₂'lerde -13,29±6,21 mV) yüzey yükünün negatifliğinde düşüş gözlemlendi (Tablo 2). Bu durum NP'lerin yüzeyinde pozitif grupların arttığını işaret etmektedir, yani yapıda -NH₂ gruplarının varlığını doğrulamaktadır (Bhavsar et al., 2020). DOX varlığı APTES ile modifiye edilmiş MSNP'lerin zeta potansiyel değerini negatifleştirmektedir (Y. Wang et al., 2016). Bu durum önemlidir çünkü, nötr zeta potansiyeline sahip (-10 ila +10 mV) NP'lerin ilaç dağıtım verimliliğinin daha yüksek olduğu belirlenen yayınların yanı sıra negatif yüklü bir yüzeye sahip olan nano taşıyıcıların, kan dolaşımı yoluyla tümöral doku etrafında daha fazla ilaçları biriktirdiği ileri sürülmektedir. (Y. Wang et al., 2016; Wilhelm et al., 2016). Bu nedenle hazırlanan MSNP-DOX-NH₂'lerin hücre alım anlamında daha etkili olması beklenmektedir. Öte yandan karışımdaki parçacık boyutlarının dağılımına ait polidispersite indeksi (PDI) değerlerine göre karışımdaki MSNP-DOX-NH₂ boyutlarının orta derecede heterojendir ve tamamen homojen değildir. Hidrodinamik çap boyutlarının MSNP'ye göre MSNP-NH₂ ve MSNP-DOX-NH₂'lerde daha düşük ölçülmesi, APTES modifikasyonunun MSNP agregasyonunu azalttığını belirtmektedir.

Tablo 2. DLS Analizi Sonuçları.

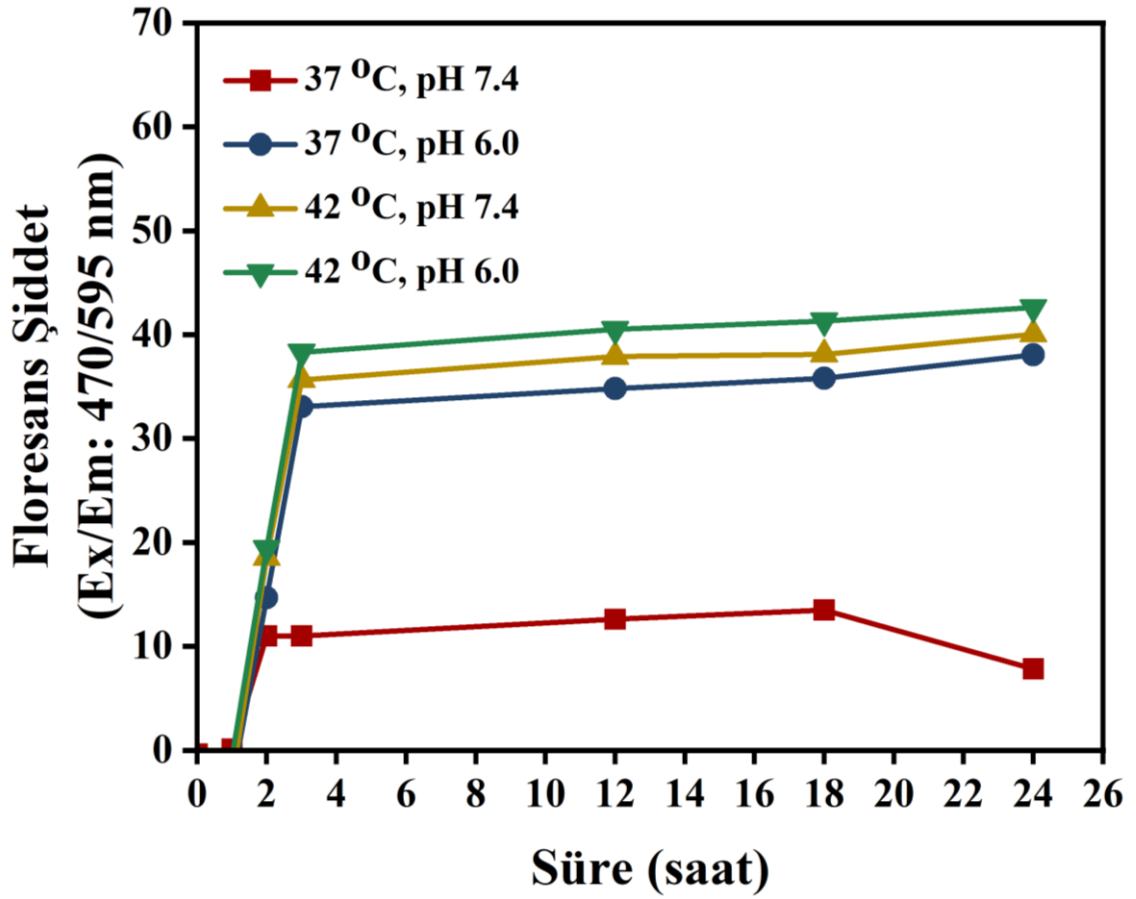
	Zeta Potansiyeli (mV)	Hidrodinamik Çap (nm)	PDI
MSNP	-31,10±11,50	3658	0,426
MSNP-NH₂	-17,50±5,35	2548	0,700
MSNP-DOX-NH₂	-13,29±6,21	1375±354,97	0,485±0,117

PDI: polidispersite indeksi. Karışımlar 0,1 mg/ml derişimde hazırlandı.

Salım Deneyleri

İlaç taşıma sistemlerinde kullanılan malzemelerinin çözünürlüğü, ilacın difüzyonu ve hem ilacın hem de taşıyıcı yapının biyolojik olarak parçalanması salım sürecine öncülük eden faktörlerdir. Eğer ilaç taşıma sisteminin çözünürlüğü/aşınma hızı, ilacın difüzyon hızından düşükse ilaç salım mekanizması difüzyon üzerinden ilerler. İlaç salımı sırasında kütle transferi, ilacı çevreleyen biyolojik sıvıya, ilacın yüksek miktarda olduğu nano-taşıyıcıdan düşük derişimde olduğu sıvı ortama difüzyonu şeklinde gerçekleşir. Başlangıçta gözlenebilen hızlı ilaç salımı (drug release) çoğunlukla nano-taşıyıcı yüzeyine tutunmuş olan ilaç moleküllerinin varlığından kaynaklanmaktadır. İlaç salım kinetiğinin incelenmesi, ilacın fizikokimyasal davranışının anlaşılması, *in vivo* sistemlerde gerçekleşebilecek salımın ön görülebilmesi, salım mekanizması hakkında fikir yürütülebilmesi ve yapının karalılığının test edilmesi açısından önem arz etmektedir.

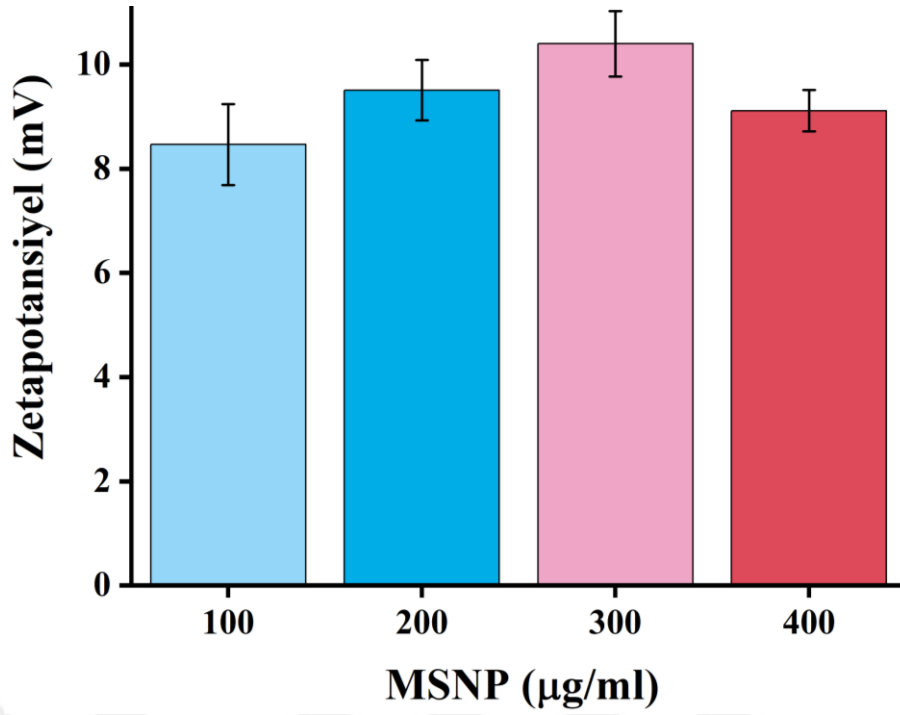
MSNP-DOX-NH₂'lerin, hem pH 7,4 ve pH 6,0 hem de 37 °C ve 42 °C'de DOX salım kinetiklerine ait floresan spektrofotometre ölçümünde, DOX salımının her iki sıcaklık şartında da pH 6,0'da daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 54). Bununla birlikte 42 °C'de daha fazla DOX salımı kaydedildi. İlk 3 saatten sonra (3-6 saat arası) hızlı bir ilaç salımı gözlemlendi, devam eden süreçte DOX salımında yavaşlama kaydedildi. Özellikle 37 °C ve pH 7,4 şartlarında oldukça düşük ilaç salımının gözlenmesi ilaç taşıma sistemimizin, önerilen çalışma için uygun olduğunu göstermektedir. Kaplama yapılmayan MSNP-DOX yapılarından 6 saat içinde DOX'un tamamının salındığı bilinmektedir (Bhavsar et al., 2020). Ayrıca ilk 6 saat göz önüne alındığında, hücrelere yapılan uygulama sonucunda ilaç yüklü yapı mıknotis üzerinde tutulacağı için hücreler maksimum oranda ilaç yüklü yapıyı kısa sürede sitoplazmalarına alacaktır. İlk 3 saat içinde ilacın burst salım etkisi ile hızlı bir şekilde (genellikle başlangıçta difüzyon hızlı olur) salındığı görülmektedir. APTES ile modifikasyon adımı, kullanılan APTES miktarı artırılarak bu etki kontrol altına alınabilir (Y. Wang et al., 2016).



Şekil 54. MSNP-NH₂'den DOX salımına ait floresan spektrofotometre ölçüm sonucu.

DINP Üretme

Hedeflenen kombine terapi çalışmalarında MSNP'ler, hücre içine DNA'nın bir mıkmatıs yardımıyla hızla alınması amacıyla kullanıldı. Bu doğrultuda, PEI-FA/DNA içeren ortama ilaç yükleme adımında APTES ile modifiye edilmiş MSNP-NH₂ de eklendi. Öncelikle elde edilen MSNP-NH₂'nin suda dağıtılması ile zeta potansiyelinin $48,43 \pm 2,31$ mV ve DPBS içinde ise $-16,93 \pm 1,00$ mV olduğu belirlendi (Şekil 55). Ardından PEI-FA ve DNA karışımına farklı miktarlarda MSNP-NH₂ eklenip 10 dakika oda şartlarında inkübe edilerek zeta potansiyel değerleri ölçüldü. Sonuçlar, nihai karışımın zeta potansiyelinin pozitif olduğunu ortaya koymaktadır. 100 ve 300 µg/ml MSNP-NH₂ içeren gruplar birbiriyle istatistiki açıdan anlamlı bir farklılığa sahip iken diğer grupların birbirleriyle istatistiki açıdan anlamlı bir farka sahip olmadığı belirlendi.



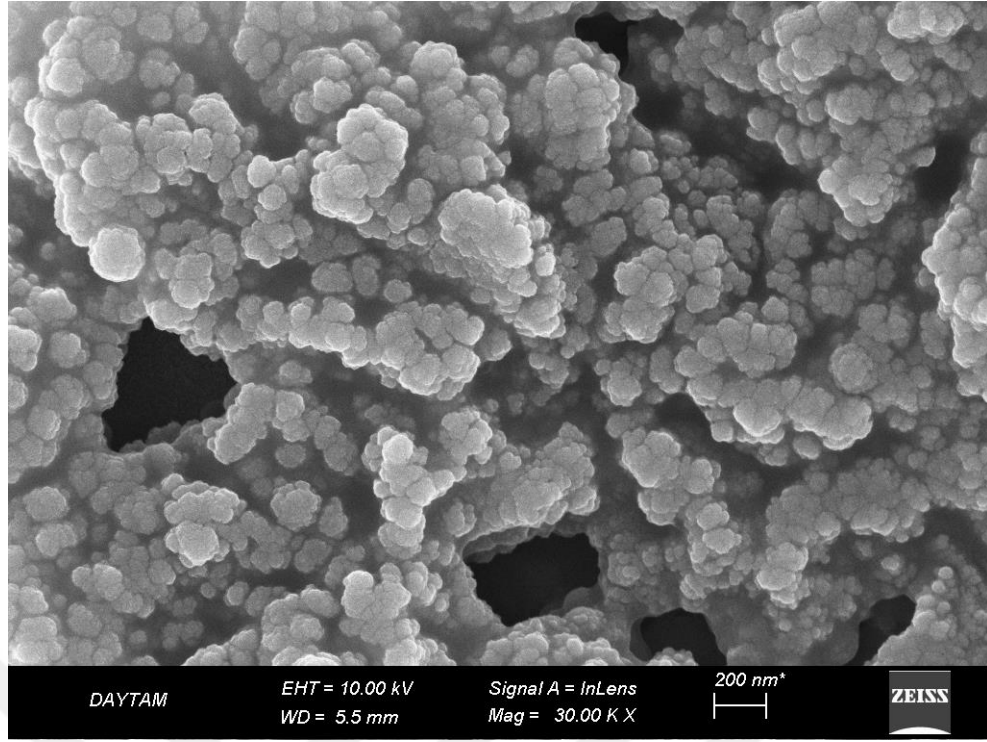
Şekil 55. PEI-FA/DNA (50, w/w) ile karıştırılan MSNP-NH₂'nin zeta potansiyel değerleri.

Bunun dışında daha yüksek DNA ve MSNP-NH₂ miktarı ve farklı PEI-FA/DNA oranları ile hazırlanan örneklerin zeta potansiyel değişimlerinde yüzey yükünün her daim pozitif olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Farklı Miktarlarda Hazırlanan Örneklerin Zeta Potansiyel Değerleri.

PEI/DNA (w/w)	DNA (µg)	MSNP-NH ₂ (mg)	Zeta Potansiyeli (mV)
100	4	-	13,33±0,503
100	6	-	11,87±0,808
120	6	-	13,4±0,2
100	4	2	13,07±0,59
100	6	2	12,73±0,31
120	6	1	12,60±0,44
60	4	1	11,60±0,53
60	4	2	11,77±1,15
120	4	2	12,8±0,92

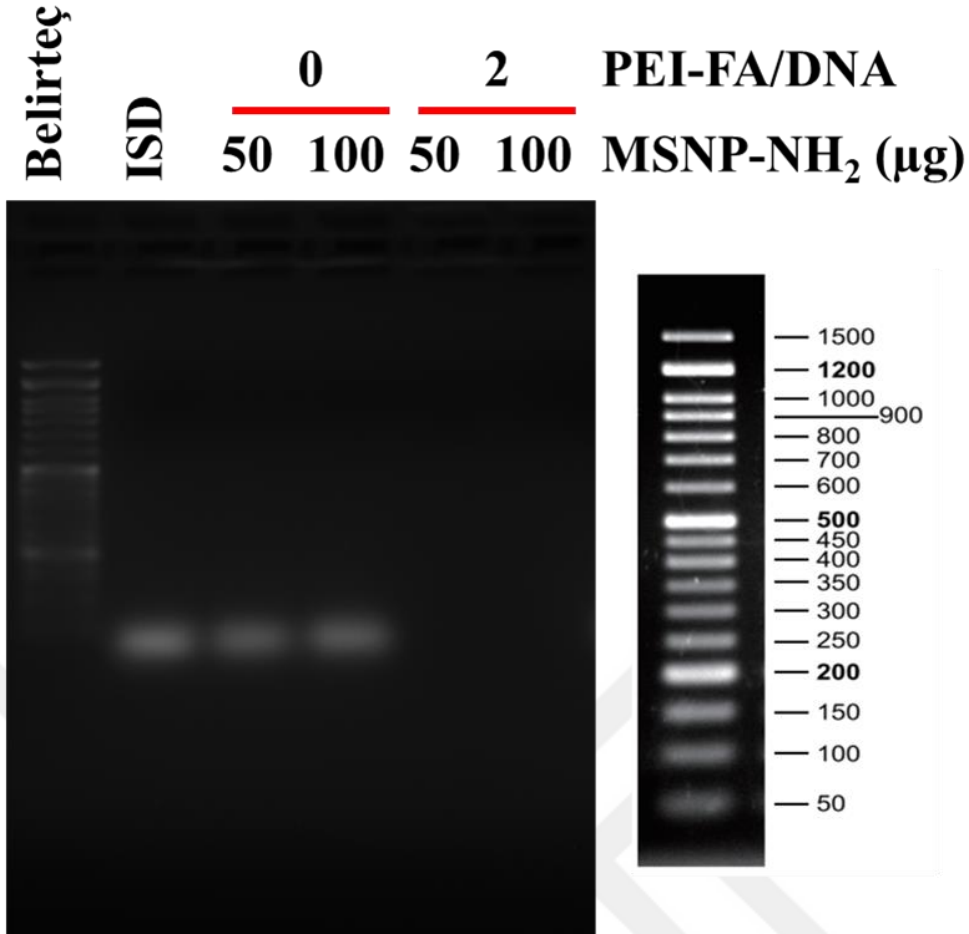
Tüm bu sonuçlar, hücrelere uygulanmak üzere hazırlanacak kompleksin yüzey yükünün pozitif olduğunu göstermektedir. Bu durum hem negatif olan hücre yüzeyi ile hazırlanan yapının elektrostatik etkileşimini artırmakta hem de fosfat omurgasından dolayı negatif olan DNA'nın PEI-FA ile tamamen sarıldığını göstermektedir. Ayrıca DNA ve PEI-FA ile birleştirilen MSNP-NH₂'lerin polimer ile sarıldığı, SEM görüntülerinde MSNP-NH₂'lerin yüzey morfolojisindeki değişimden anlaşılmaktadır (Şekil 56).



Şekil 56. DNP'a ait SEM görüntüsü.

1 ml DPBS içinde 250 μg MSNP-DOX-NH₂, 1 μg ISD ve 50 μg PEI-FA olacak şekilde hazırlanmış bir karışımdan cam üzerine damlatıldı. Örnek açık havada kurutulduktan sonra paladyum ile kaplanarak görüntüler kaydedildi.

Son olarak PEI-FA varlığında ve yokluğunda hazırlanan MSNP-NH₂ ile ISD karışımını içeren örnekler jele yüklendi (Şekil 57). Bu sonuçlar, PEI-FA kullanılmayan gruplarda DNA'ya ait bant gözlenmesi DNA'nın paketlenemediğini, MSNP-NH₂ ile etkileşse bile bu etkileşim etidyum bromürün DNA'ya ulaşmasına engel olamadığını ve bu durumda ise DNA'nın kolayca nükleazların hedefi olabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 57. MSNP-NH₂'nin DNA bağlama yeteneğine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Jelde örnek yükleme sırası soldan sağa doğru; belirteç, ISD, 50 ve 100 µg MSNP-NH₂ içeren ve PEI-FA/DNA oranı 2 olan 50 ve 100 µg MSNP-NH₂ içeren solüsyonlar. Soldaki kare, kullanılan belirtecin kullanım kılavuzunda yer alan bant görüntüsüdür.

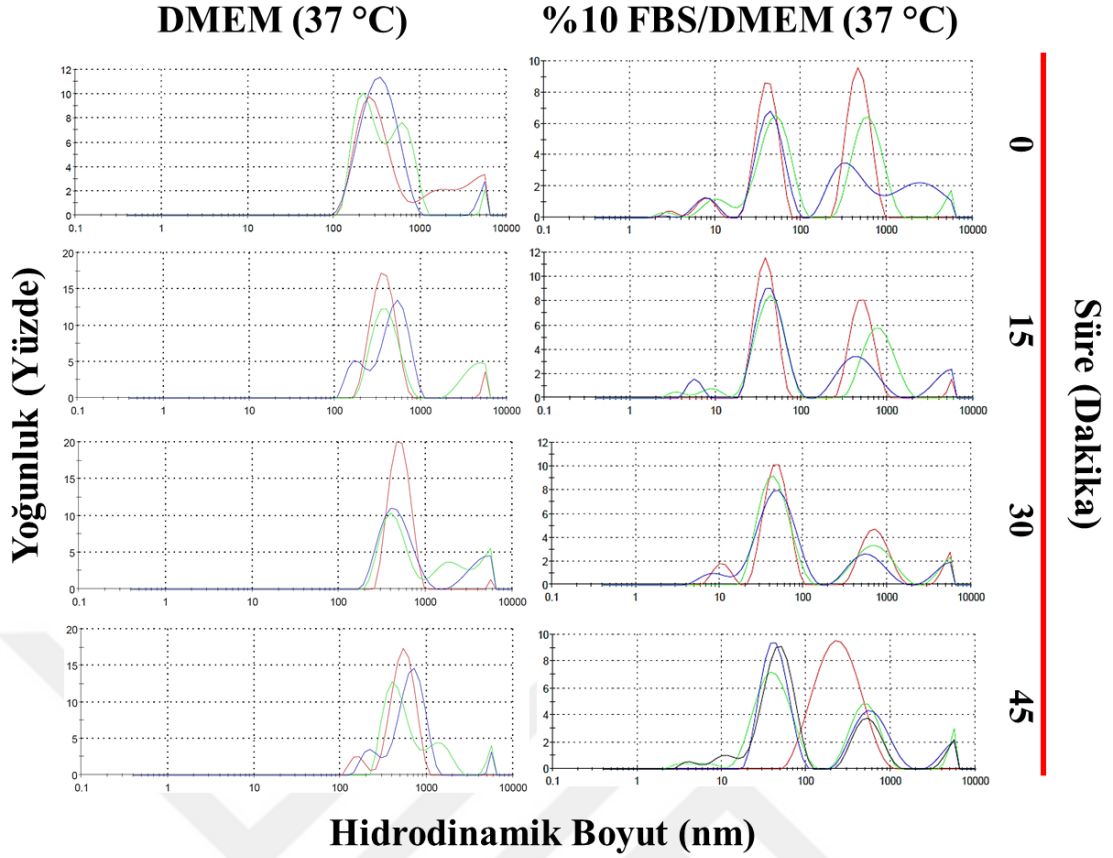
DINP Kararlılığı

İlaç taşıyıcı sistemlerin kargo molekülü ile oluşturduğu kompleksin, *in vivo* çevreye benzer ortamlardaki kararlılığının araştırılması oldukça önemlidir. Çünkü nanoformülasyon, tümör dokusuna sızdığında tümör stromasında (bağ dokudan oluşan iskelet) “ilaç yüklü depo” olarak bekler. Bu sırada meydana gelen enzimatik parçalama veya fagositik ataklar, ilaç salımı için difüzyonun başlamasına öncülük eder. Bu sebeple nanoformülasyonun biyodağılımı ve kararlılığı, terapinin etkinliği için önemlidir. Kararlılık konusundaki öncelikli nokta, fizyolojik şartlarda (plazma gibi) veya biyolojik uygulamalarda kullanılan ortamlarda (hücre kültürü medyumu gibi) nanoformülasyonun topaklaşmasının (agregasyon) araştırılmasıdır. Örneğin serum homojenatında nanopartiküllerin topaklaşması, onların kana enjekte edildiklerinde de toplanabilecekleri anlamına gelir. Topaklanmış nanoformülasyon, damarların tıkanmasına neden olabilir. Ayrıca topaklanma, ilaç salım profilini etkileyecektir. Çünkü topaklaşma, ilacın difüze olabilme yeteneğiyle kısıtlar. Topaklaşmanın boyutunun belli bir sınırın üzerine çıkması halinde bu yapılar bağışıklık sistemine ait beyaz kan hücreleri tarafından yakalanacaktır. Bu

durum, tedavide istenilen başarının sağlanamaması demektir. Belirli bir ortamda nano-yapıların kararlılığı, nanoformülasyonun yüzey özelliklerine, konsantrasyonuna ve ortam bileşenlerine bağlıdır.

