

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KANSER İLAÇLARININ TAŞINIMINA YÖNELİK
MULTİFONKSİYONEL KARBON NANOTÜPLERİN
(CNT) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE *İN
VİTRO UYGULAMALARI***

Merve YÜKSEL

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna Timur

Biyokimya Ana Bilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 04.07.2011

Bornova-İZMİR

2011

Merve YÜKSEL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Kanser ilaçlarının taşınımına yönelik multifonksiyonel karbon nanotüplerin (CNT) sentezi, karakterizasyonu ve *in vitro* uygulamalar**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 04.07.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Suna Timur	
Raportör Üye	: Doç. Dr. Cenk Selçuki	
Üye	: Prof. Dr. Serdar Özçelik	

ÖZET

KANSER İLAÇLARININ TAŞINIMINA YÖNELİK MULTİFONKSİYONEL KARBON NANOTÜPLERİN (CNT) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE *İN VİTRO* UYGULAMALARI

YÜKSEL, Merve

Yüksek lisans Tezi, Biyokimya Bölümü
Danışman: Prof. Dr. Suna TİMUR
Haziran 2011, 85 sayfa

Dünya çapında her yıl görülen 10 milyon tür rahatsızlık içinde kanser, teşhisi ve tedavisi en zor olan ve bunun yanı sıra ölüm oranının en sık görüldüğü hastalıktır. Günümüzde bu rahatsızlığın teşhis ve tedavisinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar, nanoteknoloji platformundaki yeniliklere paralel olarak ilerlemektedir [Baran et al.]. Bunlar arasında en etkili yöntemlerden biri, multifonksiyonel görüntüleme ve ilaç taşıyım sistemlerinin geliştirilmesi ile kanserli dokuya spesifik yönlendirilmiş, gerçek zamanlı görüntüleme ve tedavinin her ikisine de olanak sağlayan yapıların tasarlanmasıdır.

Bu proje kapsamında taşıyıcı olarak, fonksiyonlandığı taktirde toksik özellik göstermeyen ve yüzey alanının genişliği ile çoklu biyokonjugatların sentezlenmesine olanak sağlayan çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) kullanılmıştır. Bu tezde MCF-7 meme adenokarsinoma hücre epiteline spesifik, çok fonksiyonlu MWCNT içerikli biyokonjugatlar sentezlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, MWCNT' lerin yüzeyine, kanser hücrelerini spesifik olarak tanıyabilen estrogen reseptör antikoru (HER2), ve floresans polymer ([Polifenilen-PEG(750)]_n) yanında ayrıca anti kanser ilacı (Bleomisin) bağlanması ile çok fonksiyonlu görüntüleme/teşhis problemleri hazırlanmıştır.

Geliştirilen biyokonjugatın ve ara sentezlerin karakterizasyon çalışmaları, Raman spektroskopisi, Zeta Potansiyel, ATR/FT-IR, termal gravimetrik analiz (TGA), Atomik kuvvet mikroskopu (AFM), Taramalı elektron mikroskopu (SEM), kullanılarak gerçekleştirildi. Hücresel etkileşimlerinin incelenmesi ve floresans görüntülerinin alınması ve sitotoksikite çalışmaları hücre kültürü uygulamaları ile paralel olarak yürütüldü.

Anahtar kelimeler: Karbon nanotüp, Kanser, Hedeflenmiş taşıyım, Çok fonksiyonlu biyokonjugat

ABSTRACT**MULTIFUNCTIONAL CARBON NANOTUBE AS A NEW CANCER
DRUG CARRIER: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *IN*
VITRO APPLICATIONS**

YÜKSEL, Merve
MSc in Biochemistry Department
Supervisor: Prof. Dr.Suna TİMUR
June 2011, 85 pages

Around ten million diseases, cancer diagnosis and therapy are the most difficult cases worldwide. Also, mortality degrees are very high when it is compared with another disease. Many efforts are proceeding for investigation a new cancer diagnosis and therapy method in paralel with innovations in nanotechnology [Baran et al.]. One of the most effective method is developing multifunctional imaging and drug transport systems which are designed as specifically directed to cancerous tissue and allowing real-time imaging and treatment.

In these thesis, multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) are used as a carrier system according to their unique properties such as low toxicity when they are functionalized and having large surface area that allows varios modification on the surface. Aim of these study is developing new multifunctional MWCNT based bioconjugates for targeted breast cancer diagnosis and therapy. For this purpose, monoclonal anti-human estrogen receptor antibody (HER2), newly synthesized fluorescence polymer ([Polifenilen-PEG(750)]_n) and a chemotherapy drug (Blemycin) are attached sequentially. As a result, multifunctionalized diagnosis and therapy probs are synthesized.

Characterization studies such as, Raman Spectroscopy, Zeta potential, ATR/FT-IR, Thermal Gravimetric Analysis (TGA), Atomic Force Microskopy (AFM), Scanning Electron Microscopy (SEM) are used for both final bioconjugates and intermediate synthesis. In conclusion, applicability studies such as cell-bioconjugate incorporation test and their fluorescence microscopy images are observed according to the cell culture studies.

Keywords:Carbon nanotube, Cancer, Targeted delivery, Multifunctional bioconjugate

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecinde yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, kıymetli fikirlerinden ve bakış açısından yararlandığım, maddi ve manevi her türlü katkıyı sunan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Suna Timur'a, tezimin biçimlendirilmesinde deneysel çalışmalarına destek veren Sayın Prof. Dr. Yusuf Yağcı ve Sayın Dr. Emin İlker Medine'ye, manevi desteğini her zaman hissettiğim ve konu ile ilgili deneyimlerinden yararlandığım hocam Sayın Dr. Dilek Odacı Demirkol'a, cihaz kullanımı konusunda destek veren Sayın Doç. Dr. Mustafa Çulha'ya, çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen TUBİTAK'a ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm HOCALARIMA ve ÇALIŞMA ARKADAŞLARIMA teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, başta ANNEM olmak üzere, lisans üstü eğitim sürecince beni destekleyen AİLEM'e, nişanlım İbrahim ASLAN'a ve yanımda olan tüm DOSTLARIMA göstermiş oldukları sabır ve fedakarlık için minnettarım.

Bu çalışma 109T573 no'lu TUBİTAK projesi ve 2010 FEN 053 no'lu Ege Üniversitesi Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
KISALTMALAR DİZİNİ	XX
 1. GİRİŞ	 1
1.1 Günümüzde Kanser Hastalığı, Teşhis ve Tedavisinin Önemi.....	1
1.1.1 Göğüs kanseri	7
1.1.2 Prostat kanseri	9
1.2 Kanser Teşhisinde Kullanılan Yöntemler	10
1.2.1 Anatomi temelli görüntüleme teknikleri	12
1.2.2 Fonksiyon temelli görüntüleme teknikleri	13
1.2.3 Optik görüntüleme	16
1.3 Kanser Teşhisinde Kullanılan Yöntemler	18
1.3.2 Kemoterapi	18
1.3.2 Kriyocerrahi	19
1.3.3 Lazer terapi	19
1.3.4 Radyo terapi	20
1.3.5 Gen terapi	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.3.6 Kök hücre terapisi	21
1.3.7 Biyoterapi	21
1.4 Nanoteknoloji ve Nanoteknolojinin Kanser Teşhis/Tedavisinde Önemi.....	22
1.5 Kanser Teşhis ve Tedavisinde Kullanılan Nanomateryaller	23
1.5.1 Lipozomlar	23
1.5.2 Polimerik miseller	24
1.5.3 Dendrimerler	25
1.5.4 Nanokantilever	27
1.5.5 Karbon nanotüpler	27
1.5.6 Kuantum parçacıklar	30
2. MATERYAL ve METOD	31
2.1 Materyal	31
2.2 Cihazlar ve Sistemler	31
2.3 Metod	32
2.3.1 Çok duvarlı karbon nanotüplerin karboksil-fonksiyonel hale getirilmesi	36
2.3.2 Karboksil-fonksiyonel çok duvarlı karbon nanotüplerin floresans polimer ile kovalent olmayan modifikasyonu	36
2.3.3 f-MWCNT/[polifenilen-PEG(750)] _n floresans probunun HER-2 ve Bleomisin ile kovalent modifikasyonu	36
2.3.4 Hücre kültürü uygulamaları	37
2.3.5 Sitotoksosite çalışması	38

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.6 Floresans polimer sentez prensibi ve yapısı	39
2.4 Biyokonjugatların Karakterizasyonlarına Yönelik Çalışmalar ...	41
2.4.1 Raman Spektroskopisi	41
2.4.2 Yüzey potansiyel ölçümü (Zeta potansiyel)	41
2.4.3 Termal gravimetrik ölçüme dayalı analiz (TGA)	42
2.4.4 ATR/FT-IR	42
2.4.5 Çözünürlük testi	42
2.4.6 Floresans ölçümler	43
2.4.7 Atomik güç mikroskopisi (AFM)	44
2.4.8 Elektron mikroskopisi (SEM ve TEM)	45
2.4.9 Bradford protein tayini	45
2.4.9 Floresans mikroskop	46
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	46
3.1 Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular	46
3.1.1 Çözünürlük denemesi	47
3.1.2 Raman spektroskopisi	48
3.1.3 Termal gravimetrik ölçüme dayalı analizler	51
3.1.4 Yüzey potansiyel ölçümü (Zeta potansiyel)	53
3.1.5 Fourier transform infrared spektroskopisi (ATR/FT-IR)	54

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.6 Floresans ölçümler	56
3.1.7 Atomik güç mikroskopisi (AFM)	59
3.1.8 Elektron mikroskopisi (SEM ve TEM)	61
3.1.9 Bradford protein tayini	64
3.2 Uygulama Çalışmalarına Yönelik Bulgular	64
3.2.1 <i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları	64
3.2.2 Floresans mikroskobu ile <i>In vitro</i> görüntüleme	66
3.2.3 Sitotoksosite çalışmaları	69
4. GENEL DEĞERLENDİRME	70
KAYNAKLAR DİZİNİ	72
ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1a	Kanserli hücre yüzey karakteristiği1
1.1b	Sağlıklı hücre yüzey karakteristiği1
1.2	Kanser hücrelerinin yer değiştirmesi2
1.3	Sağlıklı hücrenin transformasyonu2
1.4a	Sağlıklı hücre bölünmesi3
1.4a	Kanserli hücre bölünmesi ve tümör oluşumu3
1.5	Kanser safhaları4
1.6	Meme dokusunun anatomik yapısı7
1.7	4. Evre kanser görüntüsü9
1.8	Kanser görüntüleme teknikleri ve hassasiyetleri11
1.9	Günümüzde kanser teşhisinin misyonu11
1.10	Gelecekte kanser teşhisi misyonu15
1.11	Optik görüntüleme tekniği18
1.12	Lipozom genel görüntüsü24
1.13	Dendrimerin genel görünümü ve jenerasyon oluşumu.26
1.14a	Diverjan yöntemi ile dendrimer sentezi26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

1.14a Konverjan yöntemi ile dendrimer sentezi	26
1.15 Tek duvarlı ve çok duvarlı (MWCNT) karbon nanotüplerin gösterimi (SWCNT)	28
1.16 Karbon nanotüplerin sitotoksik etki göstermelerinin sebepleri	30
2.1a Biyokonjugat sentezi akış şeması	34
2.1b Biyokonjugat sentezi içerik molekülleri	34
2.2 Polimer ile karbon nanotüp arasında gerçekleşen nonkovalent etkileşim	35
2.3 Sentezlenen konjugatlara uygulanan karakterizasyon yöntemleri	35
2.4 Hücre kültürü uygulama şeması	38
2.5 Suzuki çapraz kenetleme reaksiyonu	39
2.6 Yamamoto reaksiyonu	40
2.7 Floresans polimerin genel görünümü	40
2.8 Ard arda yıkamalar sonrası floresans ölçümleri alınan süpernetantlar ve pellet	44
3.1 Farklı konsantrasyonlarda f-MWCNT'lerin sergiledikleri çözünürlük karakterleri	48
3.2a MWCNT Raman Spektrumu	50
3.2b f-MWCNT Raman Spektrumu	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.2c f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n Raman Spektrumu	50
3.3 Konjugatların termal gravimetrik analiz sonuçları	52
3.4 Konjugatların ATR/FT-IR sonuçları	55
3.5 Polimerin maksimum emisyonu	57
3.6 Floresans konjugatın floresans prob özelliği	58
3.7Konjugasyonişlemleri sonrasında floresans karakter özelliği belirlenmesi...	59
3.8a f-MWCNT genel AFM görüntüsü	60
3.8b f-MWCNT üç boyutlu AFM görüntüsü.....	60
3.8c f-MWCNT AFM boyut analizi	60
3.9a f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n genel AFM görüntüsü	61
3.9b f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n üç boyutlu AFM görüntüsü	61
3.9b f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n AFM boyut analizi	61
3.10a MWCNT' lerin genel SEM	62
3.10b f-MWCNT' lerin genel SEM	62
3.10c f-MWCNT' lerin genel SEM	62
3.10d f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2 biyokonjugatının genel SEM görüntüsü	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.11a	MCF-7 adenokarsinoma epitel hücresi SEM görüntüsü	62
3.11b	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2 ve MCF-7 meme adenokarsinoma epiteli hücresi uygulaması sonrası SEM görüntüsü	62
3.12	f-MWCNT' lerin genel TEM	63
3.13	Örneklerin farklı hücre hatlarına % tutunma değerleri.....	65
3.14	Farklı hücre hatlarına uygulanan örneklerden elde edilen floresans mikroskop görüntüleri	67
3.15	Bleomisin bağlı biyokonjugatın ilaç taşınım etkinliğinin floresans mikroskop görüntüsü	68
3.16a	MTT yöntemi, sitotoksosite sonuçları	69
3.16b	WST yöntemi, sitotoksosite sonuçları	69
4.1	Tez kapsamında sentezlenmesi hedeflenen konjugatların hücresel uygulama sonuçları	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Kanser hastalarının 2005 yılına ait verileri	6
1.2 Floresans metodlar ve uygulamaları	16
2.1 Çalışma metodu ve karakterizasyon yöntemlerinin genel özeti.....	33
2.2 Floresans mikroskop görüntüsü alınan hücre türleri ve uygulanan konjugatlar	46
3.1 Raman spektrumları alınan örneklerin karakteristik bant konum, yoğunluk ve oranları	51
3.2 Örneklerin zeta potansiyel değerleri	53
3.3 Polimerin maksimum dalga boyunun belirlenmesi	57
4.1 Örneklerin hücrelere yüzdesel tutunma değerleri	64

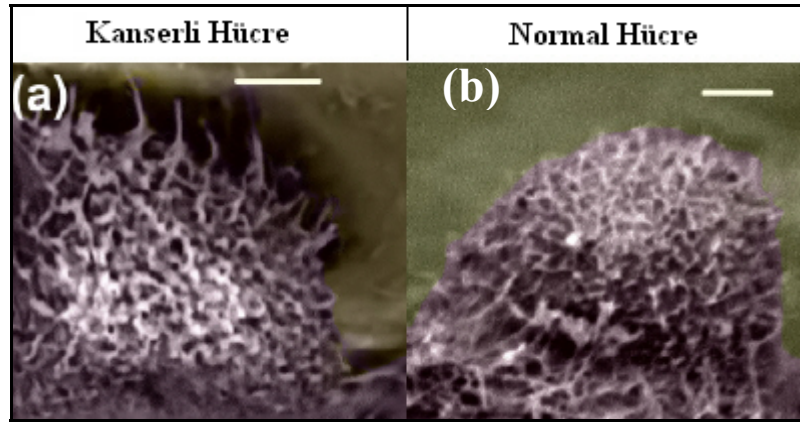
KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
CNT	Karbon nanotüp
EDC	1-Etil-3-[3-dimetil amino propil] karbodiimid
f-MWCNT	Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp
HER2	İnsan estrogen reseptörü
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
NHS	<i>N</i> -hidroksisüksinimid
PBS	Fosfat-salin tamponu
PC-3	Prostat kanseri hücre hattı
PEG	Poli Etilen Glikol
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TGA	Termal gravimetrik analiz
THF	Tetra hidro furan

1. GİRİŞ

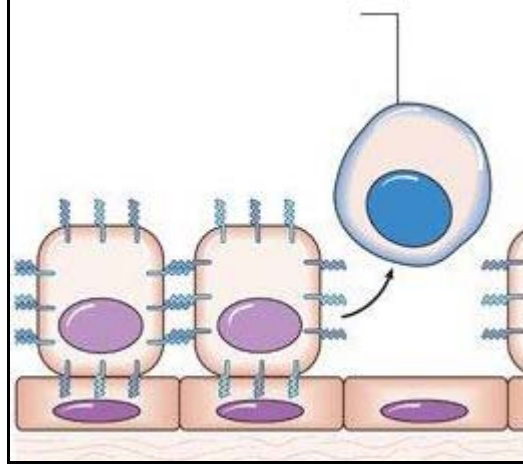
1.1 Günümüzde Kanser Hastalığı, Teşhis ve Tedavisinin Önemi

“Kanser” kelimesi Latin kökenli “yengeç” kelimesinin karşılığıdır. Eski çağlarda yunanlı bir hekim, kan damarları etrafında şişkin bir kitle gözlemlemiş ve bu yapının tıpkı bir yengeç gibi dokulara yapışarak onları zapt edercesine kuşattığını fark ederek hastalığa bu adı vermiştir (Kumar, 2007). Kanseri hücrelerin, bulundukları dokuları zapt etmiş gibi görünmesini sağlayan yüzeysel karakteristik farklılık ve sağlıklı hücre kıyaslaması şekil 1.1’ de gösterilmiştir.



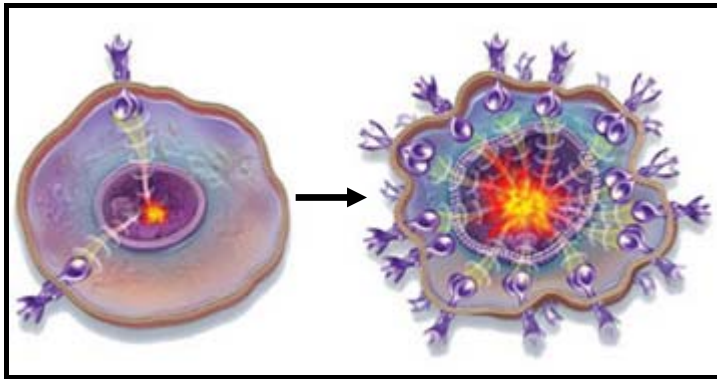
Şekil 1.1 Hücresel yüzey karakteristiği a) Kanserli hücre b) Sağlıklı hücre.

Kanseri ve oluşumunu en yalın anlamıyla tanımlamak gerekirse, kontrolünü kaybetmiş, sonsuz çoğalma kabiliyetinde ki hücrelerin oluşturduğu kitlelerdir. Kanser hücreleri kontrolsüz bölünürler, düzensiz ve aykırı hareket ederler, her birinin morfolojik yapısı sağlıklı formdaki hücresel yapının karakterinden değişkenlik gösterir. Diğer yandan ise sağlıklı hücreler, en aklı başında yapılanmalardır ve diğer tüm hücreler ile bir arada olmaktan mutludurlar. Topluluk olarak birlikte organize ve uyum içerisinde çalışırlar. Örneğin kalp hücreleri görevi olan kan pompalamayı severler, beyin hücreleri yerlerini değiştirmek istemezler. Hiç biri içinde bulunduğu dokunun, dolayısı ile işleyen mekanizmanın düzenini riske atacak girişimde bulunmaz. Kanser hücreleri ise bunların hiçbirini önemsemeyen canlarının istediğini yaparlar. Kanser hücreleri, yüzeysel tutunmayı sağlayan membran moleküllerini farklılaşma sonucu kaybederler. Bu sebeple bulundukları bölgeleri terk edip, farklı doku ve organlara hareket edebilme kabiliyetine sahiptirler (Şekil 1.2). Böylece, yeni yerlerinde hâkimiyetlerini kurmak için kontrolsüz bölünmeye devam ederler. Eğer, beyinin tam ortasında bir inşa yapmaya karar verdiler ise, bu tüm yaşamsal faaliyetlerin durması anlamına gelse dahi tam olarak yapacakları şey budur (Kumar, 2007).

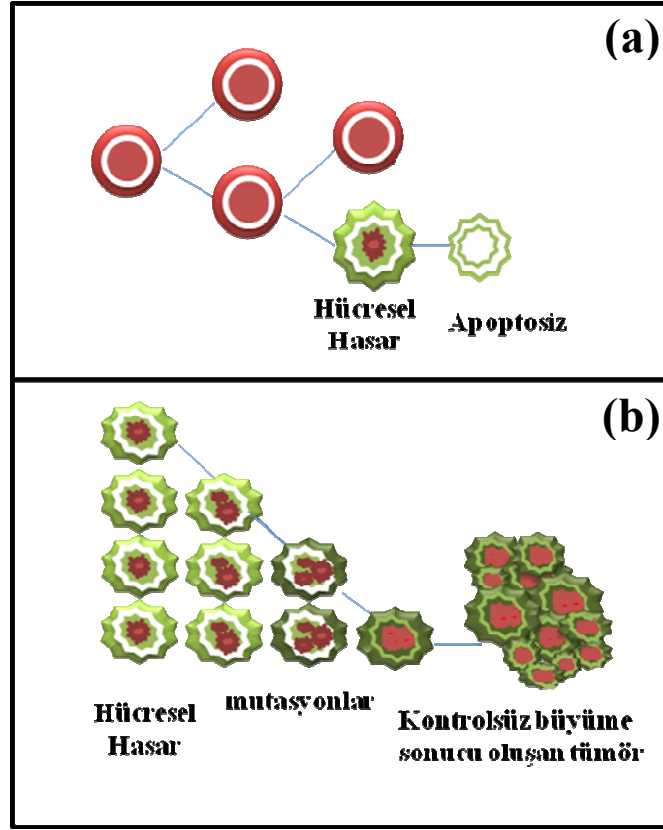


Şekil 1.2 Kanseri hücrelerinin yer değıştirmesi.

Sağlıklı hücreler “transformasyon” adı verilen proses ile kanserli hücreye dönüşürler. Transformasyon sonucu hücresel morfoloji değışir, hücre membranında var olan reseptörler ve sinyal iletim sayısı olağan dışı bir şekilde artar (Şekil 1.3). Buna paralel olarak kontrolsüz büyüme niteliğı kazanan kanser hücreler bölünmeye devam eder, sağlıklı hücrelerden farklı olarak apoptosize uğramaz ve sonuç olarak tümör oluşumu gözlenir (Şekil 1.4). Oluşan ilk tümörlü yapı büyümediğı ve vücudun diğeri noktalarına yayılma eğilimi göstermediğı sürece “benin” yani iyi huylu tümör olarak isimlendirilir. Bu tür tümörlerin tedavisi cerrahi bir operasyon ile oldukça kolaydır. Tümörler, içlerinden herhangi bir hücrenin içinde bulunduğı tümör kitlesinden ayrılarak farklı bir noktada, ayrı ve yeni tümörler oluşturabilme yeteneğı kazandığı zaman öldürücü olurlar. Metastaz eden yani farklı noktalarda oluşum gösteren bu tür yapılanmalara “malin”, kötü huylu tümör adı verilir. Bu tür kanserlerin tedavisi çok zordur. Bu aşamada kritik nokta, kanserleşen dokuların malin tümöre transforme olmadan önce teşhis edilebilmeleridir. Bu sebeple farklı evreler içinde gelişen kanserli dokuların erken safhalarında teşhis edilmeleri, aslında etkili bir tedavinin en büyük paydasını oluşturmaktadır (Gautschi et al, 2007).



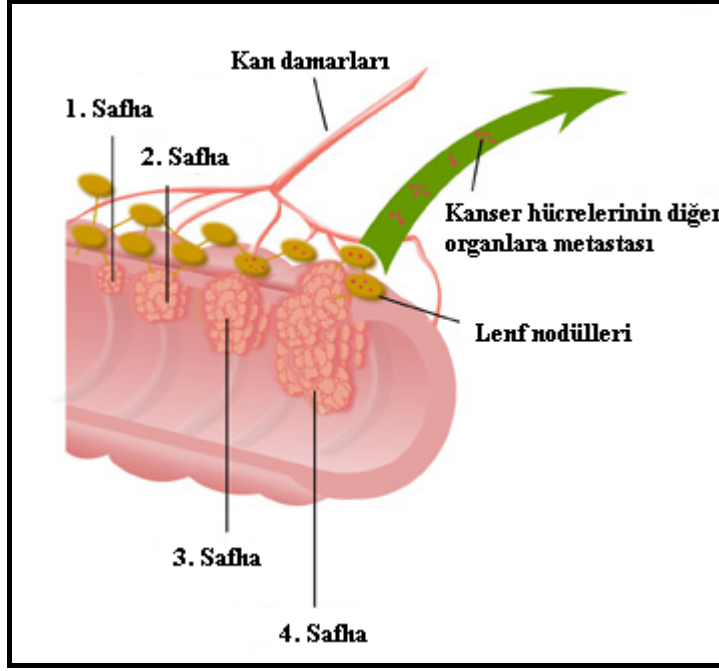
Şekil 1.3 Sağlıklı hücrenin transformasyonu.



Şekil 1.4 Bölünmenin kontrolü a) Sağlıklı hücre bölünmesi b) Kanserli hücre bölünmesi ve tümör oluşumu.

Kanser hastalığının süreci 5 aşamalıdır. Sağlıklı hücrelerde mutasyona uğrayan ve risk teşkil eden hücreler bir oto-savunma sistemi ile apoptosize uğrayarak kendilerini imha ederler. Kanserli hücreler ise bu savunma sistemi yoktur ve mutasyona uğrayan hücreler kontrolsüz bölünmelerine devam eder. Bu proses ile 0. *Safhada*; yayılımcı olmayan, yayılmaya başlamamış tümörlü kitle oluşur. 1. ve 2. *Safha*; kanserin malin tümöre dönüştüğü ve yayılmaya başladığı aşamadır. 1. *Safhada* tümörlü yapı gelişir ve yavaş yavaş komşu dokuya doğru harekete geçer. 2. *Safhada* tümör büyüse bile göreceli olarak hala küçüktür ancak yakın dokuları istilaya başlamıştır. 3. *Safhada* kanserin kapladığı hacim giderek artar, tümör boyutu büyür ve organlara yayılım başlamıştır. 4. *Safhada* kanser artık metastazik bir kanserdir ve pek çok doku ve organda gözlenir (Tu et al, 2002). Kanser safhaları şekil 1.5’de ifade edilmiştir. Malin tümör oluşumu sonrası kanser hücreleri, farklı hücresel özellikler kazanır. Malin tümör hücrelerinin karakteri niteliğindeki bu özellikler; büyüme sinyallerinde bireysel yeterlilik, apoptosize uğramamak, anjiyogenezi desteklemek, hücresel yayılım ve metastaz, sınırsız çoğalabilme potansiyelidir. Tüm bu özellikler malin tümör yapılanması sonrası kanser hücrelerinin ölümsüzlüğüne işaret eder. Bu sebeple normal hücrelerin transformasyonu sonucu oluşan kanserli hücrelerin oluşturduğu tümör yapıları ne kadar erken seviyede teşhis edilirler ise tedavi yöntemi de o derece

etkili ve uygun olur. Dolayısı ile doğru aşamada teşhis, kanser hastalığının tedavisinin birinci aşamasıdır.



Şekil 1.5 Kanser safhaları.

Kanserli dokular sistematik açıdan incelenirse, bulundukları doku ve açığa çıktıkları hücre tipine göre isimlendirilirler. Kanserli dokuların açığa çıktıkları ilk bölge birincil bölge olarak, metastaz ettiği ilk bölge ise ikincil bölge olarak isimlendirilir. Epitel hücrelerde açığa çıkan kanser türlerine “karsinoma”, bağ dokusu ya da kas dokusunda açığa çıkan kanser türlerine “sarkoma”, kan hücrelerinde açığa çıkanlara ise “lösemi” adı verilir. Cilt kanseri eğer keratin sentezi ile alakalı ise “bazal-hücre karsinoması”, ciltteki pigmentler ile alakalı ise “melanoma” adı verilmektedir (Kumar, 2007).

Kanser hastalığının teşhis ve tedavisinde uygulanan yöntemlerin ve yürütülen bilimsel çalışmaların kronolojik olarak bilinmesi, gelecekte geliştirilecek yöntemler için yol gösterici bir klavuzdur. Geçmişten bu güne ilgili varsayımları inceleyecek olursak, 1900’lü yıllarda bilim adamları kanserin sebebinin mikrobiyal enfeksiyon olduğuna inandılar. Tavukta yaptıkları çalışmalarda sarkoma türü kanserin sebebinin virüs enfeksiyonu olduğu kanısına varıldı. Ancak söz konusu kanser hastalığı ve çeşitleri insanda incelendiğinde, kanserin temel nedeninin bir virüs olması, çeşitlilik nedeni ile kabul görmemişti. Sonuç olarak, hastalığın sebebi 1970lerde rekombinant DNA teknolojisi ile tanısilana dek uzun yıllar gizemini korudu. Bu dönemde pek çok araştırmacı kansere sebep olan bu genlerin saptanmasının hiçbir yolu olmadığına inanıyorlardı. 1980’lerde bilim adamları tavukta ki sarkoma kanserini tekrardan

detaylıca incelemiş ve rekombinant DNA teknolojinde ki gelişmeleri baz alarak, ilgili virüsün kanser ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Tavuktaki kanserin indüklenmesinin sebebi olarak ilgili virüsün bir geni olduğunu belirttiler. *Src* (sarkoma) olarak isimlendirilen bu gen, kanser ile gen arasında ki bağlantının belirlenmesindeki ilk adım olarak bilinmektedir. Kansere sebep olan gen (onkogen) tanımı çok önemli olmasına rağmen yinede kanser oluşumunu tüm gerçekliği ile ifade edememekteydi çünkü kanser oluşumlarının bütünü viral enfeksiyon temelli değil idi. Bu bilmecein çözümü ise araştırmacıların *src* benzeri geni, tavuk genomunda araştırmaları ile çözüme ulaşmıştır. İlginç olarak sadece *src* genini aynı zamanda tavuk genomunda da rastlamışlar ve enfeksiyon sürecinde canlıya geçiş yaptığını belirtmişlerdi. Araştırmacılar aynı gene meyve sineğinden insan genomuna kadar rastlamışlardır. Gen haritalarının belirlenmesi ile 2003 yılından bu yana dünya çapında 60dan fazla onkogen insan genomunda saptanmıştır. Bu bilgi başlangıç aşamasında kanser oluşumu hakkında kapsamlı bir teorinin açığa çıkmasını sağlamaktadır: Kansereleşme, öncül-onkogen denilen normal hücresel genlerin onkogenlere dönüşümü ile oluşmaktadır. Onkogenler kanser oluşumuna sebep olurlar çünkü normal fonksiyonları DNA'nın sentezi, tamiri ya da hücre-hücre iletişimi gibi çok elzem hücresel proseslerin regülasyonlarından sorumlu fonksiyonları üstlenmişlerdir. Kansere hastalığı hakkındaki sayısız çalışma sonucu yalnızca onkogenlerin saptanmasına yaramamış aynı zamanda hücrenin iç dünyasının anlaşılmasına da öncül olmuştur. Bu bilgiler insanoğlunun kanser ile savaşması konusunda elinde ki cephanevidir ancak daha önemlisi, ileride ölümcül seviyeye ulaşabilecek AIDS, Alzheimer gibi hastalıklarında etkili terapilerinin geliştirilmesinde de önemli bir yol açmıştır (Panno, 2004).

Amerika Kansere Derneği'nin raporlarına göre 2005 yılında Amerika da kansere hastalığı sebebi ile 570,280 insanın öldüğü belirtilmiştir. Bu oran ilerleyen senelerde giderek artmıştır (Jin et al, 2010). Belirtilen bilgiler ve sayısal verileri ifade eden raporlar göstermektedir ki kansere hastalığı tedavi sonrası bile ölüm oranı ve hızı yüksek olan bir hastalıktır. Yine ulusal istatistiklere göre 2002 yılından 2008 yılına kadar her 100,000 insandan 470,6 beyaz, 493,6 siyahi ve 311,1 Asyalı insan kansere hastalığına yakalanmıştır. Yine eldeki istatistik verileri, vakaların 227,900 hayatının, kolon, göğüs, pankreas, akciğer gibi farklı kansere türleri sonucu ölüm ile sonuçlandığını belirtmektedir (Choi et al. 2010).

Çizelge1.1 Kanser hastalıklarının 2005 yılına ait verileri.