Oldukça seyreltilmiş ortamlarda DLS tekniği boyut ve boyut dağılımı hakkında bilgi vermesinden ötürü kullanışlı olsa da DLS tekniği genellikle opak biyolojik ortamlar için uygun değildir. Özellikle serum içeren kültür medyumlarında nanoparçacıkların boyutuna yakın başka moleküllerin varlığı sonuçları önemli derecede etkileyecektir. Spektrofotoflorimetri, nanoformülasyonların biyolojik ortamlardaki dağılımını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntemdir. Parçacık kaynaklı floresans ve parçacığın koloidal kararlılığı arasındaki ilişki, nanoformülasyon kararlılığını değerlendirmek için faydalı bir araç olarak görülmektedir. Bununla birlikte, nanoformülasyon yapısında bulunabilen polimerin bozunması veya floresan boyanın yapıdan salımı spektrofotoflorimetri analizinde ölçümü önemli ölçüde saptırabilirken, bu durum DLS için sorun değildir.

DINP yapısının serum varlığında kararlılığı %10 serum (FBS) içeren ve içermeyen ortamlar ile çalışıldı. 15, 30 ve 45 dakika 37 °C’de inkübe edilen örneklerin hidrodinamik çapları (Malvern) ölçüldü (Şekil 58). DMEM ortamında (°C) kaydedilen hidrodinamik çapa ait geniş piklerin (100-1000 nm arası) süre arttıkça daraldığı gözlemlendi. Bu durum 0-45 dakika boyunca DMEM’deki yapının zamana bağlı olarak dağılabildiğini göstermektedir. Serum (%10 FBS) içeren ortamda yapılan ölçümde, proteinlerden kaynaklı ekstra pikler (100 nm altında) gözlemlendi. 0-15 dakika arasında hidrodinamik çaplara ait piklerin değişmediği gözlenirken 30. dakikadan itibaren 1000 nm dolaylarındaki pik şiddetinin azaldığı gözlemlendi. Bu durum DINP’ın dağılması ile alakalı olabilir. Bu sonuçlar hazırlanan yapının *in vivo*’da lokal uygulamalar için daha kullanışlı olabileceğini göstermektedir. Özellikle mıknatıs uygulanarak hücresel alımın hızlandırılması yoluyla DINP’ın doğrudan hücre içinde dağılması sağlanabilir. Lokal uygulamalarda klinikte örneğini gördüğümüz NanoTherm ürünü bu tarz uygulamalara bir örnektir (Mahmoudi et al., 2018; Rodríguez et al., 2022; Southern & Pankhurst, 2018).

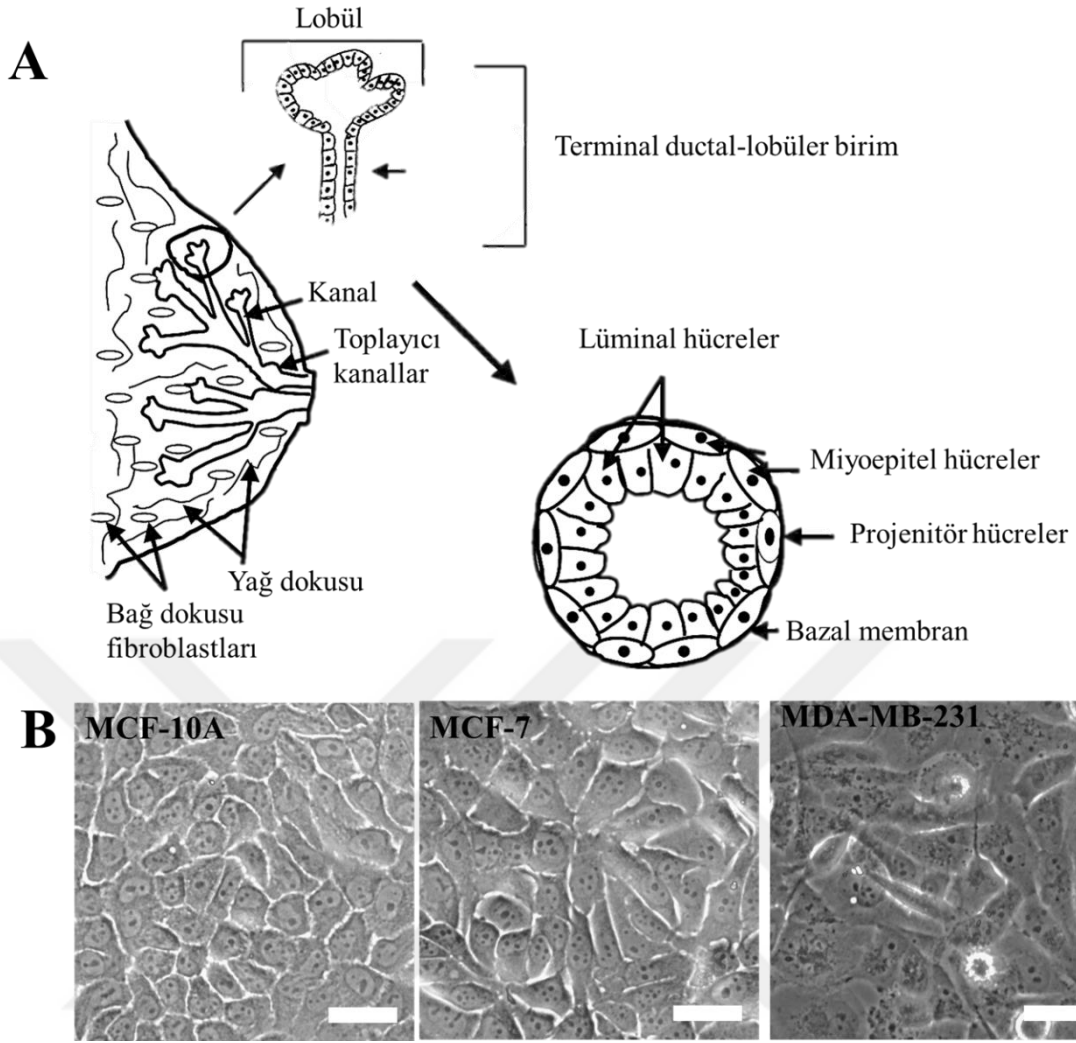


Şekil 58. DNP kararlılığına ait hidradinamik çap ölçümü.

1 ml DPBS içinde 250 µg MSNP-DOX-NH₂, 1 µg ISD ve 50 µg PEI-FA olacak şekilde hazırlanmış bir karışımdan 400 µl alındı ve 2 ml son hacim olacak şekilde medyumlar ile karıştırıldı. Örnekler, 37 °C'ye ayarlı su banyosunda inkübe edildi.

Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu tez çalışması, ülkemizde (ve dünyada) kadınlarda en sık görülen meme kanseri modeli üzerinden yürütülmüştür. Çalışmada MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları kullanıldı (Şekil 59). MCF-10A, tümörojenik olmayan bir meme epitel hücre hattıdır. MCF-7 hücre hattı luminal meme kanseri türü iken MDA-MB-231 hücre hattı üçlü negatiftir. MDA-MB-231 hücre hattı epitel benzeri bir görünüme sahiptir, bazı hücreler uzun ve ince iken bazı hücreler yuvarlaktır. Yavaş büyüme eğiliminde olan MCF-7 hücreleri ise yine epitel benzeri görünür ve düşük pasaj numaralarında küresel ve üst üste büyüme (üst üste, üç boyutlu) eğilimi sergiler. Birkaç pasaj ilerledikten sonra MCF-7 hücreleri, tek tabaka (iki boyutlu) halinde büyümeye başlar. *In vitro* olarak büyütüldüğünde, bu hücre hattı kubbeler oluşturabilir, tipik hücre boyutu 20-25 µm olan oldukça büyük yapışık (adherent) hücrelerdir. Literatürde MDA MB-231, MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin iki katına çıkma süresi sırasıyla 24, 45 ve 18 saat olarak belirtilmektedir (Ali et al., 2017).



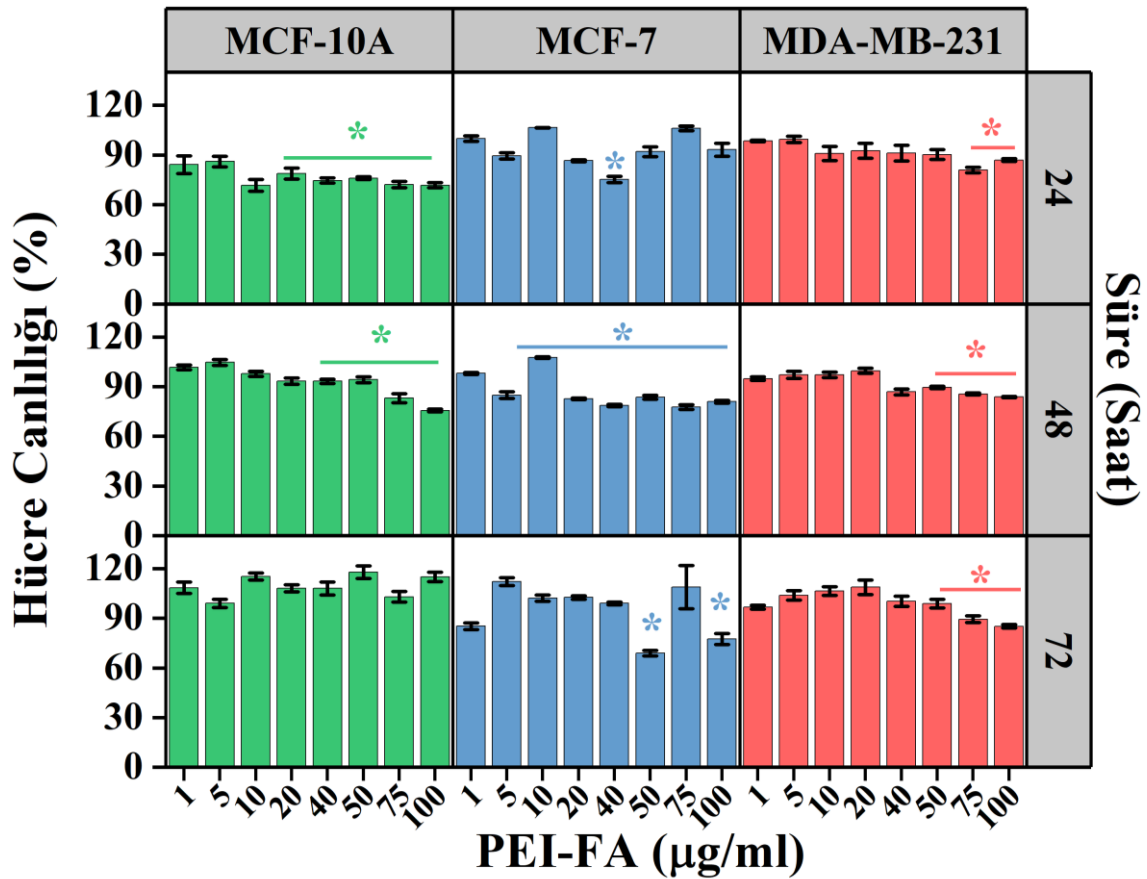
Şekil 59. A. Meme dokusu hücre yerleşimi ve B. Bu tez çalışması sırasında ters (invert) mikroskop ile görüntülenen hücreler.

A şekli (Dimri et al., 2005)'den Türkçe'ye çevrilmiştir. B görüntülerinde ölçek 20 μm 'dir.

MCF-7 hücreleri, meme epiteline özgü birkaç özelliği içermesi sebebiyle *in vitro* meme kanseri çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara göre meme adenokarsinomundan türetilen MCF-7 hücreleri, ERK (Extracellular signal-regulated kinase) ve Akt fosforilasyonu ile PI3K ve MAPK (mitogen-activated protein kinase) ilişkisini saptamak için kullanılabilir. Ayrıca, sitoplazmik östrojen reseptörlerine sahip olduğu için bu hücreler, estradiol formundaki östrojeni işleme yeteneğine sahiptir. MCF-7 ayrıca progesteron reseptörü pozitif ve HER2 negatiftir. Östrojen reseptörü (ER)-pozitif meme kanseri hücre deneyleri için araştırmalarda yaygın olarak kullanılan MCF-7 hücreleri ve geliştirilen çeşitli alt klonlar, değişen ekspresyon seviyelerine sahip farklı ER+ tümör sınıflarını temsil eder.

Hücre Canlılığı ve Sitotoksik Aktivite

PEI-FA uygulanan hücrelerde genel olarak doz bağımlı etki gözlemlendi (Şekil 60). İlk 24 saatte, 20 µg/ml ve üzeri derişimlerde MCF-10A hücre canlılığının kontrole göre istatistiki açıdan anlamlı olduğu görüldü. Genel olarak tüm hücre hatlarında hücre canlılığının %70'in altına düşmediği belirlendi. Polikatyonik bir polimer olan PEI'nin özellikle 25 kDa ve üzeri moleküler ağırlığa sahip formlarının uygulandığı hücrelerde güçlü sitotoksikite gözlenmektedir (Aravindan et al., 2009; Zintchenko et al., 2008). Yapılan FA modifikasyonu PEI'nin bu sitotoksik etkisini azalttı. Düşük derişimlerde (<20 µg/ml) ise hücre canlılığının daha yüksek olması, PEI-FA'nın taşıyıcı olarak güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

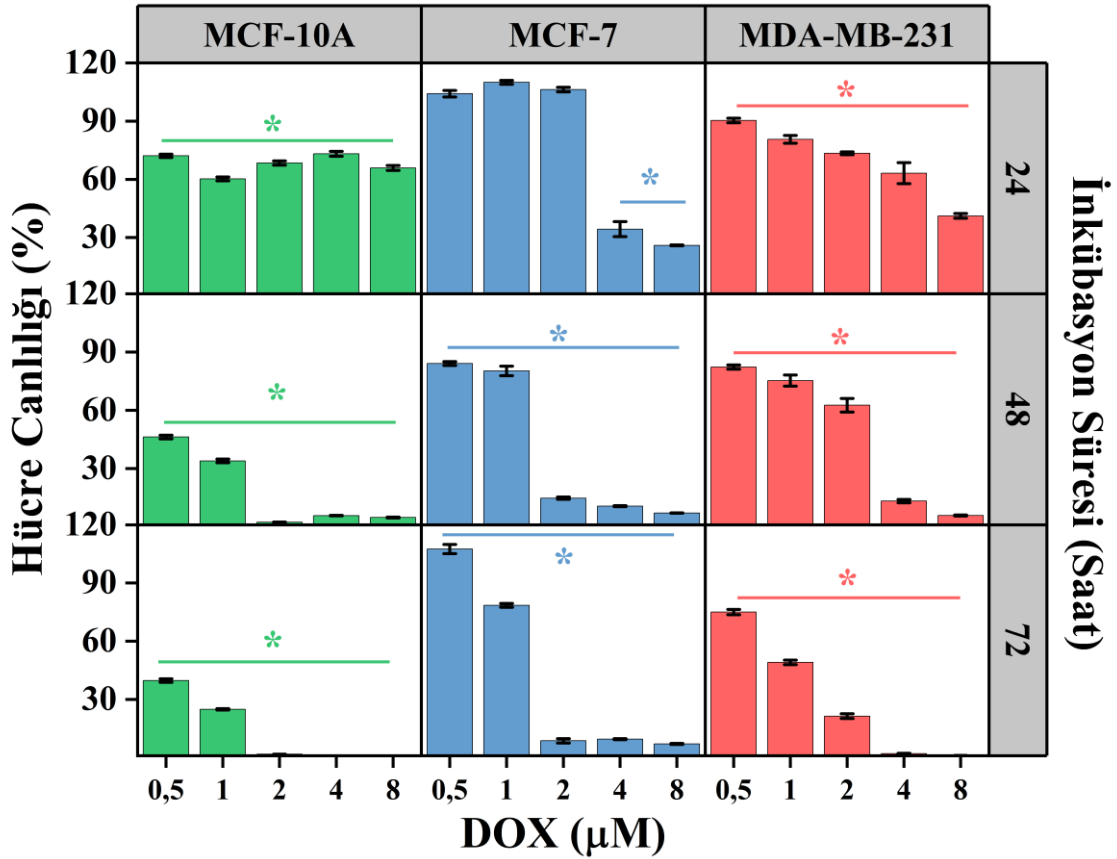


Şekil 60. PEI-FA (µg/ml) uygulanan hücrelerin, hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05

DOX uygulanmış hücrelere ait 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası CCK-8 testi ile belirlenmiş hücre canlılığı sonuçları Şekil 61'da sunuldu. Bir çalışmada MCF-10F, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için yarı inhibisyon değeri (IC₅₀⁹) sırasıyla 1, 4 ve 1 µM olarak belirtilmiştir (Pilco-Ferreto & Calaf, 2016). Başka bir çalışmada ise 48 saatlik DOX uygulaması

⁹ Bir bileşiğin uygulandığı hücrelerin belirli bir süre sonunda %50'sinin etkilendiği derişim.

neticesinde IC50 değerlerinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları için sırasıyla 36,6, 4,1 ve 15,1 μM olarak bildirilmiştir (Attarde & Pandit, 2020). DOX sitotoksitesi çalışmalarında aynı DOX derişimleri için farklı hücre canlılıkları gözlenmiştir (Davydov et al., 2014; Lüpertz et al., 2010; Radwan et al., 2016). Yani DOX toksisitesi konusunda aynı hücre hatları için rapor edilen toksisite sonuçları tutarlı değildir. Bu tez çalışması kapsamında da MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 24, 48 ve 72 saat DOX'a maruz bırakılarak hücrelerin canlılıkları CCK-8 testi ile belirlendi.



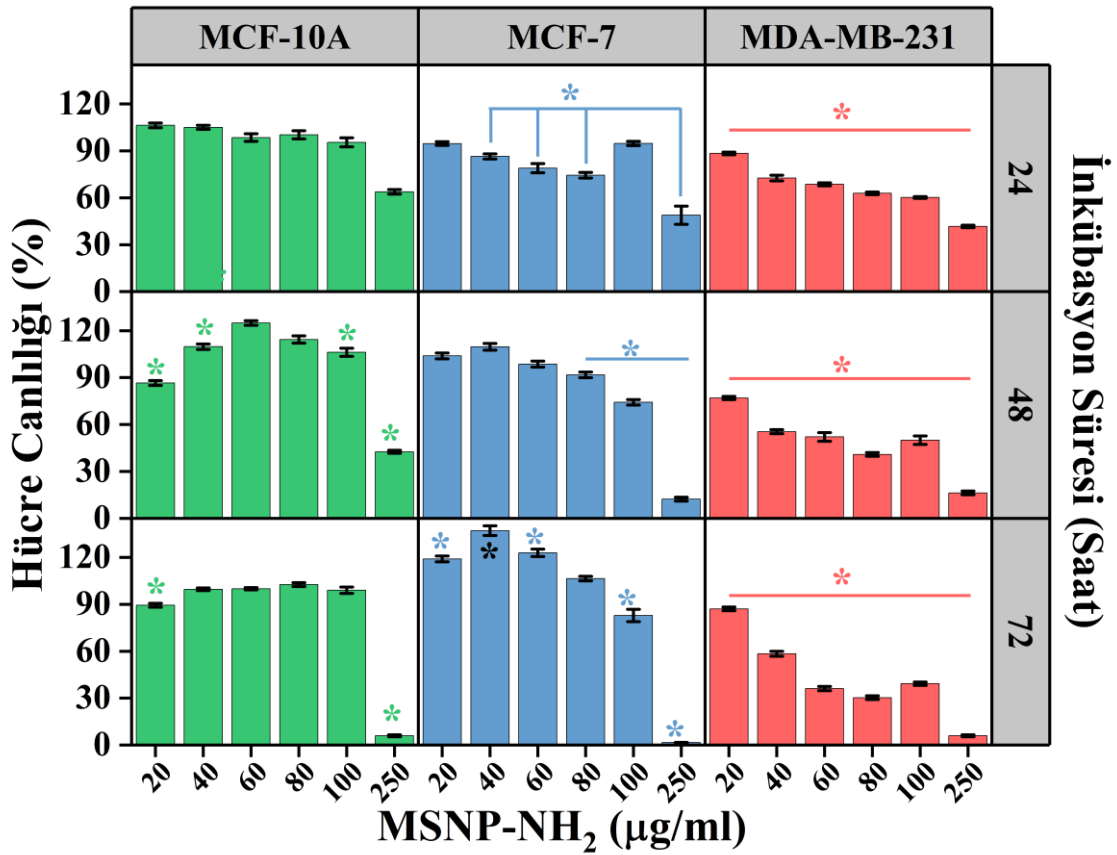
Şekil 61. Doksorubisin (μM) uygulanmış hücrelere ait hücre canlılığı grafiği. *: $p < 0,05$

MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin DOX maruziyetine ait IC50 değerleri Tablo 4'te sunuldu. Genel olarak artan inkübasyon süresi ve derişimle her üç hücre hattının DOX'tan etkilendiği gözlemlendi. Düşük derişimlerde (özellikle 0,5 ve 1 μM derişimlerde) DOX uygulanmış MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hatları MCF-7 hücre hattına göre DOX'tan daha fazla etkilendi.

Tablo 4. DOX Uygulamasına Ait IC50 Değerleri (μM).

	MCF-10A	MCF-7	MDA-MB-231
24 Saat	-	5,792	5,659
48 Saat	0,493	0,925	1,467
72 Saat	0,540	1,413	0,932

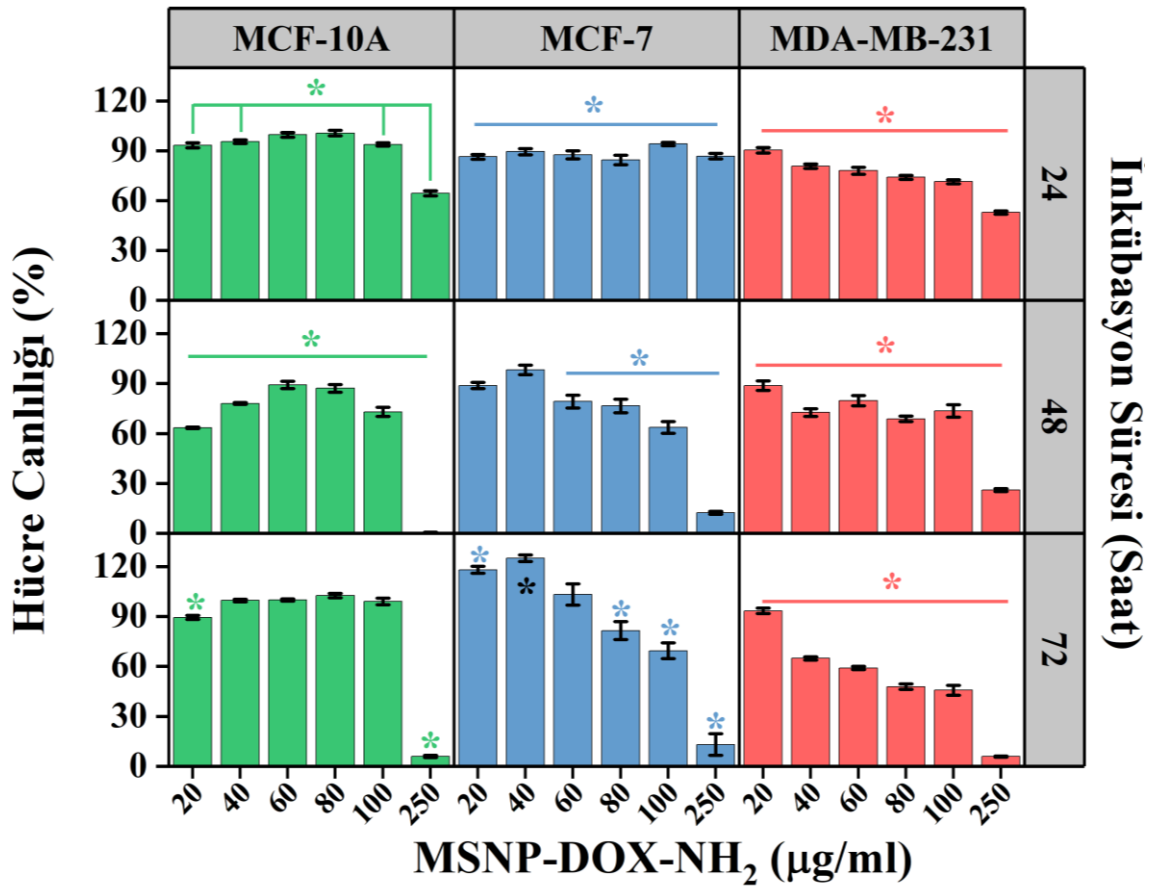
Hücreler, MSNP-NH₂'ye maruz kaldığında (Şekil 62), sadece en yüksek derişimde (250 µg/ml) yapılan uygulamanın MCF-10A hücre hattında hücre canlılığını düşürdüğü belirlendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, doz bağımlı hücre canlılığı azalışı belirgin olarak görülmektedir. MSNP-NH₂ uygulanmış MCF-10A hücrelerinde 72 saatte 40, 60 ve 80 µg/ml derişimlerinin ve MDA-MB-231 hücrelerinde 60 ile 80 µg/ml ve 60 ile 100 µg/ml derişimlerinde yapılan uygulamalar arasında anlamlı bir fark belirlenmedi. Bu sonuçlar, üretilen MSNP-NH₂'nin MCF-10A hücreleri için güvenli olduğunu ve kanser hücreleri üzerinde doz bağımlı sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar MSNP-NH₂'nin ilaç taşımaya uygun bir taşıyıcı platform olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçları destekler nitelikteki bir çalışmada, MSNP-NH₂ ile 48 saat inkübe edilmiş KB ve NOK hücrelerinde 50 µg/ml derişime kadar hücre canlılığının %80'nin üzerinde olduğu belirtilmektedir (Y. Wang et al., 2016).



Şekil 62. MSNP-NH₂ (µg/ml) uygulanmış hücelere ait hücre canlılığı grafiğı. *: p<0,05

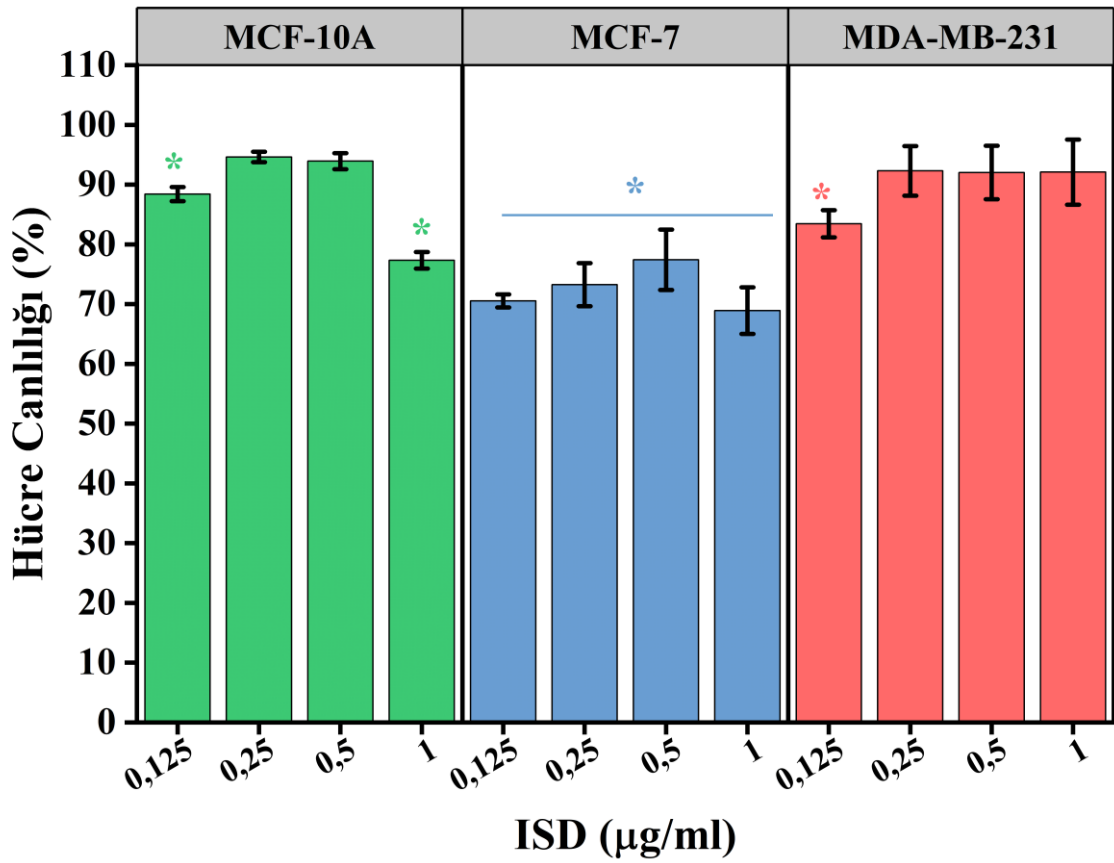
Derişik DOX solüsyonu ile muamele edilerek elde edilen MSNP-DOX-NH₂ yapısının çok güçlü sitotoksik etkisi olduğu görüldü (veri paylaşılmadı). Literatürde de yüksek derişimde DOX içeren MSNP'ler ile muamele edilmiş MCF-7 ve MDA-MB-231 hücelerinin, 10 µg/ml derişimde bile %90'ının öldüğü bildirilmiştir (Bhavsar et al., 2020). Bu tez çalışmasında düşük DOX derişimli çözelti ile hazırlanan MSNP-DOX-NH₂'lerin uygulandığı hücelerde, ilk 24 saat

yüksek bir hücre ölümü gözlenmedi ve genel hücre canlılığı yüzdesinin MSNP-NH₂'ye benzediği görüldü (Şekil 63). MCF-10A'da MSNP-NH₂'ye kıyasla MSNP-DOX-NH₂ uygulamasında daha düşük dozlarda kontrol ile anlamlı düzeyde fark oluştu. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, doz bağımlı olarak hücre canlılığı azaldı. Literatüre göre MSNP-DOX-NH₂ ile 48 saat inkübe edilmiş KB ve NOK hücrelerinde, hücre canlılığı oldukça düşük (Y. Wang et al., 2016) iken U87MG hücrelerinde 18 saat sonunda canlılık çok daha yüksektir (J. Wang et al., 2018). Bu durum MSNP-DOX-NH₂'nin sitotoksik etkisinin MSNP'nin DOX içeriği, hücre hattı ve uygulama süresiyle doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Tez çalışması kapsamında üretilen MSNP-DOX-NH₂, kanser hücre hatlarını MCF-10A'dan daha fazla etkiledi (özellikle 72. saatte, 60 ve 80 µg/ml derişimlerde) ancak bu etki hücrelerde yüksek hücre ölümüne neden olmadı. Bu durum elde edilen yapının kombine terapide hedeflenen diğer terapi modellerinin etkisini inceleyebilme imkânı tanımaktadır.



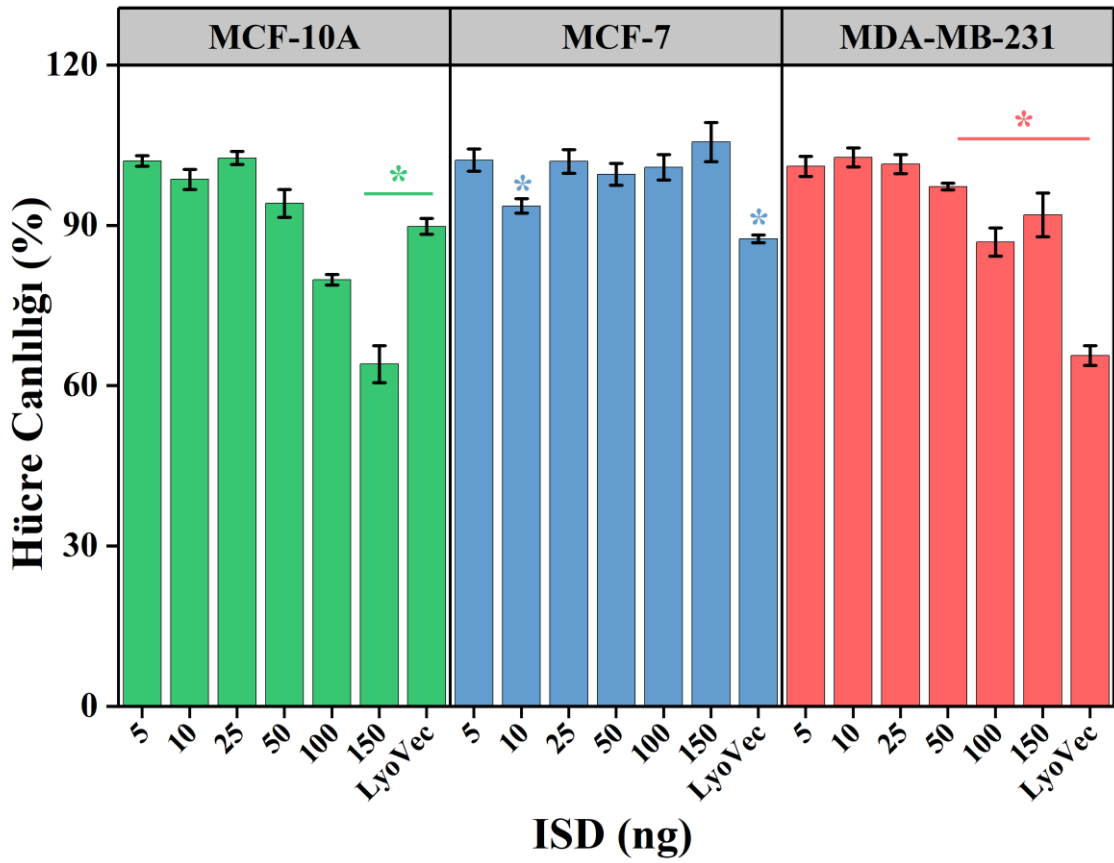
Şekil 63. MSNP-DOX-NH₂ (µg/ml) uygulanmış hücrelere ait hücre canlılığı grafiği. *: p<0,05

ISD'nin hücreler üzerindeki etkisine ait 48 saatlik CCK-8 test sonucunda (Şekil 64), MCF-10A hücre canlılıkları karşılaştırıldığında kontrol, 0,25 ve 0,5 µg/ml dozları arasında fark gözlenmedi. MCF-7'nin bu uygulamadan daha fazla etkilendiği gözlemlendi. MCF-7 hücre canlılığı tüm dozlarda, kontrole göre istatistiki açıdan anlamlı farklılığa sahiptir. MDA-MB-231 hücre hattının ise bu uygulamadan etkilemediği belirlendi.



Şekil 64. ISD uygulanan hücrelerin, hücre canlılığı grafiği. *: $p < 0,05$
 ISD (4 µg), LyoVec (400 µl) taşıyıcılığında hücrelere (10 µl/kuyu) uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra CCK-8 sitotoksikite ve proliferasyon testi yapıldı.

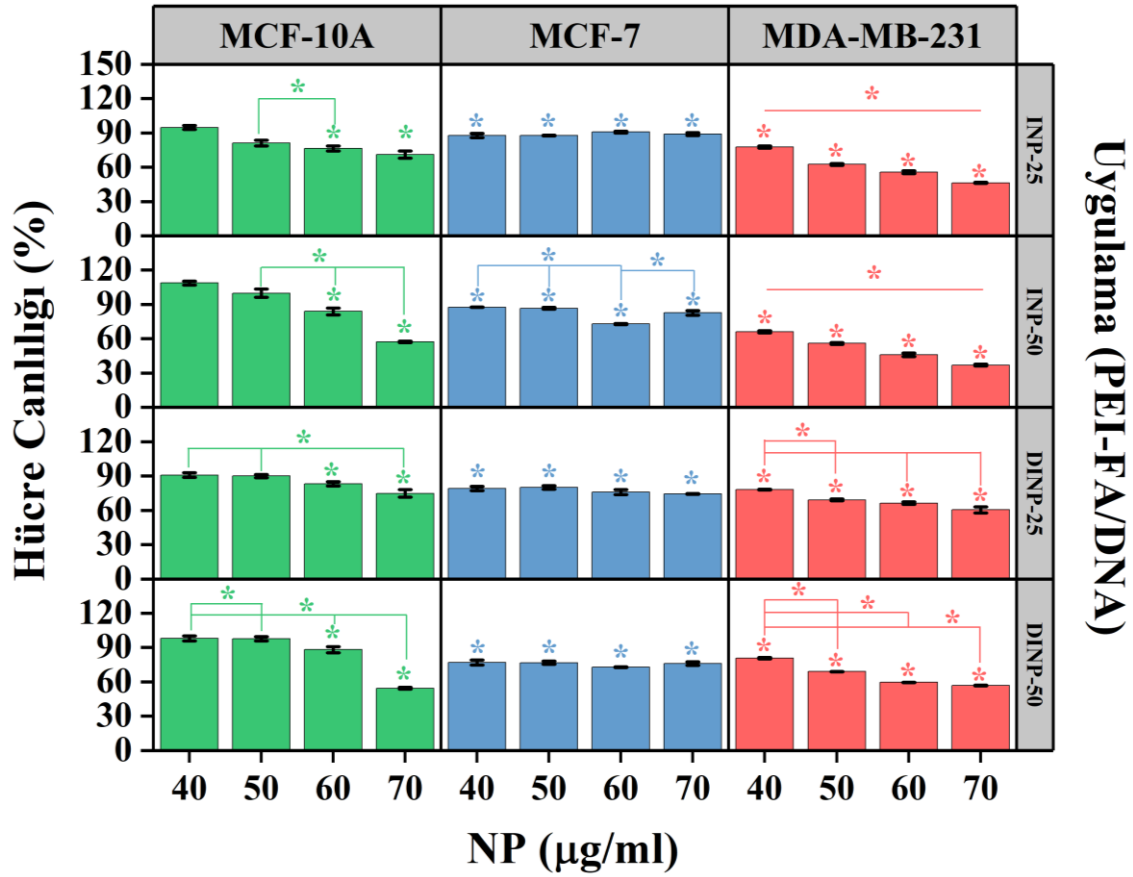
PEI-FA'nın ISD aktarımında doz bağımlı etkisi yine CCK-8 testi ile araştırıldı (Şekil 65). Bu adımda yüksek doz ISD uygulayabilmek adına PEI-FA/DNA oranı 20 olacak şekilde PEI-FA+DNA karışımları hazırlandı. 48 saat sonunda hücre canlılıkları incelendiğinde, PEI-FA+ISD uygulamasından en az etkilenen hücre hattının MCF-7 olduğu, MCF-10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde istatistiki açıdan önemli olmasa da doz bağımlı bir etki gözlemlendi. LyoVec+ISD uygulamasının tüm uygulamalardan anlamlı düzeyde farklı olduğu gözlemlendi.



Şekil 65. PEI-FA+ISD uygulanan hücrelerin, hücre canlılığı grafiği. *: $p < 0,05$
 ISD (5 μg), PEI-FA (100 μg) taşıyıcılığında hücrelere uygulandı. Kontrol olarak ISD (1 μg), LyoVec (100 μl) taşıyıcılığında (10 μl /kuyucuk) hücrelere uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra CKK-8 sitotoksikite ve proliferasyon testi yapıldı.

DINP uygulanmış MCF-10A hücre canlılığında, tüm uygulamalarda 60 ve 70 $\mu\text{g/ml}$ derişimlerde kontrole göre anlamlı bir düşüş kaydedildi ancak daha düşük derişimlerde kontrole göre fark önemsizdir (Şekil 66). Bunun yanında DOX içeren ve içermeyen gruplar karşılaştırıldığında MSNP'lerde DOX varlığı, hücre canlılığında anlamlı bir etki göstermedi. MCF-7 hücrelerinde tüm dozlarda hücre canlılığı, kontrole göre istatistiki açıdan anlamlı derecede değişmiştir ancak doz bağımlı bir etki gruplar arasında belirlenmedi. MSNP'lerin DOX içermesi, MCF-7 hücre canlılığında istatistiki açıdan önemli bir farka neden oldu. Örneğin 50 $\mu\text{g/ml}$ MSNP-NH₂ ve MSNP-DOX-NH₂ içeren karışımların PEI-FA/DNA oranı 50 olan uygulama dozları anlamlı derecede farklıdır. MSNP-NH₂ veya MSNP-DOX-NH₂ uygulanmış MCF-7 hücrelerinde, DOX'un etkisi PEI-FA/DNA oranı 25 olan gruplar arasında bariz olarak fark oluştururken (tüm konsantrasyonlarda) PEI-FA/DNA oranı 50 uygulamalarında DOX'un varlığı, düşük dozların aksine, yüksek konsantrasyonlarda (60 ve 70 $\mu\text{g/ml}$) anlamlı bir fark oluşturmadı. Öte yandan MDA-MB-231 hücre canlılıkları karşılaştırıldığında, yine tüm dozlarda hücre canlılığı, kontrole göre istatistiki açıdan anlamlı derecede değişti ve genel olarak gruplardaki uygulama dozları arasında doz bağımlı bir sitotoksik etki gözlemlendi.

Genel olarak hücrelerde 60 ve 70 µg/ml derişimler arasında fark gözlenmediği için ve MCF-10A hücrelerinin canlılığı göz önüne alınarak devam eden çalışmalarda 60 µg/ml derişiminin kullanımı uygun bulundu. PEI-FA/DNA oranı 25 ve 50 olan gruplar arasından da anlamlı bir fark gözlendi ve sonuçta çalışmanın devamında 50 oranının kullanımına karar verildi.



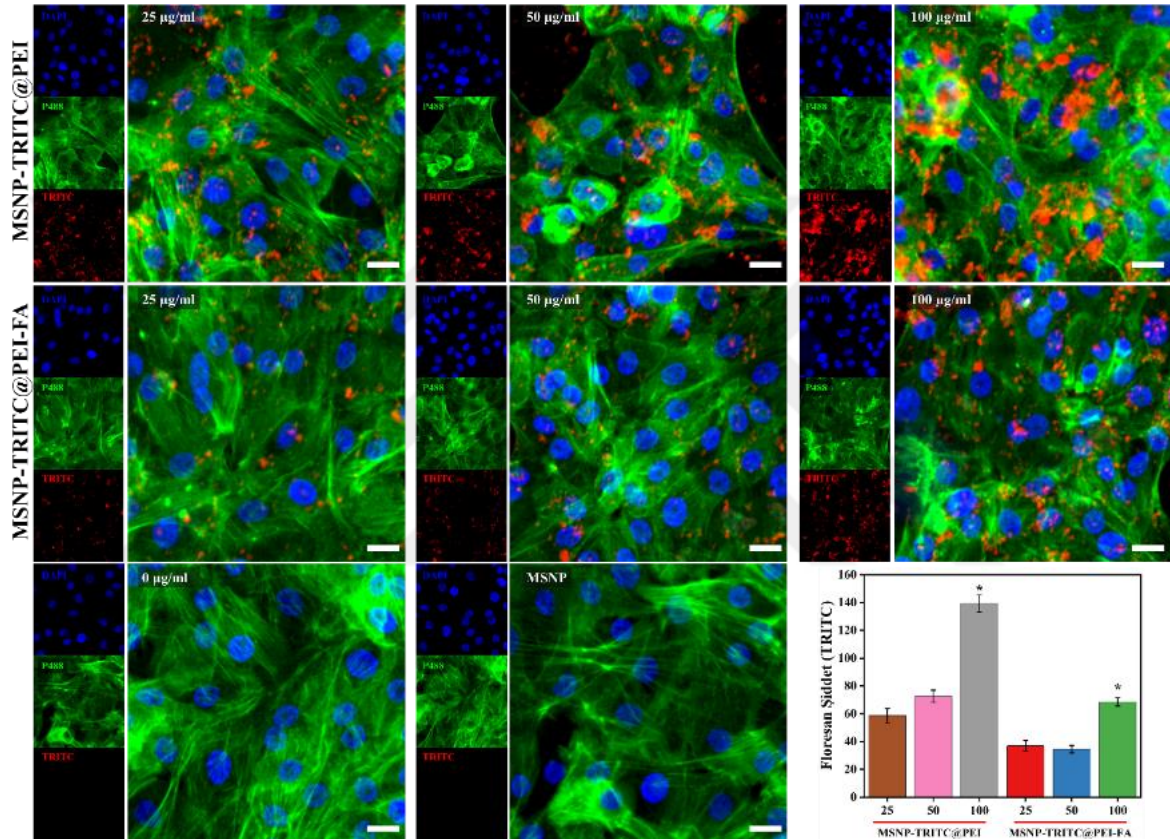
Şekil 66. DOX içeren ve içermeyen MSNP'ler ile hazırlanan DINP yapılarının uygulandığı hücrelerin hücre canlılığı grafiği.

ISD (1 µg), MSNP-NH₂ veya MSNP-DOX-NH₂ taşıyıcılığında (sırasıyla INP ve DINP) PEI-FA/DNA oranı 25 ve 50 olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra CKK-8 sitotoksikite ve proliferasyon testi yapılmıştır. *: p<0,05

Hücresel Alım

MSNP'lerin hücre içi takibini yapabilmek amacıyla üretilen MSNP-TRITC, hücrelere uygulandıktan sonra konfokal lazer taramalı mikroskop ile hücre görüntüleri alındı ve akış sitometri cihazı ile hücresel alım yüzdeleri belirlendi. Böylece MSNP'lerin hücresel alımı 3 hücre dizisi üzerinde çalışıldı. Öncelikle PEI veya PEI-FA ile modifiye edilmiş MSNP-TRITC uygulanan ve miknatis tutulmayan gruplar karşılaştırıldığında, muhtemelen PEI'nin yüksek pozitivitesinden dolayı, PEI ile kaplanmış olan MSNP-TRITC'lerin hücresel alımının fazla olduğu görüldü. Ancak bu alım seçici değildir ve her hücre hattında benzerdir.

MCF-10A hücrelerine ait konfokal resimlerinden, ImageJ ile ölçülen TRITC floresan şiddetleri incelendiğinde, en fazla MSNP-TRITC içeren grubun PEI ile kaplanmış muameleler olduğu gözlemlendi (Şekil 67). 25 µg/ml MSNP-TRITC@PEI ve MSNP-TRITC@PEI-FA uygulanmış gruplar arasında istatistiki önem arz eden fark belirlendi. 25 ve 50 µg/ml MSNP-TRITC@PEI uygulanmış hücrelerin TRITC sinyalleri arasında anlamlı fark gözlenmedi. Aynı şekilde 25 ve 50 µg/ml MSNP-TRITC@PEI-FA uygulanmış hücrelerin TRITC sinyalleri arasında anlamlı fark gözlenmedi. MCF-10A hücre iskelet yapısı incelendiğinde, yüksek dozlarda bile hücre morfolojisinde (yeşil renkli) bariz bir fark görülmemiştir.

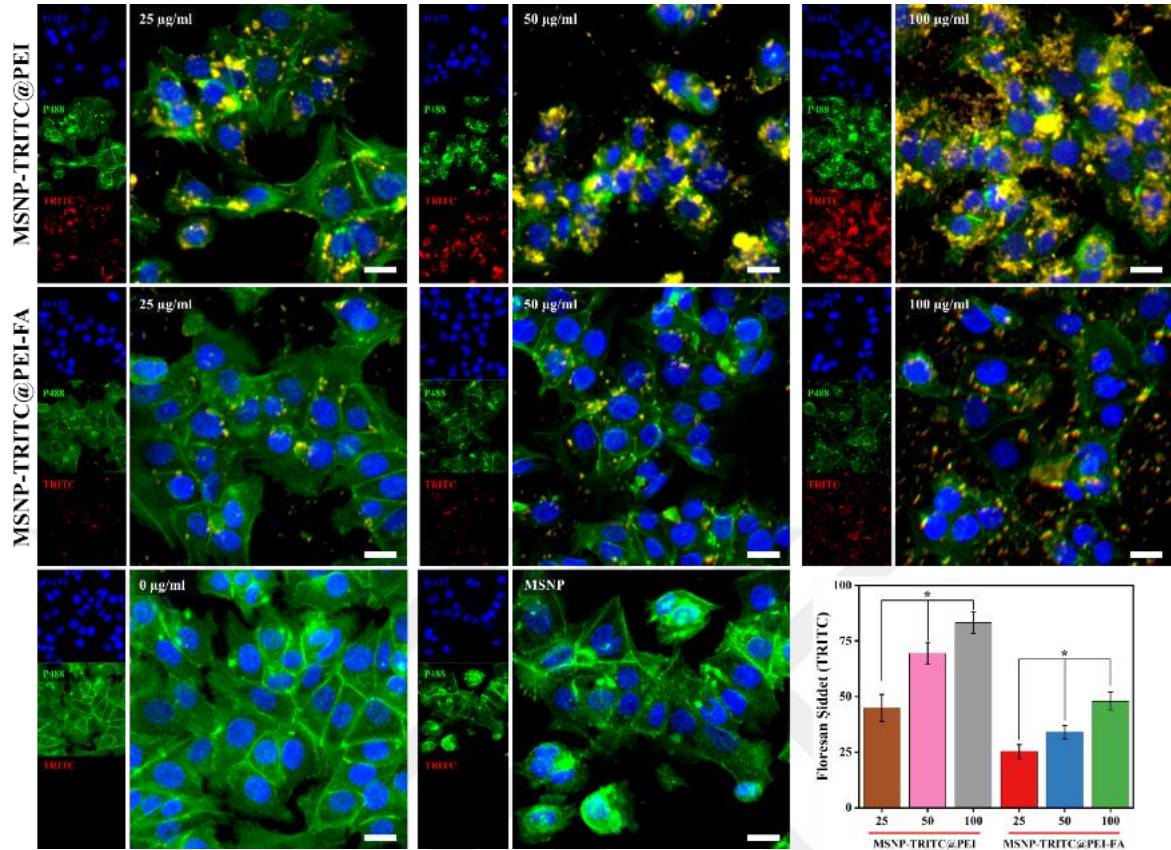


Şekil 67. MCF-10A hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri ve ImageJ ile ölçülen TRITC sinyal şiddetine ait grafik.