Kanser	Teşhis	Ölüm	% Ölüm oranı
Beyin	18,300	13,100	72
Göğüs	212,600	40,200	19
Karaciğer	17,300	14,400	83
Akciğer	185,800	163,700	88
Pankreas	30,700	30,000	98
Prostat	220,900	28,900	13
Cilt	54,200	7,600	14

Kanser hastalığı her bireyi yakalayabilir ancak risk faktörü yaş, yaşam düzeni, çevresel faktörler, beslenme kalitesi gibi etmenler ile çeşitlilik gösterir. Hastalığa yakalanan hastaların %80'i 55 yaş ve üzeri hastalardır ve sigara içenlerin akciğer kanserine yakalanma riski 20 kat fazladır. Kanser her doku ve organda oluşabilir ancak bazı dokuların riski diğerlerine göre oldukça fazladır. Örneğin, cilt hücreleri, akciğerlerdeki epitel hücreleri, sindirim yolu boyunca sisteme dahil olan organlar risk grubunun yüksek olduğu gruplardır. Çünkü bu yapılanmalar dış çevre ile birebir temas eden birincil yapılardır ve bir denizci gibi fırtına ile karşılaşıldığında zarar görebilecek ilk yapılardır.

Cilt hücreleri her gün güneşten dolayı belli bir seviyede UV ışığa ve çok çeşitli çevrede bulunan kimyasallara maruz kalır. Akciğerler, nefes alış veriş ile birlikte vücuda oksijen sağlar iken havada bulunan çeşitli zararlı gazları da alır. Sindirim sistemi üyeleri ise direkt olarak besin maddeleri ile temas ettiği için ve pek çok besin maddesinde sağlığı tehdit eden mutagenez ya da karsinogenez olarak bilinen katkı kimyasalları bulunduğu için diğer organlara göre etkilenme olasılıkları yüksektir. Beyin, göğüs ya da prostatta oluşan kanserlerin direkt çevreyle ilişkileri olmasa da bu dokularda kanser oluşumu genetik faktörlerin bir sonucudur, bu sebeple erken teşhis edilmeleri hastalıktan korunmanın önemli bir aşamasıdır.

Kanser tedavisinde, kullanılan kemoterapi, lazer terapi gibi geleneksel yöntemler kanserli dokuya spesifiklik göstermemektedir. Kanser kemoterapi ilaçları hızlı bir şekilde sağlıklı hücreleri de hedef almakta ve ciddi boyutta hasta vücudunda hasara neden olmaktadır [Jain et al.]. Bu amaçla hastalığın tedavisinde iyileştirilmeye gidilecek en önemli nokta yalnızca kanserli dokuyu hedef alacak kanser ilacı taşıyıcılarının geliştirilmesidir.

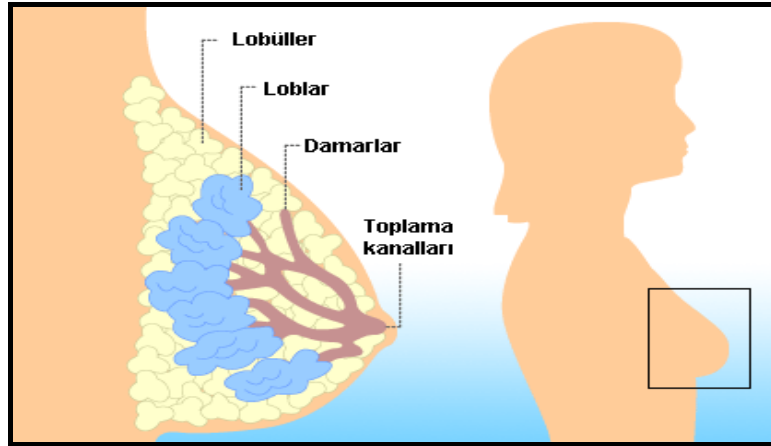
Tez kapsamında üzerinde durulan ve çalışmaların yürütüldüğü iki kanser türü, göğüs kanser ve prostat kanseridir.

1.1.1 Göğüs kanseri

Akciğer ve kolon kanserinden sonra en çok rastlanan kanser türüdür. Her yıl farklı ülkelerde 200,000 yeni vaka teşhis edilmektedir. Bunun yanı sıra yalnızca bayanlarda değil yıl içinde 2000 erkek bireyde de göğüs kanseri hastalığı saptanmıştır. Bu kadar sıklıkla rastlanan bu kanser türünün erken teşhis ve tedavisi, bu amaçla yeni yaklaşımlar geliştirilerek hasta hayatlarının kurtarılması bu amaçla oldukça önemli bir görevdir (Panno, 2004).

Anatomisi,

Her göğüs, her birinde fazlaca lobül içeren ve 15-20 adet lob denilen bölümden meydana gelir. Lobüller içerisinde sütün üretildiği küçük yuvarlak yapılardır. Göğüsde kas kütlesi yoktur ancak alt tabakasında bulunan kaburga yüzeyi, kas ile kaplanmış durumdadır. Göğüsler aynı zamanda kan damarlarını içerirler. Pek çok lenf düğümü, göğüs çevresinde ve koltuk altında bulunur. Göğüs kanserinde sıklıkla rastlanan kanser türü, düğümlerde görülen karsinomadır. Diğer ise lob ve lobüllerde görülür.



Şekil 1.6 Meme dokusunun anatomik yapısı

Risk Faktörleri,

Her iki türde ki göğüs kanserinin üç temel risk faktörü vardır. Bunlar; BRCA1 ve BRCA2 genlerinde ki genetik mutasyonlar, esterojen hormon dengesizliği ve geç doğum. Göğüs kanseri genlerinde kodlanan 1 ve 2 no'lu genler proteinleri kodlamaktadır ve bu proteinler hücresel döngüde DNA sentezi ve DNA yapısındaki hataların düzeltilmesinden sorumludurlar. Esterojen hormonu, göğüsün normal anatomik yapısı dolayınca üretilir ancak ilerleyen zamanlar içerisinde damarda ki hücrelerin transforme olmasına sebep olabilir. Geç

doğum ile göğüs kanseri arası bağlantı ise hala açıklığa kavuşmamıştır (Panno, 2004).

Semptomları,

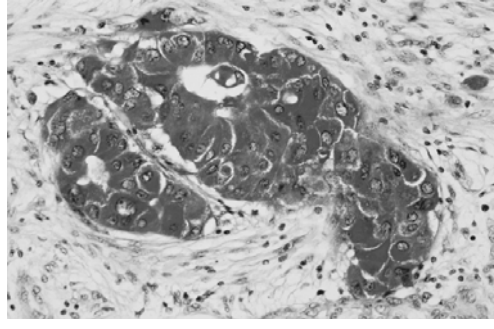
Erken evrelere herhangi bir ağrı ya da şekil/reng bozukluğu gözlenmemektedir. Dolayısı ile algılanması güçtür.

Teşhisi,

Klinik göğüs araştırmaları ile günümüzde teşhis edilebilmektedir. Örneğin, mamografi, biyografi bunlardan birkaçıdır. Klinik uygulamalar yalnızca kanserli kitlenin lokasyonunun teşhis edilmesi için uygulanmaktadır. Mamografi X-ışınlarını kullanarak ilgili dokunun resmini alır. Alınan görüntüler şüphe uyandırıcı olur ise ilgili lokasyondan biyopsi sonucu alınan parça mikroskop altında incelenir. Görüldüğü üzere hastalığın teşhisi için bireysel şüpheyeye düşmek, erken evrelerde belirti göstermediği için güçtür. Bireylerin belirli sıklıklar ile sağlıklı dokulara da zarar veren X-ray ışınlarına maruz kalması gerekmektedir. Buda hekimlere birebir doğru bilgiyi vermez ve biyopsi uygulaması yapılır. Dolayısı ile hastalığın hem erken evrelerde teşhisi hem de istenen sıklıkla kontrol altında tutulması için daha etkili ve sıkıntı yaratmayan teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi çok önemlidir.

Safhaları,

0.Safha yan doku ve organlara yayılım eğilimi göstermeyen karsinoma safhasıdır. 1. ve 2. safha da ise kanser loblara, kanallara ve yakın dokulara doğru yayılıma başlar. 1. safha da kanser hücreleri hala göğüsün içindedir ve boyutları bir inç geçmemiştir. Ancak 2. safha da tümör koltuk altı lenf nodüllerine doğru yayılır. Eğer tümör iki inç boyutuna ulaşmış ise ve hala yayılımcı bir eğilimde değil ise hala 2. safhanın başındadır. 3. safha artık kanserin ileri seviyeye ulaştığı aşamadır ve tümörlü kitle 2 inç büyüklüğünü aşmıştır, lenf nodüllerinde de kitleler oluşturmuştur. 4. safha da artık dokusal anlamda değil, yayılım organ bazında gerçekleşmiştir ve bu durumun tedavisi sistematik işlevsel bozukluklar nedeni ile imkansız yakındır (Panno, 2004).



Şekil 1.7 4.evre göğüs kanseri görüntüsü

1.1.2 Prostat Kanseri

Prostat kanseri erkekler arasında ki en yaygın kanser türüdür. Prostat kanserinden etkilenen erkeklerin sayısı göğüs kanserinden etkilenen bayanların sayısına eşittir ancak ölüm oranı prostat kanserinde daha düşüktür.

Anatomisi,

Prostat glandları erkek üretim sisteminin bir parçasıdır. Bu yapılanmada seminal sıvının bir kısmı sperm ile birlikte depolanır. Prostat glandları erkek seks hormonu testosteron ile regüle edilir. Prostat, üriner sistemin üstünü kaplar ancak idrar kanallarından ayrıdır. Yerleşimi sebebi ile prostatın anormal büyümesi üretrayı sıkıştırır ve idrarın akışına engel olur.

Risk Faktörleri,

Yaş, genetik yapı, beslenme alışkanlığı temel risk faktörleridir. Genellikle 55 yaş üstü erkek bireylerde sıklıkla rastlanır. Hastalarda teşhis edildiği yaş ortalama 70dir. Genetik yatkınlık hastalığın ilerleyen yaşlarda gözleneceğinin birincil göstergesidir. Siyahi insanlarda beyaz insanlarda görüldüğünden daha sıklıkla görülmektedir. Yapılan çalışmalara dayanarak elde verilen göstermektedir ki, meyve ve sebzeye dayalı beslenme alışkanlığı prostat kanserinde riski düşüren bir etmendir.

Semptomları,

Bilinen belirtiler genellikle ürün sistemle ilişkilidir. Özellikle geceleri, sık idrara çıkma, başlangıçta idrarın güçlükle yapılması, ağrı ve yanma hissi, son aşamada idrarın yapılamaması, idrar akışının kesilmesi, acılı ejakülasyon, idrarda kan görülmesi hastalığın belirtileridir.

Teşhisi,

Dijital rektal muayene (DRE) ve prostat spesifik antijen (PSA) için kan testleri prostat kanserinin teşhisinde kullanılan yöntemlerdir. DRE yöntemi acı veren ve rahatsızlık veren bir yöntemdir. Kan testlerinde ise işleyen mantık yalnızca kanserli hücrelerin bulunduğu ortamlarda prostat spesifik antijenin bulunması dolayısı ile hastalığın teşhis edilmesidir. PSA bir semen proteindir ve prostatta üretilir. Normal koşullarda asla kanda bulunmaz. Eğer kan tahlilleri PSA için pozitif sonuç verir ise prostat kanserinin güçlü bir kanıtıdır. Ancak bu teşhis diğer teşhislerde olduğu gibi ileri safhalarda teşhis imkanı sağlamaktadır (Panno, 2004).

1.2 Kanser Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

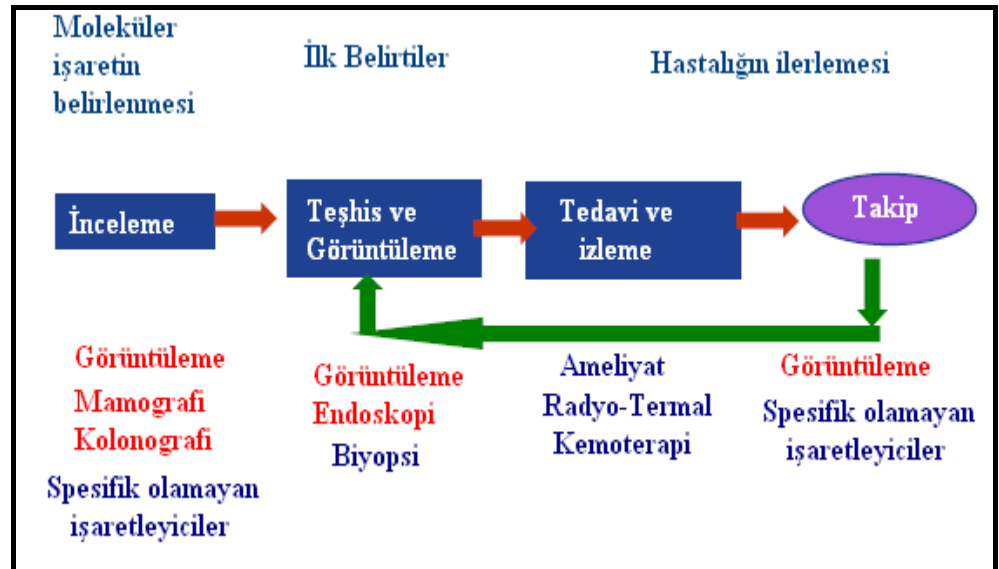
Kanser teşhisi, tümör hücrelerinin türünün ve anatomik olarak malin orijinin yerinin detaylı saptanmasını ifade eder. Kanser varlığının öncül belirtileri diğer hastalık semptomlarına benzeyebildiği ve erken evrelerinde herhangi bir belirti göstermediği için hastalığın algılanması çoğu tür için imkansızdır. Örneğin, kilo kaybı ile mide/karın ağrısı, mide kanseri ve ülser hastalığının ortak belirtileridir. Bununla beraber, kanserli dokunun histolojik türü, sınıfı, derecesi gibi hastalık için en iyi tedavinin seçilmesinde şart olan detaylı bilgilerin saptanması, günümüzde biyopsi adı verilen uygulama ile yapılmaktadır. Biyopsi, ileri görüntüleme teknikleri ile yalnızca kanserin varlığını saptamaz aynı zamanda birincil ve ikincil kanser bölgelerini belirler.

Erken kanser teşhisi, uygun tedavi ile birlikte milyonlarca yaşamı hayata bağlayabilir. Kanser hastalığının erken evrelerdeki teşhisi oldukça güçtür ve bu sebeple günümüzde üzerinde yoğun ilgi ile çalışılan bir alandır. Eğer kanserli doku vücut yüzeyine yakın bir konumda ise biyopsi yöntemi ile alınan parça sonrası doku hakkında kolaylıkla patolojik fikir sahibi olunabilir. Bununla birlikte, eğer tümörlü doku biyopsi için uygun bir konumda değil ise biyopsi için tümör bölgesini tayin edecek bir görüntüleme tekniğine ihtiyaç vardır. Geleneksel olarak kullanılan bu yöntemler, CT, MR, PET, CT(SPECT), US ve optik görüntüleme yöntemleridir. Ancak bu yöntemlerden yalnızca optik görüntüleme, mikroskopik seviyede ve ilk safhalarda teşhis edebilme potansiyeli sahiptir. Bu sebeple günümüzde yürütülen çalışmalar, ileri seviyede erken teşhisi sağlayacak cihaz ve yöntemlerin geliştirilmesi üzerinedir. Genel anlamda görüntüleme yöntemleri, işlevleri, hassasiyetleri Şekil 1.8 'de özetlenmiştir. Şekle göre, PET ve NM (nükleer ilaç) teknikleri klinik uygulamalar arasında en hassas olan yöntemlerdir. Hassasiyetleri nanomol/kilogram ve pikomol/kilogram arasında değişmektedir. CT gibi X-ışınları sistemleri milimol/kilogram hassasiyeti gösterirken MR 10 milimol/kilogram hassasiyeti göstermektedir.



Şekil 1.8 Görüntüleme teknikleri ve hassasiyetleri.

Biyomedikal görüntüleme kanserin görüntülenmesinde uygulanan en etkili yöntemlerin başında gelir. Gerçek zamanlı görüntüleme, dokulara hasar vermeden ilgili alana erişme, ilgisiz dokulara minimal hasar verme ve farklı zaman ve boyut aralıklarında uygulanabilme gibi avantajları vardır. Bahsedilen zaman dilimi bir proteinin bağlanması için geçen milisaniyeden kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için geçen yıllara kadar ölçeklendirilebilir. Boyut skalasında ise aralık moleküler yapıdan hücreye, hücreden organa ve tüm organizmaya gidebilir (Fass, 2008). Günümüzde kanser görüntüleme rolü şekil Şekil 1.9 'da gösterilmektedir ve mantığının temeli görüntüleme ve hastalığın bazı belirgin göstergelerinin görülmesi üzerinedir.



Şekil 1.9 Günümüzde kanser teşhisinin misyonu

Günümüz modern onkoloji görüntüleme sistemleri, düzenli kontrol altında belirti göstermeyen kanserli dokuların saptanmasında, biyopsi sonucu patolojik

dokunun malin ya da benin tümör olup olmadığının belirlenmesinde, kanserin boyut/bölge/safha özelliklerinde ve tedavi süreci komplikasyonları hakkında bilgi verebilmektedir. Hedeflenen tekniklerden en büyük farkı ise yapılan tüm analizlerin spesifiklikten yoksun olmalarıdır. Genel olarak uygulanan yöntemler girişimci değildir ancak günümüzde önemli verilere ulaşılabilmesi için endoskopi, girişimsel radyoskopi, girişimsel görüntüleme gibi tekniklere başvurulabilmektedir. Endoskopi, onkolojide sıklıkla kullanılan kanser teşhis yöntemidir. Tümörlü dokudan örnek alınarak patolojik sonuçları incelenir. Endoskopik teşhis yöntemleri, kolonoskopi, laparoskopidir.

Teşhis amacı ile görüntüleme yöntemleri iki ana başlık altında sınıflandırılabilir;

- a) Anatomi temelli (US, X-ışınları, CT, MRI)
- b) Fonksiyon temelli (MRS, 2D RI, SPECT, PET)

Bahsedilen bu yöntemler girişimci olmayan anatomi teşhis ve fonksiyon hakkında bilgi veren yöntemlerdir.

1.2.1 Anatomi temelli görüntüleme teknikleri

1.2.1.1 Ultrason (US)

Anatomi temelli görüntüleme tekniği yaklaşımlarının en temelidir. Görüntü oluşturabilmek için yüksek frekanslı yansıtıcı ışın demetini kullanır ve uygulaması en yaygın olan yöntemdir. Yöntem var olan lezyonları, bunların doğasını ve boyutunu (katı/kist) belirler. Biyopsiler için gerçek zamanlı görüntülerin elde edilmesinde önemli bir tekniktir ve özellikle prostat kanseri teşhisinde US- yönlendirmeli biyopsi yöntemi sıklıkla kullanılır. Safha teşhisi köklü lezyonlarda daha doğru belirlenir ve özellikle göğüs, tiroid, lenf nodülleri gibi bölgelerde yine sıklıkla kullanılır.

1.2.1.2 Geleneksel x-ışınları

Teşhis için kullanılan en geleneksel olmasına rağmen en önemli yöntemlerden biridir. Özellikle akciğer kanseri, kemik metastazları için doğru sonuçlar verir. Mamografi, yalın X-Ray ışınlarının kullanıldığı göğüs kanseri teşhis yöntemidir.

1.2.1.3 Bilgisayarlı Tomografi (CT)

Onkolojinin temel görüntüleme yöntemidir. CT, çoğu kanser türevi için girişimci olmayan, X-Işınları temelli anatomik görüntüleme yapılmasına imkan sağlar ve aynı zamanda biyopsi, endoskopi gibi girişimci uygulamalar için rehber niteliğindedir. Tetkik sırasında tümör görseelliğinin kalitesini geliştirmek için oral ya da damar içi yoldan zıtlık sağlayıcı ajanlar hastaya uygulanır. Yeni spiral tarama yöntemi ile CT tekniğinin hızının etkinliğinin artmış olması önemli bir avantajdır. Yeni CT tarayıcılar, 3D ve sanal görüntüleme, endoskopi ile karşılaştırma gibi çok düzlemsel sonuçları bir arada verebilmektedir. CT tarama yönteminin uygulanabildiği bölümler şu şekildedir: göğüs kafesi elemanları, karaciğer, safra kesesi, pankreas, böbrekler, böbrek üstü bezleri, kolon.

CT, modern radyoterapi yöntemi planlamalarında da temel mantık açısından modern bir tekniktir. Radyasyon dozu yalnızca CT tarama sonrası görülen görüntüler doğrultusunda hesaplanabilmektedir. CT yöntemine ek diğer görüntüleme yaklaşımları ile birlikte tümör ve organ bazında görüntüleme daha iyi bir şekilde yapılabilmektedir.

1.2.1.4 Magnetik rezonans görüntüleme (MRI)

Elektromanyetik spektrumun, radyo frekans aralığının dokulardaki enerjisinin soğurum ve saçılım değerleri arası farkları temel olarak görüntülemeye yarayan tekniktir. MRI, mükemmel doku çözünürlüğü, çoklu düzlemsel sonuç yeteneği, ileri seviye doku görüntü ışığı zıtlığı gibi çok önemli avantajları yanı sıra, kemikteki tümörler için özelliklerinin belirlenmesi ve tanımlamanın yetersizliği gibi dezavantajlara sahiptir. Beyin, iskelet kası, boyun, göğüs, prostat, böbreküstü bezleri gibi bölgelerde görüntü alabilir. Karaciğer ve solunum olayı nedeni ile karın üstü bölgelerde uygulanması kullanışlı değildir. Bunun için özelleşmiş bir teknik kullanılır. MRI diğer yöntemlerden farklı olarak özellikle beyin ameliyatlarında öncül görüntüleme tekniği misyonunu üstlenmiştir.

1.2.2 Fonksiyon temelli görüntüleme teknikleri

Fonksiyonel görüntüleme anatomik görüntüleme ile kıyaslandığında tümörün erken teşhisi ve tedaviye cevabı gibi konularda çok önemli avantajlar sağlar. Aynı zamanda hastanın tedaviye cevabının öngörülmesinde etkili bulgulara ulaşımı sağlar. Avantajlarının yanı sıra fonksiyonel metotlar, anatomik görüntüleme metotları yanında onkolojide temel yaklaşımlara sahiptir. Fonksiyonel görüntüleme yaklaşımının günümüz onkolojisinde kullanımı şu alanları içermektedir: tümör teşhisi, safha, farklı teşhislerin yapılabilmesi için ek bilgiler, tedaviye cevabın değerlendirilmesi, tümörün gerileyişinin tayin edilmesi.

1.2.2.1 Radyoaktif görüntüleme (RI)

Yöntemin uygulanabilirliği için radyoaktif işaretli bir ajanın damar içi ya da oral yoldan kullanılması gereklidir. Bu radyoaktif izotop bozulur ve gama kameralarınca yakalanan gama ışınları yayar. Sonuçta elde edilen görüntü saçılan izotopların yansımından elde edilir. Bu yöntem, başlatıcı ligandın türüne bağlı olarak kısıtlı anatomik çözünürlüğe dayalı bilgiyle birlikte genellikle yeterli fonksiyonel bilgi verir. İzotopların çoğu tümör spesifik olmak yerine organ ya da reseptör spesifiktir ancak literatürde tedavi uygulaması sonrası yalnızca tümörün görüntülenebileceği gallium temelli işaretleyiciler üzerinde çalışılmaktadır. Geleneksel medikal görüntülemede 2 adet temel ışın yayımlayıcı mevcuttur. Tek-foton yayımlayıcı, 2D radyoaktif taramada, SPECT ve PET yöntemlerinde kullanılır (Sun H, 2005).

2D Radyoaktif Tarama,

Işıma vücut içindeki radyoaktif ajan tarafından yayılır ve bir yada iki dedektör yardımı ile gama kameralarınca görüntüler alınır. Ardından bilgisayar yeniden yapılır ve taranan alandaki radyoaktif ajanın konsantrasyon ve ışın saçılımını yansıtarak 2D görüntü üretir. Tek-foton görüntüleme için, özellikle kemik ve tiroid için kullanılan genel izotop ^{99m}Tc kodlu Teknesyumdur. Kemikte metastaz sonrası hasar görmüş, enfekte olmuş travmatik alanları taramayarak açıklığa kavuşturur. Tiroid taraması hem anatomisi hakkında hem de teşhis ve tedavisinde önemli olan fonksiyon hakkında önemli bilgileri görünür kılar.

SPECT,

Geleneksel 2D radyoaktif tarama yöntemine göre oldukça benzer. Aynı radyoaktif işaretleyiciler ve gama kameralarında algılanan gama ışınları kullanılır. Ancak, SPECT yöntemi 2 boyutlu resimlerin 3 boyutlu farklı açılardan yararlanılarak alınan çoklu verilerinin kullanarak oluşturur. Onkolojide karaciğer taramalarında, nöro-onkolojide ve lenf taramalarında sıklıkla kullanılır.

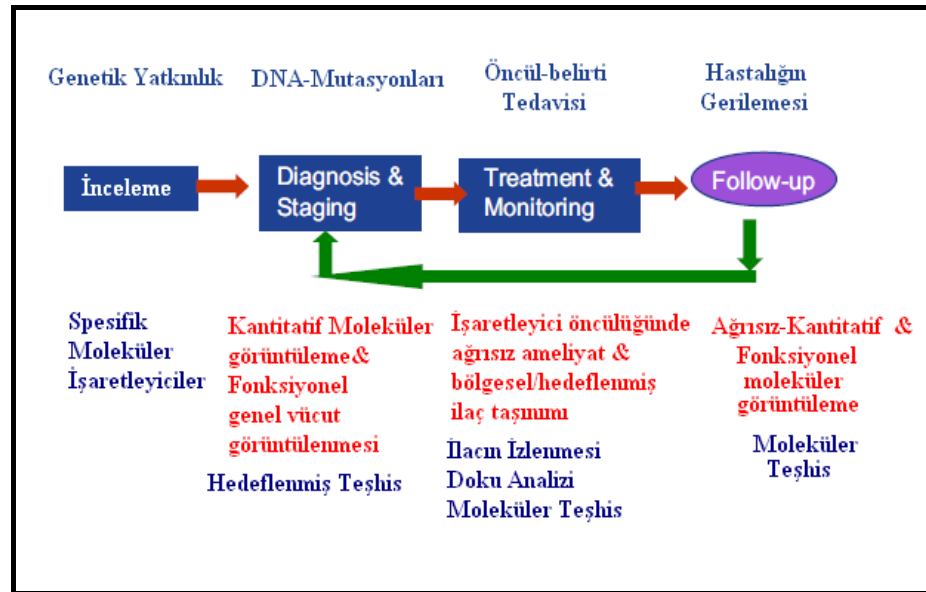
PET,

Klinik uygulamalarda ki en hassas fonksiyonel görüntülerin elde edildiği yöntemdir. Anatomik yapı farklanmasını teşhis eden CT ve MRI'dan farklı olarak, tümörlü yapının moleküler ve biyokimyasal proseslerini temel alarak anatomik yapı bozulmadan önce erken teşhise olanak sağlayan yöntemdir. Kan akışı ve reseptör durumları hakkında da bilgi verir. PET yönteminin prensibi, iki gama ışınının rastlantısal olarak karşılaşan iki gama ışını ile proton ve elektronun

imhası sonucu yayımların tespitine dayalıdır. En bilinen ve kullanılan PET radyoaktifler; ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O ve ^{18}F 'dir. ^{18}F radyoaktif işaretinin göreceli yarı ömrü 110 dakikadır. Bu sebeple ^{18}F -florodeoksiglukoz (^{18}F -FDG) PET görüntüleme tekniği için eldeki en kullanışlı işaretleyicidir.

Çeşitli tümörleri görüntüleme teknikleri çoğunlukla bulundukları safhanın saptanmasını amaçlar. Örneğin PET görüntüleme tekniği ile, akciğer kanseri safhası, CT tekniğinde genellikle benin olarak tanımlanan lenf nodüllerindeki ve pankreastaki tümörlerinin gerçek karakteri belirlenebilir ve birincil ve ikincil bölge tespiti yapılabilir. Aynı zamanda ^{18}F -FDG radyoaktif işaretleme ile cilt kanseri metastaz bölgeleri saptanır. PET/CT yöntemlerinin ikisinin kullanıldığı görüntüleme teknikleri daha hassas sonuçlar vermektedir. Yinede bu geleneksel yöntemlerin tamamında pozitif ve negatif hata payları vardır (Shim et al, 2004).

Kanser görüntülemenin gelecekte rolü ise şekil 10'da ifade edildiği üzere geleneksel yöntemlerden farklı olarak, öncül-göstergelerin belirlenmesi ve yalnızca kansere hedeflenmiş tedavileri kapsamaktadır. Erken teşhis kanser hastalığı ile ilgili ölüm oranını düşüren ve başarılı tedavi oranını arttıran temel faktördür.



Şekil 1.10 Gelecekte kanser teşhisinin misyonu.

Biyomedikal görüntüleme kanserin tüm evrelerinde çok önemli verilere ulaşmayı sağlar (Ehman et al., 2007). Bunlar, doğru tahmin, inceleme, teşhis için kolay biyopsi, safha, sonuç öngörüsü, tedavi planlaması, tedavi de izlenecek yol, tedavinin yanıtı, nüksetme ya da gerilemedir

1.2.3 Optik görüntüleme

Optik görüntüleme, görüntüleme aracılı tedavinin geliştirilen en son türüdür ve dokulardan ışık fotolarının geçişini tespit eder. Hastalığın görüntülenmesini, seyrinin izlenmesini ve tedavisini girişimci olmayan bir yaklaşımla yürütür. Yöntemde optik görüntünün alınabilmesi için floresans özellikli ajanlara ihtiyaç vardır ve aslında günümüzde yürütülen çalışmaların büyük yüzdesi bu özellikli ajanlarının sentezini ve özelliklerinin geliştirilmesini kapsamaktadır. Başlangıçta bu amaç için kullanılan floroforlar, floresans boyalar, biyo-lümünesans ve floresans proteinler idi. Ancak günümüzde ilerleyen çalışmalar ile birden fazla özelliği bir arada bulunduran çok fonksiyonlu biyo-konjugatlar optik görüntülemenin yapılabilmesi için geliştirilmektedir. Özellikle floresans/nano parçacıklar, sahip oldukları özellikler ile görüntüleme aracılı tedavi için en çok umut vaat eden adaylardır. Yöntemin hassasiyeti geleneksel yöntemler ile kıyaslandığında sinyal iletimi izlenmesine kadar görüntülenebilecek en hassas ve etkili yöntemdir (Rosenthat et. al, 2009). Optik görüntüleme de kullanılan yöntemler, uygulamaları, sınırlandırma ve kısıtlamaları çizelge 1.2' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Floresans metotlar ve uygulamaları

METOD	UYGULAMA	SINIRLAR/ KISITLAMALAR
Floresans Mikroskopisi	Dokularda florofor lokalizasyonu, geniş bir alan taramasında, düşük ölçekleme ile saptanır. Global değerlendirme ve görüntü geniş doku kesitlerinden alınır. Potansiyel bölgelerin ayrıntılı çalışmaları için yüksek çözünürlük gerektirir.	Işık kaynaklı beyazlama ve ışın dağıtıcı nedeni ile x-y düzlemlerinde kısıtlı çözünürlük. Kalın dokularda kısıtlı penetrasyon. Yaşayan hücrelerin ışık saçılımından hasar görmeleri.
Konfokal Mikroskopi	Dokularda florofor lokalizasyonu. Yapının üç boyutlu morfolojik yapılanmasının ve iskeletinin belirlenmesi. Kalın dokular için makul penetrasyon. X-y düzlemlerinin 200-300nm çözünürlük limiti. FRAP, FRET ve FLIM çalışmalarına uygunluğu.	Z-düzlemi çözünürlüğünün 500nm'de kısıtlı kalması. Floroforun beyaz ışık salınımı ve yüksek yoğunlukta eksitasyon ışığı ile hücrelerin hasarı

Multifoton Mikroskopi	Yapının üç boyutlu morfolojik yapılanmasının ve iskeletinin belirlenmesi. FRAP, FRET ve FLIM çalışmalarına uygunluğu. Yaşayan hücreler için hasar potansiyelinin düşüklüğü. Kalın dokular için iyi penetrasyon derecesi. 200-300nm x-y düzlemi çözünürlüğü.	500nm'den daha düşük olmasına rağmen z-ekseninin çözünürlüğünün azlığı.
Floresans immünohistokimya	Floresans işaretli antikorlar ile hücre içindeki yada dokudaki protein lokalizasyonlarının belirlenmesi. İşaretlemenin yaşayan hücrelere uygulanabilir olması.	Çoklu proteinlerin görüntülenmesi floresan uyarma ve ışık dalga boylarının birbirinden iyi bir şekilde ayrı olmasına bağlıdır. Antikoru spesifikliğinin kontrolü gerekir.
FRAP (Foto ışık Sonrası Geri kazanım Floresansı)	Floresans molekülün yaşayan hücrelerine difüzyon özelliğinin çalışılması. Bağlanma/ayırma sabitlerinin belirlenmesi	Yüksel uyarma ışını nedeni ile hücrelerin hasarı. Uyarma ışını yoğunluğunun kalibrasyon gerekliliği
FRET (Floresans Rezonans Enerji Transferi)	Bazı durumlarda yaşayan hücre ve dokuda işaretli protein eksprese olur. Bu, tek protein ya da iki protein arasında etkileşim sonrası konformasyonlarının değişimlerinin belirlenmesinde kullanılır.	En az 30 tekrar gerektirir. Her seferinde kullanılan floresan kalibrasyonu gereklidir.

Optik yöntemler çoğunluklu olarak öncü-klinik moleküler görüntüleme amacıyla kullanılmaktadır. Hassas dış kamera sistemleri kullanılır ve vücuttan gelen ışığın saçılımını algırlar. Şekil 11'de gelecekte öngörülen cihaz ve işlem göğüs ve lenf nodülleri kanseri için şematize edilmiştir. Işık ya bahsedilen floresans işaretleyiciler tarafından ya da biyoluminesans reaksiyonları sonucunda açığa çıkar. Optik görüntüleme yöntemleri hem görünür bölge ışığını hem de UV dalga boyu ışığını kullanılır (Hayat et al, 2008). Optik görüntüleme yöntemleri geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında, derin dokusal görüntüleme çok açık, basit ve ölçülü maliyete sahiptir. Ayrıca, NI-floresans moleküler tomografi (FTM) gibi yeni geliştirilen cihazlar insan vücudunda cerrahi müdahale gerektirmeden tedavini izlenmesi için uygun yöntemlerdir (Wessleder and Ntziachristos, 2003).



Şekil 1.11 Optik görüntüleme tekniği

1.3 Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

1.3.1 Kemoterapi

Bazı ilaçlar kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edebilir ya da onları öldürebilir. İlaçlarının doğasının farklılıkları kanserin türüne, vücuttaki lokasyonuna, normal vücut fonksiyonların olan etkisine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişir. Genellikle, günümüzde kullanılan kanser ilaçları, DNA'yı hasara uğratar, DNA ve RNA sentezini engeller ya da mitotik döngüyü bozar. Ancak aynı zamanda normal fizyolojik hücrelere de etki göstererek hormon reseptörlerinin sentezini bloke eder. DNA'yı hedef alan ilaçlar DNA'yı kimyasal olarak zarara uğratar ve DNA replikasyonunu ile RNA transkripsiyonunu durdurur. Bazı durumlarda bu ilaçlar hasarlı mRNA'nın üretimine yol açarlar ve bu durumda ilgili protein sentezlenmez. Bu ilaçlara örnek olarak cis-platin, Doxorubicin verilebilir (Panno, 2004).

Kemoterapi ile kanser tedavisinin çok fazla yan etkisi vardır ve hasta fizyolojik ve psikolojik olarak tedavinin kendisinden bile büyük zarar görür. Örneğin, aşırı derecede halsizlik, mide bulantısı/kusma, saç dökülmesi, ağrı, anemi, kolay enfeksiyon riski, kan pıhtılaşma problemleri gibi pek çok ciddi yan etkiler göstermektedir (Mead et al, 1982). Buna rağmen sistemik kemoterapinin bazı avantajları vardır. Örneğin, yöntem cerrahi operasyon öncesi uygulanan birincil tedavidir ve özellikle ileri safhalarda ki tümör yapılarının tedavisi için bir umuttur (Hortobagyi et al, 1988). Uzun süreli uygulanan tedavi için ise hastalıktan kurtulma şansı ilerleyen zaman dilimlerinde düşmektedir ancak özellikle çoğu göğüs kanseri uygulamalarında tümör boyutunda küçülme olduğu saptanmıştır (Bonadonna et al, 1996). Kemoterapi tedavisi uygulanan göğüs kanseri hayvanları üzerinde uygulanan deneylerin sonuçları göstermiştir ki neoplazmik hücre çoğalması azalmış ve tümör büyümesi baskılanmıştır (Schabel et al, 1975). Yapılan deney, erken evrelerde uygulanan kemoterapi tedavisinin hastada ilerleyen safhalarda ilaç direnci oluşturmadığını ifade etmiştir (Goldie et al, 1979).

1.3.2 Kriyocerrahi

Kriyocerrahi klinik uygulamasından dokular derin dondurma işlemine maruz kalarak, donmanın etkisi olarak nekroza uğrayarak ölürlür. İşlemden tümörlü dokular -196 C^0 'de sıvı nitrojen ile dondurulurlar (Hausamen et al, 1975). İşlem yüzeyde var olan cilt kanseri gibi kanser türlerinde spreysel uygulaması ile yapılırken, vücudun içine ki lokasyonlarda cerrahlar, kriyoprob adı verilen cihaz ile kanserli dokunun bulunduğu bölgeye temas ederek tedaviyi uygulatırlar. Kriyocerrahi uygulaması üç döngü şeklinde tekrar edilir. Minor dondurma da hasar vasküler durgunluktan kaynaklıdır ancak döngüler arttıkça dokunun yok olması ve hücrelerin ölümü tek sonuçtur. Yöntem 60 yıl önce keşfedilip 1960'lı yılların başında uygulamaya dökülmüştür. Prostat, göğüs, karaciğer, kolon ve cilt kanseri uygulamalarında yöntemin uygulanabilirliği yüksektir ve cerrahi operasyonlara göre hastanın uğradığı hasar daha azdır. Yöntem uygulamasında dokunun doğal sıcaklığı, dondurma hızı, dondurma süresi, dondurma döngüsü ve dokunun hassasiyeti etkili tedavi için çok önemlidir ve pek çok çalışmada konu olmuştur (Gage et al, 2009).

Her yöntemde olduğu gibi bazı yan etkileri vardır ancak bunlar diğer cerrahi uygulamalarının hasarları ile kıyaslanamaz. Karaciğer kanseri uygulamasında prosedür, bazı durumlarda temel kan damarlarını ve safra kanallarını hedef alarak aşırı kanamaya yol açabilir. Prostat glandlarında ürün sisteme zarar verebilecek bölgesel sinirleri hasara uğratarak cinsel yetersizliğe ve idrar tutamaya sebep olabilir.

1.3.3 Lazer terapi

Lazer terapisi özellikle kemoterapi ve radyoterapiye direnç geliştirmiş kanser türlerinin tedavisinde uygulanan yöntemdir. Uygulama da yüksek yoğunluklu lazer ışığı tümörlü dokuya uygulanarak lokalize olan tümörün küçülmesi ya da tamamen yok olması hedeflenir. Uygulamada kanserin boyutuna ve türüne göre kullanılan üç farklı lazer vardır. Bunlar; CO_2 , NAG ve Argon'dur. CO_2 orta yoğunlukta ki ışıdır ve cilt kanseri gibi yüzeysel türlerde uygulanır. NAG yoğunluğu fazladır ve dokulardan oldukça derinlere geçebilme kabiliyetine sahiptir. Argon lazeri ise en düşük lazer yoğunluğuna sahiptir ve foto dinamik tedavi amacıyla kullanılır. Dezavantajları ise Kriyocerrahi ile aynıdır.

Foto dinamik terapide argon lazeri kullanılır ancak lazer terapisinden farklı olarak yöntemin uygulanabilir olması için ışık-duyar ajanlara ihtiyaç vardır. Lazer uygulamasından önce bu ajanlar vücutta kanserli dokuya yakın lokalizasyondan enjekte edilir ve kan yolu aracılığı ile vücutta hücreler tarafında absorbe edilir. Foto dinamik terapi Nanoteknolojinin kanser terapi yöntemleri ile bulunduğu ilk uygulamasıdır. Yöntemde ışık-duyar ajan olarak porfirin halkaları gibi yapılar

birebir kullanılabilir. Bunun yanı sıra ışık-duyar ajanların hücrel geçiş ve absorpsiyon, spesifik hedefleme gibi özelliklerinin geliştirilmesi için pek çok yöntem mevcuttur (Paszko et al,2011). Örneğin, lipozom (Dercke et al, 2007), seramik tabanlı nano yapılar (Roy et al, 2003), altın nano partikül (Hone et al,2002), ve polimer temelli nano-yapılanmalar ile aynı zamanda kemoterapi ajanı taşınımı ve spesifik hedefleme mümkündür. Örneğin miseller suda çözünürlüğü olmayan farmasötik ilaçların taşınımı için uygun yapılanmalar halini alarak bu ilaçların kullanımı sağlayabilirler (Kateb, 2010).

1.3.4 Radyo terapi

İyonize radyasyon ışınlarının kullanılıp kanser hücrelerini ve tümörü yok emesi işlemine radyasyon terapisi, X-ışınları terapisi, ışın tedavisi ya da kısaca radyo terapi adı verilir. Yöntem, yüksek enerjili elektromanyetik ışın demetlerinin ya da öncül atomik parçaların kanser hücre DNA'sını hasara uğratması için uygulanmasını kapsamaktadır. DNA'sı yok olan hücrelerin bölünemeyeceği ve dolayısıyla öleceği yaklaşımdan yola çıkarak yöntem uygulanmaktadır. Ancak en önemli dezavantaj yöntemin hiçbir seçiciliği olmamasıdır. X-ışını ya cerrahi operasyon ile açılan tümörlü dokuya uygulanır ya da vücut yüzeyinden uygulanır. Ancak her ikisi de hasaya acı verir.

Radyoterapi tüm dezavantajlarına rağmen kanser vakalarında en sık uygulanan tedavi yöntemidir. Eldeki en güvenilir verilere göre (Delaney et al, 2005), Hastaların %52'si kanser tedavilerinin bir aşamasında radyoterapi görmüşlerdir. Farklı tedavilerin uygulamaları ardından bu yöntem ile tedavi edilen hastaların %40'ı için etkili bir tedavi yöntemi olduğu saptanmıştır. Yöntemin başka bir dezavantajı ise çok komplike olması ve medikal fizik, radyobiyojoloji, radyasyon güvenliği, tedavi planlama ve diğer tedavi yöntemleri ile etkileşimi hakkında bilgilerin hepsinin çok iyi bilinmesi gerekliliğidir (Shafiq et al., 2009).

1.3.5 Gen terapi

Kanserin, genlerin bir sonucu olmasının ardından ortaya atılan teori, hasarlı genin bulunduğu dokunun sağlıklı gen kopyası ile muamele edilmesi ile tamir edilmesi idi. Bu yöntem gen terapisi olarak bilinir ve 1990'lı yıllardan günümüze, Amerikada 600 gen terapisi denemesi yapılmıştır (Panno et al, 2004). Gen terapi yöntemi teorikte uygulanabilir olsada en büyük güçlüğü taşıyıcı bir vektöre ihtiyacı olması ve bu vektörlerin tehlike yaratma potansiyelidir. Gen terapisi amacı ile genlerin hücre içine taşınma uygulamaları iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan biri çıplak DNA'nın hücreye alımı gen tabancası yaklaşımı ve lipozomları içeren viral olmayan yaklaşımdır. Bir diğer yöntem olan viral yaklaşımda ise retviral, rekombinant adenovirüs, pox-virüsü, herpes virüslerinin vektör olarak kullanıldığı yöntemdir (Wysocki et al, 2002). Rekombinant

retroviral vektörler gen terapisinde kullanılan ilk vektörlerdir ve 1992 yılında Rosenberg ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (Gilboa et al, 1982). Günümüz klinik protokolünde retroviral bir vektör olan MoMLV visürü %35,8 oranında kullanılan bir vektördür. Bu vektör bölünen hücreye uyum sağlayarak viral genomun konak genoma entegre olmasını sağlar. Adeno viral vektörler klinik protokollerin %25'ini oluşturmaktadır (Rother et al, 1995). Adenovirüslerin ilk jenerasyonu immün sistemde reaksiyon göstermekteydi çünkü diğer jenerasyonlardan farklı olarak yalnızca E1 adenoviral sekansını içermemekteydi (Christ et al, 1997). Buda immün cevabın oluşmasına sebep olmakta idi (Gorziglia et al, 1996). Bütün geliştirme ve iyileştirmelere rağmen viral gen terapisin en büyük dezavantajı karmaşık hücrel etkileşim ve virüsün değişken özellikleri dolayısı ile enfeksiyon riskidir.

Enfeksiyon dolaylı yan etkiler, virüs genomu ile enfekte olan hücrelerin mutasyon geçirmesi, hücrel genin yerini alması ve kendi genomunu replike etmesine bağlı olarak hastanın ölümüdür. Diğer yandan mutasyonların bilinmeyen kanser oluşumu ya da farklı rahatsızlıklara yol açma potansiyelleri mevcuttur (Panno et al, 2004).

1.3.6 Kök hücre terapisi

Kök hücreler vücuttaki farklı hücre türlerine dönüşebilecek öncül hücrelerdir. Özellikle kemoterapi ve radyoterapi nedeni ile hasar görmüş kemik yapısının yeniden yapılandırılmasında ve lösemi/lenf kanserinde kullanılır. Gen terapinin bir kolu gibi düşünülebilir çünkü kök hücreler yine bir vektör aracılığı ile hücreye iletilirler (Ozawa et al, 2008).

1.3.7 Biyoterapi

Vücudun doğal immün sistem elemanlarının kullanıldığı kanser terapisi yöntemine biyoterapi ya da immüno terapi adı verilir. VEGF' lerin deaktive edilmesi için antikorların kullanılarak kanser tedavi edilme yöntemi biyoterapiye bir örnektir. Biyoterapi, uyumlu immün sistemin faydalarından yararlanır. B-lenfositler antijenlere karşılık antikor üretir. T-lenfositler, diğer beyaz kan hücreleri tarafından aktive edilir ve monosit adı verilen T-lenfositleri uyaran spesifik saldırgan antijen üretirler. T-lenfositler bu mesajı alarak bu saldırganları yok eder. T-hücreleri, "sitokin" adı verilen küçük sinyal molekülleri üreterek diğer lenfositleri haberdar eder. İmmün sistem aslında kanser hücrelerine de saldırır ancak kanser hücreleri yüzeylerinde mutant proteinlere sahip oldukları için yabancı orijinli bu yapılar yok edilemez. Biyoterapi, kansere spesifik sitokinleri ve monoklonal antikorları kullanarak tedavi etmeyi amaçlayan yöntemdir (Pinno et al, 2004)

1.4 Nanoteknoloji ve Nanoteknolojinin Kanser Teşhis /Tedavisinde Önemi

“Nano” öncül eki Yunanca kelime olan “cüce/bodur” kelimesinden türetilmiştir (Sahoo et al., 2007). Bir nanometre (nm) metrenin milyarda birine, 6 tane karbon atomunun ya da 10 tane su molekülünün bir araya gelmesiyle oluşan boyuta denktir. İnsan saçı yaklaşık 80,000 nm, kırmızı kan hücreleri ise yaklaşık 7000nm genişliğindedir. Atomlar ise 1nm’den küçük iken bazı proteinler dâhil olmak üzere pek çok molekül 1nm ve daha büyük boyut skalası arasındadır (Whitesides et al, 2003). Nanoteknoloji kavramı ilk olarak 1959 yılında Richard Feynman isimli fizikçinin dersinde, “There's plenty of room at the bottom. – Odanın derinliklerinde çok şey var.” Konuşmasını yapması ile ortaya atıldı. Ancak terim 1974 yılında Tokyo Üniversitesinde araştırmacı olan Norio Taniguchi’nin materyal biliminde nanometre seviyesinde yapılanmanın çok önemli olduğunu vurgulayana dek kullanılmadı. Bu sırada, öncül minyatürizeleştirme çalışması ise elektronik dünyası tarafından elektronik aletleri silikon çip yüzeyleri üzerinde küçükleştirmeleri ile gerçekleştirilmiştir. 1970’li yılların başlangıcında IBM “elektron ışın demeti litografisi” adını verdiği yöntem ile 40-70nm boyutlarında nanoyapı ve cihaz tasarımını gerçekleştirmiştir.

Herhangi bir kanser terapisinin temel anahtarı, tümörlü dokuya istenen konsantrasyonda terapötik ajanın iletimidir. Ancak bu sayede sadece kanserli hücreler yok edilirken sağlıklı hücrelere verilen hasar minimuma indirilir. Bu açıdan bakıldığında kanser ile baş edilebilmesi için, önemli olan kanseri önleyen, tayin ve tedavi eden çok amaçlı ve tek bir ajan üretmektir. Bu amaçla, immünotksinler, radyo-immünoterötatikler ve immünokonjugatlar gibi ligant-hedeflenmiş terapötik stratejiler, kemoterapi ilaçları ve cerrahi yöntemler gibi geleneksel yöntemlerden kaynaklanan problemlerin çözülmesi için geliştirilmiştir. Böylece kanser teşhis ve tedavisi için biyoterapide kullanılan yeni yaklaşımlar üretilmiştir (Vasir et al, 2007). Geliştirilen bu yöntemler geleneksel yöntemler ile kıyaslandığında taşınımları ile ilgili hala ciddi sorunların olduğu bilinmektedir. Nano-seviyede materyallerin üretimi ve geliştirilmesini kapsayan nanoteknoloji bu dezavantaja alternatif yaklaşımlar getirmektedir. Kanser nanoteknolojisi, biyoloji, kimya, mühendislik ve ilaç alanlarının bir araya geldiği interdisipliner bir alandır ve bu yaklaşımla ulaşılan her sonu kanser teşhis ve tedavisinde bir adım öne geçmeye destek olmaktadır (Ferrari et al, 2005). Nanoteknoloji aynı zamanda gelişen teknikler ile çok disiplinli alanlar arasında da en olumlu potansiyele sahip yaklaşımları barındırmaktadır.

Nano-ilâç kavramı ise nanoteknolojinin medikal uygulamasıdır ve ilâç taşıyıcı vektör, teşhis edici ve tedavi edici ajan olarak kullanım alanına sahiptir (Parveen et al, 2008). Yakın zamanlarda, teröpatik kanser ilacı taşıyıcıları olarak nanotaşıyıcılar kullanılmaktadır. Lipozom ve albümin nanopartiküller teröpatik

nanotaşıyıcılar olarak klinik uygulamalarda kullanılabilmeleri için FDA (Amerika Birleşik Devletleri, Gıda ve İlaç İdaresi) onayı almıştır. Buna ek olarak, göğüs kanseri kemoterapisinde lipozom taşıyıcı içinde yönlendirilmiş Doxorubicin ve albümin bağlı Paclitaxel (Abraxane®) nanovektörel yönlendirilmiş ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar (Bharali et al, 2009). Nanosistemler, kendilerini diğer tedavi edici ajanlardan ayıran dört eşsiz özelliğe sahiptir (Sparreboom et al, 2005). Bunlar, (i) nanosistemlerin kendileri tedavi edici özelliğe sahip olabilir ya da doğal yapıları olarak teşhis özellik sergileyebildiklerinden tedavi edici ajanla yüklenerek çok fonksiyonlu bileşenler olarak kullanılabılır; (ii) yüksek afinite ve spesifik hedeflemeye imkân sağlayacak çok değerlikli hedefleme ligandları ile konjuge edilebilirler; (iii) nano-sistemler, kanser tedavisi için aynı anda etki gösteren kombine çoklu ilaç molekülleri ile konjuge edilebilir; (iv) geleneksel yöntemler sonucu oluşan ilaç direncini yıkabilir. Ancak ister pasif ister aktif hedefleniş taşıma stratejileri olsun, her ikisinde de nanotaşıyıcılar hücre içi ilaç konsantrasyonunu arttırırlar, normal hücrelere toksik etkiyi minimize ederler ve eşzamanlı olarak anti kanser etkisini arttırırken sistematik toksisiteyi azaltırlar (Acharya et al, 2009).

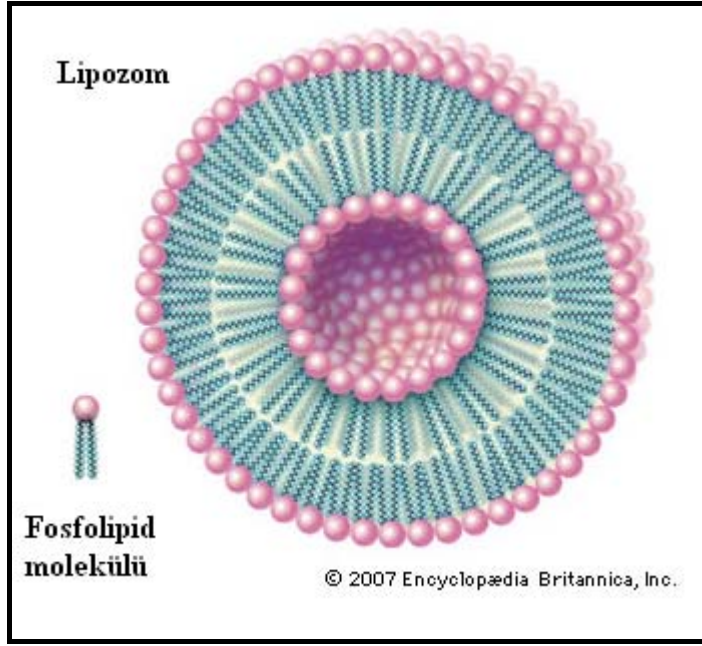
İdeal bir hedeflenmiş sistemin, uzun sirkülasyon zamanı, hedeflenmiş dokuya uygun konsantrasyon taşınımı, sirkülasyon sırasında aktivite ve tevdi etkinliğinin kaybedilmemesi gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir. Pek çok nanosistemin boyutları, yüksek konsantrasyonları ile geleneksel yöntemlerden üstündür (Charrois et al, 2004). Ayrıca vasküler geçirgenlikleri yüksektir (Simoes et al, 2004).

1.5 Kanser Teşhis ve Tedavisinde Kullanılan Nanomateryaller

Kanserin erken teşhisi ve tedavisinde kullanılabilecek çok fonksiyonlu nanomateryallerin özeti şekilde verilmiştir.

1.5.1 Lipozomlar

Lipozom adı Yunancada ‘LIPO’ anlamına gelen yağ ve ‘SOMA’ anlamına gelen vücut kelimelerinden türetilmiştir. Lipozom çok çeşitli boyut ve yapılanmalarda bulunabilir ve bu yapısında ki yapısal bloklar olan, fosfolipidler ile alakalıdır. Bunun tersi olarak nanozom boyutla alakalıdır ve 1990’lı yıllarda özeli lipozomların nano boyutta sentezlenmeleri ile elde edilmiştir. Lipozom ve nanozomlar aynı tanımlamaları ifade etmemektedir. Lipozom yapıları ilk kez 1961 yılında İngiliz bilim adamı Dr Alec tarafından bulunmuştur. Elde ettikleri yapıların elektron mikroskobu görüntülerini almışlar ve sentezlenen yapının aslında hücre membranının bilayer yapısında olduğu kanısına varmışlardır (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 Lipozom genel görüntüsü

Lipozomlar, yapısal çeşitlilik ve kompozisyonları ile biyoloji, biyokimya ve ilaç alanında kullanışlı araçlardır (Wang et al, 2008).Örneğin lipozom aracılı Doxorubicin (Doxil) ve Daunoxome ilaç taşınım sistemleri olarak ticari olarak satılmaktadırlar. PEG gruplarınca modifiye edilmiş lipozomal doxorubicin (Doxil[®], Caelyx[®]; Alza Pharmaceuticals, San Bruno, CA, USA) insanda 55 saat yarı ömre sahip en uzun sirkülasyon gösteren ilaç olarak bilinmektedir (Fassas et al, 2005). PEG gruplarınca modifiye edilen lipozomlar plazma proteinleri ile etkileşime girmez ve sonuç olarak mononükleer fagositoya uğramadıkları için oldukça uzun sirkülasyon süresine sahip olurlar. Benzer yaklaşım teröpatik moleküllerin bir lipozomda taşınması ve yüzeyinin ‘Trojan horse’ teknolojisi kullanılarak OX-26-transferin hedefli PEG ile modifiye edilmiş immünolipozomlarda da uygulanmıştır (Zhang et al, 2003). Bu yapılar tirozin hidroksilaz kodlu plazmid geni içermektedir ve Parkinson hatalığı için farelerde model olarak denenmektedir (Leamon et al, 2003). Ayrıca folat-reseptör hedeflenmiş lipozomlar in vivo ortamda Doxorubicin taşımada oldukça etkili sonuçlar vermiş ve aynı zamanda hücre kültürü çalışmalarında çoklu ilaç direncini kırmıştır.

1.5.2 Polimerik miseller

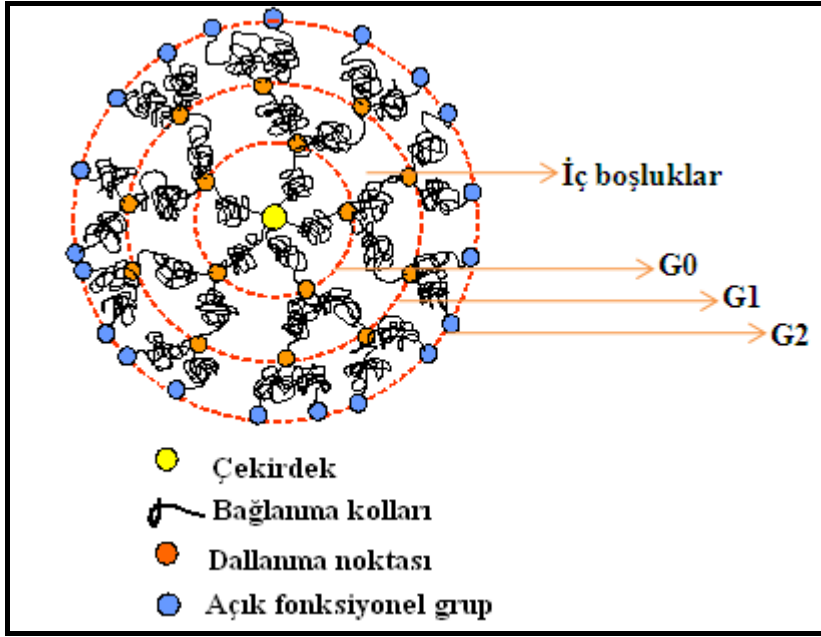
Misel, amfifilik yüzey aktif moleküllerin bir araya gelmesi ile oluşan yapılardır ve gelecekte teröpatik uygulamanın anahtar noktası olacağı düşünülmektedir (Rawat et al, 2006). Paclitaxel adlı kanser ajanının ilk polimerik misel formülasyonu, Genexol-PM (PEG-poly (D, L-lactide)-paclitaxel)’dir ve polimerik misel formülasyonu ile geliştirilmiştir. Faz I ve farmakokinetik

çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Pek çok polimerik-PEG-misel formülasyonu klinik uygulamalarda kullanım için sentezlenmektedir. Bunlar, katı tümör yapıları için fazI klinik çalışmalarında iyi sonuçlar veren Doxorubicin yüklenmiş polimerik misellerdir (Lavasanifar et al,2002). Torchilin ve arkadaşları, anti tümör özellikli antikör konjuge polimerik misel (immünomisel) sentezlemişler ve suda çözünürlüğü olmayan Taxol misel içine hapsedilmiştir. Uygulamalar sonrası konjugatın in vitro çalışmalarda kanser hücre yüzeylerini tanıyıp bağlandığı saptanmıştır (Torchilin et al, 2003). Mohanty ve arkadaşları, polifenol yüklü metoksi polietilen glikol/polip-ε-kaprolakton diblok kopolimerini kullanarak misel sentezi gerçekleştirmişler ve yapının pankreatik hücre kültüründe etkinliğini saptamışlardır (Mohanty et al, 2010).

1.5.3 Dendrimerler

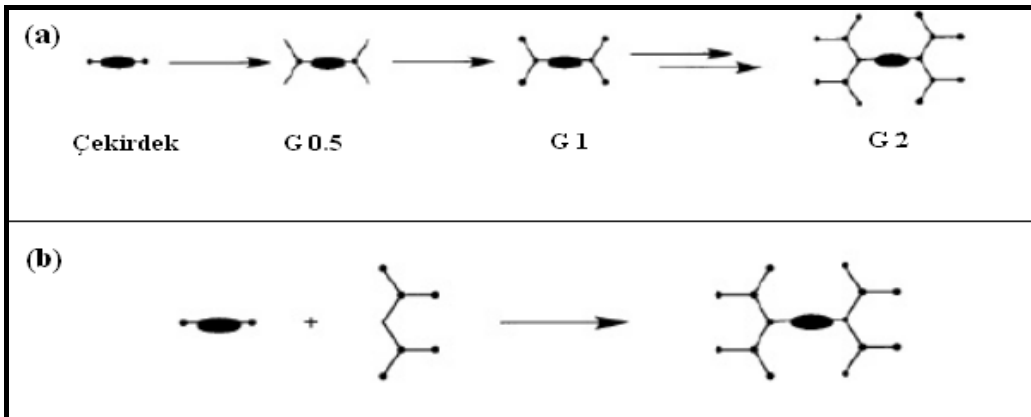
Dendrimerler farklı formlarda ki çekirdek yapıları etrafında seri katmanlar şeklinde dallanmalar gösteren makro moleküllerdir (Cloninger, 2002). Seri halde dallanan katmanlarının ve kollarının çok çeşitli formlarda modifikasyona açık olması, dendrimerlerin kullanım potansiyelini arttıran en önemli avantajlarıdır. Polimerik misellerden ve moleküllerden farklı olarak boyutsal olarak büyük yapılardır. Klasik polimerlerin tersine uzun ya da spiral şeklinde iki boyutlu değil, merkezi bir korun etrafında dallanmalar gösteren üç boyutlu bir şekle sahiptirler. Sahip oldukları globüler yapı nedeni ile bilinen lineer formu polimerlerden daha küçük hidrodinamik alan kaplamalarına rağmen globüler proteinlerden daha büyük hacimleri vardır.

Dendrimerin çekirdek yapısı etrafını boylu boyunca sararak şekillenen her bir dendrimer katmanı jenerasyon olarak adlandırılır (Şekil 1.13). Çekirdek kısmı G0 olarak isimlendirilir ve her dendrimerin çekirdeği farklı olduğu gibi aynı dendrimerlerinde farklı çekirdekleri olabilir. G0 çekirdeği üzerinde şekillenen her katman sonrası dendrimer G1, G2 gibi isimler alır. Örneğin polipropilen imin (PPI) dendrimeri için çekirdek 1,4-diaminobütan iken, poliamido amin (PAMAM) dendrimeri için çekirdek amonyaktır. PAMAM dendrimerinde ara ürünler karboksilat yüzey grupları içerirler, bunlar yarı-jenerasyon dendrimerlerdir ve G1,5 ya da G 2,5 olarak adlandırılırlar (Boas and Heegaard, 2004).



Şekil 1.13 Dendrimerin genel görüntüsü ve jenerasyon oluşumu

Genel olarak, diverjan (ıraksak) ve konverjan (yakınsak) adı verilen iki yöntemle sentezlenirler (Şekil 1.14). Diverjan yönteminde çoğul tepkime bölgelerine sahip çekirdek, bir reaktant ile tepkimeye sokulur. Oluşan tepkimede, her bir aktif bölgeye tutunan reaktant yeni bağlanma noktalarının oluşmasını sağlar ve devam eden seri tepkimelerle artarda çoğaltılma yöntemiyle üç boyutlu dallanmalar sağlanır. Konverjan yönteminde ise farklılık başlangıç noktasındadır. Öncesinde sentezlenmiş büyük dendrimerik kısımlar, bir seri reaksiyonla bir çekirdeğin reaktif noktalarına eklenir. Her iki yöntemde de sonuç olarak parçacığın çapı doğrusal olarak artarken, yüzeyindeki reaktif noktaların sayısı geometrik olarak artmakta ve buda dendrimerlerin yüzey taşıyıcısı olarak kullanılmasında büyük bir avantaj oluşturmaktadır (Wells er al, 1998).



Şekil 1.14 Dendrimer sentez yöntemleri (a) Diverjan yöntemi ile sentez (b) Konverjan yöntemi ile sentez

Dendrimerlerin eşsiz yapıları onların görüntüleme ajanı, hedefleyici molekül ve teröpatik ajanların çoklu bağlanmasına olanak sağlayarak şekilde etkili teşhis ve tedavi araçları haline getirmiştir. Dendrimerlerin olduğu kısımları üç ana başlık altında toplayabiliriz. Bunlar, çok fazla reaktif grup içeren dış yüzey, dış kısmında dendrimer yüzeyiyle korunmuş olan ve iyi tanımlanmış bir mikro çevreye sahip dallanma birimleri ve dallanmalarla sarılmış olan çekirdek kısmıdır. Dallanma birimlerinin büyümesi ile dendrimerin bağlanma noktaları arasında kalan iç boşluk sayısı ve fonksiyonel grup sayısı artmaktadır. Böylece iç hacme yüklenebilecek ya da fonksiyonel gruplara konjuge edilebilecek ajanların sayısı da artacaktır. Yakın zamanda, dendrimerlerin özelliklerinden yararlanarak, DNA toplanmış poliamidoamin dendrimer yapılarını sentezlemiş ve kanser hücrelerine spesifik hale getirmişlerdir (Choi et al, 2005).