Uygulamadan sonra hücrelere miknatıs tutulmamıştır. Hücre iskeleti yeşil (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin), hücre çekirdeği mavi ve MSNP'ler kırmızı görünmektedir. Ölçek 20 µm'dir. Grafikte *: $p < 0,05$ ve derişim µg/ml'dir.

MCF-7 hücreleri incelendiğinde, 25 µg/ml derişimde PEI ve PEI-FA ile yapılan modifikasyon arasında istatistiki açıdan anlamlı fark gözlenmedi (Şekil 68). Hem PEI hem de PEI-FA ile yapılan modifikasyonların 50 ve 100 µg/ml MSNP derişimleri arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark gözlenmezken, 25 µg/ml uygulama dozlarının 50 ve 100 µg/ml MSNP derişimlerinden anlamlı bir farka sahip olduğu belirlendi. Artan dozlarda, MCF-7 hücre iskelet yapısının bozulduğu net olarak gözlenmiştir. MSNP-TRITC@PEI-FA'ya kıyasla MSNP-TRITC@PEI içeren gruplarda morfolojik derişim çok daha fazla iken, PEI ya da PEI-FA

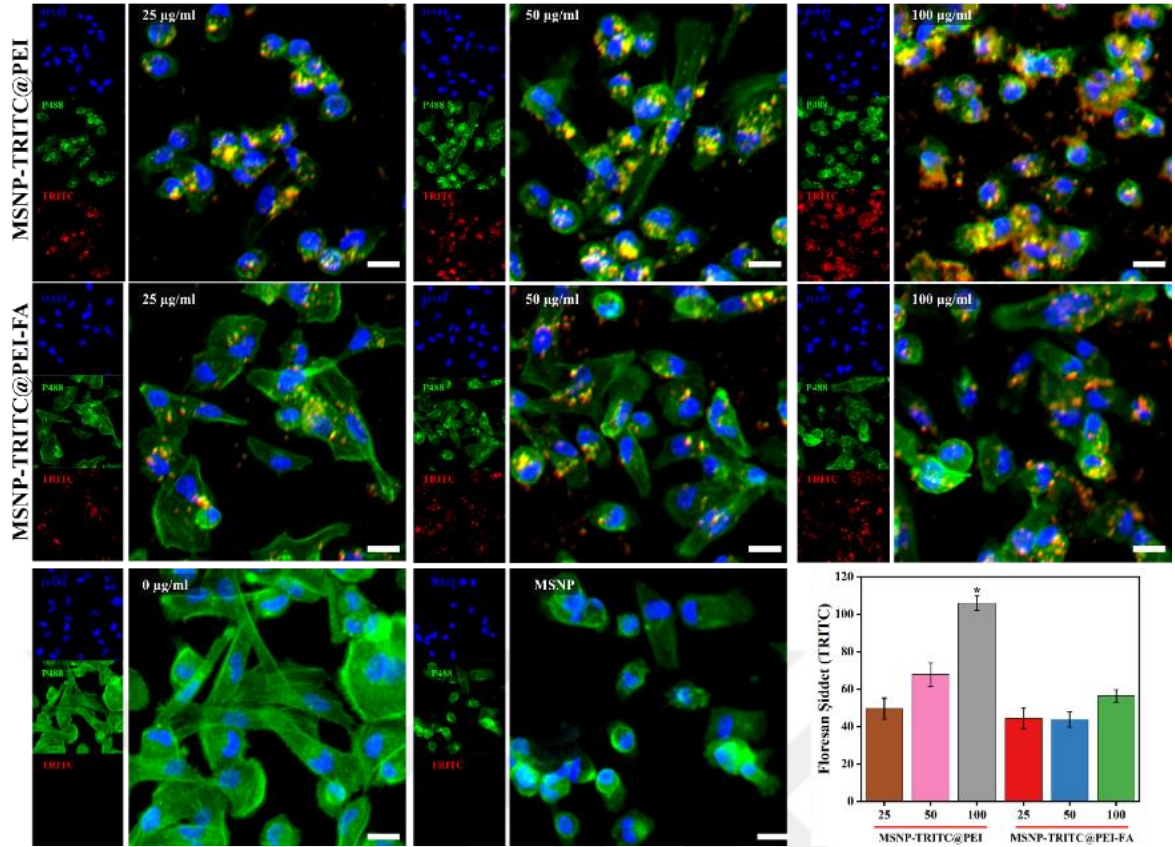
içermeyen MSNP (100 µg/ml) ile muamele edilen hücrelerde daha az bir morfolojik bozulma gözlenmiştir. Bu durum, polimer kaynaklı toksisiteyi işaret etmektedir.



Şekil 68. MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri ve ImageJ ile ölçülen TRITC sinyal şiddetine ait grafik.

Hücelere mıknaş tutulmamıştır. Hücre iskeleti yeşil (Alexa 488 Phalloidin), hücre çekirdeği mavi ve MSNP'ler kırmızı görünmektedir. Ölçek 20 µm'dir. Grafikte *: p<0,05 ve derişim µg/ml'dir.

MDA-MB-231 hücre hattında MSNP-TRITC@PEI-FA ile muamele edilmiş tüm dozlar istatistiki açıdan anlamlı bir fark belirlenmezken 25 µg/ml derişiminde MSNP-TRITC@PEI ile muamele edilmiş hücreler ile MSNP-TRITC@PEI-FA ile muamele edilmiş tüm dozlar arasında fark gözlendi (Şekil 69). Artan dozla doğru orantılı olarak, tüm gruplarda, TRITC sinyalinin arttığı ortaya kondu. MSNP-TRITC@PEI ile muamele edilmiş tüm gruplarda hücre iskelet yapısının bozulduğu ancak MSNP-TRITC@PEI-FA ile muamele edilmiş hücrelerde sadece 100 µg/ml derişimde morfolojik bozulma belirlendi. Benzer hücresel etki 100 µg/ml derişimde uygulanan MSNP@PEI-FA hücrelerinde de gözlendi.



Şekil 69. MDA-MB-231 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri ve ImageJ ile ölçülen TRITC sinyal şiddetine ait grafik.

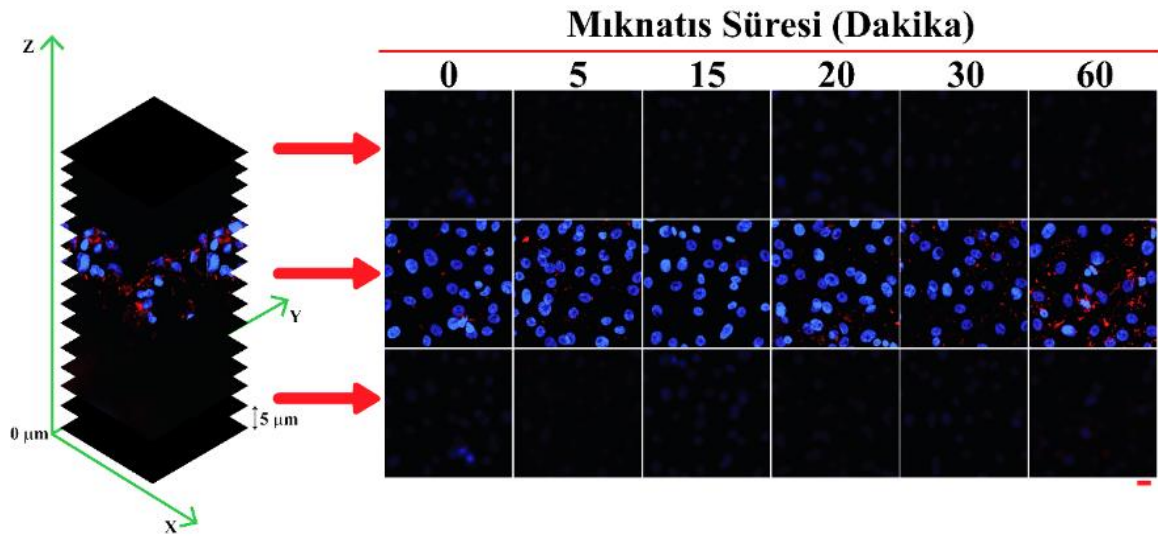
Hücelere mıkınatıs tutulmamıştır. Hücre iskeleti yeşil (Alexa 488 Phalloidin), hücre çekirdeği mavi ve MSNP'ler kırmızı görünmektedir. Ölçek 20 µm'dir. Grafikte *: $p < 0,05$ ve derişim µg/ml'dir.

Genel olarak her üç hücre hattında, çekirdek anomalisi gözlenmedi. Bu durum hücre alım deneyleri için kâfi olan inkübasyon süresinin, çekirdek anomalisi gözlemleyecek kadar uzun olmayışından kaynaklanıyor olabilir. Sonuç olarak PEI yapısına katılan FA, MSNP'nin hücre alımını (PEI'ye kıyasla) azaltmaktadır ancak tüm hücrelerde polimer kaynaklı morfolojik bozulmaya karşı hücreyi korumaktadır. Ayrıca FA sayesinde hücre alım, MCF-10A hücrelerinin daha az MSNP'ye maruz kalmasını sağlamaktadır. Bu farkın daha iyi gözlenmesi için mıkınatıs üzerinde inkübe edilen hücre serileri incelendi (Şekil 70, Şekil 71 ve Şekil 72). MCF-7 hücrelerinin daha az FA reseptörü içerdiği bilindiğinden (Jhaveri et al., 2004), bu durum MDA-MB-231 hücrelerine göre MCF-7 hücrelerinin daha az MSNP-TRITC@PEI-FA alımının izahı olabilir.

Öncelikle MSNP-TRITC@PEI-FA ile muamele edilmiş hücreler, farklı sürelerde mıkınatıs üzerinde inkübe edildi. TRITC sinyalinin hücre yüzeyinden mi yoksa hücre içinden mi geldiğini net olarak ortaya koymak ve sadece hücre içindeki MSNP'lerin miktarını karşılaştırabilmek adına, hücre ekili camlarda seçilen bölgeler, 3D tarama yoluyla görüntülendi. Lazer taramalı konfokal mikroskobun odağı, seçili alanlarda Z-ekseni boyunca 5 µm adımlarla

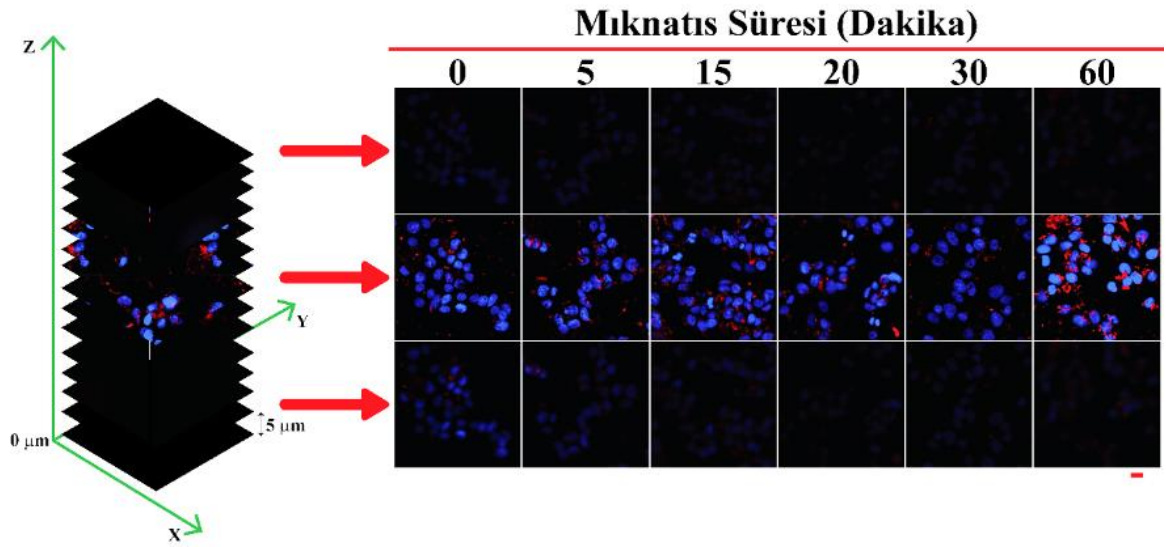
değiştirilerek görüntü alındı. Bu sayede, hücre çekirdeği katmanında alınan TRITC sinyalinin hücre içine ulaşan MSNP'lerden geldiği kesin olarak ortaya kondu (Şekil 70, Şekil 71 ve Şekil 72).

MCF-10A hücrelerine mıknatıs süresi arttıkça, hücre için TRITC sinyalinin arttığı ortaya kondu (Şekil 70). Mıknatıs tutulmayan grupta, mavi ve kırmızı renklerin aynı katmanda belirginleşmesi, MSNP'lerin hücre içinde olduğunu ama mavi ve kırmızı renklerin birbirinden uzak olmaları, MSNP'lerin sitoplazmada yer aldıklarını işaret etmektedir. Mıknatıs süresi arttıkça kırmızı sinyalin hücre çekirdeğine ait mavi renkli alana yaklaşması, MSNP'lerin sitoplazmadan çekirdeğe doğru ilerlediğini göstermektedir.



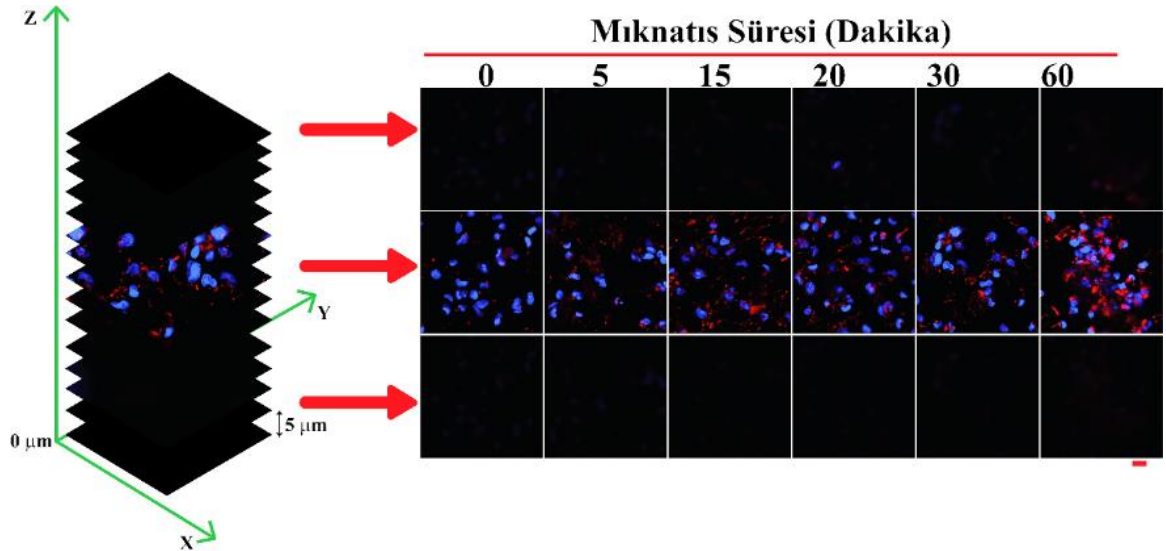
Şekil 70. MCF-10A hücrelerinin farklı sürede mıknatıs üzerinde inkübasyonuna ait görüntüsü. Lazer taramalı konfokal mikroskobu Z-ekseni boyunca 5 μm aralıklı olarak odağını değiştirerek alan taraması yapıldı. Görüntüde, hücre çekirdeği (merkez), hücrenin alt ve üstüne doğru odağın kaydığı üç kare sunuldu. Hücre çekirdeği mavi, MSNP'ler ise kırmızı görünmektedir. Ölçek 20 μm 'dir.

MCF-7 hücrelerinde, MCF-10A'ya göre daha kısa mıknatıslı inkübasyon süresi sonunda (5 dakika) TRITC sinyalinin çekirdek çevresinde olduğu gözlemlendi (Şekil 71). Bu durum MCF-7'de hücresel alımın MCF-10A'dan daha iyi olduğuna dair bir işarettir. Mıknatıs süresi arttıkça, MCF-10A'ya benzer şekilde MCF-7 hücrelerinde de TRITC sinyali artmaktadır.



Şekil 71. MCF-7 hücrelerinin farklı sürede mıknatıs üzerinde inkübasyonuna ait görüntüsü. Lazer taramalı konfokal mikroskobu Z-ekseni boyunca 5 μm aralıklı olarak odağını değiştirerek alan taraması yapıldı. Görüntüde, hücre çekirdeği (merkez), hücrenin alt ve üstüne doğru odağın kaydığı üç kare sunuldu. Hücre çekirdeği mavi, MSNP'ler ise kırmızı görünmektedir. Ölçek 20 μm 'dir.

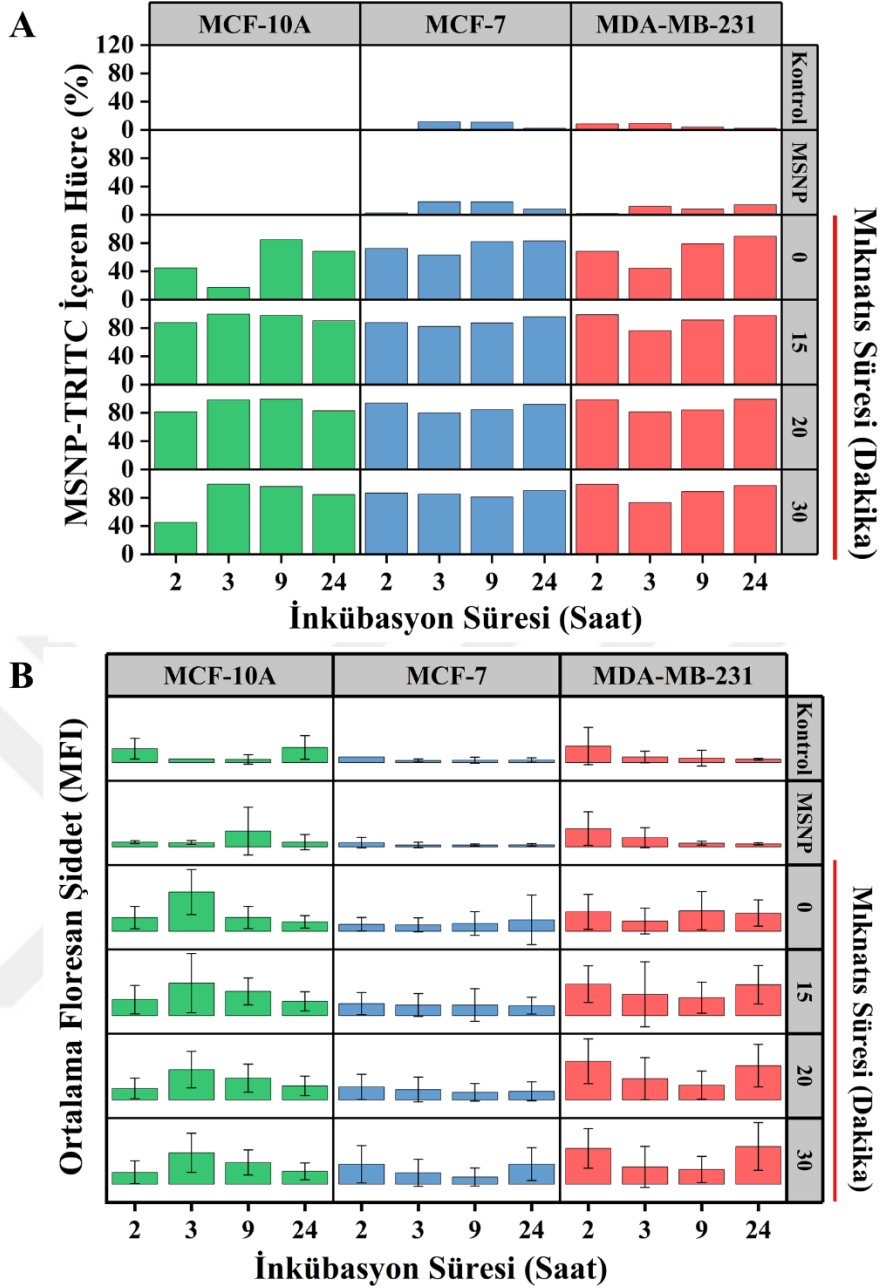
En fazla MSNP birikimi MDA-MB-231 hücre hattında gözlemlendi (Şekil 72). Bu durum MDA-MB-231 hücre hattının, FA reseptörünü yüksek seviyede eksprese etmesinden kaynaklanıyor olabilir (Parker et al., 2005; Soleymani et al., 2018; Yang et al., 2014; Zhou et al., 2016). 60 dakikalık mıknatıs üzerindeki inkübasyonun, MNSP agregasyonuna neden olduğu belirlendi.



Şekil 72. MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sürede mıknatıs üzerinde inkübasyonuna ait görüntüsü. Lazer taramalı konfokal mikroskobu Z-ekseni boyunca 5 μm aralıklı olarak odağını değiştirerek alan taraması yapıldı. Görüntüde, hücre çekirdeği (merkez), hücrenin alt ve üstüne doğru odağın kaydığı üç kare sunuldu. Hücre çekirdeği mavi, MSNP'ler ise kırmızı görünmektedir. Ölçek 20 μm 'dir.

Sonuç olarak her üç hücre hattında, mıknatıs uygulanan gruplar ile mıknatıs uygulanmayan hücrelere ait fotoğraflar karşılaştırıldığında, mıknatıs varlığında MSNP-TRITC@PEI-FA'nın çekirdek etrafında kümелendiği görülmektedir. Mıknatıs tutulmayan gruplarda ise MSNP-TRITC@PEI-FA sinyali, genel olarak hücre sitoplazmasına dağılmış olarak gözlemlendi. Son olarak hem DAPI hem de TRITC sinyalinin aynı noktadan gelmesi, görüntü kaydedilirken hücre yüzeyine odaklanılmadığını ve dolayısıyla MSNP'lerin hücre içine girdiğini kanıtlamaktadır. Eğer MSNP'ler hücre yüzeyinde kalıp hücre içine girmeseydi, 3D tarama yapıldığında çekirdekten gelen mavi renk ve MSNP'yi işaretlemek için kullandığımız TRITC sinyalleri, hücrenin farklı katmanlarında yoğunlaşırdı.

Hücre için MSNP miktarının maksimum olduğu ve MHT uygulamasına başlanacak süreyi belirlemek ve mıknatıs süresinin kalitatif analizini yapmak üzere hücreler MSNP-TRITC@PEI-FA ile farklı sürelerde mıknatıs üzerinde tutuldu ve 2-48 saat aralığında örnekler toplanarak akış sitometri cihazında okundu. Akış sitometri analizindeki kapılama işlemi için TRITC içermeyen MSNP-NH₂ ile (20 dakika mıknatıs) muamele edilmiş gruplar kullanıldı. Akış sitometri sonuçları mıknatıs tutulması halinde hücre içi MSNP miktarının arttığını ancak 15, 20 ve 30 dakika uygulama arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymaktadır (Şekil 73). Bu şartlar altında 15 dakika mıknatıs ve 2 saat inkübasyon süresinin MHT uygulamasına başlamak için yeterli olacağı sonucuna varıldı.



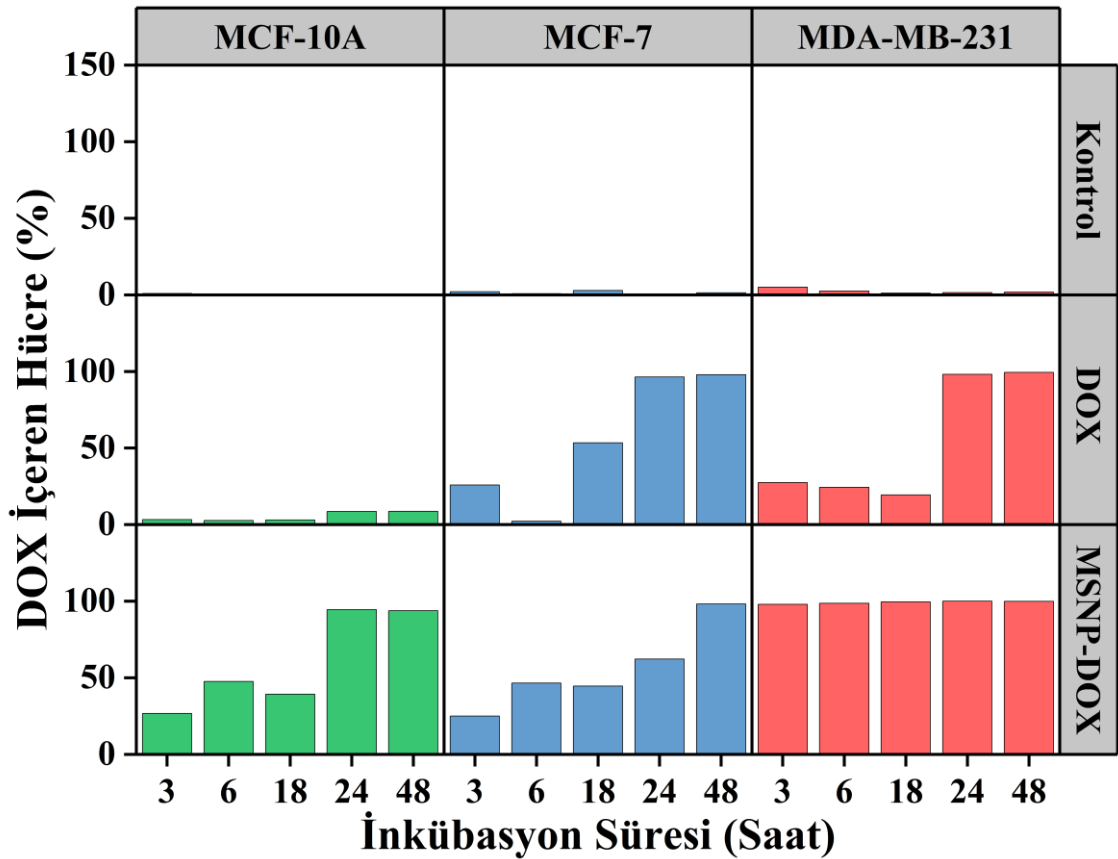
Şekil 73. Hücre içi MSNP-TRITC@PEI-FA miktarının zaman bağımlı akış sitometri sonucu. A. hücre yüzdesi ve B. Ortalama floresan şiddet (MFI, Mean Fluorescence Intensity).

Bu veriler (konfokal ve akış sitometri verileri) MSNP'lerin hızlı ve güçlü hücre alımını açıkça doğrulayarak, tümör hücrelerini öldürmek için manyetik hipertermi tedavisinde rahatlıkla kullanılabilir olduklarına kanıt sağlar. Mıknatıs tutulmayan gruplar dikkate alındığında MCF-10A hücre hattında hücre alımın diğer iki hücreye göre düşük olduğu görülmektedir. Literatürde, meme kanseri hücre hatlarının yüksek seviyede FA reseptörü (*ahFR*) ürettiği ancak normal hücre hatlarında bu proteinin daha düşük miktarda üretildiği bilinmektedir (Jhaveri et al., 2004; Ross et al., 1994). FA ile modifiye edilmiş nanomateryallerin kullanıldığı çalışmalarda, FA reseptörünü fazla üreten üçlü negatif hücre hattı olan MDA-MB-231'de tedavi etkinliğinin daha iyi olduğu bildirilmektedir (Mahalunkar

et al., 2019). Bu bilgiler, çalışmamızda gözlemlediğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde kaydedilen daha fazla MSNP-TRIC sinyalinin nedenini açıklamaktadır.

Hücre İçi DOX Salımı

MSNP-DOX-NH₂'nin hücre içinde DOX salımına izin verip vermediği akış sitometri yöntemi ile test edildi. Doğrudan DOX uygulaması yapılan hücrelerde en düşük ilaç içeren hücre yüzdesi MCF-10A'de gözlemlendi (Şekil 74). MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, genel olarak inkübasyon süresi ile DOX içeren hücre yüzdesinin doğru orantılı olarak arttığı belirlendi. MSNP-DOX-NH₂ uygulanmış hücrelerde. 3 saat sonunda DOX+ hücre yüzdesi MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 için sırasıyla %26,74, %24,98 ve %97,95 olarak kaydedildi. Bu sonuçlar, yapının kısa sürede hücre içine ulaştığının ve hücre içinde DOX salımının gerçekleştiğinin göstergesidir.



Şekil 74. Hücre içi DOX salımına ait akış sitometri sonuçları.

Kontrol (Muamele yapılmamış hücreler), DOX uygulanan hücreler (0,5 μ M) ve DOX yüklü MSNP (50 μ g/ml) uygulanan hücreler belirli saatlerde toplanarak akış sitometri cihazı ile DOX içeren hücre yüzdesi belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde düşük p-glikoprotein varlığı nedeniyle DOX alımının düşük olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (Gao et al., 2014). DOX'un hücre alımlarına ait bir başka çalışmada MCF-10A'nın daha az DOX aldığı belirtilmektedir (S. Li et al., 2018).

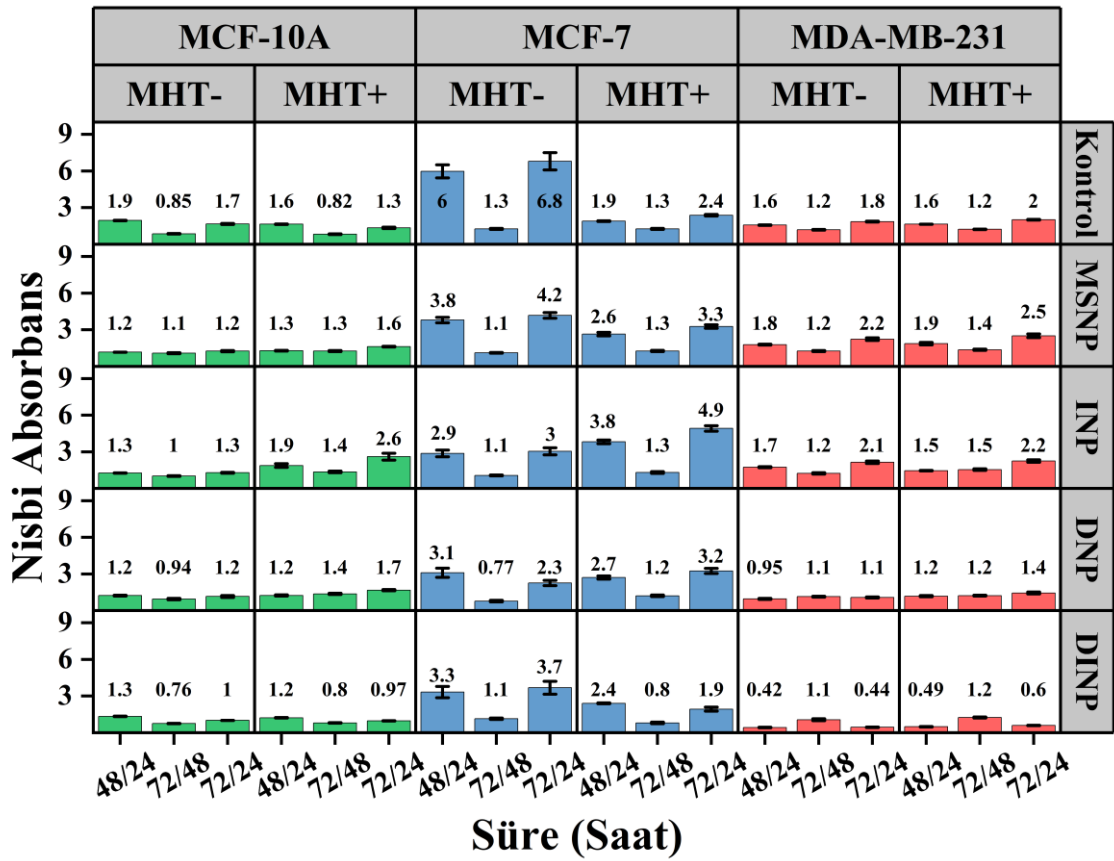
Manyetik Hipertermi ve Çoklu Terapi Uygulaması

Hücrelerin proliferasyon özelliklerini incelemek üzere, uygulama yapılan hücreler, 96 kuyucuklu kültür kaplarına eşit sayıda ekildi ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda hücrelere CCK-8 testi yapıldı. Bu süreçte 24. saatteki absorbands değerleri başlangıç kabul edilerek her bir uygulamanın 48 ve 72 saatte ölçülen absorbands değeri 24. saat verilerine oranlandı. Ayrıca 72. saatteki absorbands değeri 48 saatlik sonuçlar ile de oranlandı (Şekil 75).

MCF-10A hücre hattında 48 saatlik absorbands değerlerinin 24 saatlik absorbandslara oranlandığında (48/24), genel olarak gruplar arasında fark gözlenmedi. 72/48'de MHT uygulanmayan gruplar arasında fark yok iken MHT+ gruplarının MHT- gruplarından anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlendi. Bu sürelerde DNP ve DNP+MHT arasında fark yoktur. 72/24 değerlerinde de yine gruplardaki absorbands değişiminin birbirlerinden farklı olmadığı gözlemlendi. İlginç bir şekilde 72/24'te sadece DNP+MHT uygulanan grubun diğer tüm gruplardan ayrıldığı ve proliferasyonun arttığı gözlemlendi. Sonuç olarak genel bir değerlendirmede bulunulduğunda hem belirlenen derişimlerde uygulanan materyallerin hem de MHT'nin MCF-10A hücrelerinin absorbands değişimine etkisi sınırlıdır.

MCF-7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonundaki absorbands değerleri 24 saatlik değerlere oranlandığında (48/24) tüm gruplar kontrole göre anlamlı düzeyde farklıdır (Şekil 75). Bu sürede kontrol grubundaki hücre sayısı 6 kat arttı. Aynı sürede DNP ve DNP+MHT uygulamalarında kat artışı 3,3 ve 2,4 olduğu gözlemlendi. Genel olarak tüm sürelerde MHT+ uygulama gruplarının MHT- uygulamalarına göre absorbands değişimi daha düşüktür. 72/48 oranlarında DNP ve DNP+MHT uygulama grupları dışındaki grupların birbirinden farklı olmadığı belirlendi. 72/24'te DNP ve DNP+MHT uygulamalarındaki absorbands değişimi 3,7 ve 1,9 kattır. Sonuç olarak MCF-7 hücre hattında, MHT+ uygulanması halinde kanser hücre sayısının artışı, kontrole göre düşüktür. ISD'nin sitotoksik ve proliferatif etkisi ise gözlenmemiştir.

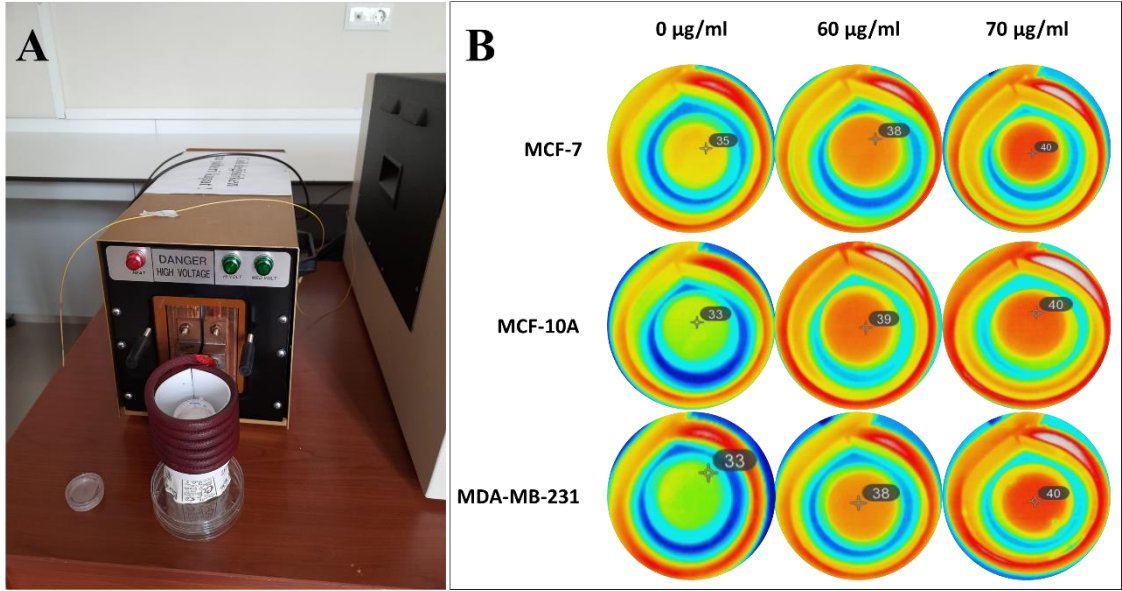
En fazla etkinin gözlemlendiği MDA-MB-231 hücrelerinde MHT uygulamasının (MHT+) genel olarak hücre sayısını etkilemediği gözlemlendi (Şekil 75). Örneğin; tüm gruplardan daha düşük absorbands değişimi gözlenen 48/24'te DNP ve DNP+MHT uygulamalarının arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Sadece, DNP ve DNP+MHT uygulamalarının hem birbirlerinden hem de tüm gruplardan farklı olduğu belirlendi. Sonuç olarak ISD varlığının ve MHT uygulamasının MDA-MB-231 hücre hattı hücre sayısında bir fark oluşturmadığı belirlendi.



Şekil 75. Çoklu terapi uygulanmış hücrelerin CCK-8 testi ile elde edilen absorbans değerlerinin karşılaştırmasına ait grafik.

Uygulamalarda 60 µg/ml MSNP, 1 µg ISD ve 50 µg PEI-FA olacak şekilde materyal kullanıldı. İlgili gruplara 2 saat AC manyetik alan uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik okuma kaplarına ait kuyular aynı tüplerden eşit sayıda hücre ekimi yapıldı. Kuyulara CCK-8 içeren medyum ilavesinden 2,5 saat sonra örneklerin absorbans değerleri bir plaka okuyucu ile kaydedildi.

Genel olarak her hücrede 48 saatten 72 saate kadar geçen sürede absorbans değerlerinde anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi. Bu nedenle çalışmanın devamında her uygulama için 48 saatlik inkübasyonun yeterli olduğu kanısına varıldı. Termal kamera ile kaydedilen görüntülerde (Şekil 76), 60 ve 70 µg/ml derişimde uygulanan MSNP-NH₂'lerin 2 saat sonunda 38-40 °C'lere eriştiği anlaşılmaktadır. MHT cihazının helezonunun ısınmasına rağmen, helezon ve kültür kapları arasındaki boşluğun ısınmamış olması (mavi renkli) ve kontrol gruplarında (33 °C) sıcaklığın yükselmemesi, kültür kaplarındaki sıcaklık artışının MSNP-NH₂'lerden kaynaklandığını kanıtlamaktadır.

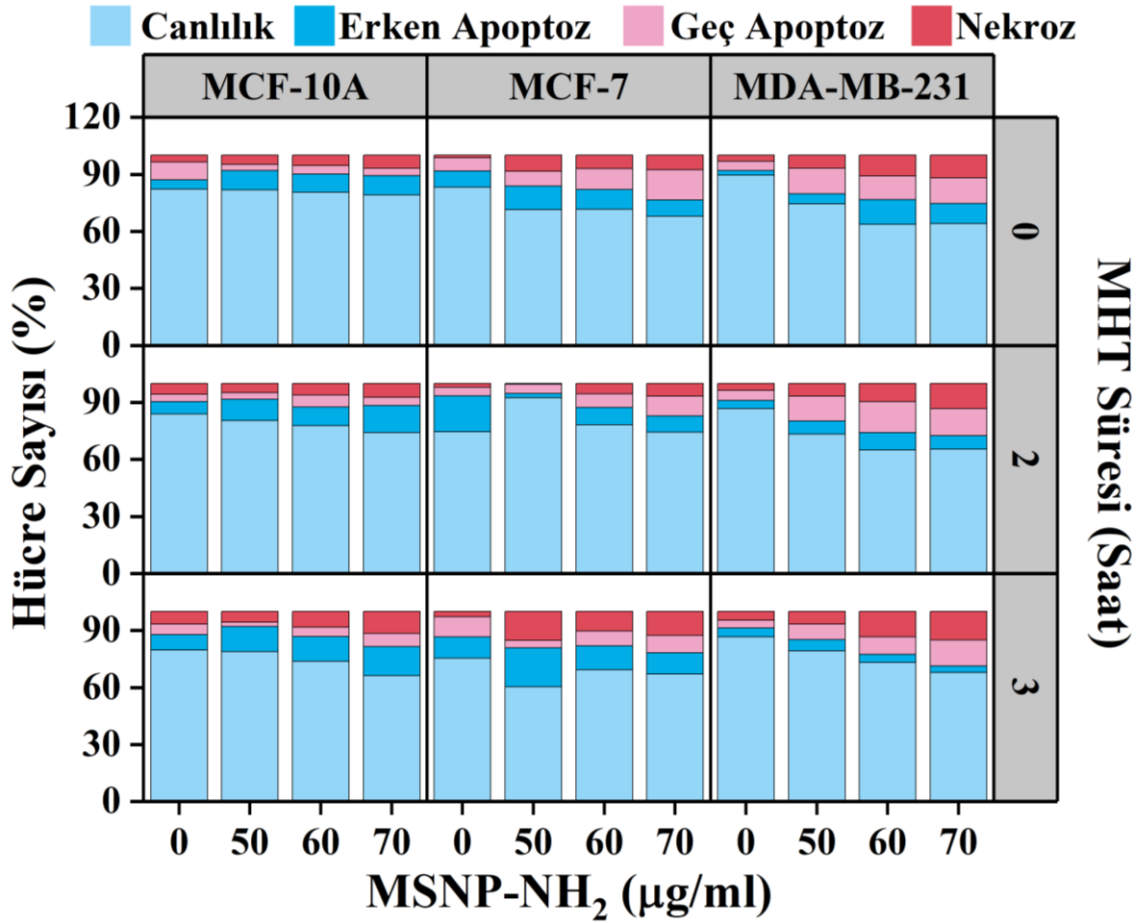


Şekil 76. AC manyetik alan uygulamasına ait fotoğraf.

A. AC manyetik alan uygulama cihazı ve B. AC manyetik alan altında tutulan (2 saat) hücrelere ait termal kamera görüntüsü. Ölçek °C'dir.

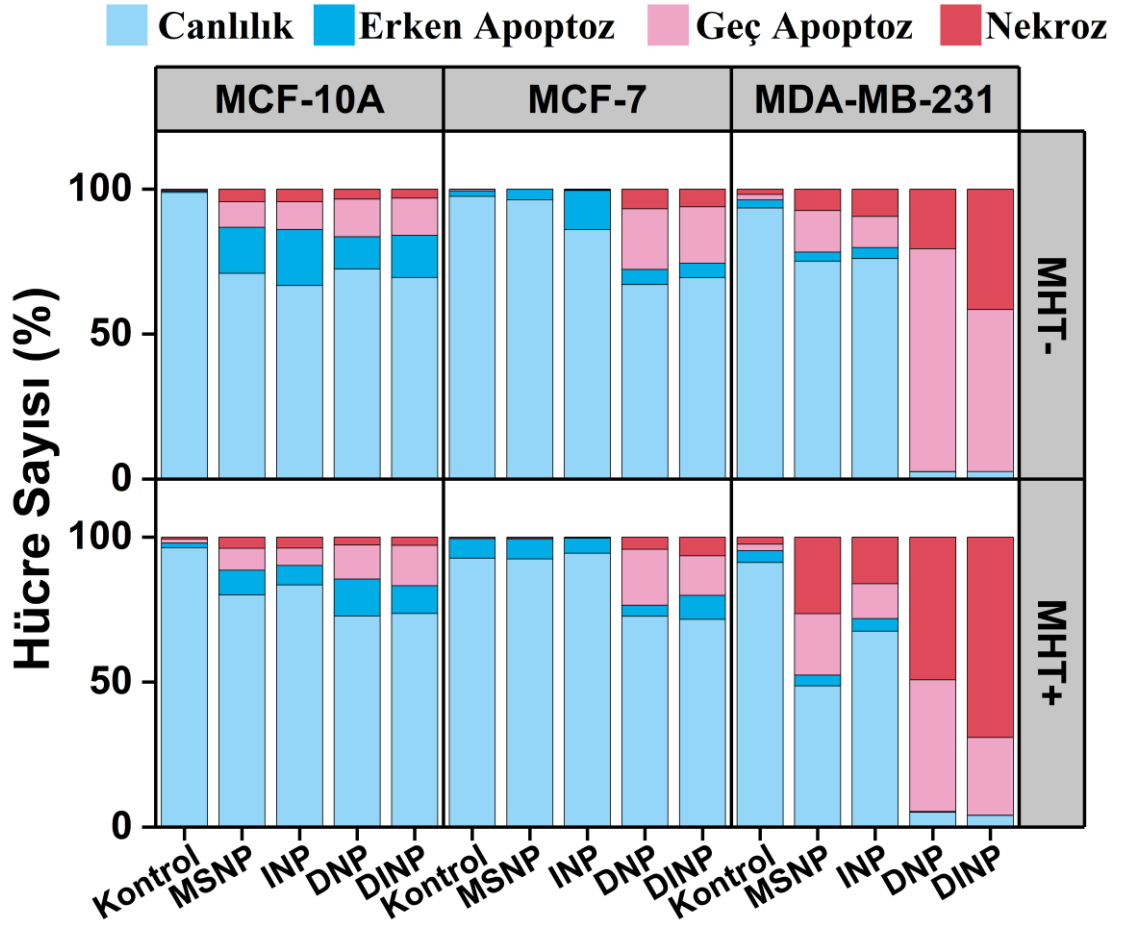
Apoptotik İndeks

Elde edilen MSNP'lerin AC manyetik alan altında hücreler üzerindeki apoptotik etkileri araştırıldı. Proliferasyon ve sitotoksosite sonuçlarına dayanarak apoptozis testi sadece 48 saatlik inkübasyon sonrasında uygulandı. AC manyetik alan uygulanmayan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığının yüksek olduğu AC manyetik alan altında tutulma süresi ve uygulanan MSNP-NH₂ dozu arttıkça hücre canlılığının düştüğü gözlemlendi (Şekil 77). AC manyetik alan süresi ve MSNP-NH₂ dozunun hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkisi MDA-MB-231 hücrelerinde daha net bir şekilde gözlemlendi. Genel olarak AC manyetik alana maruziyet süresinin artması ile nekrotik, yani PI ile boyanmış, hücre yüzdesinin arttığı belirlendi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, MCF-10A hücre canlılığı yüzde oranı göz önüne alınarak, çoklu terapi aşamasında, 2 saat AC manyetik alan uygulanmasına ve 60 µg/ml MSNP-NH₂ derişiminin kullanılmasına karar verildi.