1.5.4 Nanokantilever

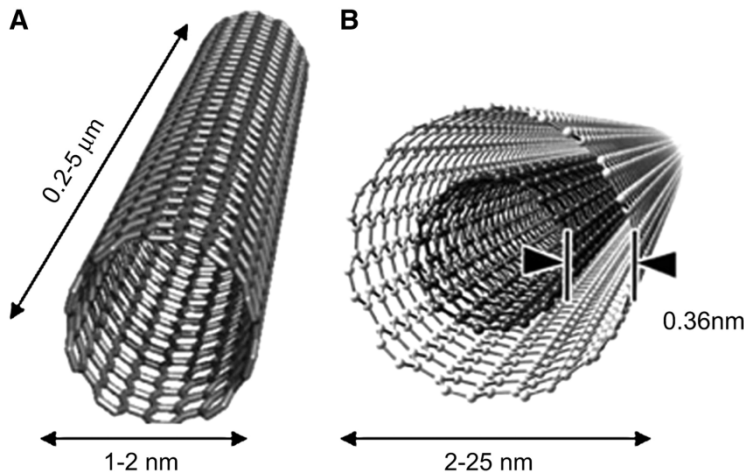
Mikroaray teknikler moleküler etkileşimlerin teşhisini temel alır ve hastalık teşhisi, genom ile ilaç araştırmaları için çok önemli bir araçtır. Küçük ve ince demir çubuk anlamına gelen kantilever üzerinde kanser ile ilişkili biyomoleküllerin bağlanması tasarlanabilir. Bu moleküller özellikle kanser çeşitliliği ile farklı DNA proteinleri olabilir. Teşhis prosedürü sırasında, immobilize reseptör ve uygulanan teşhis edilecek madde içeriğinde ki antikor arasında etkileşim gerçekleşir ise bahsedilen küçük metal yapı eğilir. Optik olarak ölçümü alınabilecek bu sistemde eğilme, uygulanan örnek içeriğinde kanser kaynaklı bileşenlerin varlığını kanıtlar ve özellikle kanserin moleküler seviyede erken teşhisi için çok önemli bir yaklaşımdır. Kantilever üzerinde eğilme miktarı aynı zamanda kantitatif olarak bağlanan DNA veya protein miktarının saptanmasında da yardımcı olur. Optik analizde yansıma direkt lazer ışığı ya da rezonans titreşimi sağlayacak diğer ışınların kullanılması ile elde edilir. Arun Majumdar ve arkadaşları mikro kantilever kullanarak tek nükleotid polimorfizmini, floresans ve radyoaktif işaretleme gerektirmeden 10-mer DNA hedefli oligonükleotid ile saptamışlardır. Bu uygulama ile aynı zamanda Prostat spesifik antijenin, klinik uygulamalarda kullanım potansiyellerinin bulunduğunu kanıtlamışlardır (Wu et al, 2001).

1.5.5 Karbon nanotüpler

Karbon yerküredeki en çok bulunan elementtir. Metal oksitlerin indirgenmesi amacı ile karbon 6000 yıldan daha uzun bir zaman kullanılmıştır. Grafit karbonun formlarından biridir ve 1779 yılında, elmas ise 1789 yılında keşfedilmiştir. Ardından, 20 yıl sonra Kroto, Smalley ve Curl tarafından karbonun özel bir formu olan fuloren bulunmuştur. Karbon nanotüplerin keşfi bu keşiflerin ardından gerçekleşmiştir. İlk olarak Sumio Ijima tarafından 1991 yılında fuloren hazırlamakta kullanılan karbon-arc yöntemine eşdeğer bir yöntem ile

sentezlenmiştir. Sentezlenen yapıda karbon atomlarının oluşturduğu hegzagonal halkaların bir araya gelerek bir yapılanma içine girdikleri belirlendi. Karbon nanotüpler var olan, değişken sayılarda karbon tabakalarının bir araya gelmesi ile oluşan ko-aksiyel yapılanmalardır. Başlangıçta çok duvarlı karbon nanotüpler, ilerleyen zamanlarda ise tek duvarlı karbon nanotüpler sentezlenmiştir (Paradise and Goswami, 2007).

Karbon nanotüpler sahip oldukları üstün özellikler nedeni ile uygulama alanı çok geniş bir türdür. Yapısal olarak mekanik sağlamlıkları öyle geniştir ki çelikten 100 kat daha fazla dirence sahiptirler. Bunun yanı sıra elmadan daha iletken ve bakırdan daha üstün yük taşıma kapasitesine sahiptir. (Merkoçi et al., 2005; Antiochia and Gorton, 2007). Karbon nanotüpler yapısal olarak, tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. (Şekil 1.15). SWCNT yapılarında karakteristik karbon düzlemi tek katmana sahiptir ve bu tabaka 2 nm çapında bir silindir şeklinde yapılanmıştır. MWCNT yapılarında ise birden fazla karbon düzlemi aralarında belirli boşluklar bırakarak bir araya gelirler ve katmanların oluşturduğu silindirler iç içe geçmiş durumdadır. Bu iki yapılanma haricinde iki silindir katmanının bir araya gelmesi ile çift duvarlı (DWCNT), üç silindir yapısının iç içe geçmesi ile üç duvarlı (TWCNT) karbon nanotüp tanımlamaları yapılabilir (Flahaut et al., 2005).



Şekil 1.15 Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) karbon nanotüplerin gösterimi.

CNT'lerin uygulanabilir formada elde edilebilmeleri için öncelikle, (biyo)analitik denemelerde kullanılmak üzere çözünür hale geçirilmesi gerekmektedir. CNT'ler çözünürleştirilmesi dolayısı ile homojen bir yapı sergilemeleri tüm biyolojik uygulamalar için çok önemli bir parametredir. Biyo uygulamalarda kullanımlarını kısıtlayan en önemli faktör çözünürlükleridir (Zhao H. and Ju H., 2006; Balasubramanian and Burghard, 2006). Bu nedenle öncelikli olarak CNT'lerin çözünürleştirilmesi gerekmektedir ve çeşitli materyal ve yöntemler bu amaçla kullanılabilir. Sıklıkla kullanılan yöntemlerin başında

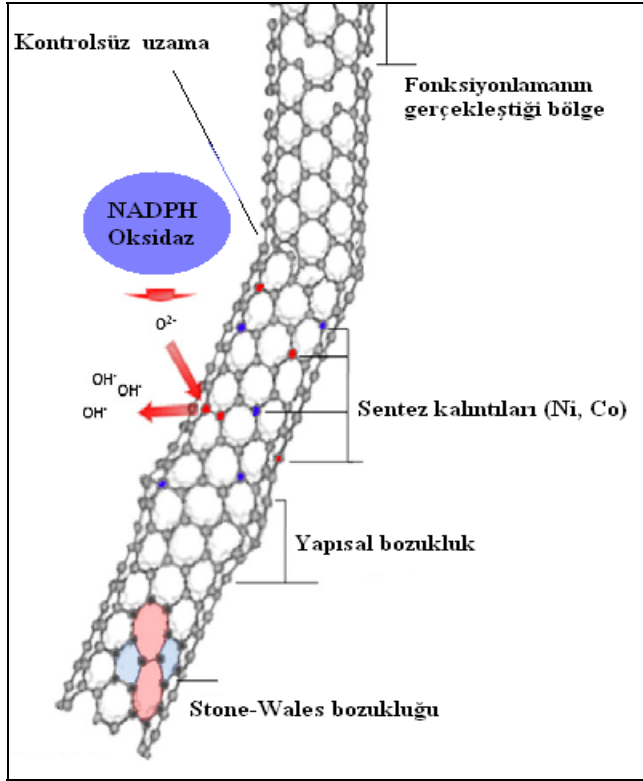
fonksiyonelleştirme, yüzey aktif maddelerinin kullanımı, polimerlerle ile sarılmaları gelmektedir. Bu metotların çoğu çözünürlük özelliği kazandırmada oldukça başarılıdır ve aynı zamanda CNT' lerin küçük parçalara bölünmesine neden olurlar. Bu sonuç bazı uygulamalar için avantaj, bazıları için dezavantaj getirir.

Biyo işaretleme uygulamaları için karbon nanotüpler elverişli materyallerdir çünkü yüzey alanları çok geniştir (Ortiz-Acevedo et al, 2005). Karbon nanotüpler, hegzagonal karbon plakaların bir araya gelmesi ile oluşan karbon silindirleridir. Sensörde kullanımları ile DNA ve protein teşhisinde, kanser teşhis ve tedavisi alanında kullanımları ile protein/DNA taşıyıcı vektör kargolar olarak aktif rol oynarlar (Balasubramanian and Burghard, 2005). Nanoteknolojinin gelişen alanı, yapısal ve mekanik, elektronik ve optik özelliklerde üstünlüğe sahip, tek ve çok duvarlı karbon nanotüplerin çok amaçlı ve fonksiyonlu olarak kullanılmalarını kapsamaktadır. Tek duvarlı karbon nanotüplerin, yakın dalga boyunda (NIR) yüksek optik absorpsiyonları lazer ışığı altında ısınmalarına ve spesifik hedeflenmiş olarak yalnızca kanser hücrelerine yönelmiş bu yapıların ısı ile kanser hücrelerinin yok olmasına yol açarlar. NIR floresans bandı biyolojik geçirgenlik için uygun bölgedir (700-1300nm) ve bu aralıkta hücrelerin doğal gereği gösterdikleri doğal floresans en küçük ışımayı yapmaktadır. Yüzeyi fonksiyonlandırılmış çok duvarlı karbon nanotüpler, biyo görüntüleme aracı olarak kullanışlı yapılardır (Rao et al, 2002). *In vitro* uygulamalarda, ilaç ve görüntüleyici ajan karbon nanotüpün geniş yüzey alanına tutunur ve böylece hücreye taşınımı ile hücre içine girişi, tek başına ilaç molekülünden çok daha etkili bir şekilde gerçekleştirilir.

CNT' lerin biyolojik uygulamalarda kullanımlarını genişleten bir diğer özellik hücre membranından kolaylıkla geçebilme kabiliyetleridir. Bununla birlikte hücresel geçişin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bilinen iki yaklaşımdan biri, CNT' lerin nano-iğne gibi davranarak, ölümüne sebep olmadan, membranından pasif olarak geçtiğidir (Pantarotto et al, 2004; Cai et al, 2005). İkinci yaklaşım ise yüzey proteinlerince endositoza uğrama ihtimalleridir (Kam et al, 2004). Tüm varsayımlara rağmen, CNT yüzeylerine kovalent ya da nonkovalent olarak modifiye edilen moleküllerin hücre membranını geçişlerde kritik öneme sahiptir

CNT' ler çoğunluklu olarak avantaja sahiptirler ancak özellikle biyolojik uygulamalarda akla gelen ilk şüphe sitotoksitesidir (Ji et al, 2010). CNT' lerin toksik özellikleri, yüzeysel fonksiyon, fonksiyonlamada kullanılan kimyasalların türü ve kullanım derecesi, çözünürlük derecesi, sentezinden kaynaklanan yapısal bozukluklar ile sentez sırasında yüzeylerinde biriken atıklardan (Fe, Co, Ni) ileri gelmektedir (şekil 1.16). Ancak, uygun seçilen çözünürlüştürme uygulaması ile

çözünürlük, yüzeysel artıklar gibi potansiyel etkiler bertaraf edilir (Firme and Bandaru, 2020).



Şekil 1.16 Karbon nanotüplerin sitotoksik etki göstermelerinin sebepleri

Sonuç olarak CNT' lerin, yükleme yapılabilecek uygun iç hacmi, geniş yüzey alanı, hücresel etkileşim ve hücre içine giriş potansiyelleri, çok çeşitli yüzeysel modifikasyonlara açık olmaları ile kanser teşhis ve tedavisi için uygulama alanı geniş nano parçacıklardır.

1.5.6 Kuantum parçacıklar

Kuantum parçacıklar (QD), floresan özelliği yüksek, organik ligand tabakasıyla stabilize edilmiş inorganik atomları temel alan 1-10 nm boyutunda nano partiküllerdir (Şekil 1.16). Yarı ömürlerinin yüksek olması, floresans stabilitelerinin ve absorpsiyon spektrumlarının yüksek olması gibi bazı üstün özelliklere sahiptirler. Bu sebeple, biyolojik uygulamalarda, tıp, teknoloji ve analitik kimya alanlarında kullanımı tercih edilen moleküllerdir (Tansil and Gao, 2006).

Yakın gelecekte, yarı iletken QD yapıları mikroelettronik, optoelettronik ve hücresel görüntüleme ile ilgili bilim ve teknolojilerde dikkat çekmektedir (Grodzinski et al, 2006). Yarı iletken QD' lar ilaç ve biyoloji için yeni bir sınıf

floresans işaretleyicidir. Bahsedilen geniş absorpsiyon ve kısıtlı saçılım karakteristikleri nedeni ile tek uyarım kanalıyla çok renkli görüntülerin alınmasını olanaklı kılmaktadır. Kimyasal ve optik özellikleri nedeni ile özellikle *in vivo* ortamda görüntü almanın bilinen en elverişli yoludur (Alivisatos, 2005). Aynı zamanda hem görüntüleme hemde ilaç taşıma özelliklerine sahip çok fonksiyonlu yapıların sentezlenmesinde de kullanışlı materyallerdir. Toksik etmenlerden dolayı sentezlenmelerinin ardından yüzeyleri, biyo uyumlu PEG-silika gibi materyaller ile kaplanmaktadır. Nie ve arkadaşlar (2007), QD yüzeylerini prostat spesifik antijen ile modifiye ederek, sentezlenen biyokonjugat ile model canlıda *in vivo* olarak görüntüleme yapan ilk gruptur. QD yüzeyleri çeşitli şekillerde modifiye edilebilir ve böylece çözünürlük, stabilite, spesifiklik gibi karakterleri hedeflenen amaç doğrultusunda düzenlenebilir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar şunlardır; kimyasal buhar biriktirmesi ile sentezlenen çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT; çap: 110–170 nm, uzunluk: 5–9 µm, % 90), nitrik asit (% 68), sülfürik asit (% 98), EDC (1-etil-3-[dimetilaminopropil]karbodiimid), NHS (N-hidroksisüksinimid), THF (Tetrahidrofuran, % 99), monoklonal anti-estrogen reseptör (HER2 – 0,3 mg/mL), pH 7,4 PBS (Fosfat-salin tamponu) Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edildi. 300 kDa filtre Millipore (Tullagreen Carrigtwohill, İrlanda) firmasından tedarik edilmiştir. MCF-7 meme adenokarsinoma epiteli hattı ve sağlıklı meme epiteli hücre hattı, Amerikan Kültür Koleksiyonundan (ATTC, Manassas, Va.), PC-3 prostat karsinoma epiteli hücre hattı, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünden tedarik edilmiştir. Polifenilen tabanlı floresans polimer İstanbul Teknik Üniversitesinde Prof.Dr. Yusuf Yağcı'nın laboratuvarında sentezlenmiştir. Model ilaç olarak seçilen Bleomisin (Bristol-Myers Squibb, USA) ticari olarak temin edilmiştir. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2 Cihaz ve Sistemler

Çalışmanın, sentez, karakterizasyon ve biyokonjugatların *in vitro* uygulama potansiyellerinin incelenmesi amacıyla kullanılan araç ve gereçler aşağıda verilmiştir: Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ve sentezlenen biyokonjugatların karakterizasyonu için, otomatize Renishaw InVia Reflex Raman Mikroskop Sistemi (U.K) kullanıldı. Cihazın 830 ve 514 nm' den oluşan iki diyotu bulunmaktadır. Ölçümler 514 nm (yeşil) argon iyon lazeri altında ve 50X objektif altında alındı. Elektrokinetik Zeta potansiyel değerlerinin ölçülmesi

amacı ile Zetasizer NanoZS cihazı (Malvern Instruments, UK) kullanıldı. Bir diğer yapısal karakterizasyon, Thermo-Nicolet 510 (USA) markalı Fourier transform infrared spektroskopisi/Total seyreltilmiş yansıtma (ATR/FT-IR) spektrometresi ile yapıldı. Sentezlerin yüzey modifikasyonlarının saptanması amacı ile Perkin-Elmer TGA-7 (Massachusetts, USA) analiz cihazı kullanıldı. Örneklerden yaklaşık 1,0 mg kullanılarak sıcaklık 800 °C 'ye kadar dakika 10 °C artacak şekilde analizler gerçekleştirildi. Üç boyutlu görüntüleme amacı ile Park SYSTEMS XE 100 Atomik Güç Mikroskopisi (AFM, Park Systems Corp. KANC, Kore) cihazı kullanıldı. Çalışmalar oda koşullarında, kontakt modda, 0,5 Hz tarama hızı ile ve silikonnirit tiplerin kullanılması ile gerçekleştirildi. Taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri Carl Zeiss Evo 40 (Carl Zeiss NTS G mbH, Germany) cihazı kullanılarak, yüksek vakum ve potansiyel (10 kV) altında alındı. Transmission Elektron Mikroskopu (TEM) görüntülerinin için ise JEOL SEM Marka STEM (Japonya) cihazı kullanıldı. Floresans polimer yapısının ve biyokonjugatların ve hücre kültürü uygulamalarında florimetrik karakterizasyonlar, Cary Eclipse ve microplate Varian Cary Eclipse (USA) marka floresans spektrometreleri ile alındı. Santrifüj (Denley, İngiltere), pH-metre (Hana Instrument, ABD), distile su cihazları (Fistream, England ve Milli-Q Milipore, ABD), ultrasonic banyo (Ultrasonic LC 30, Almanya), su banyosu (Nüve, Türkiye) ve sonikatör (Heilscher, UP200H, Germany) ilgili çalışmalarda kullanıldı.

2.3 Metod

Tez kapsamında, kanser hücrelerinin teşhis ve tedavisine yönelik, kanser hücrelerine spesifik çok fonksiyonlu MWCNT biyokonjugatlarının sentez, karakterizasyon ve uygulama çalışmaları üç ana başlık altında toplanmaktadır:

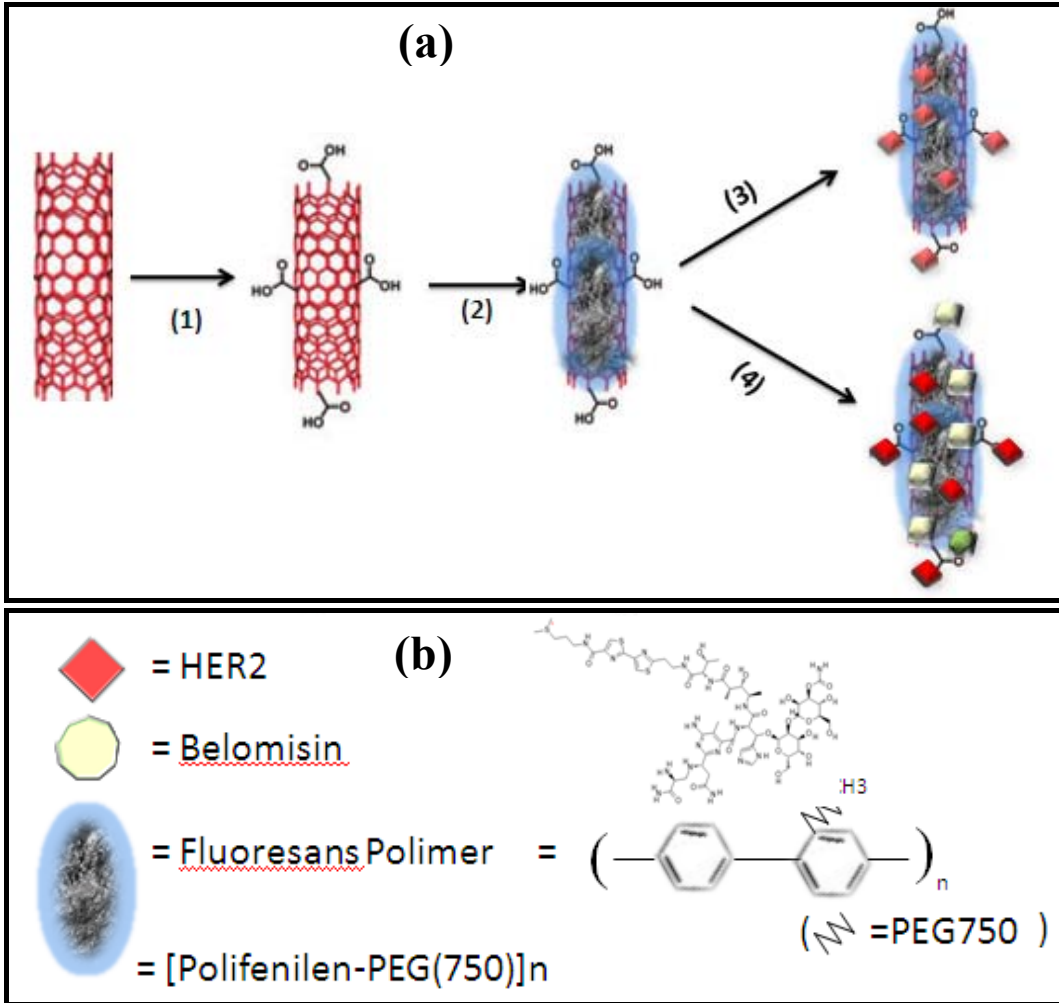
A) MWCNT aracılığı ile teşhis ve tedavi amacına yönelik ilgili biyokonjugasyon sentezlerinin yapılması;

İlgili konjugasyonlar ve detayları Çizelge 2.1 ve Şekil 2.1 'de özetlenmiştir:

Çizelge 2.1 Çalışma metodu ve karakterizasyon yöntemlerinin genel özeti

İŞLEM	1)MWCNT'lerin karboksil-fonksiyonel hale getirilmesi	2) f-MWCNT'lerin non-kovalent modifikasyonu	3) f-MWCNT/ (Polifenilen-PEG (750)) _n konjugatının kovalent modifikasyonu	4)f-MWCNT/ (Polifenilen-PEG (750)) _n /Her-2, Bleomisin ile modifikasyonu
AMAÇ	MWCNT'lerin çözünürlleştirilmesi ve antikor/ilâç bağlanmasına uygun hale getirilmesi	Kanser hücrelerinin görüntülenmesi için floresans prob sentezi: f-MWCNT lerin floresans polimer ile işaretlenmesi	Kanser hücresine spesifik olabilecek hedeflenmiş biyokonjugat sentezi	Prob moleküle kemoteröpatik ajanın bağlanması
İÇERDİĞİ MATERYALLER	MWCNT	f- MWCNT, Floresans polimer	f- MWCNT, Floresans polimer, HER-2 antikor	f- MWCNT, Floresans polimer, HER-2 antikor, Bleomisin
ÜRÜN ADI	f-MWCNT	f-MWCNT/ [polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/ [polifenilen-PEG(750)] _n / Her-2	f-MWCNT/ [polifenilen-PEG(750)] _n / Her-2/Bleo
PROSES	H ₂ SO ₄ /HNO ₃ asit oksidasyonu	Nonkovalent π - π etkileşimleri	EDC/NHS reaksiyonu	EDC/NHS reaksiyonu aracılığı ile kovalent amid bağı oluşumu
KARAKTERİZASYON	Çözünürlük, Raman Spek., Z.eta Pot., ATR/FT-IR, AFM, SEM, TGA, TEM	Raman Spek., Zeta Pot., AFM, SEM, TGA, Florimetri, Hücre kültürü, Floresans mikroskop	Raman Spek., Zeta Pot., ATR-FT-IR, SEM, TGA, Florimetri, Hücre kültürü, Floresans mikroskop, Bredford	Floresans mikroskop

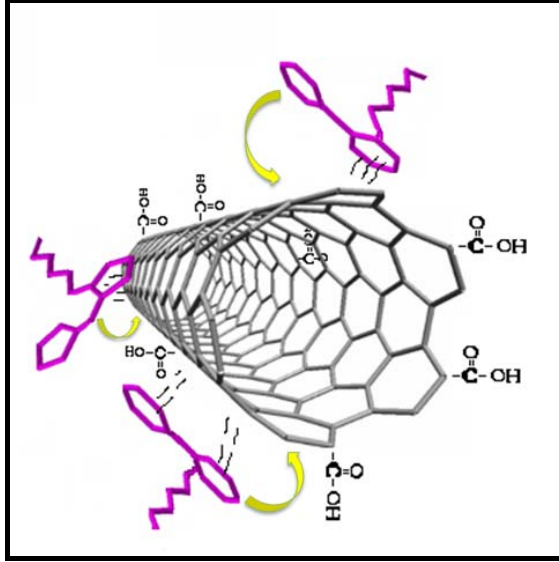
Çizelge 2.1’ de ifade edilen ilgili sentez adımlarının ve biyokonjugatlar şekil 2.1 ‘de şematize edilmiştir.



Şekil 2.1 Biyokonjugat sentezi genel gösterimi (a) akış şeması (b) içerik molekülleri

Tez kapsamında, MWCNT’ lerin karboksil fonksiyonlanıp çözünürlük özelliklerinin artırılmasının ardından gerçekleştirilen ilk modifikasyon nonkovalent yaklaşım ile gerçekleştirilmiştir. Nonkovalent modifikasyon, f-MWCNT’ lerin yan duvarları ile floresans özellikli polimer arasında gerçekleşmektedir. İki yapı arasında nonkovalent modifikasyonun gerçekleşmesini sağlayan güç ise π - π etkileşimleri dolayısı ile Van der Waals etkileşimleridir. İstiflenme (π - π stacking), supramoleküler kimyada moleküllerin, interatomik etkileşimler ile en doğru oryantasyonda istiflendiklerini öngörür. Nonkovalent bir etkileşim olan π - π istiflenmede, organik moleküllerin aromatik grupları aktif rol oynar. İstiflenen iki yapının aromatik halkalarının π -orbitalleri üst üste gelerek elektronlarını ortak kullanırlar ve π -konjuge bir sistem oluştururlar. Bu sayede, ortak kullanım ile π -elektronlarının sayısının artması sonucu daha güçlü yapıları oluştururlar (Meuer et al, 2009). MWCNT’ ler yapısal olarak tamamen

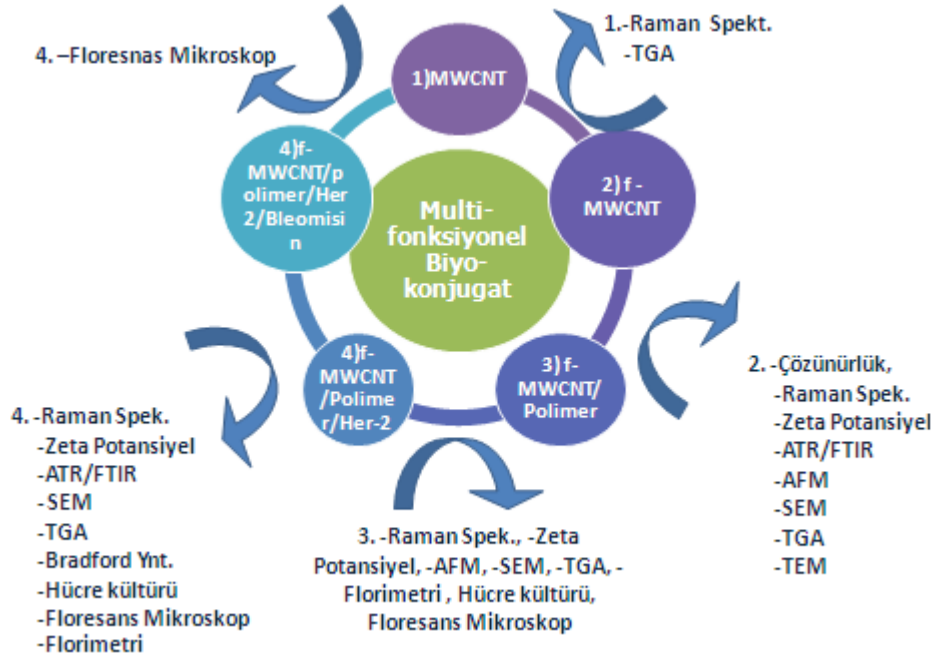
hegzagolan halkalardan oluşurken, floresans polimer polifenilen aromatik halkalarını içermektedir. Şekil 2.2 Polimerin aromatik halkaları ile CNT arasında gerçekleşen π - π istiflenmeyi şematize etmektedir. Dolayısı ile bu iki yapı arasında π - π orbitalleri bir araya gelerek istiflenecek ve böylece f-MWCNT' nin nonkovalent modifikasyonu gerçekleşecektir.



Şekil 2.2 Polimer ile karbon nanotüp arasında gerçekleşen nonkovalent etkileşim

B) Sentez, konjugat ve biyokonjugatların karakterizasyonu

Sentezlenen yapılar ve uygulanan ilgili karakterizasyon çalışmaları ile şekil 2.3' de özetlenmiştir.



Şekil 2.3 Sentezlenen konjugatlara uygulanan karakterizasyon yöntemleri

C) İn vitro uygulamaları ve görüntüleme ilaç taşıyım potansiyellerinin incelenmesi

MCF-7, PC-3 ve sağlıklı hücre hattı hücre kültürü uygulamaları ile sentezlenen çok fonksiyonlu MWCNT biyokonjugatların hücresel tutunmaların belirlenme ve floresans mikroskop görüntülerinin alınması bu başlık altında yürütülen deneysel çalışmalardır.

2.3.1 Çok duvarlı karbon nanotüplerin karboksil-fonksiyonel hale getirilmesi

10 mg ticari MWCNT 3:1 (v:v) oranında H_2SO_4 (% 98) ve HNO_3 (% 68) karışımı içerisinde 7 saat $80^\circ C$ 'de, sıklıkla sonike edilerek inkübe edildi. 8 saat sonrasında elde edilen karışım yarı yarıya saf su ile seyreltildi (Jain et al, 2009). Ardından 5 000 g'de santrifüjlenrek pH değeri nötr olana dek saf su ile yıkandı. $0,45 \mu m$ membran filtreden geçirilerek oluşan agregatlar uzaklaştırıldı. Elde edilen süspansiyon son aşamda $80^\circ C$ 'de gece boyu etüvde kurutularak, karboksil fonksiyonlu MWCNT (f-MWCNT) toz şeklinde geri kazanıldı.

2.3.2 Karboksil fonksiyonel çok duvarlı karbon nanotüplerin floresans polimer ile kovalent olmayan modifikasyonu

f-MWCNT konsantrasyonu 0,1 mg/mL ve [polifenilen-PED(750)]_n floresans polimerin konsantrasyonu 0,2 mg/mL olacak şekilde 3,0 ml Tetrahidrofuran (THF) içinde çözülerek gece boyu, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. π - π etkileşimleri ile [polifenilen-PEG(750)]_n floresans polimeri ile f-MWCNT bağlanmasının ardından çözelti, THF ortamdan uzaklaştırılana dek saf su ile yıkandı, 300 kDa'lık filtreden geçirilerek bağlanmayan polimerler ortamdan uzaklaştırıldı. İlgili çözgünde çözülerek ilerleyen aşamalarda kullanıldı (Simmons et al, 2009; Mener et al, 2009).