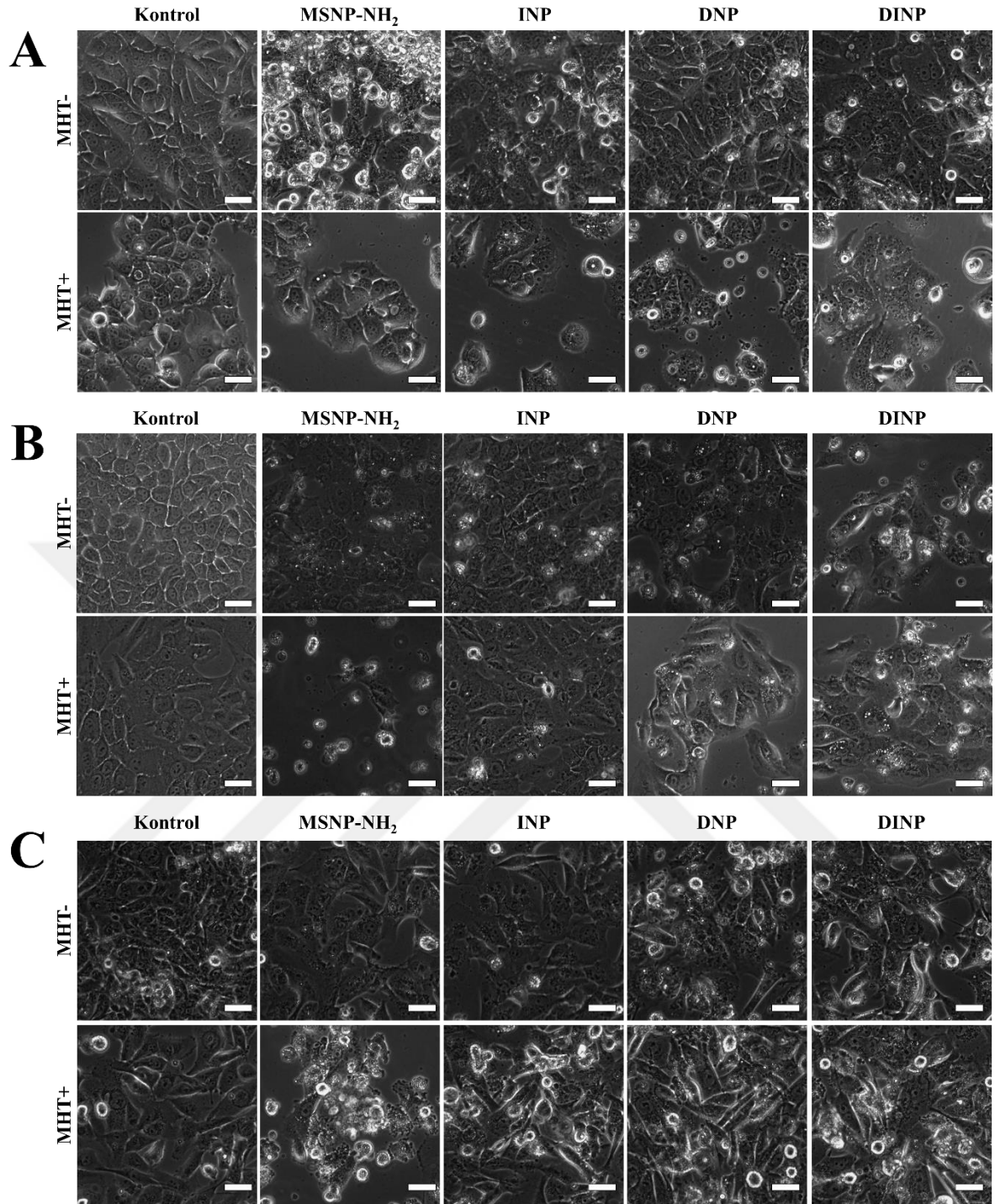
Şekil 77. MSNP-NH₂ uygulanmış hücrelerin AC manyetik alan altında 2 saat tutulduktan 48 saat sonra apoptozis testine ait akış sitometri sonuçları. Annexin-V-FITC ve PI ile işaretlenmiş hücreler en az 10.000 event kaydedilerek hücre yüzdeleri belirlendi.

Çoklu terapi uygulanan hücrelerde en fazla yıkıcı etki MDA-MB-231 hücre hattında belirlendi (Şekil 78). Özellikle DOX içeren ve MHT'ye maruz bırakılan gruplarda hücre canlılığının %10 ve daha az olduğu kaydedildi. Genel olarak DOX ve MHT varlığının hücre popülasyonunu geç apoptoza doğru kaydırmaktadır. MHT uygulanmayan gruplarda DINP'ın apoptotik yüzdeleri MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 için sırasıyla %14,55, %4,95 ve %0 iken MHT uygulandığında bu değerler %9,6, %8,28 ve %0,4 olarak değişmiştir. Buna karşın PI ile boyanan, yani nekrotik ölüm şeklinde değerlendirilen yüzdeler ise MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 için sırasıyla %12,79, %19,47 ve %78,73 iken MHT uygulandığında bu değerler %13,86, %13,62 ve %47,07 olarak değişmiştir. Bu değerlere göre kanser hücrelerinde apoptotik yüzde MHT uygulaması ile bir miktar artmaktadır. Böylece kanser hücre yoğunluğunun daha çok nekrotik alanda kaydığını ortaya konmaktadır. MSNP-DOX ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdesinin arttığına dair bilgilere rastlanmaktadır (Bhavsar et al., 2020).



Şekil 78. Çoklu terapi uygulanmış hücrelerin AC manyetik alan altında 2 saat tutulduktan 48 saat sonra apoptozis testine ait akış sitometri sonuçları. Annexin-V-FITC ve PI ile muamele edilmiş hücrelerde en az 10.000 event kaydedildi.

Uygulama yapılan hücrelerin morfoloji incelemesinde (Şekil 79), MHT uygulamasının hücre sayısında hissedilebilir azalma ve bunun yanında hücrelerde vakoul olduğu gözlemlendi.



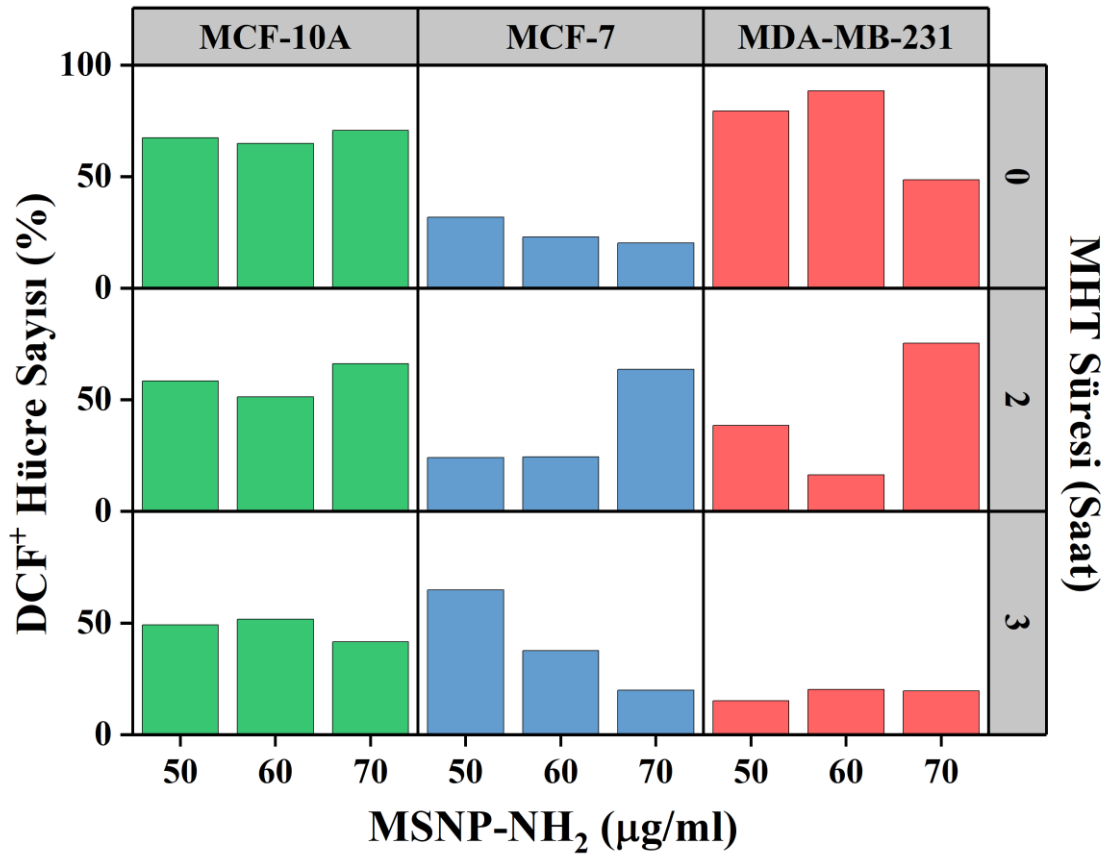
Şekil 79. Uygulama yapılmış hücelere ait mikroskop görüntüleri. A. MCF-10A, B. MCF-7 ve C. MDA-MB-231. Ölçek 20 µm'dir.

Oksidatif Stres Durumu

Apoptosis verilerinin ardından MHT uygulamasının hücre içi oksidatif stres parametrelerine etkisine bakıldı (Şekil 80). Oksidatif stres, oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan, hücre için olağan dışı bir durumdur. Geçirgen 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFDA, H₂DCFDA, DCFH-DA ve DCFH olarak da bilinir) adlı reaktifin canlı hücelere uygulanması prensibine dayalı bir test yöntemi ile reaktif oksijen

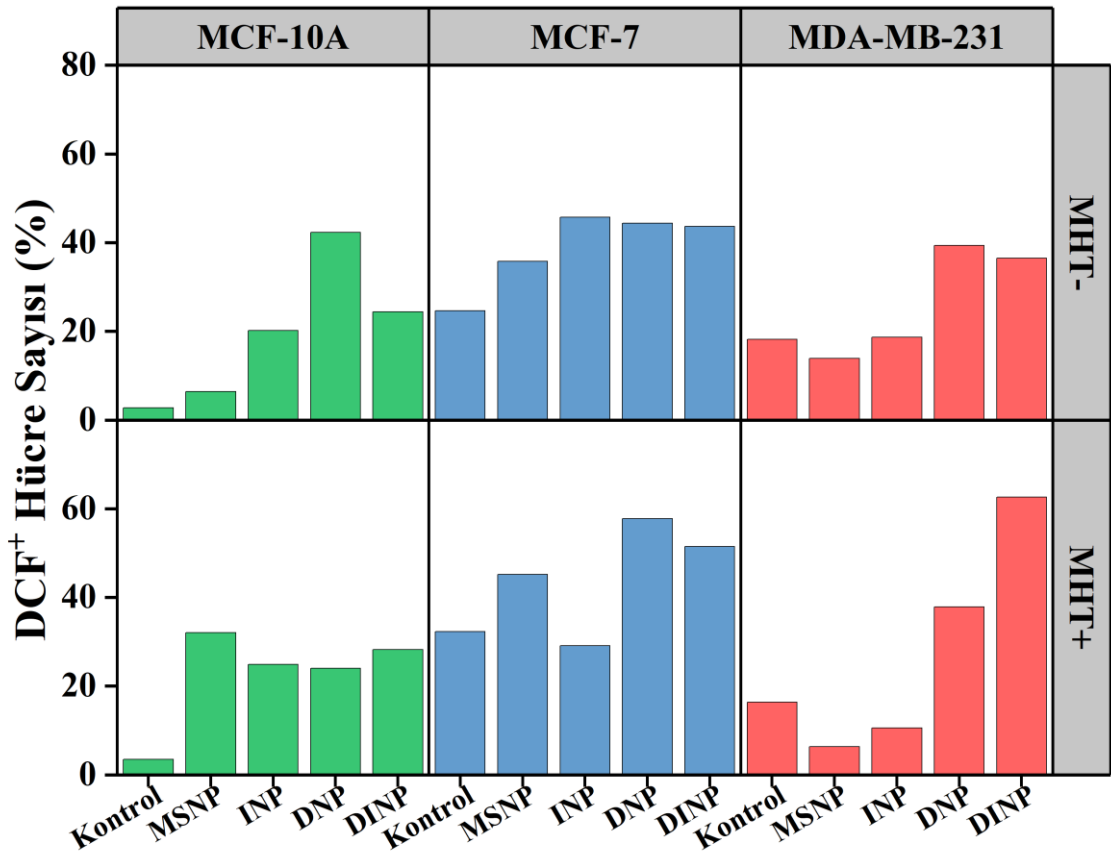
türlerini nicel olarak değerlendirmek mümkündür. Bu bileşik hücreye girdikten sonra, hücresel esterazlar tarafından deasetile edilir ve floresan olmayan bir bileşik haline dönüşür. Bu floresan olmayan bileşik ise daha sonra hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oksitlenerek yüksek floresanlı 2',7'-diklorofloresin (DCF) üretilir. DCF'nin floresans şiddeti akış sitometri cihazlarında FITC kanalı ile tespit edilir. Çalışmamız kapsamında uygulamalar sonucunda MCF-10A hücrelerinde yüksek oksidatif stres varlığı belirlendi. Her iki kanser hattında da MHT süresi arttıkça DCF sinyalinin alındığı hücre yüzdesinin azaldığı belirlendi. Buna karşın en yüksek MSNP-NH₂ derişimi uygulanan hücrelerde, beklendiği üzere, daha yüksek oksidatif stres tespit edildi.

Kanser hücre gelişiminde, hücre için ROS miktarının artışı proliferasyonu indüklemektedir (Klaunig & Kamendulis, 2004). Meme kanseri hücrelerinin östrojen reseptörü içerip içermemesine göre oksidatif strese karşı geliştirdikleri tepki ve hücre içi antioksidan enzim miktarları değişmektedir (Mobley & Brueggemeier, 2004). Östrojen reseptörlerini yapılarında yer alan sistein rezidüsü ROS varlığından etkilenmektedir (Okoh et al., 2011). Bu nedenle, bir ajan ile artırılmış hücre içi ROS miktarı yoluyla tasarlanacak tedavi yaklaşımı, kanser hücrelerinin ER içerip içermemesinden doğrudan etkilenmektedir. 42 °C'de 1 saat inkübe edilen MCF-7 ve MDA-MB-453 hücrelerinde ROS düzeyi araştırılmış ve bu uygulama neticesinde MDA-MB-453 hücrelerinde daha fazla ROS oluştuğu belirtilmiştir (Terasaki et al., 2020).



Şekil 80. MSNP-NH₂ uygulanmış hücrelerin AC manyetik alan altında belirli süre tutulduktan 48 saat sonra oksidatif stres durumuna ait akış sitometri sonuçları. FITC kanalında okuma yapıp, az 10.000 event kaydedilerek hücre yüzdeleri belirlendi.

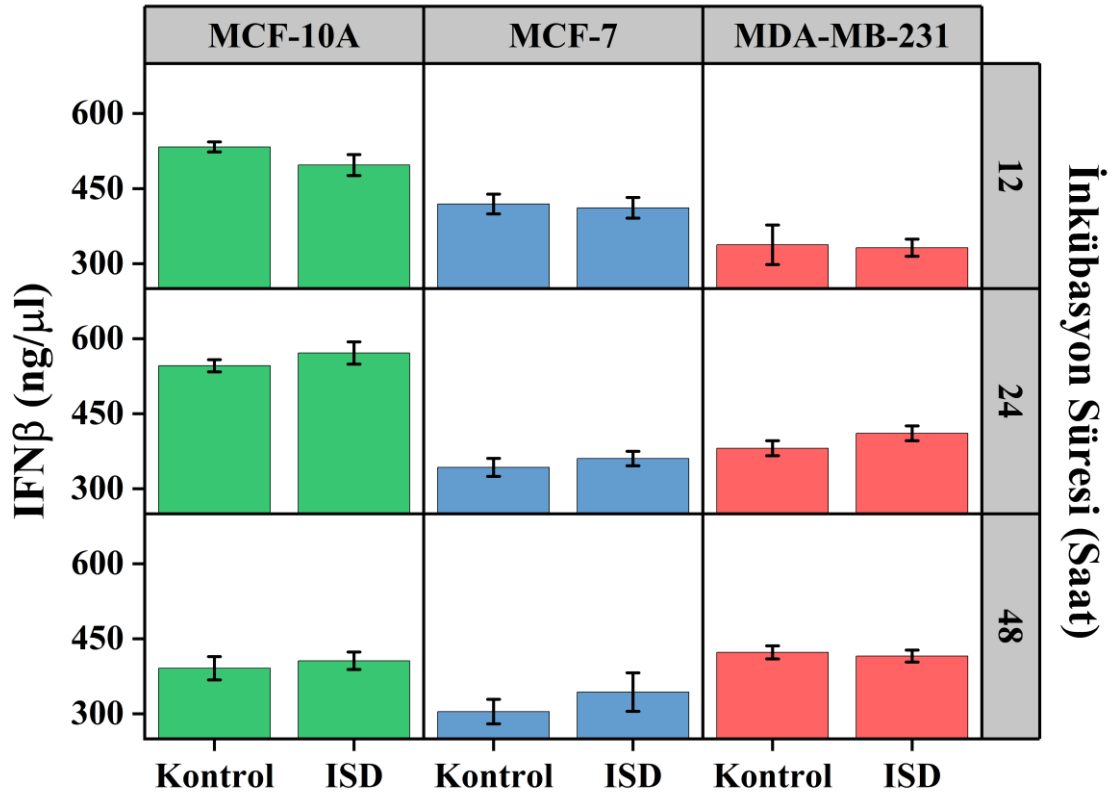
Çoklu terapi uygulanan hücrelerde MHT uygulamasının kanser hücreleri üzerinde oksidatif stresi artırdığı belirlendi (Şekil 81). Özellikle DINP+MHT gruplarında DCF⁺ hücre yüzdeleri MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 için sırasıyla %28,25, %51,44 ve %62,64 olarak belirlendi. İlginç bir şekilde MHT uygulanmayan gruplarda ISD varlığının oksidatif stres üzerinde düşürücü bir etkisinin olduğu gözlemlendi. Bu durum hücre içi yolaklarda farklı mekanizmaların devreye girmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 81. Çoklu terapi uygulanmış hücrelerin 48 saat sonundaki oksidatif stres durumu. FITC kanalında okuma yapıp, az 10.000 event kaydedilerek hücre yüzdeleri belirlendi. ISD (1 µg), MSNP-NH₂ veya MSNP-DOX-NH₂ taşıyıcılığında (sırasıyla INP ve DINP) PEI-FA/DNA oranı 50 olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır.

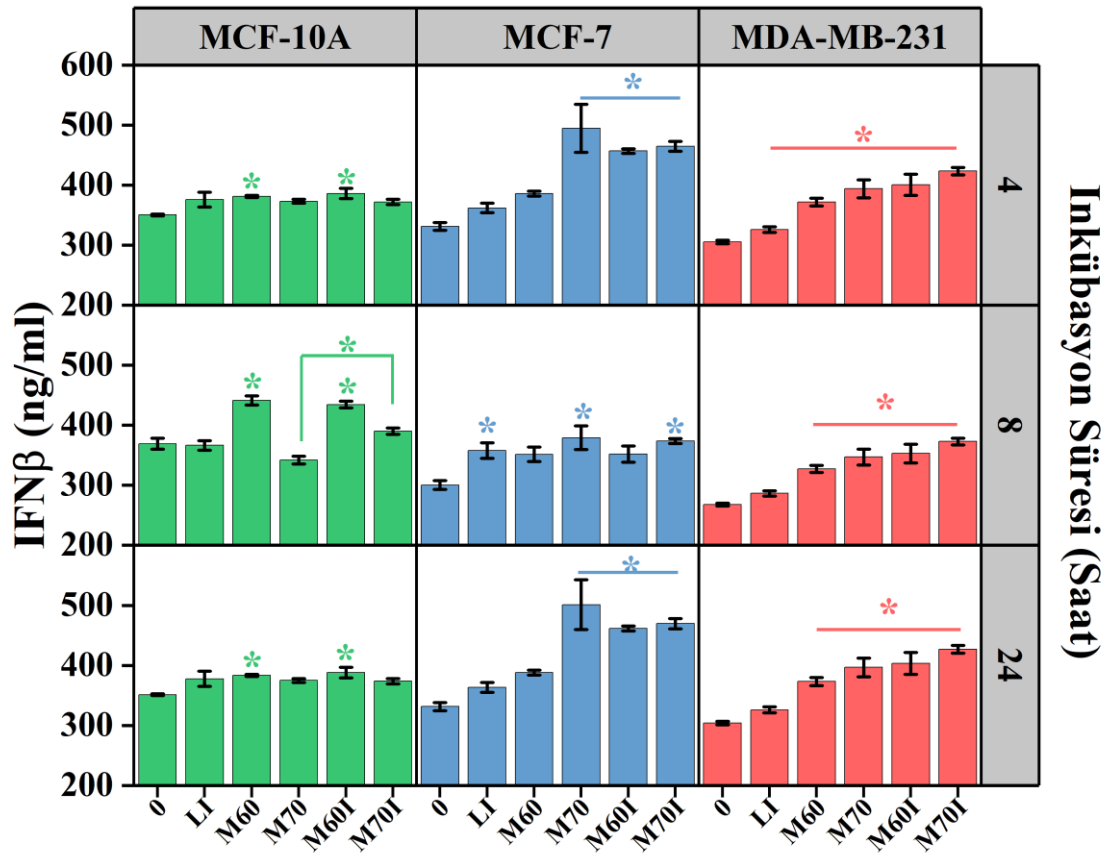
İnterferon Tespiti

Literatürde birçok farklı dsDNA dizisi, sitozolik DNA algılama yolunu aktive etmek amacıyla kullanılmaktadır. Yapılan literatür taramasında, bağışıklık hücrelerinin yanında A549 ve nöroblastoma gibi kanser hücrelerinde STING yolağının aktivasyonunun söz konusu olduğu görülmüştür (Miyabe et al., 2014; Nakamura et al., 2015; Z. Wang et al., 2015). Ancak bizim kullanacağımız hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle önce, ISD uygulanmış MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerden salınan IFN-β miktarı (Şekil 82), ELISA testi ile belirlendi. MCF-10A hücrelerinde en yüksek IFN-β miktarı 12. saatte ölçüldü ve süre arttıkça ölçülen IFN-β miktarının azaldığı belirlendi. Bu hücrelerde kontrol ve LyoVec+ISD arasında fark gözlenmedi. MCF-7 hücrelerinde de benzer şekilde en yüksek IFN-β miktarı 12. saatte ölçüldü ve süre arttıkça ölçülen IFN-β miktarının azaldığı belirlendi. Bu hücre hattında, ISD varlığında kontrole göre daha fazla IFN-β miktarı tespit edildi. MDA-MB-231 hattında 24. saatte kontrol ve LyoVec+ISD arasında fark gözlemlendi. Uygulama yapılan hücre hattı ve test süresine bağlı olarak değişkenlik göstermekle beraber, LyoVec ile ISD aktarımı sonucunda IFN-β miktarında sınırlı düzeyde artış meydana getirebildiği görülmüştür.



Şekil 82. LyoVec ile ISD uygulanmış hücrelerin IFN ölçümüne ait ELISA sonucu. Veriler 12, 24 ve 48 saatlerde toplanan ortamlarda IFNβ miktarı.

Hücrelerde ISD varlığında IFNβ üretimini araştırmak üzere 4, 8 ve 24 saatlerde toplanan örneklerle yapılan ELISA testinde (Şekil 83), MCF-10A hücrelerinde gruplar arasında IFNβ miktarı açısından ciddi fark gözlenmedi. Tüm hücre hatlarında ve tüm saat dilimlerinde ISD içeren ve içermeyen gruplar arasında (örneğin 60 µg/ml MSNP-NH₂ ve 60 µg/ml MSNP-NH₂+ISD) fark belirlenmedi. Sadece MCF-10A hücrelerinin 8 saatlik uygulamasında 70 µg/ml MSNP-NH₂ ve 70 µg/ml MSNP-NH₂+ISD gruplarının istatistiki açıdan anlamlı düzeyde farklı olduğu ortaya kondu.



Şekil 83. ISD içeren MSNP-NH₂ uygulanmış hücrelerin besi ortamından ölçülen IFN β miktarı. Gruplar şu şekildedir; 0: kontrol, LI: Lyovec (100 μ l)+ISD (1 μ g), M60: 60 μ g/ml MSNP-NH₂, M70: 70 μ g/ml MSNP-NH₂, M60I: 60 μ g/ml MSNP-NH₂ ve ISD (1 μ g) ve M70I: 70 μ g/ml MSNP-NH₂ ve ISD (1 μ g) içeren örnekler. PEI-FA/DNA oranı 50'dir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ortalama 16 nm boyutlarında $ZnFe_2O_4$ MNP'ler üretilmiştir (Şekil 28 ve Şekil 29). Bu yapı kullanılarak ortalama 100 nm boyutlarında MSNP'ler elde edilmiştir (Şekil 35). MSNP'lere DOX ilacı yüklenmiştir (Şekil 50, Şekil 51 ve Şekil 52). FA ile modifiye edilmiş PEI, ISD ile karıştırılmıştır (Şekil 47) ve sonra bu karışım MSNP-DOX-NH₂'ler ile muamele edilmiştir. Nihai olarak DNP yapısı elde edilmiştir. Elde edilen MSNP'lerin hücre alımı, manyetik alan (mıknatıs) yokluğunda (Şekil 67, Şekil 68 ve Şekil 69) ve varlığında (Şekil 70, Şekil 71 ve Şekil 72) belirlenmiştir. Mıknatıs süresi arttıkça MSNP'lerin hücre içinde topaklaştığı belirlenmiştir. Sadece 2 saatlik inkübasyon sonunda kanser hücrelerinde yüksek oranda MSNP içeriği belirlenmiştir (Şekil 73). Toksisite çalışmalarında PEI-FA'nın 20 µg/ml üzerindeki derişimlerinin sitotoksik olduğu belirlenmiştir (Şekil 60). DOX uygulamasında, literatür ile uyumlu şekilde MDA-MB-231 hücre hattına kıyasla MCF-10A ve MCF-7 hücreleri daha fazla etkilenmiştir (Şekil 61). Benzer sonuç MSNP-NH₂ uygulamasında da gözlenmiştir (Şekil 62). Ancak MSNP-DOX-NH₂ uygulamasından MCF-10A hücrelerinin daha az etkilendiği ortaya konmuştur (Şekil 63). Tüm sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda ilaç taşıma sistemimizin kanser hücrelerine daha fazla ilaç ulaştırdığı ve yapının hedefe özgü olduğu anlaşılmaktadır. MSNP-DOX-NH₂'nin kanser hücreleri üzerinde daha fazlası sitotoksik etkisi olduğu, artan inkübasyon süresiyle hücre canlılığının daha da düştüğü belirlenmiştir. ISD'nin proliferasyon ve sitotoksisite etkisi LyoVec (kontrol olarak) ve PEI-FA taşıyıcılığında test edilmiştir. MCF-7 hücrelerini LyoVec+ISD'nin daha fazla etkilediği, MDA-MB-231 hücrelerini ise PEI-FA+ISD'nin daha fazla etkilediği belirlenmiştir (Şekil 64 ve Şekil 65).

Hücre içinde MSNP-DOX-NH₂'den DOX salımı akış sitometri ölçümüyle belirlenmiştir. Yapılan çalışmada en fazla DOX içeren hücre hattı %97,95 DOX içeren hücre oranıyla MDA-MB-231'dir (Şekil 74).

MHT varlığında sitotoksik etki testleri, inkübasyon süreleri orantılanarak incelenmiştir (Şekil 75). Bu analizde 24 saatten 48 saate, 48 saatten 72 saate ve 24 saatten 72 saate kadarki absorbans değişimleri karşılaştırılmıştır. DNP+MHT uygulamasının absorbans değişiminin 48 saate kadar kontrollere göre daha az değiştiği belirlenmiştir. Bu durum, hücrelerin bahsedilen uygulamadan etkilendiğini göstermektedir. Uygulamalar arasındaki absorbans değişim farkı MCF10-A hücrelerinde daha azdır. Tüm bu sonuçlar neticesinde 48 saatlik inkübasyon süresinin testler için daha uygun olduğu ortaya konmuştur. Yapılan apoptotik incelemede MCF-10A hücrelerinde, hücre canlılığının çok daha yüksek olduğu belirlenmiş, AC manyetik alan altındaki inkübasyon süresi arttıkça özellikle kanser hücre hatlarında apoptotik ve nekrotik

hücre yüzdesinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 77 ve Şekil 78). Özellikle çoklu terapi uygulanan gruplar incelendiğinde MCF-10A hücre hattında, kansere göre daha düşük oksidatif stres sinyali gözlenmiştir (Şekil 81). Son olarak hazırlanan multi-nano yapının immünoterapötik yaklaşım için kullanılıp kullanılamayacağı, uygulama yapılan hücrelere ait hücre kültür sıvısı ile yapılan IFN β ELISA testi ile ortaya kondu. Bu sonuçlar genel olarak ISD varlığında daha fazla IFN β salındığını ortaya koymaktadır (Şekil 83).



KAYNAKLAR

- Abe, T., Harashima, A., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Morales, A., Ahn, J., Gutman, D., & Barber, G. N. (2013). STING Recognition of Cytoplasmic DNA Instigates Cellular Defense. *Molecular Cell*, 50(1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.039>
- Adibzadeh, F., Sumser, K., Curto, S., Yeo, D. T. B., Shishegar, A. A., & Paulides, M. M. (2020). Systematic review of pre-clinical and clinical devices for magnetic resonance-guided radiofrequency hyperthermia. In *International Journal of Hyperthermia* (Vol. 37, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/02656736.2019.1705404>
- Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A. M., & Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *Journal of Gene Medicine*, 7(5), 657–663. <https://doi.org/10.1002/jgm.696>
- Ali, R., Samman, N., Al Zahrani, H., Nehdi, A., Rahman, S., Khan, A. L., Al Balwi, M., Alriyees, L. A., Alzaid, M., Al Askar, A., & Boudjelal, M. (2017). Isolation and characterization of a new naturally immortalized human breast carcinoma cell line, KAIMRC1. *BMC Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3812-5>
- ALothman, Z. A. (2012). A Review: Fundamental Aspects of Silicate. *Materials*, 5(2874–2902). <https://doi.org/10.3390/ma5122874>
- American Cancer Society. (2016). Hyperthermia to Treat Cancer. *American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/hyperthermia.html>
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2016). Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1(1), 10–29. <https://doi.org/10.1002/btm2.10003>
- Aravindan, L., Bicknell, K. A., Brooks, G., Khutoryanskiy, V. V., & Williams, A. C. (2009). Effect of acyl chain length on transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.052>
- Attarde, S. S., & Pandit, S. V. (2020). Anticancer potential of nanogold conjugated toxin GNP-NN-32 from Naja naja venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0047>

- Barber, G. N. (2015). STING: Infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 760–770. <https://doi.org/10.1038/nri3921>
- Basel, M. T., Balivada, S., Wang, H., Shrestha, T. B., Seo, G. M., Pyle, M., Abayaweera, G., Dani, R., Koper, O. B., Tamura, M., Chikan, V., Bossmann, S. H., & Troyer, D. L. (2012). Cell-delivered magnetic nanoparticles caused hyperthermia-mediated increased survival in a murine pancreatic cancer model. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 297–306. <https://doi.org/10.2147/ijn.s28344>
- Bhavsar, D. B., Patel, V., & Sawant, K. K. (2020). Design and characterization of dual responsive mesoporous silica nanoparticles for breast cancer targeted therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105428>
- Bizargity, P., & Schröppel, B. (2014). Autophagy: Basic principles and relevance to transplant immunity. In *American Journal of Transplantation* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.1111/ajt.12743>
- Borade, R. M., Somvanshi, S. B., Kale, S. B., Pawar, R. P., & Jadhav, K. M. (2020). Spinel zinc ferrite nanoparticles: An active nanocatalyst for microwave irradiated solvent free synthesis of chalcones. *Materials Research Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6c9c>
- Brummelhuis, I. S. G., Crezee, J., & Witjes, J. A. (2023). Evaluation of thermal dose effect in radiofrequency-induced hyperthermia with intravesical chemotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. *International Journal of Hyperthermia*, 40(1). <https://doi.org/10.1080/02656736.2022.2157498>
- Campanini, M., Ciprian, R., Bedogni, E., Mega, A., Chiesi, V., Casoli, F., De Julián Fernández, C., Rotunno, E., Rossi, F., Secchi, A., Bigi, F., Salviati, G., Magén, C., Grillo, V., & Albertini, F. (2015). Lorentz microscopy sheds light on the role of dipolar interactions in magnetic hyperthermia. *Nanoscale*, 7(17), 7717–7725. <https://doi.org/10.1039/c5nr00273g>
- Cao, Q. T., Aguiar, J. A., Tremblay, B. J.-M., Abbas, N., Tiessen, N., Revill, S., Makhdami, N., Ayoub, A., Cox, G., Ask, K., Doxey, A. C., & Hirota, J. A. (2020). ABCF1 regulates dsDNA-induced immune responses in human airway epithelial cells. *BioRxiv*, 2020.02.08.940023. <https://doi.org/10.1101/2020.02.08.940023>

- Cardiff University. (2023). *Carbon – XPS Analysis*.
[Http://sites.cardiff.ac.uk/xpsaccess/reference/carbon/](http://sites.cardiff.ac.uk/xpsaccess/reference/carbon/).
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 17, Issue 7).
<https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Çelik, S. Y., Solak, K., & Mavi, A. (2022). Sulfanilamide Modified Magnetic Nanoparticles for Purification of Carbonic Anhydrase from Bovine Blood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03983-9>
- Chandra, D., Quispe-Tintaya, W., Jahangir, A., Asafu-Adjei, D., Ramos, I., Sintim, H. O., Zhou, J., Hayakawa, Y., Karaolis, D. K. R., & Gravekamp, C. (2014). STING ligand c-di-GMP improves cancer vaccination against metastatic breast cancer. *Cancer Immunology Research*, 2(9), 901–910. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0123>
- Chen, C., Ke, J., Edward Zhou, X., Yi, W., Brunzelle, J. S., Li, J., Yong, E. L., Xu, H. E., & Melcher, K. (2013). Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature* 2013 500:7463, 500(7463), 486–489.
<https://doi.org/10.1038/nature12327>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Cheng, T. S., Pan, J., Xu, Y. Y., Bao, Q. Q., Hu, P., & Shi, J. L. (2019). Synthesis of Zn, Mn doped Fe₃O₄ Nanoparticles with Tunable Size. *Wuji Cailiao Xuebao/Journal of Inorganic Materials*, 34(8). <https://doi.org/10.15541/jim20190013>
- Choi, H., Kwon, J., Soon Cho, M., Sun, Y., Zheng, X., Wang, J., Bouker, K. B., Casey, J. L., Atkins, M. B., Toretsky, J., & Han, C. (2021). Targeting ddx3x triggers antitumor immunity via a dsrna-mediated tumor-intrinsic type i interferon response. *Cancer Research*, 81(13). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3790>
- Cichos, J., & Karbowski, M. (2014). A general and versatile procedure for coating of hydrophobic nanocrystals with a thin silica layer enabling facile biofunctionalization and dye incorporation. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(5).
<https://doi.org/10.1039/c3tb21442g>

- Connord, V., Clerc, P., Hallali, N., El Hajj Diab, D., Fourmy, D., Gigoux, V., & Carrey, J. (2015). Real-time analysis of magnetic hyperthermia experiments on living cells under a confocal microscope. *Small*, 11(20), 2437–2445. <https://doi.org/10.1002/sml.201402669>
- Cumming, E. E., & Diamond, A. W. (2002). Songbird community composition versus forest rotation age in Saskatchewan boreal mixedwood forest. *Canadian Field-Naturalist*, 116(1), 69–75.
- Davydov, V., Rakhmanina, A., Kireev, I., Alieva, I., Zhironkina, O., Strelkova, O., Dianova, V., Samani, T. D., Mireles, K., Yahia, L. H., Uzbekov, R., Agafonov, V., & Khabashesku, V. (2014). Solid state synthesis of carbon-encapsulated iron carbide nanoparticles and their interaction with living cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(27). <https://doi.org/10.1039/c3tb21599g>
- Dayanc, B. E., Beachy, S. H., Ostberg, J. R., & Repasky, E. A. (2008). Dissecting the role of hyperthermia in natural killer cell mediated anti-tumor responses. *International Journal of Hyperthermia*, 24(1), 41–56. <https://doi.org/10.1080/02656730701858297>
- Dimri, G., Band, H., & Band, V. (2005). Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research*, 7(4), 171. <https://doi.org/10.1186/BCR1275>
- Ding, H. L., Zhang, Y. X., Wang, S., Xu, J. M., Xu, S. C., & Li, G. H. (2012). Fe₃O₄@SiO₂ core/shell nanoparticles: The silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses. *Chemistry of Materials*, 24(23), 4572–4580. <https://doi.org/10.1021/cm302828d>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Domenech, M., Marrero-Berrios, I., Torres-Lugo, M., & Rinaldi, C. (2013). Lysosomal membrane permeabilization by targeted magnetic nanoparticles in alternating magnetic fields. *ACS Nano*, 7(6), 5091–5101. <https://doi.org/10.1021/nn4007048>
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>

- Ebadi, M., Buskaran, K., Bullo, S., Hussein, M. Z., Fakurazi, S., & Pastorin, G. (2021). Drug delivery system based on magnetic iron oxide nanoparticles coated with (polyvinyl alcohol-zinc/aluminium-layered double hydroxide-sorafenib). *Alexandria Engineering Journal*, 60(1). <https://doi.org/10.1016/j.aej.2020.09.061>
- Fajardo, L. F. (1984). Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. *Cancer Research*, 44(10 SUPPL.).
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2006). Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 58, Issue 14, pp. 1456–1459). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.011>
- Furuta, M., Kose, S., Kehlenbach, R. H., & Imamoto, N. (2014). Analysis of nucleocytoplasmic transport in digitonin-permeabilized cells under different cellular conditions. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 122). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417160-2.00015-1>
- Gajewski, T. F., & Corrales, L. (2015). New perspectives on type I IFNs in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26(2), 175–178. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.01.001>
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Galon, J. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*, 313(5795), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
- Gao, W., Lin, Z., Chen, M., Yang, X., Cui, Z., Zhang, X., Yuan, L., & Zhang, Q. (2014). The co-delivery of a low-dose P-glycoprotein inhibitor with doxorubicin sterically

- stabilized liposomes against breast cancer with low P-glycoprotein expression. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1). <https://doi.org/10.2147/IJN.S56070>
- Gehrmann, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jäättelä, M., Zilch, T., & Multhoff, G. (2005). Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: Protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death and Differentiation*, 12(1), 38–51. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401510>
- Ge, R., Liu, C., Zhang, X., Wang, W., Li, B., Liu, J., Liu, Y., Sun, H., Zhang, D., Hou, Y., Zhang, H., & Yang, B. (2018). Photothermal-Activatable Fe₃O₄ Superparticle Nanodrug Carriers with PD-L1 Immune Checkpoint Blockade for Anti-metastatic Cancer Immunotherapy [Research-article]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(24), 20342–20355. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b05876>
- Giorello, M. B., Borzone, F. R., Labovsky, V., Piccioni, F. V., & Chasseing, N. A. (2021). Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. In *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (Vol. 26, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09475-y>
- Hadadian, Y., Masoomi, H., Dinari, A., Ryu, C., Hwang, S., Kim, S., Cho, B. K., Lee, J. Y., & Yoon, J. (2022). From Low to High Saturation Magnetization in Magnetite Nanoparticles: The Crucial Role of the Molar Ratios between the Chemicals. *ACS Omega*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01136>
- Han, S. O., Mahato, R. I., Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2000). Development of biomaterials for gene therapy. In *Molecular Therapy* (Vol. 2, Issue 4). <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0142>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Harvard University. (n.d.). *Media recipes for MCF-10A Cells*. Harvard.Edu. Retrieved 3 May 2020, from <https://brugge.med.harvard.edu/system/files/protocols/MediaRecipesForMCF10ACells.pdf>
- Heggannavar, G. B., Hiremath, C. G., Achari, D. D., Pangarkar, V. G., & Kariduraganavar, M. Y. (2018). Development of Doxorubicin-Loaded Magnetic Silica-Pluronic F-127

- Nanocarriers Conjugated with Transferrin for Treating Glioblastoma across the Blood-Brain Barrier Using an in Vitro Model [Research-article]. *ACS Omega*, 3(7), 8017–8026. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00152>
- Heidari Majd, M., Asgari, D., Barar, J., Valizadeh, H., Kafil, V., Coukos, G., & Omid, Y. (2013). Specific targeting of cancer cells by multifunctional mitoxantrone-conjugated magnetic nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 21(4), 328–340. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.750325>
- Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., & Uddin, M. J. (2019). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *Journal of Advanced Research*, 15, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>
- Huang, C., Zhang, L., Guo, Q., Zuo, Y., Wang, N., Wang, H., Kong, D., Zhu, D., & Zhang, L. (2021). Robust Nanovaccine Based on Polydopamine-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles for Effective Photothermal-Immunotherapy Against Melanoma. *Advanced Functional Materials*. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010637>
- Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), 121–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6)
- Hugounenq, P., Levy, M., Alloyeau, D., Lartigue, L., Dubois, E., Cabuil, V., Ricolleau, C., Roux, S., Wilhelm, C., Gazeau, F., & Bazzi, R. (2012). Iron oxide monocrystalline nanoflowers for highly efficient magnetic hyperthermia. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(29), 15702–15712. <https://doi.org/10.1021/jp3025478>
- Institute, N. C. (2011). *National Cancer Institute Fact Sheet: Hyperthermia in Cancer Treatment*. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/hyperthermia>
- Ishikawa, H., Ma, Z., & Barber, G. N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 461(7265), 788–792. <https://doi.org/10.1038/nature08476>
- Jhaveri, M. S., Rait, A. S., Chung, K. N., Trepel, J. B., & Chang, E. H. (2004). Antisense oligonucleotides targeted to the human α folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(12). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.1505.3.12>

- Kapadia, C. H., Perry, J. L., Tian, S., Luft, J. C., & DeSimone, J. M. (2015). Nanoparticulate immunotherapy for cancer. *Journal of Controlled Release*, 219, 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.062>
- Kasparis, G., Plan Sangnier, A., Wang, L., Efstathiou, C., LaGrow, A. P., Sergides, A., Wilhelm, C., & Thanh, N. T. K. (2022). Zn doped iron oxide nanoparticles with high magnetization and photothermal efficiency for cancer treatment. *Journal of Materials Chemistry B*. <https://doi.org/10.1039/d2tb01338j>
- Kim, H. J., & Choi, H. (2019). Effect of plasma treatment on magnetic properties and heating efficiency of Ni-Zn nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 484, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.03.102>
- Kim, J., Kim, H. S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., Song, I. C., Moon, W. K., & Hyeon, T. (2008). Multifunctional uniform nanoparticles composed of a magnetite nanocrystal core and a mesoporous silica shell for magnetic resonance and fluorescence imaging and for drug delivery. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(44), 8438–8441. <https://doi.org/10.1002/anie.200802469>
- Klaunig, J. E., & Kamendulis, L. M. (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851>
- Kobler, J., Möller, K., & Bein, T. (2008). Colloidal suspensions of functionalized mesoporous silica nanoparticles. *ACS Nano*, 2(4), 791–799. <https://doi.org/10.1021/nn700008s>
- Kossatz, S., Ludwig, R., Dähring, H., Ettelt, V., Rimkus, G., Marciello, M., Salas, G., Patel, V., Teran, F. J., & Hilger, I. (2014). High therapeutic efficiency of magnetic hyperthermia in xenograft models achieved with moderate temperature dosages in the tumor area. *Pharmaceutical Research*, 31(12), 3274–3288. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1417-0>
- Lachowicz, D., Górka, W., Kmita, A., Bernasik, A., Zukrowski, J., Szczerba, W., Sikora, M., Kapusta, C., & Zapotoczny, S. (2019). Enhanced hyperthermic properties of biocompatible zinc ferrite nanoparticles with a charged polysaccharide coating. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(18). <https://doi.org/10.1039/c9tb00029a>
- Lee, S., Son, B., Park, G., Kim, H., Kang, H., Jeon, J., Youn, H., & Youn, B. (2018). Immunogenic effect of hyperthermia on enhancing radiotherapeutic efficacy.

- International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 1–21.
<https://doi.org/10.3390/ijms19092795>
- Leone, J. P., & Leone, B. A. (2015). Breast cancer brain metastases: The last frontier. *Experimental Hematology and Oncology*, 4(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s40164-015-0028-8>
- Li, J. J., Tsang, J. Y., & Tse, G. M. (2021). Tumor microenvironment in breast cancer—Updates on therapeutic implications and pathologic assessment. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 16). <https://doi.org/10.3390/cancers13164233>
- Li, J. M., Wang, Y. Y., Zhang, W., Su, H., Ji, L. N., & Mao, Z. W. (2013). Low-weight polyethylenimine cross-linked 2-hydroxypopyl- β -cyclodextrin and folic acid as an efficient and nontoxic siRNA carrier for gene silencing and tumor inhibition by VEGF siRNA. *International Journal of Nanomedicine*, 8.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S42440>
- Liong, M., Lu, J., Kovochich, M., Xia, T., Ruehm, S. G., Nel, A. E., Tamanoi, F., & Zink, J. I. (2008). Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano*, 2(5), 889–896. <https://doi.org/10.1021/nn800072t>
- Li, S., Yuan, S., Zhao, Q., Wang, B., Wang, X., & Li, K. (2018). Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 100.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.055>
- Li, T. J., Huang, C. C., Ruan, P. W., Chuang, K. Y., Huang, K. J., Shieh, D. Bin, & Yeh, C. S. (2013). In vivo anti-cancer efficacy of magnetite nanocrystal - based system using locoregional hyperthermia combined with 5-fluorouracil chemotherapy. *Biomaterials*, 34(32), 7873–7883.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.012>
- Li, T., Shen, X., Geng, Y., Chen, Z., Li, L., Li, S., Yang, H., Wu, C., Zeng, H., & Liu, Y. (2016). Folate-Functionalized Magnetic-Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug/Gene Codelivery to Potentiate the Antitumor Efficacy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(22), 13748–13758. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02963>
- Li, Y., Tian, H., Ding, J., Dong, X., Chen, J., & Chen, X. (2014). Thiourea modified polyethylenimine for efficient gene delivery mediated by the combination of

- electrostatic interactions and hydrogen bonds. *Polymer Chemistry*, 5(11), 3598–3607. <https://doi.org/10.1039/c3py01781h>
- Li, Y., Tiwari, A. K., Ng, J. S., Seah, G. L., Lim, H. K., Suteewong, T., Tay, C. Y., Lam, Y. M., & Tan, K. W. (2022). One-Pot Synthesis of Aminated Bimodal Mesoporous Silica Nanoparticles as Silver-Embedded Antibacterial Nanocarriers and CO₂Capture Sorbents. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 14(46). <https://doi.org/10.1021/acsami.2c13076>
- Li, Z., Liu, X., Chen, X., Chua, M. X., & Wu, Y. L. (2017). Targeted delivery of Bcl-2 conversion gene by MPEG-PCL-PEI-FA cationic copolymer to combat therapeutic resistant cancer. *Materials Science and Engineering C*, 76, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.163>
- Longhi, M. P., Trumpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, A. M., Colonna, M., & Steinman, R. M. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *Journal of Experimental Medicine*, 206(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20090247>
- Lüpertz, R., Wätjen, W., Kahl, R., & Chovolou, Y. (2010). Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*, 271(3). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.012>
- Mahalunkar, S., Yadav, A. S., Gorain, M., Pawar, V., Braathen, R., Weiss, S., Bogen, B., Gosavi, S. W., & Kundu, G. C. (2019). Functional design of pH-responsive folate-targeted polymer-coated gold nanoparticles for drug delivery and in vivo therapy in breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 14. <https://doi.org/10.2147/IJN.S215142>
- Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov, R., & Hadjipanayis, C. (2018). Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. In *International Journal of Hyperthermia* (Vol. 34, Issue 8). <https://doi.org/10.1080/02656736.2018.1430867>
- Mattiuz, R., Brousse, C., Ambrosini, M., Cancel, J. C., Bessou, G., Mussard, J., Sanlaville, A., Caux, C., Bendriss-Vermare, N., Valladeau-Guilemond, J., Dalod, M., & Crozat, K. (2021). Type 1 conventional dendritic cells and interferons are required for spontaneous CD4⁺ and CD8⁺ T-cell protective responses to breast cancer. *Clinical and Translational Immunology*, 10(7). <https://doi.org/10.1002/cti2.1305>