2.3.3 f-MWCNT/[polifenilen-PEG(750)]_n floresans probunun HER-2 ve Bleomisin ile kovalent modifikasyonu

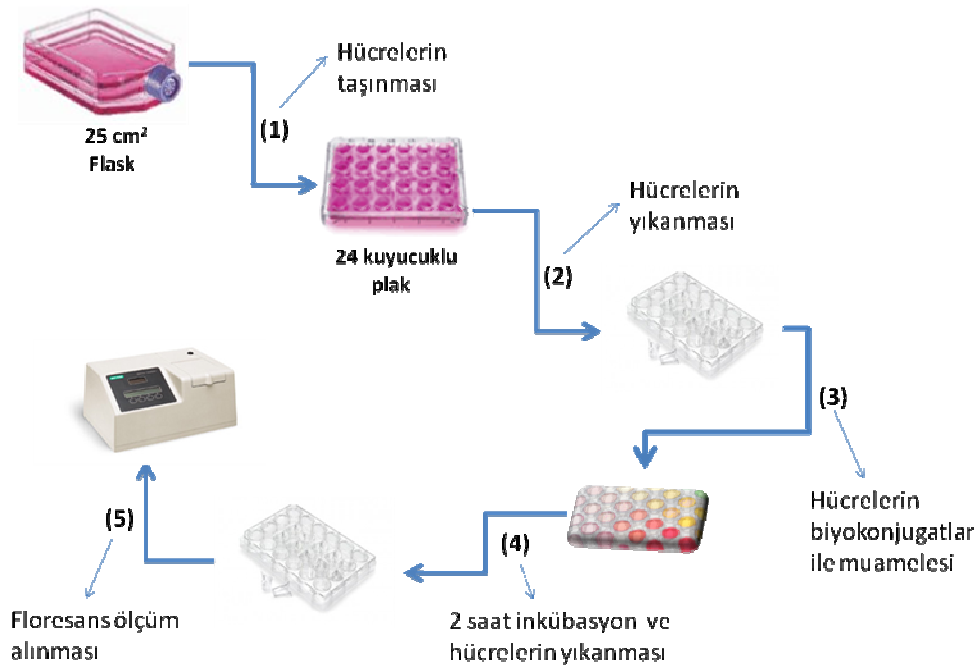
Kanser spesifik HER-2 antikoru ve ilaç f-MWCNT/[polifenilen-PEG(750)]_n floresans probuna bağlanmadan önce, prob yüzeyinde bulunan karboksil grupların reaksiyona aktif hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, 0,1 mg/mL f-MWCNT/[polifenilen-PEG(750)]_n ve son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde EDC pH 5,0 PBS tamponu içerisinde 15 dakika inkübe edildi. Ardından iki ayrı biyokonjugat sentezi için iki ayrı deney seti hazırlandı. İlk sette son konsantrasyon 50 mM olacak şekilde NHS ile 30 μ L HER-2 ortama eklenerek iki saat oda koşullarında inkübasyona bırakıldı. Ardından ortam pH'sı nötr olup reaksiyon durana dek saf su ile yıkandı. 300 kDa mikrosantrifüj membran filtre kullanılarak 15 dakika 5000 g de santrifüj işlemi gerçekleştirilerek bağlanmayan proteinler ortamdan uzaklaştırıldı. Son işlem olarak bağlanmayan EDC ve NHS kimyasallarının ortamdan uzaklaştırılması için üç saat saf suya karşı, bir gece PBS 7,4 tamponun karşı soğuk odada diyaliz işlemi uygulandı. Aynı işlen ikinci deney seti için tüm prosedür aynı kalacak şekilde ortama 0,1 mg/mL Bleomisin eklenerek gerçekleştirildi (Coley et al, 2009).

2.3.4 Hücre kültürü uygulamaları

PC-3, prostat karsinoma hücreleri Dulbecco's MEM, 2,0 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 1,0 mM sodyum piruvat ve % 5 fetal bovin serum (FBS) den oluşan medyumda, MCF-7 meme adenokarsinoma epitelyum hücreleri, minimum essential medium (Eagle), 2,0 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 0,1 mM non-esansiyel amino asitler, 1,0 mM sodyum piruvat ve % 10 fetal bovine serum (FBS) den oluşan 25 cm² lik flask ortamında üretildi. Tüm hücreler flaskları % 80 kaplayacak kadar üretildikten sonra % 0,25 (w/v) tripsin-EDTA solusyonu aracılığı ile flasktan ayrılarak çalışmaların yapılacağı 24 kuyucuklu plakalara ekildi ve çalışmada kullanılmayacak olan hücreler % 5

DMSO içeren ortamların içine koyularak -80 °C de dondurulup, -190 °C sıvı azot içinde saklandılar.

Sentezlenen biyokonjugatların hücresel tutulumlarının bağıl olarak hesaplanması amacıyla 24 kuyucuklu plaklara aktarılan hücrelerde yeterli büyüme gözlemlendiğinde, hücrelerin yüzeylerinde var olan besiyerleri pompa yardımı ile hücrelere zarar vermeden ortamdan uzaklaştırıldı. Her kuyucukta ki hücreler PBS 7,4 tamponu ile iki kez yıkanarak kuyucuk çeperlerinde kalan besiyerleri temizlendi. Ardından, 24'lük plaka uygulamaların kontrol gruplarına yalnızca PBS 7,4 tamponu ve ilgili biyokonjugatlar 250 µL eklenerek 2 saat, 37 °C 'de ve % 5,0 'lık CO₂ bulunan inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonrasında inkübatörden alınan hücrelere uygulanan çözgenler ortamdan uzaklaştırılarak yeterli düzeyde PBS 7,4 tamponu ile yıkanarak monokromatör florimetrik ölçüm alan florimetride (Varian Cary Eclipse, USA) ilgili dalga boyunda optik analizleri yapıldı ve absorbanslar Graph Pad istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Floresans mikroskop çalışması için hücreler aynı prosedür ile yetiştirilerek görüntüleri alındı. Hücre kültürü uygulaması şekil 2.4' de özetlenmiştir.



Şekil 2.4 Hücre kültürü uygulama şeması

2.3.5 Sitotoksosite çalışması

Sitotoksosite çalışması MTT ve WST isimli iki ayrı yöntem ile gerçekleştirildi. MTT sitotoksosite uygulaması ile [Polifenilen-PEG(750)]_n polimerinin ve f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının, WST sitotoksosite testi ile f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n ve f-

MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatlarının MCF-7 meme adenokarsinoma epitel hücrelerine olan sitotoksik etkisi saptanmıştır.

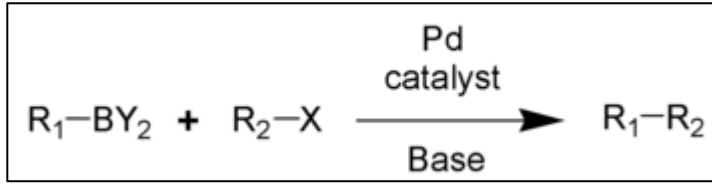
WST yöntemi için, hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrolaklarda, her bir kuyucuğa 1×10^6 hücre/mL olarak hazırlandı. Her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara sekiz farklı konsantrasyonda f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n ve f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER-2 biyokonjugatı eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Çalışmada her bir parametre üçer tekrarlı olarak çalışıldı. Hücreler 37 °C, % 5 CO₂ ortamında inkübe edildi. 48. saatte her kuyucuğa 10 µL WST (Suda çözünür tetrazolyum Tuzu) solüsyonu eklendi ve dört saate kadar inkübe edildi. Her 30 dakikada bir 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri, spektrofotometre kullanılarak okundu. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edildi. Aşağıdaki formülden yararlanılarak % sitotoksosite değerleri hesaplandı (Wörle-Knirsch et al,2006).

$$\% \text{ sitotoksosite} = 1 - (\text{ölçülen optik dansite değeri} / \text{kontrol değeri}) \times 100$$

MTT yöntemi için ise hücre süspansiyonu, yine 96 kuyucuklu mikrolaklarda, her kuyucukta 15 000 hücre olacak şekilde seyrelmeler yapılarak hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu eklenerek üç gün 37 °C, 5 % CO₂ ortamında inkübe edilerek hücreler büyütüldü. Ardından hücreler yıkandı ve kuyucuklara [Polifenilen-PEG(750)]_n ve f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n örnekleri 100 µl/ml, üç tekrar olacak şekilde uygulandı. Negatif kontrol için ilgili besi yeri kullanıldı. Hücreler 37 °C, % 5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Hücreler yıkanıp örneklerden arındırıldıktan sonra 110 µl (%10) MTT solüsyonu eklenerek 4 saat 37 °C, % 5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Bu süreç içerisinde hücre içinde formazon kompleksi oluştu ve mor rengin dışarı çıkarılması için 1M HCL (%10) içinde çözünmüş 100 µl SDS tuzu çözeltisi kuyucuklara eklenerek 1, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat inkübasyonlarında 570nm'de OD spektroskopik olarak okumalar yapılarak sitotoksik etki hesaplandı (Mosmann, 1983).

2.3.6 Floresans polimer sentez ve yapısı

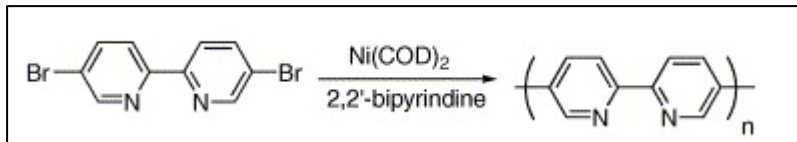
Floresans işaretleyici olarak, kanser görüntülemeye kullanılması hedeflenen polimerin aromatik gruplarının bir araya gelişi *Suzuki Kenetleme* organik reaksiyonu ile, PEG(750) yan grubunun eklenmesi ise *Yamamoto kenetlenmesi* reaksiyonun aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Suzuki tepkimesi paladyum kataliziyle bir aril boronik asit ile bir arilhalojenürün kenetlenmesini ifade etmektedir. Son zamanlarda ise bu kavram oldukça genişlemiş ve artık sentez reaksiyonu alkil, alkenil, aril, allil ve alkinil gruplarını da içermektedir.



Şekil 2.5 Suzuki çapraz kenetleme reaksiyonu

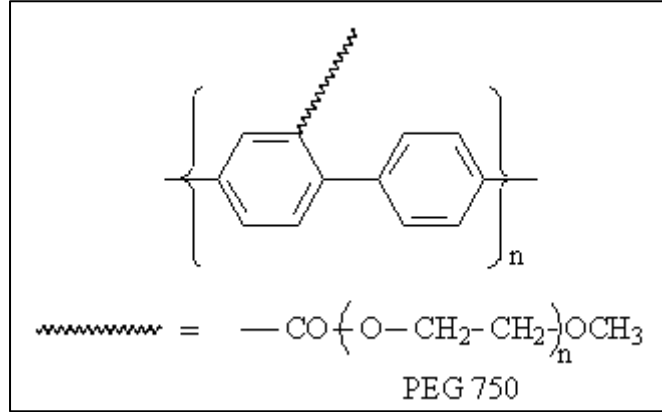
Suzuki çapraz kenetlenme tepkimesinin mekanizması diğer çapraz kenetlenme tepkimelerinin katalitik döngüsüne benzer ve dört belirgin basamaktan oluşur. Bunlar sırasıyla yükseltgen katılma, metatez, transmetalleme ve indirgen ayrılma basamaklarıdır. Yükseltgen katılma basamağında $\text{Pd}^{(0)}$ türleri organik halojenür ile $\text{Pd}^{(\text{II})}$ oluşturacak şekilde yükseltgenir. Bu aynı zamanda reaksiyonun hız belirleyici basamağıdır. Sonra Paladyuma bağlı anyon eklenen bazın anyonu ile değişir (metatez). Daha sonra $\text{Pd}^{(\text{II})}$ ile alkilborat kompleksi arasında transmetalleme gerçekleşir. Son olarak da C-C sigma bağının indirgen ayrılmasıyla yeniden $\text{Pd}^{(0)}$ elde edilir. Transmetalleme basamağında kullanılan bazın kesin rolü ve etkisi belirsizliğini koruması karşın, transmetallemenin baz vasıtasıyla elde edilen ve serbest boronik asitten daha elektrofilik olan dört koordinasyonlu borat anyonu ile kolaylaştığı düşünülmektedir (Kürti and Czako, 2005).

Yamamoto reaksiyonunda ise genellikle aril-halojen bileşenleri arasında gerçekleşen C-C kenetlenmesi olarak bilinir. Katalizör olarak metal bir kompleks olan bis(1,5-siklooktadien)nikel(0) ($\text{Ni}(\text{COD})_2$) kullanılır. Bu yöntem ile gerçekleştirilen polimerizasyonun avantajı, sadece tek ve tek tür fonksiyonlama gerektirmesidir. Ancak reaksiyonda nikel kompleksinin sitokiyometrik katsayısı bilinmelidir. Bununla birlikte yüksek moleküler ağırlıklı poliaromatik reaksiyonlar için kullanışlıdır (Cho et al, 2007). Örnek Yamamoto reaksiyonu şekil 2.6'da ifade edilmiştir.



Şekil 2.6 Yamamoto reaksiyonu

Sonuç olarak izlenen iki sentez stratejisi ile sentezlenen polimer şekil 2.7'de ifade edilmiştir,



Şekil 2.7 Floresans polimerin genel görünümü.

Floresans işaretleyici polimerin sentezinde PEG gruplarının varlığı uygulanabilirlik açısından oldukça önemlidir çünkü PEG grupları,

- Yükses hacimli olması nedeni ile biyokonjugata toksik etki yaratmaz
- Pek çok FDA onaylı ürün içerisinde biyoyoumluluk nedeni ile kullanılmaktadır
- Hidrofiliklikleri yüksektir ve esnektirler.
- Vücutta uygulandıkları çok fonksiyonlu nanopartiküllerin, plazma proteinleri ile etkileşimini önleyerek sirkülasyon süresini dolayısı ile etki süresini uzatırlar (Misra et al, 2010).

2.4 Biyokonjugatların Karakterizasyonlarına Yönelik Çalışmalar

2.4.1 Raman spektroskopisi

Çalışmanın bu aşamasında yapısal analiz gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, özellikle CNT'ler için sıklıkla uygulanan teknik Raman spektroskopisidir. Raman spektroskopisi ile elde edilen veriler karbon nanotüplerin yüzeylerinde oluşan yapısal bozulmalar hakkındadır ve bu yaklaşımla yüzey modifikasyonun başarılı olup olmadığı ile ilgili veri elde edilir. Analizlenen örnekler sırasıyla şöyledir:

- (i) MWCNT (kontrol)
- (ii) f-MWCNT
- (iii) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatı

Analizlenecek üç örneğin katı formlarının çok az miktarları yüzeye ayrı ayrı damlatıldı. Spektrumlar, 10X büyütme objektifinde, 514 nm ve % 10 lazer gücü altında elde edilmiştir.

2.4.2 Yüzey potansiyeli ölçümü (Zeta Potansiyel)

Farklı şekillerde modifiye edilmiş CNT lerin yüzey yükleri, Zetasizer NanoZS cihazı (Malvern Instruments, UK) aracılığı ile saptanmıştır. Özetle, modifikasyon sonucunda yapılara eklenen moleküller yüzey yükünde değişikliğe neden olmaktadır. İlgili analizler, her birinin MWCNT konsantrasyonu 0,1 mg/mL olan pH 7,0 distile-deiyonize suda gerçekleştirilmiştir. Yüzey yükleri analizlenen örnekler sırası ile şöyledir;

- (i) f-MWCNT
- (ii) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatı
- (iii) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatı

2.4.3 Termal gravimetrik ölçüme dayalı analiz (TGA)

Termal değişim dolayısıyla molekülde farklılık gösteren ağırlık ölçümüne dayalı TGA, CNT'lerin yüzey karakterizasyonu için kullanışlı bir yöntemdir. Modifikasyon sonrası yüzeye bağlanan yapıların termal stabiliteleri farklı olduğundan ısısal farklılıktan her biri ayrı etkilenirler prensibi ile yüzey modifikasyonları saptanmaktadır. Analiz için her bir katı formda ki örnekten yaklaşık 1,0 mg örnek, tutma haznesine yerleştirilmiştir. Sıcaklık dakikada 10 °C olacak şekilde 800 °C üst limitine kadar çıkarılmıştır. Termal analizleri gerçekleştirilen örnekler aşağıda belirtilmiştir;

- (i) MWCNT (kontrol)
- (ii) F-MWCNT
- (iii) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatı
- (iv) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatı.

2.4.4 ATR/FT-IR

ATR/FT-IR, moleküllere belirli aralıkta dalga boyu taraması yaparak, atomik bağların absorpsiyon, saçılım ve bağ titreşim hareketlerinden yararlanır ve taranan aralıkta ki tüm bağların spektrumu bilgisini verir. ATR/FT-IR CNT lerin modifikasyonları sonucu yüzeylerinde oluşan reaktif grupların ve bağlanan biyomolekül yapılarının saptanmasında önemli bir sistemdir. Tez kapsamında yüzeyleri farklı şekillerde modifiye edilen MWCNT yapıları katı formda (1,0 mg) hazırlanıp analizlenmişlerdir. Analizi yapılan ilgili örnekler şu şekildedir;

- (i) MWCNT (kontrol)
- (ii) f-MWCNT
- (iii) f-MWCNT//[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2.

2.4.5 Çözünürlük testi

Kalitatif bir analiz yöntemi olan çözünürlük testi, tez kapsamında kilit rol oynayan MWCNT'lerin çözünürlleştirilmesi aşamasında uygulanmıştır. MWCNT'lerin asit muamemesi ise çözünürlleştirilmesinin ardından f-MWCNT'ler çözünürlük testine tabi tutulmuştur. Bu amaçla pH 7,0 saf su içerisinde sırasıyla 0,15 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 5,0 mg/mL ve 15 mg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonda ki f-MWCNT'lerin çözünürlükleri kıyaslanmıştır.

2.4.6 Floresans ölçümler

Floresans ölçümleri, floresans özellik sergileyen polimer ve ilgili konjugatlarının karakterizasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır. Tez kapsamında floresans spektrometre kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar üç başlık altında toplanmıştır;

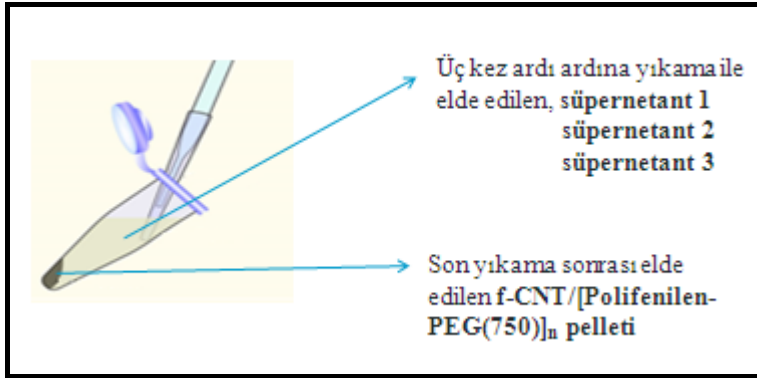
2.4.6.1 Polimere ilişkin dalga boyu taraması

1,0 mg/mL [Polifenilen-PEG(750)]_n floresans polimerin uyarılma (Eksitasyon) dalga boyu belirli aralıklarda değiştirilerek, değiştirilen dalga boylarına karşılık gelen emisyon sinyalleri grafiğe geçirilerek polimer için en uygun uyarılma dalga boyu saptanmış ve ilerleyen çalışmalarda bulunan optimum

dalga boyu kullanılmıştır. Çalışma da her uyarım için tarama 600 nm dalga boyuna kadar yapılarak, slit: 10 boyutunda ışımlar toplanmıştır.

2.4.6.2 f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının floresans özelliğinin karakterizasyonu

Bu kısımda amaç, kovalent olmayan etkileşimler ile f-MWCNT üzerine konjuge edilen polimerin belirlenmesi olup, bu şekilde sentezlenen f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının floresans bir prob olarak kullanılıp kullanılmayacağı hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Bu amaçla, gece boyu inkübasyona bırakılan f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n için metod kısmında bahsedilen yıkama ve saflaştırılma prosedürü sonrası kalan yıkama suları toplanarak floresans ölçümleri alınmış ve elde edilen son konjugatın floresans şiddeti ile kıyaslanmıştır. İlgili prosedür şekil 2.8’ de belirtilmiştir.



Şekil 2.8 Ard arda yıkamalar sonrası floresans ölçümleri alınan süpernetantlar ve pellet.

2.4.6.3 [Polifenilen-PEG(750)]_n floresans polimerin konjugasyon adımları sonrası floresans şiddeti karakterizasyonu

Floresnas karakteri çeşitli kimyasallara ve ısıya maruz kalma durumunda başta sahip olduğu yoğunlukta ve stabilite de olmayabilir. Bu amaçla her konjugasyon adımı sonrası floresans şiddetin ölçülebilir boyutta olup olmadığının ölçülmesi gereklidir. Floresans karakterleri analizlenen örnekler aşağıda belirtilmiştir; MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n

- (i) 0,2 mg/mL[Polifenilen-PEG(750)]_n floresans polimer
- (ii) MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatı
- (iii) MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatı

2.4.7 Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)

AFM, karbon nanotüplerin yayıldığı belli boyuttaki alanın üç boyutlu görüntüsünü ve aynı zamanda içeriğindeki nanoyapıların boyutları hakkında fikir veren mikroskoptur. Tez kapsamında AFM görüntüleri alınan iki örnek aşağıda belirtilmiştir;

- (i) f-MWCNT
- (ii) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatı

Görüntü almak amacı ile 0,1 mg/mL f-MWCNT ve 0,2 mg/mL [Polifenilen-PEG(750)]_n floresans polimeri içeren örnekler 100 kat saf su ile seyreltilerek kuruması amacı ile yaklaşık 1,0 cm²'lik yüzeye damlatılarak kuruması beklendi. Görüntüler 5 µm x 5 µm alanı içerisinde, kontakt moda, 0,5 Hz tarama hızı ile alınmıştır.

2.4.8 Elektron mikroskopisi (SEM ve TEM)

Taramalı elektron mikroskobu, elektron mikroskobunun bir türüdür ve örneği yüksek enerjili elektron demeti ile tarayarak üç boyutlu fotoğraf görüntüsü oluşturur. Dolayısı ile örneğin yüzey topolojisi ve kompozisyonu gibi önemli veriler üç boyutlu SEM görüntüleme cihazı ile elde edilir. Tem görüntüleme sisteminde farklı olarak elektron demeti çok ince örnek kesinin içinde geçerek örneğin morfolojisi ile birlikte görüntü CCD kamera ile alınır.

Tez kapsamında karboksillenmiş MWCNT'lerin TEM görüntüleri alınırken, TEM/SEM görüntüleri alınan örnekler aşağıda belirtilmiştir.

- (i) f-MWCNT
- (ii) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatı
- (iii) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatı
- (iv) MCF-7 kontrol hücresi
- (v) MCF-7-f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 uygulaması

Uygulama öncesi sıvı formdaki örnekler yaklaşık 2,0 µL olacak şekilde yüzeye damlatılıp çözgeni uçurulduktan sonra, altın ile kaplanarak görüntülendiler.

2.4.9 Bradford protein tayini

Bradford protein tayini, sulu çözeltilerdeki protein miktarının spektrofometrik olarak belirlenmesinde kullanılan analitik bir yöntemdir. Ölçüm, protein molekülü yapısında ki amino asit kompozisyonuna bağlı olarak alınır. Yöntem uygulamasında, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılır. Proteinlere bağlanmış formu ile boya mavi renge dönüşür ve maviye dönüşme oranı ortamdaki protein miktarı ile doğrudan orantılıdır. Boya ile protein arasında oluşan bağ sonrası renk değiştirme oranı 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Uygulama öncesi standart bir proteinin (BSA) farklı seyrelme oranlarına karşılık doğrusal bir kalibrasyon grafiği çizilmelidir. Ardından, uygulanacak standart çözeltiler ve örneklerin 0,2 ml' si ile 0.8ml Coomassie Blue çözeltisi karıştırılarak 15 dakika inkübasyona bırakılır. Bu süreç ardından oluşan renksel değişim 595 nm dalga boyunda okunarak kaydedilir. Çizilen kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak örnek içindeki protein miktarına ulaşıldı (Zor and Selinge, 1996).

2.4.10 Floresans mikroskop

Tez kapsamında sentezlenen konjugatların, kanser hücrelerine uygulanmasının ardından görüntüleme, ilaç taşıyım potansiyellerinin incelenmesi amacıyla floresans mikroskop görüntüleri alınmıştır. Görüntüsü alınan sentezler ve hücreler Tablo 2.2' de özetlemiştir.

Çizgele 2.2 Floresans mikroskop görüntüsü alınan hücre türleri ve uygulanan konjugatlar

Hücre Hattı	Görüntüsü Alınan Konjugatlar			
<i>MCF-7</i>	[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2/Bleomisin
<i>PC-3</i>	/[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2	-
<i>Sağlıklı meme epiteli</i>	/[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2	-

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Tez kapsamında hedeflenen kanser teşhis ve tedavisine yönelik biyokonjugatların hazırlanması amacı ile kullanılan temel materyaller çok duvarlı karbon nanotüplerdir (MWCNT). Bu yapılarının seçilmesinin nedeni yüzey alanının genişliği, termal stabilite ve modifikasyona açık olma gibi üstün özellikleri barındırıyor olmalarıdır. CNT yüzey alanlarının geniş olması onların çok çeşitli formlarda modifiye edilmelerine olanak sağlamaktadır.

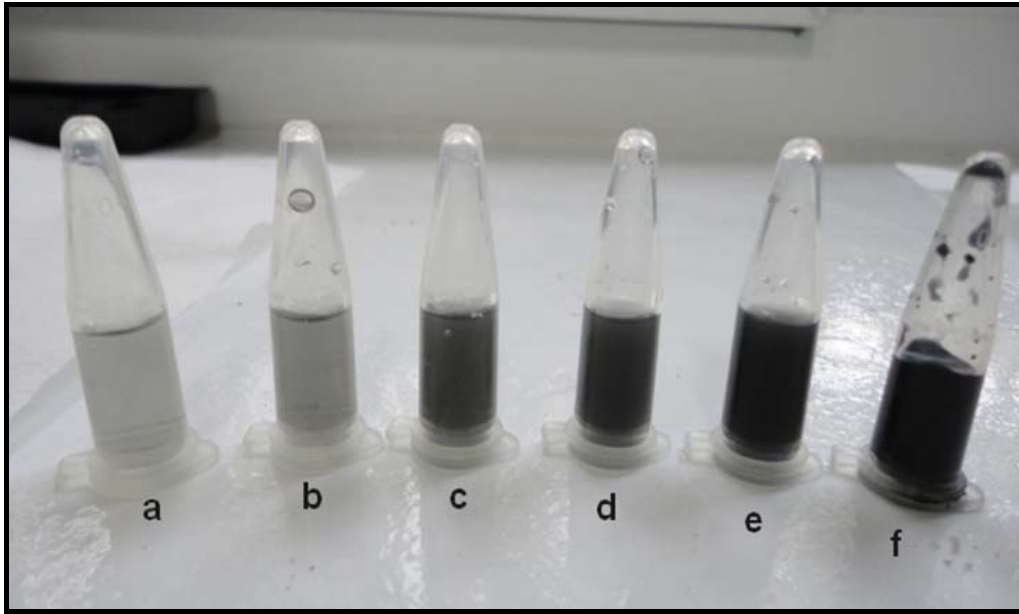
CNT'lerin en büyük dezavantajı, çok zor disperse olan ve pratikte herhangi bir çözgüde çözünürlük göstermeyen materyaller olmalarıdır. CNT'lerin nanoteknolojik alanında uygulamalara entegre edilebilmeleri için sulu çözgenler içerisinde çözünürlüklerinin arttırmak gerekir. Bunun çok fazla yöntemi bulunmaktadır ve temelde kovalent ve non-kovalent olmak üzere iki yaklaşım altında toplanırlar. Non-kovalent yaklaşımda CNT yan duvarları, polimer, peptid, oligomer, nükleik asit ve yüzey aktif maddelerce modifiye edilirler (Zheng et al, 2003; Islam et al, 2003; Richard et al, 2003). Bu yöntemin avantajı özellikle sensör uygulamaları için önemli olan, CNT'lerin aromatik yapısından ileri gelen elektronik iletkenliklerinin zarar görmemesidir. İkinci yani kovalent modifikasyon yaklaşımında ise, CNT'ler parçalanır, okside olur ve belli oranda karboksil, amin gibi reaktif gruplar açığa çıkar. Bu şekilde çözünürlük kazandırmanın, asit muamelesi, ozonlama gibi çok şekilli yöntemleri mevcuttur (Tagmatarchis and Prato et al, 2004)

CNT'ler çözünür formda elde edilmelerinin ardından, kanser teşhis ve tedavisi için kullanışlı bir nanovektör-taşıyıcı nano kargolar olarak kullanılabilirler. Görüntüleyici floresans prob ve kanser ilacı taşıma etkinlikleri günümüzün en çok çalışılan çalışma konuları arasında geçmektedir (Allen and Cullis, 2004). Günümüzde yapılan çalışmalar ile ilgili ilaç ve görüntüleyici ajan taşınım sistemleri mevcuttur (Pouton and Seymou, 2000). CNT'ler yalnızca yüzey alanlarının geniş olmaları ile değil hücre membranından kolaylı geçebildikleri için bu amaç için kullanılırlar. Örneğin floresans işaretlenmiş CNT'lerin çok çeşitli hücrelerin içine girdikleri ya da hücre membranlarına tutundukları, floresans ölçüm ve görüntüleme yöntemleri ile saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, CNT yüzeyleri 1,3-diplorsiklo katılma reaksiyonu ile modifiye edilmiş ve bu sayede floresans peptit ve florosein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek hücre etkileşimleri saptanmıştır (Pantarotto et al, 2004). Benzer bir çalışma, CNT'lerin oksidasyonu sonrası floresans streptavidin ile modifiye edilmesi ile yapılmış ve benzer sonuçlar alınmıştır (Kam et al, 2004). Günümüze kadar yapılan çalışmalar ve bilinen

bilgiler ışığında tez kapsamında gerçekleştirilen çözünürlük, yüzey modifikasyonları ile ilgili çalışmalar ve bu çalışmalara ilişkin veriler sunulmuştur.

3.1.1 Çözünürlük denemesi

Çalışmanın bu aşamasında, asit muamelesi kovalent modifikasyon sonrası çözünür forma geçen ve MWCNT'lerin (f-MWCNT) farklı konsantrasyonlarda sergiledikleri çözünürlük karakterleri incelenmiştir. Sentezlenen f-MWCNT'lerin çözünürlükleri pH 7,0 olan saf su içerisinde, oda koşullarında çözülerek test edilmiştir. Bu amaçla çözünürlükleri test edilecek f-MWCNT konsantrasyonları sırası ile 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 5,0 mg/mL ve 15 mg/mL olacak şekilde hazırlandılar. Farklı oranlarda hazırlanan f-MWCNT'lerin görüntüleri aşağıda şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.1 Farklı konsantrasyonlarda f-MWCNT'lerin sergiledikleri çözünürlük karakterleri
a) 0,1 mg/ml b) 0,3 mg/ml c) 0,5 mg/ml d) 1,0 mg/ml e) 5,0 mg/ml f) 15mg/ml

Elde edilen sonuçlar çözünürlük hakkında kalitatif bir sonuç teşkil etmektedir. Görüntüler göstermektedir ki, 0,1 mg/mL'den 0,5 mg/mL'ye kadar f-MWCNT'lerin sergiledikleri çözünürlük karakterleri iyidir ve agregat oluşumu gözlenmemektedir. 15 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan örneğin çamur kıvamında bir karakter sergilediği ve dolayısı ile çözünürlük derecesinin iyi olmadığı saptanmıştır. Ayrıca çözelti içerisinde ve içerisinde bulunduğu kalıbın yan yüzeylerinde çözünmeden kalan agregatların varlığına rastlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ilgili literatürler ile uyumlu sonuçlar sergilenmiştir (Wang et al, 2006). Aynı zamanda hazırlanan çözeltilerde, çözünürlüğün stabilitesinin saptanması için örnekler oda koşullarında depoya kaldırılmıştır. Bir hafta

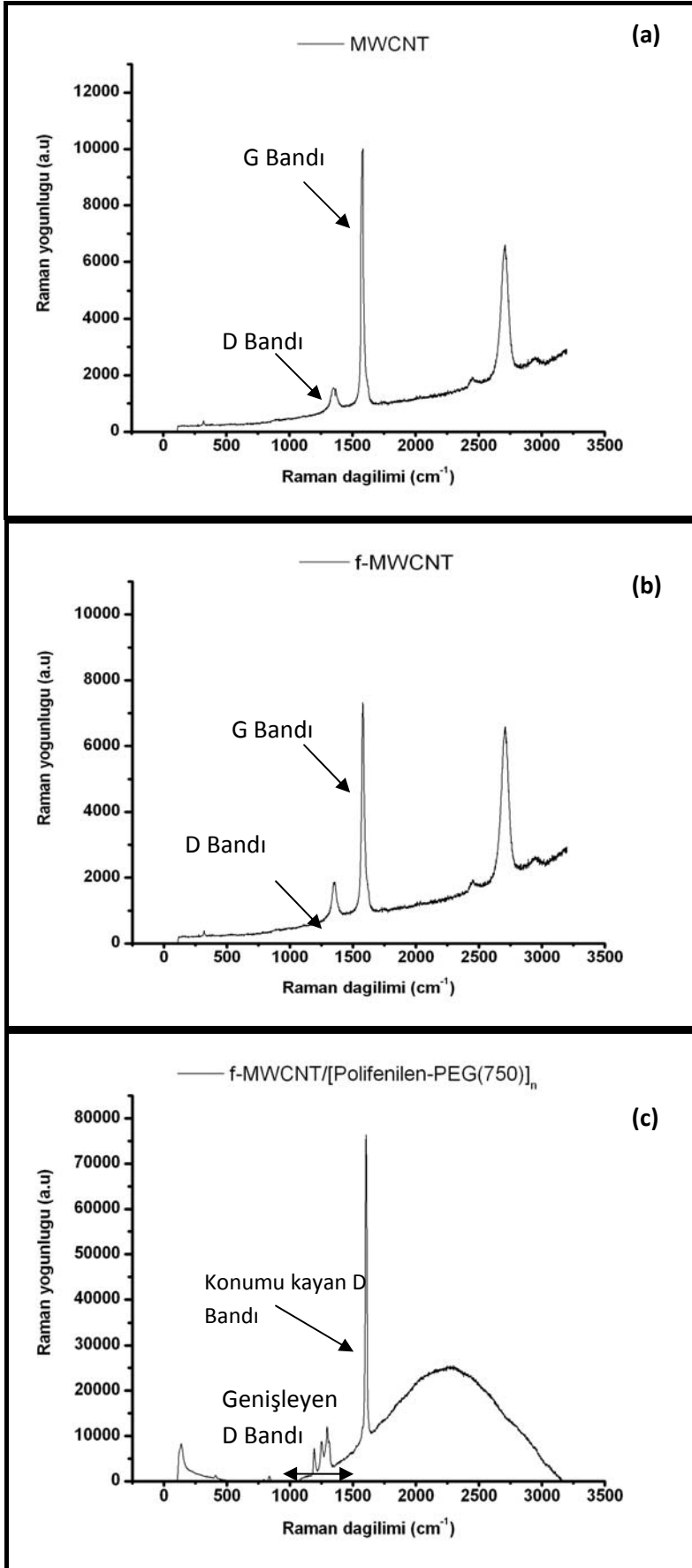
sonunda, 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 1,0 mg/mL konsantrasyonunda ki örneklerin çözünürlüklerinde farklanma gözlenmemiş, 5,0 mg/mL f-MWCNT çözeltisinde kısmen, 15 mg/mL f-MWCNT çözeltisinde ise büyük çaplı agregatlaşmaya bağlı olarak çökeltme olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, uygulanan çözünürlük testi verilerinden ve ilerleyen çalışmalarda kullanılacak materyallerin mol oranları hesaba katılarak 0,1 mg/mL f-MWCNT çözeltisinin kullanımı uygun görülmüş ve bu konantrasyonlar ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.1.2 Raman spektroskopisi

CNT'ler keşfedildiklerinden bu yana sahip oldukları üstün fiziksel özellikleri nedeni ile geniş kullanım alanına sahip materyallerdir. Raman spektroskopisi sistemi, pek çok materyalde olduğu gibi CNT lerin tek boyutlu yapısal karakterlerinin analizlenmesinde uygun bir cihaz olduğu kanıtlanmıştır (Dresselhaous et al, 2005; Jorio e al, 2004). Raman spektroskopisi ile CNT'lerin elektronik yapıları ve titreşim özellikleri belirlenebilir (Kavan et al, 2001). Çoğunluklu olarak çap boyutu, yeni sentezlenen CNT örneklerinin kalite kontrolü, yapısal düzensizlikleri ve modifikasyonlar sonrası yapısal bozulma oranları gibi karakterizasyon çalışmaları Raman spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (Astakhova et al, 2003; Dresselhaus et al, 2002)

Raman pikleri ve yoğunlukları ile molekül yapılanması arasında birebir ilişki vardır. Yüzey modifikasyonuna uğrayan CNT'lerin raman pik ve yükseklikleri, modifiye olmayan CNT'lere göre farklıdır. Sonuç olarak, tez kapsamında CNT yüzeyinde gerçekleştirilen modifikasyonların analizi, Raman spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. CNT'lerin bilinen iki karakteristik raman bandı vardır. Bunlardan biri 1400-1600 cm^{-1} aralığında gözlenen yüzeysel **G bandı**, diğeri ise 1200-1300 cm^{-1} aralığında gözlenen **D düzensizlik bandı** dır. İsimlerinden de anlaşılacağı üzere D bandı, CNT'lerin hegzagonal karbon ağı ile yapılanmış yan duvarlarında oluşan sp^3 hibridizasyonu ile yapısında oluşan yapısal düzensizlik ve bozukluklar ile ilgilidir. G bandı ise, CNT'lerin grafitik hegzagonal yan duvarlarının doğal sp^2 yapılanmasından dolayı gözlenmektedir.