- Ma, X., Zhao, Y., Ng, K. W., & Zhao, Y. (2013). Integrated hollow mesoporous silica nanoparticles for target drug/siRNA co-delivery. *Chemistry - A European Journal*, 19(46), 15593–15603. <https://doi.org/10.1002/chem.201302736>
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480–489. <https://doi.org/10.1038/nature10673>
- Miller, K. D., Nogueira, L., Devasia, T., Mariotto, A. B., Yabroff, K. R., Jemal, A., Kramer, J., & Siegel, R. L. (2022). Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(5). <https://doi.org/10.3322/caac.21731>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Miyabe, H., Hyodo, M., Nakamura, T., Sato, Y., Hayakawa, Y., & Harashima, H. (2014). A new adjuvant delivery system ‘cyclic di-GMP/YSK05 liposome’ for cancer immunotherapy. *Journal of Controlled Release*, 184(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.004>
- Mobley, J. A., & Brueggemeier, R. W. (2004). Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis*, 25(1). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg175>
- Moghim, S. M., Symonds, P., Murray, J. C., Hunter, A. C., Debska, G., & Szewczyk, A. (2005). A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: Implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy*, 11(6), 990–995. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.02.010>
- Mohamed, N., Hessen, O. E. A., & Mohammed, H. S. (2021). Thermal stability, paramagnetic properties, morphology and antioxidant activity of iron oxide nanoparticles synthesized by chemical and green methods. *Inorganic Chemistry Communications*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108572>
- Morano, W. F., Aggarwal, A., Love, P., Richard, S. D., Esquivel, J., & Bowne, W. B. (2016). Intraperitoneal immunotherapy: Historical perspectives and modern therapy. *Cancer Gene Therapy*, 23(11), 373–381. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.49>

- Moroz, P., Jones, S. K., & Gray, B. N. (2002). Magnetically mediated hyperthermia: Current status and future directions. *International Journal of Hyperthermia*, 18(24), 267–284. <https://doi.org/10.1080/02656730110108785>
- Mota, A. de L., Evangelista, A. F., Macedo, T., Oliveira, R., Scapulatempo-Neto, C., Vieira, R. A. da C., & Marques, M. M. C. (2017). Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncology Letters*, 13(6). <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6093>
- Moy, A. J., & Tunnell, J. W. (2017). Combinatorial immunotherapy and nanoparticle mediated hyperthermia. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.06.008>
- Muro-Cruces, J., Roca, A. G., López-Ortega, A., Fantechi, E., Del-Pozo-Bueno, D., Estradé, S., Peiró, F., Sepúlveda, B., Pineider, F., Sangregorio, C., & Nogues, J. (2019). Precise Size Control of the Growth of Fe₃O₄ Nanocubes over a Wide Size Range Using a Rationally Designed One-Pot Synthesis. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01281>
- Nagata, S., & Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>
- Nakamura, T., Miyabe, H., Hyodo, M., Sato, Y., Hayakawa, Y., & Harashima, H. (2015). Liposomes loaded with a STING pathway ligand, cyclic di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma. *Journal of Controlled Release*, 216, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.026>
- Nel, A., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Lin, S., Ji, Z., & Zhang, H. (2013). Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: Use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening. *Accounts of Chemical Research*, 46(3). <https://doi.org/10.1021/ar300022h>
- Nguyen, K. B., Cousens, L. P., Doughty, L. A., Pien, G. C., Durbin, J. E., & Biron, C. A. (2000). Interferon α/β -mediated inhibition and promotion of interferon γ : STAT1 resolves a paradox. In *Nature Immunology* (Vol. 1, Issue 1, pp. 70–76). <https://doi.org/10.1038/76940>
- NIH. (2014). *Doxorubicin: Medline Plus Drug Information*. U.S. National Library of Medicine. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682221.html>

- NIH. (2018). *Doxorubicin Hydrochloride* - National Cancer Institute. NIH-National Cancer Institute. <https://doi.org/10.1039/f29736901723>
- Obaidat, I. M., Narayanaswamy, V., Alaabed, S., Sambasivam, S., & Muralee Gopi, C. V. (2019). Principles of Magnetic Hyperthermia: A Focus on Using Multifunctional Hybrid Magnetic Nanoparticles. *Magnetochemistry*, 5(4), 67. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5040067>
- Okamoto-Schalch, N. O., Pinho, S. G. B., de Barros-Alexandrino, T. T., Dacanal, G. C., Assis, O. B. G., & Martelli-Tosi, M. (2020). Production and characterization of chitosan-TPP/cellulose nanocrystal system for encapsulation: a case study using folic acid as active compound. *Cellulose*, 27(10). <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03173-y>
- Okoh, V., Deoraj, A., & Roy, D. (2011). Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1815, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.10.005>
- Palanisamy, S., & Wang, Y. M. (2019). Superparamagnetic iron oxide nanoparticulate system: synthesis, targeting, drug delivery and therapy in cancer. *Dalton Transactions*, 48(26), 9490–9515. <https://doi.org/10.1039/C9DT00459A>
- Pan, J., Hu, P., Guo, Y., Hao, J., Ni, D., Xu, Y., Bao, Q., Yao, H., Wei, C., Wu, Q., & Shi, J. (2020). Combined Magnetic Hyperthermia and Immune Therapy for Primary and Metastatic Tumor Treatments. *ACS Nano*, 14(1), 1033–1044. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08550>
- Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S., & Leamon, C. P. (2005). Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry*, 338(2), 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026>
- Patti, F., Cataldi, M. L., Nicoletti, F., Reggio, E., Nicoletti, A., & Reggio, A. (2001). Combination of cyclophosphamide and interferon- β halts progression in patients with rapidly transitional multiple sclerosis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 71(3). <https://doi.org/10.1136/jnnp.71.3.404>
- Peng, F., Liao, M., Qin, R., Zhu, S., Peng, C., Fu, L., Chen, Y., & Han, B. (2022). Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. In *Signal*

- Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01110-y>
- Pilco-Ferreto, N., & Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 49(2), 753–762. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3558>
- Propper, D. J., & Balkwill, F. R. (2022). Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 19, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00588-9>
- Qian, H., Liu, B., & Jiang, X. (2018). Application of nanomaterials in cancer immunotherapy. *Materials Today Chemistry*, 7, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.01.001>
- Qin, J., Wang, X., Fan, G., Lv, Y., & Ma, J. (2023). Recent Advances in Nanodrug Delivery System for Tumor Combination Treatment Based on Photothermal Therapy. In *Advanced Therapeutics* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/adtp.202200218>
- Radwan, E. M., Abdullah, R., Al-Qubaisi, M. S., El Zowalaty, M. E., Naadja, S. E., Alitheen, N. B., & Omar, A. R. (2016). Effect of recombinant human erythropoietin and doxorubicin in combination on the proliferation of MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4989>
- Rodríguez, F., Caruana, P., De la Fuente, N., Español, P., Gámez, M., Balart, J., Llurba, E., Rovira, R., Ruiz, R., Martín-Lorente, C., Corchero, J. L., & Céspedes, M. V. (2022). Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/biom12060784>
- Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2019). Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>
- Rosenthal, E. T. (2012). Lloyd J. Old, ‘Father of Modern Cancer Immunology,’ Dies at 78. *Oncology Times*, 34(2), 28–29. <https://doi.org/10.1097/01.cot.0000411543.03220.18>
- Ross, J. F., Chaudhuri, P. K., & Ratnam, M. (1994). Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines.

Physiologic and clinical implications. *Cancer*, 73(9). [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940501\)73:9<2432::AID-CNCR2820730929>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940501)73:9<2432::AID-CNCR2820730929>3.0.CO;2-S)

Rubia-Rodríguez, I., Santana-Otero, A., Spassov, S., Tombácz, E., Johansson, C., De La Presa, P., Teran, F. J., Morales, M. del P., Veintemillas-Verdaguer, S., Thanh, N. T. K., Besenhard, M. O., Wilhelm, C., Gazeau, F., Harmer, Q., Mayes, E., Manshian, B. B., Soenen, S. J., Gu, Y., Millán, Á., ... Ortega, D. (2021). Whither Magnetic Hyperthermia? A Tentative Roadmap. *Materials*, 14(4), 706. <https://doi.org/10.3390/ma14040706>

Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., & Lee, H. (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation. *Pnas*, 106, 20842–20846.

Saito, M., & Saitoh, H. (2012). Labeling of polyethylenimine with fluorescent dye to image nucleus, nucleolus, and chromosomes in digitonin-permeabilized hela cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(9), 1777–1780. <https://doi.org/10.1271/bbb.120140>

Sarkaç. (2018). *Neymiş bu kanser immünoterapisi?* https://sarkac.org/2018/11/neymis-bu-kanser-immunoterapisi/#_ftn1

Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., ... O'Shaughnessy, J. (2020). Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(9). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910549>

Shah, B. P., Pasquale, N., De, G., Tan, T., Ma, J., & Lee, K. B. (2014). Core-shell nanoparticle-based peptide therapeutics and combined hyperthermia for enhanced cancer cell apoptosis. *ACS Nano*, 8(9), 9379–9387. <https://doi.org/10.1021/nn503431x>

Shah, S., Chandra, A., Kaur, A., Sabnis, N., Lacko, A., Gryczynski, Z., Fudala, R., & Gryczynski, I. (2017). Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.024>

Shao, K., Singha, S., Clemente-Casares, X., Tsai, S., Yang, Y., & Santamaria, P. (2015). Nanoparticle-Based Immunotherapy for Cancer. *ACS Nano*, 9(1), 16–30. <https://doi.org/10.1021/nn5062029>

- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Skitzki, J. J., Repasky, E. A., & Evans, S. S. (2009). Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 10(6), 550–558.
- Solak, K., Mavi, A., & Yılmaz, B. (2021). Disulfiram-loaded functionalized magnetic nanoparticles combined with copper and sodium nitroprusside in breast cancer cells. *Materials Science and Engineering C*, 119, 111452. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111452>
- Soleymani, J., Hasanzadeh, M., Somi, M. H., Shadjou, N., & Jouyban, A. (2018). Probing the specific binding of folic acid to folate receptor using amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles for differentiation of MCF 7 tumoral cells from MCF 10A. *Biosensors and Bioelectronics*, 115, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.025>
- Song, H., Zhu, L., Li, Y., Lou, Z., Xiao, M., & Ye, Z. (2015). Preparation of ZnFe₂O₄ nanostructures and highly efficient visible-light-driven hydrogen generation with the assistance of nanoheterostructures. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(16), 8353–8360. <https://doi.org/10.1039/c5ta00737b>
- Song, X., Li, F., Ma, J., Jia, N., Xu, J., & Shen, H. (2011). Synthesis of fluorescent silica nanoparticles and their applications as fluorescence probes. *Journal of Fluorescence*, 21(3), 1205–1212. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0799-6>
- Southern, P., & Pankhurst, Q. A. (2018). Commentary on the clinical and preclinical dosage limits of interstitially administered magnetic fluids for therapeutic hyperthermia based on current practice and efficacy models. *International Journal of Hyperthermia*, 34(6). <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1365953>
- Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M. E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G. C., Park, J., Ran, Q., ... Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. In *Cell* (Vol. 171, Issue 2, pp. 273–285). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>

- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., & Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: A promising therapeutic target for cancer treatment. In *Cell Death and Disease* (Vol. 4, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.350>
- Sun, C., Lee, J. S. H., & Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1252–1265. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.018>
- Sun, L., Kees, T., Almeida, A. S., Liu, B., He, X. Y., Ng, D., Han, X., Spector, D. L., McNeish, I. A., Gimotty, P., Adams, S., & Egeblad, M. (2021). Activating a collaborative innate-adaptive immune response to control metastasis. *Cancer Cell*, 39(10). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.08.005>
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*, 339(6121), 786–791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>
- Suteewong, T., Sai, H., Lee, J., Bradbury, M., Hyeon, T., Gruner, S. M., & Wiesner, U. (2010). Ordered mesoporous silica nanoparticles with and without embedded iron oxide nanoparticles: Structure evolution during synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, 20(36), 7807–7814. <https://doi.org/10.1039/c0jm01002b>
- Takase, K., & Saito, T. (1995). T cell activation. *Ryumachi*, 35(5), 853–861. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(90\)90312-f](https://doi.org/10.1016/0008-8749(90)90312-f)
- Tang, C. H. A., Zundell, J. A., Ranatunga, S., Lin, C., Nefedova, Y., Del Valle, J. R., & Hu, C. C. A. (2016). Agonist-mediated activation of STING induces apoptosis in malignant B cells. *Cancer Research*, 76(8), 2137–2152. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1885>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. In *Cell Research* (Vol. 29, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- T.C. Sağlık Bakanlığı. (2020). *Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2018*. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/36134,siy2018trpdf.pdf?0>
- Terasaki, A., Kurokawa, H., Ito, H., Komatsu, Y., Matano, D., Terasaki, M., Bando, H., Hara, H., & Matsui, H. (2020). Elevated production of mitochondrial reactive oxygen species via hyperthermia enhanced cytotoxic effect of doxorubicin in human breast

- cancer cell lines MDA-MB-453 and MCF-7. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249522>
- Thermoscientific. (2010). *INSTRUCTIONS FITC and TRITC*.
- Toraya-Brown, S., Sheen, M. R., Zhang, P., Chen, L., Baird, J. R., Demidenko, E., Turk, M. J., Hoopes, P. J., Conejo-Garcia, J. R., & Fiering, S. (2014). Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8⁺ T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(6), 1273–1285. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.01.011>
- Ungár, T. (2004). Microstructural parameters from X-ray diffraction peak broadening. *Scripta Materialia*, 51(8 SPEC. ISS.), <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2004.05.007>
- Unni, M., Uhl, A. M., Savliwala, S., Savitzky, B. H., Dhavalikar, R., Garraud, N., Arnold, D. P., Kourkoutis, L. F., Andrew, J. S., & Rinaldi, C. (2017). Thermal Decomposition Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Diminished Magnetic Dead Layer by Controlled Addition of Oxygen. *ACS Nano*, 11(2). <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00609>
- Unterholzner, L. (2013). The interferon response to intracellular DNA: Why so many receptors? *Immunobiology*, 218(11), 1312–1321. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.07.007>
- Van Der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., Van Hall, T., & Melief, C. J. M. (2016). Vaccines for established cancer: Overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nature Reviews Cancer*, 16(4), 219–233. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.16>
- van der Zee, J. (2002). Heating the patient: A promising approach? *Annals of Oncology*, 13(8), 1173–1184. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf280>
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
- Vilas-Boas, V., Carvalho, F., & Espiña, B. (2020). Magnetic hyperthermia for cancer treatment: Main parameters affecting the outcome of in vitro and in vivo studies. *Molecules*, 25(12), 1–30. <https://doi.org/10.3390/molecules25122874>
- Waldhauer, I., & Steinle, A. (2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*, 27(45), 5932–5943. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.267>

- Wang, H., Zhang, L., Shi, Y., Javidiparsijani, S., Wang, G., Li, X., Ouyang, W., Zhou, J., Zhao, L., Wang, X., Zhang, X., Gao, F., Liu, J., Luo, J., & Tang, J. (2014). Abscopal antitumor immune effects of magnet-mediated hyperthermia at a high therapeutic temperature on Walker-256 carcinosarcomas in rats. *Oncology Letters*, 7(3), 764–770. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1803>
- Wang, J., & Liu, J. (2016). PEI-folic acid modified carbon nanodots for cancer cell-targeted delivery and two-photon excitation imaging. *RSC Advances*, 6(24), 19662–19668. <https://doi.org/10.1039/c5ra27249a>
- Wang, J., Xu, D., Deng, T., Li, Y., Xue, L., Yan, T., Huang, D., & Deng, D. (2018). Self-Decomposable Mesoporous Doxorubicin@Silica Nanocomposites for Nuclear Targeted Chemo-Photodynamic Combination Therapy. *ACS Applied Nano Materials*, 1(4). <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b00486>
- Wang, Q., Shao, X., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, F. X. C., Mu, J., Li, J., Yao, H., & Chen, K. (2023). Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. In *Cancer Medicine* (Vol. 12, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/cam4.5698>
- Wang, Y., Sun, G., Gong, Y., Zhang, Y., Liang, X., & Yang, L. (2020). Functionalized Folate-Modified Graphene Oxide/PEI siRNA Nanocomplexes for Targeted Ovarian Cancer Gene Therapy. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S11671-020-3281-7/FIGURES/6>
- Wang, Y., Sun, Y., Wang, J., Yang, Y., Li, Y., Yuan, Y., & Liu, C. (2016). Charge-Reversal APTES-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles with High Drug Loading and Release Controllability. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(27). <https://doi.org/10.1021/acsaami.6b05370>
- Wang, Z., Yang, Y., Xu, Z., Wang, Y., Zhang, W., & Shi, P. (2015). Interrogation of Cellular Innate Immunity by Diamond-Nanoneedle-Assisted Intracellular Molecular Fishing. *Nano Letters*, 15(10), 7058–7063. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b03126>
- Warriner, L. W., Duke, J. R., Pack, D. W., & Derouchey, J. E. (2018). Succinylated Polyethylenimine Derivatives Greatly Enhance Polyplex Serum Stability and Gene Delivery in Vitro. *Biomacromolecules*, 19(11). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01248>

- Werth, S., Urban-Klein, B., Dai, L., Höbel, S., Grzelinski, M., Bakowsky, U., Czubyko, F., & Aigner, A. (2006). A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. *Journal of Controlled Release*, 112(2), 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.02.009>
- WHO. (2018). *International Agency for Research on Cancer, Globocan 2018, Turkey* (Vol. 703). <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>
- Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., & Chan, W. C. W. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1, 1–12. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., & Schlag, P. M. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology*, 3(8), 487–497. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00818-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5)
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Meng, H., Kabehie, S., George, S., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2009). Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano*, 3(10), 3273–3286. <https://doi.org/10.1021/nn900918w>
- Yang, H., Li, Y., Li, T., Xu, M., Chen, Y., Wu, C., Dang, X., & Liu, Y. (2014). Multifunctional core/shell nanoparticles cross-linked polyetherimide-folic acid as efficient notch-1 siRNA carrier for targeted killing of breast cancer. *Scientific Reports*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep07072>
- Yee, N. S., Borgia, J. A., Semenova, E., Campbell, C. J., & Booth, B. W. (2023). The Influence of the Normal Mammary Microenvironment on Breast Cancer Cells. *Cancers* 2023, Vol. 15, Page 576, 15(3), 576. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15030576>
- Yin, P. T., Shah, B. P., & Lee, K. B. (2014). Combined magnetic nanoparticle-based MicroRNA and hyperthermia therapy to enhance apoptosis in brain cancer cells. *Small*, 10(20), 4106–4112. <https://doi.org/10.1002/sml.201400963>
- Yin, P. T., Shah, S., Pasquale, N. J., Garbuzenko, O. B., Minko, T., & Lee, K. B. (2016). Stem cell-based gene therapy activated using magnetic hyperthermia to enhance the treatment of cancer. *Biomaterials*, 81, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.023>

- Yoshida, J., Mizuno, M., & Wakabayashi, T. (2004). Interferon-beta gene therapy for cancer: Basic research to clinical application. *Cancer Science*, 95(11), 858–865. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02194.x>
- Zabihi, O., Khayyam, H., Fox, B. L., & Naebe, M. (2015). Enhanced thermal stability and lifetime of epoxy nanocomposites using covalently functionalized clay: Experimental and modelling. *New Journal of Chemistry*, 39(3). <https://doi.org/10.1039/c4nj01768d>
- Zhang, H., & Chen, J. (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*, 9(10), 1773–1781. <https://doi.org/10.7150/jca.24577>
- Zhang, L., Wang, T., Li, L., Wang, C., Su, Z., & Li, J. (2012). Multifunctional fluorescent-magnetic polyethyleneimine functionalized Fe₃O₄-mesoporous silica yolk-shell nanocapsules for siRNA delivery. *Chemical Communications*, 48(69), 8706–8708. <https://doi.org/10.1039/c2cc33472k>
- Zhao, Y., Huang, Z., & Peng, H. (2021). Molecular Mechanisms of Ferroptosis and Its Roles in Hematologic Malignancies. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.743006>
- Zhou, X., Chen, L., Nie, W., Wang, W., Qin, M., Mo, X., Wang, H., & He, C. (2016). Dual-responsive mesoporous silica nanoparticles mediated codelivery of doxorubicin and Bcl-2 SiRNA for targeted treatment of breast cancer. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(39), 22375–22387. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b06759>
- Zintchenko, A., Philipp, A., Dehshahri, A., & Wagner, E. (2008). Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjugate Chemistry*, 19(7). <https://doi.org/10.1021/bc800065f>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Kübra Solak
Doğum tarihi:
Doğum Yeri:
Uyruğu:
Adres:
Tel:
E-mail:
Eğitim
Lise:
Lisans:
Yüksek lisans:
Doktora:
Yayınlar
1. Kalakenger, S., Yildiz Arslan, S., Turhan, F., Acar, M., Solak, K., Mavi, A., & Unver, Y. (2023). Heterologous Expression of Codon-Optimized Azurin Transferred by Magnetofection Method in MCF-10A Cells. Molecular Biotechnology, 1-12. 2. Acar, M., Solak, K., Yildiz, S., Unver, Y., & Mavi, A. (2022). Comparative heating efficiency and cytotoxicity of magnetic silica nanoparticles for magnetic hyperthermia treatment on human breast cancer cells. 3 Biotech, 12(11), 313. 3. Kim, H., Solak, K., Han, Y., Cho, Y. W., Koo, K. M., Kim, C. D., ... & Kim, T. H. (2022). Electrically controlled mRNA delivery using a polypyrrole-graphene oxide hybrid film to promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Nano Research, 15(10), 9253-9263. 4. Çelik, S.Y., Solak, K. & Mavi, A. (2022) Sulfanilamide Modified Magnetic Nanoparticles for Purification of Carbonic Anhydrase from Bovine Blood. Appl Biochem Biotechnol. https://doi.org/10.1007/s12010-022-03983-9 5. Muhammad, N., Ahmad, M., Sirajuddin, M., Ali, Z., Tumanov, N., Wouters, J., ... Solak, K., ...& Al-Sehemi, A. G. (2022). Synthesis, characterization,

- biological activity and molecular docking studies of novel organotin (IV) carboxylates. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 864336.
6. Yildiz, S., **Solak, K.**, Acar, M., Mavi, A., & Unver, Y. (2021). Magnetic nanoparticle mediated-gene delivery for simpler and more effective transformation of *Pichia pastoris*. *Nanoscale Advances*, 3(15), 4482-4491.
 7. **Solak, K.**, Mavi, A., & Yilmaz, B. (2021). Disulfiram-Loaded Functionalized Magnetic Nanoparticles Combined with Copper and Sodium Nitroprusside in Breast Cancer Cells. *Materials Science and Engineering: C*, 111452.
 8. Chafik, A., Essamadi, A., Çelik, S. Y., **Solak, K.**, Mavi, A. (2019). Characterization of an interesting selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) protecting cells against environmental stress: The *Camelus dromedarius* erythrocytes Se-GPx. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Vol. 18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.038>.
 9. Cakmak, K., Bayram, Ö., **Solak, K.**, Kaban, G., Şimşek, Ö., Mavi, A. (2019). Plasma Polymerized Linalool (ppLin): An Antimicrobial and Biocompatible Coating. *Turkish Journal of Chemistry*, 43(1).
 10. Chafik, A., Essamadi, A., Yildirim Çelik, S., **Solak, K.**, Mavi, A. (2018). Partial Purification and Some Interesting Properties Of Glutathione Peroxidase from Liver of Camel (*Camelus dromedarius*), *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. Vol. 44, No. 1, pp. 41–51. <https://doi.org/10.1134/S1068162018010041>.
 11. Celik, H., Aydin, T., **Solak, K.**, Khalid, S., & Farooqi, A. A. (2018). Curcumin on the “Flying Carpets” to Modulate Different Signal Transduction Cascades in Cancers: Next-Generation Approach to Bridge Translational Gaps. *Journal of cellular biochemistry*. 1-11. DOI: 10.1002/jcb.26749.
 12. **Solak, K.**, Mavi, A., Ergon, T., Sezen, A., Algur, Ö. F. (2017). “Nanomaterials and the Microbial Sphere”, *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 9(5), 609-623.

Ödüller

1. TEKNOFEST 2023-Biyoteknoloji ve İnovasyon Yarışması, Fikir Kategorisi, Arçura Takımı, En İyi Sunum Ödülü, Atatürk Havalimanı-İstanbul-Türkiye.
2. TEKNOFEST 2023-Biyoteknoloji ve İnovasyon Yarışması, Fikir Kategorisi, Arçura Takımı, Dördüncülük, Atatürk Havalimanı-İstanbul-Türkiye.
3. Kariyer Geliştirme Odaklı Öğrenci Ar-Ge Projeleri Yarışması, 2023, Birincilik Ödülü, Atatürk Üniversitesi-Erzurum-Türkiye.