Raman spektroskopisi ile analizlenen, (a) MWCNT, (b) f-MWCNT ve (c) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n örneklerinin spektrumları şekil 3.2' de gösterilmektedir;



Şekil 3.2 a)MWCNT b)f-MWCNT c)f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n Raman spektrumları

MWCNT ve f-MWCNT örneklerinin spektrumlarında, D ve G bantları sırasıyla 1354 cm^{-1} ve 1580 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Fonksiyonlanmış MWCNT'lerde asit muamelesi sonucu karboksil grubu oluşumuna bağlı olarak sp^3 karbon hibridi sayısı arttığı için yapısal bozulmalar ile ilişkili D bandı yoğunluğu artmış, grafitik yan duvarlarda sp^2 hibrid karbon sayısı azaldığı için G bandı yoğunluğu azalmıştır. Hesapsal olarak sp^3/sp^2 yani ID/IG oranında modifikasyon sonrası artışın görülmesi, asit muamelesi sonucu grafitik yan duvarlarının karboksil gruplarınca modifiye edildiğini işaret etmektedir. Elde edilen verilere göre ID, IG ve ID/IG oranları belirtilmiştir (çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Raman spektrumları alınan örneklerin karakteristik bant konum, yoğunluk ve oranları

	MWCNT	f-MWCNT	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n
D bandı konumu	1354 cm^{-1}	1354 cm^{-1}	1284 cm^{-1}
G bandı Konumu	1580 cm^{-1}	1580 cm^{-1}	1606 cm^{-1}
ID(bandı yoğunluğu)	1280 (a.u)	1900 (a.u)	-
IG(bandı yoğunluğu)	9800 (a.u)	7180 (a.u)	-
ID/IG	0,13	0,26	-

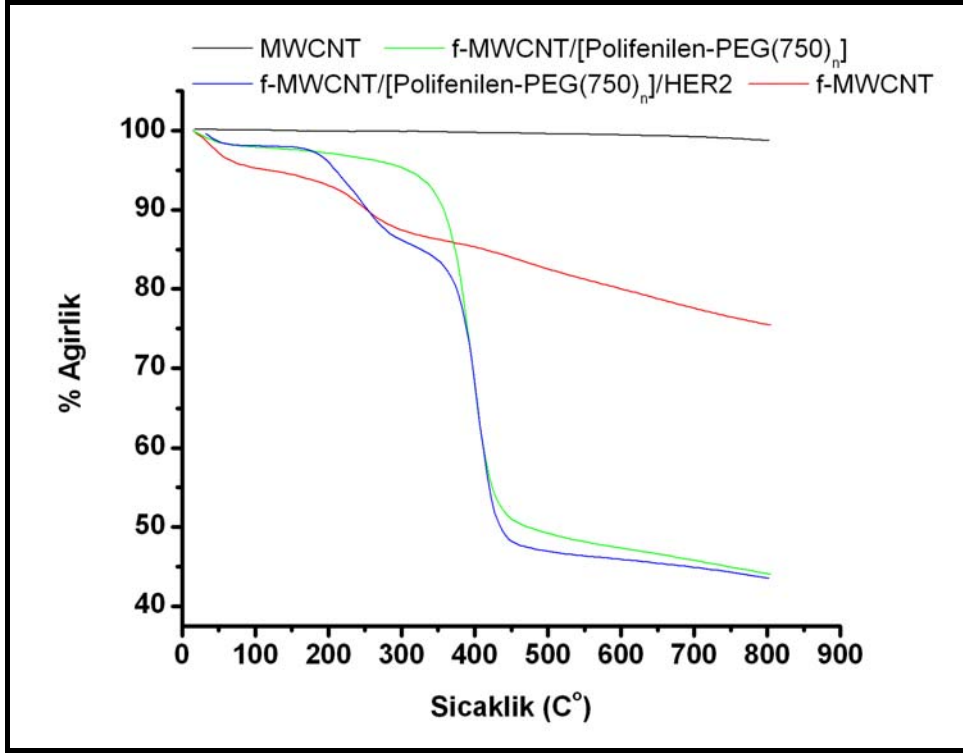
Veriler açıkça ifade etmektedir ki, modifikasyon sonrası ID/IG bant yoğunlukları oranı 0,13'den 0,26 değerine yükselmiştir, dolayısı ile yapısal modifikasyon gerçekleştirilmiştir. f-MWCNT/[PEG(750)]_n konjugatında ise, f-MWCNT yüzeyinde polimer kılıf tabakasının varlığı, MWCNT'nin D ve G bantlarının genişlemesine sebep olmuştur. Dolayısı ile genişleyen bantlarda aynı zamanda konumsal kaymada gözlenmiş, D ve G bantları sırası ile 1284 cm^{-1} ve 1606 cm^{-1} noktalarına kaymışlardır. Polimer ile f-MWCNT'lerin non-kovalent olarak konjuge edildikleri bu sayede kanıtlanmıştır. Bahsedilen sonuç ve yaklaşımlar literatür ile uyum göstermektedir (Adeli et al, 2009)

3.1.3 Termal gravimetrik ölçüme dayalı analiz (TGA)

TGA analizi CNT'lerin yüzey analizlerinin yapılmasında sıklıkla kullanılan bir diğer yöntemdir. Özellikle, kovalent ve non-kovalent modifikasyon ile yüzey içeriği zenginleştirilen CNT'lerin her bir bileşenin termal stabilitesi farklı olduğu prensibi ile analiz gerçekleştirilir.

Uygulamada analizi gerçekleştirilen konjugatlar sırası ile; (a) MWCNT, (b) f-MWCNT, (c) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n ve (d) f-

MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2'dir. Sıcaklık analiz boyunca dakikada 10 °C artacak şekilde 800 °C'ye kadar çıkarılmıştır. 1,0 mg katı formdaki örneklerin analiz sonuçlarına ilişkin Grafik aşağıda ki gibidir (Şekil 3.3);



Şekil 3.3 Konjugatların termal gravimetrik analiz sonuçları

Analiz sonunda elde edilen veriler göstermektedir ki, MWCNT'nin fonksiyonlanmamış formu toplamda %1,26 oranında kütle kaybına uğramıştır. Bu sonuç yalnızca MWNCT'nin artan sıcaklığa bağlı olarak uğradığı yapısal bozunmadan kaynaklıdır. Kütleli azalış aynı zamanda MWCNT'lerin termal stabiliteilerinin yüksek olduğu gerçeğini kanıtlamıştır çünkü sıcaklığa bağlı yapısal bozulmanın az olması nedeni ile kütleli azalış da aynı oranda azdır. f-MWCNT'lerden elde edilen veride ise sıcaklığa bağlı kütleli azalış %24,5 olarak hesaplanmıştır. Kütleli azalışın MWCNT'lerden daha fazla olmasının nedeni modifikasyon sonucu yüzeyde oluşan karboksil gruplarının sıcaklığa bağlı olarak yeniden deformasyona uğramasıdır. Bu sonuç, asitle oksidasyona maruz bırakılan MWCNT'lerin yan duvarlarında karboksil gruplarının oluştuğunu kanıtlamıştır. f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatı ile gerçekleştirilen analiz sonucunda saptanan kütleli azalış %55,9 olarak hesaplanmıştır. Bu azalış f-MWCNT yan duvarlarına non-kovalent olarak bağlanmış polimerik yapıdan kaynaklanmaktadır ve Şekil 3.3' den de görüldüğü üzere bu azalış termal stabilitesini kaybettiği 300 °C ile 400 °C bölgesi arasında gerçekleşmiştir. Son olarak analizi gerçekleştirilen f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatı için sıcaklık artışına bağlı olarak kütleli azalış oranı toplamda % 56,5 olarak saptanmıştır. Şekilde x

de görülmektedir ki bu kütleli artış iki ayrı bölgede ki sıcaklık farklanmasından etkilenen yapılardan kaynaklanmıştır. Bunlardan biri 160 °C ile 350 °C arasında yapısal bozunmaya uğramış ve kütleli azalışa sebep olmuş konjuge protein (HER2) yapılarıdır. Diğer ise yine 430 °C' ye kadar yapısal bozunması devam eden [Polifenilen-PEG(750)]_n polimerinden kaynaklıdır. Verilerin ifade ettiği sonuç, MWCNT'lerin yüzeylerinin karboksillenme, polimer ile non-kovalent modifikasyon ve ardından HER2 proteini ile kovalent modifikasyonlarının başarı ile gerçekleştirilmiş olduğudur. Veriler literatürce desteklenmektedir (Shen et al, 2009; Tachimoto et al, 2007).

3.1.4 Yüzey potansiyeli ölçümü (Zeta potansiyel)

Zeta potansiyel, kolloid çözeltilerde elektrokinetik potansiyel teriminin bilimsel karşılığıdır. Materyallerin zeta potansiyellerinde ki değişim onların yüzey modifikasyonları hakkında fikir vermektedir. Aynı zamanda yüzey potansiyelleri ilgili materyalin çözünürlük derecesi hakkında da bilgi vermektedir.

Tez kapsamında yüzey potansiyelleri pH 7,0 olan saf su içerisinde ölçülmüştür. MWCNT konsantrasyonu 0,1 mg/mL, polimerin konsantrasyonu 0,2 mg/mL ve 0,3 mg/mL HER2 protein örneklerin içeriğinde bulunmaktadır. İlgili sentez ve konjugatlar ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2' de ifade edilmiştir;

Çizelge 3.2 Örneklerin zeta potansiyel değerleri

Örnek Adı	Zeta Potansiyel (mV)
f-MWCNT	-13.3±0.31
[Polifenol-PEG(750)] _n	-5.05±0.022
f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n	-5.98±0.027
f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2	-2.95±0.01

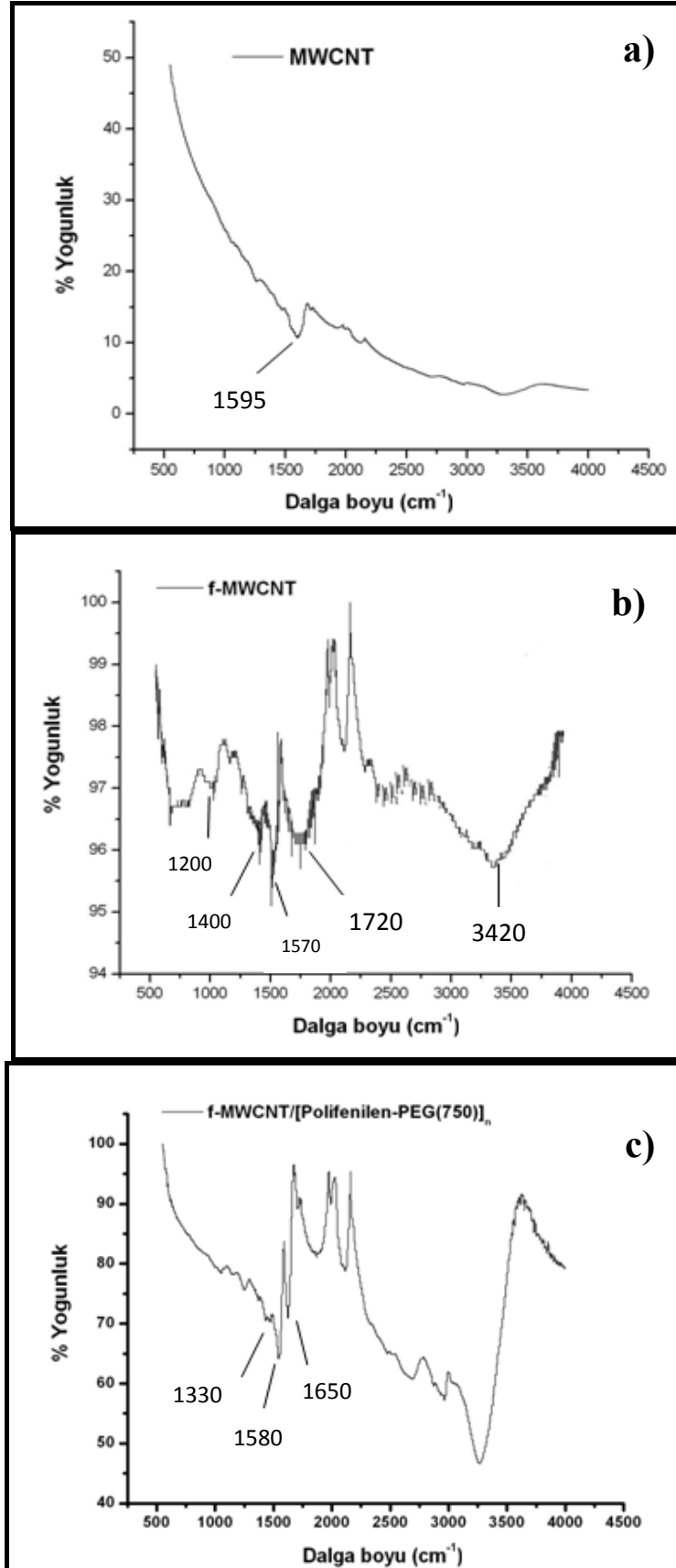
MWCNT'lerin yüzey karakterizasyonları hakkında, yüzey potansiyeli değerlerinden yola çıkarak konjugasyonun ve sentezin gerçekleşip gerçekleşmediği bilgisine ulaşılabilir. Deney setinde kontrol grubu olarak işleminden geçmemiş MWCNT kullanılamamıştır çünkü bu formu ile çözünürlük sergilememektedir. MWCNT'nin asit muamelesi ile yüzeyinde karboksil grupları nedeni ile f-MWCNT negatif yüzey potansiyeli sergilemektedir. Floresans polimerin fonksiyonel grubu bulunmamaktadır ve genellikle nötr pH değerine yakın yüzey potansiyeli sergilerler. Kendi başına yüzey potansiyeli -5,05mV iken f-MWCNT ile konjuge edilmesinin ardından yüzey potansiyeli -5,98 mV değerine ulaşmıştır. Polimerin f-MWCNT yüzeyinde var olduğunu, yüzey yükünün polimer dolayısı ile polimerin kendi yüzey potansiyeline yaklaşmasından yola çıkarak söyleyebiliriz. Ayrıca, non-kovalent konjugasyon sonrası, negatifliğin azalması

polimerin, f-MWCNT yüzeyini kaplaması ile kısmi karboksilik grupları kapatmasından kaynaklanmaktadır. f-MWCNT/[Polifenol-PEG(750)]_n konjugatının spesifik hedefleyici HER2 antikoru ile kovalent bağlanmasından sonra biyokonjugatın yüzey potansiyeli -2,95 mV olarak saptanmıştır. Protein yapısı olan HER2 sahip olduğu pozitif yükler nedeni ile negatiflik kısmi olarak azalmıştır (Dhankar et al, 2011).

3.1.5 ATR/FT-IR (Fourier transform infrared spektroskopisi)

CNT'lere kovalent olarak molekül bağlanabilmesi için öncelikle yüzeylerinin ilgili reaksiyonlara açık hale getirilmesi gerekmektedir. CNT yüzeylerinin asit oksidasyonu aracılığı ile karboksillenmesi hem çözünürlük özelliğinin kazandırılması hem de fonksiyona açık hale getirilmesinde ki en elverişli yöntemdir. Literatürde CNT yüzeylerinin sahip olduğu yapısal bozukluklardan yararlanarak onları çeşitli fonksiyonel hale getirdikleri bilinmektedir (Li et al, 2007; Ramanathan et al, 2005; Jiang et al, 2004). CNT yan yüzeylerinde gerçekleştirildiği varsayılan modifikasyonların her aşaması, oluşan bağların titreşimi yardımı ve ATR/FT-IR cihazı yardımı ile belirlenmektedir

Tez kapsamında MWCNT yüzeylerinde gerçekleştirilen iki temel kovalent modifikasyon vardır. Bunlardan ilki yan duvarların karboksil fonksiyonlandırılması, ikincisi ise HER2 ve Bleomisin'in kovalent bağlanmasıdır. ATR/FT-IR analizi gerçekleştirilen (a) MWCNT, (b) f-MWCNT ve (c) f-MWCNT/[Polifenol-PEG(750)]_n sentezlerine ilişkin spektrumlar aşağıda belirtilmiştir;



Şekil 3.4 ATR/FT-IR spektrumları a) MWCNT spektrumu, b) f-MWCNT spektrumu c) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/Her2 spektrumu

Şekil 3.4a' da spekturumunda, belirgin pik 1595 cm^{-1} dalga boyunda gözlenmiştir. Bu pik MWCNT'nin yapısal iskeletinde bulunan C=C bağı titreşimini ifade etmektedir (Liu et al, 2003). Yapısal olarak hiçbir modifikasyona uğramadığı için açıkça gözlenebilen başka titreşimi ifade eden dalga boyu piki görülmemektedir.

Şekil 3.4b' de gözlenen pikler sırasıyla farklı bağ oluşumlarını ifade etmektedir. 1720 cm^{-1} karboksilik grupların C=O bağ titreşimini (Ramanatan et al, 2005,) ifade ederken, 1400 cm^{-1} karboksil gruplarında ki O-H bağ titreşimini (Shaffer et al, 1998) gösterir. 1200 cm^{-1} , karboksilik gruplarla ilgili C-O bağ titreşimini ve son olarak 3420 cm^{-1} dalga boyu –OH bağına ifade etmektedir (Ramanatan et al, 2005,). Böylece, asit oksidasyonu ile MWCNT yüzeylerinde olduğu düşünülen karboksil gruplarının her bir bağının titreşimi gözlenmiş ve MWCNT'lerin karboksil-fonksiyonlandırıldığı kanıtlanmıştır.

Şekil 3.4b spektrumunda gözlenen dalga boyları arasında anlam ifade eden pikler ırasıyla 1650 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} dir. 1660 cm^{-1} , f-MWCNT yüzeyinde bulunan –COOH grupları ile antikorum –NH₂ grupları arasında EDC/NHS kimyası uyarınca meydana gelen amid bağının karbonil grubunun (C=O) bağ titreşimini ifade etmektedir. 1580 cm^{-1} dalga boyu, amid bağı dolayısı ile oluşan planar N-H titreşimlerinden ileri gelmektedir. Son olarak 1330 cm^{-1} C-N bağ titreşimini işaret eder (Ramanatan et al, 2005,). Sonuç olarak elde edilen veriler amid bağının oluşum titreşimlerini, dolayısı ile f-MWCNT yüzeyine antikor bağlandığı ispatlanmıştır.

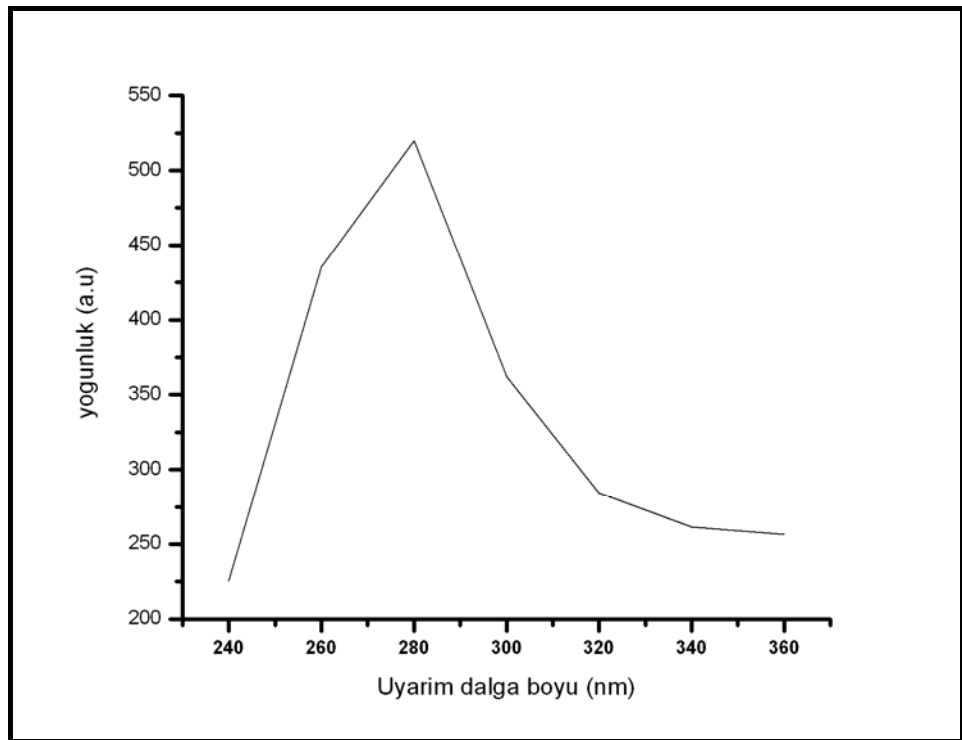
3.1.6 Floresans ölçümler

3.1.6.1 Polimerin dalga boyu optimizasyonu

Floresans karakterli polimerin maksimum sinyal verdiği dalga boyunun belirlenmesi, çalışmanın ilerleyen aşamalarında etkin sonuçların gözlenebilmesi için önemli bir parametredir. Bu amaçla polimerin PBS içerisinde hazırlanan 0,2 mg/mL konsantrasyona sahip çözeltisi ile ilgili elde edilen sonuçlar belirtilmiştir (Çizelge 3.3, şekil 3.5).

Çizelge 3.3 Polimerin maksimum dalga boyunun belirlenmesi

λ_{ex} (nm)	Şiddet(a.u)	λ_{em} (nm)
240	225.7	407
260	435.6	409
280	520	410
300	361.9	409
320	284.3	408
340	261.4	408
360	256.6	409



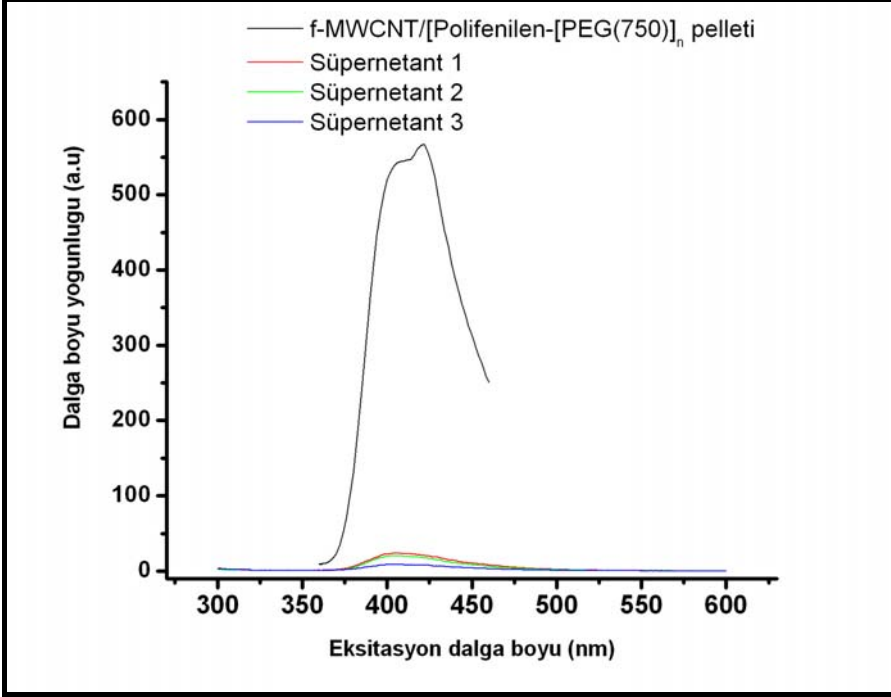
Şekil 3.5 Polimerin maksimum emisyonu

Sonuç olarak çalışma koşullarında floresans polimerin maksimum emisyon sinyali verdiği eksitasyon dalga boyu 280 nm olarak belirlenmiştir.

3.1.6.2 f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının floresans özelliğinin karakterizasyonu

Floresans polimer ile nonkovalent olarak modifiye edilen f-MWCNT'lerin modifikasyon sonrası yüzeylerini kaplayan polimerin floresans özelliğinin ne

kadarının korunduğu saptanmıştır. Çalışma da konjugasyon sonrası yıkamalardan elde edilen süpernatantlar ve alt fazda kalan f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatına ait 280 nm eksitasyon dalga boyu altında elde edilen emisyon değerleri şekilde belirtilmiştir (Şekil 3.6).

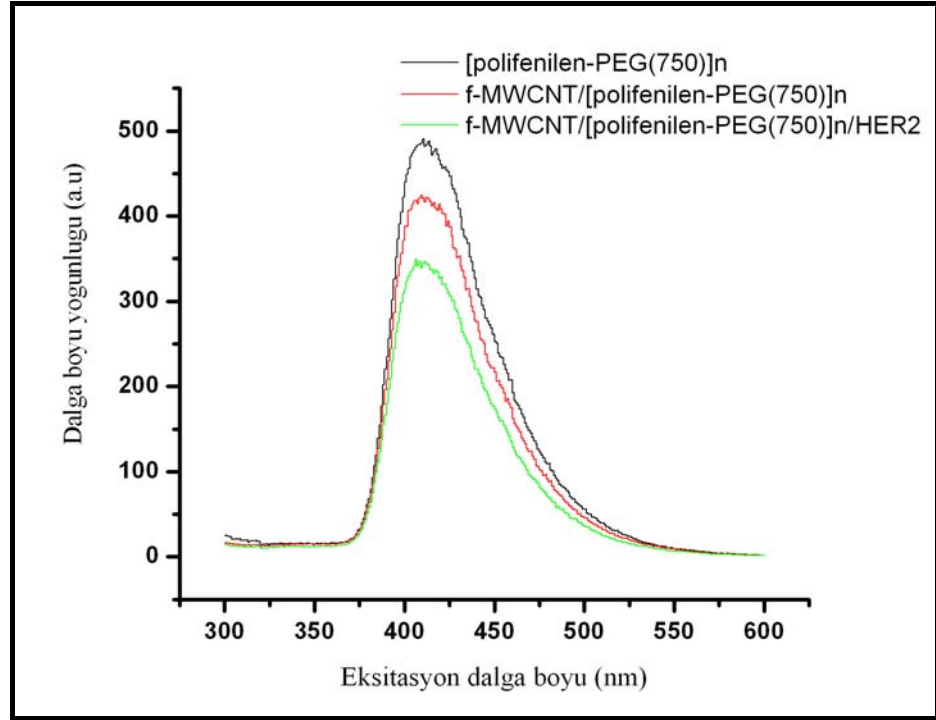


Şekil 3.6 Floresans konjugatın floresans prob özelliği

Çalışmaya ait veriler göstermektedir ki, filtrasyon ile saflaştırma işlemi sonrasında bağlanmadan ayrılan polimer miktarı dolayısı ile yoğunluğu, f-MWCNT yüzeyine bağlanan polimerin dolayısı ile ışıma yoğunluğu yanında ihmal edilir düzeydedir.

3.1.6.3 [Polifenilen-PEG(750)]_n floresans polimerin konjugasyon adımları sonrası floresans şiddeti karakterizasyonu

Materyallerin özellikle kovalent olarak modifiye edilmeleri bazı durumlarda sahip oldukları karakteristik özelliklerin zarar görmesine sebep olabilir. Çalışmanın kilit noktasından biri olan floresans özellikte polimerin floresans ışıma özelliğini kaybetmesi karşılaşılmak istenen bir sorun değildir. Bu sebeple kovalent ve non-kovalent konjugasyon adımları sonrasında elde edilen sentezlerin floresans karakterleri test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekilde belirtilmiştir;



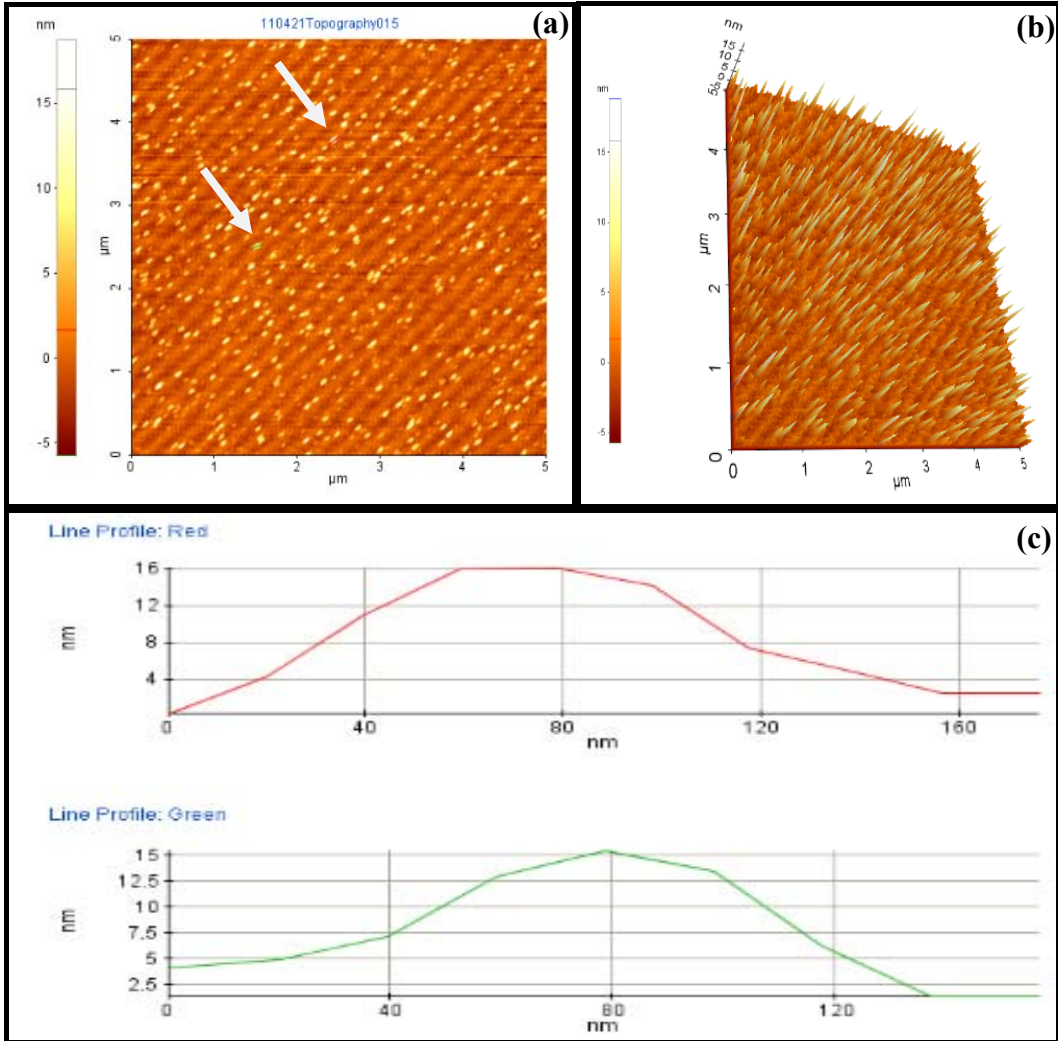
Şekil 3.7 Konjugasyon işlemleri sonrasında floresans karakter özelliği belirlenmesi

3.1.7 Atomik güç mikroskopisi (AFM)

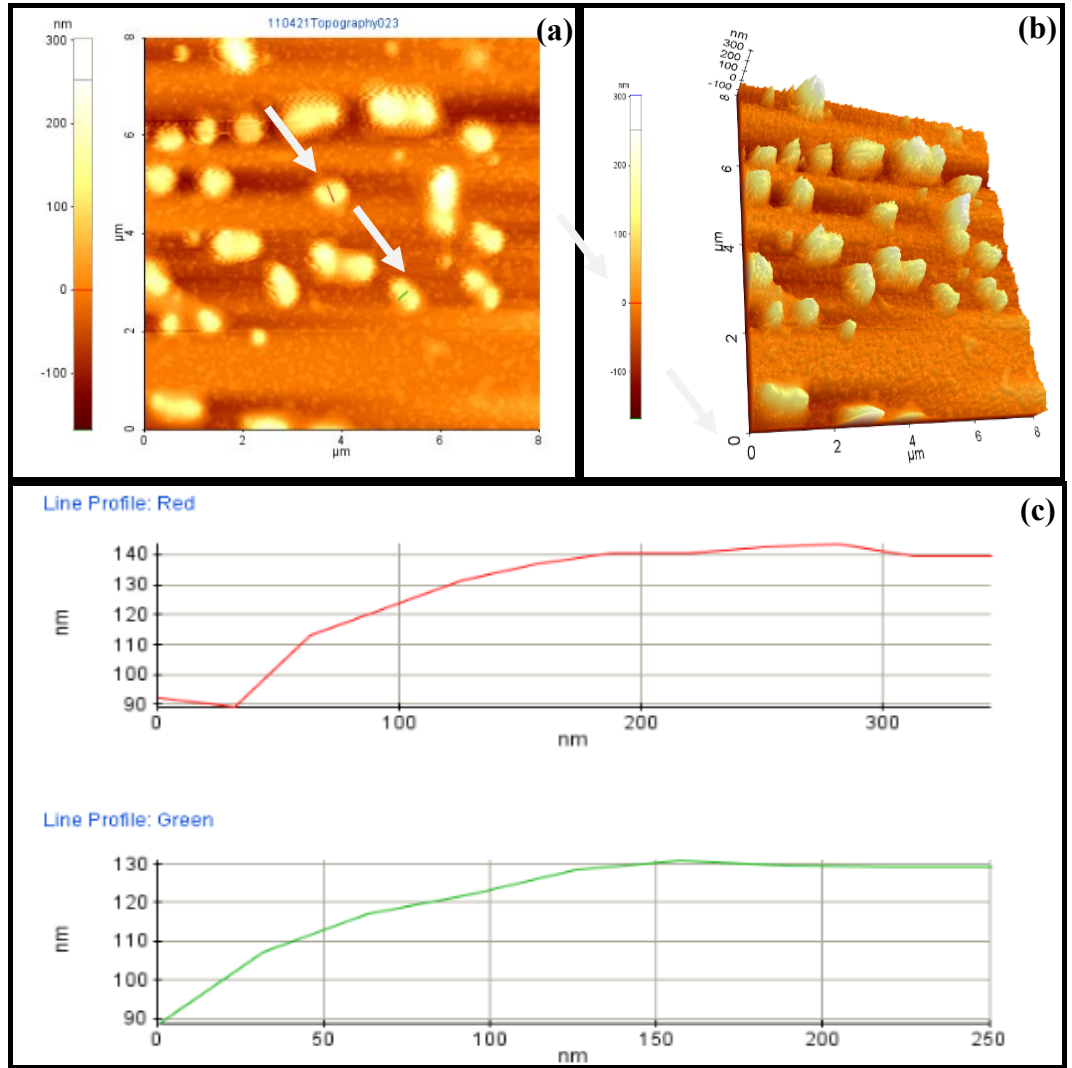
AFM, nanomateryallerin ve konjugatların yüzey topolojilerinin görüntülenmesi amacı ile kullanımı elverişli bir cihazdır. Tez kapsamında f-MWCNT ve MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n distile su ile 100 kat seytretilerek yüzeyi alkolle temizlenmiş mika yüzeyin 1,0 cm²'sini kaplayacak şekilde damlatılmış ve nemsiz ortamda kurutulmuştur. Taramalar 5 µm x 5 µm alan arasında 0,5 Hz hızında gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda, elde edilen üç boyutlu görüntülerde yaklaşık boyut analizi yapılmıştır. Sırası ile f-MWCNT, f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n örneklerinin yüzey topolojisi ile boyut analizi ve üç boyutlu görünümüne ilişkin veriler.

f-MWCNT'nin Şekil 3.8a' da ifade edilen genel görüntüsünden MWCNT'lerin karboksille modifiye edilmelerinin ardından oldukça homojen bir yapı sergilediği, analizlenen yüzeyin her noktasında homojen olarak dağılım göstermesinden anlaşılmaktadır. Şekil 3.8b ve 3.8c' de yapılan üç boyutlu boyut analizi amacı ile seçilen iki noktanın boyutlar 15 ve 16 nm olarak saptanmıştır. f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n'nin AFM görüntüsü Şekil 3.9 (a,b,c)' de verilmiş AFM genel görüntüsü sadece f-MWCNT'nin yüzey topolojisinden oldukça farklıdır. Bu sonucun temel sebebi f-MWCNT yüzeylerinde polimerin varlığıdır. Öne sürülen yaklaşım boyutsal analiz sonuçları da desteklenmektedir. Şekil üzerinde belirlenen noktalarda ki boyutsal analiz,

polimer ile konjugasyon sonrası 130 ve 140 nm olarak saptanan yüksekliklere ulaıldığını göstermektedir.



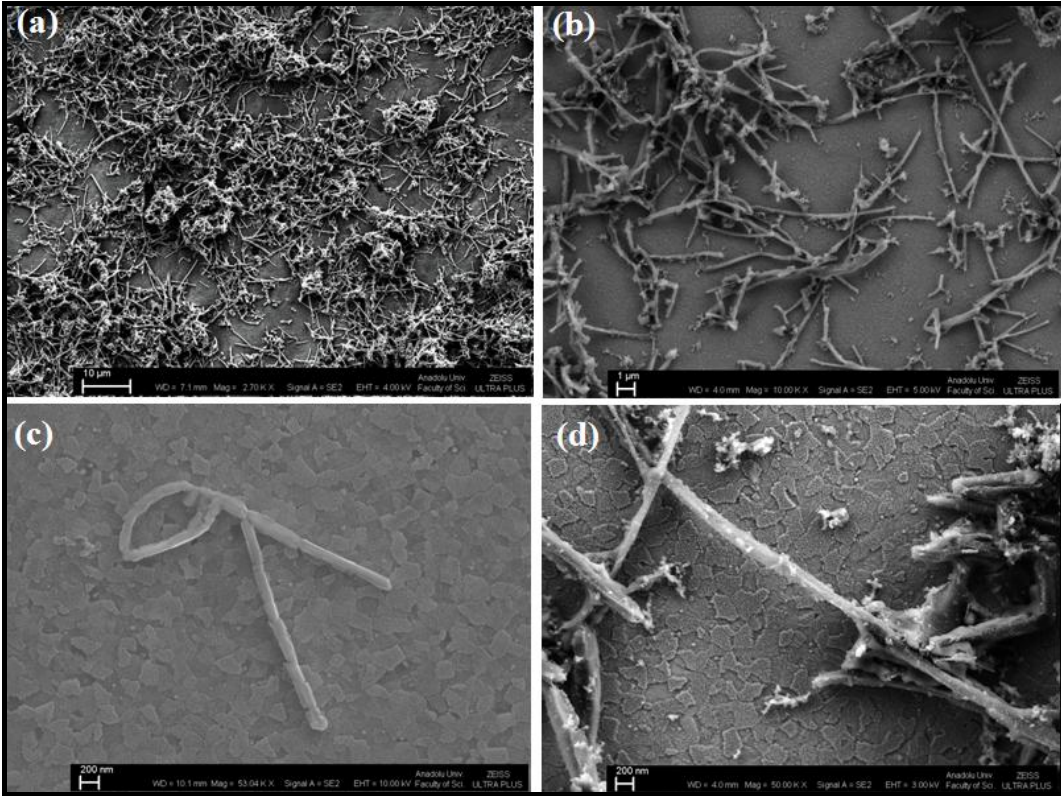
Şekil 3.8 f-MWCNT'nin AFM görüntüsü a) genel görünüm b) üç boyutlu görünüm c) boyut analizi



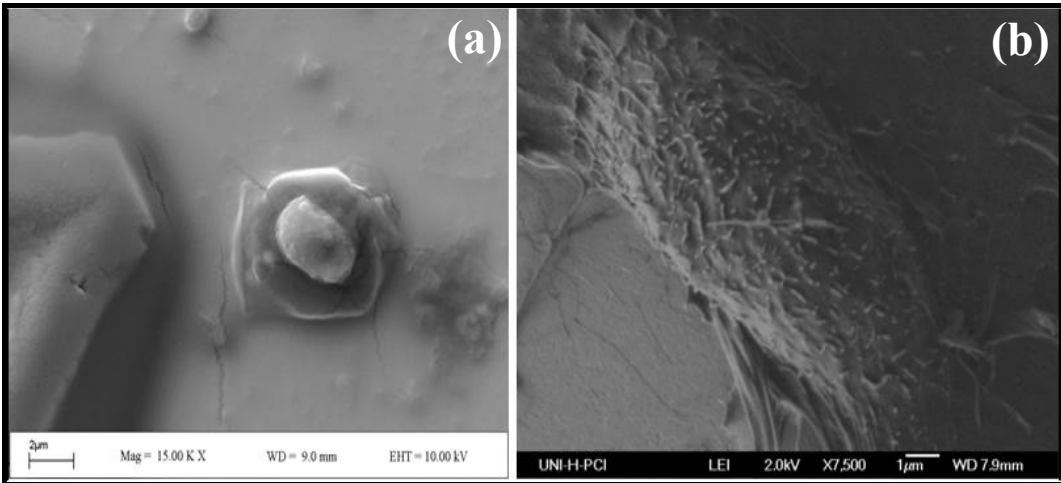
Şekil 3.9 f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n'nin AFM görüntüsü a) genel görünüm b) üç boyutlu görünüm c) boyut analizi

3.1.8 Elektron mikroskobu (SEM/TEM)

MWCNT'lerin ve uygulamalarının yüzey morfolojilerinin üç boyutlu görüntülenmesinde kullanılan en etkili yöntemler elektron ışın demetlerinin kullanılarak resimlerin alındığı elektron mikroskop teknikleridir. Alınan görüntüler sayesinde dispersiyon dereceleri ve hücresel etkileşimleri gözlemlenebilir. Tez kapsamında SEM görüntüsü alınan örnekler; f-MWCNT, f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 ile MCF-7 kontrol hücresi ve sentezlenen son biyokonjugatın MCF-7 ile hücre uygulamasıdır. Elde edilen sonuçlar şu şekildedir;



Şekil 3.10 SEM görüntüleri a) MWCNT'lerin genel görüntüsü b) f-MWCNT'lerin genel görüntüsü c) f-MWCNT ye ilişkin SEM görüntüsü d) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatının genel SEM görüntüsü



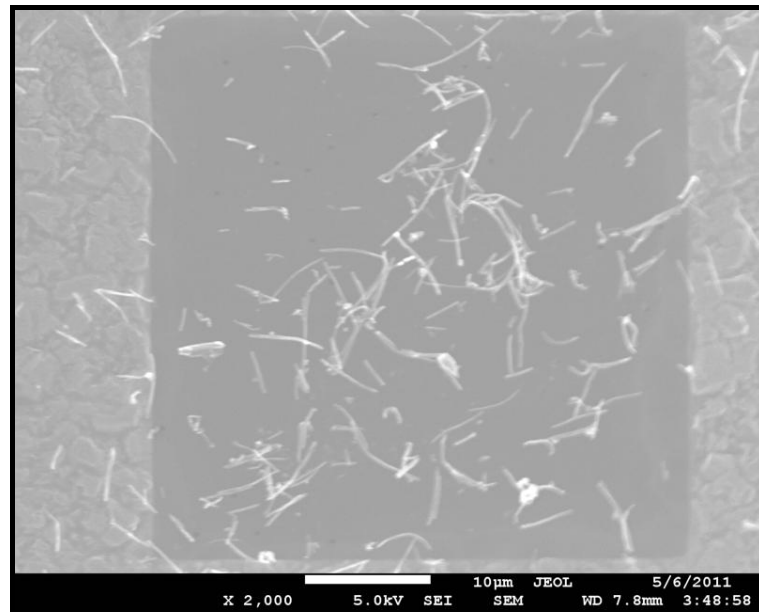
Şekil 3.11 Genel SEM görüntüleri a) MCF-7 adenokarsinoma epitel hücresi görüntüsü b) f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 ve MCF-7 meme adenokarsinoma epiteli hücresi uygulaması sonrası SEM görüntüsü

Şekil 3.10a' da gözlenen MWCNT'lerin Van der Waals etkileşimleri ile bir araya gelip agregat oluşturma eğilimde oldukları ve boyutlarının 1-5 µm aralığında olduğu açıkça gözlenmektedir. Şekil 3.10b' de de görülen f-MWCNT

görüntülerinde ise, asit ile karboksil fonksiyonlanan MWCNT'lerin asit ve sıcaklık ile parçalanarak boyutlarının küçüldüğü saptanmıştır. Ayrıca, karboksilleme işlemi sonrasında ortamda küçük oranda karbon kalıntıları gözlenmektedir. Şekil 3.10c' de gözlenen sonuçta ise f-MWCNT'lerin esnek bir yapıya sahip oldukları ve asit muamelesi nedeni ile yüzeylerinde meydana gelen parçalanma belirtileri gözlenmektedir (Jia et al, 1999). Şekil 3.10d görüntüsünde, f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 yapıları üzerinde, f-MWCNT'lerin görüntüsünden farklı olarak yüzeysel yapıların varlığı dikkat çekmektedir. Bu, yüzeye bağlanan polimer ve antikorun varlığından kaynaklanmaktadır. Şekil 3.11 a ve b' den alınan, meme kanseri hücresinin genel görüntüsü ile f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 uygulaması ardından alınan görüntü arasında gözle görülür farklanma vardır. MCF-7 hücrelerine, biyokonjugat uygulamasının ardından biyokonjugatın kanser hücresinin dış yüzeyine farklı açılarla ve boyutlar ile tutunduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak elde edilen veriler göstermektedir ki, f-MWCNT'ler asit ile karboksillenmesinin ardından fonksiyonlanmasının yanı sıra, kırılıp boyutsal olarak da küçülmüştür. Ayrıca, biyokonjugatın kanser hücresine bağlanması sonucu anlaşılmıştır ki, MWCNT'ler hücreler için görüntüleyici ajan ve ilaç taşınımına yönelik potansiyel platformları oluşturmaktadırlar.

Ayrıca f-MWCNT'nin çekilen genel TEM görüntüsü aşağıda ki gibidir;



Şekil 3.12 f-MWCNT'lerin genel TEM görüntüsü

3.1.9 Protein analizi

Hazırlanan konjugatlarda protein analizleri bradford yöntemi ile yapılmıştır. BSA protein standartlarıyla ve Bradford yöntemiyle (Zor and Selinger, 1996) oluşturulan kalibrasyon grafiğinin doğrusal denklemi $y=0,2x+0,0031$ olup, konjugasyon prosedüründe kullanılan HER2 antikorunun içerdiği protein miktarı $0,3\pm0,004$ mg/mL ($n=3$) olarak hesaplanmıştır. f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n biyokonjugatında ise protein miktarı $0,276\pm0,006$ mg/mL ($n=3$) olarak hesaplanıp, rölatif bağlanma oranı % 92 olarak bulunmuştur.

3.2 Uygulama Çalışmalarına Yönelik Bulgular

3.2.1 *In vitro* hücre kültürü çalışmaları

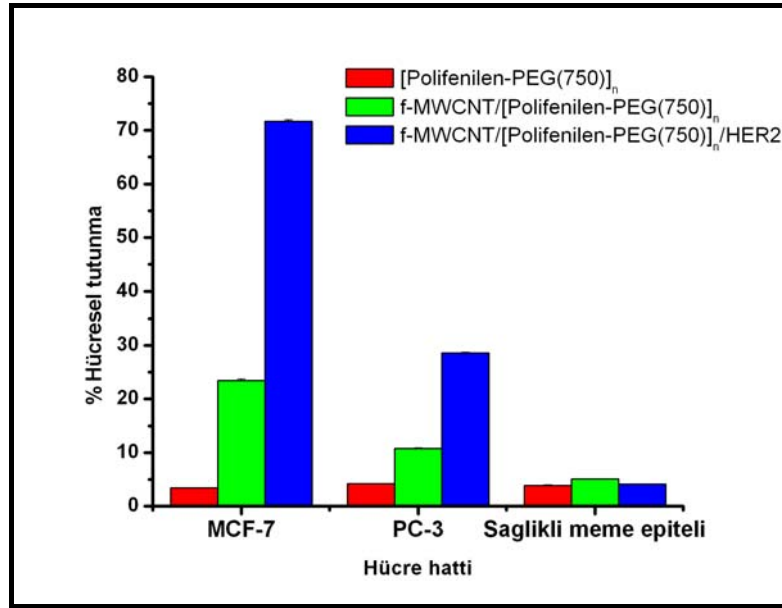
Tez kapsamında konjugatların uygulamasında kullanılan hücre hatları aşağıdaki gibidir;

- (i) MCF-7 meme adenokarsinoma epiteli
- (ii) PC-3 prostat karsinoma epiteli
- (iii) Sağlıklı meme epiteli

Antikor ile hedeflenmiş yapıların, hücresel tutulum etkinlikleri, yüzeylerine non-kovalent olarak bağlanmış floresans özellik gösteren polimerin verdiği sinyaller aracılığı ile izlenmiş ve hesaplanmıştır. İlgili uygulamalardan elde edilen hücresel tutunma sonuçları ve grafikleri aşağıda belirtilmiştir;

Çizelge 3.4 Örneklerin hücrelere yüzdesel tutunma değerleri

	[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2
MCF-7 meme adenokarsinoma epiteli	$\%3,4 \pm 0,01$	$\%23,4 \pm 0,32$	$\%71,61 \pm 0,21$
PC-3 prostat karsinoma epiteli	$\%4,2 \pm 0,05$	$\%10,8 \pm 0,09$	$\%28,6 \pm 0,12$
Sağlıklı meme epiteli	$\%3,9 \pm 0,02$	$\%5,1 \pm 0,03$	$\%4,1 \pm 0,02$



Şekil 3.13 Örneklerin farklı hücre hatlarına % tutunma değerleri

Örneklerin, hücreler ile 37 °C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde iki saat süreli inkübasyonları sonucunda elde edilen hücresel tutunum oranları istatistiksel verilere göre değerlendirildiğinde ortaya çıkan sonuçlar aşağıdaki gibidir:

- Sadece polimerin, farklı kanser tipine ve sağlıklı hücelere özel bir spesifikliğı bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple hücresel tutulumları her üç uygulama için birbirine oldukça yakın olarak saptanmıştır.

- Diğer yandan, f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının uygulamalarına ilişkin hücresel tutunum değerleri MCF-7 ve PC-3 hücreleri için yalnızca polimerden elde edilen değerlere kıyasla daha fazladır. Ancak sağlıklı hücre epiteliinden elde edilen değerler diğer hücreler ile kıyaslandığında kanser hücrelerine bağlanmanın daha fazla olduğu ayrıca gözlemlenmiştir. Bu durumda CNT varlığının söz konusu etkileşimler için pozitif yönde bir etkisi olduğu açıktır.

- HER2 antikorunun varlığı, her iki kanser hücresi için sağlıklı hücre hattına kıyasla anlamlı bir farklanma yaratmıştır. Bu farklanma MCF7 hücreleri için PC-3 hücrelerine kıyasla daha fazladır.

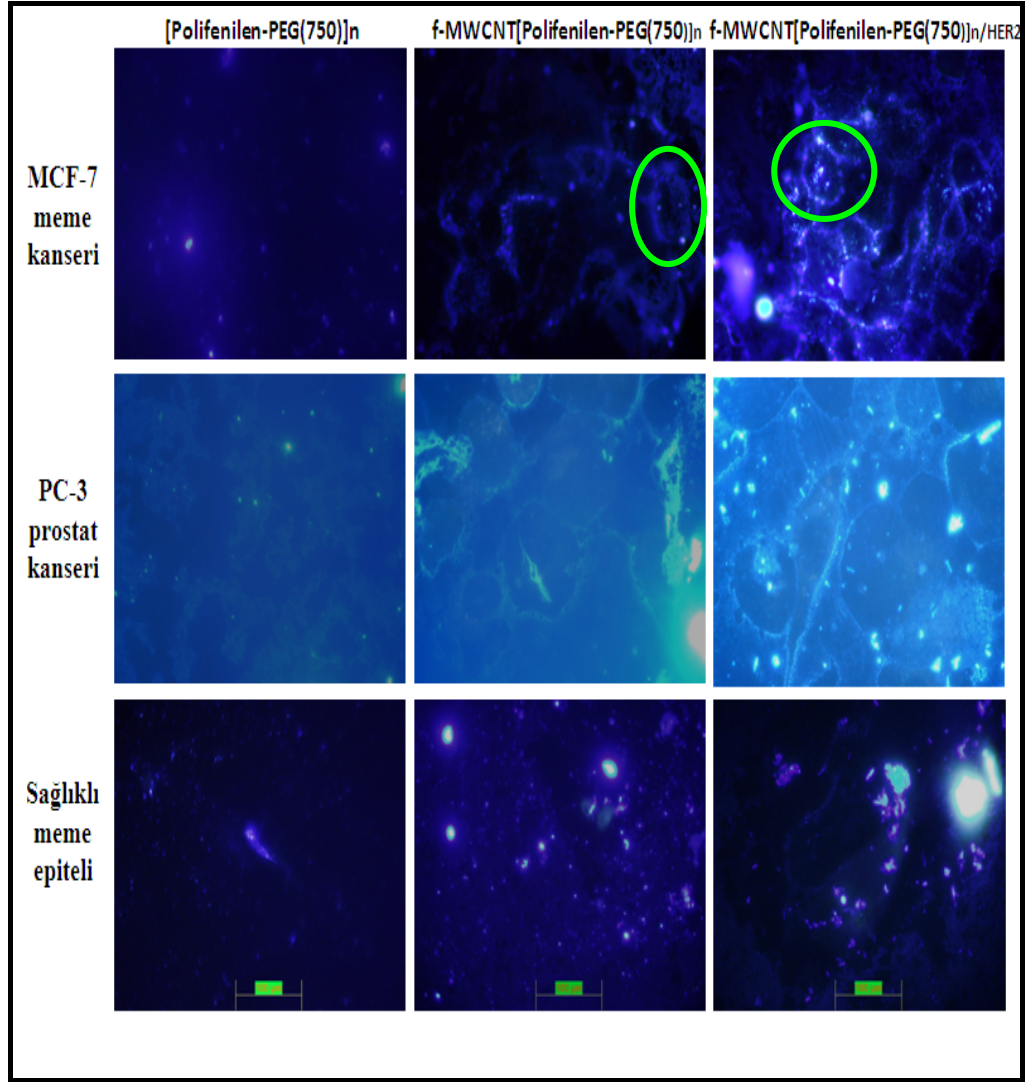
HER2 hücre membranı reseptörünün MCF7 meme ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde yüksek seviyelerde sentezlendiğı bilinmektedir (Craft et al, 1999). Bu sebeple HER2 protein ekspresyonu prostat ve meme kanseri hücrelerinin teşhisi amacı ile klinik anlamda çalışılmaktadır. Literatürlerde elde edilen verilere göre aşırı sentezlenmenin hücrelerde %0-100 oranı arasında değişen değerlerde olduğu saptanmıştır. Meme kanserinde standart HER2 reseptörü hedeflemesi ile

immünohistokimyasal bir yöntem FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmış ve HER2-DNA floresans materyal hibridizasyonu ile ilgili gen amplifikasyonları teşhis edilmektedir. Sonuç olarak HER2 reseptörünün kanser teşhisinde potansiyel teşhis aracı olduğu düşünülmüştür ve özellikle HER2 meme kanseri teşhis için önemli bir belirteç olarak dikkate alınmaktadır.

Özetle; kullanılan materyalleri tek tek incelediğimizde, MWCNT'lerin önemli bir taşıyıcı platform olduğu ve ilgili hücrelere floresans özellikli polimeri başarı ile taşıdığını gözlemlenmiştir. Ayrıca, polimerin yalnız başına etkin bir hücresel tutulumunun olmadığı, MCF7 ve PC3 hücrelerinde yüksek seviyelerde ekspresyonu gerçekleştiren HER2 reseptörüne spesifik antikorun, kanser hücrelerine spesifik hedefleme amaçlı kullanılabilir olduğu ve son olarak sentezlenen f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatının kanserli hücreleri daha seçimli olarak tanıyıp teşhis ve tedavisinde kullanılabilme potansiyeli taşıdığı sonuçlarına ulaşılmıştır.

3.2.2 Floresans mikroskobu ile *in vitro* görüntüleme

Hücrelere tutulan floresans konjugatların neden olduğu sinyallerin florimetrik olarak izlenmesiyle hesaplanan hücresel tutulum etkinlikleri dışında floresans mikroskop altında hücrelerin görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Böylece sentezlenen konjugatların optik görüntüleme teknikleri için iyi bir görüntüleme ajanı olma potansiyeli değerlendirilmiştir. Elde edilen görüntüler şu şekildedir:



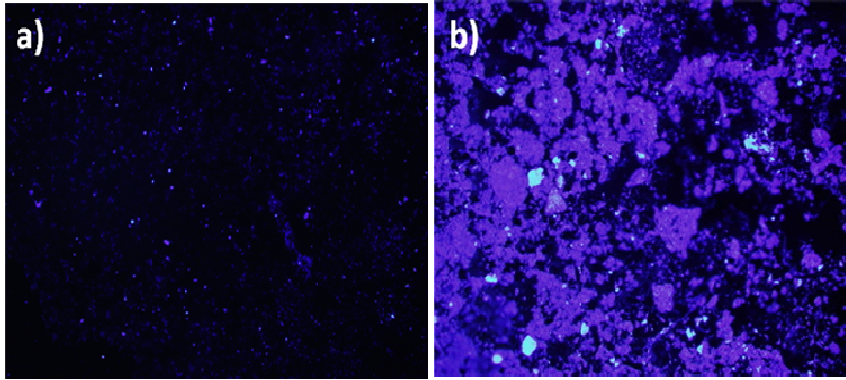
Şekil 3.14 Farklı hücre hatlarına uygulanan örneklerden elde edilen floresans mikroskop görüntüleri

Her üç hücre hattında görüntüler 100X objektif altında alınmıştır. Polimer uygulamasında hücrelerin görünürlüğü her üçü içinde yok denecek kadar azdır. Ancak, f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n ve f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 konjugatlarının uygulamasından daha net sonuçlar alınmıştır. Hüresel bağlanma yüzdeleri ile uyumluluk gösteren sonuçlarda f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının uygulamasından elde edilen floresans ışımlar f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 uygulamalarının yaklaşık yarısı kadardır. f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatının, MCF-7 kanser hattı uygulamasında, kanser hücrelerinin çeperlerinden gelen floresans ışımlar ile hüresel iskeletler açıkça görülmektedir. Ayrıca bu sonuç, SEM görüntüsünde gözlenen kanserli hücre yüzeyine tutunan f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 sonuçlarını desteklemektedir. Yalnızca f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının uygulamasında MCF-7 ve PC-3 hücre hatlarında hücre assosiasyonu tespit edilmiştir. Bu sonuç polimerin f-

MWCNT yüzeyine bağlanmış olduğunu ve aynı zamanda MWCNT'lerin uygun taşıyıcı yüzeyler olduğunu göstermektedir.

Özetle, floresans görüntüler göstermektedir ki, ışımlar hücre çeperlerinde gerçekleşmektedir. HER2 nin hücre yüzeyinde sentezlenen bir reseptör olması, kullanılan CNT lerin yüksek boyutlarda olması yapının hücre içerisine girişinden ziyade yüzeyde tutunmasına neden olmuştur. Buda literatürlerde hücre içerisine farklı mekanizmalarla alındığı bilinen ancak hücre tipi ve boyuta bağlı net bir korelasyonunun bulunmadığı ifade edilen CNT içeren konjugat yapılarının hem hücre içi hem de hücre yüzeyine hedeflenebilme potansiyelini doğrulamakta ve hem teşhis hem de terapide kullanıma oldukça elverişli bir materyal olduğunu göstermektedir.

Tezin kapsamında incelenen bir diğer konu ise fonksiyonel MWCNT konjugatlarının ilaç moleküllerini diğer yapıların (polimer/antikor vs) yanında ayrıca bağlayabilme potansiyelinin belirlenmesidir. Son aşamada f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatına, model olarak seçilen Bleomisin kemoterapi ajanı sahip olduğu amin grupları vasıtası EDC/NHS kimyası aracılığı ile bağlanmıştır. Elde edilen yapının MCF-7 meme adenokarsinoma epiteline uygulanmasının ardından elde edilen floresans mikroskop görüntüleri şekil 3.15' de verilmiştir.



Şekil 3.15 Bleomisin bağlı biyokonjugatın ilaç taşıma etkinliğinin floresans mikroskop görüntüsü

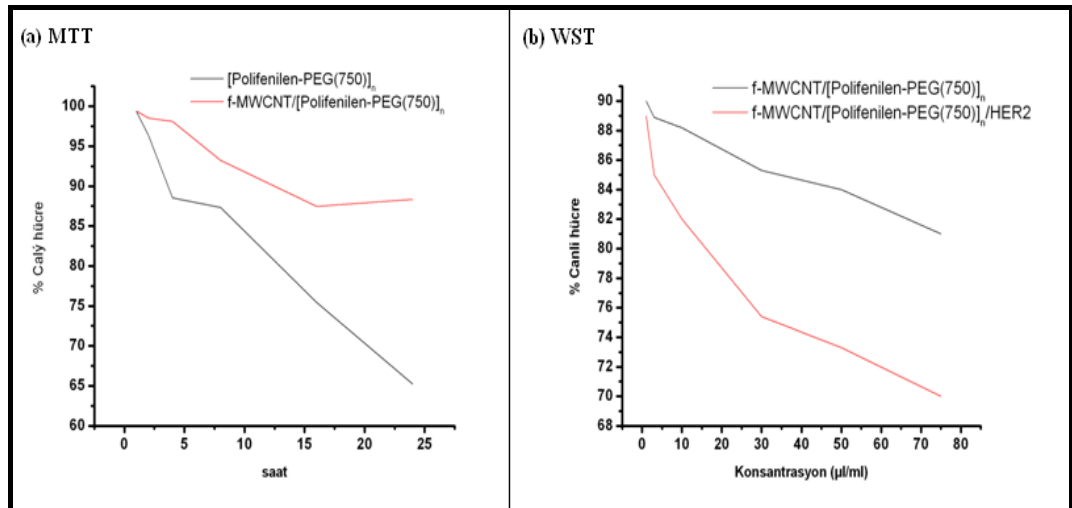
Elde edilen görüntülerde a) 100X objektif altında alınan b) ise 10X objektif altında alınan görüntülerdir. 100X optik görüntülemeye belirgin olarak gözlenen noktasal ışımlar, ilaç bağlı olmayan konjugatlardan farklı olarak hücresel iskeletleri ifade etmemektedir. Bu, 10X objektif altında alınan görüntülerden anlaşılabilir. Çünkü görüntü, MWCNT ile taşınan ilacın hücreleri öldürerek ve parçalaması sonucu hücresel kalıntılar oluşmuş, hücreler parçalanmıştır. Dolayısı ile 2 saatlik inkübasyon sonucu ilaç yüklenmiş çok fonksiyonlu MWCNT'ler ilaç taşıma fonksiyonunu da gerçekleştirmiştir.

3.2.3 Sitotoksikite çalışması

Sentezlenen yapıların sitotoksikite testleri MTT ve WST adı verilen yöntemlerden yararlanılarak gerçekleştirildi. MTT yöntemi ile Polifenilen-PEG(750)]_n polimeri ve f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının sitotoksik etkisi test edilirken WST yöntemi ile f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n ve f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 konjugatlarının sitotoksik etkisi incelenmiştir.

MTT'ye sonuçlarına göre, 24 saat sonunda 50 µg/mL polimerin gösterdiği sitotoksik etki sonucu hücrelerin % 65,23'ü canlı kalır iken, f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n konjugatının sitotoksik etkisi sonucu MCF-7 adenokarsinoma meme epiteli hücrelerinin % 88,36'sı canlı kalmıştır (Şekil 3.15). Bu sonucu, polimerin hücre yüzeyine direk etkisinin MWCNT aracılığı ile azalmış olması ile açıklayabiliriz.

İkinci çalışma olan WST testinde ise f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n ile f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 konjugatlarının sitotoksik etkisi çalışılmıştır. Yöntem, doz bağımlı olarak çalışılmıştır. Sonuçta, 50 µg/mL dozunda f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n ile 24 saat periyodunda hücrelerin % 84' ünün canlılığını koruduğu, f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)]_n/HER2 biyokonjugatının 50 µg/mL'sinin yine 24 saat sonunda hücrelerin % 73,7 canlılığını koruduğu saptanmıştır. HER2 bağlanmasının ardından sitotoksikite, taşıyım reseptör hedeflenmiş olduğu için artmıştır ancak kayda değer bir sitotoksik etki gözlenmemiştir.



Şekil 3.16 Sitotoksikite grafikleri a) MTT yöntemi b)WST yöntemi

4. Genel değerlendirme

Kanser günümüz çağının ölüm oranı en yüksek hastalığıdır. Gelişen teknoloji ile kanserin teşhis ve tedavisinde önemli adımlar atılsa da bilinen tüm yöntemler hastaya ağrı ve zarar veren spesifiklikten uzak yöntemlerdir. Geleneksel yöntemlerin kombine edilmesi ile uygulanan çoklu analizler önemli oranda teşhis ve tedavi başarısını arttırmaktadır.

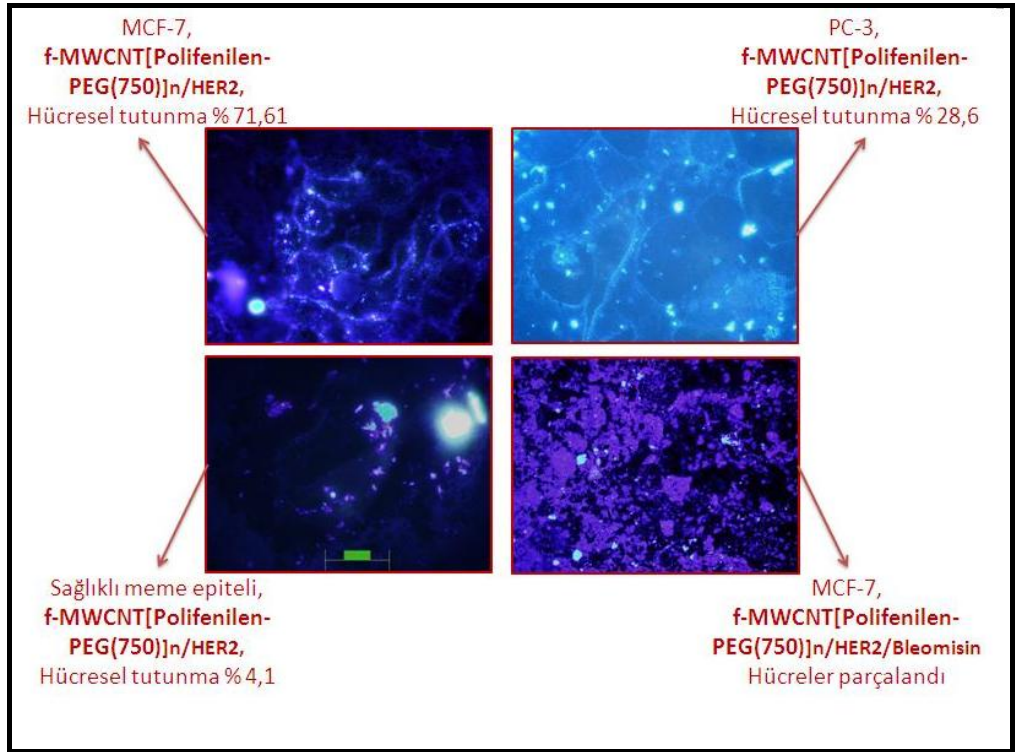
Artık tek disiplinli çalışmaların ve araştırmaların yetersiz kaldığı çağımızda yine çağımızın azılı düşmanlarından olan kanseri yenmenin en önemli aracı çok disiplinli alanlarda yürütülen çalışmalar olacaktır. Bu kapsamda nanoteknoloji platformu devreye girer ve fizikten, çevre bilimine kadar tüm bilimleri aynı çatıaltına bu çok disiplinli bilimdalı ile sonuç odaklı ve hızlı gelişmeler olmaktadır. Nanoteknoloji, medikal alanda çalışmalarında içine girdiğinden bu yana nanoilaç/multifonksiyonel biyokonjugat ve teranostik ilaç terimleri sıkça kullanılmıştır. Geleneksek yöntemlerden, spesifiklik, geniş kullanım alanı, çoklu ve acısız teşhis/tedavi gibi özellikleri ile ayrılırlar.

Bu tez projesi kapsamında göğüs kanserine spesifik, teşhis ve tedavi görevinin her ikisini de üstlenen çok fonksiyonlu biyokonjugat sentezlendi. Bu amaç ile teşhis ve tedavi edici ajanı hedef dokuya taşıması için çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT), üstün özellikleri ile taşıyıcı kargolar olarak kullanıldı. Sentez stratejisinde, floresans özellikli bir polimer karboksil fonksiyonlanmış MWCNT üzerine nonkovalent olarak bağlandı ve optik görüntü alınımları üzerinde çalışıldı. Ara basamaklar dahil olmak üzere tüm ürünlerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Polimerin, ara konjugatların ve son ürünlerin kullanım potansiyelleri çeşitli hücre hatları ile denendi. Elde edilen sonuçlar optik görüntüleme cihazı olan floresans mikroskobu ile desteklenerek, sentezlenen çok fonksiyonlu konjugatların içeriğinde HER2 reseptörü içeren tüm kanserli hücrelerin optik görüntülemesinde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Sentezlenen biyokonjugatların farklı hücre hatlarına uygulanması sonucu elde edilen floresans görüntüleri ve hücre kültürü uygulamaları sonucu hücresel tutunmaları özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 Örneklerin hücelere yüzdesel tutunma değerleri

	[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n	f-MWCNT/[Polifenilen-PEG(750)] _n /HER2
MCF-7 meme adenokarsinoma epiteli	%3,4 ± 0,01	%23,4 ± 0,32	%71,61 ± 0,21
PC-3 prostat karsinoma epiteli	%4,2 ± 0,05	%10,8 ± 0,09	%28,6 ± 0,12
Sağlıklı meme epiteli	%3,9 ± 0,02	%5,1 ± 0,03	%4,1 ± 0,02



Şekil 4.1 Tez kapsamında sentezlenmesi hedeflenen konjugatların hücresel uygulama sonuçları

KAYNAKLAR DİZİNİ

Acharya S., Dilnawaz F. and Sahoo S., 2009, Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy, *Biomaterials*, 30:5737–5750pp.

Adeli M., Mirab N, Alavidjeh M.S., Sobhani Z., and Atyabi F., 2009, Carbon nanotubes-graft-polyglycerol: Biocompatible hybrid materials, *Polymer* 50: 3528–3536pp.

Allen T.M. and Cullis P.R., 2004, Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science* 303:1818–1822pp.

Alivisatos P., 2004, The use of nanocrystals in biological detection, *Nature Biotechnology*, 22: 47–52pp.

Antiochia, R. and Gorton, L., 2007, Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages, *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 2611-2617pp.

Astakhova T.Y., Vinogradov G.A. and Menon M., *Russian Chemical Bulletin*, 2003, Characterization of Carbon Nanotubes by Raman spectroscopy, International Edition, 52: 823-830pp.

Balasubramanian K. and Burghard M.,2005, Chemically functionalized carbonnanotubes, *Small*, 1:180– 192pp.

Balasubramanian, K. and Burghard, M., 2006, Biosensors based on carbon nanotubes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385: 452–468pp.

Bharali DJ., Khalil M., Gurbuz M., Simone T. and Mousa S., 2009, Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers, *International Journal of Nanomedicine*, 4:1–7pp.

Boas, U. and Heegaard P. M. H. 2004, Dendrimers in drug research, *Chem. Soc. Rev.*, 33: 43–63pp.

Bonadonna G.,1992, Evolving concepts in the systemic adjuvant treatment of breast cancer, *Cancer*, 52: 2127–2137pp.

Bonadonna G. and Valagussa P.,1996, Primary chemotherapy in operable breast cancer. *Seminars in Oncology*, 4:464–474pp.

Cai D., Huang Z., Carnahan D., Mataraza J.M., Chiles T.C., Qin Z.H., Huang J., Kempa K. and Ren Z., 2005, Highly efficient molecular delivery intomammalian cells using carbon nanotube spearing, *Nature Methods*, 2:449–454pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Charrois G. and Allen T., 2004, Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1663:167–177pp.

Cho S.Y., Grimsdale A.C., Jones D.J., Watkins S.E. and Holmes A.B., 2007, Polyfluorenes without Monoalkylfluorene Defects, *Nano Letters*, 129:11910–11911pp.

Choi Y., Thomas T., Kotlyar A., Islam MT. and Baker JR., 2005, Synthesis and functional evaluation of DNA-assembled polyamidoamine dendrimer clusters for cancer cell-specific targeting, *Chemistry and Biology*, 12:35–43pp.

Choi Y., Kwak J. and Park J., 2010, Nanotechnology for early cancer detection, *Sensors*, 10:428-455pp.

Christ M., Lusky M., Stoeckel F., Dreyer D., Dieterle A. and Michou AI., 1997, Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response, *Immunology Letters*, 57:19-25pp.

Cloninger, M. J., 2002, Biological applications of dendrimers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 742–748pp.

Craft N., Shostak Y., Carey M. and Sawyers C.L., 1999, A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase, *Nature Medicine*, 5: 280-285pp.

Delaney G., Jacob J., Featherstone C. and Barton M., 2005, The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines, *Cancer*, 104:1129–1137pp.

Derycke A. and Witte P., 2004, Liposomes for photodynamic therapy, *Advange Drug Delivery Rev*, 56: 17–30pp.

Dhankar R., Rathee P., Jain A.K., Arora S., Kumar M.S., Rath G., Saxena A.K., Sharman P.R, Chashoo G. and Goyal A.K., 2011, HER-2 targeted immunonanoparticles for breast cancer chemotherapy, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3:132-139pp.

Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Jorio A., Souza Filho A.G., Pimenta M. A. and Saito D.R., 2002, Single Nanotube Raman Spectroscopy, *Accounts of Chemical Research*, 35: 1070-1078pp.

Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Saito R. and Jorio A., 2005, Raman spectroscopy of carbon nanotube, *Physics Reports*, 409: 47-99pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ehman R., Hendee W., Welch J., Dunnick N., Bresolin L., Arenson R., Baum S., Hricak H. and Thrall H., 2007, Blueprint for imaging in biomedical research. *Radiology*, 244: 12-27pp.

Fassas A. and Anagnostopoulos A., 2005, The use of liposomal auronubicin(DaunoXome) in acute myeloid leukemia, *Leukemia and Lymphoma*, 46: 795–802pp.

Fass L., 2008, Imaging and cancer: A review, *Molecular oncology*, 2:115-152pp.

Ferrari M., 2005, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature Reviews Cancer*, 5:161–171pp.

Firme III C.P. and Bandaru P.R., 2010, Nanomedicine: Nanotechnology, *Biology and Medicine*, 6:245–256pp.

Flahaut E., Laurent C. and Peigney A., 2005, Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation, *Carbon*, 43: 375-383pp.

Gage A., Baust JM. and Baust JG., 2009, Experimental cryosurgery investigations *in vivo*, *Cryobiology*, 59: 229-243pp.

Gautschi O., Ratschiller D., Gugger M., Betticher D. and Heighway J., 2007, Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver malignant transformation, *Lung Cancer*, 55:1-14pp.

Gilboa E., Kolbe M., Noonan K. and Kucherlapati R., 1982, Construction of a mammalian transducing vector from the genome of Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology*, 44:845-51pp.

Goldie H. and Coldman A., 1979, A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to spontaneous mutation rate, *Cancer Treat Rep*, 63:1727-1733pp

Gorziglia MI., Kadan MJ., Yei S., Lim J., Lee GM. and Luthra R., 1996, Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for *in vivo* human gene therapy, *Journal of Virology*, 70:4173-4178pp.

Graham M. and Charlotte J., 1982, Changing role of chemotherapy in treatment of head and neck cancer, *The American Journal of Medicine*, 582-595pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Grodzinski P., Silver M. and Molnar L.K., 2006, Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges, *Expert Review of Molecular Diagnostic*, 6:307–318pp.

Hausamen E., 1975, The basis, technique and indication for cryosurgery in tumours of the oral cavity and face, *Journal of Maxillofacial Surgery*, 3:41-49pp.

Hayat M., 2008, Cancer Imaging, Volume1: Lung and Breast Carcinomas, *Springer*, 1:656pp.

Heistera E., Nevesa V., Tilmaciub C., Lipertc K. and Beltran V.S., 2009, Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy, *Carbon*, 47: 2152-2160 pp.

Hone C., Walker P and Evans-Gowing R., 2002, Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: a potential delivery vehicles for photodynamic therapy, *Langmuir* 18:2985–2987pp.

Hortobagyi G., Ames F. and Buzdar U., 1988, Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery and radiation therapy, *Cancer*, 62, 2507–2516pp.

Islam F.M., Rojas E., Bergey D.M., Johnson A.T. and Yodh A.G., 2003, High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water, *Nano Letters*, 3:269– 273pp.

Jain A.K., Dubey V., Mehra K.N., Lodhi N., Nahar M., Mishra D.K. and Jain N.K., 2009, Carbohydrate-conjugated multiwalled carbon nanotubes: development and characterization, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5: 432–442pp.

Jain M., Sharma G. and Singh A., 2009, A theoretical approach for activation of a pro-drug by its conjugate and its localization in cancer chemotherapy, *Mathematical and Computer Modelling*, 50:333-343pp.

Ji S., Liu C., Yang F., Xu J., Long J., Jin C., Fu D., Ni Q. and Yu X., 2010, Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1806 : 29–35pp.

Jia Z., Wang Z., Liang J., Wei B. and Wu D., 1999, Production of short multi-walled carbon nanotubes, *Carbon*, 37:903-906pp.

Jiang K., Schadler L.S. and Siegel R.W., 2004, Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide- activated amidation, *Journal of Materials Chemistry*, 14: 37-39pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jorio A., Pimenta M.A., Fantini C., Souza M., Filho A.G, Samsonidze G.G., Dresselhaus G., Dresselhaus M.S.i. and Saito R., 2004, Advances in Single Nanotube Spectroscopy: Raman Spectra from Cross-Polarized Light and Chirality Dependence of Raman Frequencies, *Carbon*, 42:1067–1069pp.

Kam N.W.S., Jessop T.C., Wender P.A. and Dai H., 2004, Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube– protein conjugates into mammalian cells, *Journal of American Chemical Society*, 126:6850– 6851pp.

Kavan L., Rapta P., Dunsch L., Bronikowski M.J., Willis P. and Smalley R.E., 2001, Electrochemical Tuning of Electronic Properties of Single Walled Carbon Nanotubes: In-situ Raman and Vis-NIR Study, *Journal of Physics and Chemistry B*, 105:10764-10771pp.

Kateb B., Chiu K. and Yamamoto V., 2010, Nanoplatforams for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy?, *Neuroimage*, 54: 106–124pp.

Kitano H., Tachimoto K., Anraku Y. and Kitano H, 2007, Functionalization of single-walled carbon nanotube by the covalent modification with polymer chains, *Journal of Colloid and Interface Science*, 306: 28–33pp.

Kumar, C.,2007, Nanomaterials for Cancer Diagnosis, *Wiley*, 448p

Kürti L. and Czako B., 2005, Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis, *Elsevier Inc.*, 1:448p

Lavasanifar A., Samuel J.and Kwon G., 2002, Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery, *Advance Drug Delivery*, 54: 169–190pp.

Leamon C., Cooper S. and Hardee G., 2003, Folate-liposome-mediated antisense oligodeoxynucleotide targeting to cancer cells: evaluation in vitro and in vivo, *Bioconjugate Chemistry*, 14:738–747pp.

Lin Y., Rao A.M., Sadanadan B., Kenik E.A. and Sun Y.P., 2002, Functionalizing multiple-walled carbon nanotubes with aminopolymers, *The Journal of Physical Chemistry B*, 106:1294– 1298pp.

Liu L., Qin Y., Guo Z.X. and Zhu D., 2003, Reduction of solubilized multi-walled carbon nanotubes, *Carbon*, 41:331-335pp.

Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Vale, M. and Alegret S., 2005, New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *TRAC Trend Anal. Chem.*, 24: 826-838pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Meuer S., Braun L. and Zentel R., 2009, Pyrene Containing polymers for the Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210:1528–1535pp.

Mohanty C., Acharya S., Mohanty A.K., Dilnawaz F. and Sahoo S.K., 2010, Curcumin-encapsulated MePEG/PCL diblock copolymeric micelles: a novel controlled delivery vehicle for cancer therapy. *Nanomedicine (Lond.)*, 5: 433–449pp.

Misra R., Acharya S. and Sahoo S.K., 2010, Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy, *Drug Discovery Today*, 15:19-20pp.

Nie S., Xing Y., Kim G.J. and Simons J.W., 2007, Nanotechnology applications in cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9: 257–288pp.

Ortiz-Acevedo A., Xie H., Zorbas V., Sampson M.W., Dalton A.B., Baughman R.H, Draper R.K., Musselman I.K. and Dieckmann G.R., 2005, Diametersselective solubilization of single-walled carbon nanotubes by reversible cyclic peptides, *Journal of American Chemical Society*, 127:9512–9517pp.

Ozawa K., Sato K., Oh I., Ozaki I., Uchibori R., Obara Y., Kikuchi Y., Ito T., Okada T., Urabe M., Mizukami H. and Kume A., 2008, Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs), *Journal of Autoimmunity*, 30: 121-127pp.

Panno J., Cancer: The Role of Genes, Lifestyle, and Environment, 2004, *Facts On File, Inc.* ,177p.

Pantarotto D., Briand J.P., Prato M. and Bianco A., 2004a, Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes, *Chemical Communications*, 16–17p.

Pantarotto D., Singh R., McCarthy D., Erhardt M., Briand J.P., Prato M. and Kostarelos K., 2004b, Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery, *Angewandte Chemie International Edition*, 43:5242– 5246pp.

Paradise, M. and Goswami, T., 2007, Carbon nanotubes-Production and industrial applications, *Mater. Design*, 28: 1477–1489pp.

Parveen S. and Sahoo S., 2008, Polymeric nanoparticles for cancer therapy, *Journal of Drug Targeting*, 16:108–123pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Paszko E., Ehrhardt C., Senge M., Kelleher D and Reynolds J, 2011, Nanodrug applications in photodynamic therapy, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8:14-29pp.

Pouton C.W. and Seymour L.W., 2000, Key issues in non-viral gene delivery, *Advange Drug Delivery*, 46:187–203pp.

Ramanathan T., Fisher F.T. and Ruoff R.S., 2005, Amino-functionalized carbon nanotubes for binding to polymers and biological systems, *Chemistry of Materials*, 17:1290-1295pp.

Rawat M., Singh D. and Saraf S., 2006, Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29:1790–1798pp.

Richard C., Balavoine F., Mioskowski C., Schultz P. and Ebbesen T.W., 2003, Supramolecular self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes, *Science*, 300:775– 778pp.

Rosenthal E. and Zinn K., 2009, Optical Imaging of Cancer: Clinical Applications, By Eben Rosenthal, *Springer*, 239pp.

Rother RP., Squinto SP., Mason JM. And Rollins SA., 1995, Protection of retroviral vector particles in human blood through complement inhibition, *Human Gene Therapy*, 6:429-35pp.

Roy I., Ohulchanskyy T. and Pudavar H., 2003, Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *Journal of American Chemical Society*, 125:7860–7865pp.

Sahoo SK., Parveen S. and Panda J., 2007, The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3:20-31pp.

Schabel F.,1975, Concepts for systemic treatment of micrometastases. *Cancer*, 35:15–24pp.

Shaffer M.S., Fan X. and Windle A.H., 1998, Dispersion and packing of carbon nanotubes, *Carbon*, 36: 1603-1612pp.

Shafiq J., Barton M., Noble D., Lemer C. and Donaldson L., 2009, An international review of patient safety measures in radiotherapy practice, *Radiotherapy and Oncology*, 92:15-21pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Shen S., Wang S:H., Shi X., Chen X., Huang Q., Petersen E.J., Pinto R.A., Baker J.R. and Weber W.J., 2009, Polyethyleneimine-Mediated functionalization of Multiwalled Carbon Nanotubes: Synthesis, Characterization, and In Vitro Toxicity Assay, *Journal of Physical Chemistry C*, 113: 3150–3156pp.

Shim S., Lee K., Kim, B., Lee E., Choi J. and Chung M., 2004, Accuracy of integrated PET/CT using fluorodeoxyglucose incpreoperative staging on non-small cell lung cancer: a prospective comparison with standalone CT. *Radiology* 233,383pp.

Simmons L.J., Bult J., Hashim D.P., Linhardt R.J. and Ajayan P.M., 2009, Noncovalent Functionalization as an Alternative to Oxidative Acid Treatment of Single Wall Carbon Nanotubes withApplications for Polymer Composites, *American Chemical Society Nano*, 3: 865–870pp.

Simoes S., Moreira JN., Fonseca C., Düzgünes N. and De Lima MC., 2004, On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times, *Advange Drug Delivery Review*, 56: 947–965pp.

Sparreboom A., Scripture C., Trieu V., Williams P., De T., Yang A., Beals B., Figg W., Hawkins M. and Desai N., 2005, Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in Cremophor (Taxol), *Clinical Cancer Research*, 11:4136–4143pp.

Stefan M., Braun L. and Zentel R., 2010, Pyrene Containing Polymers for the Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210: 1528–1535pp.

Sun, H., 2005, Imaging DNA synthesis with [18F]FMAU and positron emission tomography in patients with cancer, *European Journal of Nuclear Medicine Molecular Imaging* 32: 15–22pp.

Tagmatarchis N. and Prato M., 2004, Functionalization of carbon nanotubes via 1,3-dipolar cycloadditions, *Journal of Material Chemistry*, 14:437–439pp.

Tansil, N. C. and Gao, Z., 2006, Nanoparticles in biomolecular detection, *Nanotoday*, 1: 28–37pp.

Tim M., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65:55–63pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Torchilin V., Lukyanov A., Gao Z. and Papahadjopoulos-Sternberg B., 2003, Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs, *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (U.S.)*, 100: 6039–6044pp.

Tu S., Yasui Y., Kuniyuki A., Schwartz S., Jackson J. and Taylor V., 2002, Breast cancer screening: stages of adoption among Cambodian American women, *Cancer Detection and Prevention*, 26:33-41pp.

Vasir J. and Labhasetwar V., 2007, Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics, *Advange Drug Delivery*, 59:718–728pp.

Yu L., Li C.M. and Zhou Q., 2007, Functionalized multi-walled carbon nanotubes as affinity ligands, *Nanotechnology*, 18: 115614-115620pp.

Zhang, Y., Schlachetzki F., Zhang Y., Boado R. and Pardridge W., 2003, Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism, *Human Gene Therapy*, 14:1–12pp.

Zhao, H. and Ju H., 2006, Multilayer membranes for glucose biosensing via layer-by-layer assembly of multiwall carbon nanotubes and glucose oxidase, *Anal. Biochem.*, 350: 138-144pp.

Zheng M., Jagota A., Semke E.D., Diner B.A., McLean R.S., Lustig S.R., Richardson R.E. and Tassi N.G., 2003, DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes, *Nature Materials*, 2:338– 342pp.

Zor T. and Sellinger Z., 1996, Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies, *Analytical Biochemistry*, 236: 302-308pp.

Wang X., Yang L., Chen Z. and Shin DM., 2008, Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *A Cancer journal for Clinicians*, 58: 97–110pp.

Wang Y., Iqbal Z. and Mitra S., 2006, Rapidly Functionalized, Water-Dispersed Carbon Nanotubes at High Concentration, *Journal of American Chemical Society*, 128: 95-99pp.

Wells NJ. and Bradley M., 1998, Solid-Phase Dendrimer Synthesis. Biopolymers, *Peptide Science*, 47:381-396pp.

Wessler R. and Ntziachristos V., 2003, Shedding light onto live molecular targets, *Technology Trends - Nature Medicine*, 2:123-128pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Whitesides G., 2003, The ‘right’ size in nanobiotechnology, *Nature Biotechnology*, 21:1161–1165pp.

Wieder M., Hone D., Cook M., Handsley M., Gavrilovic J. and Russell D., 2006, Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a ‘Trojan horse’, *Photochemical and Photobiological Science*, 5: 727–734pp.

Wörle-Knirsch J.M., Puskamp K. and Krug H.F., 2006, Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays, *Nano Letters*, 6:1261-1268pp.

Wu G., Datar R., Hansen K.M., Thundat T., Cote R. and Majumdar A., 2001, Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers, *Nature Biotechnology*, 19: 856–860pp.

Wysocki P., Mackiewicz-Wysocka M. and Mackiewicz A., 2002, Cancer gene therapy- State of the art, *Practical Oncology and Radiotherapy*, 4:194-155pp.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Merve YÜKSEL
Doğum Tarihi : 18/07/1986
Doğum Yeri : İzmir
Medeni Hali : Bekar
Sürücü Ehliyeti : B sınıfı - 2005
Adres : Ata Cad Adalı Apt. No:157/8 *Balçova*-İzmir
Telefon : 0232-2772935
Mobil Telefon : 0536-9146265
Email : merueyuksel@gmail.com,

Eğitim bilgileri,

Yüksek Lisans (2009-2011) : Ege Üniversitesi – Biyokimya Bölümü

Lisans (2005-2009) : Ege Üniversitesi – Biyokimya Bölümü
(Biyoteknoloji Opsiyonu) – Örgün Öğretim

Lise (2001-200) : Salih Dede Lisesi – Fen Bilimleri Bölümü

Yabancı Dil Eğitimi : Salih Dede Lisesi (Yabancı dil ağırlıklı –
İngilizce) - 1 sene

SERTİFİKALAR;

- GMP (İyi Üretim Uygulamaları)

KATILDIĞI KONGRE ve SEMPOZYUMLAR,

Sempozyumlar,

-Kanser Biyokimyası Sempozyumu, Ege Üniversitesi-EBİLTET, 2 Mart 2007, İzmir.

-Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi-EBİLTET, 7 Mart 2007, İzmir.

Ulusal Kongreler,

-Enzim Mühendisliği Sempozyumu, Ege Üniversitesi, 1-5 Eylül 2008, Kuşadası.

-23. Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 Temmuz 2009, Sivas.

-24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran – 2 Temmuz 2010, Zonguldak.

Uluslar arası Kongreler,

-Uluslar arası Nanomateryaller ve Nanosistemler Kongresi, 10-13 Ağustos 2009, İstanbul.

-8. Uluslar arası Elektrokimya Kongresi, 8-11 Kasım 2009, Antalya.

SUNUMLAR,

-Merve Yüksel, Mehriban Akın, Caner Geyik, Çağlar Özdemir, Dilek Gelen, Dilek Odacı, Suna Timur, Poliamidoamin(PAMAM)/Sisteamine modifiye altın elektrodu temel alan alkol oksidaz biyosensörü ve karakterizasyonu, 23. Ulusal Kimya Kongresi Sivas – Poster Sunumu.

-Caner, Geyik, Mehriban Akın, Merve Yüksel, Çağlar Özdemir, Dilek Odacı, Suna Timur, Alkol oksidaz Biyosensörünün Hazırlanması ve Akışa Enjeksiyonlu Analize (FIA) Yönelik Uygulamaları, 23. Ulusal Kimya Kongresi Sivas – Sözlü Sunum.

-Mehriban Akın, Merve Yüksel, Dilek Odacı, Suna Timur, Modified Gold Arrays by Dendrimeric Structures for Multiplex Biosensing on Glucose and Ethanol in yeast culture, International Conference on Nanomaterials and Nanosystem, Poster Sunumu.

-Fulya Ekiz, Caner Geyik, Merve Yüksel, Sevinç Tunçagıl, Abidin Balaban, Suna Timur, Levent Toppare, Amperometric glucose biosensing in cultures via pyranose oxidase biosensor modified with conducting polymer of 4-(2,5di(tiophen-yl)-1H-pyrrol-1-l) benzenamine, 8th International Electrochemistry Meeting, Poster Sunumu.

-Mehriban Akın, Merve Yüksel, Caner Geyik, Çağlar Özdemir, Dilek Odacı, Suna Timur, *Saccharomyces cerevisiae* Ortam Bileşenlerinin Multianalit Tayinine Yönelik Akışa Enjeksiyonlu Biyoanaliz Sistemlerinin Tasarımı ve Uygulaması, 24. Ulusal kimya Kongresi, Sözlü Sunum.

-Merve Yüksel, Murat Karadağ, Dilek Odacı, Suna Timur, *Lactobacillus* Kültürlerinin kulanıldığı Fermente Gıda Örneklerinde Laktat Analizine Yönelik Laktat Oksidaz/Laktat Dehidrogenaz Temelli Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu. 24. Ulusal kimya Kongresi, Sözlü Sunum.

Bilimsel Makaleler,

-Merve Yuksel, Mehriban Akın, Caner Geyik, Dilek Odaci, Arne Bluma, Tim Höpfner, Sascha Beutel, Thomas Scheper, Suna Timur, Alcohol Biosensing by Polyamidoamine(PAMAM)/ Cysteamine/ Alcohol Oxidase Modified Gold Electrode, *Biotechnological Progress*, 2010, 26(3): 896-906.

- Merve Yuksel, Mehriban Akın, Caner Geyik, Dilek Odaci Demirkol, Çağlar Özdemir, Arne Bluma, Tim Höpfner, Sascha Beutel, Suna Timur, Thomas Scheper, Offline Glucose Biomonitoring in Yeast Culture by Polyamidoamine/Cysteamine-Modified Gold electrodes, 2011, 27(2): 530-538.

-Fulya Ekiz, Merve Yüksel, Abidin Balan, Suna Timur, Levent Toppare, Electrochemical Polymerization of (2-dodecyl-4, 7-di (thiophen-2-yl)-2H-benzo[d][1,2,3] triazole): a NovelMatrix for Biomolecule Immobilization, *Macromolecular Bioscience*, 2010, 10(12): 1557–1565.

Görev Alınan Projeler:

-Architectures Based On Fluorescence Labeled And Complex Structured Polymers Targeted To Cancer Cells As A New Platform For Cancer Diagnosis And `Cell Culture On A Chip Applications, 109T573, TÜBİTAK proje bursiyeri, 2010-2011.

Alınan burslar:

-Ahmet Pıştına Eğitim Vakfı bursu (2008-2009)
-109T573 (Türkiye-Almanya), TÜBİTAK proje bursiyeri (2010-2011)

Stajlar:

-Miray Kozmetik - 2008 Yaz Dönemi – ARGE/Mikrobiyoloji laboratuvarı (1ay).
-Yeditepe Üniversitesi - 2008 Yaz Dönemi – Genetik ve Biyomühendislik Departmanı, Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı (1ay).

Lisans Tezi:

Pamam (Poliamidoamin) ile Modifiye Edilmiş Alkol Oksidaz Enzimini Temel Alan Biyosensörlerin Optimizasyonu, Karakterizasyonu ve Fermentasyon Ortamları Uygulamaları, Ege Üniversitesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Sunuş Tarihi: 29.05.2009, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna Timur